

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Timo Maier
aus Öhringen

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Mai 2013

**Zelluläre Aktinstrukturen:
Mikrorheologische Charakterisierung von
Aktinnetzwerken auf Säulensubstraten und Aufbau
eines freitragenden Aktin-Membran Komplexes**

Gutachter

Prof. Dr. Joachim P. Spatz

Physikalisch-Chemisches Institut, Universität
Heidelberg

Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme,
Stuttgart

Prof. Dr. Ulrich Schwarz

Institut für Theoretische Physik, Universität
Heidelberg

Veröffentlichungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit

- MAIER, T.; BOEHM, H.; HARASZTI, T.: Spline-like interpolation in particle tracking microrheology. In *Phys Rev E* 86 (2012), Nr. 1, 011501 - 1-7
- MAIER, T.; HARASZTI, T.: Python algorithms in particle tracking microrheology. In *Chemistry Central journal* 6 (2012), Nr. 1, 144 - 1-9
- WEISSE, S.; HEYDT, M.; MAIER, T.; SCHULZ, S.; SPATZ, J. P.; GRUNZE, M.; HARASZTI, T.; ROSENHAHN, A.: Flow conditions in the vicinity of microstructured interfaces studied by holography and implications for the assembly of artificial actin networks. In *PCCP* 13 (2011), Nr. 19, 13395-13402
- WEISSE, S.; HEDDERGOTT, N.; HEYDT, M.; PFLÄSTERER, D.; MAIER, T.; HARASZTI, T.; GRUNZE, M.; ENGSTLER, M.; ROSENHAHN, A.: A quantitative 3D motility analysis of *Trypanosoma brucei* by use of digital in-line holographic microscopy. In *PLoS one* 7 (2012), Nr. 5, S. e372961 - 1-13
- HARASZTI, T.; SCHULZ, S.; UHRIG, K.; KURRE, R.; ROOS, W.; SCHMITZ, C. H. J.; CURTIS, J. E.; MAIER, T.; CLEMEN, A. E.-M.; SPATZ, J. P.: Biomimetic Models Of The Actin Cortex. In *Biophysical Reviews and Letters* 4 (2009), Nr. 1 & 2, 17-32

Kurzbeschreibung

Seit Jahrzehnten stellt filamentöses Aktin aufgrund seiner bedeutenden Rolle in Hinblick auf Zellmobilität, -integrität und Kraftgenerierung einen wichtigen Gegenstand zellulärer Untersuchungen dar. Als Resultat seiner semiflexiblen Natur zeigen Aktinnetzwerke sowohl viskoses als auch elastisches Verhalten. *In vitro* Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften von Aktin sind aber zumeist auf 3-dimensionale Gele oder Einzelmolekülexperimente beschränkt, obwohl es sich bei den bedeutendsten zellulären Aktinstrukturen um 1-dimensionale Bündel, die sogenannten Stressfasern, und um ein 2-dimensionales Netzwerk, den Aktinkortex, handelt. Aus diesem Grund war es Ziel der Arbeit, neuartige Aktin und Aktin-Membran Strukturen innerhalb mikrofluidischer Umgebungen zu erzeugen und ihre viskoelastischen Eigenschaften mittels passiver Einzelpartikel-Mikrorheologie zu untersuchen.

Im Vergleich mit 3- und 2-dimensionalen Netzwerken zeigte sich, dass gerichtete Strukturen ein zwischen transversaler und longitudinaler Richtung divergierendes viskoelastisches Verhalten aufweisen, welches sich bei Bündelung mittels Mg^{2+} Ionen angleicht. Zeitabhängige Untersuchungen des Bündelungsprozesses im Konzentrationsbereich von 5 - 12 mM deuten darauf hin, dass die Bündelung auch bei geringeren Mg^{2+} Konzentrationen auftritt als bislang aus 3-dimensionalen Gelen bekannt ist. Außerdem zeigen sie eine Langzeitstabilität, selbst nach Mg^{2+} Entfernung aus der Lösung. Darüber hinaus wurde als Modellsystem ein freistehender Aktin-Membran Komplex auf funktionalisierten Lochstrukturen entwickelt, ähnlich dem Aktin-Membran Kortex in Zellen. Mit multiplen Vorteilen gegenüber existierenden Modellsystemen ausgestattet ermöglicht es zukünftige Studien der physikalisch-chemischen Eigenschaften von plasmalemmaverknüpften Aktinnetzwerken.

Abstract

During the recent decades, filamentous actin has been a target of cellular investigations due to its major role in cell motility, cell shape and force generation. As a result of its semiflexible nature, actin networks show both viscous and elastic behaviour. However, studying the mechanical properties of actin *in vitro* is typically limited to complex 3-dimensional gels or single molecules, while within cells actin's major forms are 1-dimensional bundles, the so called stress fibres, and a 2-dimensional network, the so called actin cortex. Thus, this work aims to create novel actin and actin-membrane structures within a microfluidic environment and probe their viscoelastic properties by using particle tracking microrheology, which is based on the thermal motion of single microparticles attached to the filaments.

By comparing 3- and 2-dimensional networks with directed actin filaments it was found that linear structures possess a divergent viscoelastic behaviour between the transversal and longitudinal directions, which merges during bundling with Mg^{2+} ions. Time dependent investigations of the bundling process at Mg^{2+} concentrations in the 5 - 12 mM range indicated that crosslinking may take place at lower concentrations than previously found in 3-dimensional gels and revealed a long term stability of the bundles even after removing Mg^{2+} from the solution. Furthermore a model system similar to the actin-membrane cortex of cells, a free-standing actin-membrane complex on functionalized holey grids, was developed. This system has several advantages over existing model systems and facilitates future studies of the physical-chemical properties of plasmalemma attached actin networks.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	xi
I Grundlagen	1
1 Einleitung und Motivation	3
2 Zellmembran und zelluläres Skelett	7
2.1 Das Zellskelett	7
2.2 Aktin	9
2.2.1 Struktur und Funktion	9
2.2.2 Biochemie des Aktins	10
2.2.3 Regulation durch Proteine	12
2.3 Die Zellmembran	14
2.3.1 Lipide & Lipidmembranen	14
2.3.2 Das Flüssig-Mosaik-Modell	17
2.4 Interaktionen zwischen Zellskelett & Zellmembran	19
2.5 Modellsysteme	20
2.5.1 Aktinstrukturen	20
2.5.2 Vesikel & Membranstrukturen	21
2.5.3 Aktin-Membran Kombisysteme	23
3 Polymertheorie und Mikrorheologie	25
3.1 Semiflexible Polymere und viskoelastische Körper	25
3.1.1 Persistenzlänge	25
3.1.2 Mechanische Parameter linearer Polymere	27
3.1.3 Spannung und Deformation in Netzwerken	30
3.1.4 Maxwell- und Kelvin-Voigt-Modell	33
3.1.5 Der komplexe viskoelastische Schermodul G^*	35
3.2 Mikrorheologie	36

3.2.1	Rheologie und Prinzip der Mikrorheologie	37
3.2.2	Probenpartikel und Einzelfilamente in semiflexiblen Polymernetzwerken .	39
3.2.3	Theoretische Betrachtung der passiven Mikrorheologie	43
3.3	Qualitativer Vergleich der Analysemethoden	45
3.3.1	Mason	45
3.3.2	Evans	46
3.3.3	Splinelike Interpolation	47
3.4	Bündelung und Vernetzung geladener Polymerfilamente durch Gegenioneninteraktion	49
 II Materialien und Methoden		 51
4	Aufbau	53
4.1	Optische Pinzette	57
4.1.1	Aufbau und Funktionsweise	57
4.1.2	Kalibrationstheorie	59
4.1.3	Kalibrationsresultate	61
4.2	Reflexions-Interferenz-Kontrastmikroskopie	64
4.2.1	Funktionsprinzip	65
4.2.2	Einrichtung & Kalibration	65
5	Mikrofluidik	71
5.1	Photolithographie und Flusszellenbau	71
5.1.1	Herstellung der Negativmasken	71
5.1.2	PDMS-Abguss und Montage	74
5.2	Proteinaufbereitung	75
5.2.1	Aufbereitung und Lagerung von globulärem Aktin	75
5.2.2	Polymerisation von filamentösem Aktin	76
5.2.3	Aufbereitung von NEM-HMM	77
5.3	Erzeugung unilamellarer Vesikel	78
5.3.1	Elektroformation von Riesenvesikeln	79
5.3.2	Verwendete Puffer und Lipide	82
5.4	Mikrofluidische Systeme I – Aktinnetzwerke auf Säulensubstraten	84
5.4.1	Flusszellendesign und Netzwerkimplementation	84
5.4.2	Methodik der mikrorheologische Messungen	86
5.4.3	Vergleichsmessungen an 3-dimensionalen Netzwerken & Lösungen	88
5.5	Mikrofluidische Systeme II – Aktin-Membran Komplex auf Lochstrukturen	89
5.5.1	Flusszellendesign	89
5.5.2	Beschichtung und Funktionalisierung von TEM-Netzen und Glassubstraten	89
5.6	Mikroskopie und Datenanalyse	93
 III Experimente und Resultate		 95
6	Quasi 2-dimensionale Aktin-Kortexstrukturen und Referenzexperimente	97

6.1	In-situ Polymerisation von Aktinnetzwerken	97
6.2	Vergleichsmessungen an 3-dimensionalen Gelen	100
6.2.1	Saccharose- & Xanthan-Lösungen	100
6.2.2	Aktin Gele	102
6.2.3	Organisation sternförmiger Aktinstrukturen	107
6.3	Verhalten lokalisierter, 2-dimensionaler Aktinnetzwerke	108
7	Stressfaserähnliche Aktinstrukturen	113
7.1	Eigenschaften von lokalisierten Aktinfilamenten und -bündeln	113
7.2	Richtungsabhängigkeit des viskoelastischen Verhaltens – Vergleich mit 2- und 3-D Strukturen	115
7.2.1	Bewegungsverhalten von Probenpartikeln in unterschiedlich dimensionalen Netzwerken	115
7.2.2	Wechselwirkungspotential und Rückstellkraft	118
7.2.3	Richtungsabhängiges viskoelastisches Verhalten	120
7.3	Zeitabhängiges Bündelungsverhalten	125
7.3.1	Bündelung bei niedrigen Ionenkonzentrationen	125
7.3.2	Langzeitverhalten bei Entzug der Mg^{2+} -Bündelungsreagenz	128
8	Aktin-Membran-Komplex	131
8.1	Aktin-Netzwerk Erzeugung auf Lochstrukturen	132
8.2	Ausbreitung von Vesikeln auf beschichteten und funktionalisierten Glassubstraten	134
8.3	Membranerzeugung auf Lochstrukturen	138
8.4	Kombination von Aktin & Membran	143
8.4.1	Abscheidung von Membranen auf freitragenden Aktinnetzwerken	143
8.4.2	Abscheidung von Aktin auf freitragenden Membranen	145
9	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	151
	Literaturverzeichnis	157
A	Softwareanwendungen	177
A.1	Kamera- und Bühnensteuerungsprogramme	177
A.2	Auswerteroutinen	179

Abbildungsverzeichnis

1.1	Fluoreszenzmarkierte REF-Zellen und schematische Darstellung zellulärer Aktinstrukturen.	3
2.1	Struktur der filamentösen Elemente des zellulären Skeletts im relativen Größenvergleich.	8
2.2	Proteinmodell von G- und F-Aktin.	10
2.3	Phasen der Aktinpolymerisation.	11
2.4	Aufbau und selbstorganisierende Strukturen von Phospholipiden am Beispiel von Phosphatidylcholin.	15
2.5	Dynamik von Lipidmolekülen innerhalb einer Doppelschicht.	17
2.6	Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran.	18
2.7	Modellsysteme zellulärer Lipidmembranen.	22
3.1	Definition der Persistenzlänge anhand des <i>Wormlike-Chain-Modells</i>	26
3.2	Klassifikation eines thermisch angeregten Polymers anhand von Kontur- und Persistenzlänge.	27
3.3	Deformationsformen eines idealen Polymers unter Angabe der wichtigsten Kenngrößen.	29
3.4	Dehnung und Scherung eines teilverbundenen Filamentnetzwerkes.	32
3.5	Mechanische Modelle zur Beschreibung viskoelastischer Materialien und Deformationskurven der Elemente.	34
3.6	Auswahl und Anwendungsbereich makro- und mikrorheologischer Techniken.	37
3.7	Veranschaulichung der longitudinalen und transversalen Filamentbewegungen in einem vernetzten Netzwerk und deren Auswirkungen auf das mittlere Verschiebungsquadrat von Probenpartikeln.	40
3.8	Schematische Darstellung der Dateninterpolation nach Evans und Resultat der <i>splinelike interpolation</i>	47
3.9	Vergleich zwischen der Auswerterroutine nach Mason und der <i>splinelike interpolation</i> basierend auf der numerischen Konvertierung nach Evans.	48
4.1	Skizze des OP/RIKM Aufbaus.	54
4.2	OP/RIKM Aufbau.	55
4.3	Strahlenoptische Erläuterung der Gradientenkraft.	58
4.4	Messdaten zur Bestimmung der Fallenstärke mittels Brown- und Stokes-Methode bei verschiedenen Polarisatorstellungen.	62
4.5	Ermittelte Federkonstanten k nach Brown & Stokes im Vergleich.	63

4.6	Symmetriebestimmung der optischen Pinzette.	64
4.7	Schematische Darstellung des RIKM-Funktionsprinzips.	66
4.8	RIKM Strahlenverlauf unter Verwendung des Antiflex-Objektives.	67
4.9	Vergleich einer Polystyrolkugel im Auflicht- und im RIKM-Modus des Aufbaus.	68
4.10	Auf Collagen beschichteter Glasoberfläche fixierte PatuT-Zelle im RIKM- und im Fluoreszenz-Modus des Aufbaus.	68
4.11	Vesikeladhäsion und -ausbreitung aufgenommen im RIKM-, Hellfeld- und Fluoreszenzmodus des Aufbaus.	69
5.1	Schematische Darstellung der Photo- und Softlithographieschritte anhand von PDMS-Säulenfeldern.	73
5.2	Fluoreszenzaufnahme von auf Glas adhärennten Aktinfilamenten zur Qualitätskontrolle im Anschluss an den Polymerisationsvorgang.	77
5.3	Schematische Darstellung der Elektroquellung von GUVs auf ITO-Glas.	80
5.4	Darstellung der Vesikelquellkammer zur Herstellung von GUVs.	81
5.5	Strukturformeln der verwendeten Lipide.	83
5.6	Bild und schematische Darstellung einer Säulenfeld-Flusszelle.	85
5.7	Visualisierung des Messprinzips am Beispiel stressfaserähnlicher Strukturen.	87
5.8	Bild und schematische Darstellung einer TEM-Gitter-Flusszelle.	90
5.9	Titanbeschichtete Au-TEM-Gitter.	91
5.10	Verwendete Aminosilane und Prozess der Oberflächenaktivierung am Beispiel von APTES.	92
6.1	Netzwerkgeometrien der durch prä- und in situ polymerisierter Filamente erzeugten Strukturen.	98
6.2	Konvokaler Querschnitt des Aktinnetzwerkes auf PDMS-Säulensubstraten erzeugt durch <i>in situ</i> Polymerisation.	99
6.3	Profil der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit, FWHM und z-Geschwindigkeitskomponente in Flusskanälen mit Säulenstrukturen.	99
6.4	Mittlere quadratische Verschiebung von Probenpartikeln in Saccharose- und Xanthanlösungen.	101
6.5	Viskoelastische Moduln und dynamische Viskositäten von Saccharose- und Xanthanlösungen.	102
6.6	Konfokale Fluoreszenzaufnahme von carboxylierten und Streptavidin-Probenpartikeln in 3-dimensionalen Aktinfilamenten.	103
6.7	Mittlere quadratische Verschiebung von Probenpartikeln in unvernetzten und vernetzten Aktinfilamenten.	104
6.8	Abhängigkeit der viskoelastischen Moduln von Probendurchmesser und -funktionalisierung.	106
6.9	Konfokale Fluoreszenzaufnahme von streptavidinbeschichteten Probenpartikeln in Aktinfilamenten.	107
6.10	Fluoreszenzaufnahme eines <i>in situ</i> polymerisierten Netzwerkes mit Streptavidinbeschichtetem Probenpartikel.	109
6.11	Kurvenverläufe der MQV und viskoelastischen Moduln quasi 2-dimensionaler Netzwerke auf PDMS-Säulen.	110

7.1	Fluoreszenzaufnahme gerichteter Aktinfilamente, vor und nach Bündelung mit 50 mM Mg^{2+} .	114
7.2	Kurvenverläufe der MQV und viskoelastischen Moduln linearer Filamentstrukturen auf PDMS-Säulen.	115
7.3	Wahrscheinlichkeitsdichte entlang der kurzen und langen Halbachsen für 3-dimensionale Aktinglele und 2-dimensionale Netzwerke.	116
7.4	Positionsverteilung eines an lineare Filamentstrukturen angebrachten Probenpartikels und Wahrscheinlichkeitsdichte in longitudinaler und transversaler Filamentrichtung.	117
7.5	Effektive longitudinale und transversale Wechselwirkungspotentiale vor und nach Zugabe von 50 mM Mg-Lösung.	118
7.6	Rückstellkraft in transversaler Richtung vor und nach Zugabe von 50 mM Mg-Lösung.	119
7.7	Richtungsabhängiges Verhalten der viskoelastischen Moduln für 3-dimensionale Aktinglele.	121
7.8	Richtungsabhängiges Verhalten der viskoelastischen Moduln für 2-dimensionale Aktinnetzwerke.	122
7.9	Richtungsabhängiges Verhalten der viskoelastischen Moduln für lineare Aktinstrukturen.	123
7.10	Verlauf des frequenzabhängigen Verlustwinkels in longitudinaler und transversaler Richtung vor und nach Bündelung durch 50 mM Mg^{2+} .	124
7.11	Zeitliche Entwicklung des mittleren MQV Plateauwertes unter Mg^{2+} induzierter Bündelung.	126
7.12	Normalisierte MQV Plateauwerte im zeitlichen Verlauf unter Mg^{2+} induzierter Bündelung.	127
7.13	Mittlere quadratische Verschiebung und viskoelastische Moduln, vor und nach Mg-Zugabe, sowie nach 3-stündiger Spülung mit magnesiumentziehendem EDTA-Puffer.	129
7.14	Plateauwerte der MQV vor und nach Mg-Zugabe, sowie nach 3-stündiger Spülung mit magnesiumentziehendem EDTA-Puffer.	130
8.1	Magnesiumvernetzte Aktinnetzwerke auf unterschiedlich funktionalisierten und beschichteten Gittern.	132
8.2	Aktinnetzwerk auf AUT funktionalisiertem 19,5 μm Au-Gitter.	133
8.3	Projektion und Querschnitt eines kompakten Aktinnetzwerkes auf mit Streptavidin funktionalisiertem Au-Gitter.	134
8.4	Ausbreitungsverhalten von GUVs auf thioliertem Gold und silanisierendem Glas.	135
8.5	Ausbreitung negativ geladener Vesikel auf DETA.	137
8.6	Vesikel und Vesikelausbreitung auf APTES/DETA silanisierendem SiN-Gitter.	139
8.7	Vergleich zwischen Adhärentem und ausgebreitetem Vesikel auf DETA-funktionalisiertem Ti-Gitter.	140
8.8	Einzelaufnahme von Membranen auf AUT funktionalisiertem Au-Gitter und auf DETA funktionalisiertem SiN-Gitter.	141
8.9	Membranen auf DETA funktionalisiertem Ti-Gitter.	142
8.10	Geplatze Vesikel über Aktin auf 10,5 μm DETA funktionalisiertem SiN-Gitter.	143
8.11	Fluoreszenzaufnahme eines ausgebreiteten Vesikels über Aktin auf 10,5 μm APTES funktionalisiertem SiN-Gitter.	144

8.12	Aktinnetzwerk über ausgebreiteten Vesikeln auf 10,5 μm APTES/DETA funktionalisiertem SiN-Gitter.	145
8.13	Aktinnetzwerk über ausgebreiteten Vesikeln auf 6,5 μm APTES/DETA funktionalisiertem SiN-Gitter.	146
8.14	Fluoreszenzaufnahme & Querschnitt eines kompakten Aktinnetzwerkes über ausgebreiteten Vesikeln auf 6,5 μm APTES/DETA funktionalisiertem SiN-Gitter. . .	147
8.15	Illustration der Schritte zur Erzeugung eines freitragenden Aktin-Membran Komplexes.	149
A.1	Grafische Benutzeroberfläche zur Kamera- und Tischsteuerung.	177
A.2	Grafische Benutzeroberfläche zur Piezobühnensteuerung.	178

Tabellenverzeichnis

4.1	Auflistung der optischen Bauelemente sowie ihrer Eigenschaften.	56
4.2	Viskosität von Wasser in Abhängigkeit der Temperatur.	61
5.1	Prozessverlauf zur photolithographischen Herstellung der PDMS-Negativmasken.	72
5.2	Zusammensetzung des G-Puffers zur Aufreinigung und Lagerung von globulärem Aktin.	76
5.3	Zusammensetzung des F-Puffers zur Polymerisation von filamentösem Aktin.	76
5.4	Zusammensetzung des Verdünnungspuffers zum Aufbau von Aktinnetzwerken.	77
5.5	Membrankonstituenten (M: Molekulargewicht, c: Konzentration).	82
5.6	Zusammensetzung des Q-Puffers zur Herstellung von GUVs via Elektroquellung.	84
5.7	Zusammensetzung des E-Puffers zur Verdünnung der Vesikellösung.	84
5.8	Schrittweises Vorgehen zur Implementation der Aktinfilamente in die Flußzelle.	86
5.9	Zusammensetzung des EDTA-Puffers zum Abfangen von Magnesiumionen.	88
7.1	Übersicht über die Kreuzungsfrequenzwerte ω_K der in den Abbildungen 7.7 bis 7.9 dargestellten Kurven.	120
8.1	Tabellarische Übersicht über die Resultate der Untersuchungen zum Aufbau eines freitragenden Aktin-Membran Komplexes.	148

Abkürzungsverzeichnis

ABP	<u>A</u> ktin <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskopie, engl.: <i>atomic force microscopy</i>
APTES	(3- <u>A</u> minopropyl)triethoxysilan
ATP	<u>A</u> denosintri <u>p</u> hosphat
AUT	11- <u>A</u> mino-1- <u>u</u> ndecan <u>t</u> hiol
BioCAP	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotinyl)
CCD	engl.: <i>charge coupled device</i>
CMOS	engl.: <i>complementary metal oxide semiconductor</i>
DAPI	engl.: <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DETA	N1-(3-Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamin
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, engl.: <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EPA	L- α -phosphatidylsäure, engl.: <i>egg-PA</i>
EPC	L- α -phosphatidylcholin, engl.: <i>egg-PC</i>
F-Aktin	<u>f</u> ilamentöses Aktin
FRAP	engl.: <i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
G-Aktin	<u>g</u> lobuläres Aktin
GFP	<u>g</u> rün <u>f</u> luoreszierendes <u>P</u> rotein
GUV	riesige unilamellare Vesikel, engl.: <i>giant unilamellar vesicle</i>
HMM	engl.: <i>heavy meromyosin</i>
ITO	Indiumzinnoxid, engl.: <i>indium tin oxide</i>
LASER	engl.: <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	Licht emittierende Diode, engl.: <i>light emitting diode</i>
LUV	große unilamellare Vesikel, engl.: <i>large unilamellar vesicle</i>
LMM	engl.: <i>light meromyosin</i>
LSM	Laserrastermikroskop, engl.: <i>laser scanning microscope</i>
MLV	multilamellare Vesikel, engl.: <i>multilamellar vesicle</i>
MQV	<u>m</u> ittlere <u>q</u> adratische <u>V</u> erschiebung
MVV	multivesikuläre Vesikel, engl.: <i>multivesicular vesicle</i>
NEM-HMM ..	<u>N</u> -ethylmalenimid modifiziertes <u>HMM</u>
OP	<u>O</u> ptische <u>P</u> inzette, engl.: <i>optical tweezer</i>
PDMS	<u>P</u> oly <u>d</u> imethylsiloxan
PEG	<u>P</u> olyethylenglykol

PEG-CF	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[poly(ethylene glycol)2000-N'-carboxyfluorescein]
PFTCS	1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorosilan
PLL	Poly-L-Lysin
PTFE	Polytetrafluorethylen
REF	engl.: <i>rat embryonic fibroblasts</i>
RIKM	Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie
RT	Raumtemperatur
SiN	Siliziumnitrid (Si_3N_4)
SUV	kleine unilamellare Vesikel, engl.: <i>small unilamellar vesicle</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIRFM	Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie, engl.: <i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	engl.: <i>Tetramethylrhodamine-B-Isothiocyanate</i>
YFP	engl.: <i>yellow fluorescent protein</i>

Zum Werke, das wir ernst bereiten,
Geziemt sich wohl ein ernstes Wort;
 Wenn gute Reden sie begleiten,
 Dann fließt die Arbeit munter fort.
So laßt uns jetzt mit Fleiß betrachten,
Was durch schwache Kraft entspringt;
Den schlechten Mann muß man verachten,
 Der nie bedacht, was er vollbringt.
Das ist's ja, was den Menschen zieret,
 Und dazu ward ihm der Verstand,
 Daß er im Herzen spüret,
Was er erschaffen mit seiner Hand.

Friedrich von Schiller, *Das Lied von der Glocke*

Das Leben findet immer einen Weg.

Michael Crichton, *Jurassic Park*

Teil I
Grundlagen

KAPITEL 1

Einleitung und Motivation

Die Zelle, Grundeinheit aller lebenden Organismen von *E. coli* bis *B. musculus*, zeigt in Hinblick auf die physikalischen und chemischen Bedingungen ihrer Umwelt außergewöhnlich adaptives Verhalten. Den Signalen rezeptorischer Proteine unterliegend stellen dabei die aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaute Zellmembran sowie das filamentöse Skelett der Zelle eine zentrale Rolle dar [93]. Mitbestimmend für die einzigartigen, je nach Zelltyp oder -zustand variierenden, viskoelastischen Eigenschaften der Zelle bietet ihre physikalische Untersuchung die Chance neuer Erkenntnisse, unter anderem auch in Hinblick auf Tumormigration oder vaskuläre Beanspruchung [203, 228].

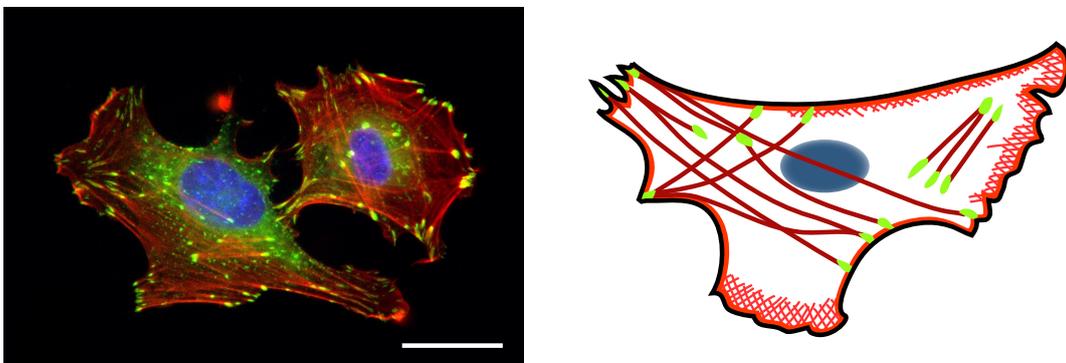


Abbildung 1.1: Fluoreszenzmarkierte REF-Zellen (links) und schematische Darstellung zellulärer Aktinstrukturen (rechts). Im Fluoreszenzbild sind Zellkern respektive DNA (DAPI, blau), fokale Adhäsionen respektive Paxillin (YFP, grün) und Stressfasern respektive Aktinfilamente (Phalloidin-TRITC, rot) zu erkennen. Die schematische Zelldarstellung zeigt neben dem Zellkern (blau) und fokaler Adhäsionspunkte (grün) 3 der unterschiedlichen Aktinstrukturen: Lamellipodium (rot gekreuzt), Stressfasern (dicke rote Linien) und Aktinkortex (rote Umrandung) direkt unter der Zellmembran (schwarz). Maßstab: 20 μm (Fluoreszenzbild mit freundlicher Genehmigung von Rebecca Medda).

Neben einer Vielzahl interagierender Proteine verfügt das Zellskelett mit Mikrotubuli, Intermediär- und Aktinfilamenten über diversifizierte Bestandteile, die eine bedeutsame Rolle bei der Kraft-

generation aber auch der Adhäsions- und Migrationsdynamik von Zellen einnehmen. Die Aktinkomponente selbst differenziert sich dabei in unterschiedlich dimensionale Strukturen (vgl. Abbildung 1.1), deren Nachbildung und Untersuchung im Fokus der Arbeit lagen: 3-dimensionale Netzwerke und planare Netzwerke unterhalb der Zellmembran, mit Dicken von wenigen hundert Nanometern, die einen wichtigen Beitrag zu Zellform und -integrität liefern, sowie bündelartige Strukturen mit komplexer innerer Proteinkomposition, die sogenannten Stressfasern, beteiligt an Mechanotransduktion und Migration [196]. Dabei stellen Geometrie und Aktin bindende Proteine (ABPs) einen bedeutenden Faktor für die Ausbildung der Strukturen und deren Eigenschaften dar. Erschwert wird die Einordnung von Resultaten aus *in vivo* Untersuchungen durch die Komplexität der intrazellulären Umgebung. In der Folge kam es zur Entwicklung von vereinfachten *in vitro* Systemen, welche Studien in Abhängigkeit spezifischer Parameter ermöglichen.

Ziel dieser Bottom-up Ansätze ist die Nachahmung zellulärer *in vivo* Bedingungen in kontrollierbaren Umgebungen sowie die Steigerung der Komplexität durch schrittweises Hinzufügen neuer Komponenten. In dieser Hinsicht bietet die in der Arbeitsgruppe entwickelte mikrofluidische Methode zur Erzeugung von Aktinstrukturen auf Säulensubstraten die Möglichkeit für neue experimentelle Ansätze [75]. Beschränkten sich bisherige Untersuchungen von Aktinfilamenten zumeist auf dreidimensionale Gele oder Einzelmoleküle, so können in der kontrollierten Umgebung der Flusszelle quasi 2- und 1-dimensionale Strukturen realisiert werden, ähnlich dem Aktinkortex und den Stressfasern in Zellen. Dabei stellen 3-dimensionale Gele und die auf den Säulen fixierten Strukturen mit festen Randbedingungen 2 Extremfälle der zellulären Netzwerke dar, deren Bewegungen durch die Begrenzung des freien zellulären Volumens sowie durch Verknüpfung mit membranassoziierten Proteinkomplexen (z.B. fokale Adhäsionen) stark eingeschränkt werden.

Neben dem Strukturaufbau durch ABPs unterliegt Aktin auch der elektrischen Wechselwirkung mit Ionen. Aufgrund ihres in wässriger Umgebung von Natur aus negativen Ladungsüberschusses kommt es unter *in vitro* Bedingungen bei Präsenz mono- und polyvalenter Kationen wie Mg^{2+} abhängig von Art und Konzentration zu Vernetzung und Bündelung der Filamente [202]. Bemerkenswerterweise zeigt dabei die experimentelle Bestimmung der während des Bündelungsprozesses auftretenden Kräfte eine große Diskrepanz zu der aus Studien zur Bündelkonformation erwarteten Bündelstabilität [99, 195].

Gegenstand der Arbeit war die rheologische Charakterisation der magnesiuminduzierten Vernetzung von - auf ihre geometrischen Parameter reduzierten - Aktinstrukturen mittels Einzelpartikel-mikrorheologie. Mit geringsten Probenvolumina und ohne Anwendung externer Kräfte stellt sie eine in zellbiologischen Aspekten besonders ergiebige Technik zur Bestimmung der rheologischen Eigenschaften von organischen Komponenten dar. Sie verknüpft dabei die Bewegungen von eingebetteten, klar detektierbaren Probenpartikeln mit der thermischen Anregung der umgebenden Filamente und ermöglicht so Rückschlüsse auf deren viskoelastische Materialparameter.

In Hinsicht auf das Verhalten zellulärer Aktinnetzwerke wurden zwei zentrale Fragen an die *in vitro* erzeugten Strukturen adressiert:

- Viskoelastisches Verhalten von verankerten Netzwerken: Bestehen viskoelastische Unterschiede zwischen den verschiedenen dimensional Systemen? Welchen Einfluss hat dabei die Verankerung auf den Säulensubstraten, insbesondere in Hinsicht auf Stressfasern?
- Filamentbündelung durch Ionen: Lassen sich durch viskoelastische Untersuchungen Zeit- und Konzentrationsabhängigkeiten des Bündelungsprozesses quantifizieren? Über welche Langzeitstabilität verfügen die Netzwerkstrukturen?

Zur Klärung dieser Fragen war die Weiterentwicklung existierender mikrofluidischer Modellsysteme nötig. In diesem Zusammenhang war es auch Bestreben ein Modell des zellulären Aktin-Membran Komplexes zu erzeugen. Existierende Modellsysteme wie Aktinvesikel oder unterstützte Membranen weisen teilweise große Beschränkungen in ihrer Zugänglichkeit, der Anwendbarkeit von Untersuchungstechniken oder der Kontrolle über chemische Vorgänge, auf. Die Kombination von künstlichen Membranen und Aktinnetzwerken in einem freitragenden System verspricht daher einen bedeutenden Beitrag zur besseren Untersuchung und Verständnisses der komplexen Membran-Filament-Interaktionen liefern zu können.

KAPITEL 2

Zellmembran und zelluläres Skelett

2.1 Das Zellskelett

Das Zellskelett ist ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher filamentöser Proteine. Wie bei vielen biologisch relevanten Makromolekülen, wie beispielsweise der DNS oder der Cellulose, handelt es sich auch hier um Polymere – lange Ketten ähnlicher, sich wiederholender Bausteine – die einen schnellen Auf- und Abbau der Filamente ermöglichen. Ging man früher davon aus, dass es ein Charakteristikum von Eukaryoten – sowohl der Fauna als auch der Flora – sei [94], so haben neuere Untersuchungen Analoge zu allen Hauptbestandteilen auch in Prokaryoten nachweisen können [185]. Wie das Knochenskelett höher entwickelter Spezies besitzt es für die einzelnen Zellen stützende und formgebende Funktion, ermöglicht durch seinen flexiblen Aufbau und seiner Verbindung mit der Zellmembran aber auch die aktive Migration und ist beteiligt an Zelldifferenzierung und Zellteilung. Darüber hinaus dient es dem gerichteten intrazellulären Transport von Stoffen mittels Motorproteinen sowie der Rezeption und Weiterleitung von Signalen.

Die unterschiedlichen Funktionen beruhen in Eukaryoten auf dem Verhalten dreier Klassen von Filamenten, deren Struktur Abbildung 2.1 entnommen werden kann. Mikrotubuli stellen mit einem Durchmesser von circa 25 nm die größten Filamente dar. Sie bestehen aus Heterodimeren von α - und β -Tubulin, kugelförmigen, etwa 55 kDa schweren, GTP-bindenden Proteinen. Diese Dimere formen lineare Protofilamente, von denen sich 10-16 um einen hohlen Kern zu Mikrotubuli zusammenlagern und deren Länge in der Regel bei einigen Mikrometern liegt. Sie zeichnen sich aufgrund ihrer zylinderartigen Struktur gegenüber den anderen Filamenten insbesondere durch ihre hohe Steifigkeit aus, welche in einer ungewöhnlich großen Persistenzlänge von mehreren Millimetern resultiert (vgl. Abschnitt 3.1.1) [55, 64]. Mikrotubuli breiten sich gewöhnlicherweise sternförmig von Regionen in der Nähe des Nukleus, den Zentrosomen, über die Zelle aus. Als zentrales Element des Spindelapparates sind sie dabei direkt an der Trennung der Chromosomen während der Mitose beteiligt. Sowohl Mikrotubuli als auch spezielle kreisförmige Anordnungen von Tubulin-Dimeren finden sich aber auch in den Zilien und Flagellen von Pro- & Eukaryo-

ten, wo sie der aktiven Fortbewegung der Organismen dienen. Aufgrund der Heterogenität des Grundbausteines besitzen Mikrotubuli eine Polarität, die es molekularen Motoren auf ATP-Basis ermöglicht sie als Transportschienen zu verwenden und deren Hauptaufgabe die Beförderung von Vesikeln oder Organellen ist. Mitglieder der Kinesin Familie bewegen sich dabei im allgemeinen in Richtung des (+)-Endes des Filamentes, Dyneine in Richtung des (-)-Endes, womit sie für den Transport in Richtung Zellzentrum verantwortlich zeichnen [89].

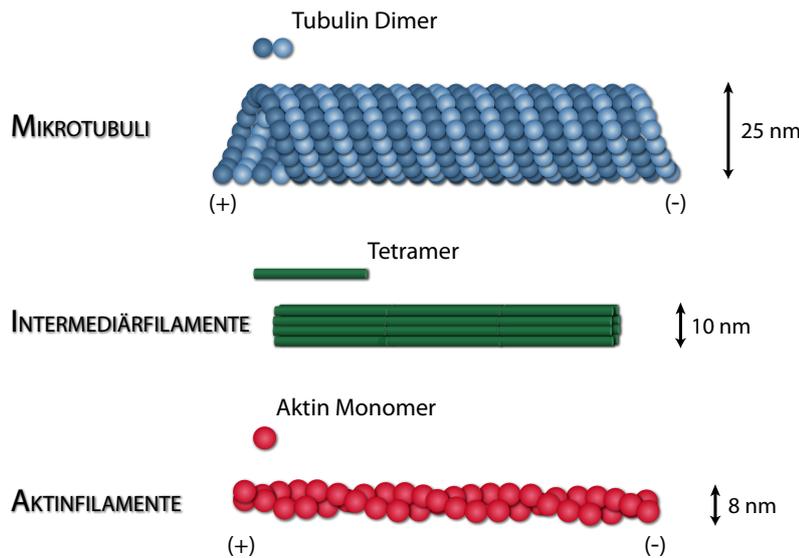


Abbildung 2.1: Struktur der filamentösen Elemente des zellulären Skeletts im relativen Größenvergleich. Mikrotubuli sind hohle Zylinder mit einem Durchmesser von 25 nm, aufgebaut aus Tubulin Dimeren mit α - und β -Untereinheit. Aktinfilamente sind doppelsträngige, helicale Polymere mit globulären Aktin Monomeren als Grundeinheit. Ihr Durchmesser beträgt circa 8 nm. Intermediärfilamente bezeichnen eine Familie seilartiger Polymere die einen Durchmesser von um die 10 nm aufweisen. Ihre strukturelle Grundeinheit bildet ein Tetramer gleicher, antiparallel angeordneter Proteine.

Anders als Mikrotubuli oder Aktin bezeichnen Intermediärfilamente eine ganze Familie strukturell gleich aufgebauter, sich stark ähnelnder Polymere. Die Grundeinheiten bilden 40-100 kDa schwere, längliche Proteine, deren Polypeptidketten im Falle von intrazellulären Strukturproteinen eine ausgedehnte zentrale Region mit α -helikaler Struktur aufweisen. Umeinander gewundene Dimere bilden durch antiparallele Anordnung versetzte Tetramere, die sich in Form von 8 Einzelsträngen zu einer ungefähr 10 nm durchmessenden, seilartigen Gesamtstruktur verbinden. Aufgrund der antiparallelen Anordnung weisen Intermediärfilamente keine strukturelle Polarisation auf und es sind keine mit ihnen assoziierten Motorproteine bekannt [89]. Eine Unterfamilie bilden dabei die Keratine, welche Hauptbestandteil von Haaren, Nägeln oder Schuppen sind. Als Bestandteil des intrazellulären Netzwerkes dienen sie aber auch der Stabilisierung gegenüber starken externen Kräften, wie sie zum Beispiel in Epithel- oder Herzmuskelzellen auftreten

[2, 215].

Obwohl Aktinfilamente, auch bekannt als Mikrofilamente, mit einem mittleren Durchmesser von lediglich 8 nm die dünnste Komponente der beschriebenen Filamente darstellen bilden sie eine Vielzahl verschiedener intrazellulärer Strukturen. Als Kernbereich der vorliegenden Arbeit wird daher im Folgenden auf ihre Struktur und Funktion besonders eingegangen.

2.2 Aktin

Aktin, ein Protein welches in allen eukaryotischen Zellen vorkommt, gehört zu den fundamentalen Molekülen des Lebens. Mit einer Variation von weniger als 5 % in der Sequenz der Aminosäuren zwischen den Spezies handelt es sich um ein hochkonserviertes Protein [103]. Zusammen mit dem Motorprotein Myosin II bilden Isoformen den Hauptbestandteil der in Muskelfasern enthaltenen Myofibrillen, stellen daneben aber auch einen zentralen Aspekt des Zellskeletts dar.

2.2.1 Struktur und Funktion

In der Zelle liegt Aktin sowohl als circa 55 Å langes Monomer als auch in filamentöser Form, als mehrere Mikrometer langer Polymerstrang, vor. Das Monomer, aufgrund seiner globulären Gestalt auch als G-Aktin bezeichnet, ist eine 42 kDa schwere Polypeptidkette aus 375 Aminosäuren, die sich in 4 Subdomänen gliedert. Je zwei der Subdomänen formen dabei eine kompakte Struktur, die von der Anderen durch eine Spalte geteilt wird, die als Bindestelle für ATP und ADP fungiert (siehe Abbildung 2.2) [89]. Aktin gehört damit als einzige der drei filamentösen Zellskelettkomponenten zu den ATPasen, einer Gruppe von Proteinen, die ATP durch Hydrolyse in ADP und Phosphat aufspalten können. Dem ATP-Nukleotid kommt eine stabilisierende Funktion zwischen den Untereinheiten zu, so dass G-Aktin in den Zellen hauptsächlich als Komplex mit Mg-ATP vorliegt. Obwohl für die Polymerisation nicht zwingend nötig kommt es dabei unter physiologischen Bedingungen zur Hydrolyse des Nukleotids, so dass F-Aktin komplexiert mit Mg-ADP dominiert. Bis zu einem pH-Wert von 5,6 weist Aktin einen negativen Ladungsüberschuss auf [183], welcher bei neutralen Bedingungen bis zu 11-fach negativ sein kann. Die Ladungsverteilung ist dabei nicht homogen über die Proteinoberfläche verteilt; vielmehr findet sich eine Konzentration der negativen Ladungen auf Subdomäne 1, nahe der Kontaktstelle vieler Aktin bindender Proteine (ABPs) [6, 93].

Als F-Aktin formt Aktin eine Struktur ähnlich einem helikalen Doppelstrang, bei dem jedes Monomer gegenüber dem Vorherigen um 166° gedreht und um 2,75 nm versetzt ist [197]. Dies führt zu einer Wiederholungslänge von 13 Monomeren respektive 36 nm in deren Folge es zu einer 6-fachen Rotation um die Achse des Stranges kommt. In seiner filamentösen Form bildet Aktin durch Vernetzung oder Bündelung mittels Proteinen und Ionen über den Zellraum hinweg unterschiedlich strukturierte Netzwerke aus, wie sie in Abschnitt 2.2.3 näher beschrieben werden. Fluoreszenzmessungen der thermalen Fluktuationen von Einzelfilamenten ergaben für

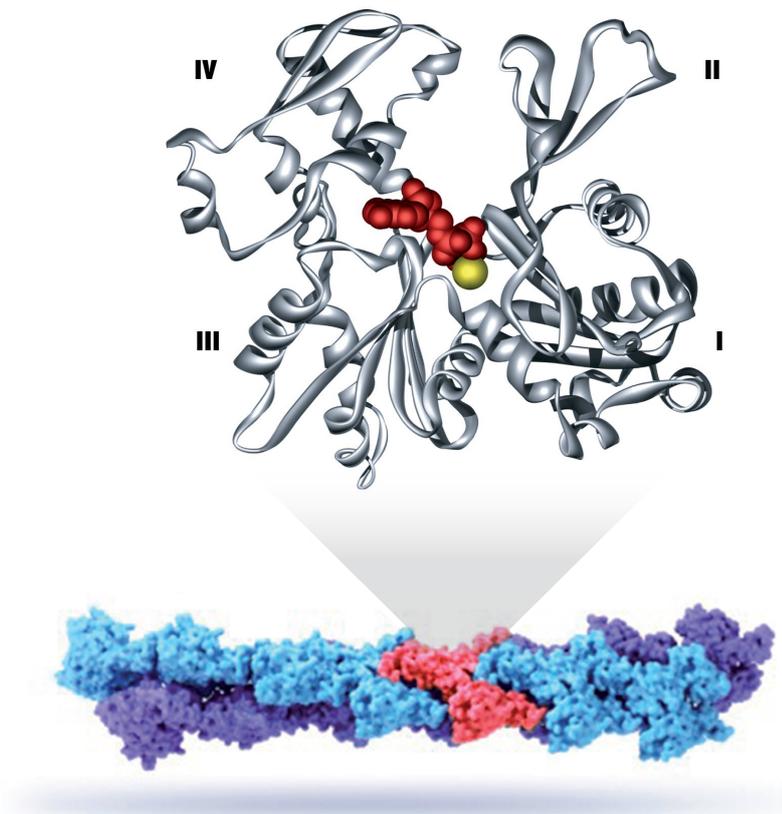


Abbildung 2.2: Proteinmodell von G- und F-Aktin. Oben: Quartärstruktur von globulärem Aktin. Zu sehen sind die 4 Subdomänen sowie die ATP-Bindungsstelle in einer Spalte zwischen den Domänen. Unten: Struktur von filamentösem Aktin. Bei einem Durchmesser von 5-9 nm besitzt F-Aktin ähnlich der DNS eine helikale Struktur, die sich alle 13 Monomere, d.h. alle 37 nm wiederholt.

die Persistenzlänge von Aktin mit circa 17 μm bei weitem geringere Werte als für Mikrotubuli [64, 153]. Aktinfilamente sind daher weitaus besser geeignet engmaschige, adaptive Netzwerke zu bilden. Wie auch bei Mikrotubuli resultiert die parallele Anordnung des monomeren Aktins in einer strukturellen Polarität und definierten Richtungen entlang der Filamente. Dies ermöglicht Mitgliedern der Myosin Familie den Transport von Zellbestandteilen entlang der Filamente, erlaubt aber darüber hinaus auch eine hochdynamische Neuordnung des Zellskeletts [89].

2.2.2 Biochemie des Aktins

Aktinfilamente in Zellen sind einem ständigen Umwandlungsprozess durch Polymerisation und Depolymerisation unterworfen. Bei physiologischen Bedingungen und ATP Anwesenheit kommt es unter ATP-Hydrolyse oberhalb einer kritischen Aktinkonzentration zu einer Polymerisation globulären Aktins zu F-Aktin wie in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt [163]. In einem ersten

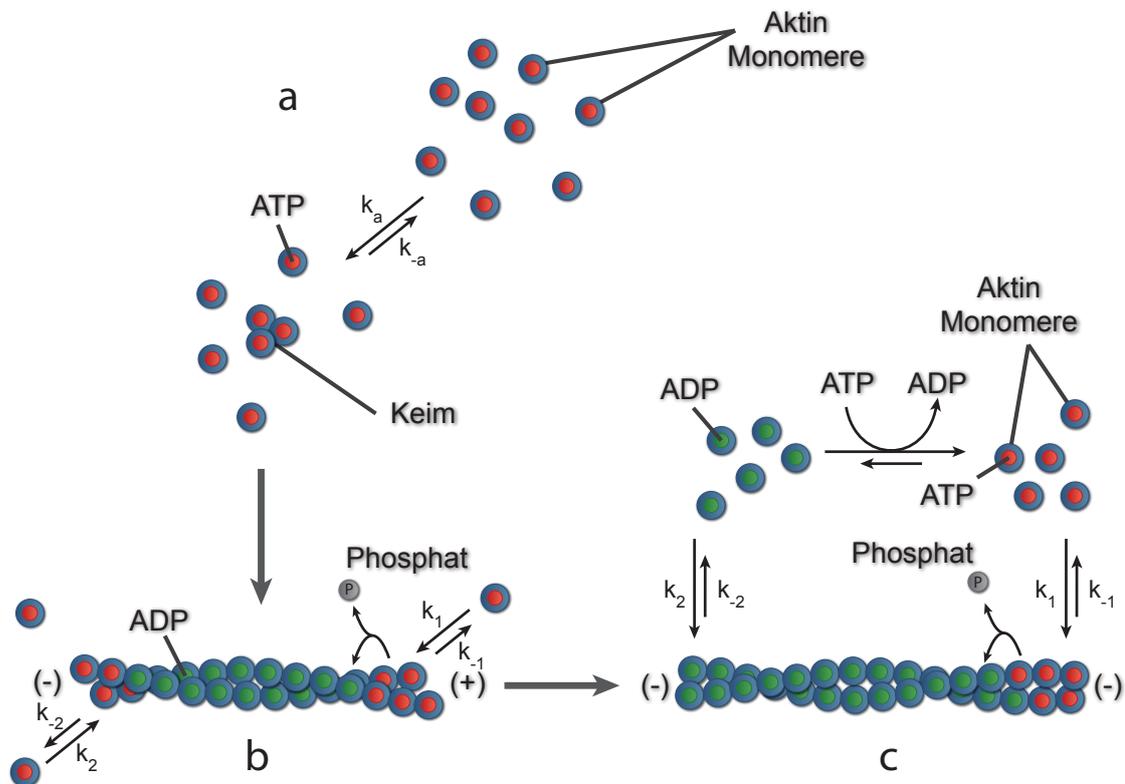


Abbildung 2.3: Phasen der Aktinpolymerisation. In der Keimbildungsphase (a) lagert sich globuläres Aktin zu Kondensationskeimen zusammen. In der folgenden Wachstumsphase (b) binden freie Monomere an beide Enden des wachsenden Filaments. Dabei wächst aufgrund der strukturellen Polarität der Monomere das (+)-Ende schneller als das (-)-Ende. Bei Erreichen der Gleichgewichtskonzentration heben sich die Reaktionsraten k der beiden Enden gegenseitig auf und die Polymerisation geht in den sogenannten Tretmühlenszyklus über (c).

Schritt, der Keimbildungsphase, lagern sich je 2-4 ATP-gesättigte Monomere zu einem Kern zusammen, welcher die Filamentbildung einleitet. Im Verhältnis zur weiteren Polymerisation führen die geringen Ratenkonstanten k_a & k_{-a} dabei zu einer Verzögerung der Polymerisation und stellen einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar [184]. Im weiteren Verlauf kommt es zur Anlagerung zusätzlicher Monomere an beiden Enden des Kondensationskeimes und zur Umwandlung gebundenen ATPs zu $ADP + P_i$ (Abbildung 2.3 (b)). Aufgrund der strukturellen Asymmetrie treten dabei an den beiden Enden des Filamentes, (+) und (-) genannt, unterschiedliche kinetische Konstanten auf, die zu variierenden Polymerisationsgeschwindigkeiten führen. So beträgt die von *Pollard* für die Anwesenheit von Mg-ATP mittels Elektronenmikroskopie ermittelte konzentrationsabhängige Ratenkonstante $k_1 = 11,6 \pm 1,2 \mu M^{-1} s^{-1}$ des positiven Endes das 7-12-fache der Konstante $k_2 = 1,3 \pm 0,2 \mu M^{-1} s^{-1}$ am negativen Ende des Filaments wohingegen die konzentrationsunabhängigen Raten der Depolymerisation $k_{-1} = 1,4 \pm 0,8 s^{-1}$ & $k_{-2} = 0,8 \pm 0,3 s^{-1}$ kaum voneinander abweichen. Die daraus kalkulierbare kritische Konzen-

tration für die Polymerisation variiert zwischen $0,12 \mu\text{M}$ für das (+)-Ende und $0,62 \mu\text{M}$ für das (-)-Ende. Dies führt dazu, dass es bei Reduktion der Monomerkonzentration zunächst zu einer Depolymerisation des Filamentes am negativen Ende kommt, während der F-Aktin Strang am positiven Ende weiterhin verlängert wird. Bei weiterer Konzentrationsabsenkung erreicht das System schließlich einen Zustand, bei dem kein Netto-Wachstum mehr auftritt, einem Zustand der als Tretmühlenszyklus bezeichnet wird. Polymerisation und Depolymerisation befinden sich im dynamischen Gleichgewicht und es kommt *in vitro* wie auch *in vivo* zur Anlagerung und Abspaltung von ADP einschließendem G-Aktin (Abbildung 2.3 (c)). Aufgrund der hohen Umsatzrate globulären Aktins zu Filamenten ist die Polymerisation in ihrer Gesamtheit für bis zu 40 % des ATP Verbrauchs in Zellen verantwortlich [93].

Die Bildung filamentösen Aktins variiert in ihrer Geschwindigkeit und Stabilität abhängig vom gebundenen Nukleotid sowie von Ionenart und -konzentration in der Lösung teilweise stark und ist selbst bei kompletter ATP Abwesenheit möglich. Die dabei auftretenden Reaktionskonstanten bei gebundenem Mg-ADP liegen mit $k_1 = 2,9 \pm 0,2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ & $k_{-1} = 5,4 \pm 0,1 \text{s}^{-1}$ respektive $k_2 = 0,09 \pm 0,03 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ & $k_{-2} = 0,25 \pm 0,04 \text{s}^{-1}$ bei gleichen Ionenkonzentrationen deutlich niedriger als im Falle ATP induzierter Polymerisation und führen zu kritischen Konzentrationen die um einen Faktor 5-15 höher liegen [58, 162]. Abwesenheit sowohl von ATP als auch von ADP erzeugt schließlich Filamente, die gegenüber physiologisch Polymerisierten eine Abweichung in ihrer Konformation aufweisen und ohne Stabilisierungsagenzen beschleunigt denaturisieren [35].

2.2.3 Regulation durch Proteine

Zur Regulation des zellulären Aktinnetzwerkes bedienen sich Organismen eines breiten Spektrums unterschiedlicher Proteine und Ionen. Liegt die Gesamtkonzentration an Aktin in Zellen je nach Typ bei $100 - 200 \mu\text{M}$ so besitzen sie darüber hinaus eine nahezu gleich große Konzentration an G-Aktin bindenden Proteinen mit hohen Dissoziationskonstanten wie z.B. Profilin. Dies führt dazu, dass lediglich ein geringer Anteil der Aktin-Gesamtmenge als freie, globuläre Einheiten vorliegt und bereits kleine Veränderungen die Filamentbildung stark beeinflussen können [103]. Durch Proteine wie Cofilin, Formin oder dem Ca^{2+} regulierten Gelsolin, welches durch Bindung an das (+)-Ende des F-Aktins dessen Verlängerung verhindert, wird zudem Einfluss auf die Polymerisation und Depolymerisation von Einzelfilamenten genommen [170]. Die Zelle ist so in der Lage ihre Form und mechanischen Parameter rasch an Veränderungen der Umwelt anzupassen.

Neben der die Polymerisation regulierende Proteine existiert eine Vielzahl an Strukturproteinen, die für die Diversifikation des zellulären Aktinnetzwerkes verantwortlich sind. Während Proteine wie α -Aktinin, Fascin oder Filamin für die Bündelung und Vernetzung von Filamenten verantwortlich sind [30, 206] ermöglichen Proteine wie Arp 2/3 und WASP die Verzweigung und Nukleation beispielsweise in Lamellipodien der Zellen [4, 218]. Dabei ist wichtig zu betonen, dass sich die Funktionen von ABPs aufgrund ihrer zahlreichen Wechselwirkungen und der kooperativen Effekte nicht immer eindeutig charakterisieren lassen [30, 221].

Eine Sonderstellung kommt Myosinen zu, einer Familie von ATP getriebenen Motorproteinen mit über 2000 klassifizierten Vertretern in mehreren Dutzend Gruppen [151]. Sie sind am Aufbau von Muskel- und Stressfasern beteiligt, stellen aber gleichzeitig auch das Analogon zu den Mikrotubuli-Transportproteinen Kinesin und Dynein dar. Man unterscheidet allgemein in prozessive Motoren – d.h. Motoren die im Laufe eines Kontaktes mehrerer Bewegungs- und Hydrolysezyklen absolvieren – und nicht-prozessive Motoren. Bei den meisten Myosinen handelt es sich um nicht-prozessive Motoren, die ihre Bindung mit Aktin nach jeder ATP-Umsetzung verlieren. Um durchgehende Transportprozesse zu gewährleisten werden in diesem Fall Gruppen von Myosinen benötigt, von denen jederzeit mindestens ein Motor in Kontakt mit dem Filament stehen muss [134]. Abgesehen von Mitgliedern der Myosin VI Familie bewegen sich dabei alle Myosine in Richtung des (+)-Endes der Filamente [219].

Nachfolgend seien die beiden im Rahmen der Arbeit zum Einsatz gekommenen Proteine Myosin II und Phalloidin gesondert beschrieben.

Myosin II

Myosin II stellt eine der bekannten Untergruppen der Myosin-Superfamilie dar, welche insbesondere in Stressfasern und den Sarkomeren der gestreiften Muskulatur vorkommt. Ihre Vertreter bestehen aus sechs Polypeptidketten, zwei je ≈ 220 kDa schweren Ketten (engl.: *heavy chains*) sowie vier modulatorischen leichten Ketten (engl.: *light chains*) mit je ≈ 20 kDa. Durch Zusammenlagerung der schweren Ketten entsteht ein circa 150 nm langer α -helikaler Schaft, dessen N-Termini zwei globuläre, circa 17 nm lange Kopfreionen bilden. Die leichten Ketten sind assoziiert mit den kurzen Halsregionen zwischen Kopf- und Schwanzbereich des Myosin-Moleküls. Sowohl ATP- als auch Aktinbindestelle sind in der Kopfreion der Myosine lokalisiert, so dass enzymatische Spaltung der Ketten mittels Trypsin einen leichten (engl.: *light mero myosin*, LMM) und einen schweren, aktiven Teil (engl.: *heavy mero myosin*, HMM) zur Folge hat [197]. In den Sarkomeren lagern sich Myosine mit ihren leichten Ketten zu 15 nm dicken, 1-2 μm langen Filamenten zusammen, wobei die Kopfreionen an parallel dazu verlaufende Aktinstränge angreifen können. Im Verlauf von ATP-Hydrolyse & Austausch kommt es zu einer Konformationsänderung, die in einem ≈ 5 nm verschiebendem Kraftschlag und einer damit verbundenen Muskelkontraktion resultiert [208].

In Stressfasern komplexiert Nicht-Muskel Myosin II mit 10-30 Aktinfilamenten und anderen Aktin bindenden Proteinen. Strukturelle und funktionale Aufklärung konnte unter anderem durch Fluoreszenzmarkierung von Myosin und α -Aktinin erreicht werden. Die dabei erkennbare Querstreifung der Filamentbündel führte zur Entwicklung von Modellen die große Ähnlichkeit mit Sarkomeren aufweisen – verbunden mit einer hohen Adaptivität und breitem Kontraktionsvermögen der Stressfasern[157].

Phalloidin

Als Toxin des grünen Knollenblätterpilzes mit einer LD_{50} von 2-3 mg/kg ist das Cyclopeptid Phalloidin verantwortlich für die *in vivo* Unterbindung der Depolymerisation und Umordnung von Aktinfilamenten [33]. Mit einer Dissoziationskonstante K_D von $\approx 10^{-8}$ M bindet Phalloidin an die Interaktionsseiten zwischen den G-Aktin Untereinheiten von F-Aktin Strängen, wodurch sich die Depolymerisationsrate 30-fach erniedrigt. [181, 220]. Insbesondere auch in *in vitro* Experimenten kommen häufig fluoreszenzmarkierte Derivate, wie beispielsweise Phalloidin-TRITC, zur Anwendung, da sie neben der Stabilisierung gleichzeitig auch die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Filamente ermöglichen.

2.3 Die Zellmembran

Membranen sind elementare Komponente aller lebenden Organismen. Die Existenz einer wenige Nanometer starken Zellmembran aus Phospholipiden wurde zum ersten Mal Ende der 20er Jahre des vergangenen Jahrhunderts von *Gorter und Grendel* postuliert. Bei der Extraktion von Lipiden aus Erythrozyten stellten sie fest, dass die Menge exakt ausreichend war, um die Oberfläche zweimal zu bedecken. Sie schlossen daraus, dass Zellen von einer Lipiddoppelschicht umgeben waren, mit den hydrophoben Teilen zueinander und den hydrophilen Teilen nach außen zeigend [65]. Durch Inkorporation unterschiedlichster Proteine fungieren Membranen neben der simplen Abgrenzung der Zelle von der Umgebung oder der Unterteilung in einzelne Kompartimente wie Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum oder Zellkern auch als hochsensitive Schranken zur Steuerung chemischer und elektrischer Vorgänge. Dadurch kontrolliert die Plasmamembran den Kommunikationsfluss zwischen den Zellen und ihrer Umgebung; sie sorgt für die Rezeption von Signalen und ihre Translation in Reaktionen der Zelle, wie z.B. der Umbildung zellulärer Aktinstrukturen. Während sich biologische Membranen so je nach Funktion oder Organismus stark unterscheiden ist ihr grundlegender Aufbau aus Lipiden eine universelle Eigenschaft der Zellen.

Zum Verständnis des Beitrags künstlicher Membransysteme zur Erforschung der Zelleigenschaften bieten die nachfolgenden Abschnitte einen Überblick über Aufbau und Funktion von Lipiddoppelschichten und der Zellmembran sowie der Interaktion mit dem Zellskelett im Besonderen.

2.3.1 Lipide & Lipidmembranen

Bei Lipiden handelt es sich um wasserunlösliche, amphiphile Moleküle, die sowohl über polare wie auch unpolare Bereiche verfügen. Bei einer Länge von circa 2,5 nm kann ihr spezieller Aufbau dabei stark variieren. Die am häufigsten in biologischen Membranen anzutreffenden Phospholipide (siehe Abbildung 2.4) bestehen aus ein oder zwei Alkylketten von 14-24 C-Atomen Länge, die gesättigt oder ungesättigt – d.h. mit Doppelbindungen versehen – vorliegen können. Verzweigte

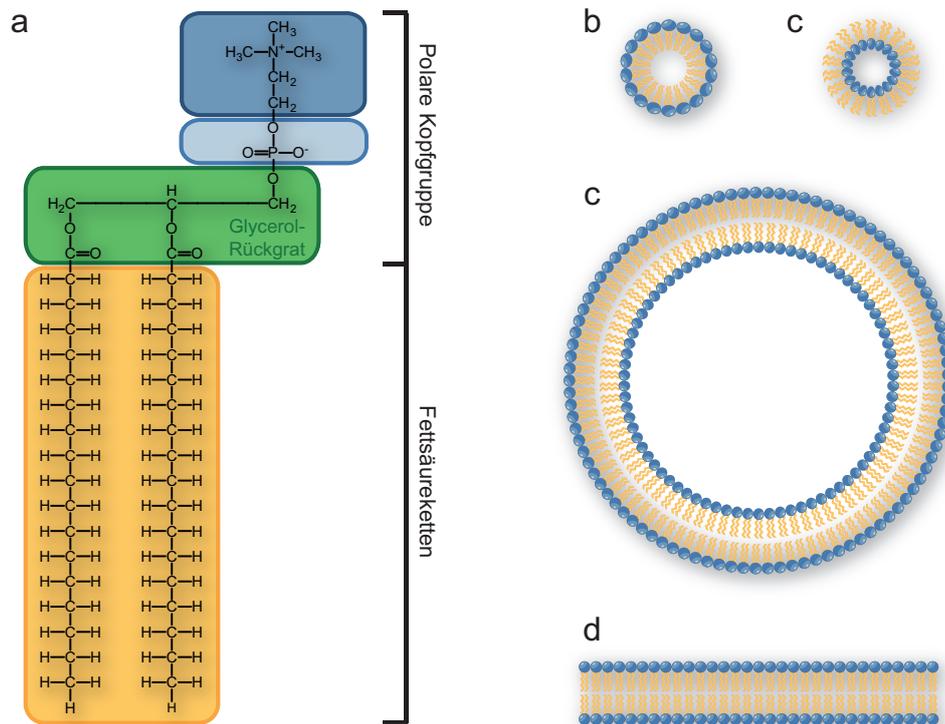


Abbildung 2.4: Aufbau und selbstorganisierende Strukturen von Phospholipiden am Beispiel von Phosphatidylcholin. Lipide lassen sich in einen unpolaren, hydrophoben (gelb) und einen polaren, hydrophilen (grün, blau) Bereich unterteilen (a). Amphiphile Lipide bilden spontan eine Reihe verschiedener Strukturen aus, darunter Mizellen (b), inverse Mizellen (c), doppel-schichtige Vesikel (d) und planare Lipiddoppelschichten (e).

Fettsäureketten sind in Tensiden tierischer Membranen nicht anzutreffen. Die Ketten schließen vornehmlich über Esterbindungen an das Rückgrat der Phospholipide, dem dreiwertigen Alkohol Glycerin, oder an das weitaus komplexere Sphingosin an. Im Falle der Phosphoglycerine ist die C-3-Hydroxylgruppe des Glycerol mit einer Phosphorsäure verestert, was in der Form von Phosphatidat, dem einfachsten Phosphoglycerid resultiert [197]. Über die Phosphorylgruppe schließlich kann eine Reihe verschiedenster Alkohole, wie Glycerin, Cholin oder Inositol mit dem Grundgerüst verbunden sein.

Neben Phosphoglyceriden und Sphingolipiden bilden Glykolipide und Sterole wie Cholesterol die weiteren Hauptgruppen der Membranlipide. Bei Glykolipiden sind statt einer Phosphorylgruppe ein oder mehrere Zucker direkt mit dem Rückgrat des Lipids verknüpft während Sterole komplett vom vertrauten Muster abweichen. Bei Cholesterol ist die unpolare Fettsäurekette an ein starres System von 4 Kohlenstoffringen angeschlossen, welche mit lediglich einer Hydroxylgruppe über einen äußerst geringen polaren Anteil verfügt.

Die besondere Unterteilung in polare und unpolare Anteile führt dazu, dass Lipide sowohl

in wässriger als auch öliger Umgebung zu spontaner Selbstorganisation neigen. Formen sie an der Grenzfläche zwischen Luft und wässrigen Lösungen gerichtete monomolekulare Schichten, bei denen die hydrophoben Alkylketten von der Oberfläche in den Luftraum hineinragen, so sind sie abhängig von ihrer Struktur und ihres prozentualen Anteils in Lösung in der Lage sogenannte Mizellen oder invertierte Mizellen auszubilden (siehe Abbildung 2.4 (b) & (c)). Eine weitere Anordnung die die hydrophoben und hydrophilen Anforderungen der Lipide erfüllt ist die Ausbildung einer Doppellipidschicht, welche von den meisten Lipiden aufgrund ihrer Fettsäurekettenstruktur bevorzugt wird ((d) & (e)). Doppellipidschichten wenden wässrigen Umgebungsmedien jeweils den hydrophilen Teil der Tenside zu, während die hydrophoben Alkylreste zueinander in Richtung Membranmitte zeigen. An den Rändern führt dies zu einer energetisch ungünstigen, starken Krümmung der Membranstruktur und einer damit einhergehenden hohen Instabilität. Nichtunterstützte, freie Lipiddoppelschichten formen daher in der Regel spontan geschlossene Vesikelstrukturen, wobei hauptsächlich hydrophobe Kräfte für deren Ausbildung verantwortlich zeichnen [72]. Weitere Beiträge zur Stabilisierung der Strukturen liefern van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten sowie elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrücken zwischen den polaren Kopfgruppen und den sie umgebenden Wassermolekülen [197].

Lipidmembranen stellen keine starren, geschlossenen Strukturen dar. Es handelt sich vielmehr um eine 2-dimensionale Flüssigkeit mit hoher innerer Dynamik, deren Viskosität sowohl von der Zusammensetzung als auch von der Temperatur abhängig ist. Die unterschiedlichen Komponenten führen dazu, dass Membranen durchlässig sind für kleine lipophile Moleküle wie CO_2 oder Ethanol. Auch die Permeabilität für Wassermoleküle liegt temperaturabhängig bei einem vergleichsweise hohen Koeffizienten von einigen Dutzend $\mu\text{m/s}$ wohingegen sich Ionen wie Cl^- oder Na^+ lediglich im Bereich von 10^{-6} - 10^{-8} $\mu\text{m/s}$ bewegen, ein Effekt der direkt mit der stabilen Hydrathülle um die Ionen verbunden ist [169, 197]. Die Permeabilität von Molekülen wie Glucose oder Glycerin liegt im Bereich dazwischen, während Membranen für noch größere Moleküle praktisch undurchlässig sind.

Innerhalb der Lipiddoppelschicht können 3 mögliche Bewegungen der Moleküle in ihrer Gesamtheit unterschieden werden, die in Abbildung 2.5 dargestellt sind. Neben einer Rotation um die Vorzugsachse können Lipide sowohl lateral innerhalb einer Lipidschicht als auch transversal diffundieren. Molekulardynamik-Simulationen liefern für Phospholipide in Übereinstimmung mit den Relaxationszeiten aus Kernspinresonanzspektroskopien Rotationskorrelationszeiten von 5-10 ns [100]. Messungen der transversalen und lateralen Diffusion können beispielsweise mittels Elektronenspinresonanz oder FRAP (engl.: *fluorescence recovery after photobleaching*) erfolgen [38, 105]. Liegt die laterale Mobilität mit 10^{-6} s in einem – gemessen an zellulären Maßstäben – hohen Bereich, so ist die transversale Diffusion mit einer statistischen Dauer von circa 10^5 s um einen Faktor 10^{11} langsamer. Begründet liegt dies in dem hohen Energiebedarf, den der hydrophile

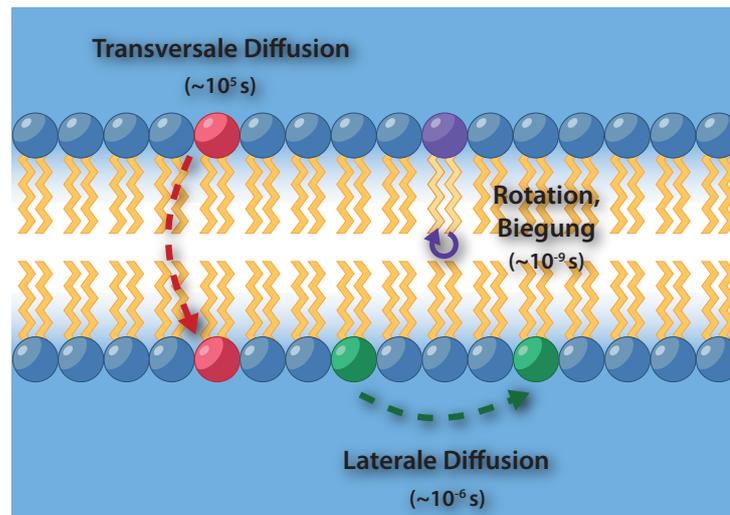


Abbildung 2.5: Dynamik von Lipidmolekülen innerhalb einer Doppelschicht. Während es sich bei der lateralen Diffusion und Rotation von Lipiden sowie bei Biegung der Fettsäureketten um hochdynamische Bewegungen im Milli- und Nanosekundenbereich handelt ist die transversale Diffusion stark gehemmt.

Teil eines Lipids aufwenden muss, um durch die hydrophoben Fettsäureketten benachbarter Lipide hindurchzudringen. Eine Ausnahme bilden Lipide mit äußerst kleinen polaren Anteilen wie Cholesterol die eine Rate von mehreren Schicht-Übergängen pro Sekunde aufweisen [37].

Einen großen Einfluss auf die Beweglichkeit der Membranlipide übt die Temperatur aus. Unterhalb einer kritischen Temperatur liegen die Lipidmoleküle in einem hochgeordneten, gelartigen Zustand vor. Bei Wärmezufuhr erhöht sich die Brownsche Bewegung der Lipide und es kommt zum Phasenübergang in einen ungeordneten, flüssigen Zustand [204]. Grund für die Zunahme an Mobilität ist der gegenüber der Gelphase geringere Ordnungsgrad der Lipide. Dieser führt zu Dichteschwankungen und einer Abnahme der bereits erwähnten van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den polaren Kopfgruppen. Dabei ist die Phasenübergangstemperatur charakteristisch für die jeweilige Zusammensetzung der Lipidmembran. Sowohl Cholesterol als auch ein hoher Anteil an Fettsäureketten mit *cis*-Doppelbindungen respektive Knicken in den Alkylketten bewirkt aufgrund des vergrößerten Abstandes zwischen den Lipidkopfgruppen eine Zunahme der Mobilität und damit verbunden eine Absenkung der kritischen Temperatur [2].

2.3.2 Das Flüssig-Mosaik-Modell

Die Erkenntnis einer flüssigen Membran führte zu Beginn der 70er Jahre zur Entwicklung des sogenannten „Flüssig-Mosaik-Modells“ für Zellmembranen durch *Singer & Nicolson* [189, 190] (vergleiche Abbildung 2.6). Es zeichnet sich dadurch aus, dass Proteine nicht mehr wie vorher angenommen auf der Membran lokalisiert, sondern in die Lipiddoppelschicht integriert sind, wobei die Wechselwirkung mit Lipidmolekülen für die Funktion der Proteine teils unerlässlich ist. Unter-

schieden wird dabei in Transmembranproteine welche beide Lipidschichten durchspannen sowie periphere Proteine die lediglich in eine Membranschicht eindringen. Während Transmembranproteine wie beispielsweise Ionenkanäle häufig über große, geringpolare Zwischenbereiche verfügen, die ihre Integration in die Doppelschicht ermöglichen, sind periphere Proteine hauptsächlich über polare Wechselwirkungen an die Lipidkopfguppen gebunden.

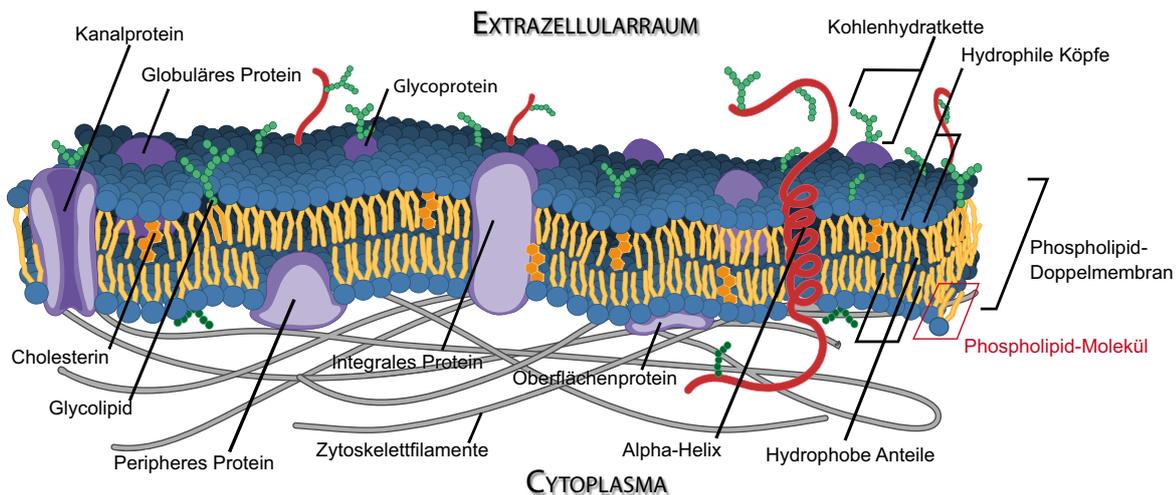


Abbildung 2.6: Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran¹. Zellmembranen sind auf zwei Dimensionen beschränkte Lösungen unterschiedlicher Lipide und Proteine. Membranproteine können sich in der Regel, wie auch einzelne Lipidmoleküle, lateral – zumindest begrenzt – frei innerhalb der Membranschicht bewegen. Im Gegensatz dazu ist der transversale Wechsel von Proteinen unterbunden was zu einer asymmetrischen Verteilung zwischen Innen- und Außenseite der Zellmembran führt.

Gingen *Singer & Nicolson* noch davon aus, dass sich Lipide wie auch Proteine frei innerhalb einer Membranschicht bewegen können, zeigen neuere Erkenntnisse deutliche Heterogenitäten in deren Strukturen. Zusammenlagerungen von Lipiden oder Proteinen, die sich häufig durch hohe Anteile an Cholesterol und Sphingolipiden auszeichnen, formen flüssig-geordnete Domänen innerhalb der Zellmembran, die als Lipidflöße bezeichnet werden [21, 188]. Dabei ist die Frage über Stabilität solcher Domänen und deren Bedeutung für die Membranfunktion Gegenstand aktueller Betrachtungen [50, 115, 159, 209].

Neben lateralen Unterschieden führt der unterdrückte Übergang von Lipiden und Proteinen von einer Lipidschicht in die Andere zudem zu einer hohen transversalen Konservierung der Membranzusammensetzung und ermöglicht so den Aufbau unterschiedlicher Strukturen in Außen- und in der dem Cytosol zugewandten Seite [2]. So finden sich beispielsweise Glycolipide und Glykoproteine, welche bekanntermaßen eine bedeutende Rolle bei der interzellulären Erkennung spielen, lediglich auf der dem Extrazellulärraum zugewandten Seite der Membran.

¹ <http://de.wikipedia.org/wiki/Flüssig-Mosaik-Modell>

2.4 Interaktionen zwischen Zellskelett & Zellmembran

Die Plasmamembran der meisten pro- und eukariotischen Zellen ist von einem engmaschigen Netzwerk filamentöser Proteine unterlegt, welches zur Formstabilität der Zelle und der Unterteilung der Membran in Domänen beiträgt. Erythrozyten beispielsweise verfügen über ein spezielles Netzwerk langkettiger Spektrinpolymere, welche über Proteine wie Ankyrin oder Protein 4.1 mit Ionenkanälen der Membran sowie dem Aktinnetzwerk der Zelle verbunden sind [197]. Zusätzlich zu intrazellulären Strukturen verfügen viele Zelltypen im extrazellulären Raum auch über dreidimensionale Filamentnetzwerke, die sogenannte Extrazelluläre Matrix (EZM), welche an die Lipiddoppelschicht oder „direkt“ an das Skellet des Cytoplasmas [93] gebunden sind. Neben solch spezialisierten Systemen stehen alle Komponenten des Zellskeletts in ihren verschiedenen Ausprägungen über teils komplexe Proteinsysteme in wechselseitigem Kontakt mit Elementen der Zellmembran.

Spezielle Membranproteine wie Ponticulin bilden direkte Angriffspunkte für Aktinfilamente indem sie als Nukleationskomponente fungieren [29]. In beschränkter Weise sind Filamente darüber hinaus in der Lage durch Ladungsinteraktion direkt an Lipidschichten zu koppeln, eine Interaktion die von geringer Stärke und daher ungeklärter physiologischer Bedeutung ist. Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Studien an Plasmamembranen konnten allerdings zeigen, dass die laterale Diffusion von Lipiden und Proteinen und somit die Ausbildung von Kompartimenten durch den unterliegenden Aktinkortex stark beeinflusst ist [104, 143]. Ebenso spielt das Zellskelett eine große Rolle bei der Änderung aber auch Rückbildung von Zellform oder -größe beispielsweise im Verlauf von Endo- oder Exocytose. Durch Kopplung an die Membran und insbesondere an Ionenkanäle ist das Filamentnetzwerk in der Lage Einfluss auf die osmotische Druckregulation der Zelle zu nehmen. Darüber hinaus bilden sich bei Dehnung oder Kompression des Netzwerkes Spannungen in der Membran und dem unterliegenden Kortex, von denen angenommen wird, dass sie als Gedächtnis für die Rückführung der Zelle in ihre ursprüngliche Form dienen [93].

Membranassoziierte Proteine – häufig durch extrazelluläre Signale gesteuert – besitzen umgekehrt einen direkten Einfluss auf die Gestalt des zellulären Netzwerkes. Über eine Reihe membranorganisierter Komplexe regulieren Gruppen von G-Proteinen Effektorproteine, wie beispielsweise WASP und WAVE, die die zellweite Nukleation und Verzweigung von Aktinfilamenten kontrollieren [41]. Darüber hinaus ist auch eine direkte Polymerisation im Kontaktbereich von Membran und Aktin möglich. So kann die Zelle durch Bindung von mit F-Aktin verbundenen Capping-Proteinen wie Gelsolin an Membranproteine eine Entkopplung mit dem Filament herbeiführen, was eine instantane Verlängerung ermöglicht [91]. Dies führt zum Teil zu kompakten Aktinstrukturen wie Filopodien, fadenförmigen Ausstülpungen der Membran, die für die Zelle von großer Bedeutung für die Wahrnehmung der Umgebung sind [41].

Grundlage für die Interaktion zwischen Zellen und der Umwelt sind sensitive Proteinkomplexe

in der Membran, wie beispielsweise die Fokalen Adhäsionen. Bei Fokalen Adhäsionen handelt es sich um Cluster aus zum Teil über 50 verschiedenen Proteinen, welche das Zellskelett mechanisch mit Elementen der extrazellulären Matrix – oder an künstliche Oberflächen verknüpft – bindet. Als Hauptmediator fungieren dabei Transmembranproteine der Integrin-Familie, welche extrazellulär an Proteine der EZM (mit spezifischer Aminosäuresequenz, z.B. RGD-Sequenz) und intrazellulär über eine Kaskade an Adapterproteinen wie α -Aktinin an die Stressfasern der Zelle anschließen und Einfluss auf den Netzwerkaufbau ausüben [16, 63, 225]. Dabei unterliegen fokale Adhäsionskomplexe einer hohen dynamischen Variation durch Auf- und Abbau und spielen eine zentrale Rolle bei der Adhäsion und Migration von Zellen. Weiterhin existieren Komplexe, welche direkte Kontakte zwischen Zellen herstellen, wie beispielsweise Integrin-verbundene Desmosome in Epithelzellen oder Adhäsionsverbindungen unter Einbindung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten [93].

2.5 Modellsysteme

Neben komplexer computerbasierter Simulationen haben moderne Präparationstechniken in den vergangenen Jahren eine Vielzahl an Modellsystemen zur Erforschung von Membran- und Cytoskelettcharakteristika hervorgebracht. Dreidimensionalen Netzwerken zellulärer Filamente oder spezialisierten Strukturen an Oberflächen stehen dabei Vesikeln sowie unterstützten oder freitragenden Membranen gegenüber. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über ausgewählte Systeme, deren Erzeugung und speziellen Eigenschaften. Weitergehende Informationen zu Vesikeln und deren Erzeugung können Abschnitt 5.3 entnommen werden.

2.5.1 Aktinstrukturen

Die Nachbildung zellulärer Aktinnetzwerke beschränkt sich im allgemeinen auf die Erzeugung dreidimensionaler Aktinengele, die unter dem Einfluss ionischer oder mit Polymeren respektive Proteinen angereicherter Reagenzien zur Ausbildung unterschiedlicher Strukturen angeregt werden [120]. Neben der Strukturaufklärung bilden dreidimensionale Gele eine verbreitete Grundlage mikrorheologischer Messungen zur Bestimmung der viskoelastischen Parameter spezieller Aktinsysteme. Abhängig von der Aktinkonzentration sowie von Typ und Konzentration der verwendeten Vernetzerreagenzien untergehen die Gele dabei strukturelle Phasenübergänge, von rein verschränkten Filamenten über homogene Netzwerke bis hin zu Netzwerken aus Aktinbündeln [18]. Während α -Aktinin dazu neigt homogen vernetzte Netzwerke zu erzeugen tendiert F-Aktin zum Beispiel unter Zugabe von Filamin oder divalenten Kationen, wie Mg^{2+} , dazu Aktinbündel auszubilden [179, 206]. Experimenten an reinen, passiven Aktinengelen stehen Experimente an gemischten, respektive aktiven Systemen, beispielsweise bestehend aus Aktin-Mikrotubuli [158] oder Aktin-Myosin Lösungen [14] gegenüber, welche die dynamischen Interaktionen der Zellnetzwerkkomponenten besser widerspiegeln.

Einen anderen Ansatz verfolgten *Reymann et al.* [171]. Um den Einfluss der Keimbildungsgeometrie auf die Erzeugung spezifischer Netzwerkstrukturen wie Stressfasern und Filopodien zu untersuchen, funktionalisierten sie Bereiche von Deckgläsern mit dem proteinadsorptionsverhinderndem PLL-PEG. Anschließende Beschichtung der freien Flächen mit dem keimbildungsfördernden Faktor pWA, einem Protein der WASP-Familie, ermöglichte das Wachstum von Aktinsträngen auf begrenzten Bereichen der Oberfläche. So konnte anhand unterschiedlicher Strukturen eine bedeutende Winkelabhängigkeit bei der Strukturausbildung nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit zur Erzeugung quasi-2-dimensionaler Aktinstrukturen, ähnlich dem Aktinkortex in Zellen, stellt die von *Roos et al.* entwickelte Methode der freitragenden Filamente auf Säulensubstraten dar [176]. Mit Myosin funktionalisierte, photolithographisch erzeugte Mikrosäulen aus Polydimethylsiloxan (PDMS) fungieren dabei als Stützen für F-Aktin. Abhängig von den chemischen und flussgeometrischen Parametern lassen sich durch Integration in mikrofluidische Kammern sowohl homogene Netzwerke als auch Filamentbündel erzeugen. Analog dazu ist es möglich begrenzte Netzwerkstrukturen mittels holographischer optischer Pinzetten (HOP) zu generieren [75]. Dabei fungieren multiple funktionalisierte Polystyrolkugeln, gefangen in den Strahlzentren der optischen Pinzette, als Ankerpunkte. Neben der Generierung und Modulation einer Vielzahl unterschiedlicher Geometrien bietet die Verwendung einer HOP den Vorteil einer simultanen und hochsensitiven Messung, der beispielweise im Verlauf der Vernetzung auftretenden Kräfte [195].

2.5.2 Vesikel & Membranstrukturen

Für die *in vitro* Untersuchung der Eigenschaften von Zellmembranen steht eine Vielzahl an diversifizierten Systemen zur Verfügung. Eine Auswahl davon kann Abbildung 2.7 entnommen werden. Große, unilamellare Vesikel (GUVs) haben sich dabei als zentrales System zur Erforschung genereller, mechanisch-dynamischer Membraneigenschaften [60] als auch der Untersuchung integrierter Proteine erwiesen [40]. Beispiele hierfür seien neben der Ermittlung von Diffusionskonstanten einzelner Lipide oder der Funktionen von Proteinen auch die Entstehung von Heterogenitäten durch Phasenseparation [209, 209]. Darüber hinaus fungieren Vesikel auch als abgeschlossene Kompartimente zur Untersuchung chemischer Reaktionen bis hin zur Proteinsynthese in Zellen, durch Einschluss von Plasmiden und den zugehörigen Transkriptions-Translations Faktoren [150, 214]. Eine Beschreibung verschiedener Herstellungstechniken kann Abschnitt 5.3 entnommen werden.

Von ebenso großer Bedeutung sind unterstützte Membranen, typischerweise durch Vesikelabscheidung erzeugt [173]. Neben der hohen Stabilität bieten sie den Vorteil eine Vielzahl oberflächensensitiver Untersuchungstechniken wie AFM oder TIRFM einsetzen zu können [26]. Bietet die Abscheidung so einerseits große Vorzüge, so kann sie in Hinsicht auf Moleküldynamik oder Funktion von Transmembranproteinen ebenso große Hindernisse darstellen. Ein Weg um dies zu minimieren stellt die Abscheidung von Membranen auf Polymer substraten wie PEG dar

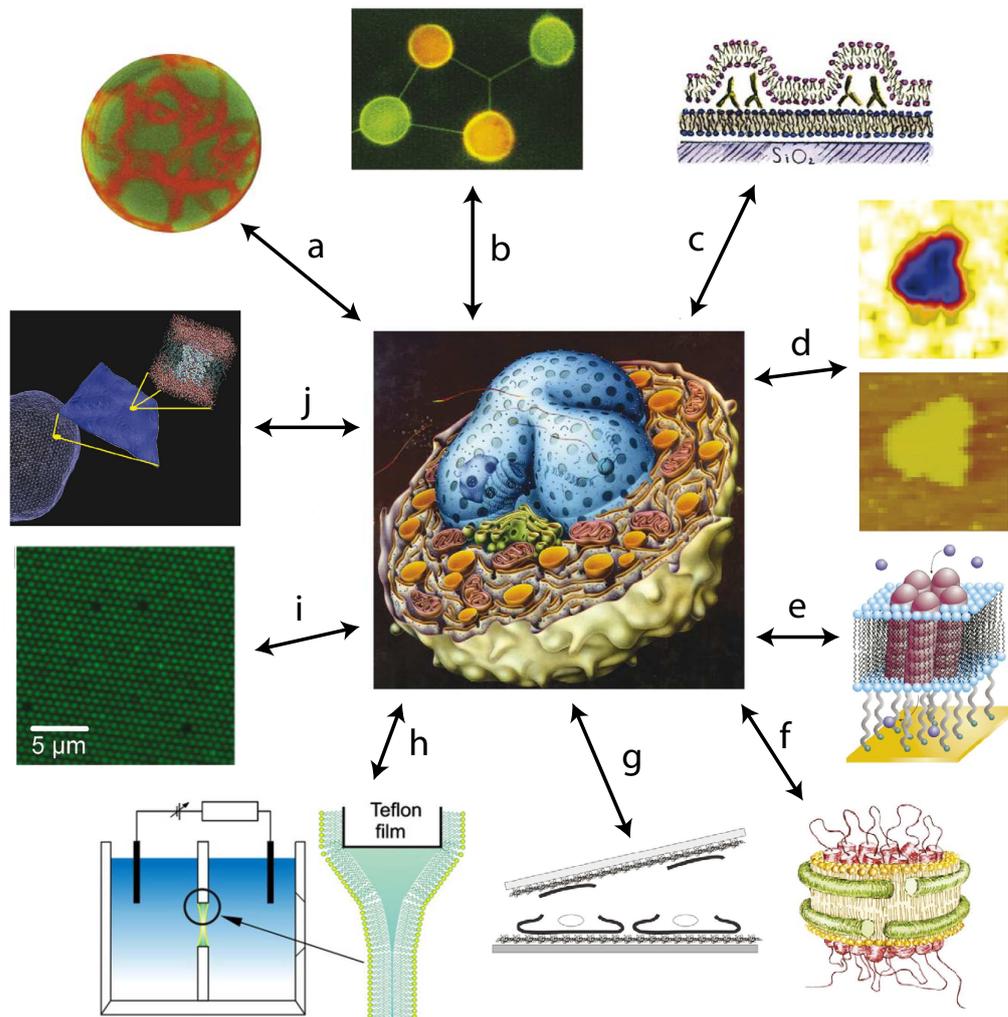


Abbildung 2.7: Modellsysteme zellulärer Lipidmembranen. (a) Phasenseparation in GUVs; (b) Vesikelnetzwerke verbunden durch Lipidzylinder; (c) & (d) unterstützte Lipiddoppelschichten erzeugt durch GUV Ausbreitung; (e) Membran mit Ionenkanälen auf Polymersubstraten; (f) isolierte Membranscheiben mit Transmembranproteinen; (g) aufgebrochene Zellmembranen auf Substraten; (h) Potentialmessung an „black lipid“ Membran; (i) freitragende „black lipid“ Membranen auf porösem Silikon; (j) Computersimulationen (Adaptiert aus [3, 26, 137]).

[135, 201].

Schränken die zwei bislang beschriebenen Modellgruppen die gleichzeitige Zugänglichkeit beider Membranseiten stark ein, so eröffnen freistehende Membranen deutlich vereinfachte Messungen, beispielsweise von Transportprozessen über die Lipiddoppelschicht. Vielfach auch *black lipid membranes* genannt – aufgrund der Auslöschung des an beiden Lipidschichten reflektierten Lichts durch Interferenz – finden sie verbreitete Anwendung bei Bestimmungen der Membranstabilität [105, 137] oder bei Messungen zur Leitfähigkeit [211, 222]. Durch Analyse von Ionenstromfluktua-

tionen lassen sich dabei selbst Aussagen über die Funktion von Kanälen auf Einzelmolekülebene treffen. Eine bereits in den 60er Jahren entwickelte Technik zur Erzeugung ist die Auftragung einer Verdünnung aus Lipiden in organischen Lösemitteln auf ein löchriges, hydrophobes Substrat mittels eines Pinsels in wässriger Umgebung. Durch Ausbreitung der Lipide auf dem hydrophoben Substrat (z.B. Teflon) verjüngt sich der Film bis hin zur Ausbildung einer Lipiddoppelschicht über den Öffnungen (vergleiche Abbildung 2.7 (h)). Die erzeugten freistehenden Membranen können einen Größenbereich von Bruchteilen eines Mikrometers bis hin zu mehreren Millimetern abdecken. Aufgrund der verwendeten Lösung beinhaltet jedoch auch die resultierende Membran große Teile an Lösemitteln, was zu einer Verfälschung der viskoelastischen Eigenschaften beziehungsweise der Diffusionskonstanten führen kann [222]. Eine Möglichkeit nahezu lösemittelfreie Membranen zu erzeugen ist die Auftragung der Lipidlösung auf die wässrige Lösung der Umgebung mit anschließender Absenkung und Anhebung des Flüssigkeitsstandes in dessen Verlauf es zur Membranausbildung auf dem senkrecht stehenden Lochsubstrat kommt.

2.5.3 Aktin-Membran Kombisysteme

Die vielfältigen Interaktionen zwischen Zellmembran und Zellskelett machen es unmöglich diese essenziellen Komponenten der Organismen durch separate *in vitro* Experimente vollständig zu verstehen. Waren die bislang beschriebenen Modellsysteme jeweils auf Eine der Beiden spezialisiert, so wurden darüber hinaus Systeme entworfen die die Untersuchung der Wechselbeziehungen ermöglichen.

Ein solches System sind beispielsweise Aktinvesikel. Dabei ist zu unterscheiden nach Vesikeln welche Aktinfilamente einschließen und Vesikeln deren Außenseite durch ein Aktinnetzwerk bedeckt ist [82]. Stellen Erstere ein Modellsystem für Aktinstrukturen in Zellen dar, so fungieren Letztere auch als Analogon für die Vesikelentstehung aus Zellmembranen im Laufe der Endocytose [167]. Während der Aufbau äußerer Netzwerke durch Anlagerung von filamentösem Aktin an Ankerpunkte in der Membran abläuft erfolgt der Aufbau interner Strukturen durch den Einschluss einer Aktin-Polymerisationslösung im Laufe der Vesikelherstellung. Nachdem die Konzentration an G-Aktin im Außenraum durch Verdünnung oder Spülung herabgesenkt wurde kann die Polymerisation innerhalb der Vesikel durch Temperaturerhöhung, den Zufluss von Ionen über Ionenkanäle und Elektroporation oder UV Bestrahlung von Polykationen initiiert werden [31, 71, 213]. Problematisch dabei ist die Herstellung von Vesikeln mit Aktin- und Ionenkonzentrationen von physiologischer Relevanz, ohne dabei die Stabilität der Membran zu beeinträchtigen, was jedoch mittels spezieller Präparationstechniken umgangen werden kann [213]. Anwendungsbereiche bilden unter anderem die Erforschung des selbständigen Aufbaus individueller Aktinstrukturen [205] oder die Bestimmung kooperativer mechanischer Eigenschaften [81]. Studien zum Adhäsionsverhalten durch *Murrell et al.* beispielsweise zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Vesikel-Ausbreitungsdynamik vom unterliegenden Aktinkortex [147].

Eine weitere Methode ist die Erzeugung von Aktinstrukturen auf unterstützten Membranen.

Im Gegensatz zu Aktinvesikeln bietet der schrittweise Aufbau eine bessere Kontrolle über die experimentellen Bedingungen – zusätzlich zu den im vorherigen Abschnitt erörterten Vorteilen unterstützter Membranen. Der Aufbau geschieht dabei wahlweise durch Abscheidung präpolymerisierter Filamente [17] oder der *in situ* Polymerisation, eingeleitet durch Aktin bindende Membranproteine wie Ponticulin [96]. Aktuelle Studien schließen neben der Untersuchung von Aktin-Membran Interaktionen und der Eigenschaften Aktin bindender Proteine auch die Formation komplexer filopodienähnlicher Strukturen ein. So gelang es *Lee et al.* durch Beigabe von Frosch-Ei Extrakt zu auf Membranen wachsenden Komplexen aus Aktin und Aktin bindenden Proteinen nicht nur eine Reorganisation und Bündelung der Filamente, sondern auch die selbstständige Anlagerung weiterer filopodienassoziierter Proteine einzuleiten [109].

KAPITEL 3

Polymertheorie und Mikrorheologie

Zellen und mit ihnen die Strukturen des zellulären Skellets unterliegen ständig wechselnden Umweltbedingungen. Ihre hohe Fähigkeit zur Adaption hängt dabei in besonderem Maße von der semiflexiblen Natur der am Zellskelett beteiligten Polymerfilamente ab. Sie führt im Netzwerkverbund zu einem mechanischen Verhalten, welches sowohl die elastischen, energiespeichernden Eigenschaften von Festkörpern, als auch das viskose, dissipative Verhalten von Flüssigkeiten widerspiegelt. Weit verbreitete Anwendung in der Untersuchung dieser speziellen Eigenschaften – sowohl im Rahmen von *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten [108, 139, 216] – findet dabei die Technik der Mikrorheologie, bei der die Bewegung der Netzwerke auf mikroskopischer Ebene durch die Einbringung von Probenpartikeln bestimmt wird. Das folgende Kapitel bietet einen Überblick über die mechanischen Eigenschaften semiflexibler Polymere sowie ihre Vernetzung mittels Gegenioneninteraktion. Es gibt darüber hinaus Einblick in das grundlegende viskoelastische Verhalten von Polymernetzwerken und legt einen Schwerpunkt auf die der Mikrorheologie zugrunde liegende Theorie sowie der für die Auswertung nötigen Routinen.

3.1 Semiflexible Polymere und viskoelastische Körper

3.1.1 Persistenzlänge

Künstliche, aber auch natürliche Polymere wie Aktin, zeichnen sich dadurch aus, dass sich ihre Untereinheiten aufgrund verschiedener molekularer Interaktionen – beispielsweise durch Wasserstoffbrücken oder Coulomb Abstoßung – in einer Konformation befinden welche nicht beliebig stark gegeneinander verschoben werden kann. Dies führt zu einer inneren Steifigkeit welche bei linearen Polymerketten mittels der Persistenzlänge l_p beschrieben werden kann.

Eine Möglichkeit zur Beschreibung semiflexibler Polymere stellt das von *Kratky und Porod* Ende der 40er Jahre entwickelte und von *Saitô et al.* erweiterte *Wormlike-Chain-Modell* dar. Anders als beispielsweise im *Freely-Jointed-Chain-Modell*, welches ein Polymer als Kette von N

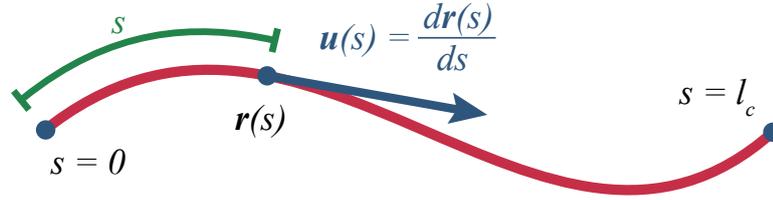


Abbildung 3.1: Definition der Persistenzlänge anhand des Wormlike-Chain-Modells. Durch Berechnung des zeitlichen Mittels der Tangentialvektoren $\mathbf{u}(s)$ an allen Orten s lässt sich die zur Persistenzlänge exponentiell proportional abfallende Korrelation der Filamentorientierung bestimmen.

steifen Abschnitten der Länge l , auch Kuhn-Segmente genannt, darstellt, wird ein Filament hier als kontinuierliche, differenzierbare Kurve $\mathbf{r}(s)$, mit der Konturlänge $l_c = s_{max}$, gemessen entlang der Kette des Polymers, beschrieben. Obwohl das Modell die Elastizität realer Materialien berücksichtigt werden aufgrund der nicht exakten Lösbarkeit im allgemeinen entsprechende Terme vernachlässigt [232]. Eine Randbedingung des Modells ist sodann, dass Filamente lediglich transversalen Schwingungen, nicht aber longitudinalen Fluktuationen durch Dehnung oder Kompression unterliegen, was bedeutet, dass l_c über alle Zeiten konstant bleibt.

Die Persistenzlänge ist in dieser Beschreibung über die Richtungskorrelation zweier Tangentialvektoren

$$\mathbf{u}(s) = \frac{d\mathbf{r}(s)}{ds} \quad (3.1)$$

an den Orten s und s' bestimmt. Im zeitlichen Kontinuum lässt sich die Korrelationsfunktion $\langle \mathbf{u}(s) \cdot \mathbf{u}(s') \rangle$ bei kleinen Richtungsänderungen $\mathbf{u}(s) - \mathbf{u}(s')$ und kleinen Abständen $s - s'$ zu einer exponentiell abfallenden Funktion mit

$$\langle \mathbf{u}(s) \cdot \mathbf{u}(s') \rangle = e^{-\frac{|s-s'|}{l_p}} \quad (3.2)$$

entwickeln. Für wachsende Abstände $s - s'$ fällt die Korrelation auf 0 ab, mit l_p als Abklingrate.

Durch Austausch von Energie mit der Umwelt, auch im thermischen Gleichgewicht, kommt es zu Fluktuationen in der Form von Polymeren. Abbildung 3.2 zeigt ein solches Filament in verschiedenen Ausschnitten. Gewöhnlich ist die Konturlänge l_c größer als die räumliche Ausdehnung. Ist die Konturlänge sehr viel größer als die Persistenzlänge, so ist das Polymer in der Lage in sich verschlungene Konformationen einzunehmen und es wird als flexibel bezeichnet. Mit zunehmender Verkürzung nimmt der Grad der Deformierbarkeit jedoch stark ab. Ist die Länge im Bereich von l_p so ist die Beweglichkeit derart eingeschränkt, dass man von Semiflexibilität spricht. Bei Abschnitten, die deutlich unter der Persistenzlänge des betrachteten Polymers liegen,

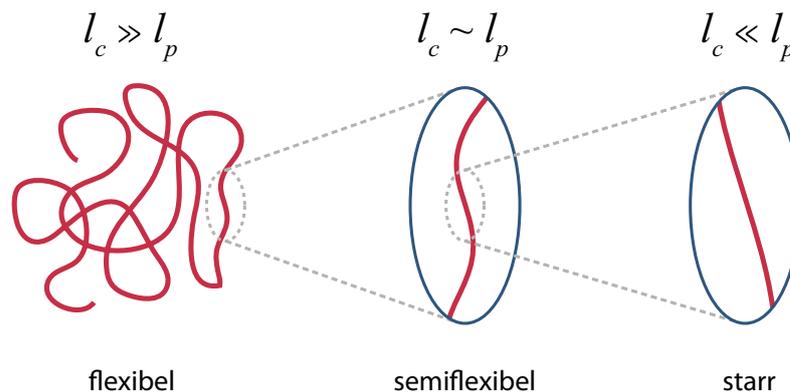


Abbildung 3.2: Klassifikation eines thermisch angeregten Polymers anhand von Kontur- l_c und Persistenzlänge l_p . Die Unterscheidung in flexibel, semiflexibel oder starr lässt sich für unterschiedliche Polymere nicht absolut treffen, sondern hängt vom Verhältnis der durchschnittlichen Kettenlänge zur Persistenzlänge ab. So fällt F-Aktin auf zellulärer Ebene in die Kategorie der semiflexiblen, Mikrotubuli jedoch in die Gruppe der Filamente mit eher starrem Charakter.

nähert sich die Konturlänge schließlich der Längsausdehnung L der Kette an. Eine thermische Verformung des Polymerstranges ist nur noch in geringem Maße möglich; das Filament ist starr. Während die Persistenzlänge eine feste, wenn auch temperaturabhängige Größe des jeweiligen Polymermaterials ist, so ist für das Verhalten eines einzelnen Filaments das Verhältnis von l_c zu l_p maßgebend. Anhand dieses Verhältnisses lassen sich auf zellulärer Größenordnung die Filamente des Zellskeletts in semiflexibel (Aktin, Intermediärfilamente) und starr (Mikrotubuli) einteilen (vgl. auch Abschnitt 2.1).

Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Energiezustands eines Polymers hängt auch die Persistenzlänge direkt von der Temperatur des umgebenden Mediums ab. Mittels

$$l_p = \frac{\kappa}{k_B T} \quad (3.3)$$

steht sie über die Biegesteifigkeit κ zudem in Verbindung mit den inneren mechanischen Eigenschaften des Polymers. In Experimenten ließen sich die Persistenzlängen von F-Aktin und Mikrotubuli beispielsweise anhand fluoreszenzmarkierter, auf 2 Dimensionen beschränkter Filamente durch Korrelations- oder Modenanalyse ermitteln [64, 153].

3.1.2 Mechanische Parameter linearer Polymere

In der Näherung für schwach gebogene Stäbe sollen für Filamente im Folgenden einige Zusammenhänge der Materialeigenschaften geklärt werden um eine Grundlage für die Beschreibung der Netzwerkeigenschaften zu liefern. Wie wir gesehen haben lässt sich die semiflexible Natur eines Filamentes zurückführen auf dessen Biegesteifigkeit κ , einem Maß für den Widerstand eines Materials gegen transversale Verformung. Durch Biegung erfahren Objekte bei Kompression der

konkaven Seite eine gleichzeitige Dehnung der Konvexen was zu lokalen Spannungen senkrecht zur Filamentachse führt. Ein Maß für den Widerstand unterschiedlicher geometrischer Formen gegen diese Spannungen stellt das axiale Flächenträgheitsmoment I_a dar. Unter Vernachlässigung der inneren Struktur eines Polymers ergibt sich für einen zylinderförmigen Strang mit Durchmesser a ein Flächenträgheitsmoment von $I_a = \int_A y^2 dA = \pi a^4/4$. Bei geringer lokaler Krümmung C

$$C\mathbf{n} = \frac{\partial \mathbf{u}(s)}{\partial s} = \frac{\partial^2 \mathbf{r}(s)}{\partial s^2}, \quad (3.4)$$

d.h. bei kleiner Änderung des Tangentialvektors $\mathbf{u}(s)$ mit s , können Querschnitt und I_a als konstant angesehen werden. Die lokale Krümmung ist dann über die Biegesteifigkeit κ , dem Produkt aus Elastizitätsmodul E und Flächenträgheitsmoment I_a mit dem Biegemoment M_B der angreifenden Kraft verknüpft:

$$C = \frac{M_B}{\kappa} = \frac{M_B}{EI_a} = \frac{\pi a^4 M_B}{4E} \quad (3.5)$$

Zahlreiche Messungen der Biegesteifigkeit von F-Aktin durch fluoreszenzmikroskopische Analyse der Filamentbewegungen führten zu Werten im Bereich von 10^{-26} Nm^2 [64, 94]. Vergleichsmessungen an mit Phalloidin stabilisierten und ungestabilisierten Filamenten durch *Isambert et al.* lieferten – einhergehend mit einer Verdopplung der Persistenzlänge – Werte von $3,6 \times 10^{-26} \text{ Nm}^2$ für ungestabilisierte und $7,6 \times 10^{-26} \text{ Nm}^2$ für stabilisierte Filamente [90].

Neben der simplen Biegung kann eine Polymerkette, anders als bislang angenommen, auch einer axialen Deformation unterliegen. Wird eine Kraft F auf die beiden Enden eines gestreckten, idealen Filaments ausgeübt, so kommt es zu einer gleichmäßigen Dehnung oder Kompression der Struktur. Die Verbindung zwischen dem durch die Kraft ausgeübten Druck und der relativen Längsdeformation $\Delta s/s$

$$\frac{F}{A} = \frac{F}{\pi a^2} = E \frac{\Delta s}{s} \quad (3.6)$$

stellt das Elastizitätsmodul E dar. Je höher der Widerstand, den ein Material seiner Verformung entgegensetzt, desto größer ist der Betrag des Elastizitätsmoduls. Dabei wird der Widerstand, also das Verhältnis $F/\Delta L = EA/L$, auch als Dehnungssteifigkeit ε des Materials bezeichnet. Röntgenbeugungsanalysen und Einzelfilamentmessungen an Aktin durch *Kojima et al.*, mittels dem AFM-Messprinzip ähnelnder Mikronadeltechnik, lieferten für ε bei $1 \mu\text{m}$ langen Aktinfilamenten Werte von $\approx 45 \text{ pN/nm}$ sowie ein abgeschätztes E-Modul von $1,8 \times 10^9 \text{ N/m}^2$ [102]. Damit liegen Aktinfilamente um eine Größenordnung unter den für viele Metalle üblichen Werten.

Überschreitet die komprimierende Kraft einen kritischen Wert F_C , so führt dies nicht mehr länger zu einer reinen Verkürzung des Polymers. Stattdessen beginnt sich das Filament zu verkrümmen, eine Eigenschaft von besonderer Bedeutung für das Verhalten von Zellen unter

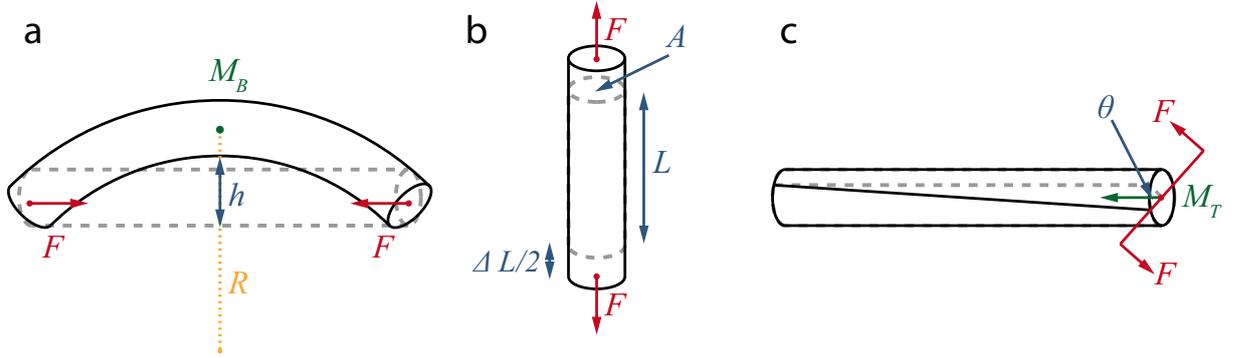


Abbildung 3.3: Deformationsformen eines idealen Polymers unter Angabe der wichtigsten Kenngrößen. (a) Biegung, (b) Dehnung, (c) Torsion.

äußerer Krafteinwirkung. Im Falle der Filamentorientierung entlang der x-Achse von $x = 0$ bis $x = L$ kommt es unter Krafteinwirkung zu einem Biegemoment $M_B(x)$ und einer transversalen Auslenkung $h(x)$, im Gleichgewicht verbunden durch

$$M_B(x) = Fh(x) . \quad (3.7)$$

Im Falle schwach gekrümmter Kurven lässt sich $\mathbf{r}(s)$ durch $h(x)$ ersetzen, so dass unter Verwendung der Gleichungen 3.5 und 3.4 und Beachtung des Krümmungsverlaufs

$$\frac{d^2h(x)}{dx^2} = -\frac{F}{EI_a}h(x) \quad (3.8)$$

folgt. Gleichung 3.8 entspricht der Differentialgleichung eines einfachen harmonischen Oszillators, deren Lösungen Linearkombinationen der Form $h(x) = A \cdot \sin(mx) + B \cdot \cos(mx)$ darstellen. Unter Beachtung der Randbedingungen $h(0) = h(L) = 0$ ergibt sich die geforderte Lösung zu

$$h(x) = h_{max} \sin(n\pi x/L) \quad (3.9)$$

mit h_{max} als Amplitude der Auslenkung und der Modenanzahl n . Eingesetzt in Gleichung 3.8 folgt daraus die zur Biegung notwendige kritische Kraft F_C zu

$$F_C = \pi^2 \frac{EI_a}{L^2} , \quad (3.10)$$

welche unabhängig von der Amplitude der Auslenkung ist. Betrachtet man ein Aktinfilament mit einer durchschnittlichen Biegesteifigkeit von $\kappa = 5 \times 10^{-26} \text{ Nm}^2$ unter einer kompressiven Kraft von 5 pN, wie sie auf zellulärer Ebene üblich ist, so kommt es schon ab Filamentlängen von *approx* 300 nm zu einer Verkrümmung. Um dieser Kraft über die Dimension einer Zelle von mehreren Dutzend Mikrometern widerstehen zu können müssten sich daher viele Dutzend Filamente zu einem gebündelten Strang zusammenlagern. Für Mikrotubuli, mit einer um den

Faktor 10-100 höheren Persistenzlänge, genügen hingegen bereits Bündel aus einigen wenigen Filamenten, wie sie beispielsweise in Flagella vorkommen.

Eine weitere Art der Verformbarkeit stellt die Torsion dar. Betrachtet man ein ideales, zylinderförmiges Filament der Länge L , das an einem Ende fixiert ist, so kommt es bei Angriff eines Drehmoments M_T am anderen Filamentende zu einer Rotation Θ des Abschlusssegmentes um die Polymerachse. Das Verhältnis von angreifendem Moment zu Verwindung $\alpha = \Theta/L$ des Zylinders stellt die Torsionssteifigkeit

$$\theta = \frac{M_T}{\alpha} \quad (3.11)$$

dar. Wie die Biegesteifigkeit κ proportional zum Elastizitätsmodul E des Filamentes ist, so steht θ in direkter Relation mit dem sogenannten Schub- oder Schermodul G und dem Torsionsdrehmoment I_t . Für den Fall eines kreisrunden Stabes ist $I_t = I_a$ woraus

$$\theta = GI_t = G \frac{\pi a^4}{2} \quad (3.12)$$

folgt. Die starke Abhängigkeit der Torsions- und Biegesteifigkeit vom Radius des Filamentes erfordert eine genaue Kenntniss der Struktur, was – wie im Falle des helikalen F-Aktins – zu unkalkulierten Faktoren führen kann. Die Ermittlung der Torsionssteifigkeit filamentösen Aktins gelang experimentell beispielsweise durch den Einsatz optischer Pinzetten. Ein Filament, fixiert auf der Oberfläche wurde am freien Ende an eine Mikrokugel angebunden. Durch Beschichtung der Partikeloberfläche mit fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln konnte dessen Rotation innerhalb der optischen Falle beobachtet und θ zu $(8,0 \pm 1,2) \times 10^{-26} \text{ Nm}^2$ bestimmt werden [207].

3.1.3 Spannung und Deformation in Netzwerken

Im Falle eines 2- oder 3-dimensionalen Polymernetzwerkes lässt sich bei Deformation aufgrund der zufälligen Ausrichtung keine Unterscheidung mehr nach Dehnung, Biegung oder Torsion einzelner Filamente treffen. Stattdessen findet ein Übergang zu einer kontinuumsmechanischen Betrachtung statt.

Die Deformation eines Körpers durch eine äußere Kraft, einschließlich der thermischen Anregung durch umgebende Teilchen, lässt sich anhand eines Verschiebungsvektors $\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \mathbf{r}' - \mathbf{r}$ beschreiben. Dabei ist die Verschiebung abhängig vom Ort \mathbf{r} und nicht zwingend uniform über die Punkte des Körpers. Tatsächlich beschreibt $\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \text{const.}$ keine Deformation, sondern eine Verschiebung des Körpers als Gesamtheit. Abbildung 3.4 zeigt zwei mögliche Deformationen eines Modellnetzwerkes. Im Falle einer Scherung variiert beispielsweise die Verschiebung u_1 entlang x_1 mit x_2 . Die Beschreibung einer beliebigen Verformung lässt sich daher mittels eines Tensors zweiter Stufe, dem sogenannten symmetrischen Deformationstensor (engl.: *strain tensor*)

$$u_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} + \sum_k \frac{\partial u_k}{\partial x_i} + \frac{\partial u_k}{\partial x_j} \right) \quad (3.13)$$

vornehmen. Betrachtet man lediglich kleine Verzerrungen, so lässt sich der Tensor durch Vernachlässigung des quadratischen Terms linearisieren [20] und man erhält

$$u_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right). \quad (3.14)$$

Für den erwähnten Fall einer Verschiebung des gesamten betrachteten Körpers $\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \text{const.}$ verschwindet die Ableitung des Verschiebungsvektors, womit für alle Komponenten des Tensors $u_{ij} = 0$ gilt. In Übereinstimmung damit steht die Eigenschaft des Deformationstensors, dass sich die relative Änderung eines Volumenelements dV – respektive Flächenelements dA im 2-dimensionalen Fall – während der Deformation aus der Summe der Diagonalelemente ergibt:

$$\frac{dV' - dV}{dV} = \sum_{i=j} u_{ij}. \quad (3.15)$$

Die für die Deformation des Körpers verantwortliche Spannung resultiert aus dem Wirken ungleichmäßiger Kräfte auf die Oberfläche des betrachteten Körpers. Bewirken senkrecht zu einer Fläche wirkende Kräfte eine Dehnung oder Kompression, so führen Kräfte, die parallel an einer Oberfläche angreifen, zu einer Scherung des Körpers. Dies macht neben der Kraftamplitude und den Materialeigenschaften auch die Wirkungsrichtung der Kraft relativ zur Körperoberfläche zu einem für die Deformation relevanten Faktor. Gleichzeitig hängt die Deformation aber auch von der Größe der unter Krafteinwirkung stehenden Fläche ab. Um diesem Rechnung zu tragen werden die wirkenden Kräfte als Tensor σ_{ij} beschrieben, wobei sich die in Richtung x_i wirkende Gesamtkraft

$$F_i = \oint \left(\sum_j \sigma_{ij} dA_j \right) \quad (3.16)$$

als Integral aus dem Produkt der Tensorkomponenten und der entsprechenden Flächenelemente dA_i ergibt. σ_{ij} , allgemein als Spannungstensor (engl.: *stress tensor*) bezeichnet, besitzt in drei Dimensionen die Einheit Kraft pro Fläche, in zwei Dimensionen die Einheit Kraft pro Einheitslänge. Betrachtet man den in Abbildung 3.4 dargestellten, rechtwinkligen Ausschnitt eines Netzwerkes, so beschreiben die Diagonalelemente σ_{ii} sogenannte Normalspannungen, resultierend aus Kräften, die auf die Seitenflächen des Rechteckes wirken und die so verantwortlich zeichnen für Dehnung oder Kompression. Die restlichen Komponenten σ_{ij} , mit $i \neq j$, beschreiben Scherspannungen in Richtung x_j die an den parallel zu x_i verlaufenden Seiten angreifen.

Die zeitliche Abhängigkeit zwischen dem Verlauf einer Deformation u_{ij} und der inneren me-

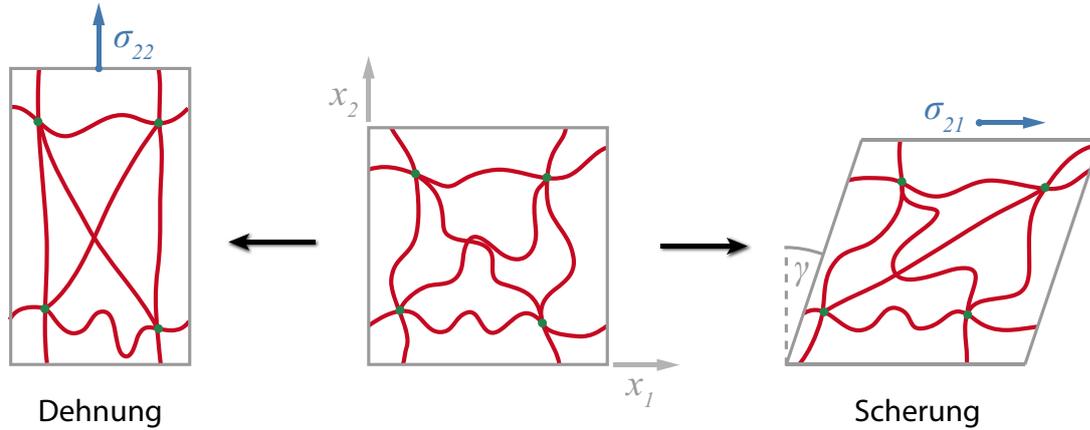


Abbildung 3.4: Dehnung und Scherung eines teilverbundenen Filamentnetzwerkes. In beiden Fällen induziert die Deformation eine Spannung in einzelnen Elementen des Netzes indessen Kräfte auf andere Elemente nicht beeinflusst oder sogar verringert werden.

chanischen Spannung σ_{ij} stellt der als Relaxations- bzw. viskoelastische Modul bezeichnete, bei Scherverformungen auch Schermodul genannte $G(t)$ mit der Einheit N/m^2 (Pascal, Pa) in 3 Dimensionen dar. Unter Beachtung des Superpositionsprinzips von Boltzmann, welches besagt, dass sich für kleine Änderungen eine lineare Überlagerung der Spannungen und der dafür verantwortlichen Deformationen herstellen lässt, d.h., dass die Einzelterme unabhängig voneinander sind, ergibt sich der Zusammenhang zu

$$\frac{d\sigma_{ij}}{dt} = G(t)2 \frac{du_{ij}}{dt} \quad (3.17)$$

Die internen Verformungen der Netzwerkfilamente, d.h. die Änderung der internen Spannung $\sigma(t)$ folgt der äußeren Verformung, d.h. den wirkenden Kräften mit einer gewissen Verzögerung. Damit hängt die Spannung σ zum Zeitpunkt t vom Verlauf der Deformation $u(t')$, mit $t' < t$ ab. Aufgrund des Superpositionsprinzips folgt $\sigma(t)$ somit aus der Summe aller vorhergehenden Deformationen, oder nach Übergang zum Kontinuum aus dem zeitlichen Integral

$$\sigma_{ij}(t) = -p\delta_{ij} + 2 \int_0^t G(t-t') \frac{\partial u_{ij}(t')}{\partial t} dt' . \quad (3.18)$$

mit dem konstanten, isotropen Druck p in Raumrichtung x_i . Betrachtet man lediglich Spannungsdifferenzen, so verschwindet der erste Term in Gleichung 3.18. Für den Fall einer variierenden Scherspannung $\sigma(t)$ ergibt sich so die zentrale Gleichung

$$\sigma(t) = \int_0^t G(t-t') \frac{\partial \gamma(t')}{\partial t} dt' \quad (3.19)$$

mit dem Scherwinkel $\gamma \approx 2u_{21}$.

Nachfolgend seien zwei Spezialfälle für den Spannungsverlauf betrachtet. Ist der Relaxationsmodul $G(t) = G_0$ zeitlich konstant, so folgt daraus für die Spannung:

$$\sigma(t) = G_0 \cdot \gamma(t) . \quad (3.20)$$

Dies ist analog zum Hookeschen Gesetz für das Verhalten rein elastischer Feststoffe. Ein näherungsweise konstantes Relaxationsmodul tritt beispielsweise auf, wenn eine nichtnewtonsche Flüssigkeit schnellen Deformationsänderungen unterzogen wird. Die ansonsten viskose Flüssigkeit nimmt sodann elastische Eigenschaften an. Für den umgekehrten Fall einer punktuell auftretenden Relaxation zum Zeitpunkt t , ausgedrückt durch $G(t) = \eta\delta(t)$ ergibt sich

$$\sigma(t) = \eta \frac{\partial \gamma(t)}{\partial t} = \eta \dot{\gamma} \quad (3.21)$$

mit der Viskosität des Materials η [Ns/m²] und der Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$. Dies entspricht dem Newtonschen Gesetz für rein viskose Flüssigkeiten und tritt ein, wenn beispielsweise eine nicht-newtonsche Flüssigkeit langsamen Deformationen unterzogen wird. Gleichung 3.19 erlaubt somit – bei geeigneter Wahl von $G(t)$ – die Beschreibung des komplexen viskoelastischen Verhaltens eines Materials.

3.1.4 Maxwell- und Kelvin-Voigt-Modell

Zur Beschreibung der allgemeinen Fälle bedient man sich unterschiedlicher mechanischer Modelle, zusammengesetzt aus seriellen und parallelen Anordnungen von Federn und Dämpfern, die jeweils unterschiedliche Aspekte des Verhaltens viskoelastischer Körper widerspiegeln. Zu den Grundlegendsten zählen dabei das Maxwell- (Feder und Dämpfer in Serie geschaltet) und das Kelvin-Voigt Modell (Feder und Dämpfer parallel geschaltet) welche in Abbildung 3.5 (a) dargestellt sind.

Analog zur Aufteilung von elektrischem Strom und Spannung in Reihen- und Parallelschaltungen von Widerständen kommt es bei den betrachteten Systemen zu einer Aufspaltung von Deformation und Spannung über die einzelnen Grundelemente. In einer Reihenschaltung entspricht die Gesamtdeformation der Summe der Einzeldeformationen, $\gamma = \sum_i \gamma_i$, während die Gesamtspannung gleich der an den einzelnen Elementen angreifenden Spannungen, $\sigma = \sigma_i$, ist. Im Falle einer Parallelschaltung kehren sich die Verhältnisse um: Die Gesamtspannung entspricht der Summe der Einzelspannungen, $\sigma = \sum_i \sigma_i$, während die Gesamtdeformation gleich den Deformationen der einzelnen Elemente, $\gamma = \gamma_i$, ist.

Das Verhalten des Gesamtsystems spiegelt dabei die Eigenschaften der einzelnen Elemente wider, wie es auch in Abbildung 3.5 (b) dargestellt ist:

- Federelemente mit Federkonstante G_0 reagieren auf äußere Kräfte durch instantane Verfor-

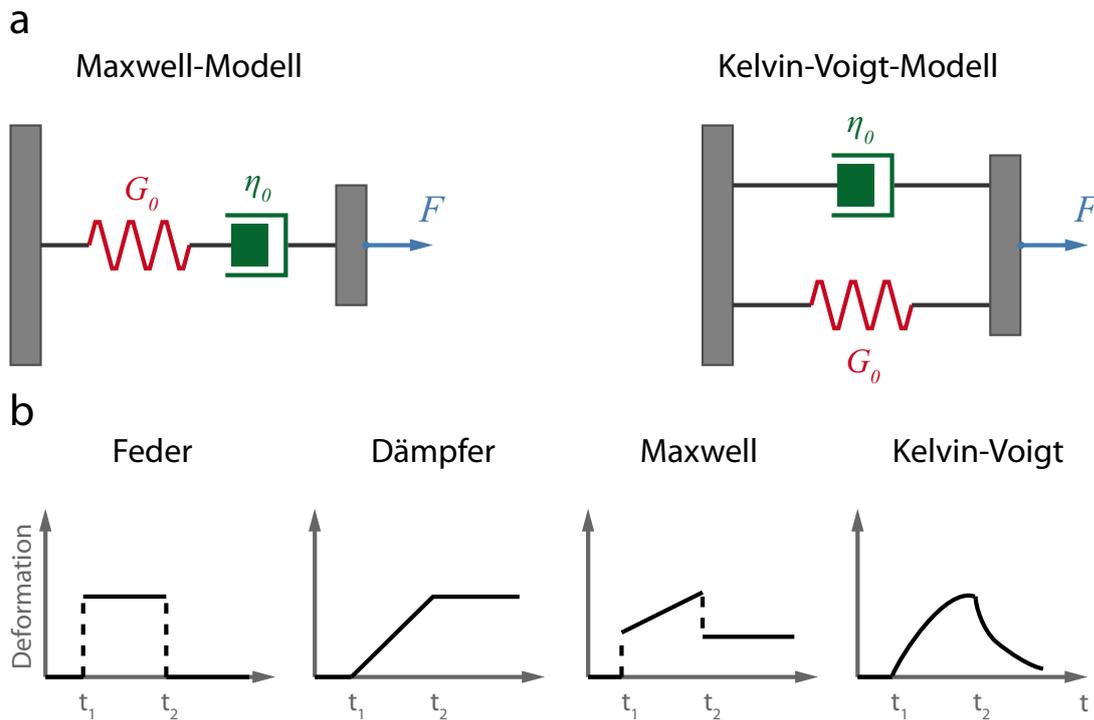


Abbildung 3.5: Mechanische Modelle zur Beschreibung viskoelastischer Materialien (a) und Deformationskurven der Elemente (b). Im Maxwell-Modell sind Feder und Dämpfer in Reihe, im Kelvin-Voigt-Modell parallel geschaltet. (b) zeigt die Deformationskurven der unterschiedlichen Elemente auf eine konstante äußere Spannung zwischen den Zeiten t_1 und t_2 .

mung bis zum kraftausgleichenden Maximalwert. Sie entsprechen damit dem energiespeichernden, elastischen Verhalten eines Festkörpers.

- Dämpfungselemente mit Viskosität η_0 reagieren durch eine linear ansteigende Verformung. Sie entsprechen damit dem dissipativen, viskosen Verhalten einer Flüssigkeit.

Polymernetzwerke sind in der Lage durch Filamentdeformation Energie zu speichern. Gleichzeitig kann es durch Filamentverschiebung zu einer Energieleitung wie in Flüssigkeiten kommen. Sie zeigen daher im allgemeinen ein viskoelastisches Verhalten. Aus Gleichungen 3.20 und 3.21 folgt für den zeitlichen Verlauf der Deformation, aufgespalten in elastisches

$$\dot{\gamma}_{el} = \frac{\dot{\sigma}_{el}}{G_0} \quad (3.22)$$

und viskoses Element:

$$\dot{\gamma}_{vis} = \frac{\sigma_{vis}}{\eta_0} . \quad (3.23)$$

Im Falle des newtonschen Modellsystems setzt sich – wie die Gesamtdeformation – auch deren

zeitliche Ableitung aus der Summe der Deformationsänderungen zu

$$\dot{\gamma} = \dot{\gamma}_{el} + \dot{\gamma}_{vis} = \frac{\dot{\sigma}_{el}}{G_0} + \frac{\sigma_{vis}}{\eta_0} \quad (3.24)$$

respektive

$$\dot{\gamma}\eta = \tau\dot{\sigma}_{el} + \sigma_{vis} \quad (3.25)$$

zusammen. Dabei stellt $\tau = \eta_0/G_0$ eine charakteristische Relaxationszeit dar. Für den Fall einer konstanten äußeren Spannung zwischen den Zeiten t_1 und t_2 ist $\dot{\sigma}_{el} = 0$ und die Deformation

$$\gamma(t) = const. + \frac{\sigma_{vis}}{\eta} \cdot t \quad (3.26)$$

steigt linear mit der Zeit an. Dabei kommt es zum Zeitpunkt t_1 zu einem Deformationssprung resultierend aus der instantanen Verformung der Feder, während der lineare Anstieg rein auf das Verhalten des Dämpfungselements zurückzuführen ist. Klingt die Spannung ab, so relaxiert die Feder instantan und es kommt zu einer Abnahme der Deformation. Dennoch bleibt das System auch nach t_2 in einem deformierten Zustand aufgrund der Energiedissipation, die eine Rückführung des Dämpfungselementes in seine Ausgangslage verhindert.

Im Kelvin-Voigt-Modell setzt sich – wie erläutert – die Gesamtspannung aus der Summe der Einzelspannungen zusammen. Unter Verwendung von Gleichungen 3.22 und 3.23 ergibt sich:

$$\sigma = G_0\gamma + \eta\dot{\gamma} . \quad (3.27)$$

Für den Fall einer konstanten äußeren Spannung im Zeitraum $t_1 < t < t_2$ entspricht die Lösung dieser Differentialgleichung einer Exponentialfunktion der Form

$$\gamma(t) = \frac{\sigma}{G_0} \left(1 - e^{-t/\tau} \right) . \quad (3.28)$$

Es kommt also zu einem exponentiellen Anstieg der Deformation und zu einer ebensolchen Rückkehr in den relaxierten Zustand für $t > t_2$.

3.1.5 Der komplexe viskoelastische Schermodul G^*

Um der Frequenzabhängigkeit des Verhältnisses von Spannung $\sigma(t)$ und Deformation $\gamma(t)$ – wie sie beispielsweise beim variierenden Verhalten nichtnewtonscher Flüssigkeiten zum Ausdruck kommt – Rechnung zu tragen werden die viskoelastischen Eigenschaften in der Regel als komplexer Schermodul $G^*(\omega)$ beschrieben. Dabei entspricht $G^*(\omega)$ der Fouriertransformierten des zeitlich abgeleiteten Schermoduls $G(t)$:

$$G^*(\omega) = \mathcal{F} \left[\frac{dG(t)}{dt} \right] \quad (3.29)$$

Nimmt man für die Deformation – wie bei vielen aktiven Messmethoden der viskoelastischen Parameter üblich (vgl. auch Abschnitt 3.2.1) – ein oszillatorisches Verhalten $\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$ mit der Deformationsrate $\dot{\gamma} = \omega \gamma_0 \cos(\omega t)$ an, so folgt unter Verwendung von Gleichung 3.19 und des Additionstheorems $\cos(\alpha \pm \beta) = \cos \alpha \cos \beta \mp \sin \alpha \sin \beta$

$$\begin{aligned} \sigma(t) &= \int G(t-t') \omega \gamma_0 \cos(\omega t') dt' \\ &= \gamma_0 \left[\omega \int_0^\infty G(\tau) \sin \omega \tau d\tau \right] \sin \omega t + \gamma_0 \left[\omega \int_0^\infty G(\tau) \cos \omega \tau d\tau \right] \cos \omega t \end{aligned} \quad (3.30)$$

mit der Substitution $\tau = t - t'$ [20]. Während der erste Term augenscheinlich in Phase mit der Deformation des Objektes ist und somit die elastischen Eigenschaften widerspiegelt, beinhaltet der zweite, um $\pi/2$ phasenverschobene Term das viskose Materialverhalten. Gleichzeitig sind die Integrale nach Substitution nicht mehr länger abhängig von t , sodass sich auch schreiben lässt

$$\sigma = \gamma_0 (G'(\omega) \sin \omega t + G''(\omega) \cos \omega t) \quad (3.31)$$

mit dem Speicher- $G'(\omega) = \text{Re } G^*(\omega)$ und Verlustmodul $G''(\omega) = \text{Im } G^*(\omega)$. Für die komplexe Viskosität $\eta(\omega)$ folgt sodann

$$\eta(\omega) = \frac{1}{\omega} \sqrt{G'^2(\omega) + G''^2(\omega)}. \quad (3.32)$$

Obwohl hier für den speziellen Fall einer sinusförmigen Materialdeformation hergeleitet kann die Aufteilung des Schermoduls in elastische und viskose Anteile auch allgemein als Verhältnis zwischen den Fouriertransformierten der Spannung $\hat{\sigma}(\omega)$ und Deformation $\hat{\gamma}(\omega)$

$$\frac{\hat{\sigma}(\omega)}{\hat{\gamma}(\omega)} = G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (3.33)$$

betrachtet werden.

3.2 Mikrorheologie

Aufklärung über die viskoelastischen Eigenschaften eines Objektes liefert das weite Feld der Rheologie. Wie am Beispiel einer nichtnewtonschen Flüssigkeit erläutert, lassen sich reale Materialien weder mittels des Hookschen Gesetz für ideale Festkörper noch nach dem Newtonschen Gesetz für ideale Flüssigkeiten vollständig beschreiben. Stattdessen verfügen sie über ein frequenzabhängiges Verhalten, welches je nach Bereich durch eine verschiedenen starke Überlagerung aus elastischem Deformations- und verzögertem viskosen Fließverhalten entsteht. Für eine materialspezifische Anwendung über einen möglichst breiten Frequenz- und Druckbereich stehen dabei multiple Messmethoden zur Verfügung.

3.2.1 Rheologie und Prinzip der Mikrorheologie

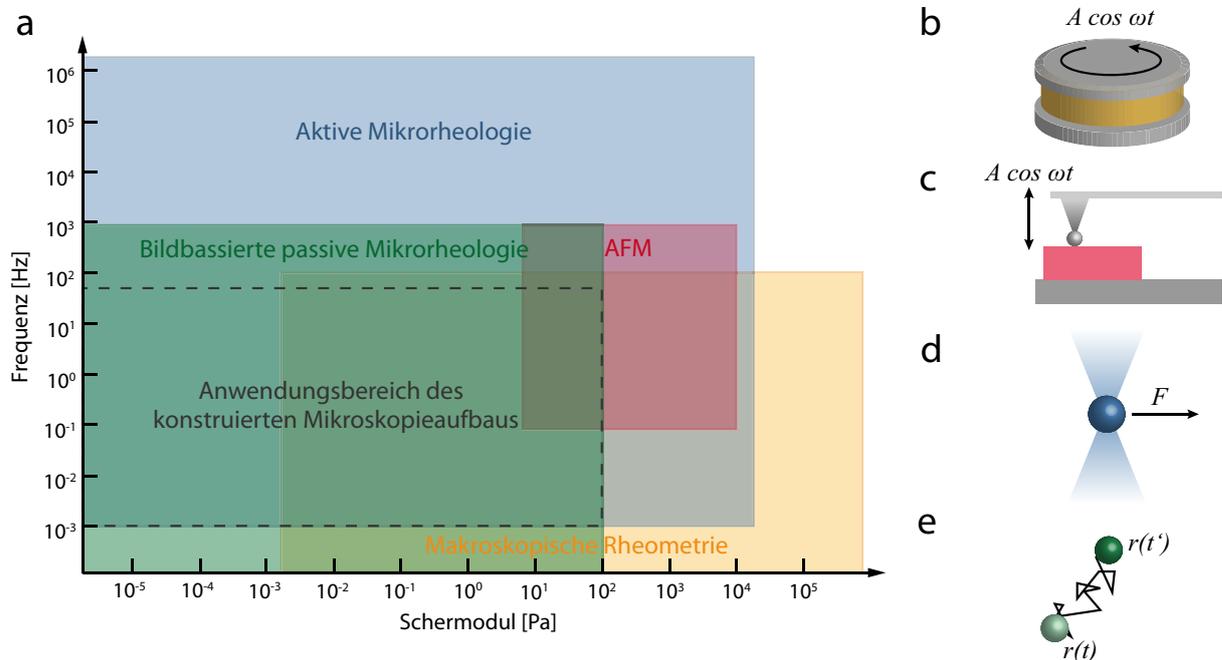


Abbildung 3.6: Auswahl und Anwendungsbereich (a) makro- und mikrorheologischer Techniken: Rotationsrheometer (b), AFM basierte Oszillationsrheometrie (c), aktive Mikrorheologie mittels optischer Pinzette (d), passive Mikrorheologie (e). Im Diagramm markiert auch der Einsatzbereich des konstruierten Mikroskopieaufbaus. (Adaptiert nach [28].)

Abbildung 3.6 zeigt eine Auswahl sowohl makroskopischer als auch mikroskopischer Rheologietechniken. Zur Untersuchung von Festkörpern im mittleren Frequenzbereich werden häufig mechanische Rheometer wie Dehn-, Kapillar- oder das in (a) abgebildete Rotationsrheometer verwendet. Während Ersteres der Bestimmung der Dehnviskosität dient ist Ziel der Weiteren die Ermittlung viskoelastischer Parameter bei Scherung. Dabei ist ihnen allen gemein, dass das zu untersuchende Material einer teilweise variierenden äußeren Krafteinwirkung unterzogen wird, die zu einer Materialverformung führt und die Berechnung der Materialparameter über die Messung der ausgeübten Kraft und der Deformation erfolgt. Einen direkteren Zugang zu den Materialparametern stellen Methoden der Akustik oder der dynamischen Lichtstreuung dar, bei welchen Informationen der gestreuten Wellen mit der atomaren Bewegung der Festkörper verknüpft werden.

Bei der Anwendung an biologischen Präparaten weist die klassische Rheologie jedoch häufig Nachteile auf. Zum einen werden für die Messgeräte im allgemeinen Probenvolumina benötigt, die weit über der zellulären Größenordnung liegen, zum anderen handelt es sich bei biologischen Präparaten meist um relativ weiche Materialien, deren typischer Druck- und Frequenzbereich mit makroskopischen Techniken nur beschränkt zugänglich ist. Darüber hinaus ist es nicht möglich

mit ihnen lokale Parameter in Zellen oder Netzwerken zu messen. Zum Einsatz hierbei kommen daher vor allem die Techniken der passiven und aktiven Mikrorheologie [28].

Der Begriff der Mikrorheologie bündelt – wie auch die Makrorheologie – eine Vielzahl unterschiedlicher Techniken, die darauf abzielen, die Materialeigenschaften bei Verwendung möglichst kleiner Probenvolumina zu ermitteln [121]. Dazu zählen neben einzelpartikelbeobachtenden Techniken auch die diffusive Wellenspektroskopie [155] sowie Messungen mittels AFM. Besonders im Rahmen von *in vivo* Experimenten bietet die AFM die Möglichkeit die lokalen Eigenschaften von Zellen unter äußerer Kraffteinwirkung zu studieren [231]. Daneben zeigen sich jedoch auch wieder starke Beschränkungen im einsetzbaren Frequenz- und Druckbereich der Technik. Ein breiteres Einsatzspektrum bietet hierbei die partikelverfolgende Mikrorheologie.

Bei der Partikel-Mikrorheologie werden mikro- oder nanometergroße, kolloidale Probenpartikel in das zu untersuchende Material eingebracht – oder spezifisch angebunden – und ihre Bewegung mittels konventioneller Hellfeld- oder Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet. Die Verfolgung der Partikelbewegung kann dabei sowohl über ein entsprechendes Kamerasystem als auch anhand einer 4-Quadranten-Diode erfolgen. Während die Beobachtung anhand Dioden über einen breiteren Frequenzbereich erfolgen kann, da sie über eine geringere Detektorauslesezeit verfügen, ermöglichen Kameras die gleichzeitige Beobachtung multipler Partikel. Die theoretische Betrachtung (vgl. Abschnitt 3.2.3) ermöglicht dann die Verknüpfung der Partikeltrajektorie mit dem Schermodul des umgebenden Materials.

In der aktiven Partikel-Mikrorheologie werden eingebundene Partikel mittels optischer oder magnetischer Pinzetten einer periodischen oder impulsartigen Auslenkung unterzogen, die zu einer aktiven Verformung des Materials führt. Während erstere der Ermittlung des frequenzabhängigen Schermoduls $G^*(\omega)$ dient wird im zweiten Fall die Kriechfunktion $J(t)$ gemessen, welche mit dem zeitabhängigen Schermodul über

$$\int_0^t J(t-t')G(t')dt' = t \quad (3.34)$$

verknüpft ist. Der Unterschied der beiden Funktionen $J(t)$ und $G(t)$ liegt dabei lediglich in der charakteristischen Form des Messprozesses. $J(t)$ beschreibt das innere Deformationsverhalten

$$\gamma(t) = \int_0^t J(t-t') \frac{d\sigma(t')}{dt'} dt' \quad (3.35)$$

welches einer angelegten Kraft d.h. äußeren Spannung folgt, wohingegen der bereits in Gleichung 3.19 definierte Schermodul $G(t)$ bzw. $G^*(\omega)$ die Relaxation der internen Spannungen mit einer vorausgehenden äußeren Deformation verknüpft.

Bei der simpleren, aber nicht minder effektiven Technik der passiven Mikrorheologie wird die mittlere quadratische Verschiebung (MQV) der Probenpartikel aufgrund thermischer Anregung

registriert. Während in der aktiven Mikrorheologie der Messbereich auf das Frequenzspektrum der Kraftquelle limitiert ist und nichtlineare Deformationen erreicht werden können, spiegeln die Partikelbewegungen im passiven Fall das exakte lineare Antwortverhalten der Materialparameter wider und decken das gesamte Frequenzspektrum ab. Der messbare Frequenzbereich hängt hierbei also lediglich von der Detektion und nicht von der für die Kraftausübung nötigen Apparatur ab.

Die Abweichung der Partikelbewegung vom freien Diffusionsverhalten stellt ein Maß für die elastischen Eigenschaften des Materials dar. Dabei müssen die lokal gemessenen Parameter aufgrund von Strukturinhomogenitäten des Materials nicht notwendigerweise mit makrorheologischen Messresultaten übereinstimmen. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen und zu eher makroskopischen Materialparametern zu gelangen, ist die Bestimmung der Bewegungskorellation multipler Partikel [210]. Um den Zusammenhang zwischen Partikel- und Netzwerkbewegung zu verdeutlichen und um eine Grundlage für die Interpretation der experimentellen Resultate zu liefern soll im Folgenden das grundlegende Verhalten eines Probenpartikels in 2- und 3-dimensionalen, semiflexiblen Netzwerken erläutert werden.

3.2.2 Probenpartikel und Einzelfilamente in semiflexiblen Polymernetzwerken

Zusammen mit den mechanischen Eigenschaften einzelner Polymerstränge ist die Filamentkonzentration und -dimension einer Polymerlösung von ausschlaggebender Bedeutung für die viskoelastischen Eigenschaften: In verdünnten Lösungen zeigen Filamente aufgrund der großen räumlichen Distanz zwischeneinander nur äußerst schwache Wechselwirkungen. Probenpartikel und einzelne Filamente können sich nahezu ungehindert bewegen und es dominieren die viskosen Eigenschaften des umgebenden Mediums. Abbildung 3.7 (b) zeigt den mit t steigenden MQV-Verlauf eines Partikels in einer rein viskosen Flüssigkeit. Die Partikelbewegung entspricht dabei dem Fall einer freien Diffusion gemäß *Einstein*. Dem gegenüber stehen konzentrierte Lösungen mit einer isotropen Netzwerkstruktur. Den Extremfall einer solch hochkonzentrierten Lösung stellt ein elastischer Festkörper dar, dessen eingebettete Partikel ein von der Zeit unabhängiges, konstantes Bewegungsverhalten zeigen.

Zwischen diesen beiden Extremfällen liegt ein Kontinuumsbereich, indem eine gestiegene Konzentration und/oder Polymerlänge zu einer Verschränkung der Filamente (engl.: *entangled filaments*) untereinander und zu einer unterdrückten Diffusion aufgrund ihrer semiflexiblen Natur führen. Aufgrund variierender Länge der Polymerketten lässt sich die Dichte eines Netzwerkes weder im 2- noch im 3-dimensionalen Fall direkt über deren Monomerkonzentration angeben. Stattdessen wird der mittlere Abstand zwischen zwei Filamentkreuzungspunkten, die sogenannte Maschenweite ξ (vgl. Abbildung 3.7 (a)) als beschreibendes Maß genutzt. Für 3-dimensionale Aktinglele konnte aufgrund der durchschnittlichen Filamentlänge eine empirische Abhängigkeit von der G-Aktin Konzentration entsprechend

$$\xi = 0,34/\sqrt{c_A} \text{ } \mu\text{m} \quad (3.36)$$

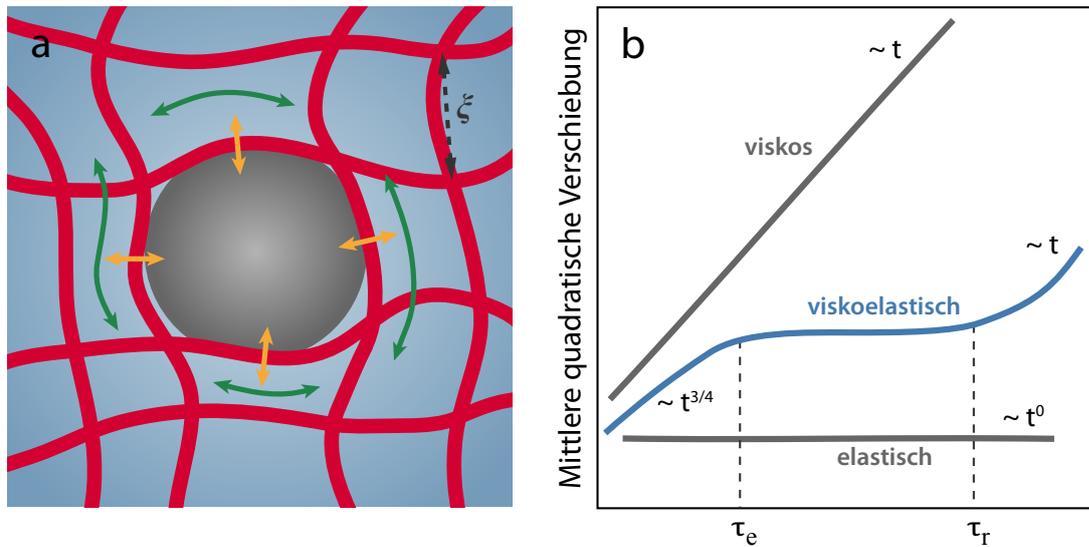


Abbildung 3.7: Veranschaulichung der longitudinalen (grün) und transversalen (gelb) Filamentbewegungen in einem vernetzten Netzwerk (a) und deren Auswirkungen auf das mittlere Verschiebungsquadrat von Probenpartikeln (b). (Adaptiert nach [223].)

(mit c_A in mg/ml) ermittelt werden [178]. Dies lässt sich jedoch nicht auf Netzwerke aus Aktinbündeln oder Aktinstrukturen auf Säulensubstraten übertragen. Hier ist eine Dateninterpretation nur durch Vergleich mit Fluoreszenzaufnahmen möglich.

Wie von *Wong et al.* gezeigt hängt die Bewegung eines Probenpartikels in Aktinellen in hohem Maße vom Verhältnis zwischen Durchmesser der Probenpartikel $2a$ und Maschengröße ξ ab [224]. Für Probenpartikel mit $2a < \xi$ gewinnen die viskosen Eigenschaften des umgebenden Lösungsmittels mit abnehmendem Durchmesser zunehmend an Bedeutung, während sich die hydrodynamische Interaktion mit den Netzwerkfilamenten verringert. Die Bewegung lässt sich sodann vergleichen mit der Bewegung von Makromolekülen durch das zelluläre Skelett, die mechanischen Eigenschaften der Polymerfilamente spiegelt dies jedoch nur noch in begrenztem Rahmen wieder. Ausschlaggebend für die Untersuchung an 3-dimensionalen Gelen ist daher die Verwendung von Probenpartikeln deren Durchmesser deutlich über der Maschengröße liegt. Im vorliegenden Fall der 2- und 1-dimensionalen Strukturen macht die räumliche Begrenzung des Netzwerkes eine aktive Anheftung der Partikel an die Aktinstränge nötig, welche die Abhängigkeit der Messresultate von der Partikelgröße entkoppelt.

Das in diesen Fällen für die Partikelbewegung dominierend verantwortliche Verhalten der Filamentbewegungen lässt sich wie in Abbildung 3.7 (a) dargestellt in Fluktuationen longitudinal $r_l(s,t)$ und transversal $r_t(s,t)$ zur lokalen Filamentorientierung einteilen. Von *Doi und Edwards* für flexible und starre Polymere entwickelt [42, 43, 47] und von *Morse* für semiflexible Polymere adaptiert stellt das sogenannte Reptationsröhren-Modell eine Grundlage für die Erklärung

der Filamentbewegungen dar. Die Bewegungsmöglichkeit des Polymers ist dabei für den Fall verschränkter Filamente auf eine Röhre längs der betrachteten Kette beschränkt. Charakterisiert wird sie durch den Röhrendurchmesser d_e und die Verschränkungslänge l_e entlang der Kontur zwischen zwei Verknüpfungspunkten. Innerhalb dieser Röhre können translatorische oder longitudinale Bewegungen im Rahmen der intrinsischen Materialparameter frei ausgeführt werden. Nähert sich die Bewegungsamplitude allerdings den Grenzen an, so unterliegt sie durch Interaktionen mit benachbarten Polymerketten einer Rückstellkraft $-k\mathbf{r}_t(s,t)$, was zu typischen Abklingzeiten führt. Das im Nachfolgenden beschriebene Polymerverhalten stellt lediglich eine grobe Vereinfachung dar, sodass reale Netzwerke ein zum Teil abweichendes Skalenverhalten in ihrem MQV-Verlauf zeigen. Für eine genauere Abhandlung über den Einfluss der Netzwerkparameter auf das Diffusionsverhalten von Probenpartikeln sei dabei auf die Arbeiten von *Morse* verwiesen [145, 146].

Für den Fall schwach verschränkter Netzwerke $\xi < l_e \approx l_p$ nähern sich die transversalen Bewegungen bei den in Abschnitt 3.1.2 diskutierten Bedingungen den Fluktuationen eines freien Filamentes an. Sie lassen sich so näherungsweise durch eine stochastische Differentialgleichung gemäß Langevin

$$\zeta_t \frac{\partial \mathbf{r}_t(s,t)}{\partial t} = -\kappa \frac{\partial^4 \mathbf{r}_t(s,t)}{\partial s^4} + \mathbf{f}_T(s,t) \quad (3.37)$$

ausdrücken, mit dem Reibungskoeffizienten ζ_t , der Biegesteifigkeit κ , der Langevin-Frequenz s und stochastisch angreifenden thermischen Kräften $\mathbf{f}_T(s,t)$. Die Reibungskräfte des umgebenden Mediums führen so auch ohne Interaktion mit benachbarten Filamenten zu einer Abklingdauer τ_t

$$\tau_t = \frac{\zeta_t}{\kappa} \lambda^4 = \frac{\zeta_t}{k_B T l_p} \lambda^4 \quad (3.38)$$

abhängig von der Wellenlänge λ der angeregten Schwingung und zu einer mittleren quadratischen Verschiebung $\langle (\Delta r_t(t'))^2 \rangle \equiv \langle [\mathbf{r}_t(t+t') - \mathbf{r}_t(t)]^2 \rangle_t$

$$\langle (\Delta r_t(t)) ^2 \rangle \propto \left(\frac{k_B T}{\zeta_t l_p^{1/3}} \right)^{3/4}. \quad (3.39)$$

Die longitudinale Bewegung wird hauptsächlich bestimmt durch die übliche Stokessche Diffusionsbewegung des Schwerpunkts in 2 Dimensionen $D_l = k_B T M$ mit der Mobilität M . Für den näherungsweisen Fall eines starren Stabes mit Länge $L_0 = l_c$ und Durchmesser $2a$ ergibt sich diese zu

$$D_l = k_B T M \approx \frac{k_B T \ln(l_c/2a)}{2\pi\eta l_c}. \quad (3.40)$$

Darüber hinaus liefern jedoch auch die fluktuierenden transversalen Schwingungen einen Beitrag zur longitudinalen Bewegung [66]. Während die Konturlänge l_c im *Wormlike-Chain-Modell* über alle Zeiten erhalten bleibt sorgen transversale Schwingungen zu einer ständig wechselnden Kon-

formation und variierenden Längsausdehnung, auch Projektionslänge $L < l_c$ genannt. Ausgehend von der Monge-Abschätzung für den Zusammenhang zwischen Projektionslänge und wahrer Filamentlänge

$$l_c = \int_0^{L(t)} \sqrt{1 + \left(\frac{\partial \mathbf{r}_t(x,t)}{\partial x} \right)^2} dx \cong L(t) \left(1 + \frac{1}{2} \overline{\left(\frac{\partial \mathbf{r}_t(x,t)}{\partial x} \right)^2} \right), \quad (3.41)$$

mit dem räumlichen Mittel $\overline{(\partial \mathbf{r}_t(x,t)/\partial x)^2}$, ergibt sich die MQV von L als Funktion der Transversalschwingungen $r_t(x,t)$ zu

$$\langle (\Delta L(t))^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\kappa} l_c \langle (\Delta \mathbf{r}_t(2t))^2 \rangle. \quad (3.42)$$

Die Tatsache von zufälligen Fluktuationen in der Projektionslänge impliziert, dass sich beide Enden in erster Näherung unabhängig voneinander bewegen und es zu einer verzögerten Reaktion im Verhältnis zueinander kommt. Dennoch kann für lange Zeiten „überschüssige“ Länge durch Fluktuationen von einem Filamentende zum Anderen geleitet werden, was effektiv einer Verschiebung des Schwerpunktes entspricht. Für den zusätzlichen Diffusionsbeitrag $D_{rep} \sim \langle (\Delta L(t))^2 \rangle$ ergibt sich so nach Abschätzung:

$$D_{rep} = \frac{\ln[l_c/\pi 2a]}{15\pi} \frac{(k_B T)^2}{\eta \kappa} = \frac{k_B T \ln[l_c/\pi 2a]}{15\pi} \eta l_p. \quad (3.43)$$

Betrachtet man stärker verschränkte oder verknüpfte Netzwerke, so werden die beschriebenen Filamentbewegungen durch Interaktion mit benachbarten Polymersträngen deutlich eingeschränkt. Qualitativ betrachtet erfahren transversale Schwingungen mit Wellenlängen $\lambda > l_e$ eine starke Dämpfung ebenso wie die longitudinale Diffusionsbewegung entlang der Reptationsröhre. Das Filamentverhalten wird somit charakterisiert durch eine Reihe statistisch unabhängiger Teilstücke mit Länge l_e . Dabei unterliegen sowohl die Verschränkungslänge als auch die Reptationsröhre ständigen Veränderungen durch Fluktuationen in der Netzwerkgeometrie.

Für die Filament- respektive Partikelbewegung resultiert dies in einem, vom MQV-Verlauf einer idealen Flüssigkeit abweichenden, reduzierten Diffusionsvermögen wie in Abbildung 3.7 (b) dargestellt. Für Zeiten kleiner als die Verschränkungszeit $\tau_e = \tau_l(\lambda = l_e)$ dominieren schnelle, transversale Fluktuationen \mathbf{r}_t der Filamente, die im Maximum zu einer mit $\sim t^{3/4}$ ansteigenden MQV führen. Beschränkte longitudinale Fluktuationen \mathbf{r}_l , die an \mathbf{r}_t gekoppelt sind liefern einen zusätzlichen Beitrag. Für größere Zeiten erreicht die Partikelbewegung aufgrund der Schwingungsdämpfung einen Plateaubereich, dessen Steigung von den Fluktuationen der Reptationsröhre respektive des Netzwerkes abhängig ist. Erst oberhalb einer Zeit τ_r , resultierend aus der Fortpflanzungsdauer einer longitudinalen Bewegung von einem Ende des Filaments zum Anderen, kann es zu einer Schwerpunktdiffusion des Polymers und somit zu einem MQV-Anstieg proportional zu t^1 kommen.

3.2.3 Theoretische Betrachtung der passiven Mikrorheologie

Entsprechend der beschriebenen Funktionsweise der Partikelmikrorheologie ist das Ziel der theoretischen Beschreibung die Verbindung der Bewegung eines eingeschlossenen Kolloids mit den rheologischen Eigenschaften des Umgebungsmaterials. Für den einfachen Fall der d-dimensionalen Bewegung in einer rein viskosen Flüssigkeit steigt das MQV eines Probenpartikels gemäß *Einstein* [49] linear mit der Zeit an:

$$\langle \Delta r^2(t') \rangle = 2dDt' . \quad (3.44)$$

D bezeichnet den Diffusionskoeffizienten, für welchen im Gleichgewichtszustand die Abhängigkeit

$$D = k_B T M \quad (3.45)$$

gilt, mit der hydrodynamischen Mobilität M , welche eine lineare Beziehung zwischen der Geschwindigkeit eines Teilchens und der auf es wirkenden Kraft in einem viskosen Medium herstellt. Für sphärische Partikel mit Radius a erhält man aus den Stokes Gleichungen die Beziehung $M = (2d\pi\eta a)^{-1}$. Kombiniert mit Gleichung 3.44 und 3.45 erhält man so einen Zusammenhang zwischen den thermischen Fluktuationen eines Teilchens und den rheologischen Eigenschaften (Viskosität η) des umgebenden Mediums, die sogenannte Stokes-Einstein Beziehung:

$$\frac{\langle \Delta r^2(t) \rangle}{2dt} = D = k_B T M = \frac{k_B T}{2d\pi\eta a} \quad (3.46)$$

Obwohl für den speziellen Fall einer rein newtonschen Flüssigkeit hergeleitet lässt sich dieser Ansatz auch für den Fall eines Mediums mit frequenzabhängiger Viskoelastizität verallgemeinern, wie von *Mason und Weitz* gezeigt [128, 130], sofern man annimmt, dass sich die Mobilität M durch ihr komplexes, frequenzabhängiges Analogon $M^*(\omega)$ ersetzen lässt indem η durch $\eta^*(\omega)$ ausgetauscht wird.

Ausgehend von der generalisierten Langevin-Gleichung zur Beschreibung der Brownschen Molekularbewegung für ein sphärisches Objekt mit Masse m und Geschwindigkeit $\mathbf{v}(t)$

$$m\dot{\mathbf{v}}(t) = \mathbf{f}_T(t) - \int_0^t \zeta(t-t')\mathbf{v}(t')dt' , \quad (3.47)$$

wobei $\zeta(t-t')$ die dämpfende Gedächtnisfunktion des Materials bezeichnet und im Laplaceraum mit der Mobilität über $\tilde{\zeta}(s) = \tilde{M}(s)^{-1} = 2d\pi a \tilde{\eta}(s)$ verknüpft ist. $\mathbf{f}_T(t)$ entspricht den auf den Partikel wirkenden stochastischen thermischen Kräften, dargestellt durch gaußsches weißes Rauschen.

Durch Laplace-Transformation von Gleichung 3.47 lässt sich die Gedächtnisfunktion mit der Autokorrelationsfunktion der Geschwindigkeit $\langle v(0)\tilde{v}(s) \rangle$ in Verbindung setzen. Nach unilateraler Laplace-Transformation folgt aus 3.47

$$m [\tilde{v}(s) - v(0)] = \tilde{f}_R(s) - \tilde{\zeta}(s) \quad (3.48)$$

beziehungsweise

$$\tilde{v}(s) = \frac{mv(0) + \tilde{f}_R(s)}{ms + \tilde{\zeta}(s)} \quad (3.49)$$

mit der Laplace-Frequenz s . Bildet man nach Multiplikation mit dem Randwert $v(t=0) = v(0)$ (invariant unter Laplace-Transformation) das zeitliche Mittel, so führt dies zu

$$\langle v(0)\tilde{v}(s) \rangle = \frac{m \langle v(0)^2 \rangle + \langle \tilde{f}_R(s)v(0) \rangle}{ms + \tilde{\zeta}(s)}, \quad (3.50)$$

der erwähnten Autokorrelationsfunktion. Berücksichtigt man weiterhin, dass es sich bei f_R um eine stochastische Kraft handelt, deren zeitliches Mittel im Gleichgewicht verschwindet, so ergibt sich unter Berücksichtigung des Equipartitionstheorems

$$\langle v(0)\tilde{v}(s) \rangle = \frac{2dk_B T}{ms + \tilde{M}^{-1}} \approx 2dk_B T \tilde{M}(s), \quad (3.51)$$

wobei d weiterhin die Dimensionalität der Partikelbewegung bezeichnet. Die generalisierte Form der Stokes-Einstein Beziehung erhält man schließlich unter Verwendung der Identitäten $\langle v(0)\tilde{v}(s) \rangle = \frac{s^2}{2} \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle$, mit der Laplacetransformierten der MQV und $\tilde{G}(s) = \tilde{\eta}(s)s$:

$$\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle = \frac{k_B T}{\pi a s^2 \tilde{\eta}(s)} = \frac{k_B T}{\pi a s \tilde{G}(s)} \quad (3.52)$$

beziehungsweise

$$\tilde{G}(s) = \frac{s}{2d\pi a} \left[\frac{2dk_B T}{s^2 \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle} - ms \right] \quad (3.53)$$

mit $\tilde{G}(s)$ als der Laplace-Transformierten des komplexen Relaxationsmoduls $G^*(\omega)$. Der letzte Term in Gleichung 3.53 spiegelt das Trägheitsverhalten des verwendeten Probenpartikels wider. Ist dessen Dichte vergleichbar zu jener des umgebenden Mediums so lässt sich der Term für Frequenzen bis zu $\approx 10^6$ Hz vernachlässigen und man erhält

$$\tilde{G}(s) = \frac{2dk_B T}{\pi a s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle}. \quad (3.54)$$

Obwohl die Generalisierung der Stokes-Komponente lediglich phänomenologisch ist, so decken sich die experimentellen Befunde mikrorheologischer Untersuchungen im Falle quasi-statischer Deformationen, Isotropie und Homogenität des Mediums mit denen klassischer, makroskopischer Messungen.

3.3 Qualitativer Vergleich der Analysemethoden

Die Anwendung von Gleichung 3.53 bzw. 3.54 ist in der Praxis mit einigen Schwierigkeiten verbunden. So erschweren verrauschte Daten zum einen die numerische Auswertung, zum anderen führt die Begrenztheit des Datensatzes bei Transformation zu unphysikalischem Verhalten und Abbruchfehlern an den Grenzfrequenzen. Zur Anwendung in der Mikrorheologie wurden daher unterschiedliche Herangehensweisen entwickelt, von denen hier die beiden Gebräuchlichsten nach *Mason* und *Evans*, sowie die in der Arbeit verwandte spezielle Adaption der „*splinelike interpolation*“ in ihren Grundzügen umrissen werden sollen.

3.3.1 Mason

Mason und Weitz [129, 130] umgingen die Probleme der numerischen Konvertierung, indem sie ein Verfahren lokal angepasster Exponentialfunktionen für die Beschreibung der mittleren quadratischen Verschiebung im Zeitraum $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ entwickelten. Hintergrund dafür ist das subdiffusive Verhalten von Probenpartikeln in viskoelastischen Materialien. Es lässt sich in Anlehnung an Gleichung 3.44 charakterisieren durch

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = Dt^\alpha \quad (3.55)$$

mit α zwischen 0 (rein elastisch) und 1 (rein viskos). In einem ersten Schritt schätzte *Mason* die MQV durch lokale Entwicklung um die Frequenz s zu

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle \approx \langle \Delta r^2(1/s) \rangle (st)^{\alpha(s)} \quad (3.56)$$

ab, mit der Amplitude $\langle \Delta r^2(1/s) \rangle$ und dem bereits eingeführten Exponentialkoeffizienten α , der sich entsprechend

$$\alpha(s) \equiv \left. \frac{d \ln \langle \Delta r^2(t) \rangle}{d \ln t} \right|_{t=1/s} \quad (3.57)$$

aus der zeitlichen logarithmischen Ableitung der mittleren quadratischen Verschiebung ergibt [128]. Durch Laplacetransformation dieser Entwicklung $s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle \approx \langle \Delta r^2(1/s) \rangle \Gamma [1 + \alpha(s)]$ geht Gleichung 3.54 sodann über in die indirekte Transformation

$$\tilde{G}(s) \approx \left. \frac{k_B T}{\pi \alpha \langle \Delta r^2(t) \rangle \Gamma [1 + (\partial \ln \langle \Delta r^2(t) \rangle / \partial \ln t)]} \right|_{t=1/s} \quad (3.58)$$

mit der Gammafunktion Γ . Man erhält daraus schlussendlich $G^*(\omega)$ und damit $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ mittels Substitution von s zu $i\omega$ sowie anschließender Aufspaltung in Real- und Imaginärteil.

Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch das Versagen bei starken lokalen Krümmungen der MQV, beispielsweise aufgrund von Oszillationen. Um diese auszugleichen erfahren die Messwerte

in veröffentlichten Auswertelgorithmen (siehe Abschnitt 5.6) zur Anpassung lokaler Polynomfunktionen eine Gaussche Gewichtung um den jeweils betrachteten Punkt. Dies beinhaltet jedoch auch das Risiko der künstlichen Glättung relevanter Informationen, die aufgrund der Nichtkonvertierung der numerischen Werte verloren gehen.

3.3.2 Evans

Anders als bei *Mason* bestand der Ansatz von *Evans et al.* zur Vermeidung der fehlerinduzierenden Laplacetransformation nicht in der Anpassung lokaler Funktionen sondern in einer direkten Fouriertransformation der Kriechfunktion $J(t)$, die mit dem zeitabhängigen Schermodul $G(t)$ über die Faltung in Gleichung 3.34 in Verbindung steht [53, 54]. Als Beschreibung der Deformation unter Einwirkung einer äußeren Spannung besteht ein direkter Zusammenhang zwischen $J(t)$ und der Probenbewegung, ausgedrückt durch die mittlere quadratischen Verschiebung:

$$J(t) = \frac{3\pi a}{N_D k_B T} \langle \Delta r^2(t) \rangle. \quad (3.59)$$

Aus der Faltung im Zeitraum folgt im Fourierraum der einfache lineare Zusammenhang

$$G^*(\omega) = \frac{1}{i\omega \hat{J}(\omega)}. \quad (3.60)$$

Anders als bei einer Laplacetransformation wie in Gleichung 3.54 kommt es bei Fouriertransformation nicht zu einer Konvergenz, da die mittlere quadratische Verschiebung – und damit auch $J(t)$ – für alle Zeiten > 0 ist. Um die Fouriertransformierte dennoch zu bestimmen verwandte *Evans* die Möglichkeit der Rekonstruktion durch Transformation der 2. Ableitung $\ddot{J}(t)$:

$$\hat{J}(\omega) = \frac{-1}{\omega^2} \mathcal{F} [\ddot{J}] (\omega) \quad (3.61)$$

Dies ist möglich, da die Steigung der Kriechfunktion viskoelastischer Systeme für große Zeiten konstant ist und es sich daher bei $\ddot{J}(t)$ anders als bei $J(t)$ um eine konvergente Funktion handelt. Allerdings beinhaltet diese Transformation keine Informationen über Offset $J(t = 0)$ oder Anfangssteigung $\dot{J}(t = 0)$ der Ausgangsfunktion, so dass sie um weitere, frequenzunabhängige Terme ergänzt werden muss. Man erhält so letzten Endes

$$\tilde{G}^*(\omega) = \frac{i\omega}{i\omega J_0 + \dot{J}_0 + \mathcal{F} [\ddot{J}_2] (\omega)} \quad (3.62)$$

mit $J_2 \equiv \ddot{J}(t)$ für $t > 0$ und 0 sonst.

In der Praxis wird die Funktion $J(t)$ durch eine Reihe der Differenzen der Datenpunkte N zwischen zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten $k - 1$ und k beschrieben

$$\frac{i\omega}{\tilde{G}^*(\omega)} = i\omega J(0) + (1 - e^{i\omega t_1}) \frac{[J_1 - J(0)]}{t_1} + \frac{e^{-i\omega t_N}}{\eta} + \sum_{k=2}^N \left(\frac{J_k - J_{k-1}}{t_k - t_{k-1}} \right) (e^{i\omega t_{k-1}} - e^{i\omega t_k}), \quad (3.63)$$

wobei die stationäre Viskosität η , welche das Verhalten für $t \rightarrow \infty$ beschreibt, extrapoliert werden muss.

3.3.3 Splinelike Interpolation

Die Transformationsmethode von Evans besitzt den großen Vorteil der akuraten Wiedergabe der Messdaten. Bei großen Datenmengen schwankende Werte machen es jedoch in manchen Fällen schwierig Trends zu erkennen. Daher wurden für die Auswertung auf die Arbeit von Evans aufbauende Algorithmen verwandt, die neben einer direkten Fouriertransformation der Messwerte auch Fitkurven, gewonnen durch abschnittsweise Kurvenanpassung (engl.: „*splinelike interpolation*“), lieferten. Weitergehende Betrachtungen können dabei den Veröffentlichungen im Rahmen der Arbeit entnommen werden [123, 124].

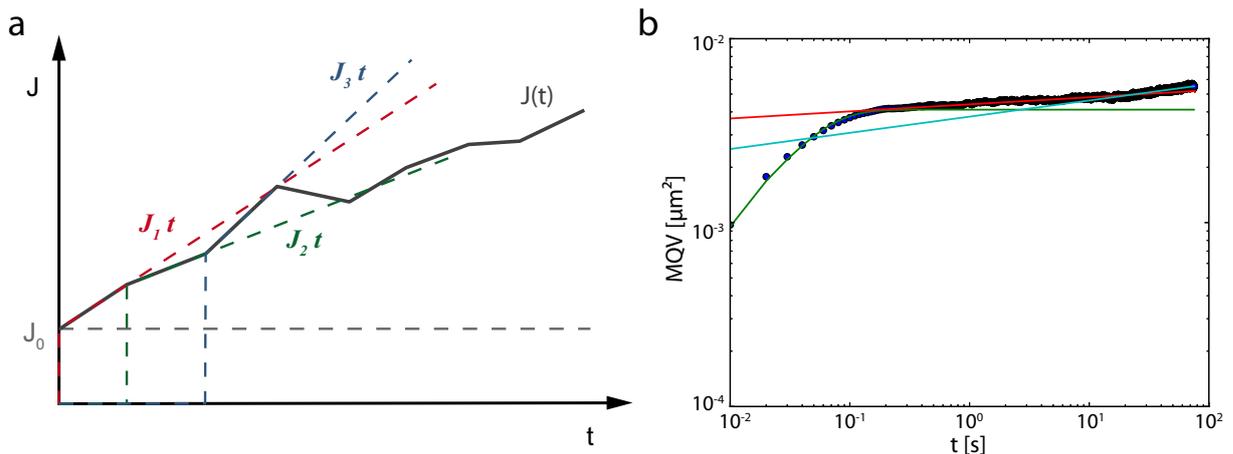


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Dateninterpolation nach Evans (a) und Resultat der *splinelike interpolation* (b) für den Fall eines unvernetzten, quasi 2-dimensionalen Netzwerkes. (Adaptiert von [123].)

Anders als bei Evans wird bei der neu entwickelten Konversionsmethode $J(t)$ durch eine Reihe von mehreren Datenpunkten umfassenden Interpolationsfunktionen $f_k(t)$ angenähert. Da für viskoelastische Systeme der Kurvenverlauf von MQV und $J(t)$ bei kleinen Zeiten häufig einem Kelvin-Voigt Anstieg entspricht (vgl. Abschnitt 3.1.4) können die lokalen Segmente sowohl aus Exponentialfunktionen $(1 - e^{-x})$ als auch aus linearen, dem Maxwell-Modell folgenden Funktionen bestehen. So ergibt sich

$$J(t) = f_0 H(t) + \sum_{k=0}^M [f_{k+1}(t) - f_k(t)] H(t - t_k), \quad (3.64)$$

mit der Anzahl der Fitfunktionen $M < N$ und der Heaviside-Stufenfunktion H . Für die Fourier-transformierte folgt daraus

$$\hat{J}(\omega) = \frac{f_0}{i\omega} + \sum_{k=0}^M [\hat{f}_{k+1}(\omega) - \hat{f}_k(\omega)] * \left(\frac{e^{i\omega t_k}}{i\omega} \right), \quad (3.65)$$

was direkt in Gleichung 3.60 eingesetzt werden kann.

Teilweise auftretendes schwaches, oszillatorisches Verhalten der Fitkurven ruht von Unstetigkeiten zwischen den einzelnen Fitsegmenten her. Dieses besitzt jedoch keinen Einfluss auf den qualitativen Kurvenverlauf und kann in der Praxis durch lokal interpolierende Linearkombination zwischen den beiden Segmenten minimiert werden.

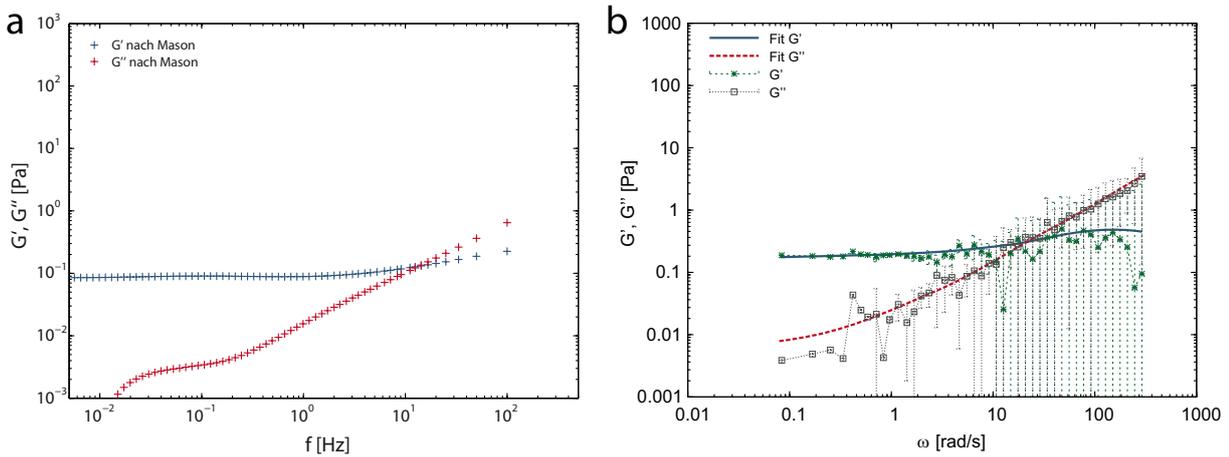


Abbildung 3.9: Vergleich zwischen der Auswerterroutine nach Mason (a) und der splinelike interpolation basierend auf der numerischen Konvertierung nach Evans (b) am Beispiel des unvernetzten, quasi 2-dimensionalen Netzwerkes aus Abbildung 3.8.

Der Vergleich eines Datensets, ausgewertet nach der Methode von *Mason* sowie mittels Konvertierung nach *Evans* mit *splinelike interpolation* (siehe Abbildung 3.9 (a) und (b)) liefert grundsätzlich übereinstimmende Kurvenverläufe. Aufgrund der logarithmischen Darstellung kommt es dabei in (b) zu einer Verzerrung der Fehlerbereiche. Daneben besteht eine hohe Korrelation zwischen den Mittelwerten der Evans-Konvertierung und den Fitkurven durch *splinelike interpolation*. Lediglich im hochfrequenten Verlauf treten Abweichungen auf, die aber hervorgerufen sind durch die direkte Fouriertransformation der Datenwerte. Gleichzeitig zeigt sich im Vergleich auch das teilweise Versagen der Mason-Konvertierung: Zusätzlich zu einem unphysikalischen Abbruch von $G''(\omega)$ bei niedrigen Frequenzen zeigt die Konvertierung in diesem Fall auch eine Unterschätzung des Plateauwertes von $G'(\omega)$.

3.4 Bündelung und Vernetzung geladener Polymerfilamente durch Gegenioneninteraktion

Viele biologische Moleküle wie die DNS, spezielle Lipide aber auch Aktin besitzen unter physiologischen Bedingungen einen negativen Ladungsüberschuss. Während für die signifikante Aufladung makroskopischer Objekte große Mengen Energie nötig sind genügen auf molekularer Ebene bereits Energien im Bereich von $k_B T$ um neutrale Moleküle in geladene Fragmente aufzuspalten, beispielsweise durch Dissoziation schwach gebundener H^+ -Ionen [148]. Dies führt im Falle von F-Aktin zu dem bereits erwähnten negativen Ladungsüberschuss von $11 e^-$ je globulärer Unter-einheit. In der Folge kommt es bei geringen Ionenkonzentrationen der umgebenden Lösung zu repulsiven Kräften zwischen den gleichartig geladenen F-Aktin Strängen. Neben den in Kapitel 2 beschriebenen vielzähligen Interaktionen mit Proteinen sowie entropisch induzierter Bündelung durch Makromoleküle (engl.: *depletion forces*) [84] kann es aber auch, wie den durchgeführten Experimenten zu Grunde liegend, zur ioneninduzierten Bündelung oder Vernetzung von Aktinfilamenten kommen.

Die von der Oberfläche eines Makromoleküls dissoziierten Ionen sehen sich einerseits der attraktiven elektrostatischen Kraft des gegenteilig geladenen Moleküls und andererseits einem entropischen Energiegewinn durch Verteilung in der Lösung ausgesetzt. Dies führt im Gleichgewicht zur Bildung einer wenige Nanometer starken Ladungswolke um das Makromolekül und zur Abschirmung dessen Ladung, einem Effekt, der von *Manning et al.* als Gegenionencondensation (engl.: *counter ion condensation*) bezeichnet wurde [126]. Den minimalen Abstand, den dabei zwei gleich geladene, monovalente Ionen aufgrund ihrer mittleren thermischen Energie in Lösung einnehmen können stellt die als Bjerrum-Länge λ_B bezeichnete Größe

$$\lambda_B \equiv \frac{e^2}{4\pi\epsilon k_B T} \quad (3.66)$$

dar, mit der elektrischen Ladung e und der dielektrischen Konstante der Lösung ϵ . Dieser beträgt für Wasser bei Raumtemperatur $\lambda_B = 0,71$ nm. Liegt der Abstand der Ladungen des Makromoleküls unter λ_B , so kann es nicht mehr zu einer vollständigen Ladungskompensation kommen. *Manning* bestimmte den Anteil der Ladungskompensation eines Polyelektrolystranges mit linearer Ladungsdichte β zu

$$\Phi = 1 - \frac{1}{Z\lambda_B\beta}, \quad (3.67)$$

welcher zusätzlich von der Valenz Z der Gegenionen abhängig ist [125]. Aus der 11-fach negativen Ladung eines globulären Aktin-Moleküls, sowie seiner Ausdehnung von 55 \AA ergibt sich eine Ladungsdichte von $\beta = 5 e^-/\text{nm}$. Daraus folgt eine theoretische Ladungskompensation von 72 % für monovalente Kationen wie H^+ und 86 % für divalente Kationen wie Mg^{2+} . Trotz dieses

abschirmenden Effektes besteht also weiterhin eine, wenn auch schwächere repulsive Kraft zwischen den Filamenten. Dabei bleibt aber anzumerken, dass die Betrachtung des F-Aktins als gleichmäßig geladener Stab mit verschwindendem Durchmesser seinem molekularem Charakter nicht gerecht wird. Einerseits liegt der Durchmesser eines F-Aktin Doppelstranges weit über λ_B , sodass sich mehrere Ionen um ihn herum anlagern können, andererseits liegt aber wie in Abschnitt 2.2 beschrieben ein Großteil der Ladung auf Subdomäne 1 des G-Aktins vor, was die negative Ladungsdichte lokal erhöht.

Das Entstehen einer attraktiven Wechselwirkung unter diesen Voraussetzungen ist weiterhin Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. In der der Berechnung des Abschirmpotentials zugrundeliegenden „*mean field*“ Theorie werden die Gegenionen als voneinander unabhängig und frei entlang des Polyelektrolyts bewegbar angesehen, so dass eine gleichverteilte Ladungsdichte entsteht. Bei Einführung eines Störungstermes kann es aber bei entsprechend hoher Oberflächenladungsdichte auch zu einer Abscheidung eines Teils der Gegenionen auf der Oberfläche des Polyelektrolyts kommen. *Lau und Pincus* konnten für 2-dimensionale Platten theoretisch zeigen, dass es dabei bei Fluktuationen aufgrund thermischer Bewegung zur Entstehung lokaler Ladungsschwerpunkte kommen kann [107]. Ähnlich wie in klassischen Dipolen führt dies zu veränderlichen van-der-Waals-Interaktionen, die eine Attraktion der Filamente hervorrufen können.

Wie *Grønbech-Jensen et al.* berichteten kann es bei tiefen Temperaturen unter den vereinfachenden Bedingungen der Brownschen Dynamik zur Attraktion zwischen gleich geladenen Stäben aufgrund ineinander greifender Anordnungen der Gegenionen kommen [68]. Mit steigender Temperatur nimmt die Langreichweitenordnung ab, wohingegen jedoch die Ordnung auf kurze Distanz - abhängig vom Stabdurchmesser und der Ionenvalenz - erhalten bleibt. Mehr noch konnten *Angelini et al.* mittels Röntgenbeugungsanalyse die Existenz von wellenförmigen, streng lokalisierten 1-dimensionalen Ladungswolkenverdichtungen entlang der Aktin Filamente bestätigen [7]. Wird die Ionenkonzentration z.B. durch Zugabe einer Salzlösung erhöht, so reduziert dies den entropischen Energiegewinn der Ladungswolke um die geladenen Makromoleküle. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Ladungswolkendimension bei gleichzeitig stärkerer Bindung der Gegenionen. *Angelini et al.* zufolge kommt es für multivalente Gegenionen in diesem Fall zur Ausbildung der beschriebenen Struktur, die sich entsprechend der periodischen Filamentkonformation anordnet und so auch bei hohen Temperaturen eine Langreichweitenordnung mit gesteigener attraktiver Wechselwirkung aufweist.

Teil II

Materialien und Methoden

KAPITEL 4

Aufbau

Moderne biologische Untersuchungen erfordern oftmals den Einsatz multipler Mikroskopietechniken. Um den gewachsenen Anforderungen gerecht zu werden war Bestandteil der Promotion einen Aufbau zu konzipieren und zu bauen, der neben herkömmlicher Licht- und Fluoreszenzmikroskopie auch den Einsatz einer optischen Pinzette sowie der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) ermöglicht.

Zentrales Element des entwickelten Aufbaus stellt ein unmotorisiertes *IX71* Mikroskop (*Olympus, Deutschland*) dar, welches zur Reduzierung externer Schwingungen auf einem passiv gedämpften Mikroskopietisch (*VH3660W-OPT; Newport Corporation, USA*) montiert wurde. Ausgestattet mit einer motorisierten Bühne des Typs *SCAN IM 112x74 (Märzhäuser Wetzlar, Deutschland)* sowie einer 3-Achsen Piezobühne *P-563.3CD (Physik Instrumente (PI), Deutschland)*, lassen sich auch kleinste Bewegungen des Untersuchungsobjekts im nm-Bereich per Computer realisieren. Hierfür wurden unter Einsatz der objektorientierten Skriptsprache *Python* grafische Steuerungsprogramme entwickelt, welche neben linearen und zyklischen Bewegungen auch die Speicherung und den automatisierten Abruf von Positionsdaten ermöglichte. Weitere Informationen hierzu können Anhang A entnommen werden. Um die Durchführung von Langzeitexperimenten über das Adhäsionsverhalten lebender Zellen zu ermöglichen [101] wurde um das Mikroskop herum eine Inkubationskammer aus Plexiglas zur Kontrolle von CO_2 -Gehalt und Temperatur errichtet (siehe Abbildung 4.2).

Um eine optimale Qualität der Aufnahmen zu gewährleisten wurde eine komplette Trennung von Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang vorgenommen (vgl. Abbildung 4.1). Die optischen Bauelemente (Spiegel & Filter: *AHF Analysentechnik, Deutschland*; Linsen & Polarisatoren: *Thorlabs, USA*; siehe auch Tabelle 4.1) wurden dabei mittels eines adaptiven Käfigsystems (*Thorlabs, USA*) befestigt und justiert und von der Umgebung mittels Aluminiumplatten lichtdicht isoliert. Während die Auskopplung der Bildinformation über den rechten Seitenzugang des Mikroskops erfolgte fand die Einkopplung der Beleuchtungsquellen über den Mikroskopiearm und die rückwärtige, mit einer angepassten Linse modifizierte Mikroskopöffnung statt. Bei den

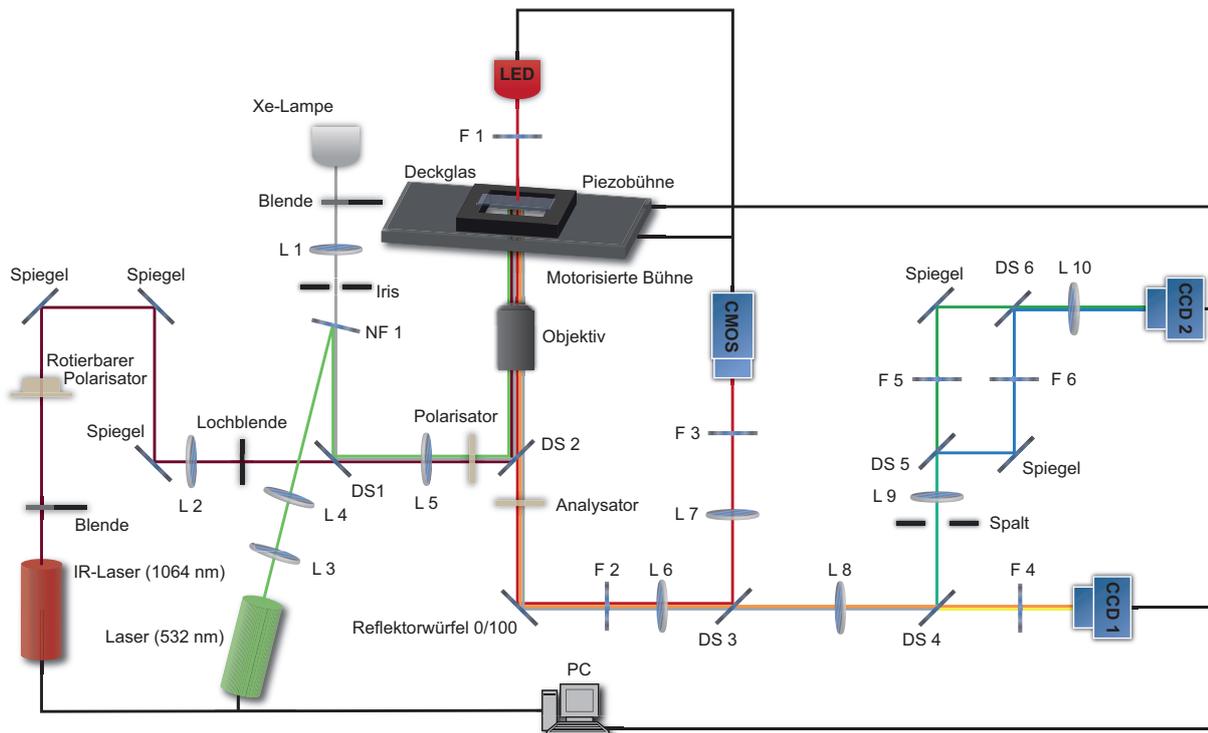


Abbildung 4.1: Skizze des OP/RIKM Aufbaus: Laser und Aufsichtbeleuchtung werden über die Fondöffnung und den Filterrevolver eingekoppelt. Die Auskopplung erfolgt über die rechte Öffnung mittels eines 100 % Reflektorwürfels. (L: Linse; F: Filter; DS: Dichroitischer Spiegel; CCD, CMOS: Kamera)

verfügbaren Lichtquellen handelte es sich um:

- eine LED-Leuchte *M660L2-C1* (*Thorlabs, USA*) mit einer Wellenlänge von 650 nm für die Durchlichtbeleuchtung bei gleichzeitiger Aufnahme von Fluoreszenzbildern
- eine mittels einer 400 μm Faser (*Ocean Optics, USA*) eingekoppelte 100 W Xe-Kurzbogenlampe *XBO R 100/45C OFR* (*Osram, Deutschland*) zur Aufsichtbeleuchtung während des RIKM-Betriebs
- ein 70 mW Laser (532 nm) *DPSSL-70* (*Roithner Lasertechnik, Österreich*) zur gepulsten Fluoreszenzanregung im Millisekunden- bis Minutenbereich

Da die Einkopplung des Fluoreszenzlasers über einen dichroitischen Spiegel zwangsläufig zu einem unterbrochenen Spektrum der Xe-Lampe geführt hätte wurde hierfür ein extrem schmalbandiger „*single notch*“-Filter verwendet, welcher unter einem Winkel $< 14^\circ$ die eingestrahelte Laserwellenlänge mit mehr als 90%iger Effizienz reflektiert. Die Pulstechnik erlaubte es in Kombination mit einer getriggerten Kameraaufnahme zum einen schärfere Abbildungen von thermisch bewegten, fluoreszenzmarkierten Objekten zu erhalten, zum anderen ermöglichte sie

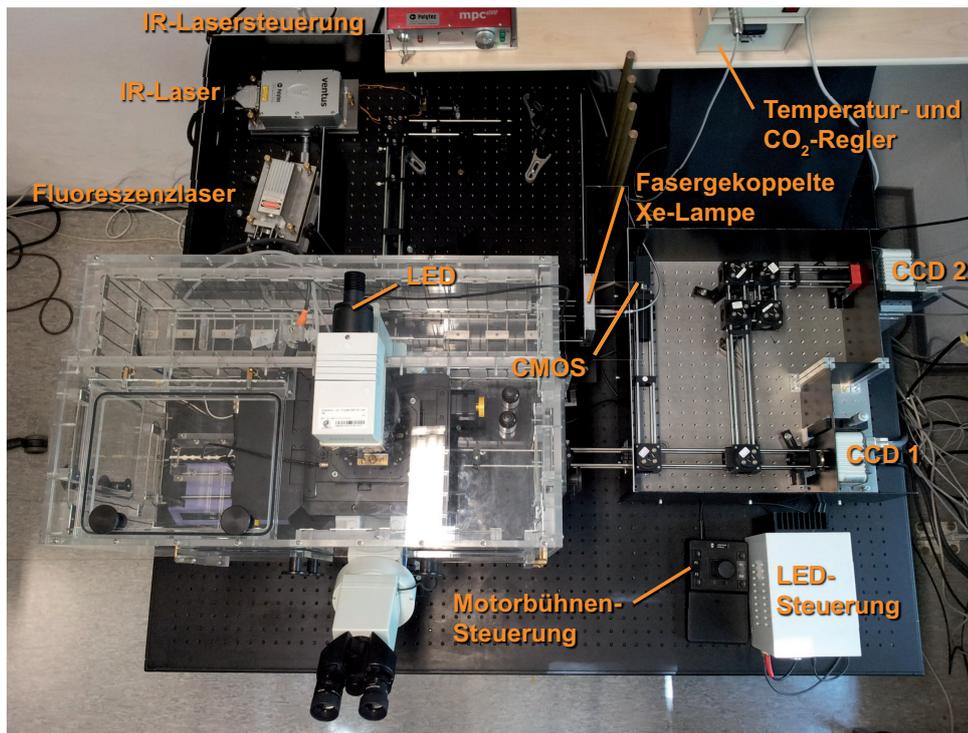


Abbildung 4.2: OP/RIKM Aufbau: Die Beleuchtungsstrahlengänge von IR-, Fluoreszenzlasers und Xe-Lampe wurden zur Verbesserung der Bildqualität vom Abbildungsstrahlengang (rechts) isoliert und über die rückwärtige Öffnung in das Mikroskop eingekoppelt. Um Experimente an lebenden Zellen zu ermöglichen wurde das Mikroskop mit einer abgeschlossenen Kammer umgeben, deren Temperatur und CO_2 -Gehalt über die entsprechenden Steuergeräte geregelt werden kann.

die Ausdehnung der Aufnahmedauer durch geringere Invasivität und verminderter Ausbleichung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs.

Zur Erzeugung der optischen Falle wurde ein *Ventus IR 1064-1500* Laser (*Laser Quantum, Großbritannien*) mit der zugehörigen Steuereinheit *mpc6000* implementiert, welcher mit einer maximalen Ausgangsleistung von 1860 mW besonders geeignet ist für die Generierung hoher Fallstärken. Da das Strahlprofil für maximale Leistung optimiert ist wurde zur Einstellung der Stärke ein rotierbarer Polarisator (*PRM05GL5/M*) sowie eine selbstentwickelte, manuelle Klappblende nachgeschaltet.

Die Bildgebung bestand aus einer Anordnung von 3 Kameras: Einer *A602f* Kamera (*Basler, Deutschland*) zur Detektion des LED-Hellfeldsignals (CMOS; $\lambda \approx 640\text{-}850\text{ nm}$) sowie zweier *Orca ER* Kameras (*Hamamatsu Photonics, Japan*) zur Aufnahme des Fluoreszenz- (*CCD 1*) oder der RIK-Signale (*CCD 1 & 2*). Durch die Wahl entsprechender Filter ermöglichte der Aufbau so die simultane Aufnahme 3er RIK-Bilder in verschiedenen Wellenlängenbereichen (*CCD 1*: $\lambda \approx 570\text{ }610\text{ nm}$; *CCD 2*: $\lambda \approx 490\text{-}550\text{ nm}$). Dabei wurden 2 Bilder gleichzeitig nebeneinander auf einer Kamera (*CCD 2*) abgebildet.

Tabelle 4.1: Auflistung der optischen Bauelemente sowie ihrer Eigenschaften. R: Reflexionsbereich [nm]; T: Transmissionsbereich [nm]; f: Brennweite der Linse; AR: Antireflexionsbeschichtet im Bereich A = 350 - 650 nm, B = 650 - 1050 nm, C = 1050 - 1620 nm.

Bauteil	Bezeichnung	Eigenschaften
Filter		
L 1	AC 254-050-A1	f = 50 mm; AR A
L 2	LA 1509-C	f = 100 mm; AR C
L 3	-	f = 12,5 mm
L 4	LA 1461	f = 250 mm
L 5	AC 254-300-A1	f = 300 mm; AR A
L 6	AC 254-150-A1	f = 150 mm; AR A
L 7	AC 254-150-A1	f = 150 mm; AR A
L 8	AC 254-150-A1	f = 150 mm; AR A
L 9	LA 1986	f = 125 mm
L 10	LA 1986-A1	f = 125 mm; AR A
Filter		
F 1	-	T 632 ± 22 nm
F 2	-	T 580 - 720 nm
F 3	-	T 600 - 640 nm
F 4	HC 593/40	T 593 ± 20 nm
F 5	FB 546/10	T 546 ± 5 nm
F 6	FB 490/10	T 490 ± 5 nm
NF 1	Single Notch	T 532 nm
Dichroitische Spiegel		
DS 1	770 DCXXR	R 450 - 750 nm > 90 %, T 785 - 1100 nm > 90 %; AR C
DS 2	Q565 LP-1064	R 530 - 560 nm > 90 %, T 575 - 1100 nm > 90 %; AR B
	-	50 % Spiegel
DS 3	Q620 SPXR	R 640 - 850 nm > 90 %, T 500 - 606 nm > 90 %
DS 4	560 DCXR	R 410 - 550 nm > 90 %, T 570 - 800 nm > 90 %; AR B
DS 5	505 DCLP	R 450 - 500 nm > 90 %, T 515 - 580 nm > 90 %
DS 6	505 DCLP	R 450 - 500 nm > 90 %, T 515 - 580 nm > 90 %
Polarisator/Analysator		
	LPVISE100-A	AR C

Die Bestimmung der Auflösung erfolgte durch Kalibration mittels einer Mikrometerskala (# 10008.04.004; POG Präzisionsoptik Gera, Deutschland). Dabei ergaben sich bei Verwendung eines Wasser-Immersionsobjektivs (LCI Plan-NEOFLUAR, 63x, NA = 1,3; Zeiss, Deutschland)

Werte von $143,4 \pm 0,9$ nm/px für die A602f-Kamera sowie $92,5 \pm 0,5$ nm/px für die Orca ER-Kameras. Unter Verwendung des Antiflexobjektives (*Neofluar Antiflex*, 63x, NA = 1,25; *Zeiss, Deutschland*) ergab sich ein Wert von $183,0 \pm 2,0$ nm/px für die Orca ER-Kameras und mit dem Hochdistanzobjektiv *LUMFl* (60x, NA = 1,2; *Olympus, Deutschland*) $163,8 \pm 0,5$ nm/px für die A602f-Kamera.

4.1 Optische Pinzette

Die optische Pinzette ist eine lichtmikroskopische Technik, welche kleinste dielektrische Partikel definierten Kräften aussetzt und so in der Lage ist Manipulationen und/oder Kraftmessungen an Systemen im Piconewtonbereich durchzuführen. Gegenüber Techniken wie der Rasterkraftmikroskopie besitzt sie den Vorteil Messungen ohne mechanischen Kontakt ausführen zu können. Erstmals beschrieben und angewandt von *Ashkin et al.* in den 70er & 80er Jahren [10, 11, 12] findet sie heute weitverbreitete Anwendung in Bereichen der Mikrofabrikation, Mikrorheologie und mikrobiologischen Studien von Einzelmolekülexperimenten bis zu Zelladhäsionsuntersuchungen [138].

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die strahlenoptische Beschreibung der Funktionsweise, eine Näherung für Partikel deren Radius $a \gg \lambda_{OP}$, der Wellenlänge des verwendeten Lasers ist. Für eine tiefere Beschreibung seien die Arbeiten von *Ashkin* [13], *Svoboda* [199] und *Ashakura et al.* [74] empfohlen.

4.1.1 Aufbau und Funktionsweise

Ein Laserstrahl mit einem gaußförmigen Intensitätsprofil, wie es der im Aufbau integrierte Einzelmoden-Infrarot-Laser aufweist, übt bei Fokussierung auf ein dielektrisches Objekt eine Gradientenkraft aus, welche dem regulären Strahlungsdruck entgegenwirkt. Dabei wächst die Gradientenkraft mit steigendem Öffnungswinkel des fokussierten Strahles an, und erzeugt bei optimaler Konfiguration eine Potentialtasche, welche eine stabile Positionierung der Objekte erlaubt. Aus diesem Grund wird für die Erzeugung der optischen Falle ein 60x Wasser-Immersionsobjektiv mit einer hohen Numerischen Apertur verwandt.

Bei Beschreibung der durch die Laserstrahlung verursachten Kräfte auf Mikropartikel mittels geometrischer Optik wird der betrachtete Lichtstrahl in separate Teilstrahlen zerlegt, wobei jeder Strahl die Eigenschaften einer ebenen Welle besitzt. Der Strahl breitet sich geradlinig aus, bis er auf eine Inhomogenität im umgebenden Medium trifft. Durchdringt er eine Grenzfläche wie z.B. die Oberfläche des betrachteten Mikroteilchens, so erfährt er aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes des Teilchens n_t und des umgebenden Mediums n_m eine Änderung der

Ausbreitungsrichtung entsprechend des Snelliusschen Brechungsgesetzes

$$n_m \sin \alpha_m = n_t \sin \alpha_t \quad (4.1)$$

mit den Winkeln α_m und α_t zwischen dem Einfallenden respektive gebrochenen Strahl und der Grenzschicht-Normalen. Aus der Richtungsänderung des Lichts folgt aufgrund des Impulserhaltungssatzes eine Impulsänderung des Mikroteilchens in entgegengesetzter Richtung. Der übertragene Impuls ist dabei proportional zur Intensität des gebrochenen Lichtstrahls.

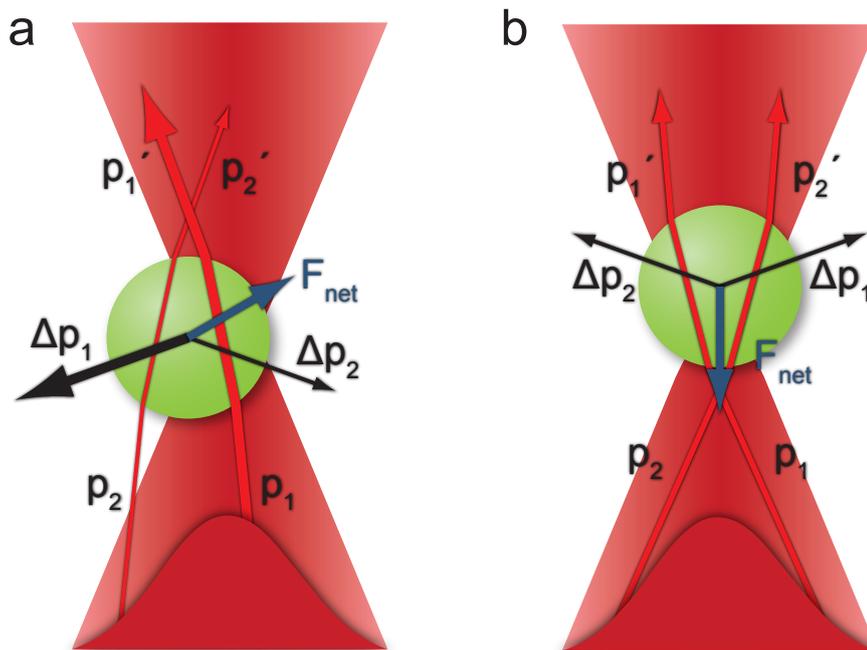


Abbildung 4.3: Strahlenoptische Erläuterung der Gradientenkraft. **Links:** Partikel außerhalb der Strahlachse. Aufgrund der inhomogenen Intensitätsverteilung ist der Impulsübertrag durch die dargestellten Teilstrahlen unterschiedlich. Es wirkt eine Nettokraft entlang des Intensitätsgradienten, welche den Mikropartikel in das Fallenzentrum treibt. **Rechts:** Im Zentrum der Strahlachse heben sich die Radialanteile der einzelnen Impulsüberträge gegenseitig auf. Die Nettokraft wirkt entgegen der Strahlrichtung und ist somit in der Lage die in Vorwärtsrichtung wirkende Streukraft auszugleichen.

Abbildung 4.3 zeigt einen sphärischen Mikropartikel im bzw. nahe des Fokus eines parallelen Laserstrahls mit gaußförmigem Intensitätsprofil. Jeweils zwei Teilstrahlen werden gesondert betrachtet. Sie erfahren beim Durchgang durch die Partikelgrenzfläche eine Richtungsänderung entsprechend dem Auftreffwinkel. Strahlen, die in einem flachen Winkel auftreffen bewirken so einen starken Impulsübertrag, jedoch weisen sie im Vergleich zu den Zentralstrahlen eine geringere Intensität auf.

Die Impulsänderung zwischen den einfallenden und den aus der Mikrokugel austretenden

Strahlen ist gleichzusetzen mit einer auf die Mikrokugel wirkenden Kraft. Im Falle, dass der Brechungsindex n_t des Teilchens größer ist als der des umgebenden Mediums n_m deutet der resultierende Kraftvektor in Richtung des Intensitätsgradienten. Um ihn zu maximieren ist eine möglichst volle Ausleuchtung des Partikels, respektive eine Überstrahlung der Apertur des Objektivs durch den Fallenlaser nötig. Die Zentralstrahlen tragen aufgrund ihres nahezu senkrechten Auftreffens auf die Grenzfläche kaum zu dieser Gradientenkraft bei. Sie sind hingegen hauptverantwortlich für die Streukraft, welche – verursacht durch teilweise Reflexion des einfallenden Lichts an der Grenzfläche – in einem Kraftvektor in Ausbreitungsrichtung des Strahls resultiert.

Sofern $n_t > n_m$ ist wirken die Netto-Gradientenkraft und die Streukraft in entgegengesetzter Richtung entlang des Strahls und führen so zu einer Stabilisierung der Partikelposition. Der Gleichgewichtspunkt ist in Folge der stärkeren Streukraft im Fokus leicht entlang der Strahlachse verschoben. Fallenzentrum und Fokus sind daher nicht exakt gleichbedeutend. Die Abweichung ist im experimentellen Betrieb jedoch vernachlässigbar.

4.1.2 Kalibrationstheorie

Die Steifigkeit einer optischen Pinzette hängt von der Form der verwendeten Fallenpartikel genauso ab, wie von Stärke und Strahlprofil des verwendeten Lasers. Die Bestimmung der auf die Mikrokugel wirkenden externen Kraft wird im Experiment durch eine Messung der Auslenkung aus dem Fallenschwerpunkt ermittelt. Dies lässt sich z.B. mit Hilfe einer vorher kalibrierten 4-Quadranten Photodiode [187] oder wie in diesem Fall mittels einer CCD-Kamera bewerkstelligen. Für den Fall eines gaußförmigen Strahlprofils bewegt sich ein gefangenes Teilchen in einem radialsymmetrischen Feld, das sich in erster Näherung als harmonisches Potential beschreiben lässt. Bei kleinen Auslenkungen lässt sich die wirkende Fallenkraft gemäß dem Hooke'schen Gesetz

$$F_H = -kx \quad (4.2)$$

linear annähern mit x als Betrag der Auslenkung aus dem Fallenzentrum. Bei Kenntniss der Federkonstante k der optischen Falle lässt sich die wirkende Kraft so eindeutig bestimmen. Die Kalibrierung der optischen Pinzette durch Messung von k kann dabei auf unterschiedliche Arten erfolgen [15], von denen im Folgenden die Methoden nach Brown und Stokes vorgestellt werden.

Kalibration nach Brown

Eine Möglichkeit bietet die Kalibration mittels Brown'scher Bewegung des Teilchens. In Medien erfährt das gefangene Teilchen Kraftstöße der umgebenden Moleküle aufgrund deren thermischer Bewegung. Abhängig von der Teilchenmasse und der Viskosität des umgebenden Mediums geht die durch die Stöße verursachte gerichtete Bewegung bereits oberhalb von 100 ns in eine statistische Zufallsbewegung des Teilchens über [86], was weit unterhalb der zeitlichen Kameraauflösung liegt.

Dem Gleichverteilungssatz im Modell des idealen Gases folgend trägt im thermischen Gleichgewicht bei Temperatur T im Mittel jeder Freiheitsgrad eines Teilchens den selben Betrag $1/2 k_B T$ zur gesamten inneren Energie bei. Sphärische Objekte – wie die verwendeten Polystyrolkugeln – verfügen lediglich über 3 Freiheitsgrade der Translation (ein Freiheitsgrad pro Raumrichtung). Im harmonischen Potential der optischen Falle besitzen sie über die Zeit gemittelt eine innere Energie U von

$$U = \frac{1}{2} k \sigma^2 \quad (4.3)$$

wobei σ^2 die mittlere quadratische Abweichung der Position \mathbf{x} innerhalb des Potentials bezeichnet:

$$\sigma^2 = \langle (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}})^2 \rangle \quad (4.4)$$

Die durch die Brown'sche Bewegung hervorgerufene Abweichung ist das Ergebniss sehr vieler, statistisch unabhängiger Beiträge und lässt sich daher mittels einer Gaußkurve

$$f(\mathbf{x}) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}})^2}{2\sigma^2}\right) \quad (4.5)$$

beschreiben. Die mittlere Abweichung vom Fallenmittelpunkt σ kann nun also gleich gesetzt werden mit der Energie pro Freiheitsgrad. Durch Kombination von $1/2 k_B T$ mit Gleichung 4.3 erhält man so für die Federkonstante

$$k = \frac{k_B T}{\sigma^2} \quad (4.6)$$

Die Kalibration nach Brown ist damit unabhängig von der Partikelgröße oder der Viskosität des umgebenden Mediums. Ungenauigkeiten liegen bei dieser Methode unter anderem in Fehlern der Positionsbestimmung. Niederfrequente Schwingungen des Systems verfälschen die mittlere Abweichung und gehen so quadratisch in die Bestimmung von k ein. Eine weitere Fehlerquelle ist die exakte Bestimmung der Temperatur. Da ein Teil des Laserlichts vom Medium absorbiert wird kann die tatsächliche Temperatur von der der Umgebung abweichen.

Kalibration nach Stokes

Die Federkonstante lässt sich auch ohne Berücksichtigung des Gleichverteilungssatzes durch Anlegen einer bekannten äußeren Kraft an das Teilchen bestimmen, mit dem Vorteil, dass man direkte Kontrolle über die wirkende Kraft respektive die Auslenkung besitzt.

Bewegt sich das Teilchen relativ zum umgebenden Medium mit einer konstanten Geschwindigkeit v – was im vorliegenden Fall durch eine Bewegung der gesamten Probe mittels der Piezobühne realisiert wird – so wirkt auf es eine Reibungskraft

$$F_R = -\beta v, \quad (4.7)$$

was zu einer Auslenkung x aus dem Fallenzentrum führt. Für ein sphärisches Teilchen mit Radius

a in einem Medium mit Viskosität η ergibt sich der Reibungskoeffizient β nach dem Gesetz von Stokes durch

$$\beta = 6\pi a\eta \quad (4.8)$$

Daraus folgt durch Kombination mit Gleichung 4.2

$$k = \frac{6\pi\eta av}{x}. \quad (4.9)$$

Problematisch hierbei ist die exakte Bestimmung des Reibungskoeffizienten. Zum einen ist die Viskosität von Wasser bei Zimmertemperatur stark temperaturabhängig und variiert zwischen 20 und 25°C um mehr als 10% [98] (vgl. Tab. 4.2), zum anderen sorgen Randeffekte dafür, dass sich der hydrodynamische Widerstand erhöht, was dazu führt, dass die Viskosität in der Nähe von Oberflächen größer ist als weit davon entfernt. Dies wird durch das Faxensche Gesetz berücksichtigt:

$$\beta_{Fa} = \frac{\beta_{St}}{1 - \frac{9}{16}\left(\frac{a}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{a}{h}\right)^4 + \frac{1}{16}\left(\frac{a}{h}\right)^5} \quad (4.10)$$

Dabei bezeichnen h die Distanz zur Oberfläche und a den Partikelradius. Für großen Abstand von der Oberfläche geht die Gleichung über in das Stokes'sche Gesetz. Bei einem für die Flußzelle typischen Verhältnis von $h/a = 15$ beträgt die Abweichung noch 4%.

Tabelle 4.2: Viskosität von Wasser in Abhängigkeit der Temperatur (T : Temperatur, η : Viskosität).

T in [°C]	15	20	21	22	23	24	25	30
η in [Ns/m ²]	1,139	1,003	0,979	0,955	0,933	0,911	0,891	0,798

Da die Auslenkung nicht instantan erfolgt muss die Bewegung abhängig von der Bildrate der verwendeten Kamera oder der Frequenz der verwendeten Detektordiode über mehrere Sekunden kontinuierlich durchgeführt werden, was eine entsprechend ausgerüstete Bühnenapparatur bedingt. Alternativ dazu kann durch Änderungen der Strahlgeometrie, wie dies z.B. bei der holographischen optischen Pinzette [45] möglich ist auch das Fallenzentrum und damit der Probenpartikel direkt durch das Medium bewegt werden.

4.1.3 Kalibrationsresultate

Die konstruierte optische Pinzette ist ausgelegt auf die Manipulation sphärischer Objekte im Bereich von 1,1 - 6,5 μm Größe. Während es unterhalb von 1,0 μm aufgrund einer plateauartigen Verbreiterung des Strahlprofils nicht möglich war Partikel stabil gefangen zu halten konnten Partikel $> 6,5 \mu\text{m}$ aufgrund zu geringer Laserleistung nur eingeschränkt bewegt werden. Die Partikeldetektion wurde ausschließlich im Durchlichtmodus über die Basler A602f-Kamera durchgeführt. Die zeitliche Auflösung war dabei von der Bildrate der Kamera auf 100 bps

limitiert, während die räumliche Auflösung von der verwendeten Wellenlänge und der Optik des Aufbaus begrenzt wurde. Dabei ist die räumliche Auflösung nach *Abbé* von der optischen Auflösung des Kamerasystems zu unterscheiden.

Für die Kalibration der optischen Pinzette, wie auch für die Untersuchung der Aktin-Dynamik ist im allgemeinen eine weitaus genauere Positionsbestimmung der Probenpartikel nötig als es die zu Beginn des Kapitels angegebene Auflösung von $143,4 \pm 0,9$ nm pro Pixel der Kamera zulässt. Umgangen wird dies durch einen Tracking-Algorithmus basierend auf der Arbeit von *Crocker und Grier* [32]. Durch Gewichtung der Helligkeitsverteilung der Mikrokugel lässt sich der Schwerpunkt und somit das Zentrum des Partikels mit einer Genauigkeit lokalisieren, die um einen Faktor 10-20 über der Pixelauflösung des Systems liegt (vergleiche auch Abschnitt 5.6, Mikroskopie und Datenanalyse).

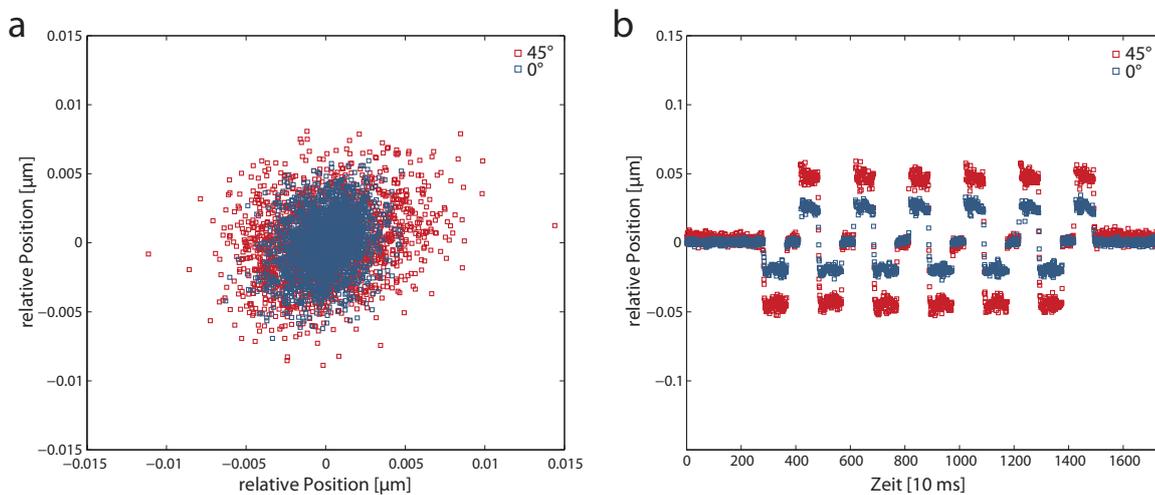


Abbildung 4.4: Messdaten zur Bestimmung der Fallenstärke mittels Brown- (a) und Stokes-Methode (b) bei verschiedenen Polarisatorstellungen respektive Laserstärken. Bei der Brown'schen Kalibration unterliegen die gefangenen Mikrokugeln den Bewegungen aufgrund thermischer Energie. Bei der Stokes Methode hingegen wird die Auslenkung des Partikels aus dem Fallenzentrum aufgrund eines alternierenden Flüssigkeitsstromes bestimmt.

Da das Strahlprofil herstellereitig auf maximale Ausgangsleistung optimiert ist wird der Fallenlaser in allen Fällen mit der größtmöglichen Leistung von 1860 mW betrieben. Dabei kommt es bei mehrstündigem Betrieb zu einer Erwärmung und damit verbundenen Verschlechterung des Strahlprofils, sodass Messungen auf weniger als 1 h zu begrenzen sind. Da das Laserlicht eine vertikale Polarisation aufweist erfolgt die Regelung der Fallenstärke über einen vor dem Laser platzierten, manuellen Polarisator. In Abbildungen 4.4 & 4.5 sind Messdaten und die daraus berechneten Fallenstärken daher in Abhängigkeit von der Polarisatorstellung angegeben. Exemplarisch sind in Abbildung 4.4 die Positionsdaten eines gefangenen Polystyrolpartikels mit $1,87 \mu\text{m}$ für Brown- (a) und Stokes-Kalibration (b) bei unterschiedlicher Polarisatorstellung

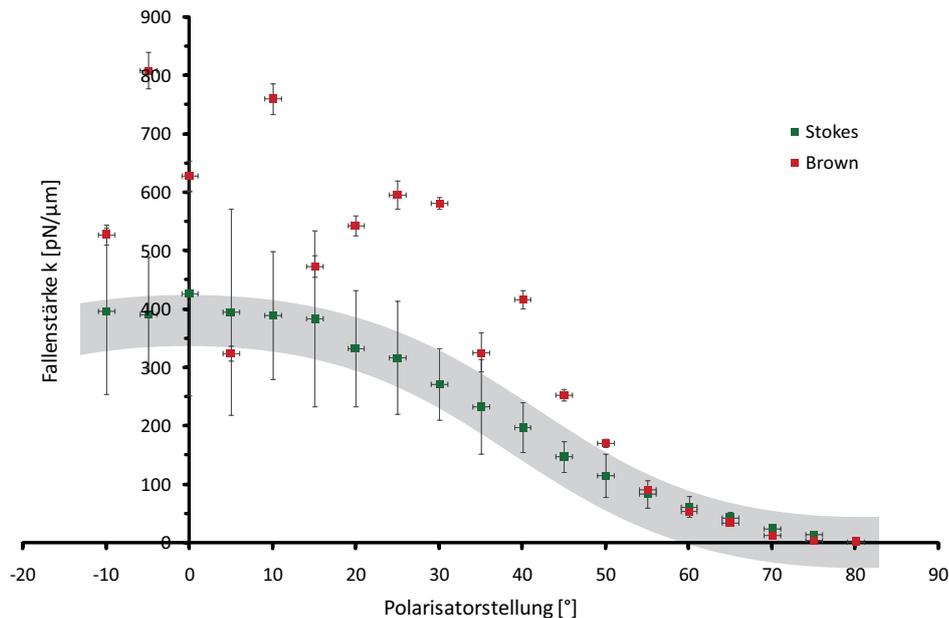


Abbildung 4.5: Ermittelte Federkonstanten k nach Brown & Stokes im Vergleich. Bei hohen Fallenstärken streuen die mittels der Brown'schen Kalibrationsmethode gemessenen Werte stark, während die mit der Stokes-Methode Bestimmten den erwarteten Cosinusverlauf aufzeigen.

wiedergegeben. Zwar zeigen die ermittelten Partikelpositionen Abstände von weniger als 1 nm jedoch liegen diese unter der Genauigkeit der für die Auswertung verwandten Fitroutinen, sodass sie nur noch bedingt mit realen Bewegungen der Partikel korrelieren.

Die Fallenstärke ist bei kleinem Polarisatorwinkel so stark, dass die Partikelbewegungen unter das Auflösungslimit des Subpixel-Trackings fallen und es zu keiner Verkleinerung der Positionswolke mehr kommt. Die Verteilung wird nun von zufälligen Vibrationen des Systems bestimmt, weshalb die daraus berechneten Fallenstärken einer hohen Streuung unterliegen (siehe Abbildung 4.5). Die Partikelauslenkungen aus dem Fallenzentrum, welche der Federstärkenberechnung nach Stokes zu Grunde liegen, befinden sich hingegen auch bei kleinen Polarisatorwinkeln noch oberhalb der Auflösungsgrenze und lassen sich so eindeutig unterscheiden. Die in 4.4 (b) dargestellten Positionen wurden für beide Winkelstellungen durch eine Bühnenbewegung von $200 \mu\text{m/s}$ hervorgerufen. Da die Auslenkungsgeschwindigkeit jedoch keiner formellen Beschränkung unterliegt kann sie der Fallenstärke angepasst werden, sodass in allen Fällen optimal detektierbare Positionsverschiebungen erreicht werden.

Bei kleinen Polarisatorwinkeln beziehungsweise hohen Laserstärken weisen so die Resultate der beiden Methoden starke Abweichungen voneinander auf. Während die Ergebnisse der Stokes-Kalibration dem Verlauf einer Cosinus-Kurve folgen, wie es aufgrund der Polarisatordrehung zu erwarten ist, stellen die Ergebnisse der Brown-Kalibration große Abweichungen dar. Dies zeigt zweierlei: Zum einen, dass der Fehler aus der statistischen Sicherheit der an die Partikelverteilung

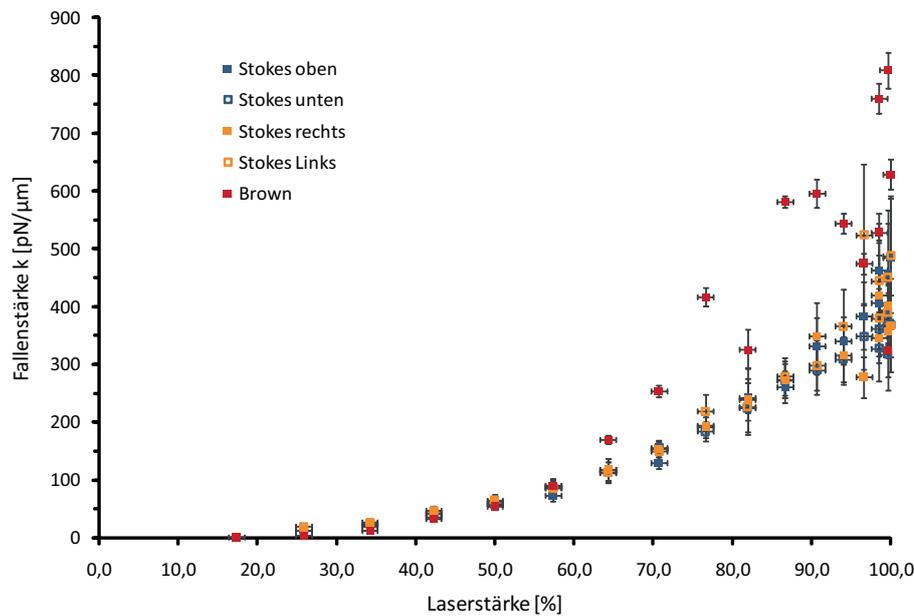


Abbildung 4.6: Symmetriebestimmung der optischen Pinzette. Mittels Stokes-Methode wurden die Partikelauslenkungen in verschiedene Richtungen bestimmt. Die daraus berechneten Federkonstanten weisen in einem weiten Bereich eine hohe Übereinstimmung auf woraus sich auf die Güte der Fallenkalibration schließen lässt.

angepassten Gaußfunktion im Falle der Kalibration nach Brown aufgrund des erreichten Auflösungslimits zu einer hohen Unterschätzung des tatsächlichen Fehlers führt. Zum anderen, dass die fehlerbehafteten Größen bei der Stokes-Kalibration mit zu hohen Fehlern angesetzt wurden, da die Fehlerbalken weit über den cosinusförmigen Korridor der Messwerte hinausreichen.

Neben der Fallenstärke ist bei Kraftmessungen mittels einer optischen Pinzette auch die Symmetrie der Falle von großer Bedeutung. Um dies zu gewährleisten wurde mittels Bühnenbewegung die Partikelauslenkung entlang der Achsen bestimmt und zur Berechnung der Federkonstante herangezogen. Abbildung 4.6 zeigt die Ergebnisse im Vergleich. Bis zu einer Laserstärke von 60 % weisen die Fallenstärken einen annähernd linearen Verlauf auf und zeigen hohe Übereinstimmung sowohl untereinander als auch mit den Resultaten der Kalibration nach Stokes. Bei höheren Stärken beginnen die Werte stark zu streuen und die Fehler nehmen an Größe zu. Mit Werten von 200 - 600 pN/μm liegt die bestimmte Fallenstärke hier jedoch bereits weit über dem für biologische Messungen typischen Bereich von < 50 pN/μm [56, 70, 198].

4.2 Reflexions-Interferenz-Kontrastmikroskopie

Reflexions-Interferenz-Kontrastmikroskopie beschreibt eine markerfreie Technik, die – basierend auf der Reflexion von Licht an Grenzflächen – eine Bestimmung des Abstandes zwischen bzw. der Höhe von Objekten im Bereich von 10^{-9} - 10^{-6} m auf lichtmikroskopische Weise ermöglicht.

Durch den Einsatz monochromatischen Lichtes und der kontrastoptimierenden Antiflex-Technik stellt sie eine Weiterentwicklung der klassischen Interferenzreflexionsmikroskopie (IRM) dar. Der folgende Abschnitt gibt einen Einblick in Funktionsweise und Anwendungsbreite des konstruierten RIKMs. Weitergehende Betrachtungen können dem Übersichtsartikel von *Limozin und Sengupta* [113] oder der Dissertation von *K. Klein* [101] entnommen werden.

4.2.1 Funktionsprinzip

Reflexionen treten nur auf an Grenzflächen von Objekten, die einen Sprung in ihren Brechungsindizes n markieren. Im Falle eines monochromatischen Lichtstrahls mit Intensität I_0 welcher einen Objektträger durchquert (vgl. Darstellung in Abbildung 4.7) entsteht zunächst ein an der Grenzfläche zwischen Glas und Medium reflektierter Strahl I_1 . Der transmittierte Anteil des Ausgangsstrahles erzeugt nachfolgend beim Eintritt in das optisch dichtere Untersuchungsobjekt einen zweiten Reflexionsstrahl I_2 was zu einer konstruktiven oder destruktiven Interferenz der beiden reflektierten Teilstrahlen entsprechend der Weglängendifferenz 2δ führt. Die resultierende Intensität I ergibt sich für den vereinfachenden Fall eines quasi-senkrecht ($\alpha \approx 0$) einfallenden Strahles I_0 zu

$$I(h(x,y),k) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos [2kh(x,y) + \Phi] \quad (4.11)$$

mit der Kreiswellenzahl $k = 2\pi n_1/\lambda$ sowie einer aus der Änderung der optischen Dichte resultierenden Phasenverschiebung Φ (hier: $\Phi = \pi$ da $n_2 > n_1$). Damit ist das detektierte Interferenzbild eine direkte Funktion des Abstandes $h(x,y)$ zwischen Objekt und Objektträger. Für Bereiche in denen das Objekt in Kontakt ($h = 0$) mit der Oberfläche ist nimmt der Cosinus aufgrund des Phasensprunges den Wert -1 an und es ergibt sich ein Minimum in Formel 4.11. Kontaktstellen erscheinen daher als dunkle Bereiche im Interferogramm. Allerdings kommt es bei steigendem Abstand zu einer periodischen Wiederholung heller und dunkler Regionen alle $\Delta h = \lambda/2n$, sodass durch die Verwendung einer einzelnen Wellenlänge keine Aussage zur absoluten Höhendifferenz über die erste Periode hinaus getroffen werden kann.

4.2.2 Einrichtung & Kalibration

Wie beschrieben erlaubt der Einsatz einer Wellenlänge keine Aussage über die absolute Höhendifferenz zwischen Objekt und Objektträger. Dies kann jedoch durch die simultane Verwendung mehrerer Wellenlängen umgangen werden. Der Aufbau wurde deshalb derart konzipiert, dass die gleichzeitige Abbildung von Interferogrammen 3er Wellenlängen möglich ist, von denen 2 ($\lambda_1 = 593$ nm, $\lambda_2 = 546$ nm) ständig genutzt wurden. Da die Periodizität der Intensität im Höhenverlauf direkt von λ abhängig ist ergeben zwei, der Wellenlänge nach separierte Strahlen, minimal differierende Interferenzbilder mit einzigartigem Muster. Durch Vergleich der Intensitäten der beiden Bilder lässt sich so in einem gegenüber der Einzelwellenlängen-RIKM um den Faktor 10 vergrößerten Bereich eine eindeutige Abstandsbestimmung treffen.

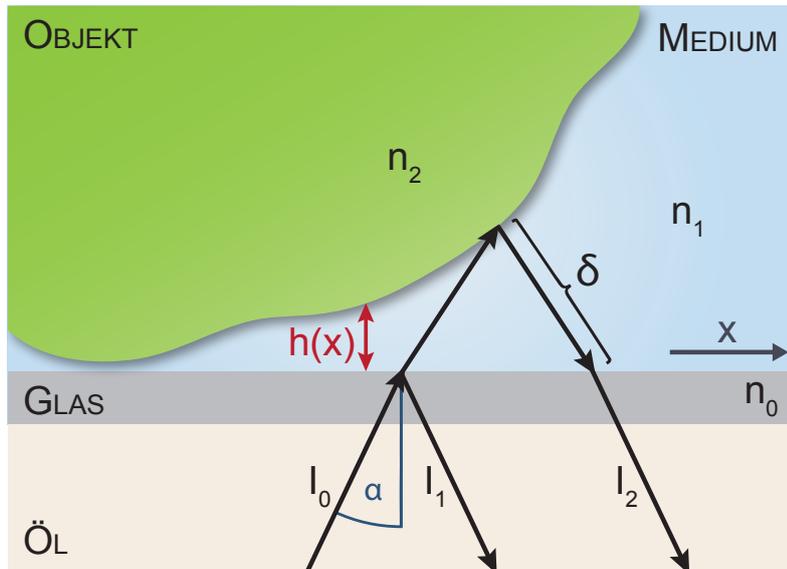


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des RIKM-Funktionsprinzips. Ein einfallender Strahl I_0 wird sowohl an der Grenzfläche Glas-Medium als auch an der Grenze zwischen Medium und Objekt reflektiert. Der daraus resultierende Wegunterschied δ zwischen den Teilstrahlen I_1 und I_2 führt zu einem Interferenzbild das vom Abstand $h(x)$ zwischen Glas und Objekt abhängig ist.

Die Filterung nach und Auftrennung in die einzelne Wellenlängen findet dabei erst nach Auskopplung des Lichtstrahles aus dem Mikroskop im Abbildungsstrahlengang statt. Der Lichtstrahl wird mittels des dichroitischen Spiegels *DS 4* in zwei Teilstrahlen aufgespalten und λ_1 (593 nm) über den Filter *F 4* auf der Kamera *CCD 1* abgebildet. Der zweite Teilstrahl (490-550 nm) wird durch einen Spalt auf ein Strahlteilersystem (*DS 5 & 6*, *F 5 & 6*) geleitet, wo er in seine blaue und grüne Komponente aufgespalten, und die Wellenlängen λ_2 (546 nm) und λ_3 (490 nm) isoliert werden. Durch den Spalt wurde der Strahl dabei derart begrenzt, dass beide Wellenlängen nebeneinander auf Kamera *CCD 2* abbildbar waren.

In der Praxis ist die Intensität der reflektierten Teilstrahlen aufgrund der geringen Unterschiede in den Brechungsindizes zwischen Glas ($n_0 = 1,52$), Medium (Bsp. H_2O : $n_1 = 1,33$) und Objekt (Bsp. Zellmembran: $n_2 = 1,46$) [19] so gering, dass bei der klassischen IRM Streulicht aus der Objektivenebene zu großen Problemen führt. Der Aufbau wurde daher nach der von *Ploem* entwickelten Antiflex-Technik realisiert [161]. Durch den Einsatz von Polarisator, Analysator sowie speziellem, mit einem rotierbaren $\lambda/4$ -Plättchen ausgestatteten Objektiv (*Neofluar Antiflex*, 63x, $\text{NA} = 1,25$; *Zeiss, Deutschland*) lässt sich dabei Streulicht herausfiltern und der Kontrast der Interferenzbilder so erhöhen (vergleiche Abbildung 4.8):

Unpolarisiertes Licht aus dem Beleuchtungsstrahlengang des Aufbaus tritt nach einer begrenzenden Iris durch einen Polarisator in den Reflektorwürfel des Mikroskops ein, wodurch es eine lineare Polarisation erfährt. Mittels eines dichroitischen Spiegels wird ein Teil des Lichtes auf die

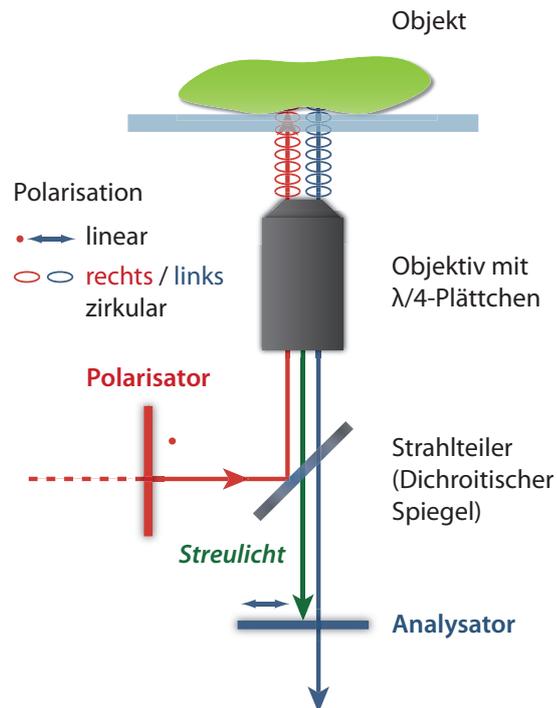


Abbildung 4.8: RIKM Strahlenverlauf. Mittels Polarisator und Analysator kann bei Einsatz des Antiflex-Objektives mit $\lambda/4$ -Plättchen Streulicht aus der Objektebene herausgefiltert und so der Kontrast des Interferenzbildes erhöht werden.

Probe gelenkt. Beim Durchgang durch das Objektiv wird es mittels des $\lambda/4$ -Plättchens zirkular polarisiert. Bei der Reflexion am Objektträger bzw. Objekt erfährt nun aber jeweils nur eine Feldkomponente eine Phasenverschiebung um π , abhängig vom Vorzeichen der Brechungsindexänderung. An der Grenzschicht zwischen Glas und Medium ($n_0 > n_1$) ist dies die Komponente parallel zur Einfallsebene, aufgespannt durch Einfallrichtung und Oberflächennormalen, am Übergang zwischen Medium und Objekt ($n_2 > n_1$) die Komponente senkrecht zur Einfallsebene. Dadurch erfährt das reflektierte Licht in beiden Fällen eine Umkehr der Zirkulationsrichtung, wodurch es nach abermaligem Durchgang durch das Objektiv eine lineare Polarisation senkrecht zur Ursprünglichen aufweist. Dies ermöglicht dem Strahl den Durchtritt durch den um 90° gegenüber dem Polarisator gedrehten Analysator. Im Gegensatz dazu ist das vom Eingangsstrahl ausgehende Streulicht in Ursprungsrichtung oder zufällig polarisiert, so dass es zu einem hohen Anteil vom Analysator blockiert wird.

Die Auswirkungen der beschriebenen Technik lassen sich in Abbildung 4.9 anhand einer $25\ \mu\text{m}$ durchmessenden Polystyrolkugel erkennen. Im regulären Hellfeldmodus (aufgenommen mit einem $60\times$ Wasser-Immersionsobjektiv) werden die Grenzflächeninterferenzen von Streulicht überlagert, sodass sich in 4.9 (a) lediglich die Umrandung der Mikrokugel erkennen lässt. Durch den zusätzlichen Einsatz der Polarisatoren und Filter (4.9 (b)) lassen sich bereits die kreisrunden Interferenzringe erkennen, welche Aufschluss über die Krümmung der Kugel geben. Das Zentrum

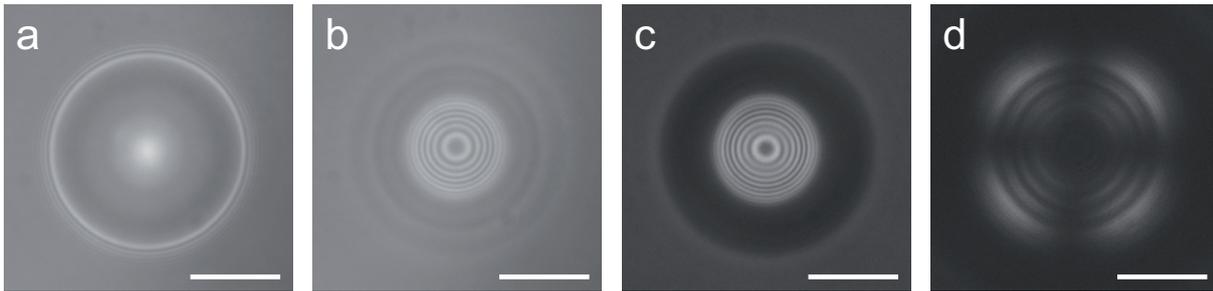


Abbildung 4.9: Vergleich einer Polystyrolkugel im Auflicht- und im RIKM-Modus des Aufbaus. (a) Hellfeldbild der Polystyrolkugel aufgenommen mit einem 60x Wasser-Immersionsobjektiv im konventionellen Auflichtmodus, (b) im RIKM-Modus (mit Polarisatoren und Filter), (c) im RIKM-Modus unter Verwendung des 63x Antiflex-Objektives bei vollständig geöffneten $\lambda/4$ -Plättchen (45° zur Polarisationsrichtung) und (d) bei vollständig geschlossenem $\lambda/4$ -Plättchen (0° zur Polarisationsrichtung). Maßstab: $10\ \mu\text{m}$.

der Ringe erscheint dabei als dunkle Scheibe, da hier die Polystyrolkugel in Kontakt mit dem Objektivträger steht. In Kombination mit dem Antiflex-Objektiv (4.9 (c)) erhöht sich der Kontrast schließlich deutlich.

Abbildung 4.9 (c) & (d) zeigen zudem den Einfluss der Stellung des $\lambda/4$ -Plättchens auf Kontrast und Helligkeit des Bildes. Bei optimaler Stellung (45° zur Polarisationsrichtung des einfallenden Lichtes, 4.9 (c)) wird das Licht zirkular polarisiert und die maximal mögliche Intensität tritt durch den Analysator. Bei abweichender Polarisatorstellung wird das einfallende Licht elliptisch polarisiert und die durch den Analysator tretende Intensität ist geringer; das Bild wird dunkler. Im Spezialfall einer Stellung des $\lambda/4$ -Plättchens von 0° ist die Intensität des Interferogramms

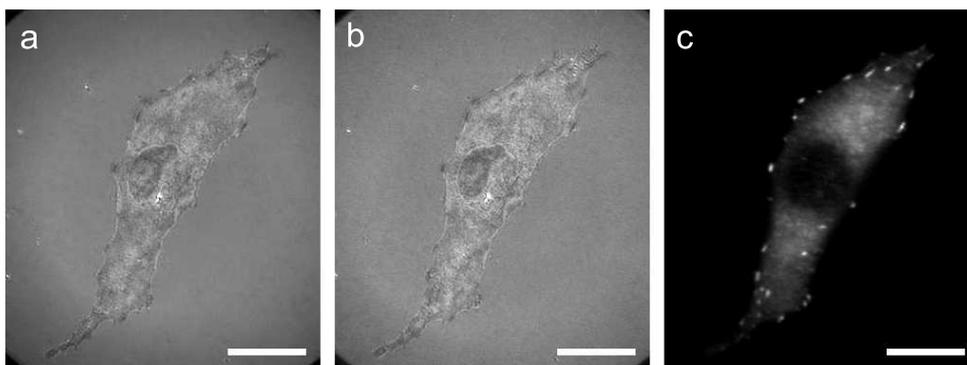


Abbildung 4.10: Auf Kollagen beschichteter Glasoberfläche fixierte PatuT-Zelle im RIKM- und Fluoreszenz-Modus des Aufbaus. (a): RIKM-Aufnahme bei $593\ \text{nm}$ (CCD1); (b): RIKM-Aufnahme bei $546\ \text{nm}$ (CCD2); (c): Fluoreszenzaufnahme des mittels Cy3 angefärbten Paxillins der Zelle (CCD1). Bei Paxillin handelt es sich um ein mit den fokalen Adhäsionsstellen der Zelle assoziiertes Signalprotein weshalb die fluoreszenten Bereiche mit den dunklen Adhäsionsbereichen im RIKM-Modus übereinstimmen. Maßstab: $20\ \mu\text{m}$ (Mit freundlicher Genehmigung von Katharina Klein).

am geringsten und weist zudem ein deutliches Kreuz auf, wie es aus Kristallanalysen mittels Polarisationsmikroskopie bekannt ist [87]. Dabei handelt es sich um eine von *Inoue und Kubota* beschriebene Diffraktionsanomalie, hervorgerufen durch eine Rotation der Polarisationssebene aufgrund gekrümmter Oberflächen (hier: Polystyrolkugel) [88].

Abbildungen 4.10 und 4.11 zeigen Anwendungsbeispiele der RIKM. Der Aufbau wurde unter anderem verwandt um Vesikeldynamiken aber auch Adhäsionscharakteristika von Tumorzellen zu untersuchen [83, 101].

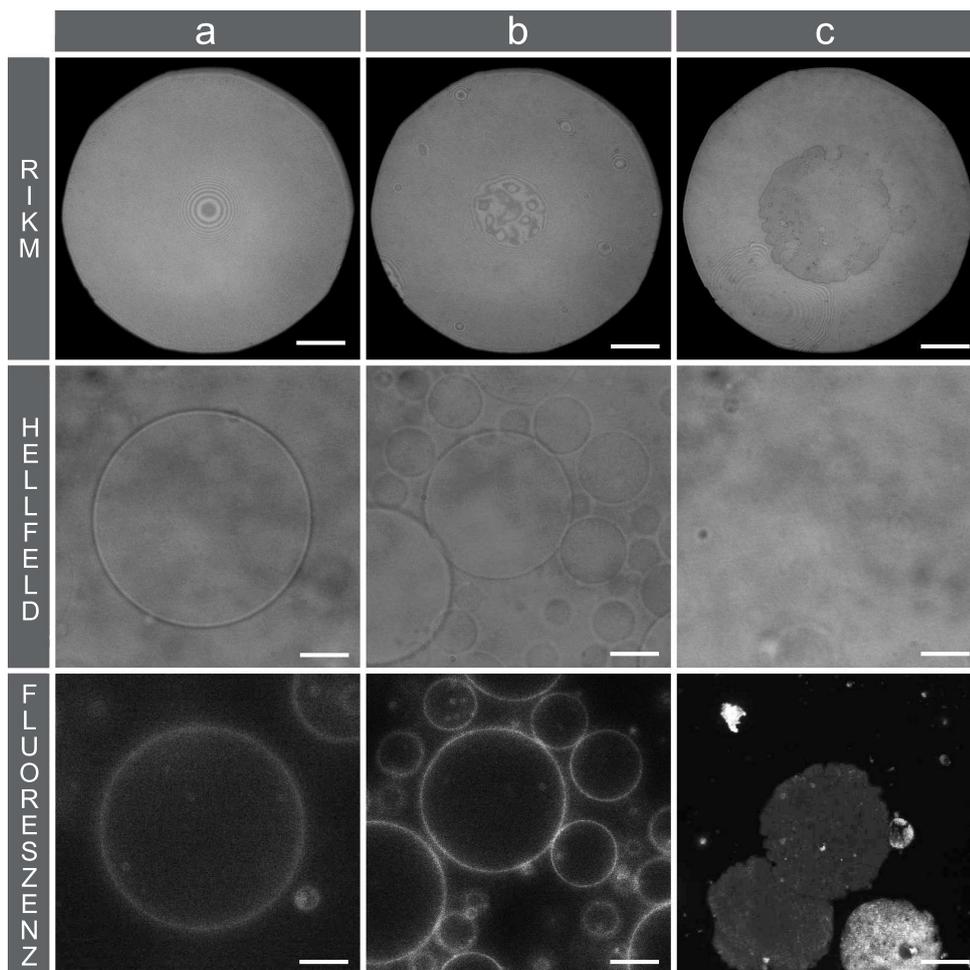


Abbildung 4.11: Vesikeladhäsion und -ausbreitung aufgenommen im Hellfeld-, RIKM- und Fluoreszenzmodus des Aufbaus. Die Gegenüberstellung zeigt die Vorteile der verschiedenen Techniken: Nicht ausgebreitete Vesikel in der Nähe der Oberfläche (a, b) sind mit allen 3 Techniken gut zu identifizieren, aber nur die RIKM-Technologie gibt Aufschluss über den Adhäsionsgrad der GUVs. Ausgebreitete Membranen (c) lassen sich mittels konventioneller Hellfeldtechnik nicht identifizieren. Gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie besitzt die RIKM zudem den Vorteil der Markerfreien Anwendung. Maßstab: 20 μm .

KAPITEL 5

Mikrofluidik

Die Mikrofluidik ist mit ihren geringen Reaktionsvolumina von wenigen Mikrolitern aber auch mit der begrenzten Dimension geeignet, chemische Reaktionen und biologische Prozesse zu erforschen, die in großen Volumina nur schwer zu realisieren sind [73, 92, 212]. Durch Einführung der Softlithographie in Flexibilität klassischen, makroskopischen Techniken nicht nachstehend, lässt sie sich auf die jeweiligen Erfordernisse einzelner Experimente anpassen [5]. So gewann sie, auch durch die damit einhergehende Reduktion der Kosten und Entwicklungsdauern, in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung für die *in vitro* Modellierung zellulärer Systeme.

5.1 Photolithographie und Flusszellenbau

Mittels der von *Whitesides et al.* entwickelten Methode der Softlithographie [44, 226] wurden in einem mehrstufigen Prozess Mikrofluidiksysteme aus Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt. Bei PDMS handelt es sich um ein im sichtbaren Wellenlängenbereich transparentes Silikonelastomer. Aufgrund seiner physikalischen und chemischen Stabilität findet es einen weit verbreiteten Einsatz in medizinischen und technischen Anwendungen, von Kontaktlinsen [149] bis hin zu ionensensitiven Membranen [9, 193]. Mit einer einzigartigen Flexibilität die, je nach Kettenlänge und Vernetzerdichte, in einem Schubmodul zwischen 100 kPa und 3 MPa zum Ausdruck kommt ist es perfekt geeignet für elastische Abformungen. Darüber hinaus bietet es eine hohe thermische Stabilität, eine hohe Kompressibilität sowie eine hohe Gas-Permeabilität [118]. Letzteres allerdings kann beim Einsatz in mikrofluidischen Zellen zu Luftblasenbildung oder Austrocknung führen.

Der Herstellungsprozess lässt sich unterteilen in Design und Erzeugung der für die Abgussformen nötigen Photomaske, der photolithographischen Erzeugung der Negativmaske sowie dem Abguss und der Montage der Flusszellkomponenten.

5.1.1 Herstellung der Negativmasken

Um eine Negativform der PDMS-Strukturen mittels Kontakt-Photolithographie zu erzeugen, werden zunächst die teilweise lichtundurchlässigen Photomasken hergestellt. Dabei wird je nach

Strukturgröße auf zwei unterschiedliche Prozesse zurückgegriffen.

Für Strukturen $> 5 - 10 \mu\text{m}$ (hier: Kanalstrukturen) wurden die mittels einer CAD-Software erzeugten Muster auf eine transparente Polymerfolie gedruckt (*JD Photo-Tools, Großbritannien*). Um die für Säulenstrukturen notwendige Genauigkeit zu erreichen wurde hingegen eine Chrom-Mastermaske hergestellt. Dafür wurde unter Reinraumbedingungen und Gelblicht 1 ml des positiv-Photolacks *AZ-1505 (Microchemicals, Deutschland)* mittels Rotationsbeschichtung (500 U/min, 8 s; 3500 U/min, 25 s) auf eine 2×2 Zoll messende Quarzglasplatte (*Krankenhaus- und Laborbedarf Manfred Fremdling, Deutschland*) aufgebracht. Nach Trocknung bei 80°C für 30 min im Lacktrockenschrank wurden die Strukturen mittels eines programmierbaren Laser-Maskenschreibers (*DWL 66; Heidelberg Instruments, Deutschland*) nach Vorlage der Zeichendatei geschrieben. Da es sich bei *AZ-1505* um einen Positivlack handelt blieben nach Entwicklung mit *AZ-351* Entwickler (1 : 6 verdünnt in Wasser, 1 min; *Microchemicals, Deutschland*) nur die belichteten Bereiche (hier: 5×5 mm großes Feld mit $5 \mu\text{m}$ durchmessenden Scheiben) zurück.

Tabelle 5.1: Prozessverlauf zur photolithographischen Herstellung der Masken mit einer Höhe von $15 \mu\text{m}$ (z.B. Lochstrukturen auf Silizium) und $40 \mu\text{m}$ (z.B. Kanalstrukturen auf Quarzglas).

Arbeitsschritt	Erläuterung für $15 \mu\text{m}$	Erläuterung für $40 \mu\text{m}$
Substrat	Siliziumplatten, 2" oder 4"	Quarzglasplatten, 2"
Substratvorbereitung	Abblasen mit Stickstoff; 15 min Dehydration bei 200°C im Trockenschrank	Ultraschallen in 10%iger Extranlösung für 10 min; 30 min Dehydration bei 200°C im Trockenschrank
Beschichtung	Rotationsbeschichtung mit SU8-2010 (2 ml für 2" Scheiben, 4 ml für 4" Scheiben): → 5 s bei 500 U/min → 32 s bei 1500 U/min	Rotationsbeschichtung mit 2 ml SU8-25: → 5 s bei 500 U/min → 32 s bei 2000 U/min
Vorbacken	Auf einer Heizplatte: → 1 min bei 65°C → 3 min bei 95°C	Auf einer Heizplatte: → 3 min bei 65°C → 7 min bei 95°C
Belichtung	400 W HBO (MJB3): 4,5 - 4,8 s	400 W HBO, (MJB3) 14,0 - 15,0 s
Nachbacken	Auf einer Heizplatte: → 1 min bei 65°C → 4 min bei 95°C	Auf einer Heizplatte: → 1 min bei 65°C → 5 min bei 95°C
Entwicklung	ca. 3 min in Microchem SU-8 Entwickler schwenken; mit Entwickler abspülen	
Trocknen	Abblasen mit Stickstoff; 20 min bei 75°C im Lacktrockenschrank zu Ende backen	

Mit Hilfe einer Sputter-Beschichtungsanlage (*MED 020 Coating System; Bal-Tec, Liechtenstein*) wurde anschließend eine ≈ 100 nm dicke, lichtundurchlässige Chromschicht aufgetragen. Dazu wurde zunächst das Chrom-Target bei 120 mA und $1,3 \cdot 10^{-2}$ mbar Argon bei geschlossener Blende 20 s lang von seiner Oxidschicht befreit, um direkt danach die Maske 320 s lang mit Chrom zu bestäuben. Anschließend wurde der noch vorhandene Photolack mit Aceton abgelöst. Zurück blieb die mit dem Maskenschreiber erstellte Struktur als dünne Chromschicht in den

Bereichen, die zuvor mittels des Laser-Maskenschreibers belichtet wurden.

Die Abgussmasken wurden mittels des negativ-Photolacks *SU8* (*MicroChem, USA*) ausgeführt. Bei *SU8* handelt es sich um eine Kombination des Epoxidharzes EPON-Resin welches, gelöst in γ -Butyrolacton oder Cyclopentanon, in verschiedenen Viskositäten erhältlich ist. Dadurch und durch seine hohe Transparenz im Ultraviolettbereich lassen sich mittels Rotationsbeschichtung Schichtdicken von $< 1 \mu\text{m}$ bis hin zu $300 \mu\text{m}$ realisieren. Bei der eigentlichen photoreaktiven Substanz, welche den Vernetzungsprozess initialisiert, handelt es sich um Triarylsulfoniumhexafluoroantimonat mit einem Absorptionsmaximum bei 365 nm [22, 152].

Der photolithographische Prozess folgt der in Tabelle 5.1 und Abbildung 5.1 beschriebenen Vorgehensweise. Für Säulenstrukturen wurden 2 und 4 Zoll große, einseitig polierte Siliziumscheiben (*Si-Mat, Deutschland*) mit Stickstoff abgeblasen und für 15 min bei $200 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wassertrockenschrank ausgeheizt. Mittels des Rotationsbeschichters wurde auf dem Silizium eine $15 \mu\text{m}$ dicke Schicht *SU8-2010* (2 ml für 2 Zoll Scheiben, 4 ml für 4 Zoll Scheiben; 5 s bei 500 U/min und 32 s bei 1500 U/min) erzeugt und zur Verdunstung des Lösemittels vorgebacken. Um Schäden an der Lackstruktur durch thermische Beanspruchung zu vermeiden wurde der Heizvorgang in zwei Stufen auf verschiedenen Heizplatten bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min) und bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min) durchgeführt. Zusammen mit der Photomaske in einen Maskenausrichter (*MJB3; SÜSS MicroTec, Deutschland*) eingespannt wurden die belackten Siliziumscheiben mittels einer 400 W Quecksilberdampfampe 4,5 - 4,8 s belichtet. Anschließend wurden sie erneut auf den Heizplatten (1 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ und 4 min bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$) erhitzt um den Vernetzungsprozess der belichteten Bereiche abzuschließen.

Im Falle des Säulenfeldes war der Lack nun überall mit Ausnahme der $5 \mu\text{m}$ durchmessenden Scheiben vernetzt. Zur Entfernung des Lackes an den nicht belichteten Stellen, respektive den

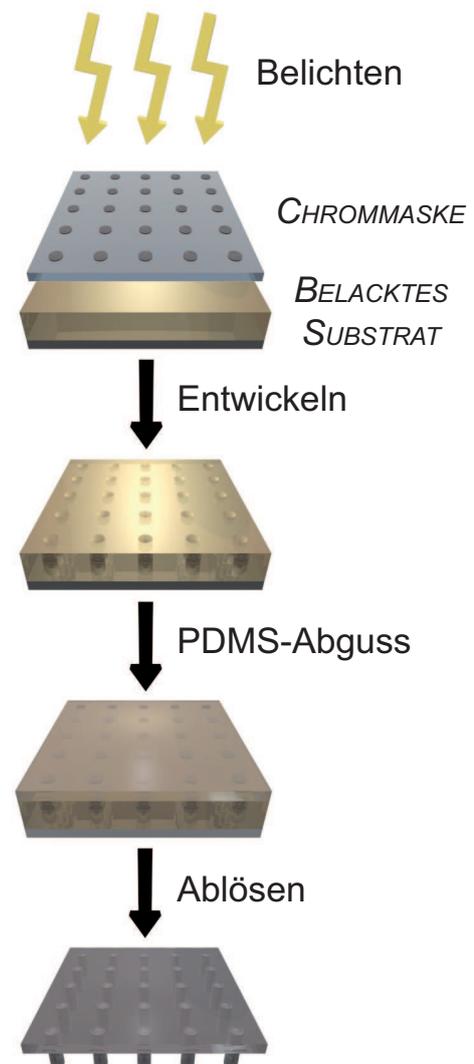


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Photo- und Softlithographieschritte anhand von PDMS-Säulenfeldern.

Kreisscheiben, wurden die Siliziumscheiben für circa 3 min in *SU8*-Entwickler (*mrDev 600*; *MicroChem, USA*) geschwenkt und mit Stickstoff trockengeblasen. Um Reste nichtbelichteten *SU8*s zu identifizieren konnten die Strukturen mit Isopropanol abgewaschen werden. Kam es dabei zu einer Weißfärbung des Photolackes so war ein weiterer Entwicklungsvorgang anzuschließen.

Auf ähnliche Weise wurden auch Masken für die Kanäle erstellt. Statt Siliziumscheiben wurden 2×2 Zoll messende Glasplatten verwendet, die in einer 10 %igen Extranlösung für 10 min ultraschallbehandelt wurden. Nach Abspülen mit Reinstwasser wurden sie für mindestens 30 min im Wassertrockenschrank dehydriert. Um die vorgesehene Höhe von $40 \mu\text{m}$ zu erreichen wurde der höherviskose *SU8-25* verwendet, was eine Anpassung der Back- (Vorbacken: 3 min bei 65°C und 7 min bei 95°C ; Nachbacken: 1 min bei 65°C und 5 min bei 95°C) sowie der Beschichtungsparameter (5 s bei 500 U/min und 32 s bei 2000 U/min) nach sich zog.

Neben den photolithographisch generierten Strukturen wurden darüber hinaus für die in Abschnitt 5.5 beschriebenen Kanäle Abgussformen aus Teflon verwandt. Um die spätere Ablösung der PDMS-Strukturen zu verbessern wurden sowohl die Silizium- als auch die Glasmasken einer Passivierung mittels 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorosilan (PFTCS) (*ABCR, Deutschland*) unterzogen. Hierfür wurden die Strukturen über Nacht, mindestens jedoch für 4 h, zusammen mit 300 μl PFTCS in einem evakuierten Exsikkator ($\approx 0,1 \text{ mbar}$) gelagert. Dabei kommt es unter Abspaltung der Chloridgruppen zu einer Anlagerung an die Siliziumstrukturen und zur horizontalen Vernetzung des Silans (vergleiche auch Abbildung 5.10 zur Silanisierung mittels APTES).

5.1.2 PDMS-Abguss und Montage

Das für den Abguss verwandte Polydimethylsiloxan wurde in Form eines 2-Komponenten Produktes, bestehend aus Siloxan sowie dem Vernetzerreagenz Hydrosilan, welchem ein Platinkomplex als Katalysator beigelegt ist, geliefert (*Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit*; *Dow Corning, USA*). Standardmäßig in einem Verhältnis von 10:1 angerührt wurde die Mischung anschließend im Exsikkator entgast und konnte bei -20°C mehrere Tage im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

Die Grundkomponente der entwickelten Mikrofluidiksysteme bildete in beiden Fällen eine Kanalstruktur eingepreßt in eine PDMS-Schicht auf Glas mit äquivalenter Höhe. Dafür wurde eine geringe Menge des entgasten PDMS über die Struktur verteilt und ein mittels Ethanol gereinigtes Deckglas ($60 \times 24 \text{ mm}$; *Carl Roth, Deutschland*) dagegengespreßt. Im Falle der Blockkomponenten, wie z.B. dem Säulenfeld, wurde die Abgussstruktur in einer Petrischale bis zur gewünschten Höhe mit PDMS übergossen und im Exsikkator ein weiteres Mal entlüftet. Um die Polymervernetzung – welche bei Raumtemperatur circa 24 h dauert – zu beschleunigen wurden die Abgüsse für 3-4 h bei 65°C gelagert. Nach Verfestigung konnten die Blockstrukturen aus der Petrischale herausgetrennt und von der Maske abgezogen werden. Die Kanalstrukturen auf

den Deckgläsern mussten unter Verwendung einer Rasierklinge und Ethanol vorsichtig von der Glasmaske abgelöst werden.

Als mikrofluidische Zuleitungen dienten PTFE-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,3 mm bei einem Außendurchmesser von 0,6 mm (# S 1810-04; Bohlender, Deutschland). Um sie anzubringen wurden die Blockstrukturen entsprechend der Kanalform mit einem Probenstanzer von 0,5 mm Durchmesser (Harris Uni-Core - 0.5; Ted Pella, Kannada) durchstoßen und die Schläuche bündig hindurchgezogen. Um Unreinheiten zu entfernen wurden die Mikrofluidikkomponenten in 10 %iger Ethanollösung für 5 min ultraschallbehandelt. Um für eine stabile Verbindung zwischen den Einzelteilen zu sorgen wurden die Flusszellenteile für 30 s bei 150 W und 0,5 mbar einem Sauerstoffplasma ausgesetzt (Plasmagerät 100-E; PVA Tepla, Deutschland). Die Plasmabehandlung führte zu einer Oxidation der endständigen Gruppen des Siloxan, wodurch stabile Bindungen zwischen den PDMS-Teilen möglich wurden [144, 154]. Um insbesondere die Anschlussstellen der Schläuche luftdicht zu verschließen wurden in einem abschließenden Schritt die Ränder der zusammengefügt Flusszelle mit additionsvernetztem 2-Komponenten-Silikon (Twinsil; picodent, Deutschland) versiegelt.

5.2 Proteinaufbereitung

Die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen hängt in hohem Maße von der Qualität der verwendeten biologischen Präparate und Puffersubstanzen ab [227]. Dabei zeigen Proteine wie Aktin im allgemeinen eine Anfälligkeit für biologische oder chemische Abbauprozesse [78, 110, 131, 142, 156], was eine sorgfältige Durchführung der Herstellungs- und Verarbeitungsprotokolle nötig macht.

5.2.1 Aufbereitung und Lagerung von globulärem Aktin

Ausgangsprodukt für die Erzeugung von F-Aktin ist globuläres Aktin, gewonnen aus dem Muskelgewebe von Kaninchen. Extrahiert nach den Methoden von Pardee und Spudich [156] am MPI für Intelligente Systeme, Stuttgart, wurde es in 2 Schritten über mehrere Tage mittels einer Dialysekassette (Slyde-A-Lyzer Dialysis Cassettes 10K MWCO; Thermo Fisher Scientific, VSA) gegen den in Tabelle 5.2 aufgeführten Puffer dialysiert. Neben dem als Puffersubstanz dienenden Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) ermöglichen die Inhaltsstoffe Dithiothreitol (DTT) als Antioxidationsmittel und NaN_3 als Schutz vor bakterieller Kontamination die Langzeitlagerung des G-Aktins. Zur Entfernung denaturierten Aktins, sowie assoziierter Proteine, wurde die Lösung jedoch zunächst über eine Dauer von 2 h bei 100.000 g zentrifugiert und der Überstand mittels Größenausschluss-Chromatographie aufgetrennt [122].

Für die Durchführung der Experimente war es nötig, das isolierte Aktin mit biotinyliertem G-Aktin (tebu-bio, Deutschland) in einem 1 : 25 Verhältnis zu mischen. Die resultierende Lösung

mit einer Aktinkonzentration von 1,6 mg/ml wurde zur Vermeidung von Gefrierschäden mit 20 Vol.-% Glycerin vermischt, in 20 µl Einheiten aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80 °C aufbewahrt lässt sich das aufgereinigte Aktin so mehrere Monate lagern ohne strukturelevante Schäden davonzutragen.

Tabelle 5.2: Zusammensetzung des G-Puffers; pH 8,0 (*M*: Molekulargewicht, *c*: Konzentration in 1x-Puffer, *m*: Massenanteil in 100 ml 10x-Puffer).

Substanz	<i>M</i> [g/mol]	<i>c</i> [mmol/l]	<i>m</i> [mg]
NaN ₃ (20 %ige Lösung)	65	3,0	1 ml
TRIS	121	2,0	242
Na ₂ ATP	551	0,2	110
DTT	154	0,2	31
CaCl ₂ · 2H ₂ O	147	0,2	29

5.2.2 Polymerisation von filamentösem Aktin

Die Polymerisation des aufgereinigten, globulären Aktins zu F-Aktin fand in einer Lösung statt deren Basis der in Tabelle 5.3 beschriebene, 10x konzentrierte F-Puffer ist. In einem Volumen von 100 ml hergestellt kann er aliquotiert, wie auch die Stocklösungen der anderen Puffer, bei -20 °C mehrere Monate gelagert werden.

Tabelle 5.3: Zusammensetzung des F-Puffers; pH 7,4 (*M*: Molekulargewicht, *c*: Konzentration in 1x-Puffer, *m*: Massenanteil in 100 ml 10x-Puffer).

Substanz	<i>M</i> [g/mol]	<i>c</i> [mmol/l]	<i>m</i> [mg]
KCl	75	100,0	7500
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203	2,0	406
TRIS	121	2,0	242
Mg ₂ ATP	507	0,5	254
DTT	154	0,2	31
CaCl ₂ · 6H ₂ O	147	0,2	29

Um eine Endkonzentration von 5 µM F-Aktin zu erreichen wurde die Polymerisation auf Eis durch Zugabe von 12,5 µl G-Aktin zu einer Mischung von 10 µl 10x F-Puffer und 72,5 µl entgastem MilliQ-Wasser initiiert. Dabei kommt die Aktinkonzentration einer Menge gleich, welche bei vollständiger Polymerisation einem Doppelstrang von circa 520 km Länge entspräche. Zur Verhinderung der Depolymerisation und gleichzeitigen Fluoreszenzmarkierung der Filamente wurden 10 min nach Polymerisationsbeginn 5 µl einer 0,1 µM Phalloidin-TRITC Lösung (*Sigma-Aldrich, USA*) zugegeben. Bei TRITC (Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat) handelt es sich

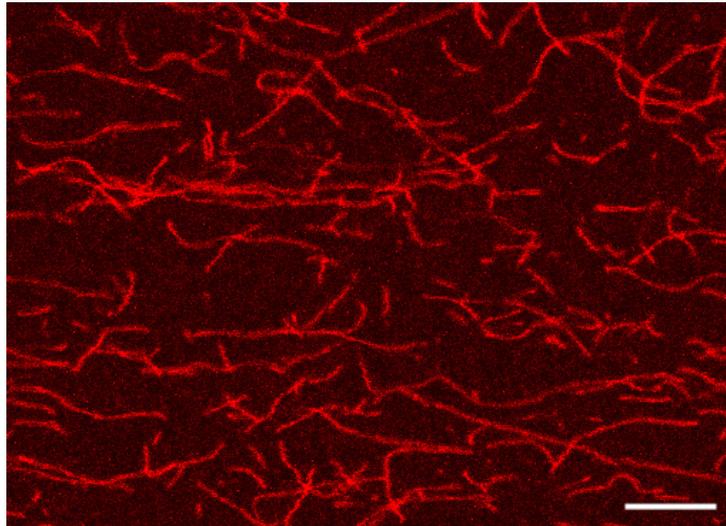


Abbildung 5.2: Fluoreszenzaufnahme von auf Glas adhärenen Aktinfilamenten zur Qualitätskontrolle im Anschluss an den Polymerisationsvorgang. Maßstab: 10 µm.

um einen zur Rhodamin-Familie gehörenden Fluoreszenzfarbstoff mit einem Anregungsmaximum λ_{ex} von 544 nm und einem Emissionsmaximum λ_{em} bei 572 nm. Die erhaltenen Aktinfilamente wiesen durchschnittliche Längen von 10-30 µm auf (vgl. Abbildung 5.2) und konnten bei 4-8 °C bis zu 2 Wochen gelagert werden.

Zur Verwendung in den Experimenten wurde die F-Aktin Stocklösung mittels des in Tabelle 5.4 beschriebenen Verdünnungspuffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Tabelle 5.4: Zusammensetzung des Verdünnungspuffers; pH 7,4 (M : Molekulargewicht, c : Konzentration in 1x-Puffer, m : Massenanteil in 100 ml 10x-Puffer).

Substanz	M [g/mol]	c [mmol/l]	m [mg]
KCl	75	25,0	1875
Imidazol	68	25,0	1700
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203	4,0	812
EGTA	380	1,0	380

5.2.3 Aufbereitung von NEM-HMM

Zur Anbindung der Aktinfilamente an die Säulenstruktur wird eine mittels N-ethylmaleimid modifizierte Abart der schweren Myosin II Kette verwandt (NEM-HMM, engl. *N-ethylmaleimide heavy meromyosin*). N-ethylmaleimid blockiert die ATPase Fähigkeit der Myosin-Kopfregion indem es an die Cystein Gruppen des aktiven Zentrums bindet. Da die Aktinbindungsseite von der Modifikation nicht beeinträchtigt wird kann es zu einer Bindung an Aktin kommen, jedoch

können einmal geschlossenen Verknüpfungen nicht mehr gelöst werden.

HMM wurde entsprechend der Extraktionsmethode von *Margossian und Lowey* aus der Muskulatur von Kaninchen gewonnen [127] und wie von *Cande et al.* beschrieben zu NEM-HMM weiterverarbeitet [23, 133].

5.3 Erzeugung unilamellarer Vesikel

Künstlich erzeugte Vesikel werden anhand ihrer Größe standardmäßig in 3 Kategorien eingeteilt: SUVs (kleine unilamellare Vesikel, engl. *small unilamellar vesicles*) mit Größen von 20-100 nm, LUVs (große unilamellare Vesikel, engl. *large unilamellar vesicles*) mit 0,1-1 μm und GUVs (riesige unilamellare Vesikel, engl. *giant unilamellar vesicles*) mit Durchmessern von 1-200 μm . Dabei können bei LUVs und GUVs auch weitere unilamellare Vesikel eingeschlossen sein. Man spricht in diesen Fällen von Multilamellaren (MLV) oder Multivesikularen Vesikeln (MVV). Neben ihrer Größe unterscheiden sie sich auch in ihren verschiedenen Herstellungsweisen [95, 106].

Gebräuchlichste Methode zur Herstellung von SUVs ist die Hochenergie-Ultraschallformation [177]. Dabei wird der zunächst im Inneren eines Glasgefäßes angetrocknete Lipidfilm nach Zugabe der wässrigen Pufferlösung mittels eines Proben-Ultraschallgerätes mit Titanspitze für mehrere Minuten in Schwingung versetzt. Die sich dabei bildende Vesikellösung wird anschließend durch einen Membranfilter gepresst um abgelöste Titanpartikel zu entfernen.

LUVs können je nach Lipidkomposition beispielsweise durch Extrusion einer MLV haltigen Lösung erzeugt werden [132]. Die dafür benötigten MLVs formen sich spontan, wenn angetrocknete, der wässrigen Pufferlösung bei Temperaturen oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_m ausgesetzte, Lipidschichten mechanischen Vibrationen unterzogen werden. Die so erhaltene Lösung wird anschließend durch Polycarbonatfilter mit Lochgrößen von einigen Dutzend bis hin zu mehreren Hundert Mikrometern gepresst. Der mechanische Stress dem die Vesikel dabei ausgesetzt sind bewirkt eine starke Deformation und den Zerfall in unilamellare Vesikel mit einer relativ homogenen Größenverteilung. Bei wiederholter, starker Deformation kommt es zu einer Zersetzung und der sukzessiven Umwandlung von LUVs in SUVs. Eine weitere Möglichkeit der LUV-Herstellung ist die Änderung des pH-Wertes einer Dispersionslösung neutraler und negativ geladener Lipide vom sauren (≈ 3) in den neutralen/alkalischen ($\approx 7-11$) Bereich [76]. Neben dem pH-Wert hängt die finale Größenverteilung der Liposomen zusätzlich vom Verhältnis der eingesetzten Lipide ab. So führt eine Erhöhung des Anteils neutraler Lipide bei gleichzeitiger Verringerung des Ziel-pH-Wertes zu einer Erhöhung der Anzahl großer Vesikel.

Eine der ersten Methoden zur Erzeugung unilamellarer Riesenvesikel war die von *Reeves et al.* beschriebene Methode der kontrollierten Hydratation von Lipidmembranen [169, 214]. Sie folgt im wesentlichen dem oben erläuterten Prinzip zur Herstellung multilamellarer Vesikel, mit dem Unterschied der Vermeidung der MLV-Erzeugung durch Vermeidung jeglicher Erschütte-

rung oder Umwälzung während des Quellvorganges. So wird die Hydratisierung initiiert indem feuchtigkeitsgesättigtes N_2 -Gas über die getrocknete Lipidschicht geleitet und die wässrige Pufferlösung erst nach 15 min Vorquellen zugegeben wird. Das Verfahren ist geeignet für eine breite Anzahl an Phospholipiden bei nicht zu hohem Anteil (10-20 mol%) geladener Lipide und ist auch bei physiologischen Pufferstärken anwendbar. Weitere Möglichkeiten stellen darüber hinaus die w/o/w-Doppel-Emulsionsmethode [200] sowie die gepulste Durchspülung einer Lipiddoppelschicht [59, 194] dar. Beide Methoden weisen dabei den Vorteil der Monodispersität und einfachen Größenkontrolle der entstehenden Liposomen auf, bieten jedoch im Vergleich mit den anderen Methoden nur eine beschränkte Mengenausbeute.

Das derzeit jedoch Verbreiteste, und noch dazu in Volumina von mehreren hundert Mikrolitern anwendbare Verfahren, ist die erstmals von *Angelova und Dimitrov* Mitte der 80er Jahre durchgeführte Elektroformation von Riesenvesikeln [8].

5.3.1 Elektroformation von Riesenvesikeln

Bei der in dieser Arbeit verwandten Methode handelt es sich um eine Weiterentwicklung des von *Angelova und Dimitrov* entwickelten Verfahrens. Dabei ist die Elektroformation (alternativ: Elektroquellung) auch anwendbar auf Lipidkompositionen die nach der klassischen Hydrationsmethode nur schwaches Quellverhalten zeigen und liefert über einen breiten Bereich an unterschiedlichen Ionenkonzentration der Pufferlösung [140, 164] einen Anteil unilamellarer Vesikel von bis zu 60 %. Historisch gesehen wird dabei eine Chloroformlösung der Lipide auf zwei parallele Platinelektroden aufgetragen und unter Stickstoff getrocknet. Die Elektroden werden anschließend in ein Gefäß mit Pufferlösung getaucht und ein elektrisches Wechselfeld geringer Stärke (< 3 V) angelegt. Der theoretischen Beschreibung von *Puff und Angelova* zufolge [166] kommt es dabei wie in Abbildung 5.3 (b) gezeigt zu elektrisch induzierten Fluktuationen durch elektroosmotische Bewegungen der H_2O -Moleküle zwischen den Lipiddoppelschichten. Verstärkt durch die Oszillation der Wassermoleküle entlang der Achse des E-Feldes kommt es zu einer teilweisen Ablösung und der Entstehung pilzartiger Ausformungen von 10-20 μm Größe (Abbildung 5.3 (c)), die in der Lage sind miteinander zu fusionieren. Im letzte Schritt (Abbildung 5.3 (d)) kommt es nach Ausbildung einer sphärischen Form zu einer Abschnürung und Loslösung von der Oberfläche.

Der Quellvorgang wird sowohl von Wechselfeldstärke und -frequenz, der Filmdicke und Pufferzusammensetzung als auch von Temperatur und Dauer der Behandlung beeinflusst. Eine Erhöhung der Temperatur über die Phasenübergangstemperatur hinaus hat dabei *Angelova et al.* gemäß eine deutliche Beschleunigung der Quellung zufolge. Wie die spontane Quellung ist auch die Elektroformation nicht geeignet um große Moleküle, wie z.B. Proteine, innerhalb der Liposome einzuschließen, da ihr Eindringen zwischen die Lipiddoppelschichten durch Größe und Ladung behindert ist [214]. Des weiteren kann es, abhängig vom Elektrodenmaterial, bei zu hohen Spannungen zur Oxidation und Hydrolyse von Lipiden kommen, was jedoch durch

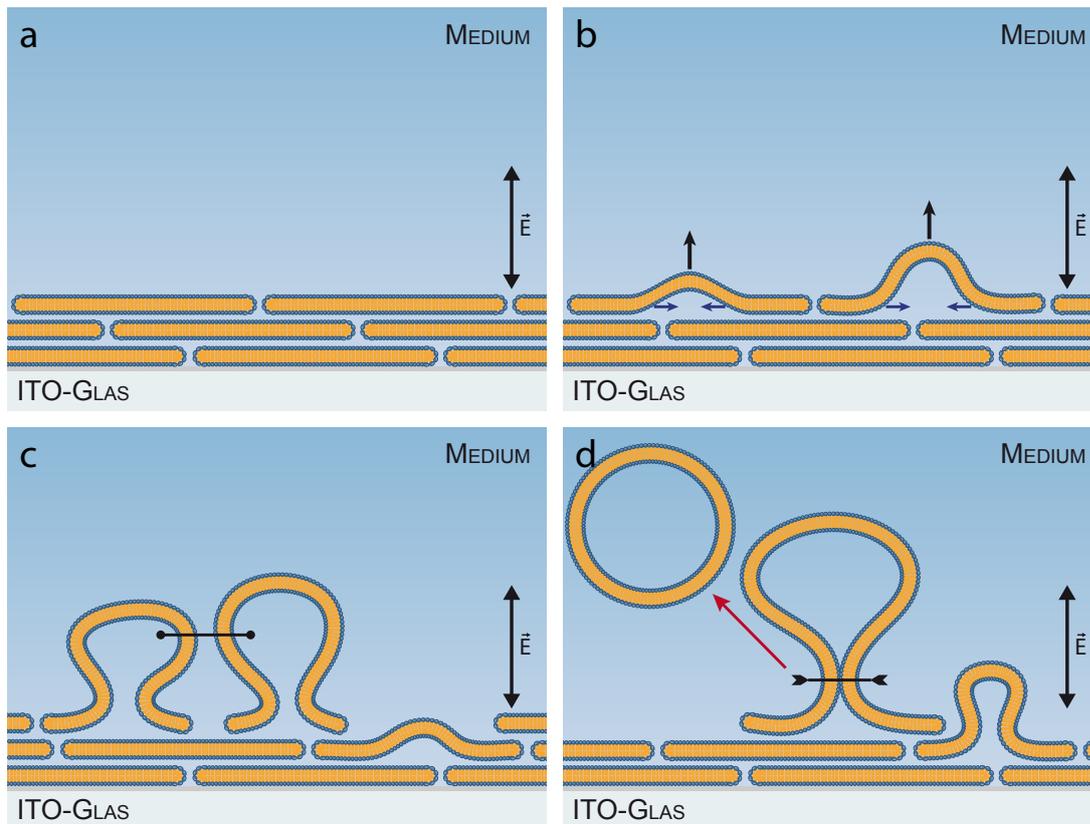


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Elektroquellung von GUVs auf ITO-Glas. Resultierend aus dem wechselnden elektrischen Feld werden die auf der Oberfläche abgeschiedenen Lipidschichten (a) durch die oszillierenden Bewegungen der Wassermoleküle entlang des E -Feldes in Schwingung versetzt (b). Dabei bilden einzelne Schichten pilzartige Formen von 10-20 μm Größe aus (c), die fusionieren und sich in einem Abschnürprozess von der Oberfläche lösen können (d). (Adaptiert von [166].)

geeignete Wahl der Puffer vermindert werden kann [141].

In dieser Arbeit wurden als Elektroden für die Quellung sogenannte ITO-Gläser verwandt. Dabei handelt es sich um Glasplatten in der Größe handelsüblicher Objektträger, welche mit einer weitgehend transparenten, 200 nm dicken Schicht des Halbleitermaterials Indiumzinnoxid (engl. *indium tin oxide*, ITO) überzogen wurden (*Präzisions Glas & Optik GmbH, Deutschland*) und einen Flächenwiderstand von 10Ω aufweisen. Zur Abscheidung der Membranschichten wurden die in Chloroform gelösten Lipidkompositionen mittels einer 25 μl fassenden, lösungsmittelbeständigen Spritze (702 RN SYR; *Hamilton, USA*) vorsichtig auf einer vorher markierten Fläche im Zentrum zweier ITO-Gläser aufgebracht. So soll gewährleistet werden, dass eine möglichst dünne – wenige Dutzend Nanometer starke – Beschichtung entsteht, deren Homogenität durch Reflexion des Lichtes bei großen Winkeln überprüft werden kann. Alternativ dazu kann die Lipidaufbringung auch mittels Rotationsbeschichtung durchgeführt werden. Sie ermöglicht eine

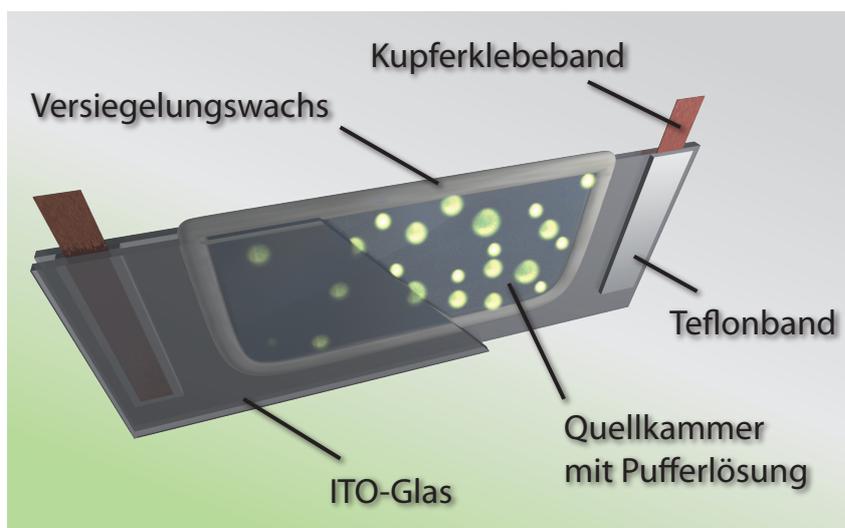


Abbildung 5.4: Darstellung der Vesikelquellkammer zur Herstellung von GUVs. Die als Elektroden dienenden ITO-Gläser wurden mit Teflonbändern als Isolatoren und Abstandshalter versehen und über Kupferklebeband an die Klemmen eines Funktionsgenerators angeschlossen. Mittels Versiegelungswachs wurde um die aufgetragene Lipidschicht eine zentrale Quellkammer geschaffen und mit Pufferlösung gefüllt. Da die Herstellung der Vesikel mehrere Stunden in Anspruch nimmt und bei erhöhter Temperatur durchgeführt wurde ist es nötig die Kammer hermetisch zu verschließen um eine Austrocknung zu verhindern.

verbesserte Kontrolle der Schichtdicke über große Bereiche was zu einem 2-5-fach höheren mittleren Durchmesser der Vesikel gegenüber der herkömmlichen Aufbringungsmethode führt [51].

Trotz einer nahezu instantanen Antrocknung der Lipide wurde die vollständige Verflüchtigung des Chloroforms zur Herstellung lösungsmittelfreier Membranen sichergestellt, indem die Gläser für wenigstens 4 h im Exsikkator evakuiert wurden. Anschließend wurden auf den mit einem Teflonband von 0,5 mm Dicke als Abstandshalter versehenen Platten (vgl. Abbildung 5.4) an den jeweils schräg gegenüberliegenden Seiten Kupferklebebänder mit leitfähigem Klebstoff und einer Stärke von 0,07 mm (*Scotch 1181/12*; 3M, Deutschland) angebracht. Zum Aufbau der Quellkammer wird der lipidbeschichtete Bereich eines Glases mit einem dünnen, gleichmäßig ausgerollten Strang Versiegelungswachses (*Hämatokrit-Versiegelungswachs*; Lab-Laborfachbedarf, Deutschland) u-förmig umgeben und vorsichtig mit dem zweiten Glasträger unter Zuhilfenahme zweier Metallblöcke zusammengepresst. Die so entstandene Kammer besitzt ein Volumen von einigen hundert Mikrolitern und kann mittels einer Spritze mit dem Quellpuffer (vgl. Tabelle 5.6) befüllt werden. Um zu verhindern, dass es zu einer Austrocknung der Kammer im Verlauf des mehrere Stunden dauernden Quellvorganges kommt, wurde schließlich die Oberseite mit einem weiteren Strang Versiegelungswachs verschlossen.

Die Elektroquellung wurde bei einer Temperatur von 30 °C in der Inkubationskammer des Aufbaus durchgeführt. Zur Initiierung wurden die Kupferstreifen mit einem Funktionsgenerator

(TG315; Thurlby Thandar Instruments, Großbritannien) verbunden und für 2 h eine Sinusspannung (1 V_{SS}; 10 Hz) angelegt. Um den Ablöseprozess der Vesikel zu unterstützen wurde in der Folge bei gleichbleibenden Parametern für eine weitere Stunde eine Rechteckspannung angelegt. Nach Abschluss des Quellvorgangs konnte die Kammer geöffnet und die Vesikellösung vorsichtig abgezogen werden. Aliquotiert in Eppendorf-Röhrchen konnte die Suspension über 5-7 Tage bei 7 °C gelagert werden bevor die Lipide begannen sich langsam zu zersetzen.

5.3.2 Verwendete Puffer und Lipide

Alle verwendeten Lipide gehören zur Gruppe der Phospholipide, stammten von *Avanti Polar Lipids, USA* und wurden in Chloroform gelöst geliefert (vgl. Tabelle 5.5). In Chloroform gelöste Lipide zeigen eine Anfälligkeit gegen Hydrolyse mittels Chlor- oder chloriger Säure. Um dies – sowie eine Verflüchtigung des Chloroforms und die damit verbundene Konzentrationsverfälschung – zu minimieren wurden alle Verarbeitungsprozesse auf Eis durchgeführt. Zur Lagerung bei -20 °C wurden sie in Mengen von einigen Hundert Mikrolitern in mit einem Teflon-Septum ausgestattete Glasfläschchen aliquotiert (Art-Nr.: E159.1, E163.1, E162.1; Carl Roth, Deutschland). Um eine Kontamination der einzelnen Lipidstammlösungen zu verhindern, wurden die verwendeten Hamilton Spritzen zwischen jedem Schritt mehrfach mit Chloroform gespült.

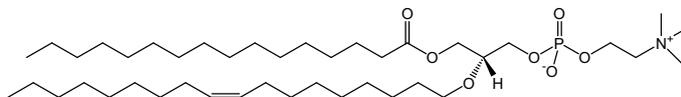
Grundkomponente der für die Experimente verwandten Lipidmischungen bildet das aus Eigelb gewonnene, ungesättigte L- α -Phosphatidylcholin (EPC, engl. *egg phosphatidylcholine*). Mit Cholin als Kopfgruppe gehören die Phosphatidylcholine zur Klasse der zwitterionischen Phospholipide und sind mit nahezu 50 % Anteil ein wichtiger Bestandteil der Membranen eukaryotischer Zellen [1]. Ihre geringe Phasenübergangstemperatur T_m von -15 bis -7 °C [27] gewährleistet, dass sich die Membranen bei Raumtemperatur im flüssigen Zustand befinden.

Tabelle 5.5: Membrankonstituenten (*M*: Molekulargewicht, *c*: Konzentration).

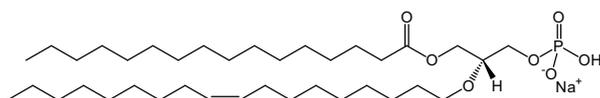
Abkürzung	Vollständige Bezeichnung	<i>M</i> [g/mol]	<i>c</i> [mg/ml]	Hersteller & Katalognummer
EPC	L- α -Phosphatidylcholin	770,12	10,0	Avanti 840051C
EPA	L- α -Phosphatidylsäure	706,16	10,0	Avanti 840101C
BioCAP	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(cap biotiny)	1105,47	10,0	Avanti 870273C
CF-PEG	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[poly(ethylen glycol)2000-N'-carboxyfluorescein]	3165,82	0,5	Avanti 810120C

Bei L- α -Phosphatidylsäure (EPA, engl. *egg phosphatidic acid*) handelt es sich um das biosynthetische Vorprodukt zu Phosphatidylcholin. Es trägt bei einem pH-Wert von 7,4, anders als das neutrale EPC, eine negative Gesamtladung und ist so zum Teil für die negative Ladung der zellulären Membranen verantwortlich.

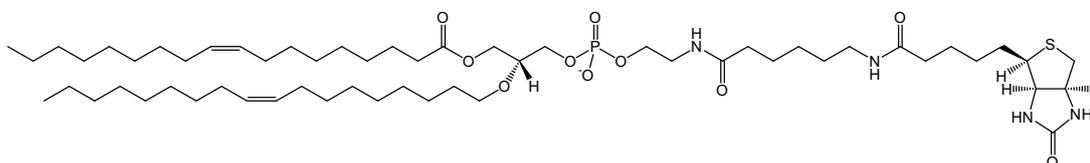
EPC



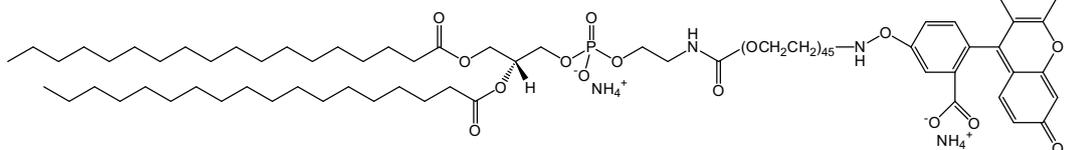
EPA



Biotinyl Cap DOPE



CF PEG2000 DSPE

**Abbildung 5.5:** Strukturformeln der verwendeten Lipide.

Eine weitere Komponente ist das mit einem Biotin-Molekül versehene 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-(cap biotinyl) (BioCAP). Sie ermöglicht mittels des Proteins Streptavidin die spezifische Bindung der Membranen an ebenfalls biotiniertes Aktin oder Substrate. Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion schließlich dient Carboxyfluorescein, ein synthetisches Fluoreszenzmolekül ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$), welches über eine 2 kDa schwere Polyethylenglycol-Kette an das Lipidgrundgerüst angebunden ist (1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-[poly(ethylenglycol)2000-*N'*-carboxyfluorescein]).

Der für die Elektroquellung verwandte Q-Puffer (siehe Tabelle 5.6) wurde in 2 verschiedenen, 10x konzentrierten Stammlösungen hergestellt, die sich in der Menge der enthaltenen Saccharose unterschieden. Durch Mischung und Verdünnung der beiden Lösungen konnten so 1x-Puffer mit variierender Saccharosekonzentration zwischen 100 und 200 mM hergestellt werden. Für die Verdünnung der Liposome sowie den Aufbau der freitragenden Membranen wurde eine Pufferlösung mit 100 mM Glucose angesetzt (siehe Tabelle 5.7). Der daraus resultierende Dichteunterschied

zwischen Vesikelinnerem und -äußerem führt zu einer Unterstützung der Sedimentation der Liposomen auf den Substraten.

Tabelle 5.6: Zusammensetzung des Q-Puffers; pH 7,5 (*M*: Molekulargewicht, *c*: Konzentration in 1x-Puffer, *m*: Massenanteil in 100 ml 10x-Puffer).

Substanz	<i>M</i> [g/mol]	<i>c</i> [mmol/l]	<i>m</i> [mg]
TRIS	121	2,0	242
NaN ₃ (20 %ige Lösung)	65	0,75	250 µl
DTT	154	0,2	31
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203	0,05	10
Saccharose	342	100	34200
		200	68400

Tabelle 5.7: Zusammensetzung des E-Puffers; pH 7,5 (*M*: Molekulargewicht, *c*: Konzentration in 1x-Puffer, *m*: Massenanteil in 100 ml 10x-Puffer).

Substanz	<i>M</i> [g/mol]	<i>c</i> [mmol/l]	<i>m</i> [mg]
HEPES	238	10,0	238
NaN ₃ (20 %ige Lösung)	65	0,75	250 µl
CaCl ₂ · 6H ₂ O	147	0,5	74
Glucose	198	100	19800

5.4 Mikrofluidische Systeme I – Aktinnetzwerke auf Säulensubstraten

5.4.1 Flusszellendesign und Netzwerkimplementation

Die Untersuchungen zum physikalischen Verhalten quasi 2-dimensionaler Aktinnetzwerke wurden in einer Flusszelle durchgeführt die an das von *Roos et. al* entwickelte System zum Aufbau von Netzwerken auf Mikrosäulen anknüpfte [176]. Im Gegensatz zum ursprünglichen, offenen System gestattet die geschlossene Umgebung der Zelle eine verbesserte Kontrolle der Flussbedingungen und zeitlich verlängerte Experimente. Die Flusszelle (siehe Abbildung 5.6) bestand aus einem Deckglas mit einem 40 µm hohen Kanal aus einer 6 × 6 mm messenden, mit Seitenarmen versehenen Zentralkammer. Darauf aufgebracht war ein PDMS-Block von ca. 2 mm Dicke, dessen auf der Unterseite befindliche Säulenfeldstruktur in der Mitte der Zentralkammer platziert war. Mit einer Höhe von 15-20 µm bei einem Durchmesser von 5 und Abständen von 6, 8, 10 und 12 µm befanden sich die Säulenköpfe ungefähr auf mittlerer Höhe des Kanals. Im Falle des Aufbaus von Netzwerken mittels vorpolimerisierter Filamente besaß die Flusszelle je einen Schlauchanschluss für Zu- und Abfuhr der Lösungen.

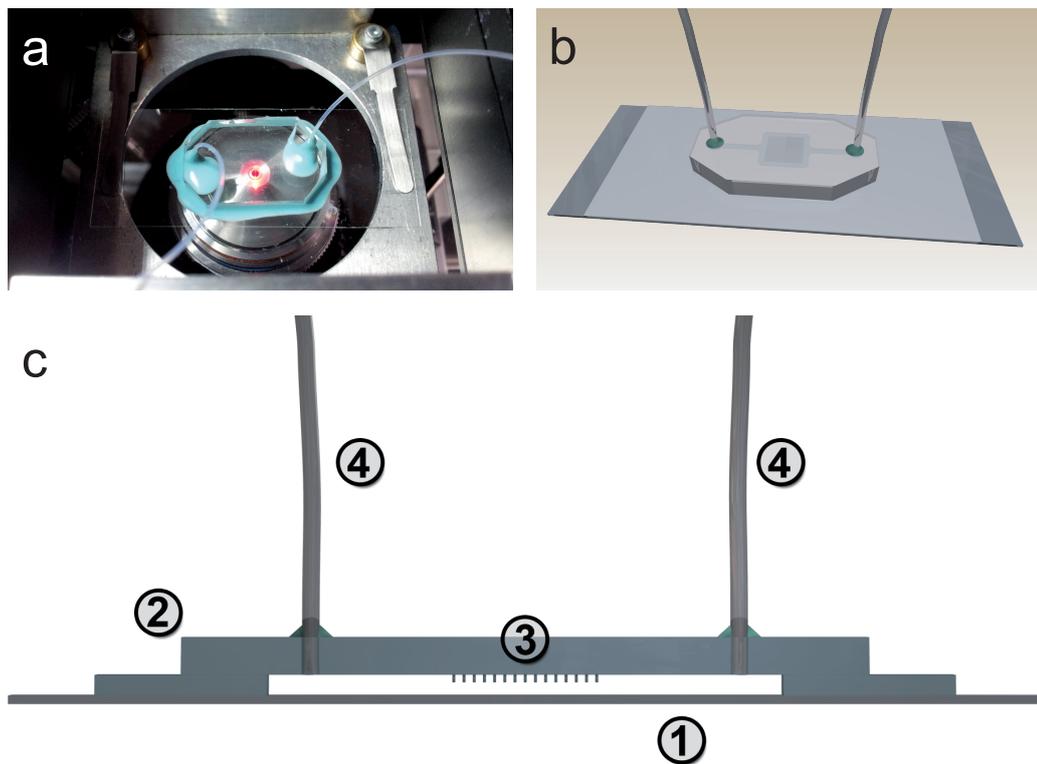


Abbildung 5.6: Bild (a) und schematische Darstellung (b) einer Säulenfeld-Flusszelle. Die Aufnahme zeigt die Flusszelle eingepasst in den verwendeten Probenhalter des Aufbaus. Der Längsschnitt (c) gibt Aufschluss über die einzelnen Komponenten: Aufbauend auf einem Deckglas (1) befindet sich die PDMS-Struktur der Flusszelle (2). Der Zu- und Abfluss der Lösungen erfolgte über seitlich angebrachte PFTE-Schläuche (4). Im Zentrum des 40 μm hohen Kanals ist das Säulenfeld (3) zu erkennen.

Die Reagenzzuführung wurde mit Hilfe einer automatischen Spritzenpumpe (*Pump 11 Pico Plus; Harvard Apparatus, VSA*) durchgeführt. Dazu wurde eine Spritze über eine 0,4 mm starke Kanüle an den Ausgangsschlauch angeschlossen und die Lösungen im Zugmodus eingespült. Zudem ermöglichte dies den Wechsel der Injektionssubstanzen im Laufe eines Experimentes, zum anderen wurde dadurch die Gefahr reduziert, dass übermäßiger Druck die Flusszelle deformierte und Leckagen auftraten.

Die Schritte zum Netzwerkaufbau sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst. Zur Vorbereitung wurde die Flusszelle mit einer 30 %igen Ethanol-MilliQ-Lösung gespült, um den Kanal von Rückständen und Luftblasen zu befreien, woran ein Spülgang mit Verdünnungspuffer anschloss. Für circa 30 min wurde eine 5 μM NEM-HMM Lösung in Verdünnungspuffer eingespült. Das durch die Plasmaaktivierung hydrophilisierte Äußere des PDMS erlangt durch Diffusion unbehandelter Polymerketten an die Oberfläche seine ursprüngliche Hydrophobität zurück [154], so dass es zu

einer unspezifischen Anlagerung des NEM-HMM an die Flusskammerwände kommen konnte. Zur Entfernung überschüssigen NEM-HMMs wurde erneut Verdünnungspuffer durch die Zelle geleitet. Nun erfolgte die vorsichtige Injektion einer gegenüber der Polymerisationslösung 1 : 200 verdünnten Lösung von F-Aktin in Verdünnungspuffer. Die Form der Netzwerkstruktur war dabei direkt durch die Geschwindigkeit und das Profil des Flusses bestimmt. Zu hohe Flussraten führten zu einer starken Vorspannung der Filamente, welche die spätere Vernetzung behinderte. Dabei hat sich eine Flussgeschwindigkeit von $0,4 \mu\text{l/s}$, resultierend in einer Geschwindigkeit von circa $50 \mu\text{m/s}$ in Höhe der Säulenköpfe, als praktikabel erwiesen. Die Dauer der Injektion richtete sich nach der gewünschten Dichte des Netzwerkes, wobei zu beachten war, dass im Zuführungsschlauch noch eine Restmenge an Aktin enthalten ist. Diese wurde während des anschließenden Spülvorgangs in die Zelle eingebracht, was zu einer weiteren Verdichtung des Netzwerkes führte.

Tabelle 5.8: Schrittweises Vorgehen zur Implementation der Aktinfilamente in die Flußzelle.

Schritt	Inkubation mit	Konzentration	Flußgeschwindigkeit [$\mu\text{l}/\text{min}$]
Vorbereitendes Spülen			
1	Ethanol in H_2O (entgast)	30 %ig	5,0 - 20,0
2	1fach Verdünnungspuffer	-	5,0 - 20,0
Säulenpräparation			
3	NEMHMM	$5 \mu\text{M}$	1,0 - 3,0
4	1fach Verdünnungspuffer	-	1,0 - 10,0
Netzwerkbildung			
5	F-Aktin	25 nM	0,4
6	1fach Verdünnungspuffer	-	0,4
Partikeleinbringung und Vernetzung			
7	Streptavidin beschichtete Mikrosphären		0,4
8	MgCl_2	50 mM	0,4

5.4.2 Methodik der mikrorheologische Messungen

Als Probenpartikel für die physikalischen Messungen wurden Streptavidin beschichtete Polystyrol-Mikrosphären von $1,87 \mu\text{m}$ mittlerer Größe (# PC-S-1.5; Kisker Biotech, Deutschland) verwendet. Anders als in 3-dim. Aktinfilamenten erfordert die Planarität der Säulennetzwerke die direkte Anbindung der Proben an die Aktinfilamente, was über die Biotin-Streptavidin Kopplung realisiert wurde.

Streptavidin, aus vier identischen Untereinheiten bestehend, ist ein 60 kDa schweres Protein welches natürlicherweise von Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* exprimiert wird. Es ist

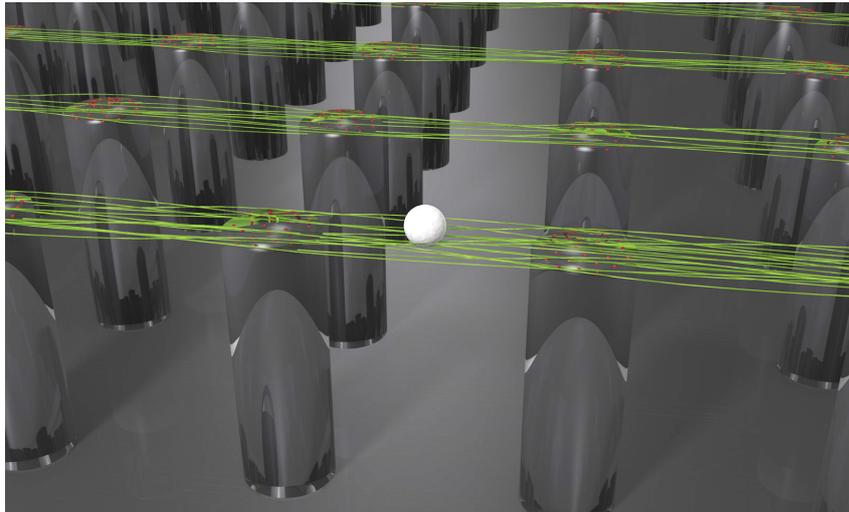


Abbildung 5.7: Visualisierung des Messprinzips am Beispiel stressfaserähnlicher Strukturen (vor der Vernetzung). Die Filamente, mittels NEM-HMM mit den Säulenköpfen verbunden, sind aufgrund des Flussprofils linear ausgerichtet. Die Mikropären adherieren über die Biotin-Streptavidin-Biotin-Bindung stochastisch an F-Aktin, so dass sich durch Beobachtung Rückschlüsse auf die viskoelastischen Parameter und den Vernetzungszustand der Filamente ziehen lassen.

in der Lage mit jeder der 4 Untereinheiten je ein Molekül des Vitamins Biotin zu binden und besitzt gegenüber Avidin eine geringere Anfälligkeit für unspezifische Bindungen. Da sich je zwei Bindungsstellen gegenüber liegen ist es neben der einfachen Kopplung auch in der Lage als Mittler zwischen zwei biotinylierten Objekten zu dienen. Dabei gilt die Streptavidin-Biotin-Bindung mit einer Dissoziationskonstante K_D von $\approx 4 \times 10^{-14}$ M und einer damit verbundenen Halbwertszeit bei Raumtemperatur von 4 Monaten als eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen in der Biologie [67]. Kalkulationen und Messungen mittels Rasterkraftmikroskopie [69, 160] haben, abhängig von der Belastungsgeschwindigkeit, zu Bindungsstärken von 50-200 pN geführt. Die geringe Größe von Biotin mit einem Gewicht von lediglich 0,24 kDa ermöglicht eine gute Konjugation mit Proteinen wie Aktin. Durch die 1 : 25 Mischung von biotinyliertem Aktin mit regulärem G-Aktin bieten die Filamente im Mittel ungefähr alle 70 nm Angriffspunkte für die Polystyrolpartikel.

Zur Aufreinigung wurden die Streptavidinkugeln einer 3-fachen Zentrifugation bei 11.000 g unterzogen und anschließend in MilliQ-Wasser resuspendiert. 1 : 50 in Verdünnungspuffer verdünnt wurde die Mischung der Partikel mit 0,4 $\mu\text{l/s}$ in die Flusszelle gespült und die Bewegung der an das Aktin angehefteten Mikrokugeln aufgezeichnet. Um die Vernetzung der Filamente zu initiieren wurde schließlich zur gewünschten Zeit Verdünnungspuffer mit erhöhter Magnesiumkonzentration zwischen 5 & 50 mM eingespült und die Messungen wiederholt. Für die Untersuchung der zeitabhängigen Vorgänge während des Vernetzungsprozesses wurde die Magnesiumeinleitung in regelmäßigen Abständen unterbrochen und die Bewegung der an das Aktin angehefteten Mi-

krokugeln aufgezeichnet. Um eine Beeinflussung der Partikelbewegung durch den Lösungsstrom zu vermeiden wurde zwischen Pumpendeaktivierung und Messung eine Abklingzeit von 1 min eingehalten.

Tabelle 5.9: Zusammensetzung des EDTA-Puffers; pH 7,4 (*M*: Molekulargewicht, *c*: Konzentration in 1x-Puffer, *m*: Massenanteil in 100 ml 10x-Puffer).

Substanz	<i>M</i> [g/mol]	<i>c</i> [mmol/l]	<i>m</i> [mg]
KCl	75	25,0	1875
Imidazol	68	25,0	1700
EDTA	292	5,0	1460
EGTA	380	1,0	380

Im Anschluss an Vernetzung und Bündelung der Aktinfilamente wurden Untersuchungen zum Magnesiumentzug und zur Entbündelung der Aktinstränge durchgeführt. Hierfür wurde für einen Zeitraum von mehreren Stunden ein magnesiumfreier, EDTA haltiger Puffer (siehe Tabelle 5.9) eingespült.

5.4.3 Vergleichsmessungen an 3-dimensionalen Netzwerken & Lösungen

Für vergleichende Studien wurden Messungen an vernetzten und unernetzten, 3-dimensionalen Aktinellen sowie viskosen Lösungen von Saccharose und Xanthan durchgeführt.

Für die Gelmessungen wurden je 3 Ansätze mit und ohne Magnesiumzugabe (Endkonzentration: 50 mM) von 11 μM Aktin-Polymerisationslösungen mit unterschiedlichen Mikrosphären angesetzt:

1. 0,53 μm carboxylierte YO Polystyrol-Mikrosphären (# 18720-10; Polysciences, USA)
2. 1,89 μm Polystyrol-Mikrosphären (# 19814; Polysciences, USA)
3. 1,87 μm Streptavidin beschichtete Polystyrol-Mikrosphären (# PC-S-1.5; Kisker Biotech, Deutschland)

Für die Viskoelastizitätsmessungen an Saccharose und Xanthan wurden unter Rühren Lösungen von 70 Gew.-% Saccharose sowie 0,5 Gew.-% Xanthan in MilliQ bei 70° C hergestellt und 1 : 50 mit aufgereinigten Polystyrol-Mikrokugeln (0,9 (# PPs-1.0; Kisker Biotech, Deutschland) und 1,89 μm) vermengt, resultierend in Lösungen von 68,8 und 0,5 Gew.-%.

Die Lösungen wurden in 3 mm durchmessende und 2 mm hohe Löcher in PDMS pipettiert und mit gereinigten Deckgläschen verschlossen. Zur Observation der Netzwerke und Partikelbewegungen in einem Abstand von $> 100 \mu\text{m}$ von den Oberflächen wurde das Hochdistanzobjektiv LUMFl verwandt.

5.5 Mikrofluidische Systeme II – Aktin-Membran Komplex auf Lochstrukturen

5.5.1 Flusszellendesign

Eine grundsätzliche Neuentwicklung stellt die parallel zu den Arbeiten von *Heinemann et. al* [80] entwickelte Flusszelle zum Aufbau eines Aktin-Membran Komplexes dar. Sie besteht aus einem komplexeren Schichtaufbau als die in Abschnitt 5.4.1 beschriebene Zelle zur Aktinnetzwerk Generierung. Auf einem Deckglas mit 3 cm langem, 3 mm breiten und 40 μm hohem Flusskanal ist eine 300 μm dicke PDMS-Membran aufgebracht. Sie grenzt den unteren Flusskanal von den Oberen, ebenfalls 40 μm hohen Kanälen ab. Im Zentrum der Membran befindet sich ein 2 mm durchmessendes Loch, welches eine Verbindung zwischen Oberem und unterem Kanalsystem herstellt. Darauf aufgebracht ist ein 3,05 mm TEM-Gitter das mittels geringster Mengen an Silikon (vgl. Abschnitt 5.1.2) befestigt wird. Den Abschluss bildet ein PDMS-Block mit einer zentralen Kammer, die Zugang zu dem Gitter ermöglicht. Durch entsprechend zugeschnittene Deckgläschen kann die Kammer abgeschlossen werden, so dass wahlweise ein 100 μm oder 2 mm hoher Raum entsteht. Je nach Bedarf können bis zu 8 Schläuche angebracht werden, welche die separate Einbringung von Pufferlösungen in beide Kanalebenen erlauben. Anders als bei der Erzeugung des Aktinnetzwerkes auf Säulen werden die angeschlossenen Pumpen dabei sowohl auf Zug als auch auf Druck betrieben.

5.5.2 Beschichtung und Funktionalisierung von TEM-Netzen und Glassubstraten

Zur Verwendung in den Experimenten kamen TEM-Gitter von *Science Services, Deutschland* mit quadratischen Lochgrößen von 6,5 μm (*GT2000-Au*), 10,5 μm (*GT1500-Au*) und 19,5 μm (*GT1000-Au*). Die aus Gold gefertigten Gitter weisen laut Herstellerangaben eine Dicke und Stegbreite von 6 μm auf. Allerdings zeigten Messungen am Mikroskop teilweise große Variationen der Loch- und Stegmaße.

Für den Aufbau eines Aktin-Membran Komplexes wurden Voruntersuchungen zum Vesikelverhalten auf unterschiedlich funktionalisierten Substraten durchgeführt. Um das Ausbreitungsverhalten zu studieren wurden Gold- sowie Titan- und Siliziumdioxid-Oberflächen einer Thiolierung respektive Silanisierung unterzogen und verglichen. Ziel war es eine Oberflächenladungsdichte zu generieren, welche förderlich ist für die Vesikelausbreitung, ohne dabei freistehende Membranen zu zerstören.

Beschichtung

Zur Substratpräparation wurden handelsübliche 20 \times 20 mm messende Deckgläschen mittels Caroscher Säure gereinigt. Dazu wurden die Deckgläser für 30 min in eine Mischung aus einem Teil 30 %igem Wasserstoffperoxid (*AppliChem, Deutschland*) und 3 Teilen 95 %iger Schwefelsäure (*Sigma-Aldrich, Deutschland*) getaucht und anschließend mit MilliQ-Wasser gespült. In

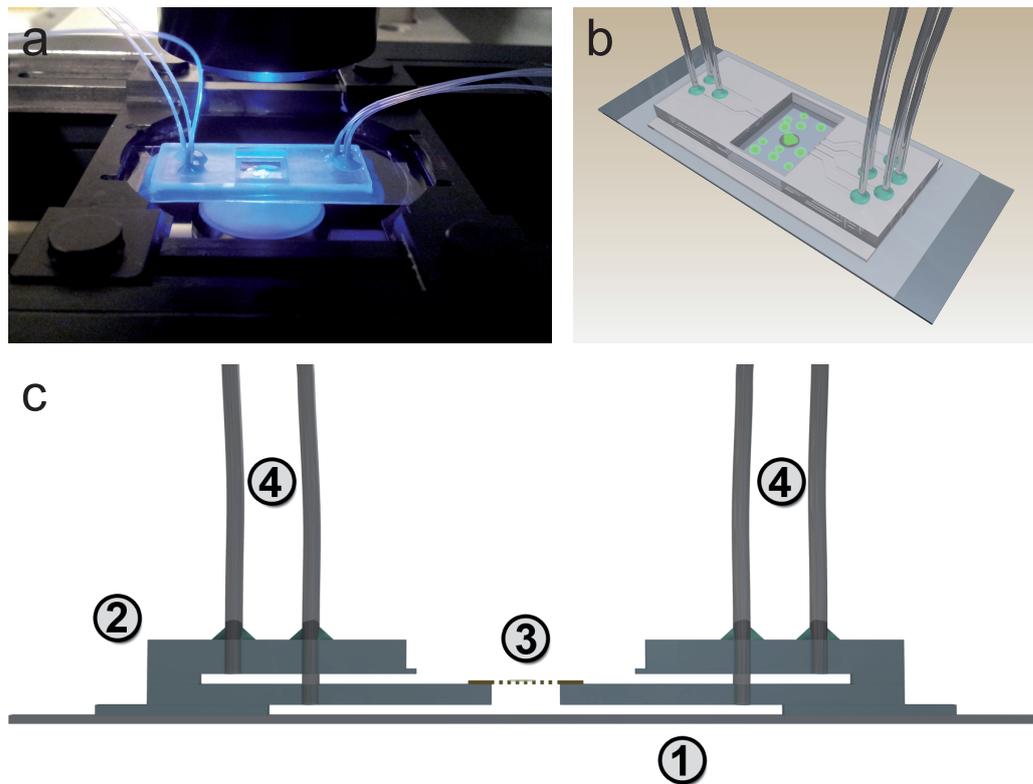


Abbildung 5.8: Bild (a) und schematische Darstellung (b) einer TEM-Gitter-Flusszelle. Die Aufnahme zeigt die Flusszelle am konfokalen LSM. Der Längsschnitt (c) gibt Aufschluss über die einzelnen Komponenten. Aufbauend auf einem Deckglas (1) befindet sich die PDMS-Struktur der mehrstöckigen Flusszelle (2). Der Zu- und Abfluss der Lösungen erfolgte über seitlich angebrachte PFTE-Schläuche (4) welche separaten Zugang zu den beiden Kammerebenen bieten. Im Zentrum des hohen Kanals ist das TEM-Gitter (3) zu erkennen.

MilliQ-Wasser gelagert und bei Bedarf mit Stickstoff abgeblasen konnten sie mehrere Tage lang verwendet werden. Der Aufbau der Au- und Ti-Schichten erfolgte mittels der beschriebenen Sputter-Beschichtungsanlage. Um eine bessere Haftung der Goldschicht auf dem Glassubstrat zu erzeugen wurde auch hier zunächst eine 6 nm messende Titanschicht aufgetragen (40 s, 120 mA, $1,3 \times 10^{-2}$ mbar Ar) welche mit 50 nm Gold überzogen wurde (60 s, 60 mA, $5,0 \times 10^{-2}$ mbar Ar). Für die Titanoberflächen wurde eine Schichtdicke von ca. 60 nm (200 s, 120 mA, $1,3 \times 10^{-2}$ mbar Ar) gewählt.

Um vergleichbare Funktionalisierungen der TEM-Gitter zu ermöglichen wurden sie parallel dazu mit Siliziumnitrid- (Si_3N_4) und Titanschichten überzogen. Siliziumnitrid ist eine Nichtoxid-Keramik welche – wie auch reguläres Quarzglas oder oxidiertes Titan – eine Anbindung von Silanen an die Oberfläche zulässt. Sie wurde mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (PVD, engl. physical vapor deposition) in einer 100 nm dicken Schicht am MPI für intelligente Systeme



Abbildung 5.9: Titanbeschichtete Au-TEM-Gitter. Aufgrund der Dünnschichtinterferenz zeigen verschieden dicke TiO_2 -Schichten unterschiedliche Färbungen, was eine instantane Abschätzung der Höhe ermöglicht. Von links nach rechts unter Angabe der Dicke und Beschichtungsdauer: gelb (60-80 nm, 200 s), rot (80-100 nm, 250 s), blau (100-130 nm, 350 s), grün (130-160 nm, 450 s).

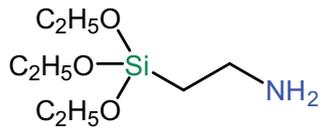
aufgebracht. Aufgrund von Kanten und Unebenheiten in der Gitteroberfläche wurde für Titan eine – gegenüber den Glassubstraten – dickere Beschichtung von circa 100 nm gewählt. Dabei wurde beobachtet, dass es bei unterschiedlichen Beschichtungsdauern, respektive Schichtdicken, zu über das gesamte Spektrum variierenden Färbungen der Titanschicht kommt (siehe Abbildung 5.9); ein Phänomen bekannt als Dünnschichtinterferenz, welches eng mit dem in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Funktionsprinzip der RIKM zusammenhängt. Ein einfallender Lichtstrahl wird dabei sowohl an der Grenzschicht Umgebung-Dünnschicht als auch an der Grenze Dünnschicht-Substrat teilweise reflektiert. Ist der Lichtstrahl weiß, so kommt es abhängig von der Schichtdicke und dem Einfallswinkel zur Auslöschung einzelner Wellenlängen durch Interferenz in den reflektierten Strahlen und das Gitter erscheint in komplementärer Färbung [36, 46]. Da bei hohen Schichtdicken die Beschichtungsdauer zum Teil stark von den in Abbildung 5.9 angegebenen Zeiten abweicht lässt sich so anhand der Färbung eine schnelle Aussage über die Höhe der Titanschicht treffen.

Funktionalisierung

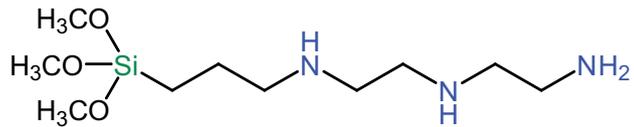
Die Funktionalisierung erfolgt im Falle der Deckgläser bzw. beschichteten Glassubstrate und der TEM-Gitter auf gleiche Weise. Für die Thiolierung der Goldoberflächen wurde das als Pulver gelieferte 11-Amino-1-undecanethiol (AUT) (# 674397; Sigma-Aldrich, USA) in Ethanol gelöst, sodass eine 1 mM Lösung entstand. Die Silanisierung wurde in 1 Vol.-% wässriger Lösung von (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) (# A 3648; Sigma-Aldrich, USA) oder N1-(3-Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamin (DETA) (# 413348; Sigma-Aldrich, USA) durchgeführt

(siehe Abbildung 5.10). Alkoxysilane reagieren äußerst sensitiv auf Feuchtigkeit und hydrolysieren schnell wobei sie große, zyklische Oligomere bilden. Es ist daher nötig die Lösung direkt vor Verwendung zuzubereiten und den Silanstock vor Feuchtigkeit zu schützen um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

a



(3-Aminopropyl)triethoxysilan



N1-(3-Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamin

b

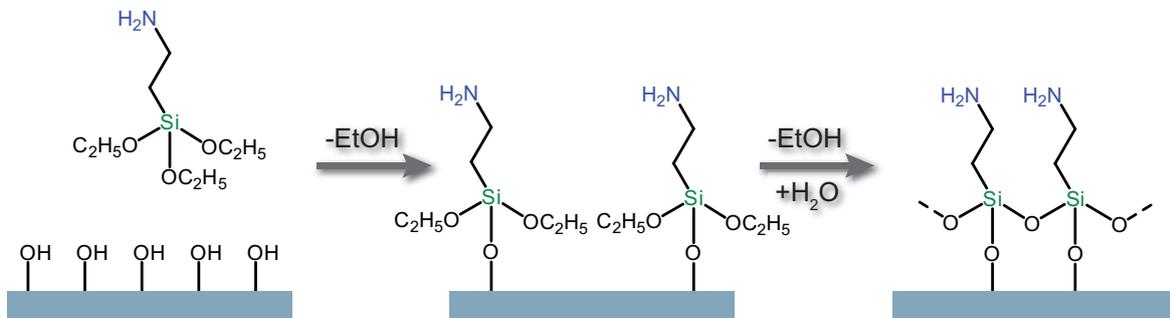


Abbildung 5.10: Verwendete Aminosilane (a) und Prozess der Oberflächenaktivierung am Beispiel von APTES (b). Unter Abspaltung eines Alkanols reagiert das Silan mit den OH-Resten der aktivierten Oberfläche. In einem zweiten Schritt kommt es unter H₂O Addition und Alkanol Abspaltung zu einer stabilisierenden Quervernetzung der Silanschicht.

Zur Vorbereitung der Thiolierung beziehungsweise Silanisierung wurden die Objekte einer Oberflächenaktivierung im Sauerstoffplasma unterzogen. Während die (beschichteten) Glassubstrate für 40 s bei 150 W plasmaaktiviert wurden, mussten zur Vorbeugung vor Verformungen die Parameter für die filigranen TEM-Gitter auf 15 s bei 100 W reduziert werden. Die Substrate wurden ohne Verzögerung in die Lösungen überführt und für variierende Dauern von 15-45 min funktionalisiert. Die mittels AUT behandelten Oberflächen wurden anschließend für 10 min in Ethanol gespült und vorsichtig abgeblasen. Die silaniserten Objekte wurden für 10 min in Methanol und für 5 min in Milli-Q-Wasser geschwenkt. Die TEM-Gitter wurden wie beschrieben in die Flusskanäle eingepasst, während die beschichteten und funktionalisierten Glasplättchen für die Beobachtung am Mikroskop mittels Silikonkleber von unten an mit Löchern versehene Petrischalen geklebt wurden.

5.6 Mikroskopie und Datenanalyse

Für die Experimente wurde im wesentlichen auf zwei unterschiedliche Mikroskopiesysteme zurückgegriffen. Die mikrorheologischen Messungen wurden dabei ausschließlich auf dem in Kapitel 4 beschriebenen Aufbau vorgenommen, während Experimente zur Erzeugung eines Aktin-Membran Komplexes an einem konvokalen Mikroskop (*Axiovert200M*; *Zeiss, Deutschland*) durchgeführt wurden.

Anders als bei herkömmlichen Mikroskopen wird bei Konvokalen niemals das gesamte Präparat beleuchtet, sondern Punkt für Punkt abgerastert und die Information erst am Computer zu einem vollständigen Bild zusammengefügt. Mit einer punktförmigen Lichtquelle beleuchtet wird das vom Objekt ausgesandte Licht durch eine in der hinteren Fokalebene befindliche Lochblende auf den Detektor geleitet. Im vorliegenden Fall handelt es sich dabei um ein LSM (engl. *laser scanning microscope*), bei dem die Fokusposition des anregenden Laserstrahls über einen Spiegel variiert wird. Dies hat zum einen den Vorteil, dass fluoreszente Proben vor dem Ausbleichen geschützt werden, zum anderen wird durch die konfokale Lochblende Licht welches nicht aus der Fokusebene des Objektes stammt ausgeblendet. Dadurch erhöhen sich sowohl Schärfe als auch Kontrast des resultierenden Bildes wodurch es möglich ist eine Serie von optischen Schnitten durch das Präparat vorzunehmen, die eine Rekonstruktion der 3-dimensionalen Gestalt erlauben.

Die mikrorheologischen Messungen wurden wie erwähnt auf dem selbst konstruierten System durchgeführt und die Partikelbewegungen mittels der A602f-Kamera bei einer maximalen Bildrate von 100 fps aufgezeichnet. Das Fluoreszenzsignal der markierten Aktinfilamente wurde auf der hochsensitiven Orca ER-Kamera abgebildet (CCD 1). Sie limitierte die mittels Laser-Triggerung grundsätzlich mögliche Aufnahme Frequenz von 100 Hz auf maximal 16 fps. Zur Bildaufzeichnung wurde das für Linux frei erhältliche Kameraansteuerungsprogramm Coriander ¹ in Verbindung mit selbst entwickelten Programmen eingesetzt (siehe Anhang A.2). Für die Auswertung wurden Routinen verwandt, die in MATLAB (*The Math Works, USA*) und Python (*Python Software Foundation*²) programmiert wurden. Die Partikeldetektion und Positionsbestimmung geschah dabei auf Basis des von *Crocker und Grier* [32] entwickelten Tracking-Algorithmus im Rahmen eines von *Maria Kilfoil* online publizierten MATLAB-Programmpaketes³ welches auch die Möglichkeit zur mikrorheologischen Auswertung nach dem Prinzip von Mason [129, 158] beinhaltet.

Eine Partikelidentifikation wird dabei vorgenommen durch Detektion lokaler Maxima mittels Konvolution mit einer Scheibe vorgegebenen Durchmessers. Selektiert anhand ihrer Gesamtin-

1 <http://damien.douxchamps.net/ieee1394/coriander/>

2 <http://www.python.org/>

3 <http://people.umass.edu/kilfoil/downloads.html>

tensität und Exzentrizität wird ihre Position als Ort des hellsten Pixels festgelegt und durch Minimierung der Verschiebung zwischen zwei Bildern zu Trajektorien zusammengefasst. Um nun eine Ortsbestimmung über den in Kapitel 4 erläuterten Pixelfaktor von $143,4 \pm 0,9$ nm/px hinaus zu erreichen wird nach Subtraktion des Hintergrundes und Reduzierung des Rauschens mittels eines Bandpassfilters eine Pixel-Scheibe an den Ort des hellsten Pixels angelegt. Innerhalb dieser Scheibe werden die Pixel anhand ihrer Intensität gewichtet und daraus ein Helligkeitsschwerpunkt berechnet, welcher als neue Subpixelposition des Partikels registriert wird. Dabei führen gesättigte Pixel zu einer Positionsverfälschung, weshalb es von immenser Wichtigkeit ist, dass es bei der Bildaufzeichnung zu einer optimalen Aussteuerung der Kamera kommt.

Die theoretischen Grundlagen der mikrorheologischen Auswertung können Abschnitt 3.3 entnommen werden. Für nähere Informationen zu den verwendeten Algorithmen siehe Anhang A.2.

Teil III

Experimente und Resultate

KAPITEL 6

Quasi 2-dimensionale Aktin-Kortexstrukturen und Referenzexperimente

Eine zentrale Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der besonderen viskoelastischen Eigenschaften unterschiedlicher Aktinstrukturen, mit besonderem Augenmerk auf quasi 1-dimensionale, stressfaserähnliche Gebilde, bei Anwendung neuartiger Auswertalgorithmen. Im Zuge dessen wurden die mikrofluidischen Techniken zur Netzwerkerzeugung verbessert sowie vergleichende mikrorheologische Experimente an Flüssigkeiten und Gelen unternommen. Neben der Beschreibung der *in situ* Polymerisation von Aktinnetzwerken auf Säulen liefern die folgenden Abschnitte grundlegende Interpretationen der durchgeführten Referenzuntersuchungen sowie des mechanischen Verhaltens der Netzwerke auf Säulensubstraten. Eine weitergehende Analyse ist im Anschluss daran Kapitel 7 – im direkten Vergleich mit Messungen an stressfaserähnlichen Strukturen – zu entnehmen.

6.1 In-situ Polymerisation von Aktinnetzwerken

Durch die auf den Arbeiten von *Simon Schulz* und *Wouter Roos* basierende, neu entwickelte Technik der *in situ* Polymerisation konnte die Erzeugung von Aktinnetzwerken auf PDMS Säulensubstraten weiter verfeinert werden. Die Verwendung präpolimerisierter Filamente führt in mikrofluidischen Kanälen – abhängig von der Flussgeometrie – zu verstärkt linear ausgerichteten, nur schwach untereinander vernetzten Aktinstrukturen (vgl. Kapitel 7 und [176, 182]). Lediglich im Falle offener Systeme, bei welchen die F-Aktin Lösung direkt auf die Säulenfelder pipettiert wurde, war es möglich isotrope Netzwerke zu erzeugen. Diese Limitierungen der Mikrofluidik konnten überwunden werden durch den Einsatz von Flusszellen mit 4 Schlauchanschlüssen sowie dem direkten Einspülen von F-Aktin Polymerisationslösung.

Abhängig von der relativen Menge des eingesetzten G-Aktins und Phalloidin-TRITCs kommt es bereits innerhalb weniger Minuten nach Mg-ATP Zugabe zur Entstehung voll ausgebildeter Aktinfilamente [33, 57]. Außerhalb der Flusszelle angesetzte Polymerisationslösung wurde daher unter Zuhilfenahme zweier Spritzenpumpen mit hoher Geschwindigkeit ($> 10 \mu\text{l}/\text{min}$) durch zwei

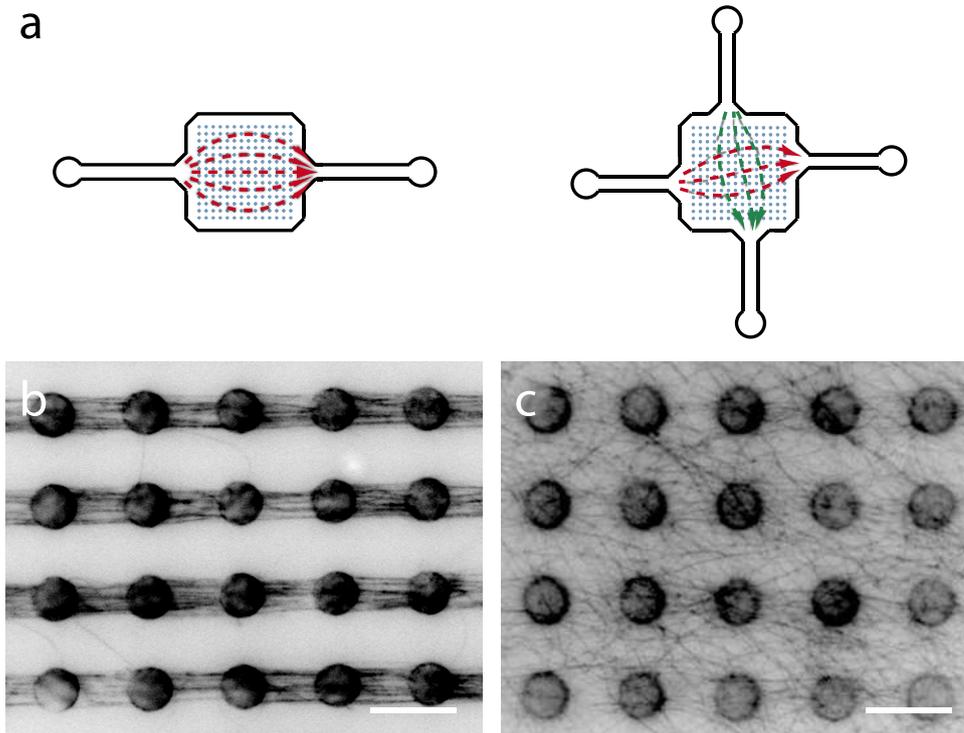


Abbildung 6.1: Netzwerkgeometrien der durch prä- und in situ polymerisierter Filamente erzeugten Strukturen. Flussprofil in 2-armigen und 4-armigen Mikrofluidikzellen bei alternierendem Pumpenbetrieb (a). Aufgrund des Flussprofils entstehen bei der Injektion präpolimerisierter Filamente hauptsächlich lineare Strukturen von einer Säule zur Nächsten (b). Innerhalb einer vier-armigen Flusszelle bilden sich hingegen je nach Position im Säulenfeld kortexähnliche Strukturen mit einer hohen Quervernetzung der Filamente aus (c). Maßstab: 10 µm.

Schläuche gleichzeitig in die nach Standardmethode vorbereitete Säulenkammer gezogen. Binnen Minutenfrist konnten sich so Polymerisationskeime und kurze Filamente an den mit NEM-HMM beschichteten PDMS-Oberflächen anlagern und polymerisierten aus.

Nach einer Ruhezeit von circa 30 min schloss sich wie üblich ein für die Entfernung überschüssiger Filamente nötiger Extraktionsvorgang an. Um die stochastische Anordnung der ausgebildeten Filamente möglichst nicht zu beeinträchtigen wurde durch separate Ansteuerung der Pumpen ein alternierender, sich in der Zellenmitte kreuzender Fluss von 0,4 µl/min erzeugt. Beginnend mit Alternierungsfrequenzen von 0,05 Hz wurde die Frequenz nach je 5-10 Zyklen sukzessive verringert (0,016 Hz, 0,005 Hz, 0,003 Hz) um schließlich in einen kontinuierlichen Spülvorgang überzugehen. Variierende Flussbedingungen innerhalb des Säulenfeldes führten sowohl zu gerichteten, stressfaserähnlichen, als auch zu annähernd isotropen, kortexähnlichen Strukturen. Abbildung 6.1 zeigt Ausschnitte eines regellos vernetzten Areals vor (a) und nach (b) Zuführung einer 50 mM MgCl-Lösung. Neben der gesteigerten Isotropie weist die neue Methodik zudem den Vorteil auf, dass die Filamente einer geringeren Vorspannung unterliegen. Dies führt zu einer stärkeren thermischen Bewegung im unvernetzten Zustand (erkennbar an den stark delokalisierten und daher

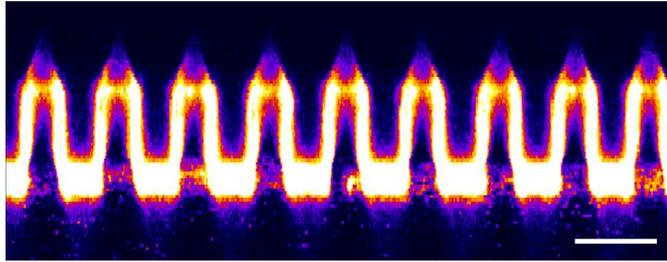


Abbildung 6.2: Konvokaler Querschnitt des Aktinnetzwerkes auf Säulensubstraten erzeugt durch *in situ* Polymerisation. Die durch Farbstoffanlagerung fluoreszenten Säulen zeigen von der Decke der Flusszelle in Richtung Flusszellenmitte. Aktinfilamente sind dabei lediglich in einem schmalen Bereich auf Höhe der Säulenköpfe lokalisiert. Maßstab: 10 μm .

unscharfen Aktinsträngen in (a)) und so zu einer erhöhten Wechselwirkungswahrscheinlichkeit der Filamente untereinander.

Anhand des mittels konvokaler Mikroskopie erzeugten, in Abbildung 6.2 dargestellten Querschnittes eines gespülten Netzwerkes wird ersichtlich, dass sich die Aktinstrukturen entgegen möglicher Erwartungen auf den Bereich der Säulenköpfe beschränkten. Eine Einlagerung der Filamente in der Tiefe des Feldes fand nicht statt. Wie Untersuchungen in Zusammenarbeit mit *Weiß* *et al.* zu Flussbedingungen innerhalb mikrostrukturierter Flusskanäle [217] offenlegten zeigen Partikeltrajektorien in Höhe der Säulenköpfe eine erhöhte *z*-Stabilität (vgl. Abbildung

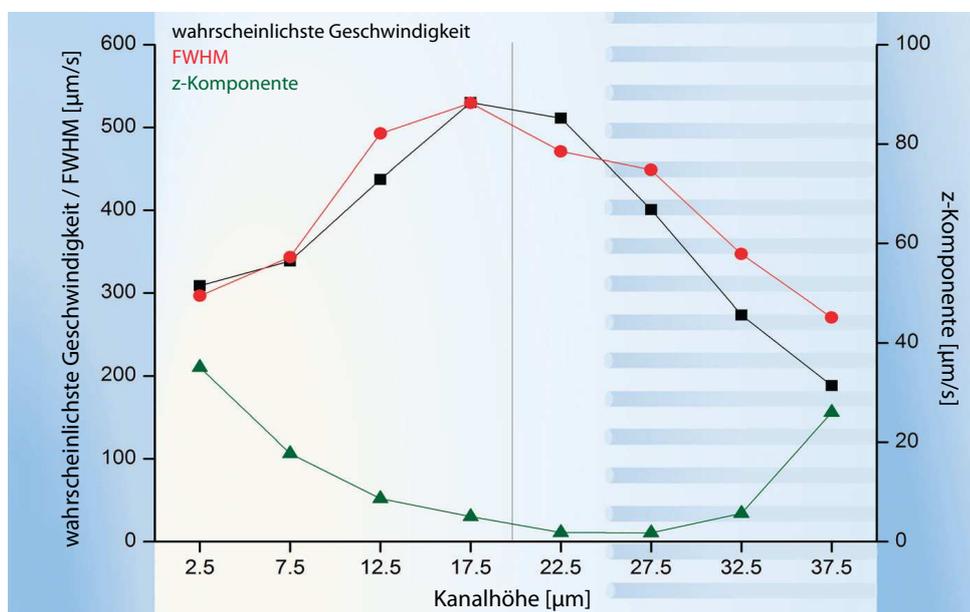


Abbildung 6.3: Profil der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit, FWHM und *z*-Geschwindigkeitskomponente aus Messungen an Flusskanälen mit Säulenstrukturen in Kooperation mit *Weiß* *et al.*. Die Säulenregion bewirkt eine Abweichung vom erwarteten symmetrischen Flussprofil zwischen zwei parallelen Platten. (Aus [217].)

6.3). Das Profil der Gesamtgeschwindigkeit zeigt aufgrund der Säulen eine deutliche Asymmetrie des zu erwartenden parabelförmigen Flussprofils zwischen zwei parallelen Platten. Während das Maximum der mittleren Gesamtgeschwindigkeit von der Kanalmitte hin in den säulenfreien, unteren Bereich verschoben ist, nimmt die z-Komponente – aus beiden Bereichen kommend – in Richtung Säulenköpfe kontinuierlich ab. Dies führt zu einem fokussierenden Flusseffekt, verantwortlich für die verstärkte Anlagerung von Filamenten auf den Säulenköpfen.

6.2 Vergleichsmessungen an 3-dimensionalen Gelen

Um die Funktionalität und Qualität des konstruierten Aufbaus und der Auswertalgorithmen zur Anwendung für mikrorheologische Systeme zu erproben, sowie um eine Vergleichsgrundlage für die Analyse der Netzwerkdaten zu schaffen, wurden multiple Experimente an Lösungen und dreidimensionalen Aktin Gelen durchgeführt. Als Beispiele für in erster Näherung ideal viskose respektive viskoelastische Systeme wurden Lösungen von Saccharose und Xanthan verwendet. Das viskoelastische Verhalten der Aktin Gelen wurde bei gleichbleibender Konzentration – mit und ohne vernetzendes Magnesium – für Partikel mit variierender Größe und Oberflächenbeschichtung ermittelt.

6.2.1 Saccharose- & Xanthan-Lösungen

Saccharose ist ein Disaccharid aus je einem Molekül α -D-Glucose und β -D-Fructose, verbunden über eine $\alpha,\beta(1 \rightarrow 2)$ glycosidische Bindung. Aufgrund seines globulären Charakters stellt es in ultrakonzentrierten Lösungen (Löslichkeitsgrenze ≈ 68 Gew.-% bei RT) ein hochviskoses System mit den Eigenschaften einer newtonschen Flüssigkeit dar [168]. Bei Xanthan handelt es sich hingegen um ein semiflexibles Polysaccharid, gewonnen aus Bakterien der Gattung *Xanthomonas*. Mit einem Rückgrat aus $\beta(1 \rightarrow 4)$ verknüpften Celluloseeinheiten bildet es bei einer Persistenzlänge von 130 ± 20 nm lineare, unverknüpfte Ketten mit hydrodynamischen Längen von 600 - 2000 nm [174].

Die unterschiedliche Natur der beiden Saccharide zeigt sich bereits im Verlauf der mittleren quadratischen Verschiebung, gewonnen mittels $1,87 \mu\text{m}$ messender Polystyrol-Probenpartikel. Abbildung 6.4 zeigt den zeitcodierten Bewegungsverlauf und die MQV für 68,8 Gew.-%iger Saccharose- und 0,5 Gew.-%iger Xanthanlösungen. Für Saccharose zeigt sich über den gesamten beobachteten Zeitbereich von 300 s erwartungsgemäß ein näherungsweise mit t^1 ansteigender Verlauf, wie er für frei diffundierende Partikel gemäß Gleichung 3.44 charakteristisch ist. Abweichungen vom Idealverlauf sind dabei vermutlich auf in der Lösung befindliche Mikrokristalle zurückzuführen, entstanden durch Übersättigung der Lösung. Im Gegensatz dazu zeigen Partikel in Xanthan einen zwar ebenfalls weitgehend linearen Verlauf jedoch mit deutlich unterdrücktem Diffusionsverhalten nahe $t^{0,2}$. Ein oszillatorisches Verhalten der MQV-Kurve konnte nicht festgestellt werden, eine Tatsache, die für eine hohe Stabilität und Unempfindlichkeit des konstruierten

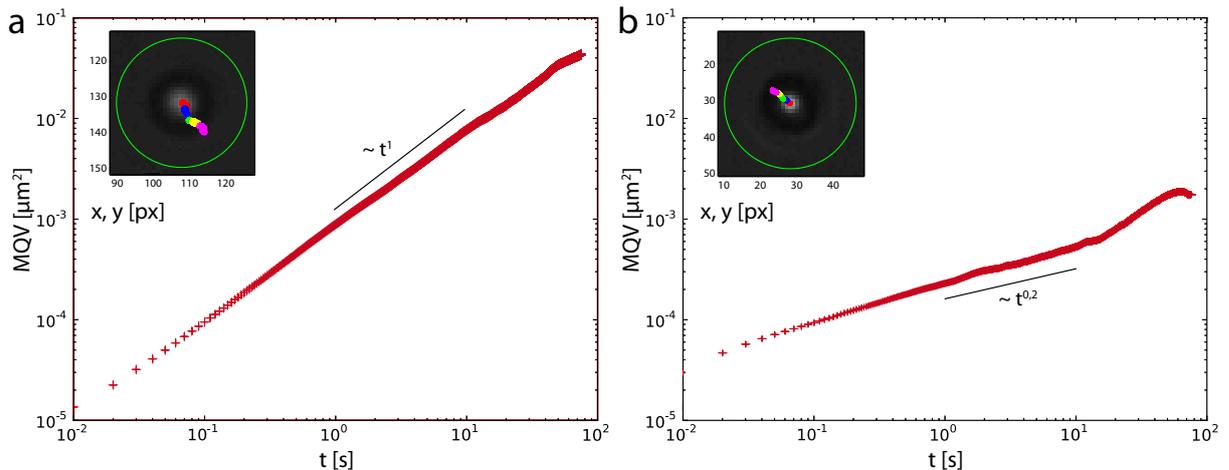


Abbildung 6.4: Mittlere quadratische Verschiebung von Probenpartikeln in 68,8 Gew.-%iger Saccharose- und 0,5 Gew.-%iger Xanthanlösung.

Mikroskopieaufbaus gegenüber externen Vibrationen spricht.

Mittels der neu entwickelten Auswertalgorithmen, sowie durch Anwendung von Gleichung 3.32, konnten aus den Positionsdaten die viskoelastischen Moduli $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ sowie die Viskosität $\eta(\omega)$ ermittelt werden. Die entsprechenden Resultate sind in Abbildung 6.5 aufgetragen. Für Saccharose zeigt sich im betrachteten Frequenzbereich ein gleichmäßiger Anstieg von Speicher- $G''(\omega)$ und Verlustmodul $G'(\omega)$, wobei $G''(\omega)$ um nahezu eine Größenordnung über $G'(\omega)$ liegt und somit das fluide Verhalten der Lösung dominiert. Aufgrund des parallelen Kurvenverlaufs ergibt sich für die aus den Mittelwerten der Moduli errechnete komplexe Viskosität ein näherungsweise konstantes Verhalten. Mit Schwankungen im Bereich von 0,4-2,0 Pa s stimmt die Viskosität überein mit von *Quintas et al.* publizierten Werten ($0,673 \pm 1,41 \times 10^{-3}$ Pa s für 69,97 Gew.-% bei 20 °C) und der theoretischen Beschreibung durch *Soesanto und Williams* [168, 192].

Im Falle von Xanthan zeigen die ermittelten Kurven der viskoelastischen Moduli einen komplexeren Verlauf. Während für Kreisfrequenzen zwischen 0,1 und 30 rad/s ein leicht dominierendes viskoses Verhalten festzustellen ist, kommt es aufgrund des stärkeren Anstiegs des Speichermoduls $G''(\omega)$ für hohe Frequenzen zu einem beherrschenden elastischen Verhalten, typisch für nichtnewtonsche Flüssigkeiten. Liegt die dynamische Viskosität bei kleinen Frequenzen noch über der Viskosität der Saccharoselösung so kommt es einhergehend mit der Zunahme von $G''(\omega)$ zu einem starken Abfall auf Werte unterhalb $\eta_{sac}(\omega)$. Auch hier stimmt bei Berücksichtigung der großen Fehlerbereiche der Moduli für $\omega > 80$ rad/s der Kurvenverlauf qualitativ und quantitativ mit veröffentlichten Werten überein. So ergeben sich aus den von *Rodd et al.* veröffentlichten Daten, gewonnen aus makrorheologischen Messungen, Werte von $\eta(0,1) = 7-15$ Pa s und $\eta(100) = (5-6) \times 10^{-2}$ Pa s [174]. Die gute Übereinstimmung mit publizierten Studien bestätigt so die Anwendbarkeit der Python-Routinen für die Auswertung der mikrorheologischen Daten.

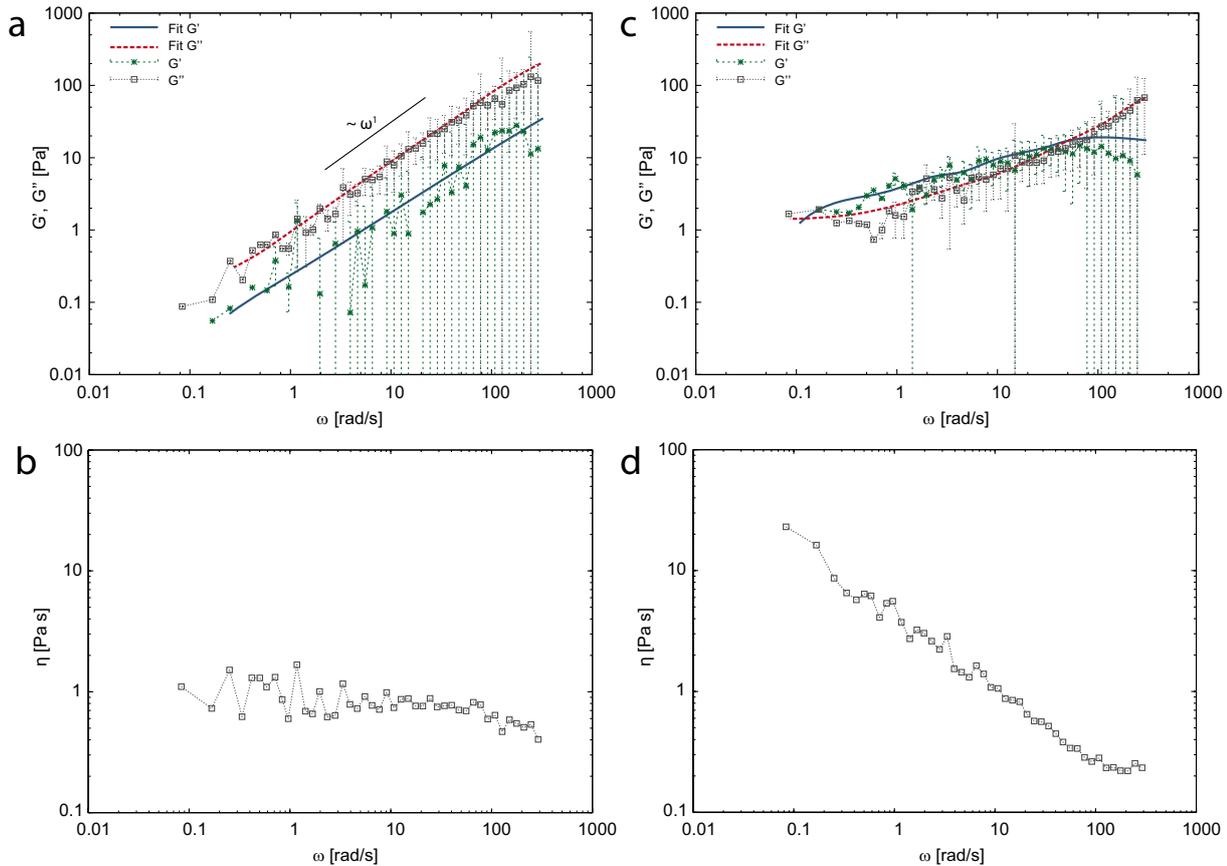


Abbildung 6.5: Viskoelastische Moduln und dynamische Viskositäten von 68,8 Gew.-%iger Saccharose- und 0,5 Gew.-%iger Xanthanlösung.

6.2.2 Aktin Gele

Für die Demonstration des viskoelastischen Verhaltens dreidimensionaler Aktingele wurden unterschiedliche Probenpartikel in Polymerisationslösungen von $11 \mu\text{M}$ ($\cong 0,462 \text{ mg/ml}$) 1 : 50 biotinyliertem Aktin eingebettet. Abbildung 6.6 zeigt konvokale Fluoreszenzaufnahmen von $0,53 \mu\text{m}$ carboxylierten und $1,87 \mu\text{m}$ PS-Probenpartikeln in verwobenen und mittels Magnesium gebündelten Netzwerken. Im Falle der unvernetzten Gele sind aufgrund der thermisch angeregten Bewegung und der hohen Hintergrundfluoreszenz durch die gleichmäßig verteilten Filamente einzelne Aktinstränge nicht zu identifizieren. Anfängliche MgCl -Zugabe bewirkt hingegen die Bildung eines Netzwerkes aus Filamentbündeln, deren hohe Fluoreszenz auf die starke Lokalisierung mehrerer Filamente zurückzuführen ist.

Entsprechend Gleichung 3.36 folgt im Falle des unvernetzten Aktingels aus c_A eine durchschnittliche Maschenweite ξ von $0,5 \mu\text{m}$, knapp unter dem Durchmesser der carboxylierten Partikel. Zusätzlich zur statistischen Fluktuation kann es durch die Partikelbewegung zu einer lokalen Erhöhung der Maschengröße und dadurch folgend, wie von *He et al.* diskutiert, bei Partikelgrößen

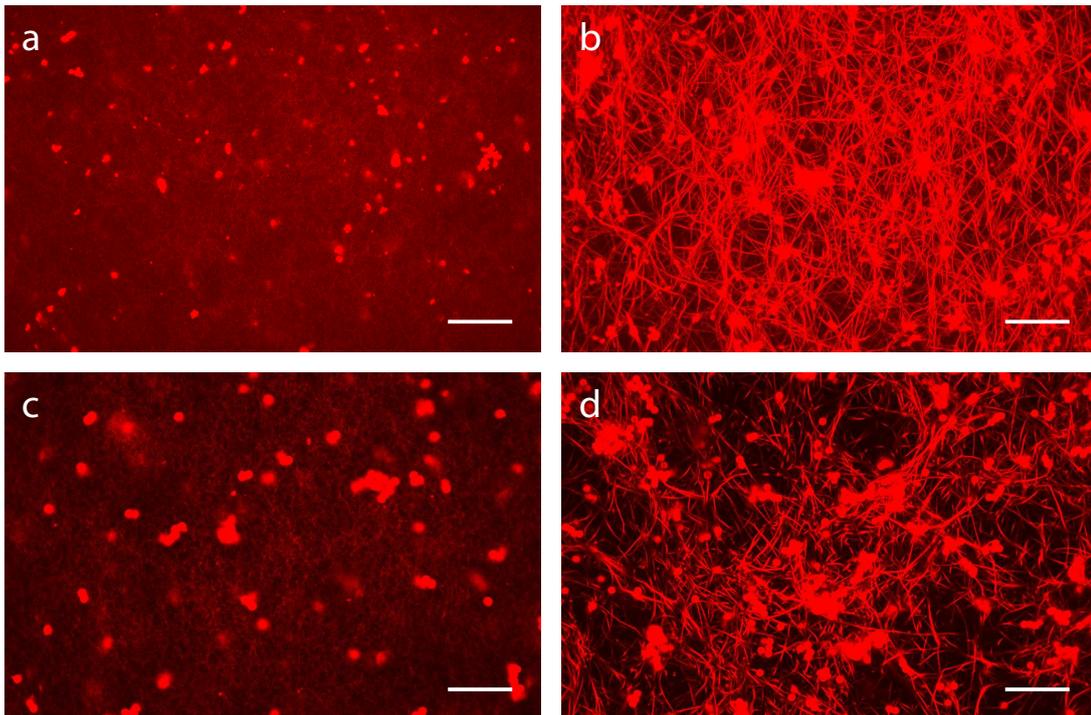


Abbildung 6.6: Konfokale Fluoreszenzaufnahme von $0,53\ \mu\text{m}$ carboxylierten (a, b) und $1,87\ \mu\text{m}$ Streptavidin-Probenpartikeln (c, d) in 3-dimensionalen Aktin Gelen. $11\ \mu\text{M}$ Lösung verschränkter Aktinfilamente (a, c) und $11\ \mu\text{M}$ F-Aktin Lösung vernetzt und gebündelt mit $50\ \text{mM}$ Mg^{2+} (b, d). Maßstab: $20\ \mu\text{m}$.

$2a \leq \xi$ zu stochastischen Übertritten von einer Maschenzelle in Benachbarte kommen [79]. In der Folge liegt für unvernetzte Gele der MQV-Verlauf der carboxylierten Partikel – wie in Abbildung 6.7 gezeigt – deutlich über dem der größeren Polystyrolkugeln. Gleichzeitig zeigt sich für die carboxylierten Proben bei sehr kleinen Zeiten ein steiler Anstieg des MQV, der über dem aus dem Reptationsröhrenmodell vorhergesagten Wert von $t^{3/4}$ liegt. Zu begründen ist dies aus der Tatsache heraus, dass kleine Zeiten mit geringen Verschiebungen der Probenpartikel korrespondieren, die dabei aufgrund ihrer Größe stärker von den viskosen Eigenschaften des Mediums als von den transversalen Schwingungen der Filamente beeinflusst werden. Die deutlich über der Maschengröße liegenden PS-Kugeln hingegen bewirken durch ihre Ausdehnung einen lokal verdichtenden Effekt in der umgebenden Netzwerkstruktur. Dies führt zu einer Verringerung des Durchmessers der Reptationsröhre und damit einhergehend zu einer stärkeren Dämpfung der Amplitude der transversalen Filamentschwingungen, was in einem schwächeren Anstieg der MQV gipfelt.

Die Gegenwart von Magnesium führt bei entsprechender Konzentration wie beschrieben zur Ausbildung eines Netzwerkes aus Aktinbündeln bei gleichzeitiger Verringerung der Anzahl freier Filamente. Die korrespondierenden MQV-Kurven liegen um 1-2 Größenordnungen unter denen verwobener Gele, zeigen jedoch für unterschiedliche Proben aufgrund der lokal variierenden

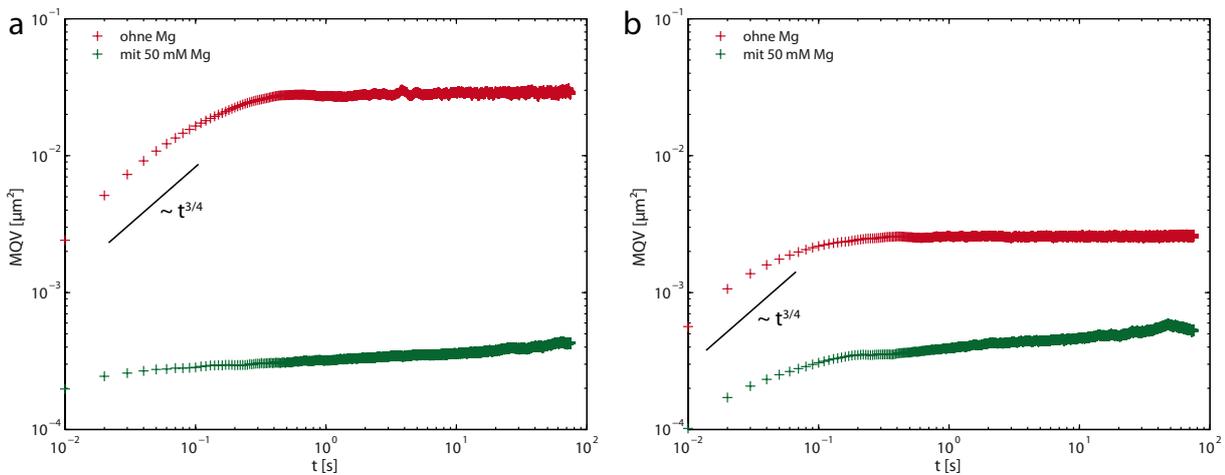


Abbildung 6.7: Mittlere quadratische Verschiebung von Probenpartikeln in unvernetzten und vernetzten Aktinfilamenten. (a) MQV von $0,53 \mu\text{m}$ messenden carboxylierten Probenpartikel ohne (rot) und mit (grün) 50 mM Mg^{2+} . (b) $1,89 \mu\text{m}$ Polystyrol-Probenpartikel ohne (rot) und mit (grün) 50 mM Mg^{2+} . Die Konzentration an globulärem Aktin betrug in allen Fällen $11 \mu\text{M}$.

Struktur auch deutliche Schwankungen im Plateauwert der mittleren quadratischen Verschiebung von bis zu einer halben Größenordnung. Die dargestellten Kurven sind daher in ihrem Verlauf als exemplarische Darstellung zu verstehen. Neben einer Angleichung des Plateauwertes führt die ioneninduzierte Bündelung im Falle der carboxylierten Proben auch zu einer Verschiebung des Plateaubereichs hin zu kleineren Zeiten, sodass dieser nun nahezu den gesamten betrachteten Zeitbereich umfasst. Anhand von Fluoreszenzaufnahmen führten *He et al.* eine verminderte MQV zwischen carboxylierten und PEG-beschichteten PS-Partikeln bei gleicher Größe auf die Oberflächenadsorption von Aktinfilamenten zurück, während sie gleichzeitig den Filamentverdrängungseffekt durch PEG als gering einstufen. Adsorption von Proteinen an carboxylierten Mikrokugeln ist, abhängig von Carboxylierungsgrad und pH-Wert der umgebenden Lösung, sowohl auf den Einfluss hydrophober als auch elektrostatischer/-dynamischer Wechselwirkungen zurückzuführen [229]. Unabhängig davon ist jedoch zu erwarten, dass Magnesiumkonzentrationen, welche eine Bündelung der gleichartig negativen Aktinfilamente einleiten, auch zu einer stärkeren Kopplung zwischen den carboxylierten, bei pH 7 negativ geladenen Partikeln und F-Aktin führt. Resultierend in einer starken Netzwerkverdichtung stellt dies eine Erklärung für die beobachtete Plateauverschiebung dar.

Im Gegensatz zum nichtgebündelten Fall zeigen beide Partikelklassen zudem einen leichten MQV-Anstieg auch während des Plateaubereichs. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf Fluktuationen respektive einer Verschiebung der Gesamtstruktur, sichtbar aufgrund der geringeren Partikelbewegung im gebündelten Netzwerk.

Die dem geänderten Bewegungsverhalten zu Grunde liegenden viskoelastischen Moduln sind in

Abbildung 6.8 aufgetragen. Ähnelt der Verlauf des Speichermoduls $G''(\omega)$ den aus Saccharose- bzw. Xanthanlösungen bekannten Verläufen, so zeigt der Verlustmodul in allen Fällen eine nur sehr schwache Frequenzabhängigkeit. Abbrüche der Mittelwerte bei hohen Frequenzen sind nicht auf die Viskoelastizität der Aktinfilamente zurückzuführen. Bei ihnen handelt es sich um einen Effekt der diskreten Fouriertransformation wie er häufig als Resultat der numerischen Konvertierung mikrorheologischer Daten auftritt, so beispielsweise auch bei *Schnurr et al.* [180].

Der ausgedehnte Plateaubereich ist zurückzuführen auf die sterischen Hinderungen der Partikelbewegungen durch die umgebenden Filamente. Seine untere Grenze im Frequenzbereich ist gegeben durch die Reptationszeit τ_r (vgl. Abschnitt 3.2.2). Mit typischen Zeiten τ_r von einigen hundert Sekunden liegt diese Grenze im allgemeinen jedoch außerhalb des hier betrachteten Frequenzbereichs. Ein Charakterisationskriterium des Plateauverlaufs ist darüberhinaus der mittlere Wert des viskosen Moduls $G'(\omega)$, auch als Plateaumodul G_0 bezeichnet, welcher für den Fall der $0,53 \mu\text{m}$ carboxylierten Probenpartikel (6.8 (a)) bei $0,12 \pm 0,01 \text{ Pa}$ liegt. Mit $0,36 \pm 0,02 \text{ Pa}$ liegt der Wert für $1,87 \mu\text{m}$ PS-Partikel leicht darüber, was mit der stärkeren Bewegungsdämpfung der größeren Partikel zu begründen ist.

Durch Bündelung mittels Magnesium – oder im allgemeinen durch vernetzende Reagenzien – kommt es nicht nur zu einer Erhöhung des Plateaumoduls sondern darüber hinaus im betrachteten Frequenzbereich auch zur Ausbildung eines Plateaus des Verlustmoduls $G''(\omega)$. Tatsächlich handelt es sich bei dem vermeintlichen Plateau um den statischen Bereich eines lokalen Minimums, hervorgerufen durch die transiente Wechselwirkung der Magnesiumvernetzung [111]. Anders als in kovalenten Verbindungen führen Fluktuationen in der Vernetzung durch ABPs oder Ionen zu einer Frequenzabhängigkeit der Schwerpunktsdiffusion einzelner Filamente. Durch Überlagerung der thermisch angeregten, dynamischen Entknüpfung der Filamente bei niedrigen Frequenzen mit der bei höheren Frequenzen dominierenden Einzelfilamentfluktuation ergibt sich ein ausgeprägtes Minimum und Maximum – typischerweise im Frequenzbereich zwischen $0,05 - 50 \text{ rad/s}$. Die in den Gelexperimenten beobachteten Minimalwerte im Verlauf von G'' lagen in der Regel um circa eine Größenordnung unter G_0 .

In der Folge verhielten sich F-Aktin Gele, unabhängig vom Vernetzungszustand, bei kleinen Frequenzen wie teilelastische Festkörper ($G' > G''$), wohingegen sie für große Frequenzen teilelastischen Flüssigkeiten ($G'' > G'$) ähnelten. Die Kreuzungsfrequenz ω_K , bei welcher $G' = G''$ gilt, steht in direkter Relation mit der Verschränkungszeit τ_e , die den Beginn der Plateauphase der MQV bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.2). Basierend auf den angepassten Verlaufskurven lassen sich die Kreuzungsfrequenzen in unvernetzten Gelen zu $9 \pm 1 \text{ rad/s}$ für carboxylierte und $22 \pm 2 \text{ rad/s}$ für PS-Proben bestimmen, woraus sich in guter Übereinstimmung mit Abbildung 6.7 Verschränkungszeiten von $0,35 \pm 0,04 \text{ s}$ beziehungsweise $0,14 \pm 0,02 \text{ s}$ ergeben. Bei initialvernetzten Gelen liegt ω_K für CA-Sphären mit $127 \pm 5 \text{ rad/s}$ mehr als eine Größenordnung über dem Wert der Unvernetzten. Dies führt zu $\tau_e = 0,025 \pm 0,02 \text{ s}$, nahe am Zeitauflöselimit des Systems, und spiegelt die Zunahme des elastischen Charakters des Systems wider. Für die größeren PS-Partikel

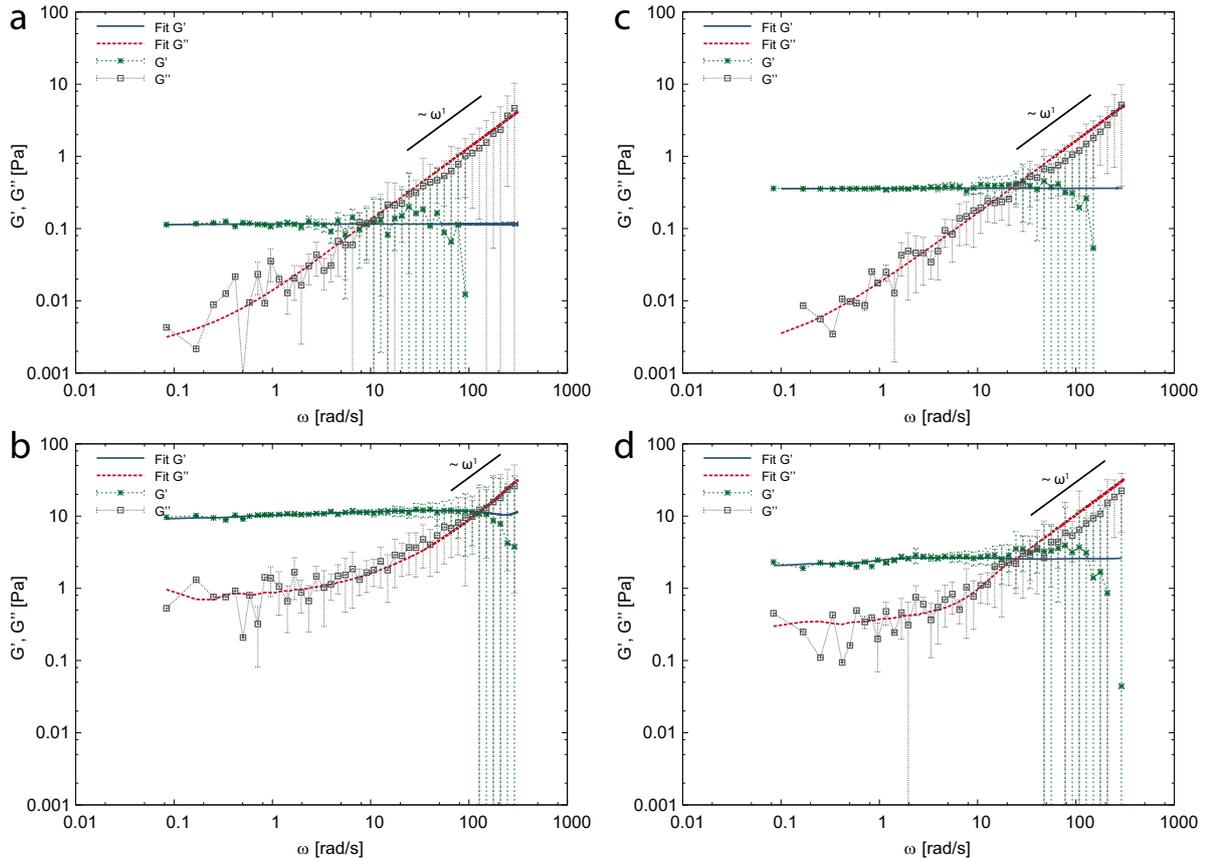


Abbildung 6.8: Abhängigkeit der viskoelastischen Moduli 11 μM Aktinlösungen von Proben-durchmesser und -funktionalisierung. (a, b) 0,53 μm carboxylierte Probenpartikel ohne (a) und mit (b) 50 mM MgCl. (c, d) 1,89 μm Polystyrol Probenpartikel ohne (a) und mit (b) 50 mM MgCl.

bleibt die Kreuzungsfrequenz mit $24 \pm 2 \text{ rad/s}$ ($\tau_e = 0,13 \pm 0,02 \text{ s}$) hingegen im Rahmen der Genauigkeit konstant. Dabei wird aus den Messresultaten direkt ersichtlich, dass eine Abnahme der Partikelbeweglichkeit, d.h. eine Abnahme der MQV, zwar eine Erhöhung von G_0 und G'' (bei kleinen Frequenzen) nach sich zieht, nicht aber zwangsläufig zu einer Änderung der Frequenzabhängigkeit der viskoelastischen Eigenschaften bei hohen Frequenzen führt.

Die Kurven stimmen in ihrem grundsätzlichen Verlauf mit entsprechenden Publikationen überein. Messungen durch *Gardel et al.* mit 0,42 μm Partikeln in Gelen von 1,0 mg/ml Aktin ergaben Werte von $G_0 = 0,25 \pm 0,05 \text{ Pa}$, mit 0,5 μm Partikeln und 0,3 mg/ml Aktin $G_0 = 0,008 \pm 0,004 \text{ Pa}$ [61]. Mangels Publikationen lässt sich kein Vergleich für 1,87 μm Partikel oder mittels Mg^{2+} gebündelter Gele anführen. G_0 aus Untersuchungen an ABP vernetzten Gelen liegt bei variierenden Aktinkonzentrationen und Vernetzerkonzentrationen allerdings typischerweise im Bereich zwischen 0,1 und 10 Pa [119, 179].

6.2.3 Organisation sternförmiger Aktinstrukturen

Da 1- und 2-dimensionale Strukturen die direkte Anhaftung von Probenpartikeln an die Netzwerkfilamente nötig machten wurden die dafür vorgesehenen $1,87\ \mu\text{m}$ streptavidinbeschichteten Polystyrolkugeln ebenfalls in entsprechenden Gelen biotinylierten F-Aktins erprobt. Kann es bei carboxylierten Partikeln durch Kationenkupplung zu einer verstärkten Anlagerung von Aktinfilamenten kommen, so erlaubt die Streptavidinbeschichtung die direkte Anlagerung von biotinylierten Nukleationskeimen, die zur Ausbildung von Aktinfilamenten auf den Oberflächen führen. In Folge der netzwerkverändernden Eigenschaft war es nicht möglich relevante viskoelastische Daten zu gewinnen. Anders als bei den carboxylierten Mikropartikeln zeigte sich dieser Effekt jedoch direkt in den Fluoreszenzaufnahmen der gebündelten Netzwerke (6.9). So kam es in Polymerisationslösungen mit 50 mM Mg-Anteil um Strukturzentren aus einzelnen oder mehreren Probenpartikeln häufig zur Ausbildung sternförmiger Filamentstrukturen, die in der Zellbiologie auch als *Astern* bezeichnet werden. *Astern* sind eine typische, selbstorganisierende Form filamentösen Aktins oder Mikrotubuli, wie sie durch Wechselwirkung mit aktiven Motor- oder passiven, die Filamentdynamik beeinflussenden Proteinen (vgl. auch Abschnitt 2.2.3) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* entsteht [25, 191].

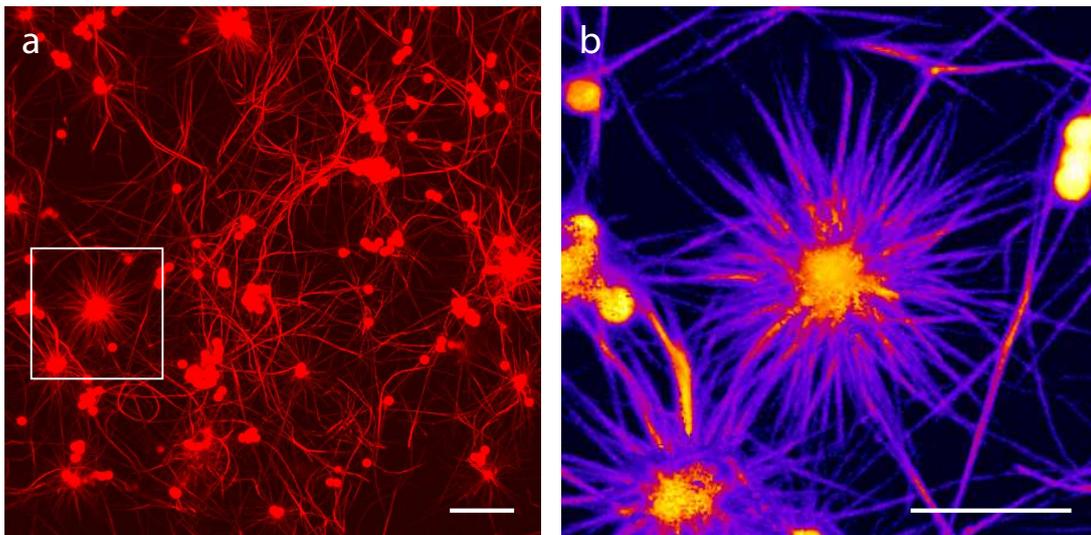


Abbildung 6.9: Konfokale Fluoreszenzaufnahme von $1,87\ \mu\text{m}$ streptavidinbeschichteten Probenpartikeln in 3-dimensionalen Aktin Gelen. Wie im Falle von Experimenten an funktionalisierten Oberflächen durch Reymann *et al.* bildeten sich ausgehend von der Partikeloberfläche Aktinfilamente, welche unter Einfluss divalenter Magnesiumionen zu Bündeln aggregierten. Maßstab: $20\ \mu\text{m}$.

In *in vitro* Experimenten konnten Haviv *et al.* die Entstehung sternförmiger Gebilde durch Zugabe des Bündelungsproteins Fascin zu Netzwerken aus F-Aktin und Arp2/3 induzieren, während es ohne Arp2/3 lediglich zur Ausbildung eines verschränkten Netzwerkes aus Aktin-

bündeln kam [77]. Gleichzeitig stellen *Astern* einen von mehreren Phasenzuständen in aktiven Netzwerken, bestehend aus Myosin II und Fascin dar, der bei Konzentrationsverhältnissen von Myosin : G-Aktin und Fascin : G-Aktin um 0,1 auftritt [14]. Essentiell für die Entstehung der sternförmigen Strukturen war in beiden Fällen der Aufbau eines dichten Zentrums von Filamenten durch Arp 2/3 oder Myosin II.

Analog zu den Experimenten durch *Reymann et al.* zur Organisation von Aktinfilamenten auf mikrostrukturierten Oberflächen (vgl. Abschnitt 2.5.1) zeigt auch das beobachtete 3-dimensionale Verhalten von Streptavidinpartikeln in Aktin Gelen, dass für die Entstehung spezieller Strukturen nicht notwendigerweise organisierende Proteine nötig sind, sondern dass es auch aufgrund geometrischer Faktoren zu Beginn der Polymerisation zu einer spontanen Strukturausbildung durch Ioneninteraktion kommen kann.

6.3 Verhalten lokalisierter, 2-dimensionaler Aktinnetzwerke

Anders als in 3-dimensionalen Gelen, bei denen von einander unabhängige Messungen ohne und mit Vernetzer verglichen werden, ist in 2-dimensionalen Netzwerken – bedingend durch die Partikelanheftung – ein direkter Vergleich der durch die Vernetzung ausgelösten Veränderungen möglich. Durch die Fixierung der Filamente auf den Säulensubstraten ist gleichzeitig ein Netzwerkverändernder Einfluss der Partikelfunktionalisierung als weitaus geringer zu erachten. Zwar kann es zu Beginn der Partikelanheftung durch den angelegten Fluss zur verstärkten Anlagerung von Filamenten und somit einer lokalen Verzerrung des Netzwerkes kommen, nachfolgende Änderungen zwischen den Messungen sind hingegen aufgrund der Wartezeit bis zum Messbeginn (durchschnittlich 20 - 30 min nach Partikelanheftung), während der sich ein Gleichgewichtszustand ausbilden kann, als unwahrscheinlich zu betrachten. Unterschiede im viskoelastischen Verhalten können so auf den netzwerkverändernden Einfluss der Vernetzerreagenz und nicht auf die Streptavidinbeschichtung der Oberfläche zurückgeführt werden.

Bei Anheftung eines Probenpartikels an ein Filament kann dessen Torsionsbewegung zu einer Datenverfälschung führen. Wie aus den Betrachtungen in Kapitel 3 ersichtlich liefert die Torsion keinen direkten Beitrag zur mikrorheologisch bestimmten Viskoelastizität einer Polymerlösung, da es anders als bei Biegung oder Diffusion entlang der Reptationsröhre nicht zu einer Schwerpunktsverschiebung des Filaments kommt. Wird ein Probenpartikel jedoch an lediglich ein Filament angeheftet, so kommt es durch Torsion des Filamentes zu einer transversalen Verschiebung des Partikelschwerpunkts, während sich die Schwerpunktsposition des Filaments nicht geändert hat. Aus diesem Grund ist es unerlässlich zu gewährleisten, dass die für die Ergebnisse herangezogenen Probenpartikel in allen Fällen über Kontakt zu mehreren Filamenten verfügen.

Abbildung 6.10 zeigt einen Ausschnitt eines *in situ* polymerisierten Netzwerkes vor und nach Vernetzung mit 50 mM MgCl-Pufferlösung. Neben der Beschränkung auf 2 Dimensio-

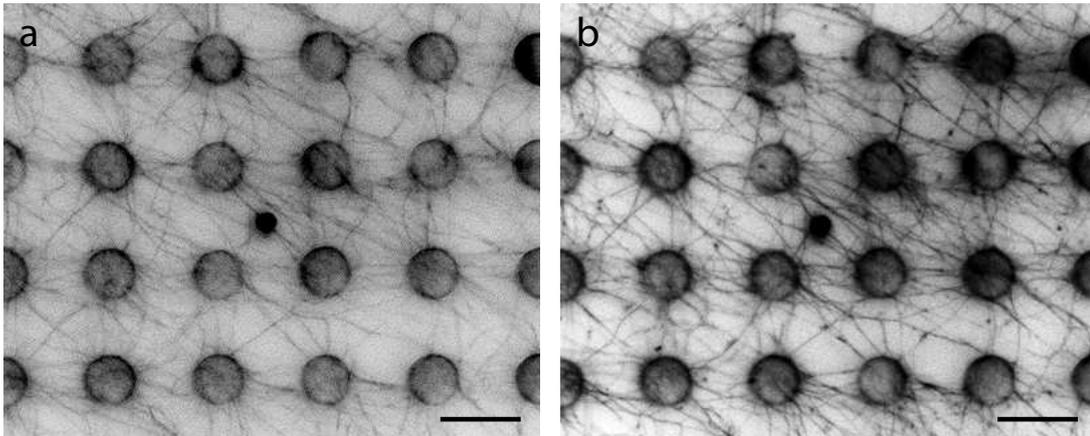


Abbildung 6.10: Fluoreszenzaufnahme eines *in situ* polymerisierten Netzwerks mit $1,87\ \mu\text{m}$ streptavidinbeschichteten Probenpartikels. Vor (a) und nach (b) Vernetzung durch $50\ \text{mM}$ MgCl -Lösung. Maßstab: $10\ \mu\text{m}$.

nen stellt die Verankerung der Filamente eine zweite Randbedingung der Aktinnetzwerke auf PDMS-Säulensubstraten dar, mit grundlegenden Konsequenzen für deren viskoelastischen Eigenschaften. Aufgrund der Fixierung bleibt die Ausgangskonfigurierung der Netzwerkstruktur in ihren Grundzügen erhalten und es kommt auch nicht zur Ausbildung dicker Bündel (vgl. Kapitel 9). Stattdessen vernetzen die Filamente lediglich untereinander, und es kommt zu reisverschlussartigen Verbindungen (engl.: *zipping*) einer geringen – jedoch anhand der Fluoreszenzbilder in der Regel nicht quantifizierbaren – Anzahl an Filamenten. Dies jedoch erschwert eine Korrelation der Messergebnisse in Hinsicht auf Maschengröße und Säulenabstand und macht den direkten Vergleich mit Aktin Gelen nicht möglich, sondern erlaubt lediglich qualitative Aussagen.

Die Plateauwerte der MQV-Kurven lagen bei starker Variation, wie die in Abbildung 6.11 beispielhaft Gezeigte, im Bereich der aus Aktin Gelen ermittelten Werte zwischen 10^{-2} und $10^{-4}\ \mu\text{m}^2$, abhängig vom Vernetzungszustand der Filamente. Generell war jedoch der in 3-dimensionalen Gelen erkennbare Anstieg bei Zeiten kleiner als die Verschränkungszeit τ_e weitaus weniger stark ausgeprägt und der Plateaubereich über den gesamten beobachteten Frequenzbereich stark dominierend. Es ist anzunehmen, dass die mit der Verankerung verbundene Planarität des Netzwerkes die Beweglichkeit der Filamente – anders als in Gelen – in z -Richtung stark einschränkt, was auch im unvernetzten Fall zu einer Verengung der Reptationsröhre an den Kreuzungsstellen der Filamente führt. Damit einher geht eine Einschränkung der anregbaren Wellenlängen transversaler Schwingungen λ , was nach Gleichung 3.38 zu einer Verringerung der Verschränkungszeit τ_e führt, ein Effekt, der sich durch die Mg^{2+} -Vernetzung noch weiter verstärkt. Damit verbunden liegt die Kreuzungsfrequenz mit $\omega_K = 71 \pm 4\ \text{rad/s}$ höher als in 3-dimensionalen Gelen und steigt durch Verknüpfung auf über $170\ \text{rad/s}$ an.

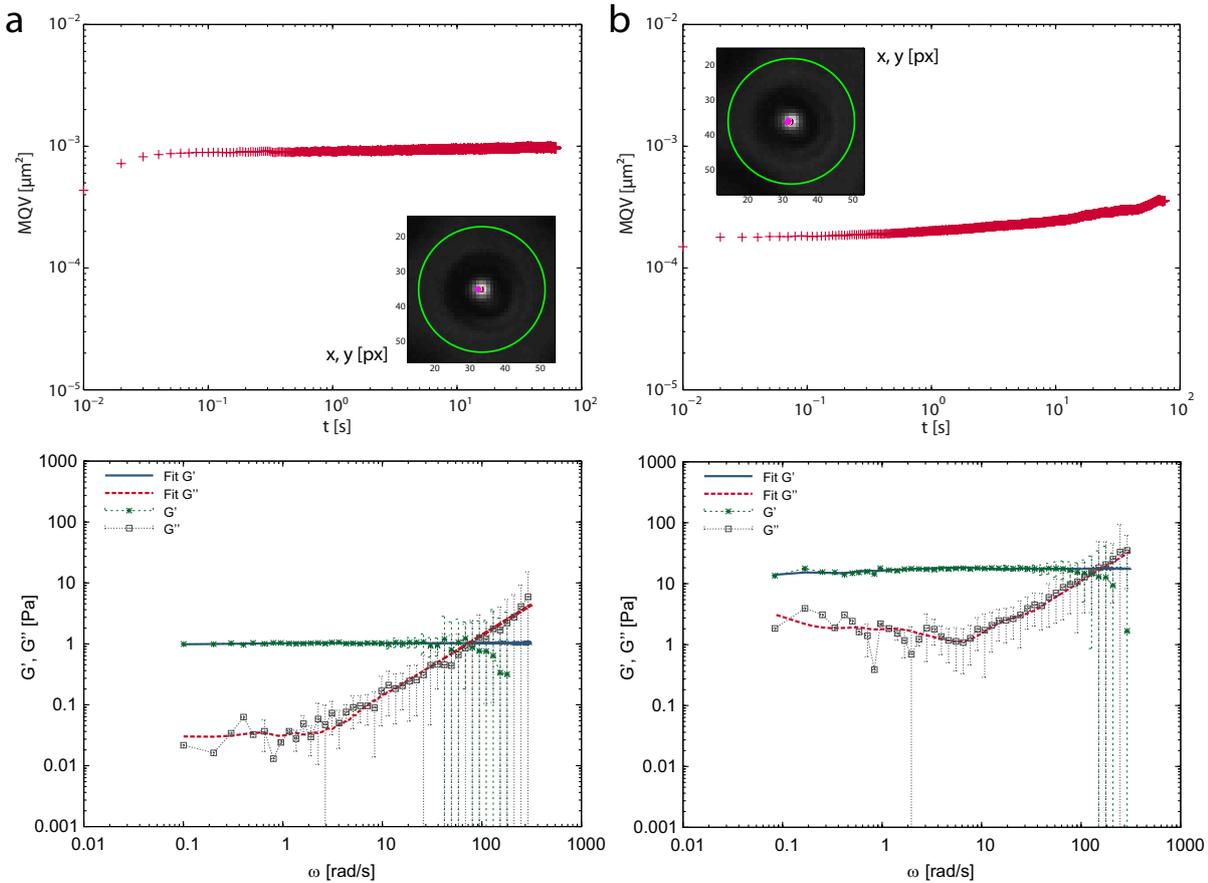


Abbildung 6.11: Kurvenverläufe der MQV und viskoelastischen Moduln quasi 2-dimensionaler Netzwerke auf PDMS-Säulen. Vor (a) und nach (b) Vernetzung mit 50 mM Mg-Lösung.

Für lokalisierte Strukturen zeigt der Verlauf der viskoelastischen Moduln bei kleinen Frequenzen – anders als in Gelen – bereits im unvernetzten Zustand die Ausbildung eines Plateaus für $G''(\omega)$ (Abbildung 6.11 (a)). Mehrere mögliche Erklärungen für dieses Verhalten ergeben sich dabei aus der Verankerung der Filamente auf den PDMS-Säulen.

Eine Möglichkeit stellt der im niedrigen Frequenzbereich schwingungsdämpfend wirkende Einfluss der PDMS-Säulen dar. Dämpfung beschreibt die Umwandlung mechanischer Schwingungsenergie in thermische Energie. Sie ist damit ein Maß für den dissipativen Anteil der Energie, welcher im Verlauf eines Schwingungszyklusses verloren geht. Dämpfende Eigenschaften eines Materials zeichnen sich durch ein im Vergleich zum Speichermodul $G'(\omega)$ hohes Verlustmodul $G''(\omega)$ aus. Viskoelastische Charakterisierung von PDMS unter vergleichbaren Bedingungen (Basis: Vernetzer = 10:1) durch *Lin et al.* enthüllten ein Maximum des frequenzabhängigen Verlustmoduls von $\approx 10^6$ Pa im Bereich von 0,3-2 Hz [114]. Gleichzeitig überwiegt der Verlustmodul den Speichermodul bei Frequenzen unterhalb von 0,6 Hz, während es oberhalb von 30 Hz zu einem starken Abfall der dissipativen Eigenschaft kommt. Damit zeigt sich – unabhängig von der

Dimension – ein konträres Verhalten zu Aktinnetzwerken, bei welchen es für hohe Frequenzen im allgemeinen zu einem starken Anstieg des Verlustmoduls kommt. Der dämpfende Charakter des PDMS deckt sich somit mit dem angedeuteten Plateau in $G''(\omega)$. Dessen gegenüber einem linearen Abfall erhöhter Wert entspricht dabei nichts anderem als einem vergrößerten dämpfenden Anteil, dem jedoch aufgrund des höheren $G'(\omega)$ weiterhin ein überwiegend elastischer Charakter der Filamente gegenübersteht.

Eine weitere Erklärung ergibt sich aus der Verankerung der Filamente mit Myosin. Wie beschrieben kommt es im Falle transientser Verknüpfung zwischen den Filamenten zu einem lokalen Minimum in $G''(\omega)$. Laut *Lieleg et al.* liegt dieses Minimum im Falle von HMM-verknüpften Netzwerken bei Aktinkonzentrationen zwischen $c_A = 4,75 - 28,5 \mu\text{M}$ abhängig von der Vernetzerdichte zwischen 0,2 und 2 Hz [112]. Damit fällt der konstante Abschnitt des Verlustmoduls in den Bereich des zu erwartenden Wideranstiegs. Aufgrund der geringeren Datengrundlage in diesem Frequenzbereich ist über einen exakten Kurvenverlauf jedoch keine eindeutige Aussage zu treffen.

KAPITEL 7

Stressfaserähnliche Aktinstrukturen

Im Fokus der mikrorheologischen Experimente lag die Erforschung der viskoelastischen Eigenschaften quasi 1-dimensionaler Aktinstrukturen, ähnlich den Stressfasern in Zellen. Heruntergebrochen auf ihre geometrischen Charakteristika beschränkten sich die Untersuchungen auf Veränderungen induziert durch Gegenionenkopplung mittels divalenter Mg^{2+} -Kationen. Dabei zeigten Aktinbündel gegenüber 2- und 3-dimensionalen Strukturen im unvernetzten Fall ein richtungsabhängiges viskoelastisches Verhalten – mit erhöhter Elastizität entlang der Filamentachse – welches sich im Zuge der Vernetzung mit Magnesium anglich.

Im Weiteren zeigten Studien zum Filamentverhalten unter variierenden Magnesiumkonzentrationen eine Zunahme der Steifigkeit, selbst bei Konzentrationen, die unter dem bislang aus 3-dimensionalen Gelen bekannten Schwellenwert lagen. Spülung der Bündelstrukturen für 3 h mit magnesiumentziehendem EDTA-Puffer führte entgegen möglicher Erwartungen nicht zu einer generellen Umkehr des Bündelungsprozesses, sondern zeigte eine Langzeitstabilität, die auf eine stark lokalisierte Bindung der Magnesiumionen hindeutet.

7.1 Eigenschaften von lokalisierten Aktinfilamenten und -bündeln

Wie im Falle von 2-dimensionalen Netzwerken wurden die mikrorheologischen Untersuchungen auch im Falle der linearen Strukturen durch Streptavidin-Biotin vermittelte Kopplung der Probenpartikel an die Aktinfilamente vorgenommen. Um die Datenverfälschung durch Torsionsbewegungen der Filamente zu minimieren (vgl. Abschnitt 6.3) wurde auch hier insbesondere darauf geachtet, dass die Probenpartikel von Beginn an über Kontakt zu mehreren Aktinfilamenten verfügten. Um direkte Beeinflussung der Partikelbewegung durch die PDMS-Säulen des Feldes auszuschließen wurden zudem lediglich die Bewegungen von Partikeln aufgezeichnet, die sich nahe des Zentrums zwischen zwei Säulen befanden.

Abbildung 7.1 zeigt Fluoreszenzaufnahmen gerichteter Aktinfilamente und -bündel, die durch das Einspülen präpolymerisierten F-Aktins erzeugt worden waren. Erscheinen sie vor Zugabe

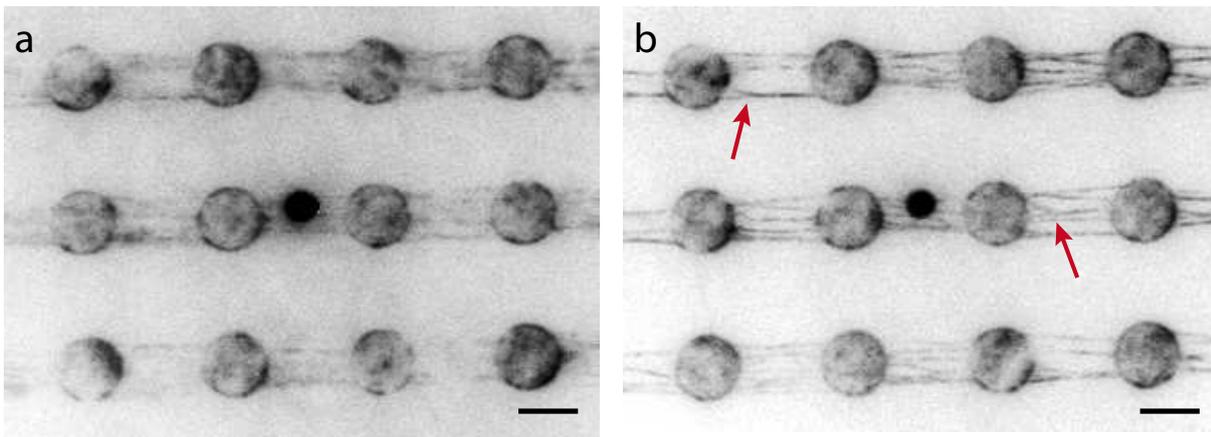


Abbildung 7.1: Fluoreszenzaufnahme gerichteter Aktinfilamente, vor (a) und nach (b) Bündelung mit 50 mM Mg^{2+} . Sind im ungebündelten Zustand keine Einzelfilamente zu erkennen, so zeigen sich in (b) deutlich die für gebündelte Filamente charakteristischen Y-förmigen Zipping-Strukturen (rote Pfeile). Maßstab: 5 μm .

von 50 mM $MgCl_2$ -Lösung aufgrund der thermischen Bewegung als delokalisierte, nur schwach fluoreszente Streifen, so lassen sich im Anschluss daran klar definierte Aktinbündel erkennen. Dabei weisen die Aktinfilamente die für den Bündelungsprozess charakteristischen Y-förmigen Zipping-Strukturen auf, die aus einem Gleichgewicht zwischen longitudinaler Spannungsenergie durch die Krümmung der Filamente und Wechselwirkungsenergie der am Kontaktpunkt wirkenden Gegenionen resultieren.

Die in Abbildung 7.2 beispielhaft dargestellten Verlaufskurven der mittleren quadratischen Verschiebung und viskoelastischen Moduln zeigen einen Verlauf, der in seinen Grundzügen mit den Messresultaten aus planaren Netzwerken auf Säulensubstraten übereinstimmt. Im Zuge der Bündelung kommt es zu einer Erniedrigung der MQV von Werten um $10^{-3} \mu\text{m}^2$ auf unter $10^{-4} \mu\text{m}^2$, wobei der Plateauverlauf im vernetzten Zustand ein Driftverhalten sichtbar werden lässt, das sich im ungebündelten Zustand lediglich für Zeiten $t > 50$ s andeutet. Eine Diffusion der Gesamtbündelstruktur ist bei der strengen Lokalisierung auszuschließen, so dass das Verhalten vermutlich auf eine nicht vollständige Korrektur der temperaturinduzierten z-Drift des Objektivs zurückzuführen ist, erkennbar auch am Verlauf der original Positionsdaten in (b).

Für die viskoelastischen Moduln zeigt sich auch hier – im Unterschied zu 3-dimensionalen Gelen – bereits im ungebündelten Zustand die Ausbildung eines Plateaus beziehungsweise Minimums im Verlauf des Verlustmoduls $G''(\omega)$, möglicherweise zurückzuführen auf die Filamentverankerung (vgl. Diskussion in Abschnitt 6.3). Durch die Bündelung kommt es auch zu einer parallelen Annäherung der Filamente was die Länge und Amplitude der transversalen Schwingungen begrenzt. Dies resultiert in einem Anstieg der Kreuzungsfrequenz von $\omega_K = 56 \pm 5$ rad/s vor der Bündelung auf $\omega_K = 130 \pm 15$ rad/s danach.

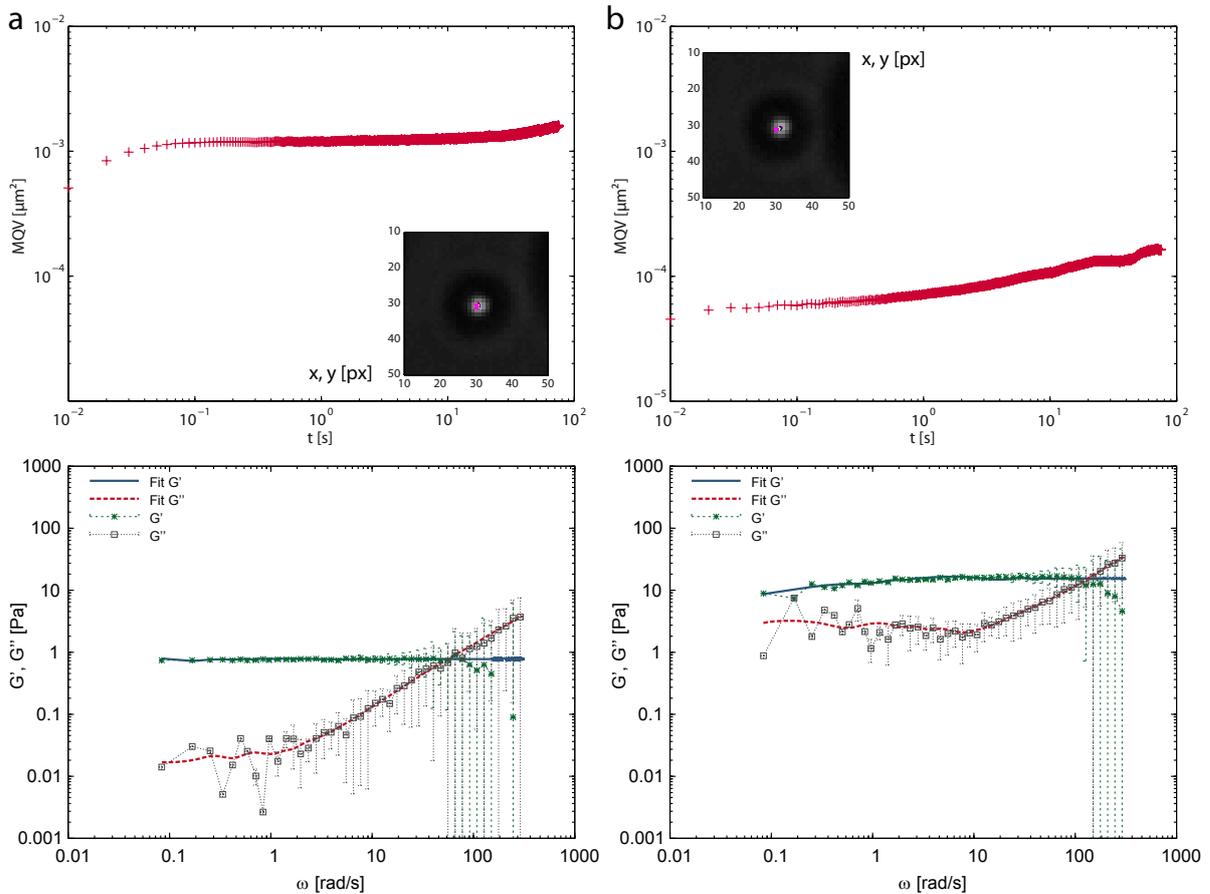


Abbildung 7.2: Kurvenverläufe der MQV und viskoelastischen Moduln linearer Filamentstrukturen auf PDMS-Säulen. Vor (a) und nach (b) Bündelung mit 50 mM Mg^{2+} .

7.2 Richtungsabhängigkeit des viskoelastischen Verhaltens – Vergleich mit 2- und 3-D Strukturen

7.2.1 Bewegungsverhalten von Probenpartikeln in unterschiedlich dimensionalen Netzwerken

Zur Analyse des richtungsabhängigen viskoelastischen Verhaltens quasi 1-dimensionaler Aktinbündel wurden die Exzentrizität der für die Probenpartikel ermittelten Positionsdaten bestimmt und sie in Komponenten entlang der kurzen und langen Halbachse aufgespalten. Abbildung 7.3 zeigt exemplarisch die Wahrscheinlichkeitsdichte zweier in 3-dimensionalen Aktinringen (a) und 2-dimensionalen Netzwerken (b) eingebetteten Probenpartikel.

Die Partikelbewegung in unvernetzten Aktinringen zeigt aufgrund der Isotropie und hohen Beweglichkeit der umgebenden Filamente in allen Dimensionen keine Vorzugsrichtung. Die beiden zugehörigen Kurven entlang der Halbachsen weisen bis auf einen leichten Verzerrungseffekt einen nahezu identischen Verlauf auf. Für vernetzte Gele ergibt sich im Regelfall hingegen ein leicht

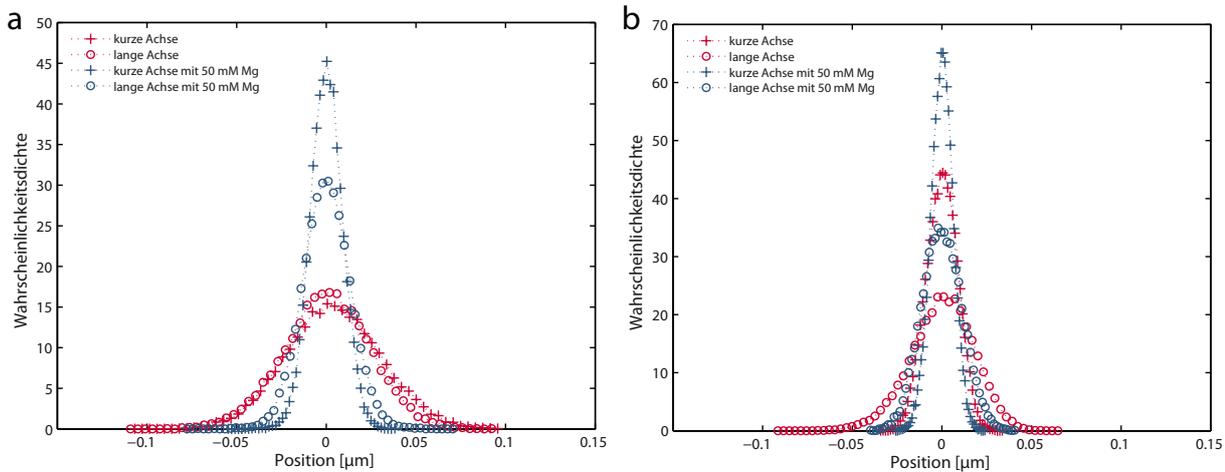


Abbildung 7.3: Wahrscheinlichkeitsdichte entlang der kurzen und langen Halbachsen für 3-dimensionale Aktinglele (a) und 2-dimensionale Netzwerke (b), vor und nach Mg-Vernetzung. Während Aktinglele im unvernetzten Zustand keine Vorzugsrichtung besitzen zeigen 2-dimensionale Aktinnetzwerke eine schwache Anisotropie die auch nach dem Bündelungsprozess erhalten bleibt.

anisotropes Bewegungsverhalten. Zwar führt die Versteifung des Netzwerkes durch Bündelung der Filamente zu einer Reduktion der Partikelbeweglichkeit und in der Folge zu einer höheren Wahrscheinlichkeitsdichte im Zentrum der Positionsverteilung, jedoch ergibt sich daraus auch eine Zerstörung der isotropen Netzwerkstruktur. In der Folge nimmt der Unterschied zwischen den Richtungen der Probenpositionen zu und es lassen sich klar kurze und lange Halbachse identifizieren.

In Netzwerken auf PDMS-Säulen zeigte sich bereits im unvernetzten Zustand eine erhöhte Richtungsabhängigkeit der Partikelbewegung. Ursache hierfür ist, dass es selbst bei *in situ* Polymerisation nicht möglich war, lokal vollständig isotrope Netzwerke zu erzeugen. Da bei Einpartikelmikrorheologie die Wechselwirkungsreichweite stark beschränkt ist wird sie – anders als die Zweipartikelmikrorheologie – verstärkt durch das lokale viskoelastische Verhalten des umgebenden Materials beeinflusst; ein Effekt, der auch nach Vernetzung durch Magnesium erhalten bleibt. Aufgrund der durch die Lokalisierung auf den Säulenköpfen stärker eingeschränkten Filamentbewegung und der direkten Streptavidin-Biotin Kopplung zwischen Probe und Filament weißt die Wahrscheinlichkeitsdichte bereits vor Vernetzung eine Amplitude auf, wie sie der Bewegung in vernetzten Aktinglelen entspricht, und die durch Vernetzung noch weiter ansteigt.

Von 3- und 2-dimensionalen Netzwerken abweichend, zeigen mit Aktinbündeln verknüpfte Probenpartikel generell ein ausgeprägteres richtungsabhängiges Schwingungsverhalten. Abbildung 7.4 stellt die Positionsverteilungen und Wahrscheinlichkeitsdichten eines ausgewählten Partikels vor und nach Mg^{2+} induzierter Bündelung dar. Dabei stimmen kurze und lange Achsen der Positionswolke innerhalb Abweichungen von 15° mit der longitudinalen und transversalen Fila-

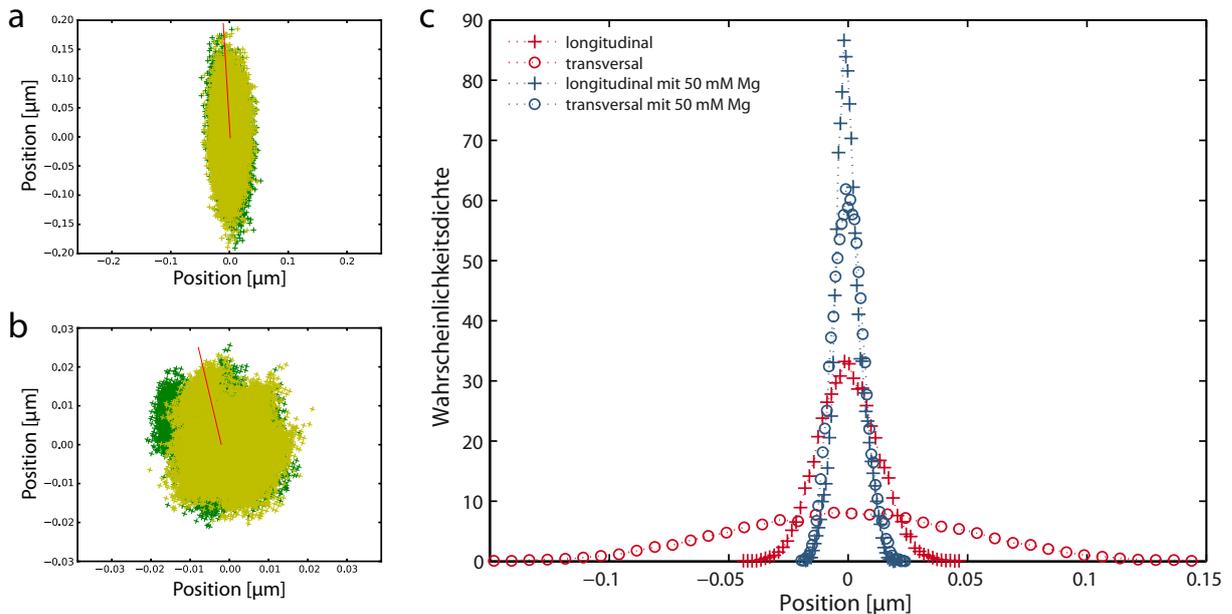


Abbildung 7.4: Positionsverteilung (a, b) eines an lineare Filamentstrukturen angebrachten Probenpartikels und Wahrscheinlichkeitsdichte in longitudinaler und transversaler Filamentrichtung (c). Vor der Bündelung mit Mg^{2+} (a) zeigt sich ein deutlich elyptisches Schwingungsverhalten, dessen lange Hauptachse mit der transversalen Richtung der in Abbildung 7.1 gezeigten Filamente übereinstimmt. Nach der Bündelung (b) zeigt sich eine deutlich reduzierte Schwingungsamplitude, die zudem eine nur noch schwache Vorzugsrichtung aufweist.

mentrichtung zwischen den Säulen überein. Entspricht die transversale Wahrscheinlichkeitsdichte vor der Vernetzung in etwa Jener der kurzen Achse in 2-dimensionalen Netzwerken, so zeigt die longitudinale Achse einen weitaus verschmierteren Verlauf. Ist das Schwingungsverhalten in longitudinaler Richtung sowohl für 1-dimensionale als auch 2-dimensionale Strukturen durch die Fixierung auf den Säulenköpfen bestimmt, so weisen gerichtete Filamente aufgrund der verminderten Anzahl an Querinteraktionen einen größeren Durchmesser der Reptationsröhre auf. Gleichzeitig ist eine longitudinale Schwerpunktsbewegung im Rahmen der thermischen Anregung wegen des hohen Widerstandes der Aktinfilamente gegen axiale Dehnung oder Kompression (vgl. Abschnitt 3.1.2) mit einer Verkrümmung von Teilsegmenten des Filaments verbunden. Longitudinale Schwingungen führen daher gleichzeitig auch zu transversalen Bewegungen. Im Zusammenspiel resultiert daraus entsprechend der Beobachtungen eine im Vergleich größere Bewegungsamplitude in transversaler Richtung.

Unter Beachtung der Skalenverhältnisse wird ersichtlich, dass sich die Positionsverteilung sowohl in longitudinaler als auch transversaler Richtung durch die Bündelung deutlich verringert. Mehr noch führt die Vernetzung zu einem Angleich der Wahrscheinlichkeitsdichten entlang der Achsen. Die Amplituden beider Komponenten liegen deutlich über denen der mehrdimensionalen Messungen, was für eine stärkere Lokalisierung der Partikel und eine höhere Einschränkung

der Filamentbeweglichkeit spricht. Befinden sich zwei Filamente in direkter Nähe zueinander, so kann es aufgrund der parallelen Anordnung durch die MgCl_2 -Zugabe zu einer gegenüber 2-dimensionalen Netzwerken deutlich verstärkten Änderung kommen. Die Bündelung ist dabei gleichzusetzen mit einer Reduzierung des Durchmessers der Reptationsröhre, der anders als in verwobenen Gelen oder Netzwerken nicht nur punktuell sondern entlang weiter Bereiche des Filaments erfolgt.

7.2.2 Wechselwirkungspotential und Rückstellkraft

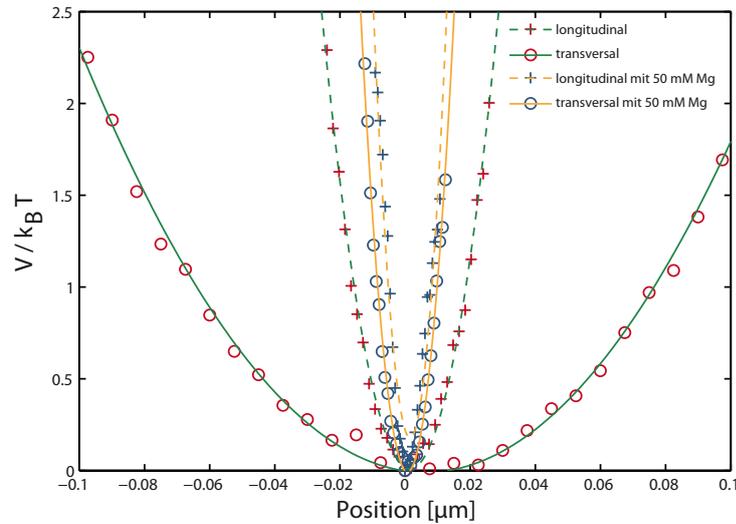


Abbildung 7.5: Effektive longitudinale und transversale Wechselwirkungspotentiale vor und nach Zugabe von 50 mM Mg -Lösung. Sowohl in longitudinaler als auch transversaler Richtung zeigt sich ein harmonischer Verlauf der Potentiale. Die Verstärkung der Potentiale ist auf eine höhere Beschränkung der Filamentbeweglichkeit durch die Bündelung und Versteifung der Filamente zurückzuführen.

Grund für die Abnahme der Bewegungsamplitude durch die Bündelung ist eine Zunahme der sogenannten Rückstellkraft (engl.: *restoring force*). Zur Einschränkung der transversalen Beweglichkeit eines Aktinstranges aufgrund seiner intrinsischen Elastizität kommen im Falle der linearen Aktinstrukturen Effekte durch Verankerung und benachbarte Filamente, die den Durchmesser der Reptationsröhre verringern, hinzu. In Folge der Bewegungsbeschränkung sehen sich Teilsegmente der Aktinstränge einem effektiven Wechselwirkungspotential $V(\mathbf{r})$ ausgesetzt, welches im thermischen Gleichgewicht in direktem Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(\mathbf{r})$ der Partikelpositionen steht. So gilt nach Boltzmann $V(\mathbf{r})/k_B T = -\ln P(\mathbf{r}) + \text{const.}$, woraus sich im Falle eines harmonischen Potentials die Kraftkonstante durch $k = \frac{1}{2} \partial^2 / \partial y^2 V(\mathbf{r})$ herleiten lässt. Aufgespalten in longitudinaler und transversaler Richtung zeigt Abbildung 7.5 die Wechselwirkungspotentiale der bereits in Abbildung 7.4 dargestellten Wahrscheinlichkeitsdichten.

Kolloidale Studien der Einzelfilamentbewegung in Aktinfilamenten mit Maschengrößen von $0,5\ \mu\text{m}$ durch *Dichtl et al.* lieferten transversale Kraftkonstanten im Bereich von 5×10^{-8} - 10^{-7} N/m [39]. Die in den vorliegenden Experimenten ermittelten Werte für lineare, ungebundelte Strukturen lagen typischerweise um eine Größenordnung höher. Für die in Abbildung 7.5 dargestellten Potentiale ergaben sich aus dem Verlauf der angefütteten Kurven vor Vernetzung Kraftkonstanten in transversaler (k_t) bzw. longitudinaler (k_l) Richtung von $k_t = (1,7 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ N/m und $k_l = (2,8 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ N/m. Zwar streuten die Werte verschiedener Experimente, begründet durch ihre Abhängigkeit von der Ausgangskonfiguration – wie Anzahl und Abstand der Filamente – stark (siehe Abbildung 7.6), es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Werte des ungebündelten Zustands wie zu erwarten systematisch über denen von Einzelfilamenten in den Experimenten von *Dichtl et al.* lagen.

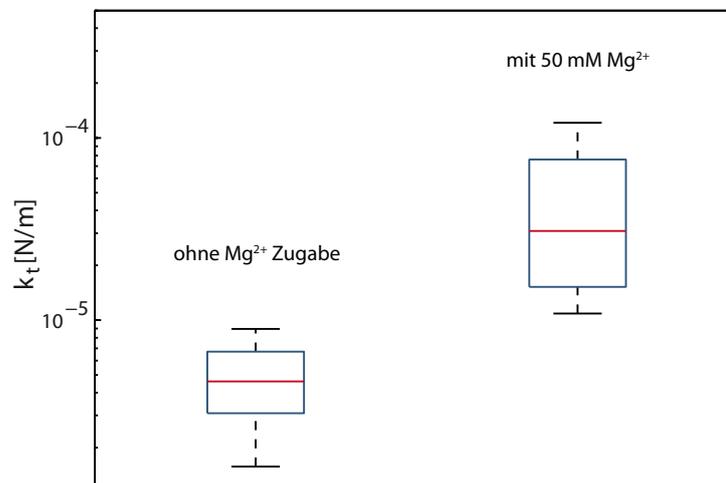


Abbildung 7.6: Rückstellkraft in transversaler Richtung vor und nach Zugabe von 50 mM Mg-Lösung.

Durch Bündelung trat eine Zunahme auf Werte von $k_t = (9,3 \pm 0,6) \times 10^{-5}$ N/m und $k_l = (2,1 \pm 0,5) \times 10^{-4}$ N/m ein. Während die longitudinale Komponente somit von einem bereits höheren Ausgangswert auf das 10-fache anstieg, versteifte sich das Filamentbündel in transversaler Richtung um einen Faktor 50. Generell kam es in transversaler Richtung zu Anstiegen von k_t um das 10 bis 100fache. Die große Schwankung lässt sich erklären durch die Tatsache, dass es im Zuge der Vernetzung einerseits zur Versteifung bereits zusammengelagerter Filamente kam, sich aufgrund der Mg^{2+} -induzierten Wechselwirkung andererseits aber auch zusätzliche Filamente anlagern konnten. Für den Fall der Filamentbündelung mittels des ABPs Scruin ermittelten *Shin et al.* einen Anstieg der Biegesteifigkeit um das 300-fache gegenüber einem unvernetzten Strang vergleichbarer Stärke [186]. Die Zunahme der Rückstellkraft in Folge der Magnesiumverknüpfung liegt damit unterhalb dieser Messungen, wobei aber auch die bereits zu Beginn vorhandene Reduktion der Bewegung durch Anbindung der Filamente auf den Säulen, deren Abstände unter der Persistenzlänge von

F-Aktin lagen, berücksichtigt werden muss.

7.2.3 Richtungsabhängiges viskoelastisches Verhalten

Mit der Aufteilung der Partikelbewegung in Richtungen longitudinal und transversal zur Filamentorientierung konnte auch die Bestimmung von richtungsabhängigen viskoelastischen Moduln durchgeführt werden. Dabei führen unterschiedliche Bewegungsamplituden in erster Linie zu variierenden Plateauwerten im MQV-Verlauf, was sich auch in den frequenzabhängigen Absolutwerten von Speicher- und Verlustmodul widerspiegelt. Für unterschiedlich dimensionale Strukturen zeigen Abbildungen 7.7, 7.8 und 7.9 die entsprechenden Verlaufskurven entlang der kurzen und langen Halbachse von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowohl vor (a) als auch nach (b) Vernetzung und Bündelung mit 50 mM Mg^{2+} . Während sich die Werte entlang der Achsen für G_0 im Falle 2- und 3-dimensionaler Strukturen erwartungsgemäß nur schwach (um einen Faktor 2-3) unterscheiden, so zeigten sich für gerichtete Filamente Unterschiede von bis zu einer Größenordnung. Die bereits diskutierten magnesiuminduzierten Effekte zeigten sich auch bei richtungsabhängiger Aufspaltung des Verhaltens. So kam es in allen Fällen im Vergleich zu den Werten vor Vernetzung zu einem proportionalen Anstieg der Moduln von circa einer Größenordnung. Ebenso kam es generell zu einer Verschiebung der Kreuzungsfrequenz ω_K hin zu höheren Werten und – bei 2- und 1-dimensionalen Strukturen – zur Ausbildung ausgeprägter Minima im Verlauf von $G''(\omega)$. Darüber hinaus zeigten lineare Strukturen jedoch eine Richtungsabhängigkeit der viskoelastischen Moduln, die sich im Laufe der Bündelung verlor.

Tabelle 7.1: Übersicht der Kreuzungsfrequenzwerte ω_K der in den Abbildungen 7.7 bis 7.9 dargestellten Kurven.

Netzwerkzustand	ω_K kurze Achse [rad/s]	ω_K lange Achse [rad/s]
3-dimensionale Gele		
verwoben	32 ± 8	25 ± 7
vernetzt	29 ± 7	28 ± 10
2-dimensionale Netzwerke		
verwoben	82 ± 15	70 ± 12
vernetzt	195 ± 30	190 ± 25
1-dimensionale Strukturen		
verwoben	94 ± 11	59 ± 8
vernetzt	180 ± 25	190 ± 20

Tabelle 7.1 gibt eine Übersicht über die ω_K -Werte der in den Abbildungen 7.7 bis 7.7 dargestellten Kurven. Sowohl für 3- als auch 2-dimensionale Strukturen galt in allen Fällen, dass die Kreuzungsfrequenz entlang der Achsen innerhalb der durch Datenstreuung verursachten Unsicherheit übereinstimmte. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei gerichteten Filamenten entlang der

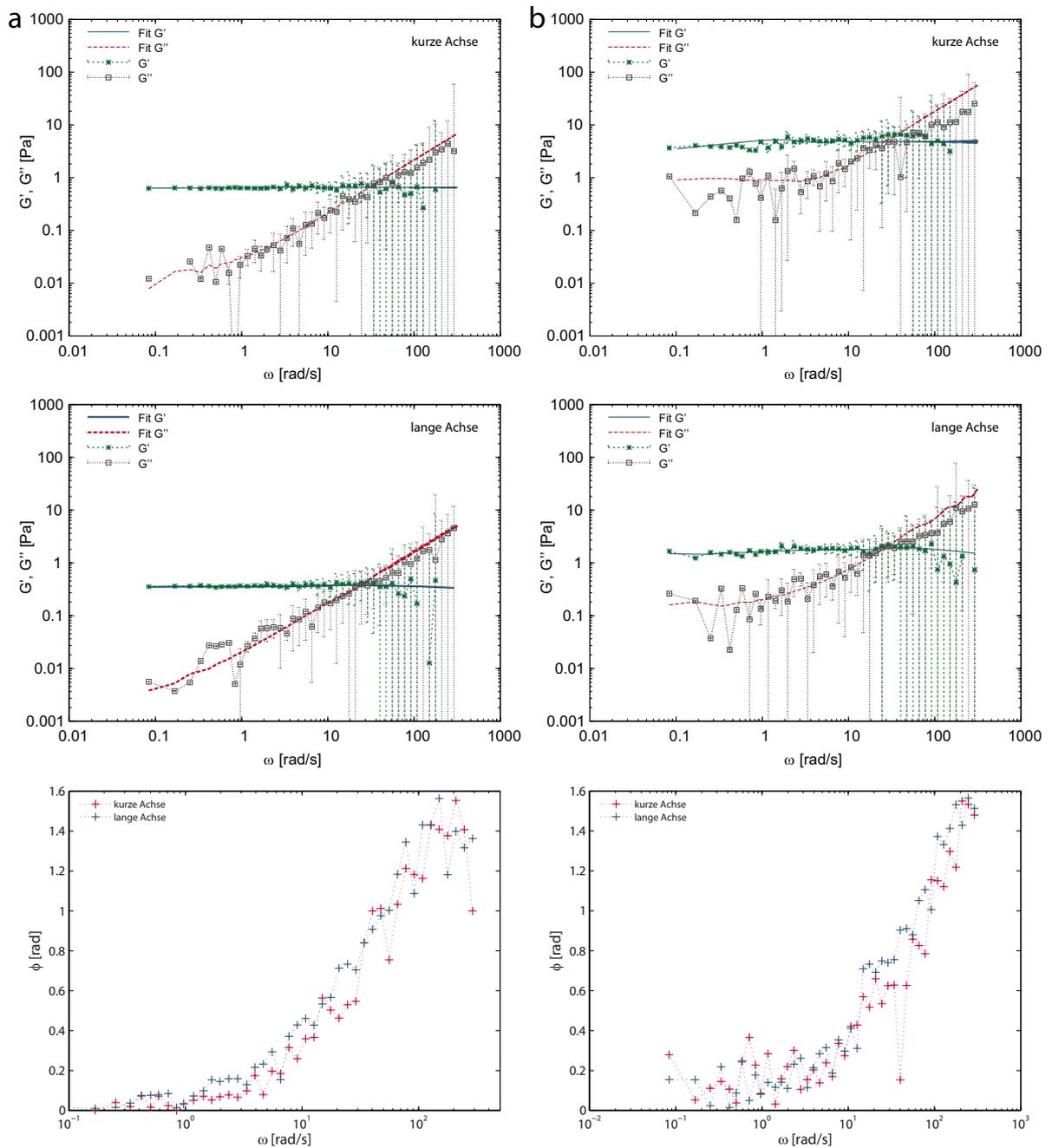


Abbildung 7.7: Richtungsabhängiges Verhalten der viskoelastischen Moduln für 3-dimensionale Aktinengele. Vor (a) und nach (b) Mg-induzierter Bündelung. Die Kurvenverläufe in Richtung der langen und kurzen Achsen zeigen eine hohe Übereinstimmung, was sich in einem deckungsgleichen Verlauf des Verlustwinkels Φ widerspiegelt.

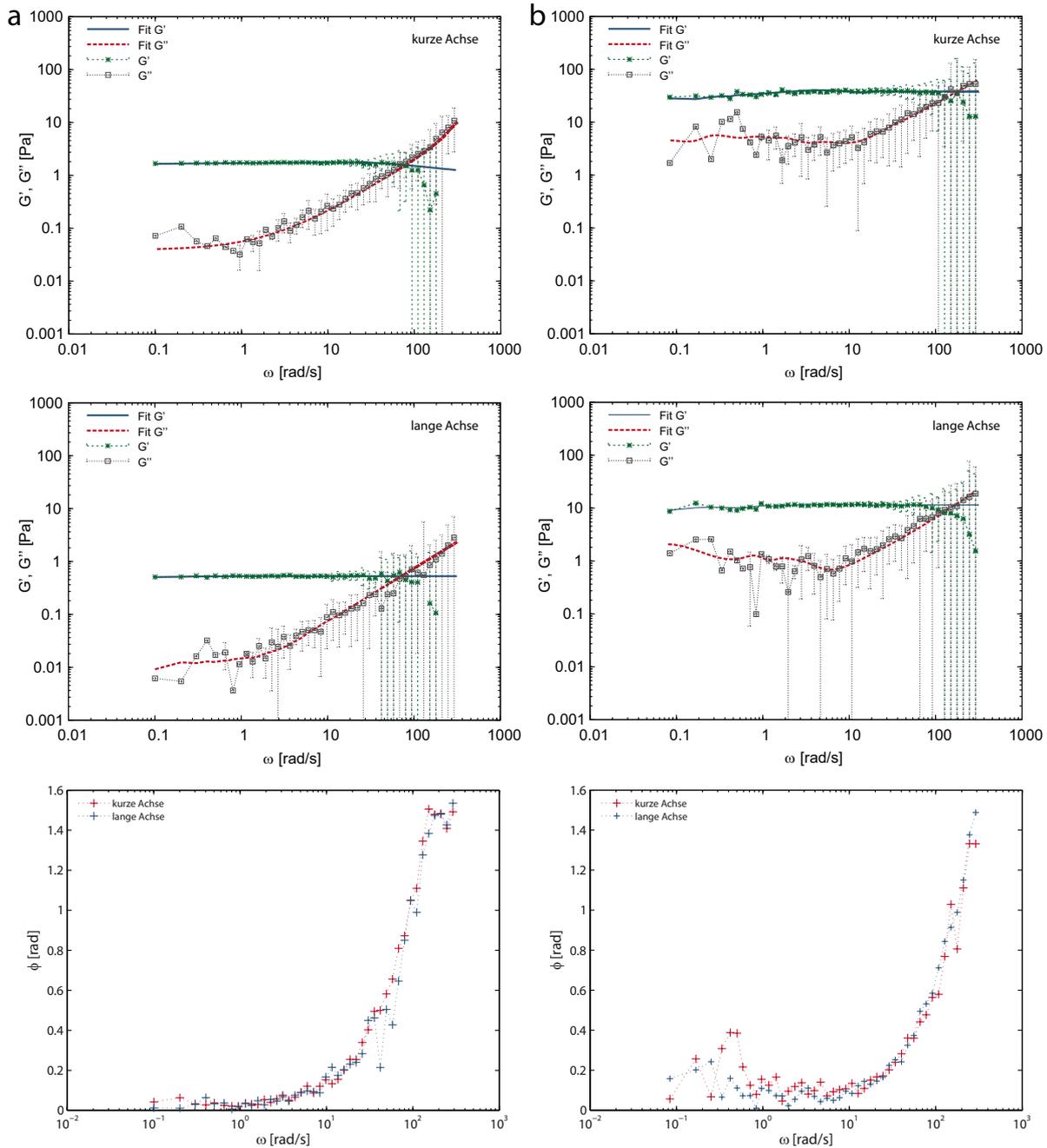


Abbildung 7.8: Richtungsabhängiges Verhalten der viskoelastischen Modul für 2-dimensionale Aktinnetzwerke. Vor (a) und nach (b) Mg-induzierter Bündelung. Trotz einer asymmetrischen Schwingungsverhaltens zeigen die viskoelastischen Modul entlang der Achsen eine hohe Übereinstimmung.

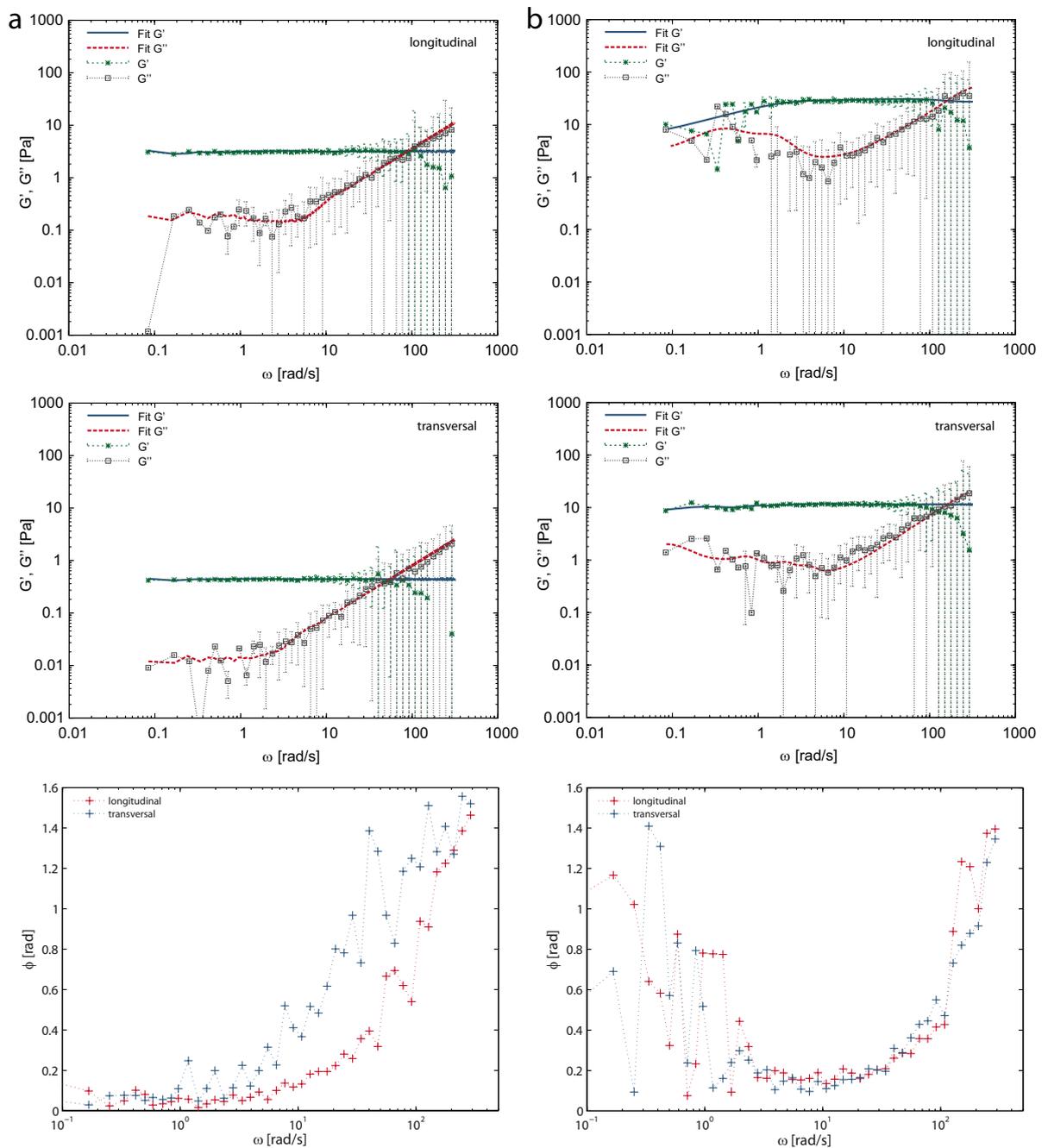


Abbildung 7.9: Richtungsabhängiges Verhalten der viskoelastischen Moduln für lineare Aktinstrukturen. Vor (a) und nach (b) Mg-induzierter Bündelung. Longitudinale und transversale Richtung weisen im ungebündelten Zustand voneinander abweichende Kreuzungsfrequenzen ω_K auf, die zu einem voneinander abweichenden Verlauf des Verlustwinkels Φ führen. Durch die Bündelung kommt es zu einem Angleich der Kreuzungsfrequenzen und des Verlustwinkel-Verlaufs.

kurzen Achse (longitudinal) eine um das 1,5- bis 2-fach gegenüber der langen Achse (transversal) erhöhte Kreuzungsfrequenz. Damit verbunden dominiert das elastische Verhalten longitudinal über einen breiteren Bereich.

Experimentell bedingt kommt es aufgrund der Ausgangsbedingungen – wie Maschenzahl in 3- und 2-dimensionalen Netzwerken oder aber Anzahl und Abstand der Filamente in quasi 1-dimensionalen Strukturen – zu Variationen in den Absolutwerten der viskoelastischen Moduln. Verlässlichere Aussagen lassen sich daher durch Angabe des frequenzabhängigen Verhältnisses von Verlustmodul $G''(\omega)$ zu Speichermodul $G'(\omega)$ treffen. Als Maß für den Energieanteil, der im Laufe eines Schwingungszyklus durch Dissipation verloren geht wird das Verhältnis häufig angegeben als sogenannter Verlustwinkel (engl.: *loss angle*) $\phi(\omega) = \arctan(G''(\omega)/G'(\omega))$ [97].

In multidimensionalen Netzwerken (vgl. Abbildungen 7.7 und 7.8) zeigt sich entlang beider Achsen der selbe frequenzabhängige Verlauf des Verlustwinkels. Der stetige Anstieg des Verlustmoduls im Falle verwobener Aktinglele führt auch zu einem stetigen Zuwachs von ϕ , wobei der Kreuzungspunkt der viskoelastischen Moduln standardmäßig einem Verlustwinkel von $\approx 0,8$ rad entspricht. Ab Werten von $\phi > 0,8$ rad überwiegt der viskose Charakter des Netzwerkes. Aufgrund der Plateau- bzw. Minimumausbildung in vernetzten Systemen und Netzwerken auf Säulensubstraten weisen die Kurven hierbei einen deutlich steileren Anstieg bei höheren Frequenzen auf. Generell zeigen diese Systeme keine Forzugsrichtung in ihrem viskoelastischen Verhalten.

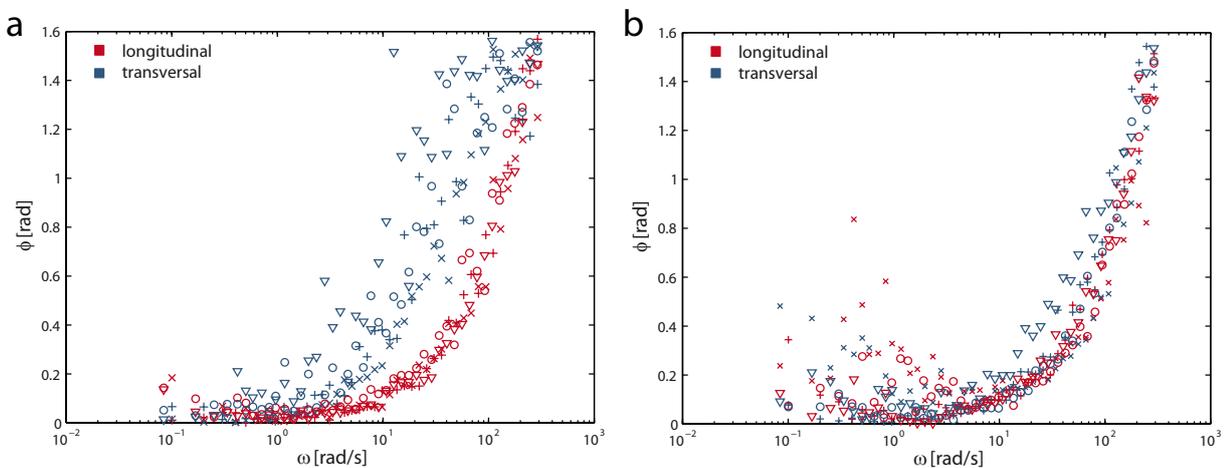


Abbildung 7.10: Verlauf des frequenzabhängigen Verlustwinkels in longitudinaler und transversaler Richtung vor (a) und nach (b) Bündelung durch 50 mM Mg^{2+} . Weißt die transversale Komponente vor der Bündelung im Bereich zwischen 1 und 100 rad/s ein stärkeres dissipatives Verhalten auf, so gleichen sich die beiden Komponenten im Laufe der Bündelung an.

In 1-dimensionalen Systemen hingegen weicht der Kurvenverlauf zwischen longitudinalem und transversalem Verlustwinkel merklich voneinander ab. Multiple Kurvenverläufe des Verlustwinkels gerichteter Strukturen sind in Abbildung 7.10 dargestellt. Dabei streute die transversale Kompo-

nente aufgrund der ausgeprägteren Abhängigkeit von der Anfangskonfiguration im unvernetzten Fall deutlich stärker als die Longitudinale. Nichtsdestotrotz ließ sich eine eindeutige Frequenzverschiebung im Verlauf der Kurven feststellen. Während die transversale Komponente dem Verlauf in 3-dimensionalen Gelen folgte, war der Anstieg in longitudinaler Richtung hin zu hohen Frequenzen verschoben. Gegenüber Aktینگelen besaßen die gerichteten, verankerten Filamente somit im untersuchten Frequenzbereich ein deutlich elastischeres, d.h. energiespeicherndes Verhalten entlang der Filamentorientierung. In Folge der Kurvendifferenz zeigte sich in transversaler Richtung im Bereich zwischen 1 und 100 rad/s ein ausgeprägteres dissipatives Verhalten als entlang der Filamentachse. Damit werden transversale Schwingungen stärker gedämpft als Longitudinale.

Bündelung durch Mg^{2+} führt zu einem Angleich der Kurven auf Werte des Verlustwinkels in Filamentrichtung. Im Bereich niedriger Frequenzen deutet sich ein Wideranstieg des Verlustwinkels an, gleichzusetzen mit einer Annäherung von $G''(\omega)$ an $G'(\omega)$. Damit ist ein überwiegend elastischer Charakter der Bündel auf einen Frequenzbereich von $\approx 0,1 - 100$ rad/s beschränkt.

7.3 Zeitabhängiges Bündelungsverhalten

7.3.1 Bündelung bei niedrigen Ionenkonzentrationen

In verwobenen Netzwerken kommt es aufgrund der polyelektrolytischen Natur der über einen weiten pH-Bereich negativ geladenen Aktinstränge zu einem schwach repulsiven Effekt zwischen den Filamenten. Erst die Anwesenheit entsprechend hoher Konzentrationen an Gegenionen und die folgende Kondensation entlang der Polymerstränge ist in der Lage eine attraktive elektrische Wechselwirkungskraft zu induzieren. Dabei hängt die zur Erzeugung einer attraktiven Wechselwirkung nötige Konzentration einerseits stark von der Ladungszahl der Kationen ab, andererseits steigt sie Untersuchungen zufolge mit zunehmender Atomzahl an. Ein Effekt, der nicht durch die *Manning*-Theorie (vgl. Abschnitt 3.4 zur Gegenioneninteraktion) erklärbar ist, aber möglicherweise auf geänderte Ionenradien oder Ausmaß der Hydrathülle zurückzuführen ist.

Im allgemeinen ist die Interpretation der *Manning*-Theorie zum abschirmenden Effekt der Gegenionen in Hinsicht auf reale Polymere mit einigen Schwierigkeiten verbunden, die aus einer ungleichmäßigen Ladungsverteilung sowie der räumlichen Ausdehnung der Filamente resultieren. Theoretische Berechnungen zur gegenioneninduzierten Bündelung durch *Yu et al.* lieferten auf Basis eines Ising-ähnlichen Modells eine von der Konzentration abhängige Anzahl an unterschiedlich stark gebundenen, divalenten Kationen [230]. Den Ergebnissen zufolge kommt es bereits ab Konzentrationen von 10^{-8} M zur Bindung einzelner Ionen an die Untereinheiten des filamentösen Aktins, deren Zahl ab Konzentrationen von 10^{-6} M langsam zunimmt. Im niedrigen Millimolar-Bereich, wie er in den vorliegenden Experimenten verwandt wurde, ergibt sich eine Anzahl von 5-6 gebundenen Ionen und damit theoretisch eine vollständige Kompensation der – bei pH 7,6 – 11-fach negativen Ladung des G-Aktins. Mit der Kompensation einhergehend

findet den Berechnungen zufolge auch ein Wechsel der repulsiven Aktininteraktion hin zu einer attraktiven Wechselwirkung statt.

Untersuchungen durch *Tang und Janmey* an 3-dimensionalen Aktinringen mittels Lichtstreuung lieferten für Mg^{2+} eine für die Bündelung kritische Konzentration von $c_k = 27 \text{ mM}$, für Ca^{2+} $c_k = 20 \text{ mM}$ und für Mn^{2+} $c_k = 7 \text{ mM}$ [202]. In neueren Studien an *de novo* polymerisierten Filamenten trat hingegen schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen Bündelung auf [85]. Darüberhinaus berichtete bereits *Roos* im Jahre 2004 – nach Studien zum Bündelungsverhalten mit unterschiedlichen divalenten Kationen – von Vernetzungsreaktionen der präpolymerisierten Filamente bei $MgCl_2$ -Konzentrationen von 10 mM [175]. Beruhten seine Beobachtungen jedoch lediglich auf der qualitativen Interpretation fluoreszenzmikroskopischer Bilder, so war es nun unter Verwendung der mikrorheologischen Technik möglich, eine quantitative Analyse durchzuführen.

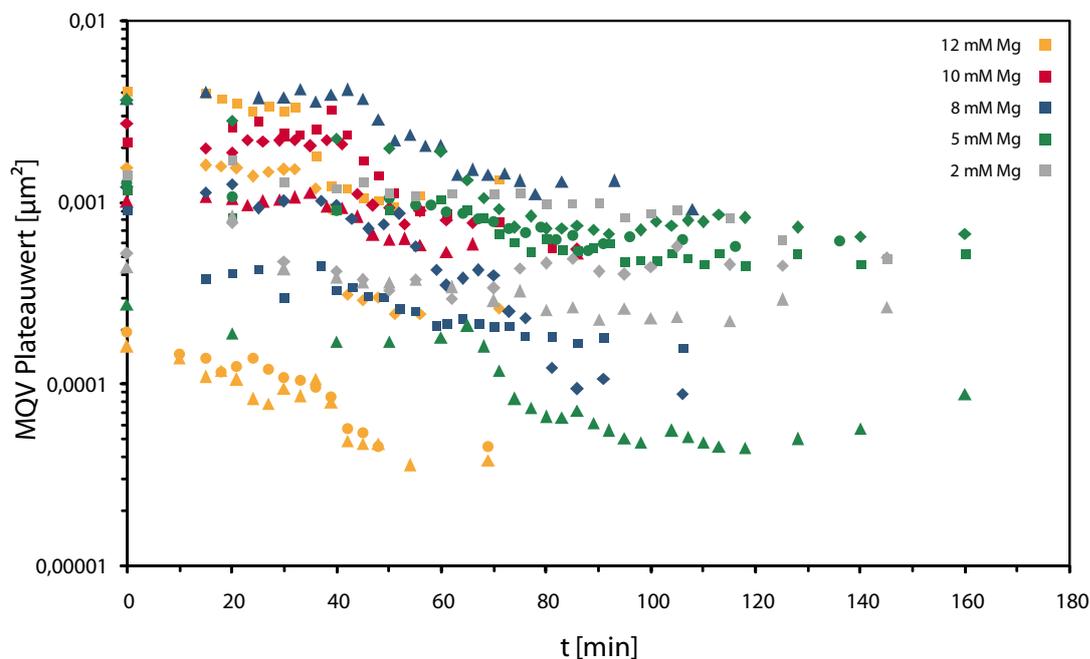


Abbildung 7.11: Zeitliche Entwicklung des MQV Plateauwertes unter Mg^{2+} induzierter Bündelung.

Dafür wurden bei Konzentrationen von 12, 10, 8, 5 und 2 mM Mg^{2+} in multiplen Experimenten Beobachtungen der Filamentbewegungen durchgeführt. Die Lösungen wurden bei übereinstimmenden Schlauchlängen von $19,5 \pm 0,3 \text{ cm}$ in allen Fällen mit einer Pumpgeschwindigkeit von $0,4 \mu\text{l}/\text{min}$ injiziert (vgl. Abschnitt 5.4.1). Daraus folgte für die Lösung bis zum Erreichen der Flusszellenkammer eine Dauer von $34,3 \pm 0,4 \text{ min}$. Messungen zur tatsächlichen Flussgeschwindigkeit ergaben jedoch Abweichungen von $48,3 \pm 0,4 \%$ zur Herstellerangabe und ein Erreichen der Flusszelle bereits nach $16,7 \text{ pm } 0,2 \text{ min}$. Die Änderungen im Plateauwert der MQV sind in Abbildung 7.11 wiedergegeben. Bei stark variierenden Anfangswerten zeichnen sich alle Kurven

bei Konzentrationen über 2 mM durch Plateaubereiche zu Beginn und Ende der Messungen aus. Neben unterschiedlich langen Plateauwerten zu Beginn der Messungen weisen die Abfälle der Kurven dabei auch unterschiedliche Amplituden und Steigungen auf, was vermutlich auf die Anfangskonfiguration der Filamente zurückzuführen ist. Kommt es in einigen Fällen zunächst zu einer schwachen Abnahme, so kann dies auf Verringerung der Abstoßung und somit Versteifung von Filamenten zurückgeführt werden, die bereits in ihrer Ausgangslage aufgrund der Partikelanheftung in engem Kontakt miteinander stehen. Starke Sprünge deuten hingegen auf die ionengeforderte Anlagerung zusätzlicher Filamente und einsetzender Zipping-Prozesse hin.

Um einen besseren Vergleich der Daten zu ermöglichen wurden die Kurven entsprechend $(MQV_i - MQV_{min}) / (MQV_0 - MQV_{min})$ auf die Differenz zwischen Anfangswerten und Endwerten einer Messreihe normiert. Bei den ersten Messungen einer jeden Datenreihe – vor Beginn der Magnesiuminjektion – handelte es sich um Langzeitmessungen über 300 s, deren Plateauwert der MQV aufgrund des unterschiedlichen Datenbereichs zum Teil von den folgenden, 50 s umfassenden Datenbereichen abwichen. Die Normierung wurde daher angepasst auf das Verhalten der ersten beiden Datenpunkte. Für Messungen bei 2 mM Mg^{2+} konnte im betrachteten Zeitraum aufgrund der Schwankung der Messwerte keine verlässliche Aussage über die Ausbildung eines Plateauwertes getroffen werden. Die Werte wurden daher nicht in die normierten Kurvenverläufe in Abbildung 7.12 mit einbezogen.

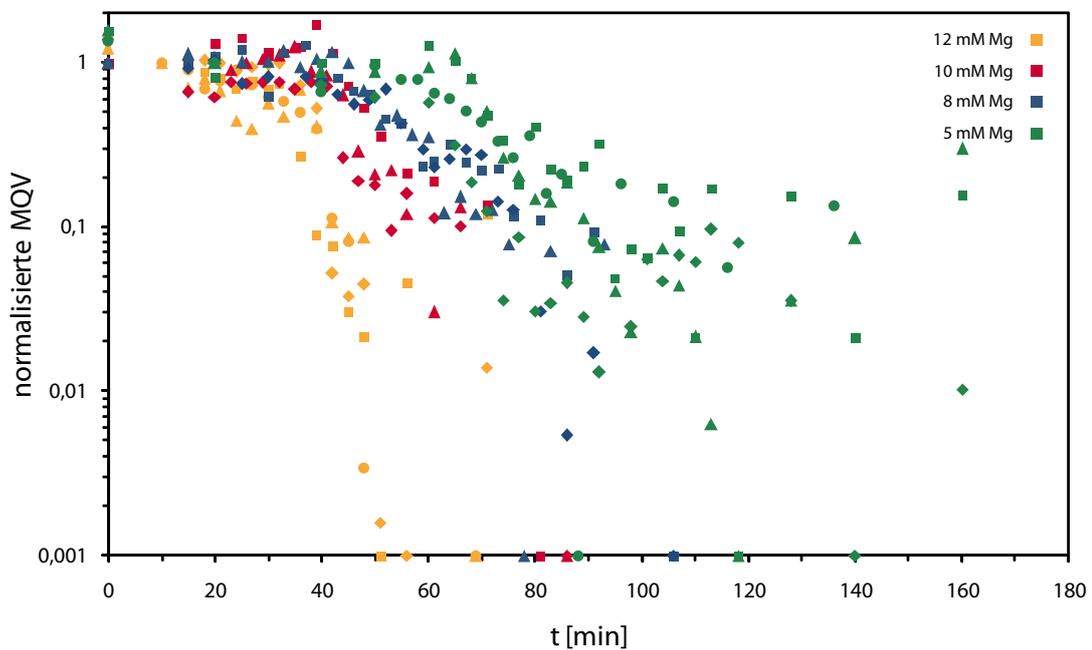


Abbildung 7.12: Normalisierte MQV Plateauwerte im zeitlichen Verlauf unter Mg^{2+} induzierter Bündelung.

Der bereits in Abbildung 7.11 zu unterschiedlichen Zeiten einsetzende Abfall des mittleren

Verschiebungsquadrates tritt in Folge der Normierung klar zu Tage. Mit sinkender Konzentration kommt es zu einer Verschiebung der Kurven hin zu höheren Zeiten. Findet für 12 mM Lösungen eine Abnahme der MQV bereits etwa 30 min nach Beginn der Lösungszufuhr statt, so tritt dieser bei 5 mM erst nach circa 60 min ein. Die Differenz der beiden Zeiten liegt auch nach Abzug der für den Einspülprozess benötigten Dauer von circa 17 min mit einem Faktor 3-4 höher, als es die Konzentrationsdifferenz im Falle einer linearen Abhängigkeit erwarten ließe. Grund dafür ist möglicherweise die Tatsache von unterschiedlich stark gebundenen Kationen entlang der Filamente, die im jeweiligen Fall zu differierenden Konzentrationsabhängigkeiten führen [230].

7.3.2 Langzeitverhalten bei Entzug der Mg^{2+} -Bündelungsreagenz

Die beobachtete Bündelung von Aktinfilamenten, selbst im einstelligen Millimolarbereich, hat die Frage zur Folge über welche Langzeitstabilität die geknüpfte Verbindung verfügt. Hierfür wurden Experimente an gerichteten Aktinstrukturen durchgeführt, bei denen – im Anschluss an Vernetzung mit Mg^{2+} – über einen Zeitraum von 3 h ein magnesiumfreier, EDTA haltiger Entzugspuffer durch die Flusszelle geleitet wurde.

Abbildung 7.13 stellt den Verlauf der MQV und viskoelastischen Moduln für einen ausgewählten Partikel (# 2 in Abbildung 7.14) vor (a), nach Bündelung durch 12 mM Mg^{2+} (b) und nach Magnesiumentzug (c) dar. Es zeigen sich im Zuge der Bündelung die bereits bekannten Kurvenverläufe mit einer Verringerung des MQV-Plateauwertes um eine Größenordnung und der Verschiebung der Kreuzungsfrequenz hin zu höheren Frequenzen. Auch nach Spülung mit der EDTA-Lösung verblieb die Beweglichkeit des Partikels auf dem selben Niveau wie zuvor. Kreuzungsfrequenz und Minima in $G''(\omega)$ zeigen den selben Wert und die selbe Ausprägtheit. Das bedeutet, dass über den gesamten Zeitraum hinweg nicht nur eine Konservierung der Struktur sondern auch die der viskoelastischen Eigenschaften stattgefunden hat. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die für die Veränderung der viskoelastischen Parameter verantwortliche Gegenionenkopplung noch immer wirksam ist.

Abbildung 7.14 zeigt die ermittelten MQV-Plateauwerte aller beobachteten Probenpartikel. In 68 % der beobachteten Fälle kam es zu keiner oder nur zu einer geringen Veränderung – sowohl in positiver als auch negativer Richtung – des MQV-Plateauwertes gegenüber dem Bündelungszustand in $MgCl_2$ Gegenwart. In 25 % kam es zu einem signifikanten Wiederanstieg über den aus vorangehenden Messungen bekannten Schwankungsbereich hinaus. Lediglich in einem Fall lag der Wert nach Abschluss des Experimentes über dem anfänglichen Plateauwert der ungebündelten Filamente. Dies ist insofern beachtlich, als dass die Filamente im Laufe der 10-12 h dauernden Experimente über einen Zeitraum von 6-7 h fließenden wechselnder Lösungen ausgesetzt waren und mehrfach Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt wurden. Hohe Laserstärken können in wässriger Lösung zur Bildung von Radikalen führen, welche nicht nur einen ausbleichenden Effekt auf den Fluoreszenzfarbstoff besitzen, sondern auch Schäden an der Proteinstruktur der Filamente

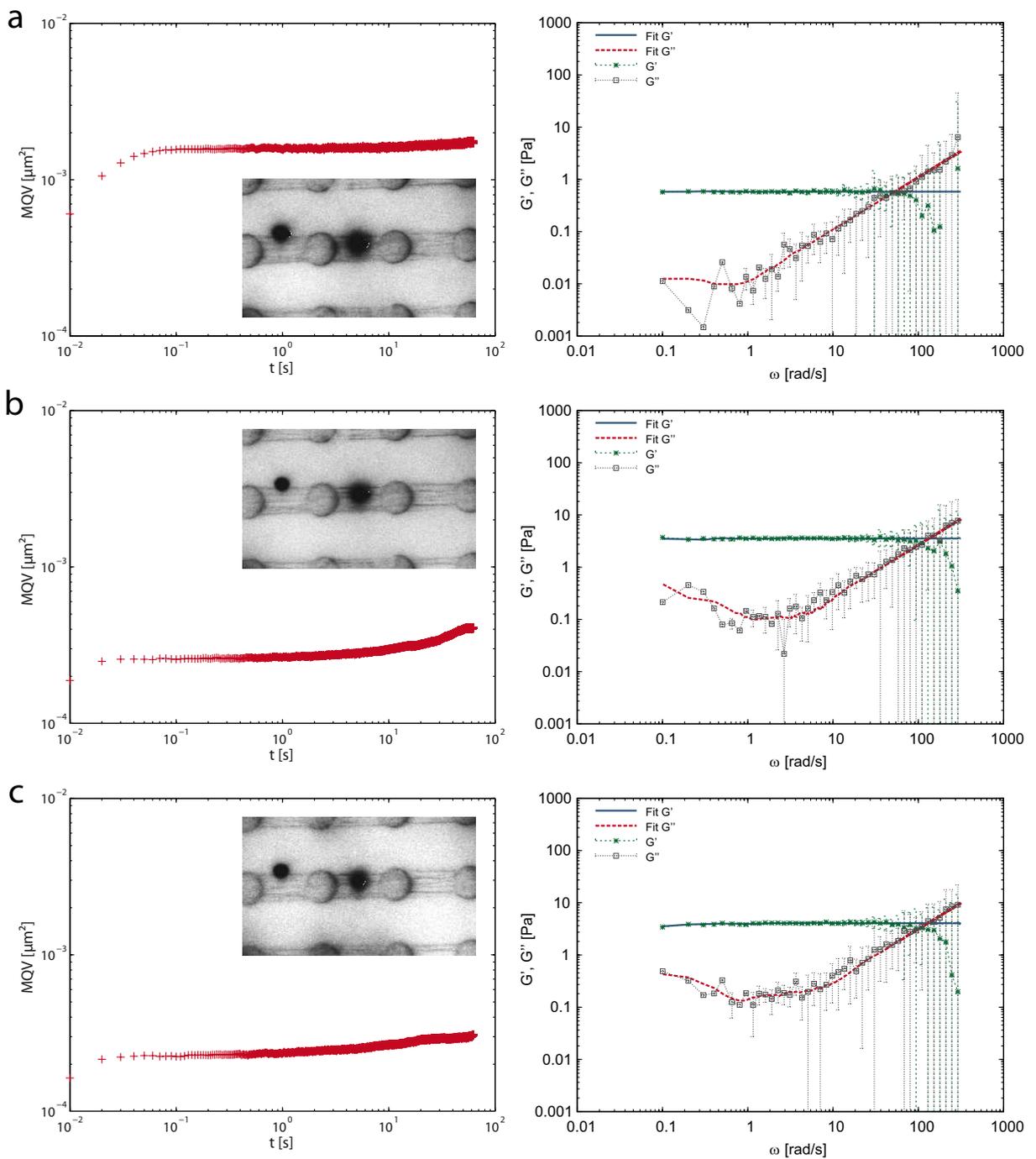


Abbildung 7.13: Mittlere quadratische Verschiebung und viskoelastische Moduln, vor (a) und nach MgCl_2 -Zugabe (b), sowie nach 3-stündiger Spülung mit magnesiumentziehendem EDTA-Puffer (c). Während es durch magnesiuminduzierte Bündelung zu einer starken Absenkung des MQV-Verlaufs sowie einer Änderung des viskoelastischen Verhaltens kommt, so zeigt das System nach EDTA-Spülung keine Veränderung gegenüber dem vernetzten Zustand.

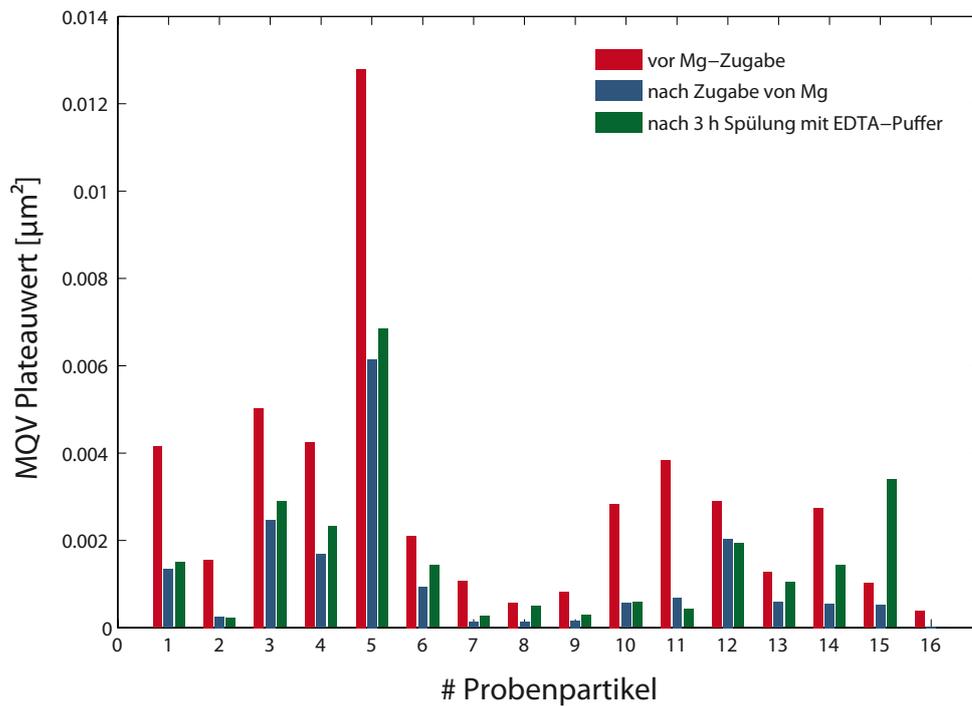


Abbildung 7.14: Plateauwerte der MQV vor und nach $MgCl_2$ -Zugabe, sowie nach 3-stündiger Spülung mit magnesiumentziehendem EDTA-Puffer.

– bis hin zum Bruch der Aktinstränge – hervorrufen können [34]. Aufgrund der hohen Fluoreszenz der Partikel waren Aussagen zur Veränderung der Netzwerkstruktur in deren Umgebung nicht möglich. Es war daher nicht quantifizierbar, inwieweit Wiederanstiege der MQV auf Degeneration der Aktinfilamente zurückzuführen sind.

Insgesamt zeigten die gebündelten Aktinstrukturen eine hohe Resistenz gegen den Versuch des Ionenentzugs durch EDTA, was auf eine starke Bindung der kondensierten Ionen an streng lokalisierten Punkten der Filamente hindeutet.

KAPITEL 8

Aktin-Membran-Komplex

In vitro Modellsysteme erlauben unter kontrollierten Bedingungen eine Untersuchung der biomolekularen Eigenschaften supramolekularer Strukturen unabhängig von der Zellumgebung. Bei Interpretation der Resultate hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz ist es jedoch wichtig, die Komplexität des Zellaufbaus zu berücksichtigen und die Wechselwirkung der beobachteten Elemente mit anderen Zellkomponenten schrittweise zu ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Nachbildung des zelleigenen Aktin-Membran Komplexes mittels einer Weiterentwicklung des Aktinnetzwerkes auf PDMS-Säulensubstraten durch Kombination mit Lipiddoppelschichten angestrebt und erreicht.

Da die Konzeption der bislang verwendeten Flusszelle, mit ihren von der Decke herabhängenden PDMS-Säulen, keine Möglichkeit zur Membranabscheidung bot wurde ein neues, wahlweise offen oder geschlossen betreibbares Mikrofluidiksystem – wie in Abschnitt 5.5 beschrieben – entwickelt. Als Grundlage für den Aufbau von Aktinnetzwerk und Membranen wurden Mikrogitter aus Gold gewählt, wie sie in der Transmissionselektronenmikroskopie Anwendung finden. Mit minimalen Lochgrößen von $6,5\ \mu\text{m}$ und höher liegen die Räume zwischen den Gitterstegen im selben Größenbereich wie die üblicherweise für die Aktinanlagerung verwendeten Säulenabstände. Im Gegensatz zu existierenden Modellsystemen, basierend auf unterstützten Lipiddoppelschichten oder Liposomen (siehe auch Abschnitt 2.5, Modellsysteme), bietet das so entwickelte System Zugang sowohl zum Filamentnetzwerk als auch den Membranen.

Neben des Aufbaus von Aktinnetzwerken auf den neuartigen Substraten wurden zur Generierung freitragender Lipiddoppelschichten im Vorfeld insbesondere das Ausbreitungsverhalten von Riesenvesikeln auf beschichteten und funktionalisierten Glassubstraten intensiv studiert. Durch Übertragung der Erkenntnisse auf die TEM-Netze wurde es möglich, zusammenhängende Membranstrukturen von bis zu $200\ \mu\text{m}$ Durchmesser bei $10,5\ \mu\text{m}$ messenden Lochgrößen auszubilden. Um schließlich ein kombiniertes System zu schaffen wurde sowohl die Ausbreitung von Membranen auf Aktinnetzwerken, als auch die Abscheidung von Filamenten auf existierenden Lipiddoppelschichten durchgeführt.

8.1 Aktin-Netzwerk Erzeugung auf Lochstrukturen

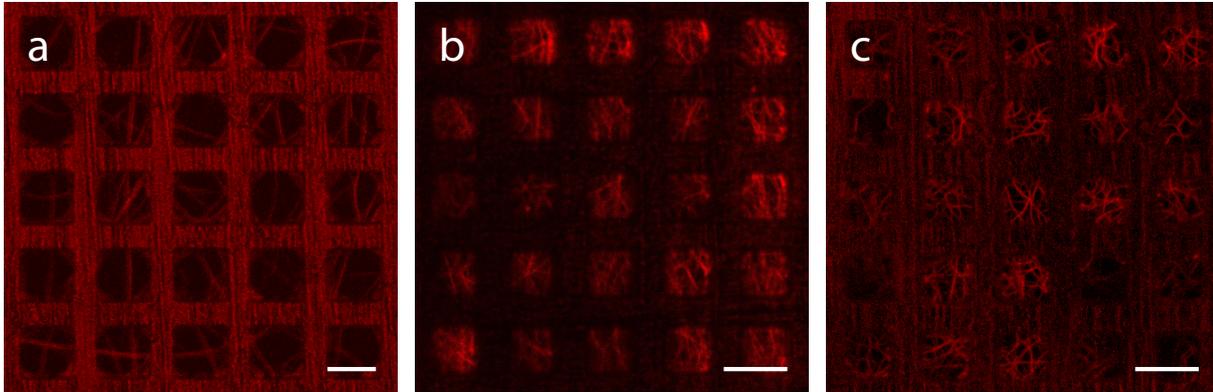


Abbildung 8.1: Magnesiumvernetzte Aktinnetzwerke auf unterschiedlich funktionalisierten und beschichteten Gittern: Auf AUT-Streptavidin funktionalisiertem 10,5 µm Au-Gitter (a), APTEs funktionalisiertem 6,5 µm SiN-Gitter (b) und DETA funktionalisiertem 6,5 µm SiN-Gitter (c). Maßstab: 10 µm.

Für die Erzeugung von Aktinnetzwerken auf Gittersubstraten wurden zwei unterschiedliche Konzepte erprobt. Zum einen – äquivalent zur Erzeugung von Netzwerken auf PDMS-Säulensubstraten – die Ankeftung mittels auf den Oberflächen adsorbierter Proteine wie HMM und Streptavidin, zum anderen die elektrostatische Anbindung über eine Funktionalisierung der TEM-Netzchen mittels AUT, APTEs und DETA.

Für die Proteinbeschichtung wurden Au-Gitter bei RT für 1 h in einer 5 µM HMM- oder 8 nM Streptavidin-Lösung (# 85878; *Sigma-Aldrich, Deutschland*) in Verdünnungspuffer inkubiert und anschließend gründlich mit reinem Verdünnungspuffer gespült. Zum Schutz der Proteinstruktur wurden sie bis zur folgenden Montage in Verdünnungspuffer gelagert. Die Funktionalisierung mit AUT, APTEs und DETA sowie die Montage wurde wie in Abschnitt 5.5 beschrieben durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde anschließend der untere Flusskanal mit Verdünnungspuffer gefüllt, bis die Lösung durch das Gitter drückte. Dabei war darauf zu achten, dass sich unter dem Gitter beziehungsweise zwischen den Stegen keine Luftblasen festsetzten. Diese besaßen zwar keinen bestimmbareren Einfluss auf den Netzwerkaufbau, jedoch behinderten sie durch Lichtbrechung die Mikroskopie und schränkten die Manipulation der Filamente ein. Vor dem Aufbringen der Aktinlösung wurde überschüssiger Puffer oberhalb des TEM-Netzes vollständig abpipettiert. Nach Montage in der Flusszelle und Spülung wurden 100-200 µl 1:5-1:20 verdünnter F-Aktin Lösung aufpipettiert und 30 min ruhen gelassen. Überschüssiges Aktin wurde durch Austausch der Lösung mit Verdünnungspuffer abgespült ($2 \times 200 \mu\text{l}$) und Verbleibendes durch Zugabe von 50 µl einer 100 mM MgCl_2 -Lösung vernetzt.

Abbildungen 8.1 – 8.3 zeigen ausgewählte Fluoreszenzaufnahmen von Netzwerken auf unterschiedlich funktionalisierten und beschichteten Substraten, Tabelle 8.1 am Ende des Kapitels gibt

einen Überblick über die erfolgten Experimente und deren Resultate. Differenzen in der Netzwerkdichte ließen sich nicht auf unterschiedliche Substratbehandlungen zurückführen, sondern variierten entsprechend der Filamentkonzentration der aufpipettierten Lösung stark. Aufgrund der Tatsache, dass hochkonzentrierte Aktinlösungen wegen der Filamentverschränkung sich nur langsam durch Diffusion verdünnen, konnten – anders als auf Säulensubstraten – spezifische Netzwerkdichten nur in groben Bereichen reproduziert werden. Bei Abbildung 8.1 (a) & (c) handelt es sich um Abscheidungen von 1 : 20 verdünnter Polymerisationslösungen, im Falle von (b) wurde die Ausgangslösung lediglich 1 : 10 verdünnt. Während es so möglich war, über Gitter mit 6,5 und 10,5 μm Lochgröße Netzwerke zu etablieren, konnte dies bei 19,5 μm Größe nicht erreicht werden (vgl. Abbildung 8.2). Aufgrund der stochastischen Anordnung und durchschnittlicher Längen von 10- 30 μm waren in diesem Fall nur wenige Filamente in der Lage die Entfernungen zwischen zweier Stege zu überbrücken. Während vor Spülung und Vernetzung (Abbildung 8.2 (a)) die Aktinlösung verstärkt oberhalb des Gitters lokalisiert war kam es danach zu einer Anlagerung der Filamente auch an den Stegwänden und Unterseiten (erkennbar an der verstärkten Fluoreszenz in Abbildung 8.2 (b)).

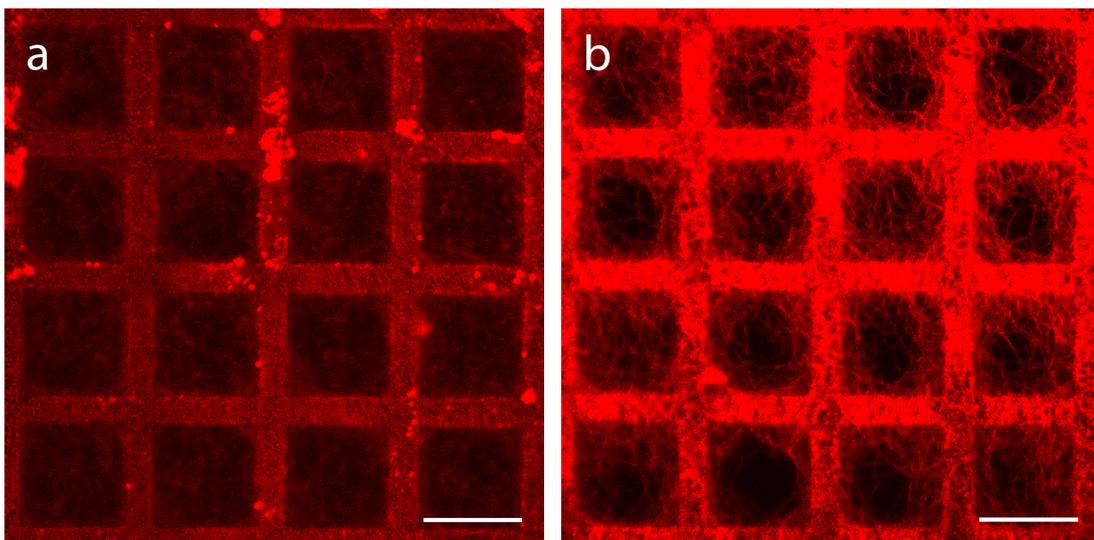


Abbildung 8.2: Aktinnetzwerk auf AUT funktionalisiertem 19,5 μm Au-Gitter. Unvernetzt und ungespült (a) und durch Magnesiumzugabe vernetzt (b). Maßstab: 20 μm .

Im Falle besonders dichter Strukturen, wie das durch Zugabe einer 1 : 5 verdünnten Polymerisationslösung entstandene Netz in Abbildung 8.3, ließen sich die Aktin-Netzwerke im z-Querschnitt lokalisieren. Die Abbildung zeigt ein auf mit Streptavidin funktionalisiertem Au-Gitter mit 10,5 μm Lochgröße erzeugtes Aktinnetzwerk. Es ist ersichtlich, dass der Abstand zwischen den Intensitätsmaxima von Gitter (hervorgerufen durch nichtgefilterte Reflexion des Anregungs-Laserlichtes an der Gitterunterseite) und Fluoreszenzsignal des Aktins (Abbildung 8.3 (b), gestrichelte Linien) $8 \pm 1 \mu\text{m}$ beträgt. Dies liegt etwas über der vom Hersteller angegebenen Dicke des TEM-Netzes

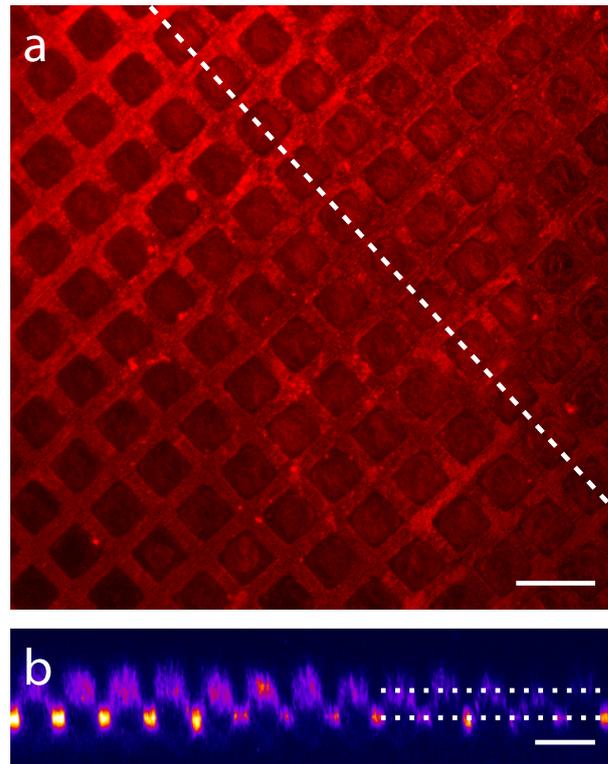


Abbildung 8.3: Projektion (a) und Querschnitt (b) eines kompakten Aktinnetzwerkes auf mit Streptavidin funktionalisiertem Au-Gitter. Das Netzwerk besitzt eine Dicke von $5 \pm 1 \mu\text{m}$ und ist auf der Oberfläche des Gitters lokalisiert. Maßstab: $20 \mu\text{m}$.

von $6 \mu\text{m}$, woraus sich schließen lässt, dass das Netzwerk auf der Gitteroberseite lokalisiert ist. Aus den Fluoreszenzaufnahmen und dem daraus resultierenden Querschnitt lassen sich keine Hinweise darauf ziehen, dass das Aktin in die Bereiche zwischen den Stegen vorgedrungen ist. Die Dicke des Aktinnetzwerkes lässt sich auf $5 \pm 1 \mu\text{m}$ abschätzen, was der hohen Konzentration der aufpipettierten Aktinlösung zu schulden war. Bei geringeren Aktinkonzentrationen respektive Netzwerkdichten lagen die Dicken darunter.

8.2 Ausbreitung von Vesikeln auf beschichteten und funktionalisierten Glassubstraten

Zum Studium der Membranabscheidung durch GUVs wurden Glassubstrate wie in Abschnitt 5.5.2 erläutert vorbereitet. Dabei wurden Lipidmischungen mit variierenden Anteilen an EPA ($5-10 \pm 1 \%$) und BioCAP ($5-10 \pm 1 \%$) in EPC und CF-PEG ($0,1 \pm 0,1 \%$) erprobt. Hinsichtlich des Ausbreitungsverhaltens oder dem Bedeckungsgrad konnten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen minimalem und maximalem Anteil der einzelnen Komponenten festgestellt werden. Die erzeugten Vesikelmischungen wurden 1:5 in E-Puffer verdünnt und auf die Substrate pipettiert.

Zur Vermeidung von Scherspannungen, welche einen Bruch der Vesikel herbeiführen können, wurden die Spitzen der Pipetten in allen Fällen gekürzt und dadurch der Öffnungsdurchmesser erhöht. Aufgrund der geringfügigen Durchlässigkeit von Lipidmembranen für kleine Dipolmoleküle wie Wasser kommt es bei der Verdünnung zu einem Ausgleich der osmotischen Druckverhältnisse zwischen Innen- und Außenraum der Vesikel [116]. Dies führt zu einem Anschwellen der GUVs und zu einer Beförderung der Ausbreitung zusätzlich zur elektrostatischen Interaktion zwischen Oberflächenfunktionalisierung und Vesikelladung.

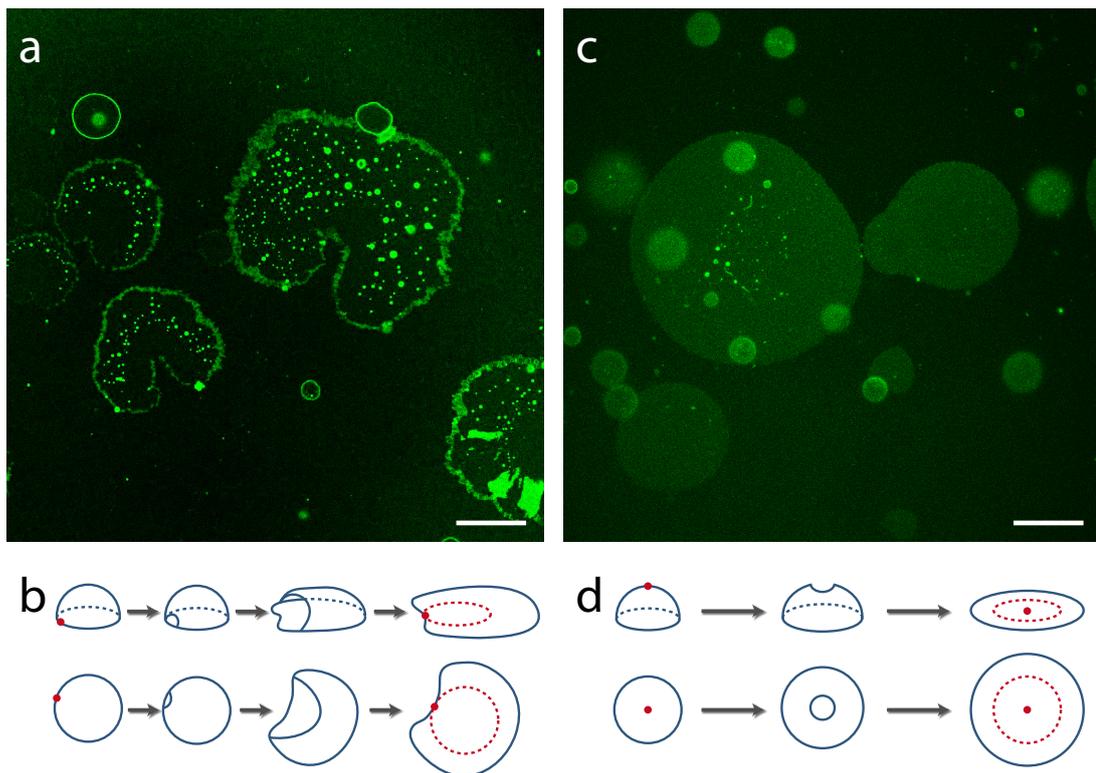


Abbildung 8.4: Ausbreitungsverhalten von GUVs auf thiolierem Gold (a) und silanisierem Glas (c). Abhängig von der Funktionalisierung kommt es auf der Au- und der Glasoberfläche zu mehrheitlich unterschiedlich geformten Lipiddoppelschichten. Herzförmige Strukturen (a) sind dabei auf einen Bruch am Kontaktbereich zwischen Vesikel und Substrat zurückzuführen (b) während kreisförmige Strukturen durch ein Aufbrechen am Zenit des Vesikels entstehen (d). Maßstab: 20 μm . (Schema adaptiert von [72].)

Abbildung 8.4 zeigt beispielhaft durch Vesikelausbreitung erzeugte Strukturen auf AUT funktionalisierter Gold- und DETA funktionalisierter Glasoberfläche. Bei den Untersuchungen kam es gegenüber den Glassubstraten auf den Goldoberflächen verstärkt zum Abschnüren kleiner Vesikel und dem Auftreten von herzförmigen Membranstrukturen, einem Effekt wie er von *Hamai et al.* beschrieben wurde [72]. *Hamai et al.* untersuchten das Ausbreitungsverhalten von 10 %ig positiv geladener GUVs auf unfunktionalisierten, und daher bei neutralem pH-Wert negativ

geladenen Glassubstraten, wobei sie in der Lage waren zwei unterschiedliche, in Abbildung 8.4 (b) und (d) dargestellte, Pfade für das Brechen und Ausbreiten der Liposomen zu isolieren. In der Mehrheit der Fälle kam es dabei zu einem Bruch (roter Punkt) am Rande der Adhäsionszone (roter Kreis), nahe zum oder in Kontakt mit dem Substrat (b). Davon ausgehend setzte sich die asymmetrische Ausbreitung halbkreisförmig fort, bis die gesamte Vesikelmembran offen ausgebreitet war, was zu der charakteristischen Form führte. In selteneren Fällen konnten dort kreisförmig ausgebildete Membranen beobachtet werden, die konsistent waren mit einem Reißen der Vesikelmembran am oder in der Nähe des Scheitelpunktes des adhären Liposomen (d).

Eine Begründung für das unterschiedliche Verhalten liegt möglicherweise in der geringen Oberflächenladungsdichte der unfunktionalisierten Glassubstrate begründet. Die daraus ausgeübte Adhäsionskraft reichte nur in Einzelfällen aus um einen Bruch in der Vesikelmembran zu induzieren. Variationen in der Dichte der Oberflächenladung, Fehlstellen in der Substratschicht oder präadsorbierte Lipide führen jedoch bei Adhäsion eines Vesikels zu einer energetischen Instabilität der Lipiddoppelschicht und können so einen Bruch an der Kontaktstelle herbeiführen. Im Falle einer radialsymmetrisch homogen verteilten Adhäsionsenergie nimmt die Spannung hingegen gleichmäßig zu, so dass ein Bruch im Spannungszentrum – d.h. am Scheitelpunkt – wahrscheinlich ist. Die Tatsache, dass die von *Hamai et al.* als Ausnahme beschriebene Variante (d) bei den vorliegenden Experimenten auf funktionalisierten Glassubstraten die Regel zu sein scheint, spricht für eine hohe Oberflächenladung und eine Verknüpfung der Silane untereinander zu einer homogenen Schicht; eine Eigenschaft, welche der zur Au-Funktionalisierung verwendete Aminoundecanthiol nicht aufweist. Während die auf große Bereiche gesehen homogene Thiolierung ausreicht, um für eine Adhäsion der Vesikel und eine fehlerstelleninduzierte Membranausbildung zu sorgen, bewirkt die von Natur aus hydrophobe Oberfläche des Goldes bei einer nicht deckenden Funktionalisierung einen lokal repulsiven Effekt, der zur Abschnürung der beobachteten kleinen Vesikel führen kann.

Tatsächlich war es in Anfangsexperimenten nicht möglich freitragende Membranstrukturen auf AUT funktionalisierten Au-Gittern zu erschaffen, weshalb das Hauptaugenmerk im Folgenden auf die Erzeugung von Membranen auf silanisierten Substraten gelegt wurde.

DETA funktionalisierte Oberflächen weisen bei neutralem pH-Wert gegenüber mit APTES behandelten Substraten ein höheres positives Potential auf. Untersuchungen durch *Metwalli et al.* mittels Raman-Spektroskopie bewiesen im Falle von DETA die Existenz von $-NH^+$, $-NH_2^+$ und $-NH_3^+$ Gruppen, wodurch sich die höhere Oberflächenladung auf die zusätzlich vorhandenen Aminogruppen zurückführen ließ (vergleiche auch Abschnitt 5.5.2) [136]. Wie von *Cha et al.* für neutrale SUV gezeigt, besitzt die Ladungsdichte der Substratoberfläche einen großen Einfluss auf das Ausbreitungsverhalten von Vesikeln [24]. Erst oberhalb einer gewissen Ladungsdichte kam es zum Bruch adsorbierter SUVs, unabhängig vom Vorzeichen der Substratladung.

Entscheidend für die Verformung der Vesikel und damit der Ausbildung von unterstützten Lipid-

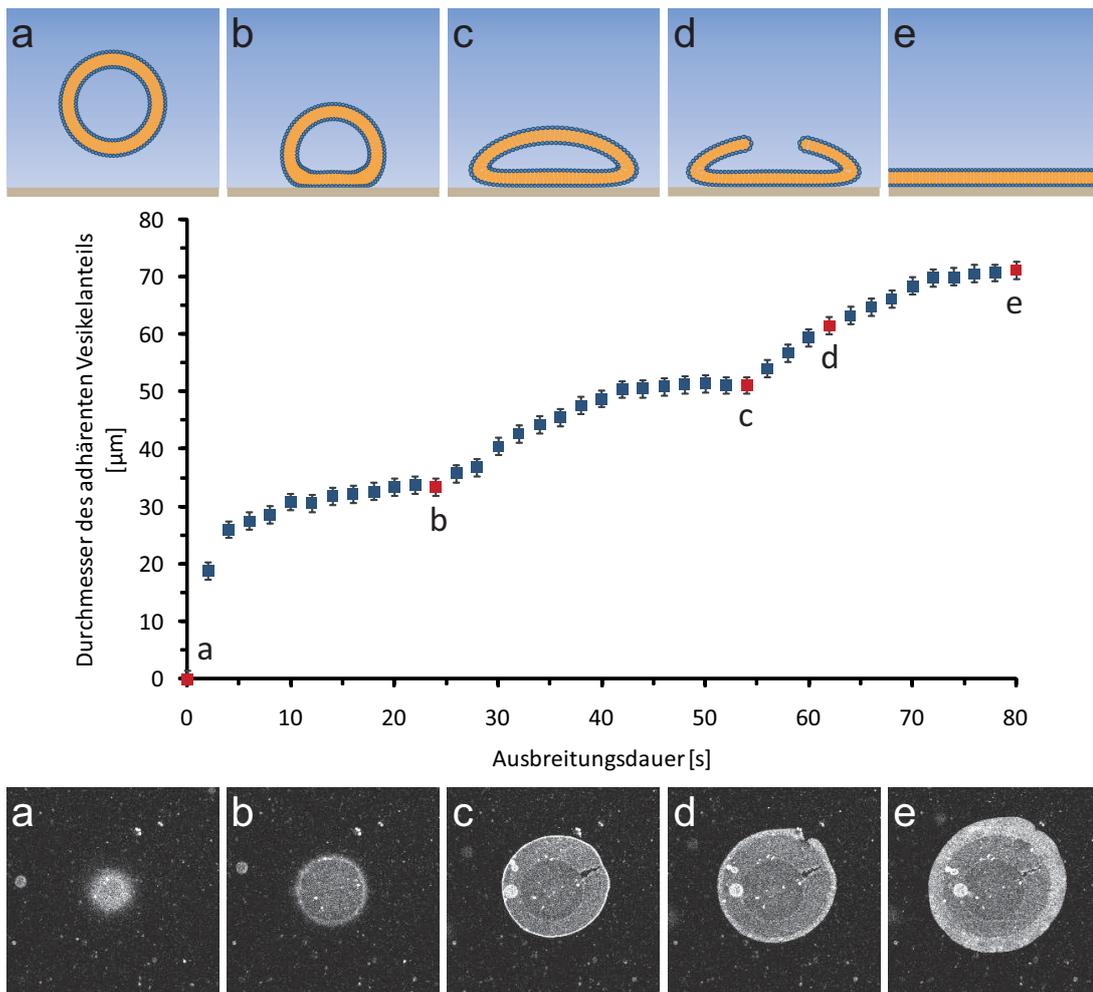


Abbildung 8.5: Ausbreitung negativ geladener Vesikel auf DETA. Der Ausbreitungsprozess lässt sich in 3 Phasen unterteilen: die Adhäsion des Vesikels (a, b), die Ausbreitung und damit einhergehende Abflachung (c) sowie die Ruptur (d) mit daraus resultierender Lipiddoppelschicht (e).

doppelschichten ist das Verhältnis zwischen dem Gewinn an Adhäsionsenergie durch Vergrößerung des Adhäsionsbereiches und dem Aufwand an Krümmungsenergie aufgrund der Biegesteifigkeit der Vesikelmembran und Lipide [117]. Dabei sind die Ränder der unterstützten Membranen energetisch besonders ungünstig, was zu einer hohen Affinität zu benachbartem Lipidmaterial führt und befördernd auf den Bruch anliegender Vesikel und die Ausbildung geschlossener Membranbereiche [173] wirkt.

Während es in den allermeisten Fällen wahlweise zu einer instantanen, mit dem LSM nicht auflösbaren, Ausbreitung oder aber einer stabilen Adhäsion der Vesikel kam, konnte in Einzelfällen, wie in Abbildung 8.5 auf DETA silanisierendem Glas gezeigt, der Adhäsions- und Ausbreitungsprozess in unterschiedliche Stadien aufgelöst beobachtet werden.

Direkt nach Kontaktaufnahme (a) des Vesikels mit dem Substrat kam es zu einem schnellen Anstieg der adhärennten Fläche. Unter Annahme einer einzelnen, deckenden Lipiddoppelschicht mit einem Enddurchmesser (e) von $71,2 \pm 1,5 \mu\text{m}$ war die bedeckte Fläche von $3980 \pm 170 \mu\text{m}^2$ der Oberfläche eines Vesikels mit Radius von $17,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ äquivalent. Daraus folgt, dass die adhärennte Fläche zum Zeitpunkt (b) von $880 \pm 80 \mu\text{m}^2$ bzw. $33,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$ Durchmesser nahezu dem Querschnitt des ursprünglichen Vesikels entsprochen haben muss. Der erreichte Zustand war dabei latent stabil und entsprach vermutlich einem von zwei allgemeinen Zuständen adhärennter Vesikel. Ist die Ladungsdichte und die damit verbundene Interaktionskraft hoch genug kommt es wie hier zu einer weitergehenden Abflachung und Deformation des Vesikels einhergehend mit einer Zunahme der Adhäsionsfläche auf $2050 \pm 120 \mu\text{m}^2$ (c) was ungefähr der Hälfte der Endfläche entspricht, einem Wert in Übereinstimmung mit den theoretischen Erwartungen [48].

Auch dieser Zustand scheint latent stabil zu sein, allerdings stand die GUV-Membran nun unter hoher innerer Spannung. Eine weitere Ausbreitung war nur noch durch einen Bruch des Vesikels möglich (d), welcher schlussendlich zu einer voll ausgebildeten Lipiddoppelschicht führte (e).

8.3 Membranerzeugung auf Lochstrukturen

Resultierend aus den Untersuchungen zum Ausbreitungsverhalten von GUVs auf funktionalisierten Au-, Ti- und Glassubstraten wurden Versuche zur Membranerzeugung beschränkt auf Ti und SiN beschichtete Netze. Die Schlussfolgerung steht damit in Einklang mit einem im Laufe der Untersuchung veröffentlichten Artikel zur Erzeugung freistehender Lipiddoppelschichten auf TEM-Membranen durch *Heinemann et al.* [80]. Als Substrat dienten dabei kommerziell erhältliche, 200 nm dicke SiN-Membranen mit Löchern von $2,5 \mu\text{m}$ Durchmesser. Die geringe Lochgröße stellt eine große Hürde für Untersuchungen passiver oder aktiver Art, wie z.B. der Mikrorheologie, dar und schränkt die verwendeten Gitter als Grundlage für die Erzeugung eines Aktin-Membran-Komplexes von vorneherein stark ein.

Die Vorbereitung und Montage der Gittersubstrate erfolgte wie in Abschnitt 5.5.2 beschrieben. Vor Aufpipettierung der 1:3-1:5 in E-Puffer verdünnten Vesikellösung wurden die Flusszellen mit reinem E-Puffer gespült und überschüssige Lösung von der Gitteroberseite entfernt.

Abbildung 8.6 zeigt die Ausbildung freistehender Membranen auf einem 9:1 APTES/DETA funktionalisierten SiN-Gitter mit – laut Herstellerangabe – $6,5 \mu\text{m}$ messenden Löchern (real: $7,5 \pm 0,25 \mu\text{m}$). Nach Sedimentation des Vesikels (a), was je nach Größe circa 10-100 s benötigte, kam es zur Adhäsion und Ausbreitung entlang der Gitterstege (b-f). Wie die gelben Pfeile indizieren konnte es bereits während des Adhäsionsvorganges zum Bruch von Membranen über einzelnen Gitterhohlräumen kommen. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die gegenüber den Glassubstraten deutlich aufgeraute Oberfläche der Au-Gitter, die auch nach Beschichtung mit Ti

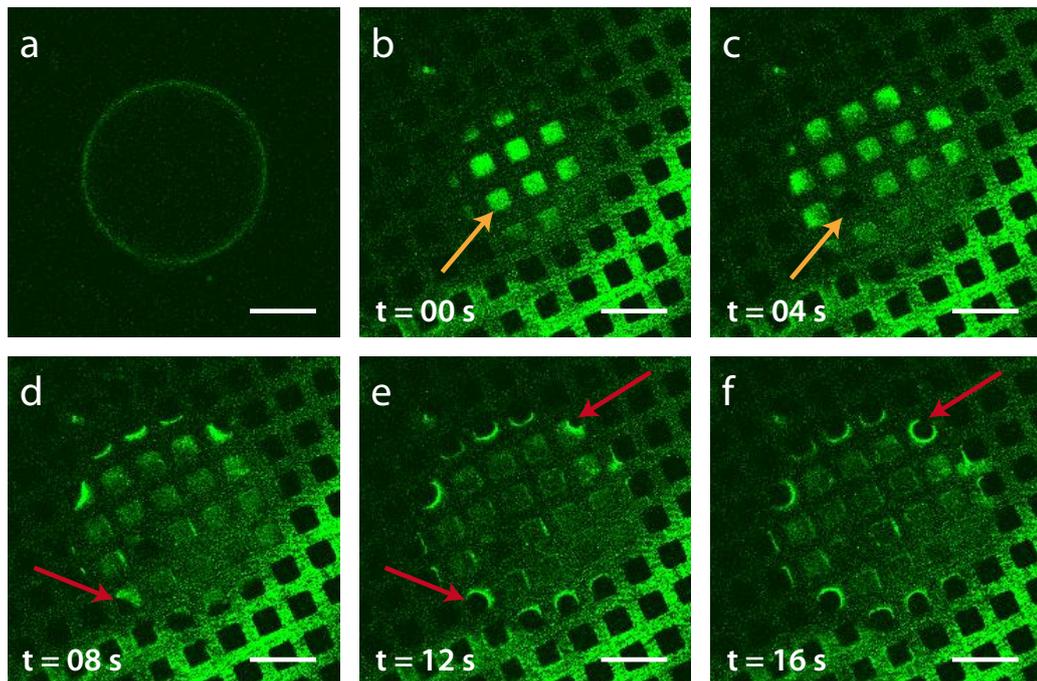


Abbildung 8.6: Vesikel (a) und Vesikelausbreitung (b-f) auf APTES/DETA silanisiertem SiN-Gitter. Die Pfeile zeigen Kollabierende (gelb) sowie den Rückzug von Membranen (rot). Maßstab: 20 μm .

oder SiN noch zu Defekten in der Struktur führt. Der Kollaps hatte dabei jedoch keinen Einfluss auf Membranen benachbarter Löcher.

Nach Vollständiger Ausbreitung der Lipiddoppelschicht kam es zur Rückbildung einzelner Membranabschnitte (rote Pfeile). Während bei unterstützten Membranen die Adhäsionskraft der entscheidende Faktor ist, scheint bei freitragenden auch die daraus resultierende kinetische Energie des GUV-Bruches von großer Bedeutung für deren Ausbildung zu sein. In Bereichen, bei denen es mangels kinetischer Energie, respektive zu hoher innerer Membranspannung, nicht möglich ist die Hohlräume komplett zu überbrücken zieht sich der Membranrand auf eine energetisch günstige, invertierte Kreisform entlang der Stege zurück. Bei Bruch oder Rückbildung der Membranen kann es dabei auch zu einer Anlagerung des überschüssigen Lipidmaterials auf der Unterseite der Gitterstege kommen.

Im Regelfall konnte eine Ausbreitung der Mehrzahl der Vesikel sowohl auf APTES, als auch auf DETA funktionalisierten Gittern, unabhängig von der Beschichtung, beobachtet werden. Aufgrund der Lochstruktur ist die für die Vesikel zur Verfügung stehende Adhäsionsfläche gegenüber den Glassubstraten im Falle von 6,5 μm messenden Löchern um 27 % und im Falle von 10,5 μm großen Löchern gar um 40 % verringert. Damit einhergehend ist auch eine Reduktion der Adhäsionsenergie verbunden, was in einer verminderten Ausbreitungswahrscheinlichkeit gipfelt.

Damit die elektrostatische Interaktion zwischen dem positiv geladenen Silanfilm auf den Stegen und den negativ geladenen Kopfgruppen der EPA-Lipide eine ausreichend starke Abflachung der adhärennten Vesikel bewirkte, mussten die GUVs daher eine Größe von mehr als 30-40 μm aufweisen. Kleinere Vesikel tendierten dazu lediglich zu adhären oder sich in den Löchern anzulagern.

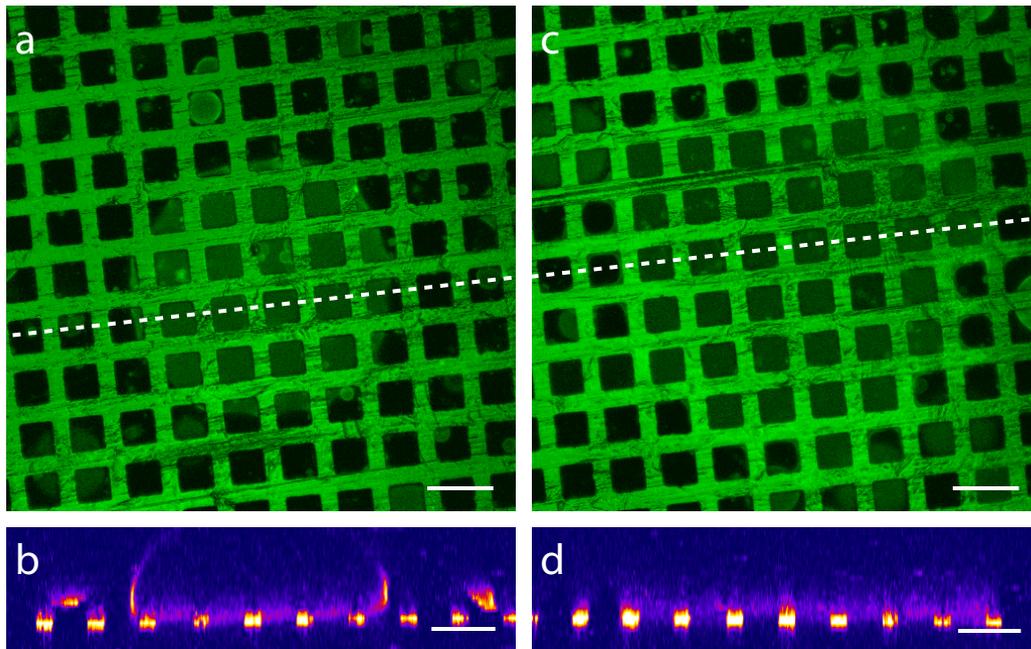


Abbildung 8.7: Vergleich zwischen Adhärentem (a, b) und ausgebreitetem Vesikel (c, d) auf 10,5 μm DETA-funktionalisiertem Ti-Gitter. Bei Fokussierung auf die Gitteroberfläche sind adhärennte Vesikel (a) oftmals nicht von ausgebreiteten Membranen (c) zu unterscheiden. Durch Fokussierung über das Grid oder Erstellung eines Querschnitts (b, d) lässt sich jedoch eine eindeutige Identifikation vornehmen. Maßstab: 20 μm .

Abbildung 8.7 zeigt den Vergleich zwischen einem adhärennten Vesikel (a, b) und einer ausgebreiteten Membran (c, d). Anhand der Querschnitte (b) und (d) ließ sich eine eindeutige Identifikation der Lipiddoppelschichten vornehmen. Dabei lässt die Form der Querschnittssektion (b) darauf schließen, dass sich der Vesikel in einem Zustand wie in Abbildung 8.5 (c) befand. Die Intensitätsmaxima der reflektierenden Gitterunterseite und der fluoreszierenden Lipide lassen zudem erkennen, dass – wie bereits im Falle des Aktinnetzwerkes auf TEM-Netzen – auch die Membranen auf der Oberseite lokalisiert waren.

Einen Beitrag zur Stabilität der freitragenden Lipiddoppelschichten liefert möglicherweise die Energie, welche nötig ist, um die Ränder der Membran abzuschließen. Ein Bruch in der Membran ließe zwar einen Energiegewinn durch Anlagerung der Lipide an die funktionalisierten Innenseiten der Gitterstege zu, wäre aber unweigerlich mit energetischen Kosten für die Krümmung der Lipide an den Membranabschlüssen verbunden (vergleiche auch Abschnitt 2.3.1). Generell zeigte

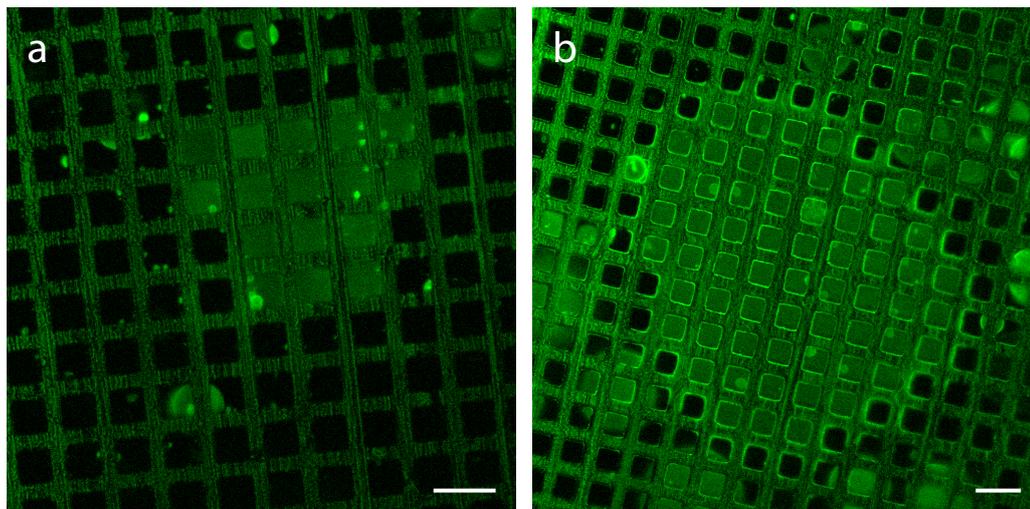


Abbildung 8.8: Einzelaufnahme von Membranen auf AUT funktionalisiertem Au-Gitter (a) und auf DETA funktionalisiertem SiN-Gitter (b). Durch die Vesikelausbreitung lassen sich zusammenhängende Membranbereiche mit bis zu 200 μm Durchmesser erzeugen. Maßstab: 20 μm .

sich jedoch, dass die Membranen weitaus empfindlicher für anschließende Spülvorgänge waren als die Filamentnetzwerke, kam es dabei doch mit zunehmender Häufigkeit zum Bruch einzelner Lochmembranen.

Abbildung 8.8 (a) zeigt eine freitragende Lipiddoppelschicht auf AUT funktionalisiertem Au-Gitter, deren erfolgreiche Ausbildung allerdings weitaus seltener war als auf silaniserten Ti- und SiN-Gittern (b). Darüberhinaus tendierten Membranen auf thiolierten Netzen ohne äußeren Einfluss zu brechen, wohingegen Membranen über silaniserten Stegen bei Vermeidung von Vibrationen über den gesamten Beobachtungszeitraum von bis zu anderthalb Stunden stabil blieben.

Generell zeigte sich ein deutlich verschlechtertes Ausbreitungsverhalten auf den Gittern – aber auch bereits eine Verschlechterung bei der Vesikelerzeugung – für alternde Lipidkompositionen. Wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben kann es durch Alterung oder unsachgemäße Handhabung zu einer Hydrolyse der Membranlipide kommen welche eine Verminderung der Membranstabilität mit sich führt. Die Verwendung möglichst frischer Lipidlösungen sowie die Gewährleistung einer ununterbrochenen Kühlkette war daher von entscheidender Bedeutung für den erfolgreichen Aufbau freitragender Lipiddoppelschichten.

Eine leichte Tendenz der Instabilität zeigte sich hinsichtlich der Lochgröße. Bei 10,5 μm messenden Öffnungen kam es während der Vesikelausbreitung häufiger zum Bruch einzelner Lochmembranen als bei 6,5 μm großen Hohlräumen. Experimente auf 19,5 μm auseinander liegenden Gitterstegen wurden – auch in Hinsicht auf die gegenüber Glassubstraten um 58 % verringerte Oberfläche – nicht vorgenommen. Eine Übersicht der erfolgten Experimente kann auch hier der Tabelle 8.1 am Ende des Kapitels entnommen werden.

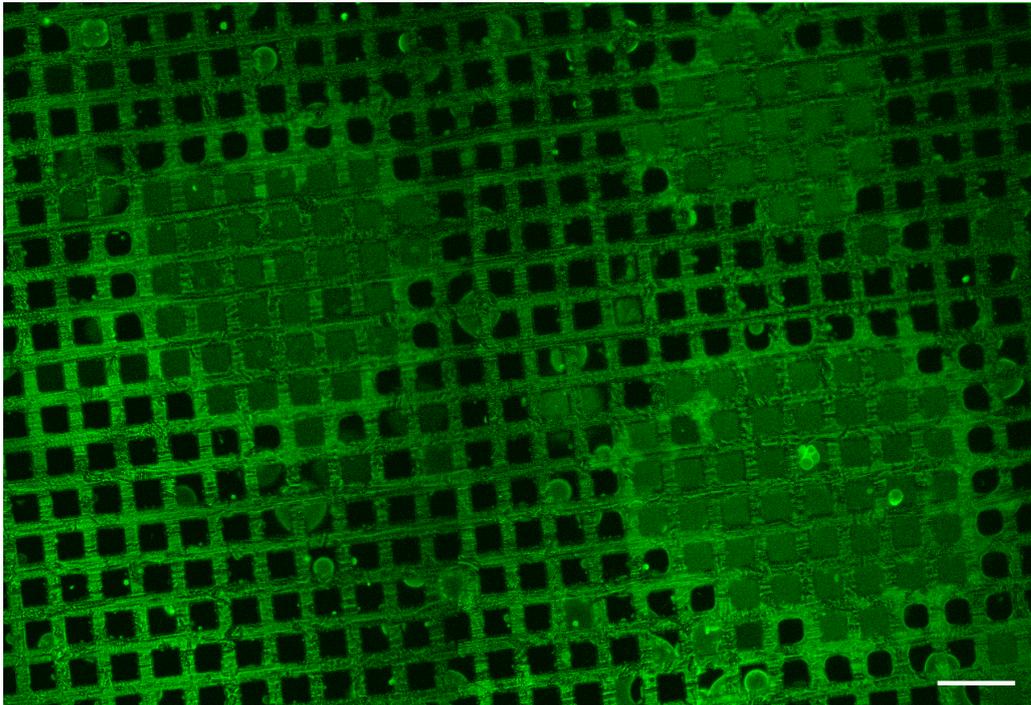


Abbildung 8.9: Membranen auf DETA funktionalisiertem Ti-Gitter. Maßstab: 30 μm .

Die erzeugten freitragenden Membranen lagen so im Maximum um einen Faktor 4-5 über der von *Heinemann et al.* erzeugten Größe. Der Durchmesser der durch die Vesikelausbreitung generierten Membranbereiche variierte von Membranen über einzelnen Öffnungen bis hin zu 200 μm und lag auch damit deutlich über den von *Heinemann* erzielten Werten.

Abbildung 8.9 zeigt exemplarisch den durchschnittlichen Bedeckungsgrad anhand von Membranen auf einem 10,5 μm DETA funktionalisierten Ti-Gitter. Zusammenhängende Membranbereiche ließen sich lediglich in Einzelfällen durch eine hohe Konzentration an zugegebenen Vesikeln erreichen, was jedoch zu zweierlei Problematik führte. Zum einen wurde die Vesikelausbreitung durch eine geringere Verdünnung der Ausgangslösung weniger befördert, zum anderen kam es zur Ablagerung von Vesikeln auf bereits gebildeten Membranen. Ließen sich große Vesikel durch die Spülvorgänge leicht entfernen, so widerstanden in der Regel kleine Vesikel dem Strömungsfluss. Ähnliches ließ sich im Falle von unterstützten Lipiddoppelschichten beobachten, wo sich die Vesikel an Unregelmäßigkeiten und Fehlstellen in der Membran festsetzten. Eine geschlossene Bedeckung der gesamten Gitteroberfläche war nicht möglich.

Im Gegensatz zur Ausbildung von unterstützten Membranen in Abschnitt 8.2 zeigte sich im Falle der freistehenden Membranen eine Destabilisierung mit steigendem EPA Anteil. Die Lipidmischungen wurden daher für die weitergehenden Experimente auf $5 \pm 1\%$ EPA, $10 \pm 1\%$ BioCAP, $84,9 \pm 1\%$ EPC und $0,1 \pm 0,1\%$ CF-PEG festgesetzt.

8.4 Kombination von Aktin & Membran

Nach Voruntersuchungen und erfolgreichem Aufbau freitragender Aktin- und Membranstrukturen auf TEM-Gittern wurde die Kombination der beiden Systeme angestrebt. In einem ersten Ansatz wurde die Ausbreitung von GUVs auf existierenden, vernetzten und unvernetzten Aktinnetzwerken erprobt, in einem Zweiten die Abscheidung und Kopplung von Filamenten auf ausgebildeten Membranen. Während bei Ersterem die übereinstimmende, negative Ladung von Aktin und Vesikelmembran eine Ausbreitung der GUV behinderte, konnte bei Zweiterem durch Verknüpfung mittels Streptavidin eine stabile Komposition erreicht werden.

8.4.1 Abscheidung von Membranen auf freitragenden Aktinnetzwerken

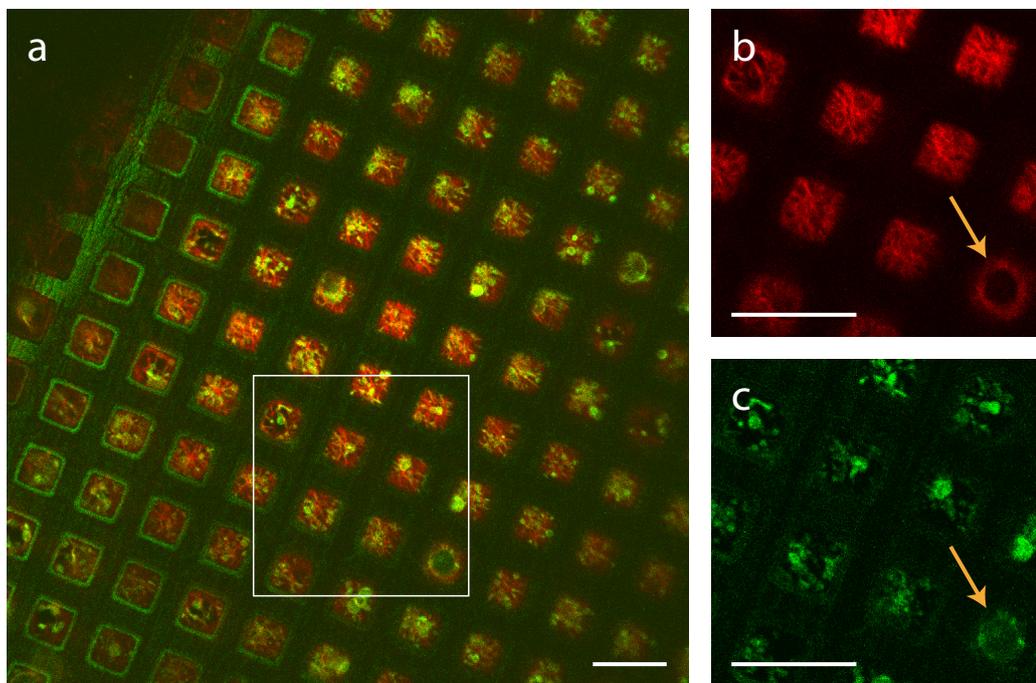


Abbildung 8.10: Fluoreszenzaufnahme von geplatzten Vesikeln über Aktin auf $10,5\ \mu\text{m}$ DETA funktionalisiertem SiN-Gitter. Statt Membranen auszubilden führt die Zugabe von GUVs und Magnesium auf ein bestehendes, kompaktes Aktinnetzwerk zu einem Platzen der Vesikel. Überreste der Vesikel lagern sich an das Netzwerk an (a), wobei es auch zur Verdrängung des Aktins durch kleine Vesikel kommen kann ((b, c), gelber Pfeil). Maßstab: $20\ \mu\text{m}$.

Da sich die freitragenden Aktinnetzwerke als stabil gegenüber nachfolgenden Spülvorgängen oder der Zugabe und Abnahme von Lösung mittels Pipettieren gezeigt hatten, sollte in ersten Versuchen die Abscheidung von Membranen auf existierenden Netzwerken durchgeführt werden. Als positiver Effekt wurde dabei die Unterstützung der Membranen durch die Aktinfilamente angesehen, wobei jedoch die Auswirkungen der räumliche Ausdehnung des Netzwerkes sowie der

Effekt der identischen Ladung unterschätzt wurden.

In der experimentellen Umsetzung wurden sowohl auf vernetzte als auch unvernetzte Aktinnetzwerke, aufgebaut wie in Abschnitt 8.1 erläutert, 100-200 μl einer 1:10 in E-Puffer verdünnten Vesikellösung pipettiert. Abbildung 8.10 zeigt das Resultat auf einem zu Beginn unvernetzten Netzwerk. Auch nach einer Zeit von 45 min nach Vesikelzugabe konnten keine ausgebreiteten Membranen beobachtet werden. Zurückzuführen ist dieses, den vorangehenden Experimenten widersprechende Ergebnis, vermutlich auf den Abstand sowie die Abschirmung der Oberflächenladung aufgrund der eine negative Gesamtladung aufweisenden Aktinfilamente. Eine zum Bruch führende Deformation der Vesikel mit anschließender Membranausbreitung durch die Adhäsionskraft der Silanladung war so nicht länger gewährleistet.

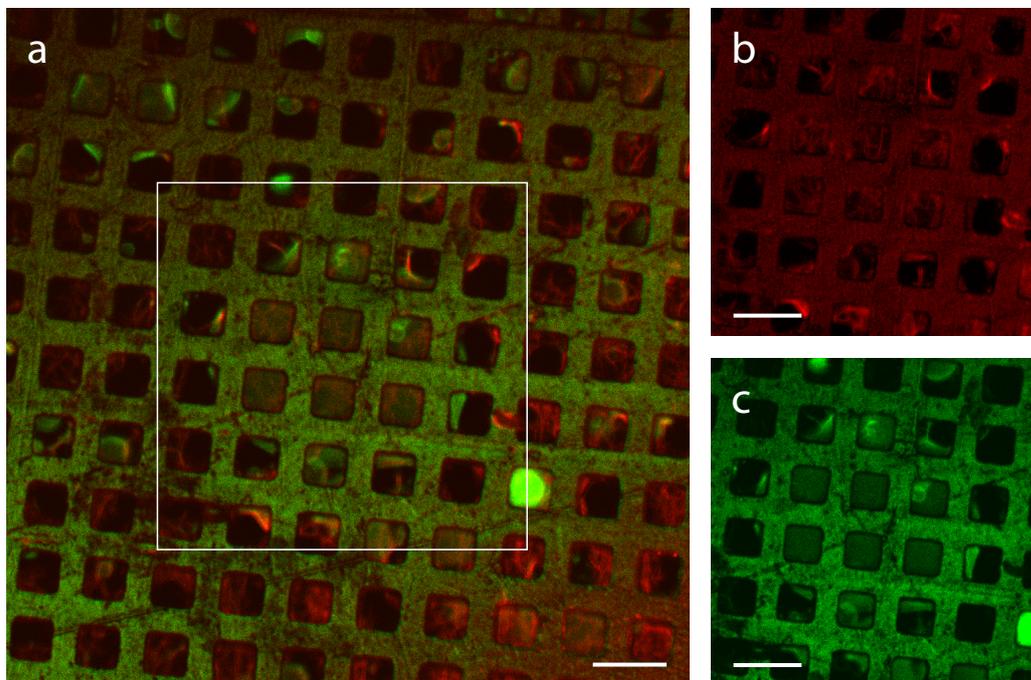


Abbildung 8.11: Fluoreszenzaufnahme eines ausgebreiteten Vesikels über vernetztem Aktin auf 10,5 μm APTEs funktionalisiertem SiN-Gitter (a). Die Ausbildung von Membranen über Aktin führte im Umfeld zu großflächigen Zerstörungen des Aktinnetzwerkes (b, c). Maßstab: 20 μm .

Divalente Kationen, wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} , sind bekannt für ihre befördernde Wirkung bei der Fusion von Vesikeln, aber auch bei der Ausbildung unterstützter Membranen [165, 172]. Mit dieser Absicht – aber auch um eine Verdichtung des Netzwerkes zu erreichen – wurde eine 50 mM MgCl_2 -Lösung in Verdünnungspuffer zugeführt. Kam es jedoch bereits im Laufe des Sedimentationsprozesses zu einem vereinzelt Brechen der Vesikel ohne Entstehung einer stabilen Lipiddoppelschicht, so führte die Zugabe der MgCl_2 -Lösung zum Platzen aller GUVs und der Ausbildung von LUVs, welche sich sodann an den Filamenten des Aktinnetzwerkes festsetzten.

Darüber hinaus kam es durch kleine GUVs, wie an der mit gelben Pfeilen indizierte Stelle, zur Verdrängung und Zerstörung der Aktinfilamente. Eine Ausbildung von Membranen über Netzwerken signifikanter Dichte konnte in keinem Fall erreicht werden.

In Einzelfällen war es – wie in Abbildung 8.11 gezeigt – möglich, Membranen auf bereits vorher vernetztem Aktin auszubilden. Der Kollaps der Vesikel führte jedoch zu teilweisen Zerstörungen der Netzwerke im Umkreis der Lipiddoppelschicht. Die Ränder der Membranen tendierten dazu in Fällen, in denen sie sich nicht entlang der Gitterstege verankern konnten, zur Minimierung der Energie an Aktinfilamenten festzumachen.

8.4.2 Abscheidung von Aktin auf freitragenden Membranen

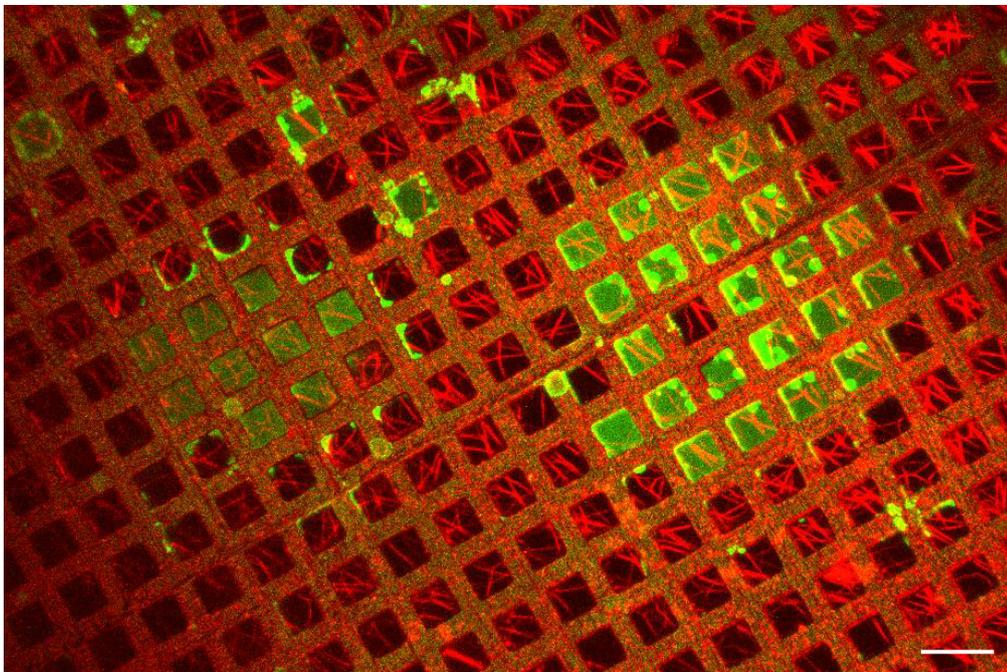


Abbildung 8.12: Fluoreszenzaufnahme eines Aktinnetzwerkes über ausgebreiteten Vesikeln auf $10,5\ \mu\text{m}$ APTES/DETA funktionalisiertem SiN-Gitter. Anders als bei der Ausbreitung von Vesikeln auf Aktinnetzwerken kommt es bei der Abscheidung von Aktin auf den ausgebreiteten Vesikeln zu keinen direkten Zerstörungen. Maßstab: $20\ \mu\text{m}$.

Aufgrund der negativen Effekte brechender GUVs auf die Filamentnetzwerke wurde eine Umkehr des Prinzips vorgenommen. Für den Fall unterstützter Lipiddoppelschichten konnten *Barfoot et al.* zeigen, dass es möglich war, F-Aktin auf EPC-Membranen abzuscheiden und über Ponticulin anzubinden [17]. Eine äquivalente Vorgehensweise wurde nun auch für den Fall freitragender Lipiddoppelschichten durchgeführt, wobei eine Verknüpfung der Komponenten durch Verbindung der Filamente mit von der Membran präsentierter Biotin-Streptavidin Komplexe realisiert wurde.

In der Vorbereitung wurden freitragende Membranen – wie in Abschnitt 8.3 beschrieben – auf SiN-Gittern, silanisiert mit 90 % APTES und 10 % DETA, aufgebaut. Die Kombination der beiden Silane sollte hierbei eine möglichst optimale Ladungsdichte erzeugen, welche erhöhte Membranstabilität zusammen mit einer hohen Rate an GUV-Ausbreitungen verband. Anschließend an die Erzeugung von Membranen wurde Verdünnungspuffer mit 8 mM Streptavidin zugeführt, für 30 min inkubiert und mit reinem Verdünnungspuffer gründlich gespült. Nach Entfernung überschüssigen Puffers wurde verdünnte F-Aktin Lösung direkt auf das Gitter pipettiert. Versuche des Netzwerkaufbaus durch Einspülen der Aktinlösung mittels des oberen Kanalsystems schlugen aufgrund der Flussgeometrie fehl: Die Umfassung des TEM-Netzes mittels Silikonkleber sorgte für die Entstehung einer wenige Dutzend Mikrometer hohen Lösungsschicht über dem Gitter. Filamente, welche durch die Kanäle eingespült wurden, flossen über diese Schicht hinweg, ohne in Kontakt mit dem Gitter oder den Membranen zu geraten. Eine Sedimentation trat kaum auf. Das obere Kanalsystem konnte in der vorliegenden Form daher lediglich zur Spülung sowie zur Einbringung von Reagenzien mit Stoffen, die wie Streptavidin und Mg^{2+} leicht diffundieren, genutzt werden. Nach einem Zeitraum von 30 min, in welchem die biotinylierten Aktinfilamente Verbindungen mit den von der Membran exprimierten Streptavidinen eingingen wurde überschüssiges Aktin durch Spülen mit Verdünnungspuffer entfernt und das Verbleibende mittels 50 mM $MgCl_2$ -Lösung vernetzt.

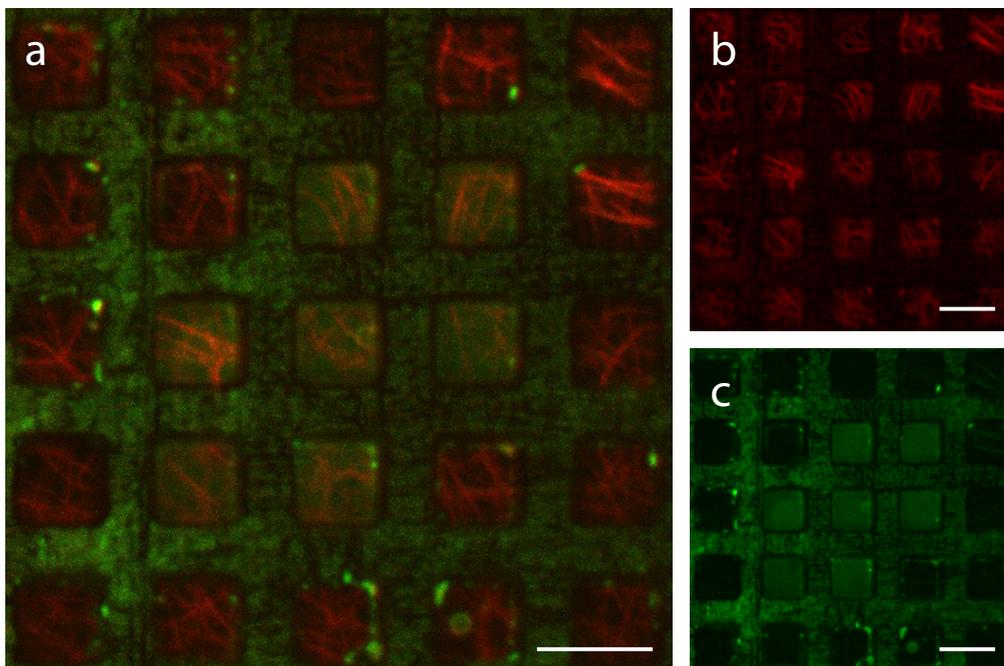


Abbildung 8.13: Fluoreszenzaufnahme eines Aktinnetzwerkes über ausgebreiteten Vesikeln auf $6,5\ \mu\text{m}$ APTES/DETA funktionalisiertem SiN-Gitter. Die Dichte des Netzwerkes hängt in starkem Maße von der Aktinkonzentration der aufpipettierten Lösung (hier: $1,25\ \mu\text{M}$) ab. Maßstab: $10\ \mu\text{m}$.

Abbildungen 8.12 und 8.13 zeigen erfolgreich erzeugte Aktin-Membran Komplexe mit unterschiedlich dichten Netzwerken auf $10,5\ \mu\text{m}$, respektive $6,5\ \mu\text{m}$, messenden Lochstrukturen in der Übersicht und in Detailaufnahme. 8.12 wurde durch Zugabe einer 1:10 verdünnten F-Aktin Lösung in Verdünnungspuffer, 8.13 durch eine 1:5 verdünnte Lösung gebildet.

Anders als in Abschnitt 8.3 beschrieben schlossen sich bei der Erzeugung eines Aktin-Membran Komplexes an die Membranausbildung noch mehrere Spül- und Injektionsgänge an, welche im Falle der Durchführung mittels Pipetten eine hohe Strapazierung der Lipiddoppelschichten darstellten. Dies führte in vielen Fällen zu teilweisen Zerstörungen der erzeugten Membranen. Dennoch konnten in allen Versuchen erfolgreich Aktinfilamente und Membranen über hunderten von Stegzwischenräumen abgeschieden werden, im Maximum in zusammenhängenden Strukturen von bis zu $120\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Es war allerdings nötig zu gewährleisten, dass es aufgrund des Flüssigkeitsaustausches nicht zu einer Absenkung der Membranen in die Löcher des Grids kam, und ein direkter Kontakt zwischen Ihnen und dem anschließend abgeschiedenen Aktinnetzwerk bestand.

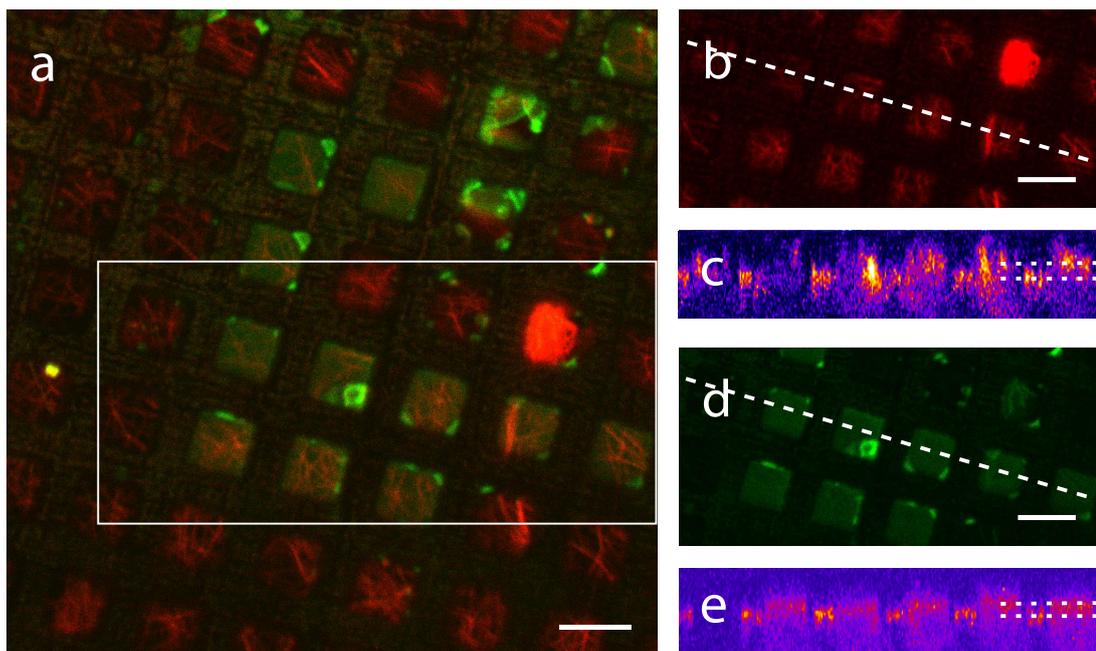


Abbildung 8.14: Fluoreszenzaufnahme & Querschnitt eines kompakten Aktinnetzwerkes über ausgebreiteten Vesikeln auf $6,5\ \mu\text{m}$ APTES/DETA funktionalisiertem SiN-Gitter (a). Querschnitte (c, e) entlang der Linien in den Ausschnitten (b, d) zeigen, dass es zu keiner Absenkung der Membranen kommt und sie in engem Kontakt mit dem Netzwerk stehen. Maßstab: $10\ \mu\text{m}$.

Anhand der in Abbildung 8.14 (c) und (e) gezeigten z-Querschnitte konnte eine qualitative Analyse der erzeugten Strukturen vorgenommen werden. Trotz der gegenüber dem Netzwerk in Abbildung 8.3 geringeren Filamentdichte lässt sich erkennen, dass das F-Aktin in einer

dünnen Schicht lokalisiert ist, deren Intensitätsmaximum der Fluoreszenz $7 \pm 1 \mu\text{m}$ oberhalb des Maximums der Gitterreflexion liegt. Gleiches gilt für die Membran, die durch ihr Fluoreszenzsignal eindeutig als $6 \pm 1 \mu\text{m}$ über der Gitterunterseite liegend identifiziert werden kann. Eine Absenkung der Membran in die Gitteröffnungen ist also lediglich im Bereich des Fehlers von $1 \mu\text{m}$ möglich; eine Distanz, welche durch die Filamente aufgrund ihrer Semiflexibilität überbrückt werden kann, so dass selbst in diesem Fall noch ein Kontakt zwischen Netzwerk und Membran zu erwarten wäre.

Tabelle 8.1: Tabellarische Übersicht über die Resultate der Untersuchungen zum Aufbau eines freitragenden Aktin-Membran Komplexes (- : nicht erfolgreich; o : ungenügend; + : erfolgreich)

	Netzwerk	Membran	Netzwerk + Membran
Gold			
Unfunktionalisiert	-	-	
HMM	+		
Streptavidin	+	-	
11-Amino-1-undecanthiol	o	o	
11-Amino-1-undecanthiol + Streptavidin	+	o	-
Gold + 100 nm Ti			
Unfunktionalisiert	-	-	
APTES		+	
DETA	o	+	
DETA + Streptavidin	+	+	
Gold + 100 nm Si₃N₄			
Unfunktionalisiert	-	-	
APTES	o	+	
DETA	+	+	
DETA + Streptavidin	+	+	o
90 % APTES, 10 % DETA	+	+	+

Abbildung 8.15 illustriert zusammenfassend die zum erfolgreichen Aufbau eines freitragenden Aktin-Membran Komplexes führenden Schritte: Die SiN beschichteten Gittersubstrate (a) wurden, um eine optimale, positive Ladungsbedeckung der Oberfläche zu erreichen, mit einem APTES/-DETA Verhältnis von 9:1 funktionalisiert und in der Flusszelle montiert (b). Biotinylierte, negativ geladene Vesikel, die mittels Elektroformation aus einer Lipidlösung mit Anteilen von $5 \pm 1 \%$ EPA, $10 \pm 1 \%$ BioCAP, $84,9 \pm 1 \%$ EPC und $0,1 \pm 0,1 \%$ CF-PEG hergestellt worden waren, wurden 1:5 in E-Puffer verdünnt auf das gespülte TEM-Gitter pipettiert. Durch Ladungsinteraktion mit den Gitterstegen und unterstützt durch osmotischen Druck kam es nach Sedimentation zur Adhäsion und Ausbreitung der Vesikel (c).

Nach einer Ruhedauer von 30 min und Spülung des oberen Kanalsystems mit Verdünnungspuf-

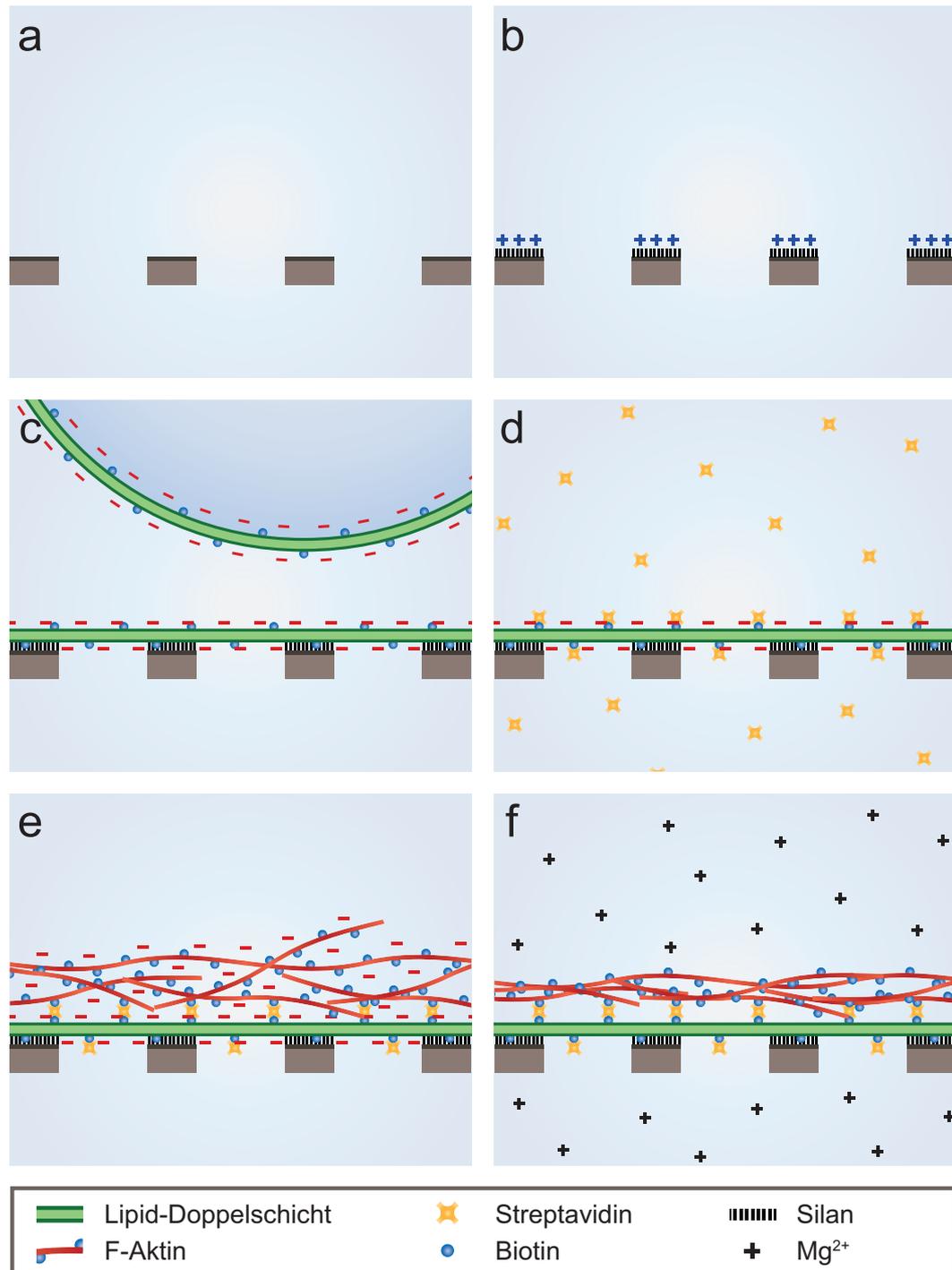


Abbildung 8.15: Illustration der Schritte zur Erzeugung eines freitragenden Aktin-Membran Komplexes: Handelsübliche Au-TEM Grids werden mit Si_3N_4 beschichtet (a) und mit APTES oder DETA Silanen funktionalisiert, um eine hohe, positive Oberflächenladung zu generieren (b). Membranaufbau wird initiiert durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Vesikeln und dem positiv geladenen Grid sowie dem erhöhten osmotischen Druck innerhalb der Vesikel (c). Zugabe von Streptavidin führt zur Anlagerung an die biotinylierten Lipide der Membranen (d), woran sich wiederum die biotinylierten Aktine anlagern können (e). Zur Vernetzung wird in einem letzten Schritt MgCl_2 -haltige Lösung zugegeben (f).

fer wurde eine 8 nM Streptavidin-Lösung in Verdünnungspuffer eingeleitet und das System für weitere 30 min inkubiert (d). Durch Anheftung der Streptavidine an die endständigen Biotingruppen der Lipide wurde eine Verknüpfung zwischen den biotinylierten Aktinfilamenten und der Membran ermöglicht. Um eine Verbindung der Filamente untereinander zu verhindern wurde vor Aufbringung des Aktins ein mehrfacher Lösungsaustausch vorgenommen. Anschließend wurde eine 1 : 5 - 1 : 10 Lösung von F-Aktin in Verdünnungspuffer direkt auf das Gitter pipettiert und abermals für einen Zeitraum von 30 min inkubiert (e). Filamente, die keine Verbindung mit der Membran eingingen oder die mit Anderen lediglich leicht verschränkt waren, konnten durch Spülung aus der Lösung entfernt werden. Durch Zugabe einer 100 mM Lösung MgCl_2 in Verdünnungspuffer konnte letztlich eine Filamentverknüpfung und Komprimierung des Netzwerkes initiiert werden.

KAPITEL 9

Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Zusammen mit Plasma- und intrazellulären Membranen stellt das Zytoskelett, bestehend aus unterschiedlichen, semiflexiblen Filamenten mit multiplen Funktionen und Strukturen, eine Grundkomponente von lebenden Organismen dar. Insbesondere Aktin ist dabei über den Aktin-kortex unterhalb der Zellmembran und den Stressfasern an der strukturellen Integrität sowie der Adhäsions- und Migrationsdynamik von Zellen beteiligt. In dieser Hinsicht stellt die Nachbildung und mikrorheologische *in vitro* Untersuchung zellulärer Filamentstrukturen eine bedeutende Methode zur physikalischen Aufklärung des Zellverhaltens dar.

Aufbauend auf existierenden mikrofluidischen Techniken zur Erzeugung von Filamentnetzwerken auf Säulensubstraten [176], waren deren Verfeinerung und Ausbau Gegenstand dieser Arbeit. Insbesondere wurde im Zuge dessen auch ein neuartiges, freitragendes Modellsystem auf Gitterstrukturen zur Untersuchung der Membran-Kortex Wechselwirkungen entwickelt. Dabei stand die Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften gerichteter, stressfaserähnlicher Strukturen, sowie deren Vergleich mit multidimensionalen Netzwerken im Fokus. Die streng lokalisierten Netzwerke auf PDMS-Säulen stellen das Gegenstück zu verwobenen und vernetzten, 3-dimensionalen Aktinfilamenten dar, auf welche sich bisherige viskoelastische Studien hauptsächlich beschränkten. Mit hochdynamischen Verankerungen an Membrankomplexen, respektive extrazellulären Strukturen, liegen die Randbedingungen von Stressfasern jedoch weit entfernt von denen der Gele.

So zeigten Aktinbündel im unvernetzten Fall ein richtungsabhängiges Schwingungsverhalten, das im betrachteten Frequenzbereich zu einem verstärkten viskosen Charakter in transversaler Richtung sowie – gegenüber 3-dimensionalen Gelen – zu einer erhöhten Energiespeicherung entlang der Filamentachse führte. Die gegenioneninduzierte Kopplung der, unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen, Aktinpolymere durch divalente Mg^{2+} -Ionen bewirkte einen Anstieg der Werte auf das Niveau der longitudinalen Achse. Weiterhin konnte eine Quantifizierung des Bündelungsverhaltens im Bereich von 5-12 mM Mg^{2+} – unter den aus Aktinfilamenten bekannten kritischen Werten für das Entstehen vernetzter Strukturen [202] – durchgeführt werden, welche eine klare Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit offenbarte. Die gekoppelten Aktinfilamente

zeigten darüber hinaus eine Langzeitstabilität, welche selbst nach Ionen entziehender Pufferbehandlung noch verstärkt Eigenschaften von vernetzten Aktinbündeln aufwies. Dabei kam die Technik der passiven Einzelpartikelmikrorheologie zur Anwendung, welche die Bewegung von eingebetteten Probepartikeln über die thermisch angeregten Schwingungen des umgebenden Materials mit dessen viskoelastischen Parametern in Verbindung setzt [62]. Auch aufgrund der geringen Probenvolumina ist sie dabei insbesondere für die Untersuchung biologischer Präparate geeignet.

Zudem wurde im Vorfeld ein multifunktionales Mikroskopiesystems mit integrierter optischer Pinzette und Reflexions-Interferenz-Kontrast Technik konzipiert und konstruiert. Unter anderem für die Durchführung von Zelladhäsionsexperimenten erstellt [101], wurde das System – sowie die dafür entwickelten Steuerungsprogramme – hauptsächlich für die Durchführung der mikrorheologischen Experimente genutzt. Für die Auswertung der rheologischen Daten kamen neu entwickelte Algorithmen auf *Python*-Basis zum Einsatz, deren Prinzip auf der numerischen Konvertierung der Positionsdaten nach *Evans et al.* beruhen und durch die Methode der „*splinelike interpolation*“ ergänzt wurden [54, 123, 124]. Zur Validierung der Anwendbarkeit von System und Algorithmen wurden Experimente an viskosen Saccharose- und viskoelastischen Xanthan-Lösungen durchgeführt, und um den Vergleich mit Auswertalgorithmen nach *Mason* ergänzt [128].

In Übereinstimmung mit Experimenten zu Flussbedingungen in mikrostrukturierten Kanälen, die in Zusammenarbeit mit *Weißer et al.* durchgeführt worden waren [217], gelang es Aktinnetzwerke auf den Köpfen der Säulensubstrate *in situ* zu polymerisieren. Im Vergleich zu bisherigen Präparationsprotokollen verfügten die so erzeugten Strukturen über eine erhöhte Isotropie. Dabei wiesen 2-dimensionale Netzwerke bereits im verwobenen Zustand eine – vermutlich von der Beschränkung und Verankerung der Filamente verursachte – Abweichung der viskoelastischen Eigenschaften im Vergleich zu 3-dimensionalen Gelen auf: Im Frequenzbereich zwischen 0,1 und 1 rad/s, am unteren Ende des beobachteten Intervalls, zeigte sich eine signifikante Erhöhung des dissipativen, viskosen Charakters; ein Effekt, wie er in Aktin Gelen erst durch transiente Verknüpfungen zwischen den Filamenten zustande kommt. Gleichzeitig lag auch der elastische Charakter durch Verschiebung des Verlustmoduls $G''(\omega)$ zu größeren Frequenzen hin deutlich höher. Denkbar ist die Rückführung dieser Beobachtungen auf die Anbindung der Filamente auf den Säulenköpfen mittels des deaktivierten Myosin II-Fragments NEM-HMM, dessen Koppelstärke aufgrund thermisch angeregter Dissoziationen schwanken kann. Ebenfalls in Betracht kommen die speziellen viskoelastischen Eigenschaften des Silikonelastomers PDMS, welches für den Flusszellenaufbau verwandt wurde. Dieses verfügt im erwähnten Frequenzbereich über schwingungsdämpfendes Verhalten, welches die thermisch angeregte Bewegung der Filamente beeinflussen kann.

Über den Unterschied zu 3-dimensionalen Gelen hinaus zeigten die gerichteten Filamentstrukturen Unterschiede sowohl im Schwingungsverhalten als auch im Verlauf der viskoelastischen Moduln zwischen longitudinaler und transversaler Richtung. Ihren Ausdruck fand dies in voneinander abweichenden Werten des Verhältnisses von Verlustmodul $G''(\omega)$ zu Speichermodul $G'(\omega)$. So besitzen Filamentbündel im unvernetzten Zustand ein in transversaler Richtung erhöhtes viskoses Verhalten. Dies entspricht einer verstärkten Umwandlung von elastischer Schwingungsenergie in dissipative, thermische Energie und somit einer erhöhten Dämpfung. Im Zuge der Bündelung durch Mg^{2+} -Ionen kam es zu einer starken Erhöhung der Rückstellkraft und damit einhergehend zu einer Angleichung des Kurvenverlaufs auf das Niveau der longitudinalen Werte.

Ob es sich bei dieser richtungsabhängigen Viskoelastizität um eine intrinsische Eigenschaft der Aktinbündel oder aber um einen Effekt der Filamentverankerung auf den Säulen handelt konnte nicht mit abschließender Sicherheit verifiziert werden. Unabhängig davon ist es jedoch in beiden Fällen von Interesse für die Beschreibung des Verhaltens der teilverankerten Stressfasern in Zellen, da diese nicht getrennt von ihrer Umgebung betrachtet werden können. Dabei stellt sich die Frage ob Stressfasern mit ihrer komplexen Struktur aus Aktinfilamenten und diversen Aktin bindenden Proteinen (ABPs), wie Myosin und α -Aktinin, in ihrem Verhalten mehr den unvernetzten oder den gebündelten Filamentstrukturen entsprechen. Zwar bewirken auch ABPs eine Reduktion der Reptationsröhre und spezifische Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften von Aktinellen [52], jedoch finden die durch sie ausgeübten Verknüpfungen nicht in der kontinuierlichen Weise der ioneninduzierten Wechselwirkung statt. Berechnungen durch *Yu et al.* ergaben im ionengebündelten Zustand einen mittleren Abstand der Filamente von $75,3 \text{ \AA}$, weitaus geringer als die Dimensionen der erwähnten Aktin bindenden Proteine [230]. Auch unter Berücksichtigung der speziellen Bindungsgeometrien besitzen die so gebündelten Filamente eine gegenüber den ionenverknüpften höhere translatorische Freiheit in der Schwingungsanregung.

Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes wäre es daher denkbar Untersuchungen auf Säulensubstraten mit fein einstellbaren Materialparametern, wie beispielsweise bei Einsatz von PEG-Säulen, durchzuführen. Zusätzlich ist zur Bestimmung des Einflusses der NEM-HMM Filamentanbindung eine Kopplung mittels der stärkeren, nur schwach transienten Streptavidin-Biotin Bindung anzustreben. Um des weiteren Unterschiede in der Bündelung zwischen ABPs und Ionen zu ermitteln ist es denkbar Proteine wie α -Aktinin oder Filamin einzusetzen – auch in Kombination mit Mg^{2+} -Ionen.

Im Zuge der viskoelastischen Experimente wurde auch die Bündelung der Aktinfilamente bei Mg^{2+} -Konzentrationen im niedrigen Millimolar Bereich untersucht. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der im neutralen pH-Bereich natürlicherweise negativ geladenen Aktinfilamente muss für die Kopplung durch Gegenionen Kondensation eine kritische Ionenkonzentration über-

wunden werden, während es bei hohen Konzentration ab circa 500 mM Berechnungen zufolge zu einem erneuten Verlust der attraktiven Kopplung kommt [230]. Wurde die untere Grenze in 3-dimensionalen Gelen zu 27 mM Mg^{2+} bestimmt [202], so gaben fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen durch *Roos et al.* jedoch Anlass zu der Vermutung, dass eine Bündelung bereits bei niedrigeren Konzentrationen um 10 mM eintritt [175]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war es nun möglich, eine klare zeit- und konzentrationsabhängige Änderung der Filamentbewegung im Bereich zwischen 5 und 12 mM zu ermitteln.

Dies steht im Einklang mit erst kürzlich veröffentlichten Untersuchungen durch *Hu et al.*, welche Bündelungsverhalten von *de novo* polymerisierten Filamenten bereits unter physiologischen Bedingungen (circa 1 mM Mg^{2+}) beobachten konnten [85]. Explizit dies ist jedoch konträr zu dem Resultat, dass trotz Beobachtung über Zeiträume von 3 h in den mikrorheologischen Experimenten bei 2 mM Mg^{2+} keine Veränderung der Filamentbewegungen bestimmt werden konnte. Allerdings kam es in den Experimenten von *Hu et al.* auch zur Verwendung von 0,25 % Methylcellulose, einem die Viskosität der Lösung erhöhenden Polymer, das unter anderem bei *in vitro* Bewegungs-Assays von Aktinfilamenten zum Einsatz kommt. Wie in Abschnitt 3.4 angemerkt kann es durch Makromoleküle auch zur entropisch getriebenen Bündelung von Aktinfilamenten kommen. Aus diesem Grund ist nicht auszuschließen, dass die von *Hu et al.* beobachtete Bündelung auf einen kooperativen Effekt von Gegenionenkopplung und den sogenannten entropischen „*depletion forces*“ zurückzuführen ist.

Darüber hinaus zeigte sich durch die spontane Ausbildung von sternförmigen Strukturen an Streptavidin beschichteten Probenpartikeln, ähnlich den Mikrotubuli-Astern in Zellen oder ABP-Aktin-Astern *in vitro*, dass spezielle intrazelluläre Filamentstrukturen, wie schon in Experimenten durch *Reymann et al.* gezeigt [171], in bestimmten Fällen als Resultat der geometrischen Faktoren angesehen werden können. Zusammen mit der Filamentbündelung selbst in der Nähe physiologischer Konzentrationen gibt dies Anlass zu der Betrachtung, dass Aktin bindende Proteine nur beschränkt als Bündelungs- oder Vernetzereagent zu betrachten sind, sondern vielmehr als abstandshaltende Formgeber und mechanische Mediatoren am Aufbau und Verhalten der Filamentstrukturen beteiligt sind.

Bemerkenswerte Langzeitstabilität zeigte sich anhand der viskoelastischen Parameter der gebündelten Filamente. Auch nach Austausch der Pufferlösung mit ionenentziehendem EDTA-Puffer und anschließender, 3-stündiger Spülung kam es in 68 % der Fälle zu keiner Umkehr des Bündelungsprozesses über die übliche Schwankungsbreite hinaus. In den weiteren Fällen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Wiederanstieg der mittleren quadratischen Verschiebungen auf Schäden der Filamente durch Spülung oder den Einsatz des Fluoreszenzlasers zurückzuführen sind. Die Übereinstimmung von Verlust und Speichermodul im Vergleich zum Zustand nach Ionenbündelung impliziert aber nicht nur eine strukturelle Konservierung der Bündel sondern auch die Beibehaltung der ionenvermittelten Wechselwirkung. Dies ist nur erklärbar, wenn

man anders als im „*mean field*“ Modell der Gegenionenkondensation von stark lokalisierten Gegenionen ausgeht, wie sie beispielsweise *Angelini et al.* durch Röntgenbeugungsanalyse nachweisen konnten. Wie *Yu et al.* theoretisch bestätigten [230] weist der Anteil stark gebundener Gegenionen und somit die Ausbildung dieses attraktiven Zustandes eine hohe Abhängigkeit von der Ionenkonzentration der Umgebung auf. Wie es dabei, auch bei Magnesiumentzug der Lösung, zu einer Aufrechterhaltung des Bündelungszustandes kommen kann, erklärt möglicherweise die bei Bündelung durch Makromoleküle auftretende Hysterese.

Durch die Abhängigkeit von der umgebenden Ionenkonzentration zeigt sich, dass die gegenioneninduzierte Wechselwirkung starken entropischen Einflüssen ausgesetzt ist [148]. Auch den „*depletion forces*“ der makromolekülinduzierten Bündelung liegt ein entropischer Effekt zugrunde. Untersuchungen durch *Hosek et al.* offenbarten dabei eine Stabilität der Aktinbündel auch bei Werten deutlich unterhalb der für die ursprüngliche Bildung notwendigen Makromolekülkonzentrationen [84]. In Analogie dazu ist es denkbar, dass auch die mit einer Konformationsänderung der Aktinfilamente einhergehende Bildung lokalisierter Ladungswolken einem Hystereseeffekt unterliegt.

Im Rahmen der Nachbildung zellulärer Systeme konnte die Kombination eines Aktinnetzwerkes mit freitragenden Membranen innerhalb einer mikrofluidischen Umgebung erreicht werden, wobei bereits die Membranerzeugung eine Verbesserung bestehender Techniken darstellte. Mittels Funktionalisierung von beschichteten TEM-Gittern war es möglich, durch Abscheidung von negativ geladenen Riesenvesikeln, die Ausbildung von bis zu $11,5 \times 11,5 \mu\text{m}$ messenden, freitragenden Membranen zu befördern. Im Unterschied zu konventionellen freitragenden Membranen, den sogenannten „*black lipid membranes*“ [222], handelte es sich hierbei um vollkommen lösemittelfreie Lipiddoppelschichten.

Abhängig vom Vesikeldurchmesser konnten zusammenhängende Bereiche von bis zu $30.000 \mu\text{m}^2$ lückenlos mit Membranen bedeckt werden. Damit lagen sowohl die Gesamtfläche als auch die Größe der einzelnen freitragenden Lipiddoppelschichten um ein Vielfaches über den Resultaten der durch *Heinemann et al.* parallel entwickelten Technik zur Abscheidung auf porösen SiN-Membranen [80]. Im Verlauf der Experimente zeigte sich, dass die Ausbildung einer signifikanten Zahl stabiler Membranen auf thiolierten Au-Gittern nicht möglich war, wohingegen sich die auf silanisierten Ti- und SiN-Strukturen Generierten durch eine hohe Lebensdauer über den gesamten beobachteten Zeitraum von mehreren Stunden auszeichneten. Ein Effekt, der im Einklang mit Vergleichsexperimenten an unterstützten Membranen, vermutlich auf das unterschiedliche chemische Verhalten von Thiolen und Silanen zurückzuführen ist.

Die Erzeugung von Aktinnetzwerken auf TEM-Gittern gelang sowohl durch Anbindung mittels NEM-HMM als auch durch Streptavidin-Biotin Kopplung. So war es schließlich auch möglich,

unter Verwendung biotinylierter Lipide, eine direkte Verbindung zwischen Membran und Aktinfilamenten herzustellen und so aus abgeschiedenen Filamenten unter Mg^{2+} -Vernetzung einen kompakten Aktin-Kortex zu formen. Anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung konnte dabei verifiziert werden, dass sowohl Membranen als auch Aktinnetzwerk auf der Oberseite der Gitterstruktur lokalisiert waren.

Im Vergleich zu existierenden Systemen basierend auf unterstützten Membranen oder Aktinvesikeln [213] bietet der entwickelte freistehende Aktin-Membran Komplex einen vereinfachten Zugang zu beiden Seiten der Membran sowie die Möglichkeit des nachträglichen Pufferaustausches. Damit ist das System auch für den schrittweisen Aufbau komplexer membranassoziierter Strukturen, wie beispielsweise den fokalen Adhäsionen, geeignet, sowie für deren Untersuchung durch Mikrorheologie, optische Pinzetten oder AFM.

Gegenstand des wissenschaftlichen Diskurs ist unter anderem der Einfluss des Aktinkortexes auf die Beweglichkeit von Lipiden und Membranproteinen [104, 143]. So ist vorgesehen in Folgeuntersuchungen durch FRAP die Diffusionsdynamik der Lipide mit und ohne gekoppeltem Aktinnetzwerk zu studieren. Auf dem Weg zu komplexeren Strukturen, wie beispielsweise Fokalen Adhäsionskomplexen, wäre im weiteren Verlauf die Anbindung - respektive die *in situ* Polymerisation des Netzwerkes - mittels Membranproteinen wie Ponticulin anzustreben.

Literaturverzeichnis

- [1] AKTAS, M. ; WESSEL, M. ; HACKER, S. ; KLÜSENER, S. ; GLEICHENHAGEN, J. ; NARBERTHAUS, F. : Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. In: *European Journal of Cell Biology* 89 (2010), Nr. 12, 888–894
- [2] ALBERTS, B. : *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2007
- [3] AMADO, E. ; KRESSLER, J. : Interactions of amphiphilic block copolymers with lipid model membranes. In: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16 (2011), Nr. 6, 491–498
- [4] AMANN, K. J. ; POLLARD, T. D.: The Arp2 / 3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. In: *Nature Cell Biology* 3 (2001), Nr. 3, S. 306–310
- [5] ANDERSSON, H. : Microfluidic devices for cellomics: a review. In: *Sensors and Actuators B. Chemical* 92 (2003), Nr. 3, 315–325
- [6] ANGELINI, T. E. ; GOLESTANIAN, R. ; CORIDAN, R. H. ; BUTLER, J. C. ; BERAUD, A. ; KRISCH, M. ; SINN, H. ; SCHWEIZER, K. S. ; WONG, G. C. L.: Counterions between charged polymers exhibit liquid-like organization and dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Nr. 21, 7962–7967
- [7] ANGELINI, T. E. ; LIANG, H. ; WRIGGERS, W. ; WONG, G. C. L.: Like-charge attraction between polyelectrolytes induced by counterion charge density waves. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), Nr. 15, 8634–8637
- [8] ANGELOVA, M. I. ; DIMITROV, D. S.: Liposome electroformation. In: *Faraday Discussions of the Chemical Society* 81 (1986), 303–311
- [9] ANTONISSE, M. M. G. ; ENGBERSEN, J. F. J. ; REINHOUDT, D. N.: Nitrate And Bicarbonate Selective Chemfets. In: *Proceedings of the International Solid-State Sensors and Actuators Conference* 1 (1995), 867–869
- [10] ASHKIN, A. : Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. In: *Physical Review Letters* 24 (1970), Nr. 4, S. 156–159

- [11] ASHKIN, A. ; DZIEDZIC, J. M.: Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. In: *Science* 235 (1987), Nr. 4795, 1517–1520
- [12] ASHKIN, A. ; DZIEDZIC, J. M. ; BJORKHOLM, J. ; CHU, S. : Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. In: *Optics Letters* 11 (1986), Nr. 5, 288–290
- [13] ASHKIN, A. : Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. In: *Biophysical Journal* 61 (1992), Nr. 2, 569–582
- [14] BACKOUCHE, F. ; HAVIV, L. ; GROSWASSER, D. ; BERNHEIM-GROSWASSER, A. : Active gels: dynamics of patterning and self-organization. In: *Physical Biology* 3 (2006), Nr. 4, 264–273
- [15] BAEK, J.-H. ; HWANG, S.-U. ; LEE, Y.-G. : Trap stiffness in optical tweezers. In: *Asian Symposium for Precision Engineering and Nanotechnology*, 2007
- [16] BALABAN, N. Q. ; SCHWARZ, U. S. ; RIVELINE, D. ; GOICHBERG, P. ; TZUR, G. ; SABANAY, I. ; MAHALU, D. ; SAFRAN, S. ; BERSHADSKY, A. ; ADDADI, L. ; GEIGER, B. : Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. In: *Nature Cell Biology* 3 (2001), Nr. 5, 466–472
- [17] BARFOOT, R. J. ; SHEIKH, K. H. ; JOHNSON, B. R. G. ; COLYER, J. ; MILES, R. E. ; JEUKEN, L. J. C. ; BUSHBY, R. J. ; EVANS, S. D.: Minimal F-actin cytoskeletal system for planar supported phospholipid bilayers. In: *Langmuir* 24 (2008), Nr. 13, 6827–6836
- [18] BAUSCH, A. R. ; KROY, K. : A bottom-up approach to cell mechanics. In: *Nature Physics* 2 (2006), Nr. 4, 231–238
- [19] BEREITER-HAHN, J. ; FOX, C. H. ; THORELL, B. : Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. In: *The Journal of Cell Biology* 82 (1979), Nr. 3, 767–779
- [20] BOAL, D. : *Mechanics of the Cell*. Cambridge University Press
- [21] BROWN, D. A. ; LONDON, E. : Functions of lipid rafts in biological membranes. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14 (1998), 111–136
- [22] CAMPO, a. D. ; GREINER, C. : SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (2007), Nr. 6, R81–R95
- [23] CANDE, W. Z.: Preparation of N-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin and its use as a functional probe of actomyosin-based motility. In: *Methods in Enzymology* 134 (1986), 473–477

- [24] CHA, T. ; GUO, A. : Formation of supported phospholipid bilayers on molecular surfaces: role of surface charge density and electrostatic interaction. In: *Biophysical Journal* 90 (2006), Nr. 4, 1270–1274
- [25] CHAKRAVARTY, A. ; HOWARD, L. ; COMPTON, D. A.: A Mechanistic Model for the Organization of Microtubule Asters by Motor and Non-Motor Proteins in a Mammalian Mitotic Extract. 15 (2004), Nr. May, S. 2116–2132
- [26] CHAN, Y.-H. M. ; BOXER, S. G.: Model membrane systems and their applications. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (2007), Nr. 6, 581–587
- [27] CHAPMAN, D. ; WILLIAMS, R. M. ; LADBROOKE, B. D.: Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins). In: *Chemistry and Physics of Lipids* 1 (1967), Nr. 5, 445–475
- [28] CHEN, D. T. ; WEN, Q. ; JANMEY, P. A. ; CROCKER, J. C. ; YODH, A. G.: Rheology of Soft Materials. In: *Annual Review of Condensed Matter Physics* 1 (2010), Nr. 1, 301–322
- [29] CHIA, C. P. ; SHARIFF, A. ; SAVAGE, S. A. ; LUNA, E. J.: The integral membrane protein, ponticulin, acts as a monomer in nucleating actin assembly. In: *Journal of Cell Science* 120 (1993), Nr. 4, 909–922
- [30] CLAESSENS, M. M. A. E. ; BATHE, M. ; FREY, E. ; BAUSCH, A. R.: Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. In: *Nature Materials* 5 (2006), Nr. 9, 748–753
- [31] CORTESE, J. D.: Actin Polymerization Induces a Shape Change in Actin-Containing Vesicles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989), Nr. 15, 5773–5777
- [32] CROCKER, J. C.: Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 179 (1996), Nr. 1, 298–310
- [33] DANCKER, P. ; LÖW, I. ; HASSELBACH, W. ; WIELAND, T. : Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 400 (1975), Nr. 2, 407–414
- [34] DAVIES, K. J. ; DELSIGNORE, M. E. ; LIN, S. W.: Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of Amino Acids. In: *The Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), Nr. 20, 9902–9907
- [35] DE LA CRUZ, E. M. ; MANDINOVA, A. ; STEINMETZ, M. O. ; STOFFLER, D. ; AEBI, U. ; POLLARD, T. D.: Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. In: *Journal of Molecular Biology* 295 (2000), Nr. 3, 517–526

- [36] DELPLANCKE, J. L. ; DEGREGZ, M. ; FONTANA, A. ; WINAND, R. : Self-colour anodizing of titanium. In: *Surface Technology* 16 (1982), Nr. 2, 153–162
- [37] DEVAUX, P. F.: Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. In: *Biochemistry* 30 (1991), Nr. 5, 1163–1173
- [38] DEVAUX, P. ; MCCONNELL, H. : Lateral Diffusion in Spin-Labeled Phosphatidylcholine Multilayers. In: *Journal of the American Chemical Society* 94 (1972), Nr. 13, 4475–4481
- [39] DICHTL, M. A. ; SACKMANN, E. : Colloidal probe study of short time local and long time reptational motion of semiflexible macromolecules in entangled networks. In: *New Journal of Physics* 1 (1999), Nr. 18, 18.1–18.11
- [40] DOEVEN, M. K. ; FOLGERING, J. H. a. ; KRASNIKOV, V. ; GEERTSMA, E. R. ; BOGAART, G. van d. ; POOLMAN, B. : Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), Nr. 2, 1134–1142
- [41] DOHERTY, G. J. ; MCMAHON, H. T.: Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. In: *Annual Review of Biophysics* 37 (2008), 65–95
- [42] DOI, M. ; EDWARDS, S. F.: Dynamics of rod-like macromolecules in concentrated solution. Part 1. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* 74 (1978), Nr. 6, 560–570
- [43] DOI, M. ; EDWARDS, S. F.: Dynamics of rod-like macromolecules in concentrated solution. Part 2. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* 74 (1978), 918–932
- [44] DUFFY, D. C. ; McDONALD, J. C. ; SCHUELLER, O. J. ; WHITESIDES, G. M.: Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Nr. 23, 4974–4984
- [45] DUFRESNE, E. R. ; SPALDING, G. C. ; DEARING, M. T. ; SHEETS, S. A. ; GRIER, D. G.: Computer-generated holographic optical tweezer arrays. In: *Review of Scientific Instruments* 72 (2001), Nr. 3, 1810–1816
- [46] EDWARDS, H. : Interference in Thin Metallic Films. In: *Physical Review* 38 (1931), Nr. 1, 166–173
- [47] EDWARDS, S. F. ; VILGIS, T. A.: The tube model theory of rubber elasticity. In: *Reports on Progress in Physics* 51 (1988), Nr. 2, 243–297
- [48] EFREMOV, A. ; MAURO, J. C. ; RAGHAVAN, S. : Macroscopic model of phospholipid vesicle spreading and rupture. In: *Langmuir* 20 (2004), Nr. 14, 5724–5731

- [49] EINSTEIN, A. : Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. In: *Annalen der Physik* 322 (1905), Nr. 8, 549–560
- [50] ENGELMAN, D. M.: Membranes are more mosaic than fluid. In: *Nature* 438 (2005), Nr. 7068, 578–580
- [51] ESTES, D. J. ; MAYER, M. : Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids. In: *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* 42 (2005), Nr. 2, 115–123
- [52] ESUE, O. ; TSENG, Y. ; WIRTZ, D. : Alpha-actinin and filamin cooperatively enhance the stiffness of actin filament networks. In: *PloS One* 4 (2009), Nr. 2, e4411 – 1–6
- [53] EVANS, R. M. L.: Transforming from time to frequency without artefacts. In: *Soft Condensed Matter* 50 (2009), Nr. 1, 76–86
- [54] EVANS, R. M. L. ; TASSIERI, M. ; AUHL, D. ; WAIGH, T. A.: Direct conversion of rheological compliance measurements into storage and loss moduli. In: *Physical Review E* 80 (2009), Nr. 1, 012501 – 1–4
- [55] FELGNER, H. ; FRANK, R. ; SCHLIWA, M. : Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. In: *Journal of Cell Science* 109 (1996), 509–516
- [56] FOOTER, M. J. ; KERSEMAKERS, J. W. J. ; THERIOT, J. A. ; DOGTEROM, M. : Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007), Nr. 7, 2181–2186
- [57] FUJIWARA, I. ; TAKAHASHI, S. ; TADAKUMA, H. ; FUNATSU, T. ; ISHIWATA, S. : Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. In: *Nature Cell Biology* 4 (2002), Nr. 9, 666–673
- [58] FUJIWARA, I. ; VAVYLONIS, D. ; POLLARD, T. D.: Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007), Nr. 21, 8827–8832
- [59] FUNAKOSHI, K. ; SUZUKI, H. ; TAKEUCHI, S. : Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), Nr. 42, 12608–12609
- [60] GARCÍA-SÁEZ, A. J. ; SCHWILLE, P. : Surface analysis of membrane dynamics. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1798 (2010), Nr. 4, 766–776

- [61] GARDEL, M. L. ; VALENTINE, M. T. ; CROCKER, J. C. ; BAUSCH, A. ; WEITZ, D. A.: Microrheology of entangled F-actin solutions. In: *Physical Review Letters* 91 (2003), Nr. 15, 158302 – 1–4
- [62] GARDEL, M. L. ; VALENTINE, M. T. ; WEITZ, D. A.: Microrheology. In: *Microscale Diagnostic Techniques*. 2005, S. 1–50
- [63] GEIGER, B. ; SPATZ, J. P. ; BERSHADSKY, A. D.: Environmental sensing through focal adhesions. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (2009), Nr. 1, 21–33
- [64] GITTES, F. ; MICKY, B. ; NETTLETON, J. ; HOWARD, J. : Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. In: *The Journal of Cell Biology* 120 (1993), Nr. 4, 923–934
- [65] GORTER, E. ; GREDEL, F. : On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. In: *Journal of Experimental Medicine* 41 (1925), Nr. 4, 439–443
- [66] GRANEK, R. : From Semi-Flexible Polymers to Membranes: Anomalous Diffusion and Reptation. In: *Journal de Physique II* 7 (1997), Nr. 12, 1761–1788
- [67] GREEN, N. M.: Avidin and streptavidin. In: *Methods in Enzymology* 184 (1990), 51–67
- [68] GRØNBECH-JENSEN, N. ; MASHL, R. ; BRUINSMA, R. ; GELBART, W. : Counterion-Induced Attraction between Rigid Polyelectrolytes. In: *Physical Review Letters* 78 (1997), Nr. 12, 2477–2480
- [69] GRUBMÜLLER, H. ; HEYMANN, B. ; TAVAN, P. : Ligand binding: molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force. In: *Science* 271 (1996), Nr. 5251, 997–999
- [70] GUCK, J. ; ANANTHAKRISHNAN, R. ; MAHMOOD, H. ; MOON, T. J. ; CUNNINGHAM, C. C. ; KÄS, J. A.: The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. In: *Biophysical Journal* 81 (2001), Nr. 2, 767–784
- [71] HÄCKL, W. ; BÄRMANN, M. ; SACKMANN, E. : Shape Changes of Self-Assembled Actin Bilayer Composite Membranes. In: *Physical Review Letters* 80 (1998), Nr. 8, 1786–1789
- [72] HAMAI, C. ; CREMER, P. S. ; MUSSER, S. M.: Single giant vesicle rupture events reveal multiple mechanisms of glass-supported bilayer formation. In: *Biophysical Journal* 92 (2007), Nr. 6, 1988–1999
- [73] HANSEN, C. : Microfluidics in structural biology: smaller, faster... better. In: *Current Opinion in Structural Biology* 13 (2003), Nr. 5, 538–544

- [74] HARADA, Y. : Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. In: *Optics Communications* 124 (1996), Nr. 5-6, 529–541
- [75] HARASZTI, T. ; SCHULZ, S. ; UHRIG, K. ; KURRE, R. ; ROOS, W. ; SCHMITZ, C. ; CURTIS, J. E. ; MAIER, T. ; CLEMEN, A. E. ; SPATZ, J. P.: Biomimetic Models Of The Actin Cortex. In: *Biophysical Reviews and Letters* 4 (2009), Nr. 01 & 02, 17–32
- [76] HAUSER, H. ; GAINS, N. : Spontaneous vesiculation of phospholipids: a simple and quick method of forming unilamellar vesicles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (1982), Nr. 6, 1683–1687
- [77] HAVIV, L. ; BRILL-KARNIELY, Y. ; MAHAFFY, R. ; BACKOUCHE, F. ; BEN-SHAUL, A. ; POLLARD, T. D. ; BERNHEIM-GROSWASSER, A. : Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Nr. 13, 4906–4911
- [78] HAWKINS, M. ; POPE, B. ; MACIVER, S. K. ; WEEDS, a. G.: Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. In: *Biochemistry* 32 (1993), Nr. 38, 9985–9993
- [79] HE, J. ; TANG, J. X.: Surface adsorption and hopping cause probe-size-dependent microrheology of actin networks. In: *Physical Review E* 83 (2011), Nr. 4, 1–13
- [80] HEINEMANN, F. ; SCHWILLE, P. : Preparation of micrometer-sized free-standing membranes. In: *Chemphyschem* 12 (2011), Okt., Nr. 14, 2568–2571
- [81] HELFER, E. ; HARLEPP, S. ; BOURDIEU, L. ; ROBERT, J. ; MACKINTOSH, F. C. ; CHATENAY, D. : Microrheology of biopolymer-membrane complexes. In: *Physical Review Letters* 85 (2000), Nr. 2, 457–460
- [82] HELFER, E. ; HARLEPP, S. ; BOURDIEU, L. ; ROBERT, J. ; MACKINTOSH, F. C. ; CHATENAY, D. : Buckling of Actin-Coated Membranes under Application of a Local Force. In: *Physical Review Letters* 87 (2001), Nr. 8, 088103 – 1–14
- [83] HOFMANN, T. W.: *Membrangebundene Aktinnetzwerke in Riesenvesikeln als biomimetisches Modell des Aktin-Cortex*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Diss., 2009
- [84] HOSEK, M. : Polymer-induced bundling of F actin and the depletion force. In: *Physical Review E* 69 (2004), Nr. 5, 051907 – 1–9
- [85] HU, X. ; KUHN, J. R.: Actin filament attachments for sustained motility in vitro are maintained by filament bundling. In: *PloS one* 7 (2012), Nr. 2, e31385 – 1–18

- [86] HUANG, R. ; CHAVEZ, I. ; TAUTE, K. M. ; LUKIĆ, B. ; JENEY, S. ; RAIZEN, M. G. ; FLORIN, E.-L. : Direct observation of the full transition from ballistic to diffusive Brownian motion in a liquid. In: *Nature Physics* 7 (2011), Nr. 7, 576–580
- [87] INOUE, S. ; HYDE, W. L.: Studies on depolarization of light at microscope lens surfaces. II. The simultaneous realization of high resolution and high sensitivity with the polarizing microscope. In: *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 3 (1957), Nr. 6, 831–838
- [88] INOUE, S. ; KUBOTA, H. : Diffraction anomaly in polarizing microscopes. In: *Nature* 182 (1958), Nr. 4651, 1725–1726
- [89] INSALL, R. ; MACHESKY, L. : Cytoskeleton. In: *Encyclopedia of Life Sciences* (2001), Nr. c, S. 1–7
- [90] ISAMBERT, H. ; VENIER, P. ; MAGGS, A. C. ; FATTOUM, A. ; KASSAB, R. ; PANTALONI, D. ; CARLIER, M. F.: Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), Nr. 19, 11437–11444
- [91] ISENBERG, G. : Actin binding proteins -lipid interactions. In: *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 12 (1991), Nr. 2, 136–144
- [92] ISMAGILOV, R. F.: Integrated microfluidic systems. In: *Angewandte Chemie* 42 (2003), Nr. 35, 4130–4132
- [93] JANMEY, P. A.: Cell Membranes and the Cytoskeleton. In: *Handbook of Biological Physics* 1 (1995), S. 805–849
- [94] JANMEY, P. A. ; TANG, J. X. ; SCHMIDT, C. F.: Actin Filaments. In: *Biophysical Textbook Online*. 1999, S. 1–32
- [95] JESORKA, A. ; ORWAR, O. : Liposomes: technologies and analytical applications. In: *Annual Review of Analytical Chemistry* 1 (2008), 801–832
- [96] JOHNSON, B. R. G. ; BUSHBY, R. J. ; COLYER, J. ; EVANS, S. D.: Self-assembly of actin scaffolds at ponticulin-containing supported phospholipid bilayers. In: *Biophysical Journal* 90 (2006), Nr. 3, L21–L23
- [97] KELLER, M. ; THARMANN, R. ; DICHTL, M. A. ; BAUSCH, A. ; SACKMANN, E. : Slow filament dynamics and viscoelasticity in entangled and active actin networks. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 361 (2003), Nr. 1805, 699–712

- [98] KESTIN, J. ; SOKOLOV, M. ; WAKEHAM, W. A.: Viscosity of liquid water in the range $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 7 (1978), Nr. 3, 941–948
- [99] KIERFELD, J. ; GUTJAHR, P. ; KÜHNE, T. ; KRAIKIVSKI, P. ; LIPOWSKY, R. : Buckling, Bundling, and Pattern Formation: From Semi-Flexible Polymers to Assemblies of Interacting Filaments. In: *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience* 3 (2006), Nr. 6, 898–911
- [100] KLAUDA, J. B. ; ROBERTS, M. F. ; REDFIELD, A. G. ; BROOKS, B. R. ; PASTOR, R. W.: Rotation of lipids in membranes: molecular dynamics simulation, 31P spin-lattice relaxation, and rigid-body dynamics. In: *Biophysical Journal* 94 (2008), Nr. 8, 3074–3083
- [101] KLEIN, K. : *Untersuchung von Adhäsionscharakteristika mittels physikalischer Messungen zur Selektion von Tumorzellen*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Diss., 2012
- [102] KOJIMA, H. ; ISHIJIMA, A. ; YANAGIDA, T. : Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994), Nr. 26, 12962–12966
- [103] KORN, E. D. ; CARLIER, M.-F. ; PANTALONI, D. : Actin polymerization and ATP hydrolysis. In: *Advances in Biophysics* 26 (1987), Nr. 4827, 51–73
- [104] KUSUMI, A. ; NAKADA, C. ; RITCHIE, K. ; MURASE, K. ; SUZUKI, K. ; MURAKOSHI, H. ; KASAI, R. S. ; KONDO, J. ; FUJIWARA, T. : Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 34 (2005), 351–378
- [105] LADHA, S. ; MACKIE, A. R. ; HARVEY, L. J. ; CLARK, D. C. ; LEA, E. J. ; BRULLEMANS, M. ; DUCLOHIER, H. : Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. In: *Biophysical Journal* 71 (1996), Nr. 3, 1364–1373
- [106] LASIC, D. D.: The mechanism of vesicle formation. In: *The Biochemical Journal* 256 (1988), Nr. 1, 1–11
- [107] LAU, a. ; PINCUS, P. : Counterion condensation and fluctuation-induced attraction. In: *Physical Review E* 66 (2002), Nr. 4, 041501 – 1–14

- [108] LEE, H. ; FERRER, J. M. ; NAKAMURA, F. ; LANG, M. J. ; KAMM, R. D.: Passive and active microrheology for cross-linked F-actin networks in vitro. In: *Acta Biomaterialia* 6 (2010), Nr. 4, 1207–1218
- [109] LEE, K. ; GALLOP, J. L. ; RAMBANI, K. ; KIRSCHNER, M. W.: Self-assembly of filopodia-like structures on supported lipid bilayers. In: *Science* 329 (2010), Nr. 5997, 1341–1345
- [110] LEHRER, S. S.: Damage to actin filaments by glutaraldehyde: protection by tropomyosin. In: *The Journal of Cell Biology* 90 (1981), Nr. 2, 459–466
- [111] LIELEG, O. ; CLAESSENS, M. M. A. E. ; LUAN, Y. ; BAUSCH, A. : Transient binding and dissipation in cross-linked actin networks. In: *Physical Review Letters* 101 (2008), Nr. 10, 108101 – 1–4
- [112] LIELEG, O. ; SCHMOLLER, K. M. ; CLAESSENS, M. M. A. E. ; BAUSCH, A. : Cytoskeletal polymer networks: viscoelastic properties are determined by the microscopic interaction potential of cross-links. In: *Biophysical Journal* 96 (2009), Nr. 11, 4725–4732
- [113] LIMOZIN, L. ; SENGUPTA, K. : Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion. In: *Chemphyschem* 10 (2009), Nr. 16, 2752–2768
- [114] LIN, I.-K. ; OU, K.-S. ; LIAO, Y.-M. ; LIU, Y. ; CHEN, K.-S. ; ZHANG, X. : Viscoelastic Characterization and Modeling of Polymer Transducers for Biological Applications. In: *Journal of Microelectromechanical Systems* 18 (2009), Nr. 5, 1087–1099
- [115] LINGWOOD, D. ; SIMONS, K. : Lipid rafts as a membrane-organizing principle. In: *Science* 327 (2010), Nr. 5961, 46–50
- [116] LIPOWSKY, R. ; BRINKMANN, M. ; DIMOVA, R. ; FRANKE, T. ; KIERFELD, J. ; ZHANG, X. : Droplets, bubbles, and vesicles at chemically structured surfaces. In: *Journal of Physics. Condensed Matter* 17 (2005), Nr. 9, S537–S558
- [117] LIPOWSKY, R. ; SEIFERT, U. : Adhesion of membranes: a theoretical perspective. In: *Langmuir* 7 (1991), Nr. 9, 1867–1873
- [118] LOETTERS, J. C. ; OLTHUIS, W. ; VELTINK, P. H. ; BERGVELD, P. : The mechanical properties of the rubber elastic polymer polydimethylsiloxane for sensor applications. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 7 (1997), Nr. 3, 145–147
- [119] LUAN, Y. ; LIELEG, O. ; WAGNER, B. ; BAUSCH, A. R.: Micro- and macrorheological properties of isotropically cross-linked actin networks. In: *Biophysical Journal* 94 (2008), Nr. 2, 688–693
- [120] MACKINTOSH, F. C. ; JANMEY, P. A.: Actin gels. In: *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2 (1997), Nr. 3, S. 350–357

- [121] MACKINTOSH, F. C. ; SCHMIDT, C. F.: Microrheology. In: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 4 (1999), 300–307
- [122] MACLEAN-FLETCHER, S. ; POLLARD, T. D.: Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 96 (1980), Nr. 1, 18–27
- [123] MAIER, T. ; BOEHM, H. ; HARASZTI, T. : Spline-like interpolation in particle tracking microrheology. In: *Physical Review E* 86 (2012), Nr. 1, 011501 – 1–7
- [124] MAIER, T. ; HARASZTI, T. : Python algorithms in particle tracking microrheology. In: *Chemistry Central Journal* 6 (2012), Nr. 1, 144 – 1–9
- [125] MANNING, G. S.: The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. In: *Quarterly reviews of biophysics* 11 (1978), Nr. 2, 179–246
- [126] MANNING, G. S.: Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties. In: *The Journal of Chemical Physics* 51 (1969), Nr. 3, 924–933
- [127] MARGOSSIAN, S. S. ; LOWEY, S. : Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. In: *Methods in Enzymology* 85 Pt B (1982), 55–71
- [128] MASON, T. G.: Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized Stokes-Einstein equation. In: *Rheologica Acta* 39 (2000), Nr. 4, 371–378
- [129] MASON, T. G. ; GANESAN, K. ; ZANTEN, J. van ; WIRTZ, D. ; KUO, S. C.: Particle tracking microrheology of complex fluids. In: *Physical Review Letters* 79 (1997), Nr. 17, 3282–3285
- [130] MASON, T. G. ; WEITZ, D. A.: Optical Measurements of Frequency-Dependent Linear Viscoelastic Moduli of Complex Fluids. In: *Physical Review Letters* 74 (1995), Nr. 7, 1250–1253
- [131] MAUPIN-SZAMIER, P. ; POLLARD, T. D.: Actin filament destruction by osmium tetroxide. In: *The Journal of Cell Biology* 77 (1978), Nr. 3, 837–852
- [132] MAYER, L. D. ; HOPE, M. J. ; CULLIS, P. R.: Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 858 (1986), Nr. 1, 161–168
- [133] MEEUSEN, R. L. ; CANDE, W. Z.: N-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin. A probe for actomyosin interactions. In: *The Journal of Cell Biology* 82 (1979), Nr. 1, 57–65
- [134] MEHTA, A. D. ; ROCK, R. S. ; RIEF, M. ; SPUDICH, J. A. ; MOOSEKER, M. S. ; CHENEY, R. E.: Myosin-V is a processive actin-based motor. In: *Nature* 400 (1999), Nr. 6744, 590–593

- [135] MERZLYAKOV, M. ; LI, E. ; GITSOV, I. ; HRISTOVA, K. : Surface-supported bilayers with transmembrane proteins: role of the polymer cushion revisited. In: *Langmuir* 22 (2006), Nr. 24, 10145–10151
- [136] METWALLI, E. ; HAINES, D. ; BECKER, O. ; CONZONE, S. ; PANTANO, C. G.: Surface characterizations of mono-, di-, and tri-aminosilane treated glass substrates. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 298 (2006), Nr. 2, 825–831
- [137] MEY, I. ; STEPHAN, M. ; SCHMITT, E. K. ; MÜLLER, M. M. ; BEN AMAR, M. ; STEINEM, C. ; JANSHOFF, A. : Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers. In: *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009), Nr. 20, 7031–7039
- [138] MOFFITT, J. R. ; CHEMLA, Y. R. ; SMITH, S. B. ; BUSTAMANTE, C. : Recent advances in optical tweezers. In: *Annual Review of Biochemistry* 77 (2008), 205–228
- [139] MOFRAD, M. R. K.: Rheology of the Cytoskeleton. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 41 (2009), Nr. 1, 433–453
- [140] MONTES, L.-R. ; ALONSO, A. ; GOÑI, F. M. ; BAGATOLLI, L. A.: Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. In: *Biophysical Journal* 93 (2007), Nr. 10, 3548–3554
- [141] MORALES-PENNINGSTON, N. F. ; WU, J. ; FARKAS, E. R. ; GOH, S. L. ; KONYAKHINA, T. M. ; ZHENG, J. Y. ; WEBB, W. W. ; FEIGENSON, G. W.: GUV preparation and imaging: minimizing artifacts. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1798 (2010), Nr. 7, 1324–1332
- [142] MORNET, D. ; UE, K. : Proteolysis and structure of skeletal muscle actin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (1984), Nr. 12, 3680–3684
- [143] MORONE, N. ; FUJIWARA, T. ; MURASE, K. ; KASAI, R. S. ; IKE, H. ; YUASA, S. ; USUKURA, J. ; KUSUMI, A. : Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. In: *The Journal of Cell Biology* 174 (2006), Nr. 6, 851–862
- [144] MORRA, M. ; OCCHIELLO, E. ; MAROLA, R. ; GARBASSI, F. ; HUMPHREY, P. ; JOHNSON, D. : On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 137 (1990), Nr. 1, 11–24
- [145] MORSE, D. C.: Viscoelasticity of Concentrated Isotropic Solutions of Semiflexible Polymers. 1. Model and Stress Tensor. In: *Society* 9297 (1998), Nr. 98, S. 7030–7043
- [146] MORSE, D. C.: Viscoelasticity of Concentrated Isotropic Solutions of Semiflexible Polymers. 2. Linear Response. In: *Macromolecules* 31 (1998), Nr. 20, 7044–7067

- [147] MURRELL, M. ; PONTANI, L.-L. ; GUEVORKIAN, K. ; CUVELIER, D. ; NASSOY, P. ; SYKES, C. : Spreading dynamics of biomimetic actin cortices. In: *Biophysical Journal* 100 (2011), Nr. 6, 1400–1409
- [148] NELSON, P. : *Biological Physics*. W. H. Freeman and Company, 2004
- [149] NICOLSON, P. C. ; VOGT, J. : Soft contact lens polymers: an evolution. In: *Biomaterials* 22 (2001), Nr. 24, 3273–3283
- [150] NOMURA, S.-i. M. ; TSUMOTO, K. ; HAMADA, T. ; AKIYOSHI, K. ; NAKATANI, Y. ; YOSHIKAWA, K. : Gene expression within cell-sized lipid vesicles. In: *Chembiochem* 4 (2003), Nr. 11, 1172–1175
- [151] ODRONITZ, F. ; KOLLMAR, M. : Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. In: *Genome Biology* 8 (2007), Nr. 9, R196.1–R196.22
- [152] OLZIERSKY, A. ; BARQUINHA, P. ; VILA, A. ; PEREIRA, L. ; GONCALVES, G. ; FORTUNATO, E. ; MARTINS, R. ; MORANTE, J. R.: Insight on the SU-8 resist as passivation layer for transparent Ga₂O₃-In₂O₃-ZnO thin-film transistors. In: *Journal of Applied Physics* 108 (2010), Nr. 6, 064505 – 1–7
- [153] OTT, A. ; MAGNASCO, M. ; SIMON, A. ; LIBCHABER, A. : Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. In: *Physical Review E* 48 (1993), Nr. 3, 1642–1645
- [154] OWEN, M. J. ; SMITH, P. J.: Plasma treatment of polydimethylsiloxane. In: *Journal of Adhesion Science and Technology* 8 (1994), Nr. 10, 1063–1075
- [155] PALMER, A. ; MASON, T. G. ; XU, J. ; KUO, S. C. ; WIRTZ, D. : Diffusing Wave Spectroscopy Microrheology of Actin Filament Networks. In: *Biophysical Journal* 76 (1999), Nr. 2, 1063–1071
- [156] PARDEE, J. D. ; SPUDICH, J. A.: Purification of muscle actin. In: *Methods in Enzymology* 85 Pt B (1982), 164–181
- [157] PELLEGRIN, S. ; MELLOR, H. : Actin stress fibres. In: *Journal of Cell Science* 120 (2007), Nr. Pt 20, 3491–3499
- [158] PELLETIER, V. ; GAL, N. ; FOURNIER, P. ; KILFOIL, M. : Microrheology of Microtubule Solutions and Actin-Microtubule Composite Networks. In: *Physical Review Letters* 102 (2009), Nr. 18, 100–103
- [159] PIKE, L. J.: The challenge of lipid rafts. In: *Journal of Lipid Research* 50 Suppl (2009), S323–S328

- [160] PINCET, F. ; HUSSON, J. : The solution to the streptavidin-biotin paradox: the influence of history on the strength of single molecular bonds. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), Nr. 6, 4374–4381
- [161] PLOEM, J. S.: Reflection-contrast microscopy as a tool for investigation of the attachment of living cells to a glass surface. In: *Mononuclear phagocytes in immunity infection, and pathology. Blackwell Scientific Publications* (1975), S. 404–421
- [162] POLLARD, T. D.: Polymerization of ADP-actin. In: *The Journal of Cell Biology* 99 (1984), Nr. 3, 769–777
- [163] POLLARD, T. D.: Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. In: *The Journal of Cell Biology* 103 (1986), Nr. 6 Pt 2, 2747–2754
- [164] POTT, T. ; BOUVRAIS, H. ; MÉLÉARD, P. : Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 154 (2008), Nr. 2, 115–119
- [165] PRESTEGARD, J. H. ; O'BRIEN, M. P.: Membrane and Vesicle Fusion. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 38 (1987), Nr. 1, 383–411
- [166] PUFF, N. ; ANGELOVA, M. I.: Development and Applications for Studying Membrane Heterogeneity and Interactions. In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 5 (2006), S. 173–228
- [167] QUALMANN, B. ; KESSELS, M. M. ; KELLY, R. B.: Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. In: *The Journal of cell biology* 150 (2000), Nr. 5, F111–F116
- [168] QUINTAS, M. ; BRANDÃO, T. R. S. ; SILVA, C. L. M. ; CUNHA, R. L.: Rheology of supersaturated sucrose solutions. In: *Journal of Food Engineering* 77 (2006), Nr. 4, 844–852
- [169] REEVES, J. P. ; DOWBEN, R. M.: Water permeability of phospholipid vesicles. In: *The Journal of Membrane Biology* 3 (1970), Nr. 1, 123–141
- [170] REMEDIOS, C. G. ; CHHABRA, D. ; KEKIC, M. ; DEDOVA, I. V. ; TSUBAKIHARA, M. ; BERRY, D. a. ; NOSWORTHY, N. J.: Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. In: *Physiological Reviews* 83 (2003), Nr. 2, 433–473
- [171] REYMANN, A.-C. ; MARTIEL, J.-L. ; CAMBIER, T. ; BLANCHOIN, L. ; BOUJEMAA-PATERSKI, R. ; THÉRY, M. : Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. In: *Nature Materials* 9 (2010), Nr. 10, 827–832

- [172] RICHTER, R. ; MUKHOPADHYAY, A. ; BRISSON, A. : Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. In: *Biophysical Journal* 85 (2003), Nr. 5, 3035–3047
- [173] RICHTER, R. P. ; BÉRAT, R. ; BRISSON, A. R.: Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. In: *Langmuir* 22 (2006), Nr. 8, 3497–3505
- [174] RODD, A. B. ; DUNSTAN, D. E. ; BOGER, D. V.: Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. In: *Carbohydrate Polymers* 42 (2000), Nr. 2, 159–174
- [175] ROOS, W. : *Biomimetic cytoskeleton assemblies and living cells on micropillar force sensor arrays*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Diss., 2004
- [176] ROOS, W. H. ; ROTH, A. ; KONLE, J. ; PRESTING, H. ; SACKMANN, E. ; SPATZ, J. P.: Freely suspended actin cortex models on arrays of microfabricated pillars. In: *Chemphyschem* 4 (2003), Nr. 8, 872–877
- [177] SAUNDERS, L. ; PERRIN, J. ; GAMMACK, D. : Ultrasonic Irradiation Of Some Phospholipids Sols. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 14 (1962), Nr. 1, 567–572
- [178] SCHMIDT, C. F. ; BAERMANN, M. ; ISENBERG, G. ; SACKMANN, E. : Chain dynamics, mesh size, and diffusive transport in networks of polymerized actin: a quasielastic light scattering and microfluorescence study. In: *Macromolecules* 22 (1989), Nr. 9, 3638–3649
- [179] SCHMOLLER, K. M. ; LIELEG, O. ; BAUSCH, A. : Structural and viscoelastic properties of actin/filamin networks: cross-linked versus bundled networks. In: *Biophysical Journal* 97 (2009), Nr. 1, 83–89
- [180] SCHNURR, B. ; GITTES, F. ; MACKINTOSH, F. C. ; SCHMIDT, C. F.: Determining Microscopic Viscoelasticity in Flexible and Semiflexible Polymer Networks from Thermal Fluctuations. In: *Macromolecules* 30 (1997), Nr. 25, 7781–7792
- [181] SCHOENENBERGER, C. ; STEINMETZ, M. O. ; STOFFLER, D. ; MANDINOVA, A. ; AEBI, U. : Structure, assembly, and dynamics of actin filaments in situ and in vitro. In: *Microscopy research and technique* 47 (1999), Nr. 1, 38–50
- [182] SCHULZ, S. : *Application of Micropillar Interfaces - A Study on Human Periodontal Cells and Actin Biomimetic Systems*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Diss., 2009
- [183] SENGUPTA, K. ; LIMOZIN, L. ; TRISTL, M. ; HAASE, I. ; FISCHER, M. ; SACKMANN, E. : Coupling artificial actin cortices to biofunctionalized lipid monolayers. In: *Langmuir* 22 (2006), Nr. 13, 5776–5785

- [184] SEPT, D. ; MCCAMMON, J. a.: Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. In: *Biophysical Journal* 81 (2001), Nr. 2, 667–674
- [185] SHIH, Y.-L. ; ROTHFIELD, L. : The bacterial cytoskeleton. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (2006), Nr. 3, 729–754
- [186] SHIN, J. H. ; MAHADEVAN, L. ; SO, P. T. ; MATSUDAIRA, P. : Bending stiffness of a crystalline actin bundle. In: *Journal of Molecular Biology* 337 (2004), Nr. 2, 255–261
- [187] SIMMONS, R. : Molecular motors: single-molecule mechanics. In: *Current Biology* 6 (1996), Nr. 4, 392–394
- [188] SIMONS, K. ; IKONEN, E. : Functional rafts in cell membranes. In: *Nature* 387 (1997), Nr. 6633, 569–572
- [189] SINGER, S. J.: A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 195 (1972), 16–23
- [190] SINGER, S. J. ; NICOLSON, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. In: *Science* 175 (1972), Nr. 4023, 720–731
- [191] SMITH, D. ; ZIEBERT, F. ; HUMPHREY, D. ; DUGGAN, C. ; STEINBECK, M. ; ZIMMERMANN, W. ; KÄS, J. A.: Molecular motor-induced instabilities and cross linkers determine biopolymer organization. In: *Biophysical Journal* 93 (2007), Nr. 12, 4445–4452
- [192] SOESANTO, T. ; WILLIAMS, M. C.: Volumetric interpretation of viscosity for concentrated and dilute sugar solutions. In: *The Journal of Physical Chemistry* 85 (1981), Nr. 22, 3338–3341
- [193] SONG, Y.-A. ; BATISTA, C. ; SARPESHKAR, R. ; HAN, J. : Rapid fabrication of microfluidic polymer electrolyte membrane fuel cell in PDMS by surface patterning of perfluorinated ion-exchange resin. In: *Journal of Power Sources* 183 (2008), Nr. 2, 674–677
- [194] STACHOWIAK, J. C. ; RICHMOND, D. L. ; LI, T. H. ; LIU, A. P. ; PAREKH, S. H. ; FLETCHER, D. a.: Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), Nr. 12, 4697–4702
- [195] STREICHFUSS, M. ; ERBS, F. ; UHRIG, K. ; KURRE, R. ; CLEMEN, A. E. ; CHRISTIAN, H. J. B.: Measuring Forces between Two Single Actin Filaments during Bundle Formation. (2011), S. 3676–3680
- [196] STRICKER, J. ; FALZONE, T. ; GARDEL, M. L.: Mechanics of the F-actin cytoskeleton. In: *Journal of Biomechanics* 43 (2010), Nr. 1, 9–14

- [197] STRYER, L. : *Biochemie*. Vieweg+Teubner Verlag
- [198] SUN, Y. L. ; LUO, Z. P. ; AN, K. N.: Stretching short biopolymers using optical tweezers. In: *Biochemical and biophysical research communications* 286 (2001), Nr. 4, 826–830
- [199] SVOBODA, K. ; BLOCK, S. M.: Biological applications of optical forces. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23 (1994), 247–285
- [200] SZOKA, F. ; PAPAHAJDOPOULOS, D. : Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (1978), Nr. 9, 4194–4198
- [201] TANAKA, M. ; SACKMANN, E. : Polymer-supported membranes as models of the cell surface. In: *Nature* 437 (2005), Nr. 7059, 656–663
- [202] TANG, J. X. ; JANMEY, P. A.: The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin bundle formation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 15, 8556–8563
- [203] TOJKANDER, S. ; GATEVA, G. ; LAPPALAINEN, P. : Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles. In: *Journal of Cell Science* 125 (2012), Nr. 8, 1855–1864
- [204] TRISTRAM-NAGLE, S. ; NAGLE, J. F.: Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations, and interactions. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 127 (2004), Nr. 1, 3–14
- [205] TSAI, F.-C. ; STUHRMANN, B. ; KOENDERINK, G. H.: Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes. In: *Langmuir* 27 (2011), Nr. 16, 10061–10071
- [206] TSENG, Y. ; FEDOROV, E. ; MCCAFFERY, J. M. ; ALMO, S. C. ; WIRTZ, D. : Micromechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin: a comparison with alpha-actinin. In: *Journal of Molecular Biology* 310 (2001), Nr. 2, 351–366
- [207] 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. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Nr. 23, 12937–12942
- [208] TYSKA, M. J. ; WARSHAW, D. M.: The Myosin Power Stroke. 51 (2002), Nr. 1, S. 1–15
- [209] URSELL, T. S. ; KLUG, W. S. ; PHILLIPS, R. : Morphology and interaction between lipid domains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), Nr. 32, 13301–13306

- [210] VALENTINE, M. T. ; PERLMAN, Z. E. ; GARDEL, M. L. ; SHIN, J. H. ; MATSUDAIRA, P. ; MITCHISON, T. J. ; WEITZ, D. A.: Colloid surface chemistry critically affects multiple particle tracking measurements of biomaterials. In: *Biophysical Journal* 86 (2004), Nr. 6, 4004–4014
- [211] VAN GELDER, P. ; DUMAS, F. ; WINTERHALTER, M. : Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes. In: *Biophysical Chemistry* 85 (2000), Nr. 2-3, 153–167
- [212] VELVE-CASQUILLAS, G. ; LE BERRE, M. ; PIEL, M. ; TRAN, P. T.: Microfluidic tools for cell biological research. In: *Nano Today* 5 (2010), Nr. 1, 28–47
- [213] VOGEL, S. K. ; SCHWILLE, P. : Minimal systems to study membrane-cytoskeleton interactions. In: *Current Opinion in Biotechnology* (2012), 1055 – 1–8
- [214] WALDE, P. ; COSENTINO, K. ; ENGEL, H. ; STANO, P. : Giant vesicles: preparations and applications. In: *Chembiochem* 11 (2010), Nr. 7, 848–865
- [215] WANG, N. ; STAMENOVIĆ, D. : Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. In: *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279 (2000), Nr. 1, C188–C194
- [216] WEIHS, D. ; MASON, T. G. ; TEITELL, M. A.: Bio-microrheology: a frontier in microrheology. In: *Biophysical Journal* 91 (2006), Nr. 11, 4296–4305
- [217] WEISSE, S. ; HEYDT, M. ; MAIER, T. ; SCHULZ, S. ; SPATZ, J. P. ; GRUNZE, M. ; HARASZTI, T. ; ROSENHAHN, A. : Flow conditions in the vicinity of microstructured interfaces studied by holography and implications for the assembly of artificial actin networks. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011), Nr. 29, 13395–13402
- [218] WELCH, M. D.: The world according to Arp : regulation of actin nucleation by the Arp2 / 3 complex. In: *Trends in Cell Biology* 8924 (1999), Nr. 99, S. 423–427
- [219] WELLS, A. L. ; LIN, A. W. ; CHEN, L. Q. ; SAFER, D. ; CAIN, S. M. ; HASSON, T. ; CARRAGHER, B. O. ; MILLIGAN, R. A. ; SWEENEY, H. L.: Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. In: *Nature* 401 (1999), Nr. 6752, 505–508
- [220] WIELAND, T. : Modification of actins by phallotoxins. In: *Naturwissenschaften* 64 (1977), Nr. 6, 303–309
- [221] WINDER, S. J. ; AYSCOUGH, K. R.: Actin-binding proteins. In: *Journal of Cell Science* 118 (2005), Nr. 4, 651–654
- [222] WINTERHALTER, M. : Black lipid membranes. In: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5 (2000), Nr. 3-4, 250–255

- [223] WIRTZ, D. : Particle-tracking microrheology of living cells: principles and applications. In: *Annual Review of Biophysics* 38 (2009), 301–326
- [224] WONG, I. Y. ; GARDEL, M. L. ; REICHMAN, D. R. ; WEEKS, E. R. ; VALENTINE, M. T. ; BAUSCH, A. ; WEITZ, D. A.: Anomalous diffusion probes microstructure dynamics of entangled F-actin networks. In: *Physical Review Letters* 92 (2004), Nr. 17, 178101 – 1–4
- [225] WOZNIAK, M. A. ; MODZELEWSKA, K. ; KWONG, L. ; KEELY, P. J.: Focal adhesion regulation of cell behavior. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1692 (2004), Nr. 2-3, 103–119
- [226] XIA, Y. ; WHITESIDES, G. M.: Soft Lithography. In: *Annual Review of Materials Science* 28 (1998), Nr. 1, 153–184
- [227] XU, J. ; SCHWARZ, W. H. ; KÄS, J. A. ; STOSSEL, T. P. ; JANMEY, P. A. ; POLLARD, T. D.: Mechanical properties of actin filament networks depend on preparation, polymerization conditions, and storage of actin monomers. In: *Biophysical Journal* 74 (1998), Nr. 5, 2731–2740
- [228] YAMAGUCHI, H. ; CONDEELIS, J. : Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 (2007), Nr. 5, 642–652
- [229] YOON, J.-Y. ; PARK, H.-Y. ; KIM, J.-H. ; KIM, W.-S. : Adsorption of BSA on Highly Carboxylated Microspheres - Quantitative Effects of Surface Functional Groups and Interaction Forces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 177 (1996), Nr. 2, 613–620
- [230] YU, X. ; CARLSSON, a. E.: Multiscale study of counterion-induced attraction and bundle formation of F-actin using an Ising-like mean-field model. In: *Biophysical Journal* 85 (2003), Nr. 6, 3532–3543
- [231] ZAHN, J. T. ; LOUBAN, I. ; JUNGBAUER, S. ; BISSINGER, M. ; KAUFMANN, D. ; KEMKEMER, R. ; SPATZ, J. P.: Age-dependent changes in microscale stiffness and mechanoresponses of cells. In: *Small* 7 (2011), Nr. 10, 1480–1587
- [232] ZHAO, S. R. ; SUN, C. P. ; ZHANG, W. X.: Statistics of wormlike chains. I. Properties of a single chain. In: *The Journal of Chemical Physics* 106 (1997), Nr. 6, 2520–2529

ANHANG A

Softwareanwendungen

A.1 Kamera- und Bühnensteuerungsprogramme

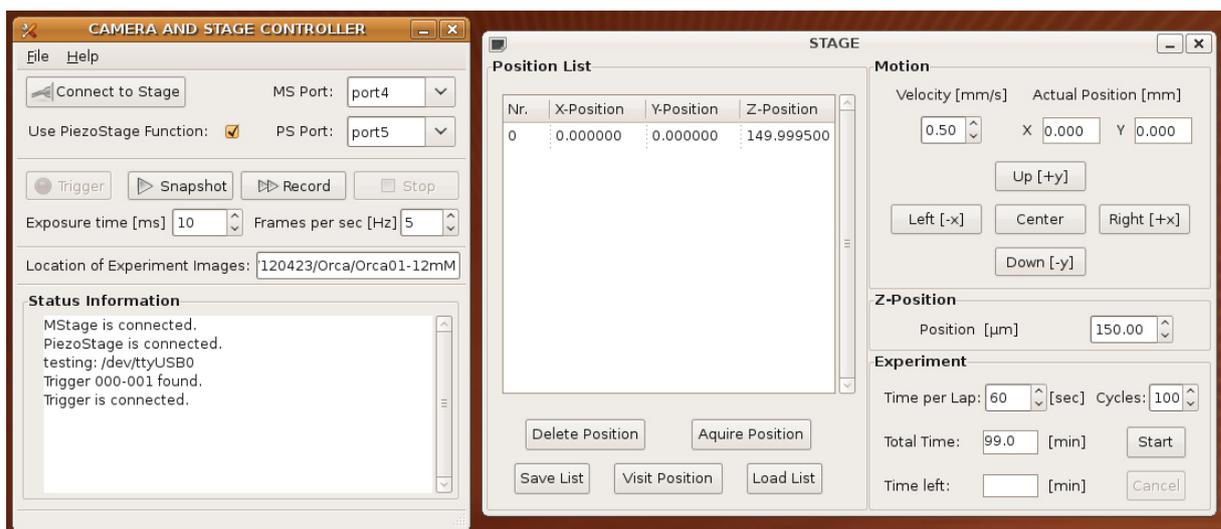


Abbildung A.1: Grafische Benutzeroberfläche zur Kamera- und Tischsteuerung. Das Programm bietet die Möglichkeit zur Speicherung und zum Abruf von Positionsdaten sowie zur Durchführung automatisierter Experimente durch Triggern der Orca-Kameras.

Zur Ansteuerung der Kameras und Mikroskopbühnen wurden mittels der objektorientierten Skriptsprache Python 2.5 modulare Steuerungsprogramme entworfen. Zur Steigerung der Benutzerfreundlichkeit wurden die beiden Hauptprogramme *CameraStageController.py* und *PS-Controller.py* mit Hilfe des Schnittstellen Gestalters Glade 3.0¹ und GTK+ 2.14² mit grafischen Benutzeroberflächen versehen. Dabei dienen die Hauptprogramme neben der Initialisierung der

1 <http://glade.gnome.org/>

2 <http://www.gtk.org/>

Auslese und Weiterleitung der über die Benutzeroberfläche erzeugten Aktionen. Eine Reihe von Steuerungsunterprogrammen sorgt in beiden Fällen für die Kommunikation mit den Peripheriegeräten über RS-232 Schnittstellen. Durch Adaption der zu übermittelnden Kommandobefehle lassen sich die Unterprogramme auf die Ansteuerung verschiedener Geräte anpassen, ohne das Hauptprogramm modifizieren zu müssen. Der Modulare Aufbau ermöglicht so eine erleichterte Portierung auf andere Computer- oder Mikroskopiesysteme. Beide Programmpakete liegen auf der den offiziellen Veröffentlichungen der Arbeit beigefügten CD vor.

Abbildung A.1 zeigt die Benutzeroberfläche des *CameraStageController.py* Hauptprogrammes. Über eine zwischengeschaltete Steuerplatine lässt sich der 532 nm Fluoreszenzlasers simultan mit dem Coriander-Kameraprogramm ansteuern, um so Fluoreszenzsignale ab 10 ms Dauer bei maximalen 16 Hz auszulesen. Probenpositionen lassen sich durch Ansprechen der motorisierten Bühne mittels eines Steuerkreuzes bei variierenden Geschwindigkeiten anfahren. Die Position des Fokus lässt sich durch Änderung der z-Position der Piezobühne auf den jeweils optimalen Wert einstellen. Die Positionsdaten der Bühnen können ausgelesen und gespeichert werden, so dass sich im Rahmen von Langzeitexperimenten zyklische Aufnahmen multipler Probenpunkte durchführen lassen.

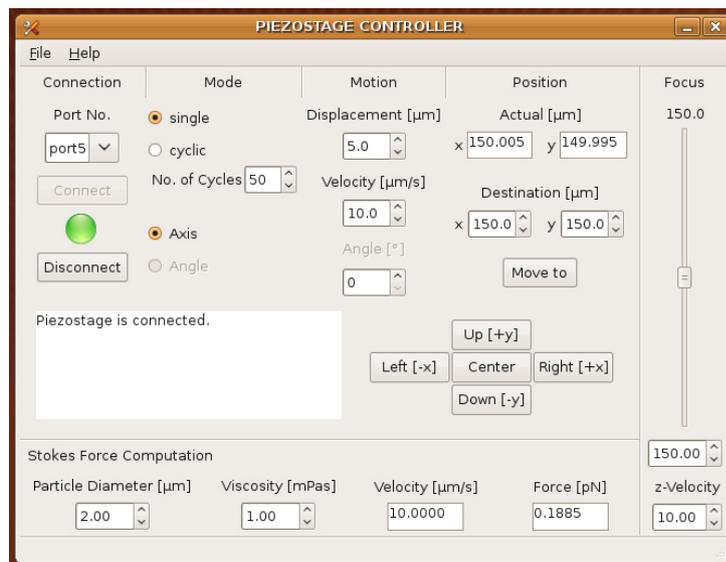


Abbildung A.2: Grafische Benutzeroberfläche zur Piezobühnensteuerung. Das Programm ermöglicht eine exakte Verschiebung und Positionierung der Mikroskopieobjekte mittels der 3-Achsen Piezobühne im Mikrometerbereich. Darüber hinaus lassen sich zyklische Bewegungen durchführen, welche der Kalibration der optischen Pinzette dienen.

Mit einem separaten Programm (Abbildung A.2) lässt sich der volle Funktionsumfang der Piezobühne nutzen. Hauptsächlich für den Einsatz der optischen Pinzette konzipiert lassen sich Bewegungen im Nano- und Mikrometerbereich realisieren. Dabei ist es möglich, neben

der Anfahrung spezifischer Punkte, auch relative, zyklische Verschiebungen durchführen – wie beispielsweise im Rahmen der Fallenkalibration nach Stokes. Für diesen Fall wurde in das Programm die Möglichkeit einer automatischen Berechnung der auf die Probenpartikel ausgeübten Stokes-Kraft integriert.

A.2 Auswerteroutinen

Die zur Auswertung der Partikelpositionen verwandten Routinen basieren auf mehreren in Python 2.7 programmierten Skripten. Das gesammte Programmpaket wurde im Rahmen einer *open access* Publikation [124] veröffentlicht und kann zusammen mit weitergehenden Instruktionen in *LGPLv3*-Lizenz über ChemistryCentral¹ oder Launchpad² bezogen werden.

Die Partikelpositionen wurden unter Anwendung des von *Maria Kilfoil* online publizierten MATLAB-Programmpaketes erlangt (vgl. Abschnitt 5.6). Da die Python-Algorithmen ausgelegt sind für Einpartikelmikrorheologie wurden die einzelnen Partikel vor der Verarbeitung isoliert um anschließend in separaten Dateien gespeichert zu werden. Für das Hauptprogramm *ProcessRheology.py*, welches nach Installation über die Kommandokonsole ausgeführt werden kann, lassen sich durch Festlegung entsprechender Variablen multiple automatisierte Berechnungen durchführen.

Durch Angabe des Pixelfaktors werden die Pixel-Positionsdaten der Probenpartikel in Mikrometer umgerechnet. Aufgrund von Temperaturschwankungen kann es zu einer Drift des Mikroskopobjektivs kommen. Zur Kompensation dieses systematischen Fehlers ist das Programm in der Lage nach Bedarf eine lineare Driftkorrektur durchzuführen. Um die Richtungsabhängigkeit der viskoelastischen Parameter zu ermitteln bestimmt das Programm im Anschluss die Hauptachsen der Partikelverteilung und führt eine Drehung der Positionsdaten durch, um die Hauptachsen mit den Achsen des unterliegenden Koordinatensystems zur Deckung zu bringen.

Aus den bereinigten Positionsdaten der Probenpartikel werden MQV und Kriechfunktion der Bewegung bestimmt. Zur Verbesserung der Statistik wird dabei die mittlere quadratische Verschiebung lediglich bis zu einer Maximalverschiebung bestimmt, die einem viertel der aufgezeichneten Zeitperiode entspricht. Alternativ zu den vorangehenden Berechnungen können auch bereits vorhandene MQV-Daten in das Programm geladen werden. Durch numerische Fouriertransformation werden die spezifischen Werte der Kriechfunktion einer Umwandlung in den Frequenzraum unterzogen und das frequenzabhängige, komplexe Schermodul G^* berechnet. Nach der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Methode wird ein segmentweises Fitting des MQV durchgeführt und die erhaltene Funktion zur Berechnung eines idealisierten G^* Verlauf herangezogen. Alternativ kann auch eine Berechnung nach der Methode von Mason erfolgen. Die Resultate der Auswertung werden unter

1 <http://journal.chemistrycentral.com/content/6/1/144>

2 <https://launchpad.net/microrheology>

Verwendung von gnuplot 4.6¹ zusammen mit tabellarischen Aufzählungen direkt als vektor- oder pixelbasierte Grafikdatei ausgegeben.

1 <http://http://www.gnuplot.info/>

Danksagung

Diese Zeilen wären nicht entstanden, hätten mich nicht so viele fleißige Hände und muntere Geister dabei unterstützt, hätte es nicht Menschen gegeben, mit denen sich Freud und Leid haben teilen lassen. Ein großer Dank gebührt dabei selbstverständlich Herrn Prof. Dr. Joachim Spatz dafür, mir dieses interdisziplinäre Projekt offeriert und zahlreiche Vertragsverlängerungen gewährt zu haben. Ich hoffe, dass sie sich in seinen Augen als gerechtfertigt erwiesen haben. Mir selbst bot sich so die Chance, meinen fächerübergreifenden Horizont zu erweitern und Arbeitstechniken in vielen unterschiedlichen Feldern zu erlernen.

Genauso gilt mein Dank auch den anderen Teilnehmern an meiner Promotionsprüfung, Herrn Prof. Dr. Rainer Fink, Herrn Prof. Dr. Dirk Dubbers sowie Herrn Prof. Dr. Ulrich Schwarz, dem zudem das zweifelhafte, aber daher auch besonders erwähnenswerte Vergnügen zu Teil wurde, Zweitgutachter der vorliegenden Arbeit sein zu dürfen.

Bei Dr. Tamás Haraszti möchte ich mich besonders bedanken für die Unterstützung die er mir als Betreuer im Laufe der vergangenen Jahre zu Teil werden lies. Egal ob es sich um von mir weniger geliebte Programmieraktivitäten an teilweise äußerst zickigen Rechenmaschinen handelte oder um die Planung von Experimenten, egal ob es um theoretische Grundlagen oder die Beschaffung neuer Materialien ging, Tamás war immerzu ein hilfreicher, geduldiger und freundlicher Ansprechpartner und Kollege.

Einen großen Anteil am Erfolg der Arbeit hatten auch die Techniker des Institutes. Erwähnt seien hierbei Herr Jehle, welcher die Inkubationskammer des Mikroskops entworfen hat, Herr Meusch der immer zur Stelle war wenn es um Fragen der Elektronik ging und besonders Herr Schmidt und seine Kollegen aus der Feinwerkstatt. Sie bauten unzählige mechanische Komponenten des Aufbaus, mal komplex - wie im Falle der Inkubationskammer - mal weniger komplex - was die Regel war wenn ich etwas entworfen hatte. Ihre Kompetenz und ständige Ansprechbarkeit waren ein unschlagbarer Vorteil bei der Bewältigung technischer Probleme.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Wissenschaftlern des Dünnschichtlabores am MPI in Stuttgart für die Erzeugung der SiN-Beschichtungen, all den hilfreichen Händen in der Verwaltung, den Sekretärinnen Frau Hess und Frau Pfeilmeier, den Putzfrauen - ohne die das Institut schon längst unter Asche und Dreck versunken wäre wie einst Pompeji - sowie insbesondere den guten Geistern der Labore, Siegrid Riese und Ling Cheng, die mich immerzu mit allem Nötigen versorgten.

Katharina habe ich besonders zu danken, für die Unterstützung bei der Konstruktion des Mikroskopieaufbaus genauso wie für das fleißige Korrekturlesen meiner Arbeit. Auch wenn sie vielleicht nicht halb so verrückt sein mag wie ich, so gilt für sie dennoch das Gleiche was sie auch über mich geschrieben hat: Durch die Hochs und Tiefs und Tiefs des alltäglichen Laborlebens, durch das Auf und Ab der Emotionswelt hat sie sich als eine gute Freundin erwiesen.

Nicht minder viele Auf's und Abs hat Jasmin mit mir durchgestanden. Ihr danke ich vor allem für die vielen, langen Gespräche, all die Partys und den (nicht komplett gescheiterten) Versuch mir das Salsatanzen ein wenig nahe zu bringen.

Am schönsten an all den Praktika die ich zu betreuen hatte war die Tatsache Veronika kennengelernt zu haben. Daraus ist eine Freundschaft entstanden mit wunderschönen Erlebnissen - ob in Heidelberg oder in Stockholm - die mich von der Arbeit und anderen Dingen abgelenkt haben, und an die ich mich immer erinnern werde. Auf dass noch viele Erinnerungen dazu kommen mögen.

Genauso danke ich Elisabeth - nicht nur für ihre fleißige Kommasetzung. In all den Wortgefechten über Vesikel oder unsere gemeinsame fränkische Herkunft hat sie sich als eine mehr als würdige Gegnerin erwiesen, von der ich hoffe sie auch in Zukunft zu meinen Freunden zählen zu können.

Meinen genauso liebreizenden wie auch gescheiten Praktikantinnen Julia & Melissa danke ich für ihre hilfreiche Arbeit und insbesondere für die Freude die ich mit ihnen zusammen hatte.

Anne & Siggie möchte ich danken für den vielen Spaß den wir hatten - zuerst im Labor und dann auch darüber hinaus, genauso wie Seba & Sabri. Mit Euch zusammen ist keine Wand zu steil und keine Route zu schwer!

All den Anderen die mich in den vergangenen Jahren begleitet haben danke ich für jeden einzelnen schönen Moment, von denen es unzählige gab.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich besonders für all die Unterstützung - finanziell, in Form von Naturalien aber auch moralisch - die sie mir im Laufe meines Studiums zukommen ließen. Mehr aber noch danke ich meiner Familie für all die Zeit davor und für das, was noch kommen mag.

...let's go exploring!

Erklärung der Selbstständigkeit

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den

.....

Timo Maier

