

Technische Universität München
Physik Department
Lehrstuhl für Biophysik, E22

Moleküldynamik und Mikrorheologie von Biopolymernetzwerken:
Eine Untersuchung mit kolloidalen Sonden.

Marius Dichtl

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
2. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister

Die Dissertation wurde am 26.06.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 27.08.2001 angenommen.

Für meine Mutter

* 1946 † 2000

Worte des Dankes

An erster Stelle gelten diese meinem Doktorvater, Herrn Professor Sackmann, für das große Vertrauen, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, und die Freiheit, die er mir dabei ließ. Seine Energie und sein Enthusiasmus, mit der er wissenschaftliche Themen angeht, sein reicher Erfahrungsschatz und Ideenreichtum aber auch sein persönliches Engagement für jeden einzelnen Mitarbeiter haben mich sehr beeindruckt.

Ganz herzlich möchte ich mich natürlich auch bei allen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Den beiden „Ehemaligen“ Dr. Florian Ziemann und Dr. Frank G. Schmidt, ohne deren fundierte Kenntnisse und ständige Diskussionsbereitschaft die Einarbeitungsphase zu Aktin- und „Magnetic Tweezers“-Experimenten entschieden länger gedauert hätte. Ohne die Zusammenarbeit mit Florian gäbe es heute nicht die Bildverarbeitungssoftware, die mir erst eine Auswertung meiner Experimente ermöglichte. Danke auch fürs Korrekturlesen der Arbeit. Die äußerst kritischen Diskussionen mit Frank haben meinen Blick oft auf das Wesentliche bei der Interpretation experimenteller Daten gelenkt und ohne den von ihm ins Leben gerufenen Journal Club „Plaste & Elaste“ wäre meine Literaturliste vermutlich etwas kürzer, dafür aber mein Überblick anderer Arbeiten etwas kleiner.

Meiner französischen Schreibtischnachbarin Dr. Cecile Abdelghani, ohne die es alle Experimente zu festkörpergestützten Hyaluronsäurefilmen nicht geben würde. Die von ihr komplett übernommene Herstellung der Präparate ermöglichte mir Messungen ohne lange, nervenaufreibende Vorarbeiten und ihre Geduld mit mir und dem konfokalen Mikroskop bewundere ich heute noch.

Die Diskussionen mit den Theoretikern Prof. Dr. Fred Mackintosh, Dr. habil. Erwin Frey, Dr. habil. Alexei Boulbitch, Dr. Klaus Kroy und Dr. Jan Wilhelm werde ich in guter Erinnerung behalten, da sie mir häufig tiefere Einsichten zur Dynamik einzelner Polymere in verschlauften Aktinnetzwerken bescherten. Ohne die auf meine Versuche zugeschnittenen Arbeiten von Fred, Alexei und Klaus wäre deren Interpretation und Diskussion entschieden kürzer und oberflächlicher ausgefallen.

Hätte Wolfgang Feneberg nicht ausdauernd das Für und Wieder mechanischer Ersatzschaltungen mit mir diskutiert, wäre vieles bei der Interpretation der „Enforced Reptation“-Experimente im Dunklen geblieben. Auch für das geduldige Korrekturlesen bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet.

Ohne meinen Kollegen Bernhard Hinner wäre die Arbeit mit Aktin weniger interessant und kurzweilig gewesen. Bernhard weiß stets immer noch mehr zum Thema semiflexibler Polymere und hat mir oft nützliche Tipps und Hilfestellungen geben können.

Unserer Aktin-Crew Monika Rusp, Frau Kirpal und Dr. Michael Bärman gilt mein besonderer Dank. Ohne das regelmäßig hergestellte, äußerst hochwertige G-Aktin hätte ich meine Versuche gar nicht durchführen können. Für die kleinen wertvollen Hinweise bei Arbeiten im Chemie-Labor bin ich immer noch dankbar, da sie mir oft meine Arbeit wesentlich erleichterten.

Wären Matthias Tristl und Jörg Schilling nicht manchmal für mich in die Bresche gesprungen, um die Fragen und Probleme der Computer-Welt am Lehrstuhl zu lösen, hätte meine Arbeit vermutlich noch ein Jahr länger gedauert. Und ohne die von Jörg neu konzipierte Bildverarbeitungssoftware hätte ich einen Teil meiner Experimente nicht derart elegant auswerten können.

Außerdem geht ein herzliches Dankeschön an alle übrigen E22er, die ich hier nicht namentlich aufgeführt habe, für die außergewöhnlich nette, diskussionsfreundliche und unkomplizierte Atmosphäre.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern und meines Bruders während meines ganzen Studiums könnte ich diese Zeilen hier nicht schreiben. Deshalb gilt auch ihnen meine tief empfundene Dankbarkeit.

Hätte Julia mich in den letzten Monaten nicht öfters auf die Sonnenseite des Lebens begleitet, wäre mein Adrenalinpiegel aber auch Zigaretten- und Kaffeekonsum vermutlich ins Unendliche gestiegen. Dafür und vieles mehr sage ich Dankeschön.

Gliederung

I Zusammenfassung.....	4
II Einführung	6
1 Was ist „Kolloidale Sondentechnik“?	7
2 Kolloidale Sondentechnik in der Rheologie.....	8
2.1 Nicht-Manipulative Methoden.....	8
2.2 Manipulative Methoden	9
2.3 In dieser Arbeit verwendete Methode	10
III Methodischer Teil	11
3 Technische Realisierung.....	12
3.1 Kolloidale SONDENSYSTEME.....	12
3.1.1 Unmagnetische Nanopartikel.....	12
3.1.2 Para- und Ferromagnetische Partikel.....	16
3.2 Analoge Fluoreszenz-Video-Mikroskopie	18
3.3 Konfokale Mikroskopie – Digitale Ultramikroskopie	19
3.4 Rechnergestützte Bildverarbeitung.....	20
3.4.1 Hardware.....	20
3.4.2 Software – Verfolgung der Sondenbewegung	22
3.5 Magnetic Tweezers Aufbau im ‚High Force‘-Modus	23
3.5.1 Überblick	23
3.5.2 Para- und Ferromagnetische Kugeln im inhomogenen Magnetfeld.....	26
3.5.3 Kraft-Kalibration der paramagnetischen Sonden.....	27

4	Viskoelastizität von Polymersystemen	30
4.1	Semiflexible, verschlaufte Polymernetzwerke.....	30
4.1.1	Das ‚Wormlike Chain‘-Modell	31
4.1.2	Dynamik semiflexibler Polymere in Flüssigkeiten.....	33
4.1.3	Reptation semiflexibler Polymere in verschlaufenen Netzwerken	35
4.2	Festkörpergestützte, verschlaufte Polyelektrolytfilme.....	38
4.3	Grundlagen der linearen Viskoelastizitätstheorie.....	40
4.3.1	Deformation und Spannung eines Körpers, Grundgleichung der Linearen Viskoelastizität	40
4.3.2	Mechanische Ersatzmodelle für viskoelastische Systeme.....	43
4.3.3	Transiente Messmethode	45
IV	Experimenteller Teil	48
5	Semiflexible Polymernetzwerke.....	48
5.1	Aktin	48
5.1.1	Präparation von Aktin	51
5.1.2	Konturmarkierung einzelner Aktinfilamente	51
5.1.3	Aktinfilamente für Segmentmarkierung mittels kolloidaler Sondentechnik.....	52
5.2	Diffusion einzelner Polymere im verschlaufenen Netzwerk.....	54
5.2.1	Probenpräparation mit unmagnetischen Partikeln.....	55
5.2.2	Durchführung der Messungen.....	56
5.2.3	Analyse der Kugelfluktuationen – Diffusive Bewegung einzelner Aktinfilamente	58
5.2.4	Lokales Wechselwirkungspotential bei unterschiedlichen Netzwerkkonzentrationen..	64
5.2.4.1	Auswertung	65
5.2.4.2	Ergebnisse und Diskussion	66
5.2.5	Dynamik der Reptation einzelner Polymere.....	69
5.2.5.1	Auswertung	69
5.2.5.2	Ergebnisse und Diskussion	70
5.3	„Enforced Reptation“ – Versetzung einzelner Polymere im verschlaufenen Netzwerk.....	79
5.3.1	Probenpräparation mit magnetischen Partikeln.....	80
5.3.2	Durchführung der Messungen.....	81
5.3.3	Analyse der Kugelbewegung.....	82

5.3.4 Reibungsinduzierte Wechselwirkungen zwischen semiflexiblen Polymeren im verschlauften Netzwerk	86
5.3.4.1 Auswertung	86
5.3.4.2 Ergebnisse und Diskussion	89
5.3.5 „Enforced Reptation“-Untersuchungen als neue mikrorheologische Messtechnik	93
5.3.5.1 Phänomenologisches Modell	93
5.3.5.2 Auswertung	96
5.3.5.3 Ergebnisse und Diskussion	96
5.4 Zusammenfassung	101
6 Festkörpergestützte Polyelektrolytfilme.....	103
6.1 Hyaluronsäure.....	103
6.1.1 Präparation kugelmarkierter, kovalent an Festkörperoberflächen gekoppelter Hyaluronsäureschichten	104
6.2 Diffusive Bewegung der verankerten, kolloidalen Sonden.....	107
6.2.1 Durchführung	108
6.2.2 Analyse der Kugelfluktuationen.....	110
6.2.3 Ergebnisse und Diskussion	113
6.3 Lokale Deformation dünner Schichten mittels MT-Methode.....	117
6.3.1 Durchführung	117
6.3.2 Kraft-Kalibration – Nutzung thermisch getriebener Fluktuationen	119
6.3.3 Ergebnisse und Diskussion	123
6.4 Zusammenfassung	125
7 Ausblick.....	127
V Verwendete Abkürzungen	129
VI Literaturverzeichnis	130
Veröffentlichungen aus dem Themenkreis der Dissertation.....	138
Lebenslauf.....	139

I Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Techniken entwickelt, kolloidale Sonden zur Erforschung der Dynamik einzelner Polymere in Biopolymernetzwerken einzusetzen, um daraus lokale viskoelastische Eigenschaften abzuleiten. Dazu wurden erstmals kolloidale Partikel an einzelne Testpolymere des untersuchten Systems gekoppelt und deren thermische oder magnetisch induzierte Auslenkungen analysiert.

Entscheidend für die Einführung dieser Methode war die Entwicklung neuer Techniken zur Markierung von Polymeren mit Sub-Mikrometer-Partikeln, da nur deren Verwendung eine artefaktfreie Messung der Einzelmoleküldynamik im Netzwerk ermöglicht. Die Verwendung derart kleiner Sonden in einem Magnetkugel-Mikrorheometer („Magnetic Tweezers“) stellte eine technische Herausforderung dar, da völlig neue Kalibrationstechniken entwickelt werden mussten. Die Grundlagen der quantitativen Beschreibung der Dynamik in den untersuchten Systemen bilden neu entwickelte Techniken zur mikroskopischen Beobachtung und anschließenden rechnergestützte Analyse der Partikelbewegung.

Im ersten Teil der Arbeit wurde kolloidale Sondentechnik eingesetzt, um verschlaufte Netzwerke des semiflexiblen Polymers Aktin zu untersuchen. Messungen der thermisch getriebenen Fluktuationen von kugelmakrierten Testfilamenten lieferten direkte mikroskopische Einblicke in die Wechselwirkung des gestreckten Polymers mit dem umgebenden Netzwerk, wobei eine vollständige Beschreibung aller dynamischen Prozesse parallel und senkrecht zur Polymerorientierung auf einer Zeitskala von 4 ms bis 40 min möglich wurde. Die Beschränkung der thermischen Formfluktuationen einzelner Polymere durch das Netzwerk wurde durch Messung des effektiven harmonischen Wechselwirkungspotentials zwischen Testpolymer und der Umgebung quantitativ charakterisiert. Überraschend ist der Befund einer starken lokalen Variation der Kraftkonstanten in einem Netzwerk fester Konzentration, da das klassische Röhrenmodell für Polymere von einem konstanten Wert ausgeht. Untersuchungen zur Dynamik der Reptation im verschlaufenen Netzwerk durch Bestimmung der mittleren quadratischen Verschiebung (engl.: mean square displacement, kurz: MSD) einzelner Polymersegmente lieferten eine Reihe neuer Ergebnisse: Auf kurzen Zeitskalen dominieren entropische und enthalpische Einflüsse auf das Einzelpolymer. Bei längeren Zeiten treten Wechselwirkungen des Polymers mit dem Netzwerk in den Vordergrund, was zu einer Sättigung des MSD führt. Auf langen Zeitskalen diffundiert das Polymer im Netzwerk mit Diffusionskonstanten von 10^{-17} bis 10^{-15} m²/s in guter Überein-

stimmung mit makrorheologischen Untersuchungen. Der Vergleich der Ergebnisse dieser Experimente mit dem klassischen Reptationsröhren-Modell zeigt, dass reibungsinduzierte Wechselwirkungsprozesse in Theorien zu verschlauften semiflexiblen Netzwerken stark unterschätzt werden.

Zur Messung der lokalen Reibungskräfte wurden Magnetische Pinzetten an ein Ende von Testpolymeren gekoppelt und die durch Kraftpulse erzeugte Bewegung der Filamente durch das Netzwerk („Enforced Reptation“) analysiert. Die ermittelte effektive Viskosität verschlauerter Polymersysteme übersteigt den theoretisch geforderten Wert um einen Faktor 10 bis 100 bei starken lokalen Schwankungen, was zeigt, dass die Bedeutung reibungsinduzierter Wechselwirkungen innerhalb semiflexibler Netzwerke größer ist als bisher angenommen.

Die reibungsinduzierte Kopplung des Testpolymers an das umgebende Netzwerk führt zunächst zu dessen lokaler Deformation und anschließender erzwungener Reptation des Filaments. „Enforced Reptation“-Untersuchungen lassen sich deshalb als neues mikrorheologisches Messverfahren ansehen. Aus dem Antwortverhalten des Polymers ließen sich so mit anderen rheologischen Methoden vergleichbare Werte zur lokalen Elastizität und Viskosität des Netzwerks entnehmen, deren große Schwankungsbreiten wiederum augenfällig waren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden festkörpergestützte verschlaupte Filme des flexiblen Biopolymers Hyaluronsäure untersucht. Messungen der thermisch getriebenen Sondenfluktuationen parallel zur Oberfläche lieferten mit dem Modell eines thermisch getriebenen harmonischen Oszillator eine lokale Charakterisierung der erstaunlicherweise sehr homogenen elastisch dominierten Viskoelastizität dieses Systems. In anschließenden „Magnetic Tweezers“-Untersuchungen wurde dies gezielt benutzt, um eine neuartige individuell für jede Sonde verwendbare Kraft-Kalibration zu etablieren. Dabei wurde anhand thermischer Fluktuationen der Sonde die lokale Elastizität des Films ermittelt, um anschließend anhand der durch die Magnetkraft verursachten Auslenkung deren Absolutbetrag zu bestimmen.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass die kolloidale Sondentechnik sehr gut geeignet ist, heterogene makromolekulare Polymernetzwerke mechanisch zu charakterisieren. Insbesondere erlaubt sie die Bestimmung lokaler viskoelastischer Moduln biologischer Substanzen auf Mikrometerskala und eröffnet somit neue Möglichkeiten makroskopische viskoelastische Eigenschaften eines Netzwerks mit der Dynamik von Einzelpolymeren zu korrelieren.

II Einführung

In den letzten Jahren sind viele biologische Materialien aufgrund ihrer viskoelastischen Eigenschaften ins Zentrum biophysikalischer Untersuchungen gerückt (Glasser und Hatakeyama, 1992). Im Zuge dieser Studien kristallisiert sich immer deutlicher heraus, dass die Viskoelastizität dieser Stoffe von der Natur gezielt genutzt wird, um spezielle biologische Problemstellungen möglichst effizient gleichzeitig aber äußerst flexibel zu lösen.

Die Tatsache, dass viele biologische Zellgewebe zu einem hohen Anteil aus relativ weichen viskoelastischen Stoffen bestehen, verdeutlicht die biologische Relevanz dieser Art von Materialien. Als strukturelle Hauptbestandteile z.B. des Zytoskeletts, der Zellmembran oder der extrazellulären Matrix sind sie an einer Vielzahl von lebenswichtigen Prozessen beteiligt. Für das Verständnis der Physik der Zelle ist es deshalb unabdingbar, die für diese Materialien charakteristischen Eigenschaften eingehender zu untersuchen. Um sinnvolle physikalische Modellvorstellungen zu entwickeln, werden häufig *in vitro* Experimente mit einzelnen Zellbestandteilen durchgeführt, da die physikalischen Vorgänge in der ganzen Zelle wegen der Vielzahl beteiligter Stoffe zu komplex sind.

Besonders die rheologischen Eigenschaften, d.h. das Fließverhalten, der viskoelastischen Zellbestandteile, die für so wichtige Vorgänge wie die Zellteilung, die Zellfortbewegung oder die aktive Formveränderung von Zellen entscheidend sind, ist in den letzten Jahren in den Mittelpunkt vieler biophysikalischer Untersuchungen gerückt. Im Zuge einer ersten Charakterisierung mittels makroskopischer Techniken wie der Torsionsrheometrie wurde schnell deutlich, dass v.a. lokale Schwankungen der viskoelastischen Eigenschaften für die Physik der Zelle wichtig sind (Janmey, 1991; Sackmann, 1994). Speziell zur Untersuchung dieser lokalen rheologischen Schwankungen wurden neuartige, experimentelle Messtechniken entwickelt, die eine artefaktfreie und örtlich lokalisierte Quantifizierung der viskosen und elastischen Stoffeigenschaften ermöglichen.

1 Was ist „Kolloidale Sondentechnik“?

Die Kolloid-Chemie liefert wohl die allgemeinste Definition eines *Kolloids*. Man bezeichnet alle Teilchen als *kolloidale Partikel*, deren lineare Dimensionen im Bereich zwischen 10 Å und 1 mm liegen (Hiemenz, 1986). Diese Klassifizierung basiert allein auf Längenangaben und lässt weitere wichtige Charakteristika, wie Teilchenmasse oder die Anzahl der Atome pro Partikel, vollständig außer Acht.

Eine etwas physikalisch orientiertere Abgrenzung eines Kolloids von anderen Materialien geben die folgenden Quellen (Bell Laboratories und Technologies, 1999; Rennie, 2000). Demnach versteht man unter einem Kolloid eine verteilte Dispersion kolloidaler Partikel im Sinne der obigen Definition in einer zweiten kontinuierlichen Phase, wobei die untere Grenze für kolloidale Teilchen bei molekularen Dimensionen gezogen wird und die obere Schranke erreicht ist, wenn externe Kräfte wie z.B. die Schwerkraft die thermischen Kräfte der Brownschen Bewegung der Partikel dominieren. Beispiele für Kolloide sind Tone, Gold Sol und Latex- oder Silica-Partikel.

Im weiteren wird der Begriff der *kolloidalen Sondentechnik* verwendet, um zu beschreiben, dass kolloidale Partikel in mechanischen Kontakt mit einem System gebracht werden, um lokale mechanische Eigenschaften zu untersuchen. In dieser Arbeit wird die kolloidale Sondentechnik speziell zur Erforschung viskoelastischer Eigenschaften eingesetzt.

2 Kolloidale Sondentechnik in der Rheologie

Rheologische Messungen an viskoelastischen Körpern können mit einer Vielzahl von Techniken unter Verwendung kolloidaler Sondentechnik durchgeführt werden. Grob lassen sich zwei Klassen von experimentellen Ansätzen unterscheiden: Techniken, die ausschließlich die thermisch induzierte Brownsche Bewegung der Partikel nutzen, d.h. die Bewegung unter Wirkung einer räumlich isotropen Kräfteverteilung (nicht-manipulative Methoden), und Verfahren, in denen Sondenpartikel aktiv durch Anwendung äußerer Kräfte durch eine räumlich anisotrope Kräfteverteilung ausgelenkt werden (manipulative Methoden).

2.1 Nicht-Manipulative Methoden

Die optisch gestützte Methode der sog. *Einzel-Kugel-Verfolgung* (engl.: single particle tracking, kurz: SPT) nutzt die thermisch getriebene Bewegung einzelner in viskoelastische Körper eingebetteter kolloidalen Sonden für rheologische Untersuchungen (Geerts et al., 1987; Gelles et al., 1988; Peters et al., 1998; Qian und Elson, 1999; Qian et al., 1991; Saxton und Jacobsen, 1997). Die Verfolgung der Brownschen Sondenbewegung mit sehr hoher Ortsauflösung (teils sub-nanometer) und die anschließende Analyse mit Hilfe neuartiger theoretischer Konzepte der statistischen Physik (Gittes et al., 1997; Mason et al., 1997; Qian, 2000) liefert Werte für lokale viskoelastischen Moduln der untersuchten Systeme. Der Vorteil dieser Techniken ist, dass sich das untersuchte System im thermischen Gleichgewicht befindet und deshalb keinerlei Nichtgleichgewichtsphänomene oder andere Messartefakte zu berücksichtigen sind. Nachteilig ist, dass die Bestimmung viskoelastischer Parameter ausschließlich über Anwendung theoretischer Modelle möglich ist. Da Modelle aber häufig Vereinfachungen beinhalten, müssen die Ergebnisse stets kritisch interpretiert werden.

Ein Beispiel einer weiteren rheologischen Technik ist die auf dynamischer Lichtstreuung beruhende Technik der sog. *Diffusing-Wave-Spectroscopy* (kurz: DWS) (Mason et al., 1996; Pine et al., 1988). Bei dieser Technik wird ein hoher Anteil (bis zu 6 Vol.-%) kolloidaler Sonden in viskoelastische Proben als diffuse Streuzentren für den Laserstrahl einer Lichtstreuungsanlage eingebettet. Da sich die Sonden durch thermische Anregungen im viskoelasti-

schen Körper bewegen, enthält die Korrelationsfunktion der aufgezeichneten, zeitaufgelösten Streuintensität Informationen über die rheologischen Eigenschaften des Systems. Über Anwendung allgemeiner Methoden der statistischen Physik unter Verwendung idealisierter Modelle des Systems lassen sich daraus viskoelastische Parameter errechnen. Eine Vielzahl von Biopolymeren wurde bereits mit dieser Technik untersucht (Gisler und Weitz, 1999; Mason und Weitz, 1995; Nisato et al., 2000; Xu et al., 1998). Da die Ableitung viskoelastischer Eigenschaften über die Verwendung theoretischer Modelle erfolgt, gelten die gleichen Einschränkungen wie oben. Außerdem kann der hohe Anteil kolloidaler Sonden zu starken topologischen Störungen des untersuchten Körpers führen, was die Aussagekraft der Ergebnisse zusätzlich beeinträchtigt.

2.2 Manipulative Methoden

Eine Vielzahl rheologischer Untersuchungen an biologischen Systemen wurden in den letzten Jahren mit der Methode der sog. *Magnetischen Pinzette* (engl.: magnetic tweezers, kurz: MT) durchgeführt (Ziemann, 1997). Bei dieser Technik werden para- oder ferromagnetische kolloidale Sonden, die in biologische Proben eingebettet sind, durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes aktiv bewegt. Diese Methode eignet sich hervorragend als Werkzeug für rheologische Untersuchungen biologischer Systeme auf mikroskopischen Längenskalen. Ein besonders großer Vorteil ist, dass genau definierte Kräfte von wenigen Piko- bis hin zu einigen hundert Nanonewton verwendet werden können, d.h. an unterschiedlichsten biologischen Systemen können rheologische Untersuchungen durchgeführt werden. Beispiele sind die Messungen zur Viskoelastizität in Polymernetzwerken (Amblard et al., 1996; Ziemann et al., 1994) oder jüngste Untersuchungen der Oberfläche und des Zytoskeletts von lebenden Zellen (Bausch et al., 1999; Bausch et al., 1998; Feneberg et al., 2001).

Eine weitere rheologische Technik ist die Methode der sog. *Optischen Pinzette* (engl.: optical tweezers, kurz: OT) (Ashkin et al., 1986). Bei dieser Methode können kolloidale Partikel, die einen höheren Brechungsindex als das umgebende Medium besitzen, im Fokus eines Laserstrahls gehalten und so innerhalb der Probe bewegt werden. Diese Methode eignet sich daher hervorragend als universelles Manipulationswerkzeug in Untersuchungen biologischer Proben. Obwohl die Kraft-Kalibration des OT-Aufbaus aufgrund des komplizierten Potentials, in dem sich das gefangene Objekt befindet, schwieriger ist als beim MT-Aufbau,

können auch mit dieser Methode Absolutwerte der Elastizität biologischer Materialien gemessen werden. Ein Beispiel hierfür ist die Messung der Biegesteifigkeit von Mikrotubuli (Felgner et al., 1996). Ein Nachteil ist allerdings die lokale Aufheizung der Probe durch den Laserstrahl, die zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. Weitere Anwendungsgebiete dieser Technik lassen sich dem Übersichtsartikel von Ashkin entnehmen (Ashkin, 1997).

2.3 In dieser Arbeit verwendete Methode

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der kolloidalen Sondentechnik wurde entwickelt, um molekulardynamische Prozesse in Modellsystemen verschlauerter Biopolymere zu untersuchen und daraus lokale viskoelastische Moduln zu bestimmen. Damit lassen sich Beziehungen zwischen makroskopischen viskoelastischen Eigenschaften und molekularen Bewegungsvorgängen heterogener und homogener Biopolymersysteme aufstellen. Im Vergleich zu anderen kolloidalen Techniken bietet die in dieser Arbeit etablierte Technik die Möglichkeit, rheologische Untersuchungen sowohl unter Nutzung rein thermisch getriebener Bewegungen als auch durch Applizieren äußerer Kräfte durchzuführen, wofür die MT-Methode eingesetzt wurde. Sie vereint also charakteristische Aspekte nicht-manipulativer und manipulativer mikrorheologischer Verfahren.

III Methodischer Teil

Im folgenden Abschnitt werden allgemeine, methodische Grundlagen vorgestellt, die bei der Durchführung mikrorheologischer Experimente unter Einsatz kolloidaler Sondentechnik Anwendung finden. Neben Aspekten der technischen Realisierung (Kap. 3) werden auch theoretische Ansätze zur Beschreibung der viskoelastischen Eigenschaften verschlaufener, semiflexibler Polymernetzwerke und dünner stark verschlaufener Polymerschichten (Kap. 4) vorgestellt, die für exakte Auswertung und Diskussion der experimentellen Daten relevant sind.

Zusammenfassend soll dieser Abschnitt klären, wie ein typisches Experiment unter Verwendung kolloidaler Sondentechnik durchgeführt wird, auf welchem Wege man quantitative Information über das untersuchte System erlangen kann und welche weitergehenden, numerischen Analyseverfahren angewendet werden müssen, um physikalisch relevante, diskussionsfähige Information über das untersuchte System zu erlangen.

3 Technische Realisierung

3.1 Kolloidale Sondensysteme

Kolloidale Sondensysteme spielen bei allen in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten eine Schlüsselrolle, da sie das eigentliche Messsystem bei der Untersuchung viskoelastischer Eigenschaften bilden. Anhand ihrer experimentellen Verwendung lassen sich zwei Klassen von Sondensystemen unterscheiden.

Mikrorheologische Untersuchungen an viskoelastischen Systemen unter ausschließlicher Nutzung thermisch getriebener Bewegung der eingebrachten kolloidalen Sonden können mit unmagnetischen Partikeln durchgeführt werden. Untersuchungen hingegen nach der MT-Methode an viskoelastischen Körpern verlangen nach Verwendung magnetischer Partikel. Bei beiden eingesetzten Techniken gilt das Hauptinteresse der Klärung von Wechselwirkungsprozessen auf molekularer Ebene. Deshalb sollten bei beiden Messverfahren möglichst kleine Partikel mit Durchmessern im Nanometerbereich verwendet werden, was bei der Nutzung der MT-Methode aus technischen Gründen nur eingeschränkt realisiert werden kann (vgl. Kap. 3.5).

3.1.1 Unmagnetische Nanopartikel

Partikel, die zum Studium thermisch getriebener Bewegung in Modellsystemen verwendet werden, müssen eine erste triviale Bedingung erfüllen. Um Gravitationseffekte vernachlässigen zu können, muss die Masse der eingesetzten Teilchen möglichst klein sein.

Eine zweite Anforderung an die Teilchen lässt sich mit Hilfe einer einfachen, modellhaften Abschätzung ableiten. In viskosen Medien gilt für die mittlere quadratische Verschiebung $\langle \Delta x(t)^2 \rangle$ einer Kugel durch Diffusion:

$$\langle \Delta x(t)^2 \rangle = \frac{2k_B T \cdot t}{6\pi\eta r} \propto \frac{1}{r} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

unter Berücksichtigung der Einstein-Relation $D\gamma = k_B T$ und dem Reibungskoeffizienten für Stokessche Reibung $\gamma(\text{Kugel}) = 6\pi\eta r$.

Soll in Experimenten die thermisch getriebene Partikelbewegung möglichst einfach zu messen sein, d.h. die mittlere quadratische Verschiebung pro Zeiteinheit möglichst groß sein, ist ein möglichst kleiner Partikeldurchmesser erforderlich. Das maximale optische Auflösungsvermögen der in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopietechniken begrenzt den Durchmesser auf 10 bis 50 nm. Positiver Nebeneffekt der kleinen Sondenabmessungen ist, dass Messartefakte aufgrund lokaler mechanischer oder topologischer Störungen des untersuchten Systems durch die Sonde minimiert werden.

Für einen Vergleich der Daten unterschiedlicher Partikel in einer Probe muss nach Gleichung 3-1 gewährleistet sein, dass diese gleiche Durchmesser besitzen, die eingesetzten Partikel also möglichst monodispers vorliegen.

Für mikrorheologische Experimente ist eine gute mechanische Kopplung der Sonden an das untersuchte System hilfreich. Die Partikel sollten demnach chemisch derart aktivierbar sein, dass sie feste Bindungen mit dem untersuchten System eingehen können.

Zentrale Anforderungen an unmagnetische, kolloidale SONDENSYSTEME sind also: geringe Masse der Teilchen, kleine räumliche Abmessungen, Monodispersität und Möglichkeit zur chemischen Funktionalisierung.

In den später vorgestellten Versuchen (vgl. Kap. 5.2) wurden je nach eingesetzter Mikroskopietechnik zwei Sorten unmagnetischer SONDENSYSTEME verwendet – fluoreszent markierte Latex-Partikel und kolloidales Gold.

Schon seit mehreren Jahrzehnten sind Techniken bekannt, wie aus Polystyrol hochsphärische, monodisperse Latex-Partikel in wässriger Lösung hergestellt werden können (Furusawa et al., 1972; Ottewill und Shaw, 1967; Wiese und Healy, 1970). Die einzelnen Polystyrolketten werden in den Partikeln durch Van-der-Waals-Kräfte und evtl. zusätzlich aufgebraute Oberflächenladungen stabilisiert. Mehrere kommerzielle Anbieter vertreiben diese Kugeln mit Durchmessern zwischen 0.02 und 15 μm , v.a. für zellbiologische Anwendungen. Da die Oberflächen dieser Kugeln relativ einfach chemisch aktiviert werden können, existiert ein breites Angebot unterschiedlichster, molekularbiologisch relevanter Funktionalisierungen. Durch Eindiffundieren von beliebigen Fluoreszenzfarbstoffen (sog. *Fluorophoren*) in den Kugelkörper können sie zusätzlich markiert werden, was sie für fluoreszenzmikroskopische Applikationen verwendbar macht. In mikroskopischen Untersuchungen aus dem Bereich der Zellbiologie werden diese Partikel als Marker für

Zellantigene und als retrograde, neuronale Tracer verwendet. Daneben lassen sie sich auch als spezifische Marker mittels Mikroinjektion in Zellen einbringen und finden als Standardreagenzien in der Fluss-Zytometrie Verwendung.

Die in Kap. 5.2 verwendeten FluoSpheres® der Fa. Molecular Probes (Eugene OR, USA) erfüllen die speziellen oben genannten Anforderungen für unmagnetische Nanopartikel (vgl. Tabelle 3-1). Außerdem bieten sie laut Hersteller die zurzeit größte erreichbare Fluoreszenzausbeute (vgl. Abbildung 3-1a) und sind außergewöhnlich stabil gegenüber Degradationsprozessen des Fluorophors unter Lichteinwirkung (sog. *Bleichprozesse*). Sie werden mit einer auf das untersuchte System optimierten, molekularbiologischen Oberflächenfunktionalisierung angeboten (NeutraLite™ Avidin), die eine sehr gute mechanische Kopplung ermöglicht (vgl. Kap. 5.1). Eine zusammenfassende Darstellung aller charakteristischen Parameter des verwendeten Produkts *FluoSpheres® NeutraLite™ avidin-labeled, red fluorescent* enthält Tabelle 3-1 am Ende dieses Abschnitts.

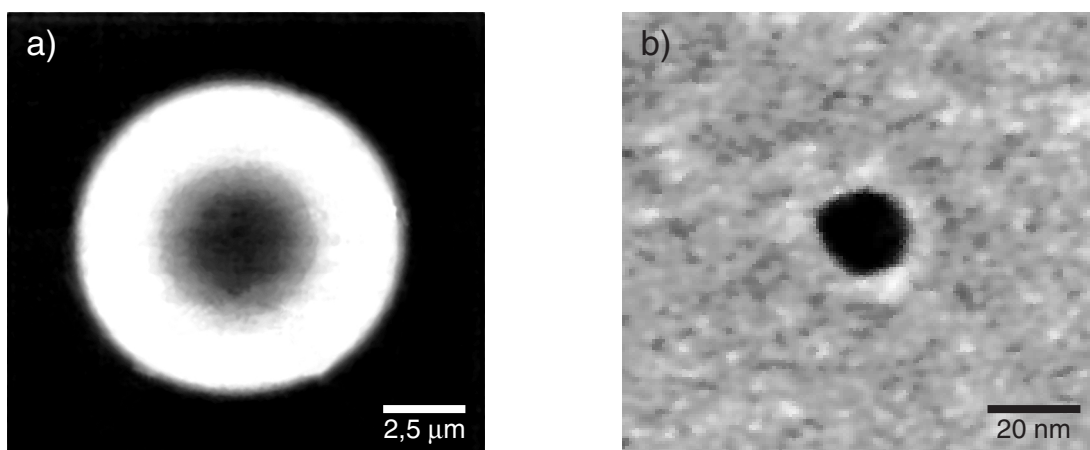


Abbildung 3-1: Verwendete unmagnetische Nanopartikel. a) Fluoreszenzmikroskopisches Schnittbild einer FluoSpheres® Kugel mit einem Durchmesser von 10 µm. Die Kugel ist fast ideal sphärisch und gut mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch die diffusive Einlagerung des Fluorophors ergibt sich eine radialsymmetrische, exponentielle Farbstoffverteilung. b) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Goldkugel mit einem Durchmesser von 20 nm adhäriert auf einem Substrat. Die hohe Elektronendichte von Gold führt zu einer starken Schwärzung im Bereich der Kugel.

Neben Nanopartikeln aus Polystyrol wird in den letzten Jahren in der Molekularbiologie zunehmend kolloidales Gold für Markierungszwecke v.a. für elektronenmikroskopische (kurz: EM) Untersuchungen verwendet. In speziellen Fällungsreaktionen lassen sich diese ebenfalls hochsphärischen, monodispersen Goldkugeln herstellen (Handley und Hayat, 1989). Sie sind inzwischen kommerziell erhältlich mit Durchmessern zwischen 0.8 und 40 nm. Die Oberflächen dieser Partikel können ebenfalls mit unterschiedlichsten, molekular-

biologisch relevanten Funktionalisierungen versehen werden. Typischerweise werden kolloidale Goldkugeln bei EM-Untersuchungen verwendet, da sie aufgrund der hohen Elektronendichte von Gold ein besonders hohes Streuvermögen für Elektronen besitzen. Hierbei ergeben sich ähnliche Einsatzfelder wie bei den oben beschriebenen Polystyrolkugeln. Aufgrund ihrer hohen Elektronendichte besitzen die Kugeln ebenfalls gute Reflektivitätseigenschaften für Licht und eignen sich deshalb auch für optische Mikroskopietechniken, die lokale Unterschiede der Reflektivität einer untersuchten Probe abbilden. Die später vorgestellte konfokale Mikroskopie macht genau das möglich und u.a. deshalb wurde kolloidales Gold eingesetzt (vgl. Kap. 5.2).

Das verwendete Goldkolloid (vgl. Abbildung 3-1b) der Fa. Sigma (Deisenhofen) erfüllt ebenfalls die Anforderungen für unmagnetische Nanopartikel (vgl. Tabelle 3-1). Zudem wird die für das untersuchte System notwendige molekularbiologische Oberflächenfunktionalisierung angeboten (Streptavidin). Eine entsprechende Darstellung aller charakteristischen Parameter des verwendeten Produkts *Streptavidin – 20 nm Colloidal Gold Labeled* enthält Tabelle 3-1.

Produktbezeichnung	FluoSpheres® NeutraLite™ avidin-labeled, red fluorescent	Streptavidin – 20 nm Colloidal Gold Labeled
Materialdichte [g/cm ³]	1.06	19.29
Mittlerer Radius [nm]	17.5	8.9
Monodispersität (CV) [%]	21.6	8.8
Funktionalisierung	NeutraLite™ Avidin	Streptavidin
Partikeldichte [1/ml]	4.2·10 ¹⁴	3.9·10 ¹²

Tabelle 3-1: Charakteristische Parameter der verwendeten unmagnetischen Nanopartikel. Die enthaltenen Daten wurden jeweils den Produktdatenblättern des Herstellers entnommen. Die Monodispersität wird traditionell durch den Parameter 'Coefficient of Variation' angegeben. Definiert ist dieser als der Quotient aus Standardabweichung einer Verteilung und deren Mittelwert gemessen in Prozent. Die Funktionalisierung wird in Kap. 5.1 genauer erläutert.

3.1.2 Para- und Ferromagnetische Partikel

Bei der MT-Methode spielen magnetische, kolloidale Sondenpartikel die zentrale Rolle als lokale Kraftüberträger im untersuchten System. Die unter Kap. 3.1 erwähnte Zielsetzung der Experimente macht den Einsatz möglichst kleiner Sonden notwendig, was die Möglichkeit eröffnet, neben den eigentlichen MT-Experimenten im gleichen Aufbau auch Analysen der thermisch getriebenen Sondenbewegung durchzuführen. Aufgrund technischer Eigenheiten des MT-Aufbaus (vgl. Kap. 3.5.3) und spezifischer Anforderungen bzgl. der auf die Kugeln zu applizierenden Kräfte können nur Partikel mit einem Minimaldurchmesser von ca. $1\ \mu\text{m}$ verwendet werden.

Die eingesetzten magnetischen Sonden sollten zuerst alle zentralen, in Kap. 3.1.1 erwähnten Kriterien erfüllen. Die MT-Methode macht aber die Einhaltung weiterer Anforderungen an magnetische Partikel erforderlich.

Wie in den grundlegenden Arbeiten zur MT-Methode (Bausch, 1999; Schmidt, 1999; Ziemann, 1997) hinlänglich begründet, limitiert die Uniformität und Monodispersität der verwendeten Magnetkugeln die Genauigkeit der Messungen entscheidend. Diesen beiden Eigenschaften gilt bei der Auswahl geeigneter Magnetkugeln deshalb ein besonders großes Interesse.

In MT-Experimenten können para- und ferromagnetische Kugeln verwendet werden. Paramagnetische Partikel haben den Vorteil, dass sie in der Abwesenheit von Magnetfeldern nicht zur Verklumpung neigen, was speziell die Probenpräparation erleichtern kann. Zudem wird auf diese Kugeln im magnetischen Feldgradienten des MT-Aufbaus kein Drehmoment ausgeübt, wodurch unerwünschte Torsionseffekte vermieden werden. Ferromagnetische Kugeln haben dagegen den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer großen magnetischen Suszeptibilität bis hin zu sehr kleinen Kugelradien im MT-Aufbau verwendet werden können. In dieser Arbeit wurde mit beiden Kugeltypen gearbeitet, wobei nicht die magnetischen Eigenschaften für den Einsatz ausschlaggebend waren, sondern rein präparative Aspekte.

Seit längerem ist es technisch möglich, aus den in Kap. 3.1.1 vorgestellten Polystyrolkugeln durch zusätzliche Einbringung von 10 bis 20 nm großen Eisenoxidkristallen paramagnetische Sondenpartikel herzustellen (Ugelstad et al., 1991). Mehrere kommerzielle Hersteller bieten diese sog. *superparamagnetischen* Kugeln mit unterschiedlichsten Durchmessern

(0.02-15 μm) und Metallgehalt (10-70 Gewichts-%) an. Superparamagnetisch bedeutet, dass die Kugeln bei einer sehr hohen Suszeptibilität weder signifikante Remanenz- noch Hysteresis-Eigenschaften besitzen. Magnetkugeln mit sehr kleinen Durchmessern (ca. 50-250 nm) und hohem Metallgehalt (ca. 60-70 %) besitzen schlechte Sphärizität und können u.a. deshalb nicht für MT-Experimente verwendet werden. Typischerweise werden Magnetkugeln in der Zellbiologie für die Magnetseparation von Zellen verwendet.

Die in Kap. 5.3 verwendeten Magnetkugeln *ProActive® Streptavidin Superparamagnetic, Classic* der Fa. Bangs Laboratories (Carmel IN, USA) erfüllen die Anforderungen aus Kap. 3.1.1 und die weitergehenden Eigenschaften für Magnetpartikel (vgl. Tabelle 3-2). Abbildung 3-2a zeigt eine mikroskopische Durchlichtaufnahme einer polydispersen Mischung dieser Partikel. Uniformität und Monodispersität sind weniger gut realisiert als bei den größeren Kugeln der Fa. Dynal (Dt. Dynal, Hamburg), die in früheren Arbeiten eingesetzt wurden (Bausch, 1999; Schmidt, 1999; Ziemann, 1997). Das Herstellungsverfahren limitiert leider die Schwankungsbreite des Partikeldurchmessers auf den angegebenen Wert (vgl. Tabelle 3-2). Zusätzlich mussten diese Kugeln für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen noch selbst mit Fluorophoren markiert werden (vgl. Kap. 5.3.1).

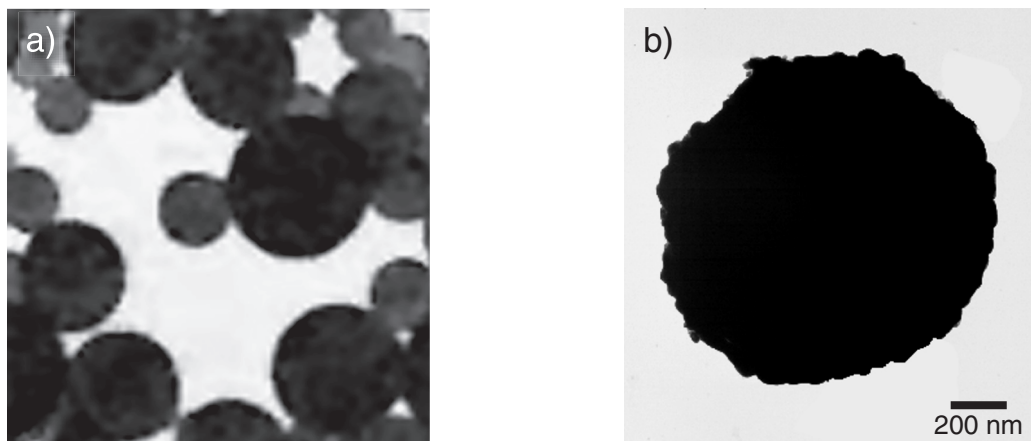


Abbildung 3-2: Verwendete magnetische Mikropartikel. a) Mikroskopische Durchlichtaufnahme einer polydispersen *Superparamagnetic Classic* Kugellösung der Fa. Bangs Laboratories. Die Kugeln besitzen gute Sphärizität und das eingelagerte Eisenoxid ist homogen verteilt.

b) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer goldbeschichteten Eisenkugel. Gold kann in der Präparation nur ungleichmäßig auf die hochsphärischen Eisenkugeln aufgebracht werden.

Für die in Kap. 6 vorgestellten Experimente wurde am Lehrstuhl erstmals eine eigene Magnetkugelpräparation entwickelt, mittels derer goldbeschichtete, biofunktionalisierbare Eisen- und Kobaltpartikel hergestellt werden können (Abdelghani-Jacquin, 2001; Abdelghani-Jacquin et al., 2001). Diese ferromagnetischen Partikel eignen sich für Untersu-

chungen an festkörpergestützten Schichtsystemen mittels klassischer und konfokaler Mikroskopietechniken besonders gut (vgl. Kap. 6) und erfüllen die genannten Anforderungen an kolloidale Magnetkugelsysteme (vgl. Tabelle 3-2). Herstellungsbedingt besitzen diese Partikel weniger gute, sphärische Eigenschaften (vgl. Abbildung 3-2b) und schlechtere Monodispersität. Alle Parameter der ferromagnetischen Goldpartikel sind Tabelle 3-2 zu entnehmen.

Produktbezeichnung	ProActive® Streptavidin Superparamagnetic, Classic	Goldbeschichtete, biofunktionalisierbare Eisenkugeln
Materialdichte [g/cm ³]	2.206	ca. 7.0
Mittlerer Radius [μm]	0.42	0.35
Monodispersität (CV) [%]	ca. 20%	ca. 30 – 40%
Funktionalisierung	Streptavidin	Cystein
Partikeldichte [1/ml]	1.5·10 ¹⁰	nicht bestimmt
Magnetische Eigenschaften	Paramagnetisch	Ferromagnetisch
Magnetitgehalt	66 %	--
Eisengehalt	--	ca. 100%

Tabelle 3-2: Charakteristische Eigenschaften der verwendeten magnetischen Mikropartikel. Die enthaltenen Daten wurden entweder den Produktdatenblättern des Herstellers entnommen oder selbst experimentell bestimmt. Detaillierte Angaben zur Funktionalisierung sind Kap. 5.1 und Kap. 6.1 zu entnehmen.

3.2 Analoge Fluoreszenz-Video-Mikroskopie

Ein Großteil der Messungen dieser Arbeit wurde auf invertierten Zeiss-Mikroskopen des Typs Axiovert 10 (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde mit einem hochauflösenden Zeiss Plan-Achromat 63x/1.40_{oil}- oder einem Zeiss Achroplan 63x/0.9_w-Immersionsobjektiv gearbeitet, wobei die Probe mit einer Zeiss Hochdruck-Quecksilberdampfampe HBO 100 beleuchtet wurde. Zusätzlich wurde ein Fluoreszenzfiltersatz für Rhodamin (Anregung 540 nm, Emission 570 nm) in den Strahlengang des Mikroskops gebracht. Für einige Experimente (vgl. Kap. 5.2) wurden zusätzlich Graufilter benutzt, um die Intensität des Anregungslichts zu mindern. Das optische Auflösungsvermögen dieser Anordnung ist bestimmt durch die sog. dreidimensionale op-

tische *Punkt-Transferfunktion* (engl.: point spread function, kurz: PSF) in der Fokalebene auf $0.2 \mu\text{m}$ und in Richtung der optischen Achse auf $0.7 \mu\text{m}$ (Pluta, 1988).

Das Bild des Mikroskops wurde bei Fluoreszenzaufnahmen direkt mit einem Hamamatsu C2400 SIT-Kamerasystem (Hamamatsu, Herrsching) aufgenommen und verstärkt.

Das Videobild der Kamera wurde über ein Panasonic-SVHS-Videomischpult des Typs WJ-MX30 (Matsushita Electric Industrial Co., Osaka, Japan) auf einem Panasonic-SVHS-Videorekorder (Modell AG 7350) zur späteren rechnergestützten Bildauswertung aufgezeichnet. Über das Videomischpult können experimentrelevante Daten (z.B. Zeit, Stromstärke, Temperatur etc.) oder das Videosignal der Verstärkereinheit des MT-Aufbaus (vgl. Kap. 3.5.1) in das Videobild inkopiert und aufgezeichnet werden.

3.3 Konfokale Mikroskopie – Digitale Ultramikroskopie

Für die Arbeiten zu Kap. 5.2.5 und Kap. 6.2 wurde ein konfokales Raster-Laser-Mikroskop (engl.: confocal laser scanning microscope, kurz: CLSM) vom Typ Odyssey XL der Fa. Noran (Middleton WI, USA) verwendet. Auf diesem rechnergestützten Mikroskop können sowohl Fluoreszenz-Experimente als auch Untersuchungen der Reflektivität einer Probe durchgeführt werden.

Konfokale Raster-Laser-Mikroskope bieten den Vorteil, dass einzelne Ebenen (sog. *optische Schnitte*) einer Probe mit verbesserter lateraler und axialer Auflösung und unter Ausblendung von Streulicht aus benachbarten Teilen des untersuchten Präparats mittels punktwieser Abrasterung aufgezeichnet werden können (Pawley, 1990). In der Praxis wird diese Technik verwendet, um entweder analog zur Computertomographie aus einem Satz mehrerer optischer Schnitte ein Objekt dreidimensional zu rekonstruieren oder um zeitaufgelöste Aufnahmen einer scharf abgebildeten Ebene zu erstellen.

Das verwendete Odyssey XL Mikroskop ist in sog. *Epi-Anordnung* konzipiert, besitzt drei Aufnahmekanäle (2x Fluoreszenz, 1x Reflexion), ist ausgestattet mit einem Ar-Kr-Laser als Beleuchtung (Wellenlängen: 488, 567 und 647 nm) und den notwendigen Abrastereinrichtungen und Blendensätzen. Die Abrasterung der aufgenommenen optischen Schnitte erfolgt bei diesem Gerät mit einer patentierten Technologie mit Aufnahmefrequenzen bis zu 240 Bildern/Sekunde. Aufgebaut ist das System aus drei Komponenten: dem Hauptgerät, das alle für den konfokalen Betrieb wichtigen technischen Komponenten enthält, einem in-

vertierten Zeiss-Mikroskop Axiovert 100, bestückt mit einem Zeiss Plan-Apochromat 63x/1.40_{Oil}-Immersionsobjektiv, und einer Grafikworkstation als Steuer- und Auswertungsrechner.

Für detaillierte Informationen zu Aufbau, Funktion und Bedienung dieses Geräts und dem experimentell bestimmten optischen Auflösungsvermögen sei auf meine Diplomarbeit verwiesen (Dichtl, 1997).

3.4 Rechnergestützte Bildverarbeitung

Die Hauptaufgabe der im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten, unterschiedlichen Bildverarbeitungssysteme bestand in der automatischen, quantitativen Bestimmung der zeitlich veränderlichen relativen Position der verwendeten kolloidalen Sonden in der Bildebene des Mikroskops, um daraus viskoelastische Eigenschaften des untersuchten Materials abzuleiten. In diesem Abschnitt wird deshalb auf die unmittelbar damit zusammenhängenden hardware- und softwaretechnischen Aspekte näher eingegangen.

3.4.1 Hardware

Für die in Kap. 5.2 vorgestellten Video-Mikroskopie-Experimente wurde als Rechnersystem ein speziell für Bildverarbeitungszwecke ausgerüsteter Apple Power Macintosh 9500 (Apple Computer, Cupertino CA, USA) verwendet. Dieser Computer ist mit einem PowerPC 604e Prozessor (200 MHz), einem PCI-Datenbus, 256 MB Arbeitsspeicher und 4 GB Festplattenkapazität ausgestattet. Zur Digitalisierung der auf Videoband aufgezeichneten Bildsequenzen dient eine Bildverarbeitungs-Erweiterungskarte des Typs LG3 der Fa. Scion (Scion Corp., Frederick MD, USA). Mit dieser sog. *Framegrabber-Karte* kann das Videosignal mit Videofrequenz (25 Bilder/Sekunde) digitalisiert, kompressions- und verlustfrei direkt über den PCI-Bus in den Arbeitsspeicher des Rechners gelesen und von dort zur weiteren Verarbeitung auf Festplatte abgespeichert werden. Eine kleine Abschätzung ergibt, dass bei einer Standardbildgröße von 640 x 480 Bildpunkten ca. 800 Einzelbilder im Arbeitsspeicher dieses Rechners Platz finden, was einer Aufzeichnungsdauer von ca. einer halben Minute entspricht. Da es aber möglich ist den Digitalisierungsbereich auf beliebige Ausschnitte des Videobildes zu beschränken, ist die Anzahl der Einzelbilder prinzipiell nach oben nur durch die verwendete Software begrenzt. In dieser Arbeit wurden damit

Bildsequenzen mit bis zu 3000 Einzelbildern digitalisiert, was bei Videofrequenz einer Zeit von ca. 2 Minuten entspricht.

Die Beschränkung auf ca. 800 Einzelbilder bei einer Bildgröße von 640 x 480 Bildpunkten musste für die in Kap. 5.3 und Kap. 6.3 vorgestellten Experimente durch den Einsatz eines alternativen inzwischen neu am Lehrstuhl etablierten Bildverarbeitungssystems umgangen werden, da Vollbildaufnahmen mit einer Bildgröße von 768 x 576 Bildpunkten (PAL-Standard) über mehrere Minuten zu digitalisieren waren.

Für diesen Teil der Arbeit wurde als Rechnersystem ein hochleistungsfähiger PC mit dem Betriebssystem Windows NT 4.0 verwendet. Der Computer ist mit zwei Intel® Pentium® III Prozessoren (700 MHz), einem PCI-Datenbus, 512 MB Arbeitsspeicher, 190 GB Festplattenkapazität und einer Framegrabber-Karte PXC200 der Fa. Imagenation (Imagenation Corp., Portland OR, USA) ausgestattet. Bei diesem System werden im Gegensatz zum Vorgänger bereits während des mit Videofrequenz durchgeführten Digitalisierungsvorgangs Bilddaten auf der Festplatte abgespeichert. Nicht der Umfang des Arbeitsspeicher begrenzt bei diesem Rechner die maximal mögliche Aufnahmedauer, sondern die um Größenordnungen höhere Speicherkapazität der Festplatte. Eine analoge Abschätzung wie oben ergibt für Vollbildaufnahmen (768 x 576 Bildpunkte) eine maximale Aufzeichnungsdauer von annähernd 24 Stunden, was für die durchgeführten Experimente mehr als ausreichend ist.

Bei Experimenten, die mit dem CLSM- durchgeführt wurden (vgl. Kap. 5.2.5 und Kap. 6.2), liegt die Bildinformation am Ende des Experiments bereits in digitalisierter Form vor. Auf dem Steuerrechner des CLSM einer Grafikworkstation Indy™ von Silicon Graphics (Silicon Graphics Inc. SGI, Mountain View CA, USA), betrieben mit einem MIPS R4600 (132 MHz) Hauptprozessor, 192 MB Arbeitsspeicher und 3 GB Festplattenkapazität, werden die entstehenden Daten nur für eine weitergehende Auswertung mit den in Kap. 3.4.2 erwähnten Programmen zur automatischen Kugelverfolgung in andere Datenformate (TIFF-, AVI-Format) konvertiert.

3.4.2 Software – Verfolgung der Sondenbewegung

Die automatische Bestimmung der zeitlich veränderlichen, relativen Position der Sondenpartikel erfolgte im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von Computeralgorithmen, die eine Bestimmung der Partikelposition mit einer Genauigkeit ermöglichen, die unter der Größe eines einzelnen Bildschirmpunkts liegt (sog. *Sub-Pixel-Auflösung*). Dies kann prinzipiell dadurch erreicht werden, dass an das Helligkeitsprofil des Bilds der zu verfolgenden Kugel eine geeignete analytische Funktion angepasst wird (Ziemann, 1997). In dieser Arbeit wurden zwei Programme eingesetzt: Für die Messungen aus Kap. 5.2 wurde das auf der Public-Domain-Software NIH Image basierende *Trekking Image* verwendet (Dichtl, 1997; Ziemann, 1997). Alle Experimente aus Kap. 5.3 und Kap. 6 wurden mit der am Lehrstuhl selbst entwickelten, völlig neuartigen *Open Box*-Software ausgewertet (Schilling, 1999). Beide Pakete erlauben es außerdem, die bei MT-Experimenten ins Videobild eingeblendete LED-Zusatzinformation (vgl. Kap. 3.5) auszuwerten.

3.5 Magnetic Tweezers Aufbau im ‚High Force‘-Modus

3.5.1 Überblick

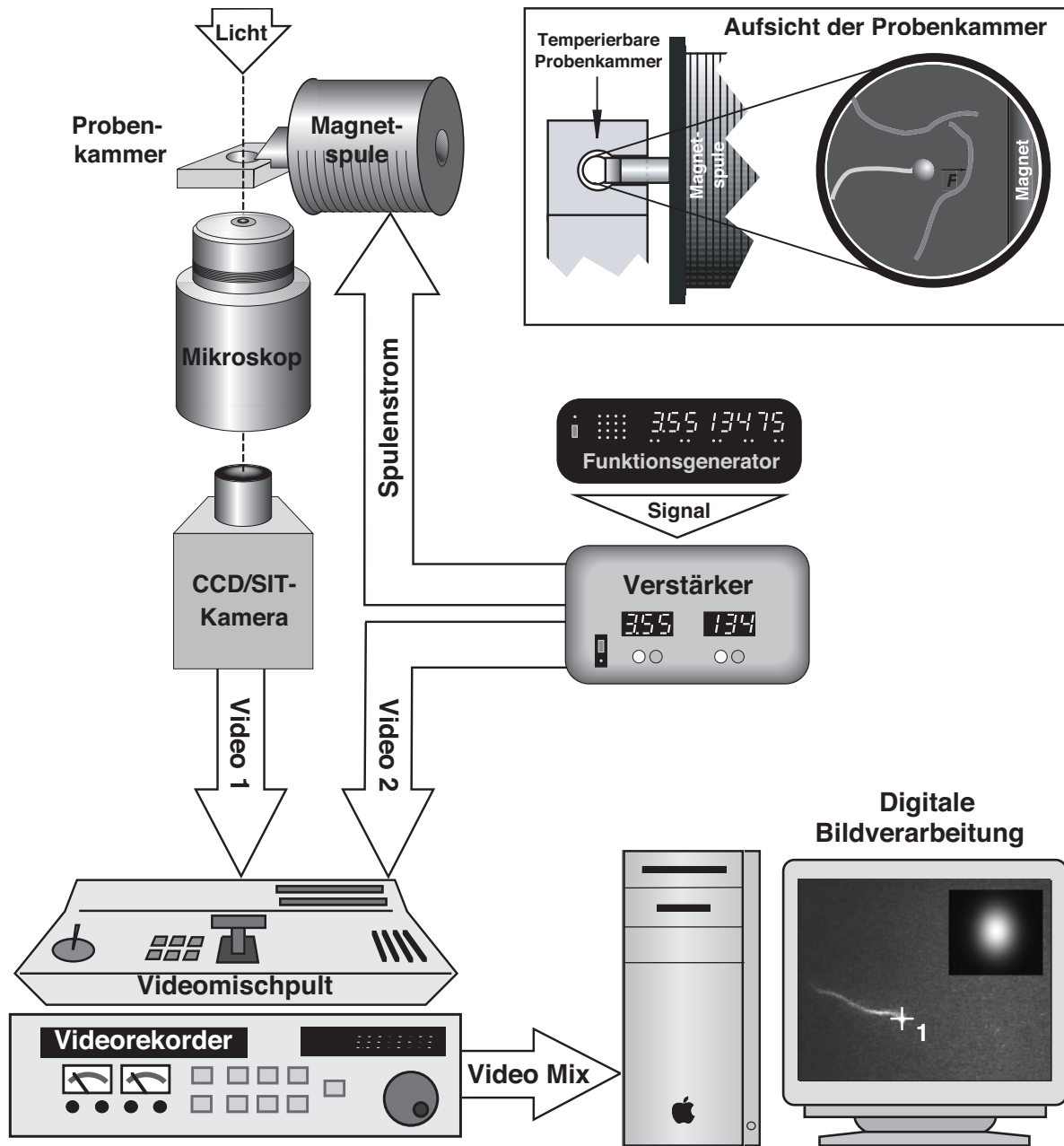


Abbildung 3-3: Der Magnetic Tweezers Aufbau im schematischen Überblick. Kasten: Aufsicht der Probenkammer. Die zentrale Einheit der Apparatur bildet die Probenkammer zusammen mit den magnetischen Sondenpartikeln, die als Kraftüberträger in das untersuchte Material eingebettet sind. Zu ihrer Beobachtung wird in der Regel Video-Mikroskopie eingesetzt, die Auswertung der Messung erfolgt mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung.

Abbildung 3-3 zeigt eine schematische Gesamtübersicht des verwendeten Aufbaus. Die Apparatur besteht aus vier Komponenten:

- Dem speziellen x-y-Mikroskopisch, auf dem die Probenkammer vor der Spule des Elektromagneten montiert wird (Bausch, 1999; Ziemann, 1997);
- den magnetischen Sondenpartikeln, die als Kraftüberträger im untersuchten Material verwendet werden (vgl. Kap. 3.1.2);
- einem invertierten Videomikroskop zur Beobachtung der Kugelbewegung (vgl. Kap. 3.2);
- und der rechnergestützten Bildverarbeitung zur quantitativen Bestimmung der Auslenkung der Kugel (vgl. Kap. 3.4).

Mit diesem Aufbau können Magnetkugeln, die sich in der Probenkammer befinden, nach einer Seite hin ausgelenkt werden (Bausch, 1999; Ziemann, 1997), wobei auf die in dieser Arbeit benutzten magnetischen Mikropartikel Kräfte von mehreren Pikonewton wirken (vgl. Kap. 3.5.3). Da Kräfte dieser Größenordnung für die Experimente aus Kap. 5.3 und Kap. 6.3 erforderlich waren, konnte der sog. ‚Low Force‘-Aufbau nicht verwendet werden.

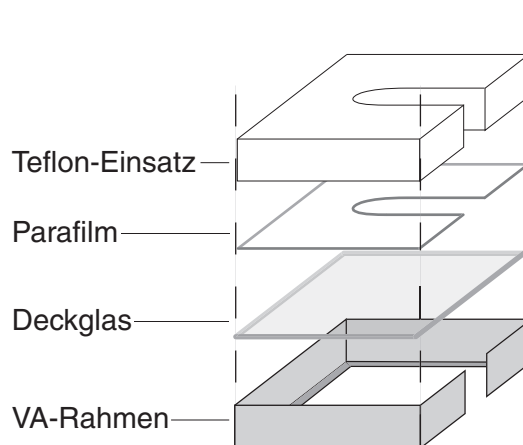


Abbildung 3-4: Schematischer Aufbau der Probenkammer. Im Stahlrahmen kommen Deckglas und Parafilm als Abdichtung aufeinander zu liegen. Mit dem Tefloneinsatz werden Parafilm und Deckglas gegen den Rahmen gepresst.

Die zentrale Probenkammer mit Magneten ist in Abbildung 3-3 (Kasten) schematisch gezeigt. Der Polschuh des Elektromagneten ist an der Stirnseite in einem 60° Winkel abgeflacht und ragt in die Messkammer hinein. Die Probenkammer besteht aus einem VA-Stahlrahmen, dem Deckglas, einer zugeschnittenen Parafilm-Folie (Parafilm M[®], American National Can[™], Norwalk CT, USA) und einem Tefloneinsatz, mit dem Parafilm-Folie und Deckglas im Rahmen fixiert werden können (vgl. Abbildung 3-4). Nach dem Zusammen-

setzen wird das Deckglas mit einem Heißluft-Fön angewärmt, bis sich der Parafilm bei ca. 54° C zu verflüssigen beginnt. Die Verspannung durch den Tefloneinsatz sorgt dafür, dass der zähflüssige Parafilm unter Druck jeden Hohlraum zwischen Deckglas, Stahlrahmen und Tefloneinsatz optimal ausfüllt. Man erhält absolut dichte Probenkammern, bis auf den Spalt durch den der Magnet in die Kammer ragt. Dieser kann per Silicon-Fett leicht verschlossen werden.

Der Spulenstrom des Elektromagneten wird durch das Spannungssignal eines Funktionsgenerators FG9000 (ELV, Leer) gesteuert. Dieses Signal wird von einer Verstärkereinheit (Spezialanfertigung der Elektronikwerkstatt des Physik-Departments der Technischen Universität München) in einen definierten, spannungsproportionalen Strom umgesetzt.

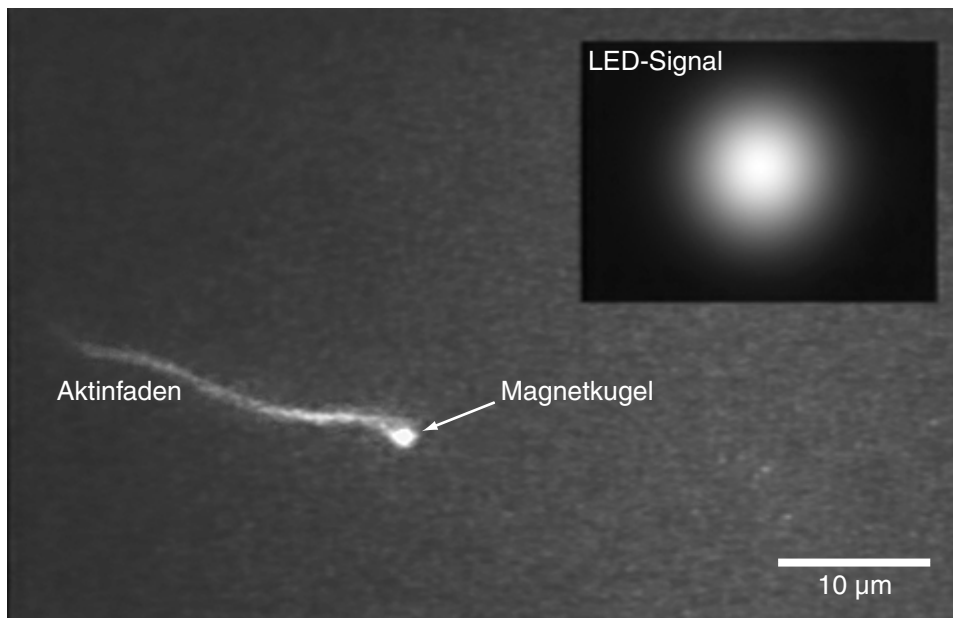


Abbildung 3-5: Typisches mit dem MT-Aufbau erzeugtes fluoreszenzmikroskopisches Videobild, das ein an einen einzelnen fluoreszenten Aktinfaden gebundene, fluoreszierende Magnetkugel zeigt, die in ein nicht leuchtendes Netzwerk eingebettet ist. In das Bild eingebendet ist die Leuchtdiode, deren Helligkeit Information über den Spulenstrom der Magnetspule liefert.

Zur Beobachtung kann sowohl Durchlicht- als auch Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden (vgl. Kap. 3.2). Um zusammen mit der Antwortbewegung der Partikel stets eine Information über die wirkende Kraft zu erhalten, wird das Steuersignal des Funktionsgenerators nicht nur an den Verstärker, sondern auch an eine Leuchtdiode angelegt. Das Helligkeitssignal der LED wird von einer CCD-Kamera (CCB-M35/CE, Manfred Sticksel GmbH, Aichhalden) aufgenommen, die in den Verstärker integriert wurde, und über das Videomischpult in das von der Mikroskopkamera gelieferte Bild eingebendet (vgl. Abbildung 3-5).

3.5.2 Para- und Ferromagnetische Kugeln im inhomogenen Magnetfeld

Auf einen magnetischen Dipol \vec{m} wirkt in einem Magnetfeld \vec{B} die Kraft $\vec{F} = \nabla(\vec{m} \cdot \vec{B})$.

Wenn das Magnetfeld stationär ist, gilt somit:

$$\vec{F} = (\vec{m} \cdot \nabla)\vec{B}. \quad \text{Gleichung 3-2}$$

Das magnetische Moment \vec{m} einer paramagnetischen Kugel ist proportional zum äußeren Magnetfeld \vec{B} und dem Volumen der Kugel (Schmidt, 1999). Es gilt also:

$$\vec{F}_{para} \propto (\vec{B} \cdot \nabla)\vec{B}. \quad \text{Gleichung 3-3}$$

Falls die magnetische Feldstärke \vec{B} zeitabhängig ist, lässt sich diese Zeitabhängigkeit abseparieren ($\vec{B}(\vec{r}, t) = B(t) \cdot f(\vec{r})$). Insgesamt ist die Kraft auf eine ortsfeste paramagnetische Kugel also proportional zum Quadrat des zeitabhängigen Anteils der magnetischen Feldstärke $B(t)$ und damit auch zum Quadrat des zur Feldstärke proportionalen Spulenstroms $I(t)$:

$$F_{para}(t) \propto B(t)^2 \propto I(t)^2. \quad \text{Gleichung 3-4}$$

Bei ferromagnetischen Kugeln hingegen hängt das magnetische Moment \vec{m} nicht vom äußeren Feld ab; es gilt $\vec{m} = \vec{m}_0 = const$. Damit erhält man für ferromagnetische Kugeln:

$$\vec{F}_{ferro} = (\vec{m}_0 \cdot \nabla)\vec{B} \quad \text{bzw.} \quad \vec{F}_{ferro} \propto \nabla\vec{B}. \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Auch hier kann die Zeitabhängigkeit absepariert werden. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Spulenstrom und der auf die Kugel ausgeübten Kraft:

$$F_{ferro}(t) \propto B(t) \propto I(t). \quad \text{Gleichung 3-6}$$

Im Falle der MT-Technik gilt Gleichung 3-6 erstaunlicherweise auch für paramagnetische Kugeln. Dies liegt an der schon bei relativ geringen magnetischen Feldstärken einsetzenden Sättigungsmagnetisierung der paramagnetischen Partikel (Bausch, 1999; Schmidt, 1999; Ziemann, 1997). Bei den hier benutzten Kräften kann man also auch bei paramagnetischen Kugeln in guter Näherung von einem linearen Zusammenhang zwischen Spulenstrom und Kraft ausgehen, was durch die Kraft-Kalibration in Kap. 3.5.3 bestätigt wird.

Bei der Anwendung ferromagnetischer Partikel für die MT-Methode (vgl. Kap. 6.3) besteht der Unterschied zu den paramagnetischen Partikeln neben der deutlich höheren Suszeptibilität darin, dass auf die ferromagnetischen Kugeln zusätzlich noch ein Drehmoment $\vec{D} = \vec{m}_0 \times \vec{B}$ wirkt.

3.5.3 Kraft-Kalibration der paramagnetischen Sonden

In diesem Abschnitt wird die quantitative, ortsabhängige Kraft-Kalibration der verwendeten, paramagnetischen Sonden in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stromstärken präsentiert. Dieser Kalibration kommt besondere Bedeutung zu, da nur mit ihrer Hilfe eine exakte Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der untersuchten Systeme möglich ist.

Im ‚High Force‘-Modus sind die Abstände zwischen Magnetkugel und magnetischer Kante sehr klein. Außerdem steigt durch die Form der Kante das Magnetfeld im Nahbereich sprunghaft an. Beide Aspekte führen dazu, dass auf die Kugeln ein sehr hoher, örtlich stark variabler Feldgradient wirkt. Dadurch sind die auf die Magnetkugeln wirkenden Kräfte stark abhängig vom Abstand zum Polschuh.

In vorangegangenen Arbeiten (Bausch, 1999; Ziemann, 1997) wurden paramagnetische Sonden mit einem ca. sechsmal größerem Durchmesser verwendet als der hier verwendeten (vgl. Kap. 3.1.2). Das magnetische Moment \bar{m} einer Kugel ist nicht nur Funktion des äußeren Magnetfelds \vec{B} sondern auch des Kugelvolumens (Schmidt, 1999) und deshalb ergeben sich für die in der vorgestellten Apparatur benutzten Magnetkugeln Kräfte, die um einen Faktor von ca. 200 kleiner sind als bei den größeren Kugeln. Der mit dem ‚High Force‘-Aufbau zugängliche Kraftbereich reduziert sich folglich von ca. 100 pN bis 10 nN auf ca. 0.5 pN bis 50 pN.

Die Kalibrierungsexperimente basieren auf Messungen der Geschwindigkeit der Magnetkugeln in einer rein viskosen Flüssigkeit als Funktion des Spulenstroms. Aus der gemessenen Kugelgeschwindigkeit berechnet man die Kräfte auf die Kugeln mit der Stokesschen Formel $F = 6\pi R\eta \cdot \dot{x}$.

Als Eichmedium wurde eine Wasser-Glyzerin-Mischung mit 20 Vol.-% Wasser verwendet, deren dynamische Viskosität mittels Kugelfall-Viskosimetrie bei Raumtemperatur von ca. 20 ° C auf 56.94 mPa · s bestimmt wurde. Zur Präparation der Kalibrierungsproben wurde 0.5 µl Magnetkugellösung in 1 ml der Wasser-Glyzerin-Mischung gegeben und durch Vortexen gemischt. Nach Erreichen einer homogenen Mischung wurde die Probenkammer des ‚High Force‘-Aufbaus damit befüllt und auf eine Temperatur von 20 ° C temperiert.

Die Messung erfolgte durch die Aufnahme der Kugelbewegung mehrerer Partikel in der Wasser-Glyzerin-Mischung bei vier verschiedenen Stromstärken. Die Kante des Magnetschuhs wurde gemeinsam mit den Kugeln aufgenommen, um die Abstandsabhängigkeit der Magnetkraft, möglichst genau zu erfassen. Außerdem ist in dieser Ebene die Bewegung der Kugeln in Richtung der optischen Achse minimal, so dass axiale Magnetkräfte nicht berücksichtigt werden mussten. Hydrodynamische Randeﬀekte konnten ebenfalls vernachlässigt werden, da der Polschuh auf eine Höhe von mindestens $100\ \mu\text{m}$ über dem Deckglas eingestellt wurde.

Der starken Abstandsabhängigkeit der Magnetkraft wird in der Auswertung Rechnung getragen durch die Darstellung der Ergebnisse der Kalibrationsmessungen in Form von Kraft-Abstands-Kurven ($F(x)$ -Kurven). Die Kleinheit der Magnetkugeln hat bei der Auswertung der $x(t)$ -Kurven essentielle Auswirkungen. Der mittlere Durchmesser von $0.83\ \mu\text{m}$ liegt genau im Bereich der Tiefenschärfe des verwendeten $63\times/0.9_{\text{w}}$ -Immersionsobjektivs (ca. $0.8\text{-}1.1\ \mu\text{m}$). Da i.a. der Gradient des Magnetfelds, dem die Kugelbewegung folgt, nicht völlig parallel zur Fokalebene des Mikroskops orientiert ist, konnte im Experiment keine Magnetkugel über den ganzen Abstandsbereich von ca. 20 bis $100\ \mu\text{m}$ von der Kante scharf aufgenommen werden. Deshalb wurden für die Auswertung die $x(t)$ -Kurven mehrerer Kugeln verwendet (bis zu 50), die jeweils einen Teil des vermessenen Abstandsbereichs scharf abzubilden waren. Bei der Auswertung der $x(t)$ -Kurven wurde wie folgt vorgegangen: An die aufgenommenen $x(t)$ -Kurven wurde eine spezielle analytische Funktion angepasst, die möglichst gut die Kurvenform wiedergab. Hierfür erwies sich ein gestreckt exponentieller Abfall plus linearem Anteil als besonders geeignet, da er die $x(t)$ -Kurven erstaunlich gut wiedergab. Durch einfaches Ableiten dieser analytischen Funktion erhielt man glatte $v(t)$ -Kurven, im Gegensatz zu ebenfalls getesteten, numerischen Differentiationstechniken. Die $v(t)$ -Kurven wurden mit dem Faktor $6\pi R \eta$ (R : Kugelradius; η : Viskosität der Wasser-Glyzerin-Mischung) multipliziert und gegen $x(t)$ aufgetragen, was unterschiedliche Abstandsbereiche abdeckende $F(x)$ -Kurven ergab. Durch entsprechende Mittelung dieser sich teilweise überschneidenden Kurven erhielt man die jeweils für den ganzen Abstandsbereich gültige, mittlere $F(x)$ -Kurve.

Die Kalibrationsmessungen wurden für die verwendeten paramagnetischen Kugeln bei vier verschiedenen Stromstärken im Bereich von 250 bis 1000 mA durchgeführt. In Abbildung 3-6a sind die mittleren $F(x)$ -Kurven dargestellt. In der Nähe des Polschuhs (unterhalb 50 μm) sind die Magnetkräfte stark abstandsabhängig, wogegen sich bei größeren Abständen wesentlich schwächere Abhängigkeiten ergeben. Auch hier ergibt sich die aus älteren Arbeiten (Bausch, 1999; Ziemann, 1997) bereits bekannte lineare Zusammenhang zwischen Magnetkraft auf die Kugeln bei festen Abständen und dem verwendeten Spulenstrom (vgl. Abbildung 3-6b).

Die Genauigkeit der Kraft-Kalibration für verschiedene Kugeln des verwendeten Typs limitiert die quantitative Aussagekraft bei Messung viskoelastischer Parameter. Da zur Kalibration die Stokeschen Formel $F = 6\pi R\eta \cdot \dot{x}$ verwendet wurde, tragen zum gesamten relativen Fehler der Magnetkraftbestimmung die relativen Fehler der experimentell bestimmten dynamischen Viskosität der Wasser-Glyzerin-Mischung ($\Delta\eta/\eta \approx 1.6\%$), die Variation des Kugeldurchmessers der Kugel ($\Delta R/R \approx 20\%$) und die relative Genauigkeit der Geschwindigkeitsmessung ($\Delta v/v \approx 1-2\%$) bei. Zusätzlich werden beim Vergleich unterschiedlicher Kugeln Unsicherheiten bzgl. des induzierten magnetischen Moments wichtig, die zum einen von der Suszeptibilität abhängen, also dem Eisengehalt des Partikels, und zum anderen von dessen Volumen, also von R^3 . Anhand der Streuung der Messwerte unterschiedlicher Kugeln bei einer festen Stromstärke wurde der gesamte relative Fehler zu 40% bestimmt.

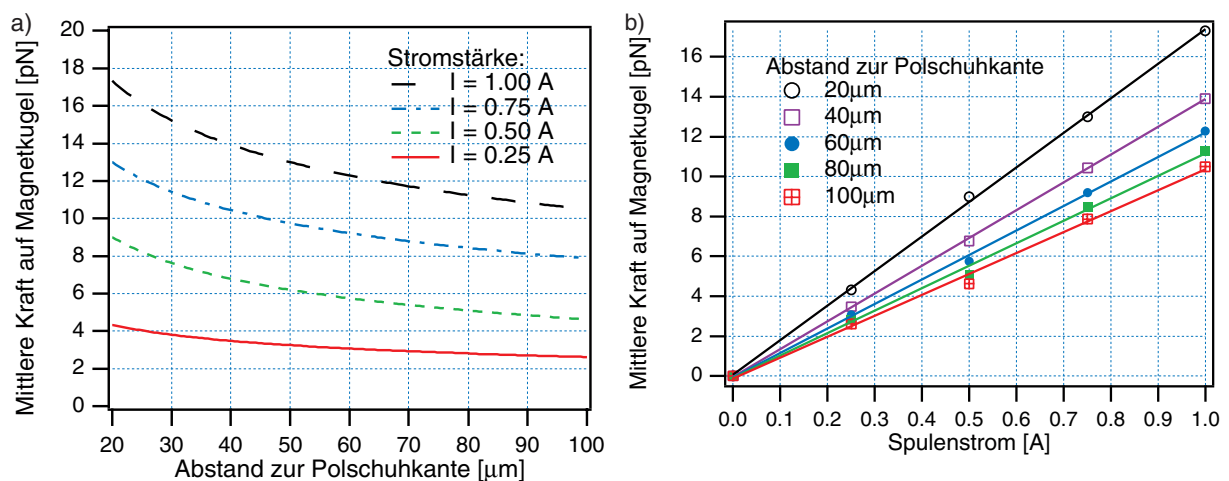


Abbildung 3-6: Ergebnisse der Kraft-Kalibration der verwendeten, paramagnetischen Sonden. a) Mittlere Magnetkraft als Funktion des Abstands zur Polschuhkante. Gemessen wurden vier Stromstärken von 0.25 A bis 1.00 A. b) Mittlere Magnetkraft als Funktion des Spulenstroms. Für die dargestellten unterschiedlichen Abstandsdatensätze ergibt sich jeweils eine lineare Abhängigkeit von Kraft und Spulenstrom.

4 Viskoelastizität von Polymersystemen

4.1 Semiflexible, verschlaufte Polymernetzwerke

Die in dieser Arbeit diskutierten viskoelastischen Körper (vgl. Kap. 5) bestehen aus einer Vielzahl von Polymerfäden (sog. *Polymerfilamente*) und Flüssigkeit (sog. *Lösungsmittel*), die die Bereiche zwischen den Filamenten füllt. Die Viskoelastizität von Polymernetzwerken beeinflussen demnach sowohl Polymer- als auch Lösungsmiteleigenschaften.

Künstliche und biologische Polymere lassen sich in drei in ihren physikalischen Eigenschaften stark unterschiedliche Klassen einteilen. Für die Klassifizierung verwendet man eine charakteristische Größe des einzelnen Polymerfilaments, die sog. *Persistenzlänge* l_p . Das ist der Abstand zwischen zwei Punkten entlang der Kontur des einzelnen Filaments, auf dem die Korrelation des Tangentenwinkels der Filamentkontur auf $1/e$ abgefallen ist (vgl. Kap. 4.1.1). Damit ist die Persistenzlänge l_p ein Maß für die lokale mechanische Steifigkeit des einzelnen Polymers. Um Aussagen über das Verhalten des ganzen Filaments machen zu können, ist das Verhältnis von l_p zur Länge des Filaments, der sog. *Konturlänge* L , entscheidend. Anhand dieses Verhältnisses lässt sich die folgende Klassifizierung (vgl. Tabelle 4-1) vornehmen:

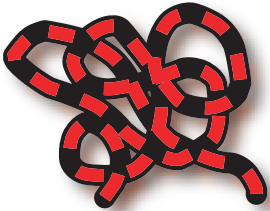
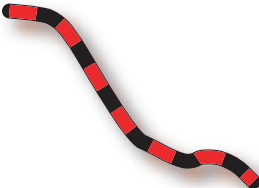

Polymer-Klasse	Flexibel	Semiflexibel	Steifer Stab
Persistenz-/Konturlänge	$l_p \ll L$	$l_p \approx L$	$l_p \gg L$
Kontur-Beispiel			

Tabelle 4-1: Polymer-Klassifikation anhand Persistenz- und Konturlänge. Für die drei Klassen enthält die Tabelle jeweils eine beispielhafte Filamentkontur.

Das in Kap. 5 untersuchte Biopolymer Aktin besitzt eine mittlere Konturlänge $\langle L \rangle \approx 22 \mu\text{m}$ (Käs, 1993) und eine Persistenzlänge $l_p \approx 17 \mu\text{m}$ (Gittes et al., 1993) und ist damit der Gruppe der semiflexiblen Polymere zuzuordnen.

Für die mechanischen Eigenschaften einer Polymerlösung ist neben den intrinsische Polymereigenschaften auch der Verdünnungsgrad entscheidend. Man unterscheidet:

- *Verdünnnte Lösungen*: Aufgrund der großen räumlichen Distanz keine oder nur schwache Wechselwirkung zwischen den einzelnen Filamenten.
- *Halbverdünnte Lösungen*: Die Konzentration der Filamente ist gerade so hoch, dass Überlappungen und damit Verschlaufungen (engl.: entanglements) der Filamente untereinander auftreten.
- *Konzentrierte Lösungen*: Der Überlappungsgrad zwischen den einzelnen Filamenten ist hoch, es resultiert eine isotrope Netzwerkstruktur.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verdünnte und halbverdünnte Lösungen semiflexibler Polymere untersucht. Eine zum Verdünnungsgrad äquivalente und gebräuchlichere Größe zur Beschreibung ist die sog. *Maschenweite* ξ (engl.: mesh-size). Damit wird der mittlere Abstand zwischen zwei Kreuzungspunkten im Netzwerk bezeichnet. Im Fall von F-Aktin wurde am Lehrstuhl (Schmidt et al., 1989) empirisch folgender Zusammenhang zwischen ξ (in μm) und der Monomerkonzentration c_a (in mg/ml) bestimmt:

$$\xi = 0.34 \cdot \left(\frac{c_a}{1 \text{ mg/ml}} \right)^{-1/2} \mu\text{m}. \quad \text{Gleichung 4-1}$$

4.1.1 Das ‚Wormlike Chain‘-Modell

Ältere experimentelle Arbeiten (Dichtl, 1997; Käs, 1993), die sich mit statischen und dynamischen Eigenschaften einzelner semiflexibler Biopolymere (Modellsystem F-Aktin) beschäftigen, benutzen zur Interpretation die weniger geeigneten Theorien flexibler Polymere oder starrer Stäbe (Doi und Edwards, 1986). Die theoretische Beschreibung semiflexibler Polymere wurde erst in den letzten Jahren vorangetrieben, wobei das bereits vor 50 Jahren eingeführte sog. ‚Wormlike Chain‘-Modell (kurz: WLC) die Grundlage bildet (Kratky und Porod, 1949). In diesem Minimalmodell eines semiflexiblen Polymers wird das einzelne Polymer durch eine differenzierbare Ortskurve $\vec{r}(s)$ mit Konturlänge L repräsentiert (vgl. Abbildung 4-1).

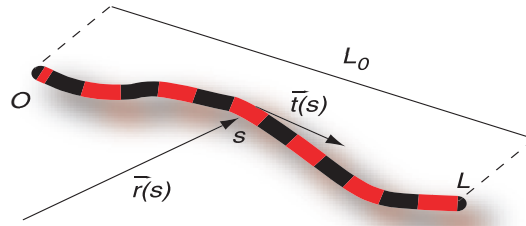


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung einer Wormlike Chain als differenzierbare Ortskurve $\vec{r}(s)$ mit Konturlänge L parametrisiert durch die Bogenlänge s . Ebenfalls eingezeichnet ist der Tangentenvektor $\vec{t}(s)$ und der End-zu-End-Abstand L_0 des gesamten Polymers.

Die statistischen Eigenschaften werden bestimmt durch die freie Energie H :

$$H = \frac{\kappa}{2} \int_0^L ds \left(\frac{\partial^2 \vec{r}(s)}{\partial s^2} \right)^2 \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Dieser Ausdruck misst die elastische Energie einer Polymer-Konformation als Integral über das Quadrat der lokalen Kurvenkrümmung $\partial^2 \vec{r}(s) / \partial s^2$ gewichtet durch die Biegesteifigkeit κ . Eine Randbedingung des WLC-Modells ist, dass die Konturlänge L des Filaments keinen Fluktuationen unterworfen ist. Im Modell wird dies durch die Bedingung $|\vec{t}(s)| = 1$ des Tangentenvektors $\vec{t}(s)$ berücksichtigt. Diese Eigenschaft bezeichnet man auch als sog. *Inkompressibilität* der WLC.

Aus Gleichung 4-2 lassen sich bereits einige statistische Eigenschaften der WLC ableiten:

- Exponentieller Zerfall der Tangenten-Tangenten-Korrelation

$$\langle \vec{t}(s) \vec{t}(s') \rangle = \exp(-|s - s'| / l_p) \quad \text{Gleichung 4-3}$$

mit einer Persistenzlänge l_p von $l_p = \kappa / k_B T$;

- Mittlerer quadratischer End-zu-End-Abstand

$$\langle R^2 \rangle = \left\langle \left(r(L) - r(0) \right)^2 \right\rangle = L^2 f_D(L / l_p); \quad \text{Gleichung 4-4}$$

mit der Debye Funktion $f_D(x) = 2(e^{-x} - 1 + x) / x^2$.

In den Grenzfällen $l_p \ll L$ und $l_p \gg L$ beschreibt das WLC-Modell auch flexible Polymere und starre Stäbchen.

4.1.2 Dynamik semiflexibler Polymere in Flüssigkeiten

Um die thermisch getriebene Bewegung einer WLC in einer Flüssigkeit zu beschreiben, geht man ähnlich vor wie bei den Theorien flexibler Polymere durch Einführung des *Rouse-* und *Zimm-*Modells (Doi und Edwards, 1986). In einer Bewegungsgleichung werden polymerinterne Wechselwirkungen und langreichweitige hydrodynamische Kopplungen berücksichtigt.

Für den sog. *schwach gekrümmten Stabs* $l_p \approx L$ unter Einhaltung der Inkompressibilitäts-Bedingung kann eine Bewegungsgleichung formuliert werden. Man unterscheidet zwischen Fluktuationen des Polymers senkrecht $\vec{r}_\perp(s,t)$ (*transversal*) und parallel $\vec{r}_\parallel(s,t)$ (*longitudinal*) zur lokalen Orientierung, die im folgenden getrennt vorgestellt werden.

Die Dynamik der transversalen Fluktuationen $\vec{r}_\perp(s,t)$ lässt sich in folgender Langevin-Gleichung ausdrücken (Soda, 1973):

$$\zeta_\perp \frac{\partial \vec{r}_\perp(s,t)}{\partial t} = -\kappa \frac{\partial^4 \vec{r}_\perp(s,t)}{\partial s^4} + \vec{f}^\perp(s,t) \quad \text{Gleichung 4-5}$$

mit einem effektiven Reibungskoeffizienten $\zeta_\perp = 4\pi\eta/\ln(\Lambda a)$, der die Viskosität η der Flüssigkeit, den Durchmesser a des Polymers und eine hydrodynamische Abschirmlänge Λ beinhaltet. Die angreifenden thermischen Kräfte $\vec{f}^\perp(s,t)$ erfüllen die üblichen Anforderungen an rein stochastische Kräfte, die sog. *Gaußschen Bedingungen*. Aus Gleichung 4-5 folgt direkt eine typische Abklingdauer τ_l thermisch angeregter Undulationen der WLC mit Wellenlänge l :

$$\tau_l = \frac{\zeta_\perp}{\kappa} l^4 \quad ; \quad \text{Gleichung 4-6}$$

und für die sog. *mittlere quadratische Verschiebung* $r_\perp^2(t) = \left\langle \left(r_\perp(t) - r_\perp(0) \right)^2 \right\rangle$ (engl.: mean square displacement, kurz: MSD) dieser Undulationen ergibt sich folgende Zeitabhängigkeit:

$$r_\perp^2(t) \propto \left(\frac{k_B T}{\zeta_\perp l_p^{1/3}} t \right)^{3/4} \quad \text{Gleichung 4-7}$$

Damit liefert das WLC-Modell in der Näherung des schwach gekrümmten Stabs ein anormales diffusives Verhalten mit einem skalierenden Exponenten von 3/4.

Für longitudinale Fluktuationen $\bar{r}_{\parallel}(s,t)$ des schwach gekrümmten Stabs wird keine explizite Langevin-Gleichung formuliert. Man geht davon aus, dass zur Diffusion zwei wesentliche Hauptbestandteile beitragen. Den größeren Beitrag liefert die translatorische Schwerpunktdiffusion eines starren Stabes (Doi und Edwards, 1986) beschrieben durch die Diffusionskonstante D_{\parallel} :

$$D_{\parallel} \approx \frac{k_B T \ln(L/a)}{2\pi\eta L} . \quad \text{Gleichung 4-8}$$

Einen weiteren diffusiven, longitudinalen Bewegungsanteil liefern sog. *Fluktuationen der Projektionslänge*. Wenn der schwach gekrümmte Stab unduliert, bleibt seine Konturlänge L erhalten. Seine Projektionslänge, hier der End-zu-End-Abstand $L_o(t) = |\bar{r}(L,t) - \bar{r}(0,t)|$, (vgl. Abbildung 4-1) unterliegt aber Fluktuationen. Die Fluktuationen der Projektionslänge um den mittleren End-zu-End-Abstand (vgl. Gleichung 4-4) lassen sich exakt durch die transversalen Fluktuationen $r_{\perp}^2(t)$ ausdrücken (Granek, 1997; Isambert und Maggs, 1996). Die endliche Korrelation der transversalen Fluktuationen (vgl. Gleichung 4-6) ist demnach auch für Fluktuationen der Projektionslänge gültig, d.h. die Bewegungen der beiden Polymerenden sind in erster Näherung statistisch unabhängig. Diese Fluktuationen können deshalb eine longitudinale Diffusionsbewegung des Polymers verursachen, da sie analog zu älteren theoretischen Ansätzen Überschusslänge vom einen Ende des Polymers zum anderen transportieren (de Gennes, 1979). Eine Abschätzung des dementsprechenden Diffusionskoeffizienten D_{rep} für lange Zeiten ergibt (Granek, 1997):

$$D_{rep} \approx \frac{k_B T \ln(L/\pi a)}{15\pi\eta l_p} . \quad \text{Gleichung 4-9}$$

Interessanterweise ist dieser Ausdruck nur schwach von der Konturlänge L abhängig.

Zur longitudinalen Diffusion des schwach gekrümmten Stabs tragen beide Prozesse bei. Das Verhältnis $D_{rep}/D_{\parallel} \approx 0.1 \cdot L/l_p$ macht aber deutlich, dass der von Fluktuationen der Projektionslänge verursachte Anteil nur gering ist. Die allgemeinen Konzepte der Reptation flexibler Polymere in Netzwerken (de Gennes, 1979; Doi und Edwards, 1986) sind aber erst aufgrund dieses Anteils auch auf semiflexible Filamente anzuwenden (vgl. Kap. 4.1.3).

4.1.3 Reptation semiflexibler Polymere in verschlauften Netzwerken

Um die thermisch getriebene Bewegung semiflexibler Polymere in verschlauften (engl.: entangled) Netzwerken halbverdünnter Lösungen der Maschenweite ξ zu beschreiben, bedient man sich des sog. *Reptationsröhren-Modells* (vgl. Abbildung 4-2), das für flexible Polymere von de Gennes und Doi eingeführt wurde (de Gennes, 1979; Doi und Edwards, 1986).

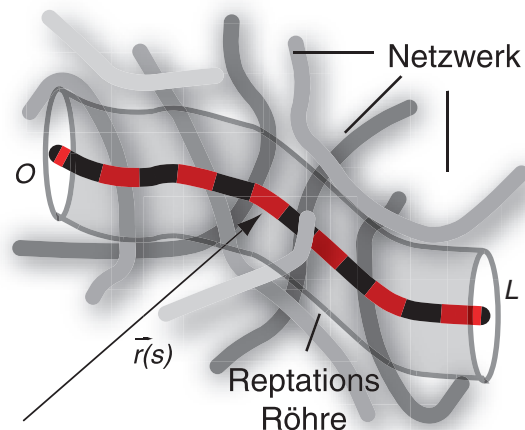


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Reptationsröhren-Modells für semiflexible Polymere. Im verschlauften Netzwerk schränken benachbarte Filamente die Bewegung des Test-Polymers auf das Gebiet einer zylindrischen Röhre ein. Fluktuationen des Netzwerks führen dazu, dass die Röhre selbst zeitlichen, topologischen Veränderungen unterworfen ist.

Man unterscheidet auch in diesem Modell zwischen transversalen und longitudinalen Fluktuationen des Polymers ($\vec{r}_\perp(s,t)$ bzw. $\vec{r}_\parallel(s,t)$), wobei im Vergleich zum freien semiflexiblen Polymer v.a. die longitudinale Bewegung unterschiedlich diskutiert werden muss.

Die Gleichung 4-5 für transversale Fluktuationen $\vec{r}_\perp(s,t)$ des Test-Polymers ändert sich in diesem System. Die topologischen, sterischen Beschränkungen entlang der *Reptationsröhre* werden durch Einführung einer harmonischen Rückstellkraft $-k \cdot \vec{r}_\perp(s,t)$ berücksichtigt (Odijk, 1983). Undulationen mit Wellenlängen größer als die sog. *Entanglement-Länge* $L_e = \xi^{2/3} \cdot l_p^{1/3}$ werden dadurch stark überdämpft. Die Entanglement-Länge L_e kann als mittlerer Abstand entlang der Reptationsröhre des Polymers gesehen werden, der zwei aufeinanderfolgende, von diesem Polymer berührte Verschlaufungspunkte trennt.

Die Reptationsröhre ist kein statischer Käfig für ein Filament, sondern unterliegt aufgrund von Netzwerkfluktuationen selbst einer dynamischen Veränderung. Man trägt diesem Umstand Rechnung durch Einführung einer zusätzlichen Diffusionsgleichung überdämpfter Phononen eines homogenen effektiven Mediums (Kroy, 1998).

Beide Effekte wirken auf das MSD $r_{\perp}^2(s,t)$ eines Filamentsegments (vgl. Gleichung 4-7) und lassen sich in der folgenden Formel zusammenfassen:

$$r_{\perp}^2(\omega't) = \frac{4}{3} \langle \bar{r}^2 \rangle \left[1 - \sqrt{\pi} \frac{\text{erf}(\sqrt{\omega't})}{2\sqrt{\omega't}} \right] + \frac{4}{3\pi} \left(\frac{k_B T}{\omega' \zeta_{\perp} l_p^{1/3}} \right)^{3/4} \left[1 - (\omega't)^{3/4} \frac{3}{4} \Gamma(-3/4, \omega't) \right], \quad \text{Gleichung 4-10}$$

wobei $\langle \bar{r}^2 \rangle$ das Sättigungsniveau aufgrund der harmonischen Rückstellkraft beschreibt und ω' die dazugehörige typische Sättigungsfrequenz. Diese Sättigungsfrequenz bestimmt sich aus der Abklingzeit τ_e von Undulationen mit der Entanglement-Länge L_e als Wellenlänge.

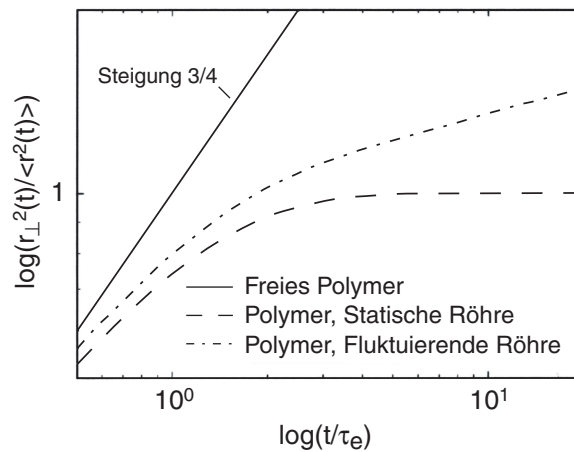


Abbildung 4-3: Transversale mittlere quadratische Verschiebung (kurz: MSD) eines semiflexiblen Polymers. Dargestellt sind die drei beschriebenen Szenarien: freies Polymer in viskosen Medium, Polymer in statischer Reptationsröhre und Polymer in fluktuierender Reptationsröhre. Sowohl die MSD- als auch die Zeitachse wurden auf die entsprechenden natürlichen Einheiten normiert.

In Abbildung 4-3 ist das transversale MSD $r_{\perp}^2(s,t)$ aller diskutierten Fälle aufgetragen. Je nach Modell unterscheidet man unterschiedliche Zeitdomänen mit variierendem Skalierungsverhalten:

- Bei kurzen Zeiten $t \ll \tau_e$ zeigt das MSD für alle drei Modelle annähernd das typische Skalenverhalten $r_{\perp}^2(s,t) \propto t^{3/4}$ eines semiflexiblen Polymers im viskosen Medium.
- Das MSD in einer statischen Röhre sättigt für $t > \tau_e$, da entsprechende Undulationen des Filaments ausgedämpft werden.
- Ist die Reptationsröhre selbst dynamischen Fluktuationen unterworfen, ist der Sättigungseffekt weniger stark ausgeprägt und das MSD steigt für $t > \tau_e$ weiter an.

Die Bewegung des Polymers entlang der Röhre, die sog. *Reptation*, lässt sich mit existierenden Theorien (Everaers et al., 1999; Granek, 1997; Isambert und Maggs, 1996; Semenov, 1986; Semenov, 1987) grundsätzlich analog der Reptation flexibler Polymere beschreiben. Allerdings sind quantitative Ergebnisse dieser Ansätze untereinander oft nicht vergleichbar, da es Unterschiede in den Grundannahmen gibt und zudem für semiflexible Polymere nicht sinnvolle Randbedingungen eingehen. Deshalb folgt nur eine Zusammenstellung qualitativer Ergebnisse.

Die Fixierung des Polymers an den Verschlaufungspunkten mit der Umgebung unterdrückt die longitudinale Diffusion des Filaments als Ganzes ($L_e \ll l_p$). Deshalb tragen zur longitudinalen Diffusion, wie in theoretischen Konzepten für flexible Polymere (de Gennes, 1979; Doi und Edwards, 1986), hauptsächlich Fluktuationen der Projektionslänge bei. Im Gegensatz zu Kap. 4.1.2 reduziert sich die typische Länge, auf der diese Fluktuationen statistisch unabhängig sind, auf die Entanglement-Länge L_e . Deshalb lässt sich ein Polymer der Länge L in L/L_e statistisch unabhängige Teile aufteilen, die zur Gesamtdiffusivität des Filaments beitragen. Eine Störung der Projektionslänge kann nur von diesen statistisch unabhängigen Teilstücken entlang des Polymers transportiert werden (analog Rouse-Modell).

Für die longitudinale Diffusionsbewegung $\vec{r}_{\parallel}(s,t)$ ergeben sich wie oben drei Zeitbereiche mit unterschiedlichem Skalierungsverhalten, die von unterschiedlichen Wechselwirkungsprozessen dominiert werden. Für das longitudinale MSD $r_{\parallel}^2(s,t)$ eines Filamentsegments gilt qualitativ:

- $t \ll \tau_e$: Diffusive Bewegung der Polymerteilstücke mit einer mittleren Projektionslänge von L_e ohne direkte Kopplung an Nachbarteilstücke. Diese Fluktuationen sind an die transversalen Fluktuationen $\vec{r}_{\perp}(s,t)$ gekoppelt (vgl. Kap. 4.1.2). Deshalb folgt ein Skalenverhalten $r_{\parallel}^2(s,t) \propto t^{3/4}$;
- $\tau_e < t < \tau_r$: In diesem Zeitbereich koppeln die Längenfluktuationen der Teilstücke untereinander ein. Die obere Zeitschranke τ_r ergibt sich als die Zeit, die eine Störung benötigt, um sich von einem Ende des Polymers zum anderen fortzupflanzen. Näherungsweise gilt analog dem Rouse-Modell $r_{\parallel}^2(s,t) \propto t^{1/2}$;

- $t \gg \tau_r$: Normale Schwerpunktsdiffusion des gesamten Polymers und deshalb lineares Skalieren $r_{||}^2(s, t) \propto t$

Alle vorgestellten Wechselwirkungsmechanismen gehen fließend ineinander über, was eine Analyse erschwert. Nur in den beiden Grenzfällen $t \ll \tau_e$ und $t \gg \tau_r$ lassen sich klar unterschiedliche skalierende Exponenten unterscheiden.

Zusammenfassend ist die longitudinale Bewegung des semiflexiblen Polymers in der Reptationsröhre weniger gut quantitativ charakterisierbar als deren transversale Bewegung, da aufgrund der endlichen Biegesteifigkeit rein entropische und enthalpische Wechselwirkungen entlang der gesamten Kontur L wesentlich stärker ineinandergreifen.

4.2 Festkörpergestützte, verschlaufte Polyelektrolytfilme

Neben viskoelastischen Körpern beschäftigt sich diese Arbeit mit viskoelastischen, festkörpergestützten, hydratisierten Polymerfilmen (vgl. Kap. 6).

Das in Kap. 6 untersuchte, negativ geladene sog. *Polyelektrolyt* Hyaluronsäure besitzt polymerisiert eine Konturlänge $\langle L \rangle > 10 \mu\text{m}$ (Rinaudo et al., 1993) bei einer intrinsischen Persistenzlänge von $l_p \approx 4 - 8 \text{ nm}$ (Cleland, 1984; Fouissac et al., 1992) und ist damit der Gruppe der flexiblen Polymere zuzuordnen. Die Persistenzlänge l_p ist bei Polyelektrolyten stark abhängig von der Ionenkonzentration des Lösungsmittels, da sog. *Gegenionen* im Lösungsmittel die zwischen Untereinheiten des Polyelektrolyts wirksamen langreichweitigen Coulomb-Wechselwirkungen durch Abschirmeffekte massiv beeinflussen können.

Neben intrinsischen Polymereigenschaften bestimmt der Verdünnungsgrad der Polyelektrolytlösungen entscheidend deren mechanische Eigenschaften. Verdünnte, halbverdünnte und konzentrierte Lösungen mit einer mittleren Maschenweite ξ können hergestellt werden, wobei ξ stark von der Ionenkonzentration des Lösungsmittels abhängt. Eine detaillierte Zusammenstellung theoretischer Grundlagen zu einzelnen Polyelektrolyten in Lösung und halbverdünnten Polyelektrolytlösungen enthält die Dissertationsschrift von A. Albersdörfer (Albersdörfer, 1999).

Aus diesen Lösungen können durch sog. *Physisorption* an geladenen Festkörperoberflächen stark verschlaufte Polymerfilme hergestellt werden, die durch anschließende chemische Kopplung an statistisch verteilten Ankerpunkten an der Oberfläche fixiert werden können.

Die Konformation der adsorbierten Ketten wird auf diese Weise gewissermaßen eingefroren. Der so verankerte Film (engl.: surface grafted film) wird abschließend einer Elektrolytlösung ausgesetzt, damit sich ungekoppelte Bereiche der Polymere wieder von der Oberfläche ablösen können.

Obwohl die genaue Struktur des Polyelektrolytfilms nicht bekannt ist, lässt das Präparationsverfahren auf die typische Konfiguration adsorbierter Polyelektrolyte mit Schleifen und freien Kettenenden unterschiedlicher Länge schließen (vgl. Abbildung 4-4, unten links). Im Gegensatz zu adsorbierten Polyelektrolyten sind chemisch gebundene Ketten irreversibel an Ankerpunkten auf der Oberfläche fixiert. Dieser Aspekt wird besser durch Modelle für verankerte Polyelektrolyt-Bürsten beschrieben (vgl. Abbildung 4-4, unten rechts). In diesem Polymerfilm wird die mittlere Maschenweite ξ definiert als hydrodynamische oder alternativ als Debye-Abschirmlänge (Albersdörfer, 1999). Sie wurde jüngst unter unterschiedlichen Ionenkonzentrationen im Lösungsmittel bestimmt (Albersdörfer, 1999) und liegt im Bereich $\xi \approx 1 - 3 \text{ nm}$.

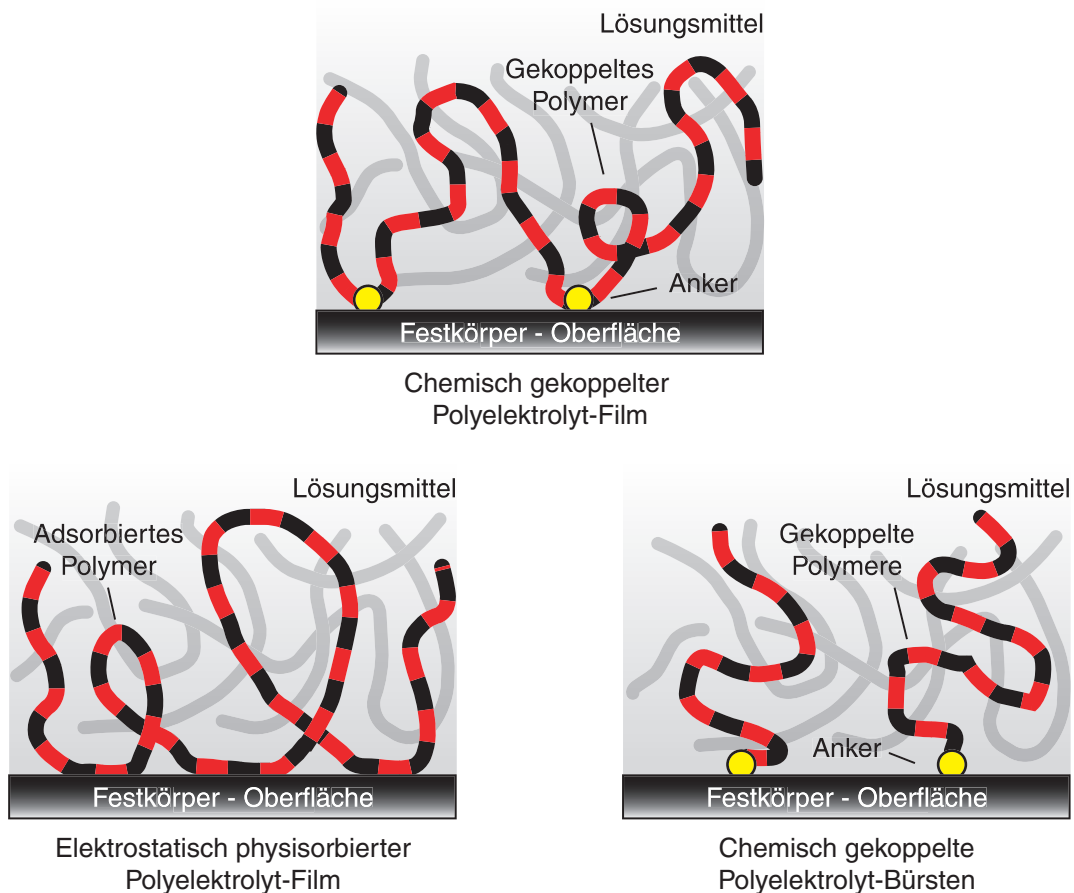


Abbildung 4-4: Oben: Schematische Darstellung der Struktur eines statistisch verankerten Polyelektrolytfilms mit Schleifen und freien Enden des Polymers. Die Polymer-Konformation beinhaltet strukturelle Aspekte von adsorbierten Polymeren (unten links) und Polymer-Bürsten (unten rechts).

4.3 Grundlagen der linearen Viskoelastizitätstheorie

Viskoelastische Polymersysteme werden seit längerem mittels klassischer, makrorheologischer Techniken untersucht (Hinner et al., 1998; Müller et al., 1991; Ruddies et al., 1993; Tempel et al., 1996). Die folgenden Kapitel geben eine Einführung in die rheologische Beschreibung viskoelastischer Systeme (Ferry, 1980; Landau und Lifschitz, 1975; Tschoegl, 1989) und deren phänomenologische Beschreibung mittels mechanischer Ersatzmodelle. Abschließend wird eine rheologische Messmethode vorgestellt.

4.3.1 Deformation und Spannung eines Körpers, Grundgleichung der Linearen Viskoelastizität

Die Einwirkung einer äußeren Kraft auf einen viskoelastischen Körper führt zu dessen Deformation. Ein beliebiger Punkt des Körpers $\vec{r} = (x_1, x_2, x_3)$ wird durch die Deformation an einen anderen Ort $\vec{r}' = (x'_1, x'_2, x'_3)$ verschoben. Quantitativ lässt sich die Deformation des Körpers durch den Verschiebungsvektor $\vec{u} = \vec{r}' - \vec{r}$ beschreiben. Der Abstand $dl = \sqrt{dx_1^2 + dx_2^2 + dx_3^2}$ zweier infinitesimal benachbarter Punkte verändert sich bei einer Deformation:

$$dl'^2 = dx_1'^2 + dx_2'^2 + dx_3'^2 = dl^2 + \sum_{i,k} 2u_{ik} dx_i dx_k \quad \text{Gleichung 4-11}$$

ist der Abstand der Punkte nach der Deformation unter Einführung des *Verzerrungstensors* u_{ik} (engl.: strain tensor):

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} + \sum_l \frac{\partial u_l}{\partial x_i} \frac{\partial u_l}{\partial x_k} \right). \quad \text{Gleichung 4-12}$$

Werden nur kleine Deformationen betrachtet, so lässt sich der Verzerrungstensor unter ausschließlicher Berücksichtigung linearer Terme vereinfachen:

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} \right). \quad \text{Gleichung 4-13}$$

Die Größe eines Volumenelements nach einer Deformation ergibt sich als $dV' = dV \left(1 + \sum_l u_{ll} \right)$, d.h. die Summe der Diagonalelemente des Verzerrungstensors gibt an, ob das Volumen bei der Deformation verändert wird.

Die mechanische Spannung, die eine Deformation des Körpers verursacht, wird durch den symmetrischen *Spannungstensor* σ_{ik} (engl.: stress tensor) beschrieben. Die Komponenten der Kraft \vec{f} pro Volumeneinheit lassen sich damit schreiben als:

$$f_i = \sum_T \frac{\partial \sigma_{il}}{\partial x_l}. \quad \text{Gleichung 4-14}$$

Die Komponenten der Kraft \vec{F} , die auf ein Teilvolumen des Körpers wirkt, ergeben sich als Integral des Spannungstensors über die Oberfläche des Volumens:

$$F_i = \int f_i dV = \oint \left(\sum_T \sigma_{il} dA_l \right). \quad \text{Gleichung 4-15}$$

Wählt man ein kubisches Teilvolumen, so beschreiben die Diagonalelemente σ_{ii} des Spannungstensors die Normalspannungen, d.h. die Dehnungs- oder Kompressionskräfte, die auf die Seitenflächen des Volumens wirken. Die übrigen Elemente σ_{ik} (mit $i \neq k$) sind Scherspannungen, die parallel zur Raumrichtung x_k wirken und an die Fläche des Volumens angreifen, deren Flächennormale parallel zu der durch x_i definierten Richtung liegt.

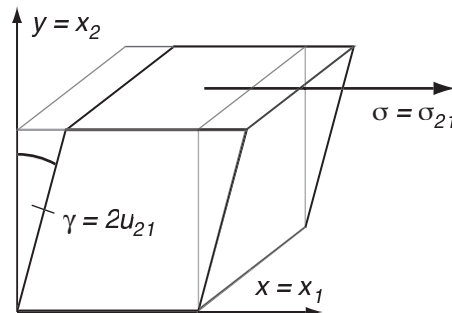


Abbildung 4-5: Geometrie der einfachen Scherung eines kubischen Volumenelements, das durch die Spannung σ um einen Winkel γ deformiert wird.

In einem einfachen Fall greift eine Scherspannung vom Betrag $\sigma = F/A$ in die durch x_i bestimmte Raumrichtung tangential an die durch die Normale $(0, 1, 0)$ definierte Fläche an (vgl. Abbildung 4-5). Die einzigen nichtverschwindenden Elemente des Verzerrungstensors sind in diesem Fall:

$$u_{12} = u_{21} = \frac{1}{2} \frac{\partial (x'_1 - x_1)}{\partial x_2} = \frac{1}{2} \tan \gamma \approx \frac{1}{2} \gamma, \quad \text{Gleichung 4-16}$$

wobei γ der Winkel ist, um den das Volumenelement geschert wird. Nur für kleine Deformationen kann $\tan \gamma$ gleich γ gesetzt werden, was aber generell zu erfüllen ist, um die einfache Form des Verzerrungstensors (vgl. Gleichung 4-13) verwenden zu können. Verzerrungs- und Spannungstensor haben dann folgende Form:

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0 & \gamma & 0 \\ \gamma & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad \text{und} \quad \sigma_{ik} = \begin{pmatrix} -p & \sigma & 0 \\ \sigma & -p & 0 \\ 0 & 0 & -p \end{pmatrix}. \quad \text{Gleichung 4-17}$$

p ist ein isotroper Druck im Volumenelement.

Zwischen Deformation eines viskoelastischen Körpers und mechanischer Spannung lässt sich unter Beachtung einiger Bedingungen ein Zusammenhang formulieren. Unter der Voraussetzung, dass kleine Deformationen du_{ik} auf lineare Weise (engl.: linear response) Änderungen der Spannung $d\sigma_{ik}$ verursachen, lautet die *Grundgleichung de Viskoelastizitätstheorie*:

$$\sigma_{ik} = -p\delta_{ik} + 2 \int_{-\infty}^t G(t-t') \frac{\partial u_{ik}(t')}{\partial t} dt'. \quad \text{Gleichung 4-18}$$

p ist hierbei der isotrope Druck im Volumenelement, $\partial u_{ik}/\partial t$ die Scherrate und $G(t)$ wird als *Relaxationsmodul* bzw. *-funktion* bezeichnet. Diese Gleichung folgt aus dem Boltzmannschen Superpositionsprinzip, das besagt, dass sich die Spannung zur Zeit t aus allen früheren Deformationen berechnen lässt. Das Relaxationsmodul enthält die interessante Information über das viskoelastische Antwortverhalten eines viskoelastischen Körpers. In rheologischen Untersuchungen studiert man diese viskoelastische Antwortfunktion eines Körpers.

Bei der Anwendung von Rheometern liegt üblicherweise folgende Situation vor: Es werden am untersuchten System ausschließlich Scher- und keine Normalspannungen gemessen. Das Scherfeld in der Probe hängt von einer räumlichen Koordinate ab und ist homogen. Drücke p sind irrelevant, da lediglich Spannungsdifferenzen betrachtet werden. In diesem Fall wird folgende (eindimensionale) Formulierung von Gleichung 4-18 verwendet:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G(t-t') \frac{\partial \gamma(t')}{\partial t} dt'. \quad \text{Gleichung 4-19}$$

σ ist die Scherspannung und γ der die Deformation beschreibende Winkel. Gleichung 4-19 eignet sich für die Analyse von rheologischen Versuchen, bei denen eine zeitlich veränderliche Deformation vorgegeben wird und sich die Auswirkungen auf die Spannung des Körpers beobachten lassen.

Wenn eine zeitliche Änderung der Scherkraft vorgegeben wird und die Verzerrung des viskoelastischen Systems beobachtet werden kann, wird Gleichung 4-18 auch in einer anderen, komplementären Form geschrieben:

$$\gamma(t) = \int_{-\infty}^t J(t-t') \frac{\partial \sigma(t')}{\partial t'} dt'. \quad \text{Gleichung 4-20}$$

$J(t)$ ist hier die *Kriechkomplianz* bzw. *-nachgiebigkeit*, welche als viskoelastische Antwortfunktion fungiert.

In Gleichung 4-19 sind rein elastisches bzw. rein viskoses Verhalten als Grenzfälle enthalten:

Ist $G(t) = G = \text{const.}$, so ergibt sich:

$$\sigma(t) = G \cdot \gamma(t). \quad \text{Gleichung 4-21}$$

Dies ist das Hookesche Gesetz, welches das Verhalten rein elastischer Festkörper beschreibt. G heißt hier *Schub-* bzw. *Schermodul*.

Setzt man allerdings $G(t) = \eta \delta(t)$ so folgt:

$$\sigma(t) = \eta \frac{\partial \gamma(t)}{\partial t}. \quad \text{Gleichung 4-22}$$

Das ist das Newtonsche Gesetz für rein viskose Flüssigkeiten mit *Viskosität* η .

4.3.2 Mechanische Ersatzmodelle für viskoelastische Systeme

Zur phänomenologischen Modellierung des Verhaltens viskoelastischer Systeme benutzt man mechanische Modelle, die aus Dämpfungs- und Federgliedern als Grundeinheiten aufgebaut sind. Mit $\sigma(t)$ als zeitlichem Verlauf der Scherspannung und $\gamma(t)$ als Scherdeformation gilt für das Verhalten dieser Grundelemente:

- Dämpfungsglieder der Viskosität η spiegeln das dissipative Verhalten einer Flüssigkeit wieder.
- Federglieder mit einer Federkonstanten G beschreiben das energiespeichernde Verhalten eines Festkörpers.
- Für ein viskoelastisches Medium sind η und G gleichbedeutend mit Viskosität und Gleichgewichts-Relaxationsmodul.

Für eine Parallel- bzw. Reihenschaltung von i Grundelementen gelten die folgenden Regeln für Deformation und Spannung:

Parallelschaltung: $\gamma = \gamma_1 = \gamma_2 = \dots = \gamma_i$; $\sigma = \sum_i \sigma_i$

Reihenschaltung: $\sigma = \sigma_1 = \sigma_2 = \dots = \sigma_i$; $\gamma = \sum_i \gamma_i$

Abbildung 4-6 zeigt einfache Kombinationen der Grundelemente. Die Reihenschaltung eines viskosen Elements mit einer Feder sowie die Parallelschaltung dieser beiden Elemente sind die einfachsten viskoelastischen Modelle. Sie werden als Maxwell- bzw. Voigt-Kelvin-Modell bezeichnet. Das Zener-Modell, eine Parallelschaltung von Maxwell-Element und zusätzlichem Federglied, wird oft auch als lineares Standard-Modell eines Festkörpers bezeichnet, da es nach Zener das viskoelastische Verhalten von Festkörpern beschreibt. Das erweiterte Voigt-Modell, eine Reihenschaltung von Voigt-Modell und einer zusätzlichen Viskosität wird später zur Interpretation der Experimente in Kap. 5.3 verwendet. Das Verhalten der in Abbildung 4-6 gezeigten viskoelastischen Körper in transienten rheologischen Experimenten wird im folgenden Kapitel diskutiert.

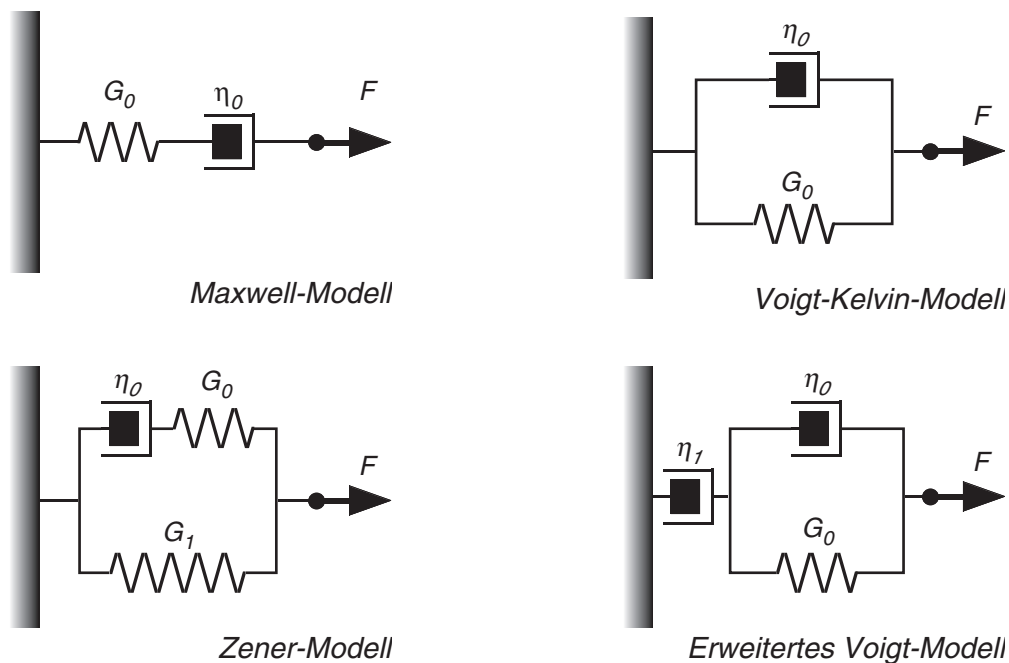


Abbildung 4-6: Einfache, mechanische Modelle zur phänomenologischen Beschreibung viskoelastischer Körper. Oben links: Maxwell-Modell, Serienschaltung eines Feder- und Dämpfungsglieds. Oben rechts: Voigt-Kelvin-Modell, Parallelschaltung eines Feder- und Dämpfungsglieds. Unten links: Zener-Modell, Parallelschaltung eines Federelements und eines Maxwell-Elements. Unten rechts: Erweitertes Voigt-Kelvin-Modell, Serienschaltung eines Voigt-Kelvin-Modells und zusätzlichem Dämpfungsglied.

4.3.3 Transiente Messmethode

In Gleichung 4-18 gilt das Boltzmannsche Superpositionsprinzip. Daher können Messungen des Relaxationsmoduls und der Kriechkomplianz durch verschiedenste Anregungsarten erhalten werden. Bei *transienten* rheometrischen Methoden wird die viskoelastische Antwortfunktion eines Körpers als Funktion der Zeit gemessen. Falls die Messung der Antwortfunktionen frequenzabhängig erfolgt, spricht man von *dynamischen* Methoden, auf die aber hier nicht näher eingegangen wird (Schmidt, 1999).

Bei transienten Methoden unterscheidet man zwischen *Spannungsrelaxations-* (engl.: stress relaxation) und *Kriechantwort-*Experimenten (engl.: creep response). Bei Messungen der Spannungsrelaxation wird der zeitliche Verlauf der Scherspannung $\sigma(t)$ innerhalb des untersuchten Materials nach Anlegen einer plötzlichen, konstanten Deformation γ_0 betrachtet. Dies ist mit der MT-Methode (vgl. Kap. 3.5) nicht realisierbar, da zwar die Kraft auf das Sondenpartikel, nicht aber dessen Auslenkung kontrolliert werden kann.

Bei Kriechantwort-Experimenten wird der viskoelastische Körper einer konstanten, zeitlich stufenförmigen Scherspannung ausgesetzt ($\sigma(t) = 0$ für $t < t_0$, $\sigma(t) = \sigma_0$ für $t > t_0$). Gemessen wird die Zeitabhängigkeit der Kriechkomplianz $J(t)$. Mit der MT-Methode wird ein solches Experiment dadurch realisiert, dass auf das magnetische Partikel eine konstante Kraft F_0 ausgeübt und die Position des Partikels nach Einschalten der Kraft gemessen wird. Im folgenden soll kurz auf die Theorie der Kriechantwort-Experimente eingegangen werden.

Wird die Scherspannung σ_0 innerhalb eines kurzen Zeitintervalls τ eingeschaltet, d.h. dass von $t = t_0 - \tau$ bis $t = t_0$ die Scherspannung mit einer Rate $\dot{\sigma}(t) = \sigma_0 / \tau$ von $\sigma = 0$ auf $\sigma = \sigma_0$ anwächst, ergibt sich aus Gleichung 4-20:

$$\gamma(t) = \int_{t_0 - \tau}^{t_0} J(t - t') \cdot \frac{\sigma_0}{\tau} dt'. \quad \text{Gleichung 4-23}$$

Mit dem Mittelwertsatz der Integralrechnung wird hieraus:

$$\gamma(t) = \frac{\sigma_0}{\tau} \cdot \tau \cdot J(t - t_0 + \varepsilon\tau), \quad \text{mit } 0 \leq \varepsilon \leq 1 \quad \text{Gleichung 4-24}$$

und für $t_0 = 0$ sowie $t \gg \tau$ schließlich:

$$\gamma(t) = \sigma_0 \cdot J(t). \quad \text{Gleichung 4-25}$$

Für große Zeiten sind Kriechkomplianz und Deformation also zueinander proportional. Der Vergleich von Gleichung 4-25 und dem Hookeschen Gesetz (vgl. Gleichung 4-21) zeigt

die physikalische Bedeutung der Kriechkomplianz, welche die Einheit eines reziproken Elastizitätsmoduls besitzt. Durch Gleichung 4-25 ist es möglich, über die Messung der Deformation die Kriechkomplianz zu ermitteln.

Für viskoelastische Festkörper erreicht der Deformationszustand nach einer Zeit τ_d , der sog. *terminalen Relaxationszeit*, einen konstanten Wert $\gamma_0 = \sigma_0 \cdot J_0$, wobei J_0 als *Gleichgewichts-Kriechkomplianz* bezeichnet wird (Beispiel für viskoelastische Festkörper: Quervernetzte Polymernetzwerke).

Bei viskoelastischen Flüssigkeiten hingegen wird kein konstanter Deformationszustand erreicht. Ab dem Zeitpunkt τ_d stellt sich vielmehr ein Zustand gleichmäßigen Fließens ein (Beispiel für viskoelastische Flüssigkeiten: Verschlaufte Polymernetzwerke):

$$\gamma(t) = \sigma_0 \cdot \left(J_0 + \frac{t}{\eta_0} \right) \quad \text{für } t > \tau_d. \quad \text{Gleichung 4-26}$$

Hierbei bezeichnet η_0 die sog. *Nullviskosität* der viskoelastischen Flüssigkeit.

Für die viskoelastischen Modellsysteme aus Kap. 4.3.2 ergeben sich die folgenden zeitabhängigen Kriechkomplianzen (Schmidt, 1999), die in Abbildung 4-7 auch grafisch dargestellt werden:

- Maxwell-Modell : $J(t) = \frac{1}{G_0} \cdot \left(1 + \frac{t}{\tau} \right);$
- Voigt-Kelvin-Modell : $J(t) = \frac{1}{G_0} \cdot \left(1 - e^{-t/\tau} \right);$
- Zener-Modell: $J(t) = \frac{1}{G_1} \cdot \left(1 - \frac{G_0}{G_0 + G_1} e^{-\frac{G_1}{G_0 + G_1} \frac{t}{\tau}} \right);$
- Erweitertes Voigt-Kelvin-Modell: $J(t) = \frac{1}{G_0} \cdot \left(1 - e^{-t/\tau} \right) + \frac{t}{\eta_1};$

Hierbei ist die Zeitkonstante $\tau = \eta_0/G_0$. In Modellsystemen, die eine Parallelschaltung aus Dämpfungs- und Federglied enthalten (Voigt-Kelvin-, Zener- und Erweitertes Voigt-Kelvin-Modell), kann diese Konstante als die Relaxationszeit interpretiert werden, die das System benötigt, um das in Gleichung 4-25 bzw. Gleichung 4-26 abgeleitete Langzeitverhalten auszubilden.

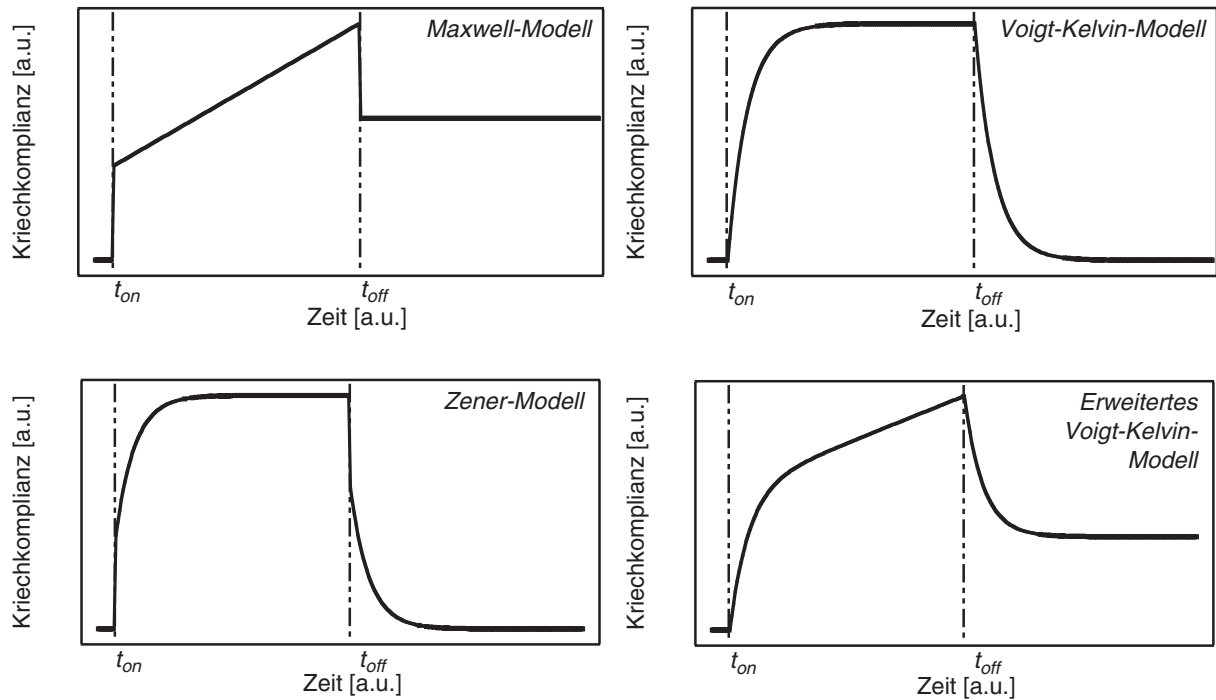


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung der Kriechantwort der in Kap. 4.3.2 eingeführten Modellsysteme. Gezeigt ist das Antwortverhalten auf eine ab dem Zeitpunkt $t_{on} = 0$ wirkende Scherspannung, die bei t_{off} wieder abgeschaltet wird. In *Retardations*-Modellen, die durch ein Sättigungsverhalten charakterisiert sind, wird die wirkende Scherspannung durch interne Kräfte des Modellsystems im Gleichgewicht gehalten. Im Gegensatz dazu bewirkt in *Relaxations*-Modellen die Scherspannung gleichzeitig eine Deformation des Systems und viskoses Fließen, was sich in einem konstanten Langzeit-Fluss manifestiert. Außerdem kehren diese Systeme nach Abschalten der Scherspannung nicht mehr in die Ausgangslage zurück.

IV Experimenteller Teil

5 Semiflexible Polymernetzwerke

5.1 Aktin

Das Biopolymer Aktin wurde erstmals in seiner monomeren, globulären Form (sog. *G-Aktin*) aus einem Extrakt von Muskelgewebe isoliert (Straub, 1942). Die makroskopische Muskelkontraktion wird durch ein mikroskopisches, energiegetriebenes Ineinandergleiten von Myosinbündeln und polymerisierten Aktinfilamenten (sog. *F-Aktin*) verursacht (Huxley, 1969). Daher hat Aktin mit ca. 25 % einen hohen Anteil am gesamten Zellprotein in Muskelzellen von Wirbeltieren (Pollard, 1981). Auch im Zytoplasma von Nicht-Muskelzellen liegt sein Anteil noch bei bis zu 15 %. In diesen Zellen stellt das zur Gruppe der Mikrofilamente gehörende F-Aktin neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten den dritten, strukturellen Baustein des Zell-Zytoskeletts dar, das alle eukaryotischen Zellen besitzen (als Eukaryoten werden Zellen mit Zellkern bezeichnet). Dieses intrazelluläre, dreidimensionale Polymernetzwerk bestimmt wesentlich die viskoelastischen Eigenschaften der Zelle und deren charakteristische Form. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei Vorgängen zur Formveränderungen während Zellteilung und -migration (Sackmann, 1994).

Monomeres G-Aktin, das nur unter niederionischen Bedingungen vorliegt, ist ein annähernd globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Strukturell baut sich das Monomer aus einer auf zwei annähernd gleich große Domänen verteilten Aminosäuresequenz von 375 Einheiten auf (Kabsch et al., 1990). Die Abmessungen des Monomers betragen etwa 3.3 nm x 5.6 nm x 5.0 nm.

Bei erhöhten Salzkonzentrationen (sog. *physiologische Bedingungen*, d.h. ca. 100 mM KCl) und Anwesenheit von Kalzium- und Magnesiumionen polymerisiert G-Aktin zu Aktinfilamenten in Form einer doppelsträngigen Helix mit einer Dicke von 7 nm und einer Pe-

riodizität von 72 nm (Bullitt et al., 1988). Abbildung 5-1 zeigt den strukturellen Aufbau eines Aktinfilaments. *In vitro* setzt diese Polymerisierung oberhalb einer Aktin-Konzentration von ca. 0.04 mg/ml (0.1 μM) ein. Es entstehen Filamente mit einer mittleren Länge von 22 μm (Käs, 1993). In lebenden Zellen übersteigt die Filamentlänge dagegen selten 1 μm (Bretscher, 1991), da die Zelle diese ständig aktiv durch eine Vielzahl von aktinbindenden Proteinen reguliert und damit den Anforderungen anpaßt (Pollard, 1986).

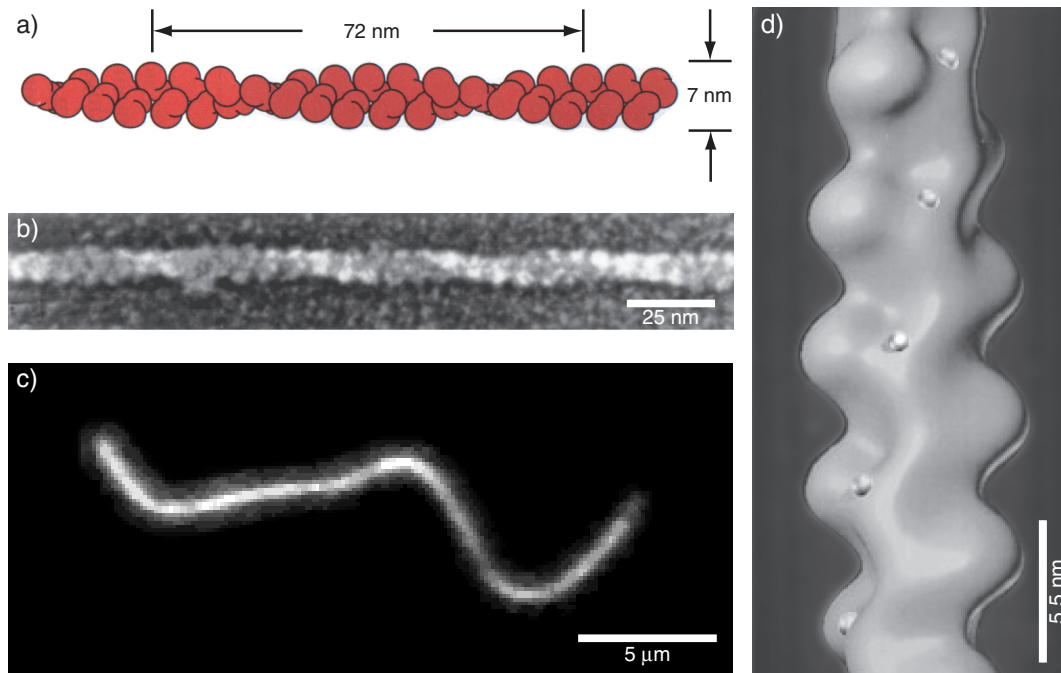


Abbildung 5-1: Struktur des Aktinfilaments. a) Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus. Globuläre Monomere lagern sich in Form einer Doppelhelix aneinander an (Periodizität: 72 nm, Durchmesser: 7 nm). b) Die FESEM-Aufnahme (engl.: field-emission scanning electron microscope) zeigt bei gleicher Ortsauflösung die helikale Struktur wie in Abbildung 5-1a (Steinmetz et al., 1997). c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Aktinfilaments von ca. 20 μm Länge eingebettet in ein halbverdünntes Netzwerk. Das Aktinfilament wurde mit TRITC-Phalloidin fluoreszenzmarkiert. d) 3D-Rekonstruktion der Massenverteilung eines Aktinfilaments aus EM-Aufnahmen. Zusätzlich wurden mittels kolloidalem Gold die Bindungsstellen von Phalloidin markiert. (Steinmetz et al., 1997).

Bei der Polymerisation von Aktin handelt es sich nicht um einen statisch endenden Prozess, der nach Keimbildungs- und Wachstumsphase mit der Auspolymerisierung der Monomere zu Filamenten im thermodynamischen Gleichgewicht endet. Die Polymerisierung läuft bei Anwesenheit von ATP (Adenosin-Triphosphat) vielmehr in einen energiedissipierenden stationären Gleichgewichtszustand (Wegner, 1976), in dem an einem Filamentende (sog. „Plus“-Ende, engl.: barbed end) weiterhin Monomere eingebaut werden, während am anderen Ende (sog. „Minus“-Ende, engl.: pointed end) eine Depolymerisation mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt (sog. „Tretmühlen“-Prozess, engl.: treadmilling).

F-Aktinlösungen in einem Konzentrationsbereich von einigen $\mu\text{g/ml}$ bis 2 mg/ml formen *in vitro* isotrope, verschlaufte Netzwerke ohne chemische Quervernetzung, die sich viskoelastisch verhalten (Käs et al., 1995). Wegen gegenseitiger sterischer Behinderung, u.a. aufgrund gegenseitiger Abstoßung der Filamente durch ihre stark negative Ladung, können sich einzelne Polymere in diesen Lösungen nicht ungehindert gegeneinander bewegen, so dass es zu Verschlaufungen bzw. Verhedderungen kommt (vgl. Abbildung 5-2). Bei höheren Konzentrationen bilden sich in diesen Lösungen deshalb sogar flüssigkristallin geordnete Phasen (sog. *nematische* Bereiche).

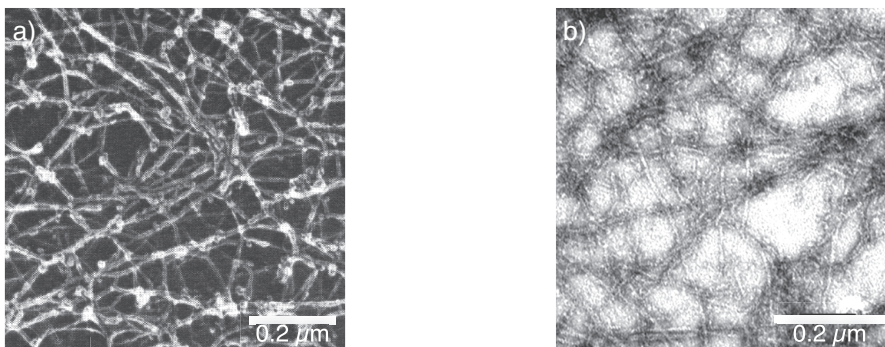


Abbildung 5-2: EM-Aufnahmen stark und schwach verschlaufter F-Aktinlösungen. a) Aufnahme (Gefrierätz-Technik) eines stark verschlauferten Netzwerks (Hartwig, 1992). b) Aufnahme (Transmissions-Technik) eines schwach verschlauferten Netzwerks. Die Semiflexibilität der Aktinfilamente (weder gestreckte noch in sich verknäulte Polymere) im Netzwerk ist gut erkennbar.

Die physikalischen Eigenschaften von Aktinfilamenten und -lösungen und nicht nur deren biologische Bedeutung machen sie zu besonders interessanten Modellsystemen der Polymerphysik. Das Verhältnis von Persistenz- zu Konturlänge ordnet Aktinfilamente der Klasse der semiflexiblen Polymere zu (vgl. Kap. 4.1). Im Vergleich zu künstlichen Polymeren besitzen *in vitro* polymerisierte Aktinfilamente außerdem äußerst große Konturlängen, was mikroskopische Untersuchungen ermöglicht, die Einblicke in Wechselwirkungsprozesse auf molekularer Ebene gestatten. Zudem ist die sehr hohe Gelationseffizienz zu nennen: Aktin bildet bereits Gele unterhalb von 0.1 Vol.-% in Lösung (MacKintosh und Janmey, 1997). In dynamischen rheometrischen Experimenten besitzen F-Aktinlösungen weiterhin eine von der Geschwindigkeit der applizierten Scherspannung abhängige Viskosität und Elastizität, wobei die gemessenen Elastizitätsmoduln in der Größenordnung von wenigen Pa liegen. F-Aktinlösungen können also auch als extrem weiche Festkörper bezeichnet werden (zum Vergleich: Kupfer als harter Festkörper besitzt einen Elastizitätsmodul von 120 GPa).

5.1.1 Präparation von Aktin

G-Aktin wird am Institut aus Kaninchenmuskel nach dem Verfahren von Pardee und Spudich (1992) präpariert. Die Präparation wird um einen zusätzlichen Reinigungsschritt mittels Gelfiltration nach MacLean-Fletcher und Pollard (1980) ergänzt. Ein Aktivitätstest wird mit Hilfe von Kugelfall-Viskosimetrie durchgeführt. Die Konzentration wird photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 290 nm durchgeführt, der Absorptionskoeffizient A_λ beträgt $A_{290nm} = 0.63 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Aufbewahrung des Proteins erfolgt nach Sterilfiltration in G-Puffer (2mM Tris, 0.2 mM ATP, 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM Dithiothreitol (DTT), 0.05 Vol.-% einer 20 %igen NaN_3 -Lösung, pH = 7.5) bei etwa 0 °C auf Eis. Unter diesen Pufferbedingungen liegt Aktin in seiner globulären Form vor.

Zur Initiation der Aktinpolymerisierung wurden 9 Teile einer Mischung von G-Aktin in G-Puffer und 1 Teil 10-fach konzentrierter F-Puffer (20 mM Tris, 5 mM ATP, 1 M KCl, 2mM CaCl_2 , 20mM MgCl_2 , 2mM Ascorbinsäure, pH = 7.5) so gemischt, dass die resultierende Lösung Aktin in der gewünschten Konzentration enthält. Die Polymerisierung dieser Proben erfolgte bei ca. 0 °C über Nacht auf Eis. Experimente mit Aktin aus einer Charge wurden in einem Zeitraum von bis zu 14 Tagen nach Präparation durchgeführt.

5.1.2 Konturmarkierung einzelner Aktinfilamente

Für einen Teil der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die Kontur einzelner Filamente markiert (vgl. Abbildung 5-1c). Man benutzt dafür Verbindungen von Fluorophoren mit Phalloidin, einer Komponente des Gifts des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), mit einem Molekulargewicht von 789 Da. Einzelne Phalloidin-Moleküle binden an polymerisiertes Aktin, indem sie jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgende Monomere in die Helix-Struktur des Filaments eingebaut werden (vgl. Abbildung 5-1d). Dadurch wird die Monomer-Monomer-Bindung im Filament verstärkt, was die Monomerabspaltung am Filament verringert (sog. *Stabilisierung*). Außerdem erhöht dies die Biegesteifigkeit der Filamente.

Um die Filamentkontur homogen mit Fluorophoren zu markieren, wurden zwei kommerziell erhältliche Verbindungen von Fluorophoren und Phalloidin verwendet: TRITC-Phalloidin (Sigma, Deisenhofen), ein Rhodamin-Phalloidin-Derivat, mit Absorptions- bzw. Emissionswellenlänge von 554 bzw. 573 nm und Texas-Red-X®-Phalloidin (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) mit Absorptions- bzw. Emissionswellenlänge von 591 bzw. 608 nm.

Einer Standardprozedur folgend (Käs, 1993) wurden die wässrigen Fluorophor-Phalloidin-Lösungen F-Aktin in isomolarem Verhältnis beigemischt, ca. 30 min nachdem die Aktinpolymerisierung gestartet wurde. Bei Raumtemperatur befinden sich F-Aktinlösungen zu diesem Zeitpunkt bereits im dynamischen Gleichgewicht des Polymerisierungsvorgangs und es erfolgt eine Stabilisierung der Filamente in ihrer nativen Längenverteilung (Wegner, 1976). Anschließende Lagerung der Lösung über Nacht bei ca. 0 °C unter Lichtabschluss stellte eine möglichst vollständige, homogene Filamentmarkierung sicher.

5.1.3 Aktinfilamente für Segmentmarkierung mittels kolloidaler Sondentechnik

Ausgezeichnete Stellen des einzelnen Filaments (sog. *Segmente*) lassen sich mittels Anheften kolloidaler Sonden markieren. Als biochemisches Kopplungssystem wurde das aus der Molekularbiologie bekannte Biotin-(Strept)-Avidin-System verwendet (Wilchek und Bayer, 1990). Biotin (Vitamin H) ist ein langgestrecktes Molekül mit einem Molekulargewicht von 244.3 Da. Das Glykoprotein Avidin, ein Bestandteil des Eiweiß von Hühnereiern, besitzt einen tetrameren Aufbau mit einem Molekulargewicht von 67 kDa. Jede der vier Untereinheiten besitzt eine Bindungsstelle für Biotin (sog. *Bindungstasche*). Auch das dem Avidin sehr ähnliche Streptavidin, produziert von Bakterien *Streptomyces avidinii*, besitzt diese tetramere Molekularstruktur, je eine Biotin-Bindungstasche pro Untereinheit, jedoch ein Molekulargewicht von nur 60 kDa.

Die Bindungen, die Avidin bzw. Streptavidin mit Biotin eingehen, gelten als die stärksten nichtkovalenten Wechselwirkungen, die für Proteine und Liganden bekannt sind (Dissoziationskonstanten: $k_D(\text{Avidin-Biotin}) = 0.6 \cdot 10^{-15} \text{ M}^{-1}$ bzw. $k_D(\text{Streptavidin-Biotin}) = 4.0 \cdot 10^{-14} \text{ M}^{-1}$). Die Bindung erfolgt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und besitzt einige für Markierungszwecke positive Eigenschaften: Sie wird schnell ausgebildet, was kurze, präparative Inkubationszeiten ermöglicht, ist über einen weiten pH- bzw. Temperaturbereich stabil und organische Lösungsmittel und andere denaturierende Einflüsse haben keinerlei Wirkung auf den Komplex.

Für die Segmentmarkierung mittels kolloidaler Sonden wurde Biotin auf Aktinfilamente aufgebracht, während die Oberfläche der kolloidalen Sonden mit (Strept)-Avidin beschichtet vorlag (vgl. Kap. 3.1.1 bzw. 3.1.2). Globuläres, mit Biotin funktionalisiertes sog. *Biotin-Aktin* wurde ebenfalls am Institut aus G-Aktin nach der Methode von Okabe und Hirokawa (1989) hergestellt, nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (vgl. Kap.

5.1.1) in G-Puffer tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren, und anschließend bei -80 °C gelagert. Kurz vor Verwendung wurde die benötigte Menge Biotin-Aktin in lauwarmen Wasser bei ca. 37 °C aufgetaut.

Bei Verwendung unmagnetischer Sonden wurden experimentell optimierte Mischungen von Biotin-Aktin und G-Aktin mit Konzentrationsverhältnissen $c(\text{Biotin-Aktin}):c(\text{G-Aktin})$ zwischen 1:50 und 1:20 hergestellt. G-Aktin und Biotin-Aktin besitzen identische Polymerisierungskinetiken, weshalb Biotin-Aktin homogen verteilt in die entstehenden sog. *Mischaktinfilamente* eingebaut wird (Okabe und Hirokawa, 1989). Diese Mischung stellt sicher, dass pro Filament genügend Bindungsstellen vorhanden sind, aber nicht mehrere Filamente an eine Kugel binden, was zu unerwünschten Vernetzungen der Aktinlösung führen kann. In Kombination mit magnetischen Partikeln wurden ausschließlich reine Biotin-Aktinfilamente verwendet.

Die Segmentmarkierung der Mischaktin- bzw. Biotin-Aktinfilamente mit kolloidalen Sonden erfolgte bei Verwendung von unmagnetischen bzw. magnetischen Partikeln nach unterschiedlichen Präparationsvorschriften, die gesondert in den Kap. 5.2.1 bzw. 5.3.1 eingeführt werden.

5.2 Diffusion einzelner Polymere im verschlauften Netzwerk

Aufgrund der großen Konturlänge kann die Konformationsdynamik einzelner Aktinfilamente und ihre Diffusion in verschlauften Netzwerken mikroskopisch beobachtet werden. Dies ermöglicht direkte Messungen der Biegesteifigkeit, die Quantifizierung der Diffusion entlang der Reptationsröhre oder der durch Scherkräfte induzierten Orientierung einzelner Polymere im Netzwerk (Käs, 1993; Käs et al., 1995). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Konformationsdynamik und Brownschen Bewegung einzelner Filamente können mit makroskopischen viskoelastischen Parametern des Netzwerks verglichen werden.

Die Frequenzabhängigkeiten der makroskopischen viskoelastischen Moduln (vgl. Kap. 4.3) verschlauerter Aktinlösungen können teils erstaunlich gut im Rahmen des in Kap. 4.1.3 vorgestellten mikroskopischen Modells interpretiert werden (Morse, 1998a; Morse, 1998b). Bis jetzt gibt es allerdings nur vorläufige, direkte experimentelle Beweise für dieses Modell (Käs, 1993; Käs et al., 1994). Abweichend von diesem Modell lieferten diese Untersuchungen auch Hinweise auf massive, ortsabhängige Fluktuationen des Reptationsröhrendurchmessers für einzelne Polymere. Außerdem wurden in diesen mikroskopischen Studien für die Bewegung entlang der Reptationsröhre Diffusionskoeffizienten ermittelt, deren Werte um mehrere Ordnungen größer waren als aufgrund makrorheologischer Untersuchungen zu erwarten war (Ruddies et al., 1993).

Die in dieser Arbeit eingeführte kolloidale Sondentechnik ermöglicht weitergehende mikroskopische Einblicke in die Wechselwirkung des einzelnen Filaments mit seiner direkten Umgebung im verschlauften Netzwerk. Erstmals können thermisch getriebene Bewegungen einzelner Polymersegmente entlang und senkrecht zur Ausrichtung des Filaments über lange Zeiten untersucht werden. Neben Analysen zur Konformationsdynamik können deshalb auch Langzeitstudien zur Diffusion einzelner Filamente realisiert werden, die helfen, die angesprochene Diskrepanz zu klären.

5.2.1 Probenpräparation mit unmagnetischen Partikeln

Die Präparation der untersuchten Proben erfolgt in mehreren, voneinander unabhängigen Arbeitsschritten:

- Herstellung kugelmarkierter Aktinfilamente (sog. *Reporterfilamente*) unter Verwendung unmagnetischer, kolloidaler Polystyrol- oder Goldsonden (vgl. Kap. 3.1.1);
- Herstellung einer unmarkierten Aktinlösung als sog. *Einbettungsnetzwerk* für Reporterfilamente;
- Einbettung der Reporterfilamente in unmarkiertes Netzwerk vor der Messung.

Kugelmarkierte Aktinfilamente: Nach Kap. 5.1.3 wurde eine 5 μM auspolymerisierte Mischaktinlösung hergestellt ($c_a = 210 \mu\text{g/ml}$, Volumen = 125 μl). Teilweise wurde zusätzlich eine Konturmarkierung nach Kap. 5.1.2 vorgenommen. Anschließend wurde eine geeignete Verdünnung der Kugelstammlösungen (vgl. Kap. 3.1.1) in G-Puffer hergestellt (Optimale Konzentration: ca. $10^{12} - 10^{13}$ Kugeln/ml). Diese Verdünnung wurde für 20 min auf Eiswasser im Ultraschallbad beschallt, um Verklumpungen der Kugeln aufzulösen. Mischaktin- und die Kugellösung wurden danach zu gleichen Teilen (je ca. 40 μl) in einem separaten Reaktionsgefäß gemischt. Eine optimale Durchmischung beider Lösungen gelang durch Verwendung eines Standrotators (TEST-TUBE-ROTATOR, Model 34528, Snijders Tilburg, Tilburg, Niederlande) für weitere 12 h bei ca. 4 °C. Während dieser Phase lagern sich die (Strept-)Avidin beschichteten Kugeln an die Filamente an.

Unmarkiertes Einbettungsnetzwerk: Nach Kap. 5.1.1 wurde eine 23.8 μM F-Aktinlösung ($c_a = 1.0 \text{ mg/ml}$, Volumen = 250 μl) angesetzt. Für das Einbettungsaktin wurde ausschließlich G-Aktin verwendet, um spätere Wechselwirkungen der (Strept-)Avidin Kugeln mit dem Einbettungsnetzwerk auszuschließen.

Einbettung der Reporterfilamente in unmarkiertes Netzwerk: Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurde das auf dem Mikroskop zu untersuchende Präparat hergestellt. Es wurden zuerst 0.5 – 1.0 μl der Reporterfilamente in 1 ml Antiox-F-Puffer (2 mM Tris, 0.5 mM ATP, 100 mM KCl, 0.2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 0.2mM Ascorbinsäure, 0.2 mg/ml Glukose, 0.05 mg/ml Glukoseoxidase, 0.01 ml/ml Katalase, 0.5 Vol.-% Mercaptoethanol, pH = 7.5) verdünnt. Die enthaltenen Antioxidantien erhöhen die Stabilität der Reporterfilamente speziell in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen gegen lichtinduzierte Degradationsprozesse (sog. *Bleichprozesse*). Bei der Verwendung von Goldkolloid

musste auf Mercaptoethanol verzichtet werden, da dieser die Funktionalisierung der Kugeln angreift. Durch anschließendes Mischen dieser Verdünnung mit dem Einbettungsaktin erhielt man die gewünschte Netzwerkkonzentration von 0.2 - 0.9 mg/ml. Ca. 70 μ l dieser Mischung wurden auf ein sauberes, mit Fettrand versehenes Deckglas pipettiert, auf das ein Objektträger gelegt und leicht festgedrückt wurde.

5.2.2 Durchführung der Messungen

Mikroskopische Aufnahmen der an den Reporterfilamenten haftenden Kugeln wurden je nach verwendeter Kugelsorte mit den in Kap. 3.2 bzw. 3.3 eingeführten Techniken der klassischen Fluoreszenz-Video-Mikroskopie (Kugelsorte: FluoSpheres®, vgl. Kap. 3.1.1) oder der konfokalen Ultramikroskopie (Kugelsorte: Colloidal Gold, vgl. Kap. 3.1.1) bei ca. 20 °C Raumtemperatur erstellt. Nur durch Kombination beider Techniken konnte die Dynamik der Reporterfilamente umfassend charakterisiert werden, da jede der Techniken spezifische Vor- und Nachteile besitzt:

- *Fluoreszenz-Video-Mikroskopie*: Neben der primär beobachteten Kugelbewegung kann die Konformationsdynamik des Reporterfilaments untersucht werden. Die Verwendung von Rhodamin-Phalloidin als Farbstoff bringt es aber mit sich, dass erstens Bleichprozesse auftreten, welche die Beobachtungsdauer pro Reporterfilament auf max. 5 min herabsetzen, und dass zweitens die Biegesteifigkeit der Reporterfilamente leicht erhöht ist. Im übrigen bleibt die Zeitauflösung technisch auf 25 Bilder/Sekunde beschränkt.
- *Konfokale Ultramikroskopie*: Im Reflexionsmodus (Wellenlänge: 647 nm) lässt sich nur die Bewegung der Kugeln detektieren, was ausschließlich dynamische Untersuchungen einzelner Segmente der Reporterfilamente erlaubt. Da aber keine Bleichprozesse innerhalb der Probe auftreten, gibt es keinerlei zeitliche Beschränkungen der maximal möglichen Beobachtungsdauer. So konnten Langzeitstudien bis ca. 40 min. realisiert werden. Zudem können technisch Zeitauflösungen bis zu 240 Bildern/Sekunde erreicht werden, was Untersuchungen der Segmentdynamik in einem Zeitbereich von fast acht Größenordnungen (von ca. $4.2 \cdot 10^{-3}$ bis $1.4 \cdot 10^5$ s) ermöglicht.

Die quantitative Auswertung der Kugelbewegung erfolgte unter Verwendung der in Kap. 3.4.2 erwähnten Software. Als Ergebnis erhielt man die zeitaufgelöste, laterale Position (sog. *Trajektorie*) der untersuchten Kugel mit einer Genauigkeit von ca. 2-5 nm. Abbildung 5-3 zeigt eine schematische Darstellung des Messablaufs (Abbildung 5-3a), eine fluoreszenzmikroskopische Einzelaufnahme eines kontur- und kugelmarkierten Aktinfilaments (Abbildung 5-3b), und die zweidimensionale Trajektorie der Kugelbewegung, die aus der gesamten Aufnahmesequenz des dargestellten Filaments ermittelt wurde (Abbildung 5-3c).

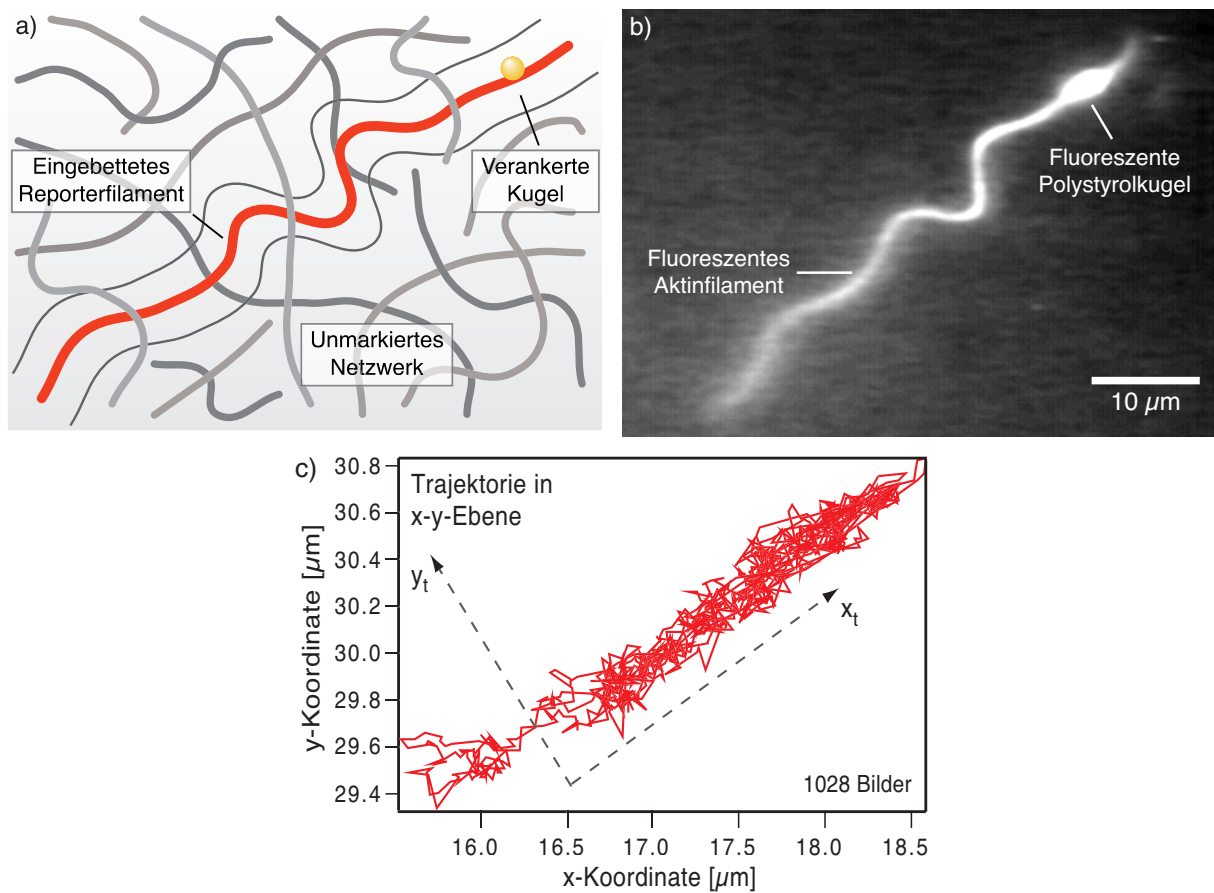


Abbildung 5-3: Schematische Darstellung des Messablaufs. a) Am Reporterfilament, das in ein unmarkiertes Aktinnetzwerk eingebettet ist, wurde eine kolloidale Sonde verankert, um ein Segment zu markieren. Die Fluktuationen des umgebenden Netzwerks beschränken die Fluktuationen des Reporterfilaments auf die angedeutete Reptationsröhre.

b) Beispiel einer typischen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme. Das Reporterfilament wurde in ein Netzwerk mit Konzentration $c = 0.5 \text{ mg/ml}$ (Maschenweite $\xi \approx 0.5 \mu\text{m}$) eingebettet. Deutlich sind sowohl die Kontur als auch die stark fluoreszierende Polystyrolkugel erkennbar. Die Kugelposition der angehefteten Sonde und für weitergehende Untersuchungen auch die Kontur in parametrisierter Form können durch Bildverarbeitung ermittelt werden.

c) Die Trajektorie der thermisch getriebenen Kugelbewegung aus b) in x- und y-Richtung (Beobachtungsdauer: 41 s, Aufnahmefrequenz: 25 Bilder/Sekunde). Die Trajektorie ist elongiert in Richtung der lokalen Reptationsröhrenorientierung. Die Definition eines lokalen Koordinatensystems (x_t, y_t) macht die separate Analyse die Kugelbewegung entlang und senkrecht zur Reptationsröhre möglich.

5.2.3 Analyse der Kugelfluktuationen – Diffusive Bewegung einzelner Aktinfilamente

Die thermische Bewegung der kolloidalen Sonde im lokalen Wechselwirkungspotential des Reporterfilaments in seiner Netzwerkumgebung lässt sich mit folgender Langevin-Gleichung beschreiben:

$$m \frac{\partial^2 \bar{x}}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial \bar{x}}{\partial t} + \frac{\partial V(\bar{x})}{\partial \bar{x}} = f_{therm}. \quad \text{Gleichung 5-1}$$

Dabei ist $\bar{x}=(x(t),y(t))$ der Ortsvektor der Kugelposition in der Fokalebene des Mikroskops. Der erste Term berücksichtigt die auf die Kugel wirkenden Trägheitskräfte. Aufgrund der äußerst kleinen Masse der verwendeten Polystyrol- und Goldkugeln kann dieser Beitrag vernachlässigt werden ($m_{Polystyrol} = 1.9 \cdot 10^{-19}$ kg bzw. $m_{Gold} = 4.5 \cdot 10^{-19}$ kg, vgl. Kap. 3.1.1).

Der zweite Term beschreibt die dissipative Reibung der Kugel mit ihrer direkten Umgebung aus Wasser und dem Reporterfilament mit dem Reibungskoeffizienten γ , wobei das Filament nach Kap. 4.1.2 und Kap. 4.1.3 selbst dissipativen Prozessen unterworfen ist. Reibungsprozesse der Kugel mit dem Netzwerk können vernachlässigt werden, da der Radius der verwendeten Kugeln wesentlich kleiner ist als die mittlere Maschenweite ξ (vgl. Kap. 4.1). Eine Abschätzung der auf die Kugel in wässriger Umgebung wirkenden Reibungskräfte nach der Stokesschen Beziehung ergibt, dass diese in der Größenordnung von 10^{-5} pN liegen und damit ebenfalls vernachlässigt werden können. Reibungsprozesse des Reporterfilaments mit der lokalen Netzwerkumgebung dominieren deshalb diesen Term.

Der dritte Term von Gleichung 5-1 umfasst die auf die Kugel im Wechselwirkungspotential $V(\bar{x})=V(x,y)$ lokal wirkenden Kräfte. Das Wechselwirkungspotential $V(\bar{x})=V(x,y)$ setzt sich nach Kap. 4.1.2 und Kap. 4.1.3 zusammen aus Beiträgen der lokalen Biegesteifigkeit κ des Reporterfilaments und lokalen, netzwerkinduzierten, sterischen Beschränkungen entlang der Reptationsröhre. Äußere, stochastisch fluktuierende Kräfte des thermischen Rauschens werden durch f_{therm} in der Gleichung berücksichtigt.

Zusammenfassend ergibt sich: Die Kugelbewegung ist allein bestimmt von Fluktuationen des Reporterfilaments, genauer des markierten Filamentsegments. Die Wechselwirkungen der Kugel selbst mit seiner Umgebung können vollständig vernachlässigt werden.

Wie Abbildung 5-3c zeigt, ist die Trajektorie der kolloidalen Sonde in Richtung der mittleren, lokalen Filamentorientierung elongiert. Durch eine Drehtransformation können die Kugeldaten (x, y) deshalb ins Koordinatensystem (x_t, y_t) der lokalen Reptationsröhrenausrichtung transformiert werden, was eine getrennte Diskussion longitudinaler und transversaler Fluktuationen (x_t bzw. y_t) ermöglicht (vgl. Kap. 4.1.3).

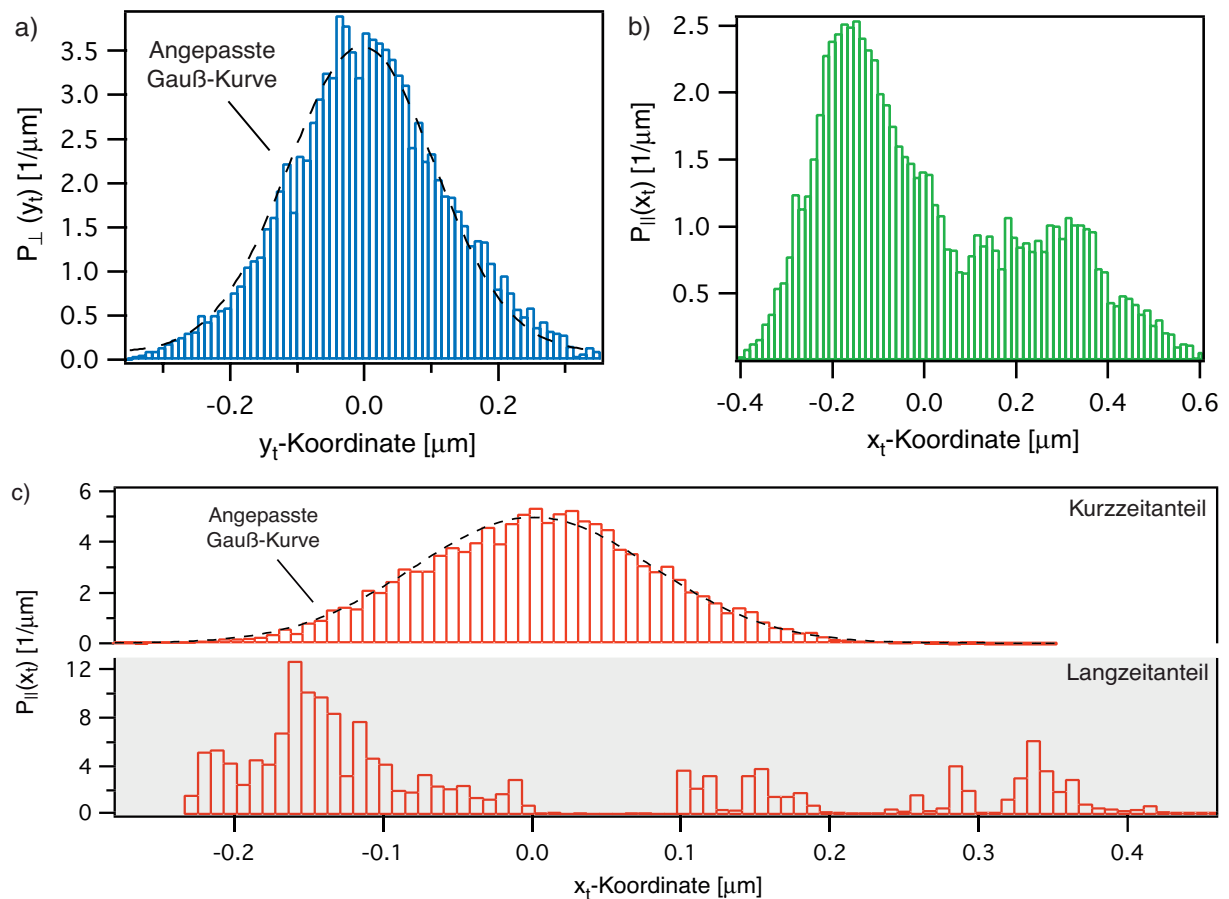


Abbildung 5-4: Aus Analyse der Sondenfluktuationen erhaltene statische Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P_{\perp}(y_t)$ bzw. $P_{\parallel}(x_t)$ der an das Reporterfilament gekoppelten kolloidalen Sonde (Beobachtungsdauer: 30 s, Aufnahme­frequenz: 240 Bilder/Sekunde). a) Normierte Verteilung $P_{\perp}(y_t)$ der transversalen Kugelbewegung (senkrecht zur lokalen Röhrenorientierung). An diese Verteilung lässt sich eine Gauß-Funktion $f(x_t) = a_0 + a_1 \exp(-((x_t - a_2)/a_3)^2)$ anpassen.

b) Normierte Verteilung $P_{\parallel}(x_t)$ longitudinaler Fluktuationen der gleichen Sonde (in Richtung der Reptationsröhre). Diese Verteilung kann nicht eindeutig einer analytischen Einhüllenden zugeordnet werden.

c) Getrennt berechnete Verteilungen des Kurz- und Langzeitanteils der longitudinalen Fluktuationen aus b). An den Kurzzeitanteil lässt sich eine Gauß-Funktion anpassen, wohingegen sich für den Langzeitanteil ein flache Verteilung ergibt.

Für die Fluktuationen der Kugelposition $x_t(t)$ und $y_t(t)$ können die statischen Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P_{\parallel}(x_t)$ bzw. $P_{\perp}(y_t)$ entlang bzw. senkrecht zur Röhrenorientierung berechnet werden (vgl. Abbildung 5-4). Für die transversale Bewegung $y_t(t)$, auch unterschiedlicher Kugeln, findet man wohldefinierte, symmetrische Verteilungen $P_{\perp}(y_t)$, die sich gut mit einer Gauß-Funktion nähern lassen (vgl. Abbildung 5-4a). In tangentialer Richtung ist zuerst keine eindeutige Struktur der Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P_{\parallel}(x_t)$ erkennbar (vgl. Abbildung 5-4b). Die Verteilungen für unterschiedliche Kugeln unterscheiden sich teils stark voneinander. Häufig weisen die Verteilungen $P_{\parallel}(x_t)$ aber einzelne Spitzen auf, d.h. das markierte Filamentsegment ist an diesen Stellen für eine gewisse Zeit $\tau_e \approx 1$ s fixiert, bevor es sich entlang der Reptationsröhre weiterbewegt. Anhand dieser Zeitkonstanten τ_e lassen sich longitudinale Kugelfluktuationen in einen Kurzzeit- und einen Langzeitanteil trennen $x_t(t) = x_t(t)_{kurz} + x_t(t)_{lang}$. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P_{\parallel}(x_t)_{kurz}$ des Kurzzeitanteils kann ebenfalls durch eine Gauß-Funktion genähert werden (vgl. Abbildung 5-4c), wobei die Breite der Verteilung $P_{\parallel}(x_t)_{kurz}$ vergleichbar ist zu der jeweils bei $P_{\perp}(y_t)$ bestimmten. Für die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Langzeitfluktuationen $P_{\parallel}(x_t)_{lang}$ existiert jedoch ein Übergang zu einer konstanten, flachen Verteilung.

Unter der Annahme, dass sich das verschlaufte Netzwerk in thermischen Gleichgewicht befindet, können die transversalen Fluktuationen $y_t(t)$ interpretiert werden als Bewegung des Filamentsegments in einem effektiven Potential $V_{\perp}(y_t)$. Das harmonische Wechselwirkungspotential $V_{\perp}(y_t)$ kann aus der Verteilung $P_{\perp}(y_t)$ durch Auswertung der Boltzmannschen Beziehung berechnet werden (Doi und Edwards, 1986; Jensenius und Zocchi, 1997; Rädler und Sackmann, 1993):

$$\frac{V_{\perp}(y_t)}{k_B T} = -\ln P_{\perp}(y_t) + const.. \quad \text{Gleichung 5-2}$$

Abbildung 5-5 zeigt den für mehrere Kugeln bei einer festen Netzwerkkonzentration bestimmten Potentialverlauf $V_{\perp}(y_t)$. Auffallend ist, dass trotz identischer Netzwerkkonzentration die dargestellten harmonisch angenäherten Potentiale in ihrer Krümmung stark variieren. Durch Anpassen von Parabeln an $V_{\perp}(y_t)$ lassen sich aus der Krümmung lokale Kraftkonstanten k_{\perp} bestimmen, die eine Beschreibung der rücktreibenden Kräfte bzgl. transversaler Segmentbewegungen ermöglichen:

$$k_{\perp} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\partial^2}{\partial y_t^2} V_{\perp}(y_t). \quad \text{Gleichung 5-3}$$

In ähnlicher Weise kann für longitudinale Kurzzeitfluktuationen $x_t(t)_{kurz}$ ein effektives, harmonisches Wechselwirkungspotential $V_{\parallel}(x_t)$ berechnet werden. Die bestimmten lokalen Kraftkonstanten k_{\parallel} stimmen im Rahmen der Genauigkeit der Methode mit den transversale Werten k_{\perp} überein.

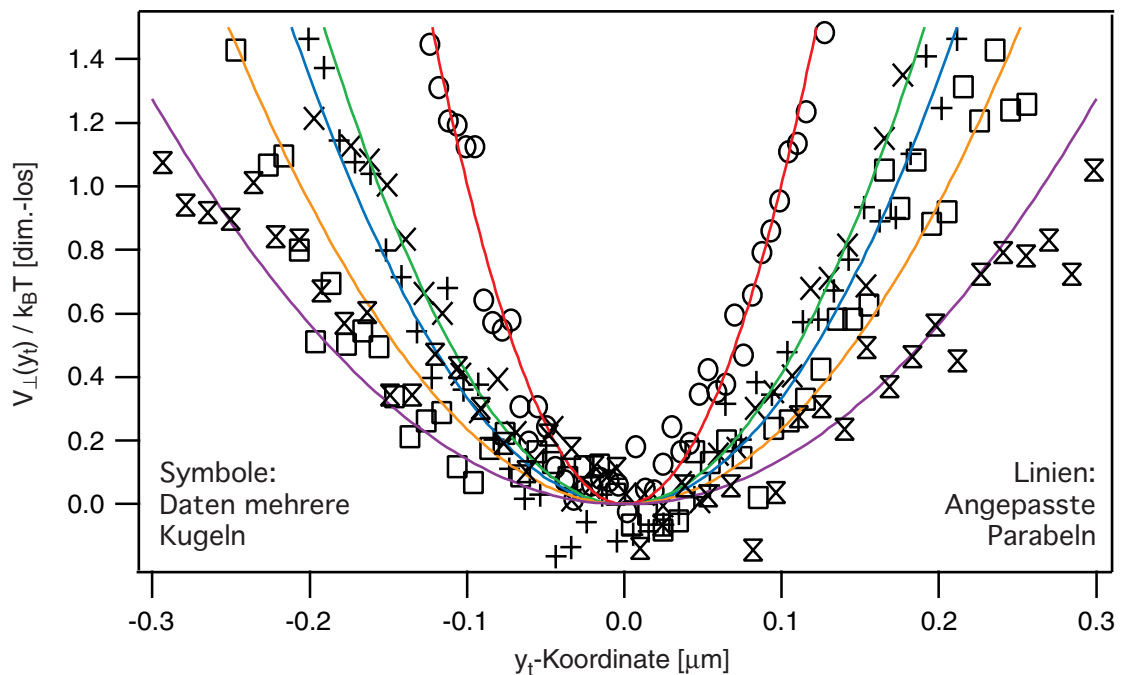


Abbildung 5-5: Mehrere, effektive Wechselwirkungspotentiale $V_{\perp}(y_t)$ von an fünf unterschiedliche Reporterfilamente gekoppelten, kolloidalen Sonden. Die Filamente waren eingebettet in ein Netzwerk der Konzentration 0.5 mg/ml mit einer mittleren Maschenweite $\xi \approx 0.5 \mu\text{m}$. Die Potentiale charakterisieren die bzgl. transversaler Filamentsegmentfluktuationen wirkenden Beschränkungen durch das umgebende Netzwerk. An die Daten lassen sich gut Parabeln der Form $f(y_t) = a_0 + a_1/2 \cdot (y_t - a_2)^2$ anpassen. Daraus ergibt sich direkt durch Vergleich mit Gleichung 5-3 die pro Kugel wirkende lokale Kraftkonstante k_{\perp} .

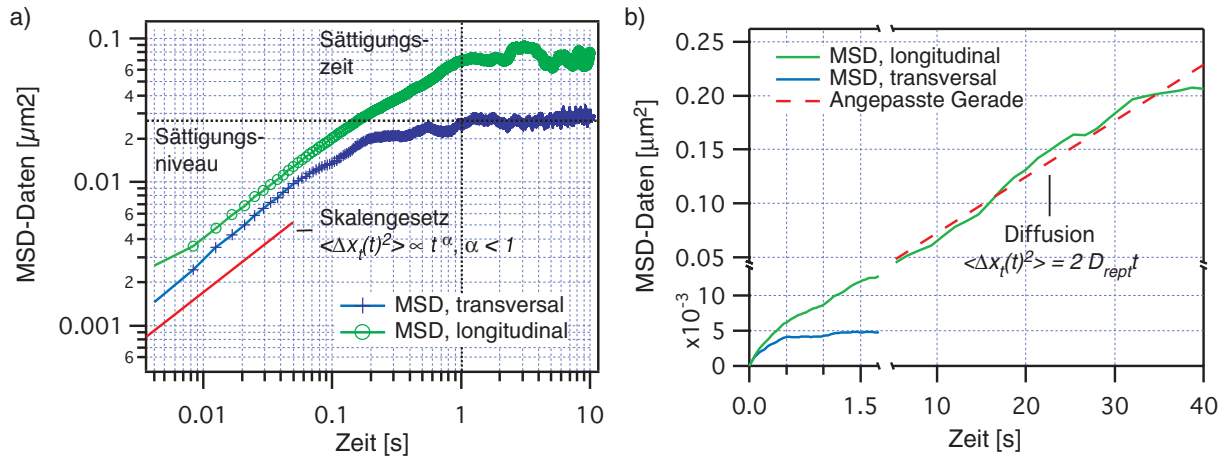


Abbildung 5-6: Mittlere quadratische Verschiebung MSD $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ longitudinaler und transversaler Kugelfluktuationen. a) Doppelt logarithmische Auftragung der MSD-Kurven für 4 ms bis 10 s. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop erstellt (Aufnahmefrequenz: 240 Bilder/Sekunde, Beobachtungsdauer: 30 s). Deutlich ist das Sättigen beider Kurven bei $t \approx 1$ s erkennbar. Die transversale MSD sättigt auf dem eingezeichneten Niveau. Für sehr kurze Zeiten folgen beide Kurven einem ähnlichen Skalengesetz, wobei sie sich in ihrer Amplitude unterscheiden.

b) MSD-Auswertung einer Langzeitmessung (Aufnahmefrequenz: 240 Bilder/Sekunde, Beobachtungsdauer: 10 min). Aus statistischen Gründen sind nur die ersten 40 s dargestellt. Der Graph besitzt eine gebrochene Skalierung, um Kurzzeit- und Langzeitanteil gleichzeitig darzustellen. Im Langzeitverhalten beschreibt die longitudinale MSD-Kurve einen normal, diffusiven Prozess charakterisiert durch die Diffusionskonstante D_{rept} .

Die Auswertung der mittleren quadratischen Verschiebung MSD:

$$\langle \Delta x(t)^2 \rangle := \langle (x(t) - x(0))^2 \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T (x(\tau) - x(\tau + t))^2 d\tau \quad \text{Gleichung 5-4}$$

erlaubt weitere Einblicke in die Dynamik der longitudinalen und transversalen Filamentsegmentbewegung $x_i(t)$ bzw. $y_i(t)$. Abbildung 5-6a zeigt MSD-Daten $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ einer Kugel in doppelt logarithmischer Darstellung als Funktion der Zeit. Für sehr kurze Zeiten $4 \leq t \leq 50$ ms bzw. $t \ll \tau_e$ lassen sich Geraden mit identischer Steigung an die Daten anpassen, was zeigt, dass die MSD-Daten in beide Richtungen einem Skalengesetz mit Exponenten $\alpha < 1$ (charakteristisch für sog. *behinderte* Diffusionsprozesse, (Weiss und Rubin, 1983)) folgen:

$$\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle \approx \langle \Delta y_i(t)^2 \rangle \propto t^\alpha \quad \text{mit} \quad \alpha < 1. \quad \text{Gleichung 5-5}$$

Für längere Zeiten nimmt der Anstieg der MSD-Kurven in beide Richtungen kontinuierlich ab. Die Kurven des transversalen MSD sättigen vollständig für Zeiten $t \geq 1 \text{ s} \approx \tau_e$, während $\langle \Delta x_t(t)^2 \rangle$ weiter ansteigt. Die asymptotischen Werte des transversalen MSD sind leicht, aber systematisch kleiner als die longitudinalen Daten. Die Sättigung beider MSD-Kurven ist in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Analyse der Wahrscheinlichkeitsverteilungen, dass die Verteilungen sowohl des longitudinalen Kurzzeitanteils $P_{\parallel}(x_t)_{\text{kurz}}$ als auch des transversalen Anteils $P_{\perp}(y_t)$ durch Gaußsche Verteilungen ähnlicher Breite genähert werden können.

Abbildung 5-6b zeigt MSD-Daten der Langzeitbewegung des markierten Filamentsegments. Die Sättigung in transversaler Richtung wird hier stärker deutlich als in Abbildung 5-6a. Außerdem ist erkennbar, dass das tangential MSD für $t \gg \tau_e$ einem Skalengesetz folgt:

$$\langle \Delta x_t(t)^2 \rangle \approx 2D \cdot t^{\alpha} \quad \text{mit} \quad \alpha = 1. \quad \text{Gleichung 5-6}$$

Dieses sog. *normal diffusive* Verhalten (charakterisiert durch $\alpha = 1$, (Weiss und Rubin, 1983)) lässt sich durch Bestimmung der Diffusionskoeffizienten D_{rept} aus der Steigung der Kurve quantifizieren. Die bestimmten Koeffizienten charakterisieren die Diffusion des Reporterfilaments entlang der Reptationsröhre.

Zusammenfassend liefert die Analyse der Kugelbewegung eine lokale Beschreibung der thermisch getriebenen Segmentdynamik der markierten Reporterfilamente. Anhand der transversalen Kugelbewegungen $y_t(t)$ lässt sich lokal das effektive Wechselwirkungspotential $V_{\perp}(y_t)$ des Filamentsegments mit seiner direkten Netzwerkumgebung bestimmen, was das klassische Reptationsröhren-Modell wesentlich erweitert (vgl. Kap. 4.1.3). Die starke lokale Variation der Krümmung dieser Potentiale bzw. der abgeleiteten Kraftkonstante k_{\perp} stehen im Gegensatz zu eingeführten theoretischen Konzepten. Analog kann für Kurzzeitfluktuationen in longitudinaler Richtung $x_t(t)_{\text{kurz}}$ ein effektives lokales Potential $V_{\parallel}(x_t)$ bestimmt werden. Die Werte für die Krümmung dieser Potentiale bzw. der Kraftkonstanten k_{\parallel} stimmen mit den in transversaler Richtung ermittelten Werten überein. Dies ist als Hinweis zu werten auf eine Kopplung transversaler und longitudinaler Segmentfluktuationen in diesem Zeitbereich, was auch in theoretischen Überlegungen hierzu gefordert wird (vgl. Kap. 4.1.3).

Die Berechnung longitudinaler und transversaler MSD-Kurven $\langle \Delta x_t(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_t(t)^2 \rangle$ erlaubt die direkte Messung thermisch getriebener Konformationsdynamik des Filaments. Für kurze Zeiten $t \ll \tau_e$ können sowohl longitudinaler als auch transversaler Bewegungsanteil als behinderter diffusiver Prozess beschrieben werden, wobei beide identisches Skalierungsverhalten besitzen. Nach dem Sättigen beider Kurven zu gleichen Zeiten $t \approx \tau_e$ unterscheiden sich die MSD-Daten $\langle \Delta x_t(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_t(t)^2 \rangle$ stark. Die MSD-Kurve des transversalen Anteils verharrt auf konstantem Niveau im Gegensatz zur longitudinalen MSD-Kurve, die das typische Skalierungsverhalten normal diffusiver Prozesse entwickelt. Die in Kap. 4.1.3 präsentierte Theorie zur Reptation beschreibt prinzipiell dieses Ergebnis. Experimentell lassen sich theoretische Voraussagen hinsichtlich skalierender Exponenten, typischer Sättigungszeiten und -niveaus der MSD-Kurven überprüfen. Außerdem können Diffusionskonstanten zur Reptation einzelner Filamente im Netzwerk direkt ermittelt werden.

5.2.4 Lokales Wechselwirkungspotential bei unterschiedlichen Netzwerkkonzentrationen

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass mit der Methode der kolloidalen Sondentechnik das lokale, harmonische Potential $V_{\perp}(y_t)$ gemessen werden kann, das die Wechselwirkung des Reporterfilaments mit seiner Netzwerkumgebung beschreibt. Unerwarteterweise variiert die lokale Kraftkonstante k_{\perp} dieser Potentiale für unterschiedliche Kugeln selbst für feste Netzwerkkonzentrationen c_a stark. So ergeben sich aus den Daten von Abbildung 5-5 bei einer Netzwerkkonzentration von 0.5 mg/ml Werte zwischen $1.25 \cdot 10^{-8}$ und $1.09 \cdot 10^{-7}$ J/m².

Von diesem qualitativen Ergebnis ausgehend sollen im folgenden lokale Kraftkonstanten k_{\perp} und deren Variation anhand mehrerer Kugeln für unterschiedliche Netzwerkkonzentrationen c_a bestimmt werden. Außerdem lässt sich mit dieser Untersuchung prüfen, ob die kolloidale Sondentechnik quantitative Ergebnisse liefert, die mit anderen mikroskopischen und makroskopischen Studien an verschlauften Aktinnetzwerken vergleichbar sind.

Bereits in älteren Untersuchungen (Käs et al., 1995) wurde die Reptationsröhre einzelner Filamente im Netzwerk mikroskopisch untersucht. Da mit dieser Methode aber das Wechselwirkungspotential $V_{\perp}(y_t)$ nicht direkt bestimmt werden kann, wurden die topologischen, netzwerkinduzierten Beschränkungen durch Messung eines gemittelten Röhren-

durchmessers d quantifiziert. Zwischen dem Röhrendurchmesser d und den hier bestimmten Potentialen $V_{\perp}(y_t)$ lässt sich folgender Zusammenhang herstellen: Der Röhrendurchmesser d ist ein Maß für die im Potential $V_{\perp}(y_t)$ maximal mögliche thermisch getriebene Auslenkung eines Filamentsegments. Unter Zuhilfenahme des Äquipartitionstheorems erhält man folgende Beziehung zwischen k_{\perp} und d :

$$k_{\perp} = 4k_B T / d^2. \quad \text{Gleichung 5-7}$$

Mit Gleichung 5-7 können deshalb quantitative Ergebnisse der älteren Arbeit mit den hier bestimmten verglichen und auf ihre Konsistenz geprüft werden.

Makroskopisch wurde mit Lichtstreuung die Konzentrationsabhängigkeit der mittleren Maschenweite ξ halbverdünnter Aktinnetzwerke bestimmt (Schmidt et al., 1989). Der Repurationsröhrendurchmesser d und damit die lokale Kraftkonstante k_{\perp} lässt sich durch die Maschenweite ξ und die Persistenzlänge l_p ausdrücken (Isambert und Maggs, 1996; Wilhelm und Frey, 1999):

$$d \approx \xi^{6/5} / l_p^{1/5}. \quad \text{Gleichung 5-8}$$

Gleichung 5-8 eröffnet also die Möglichkeit, selbst Daten makroskopischer Untersuchungen mit den im folgenden präsentierten zu vergleichen.

Außerdem existieren unterschiedliche, theoretisch bestimmte Skalengesetze für die Abhängigkeit der Maschenweite ξ von der Netzwerkkonzentration c_a , die sich hier experimentell überprüfen lassen (Morse, 2001).

5.2.4.1 Auswertung

Für die folgende Analyse wurde bei sechs Netzwerkkonzentrationen c_a zwischen 0.2 mg/ml und 0.9 mg/ml anhand mehrerer Kugeln, die an unterschiedliche Filamente gekoppelt waren, nach Gleichung 5-3 das Potential $V_{\perp}(y_t)$ und die lokale Kraftkonstante k_{\perp} bestimmt. Anhand der Daten wurde pro Netzwerkkonzentration c_a der Mittelwert $\langle k_{\perp} \rangle$ und dessen relative Schwankungsbreite $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ errechnet, wobei je nach Konzentration zwischen 6 bis 35 Kugeldaten verwendet wurden.

5.2.4.2 Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 5-1 finden sich quantitative Angaben zur mittleren Kraftkonstanten $\langle k_{\perp} \rangle$ und deren relativer Variation $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ aufgelistet nach Netzwerkkonzentrationen c_a . Direkt daraus wurde nach Gleichung 5-7 der mittlere Röhrendurchmesser $\langle d \rangle$ ermittelt.

Netzwerk- konzentration c_a [mg / ml]	Vermessene Kugeln	Mittlere Kraftkonstante $\langle k_{\perp} \rangle$ [J / m ²]	Relative Variation $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ [%]	Mittlerer Durchmesser $\langle d \rangle$ [μm]
0.2	11	$2.51 \cdot 10^{-8}$	71.4	0.81
0.3	6	$1.15 \cdot 10^{-7}$	79.6	0.38
0.5	35	$1.52 \cdot 10^{-7}$	49.5	0.33
0.6	20	$8.34 \cdot 10^{-8}$	52.4	0.45
0.7	25	$7.64 \cdot 10^{-8}$	54.5	0.47
0.9	7	$2.61 \cdot 10^{-7}$	74.3	0.25

Tabelle 5-1: Quantitative Ergebnisse der Auswertung lokaler Kraftkonstanten k_{\perp} bzw. des lokalen Reptationsröhrendurchmessers d in Abhängigkeit von unterschiedlichen Netzwerkkonzentration c_a zwischen 0.2 und 0.9 mg/ml. Aufgelistet sind die Zahl der vermessenen Kugeln, die mittlere Kraftkonstante $\langle k_{\perp} \rangle$, deren relative Variation $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ und der bestimmte mittlere Röhrendurchmesser $\langle d \rangle$. Die relative Variation des Röhrendurchmessers $\Delta d / \langle d \rangle$ ist aufgrund der Berechnung gleich der relativen Variation der Kraftkonstanten $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$.

Abbildung 5-7a enthält eine grafische Darstellung der in Tabelle 5-1 enthaltenen Mittelwerte $\langle k_{\perp} \rangle$ und deren Variation $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ als Funktion der Netzwerkkonzentration c_a . Daneben ist in Abbildung 5-7b der konzentrationsabhängige, mittlere Röhrendurchmesser $\langle d \rangle$ aufgetragen. Zusätzlich wurden in Abbildung 5-7b Daten aufgenommen, die mittels Mikrofluoreszenz-Untersuchungen ermittelt wurden (Käs et al., 1995).

Die mittlere lokale Kraftkonstante $\langle k_{\perp} \rangle$ nimmt mit steigender Netzwerkkonzentration c_a zu. Wie schon in Kap. 5.2.3 erwähnt schwanken die bei einer festen Konzentration c_a gemessenen Werte k_{\perp} stark, wobei keinerlei Konzentrationsabhängigkeit von $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ erkennbar ist. In der doppelt logarithmischen Darstellung von Abbildung 5-7a wird aber deutlich, dass die Mittelwerte $\langle k_{\perp} \rangle$ einem Skalengesetz folgen.

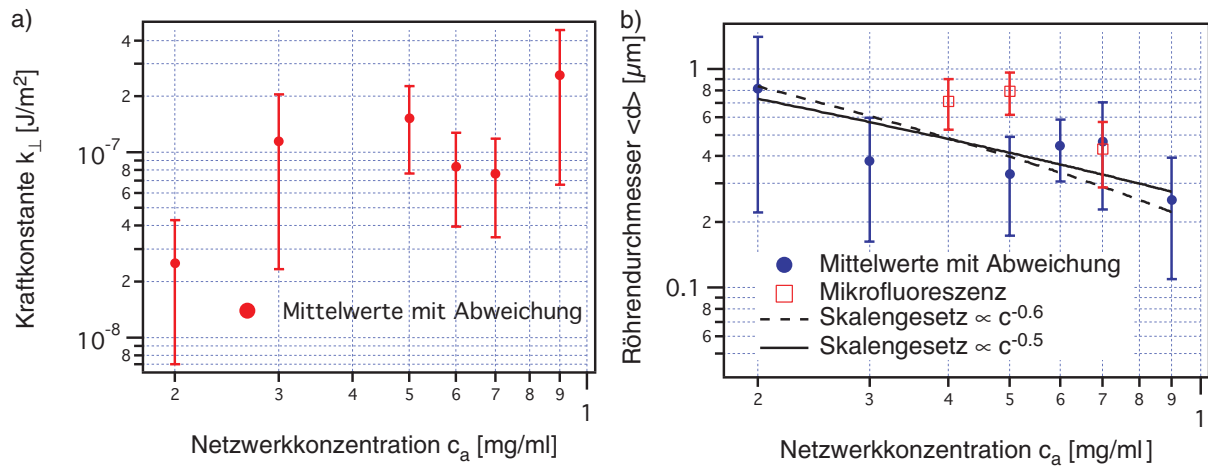


Abbildung 5-7: Doppelt logarithmische Darstellung der lokalen Kraftkonstanten k_{\perp} bzw. des lokalen Reptationsröhrendurchmessers d in Abhängigkeit von der Netzwerkkonzentration c_a zwischen 0.2 und 0.9 mg/ml. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten und die Balken sind ein Maß für die jeweiligen Schwankungsbreiten (vgl. Tabelle 5-1). a) Konzentrationsabhängigkeit der lokalen Kraftkonstante k_{\perp} . Die Mittelwerte $\langle k_{\perp} \rangle$ steigen einem Skalengesetz folgend mit wachsender Konzentration c_a . Die relativ großen Schwankungen $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ zeigen hingegen keinerlei Abhängigkeit von c_a .

b) Konzentrationsabhängigkeit des mittleren Reptationsröhrendurchmessers $\langle d \rangle$. Das sich in a) abzeichnende Skalenverhalten reproduziert sich (vgl. Gleichung 5-7). Die zusätzlich aufgenommenen Datenpunkte aus Mikrofluoreszenz-Untersuchungen liegen tendenziell über den hier bestimmten Werten. Die beiden angepassten Skalengesetze $\langle d(c) \rangle \propto c^{-0.5}$ bzw. $\langle d(c) \rangle \propto c^{-0.6}$ wurden theoretischen Arbeiten entnommen.

Analog lassen sich diese Ergebnisse für den Durchmesser der Reptationsröhre d formulieren (vgl. Abbildung 5-7b): bei steigender Netzwerkkonzentration c_a nimmt der mittlere Durchmesser $\langle d \rangle$ ab, die relative Schwankungsbreite $\Delta d / \langle d \rangle = \Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ ist groß und die Mittelwerte folgen im Gegensatz zu den Schwankungsbreiten einem Skalengesetz.

Die quantitativen, konzentrationsabhängigen Ergebnisse bzgl. der Mittelwerte $\langle k_{\perp} \rangle$ und $\langle d \rangle$ sind konsistent mit makroskopischen Lichtstreuexperimenten (Schmidt et al., 1989) der Maschenweite ξ (unter Berücksichtigung von Gleichung 5-8) und mikroskopischen Untersuchungen mittels Mikrofluoreszenz (Käs et al., 1995) (vgl. Abbildung 5-7b) des Reptationsröhrendurchmessers d . Im Gegensatz zu diesen Arbeiten ergeben sich höhere Schwankungsbreiten $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ bzw. $\Delta d / \langle d \rangle$, wobei die Schwankungsbreite $\Delta d / \langle d \rangle$ der Mikrofluoreszenz-Untersuchungen um ca. den Faktor 2 kleiner ist (vgl. Abbildung 5-7b).

Das Skalenverhalten lässt sich mit theoretischen Arbeiten zur Konzentrationsabhängigkeit des Röhrendurchmessers d vergleichen, die auf dem in Kap. 4.1.3 vorgestellten Reptationsmodell basieren (de Gennes et al., 1976; Morse, 2001).

Es gelten folgende Skalengesetze für unterschiedliche Modelle des Einzelpolymers:

- Starre (Polyelektrolyt-)Stäbe $\langle d \rangle \propto c^{-1/2}$;
- Semiflexibles Polymer $\langle d \rangle \propto c^{-3/5}$.

Im Rahmen der Messgenauigkeit werden beide Skalengesetze erfüllt (vgl. Abbildung 5-7b). Allerdings ist aufgrund der starken Schwankungen keine eindeutige Unterscheidung zwischen beiden Modellen möglich.

Die großen Schwankungsbreiten $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ bzw. $\Delta d / \langle d \rangle$ sind das überraschende Ergebnis dieser Untersuchung. Das einfache Reptationsröhren-Modell, in dem der Durchmesser d entlang der Reptationsröhre als konstant gilt, stellt für die topologische Beschreibung von Aktinnetzwerken auf Einzelfilamentbasis eine zu einfache Annahme dar. Der Röhrendurchmesser d bzw. die Maschenweite ξ sind offenbar lokal sehr starken Variationen unterworfen. Dieses mikroskopische Ergebnis wirkt sich direkt auf die Interpretation makrorheologischer Experimente aus, da der makroskopische Elastizitätsmodul G' semiflexibler Polymernetzwerke in mehreren Theorien direkt vom mittleren Reptationsröhrendurchmesser $\langle d \rangle$ abgeleitet wird (Hinner et al., 1998; Isambert und Maggs, 1996; Morse, 1998b; Wilhelm und Frey, 1999). Auf mikroskopischer Basis ergibt sich, diesen Arbeiten folgend, eine starke Variation von G' innerhalb des Netzwerks, die in diesen Theorien explizit nicht berücksichtigt wird.

Die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Bestimmung lokaler Kraftkonstanten bzw. Röhrendurchmesser lassen sich wie folgt zusammenfassen: In Netzwerken unterschiedlicher Konzentration c_a stimmen die anhand mehrerer Kugeln ermittelten Mittelwerte $\langle k_{\perp} \rangle$ bzw. $\langle d \rangle$ überein mit älteren experimentellen Arbeiten, d.h. die kolloidale Sondentechnik liefert konsistentes Datenmaterial. Das Skalenverhalten der Mittelwerte folgt im Rahmen der Genauigkeit theoretischen Modellen zu semiflexiblen Netzwerken. Auffällig ist aber, dass die Schwankungsbreiten $\Delta k / \langle k_{\perp} \rangle$ bzw. $\Delta d / \langle d \rangle$ groß sind. Dies deutet darauf hin, dass das einfache klassische Reptationsmodell in Aktinnetzwerken nicht vollständig gültig ist, was Auswirkungen auch auf die Interpretation makrorheologischer Untersuchungen haben dürfte.

5.2.5 Dynamik der Reptation einzelner Polymere

Nachdem in Kap. 5.2.4 statische, topologische Eigenschaften des Netzwerks untersucht wurden, die auch mit anderen makroskopischen und mikroskopischen Techniken zugänglich sind, soll im folgenden die Dynamik der thermisch getriebenen Filament-Reptation im verschlauften Netzwerk untersucht werden.

In Kap. 5.2.3 wurde mittels der MSD-Analyse gezeigt, dass sich die Diffusion einzelner Filamentsegmente in longitudinaler und transversaler Richtung unterscheiden. Auf kurzen Zeitskalen $t \ll 1$ s folgen die MSD-Kurven jeweils gleichen Skalengesetzen, die behinderte Diffusionsprozesse beschreiben. Hier eröffnet sich die Möglichkeit, jüngere theoretische Arbeiten zur Diffusion semiflexibler Polymere experimentell zu überprüfen (Amblard et al., 1996; Everaers et al., 1999; Gittes und MacKintosh, 1998; Granek, 1997; Isambert und Maggs, 1996; Kroy und Frey, 1998; MacKintosh, 1998; Maggs, 1997; Morse, 1998a; Morse, 1998b) (vgl. auch Kap. 4.1.3). Für Zeiten $0.5 \leq t \leq 1$ s sättigen die MSD-Kurven beider Bewegungsrichtungen, wobei das Sättigungsniveau in longitudinaler Richtung systematisch größer als das in transversaler ist. Für lange Zeiten $t \gg 1$ s schließlich skalieren die MSD-Daten in longitudinaler Richtung linear, es können also Diffusionskoeffizienten einzelner Filamente gemessen werden. Die Werte der Diffusionskonstanten, lassen sich über Einbeziehung der jeweiligen Filamentlänge mit Werten der sog. *terminalen Relaxationszeit* aus makrorheologischen Experimenten vergleichen (Ruddies et al., 1993).

Mit Hilfe kolloidaler Sondentechnik konnte so erstmals experimentell die Dynamik der Diffusion einzelner Aktinfilamente im Netzwerk auf mikroskopischer Ebene untersucht werden. Insbesondere die direkte Beobachtung longitudinaler Diffusion über große Zeitbereiche konnte so realisiert werden, was bisher weder makroskopisch noch mikroskopisch möglich war.

5.2.5.1 Auswertung

Für die Analyse der Kurzzeitdiffusion einzelner Filamente wurden mit Polystyrolkugeln markierte Reporterfilamente in ein Netzwerk der Konzentration 0.5 mg/ml eingebettet. Die thermisch getriebene Bewegung von fünf Sonden wurde mittels konfokaler Mikroskopie (Aufnahmefrequenz: 240 Bilder/Sekunde, Beobachtungsdauer: 30 s) aufgenommen. Abschließend erfolgte die Berechnung der longitudinalen und transversalen MSD-Kurven nach Gleichung 5-4.

Die Langzeitdiffusion wurde unter Verwendung goldkugelmarkierter Reporterfilamente untersucht, die ebenfalls in ein Netzwerk von 0.5 mg/ml eingebettet wurden. Die Bewegung von acht Kugeln wurde mittels konfokaler Mikroskopie teilweise bis zu einer Gesamtdauer von 40 min aufgenommen. Die Berechnung transversaler bzw. longitudinaler MSD-Kurven erfolgte wie bereits erläutert. Durch Anpassen von Geraden im Langzeitbereich des longitudinalen MSD-Signals (vgl. Abbildung 5-6) konnte nach Gleichung 5-6 direkt die Diffusionskonstante D_{rept} ermittelt werden. Eine weitergehende Analyse der transversalen MSD-Kurven erübrigt sich aufgrund der in Langzeitbereich auftretenden Sättigung.

5.2.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5-8 enthält die doppelt logarithmische Darstellung der MSD-Kurven $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ im Kurzzeitbereich in longitudinaler und transversaler Richtung.

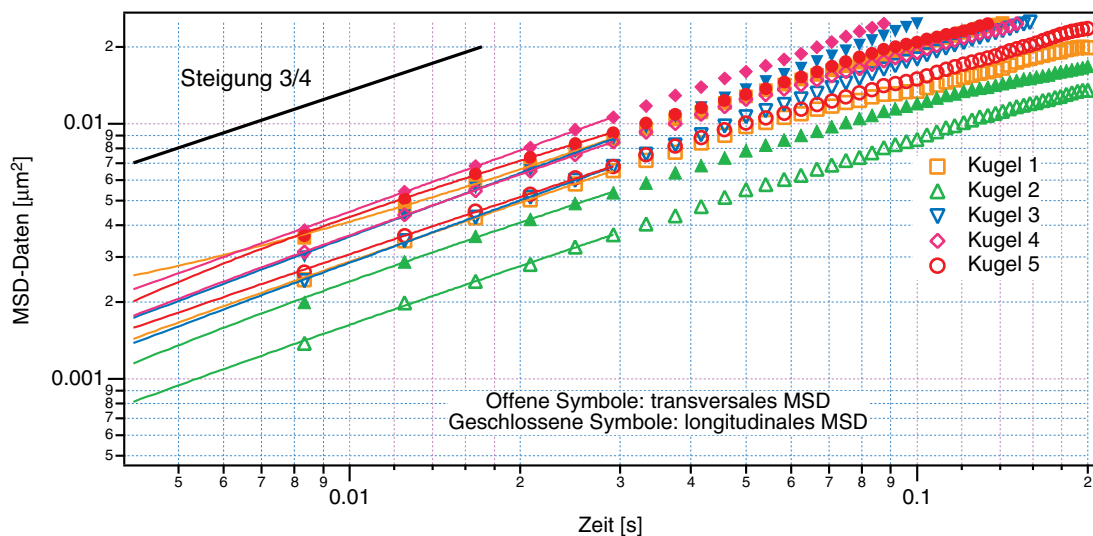


Abbildung 5-8: Doppelt logarithmische Darstellung der mittleren quadratischen Auslenkung (MSD) $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ longitudinaler bzw. transversaler Sondenfluktuationen von fünf unterschiedlichen Kugeln im Kurzzeitbereich $4 \text{ ms} \leq t \leq 2 \text{ s}$. Die MSD-Daten entlang der Reptationsröhre sind durch geschlossene und die senkrecht dazu durch offene Symbole dargestellt. Im Zeitbereich $4 \leq t \leq 30 \text{ ms}$ zeigen sowohl $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ MSD-Daten identisches Skalierungsverhalten mit skalierendem Exponenten $\alpha \approx 3/4$ (vgl. Gerade mit Steigung 3/4), wobei systematisch die Amplitude des longitudinalen über der des transversalen Anteils liegt. In diesem Bereich erfolgte die Anpassung des Skalengesetzes $f(t) \propto t^\alpha$. Tabelle 5-2 enthält die Ergebnisse α für jede Kugel.

Im Zeitbereich von $4 \leq t \leq 30$ ms zeigen die $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ - bzw. $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ -Daten jeweils fast identisches Skalenverhalten. Für jede Kugel wurde in beiden Richtungen der skalierende Exponent α_y bzw. α_x durch Anpassung von $f(t) = t^\alpha$ ermittelt. Tabelle 5-2 enthält die Ergebnisse dieser Analyse neben der nach Gleichung 5-3 (vgl. Kap. 5.2.3) ermittelten lokalen Kraftkonstanten k_\perp .

Kugel	Lokale Kraftkonstante k_\perp [J / m ²]	Skalierender Exponent, transversal α_y	Skalierender Exponent, longitudinal α_x
1	$4.77 \cdot 10^{-8}$	0.743	0.888
2	$4.29 \cdot 10^{-8}$	0.732	0.686
3	$1.25 \cdot 10^{-8}$	0.799	0.817
4	$2.08 \cdot 10^{-8}$	0.755	0.800
5	$1.09 \cdot 10^{-7}$	0.731	0.578

Tabelle 5-2: Quantitative Ergebnisse der Anpassung des Skalengesetz $f(t) \propto t^\alpha$ an die $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ MSD-Daten aus Abbildung 5-8 im Kurzzeitbereich $4 \leq t \leq 30$ ms. Für jede Kugel ist die nach Kap. 5.2.3 berechnete lokale Kraftkonstante k_\perp , sowie die skalierenden α_y bzw. α_x des transversalen bzw. longitudinalen MSD-Anteils enthalten.

Die einzelnen Werte weichen relativ wenig voneinander ab und es ergeben sich Mittelwerte $\bar{\alpha}_y = 0.75 \pm 0.03$ bzw. $\bar{\alpha}_x = 0.75 \pm 0.12$. Im Grenzfall kurzer Zeiten erfüllen die MSD-Kurven also genau die theoretischen Vorhersagen aus Kap. 4.1.2 und Kap. 4.1.3: Die transversalen Fluktuationen folgen dem Skalenverhalten $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle \propto t^{3/4}$ eines schwach gekrümmten Stabes in einer Flüssigkeit. Die geringe Variation der α_y -Werte verdeutlicht, dass selbst für unterschiedliche Filamente dieses Skalenverhalten nicht von spezifischen Filament- oder Netzwerkparametern beeinflusst wird. Die longitudinalen MSD-Signale skalieren ebenfalls dem theoretischen Modell folgend mit $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle \propto t^{3/4}$, da im verschlauften Netzwerk longitudinale Kurzzeitfluktuationen direkt an die transversale Segmentdynamik gekoppelt sind. Die größere Variation der α_x -Werte verdeutlicht aber, dass longitudinale Segmentbewegungen stärker von lokalen Eigenschaften des Filaments oder des umgebenden Netzwerks beeinflusst werden.

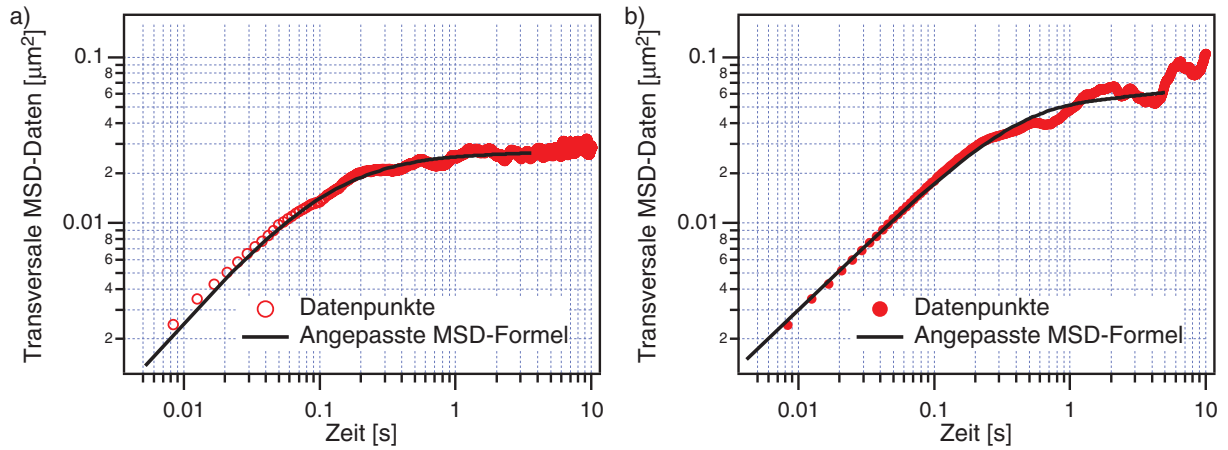


Abbildung 5-9: Doppelt logarithmische Darstellung der Sättigung der mittleren quadratischen Auslenkung (MSD) $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ transversaler Sondenfluktuationen zweier Kugeln im Zeitbereich $4 \text{ ms} \leq t \leq 10 \text{ s}$. In beiden Fällen ist die in Kap. 4.1.3 theoretisch abgeleitete Gleichung 4-10 gut erfüllt. Den nach Gleichung 5-9 im Bereich $4 \text{ ms} \leq t \leq 4 \text{ s}$ angepassten Kurven lassen sich Parameter entnehmen, die charakteristisch für die lokale Viskoelastizität des Netzwerks sind (vgl. Tabelle 5-3). a) Die transversalen MSD-Daten sättigen auf einem im Vergleich zum Mittelwert kleinen Wert von $\langle \bar{r}^2 \rangle = d^2 \approx 0.02 \mu\text{m}^2$, woraus auch die kleine Sättigungszeit $\tau_e \approx 0.3 \text{ s}$ folgt. Aufgrund des vergleichbar kleinen Sättigungsniveaus ist der Sättigungseffekt stark ausgeprägt. b) Die transversalen MSD-Daten sättigen auf einem im Vergleich zum Mittelwert großen Wert von $\langle \bar{r}^2 \rangle = d^2 \approx 0.05 \mu\text{m}^2$. Dies hat eine im Vergleich zu a) längere Sättigungszeit $\tau_e \approx 1.3 \text{ s}$ zur Folge, wobei zusätzlich der Sättigungseffekt weniger deutlich ausgeprägt ist.

Wie in Kap. 5.2.3 erläutert, sättigen transversale $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ -Daten bei Zeiten $t \geq 1 \text{ s} \approx \tau_e$, was den direkten Vergleich experimenteller Daten mit der theoretisch abgeleiteten Gleichung 4-10 (vgl. Kap. 4.1.3) ermöglicht. In Abbildung 5-9 sind die transversalen $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ -Signale zweier Kugeln mit unterschiedlich großen Sättigungsniveaus von 0.02 bzw. $0.05 \mu\text{m}^2$ dargestellt. An beide Datensätze lässt sich die Beziehung für $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ aus Gleichung 4-10 anpassen:

$$\begin{aligned} \langle \Delta y_i(t)^2 \rangle = & \frac{4}{3} \langle \bar{r}^2 \rangle \left[1 - \sqrt{\pi} \frac{\text{erf}(\sqrt{\omega't})}{2\sqrt{\omega't}} \right] \\ & + \frac{4}{3\pi} \left(\frac{k_B T}{\omega' \zeta_{\perp} l_p^{1/3}} \right)^{3/4} \left[1 - (\omega't)^{3/4} \frac{3}{4} \Gamma(-3/4, \omega't) \right] \end{aligned} \quad \text{Gleichung 5-9}$$

Das theoretische Konzept eines effektiven, homogenen Mediums, in das der einzelne Polymerfaden eingebettet ist, scheint also prinzipiell für die Beschreibung der transversalen Fluktuationen einzelner Filamentsegmente geeignet zu sein. Den Erläuterungen aus Kap. 4.1.3 folgend sättigen beide Signale in Abhängigkeit des jeweiligen Sättigungsniveaus $\langle \bar{r}^2 \rangle = d^2$ unterschiedlich stark: Für den kleineren $\langle \bar{r}^2 \rangle$ -Wert (vgl. Abbildung 5-9a) wird

ein starker Sättigungseffekt beobachtet, wohingegen beim größeren $\langle \bar{r}^2 \rangle$ -Wert (vgl. Abbildung 5-9b) dieser Effekt weniger stark ausgeprägt ist und das MSD-Signal über einen längeren Zeitbereich weiter ansteigt.

Den nach Gleichung 5-9 angepassten Kurven lassen sich unter Nutzung der Persistenzlänge von Aktin $l_p \approx 17 \mu\text{m}$ Parameter entnehmen, die im Rahmen dieser Theorie lokal die Viskoelastizität des Netzwerks beschreiben: das Sättigungsniveau $\langle \bar{r}^2 \rangle = d^2$ und damit der lokale Röhrendurchmesser d , die Sättigungszeit $\tau_e = 2\pi/\omega'$ und den effektiven Reibungskoeffizienten ζ_{\perp} . Nach $\zeta_{\perp} = 4\pi\eta/\ln(\Lambda/a)$ kann aus ζ_{\perp} unter Verwendung der hydrodynamischen Abschirmlänge in Aktinnetzwerken $\Lambda \approx \xi \approx 0.5 \mu\text{m}$ und des Filamentdurchmessers $a \approx 7 \text{ nm}$ die lokale Viskosität η berechnet werden.

Kugel	Sättigungsniveau $\langle \bar{r}^2 \rangle$ [μm^2]	Röhrendurchmesser d [μm]	Sättigungszeit τ_e [s]	Reibungskoeffizient ζ_{\perp} [Pa s]	Lokale Viskosität η [Pa s]
1	0.021	0.30	0.28	0.578	0.196
2	0.034	0.37	2.02	0.160	0.055
3	0.102	0.64	3.39	0.039	0.013
4	0.050	0.45	1.34	0.083	0.028
5	0.042	0.55	5.61	0.038	0.013

Tabelle 5-3: Quantitative Ergebnisse der Anwendung von Gleichung 5-9 an $\langle \Delta y_i(t)^2 \rangle$ -Daten aus Abbildung 5-8 im Zeitbereich $4 \text{ ms} \leq t \leq 4 \text{ s}$. Für jede Kugel wurden der angepassten MSD-Formel folgende Parameter entnommen: das Sättigungsniveau $\langle \bar{r}^2 \rangle$, der Röhrendurchmesser d , die Sättigungszeit τ_e , der unter Verwendung von $l_p \approx 17 \mu\text{m}$ berechnete lokale Reibungskoeffizient ζ_{\perp} und die lokale Viskosität η .

Tabelle 5-3 enthält die quantitativen Ergebnisse dieser Analyse für die einzelnen Kugeln. Für die Röhrendurchmesser d ergeben sich Werte zwischen 0.30 und $0.64 \mu\text{m}$, in Übereinstimmung mit den in Kap. 5.2.4 für eine Netzwerkkonzentration von 0.5 mg/ml gemessenen Werten. Die Sättigungszeiten τ_e bewegen sich in einem Zeitbereich von 0.28 bis 5.61 s , variieren also für unterschiedliche Röhrendurchmesser d um den Faktor 20.

Laut theoretischem Modell wird die Abhängigkeit von τ_e vom lokalen Röhrendurchmesser d unter Berücksichtigung der Persistenzlänge l_p und des lokalen Reibungskoeffizienten ζ_{\perp} durch folgendes Skalengesetz beschrieben (Isambert und Maggs, 1996; Kroy und Frey, 1998; Morse, 1998a; Morse, 1998b):

$$\tau_e = \frac{2^{2/3} \zeta_{\perp} l_p^{1/3}}{k_B T} d^{8/3}. \quad \text{Gleichung 5-10}$$

Abbildung 5-10a enthält die doppelt-logarithmische Darstellung von τ_e als Funktion des Röhrendurchmessers d . An die Daten wurde Gleichung 5-10 angepasst, die im Rahmen der Genauigkeit dieser Analyse, das Skalenverhalten richtig wiedergibt.

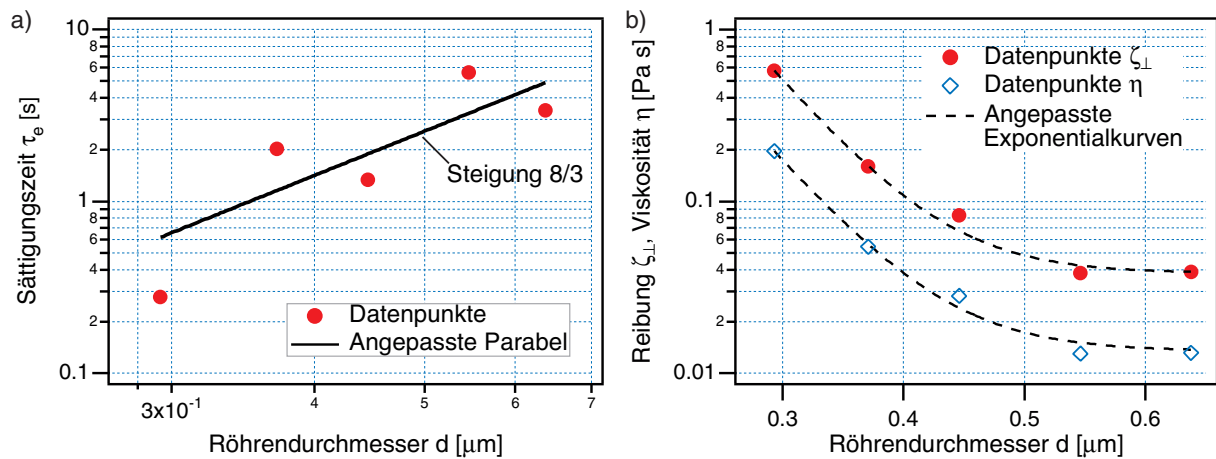


Abbildung 5-10: Darstellung der quantitativen Ergebnisse aus Tabelle 5-3 als Funktion des Röhrendurchmessers d . a) Doppelt logarithmische Darstellung der gemessenen Sättigungszeiten τ_e als Funktion von d . Die Datenpunkte τ_e steigen im Rahmen der Genauigkeit des Verfahrens mit dem Röhrendurchmesser d . Das in Gleichung 5-10 geforderte Skalenverhalten wird erfüllt, was die angepasste Skalengesetz verdeutlicht.

b) Einfach logarithmische Darstellung des effektiven Reibungskoeffizienten ζ_{\perp} bzw. der lokalen Viskosität η unterschiedlicher Kugeln als Funktion von d . Deutlich ist der Abfall beider Größen mit wachsendem d erkennbar. Heuristisch wurde jeweils ein exponentieller Abfall angepasst.

Die Bestimmung der effektiven Reibungskoeffizienten ζ_{\perp} bzw. der lokalen Viskositäten η liefert ein völlig überraschendes Ergebnis. Aus den Reibungskoeffizienten ζ_{\perp} ergeben sich Viskositäten η zwischen 0.013 und 0.196 Pa s. Im Gegensatz zu der Grundannahme der Theorie, dass für die Viskosität η die von Wasser (0.001 Pa s) verwendet werden kann, sind die experimentellen Werte also um einen Faktor 10 bis 100 erhöht. Außerdem macht Abbildung 5-10b deutlich, dass der effektive Reibungskoeffizient ζ_{\perp} bzw. die Viskosität η keine örtlich konstanten Größen sind, sondern massive Abhängigkeiten vom Röhrendurchmesser d besitzen: Mit steigendem Röhrendurchmesser d nehmen die Werte von ζ_{\perp} bzw. η ab, was sich heuristisch gut durch einen exponentiellen Abfall beschreiben lässt.

Schlussfolgerung hieraus ist, dass klassische Theorien zur Reptation, die bei Wechselwirkung des einzelnen Polymers mit dem Netzwerk dieses als kontinuierlichen homogenen, viskoelastischen Körper berücksichtigen, bei der Interpretation mikroskopischer Experimente teilweise versagen. Speziell dissipative Wechselwirkungen, denen ein Reporterfilament im Netzwerk ausgesetzt ist, sind dominiert von lokalen, topologischen Variationen, was diese theoretischen Konzepte nicht berücksichtigen.

Ähnliche Ergebnisse findet man für das Sättigungsverhalten longitudinaler Filamentfluktuationen. Das Sättigen der $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ -Kurven lässt sich analog dem oben diskutierten Modell erklären, da transversale und longitudinale Fluktuationen im Kurzzeitbereich gekoppelt sind, wie in Kap. 4.1.3 theoretisch abgeleitet wurde und hier experimentell verifiziert werden konnte.

Kugel	Diffusionskoeffizient D_{rept} [m ² /s]	Beobachtungsdauer T [s]
1	$2.914 \cdot 10^{-15}$	289.3
2	$1.097 \cdot 10^{-15}$	970.4
3	$8.031 \cdot 10^{-16}$	100.0
4	$4.504 \cdot 10^{-16}$	67.5
5	$2.040 \cdot 10^{-16}$	62.4
6	$3.521 \cdot 10^{-17}$	78.9
7	$2.581 \cdot 10^{-17}$	236.6
8	$1.634 \cdot 10^{-17}$	79.4

Tabelle 5-4: Quantitative Ergebnisse der Anwendung von Gleichung 5-6 an $\langle \Delta x_i(t)^2 \rangle$ -Daten aus im Langzeitbereich $t > 3$ s. Für jede Kugel wurde anhand der angepassten Geraden die Diffusionskonstante D_{rept} bestimmt, wobei aus statistischen Gründen nur die ersten 10% der gesamten MSD-Kurve verwendet wurden. Zusätzlich wurde die gesamte Beobachtungsdauer T pro Kugel aufgenommen.

Wie den in Tabelle 5-4 dargestellten Werten zu entnehmen ist, liefert die Bestimmung der Diffusionskonstanten D_{rept} im Langzeitbereich $t \gg \tau_e$ für die acht vermessenen Kugeln Werte zwischen $2.9 \cdot 10^{-15}$ und $1.6 \cdot 10^{-17}$ m²/s mit einem Mittelwert $\langle D_{rept} \rangle \approx 6.9 \cdot 10^{-16}$ m²/s.

Die gemessenen Werte der Diffusionskonstanten D_{rept} sind um zwei Größenordnungen kleiner als Werte die in früheren Arbeiten in Mikrofluoreszenz-Untersuchungen ermittelt wurden. (Käs, 1993; Käs et al., 1995). Mit dem Mittelwert $\langle D_{rept} \rangle \approx 6.9 \cdot 10^{-16}$ m²/s kann die Zeit τ_D (sog. *Reptationszeit*) berechnet werden, die ein Filament mittlerer Länge $\langle L_c \rangle \approx 22 \mu\text{m}$ benötigt, um aus der ursprünglichen Reptationsröhre im Netzwerk herauszuweichen:

$$\tau_D = \frac{L_c^2}{2 \cdot D_{rept}}. \quad \text{Gleichung 5-11}$$

Es ergibt sich ein mittlerer Wert $\langle \tau_D \rangle \approx 3.5 \cdot 10^5$ s, der mit der terminalen Relaxationszeit $\tau_R \approx 10^5$ s übereinstimmt, die man aus makrorheologischen Messungen der viskoelastischen Impedanz verschlauerter Aktinnetzwerke erhält (Ruddies et al., 1993). Im Gegensatz zu Mikrofluoreszenz-Untersuchungen liefert die kolloidale Sondentechnik also Ergebnisse, die konsistent sind mit makroskopischen Untersuchungen an Aktinnetzwerken. Dieses Ergebnis zeigt, dass die mit Mikrofluoreszenz-Experimenten derzeit erreichbaren Beobachtungszeiten zu kurz sind, um verlässliche Werte zur Langzeitdiffusion einzelner Aktinfilamente zu erhalten.

Die großen Unterschiede der einzelnen D_{rept} -Werte weisen darauf hin, dass die Diffusionskonstante eine starke Längenabhängigkeit besitzen (vgl. auch Kap. 4.1.2). Im klassischen Reptationsmodell wird theoretisch folgende Längenabhängigkeit gefordert (Morse, 1998a; Morse, 1998b):

$$D_{rept} \approx \frac{k_B T \ln(\Lambda/a)}{2\pi\eta_s L_c}, \quad \text{Gleichung 5-12}$$

unter Verwendung der hydrodynamischen Abschirmlänge in Aktinnetzwerken $\Lambda \approx \xi \approx 0.5 \mu\text{m}$, des Filamentdurchmessers $a \approx 7$ nm, der Lösungsmittel-Viskosität η_s und der Konturlänge des Filaments L_c .

Unglücklicherweise war es aus technischen Gründen nicht möglich, mit dem konfokalen Mikroskop gleichzeitig die Bewegung der Goldkugeln und die Länge der fluoreszent markierten Filamente zu messen, da bei langen Beobachtungszeiten Bleichprozesse die Reporterfilamente zerstören. Eine genaue Überprüfung des Skalenverhaltens aus Gleichung 5-12 war deshalb nicht möglich. Aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen weiß man aber (Käs, 1993; Käs et al., 1995), dass sich die Längenverteilung auspolymerisierter Aktinfilamente von 4 bis 40 μm erstreckt. Unter der Annahme, dass der gemessene Wertebereich von D_{rept} korrespondiert zur Längenverteilung einzelner Filamente, kann man folgendes von Gleichung 5-12 abweichendes Skalenverhalten ableiten:

$$D_{rept} \approx L_c^{-2.5 \pm 0.5}. \quad \text{Gleichung 5-13}$$

Ein weiterer Unterschied zu theoretischen Voraussagen ergibt sich für den Reibungskoeffizienten einzelner Filamente $\zeta = k_B T / D_{rept}$, der sich aus Gleichung 5-12 durch Anwendung der Einsteinschen Beziehung ableiten lässt. Dieser Reibungskoeffizient ist im klassischen Röhrenmodell direkt von der Lösungsmittel-Viskosität η_s der wässrigen Umgebung des Netzwerks bestimmt. Bei Berechnung der Viskosität η_s aus Gleichung 5-12 mit $\langle D_{rept} \rangle \approx 6.9 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$ und den typischen Werten der eingehenden Parameter (vgl. Angaben unter Gleichung 5-12) erhält man überraschenderweise $\eta_s \approx 0.1 \text{ Pas}$, was um zwei Größenordnungen von der Wasserviskosität von 0.001 Pas abweicht. Auch an dieser Stelle werden also massive Abweichungen theoretischer Voraussagen und experimentell messbarer Werte deutlich.

Eine ähnliche Diskrepanz wurde kürzlich durch Vergleich der nach Morse berechneten und der aus makrorheologischen Impedanzspektren erhaltenen Reibungskoeffizienten gefunden (Morse, 1998b). Die Abweichung der diskutierten Experimente von theoretischen Folgerungen des klassischen Reptationsröhren-Modell lässt sich durch die Annahme erklären, dass im Netzwerk lokale topologische Störungen im Sinne einer Verengung der Reptationsröhre vorhanden sind. Die in Kap. 5.2.4 diskutierte starke Variabilität der lokalen Potentiale $V_{\perp}(y_i)$ und die in diesem Abschnitt weiter oben diskutierte Abhängigkeit des Reibungskoeffizienten ζ_{\perp} vom lokalen Röhrendurchmesser d geben erste experimentelle Hinweise in diese Richtung.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen zur thermisch getriebenen Reptation des einzelnen Filaments im verschlauften Netzwerk formulieren: Die Einführung der kolloidalen Sondentechnik eröffnet erstmals die Möglichkeit, die Reptation einzelner Reporterfilamente über mehrere Größenordnungen in der Zeit direkt mikroskopisch zu beobachten. Für sehr kurze Zeiten lassen sich durch Analyse der mittleren quadratischen Verschiebung einzelner Filamentsegmente in transversaler und longitudinaler Richtung die von theoretischen Modellen geforderten Skalengesetze eindeutig bestätigen. Im transversalen Skalenverhalten, das einen behinderten Diffusionsprozess beschreibt, manifestiert sich das für semiflexible Polymere typische Zusammenspiel entropischer und enthalpischer Beiträge. Das fast identische Skalenverhalten des longitudinalen Bewegungsanteils bestätigt die theoretische Annahme, dass auf diesen kurzen Zeiten transversale und longitudinale Fluktuationen aneinander gekoppelt sind. Die sterischen, durch das umgebende Netzwerk induzierten Beschränkungen der Segmentfluktuationen des Reporterfilaments manifestieren sich in einer Sättigung beider Anteile, die aufgrund der existierenden Kopplung beider Bewegungsrichtungen zur gleichen Zeit eintritt. Theoretische Modelle zur Sättigung der transversalen Fluktuationen lassen sich prinzipiell an die experimentellen Daten anpassen, liefern quantitativ aber Hinweise darauf, dass dissipative Prozesse nicht ausreichend berücksichtigt werden. Für die durch normale Diffusion beschriebene Bewegung des Filaments entlang der Reptationsröhre im Langzeitbereich konnten längenabhängige Diffusionskoeffizienten ermittelt werden, die im Gegensatz zu früheren mikroskopischen Untersuchungen mit makrorheologischen Messungen übereinstimmen.

5.3 „Enforced Reptation“ – Versetzung einzelner Polymere im verschlauften Netzwerk

Die Untersuchung thermisch getriebener Fluktuationen einzelner, in verschlaufte Netzwerke eingebetteter Reporterfilamente liefert eine quantitativ höchst unterschiedliche Übereinstimmung von Theorie und Experiment. Kurzzeitfluktuationen, die von Eigenschaften des einzelnen semiflexiblen Polymers und dem viskosen Lösungsmittel des Netzwerks bestimmt sind, konnten mit den theoretischen Modellen auf Basis des klassischen Reptationsröhren-Modells sehr gut in Einklang gebracht werden. Bei der Diskussion des Sättigungsverhaltens der Segmentfluktuationen aufgrund von Netzwerkeinflüssen und dem Langzeitverhalten der Diffusion einzelner Filamente treten aber gravierende Unterschiede zwischen Theorie und Experiment auf. Die im Rahmen der theoretischen Modelle anhand experimenteller Daten errechneten Reibungskoeffizienten für das Einzelpolymer im Netzwerk sind im Gegensatz zu den Grundannahmen des Reptationsröhren-Modells um einen Faktor 10 bis 100 erhöht und scheinen zudem von topologischen Eigenschaften der Reptationsröhre abhängig zu sein. Diese experimentellen Befunde deuten darauf hin, dass reibungsinduzierte, mechanische Kopplungen zwischen dem Reporterfilament und seiner Netzwerkumgebung im klassischen Reptationsröhren-Modell stark unterbewertet werden.

Um genauere Einblicke zu erlangen, wurde in den folgenden Untersuchungen die MT-Methode („Magnetic Tweezers“) verwendet, um gezielt einzelne Filamente durch Applizieren von Kraftpulsen durch ein verschlauftes Netzwerk zu ziehen (sog. *erzwungene Reptation*, engl.: *enforced reptation*). Die Analyse reibungsinduzierter Wechselwirkungsprozesse wird erleichtert, da sich eindeutig Einzelfilament- und Netzwerkeigenschaften trennen lassen.

Außerdem ist das System Reporterfilament mit angehefteter Magnetkugel eine neuartige mikrorheologische Messapparatur, die eine weitestgehend artefaktfreie Ermittlung lokaler viskoelastischer Eigenschaften in verschlauften Netzwerken ermöglicht.

5.3.1 Probenpräparation mit magnetischen Partikeln

Die Probenpräparation umfasst folgende Arbeitsschritte:

- Fluoreszenzmarkierung paramagnetischer Polystyrolkugeln (vgl. Kap. 3.1.2);
- Herstellung konturmarkierter Biotin-Aktin-Reporterfilamente ohne kolloidale Magnetsonden;
- Herstellung des Einbettungsnetzwerks mit kolloidalen Magnetsonden;
- Einbettung der Reporterfilamente in unmarkiertes Netzwerk bei gleichzeitiger Kugelbindung.

Fluoreszenzmarkierung paramagnetischer Polystyrolkugeln: Die Kugeln (vgl. Kap. 3.1.2) wurden für ihre fluoreszenzmikroskopische Verwendung mit Rhodamin-BSA beschichtet. Dieser Fluorophor bot sich an, da die Kugeln bereits mit einer BSA-Oberflächenbeschichtung geliefert werden und deshalb durch den Austausch des BSA durch Rhodamin-BSA markiert werden können. Aus der Stammlösung wurden 100 μl entnommen und mit 200 μl Millipore-Wasser (Milli-Q-System, Eschborn) verdünnt. Nach längerem Vortexen erfolgte über 10 min eine Trennung von Magnetkugeln und Puffer mittels Magnetsedimentation (Magnetseparator MPC[®]-E-1, Dt. Dynal, Hamburg), anschließend wurde der Überstand (ca. 200 μl) abpipettiert und durch frisches Millipore-Wasser ersetzt. Diese Waschprozedur wurde fünfmal wiederholt. Durch Austausch des Überstands durch eine wässrige Rhodamin-BSA Lösung ($c = 10 \text{ mg/ml}$) und Inkubation für 1 h auf Eiswasser im Ultraschallbad wurden die Kugeln gefärbt. Abschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch fünfmaliges Waschen (nach obigem Schema) mit einer BSA-Lösung ($c = 1 \text{ mg/ml}$) entfernt. Die fluoreszenten Magnetpartikel wurden unter Lichtabschluss bei ca. 4 °C gelagert und waren über 3 Monate verwendbar. Vor den Versuchen wurden sie jeweils 5 min im Ultraschallbad beschallt, um während der Lagerung entstanden Verklumpungen der Kugeln aufzubrechen.

Konturmarkierte Biotin-Aktin-Reporterfilamente: Entsprechend der Präparationsvorschrift in Kap. 5.1.3 wurde eine 2.55 μM auspolymerisierte Biotin-Aktinlösung hergestellt ($c_a = 105 \mu\text{g/ml}$, Volumen = 125 μl), wobei eine Konturmarkierung nach Kap. 5.1.2 erfolgte.

Unmarkiertes Einbettungsnetzwerk mit kolloidalen Magnetsonden: Analog Kap. 5.1.1 wurde eine 10 μM F-Aktinlösung ($c_a = 0.4 \text{ mg/ml}$, Volumen = 250 μl) angesetzt, wobei der Monomerlösung 5 μl der fluoreszenzmarkierten Magnetkugellösung beigemischt wurde und

die Polymerisierung bei 4 °C unter Lichtabschluss im Standrotator erfolgte, um ein Absinken der Magnetkugeln zu vermeiden.

Einbettung der Reporterfilamente in unmarkiertes Netzwerk: Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden zuerst 0.5 μl der Reporterfilamente in 1 ml Antiox-F-Puffer verdünnt, davon 40 μl mit 40 μl des Einbettungsaktins vermengt und von dieser Mischung 70 μl in die Probenkammer des MT-Aufbaus pipettiert. Während einer zehnminütigen Inkubationszeit erfolgte dort die Kugelmarkierung der Filamente, wobei die Kugeln ausschließlich an Filamentenden banden.

5.3.2 Durchführung der Messungen

Die Probenkammer des verwendeten MT-Aufbaus (vgl. Kap. 3.5) wurde für alle Untersuchungen auf 20 °C temperiert. Die Magnetkräfte wurden in einer Sequenz von Rechteckpulsen appliziert, wobei unterschiedliche Stromstärken und Pulsdauern von 2 bis 10 s verwendet wurden. Für Aufnahmen der magnetkugelmarkierten, fluoreszenten Reporterfilamente wurde ausschließlich Fluoreszenz-Video-Mikroskopie (vgl. Kap. 3.2) verwendet, da neben der Kugelbewegung auch die Filamentkontur aufgezeichnet wurde. Um die Kraft-Kalibration aus Kap. 3.5.3 verwenden zu können, wurden in den Aufnahmen die Reporterfilamente und die Kante der Magnetspule gleichzeitig aufgezeichnet.

Die quantitative Auswertung der Kugelbewegung erfolgte analog Kap. 5.2.2. Die pro Puls auf die Kugel wirkende Magnetkraft wurde anhand des ermittelten Abstands der Magnetkugel von der Polschuhkante des Magneten bestimmt (vgl. Kap. 3.5.3). Die Filamentkontur jedes untersuchten Reporterfilaments wurde unmittelbar vor jedem Kraftpuls durch Anwendung eines Spurverfolgungs-Algorithmus (Strey, 1993) ermittelt. Abbildung 5-11 zeigt ein typisches Beispiel für die Versetzung eines Reporterfilaments durch einen Kraftpuls anhand der Überlagerung von Fluoreszenzaufnahmen vor und nach dem Kraftpuls. Die Kugelbewegung in Richtung des Polschuhs des Magneten und die Filamentkonturen sind ebenfalls eingezeichnet.

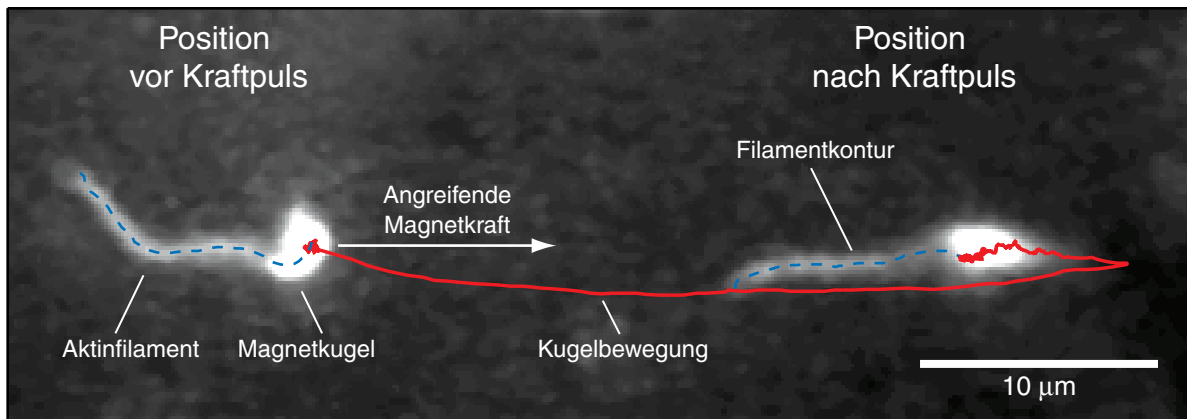


Abbildung 5-11: Schematische Darstellung des Messablaufs. Das fluoreszenz- und magnetkugelmehrte Reporterfilament wurde in ein unmarkiertes Netzwerk mit Konzentration $c = 0.2 \text{ mg/ml}$ (Maschenweite $\xi \approx 1.3 \mu\text{m}$) eingebettet. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Filaments vor und nach dem Kraftpuls wurden überlagert. Deutlich sind die Kontur des Filaments und die stark fluoreszierende Magnetkugel erkennbar. Die Darstellung enthält sowohl die Trajektorie der Kugel während des Kraftpulses als auch die Filamentkonturen vor und nach dem Puls.

5.3.3 Analyse der Kugelbewegung

Abbildung 5-12 zeigt ein typisches Beispiel erzwungener Filamentbewegung: Kraftpulse konstanter Amplitude und Dauer wurden entlang der x-Achse auf das Reporterfilament appliziert. Die verursachte Kugelbewegung wurde parallel und senkrecht zur Richtung der wirkenden Kraft aufgezeichnet.

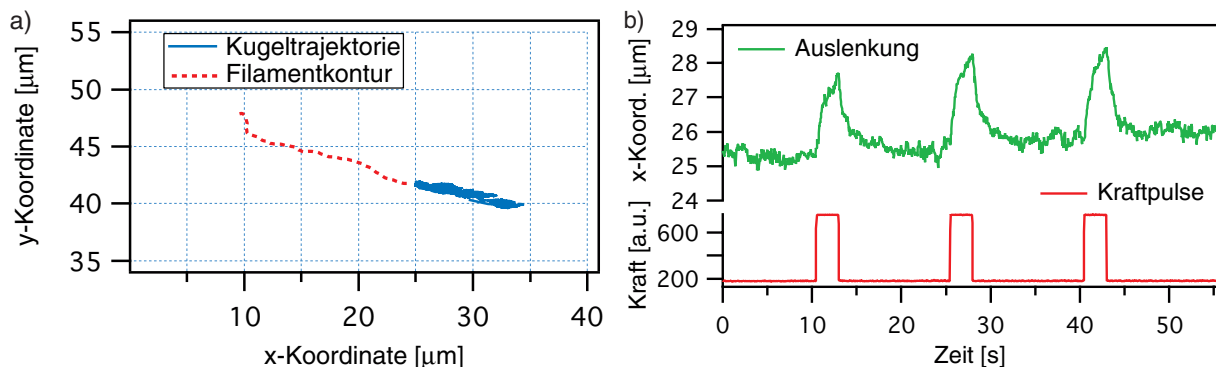


Abbildung 5-12: Typisches Antwortverhalten eines Reporterfilaments auf applizierte Kraftpulse mit Amplitude $F_0 = 5.4 \text{ pN}$ und Pulsdauer $T = 2.5 \text{ s}$. a) Trajektorie der an das Reporterfilament gekoppelten Kugel (Beobachtungsdauer: 288 s, Aufnahmefrequenz: 25 Bilder / Sekunde). Die Filamentkontur vor dem ersten applizierten Kraftpuls ist zusätzlich eingezeichnet, was eine Berechnung der Konturlänge möglich macht. Obwohl die Magnetkraft nur in Richtung der x-Achse wirkt, bewegt sich die Kugel auch in y-Richtung. Die von der Lage des Filaments vorgegebene Vorzugsrichtung findet sich in der Bewegung der Kugel wieder.

b) Auslenkung der Kugel in x-Richtung für drei applizierte Kraftpulse. Im Mittel wird die Kugel pro Puls um $2 \mu\text{m}$, also nur einem Teil der Filamentlänge, ausgelenkt. Im Antwortverhalten der Kugel lassen sich drei unterschiedliche Regimes erkennen. Zu Beginn des Kraftpulses steigt die Auslenkung schnell an, anschließend erfolgt eine Retardation und nach Abschalten der Kraft relaxiert das System in eine neue Ruheposition.

Der Argumentation aus Kap. 5.2.3 folgend soll anhand der Bewegungsgleichung für die Magnetkugel bei wirkender Magnetkraft $f_{mag}(t)$ geklärt werden, ob das Antwortverhalten der Kugel die Wechselwirkung des Reporterfilaments mit dem Netzwerk wiedergibt (vgl. Gleichung 5-1):

$$m \frac{\partial^2 \bar{x}}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial \bar{x}}{\partial t} + \frac{\partial V(\bar{x})}{\partial \bar{x}} = f_{therm} + f_{mag}(t). \quad \text{Gleichung 5-14}$$

Die Trägheitskräfte können wegen der äußerst kleinen Masse der Magnetkugeln ($m_{Magnetkugel} = 6.8 \cdot 10^{-16}$ kg, vgl. Kap. 3.1.2) vernachlässigt werden. Stokessche Reibung der Magnetkugel mit der wässrigen Umgebung spielt eine untergeordnete Rolle. Eine Abschätzung des Reibungskoeffizienten ergibt $\zeta_{Magnetkugel} = 6\pi \eta_{Wasser} r = 7.8 \cdot 10^{-9}$ Ns/m, was im Vergleich zu den in Kap. 5.2.5 ermittelten Reibungskoeffizienten für das Einzelfilament um mindestens drei Größenordnungen kleiner ist. Da der Kugeldurchmesser $\langle d \rangle \approx 0.83 \mu\text{m}$ kleiner ist als die Maschenweite $\xi \approx 1.3 \mu\text{m}$ des Netzwerks, spielen direkte Wechselwirkungen der Kugel mit dem Netzwerk ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Mehrere qualitative und quantitative Argumente stützen diese Aussage:

- *Qualitativ:* In den Experimenten wurden nur kugelmarkierte Filamente beobachtet. Freie, ungebundene Kugeln, die in jedem Präparat anfangs vorhanden waren, wurden durch die ersten Kraftpulse zur Kante der Magnetfeldspule gezogen und sammelten sich dort. Außerdem erfolgte teilweise die Bewegung der an ein Filament angehefteten Kugel erstaunlicherweise nicht in Richtung der wirkenden Magnetkraft $f_{mag}(t)$, sondern in eine davon abweichende durch die ursprüngliche Lage des Filaments vorgegebene Richtung (vgl. Abbildung 5-12a), d.h. das Antwortverhalten ist durch die Wechselwirkung des Filaments und nicht durch die der Kugel mit dem Netzwerk bestimmt.
- *Quantitativ:* Durch eine MSD-Analyse der thermisch getriebenen Kugelfluktuationen nach applizierten Kraftpulsen (vgl. Abbildung 5-12b) konnte nachgewiesen werden, dass durch die Kugelbewegung keinerlei topologische Störungen des Netzwerks entstehen. Das Sättigungsniveau der MSD-Kurven $\langle \bar{r}^2 \rangle$ für die Fluktuationen ist ein Maß für den der Kugel zur Verfügung stehenden Raum. Für vier Filamente wurde $\langle \bar{r}^2 \rangle \approx 0.04 \mu\text{m}^2$ anhand 33 ausgewerteter Kraftpulse ermittelt, was genau dem Quadrat der Differenz aus Maschenweite des Netzwerks und dem Durchmesser der Magnetkugeln entspricht.

Zusammenfassend ergibt sich, dass das Antwortverhalten des mit Magnetkugeln markierten Reporterfilaments hauptsächlich die Wechselwirkung des Filaments mit seiner Netzwerkumgebung wiedergibt. Damit eröffnet sich die einzigartige Möglichkeit, mit einzelnen Filamenten als Messsonden mikrorheologische Untersuchungen verschlauerter Netzwerke durchzuführen.

Bei quantitativen Analysen des viskoelastischen Antwortverhaltens von Reporterfilamenten ist es bequemer, die auf die Amplitude F_0 der Magnetkräfte $f_{mag}(t)$ normierten Kugelauslenkungen $x'(t) = x(t)/F_0$ bzw. $y'(t) = y(t)/F_0$ zu verwenden. Für die folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich Filamente mit gestreckter, parallel zur Krafrichtung orientierter Konformation verwendet, da man sich in diesen Fällen auf die Diskussion von $x'(t)$ beschränken kann.

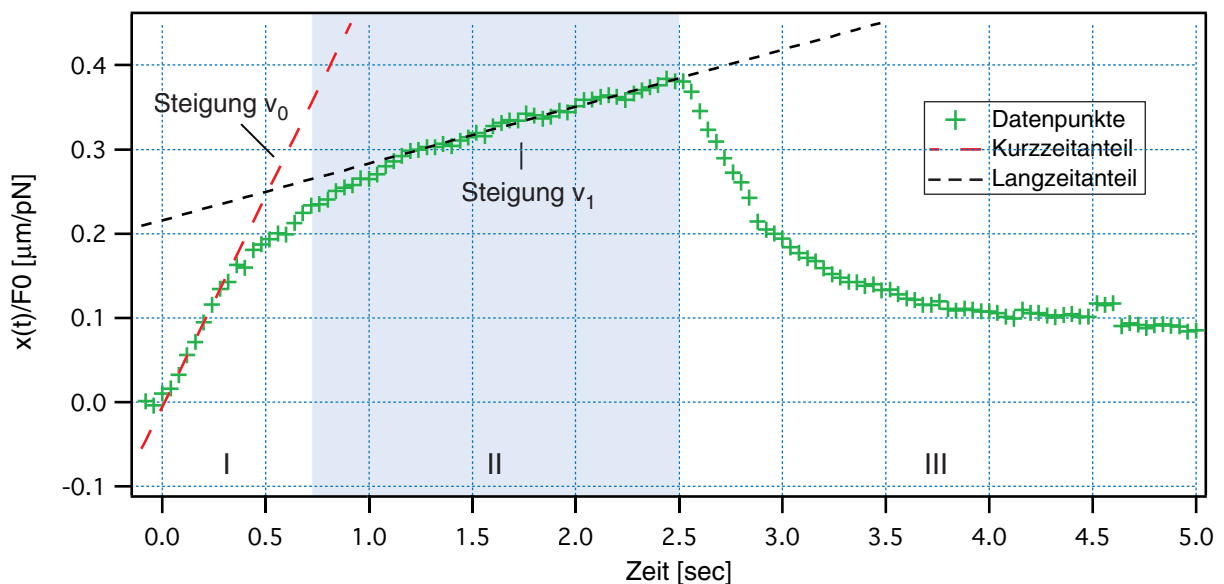


Abbildung 5-13: Gemittelt, viskoelastisches Antwortverhalten $x'(t)=x(t)/F_0$ eines Reporterfilaments. Zur Mittelung wurden 15 aufeinanderfolgende Kraftpulse mit einer Amplitude $F_0 = 6.3$ pN und Pulsdauer $T = 2.5$ s verwendet. Es lassen sich drei phänomenologisch unabhängige Zeitbereiche im Antwortverhalten erkennen: I) Kurzzeitanteil: Nach Einschalten der Kraft erfolgt eine Auslenkung der Kugel mit konstanter Geschwindigkeit v_0 . Anschließend verlangsamt sich die Bewegung aufgrund von Retardierungseffekten. II) Langzeitanteil: Das Filament bewegt sich mit im Vergleich zu v_0 verlangsamer aber konstanter Geschwindigkeit v_1 . III) Relaxation: Nach Abschalten der Kraft relaxiert die Kugel zurück in eine neue Gleichgewichtslage, wobei nicht mehr die Ausgangsposition vor dem Kraftpuls erreicht wird. Das Reporterfilament hat sich während des Pulses relativ zum gesamten Netzwerk bewegt. Die angepassten Geraden verdeutlichen den Unterschied in den Geschwindigkeiten v_0 und v_1 .

Bereits in Abbildung 5-12b sind einige der Charakteristika des Antwortverhaltens des Reporterfilaments erkennbar. Mittelt man das Antwortverhalten $x'(t)$ für mehrere aufeinanderfolgende Kraftpulse $f_{mag}(t)$, erhält man Ergebnisse, wie sie in Abbildung 5-13 abgebildet sind.

Anhand Abbildung 5-13 lassen sich drei typische, phänomenologisch unterschiedliche Zeitbereiche im Antwortverhalten $x'(t)$ des Reporterfilaments unterscheiden:

- *Kurzzeitanteil*: Nach Einschalten der Kraft mit Amplitude F_0 erfolgt eine schnelle Auslenkung $x'(t)$ der Kugel mit Geschwindigkeit v_0 . Anschließend verlangsamt sich die Bewegung aufgrund von Retardierungseffekten.
- *Langzeitanteil*: Die Bewegung des Filaments im Netzwerk $x'(t)$ erfolgt mit konstanter, aber im Vergleich zum Kurzzeitanteil erniedrigter Geschwindigkeit v_1 .
- *Relaxation*: Nach Abschalten der Kraft $f_{mag}(t)$ relaxiert die Kugel zurück in eine neue Gleichgewichtslage, wobei die ursprüngliche Ausgangsposition nicht mehr erreicht wird. Das Reporterfilament hat sich während des Pulses relativ zum umgebenden Netzwerk bewegt.

Im folgenden Abschnitt wird die Wechselwirkung des Reporterfilaments mit seiner direkten Netzwerkumgebung durch Analyse des Kurzzeitanteils im Antwortverhalten des Reporterfilaments untersucht. Basierend auf diesen Zusammenhängen kann im abschließenden Kapitel ein phänomenologisches Modell erarbeitet werden, mit dessen Hilfe diese neuartigen Experimente als neues mikrorheologisches Messverfahren genutzt werden können.

5.3.4 Reibungsinduzierte Wechselwirkungen zwischen semiflexiblen Polymeren im verschlauften Netzwerk

Wie im vorigen Kapitel gezeigt wurde, bewegt sich das Reporterfilament unmittelbar nach Einschalten der Magnetkraft F_0 mit der Anfangsgeschwindigkeit v_0 (vgl. Abbildung 5-13). Dem klassischen Reptationsröhren-Modell folgend ist für die Bewegung innerhalb der Röhre nur der Reibungskoeffizient $\zeta_p = 2\pi\eta_s L_c / \ln(\Lambda/a)$ (vgl. Gleichung 4-8) bestimmend. Für die Geschwindigkeit v_0 bzw. die normierte Auslenkung $x'(t)$ gilt deshalb:

$$v_0 = \frac{F_0}{\zeta_p} = \frac{F_0 \cdot \ln(\Lambda/a)}{2\pi\eta_s L_c} \quad \text{bzw.} \quad , \quad \text{Gleichung 5-15}$$

$$x'(t) = \frac{v_0 \cdot t}{F_0} = \frac{1}{\zeta_p} \cdot t = \frac{\ln(\Lambda/a)}{2\pi\eta_s L_c} \cdot t$$

wobei die hydrodynamische Abklinglänge im Aktinnetzwerk $\Lambda \approx \xi \approx 1.3 \mu\text{m}$, der Durchmesser des Aktinfilaments $a \approx 7 \text{ nm}$, die Viskosität der Umgebung η_s und die Konturlänge des Filaments L_c eingehen.

Da sich aus der Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Reibungskoeffizient ζ_p bestimmen lässt, macht eine Analyse des Kurzzeitanteils von $x'(t)$ die direkte Messung reibungsinduzierter Wechselwirkungen des Filaments mit dem verschlauften Netzwerk möglich. Derartige Analysen haben potentiell auch Auswirkungen auf die Interpretation makrorheologischer Eigenschaften des semiflexiblen, verschlauften Aktinnetzwerks, da viele theoretische Modelle das klassische Reptationsröhren-Modell als Grundlage verwenden, um die viskoelastischen Moduln abzuleiten (Gittes und MacKintosh, 1998; Hinner et al., 1998; Isambert und Maggs, 1996; Kroy und Frey, 1998; Maggs, 1997; Morse, 1998a; Morse, 1998b; Morse, 2001; Wilhelm und Frey, 1999).

5.3.4.1 Auswertung

Nach Gleichung 5-15 ist der Reibungskoeffizient ζ_p des Reporterfilaments primär durch die Länge L_c (Polymerparameter) und die lokale Abschirmlänge Λ (Netzwerkparameter) bestimmt. Da neben der Bestimmung quantitativer Werte von ζ_p auch die Frage zu beantworten ist, ob Gleichung 5-15 prinzipiell gültig ist, wurden zwei Klassen von Auswertungen durchgeführt.

Mehrere Auslenkungen bei einem Reporterfilament: Der Reibungskoeffizient ζ_p sollte bei einem Filament fester Länge L_c für aufeinanderfolgende Kraftpulse konstant bleiben, wenn sich die lokale Abschirmlänge Λ pro Puls nur wenig ändert. Da der lokale Wert von Λ durch die Netzwerkumgebung (Doi und Edwards, 1986; Landau und Lifschitz, 1966) festgelegt wird, ist diese Bedingung für ein Reporterfilament erfüllt, dessen jeweilige Reptationsröhre vor jedem Kraftpuls in ihren topologischen Eigenschaften wenig variiert, selbst wenn das Filament über große Bereiche gezogen wird.

Für ein Filament der experimentellen Messreihe mit Konturlänge $L_c \approx 9.0 \mu\text{m}$, das während vier Kraftpulsen mit mittlerer Amplitude $F_0 \approx 8.8 \text{ pN}$ über eine Distanz von ca. $30 \mu\text{m}$ gezogen wurde, waren diese Voraussetzungen erfüllt. Durch eine neuartige Bildanalyse konnte gezeigt werden, dass trotz der großen Auslenkung des Filaments die lokale Röhrenkonformation und damit die Netzwerkumgebung vor jedem Kraftpuls nur wenig variierte.

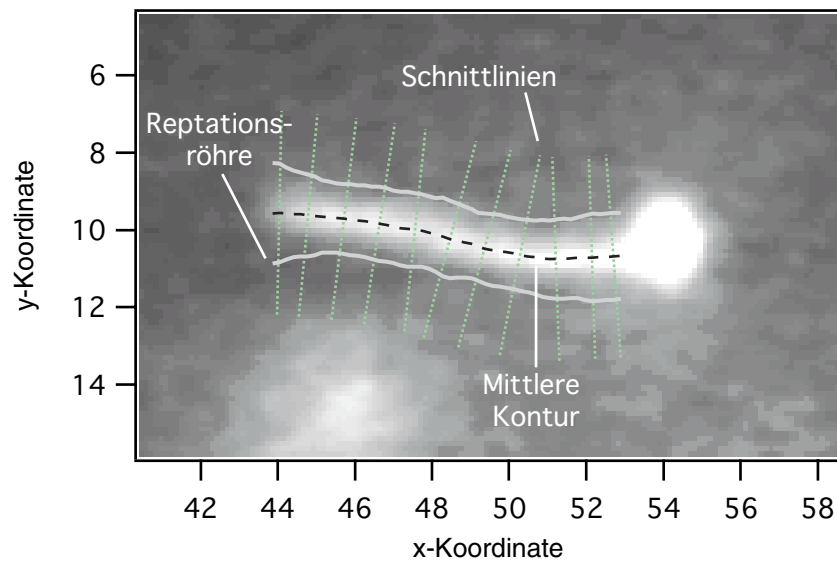


Abbildung 5-14: Bestimmung der Reptationsröhre eines Filaments aus einer gemittelten Intensitätsverteilung. Durch Überlagerung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen des Filaments über 10 s (250 Bilder) entsteht ein Bild, das eine direkte Abbildung der lokalen Reptationsröhre ist. Folgt man in dieser Aufnahme der mittleren Kontur und bestimmt senkrecht dazu entlang der Schnittlinien (nur jede fünfte Schnittlinie ist hier dargestellt) die Breite der Intensitätsverteilungen erhält man den lokalen Radius der Reptationsröhre. Die Intensitätswerte entlang der Schnittlinien werden aus dem Bild ausgelesen und mittels Anpassung einer eindimensionalen Gauß-Funktion wird die Breite errechnet. Als Ergebnis erhält man die topologische Struktur der Röhre, anhand derer man den lokalen Röhrendurchmesser bestimmen kann.

Die thermischen Undulationen eines Filaments erfahren durch die Netzwerkumgebung eine topologische Beschränkung. In Kap. 5.2.5 wurde gezeigt, dass im Mittel 1 s vergeht, bis das einzelne Filamentsegment und damit auch die Undulationen der Kontur diese topologische Beschränkung spüren. Durch Überlagerung aufeinanderfolgender fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der Konturundulationen über einen Zeitraum von 10 s (250 Bilder) entsteht folglich eine Intensitätsverteilung, die als direkte Abbildung der lokalen Reptationsröhre verwendet werden kann, wenn das Filament parallel zur Fokalebene des Mikroskops orientiert ist (vgl. Abbildung 5-14). Folgt man in dieser gemittelten Aufnahme dem Maximum der Intensitätsverteilung, erhält man die mittlere Kontur des Filaments. Bestimmt man anschließend senkrecht zur mittleren Kontur die lokale Breite der Intensitätsverteilung, so kann der lokale Durchmesser der Röhre quantitativ charakterisiert werden (vgl. Abbildung 5-14).

Anhand der Auslenkung $x'(t)$ des Filaments wurde nach Gleichung 5-15 der Reibungskoeffizient ζ_p für jeden Kraftpuls durch Anpassen einer Geraden im Zeitbereich $0 \leq t \leq 0.28$ s nach Einschalten der Kraft bestimmt (vgl. Abbildung 5-13).

Auslenkungen unterschiedlicher Reporterfilamente: Für Filamente unterschiedlicher Länge sollte sich nach Gleichung 5-15 ein linearer Zusammenhang zwischen Reibungskoeffizient ζ_p und Konturlänge L_c herstellen lassen. Lokale Variationen von Λ wirken sich trotz der logarithmischen Abhängigkeit nur schwach aus, da die Größenordnung des Arguments der Logarithmusfunktion bei ca. 10^3 liegt, d.h. in einem Bereich sehr flacher Steigung der Logarithmusfunktion.

Sieben unterschiedlich lange Filamente wurden für diese Auswertung verwendet, wobei auf jedes einzelne 10 Kraftpulse appliziert wurden. Abhängig von der jeweiligen Position des Filaments in der Messkammer wirkten dabei Kräfte mit Amplituden im Bereich von 5.4 bis 19.7 pN (vgl. Tabelle 5-5). Anhand der gemittelten, normierten Auslenkungsdaten wurde der Reibungskoeffizient ζ_p wie oben beschrieben ermittelt. Außerdem wurde anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bilddaten die Konturlänge L_c bestimmt.

5.3.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Auswertung des einzelnen Reporterfilaments an unterschiedlichen Stellen des Netzwerks mit im Mittel identischen Netzwerkbeschränkungen sind in Abbildung 5-15 nach Pulsen geordnet dargestellt. Neben dem pro Kraftpuls ermittelten Reibungskoeffizienten ζ_p ist der mittels der neu eingeführten Bildanalyse bestimmte, minimale Röhrendurchmesser der jeweiligen Reptationsröhre vor dem Puls dargestellt.

Für die vier ausgewerteten Kraftpulse ergibt sich ein Mittelwert des Reibungskoeffizienten $\bar{\zeta}_p \approx 3.86 \cdot 10^{-6}$ Ns/m mit einer Abweichung von $\pm 2.4 \cdot 10^{-6}$ Ns/m. Obwohl das Filament während der Pulssequenz über ca. $30 \mu\text{m}$ gezogen wurde, ändert sich ζ_p nur relativ wenig. Dies wird verständlich, wenn man die topologische Beschränkung des Reporterfilaments durch das Netzwerk vor jedem Kraftpuls anhand des minimalen Reptationsröhrendurchmessers quantifiziert. Man stellt fest, dass auch dieser nur sehr schwach variiert in einem Bereich $0.80 \pm 0.06 \mu\text{m}$.

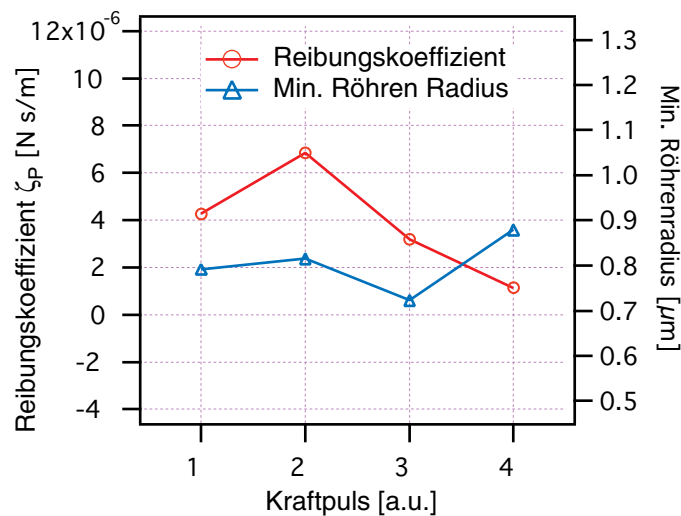


Abbildung 5-15: Ergebnisse der Bestimmung des Reibungskoeffizienten ζ_p und des für die jeweilige Ausgangsposition des Filaments relevanten minimalen Röhrenradius. Obwohl das Filament durch Kraftpulse über eine Länge von ca. $30 \mu\text{m}$ gezogen wird, sind die topologischen Bedingungen für das Reporterfilament vor Applizieren des Kraftpuls fast identisch, was in der geringen Variation des minimalen Röhrenradius deutlich wird. Diese topologisch ähnlichen Bedingungen äußern sich in einer geringen Variation des Reibungskoeffizienten ζ_p .

Diese erste Auswertung stützt also die Hypothese zur Anwendbarkeit von Gleichung 5-15 für den Kurzzeitanteil im Antwortverhalten der Kugelbewegung.

In Tabelle 5-5 sind die Resultate der Auswertung mehrerer Reporterfilamente zusammengefasst. Diese Tabelle enthält für jedes untersuchte Filament die ermittelte Konturlänge L_c , den Reibungskoeffizienten ζ_p und die wirkende Magnetkraft F_0 .

Filament	Konturlänge L_c [μm]	Reibungskoeffizient ζ_p [N s / m]	Magnetkraft F_0 [pN]
1	4.48	$1.90 \cdot 10^{-6}$	19.7
2	9.54	$3.59 \cdot 10^{-6}$	6.0
3	10.00	$3.20 \cdot 10^{-6}$	8.8
4	12.20	$1.57 \cdot 10^{-5}$	6.1
5	14.59	$9.27 \cdot 10^{-6}$	5.7
6	17.20	$1.64 \cdot 10^{-5}$	7.4
7	26.60	$3.81 \cdot 10^{-5}$	5.4

Tabelle 5-5: Quantitative Ergebnisse der Bestimmung des Reibungskoeffizienten ζ_p bzw. der Konturlänge L_c für sieben Filamente. Die Ergebnisse sind nach der Filamentlänge ansteigend geordnet.

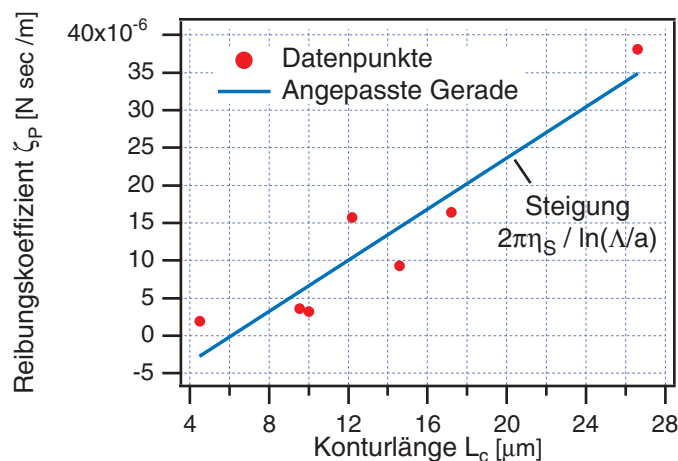


Abbildung 5-16: Darstellung des Reibungskoeffizienten ζ_p als Funktion der Konturlänge L_c des Reporterfilaments. Jeder der aufgetragenen Datenpunkte entspricht dem bei einem Filament gemessenen Reibungskoeffizienten. Die lineare Abhängigkeit des Reibungskoeffizienten ζ_p von der Konturlänge L_c , wie sie in Gleichung 5-15 gefordert ist, wird erfüllt. An die Daten wurde eine Gerade angepasst, aus deren Steigung $2\pi\eta_s / \ln(\Lambda/a)$ sich ein mittlerer Wert für die Viskosität η_s ableiten lässt.

Abbildung 5-16 enthält die grafische Darstellung der Reibungskoeffizienten ζ_p als Funktion der Konturlänge L_c , in der die in Gleichung 5-15 geforderte lineare Abhängigkeit deutlich wird. Auch diese Analyse bestätigt die Anwendbarkeit von Gleichung 5-15 für diese

Klasse von Experimenten. Außerdem lässt sich anhand der Steigung der angepassten Geraden ein mittlerer Wert für $2\pi\eta_s / \ln(\Lambda/a) \approx 1.70$ Pas ermitteln. Unter Verwendung von $\Lambda \approx \xi \approx 1.3 \mu\text{m}$ und $a \approx 7 \text{ nm}$ kann mit Gleichung 5-15 der Mittelwert der lokal in Aktinnetzwerken wirksamen Viskosität $\bar{\eta}_s \approx 1.41$ Pas berechnet werden.

Beide Klassen von Auswertungen bestätigen, dass der Kurzzeitanteil des Antwortverhaltens des Reporterfilaments auf einen applizierten Kraftpuls im Sinne von Gleichung 5-15 interpretiert werden kann. Damit wurde erstmals die reibungsinduzierte Wechselwirkung des Filaments mit seiner Netzwerkumgebung experimentell gemessen. Der Mittelwert $\bar{\eta}_s$ quantifiziert die Viskosität der Netzwerkumgebung. Zwischen $\bar{\eta}_s$ und dem Verlustmodul $G''(\omega)$ für Aktinnetzwerke lässt sich ein Zusammenhang herstellen, wenn man folgende Beziehung beachtet (Ferry, 1980):

$$\eta(\omega) = \frac{G''(\omega)}{\omega}. \quad \text{Gleichung 5-16}$$

Die Viskosität $\bar{\eta}_s$ kann mit der frequenzabhängigen Viskosität $\eta(\omega)$ bzw. $G''(\omega)$ verglichen werden, unter Beachtung des für die Bestimmung von $\bar{\eta}_s$ relevanten Frequenzbereich. Da für die Bestimmung von $\bar{\eta}_s$ in diesen Experimenten der Zeitbereich $0 \leq t \leq 0.28 \text{ s}$ genutzt wurde, muss der Vergleich mit dem Verlustmodul $G''(\omega)$ im korrespondierenden Frequenzbereich von $22.4 \leq \omega \leq 157.2 \text{ rad/s}$ erfolgen. In diesem Hochfrequenzbereich wurden bis heute nur wenige mikrorheologische Messungen realisiert (Gittes et al., 1997; Ziemann, 1997). Diesen Quellen und einer jüngeren theoretischen Arbeit zu den viskoelastischen Moduln von Aktinnetzwerken (Morse, 1998b) ist zu entnehmen, dass für halbverdünnte Aktinlösungen mit Konzentration $c_a \approx 1.0 \text{ mg/ml}$ ein Wert $G''(\omega > 20 \text{ rad/s}) > 5 - 10 \text{ Pa}$ bzw. eine Viskosität $\eta(\omega > 20 \text{ rad/s}) > 0.03 - 0.45 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ zu erwarten ist. Der ermittelte Wert von $\bar{\eta}_s \approx 1.41 \text{ Pas}$ liegt um einen Faktor 3 bis 50 über diesen Werten. Da zudem hier eine geringere Netzerkkonzentration als in den mikrorheologischen Experimenten verwendet wurde, ist dieser Unterschied sicherlich noch größer.

Der Vergleich des Mittelwerts $\bar{\eta}_s$ mit der frequenzabhängigen Viskosität $\eta(\omega)$ liefert die Möglichkeit zur Interpretation der reibungsinduzierten Wechselwirkung des Filaments mit der Netzwerkumgebung. Untersuchungen des Verlustmoduls $G''(\omega)$ in dem hier untersuchten Frequenzbereich gehen davon aus, dass bei derart hohen Frequenz nur dissipative Prozesse der internen Kettendynamik zu berücksichtigen sind. Eine angelegte mechanische

Spannung wird nur durch Prozesse quer zur Kontur der Filamente, d.h. durch filamentinterne Prozesse abgebaut. Die Wechselwirkung zwischen Aktinfilamenten spielt in diesem Bereich keine Rolle. Das bedeutet aber, dass bei der Auslenkung des Reporterfilaments in „Enforced Reptation“-Untersuchungen zuerst eine reibungsinduzierte Kopplung an diese Konturfluktuationen der Filamente der Netzwerkumgebung erfolgt.

Zur Ursache der starken, reibungsinduzierten Kopplung lassen sich nur Vermutungen anstellen: Wenn das Reporterfilament direkt mit den Filamenten der Umgebung wechselwirkt, müssen Prozesse direkter Filament-Filament-Reibung berücksichtigt werden. Bei direkten Kontakten der einzelnen Filamente untereinander, die typischerweise im Netzwerk auf der Längenskala der Entanglement-Länge $L_e \approx 1 - 2 \mu\text{m}$ auftreten, kann es zu der aus der Festkörperphysik bekannten sog. *trockener Reibung* zwischen einzelnen Filamenten kommen, die im Vergleich zur rein viskosen Reibung eine stark erhöhte Impulsübertragung aufweist. Das Verhältnis aus Kontur- und Entanglement-Länge legt fest, wie viele Filamente des Netzwerks im Mittel mit dem Reporterfilament zu jedem Zeitpunkt in Kontakt stehen. Die Kontakt Ereignisse selbst besitzen rein stochastische Natur, d.h. die auftretenden Reibungskräfte aus Filament-Filament-Reibung lassen sich im Sinne angreifender thermischer Kräfte an das Reporterfilament interpretieren. Durch Anwendung des Fluktuations-Dissipations-Theorems der Thermodynamik kann deshalb für die Filament-Filament-Reibung ein effektiver Reibungskoeffizient definiert werden. Reibungsprozesse dieser Art tragen, ähnlich wie die mit der viskosen, wässrigen Umgebung des Reporterfilaments, in klassischen Theorien zur Reptation zur Wechselwirkung eines Filaments mit seiner Umgebung bei. Formal kann Filament-Filament-Reibung im Sinne trockener Reibung in bisherige Theorien integriert werden durch Einführung einer effektiven lokalen Viskosität η_{eff} . In jüngsten theoretischen Arbeiten zur Elektrophorese von DNS (Desoxyribonukleinsäure), d.h. der getriebenen Bewegung einzelner Polymerfäden durch eine Matrix zufällig verteilter Hindernisse wird trockene Reibung entweder direkt (Burlatsky und Deutch, 1995; Hunter et al., 1999) oder phänomenologisch durch Einführung eines anisotropen Reibungskoeffizienten (Noguchi, 2000; Noguchi und Takasu, 2001) bereits benutzt, um experimentelle Ergebnisse zu interpretieren. Vielleicht ist es zukünftig möglich, Abwandlungen dieser Ansätze auch für die Magnetophorese von Aktinfilamenten in verschlauten, semiflexiblen Netzwerken zu verwenden.

5.3.5 „Enforced Reptation“-Untersuchungen als neue mikrorheologische Messtechnik

Die Erkenntnisse zur starken reibungsinduzierten Kopplung des Reporterfilaments an das umgebende Netzwerk lassen sich nutzen, um ein phänomenologisches Modell zur Interpretation des in Abbildung 5-13 dargestellten typischen Antwortverhaltens $x'(t)$ auf einen applizierten Kraftpuls F_0 zu entwickeln. Dieses Modell ermöglicht es, „Enforced Reptation“-Untersuchungen als neue mikrorheologische Messtechnik zu etablieren, mit der viskoelastische Eigenschaften des umgebenden Netzwerks auf molekularen Skalen messbar werden. Abschließend wird gezeigt, dass selbst ein Vergleich der Ergebnisse mit makrorheologischen Untersuchungen möglich wird.

5.3.5.1 Phänomenologisches Modell

Die durch die Magnetkraft $f_{mag}(t)$ verursachte Bewegung des Reporterfilaments koppelt über Reibungskräfte direkt an das umgebende Netzwerk und führt zu dessen Deformation. Nach Einschalten der Magnetkraft F_0 bewegt sich das Reporterfilament zuerst mit der konstanten Geschwindigkeit v_0 . Nach Landau-Lifschitz erzeugt diese Bewegung ein hydrodynamisches Strömungsfeld, das in radialer Richtung zum Filament logarithmisch abfällt (Landau und Lifschitz, 1966). Dieses Strömungsfeld induziert in der Netzwerkumgebung eine Scherspannung σ :

$$\sigma \propto \frac{\xi_p \cdot v_0}{d \cdot L_c}, \quad \text{Gleichung 5-17}$$

wobei der lokale Reibungskoeffizient $\xi_p = 2\pi\eta_s L_c / \ln(\Lambda/a)$ des Reporterfilaments, dessen Anfangsgeschwindigkeit v_0 , der mittlere Durchmesser der Reptationsröhre $d \approx \xi \approx 1.3 \mu\text{m}$, und die Konturlänge L_c zu berücksichtigen sind.

Entlang der Reptationsröhre kann die Scherspannung σ explizit berechnet werden:

$$\sigma = \frac{2\pi \cdot \eta_s \cdot L_c \cdot v(r = d/2)}{\pi \cdot d \cdot L_c} = \frac{2\eta_s \cdot v_0 \cdot \ln(d/2\Lambda)}{d \cdot \ln(a/2\Lambda)}, \quad \text{Gleichung 5-18}$$

wobei die lokale Viskosität η_s des Netzwerks, die hydrodynamische Abklinglänge $\Lambda \approx \xi \approx 1.3 \mu\text{m}$ und der Filamentdurchmesser $a \approx 7 \text{ nm}$ Eingang finden.

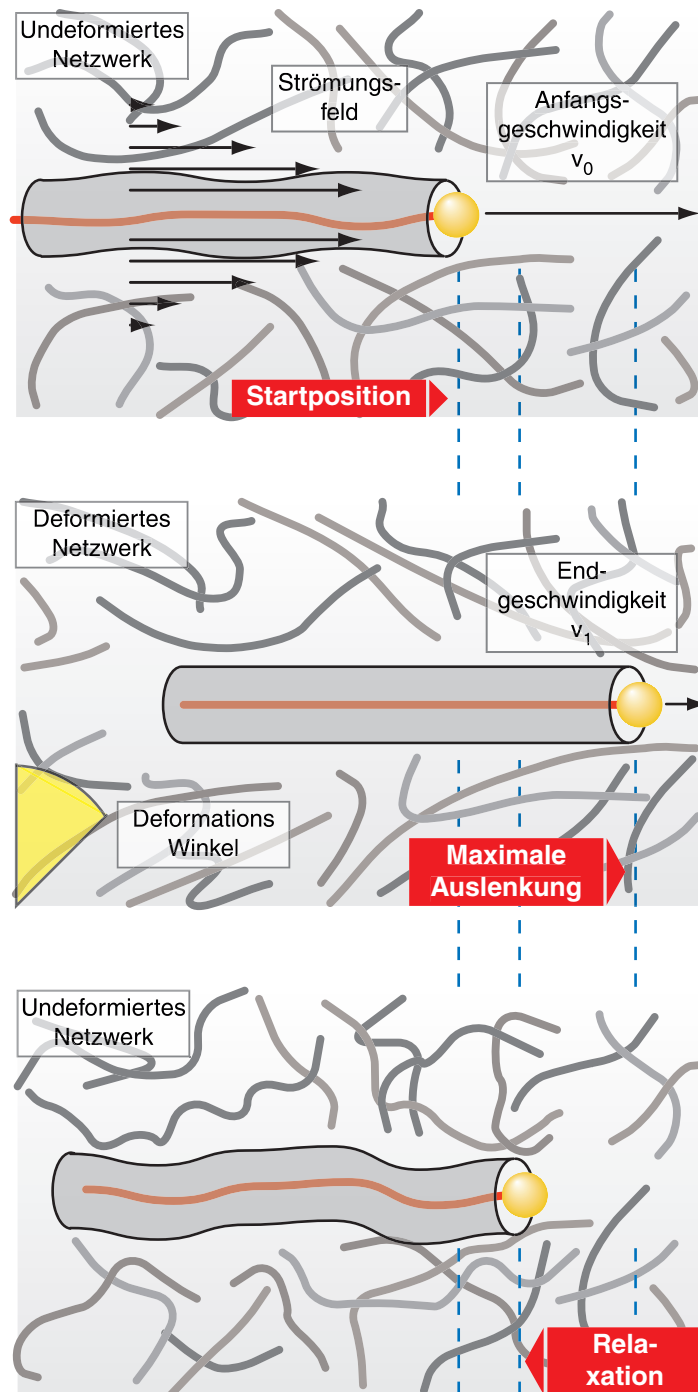


Abbildung 5-17: Schematische Darstellung zur Phänomenologie der Bewegung eines Reporterfilaments während eines applizierten Kraftpulses. Das in das relaxierte Netzwerk eingebettete Filament bewegt sich nach Einschalten der Kraft mit einer Anfangsgeschwindigkeit v_0 aus seiner Startposition in Richtung der wirkenden Kraft. Diese Bewegung induziert ein Strömungsfeld, das zu einer Deformation (Scherung) des Netzwerks führt. Die wachsende Deformation wirkt auch auf das Reporterfilament, was sich in einer gestreckten Filamentkontur und einer sinkenden Kugelgeschwindigkeit äußert. Wenn die wesentlich kleinere Endgeschwindigkeit v_1 erreicht ist, bewegt sich das Filament samt Röhre relativ zum Netzwerk. Nach Abschalten der Kraft relaxiert das deformierte Netzwerk. Der Abbau elastischer Spannungen führt zu einer Rückwärtsbewegung des Reporterfilaments. Die Skizze wurde unter Berücksichtigung aller im System gültigen Längenmaßstäbe erstellt.

Die Scherspannung σ führt zu einer lokalen Deformation des Netzwerks in der Umgebung des Reporterfilaments. Da Aktinnetzwerke viskoelastische Körper sind, wird σ teilweise elastisch gespeichert, was sich in einer Retardation der Bewegung des Reporterfilaments manifestiert. Die Bewegung des Reporterfilaments mit verlangsamter Geschwindigkeit v_1 im Langzeitanteil entspricht einer relativen Versetzung des Filaments zum Gesamtnetzwerk. Da sich im Antwortverhalten viskoelastische Eigenschaften des umgebenden Netzwerks wiederfinden, kann das durch Magnetkräfte $f_{mag}(t)$ verschobene Reporterfilament als molekulares Rheometer seiner Netzwerkumgebung benutzt werden.

Nach Abschalten der Magnetkraft $f_{mag}(t)$ relaxiert das lokal deformierte Netzwerk. Aufgrund der Relativbewegung mit Geschwindigkeit v_1 kehrt das Reporterfilament nicht mehr in seine Ausgangsposition zurück, sondern nimmt eine neue Gleichgewichtskonformation ein.

In Abbildung 5-17 sind die einzelnen Stufen dieser phänomenologischen Interpretation des Antwortverhaltens eines Reporterfilaments im verschlauften Aktinnetzwerk schematisch dargestellt.

Formal beschreibt das in Kap. 4.3.2 eingeführte mechanische Ersatzmodell des erweiterten Voigt-Kelvin-Körpers (vgl. Abbildung 4-6) das normierte Antwortverhalten $x'(t)$ des magnetkugelmarkierten Reporterfilaments in transienten MT-Experimenten. Dabei werden den einzelnen Komponenten des Modells folgende hier relevanten Parameter zugeordnet: Im einfachen Voigt-Kelvin-Modell entspricht dem Dämpfungsglied die lokale Viskosität η_p und dem Federglied die lokale Elastizität μ des Netzwerks. Das in Serie geschaltete Dämpfungsglied η quantifiziert die Reibungsbeiträge bei der relativen Versetzung des Reporterfilaments im Langzeitbereich. Der Argumentation der Dissertationsschrift von F. Ziemann folgend (Ziemann, 1997), kann unter Berücksichtigung von geometrischen Faktoren g_v bzw. g_E , die einen Vergleich dieser Untersuchungen mit einfachen Scherexperimenten ermöglichen, die Lösung der Bewegungsgleichung für den erweiterten Voigt-Kelvin-Körper (vgl. Abbildung 4-7) bei wirkender Magnetkraft $f_{mag}(t) = F_0$ angegeben werden:

$$x'(t) = x(t)/F_0 = \frac{1}{g_E} \cdot \left(\frac{1}{\mu} (1 - e^{-t/\tau}) \right) + \frac{1}{g_v} \cdot \frac{t}{\eta}, \quad \text{Gleichung 5-19}$$

wobei $\tau = \eta_p / \mu$ die typische Retardierungszeit ist. Diese Beziehung gestattet es, einen Zusammenhang zwischen der lokalen Kraftkonstanten $\mu' = g_E \cdot \mu$ bzw. des lokalen Reibungs-

koeffizienten $\eta' = g_v \cdot \eta$ und den in makrorheologischen Kriechexperimenten messbaren viskoelastischen Kenngrößen der sog. *Nullviskosität* $\eta_0 = \eta$ bzw. der sog. *Gleichgewichtskomplianz* $J_0 = 1/\mu$ herzustellen (Tempel, 1996). Der Wert von g_v ergibt sich aus der Formel für die Reibung eines Zylinders der Länge L_c in einem viskosen Medium zu $g_v = 2\pi L_c / \ln(\Lambda/a)$. Leider existieren keine theoretischen Ansätze zur elastischen Deformation eines Körpers durch Wirken einer Linienkraft. Deshalb wird im folgenden die Annahme $g_E = g_v$ als erste Näherung verwendet.

5.3.5.2 Auswertung

Die gemittelten Antwortfunktionen $x'(t)$ bei wirkender Magnetkraft $f_{mag}(t) = F_0$ der sieben unterschiedlich langen Filamente, die bereits im vorherigen Abschnitt Verwendung fanden, wurden auch für diese Auswertung verwendet. Durch Anpassung von Gleichung 5-19 an die Datensätze $x'(t)$ wurden die Parameter $\mu' = g_E \cdot \mu$ und $\eta' = g_v \cdot \eta$ bestimmt. Daraus konnten für jedes Reporterfilament unter Verwendung der individuellen Filamentlänge L_c die Viskosität η und Elastizität μ , sowie Werte für die Nullviskosität η_0 und Gleichgewichtskomplianz J_0 berechnet werden.

5.3.5.3 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5-18 zeigt das gemittelte Antwortverhalten $x'(t)$ der sieben ausgewerteten Filamente bei wirkender Magnetkraft $f_{mag}(t) = F_0$. An die Datenpunkte wurde jeweils eine Kurve nach Gleichung 5-19 angepasst, aus der sich direkt die lokale Kraftkonstante μ' bzw. der lokale Reibungskoeffizient η' ableiten lassen.

In Tabelle 5-6 sind die quantitativen Resultate dieser Anpassung zusammengefasst. Die Tabelle enthält für jedes Filament die ermittelte Konturlänge L_c , die Kraftkonstante μ' und den Reibungskoeffizienten η' .

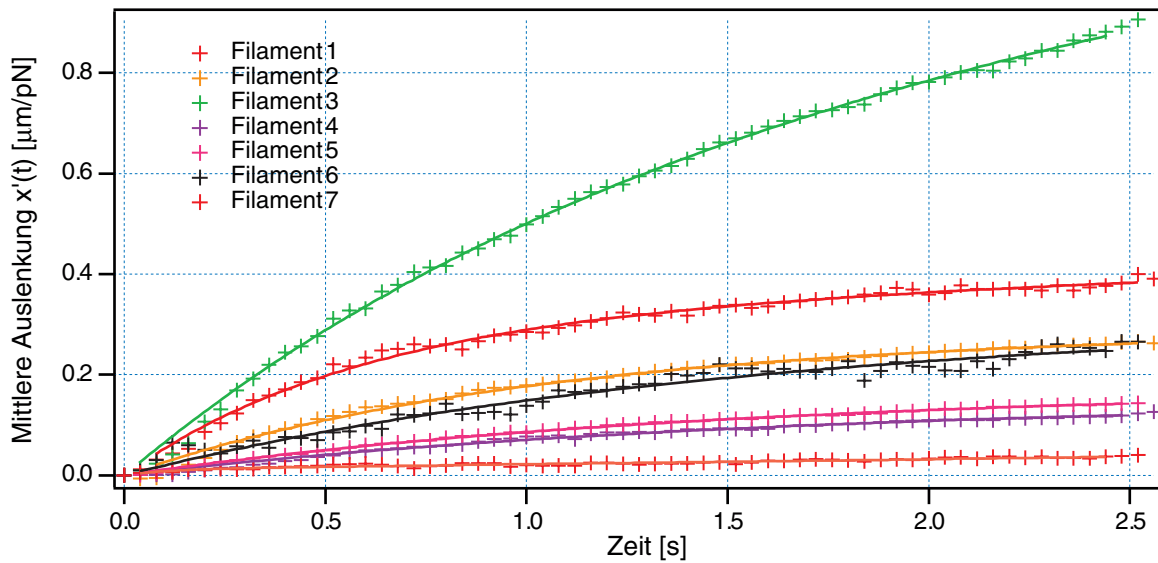


Abbildung 5-18: Darstellung des mittleren Antwortverhaltens $x'(t)$ von sieben Reporterfilamenten nach Einschalten der Magnetkraft $f_{mag}(t) = F_0$ (vgl. hierzu Kap. 5.3.4). An die Datenpunkte eines Reporterfilaments wurde das Antwortverhalten des erweiterten Voigt-Kelvin-Modells aus Gleichung 5-19 angepasst (durchgezogene Linien), dem die in Tabelle 5-6 enthaltenen lokalen Kraftkonstanten μ' und Reibungskoeffizienten η' zu entnehmen waren.

Filament	Konturlänge L_c [μm]	Kraftkonstante μ' [N / m]	Reibungskoeffizient η' [N s / m]
1	4.48	$3.10 \cdot 10^{-6}$	$3.84 \cdot 10^{-5}$
2	9.54	$3.62 \cdot 10^{-6}$	$2.83 \cdot 10^{-4}$
3	10.00	$1.26 \cdot 10^{-6}$	$1.14 \cdot 10^{-5}$
4	12.20	$7.06 \cdot 10^{-6}$	$4.37 \cdot 10^{-4}$
5	14.59	$6.04 \cdot 10^{-6}$	$4.33 \cdot 10^{-4}$
6	17.20	$3.64 \cdot 10^{-6}$	$1.11 \cdot 10^{-4}$
7	26.60	$8.35 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 5-6: Quantitative Ergebnisse der Anpassung von Gleichung 5-19 an die Auslenkungsdaten $x'(t)$ von sieben Filamenten aus Abbildung 5-18. Neben der Konturlänge L_c sind pro Filament die lokalen Kraftkonstante μ' und der lokale Reibungskoeffizient η' aufgelistet. Die Ergebnisse sind nach Konturlängen geordnet.

Tabelle 5-7 enthält die aus den Daten aus Tabelle 5-6 ermittelten Angaben zur Elastizität μ , der Viskosität η , die der Nullviskosität η_0 entspricht, und Angaben zur Gleichgewichtskomplianz J_0 .

Filament	Elastizität μ [Pa]	Viskosität η [Pa s]	Gleichgewichtskomplianz J_0 [1/Pa]
1	0.58	7.13	1.74
2	0.32	24.63	3.17
3	0.12	1.06	8.52
4	0.48	29.91	2.07
5	0.34	24.69	2.91
6	0.18	5.37	6.69
7	2.61	3.14	0.38

Tabelle 5-7: Quantitative Ergebnisse der Bestimmung des Reibungskoeffizienten ζ_p bzw. der Konturlänge L_c für sieben Filamente. Die Ergebnisse sind nach der Filamentlänge ansteigend geordnet.

Abbildung 5-19 enthält sowohl eine Darstellung der Elastizität μ bzw. der Viskosität η als auch die Daten zur Gleichgewichtskomplianz J_0 bzw. der Nullviskosität η_0 als Funktion der Filamentlänge. In beiden Darstellungen ist keine Abhängigkeit der viskoelastischen Parameter von der Konturlänge L_c erkennbar, was darauf hinweist, dass mit dieser Auswertung Netzwerkeigenschaften gemessen wurden. Für die elastischen Eigenschaften ergeben sich Mittelwerte der Elastizität von $\bar{\mu} \approx 0.66$ Pa bzw. eine mittlere Gleichgewichtskomplianz $J_0 \approx 3.50$ 1/Pa mit einer großen relativen Schwankungsbreite von 78.5 %. Die viskosen Eigenschaften werden durch die mittlere Nullviskosität $\eta_0 = \eta \approx 13.71$ Pa s bei einer relativen Abweichung von 79.5 % beschrieben.

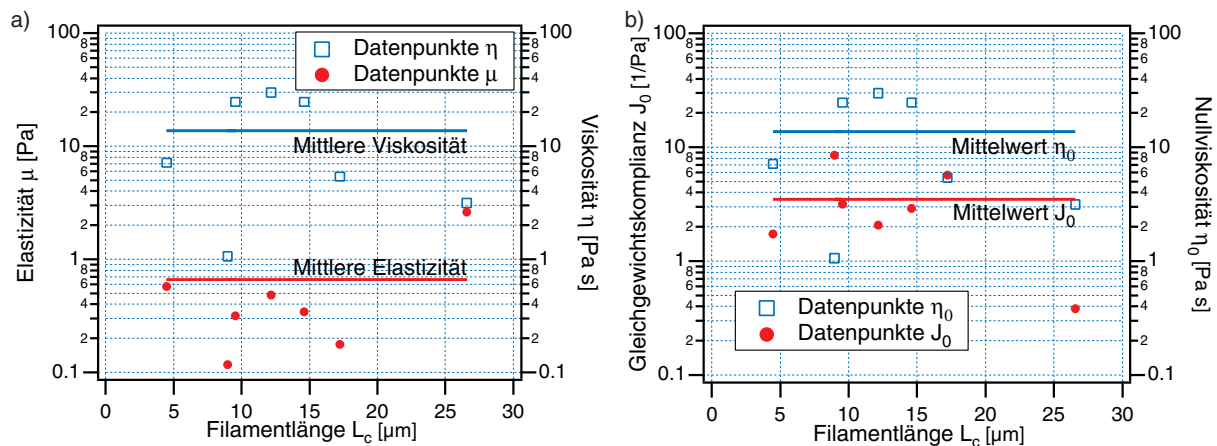


Abbildung 5-19: Logarithmische Darstellung der viskoelastischen Parameter, die sich im Rahmen des phänomenologischen Modells für jedes einzelne untersuchte Reporterfilament bestimmen lassen, in Abhängigkeit der Konturlänge L_c . In beiden Darstellungen ist keine Abhängigkeit der Parameter von der Filamentlänge erkennbar. Deutlich wird aber die starke Variation der einzelnen Datenpunkte, die lokale Variationen der Netzwerkeigenschaften wiedergeben. a) Elastizität μ und Viskosität η der lokalen Netzwerkkumgebung der einzelnen Filamente. b) Gleichgewichtskomplianz J_0 und Nullviskosität η_0 der einzelnen Filamente.

Die Mittelwerte lassen sich mit Ergebnissen von Kriechantwort-Experimente mit anderen makro- und mikrorheologischer Techniken vergleichen (Tempel et al., 1996; Ziemann, 1997). In der Arbeit von M. Tempel wurde makrorheologisch für ein Aktinnetzwerk mit Konzentration $c = 1.05 \text{ mg/ml}$ ein Wert $J_0^{\text{MAKRO}} \approx 72.1 \text{ Pa}^{-1}$ bzw. $\eta_0^{\text{MAKRO}} \approx 32.7 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ermittelt. Dagegen liefert die mikrorheologische Untersuchung bei F. Ziemann eines Netzwerks der Konzentration $c = 1.35 \text{ mg/ml}$ Werte $J_0^{\text{MIKRO}} \approx 3.60 \text{ Pa}^{-1}$ bzw. $\eta_0^{\text{MIKRO}} \approx 56.30 \text{ Pa} \cdot \text{s}$. Der hier gemessene Mittelwert der Nullviskosität η_0 ist konsistent mit den beiden Referenzwerten, wenn man die Konzentrationsabhängigkeit, die sich aus beiden ableiten lässt, linear auf die verwendete Netzwerkkonzentration $c = 0.2 \text{ mg/ml}$ extrapoliert. Schlechtere Übereinstimmung der Methoden wird für die Gleichgewichtskomplianz J_0 beobachtet. Erstaunlicherweise existiert eine gute Übereinstimmung mit dem Wert der Gleichgewichtskomplianz aus mikrorheologischen Untersuchungen, jedoch ist dieser um ca. eine Ordnung kleiner als der makrorheologisch gemessene.

Die festgestellten Übereinstimmungen und Diskrepanzen lassen sich durch unterschiedliche Argumente erklären.

- *Mängel des phänomenologischen Modells:* Bei der Erarbeitung von Gleichung 5-19 zur mikrorheologischen Analyse des Antwortverhaltens $x'(t)$ wurden mehrere Vereinfachungen gemacht, deren Auswirkungen auf das hier vorgestellte Datenmaterial nur schwer

abzuschätzen ist. Insbesondere die Annahme, dass die Geometriefaktoren gleichzusetzen sind ($g_E = g_V$), ist nur aus Plausibilitätsgründen erfolgt und bedarf einer eingehenden theoretischen Überprüfung.

- *Diskrepanzen zwischen Ergebnissen mikrorheologischer und makrorheologischer Methoden:* In den theoretischen und experimentellen Arbeiten von A. C. Maggs (Maggs, 1998) und F. Schmidt et al. (Schmidt et al., 2000) wurde bereits gezeigt, dass für makrorheologische und mikrorheologische Untersuchungen von Aktinnetzwerken große Unterschiede der Absolutwerte der viskoelastischen Parameter zu erwarten sind.
- *Schwächen in der numerischen Anpassung des erweitertes Voigt-Kelvin-Modell an das Antwortverhalten:* In den Dissertationsschriften von F. Ziemann (Ziemann, 1997) und F. Schmidt (Schmidt, 1999) wurde darauf hingewiesen, dass bei der Verwendung von mechanischen Ersatzmodellen mit einem viskosen Langzeitverhalten zur Interpretation des Antwortverhaltens eine genaue Quantifizierung des Retardierens des Messsignals schwierig ist. Hier hat dies potentielle Auswirkungen auf den elastischen Parameter, da in diesem Modell die Retardationszeit durch $\tau = \eta_p / \mu$ definiert ist.

Eine abschließende Diskussion dieser Thematik kann an dieser Stelle nicht erfolgen und bedarf weiterer Klärung in zukünftigen Arbeiten.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: „Enforced Reptation“-Untersuchungen lassen sich als neue mikrorheologische Messtechnik nutzen. Selbst das einfache phänomenologische Modell liefert quantitative Ergebnisse zur Gleichgewichtskomplianz J_0 und Nullviskosität η_0 , die konsistent sind zu anderen mikrorheologischen Techniken. Damit ist es erstmals möglich, die Wechselwirkung des einzelnen Polymers mit dem umgebenden Netzwerk und deren Auswirkung auf makrorheologische Eigenschaften des Systems zu untersuchen. Die hohe Schwankungsbreite der Einzelwerte verdeutlicht auch an dieser Stelle, dass in semiflexiblen Polymernetzwerken selbst im thermischen Gleichgewicht starke topologische Variationen vorhanden sind.

5.4 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass einzelne Filamente in verschlauten Aktinnetzwerken mit kolloidalen Sonden unter Verwendung geeigneter biochemischer Kopplungsmethoden markiert werden können. Dadurch wurden mikroskopische Untersuchungen zur Moleküldynamik der Reporterfilamente in Wechselwirkung mit der Netzwerkumgebung möglich, die verwendet werden konnten, lokale viskoelastische Eigenschaften dieses Systems abzuleiten.

Die Verwendung kolloidaler Sonden macht erstmals die Untersuchung der thermisch getriebenen Segmentfluktuationen des Reporterfilaments senkrecht und parallel zur Polymerorientierung auf einer Zeitskala von 4 ms bis 40 min möglich.

Die Beschränkung der Fluktuationen durch das Netzwerk wurde durch die Messung des effektiven harmonischen Wechselwirkungspotential zwischen Reporterfilament und der Umgebung charakterisiert. Die für unterschiedliche Netzwerkkonzentrationen ermittelten, mittleren Kraftkonstanten folgen theoretisch entwickelten Skalengesetzen. Überraschend ist dabei die starke lokale Variation der Kraftkonstanten für feste Netzwerkkonzentrationen, da das klassische Reptationsröhren-Modell von einem konstanten Wert ausgeht.

Untersuchungen zur Dynamik der Reptation im verschlauten Netzwerk durch Bestimmung der MSD-Kurven der Segmentbewegung der Reporterfilamente lieferten eine Vielzahl von Ergebnissen: Auf kurzen Zeiten beherrschen entropische und enthalpische Einflüsse die Fluktuationen, wobei eine Kopplung transversaler und longitudinaler Bewegung nachgewiesen werden konnte. Existierende theoretische Skalengesetze für die Kurzzeitdynamik der Segmentbewegung ließen sich eindeutig bestätigen. Bei längeren Zeiten treten Wechselwirkungen des Reporterfilaments mit dem Netzwerk in den Vordergrund, was zu einer gleichzeitigen Sättigung der MSD-Kurven in beiden Bewegungsrichtungen führt. Theoretische Ansätze zur Reptation einzelner Filamente in semiflexiblen Netzwerken, die thermische Fluktuationen des gesamten Systems berücksichtigen, konnten an die transversalen MSD-Kurven angepasst werden. Dieser theoretische Ansatz beschreibt prinzipiell das Verhalten richtig. Allerdings erlauben quantitative Ergebnisse den Schluss, dass reibungsinduzierte Wechselwirkungen in semiflexiblen Polymernetzwerken unterschätzt werden. Auf langen Zeitskalen diffundiert das Reporterfilament durch das Netzwerk mit Diffu-

sionskonstanten von 10^{-17} bis 10^{-15} m^2/s , in guter Übereinstimmung mit makrorheologischen Untersuchungen.

Zur Messung lokaler Reibungskräfte im verschlauften Netzwerk wurden magnetische Sonden an einzelne Filamente gekoppelt, so dass durch Nutzung der MT-Methode Reporterfilamente durch Kraftpulse im Netzwerk bewegt werden konnten („Enforced Reptation“). Die Analyse der individuellen Reibungskoeffizienten ergab, dass die effektive Viskosität in Aktinnetzwerken den theoretischen Wert, aber auch den aus mikrorheologischen Untersuchungen, um einen Faktor 10 bis 100 übersteigt. Dadurch wird deutlich, dass reibungsinduzierte Wechselwirkungen innerhalb semiflexibler Netzwerke eine größere Rolle spielen als bisher angenommen. Die starke reibungsinduzierte Kopplung der Versetzung des Reporterfilaments an die Netzwerkumgebung führt zu dessen lokaler Deformation. Ein einfaches phänomenologisches Modell erlaubt es „Enforced Reptation“-Untersuchungen als neue mikrorheologische Messmethode einzuführen. Aus dem Antwortverhalten des versetzten Reporterfilaments ließen sich mit anderen rheologischen Methoden vergleichbare Werte zur lokalen Elastizität und Viskosität des Netzwerks entnehmen. Erstmals konnten so Wechselwirkungsmechanismen auf Längenskalen des Reporterfilaments makroskopische viskoelastische Eigenschaften des Netzwerks zugeordnet werden.

6 Festkörpergestützte Polyelektrolytfilme

6.1 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure bildet einen wichtigen Bestandteil vieler natürlicher Gewebe wie z.B. der Gelenksflüssigkeit, der Haut, des Knorpelgewebes oder der Mucinschicht des Auges. Daneben ist sie einer der Hauptbestandteile der sog. *extrazellulären Matrix*. In dieses komplexe Netzwerk aus Proteinen und Polymeren sind die Zellen natürlichen Gewebes eingebettet. Die extrazelluläre Matrix dient dem Zusammenhalt der Zellen und ist Reservoir für zahlreiche Hormone, die vor allem bei embryonalen Zellen Wachstum und Differenzierung steuern. Das Grundgerüst der extrazellulären Matrix bildet eine Kombination aus Kollagenfasern, sowie dem langkettigen Polysaccharid Hyaluronsäure und Proteoglykanen. Dabei sind Kollagene mit ihrer relativ steifen Struktur verantwortlich für die Stabilität gegen Zugkräfte. Im Gegensatz dazu ist Hyaluronsäure ein sehr flexibles, negativ geladenes Polymer (Hay, 1991).

Hyaluronsäure ist ein lineares Polymer, das aus dimeren Einheiten von β -D-Acetylglucosamin und β -D-Glucuronsäure aufgebaut ist. Abbildung 6-1a zeigt die molekulare Struktur von Hyaluronsäure mit den sich wiederholenden Disaccharideinheiten. Im Polymerstrang wechseln die 1 \rightarrow 3-, beziehungsweise 1 \rightarrow 4-glycosidischen Verknüpfungen alternierend (Meyer, 1958) (vgl. Abbildung 6-1a). Die Carboxyl-Gruppe der Glycuronsäure ist unter physiologischen Bedingungen vollständig dissoziiert ($pK_s = 3.21$, (Hallett und Laurence, 1974; Laurent, 1970)) und verleiht der Hyaluronsäure eine negative Ladung. Insgesamt ergibt sich für das gesamte Polyelektrolyt ein mittleres Ladungsverhältnis f von 0.7 Ladungen pro Monomereinheit.

In dieser Arbeit wurde bakterielle Hyaluronsäure (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet, die biotechnologisch durch Kultivierung von Hyaluronsäure produzierenden Streptokokken (*Streptococcus Zooepidemicus*) hergestellt wurde. Die einzelne Kette kann ein mittleres Molekulargewicht bis zu 10^7 Da mit einer Konturlänge von über $10 \mu\text{m}$ erreichen (Rinaudo et al., 1993). Untersuchungen durch Lichtstreuung (Cleland, 1977; Terbojevich et al., 1986), sowie intrinsische Viskositätsmessungen (Cleland, 1970; Ogston und Stanier,

1951) ergaben für Hyaluronsäure in physiologischer Lösung eine räumlich symmetrische, flexible Knäuelstruktur mit einem Gyrationradius von einigen 100 nm (vgl. Abbildung 6-1b). Auf molekularer Skala können jedoch einzelne Segmente auch eine Helixkonformation einnehmen (Atkins et al., 1980; Comper und Laurent, 1978). Durch Licht- und Röntgenkleinwinkelstreuung wurden für Hyaluronsäure eine Persistenzlänge von 4 - 8 nm gemessen (Cleland, 1984; Fouissac et al., 1992). Da die Hyaluronsäuresegmente etwa 1 nm lang sind, entspricht dies 4 - 8 Monomereinheiten.

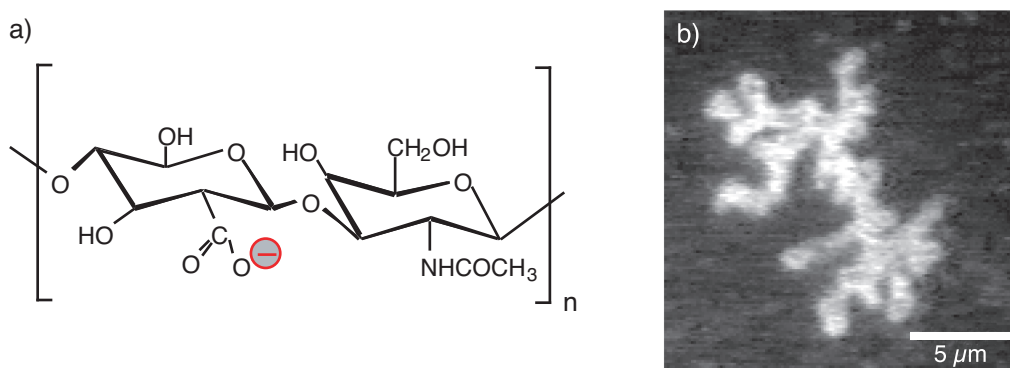


Abbildung 6-1: Struktur des Polymers Hyaluronsäure. a) Chemische Struktur von Hyaluronsäure. Die Polymerketten bestehen aus bis zu 50000 Disaccharideinheiten aus N-Acetyl-D-Glucosamin und D-Glycuronsäure.

b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Hyaluronsäurefilamenten in einer 1 mg/ml Hyaluronsäure-Matrix (Albersdörfer, 1999). Die Abbildung zeigt deutlich die verknäulte Struktur der Filamente in der Hyaluronsäure-Matrix.

Die biologische Rolle der Hyaluronsäure ist auch vom physikalischen Standpunkt aus interessant, da sich die meisten Funktionen auf viskoelastische Eigenschaften von Polyelektrolytnetzwerken zurückführen lassen. Als flexibles Polyelektrolyt vereint Hyaluronsäure mehrere bemerkenswerte physikalische Eigenschaften: Einerseits enthält Hyaluronsäure eine Vielzahl hydrophiler Seitengruppen, die der Hyaluronsäure auch bei niedrigen Konzentrationen den Charakter eines hochviskosen, stark hydratisierten Gels mit außergewöhnlichen Gleit- und Benetzungseigenschaften verleiht. Andererseits besitzt Hyaluronsäure aufgrund der typischen Entropieelastizität von Polyelektrolyten eine starke Stabilität gegen Kompression.

6.1.1 Präparation kugelmarkierter, kovalent an Festkörperoberflächen gekoppelter Hyaluronsäureschichten

Im folgenden soll kurz das Präparationsverfahren zur chemischen Kopplung von Hyaluronsäure an Glassubstrate und deren Kugelmarkierung nach C. Abdelghani-Jacquin (Abdelghani-Jacquin, 2001) beschrieben werden. Grundlage für die Bindung der Hyaluron-

säure an das Glassubstrat ist die Kopplung von Carboxygruppen der Hyaluronsäure an Aminogruppen, die durch Aminosilanisierung an die Substratoberfläche gebunden werden. Die Ankopplung der ferromagnetischen, goldbeschichteten Eisenkugeln (vgl. Kap. 3.1.2) an die Hyaluronsäureschicht erfolgt ebenfalls durch Amid-Bindungen. Die gesamte Prozedur unterteilt sich in vier Arbeitsschritte:

- Reinigung der Glassubstrate;
- Aminosilanisierung der Glassubstrate;
- Kopplung der Hyaluronsäure an das Substrat;
- Ankopplung der ferromagnetischen, goldbeschichteten Eisenkugeln (vgl. Kap. 3.1.2).

Reinigung der Glassubstrate: Zunächst mussten die Glassubstrate (Deckgläser: 24 mm x 24 mm) sorgfältig gereinigt werden. Hierzu wurde exakt nach den Anweisungen von A. Albersdörfer vorgegangen (Albersdörfer, 1999).

Aminosilanisierung der Glassubstrate: Die Aminosilanisierung ist bei Elender et al. und Beyer et al. beschrieben (Beyer et al., 1996; Elender et al., 1996). Die Beschichtung mit 4-Aminobutyl-Dimethyl-Monomethoxysilan (ABDMS, ABCR GmbH, Karlsruhe) erfolgt dabei aus der Dampfphase. Als Resultat erhält man eine homogene und korrekt orientierte ABDMS-Monoschicht (Vandenberg et al., 1991).

Kopplung der Hyaluronsäure an das Substrat: Zur Kopplung an das aminosilanisierte Substrat wurde die Hyaluronsäure in einer Konzentration von 1 mg/ml in 10 mM Hepes (pH = 7.0) gelöst. Anschließend wurden 200 mM N-(3-Dimethyl Amino Propyl)-3-ethyl Carbodiimid Hydrochlorid (EDC, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 50 mM N-Hydroxysuccimid (NHS, Fluka GmbH, Steinheim) hinzugefügt, um die Carboxy-Gruppen der Hyaluronsäure durch Aktivester zu funktionalisieren. Nach fünf Minuten wurden die aminosilanisierten Substrate für 12 h bei Raumtemperatur in die aktivierte Hyaluronsäurelösung gestellt. Um adsorbierte, nicht chemisch gekoppelte Hyaluronsäure-Reste von der Probenoberfläche zu entfernen, wurden die Substrate für mehrere Tage mit reinem Millipore-Wasser gespült. Dazu wurden die Proben in einer Kammer auf einen Schütteltisch gestellt und täglich mehrere Male das Wasser gewechselt.

Ankopplung der ferromagnetischen, goldbeschichteten Eisenkugeln: Die mit Cystein beschichteten Kugeln wurden zweimal in 1 ml Ethanol und 1 ml Millipore-Wasser gewaschen. Die mit Hyaluronsäure beschichteten Deckgläser wurden in eine 10 mM Hepes-Lösung gestellt, die wiederum 200 mM EDC und 50 mM NHS enthielt (pH = 7.0). Nach 5 min wurden die funktionalisierten Kugeln hinzugegeben (ca. 1 Vol.-%) und für weitere 12 h bei Raumtemperatur auf einen Schütteltisch gestellt. Abschließend wurden die Substrate, wie oben beschrieben, mit Millipore-Wasser gespült.

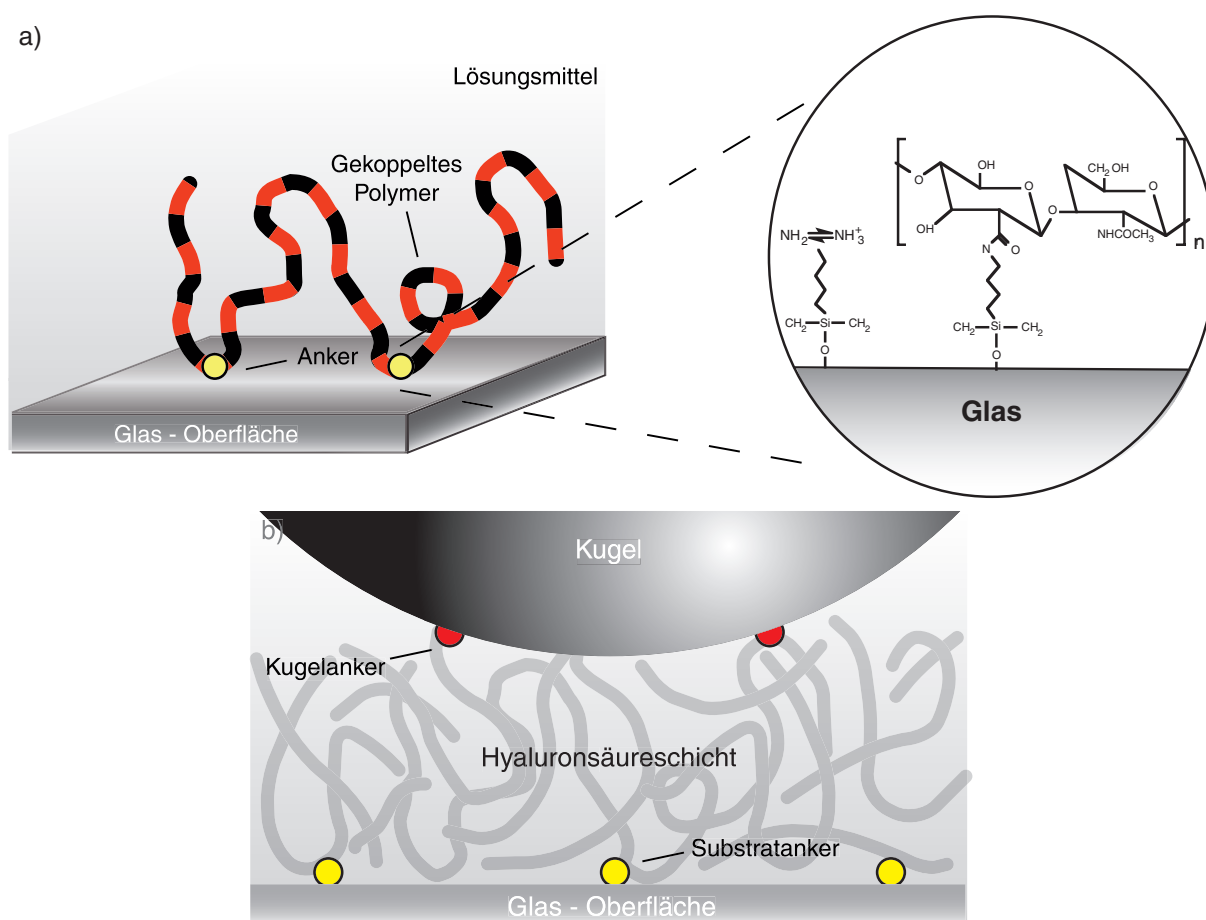


Abbildung 6-2: Schematische Darstellung der kugelmakierten, festkörpergestützten Hyaluronsäureschicht. a) Die Hyaluronsäure wird chemisch an aminosilanisierte Glasoberflächen gekoppelt. Der vergrößerte Ausschnitt enthält Strukturinformation zur Silanisierung und Hyaluronsäurekopplung. b) Darstellung der an die Hyaluronsäure gekoppelten, ferromagnetischen Kugel. Die Darstellung erfolgte unter Berücksichtigung der typischen Abmessungen für die Dicke der Hyaluronsäureschicht und des Kugeldurchmessers. Die Kugel sinkt nicht nennenswert in die Hyaluronsäureschicht ein (vgl. Kap. 6.2.3). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Kugel nur wenige Kontaktstellen mit dem Polymerfilm besitzt.

In Abbildung 6-2 ist eine schematische Darstellung der substratgekoppelten Hyaluronsäure und deren Kopplung an ferromagnetische Kugeln gezeigt. Derart präparierte, kugelmakierte, festkörpergestützte Hyaluronsäurefilme bleiben bei Lagerung in frischem Millipore-

Wasser mindestens für mehrere Wochen stabil (Albersdörfer, 1999). Für die durchgeführten Experimente wurde die Probenkammer des MT-Aufbaus unter Verwendung dieser Deckgläser zusammgebaut und mit Millipore-Wasser befüllt. Dabei wurde die standardmäßig zur Abdichtung der Probenkammer verwendete Parafilm-Folie durch doppelseitiges Klebeband ersetzt.

6.2 Diffusive Bewegung der verankerten, kolloidalen Sonden

In den letzten Jahren wurden Techniken zur mikrorheologischen Untersuchung von lebenden Zellen entwickelt. Unter anderem wurde die MT-Methode durch Anheften von Magnetkugeln an die Oberfläche von Zellen (Bausch et al., 1998) oder deren Einbettung ins Zellinnere (Bausch et al., 1999; Feneberg et al., 2001) so weiterentwickelt, dass auch an diesem *in vivo*-System viskoelastische Eigenschaften gemessen werden konnten.

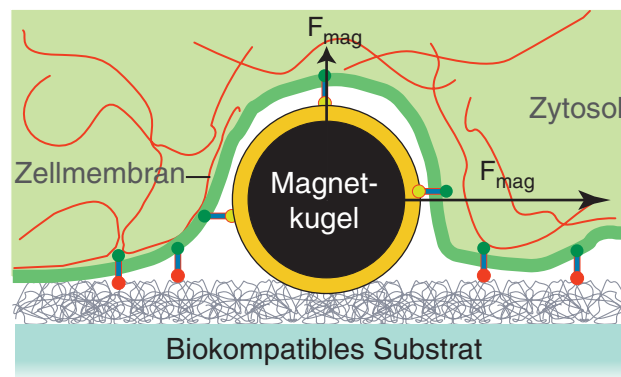


Abbildung 6-3: Ausschnitt des schematischen Querschnitts einer Zelle, der die Zellunterseite zeigt. Die Zelle ruht auf einem biokompatiblen, kugelmakierten Substrat, das Kopplungsproteine für die Zellmembran enthält. Die Magnetkugel ist an Zellmembran und Substrat gekoppelt. Um viskoelastische Eigenschaften der Zellunterseite bei Zellfortbewegung und -adhäsion zu untersuchen, sollen mit der MT-Methode lokal Kräfte, parallel und senkrecht zur Unterlage, auf die Zelle appliziert werden. Durch Messung der resultierenden Kugelbewegung wird die Quantifizierung des viskoelastischen Antwortverhaltens der Zellunterseite möglich.

In Zukunft sollen mit der MT-Methode auch mikrorheologische Untersuchungen der Zelladhäsion und -fortbewegung erfolgen. In Abbildung 6-3 ist schematisch gezeigt, wie derartige Experimente realisiert werden sollen: Geplant ist, eine lebende Zelle auf einem biokompatiblen, kugelmakierten, viskoelastischen Substrat so zu positionieren, dass sie über einer oder mehreren Kugeln zu liegen kommt. Die unspezifische oder spezifische, durch Bindeproteine vermittelte, mechanische Kopplung zwischen Zellunterseite, Magnetkugel und Substrat erlaubt es, durch Applikation von lokalen Magnetkräften mikrorheologische Untersuchungen dieses Gesamtsystems durchzuführen.

Die in dieser Arbeit untersuchten festkörpergestützten, kugelmarkierten Hyaluronsäurefilme sollen dabei als Substrat eingesetzt werden. Sie eignen sich besonders gut, da Hyaluronsäure, als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix, eine fast natürliche Zellunterlage darstellt und zudem die Dekoration mit Magnetkugeln relativ einfach realisiert werden kann. Die speziell entwickelten goldbeschichteten Eisenkugeln (vgl. Kap. 3.1.2) bieten den Vorteil, dass sie im Vergleich zu Eisenoxid-Partikeln größere magnetische Momente besitzen. Die Kugelgröße kann also verkleinert werden, was eine Reduktion der durch die Kugel induzierten Zelldeformationen erwarten lässt. Messartefakte würden minimiert. Außerdem beugt die Goldbeschichtung der Kugeln möglichen durch gelöstes Eisen bedingten Zellschädigungen vor.

Im folgenden Kapitel werden die viskoelastischen Eigenschaften dieses Systems experimentell ermittelt. Durch Messung und Analyse thermisch getriebener Kugelbewegungen im Wechselwirkungspotential der Polymerschicht lassen sich Aussagen machen über lokale viskoelastische Parameter des vollständig hydratisierten Polyelektrolytfilms. In dieser Arbeit wurden dafür Fluktuationen der kolloidalen Sonden parallel zur Oberfläche analysiert (sog. *laterale* Fluktuationen). In Kombination mit der von A. Albersdörfer (Albersdörfer, 1999) mittels kolloidaler Sondentechnik durchgeführten Bestimmung viskoelastischer Eigenschaften bzgl. Kugelfluktuationen senkrecht zur Oberfläche ergibt sich eine vollständige, mikrorheologische Beschreibung dieses biokompatiblen, kugelmarkierten Substrats. Damit ist eine Hauptkomponente des oben beschriebenen Gesamtsystems aus Substrat, Magnetkugel und Zellunterseite mikrorheologisch charakterisiert.

6.2.1 Durchführung

Die mikroskopische Aufnahme der lateralen Bewegung der auf den Hyaluronsäurefilmen verankerten, goldbeschichteten Sonden erfolgte mittels des in Kap. 3.3 eingeführten konfokalen Mikroskops im Reflexionsmodus bei ca. 20 °C Raumtemperatur (Wellenlänge: 647 nm, Aufnahmefrequenz: bis 240 Bilder/Sekunde, Beobachtungsdauer: bis 30 s). Die quantitative Auswertung der Kugelbewegung wurde unter Zuhilfenahme der in Kap. 3.4.2 erwähnten Software realisiert und als Ergebnis erhielt man die zeitaufgelöste, laterale Trajektorie der untersuchten Kugel. Abbildung 6-4 zeigt eine schematische Darstellung des Messablaufs (vgl. Abbildung 6-4a), die gemessenen Fluktuationen einer auf dem Hyaluron-

säurefilm verankerten Kugel als Funktion der Zeit (vgl. Abbildung 6-4b) und die sich aus diesen Daten ergebende Trajektorie der Kugelbewegung (vgl. Abbildung 6-4c).

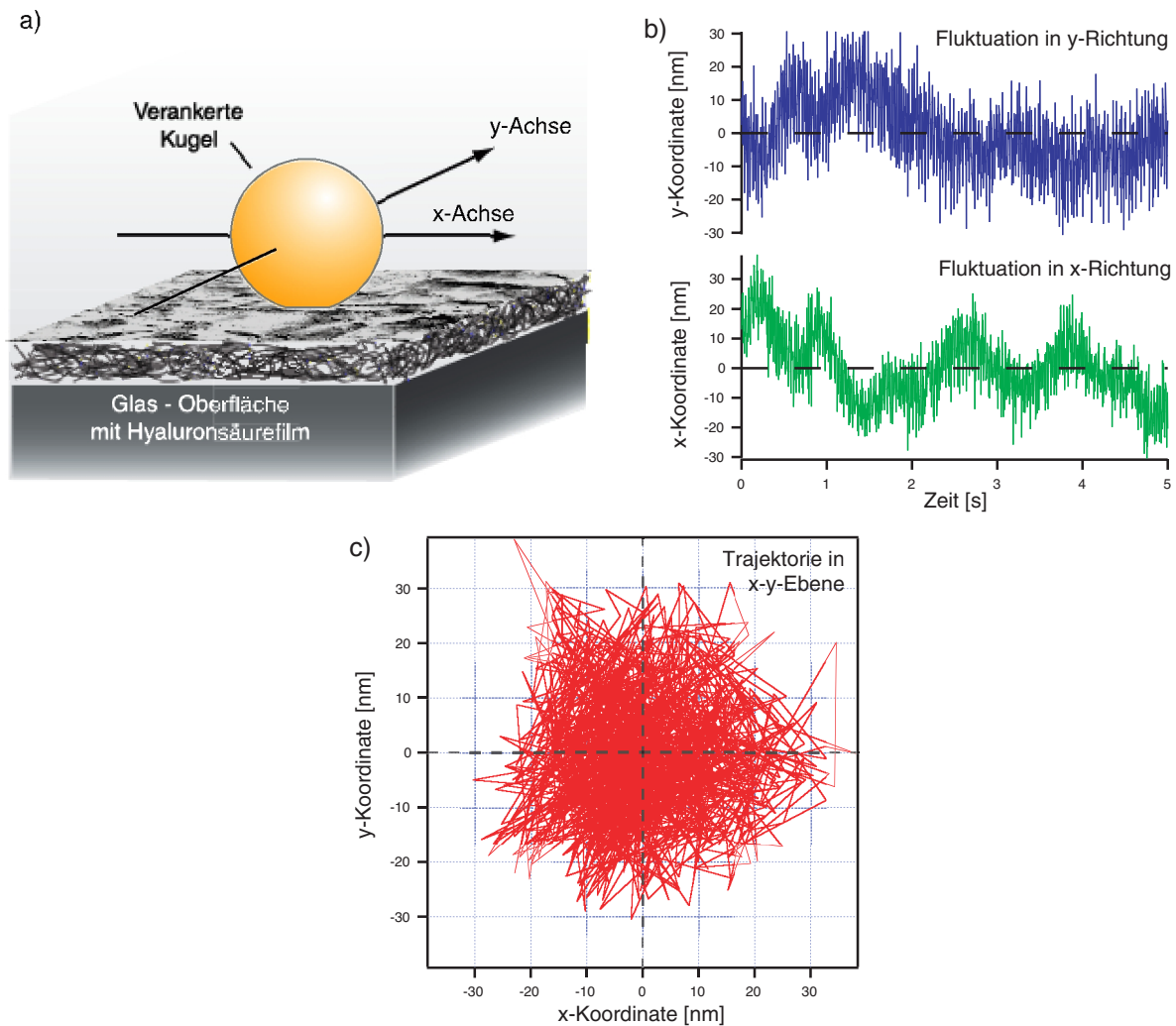


Abbildung 6-4: Schematische Darstellung des Messablaufs. a) Die auf dem Hyaluronsäurefilm verankerte Kugel bewegt sich thermisch getrieben in der durch x- und y-Achse aufgespannten Ebene. b) Beispiel für die thermisch getriebenen Fluktuationen einer Kugel in x- und y-Richtung als Funktion der Zeit. Ausschnitt von 5 sec eines wesentlich längeren Experiments (Beobachtungsdauer: 30 s, Aufnahmefrequenz: 240 Bilder/Sekunde). Die statistische Bewegung erfolgt um einen Langzeitmittelwert, der den Verankerungspunkt der Kugel auf dem Hyaluronsäurefilm kennzeichnet. c) Darstellung der thermisch getriebenen Kugelbewegung in der x-y-Ebene. Die Trajektorie ist annähernd punktsymmetrisch zur Position des Verankerungspunkts der Kugel. Erfolgt die thermisch getriebene Bewegung in einem Potential $V(x,y)$ legt diese Darstellung nahe, dass das Potential keine Vorzugsrichtung besitzt.

6.2.2 Analyse der Kugelfluktuationen

Die laterale Brownsche Bewegung der kolloidalen Sonde im Wechselwirkungspotential des Substrats lässt sich durch folgende Langevin-Gleichung beschreiben:

$$m \frac{\partial^2 \vec{x}}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial \vec{x}}{\partial t} + \frac{\partial V(\vec{x})}{\partial \vec{x}} = f_{therm} \quad \text{Gleichung 6-1}$$

Dabei ist $\vec{x}=(x(t),y(t))$ Ortsvektor der lateralen Kugelposition in der x-y-Ebene. Der erste Term dieser Gleichung berücksichtigt die auf die Kugel wirkenden Trägheitskräfte. Der zweite Term beschreibt die dissipative Reibungskraft F_R der Kugel mit ihrer direkten Umgebung aus Wasser und Hyaluronsäureschicht mit dem Reibungskoeffizienten γ . Für die in Abbildung 6-2b und Abbildung 6-4a beschriebene Geometrie ist der Reibungskoeffizient γ gegeben durch (Reynolds, 1886):

$$\gamma = 6\pi R^2 \frac{\eta_{eff}}{h} \quad \text{Gleichung 6-2}$$

Dabei ist R der Radius der kolloidalen Sonde ($R \approx 0.7 \mu\text{m}$), η_{eff} beschreibt die effektive dynamische Viskosität des umgebenden Mediums aus Wasser und chemisch gekoppelten Hyaluronsäureketten und h ist der kleinste Abstand zwischen Kugel und dem Glassubstrat.

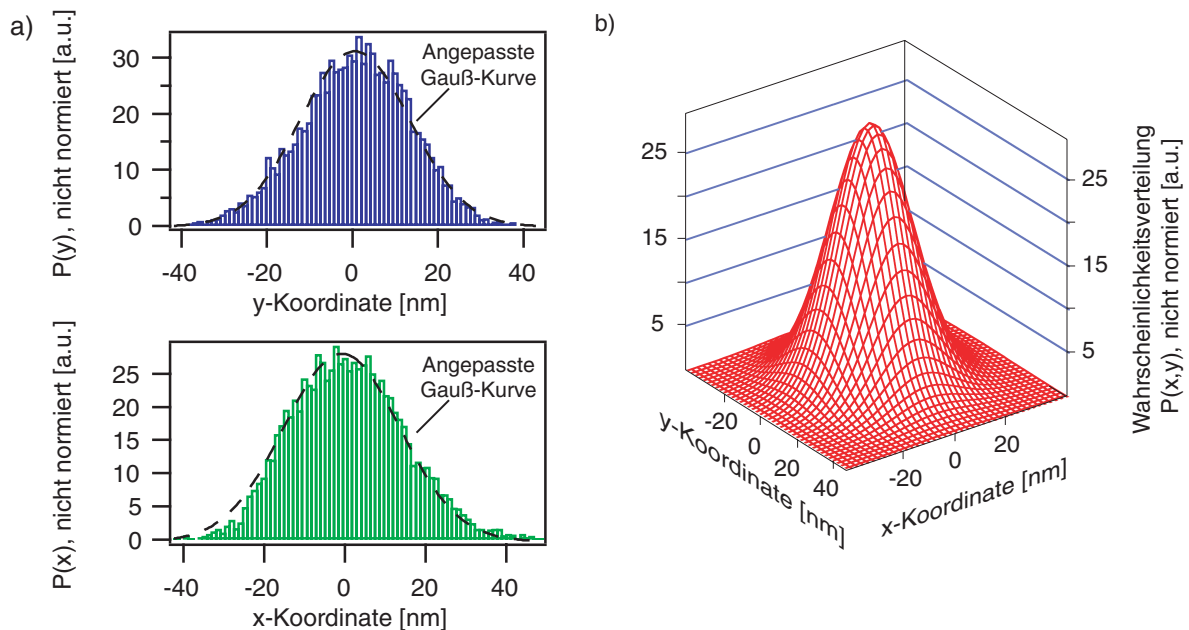


Abbildung 6-5: Berechnete statische Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(x, y)$ der Kugelbewegung aus Abbildung 6-4. a) Entlang der x- bzw. y- Achse ausgewertete Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(x)$ bzw. $P(y)$ der Kugelbewegung. An beide Verteilungen lässt sich eine Gauß-Funktion $f(x_i) = a_0 + a_1 \exp(-((x_i - a_2)/a_3)^2)$ anpassen.

b) Aus den angepassten Gauß-Funktionen in x- bzw. y-Richtung kann die zweidimensionale Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(x, y)$ rekonstruiert werden. Die abgebildete Verteilung ist vollkommen symmetrisch.

Der dritte Term von Gleichung 6-1 umfasst die auf die Kugel durch das Wechselwirkungspotential $V(\vec{x})=V(x,y)$ der Hyaluronsäureschicht wirkenden elastischen Kräfte. Die äußere, stochastisch fluktuierende Kraft des thermischen Rauschens wird durch f_{therm} in der Gleichung berücksichtigt.

Aus zeitlichen Fluktuationen der lateralen Kugelposition $x(t)$ und $y(t)$ kann man statische Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(x)$ und $P(y)$ bestimmen (vgl. Abbildung 6-5a). Da sich das gesamte System mit der Umgebung im thermischen Gleichgewicht befindet, ist die zweidimensionale Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(x,y)$ durch eine Boltzmannverteilung gegeben (vgl. Abbildung 6-5b):

$$P(x,y) \propto \exp\left(\frac{-V(x,y)}{k_B T}\right). \quad \text{Gleichung 6-3}$$

Damit ergibt sich für das Wechselwirkungspotential $V(\vec{x})=V(x,y)$ der Kugel (Prieve et al., 1990):

$$\frac{V(x,y)}{k_B T} \propto -\ln(P(x,y)). \quad \text{Gleichung 6-4}$$

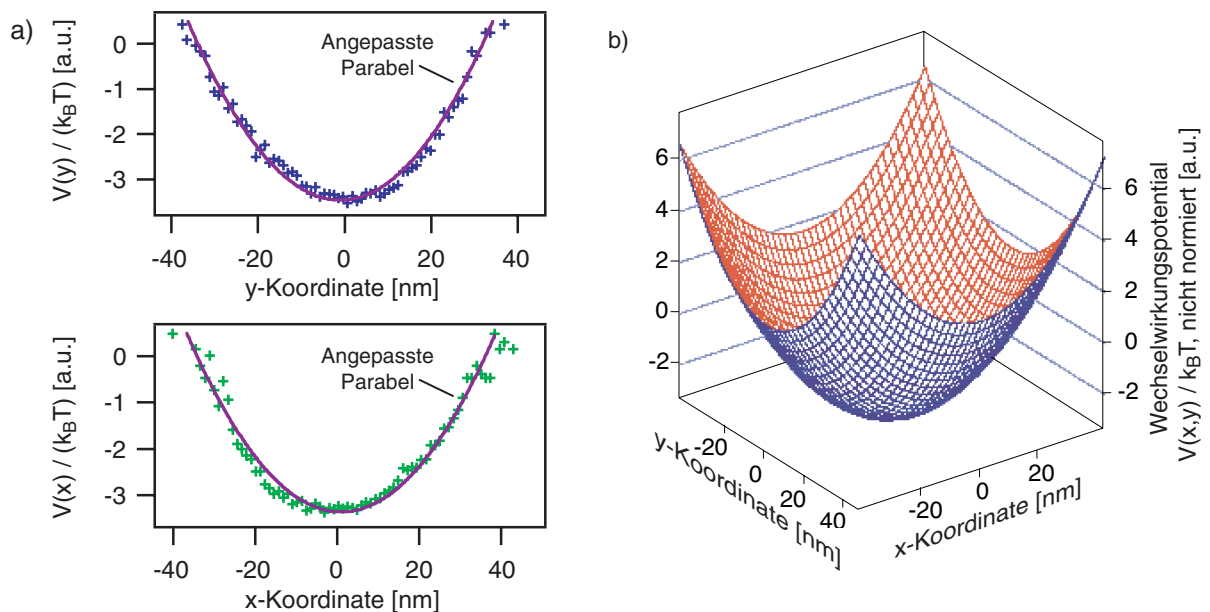


Abbildung 6-6: Berechnetes Wechselwirkungspotential $V(x,y)$ der Kugel mit dem Hyaluronsäurefilm. a) Entlang der x- bzw. y- Achse ausgewertete Potentiale $V(x)$ bzw. $V(y)$ der Kugelbewegung. An die Potentialdaten lässt sich eine Parabel $f(x_i) = a_0 + a_1/2 \cdot (x_i - a_2)^2$ anpassen. b) Aus den angepassten Parabeln in x- bzw. y-Richtung kann das zweidimensionale Wechselwirkungspotential $V(x,y)$ rekonstruiert werden. Das Wechselwirkungspotential $V(x,y)$ ist vollkommen symmetrisch und isotrop.

Wie aus Abbildung 6-6 deutlich wird, kann das Potential, in dem sich die Kugel bewegt, harmonisch angenähert werden:

$$V(\bar{x}) = V_0 + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 V}{\partial \bar{x}^2} \Big|_{\bar{x}=\langle \bar{x} \rangle} d\bar{x}^2 = V_0 + \frac{1}{2} V'' \cdot d\bar{x}^2. \quad \text{Gleichung 6-5}$$

Dabei beschreibt V'' die lokale Krümmung des Potentials am Potentialminimum, das durch den Mittelwert $\langle \bar{x} \rangle$ der Kugelbewegung, dem Verankerungspunkt, markiert wird. Diese Krümmung entspricht einer lokalen Federkonstante k des Substrats. Da sich aus den experimentellen Daten $V'' \ll \gamma^2 / m$ ergibt, ist die Bewegung der Kugel stark überdämpft, d.h. der Trägheitsterm in Gleichung 6-1 kann vernachlässigt werden.

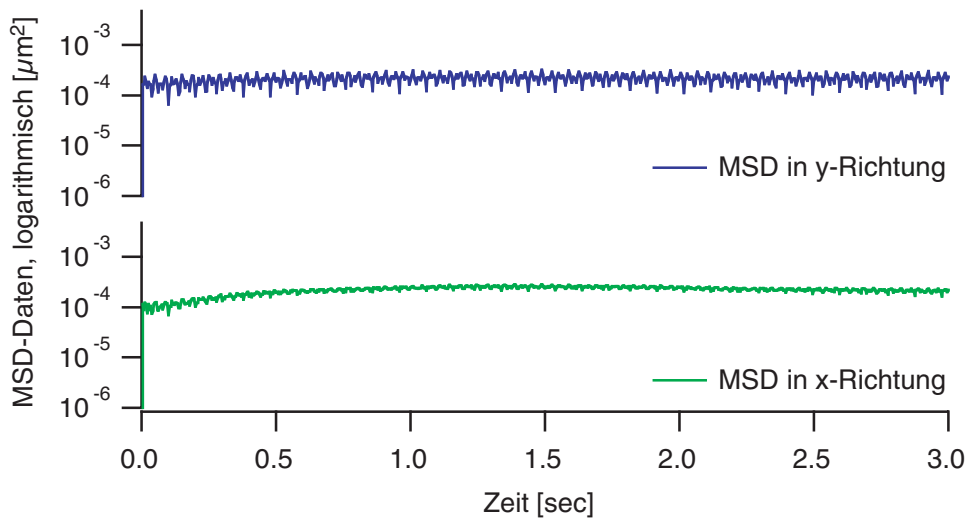


Abbildung 6-7: Berechnete mittlere quadratische Verschiebung MSD $\langle \Delta x(t)^2 \rangle$ und $\langle \Delta y(t)^2 \rangle$ in x- bzw. y-Richtung in logarithmischer Auftragung. Die erwartete Relaxation ist dieser MSD-Auswertung nicht zugänglich, da bei sehr kurzen Zeiten $t \ll 0.25$ s bereits das MSD in x- und y-Richtung auf fast identischen Niveau sättigt. Die Aufnahme­frequenz von 240 Bildern/Sekunde des konfokalen Mikroskops ist nicht ausreichend, die Relaxation zeitlich aufzulösen.

Für thermisch getriebene Bewegung eines Teilchens in einem harmonischen Potential kann die mittlere quadratische Verschiebung MSD $\langle \Delta \bar{x}(t)^2 \rangle := \langle (\bar{x}(t) - \bar{x}(0))^2 \rangle$ analytisch berechnet werden (Doi und Edwards, 1986):

$$\langle \Delta \bar{x}(t)^2 \rangle := \langle (\bar{x}(t) - \bar{x}(0))^2 \rangle = \frac{k_B T}{V''} [1 - \exp(-2t/\tau)]. \quad \text{Gleichung 6-6}$$

Die Relaxationszeit τ ist bestimmt durch das Verhältnis dissipativer und elastischer Koeffizienten $\tau = \gamma / V''$.

Für Zeiten, die sehr viel größer sind als die Relaxationszeit τ , ergibt sich der Grenzwert des MSD:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle \Delta \bar{x}(t)^2 \rangle = \frac{k_B T}{V''} \quad \text{Gleichung 6-7}$$

Zusammenfassend erhält man durch Analyse der thermisch getriebenen Kugelbewegung mit Berechnung der statischen Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(x,y)$ und der zeitlichen Entwicklung des MSD $\langle \Delta \bar{x}(t)^2 \rangle$ eine vollständige lokale Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften des festkörpergestützten Hyaluronsäurefilms.

6.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 6-8 enthält Ergebnisse der Berechnung des Wechselwirkungspotentials $V(\bar{x})=V(x,y)$ und der mittleren quadratischen Verschiebung $\langle \Delta \bar{x}(t)^2 \rangle = \langle (\bar{x}(t) - \bar{x}(0))^2 \rangle$ für mehrere Kugeln in x- bzw. y-Richtung. Die Kugeln befanden sich an unterschiedlichen Stellen der Probe.

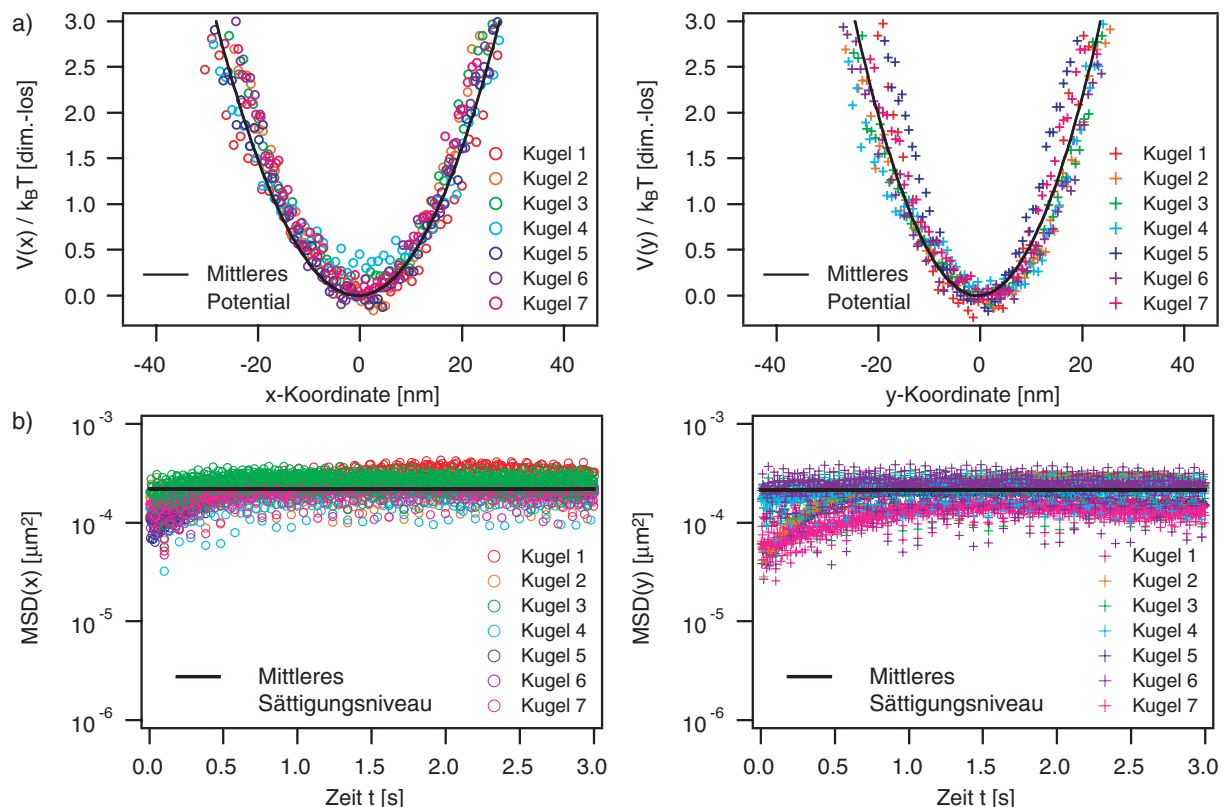


Abbildung 6-8: Ergebnisse der Potential- bzw. MSD-Auswertung für mehrere auf dem vollständig hydratisierten Hyaluronsäurefilm verankerten Kugeln. a) Die Wechselwirkungspotentiale in x- bzw. y-Richtung $V(x)$ bzw. $V(y)$ wurden für jede Kugel nach Kap. 6.2.2 berechnet und getrennt nach Raumrichtungen dargestellt. Die durchgezogene Linie markiert den mittleren Potentialverlauf. b) Die mittlere quadratische Verschiebungen $\text{MSD} \langle \Delta x(t)^2 \rangle$ bzw. $\langle \Delta y(t)^2 \rangle$ in x- bzw. y-Richtung wurden auch nach Kap. 6.2.2 berechnet und gesammelt für beide Raumrichtungen getrennt dargestellt. Die durchgezogenen Linien markieren das mittlere Sättigungsniveau aller Datensätze.

Bei Bewertung der Daten der Potentialauswertung (vgl. Abbildung 6-8a) wird deutlich, dass die Streuung der lokalen Daten V'' relativ klein ist (vgl. Tabelle 6-1), obwohl sich die untersuchten Kugeln an völlig unterschiedlichen Stellen des Präparats befanden. Die Kugeln sind im Mittel einer fast identischen, viskoelastischen Umgebung ausgesetzt. Lateral besitzt das System also sehr homogene viskoelastische Eigenschaften. Dieses qualitative Ergebnis ist erstaunlich, da die kolloidale Sondentechnik als lokalisierte Messmethode äußerst effektiv eine Detektion lokaler viskoelastischer Unterschiede des untersuchten Systems erlaubt (vgl. Kap. 5).

Es ist denkbar, dass diese homogenen Eigenschaften ein Ergebnis der Kugelmarkierung des Hyaluronsäurefilms sind. Komprimiert die gebundene Kugel aufgrund von Gravitationskräften lokal die Polyelektrolytschicht, würden die gemessenen viskoelastischen Parameter nicht den ungestörten Hyaluronsäurefilm beschreiben, sondern die Kombination aus Kugel und Polyelektrolytschicht. Eine Abschätzung der effektiven Gewichtskraft einer Kugel liefert einen Wert im Bereich von 0.1 pN. Unter Verwendung der von A. Albersdörfer (Albersdörfer, 1999) bestimmten mittleren, lokalen Elastizität $V''(\text{senkrecht}) \approx 2.89 \cdot 10^{-4} \text{ N/m}$ der Polyelektrolytschicht bzgl. Kugelfluktuationsen senkrecht zur Unterlage ergibt sich für Gewichtskräfte dieser Größenordnung eine Eindringtiefe der Kugel von ca. 0.5 nm. Die lokale Kompression des Hyaluronsäurefilms durch die Kugeln ist demnach vernachlässigbar, da nach A. Albersdörfer die Schichtdicke der Hyaluronsäureschicht $h > 140 \text{ nm}$ ist. Wegen der geringen Eindringtiefe ist die Kontaktfläche der Kugel mit der Polyelektrolytschicht äußerst klein und deshalb sind nur wenige Polymere an der Kugel verankert.

Aus den Daten der MSD-Auswertung (vgl. Abbildung 6-8b) lassen sich sowohl elastische als auch viskose Eigenschaften ermitteln. Im Gegensatz zur Potentialauswertung variieren die Sättigungsniveaus der einzelnen Kurven als indirektes Maß für V'' wesentlich stärker. Dies setzt die Genauigkeit der ermittelten elastischen Parameter V'' herab, aber im Rahmen der ermittelten Toleranzen stimmen die mittleren Elastizitätswerte $V''(\text{Potential})$ und $V''(\text{MSD})$ trotzdem überein (vgl. Tabelle 6-1).

Die in der Relaxationszeit τ der MSD-Kurven enthaltene Information der viskosen Eigenschaften des Hyaluronsäurefilms lässt sich aus den gemessenen Daten nur schwer ableiten. Die MSD-Kurven sättigen bereits nach wenigen Millisekunden, was die Datengrundlage für eine anzupassenden exponentiellen Kurve verringert. Da die Zeitauflösung der Messungen (240 Bilder/Sekunde) an der Grenze des mit dem konfokalen Mikroskop technisch möglichen liegt, konnte keine Aufnahme mit noch größerer Zeitauflösung erfolgen. Um dennoch eine Abschätzung für die Relaxationszeit τ zu geben, wurde der gemittelte MSD-Verlauf aller Datensätze verwendet.

Tabelle 6-1 enthält die quantitativen Ergebnisse der Potential- und MSD-Auswertung. Sie enthält Angaben zur lokalen Elastizität des Hyaluronsäurefilms $V''(\text{Potential})$ bzw. $V''(\text{MSD})$, bestimmt unter Verwendung von Gleichung 6-5 und Gleichung 6-7. Eine Abschätzung der viskosen Eigenschaften erfolgte durch Bestimmung der Relaxationszeit $\tau(\text{MSD})$ des gemittelten MSD-Verlaufs anhand Gleichung 6-6. Daraus und unter Verwendung von Gleichung 6-2 konnte der auf die Kugeln wirkende Reibungskoeffizient $\gamma(\text{MSD})$ und die effektive dynamische Viskosität $\eta_{\text{eff}}(\text{MSD})$ abgeleitet werden. Hierbei wurde der mittlere Radius der Kugeln ($R \approx 0.7 \mu\text{m}$) und die mittlere Schichtdicke des mit Millipore-Wasser hydratisierten Hyaluronsäurefilms ($h > 140 \text{ nm}$, (Albersdörfer, 1999)) verwendet.

Messgröße	Mittelwert	Relativer Fehler
$V''(\text{Potential})$ [N/m]	$4.25 \cdot 10^{-5}$	36.9 %
$V''(\text{MSD})$ [N/m]	$1.92 \cdot 10^{-5}$	95.4 %
$\tau(\text{MSD})$ [s]	0.39	--
$\gamma(\text{MSD})$ [N s/m]	$7.46 \cdot 10^{-6}$	--
$\eta_{\text{eff}}(\text{MSD})$ [mPa s]	> 80.43	--

Tabelle 6-1: Quantitative Ergebnisse der Potential- und MSD-Auswertung. Der Parameter V'' , der die lokale Elastizität beschreibt, kann sowohl der Potential- als auch der MSD-Auswertung entnommen werden. Alle Angaben zur Viskosität wurden ausschließlich mit Hilfe der MSD-Kurven bestimmt.

Der mittlere, gemessene Wert $\langle V'' \rangle = 0.5 \cdot (V''(\text{Potential}) + V''(\text{MSD})) = 3.10 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}$ der lokalen Elastizität ist um eine Größenordnung kleiner als der von A. Albersdörfer bei einer Ionenkonzentration von 5 mM NaCl gemessene Wert $V''(\text{senkrecht}) \approx 2.89 \cdot 10^{-4} \text{ N/m}$. Bei diesen Salzkonzentrationen sind die ladungstragenden Hyaluronsäureketten wesentlich

stärker durch Gegenionen abgeschirmt, was die gegenseitige elektrostatische Abstoßung der Ketten vermindert und damit einen höheren Wert der Elastizität bedingt.

Bei mit Millipore-Wasser hydratisierten, festkörpergekoppelten Polyelektrolytschichten ist zu erwarten, dass die Elastizität weniger von der Entropieelastizität der flexiblen Hyaluronsäureketten als von elektrostatischen Effekten bestimmt wird, da das Lösungsmittel äußerst wenige Ionen enthält. Qualitativ wird dies klar, wenn man die Präparationsschritte betrachtet (vgl. Kap. 6.1.1): Bei der Herstellung kugelmarkierter, festkörpergestützter Hyaluronsäurefilme erfolgt die chemische Kopplung in Anwesenheit von Gegenionen. In der so fixierten Polyelektrolytschicht besitzen die Ketten aufgrund der im Vergleich zum vollgequollenen Zustand geringeren Debye-Abschirmlänge sehr kleine mittlere Abstände. Entzieht man anschließend der chemisch fixierten Hyaluronsäureschicht Gegenionen durch Waschen mit Millipore-Wasser, stellt sich senkrecht zur Substratoberfläche ein stationäres Konzentrationsgefälle der Gegenionen mit erhöhten Werten in Nähe der Festkörperoberfläche und sehr niedrigen Werten an der Polymer-Wasser-Grenzfläche ein. Dieses stationäre Konzentrationsgefälle bildet sich, da einerseits die Tendenz zur Erhaltung der Ladungsneutralität der chemisch fixierten Polyelektrolytketten in Nähe des Substrats besteht, und andererseits Ionen an der Polymer-Wasser-Grenzfläche ausdiffundieren; in Analogie zur Ausbildung der Raumladungszone bei pn-Übergängen in Halbleitern. In reinem Millipore-Wasser gequollene, chemisch am Substrat verankerte Polyelektrolyte besitzen in Nähe der Festkörperoberfläche Gleichgewichtsabstände zueinander, die höheren Ionenkonzentrationen entsprechen. Andererseits herrscht ein Mangel an Gegenionen an der Polymer-Wasser-Grenzfläche. Aufgrund der chemischen Verankerung können die Polyelektrolyte an der Polymer-Wasser-Grenzfläche nicht die eigentlich für derartig geringe Ionenkonzentrationen erforderliche Gleichgewichtskonfiguration einnehmen. Die Abstände der Ketten zueinander sind im Mittel kleiner. Die Wechselwirkung der Ketten untereinander ist demnach in Nähe der Polymer-Wasser-Grenzfläche von elektrostatischen Abstoßungskräften der Polyelektrolyte untereinander dominiert.

Dieses Modell kann ebenfalls erklären, wieso die in der Potentialauswertung ermittelten Werte relativ geringe Streuung besitzen. Nicht die kurzreichweitigen, sterischen Abstoßungen der Polyelektrolyte untereinander beherrschen die Wechselwirkung, sondern langreichweitige, elektrostatische Abstoßungserscheinungen.

Die viskosen Wechselwirkungen der Kugel mit ihrer Umgebung aus Wasser und Polyelektrolytschicht lassen sich durch Berechnung der effektiven, dynamischen Viskosität $\eta_{eff}(\text{MSD})$ charakterisieren. Der ermittelte Wert $\eta_{eff}(\text{MSD}) > 80.43 \text{ mPa s}$ ist im Vergleich zur Viskosität von Wasser (1 mPa s) um fast zwei Größenordnungen erhöht. Dies beweist, dass dissipative Prozesse innerhalb der Hyaluronsäureschicht die Bewegung der angehefteten Kugel dominieren.

Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen lateraler, thermisch getriebener Kugelfluktuationen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Durch Potential- und MSD-Auswertungen können lokale viskoelastische Eigenschaften des festkörpergestützten, kugelmarkierten Hyaluronsäurefilms ermittelt werden. Auffällig ist, dass die viskoelastischen Eigenschaften an unterschiedlichen Stellen der Probe sehr ähnlich sind. Für die angesprochenen, weitergehenden Zellexperimente vereinfacht dies die Durchführung wesentlich, da von einem biokompatiblen Substrat mit lokal identischen mechanischen Eigenschaften ausgegangen werden kann. Aufgrund des Vergleichs der Größenordnungen der ermittelten Viskosität und Elastizität des Hyaluronsäurefilms, ist zu erwarten, dass lokal applizierte Spannungen, durch Auslenkung der Kugeln aufgrund äußerer Kräfte, eher elastisch gespeichert, als durch dissipative Prozesse abgebaut werden (vgl. Kap. 6.3).

6.3 Lokale Deformation dünner Schichten mittels MT-Methode

Nach Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften festkörpergestützter Hyaluronsäurefilme wird im folgenden Kapitel gezeigt, dass sich mit der MT-Methode lokal laterale Kräfte auf dieses System applizieren lassen. Diese spezielle, neuartige Anwendung des ‚High Force‘-Aufbaus macht folgende alternative Methode der Kraft-Kalibration der auf die Magnetkugeln wirkenden Kräfte erforderlich: Durch Analyse thermisch getriebener Kugelbewegungen auf der Basis der Brownschen Bewegung in einem Potential werden lokal die Elastizitäten des Polyelektrolytfilms ermittelt. Diese Ergebnisse werden genutzt, um aus der mittleren Auslenkung der Kugel die lokal, wirkende Magnetkraft zu bestimmen.

6.3.1 Durchführung

Die Aufnahme der lateralen Bewegung der auf den Hyaluronsäurefilmen verankerten, goldbeschichteten Magnetkugeln erfolgte analog Kap. 6.2.1 mit dem konfokalen Mikroskop im Reflexionsmodus bei ca. $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Raumtemperatur (Wellenlänge: 647 nm , Aufnahme-frequenz: $30 \text{ Bilder/Sekunde}$, Beobachtungsdauer: bis 2 min). Die Magnetkraft wurde in

Form eines Rechteckpulses auf die Kugeln appliziert (Stromstärke: 2.5 A, Frequenz: 200 mHz). Auch die quantitative Auswertung der Kugelbewegung wurde analog Kap. 6.2.1 realisiert. Abbildung 6-9 zeigt schematisch eine Darstellung des Messablaufs (vgl. Abbildung 6-9a) und ein typisches Beispiel der gemessenen Kugelbewegung in Richtung des Polschuhs des Magneten (vgl. Abbildung 6-9b).

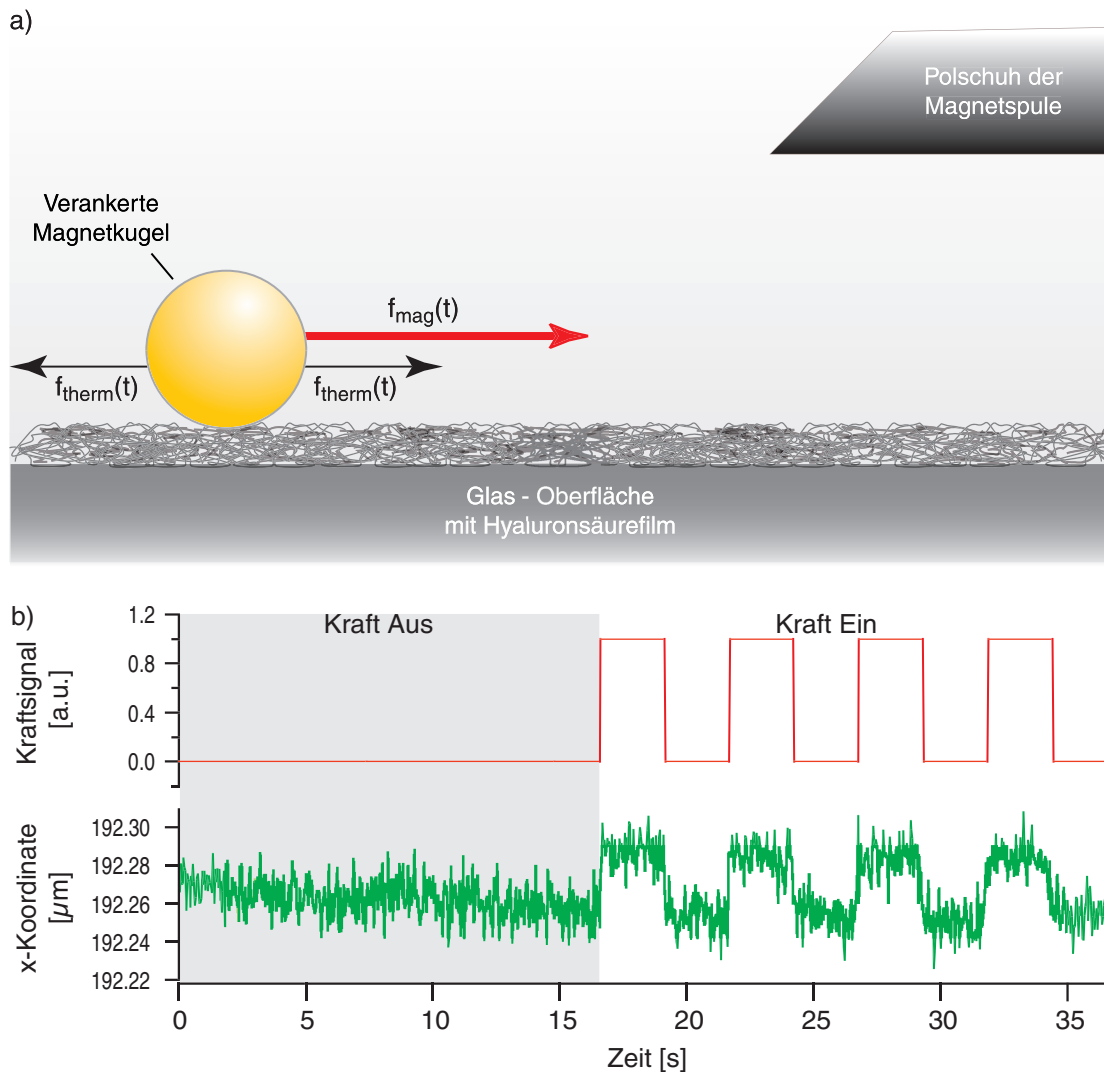


Abbildung 6-9: Schematische Darstellung des Messablaufs. a) Die auf dem Hyaluronsäurefilm verankerte Kugel bewegt sich aufgrund äußerer, stochastisch fluktuierender Kräfte $f_{therm}(t)$ des thermischen Rauschens und zusätzlich wirkender Magnetkräfte $f_{mag}(t)$ parallel zur Substratoberfläche. Der Abstand von Polschuh und Substrat ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. b) Beispiel für der Bewegung der Magnetkugel in Richtung des Polschuhs der Magneten $x(t)$. Ohne Magnetkraft $f_{mag}(t)$ werden ausschließlich thermisch getriebenen Fluktuationen gemessen. Bei eingeschalteter Magnetkraft $f_{mag}(t)$ überlagern die Kugelfluktuationen die Verschiebung der Kugel aufgrund der wirkenden Magnetkraft. Dies erschwert die Analyse, da sich thermisch getriebene und von der Magnetkraft verursachte Auslenkungen nicht eindeutig trennen lassen. Ausschnitt von 36 sec eines längeren Experiments (Beobachtungsdauer: 1 min, Aufnahmefrequenz: 30 Bilder/Sekunde).

6.3.2 Kraft-Kalibration – Nutzung thermisch getriebener Fluktuationen

Wie in Abbildung 6-9a angedeutet, befinden sich magnetische Kante des Spulenkerns und Magnetkugeln nicht auf gleicher Höhe (Unterschied ca. $500 \mu\text{m}$), d.h. eine Kraft-Kalibration nach der in Kap. 3.5.3 vorgestellten Methode ist für dieses System nicht realisierbar.

Die Bewegung der Magnetkugeln im Wechselwirkungspotential des Substrats unter Wirkung äußerer, stochastisch fluktuierender Kräfte des thermischen Rauschens und einer äußeren, gerichteten Magnetkraft wird in Richtung der Magnetkraft (entlang x -Achse) durch folgende Langevin-Gleichung beschrieben:

$$m \frac{\partial^2 x}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial x}{\partial t} + \frac{\partial V(x)}{\partial x} = f_{therm}(t) + f_{mag}(t) \quad \text{Gleichung 6-8}$$

Diese Gleichung folgt aus Gleichung 6-1 durch Hinzunahme einer zeitlich veränderlichen Magnetkraft $f_{mag}(t)$. Die Bewegung der Kugel $x(t) = x_{therm}(t) + x_{mag}(t)$ setzt sich zusammen aus thermisch getriebenen und von der Magnetkraft verursachten Positionsänderungen.

In Kap. 6.2.3 ist bereits eine vollständige Analyse der auf die Magnetkugel wirkenden, thermischen Kräfte $f_{therm}(t)$ erfolgt. Wie dort gezeigt wurde, ist die Kugelbewegung von viskoelastischen Eigenschaften des Hyaluronsäurefilms bestimmt, wobei dessen Elastizität dominiert. Der lokale Parameter V'' quantifiziert diese Elastizität im Sinne einer lokalen Federkonstanten k . Dagegen wurde rein viskoses Fließen der Kugeln nicht beobachtet. Wenn sich also zeigen lässt, dass trotz der zusätzlich wirkenden Magnetkraft $f_{mag}(t)$ keine Veränderung elastischer und viskoser Eigenschaften des Hyaluronsäurefilms nachweisbar ist, kann die lokale Kraft-Kalibration der auf eine Magnetkugel wirkenden Kraft $f_{mag}(t)$ nach folgendem Schema erfolgen:

- Bestimmung lokaler viskoelastischer Eigenschaften des Hyaluronsäurefilms durch Analyse rein thermisch getriebener Kugelfluktuationen $x_{therm}(t)$;
- Ermittlung der durch die Magnetkraft $f_{mag}(t)$ verursachten Kugelauslenkung $x_{mag}(t)$;
- Verwendung der viskoelastischen Parameter der Fluktuationsanalyse zur Kalibration der wirkenden Magnetkraft $f_{mag}(t)$.

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Kugelbewegung auch in diesen Experimenten elastisch dominiert ist, muss bewiesen werden: Bei wirkender Magnetkraft $f_{mag}(t)$ folgt die Kugelbewegung $x(t)$ dem Hookeschen Gesetz. Die Magnetkraft $f_{mag}(t)$ besitzt die Form eines Rechteckpulses, deshalb sollte die Kugelbewegung $x(t)$ ebenfalls als Rechteckpuls messbar sein. Wie Abbildung 6-9 zeigt, ist dieser Nachweis weder anhand des direkten Messsignals $x(t)$ noch anhand über mehrere Pulsperioden gemittelter Daten $\langle x(t) \rangle$ eindeutig zu führen. Für den Nachweis wurde auf die Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung MSD $\langle \Delta x(t)^2 \rangle$ zurückgegriffen. Die Berechnung der MSD $\langle \Delta x(t)^2 \rangle$ entspricht im Gegensatz zur einfachen Mittelung der Auswertung eines Faltungsintegrals des Messsignals, das zeitlich schwach korrelierte, thermische Fluktuationen signifikant unterdrückt zu Gunsten der stark korrelierten Auslenkungen der Kugel aufgrund der Magnetkraft. Berechnet man analytisch die MSD eines Rechteckpulses:

$$x(t) = \begin{cases} 0 & t < 0 \\ x_{\max} & \text{für } 0 \leq t \leq T, \\ 0 & t > T \end{cases} \quad \text{Gleichung 6-9}$$

mit Amplitude x_{\max} und Pulsdauer T , so erhält man den Zeitverlauf einer Dreiecksfunktion:

$$\langle \Delta x(t)^2 \rangle \propto \begin{cases} t & t \leq T/2 \\ -t & \text{für } T/2 < t < T. \\ 0 & t \geq T \end{cases} \quad \text{Gleichung 6-10}$$

Abbildung 6-10 demonstriert, dass diese triangulare Zeitabhängigkeit des MSD auch bei künstlich stark verrauschten Signalen gut reproduziert wird.

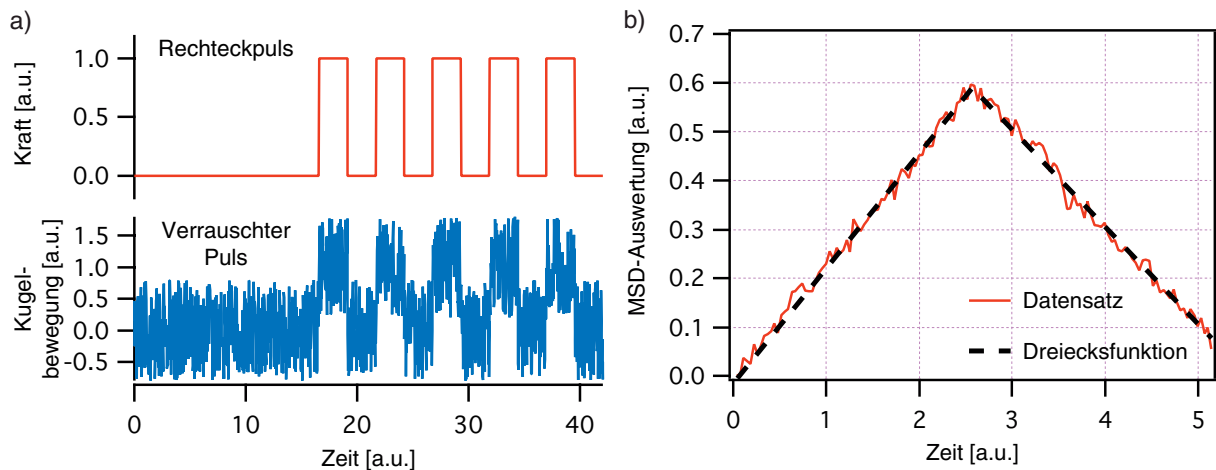


Abbildung 6-10: Mittlere quadratische Verschiebung MSD eines stark verrauschten Rechteckpulses. a) Der Rechteckpuls gibt den zeitlichen Verlauf der in Abbildung 6-9b angelegten Magnetkraft wieder. Durch Überlagerung mit künstlichen, thermischen Rauschen erhält man ein Signal, das in etwa der zu analysierenden Kugelbewegung aus Abbildung 6-9b entspricht. Die mittlere Amplitude des künstlichen Rauschens wurde größer als die des in den Messergebnissen erkennbaren Rauschens gewählt. Damit soll die Güte der MSD-Auswertung unterstrichen werden. b) Die aus dem stark verrauschten Datensatz berechneten MSD-Kurve produziert eindeutig die nach Gleichung 6-10 erwartete Dreiecksfunktion. Die Darstellung der MSD ist aus numerischen Gründen auf die erste Periode des MSD-Datensatzes beschränkt.

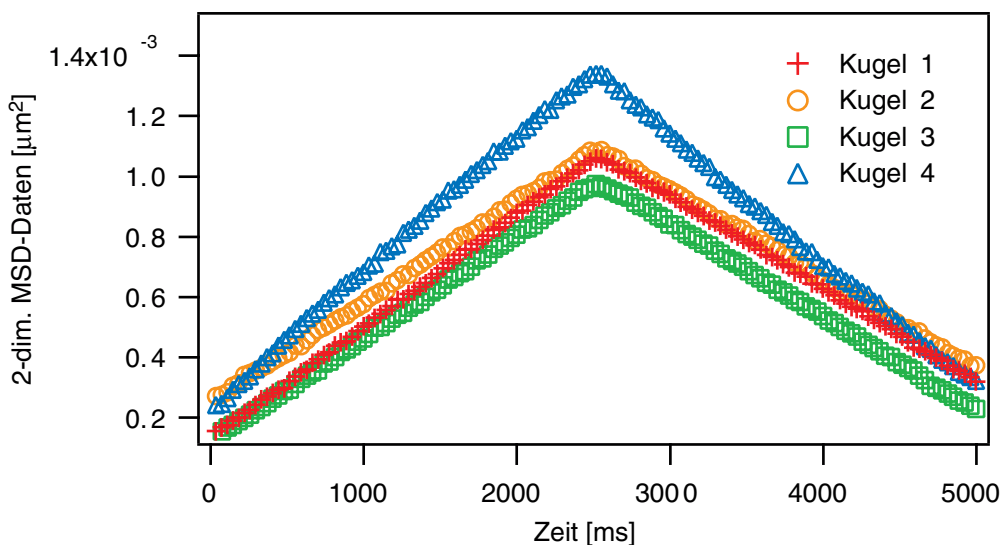


Abbildung 6-11: Mittlere quadratische Verschiebung MSD mehrerer Magnetkugeln, auf die ein rechteckförmige Magnetkraft appliziert wurde. Der signifikante Zeitverlauf in Form einer Dreiecksfunktion aller Kurven zeigt, dass das Antwortverhalten der Magnetkugeln elastisch dominiert ist. Zusätzlich wird die Pulsfrequenz $f = 200$ mHz der Magnetkraft-Sequenz vollständig reproduziert. Aus Gründen der numerischen Genauigkeit der Berechnung ist nur die erste Periode der MSD-Kurven gezeigt.

Abbildung 6-11 enthält die MSD-Auswertung mehrerer an unterschiedlichen Stellen der Probe vermessener Magnetkugeln. In keinem Fall lassen sich signifikante Abweichungen vom Zeitverlauf einer Dreiecksfunktion erkennen. Dies erlaubt im Rückschluss, dass die Elastizität des Hyaluronsäurefilms auch hier das Antwortverhalten $x(t) = x_{therm}(t) + x_{mag}(t)$ der Kugel dominiert.

Dem obigen Schema folgend kann man die thermische Bewegung $x_{therm}(t)$ verwenden, um die lokalen viskoelastischen Eigenschaften des Hyaluronsäurefilms zu ermitteln. Aus der gemessenen Kugelbewegung $x(t) = x_{therm}(t) + x_{mag}(t)$ wurde der Anteil $x_{therm}(t)$ absepariert, indem das Messsignal $x(t)$ mit einer festen Mittelungszeit $T = 5$ s gemittelt wurde, diese Mittelungszeit entspricht der Frequenz des Kraftsignals mit $f = 200$ mHz. Das resultierende Signal $\tilde{x}(t) = \langle x(t) \rangle_{t=5s}$ wurde von der Kugelbewegung abgezogen und man erhielt die thermische Bewegung $x_{therm} = x(t) - \tilde{x}(t)$. Abbildung 6-12a zeigt ein Beispiel dieser Prozedur zur Trennung thermisch getriebener und durch die Magnetkraft f_{mag} verursachter Bewegung. Anschließend konnte die lokale Elastizität V'' ermittelt werden durch Berechnung der MSD-Kurve für $x_{therm}(t)$ und Bestimmung des Sättigungswerts nach Kap. 6.2.

Die abschließende Eichung der jeweils wirkenden Magnetkraft f_{mag} erfolgte unter Anwendung des Hookeschen Gesetzes auf die aus mehreren Kraftpulsen gemittelten, maximalen Verschiebung x_{max} (vgl. Abbildung 6-12b):

$$f_{mag} = V'' \cdot x_{max} \quad \text{Gleichung 6-11}$$

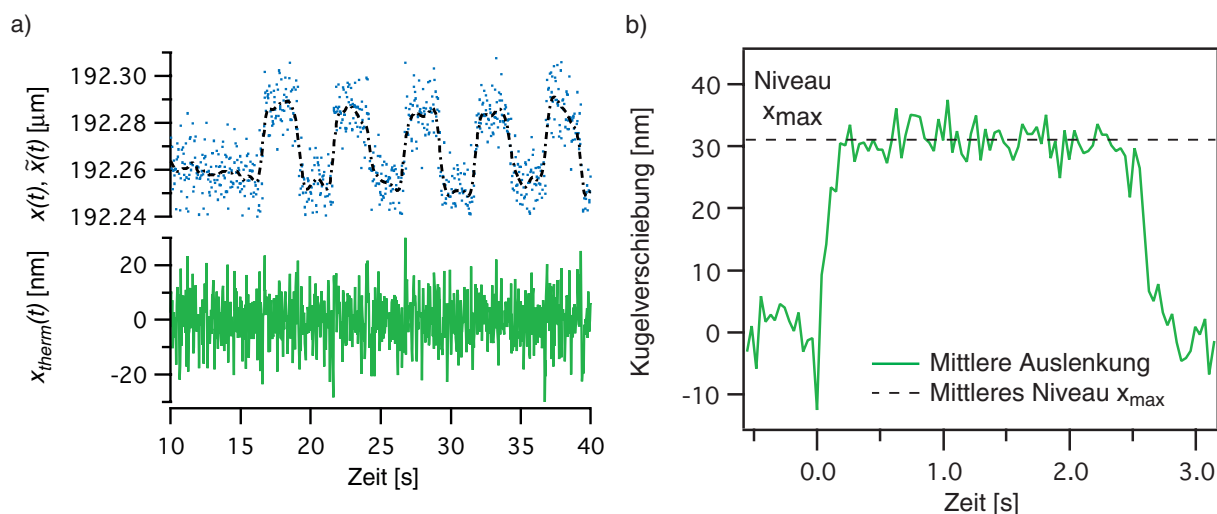


Abbildung 6-12: Berechnung der thermischen Fluktuationen $x_{therm}(t)$ und der mittleren durch die Magnetkraft $f_{mag}(t)$ induzierten Verschiebung $\langle x_{mag}(t) \rangle$ der Magnetkugel aus Abbildung 6-9. a) Extraktion thermisch getriebener Fluktuationen $x_{therm}(t)$ aus der gemessenen Kugelbewegung $x(t)$. Dargestellt ist der ursprüngliche Datensatz $x(t)$ (Punkte, oben), das gemittelte Signal $\tilde{x}(t)$ (gestrichelte Linie, oben) und die abseparierten thermischen Kugelfluktuationen $x_{therm}(t)$ (durchgezogene Linie, unten).

b) Aus zehn Kraftpulsen des gesamten Datensatzes berechnete mittlere Auslenkung $\langle x_{mag}(t) \rangle$ der Kugel. Die mittlere maximale Verschiebung x_{max} lässt sich durch Anpassung einer Geraden (gebrochene Linie) bestimmen. Deutlich ist die Dauer des Kraftpulses von 2.5 s erkennbar.

6.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 6-13a enthält die Ergebnisse der MSD-Auswertung thermischer Kugelfluktuationen für mehrere Kugeln $\langle \Delta x_{therm}(t)^2 \rangle = \langle (x_{therm}(t) - x_{therm}(0))^2 \rangle$. Die analysierten Magnetkugeln befanden sich an unterschiedlichen Stellen der Probe. Deutlich ist das Sättigen der Kurven erkennbar. Für jede MSD-Kurve wurde die lokale Elastizität V'' anhand Gleichung 6-7 berechnet. Es ergaben sich Werte für V'' zwischen $1.6 \cdot 10^{-5}$ und $2.8 \cdot 10^{-5}$ N/m in guter Übereinstimmung mit den Daten aus Tabelle 6-1.

Um die auf die einzelnen Kugeln wirkenden Magnetkräfte f_{mag} zu bestimmen, wurde für jede Kugel die aus zehn Pulsen gemittelte Verschiebung berechnet (vgl. Abbildung 6-13b). Die Magnetkräfte selbst errechneten sich aus der maximalen Auslenkung x_{max} dieser Kurven und der lokal ermittelten Elastizität V'' nach Gleichung 6-11. Es ergaben sich Kräfte zwischen 0.46 und 0.97 pN.

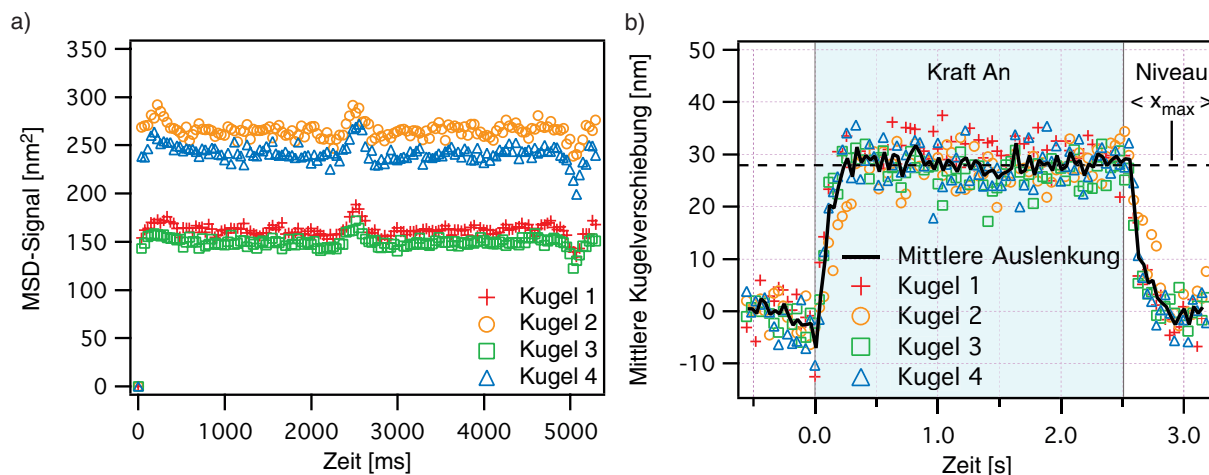


Abbildung 6-13: Ergebnisse der MSD-Auswertung der thermischen Fluktuationen $x_{therm}(t)$ und der mittleren Verschiebung $\langle x_{mag}(t) \rangle$ mehrerer Magnetkugeln, die sich an unterschiedlichen Stellen der Probe befanden. a) Die mittlere quadratische Verschiebung MSD in x-Richtung berechnet für die thermischen Fluktuationen $x_{therm}(t)$ unterschiedlicher Kugeln. Deutlich ist das Sättigungsverhalten erkennbar.

b) Die mittlere durch die Magnetkraft $f_{mag}(t)$ induzierte Verschiebung $\langle x_{mag}(t) \rangle$ mehrerer Kugeln. Die einzelnen Datensätze $\langle x_{mag}(t) \rangle$ wurden durch Mittelung der Daten von 10 Pulsen pro Kugel errechnet. Die durchgezogene Linie markiert die aus allen Kugeldaten errechnete mittlere Auslenkung. Die gestrichelte Linie markiert die gemeinsame, mittlere Auslenkung $\langle x_{\max} \rangle$ aller Kugeln.

Bei qualitativer Bewertung des Ergebnisses fällt auf, dass, obwohl die unterschiedlichen Magnetkugeln völlig unterschiedliche Entfernungen zur Polschuhkante des MT-Aufbaus besaßen (zwischen 78 und 152 μm), im Gegensatz zur Situation in Kap. 3.5.3 keine starke Abstandsabhängigkeit der Magnetkräfte erkennbar ist. Dies wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass das Magnetfeld im Fernfeld einen weit weniger stark ortsabhängigen Feldgradienten, zu dem die Magnetkräfte proportional sind (vgl. Kap. 3.5.2), besitzt als in Nähe der Polschuhkante. Alle Kugeln dieser Messreihe besitzen große Abstände zur Polschuhkante. Der Absolutwert des Gradienten ist bei diesen großen Abständen klein, weshalb auf die verwendeten ferromagnetischen Kugeln trotz ihres höheren magnetischen Moments nur Kräfte in der Größenordnung 0.75 pN appliziert werden können.

Neben den lokal bestimmbaren viskoelastischen Eigenschaften interessiert, ob mit diesen Messungen das Schermodul des vollständig hydratisierten Hyaluronsäurefilms bestimmt werden kann. Leider ist dies derzeit nicht möglich, da für derartige Auswertungen dieser Scherexperimente nach neueren theoretischen Überlegungen (Bausch et al., 1999; Boulbitch, 1999) neben der bestimmten Verschiebung der Magnetkugel zusätzlich die charakteristische Abklinglänge des im Polyelektrolytfilm induzierten zweidimensionalen Spannungsfelds bekannt sein muss. Zwar wurde versucht, durch Auswertung von Kreuz-

korrelationen der Kugelbewegung unterschiedlich voneinander entfernter Kugeln, die Abklinglänge zu ermitteln, aber es zeigte sich nur, dass diese kleiner ist als $1\ \mu\text{m}$.

Zusammenfassend lässt sich über diese Experimente folgendes bemerken: Mit dem derzeitigen MT-Aufbau lassen sich Polyelektrolytfilme lokal deformieren. Die Kalibrierung der auf die Magnetkugeln wirkenden Kräfte durch Analyse rein thermisch getriebener Kugelbewegungen erfolgen. Die Kalibration erfolgt für jede Kugel individuell unter Verwendung lokal ermittelter, viskoelastischer Parameter.

Damit ist diese Kalibrationstechnik auch für Magnetkugeln geeignet, deren magnetisches Moment a priori nicht bekannt ist. Für zukünftige Untersuchungen können also auch andere bisher nicht verwendbare Kugelsorten eingesetzt werden. Die applizierten Kräfte sind in der untersuchten Ebene nahezu identisch und liegen in der Größenordnung von $0.75\ \text{pN}$. Die mit diesem MT-Aufbau applizierten Kräfte sind demnach für Experimente an lebenden Zellen, die Kräfte im Nanonewton-Bereich erfordern, nicht ausreichend. Eine Modifikation des MT-Aufbaus derart, dass, wie in Kap. 3.5.3 beschrieben, Magnetkugeln und Polschuhkante des Magneten in der gleichen Ebene liegen, ist aber leicht zu realisieren.

6.4 Zusammenfassung

Die Entwicklung der hier verwendeten neuartigen ferromagnetischen Goldkugeln in Kombination mit deren chemischen Kopplung an auf Festkörperoberflächen verankerten, vollständig hydratisierten Polyelektrolytschichten erlaubt es, kolloidale Sondentechnik auch für mikrorheologische Untersuchungen dieses Systems zu nutzen. Die verwendeten Magnetkugeln können aufgrund ihrer Eigenschaften (vgl. Kap. 3.1.2) sowohl für Untersuchungen rein thermisch getriebener, als auch durch äußere Magnetkräfte induzierter Bewegungen parallel zur Substratoberfläche verwendet werden. Allein durch Analyse thermisch getriebener Kugelfluktuationen können lokal die viskoelastischen Eigenschaften des Hyaluronsäurefilms bestimmt werden. Die magnetischen kolloidalen Sonden können so bereits zur Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften weicher Phasengrenzschichten eingesetzt werden. Erstaunlicherweise besitzt diese Polyelektrolytschicht lateral sehr homogene Eigenschaften und es stellt sich heraus, dass die Wechselwirkung der Kugel mit der Polyelektrolytschicht dominiert wird von deren Elastizität. Bei Experimenten unter Verwendung der MT-Methode können diese Ergebnisse benutzt werden, um individuell

für jede Kugel eine konzeptionell völlig neuartige Kraft-Kalibration durchzuführen, mit der die MT-Technik auch für unterschiedlichste neue Anwendungsgebiete eingesetzt werden kann. Zur Bestimmung des Schermoduls für dieses Systems sind neben den hier präsentierten Analysen weitergehende Untersuchungen des lokal induzierten zweidimensionalen Scherfeldes notwendig, die evtl. den Einsatz anderer Messtechniken erforderlich machen. Durch Veränderungen des MT-Aufbaus könnten wesentlich höhere Magnetkräfte (im Nanonewton-Bereich) erzeugt werden. Dadurch können diese kugelmarkierten festkörpergestützten Substrate zukünftig für mikrorheologische *in vivo* Untersuchungen der Kräfte zwischen Zellen und biokompatiblen Oberflächen genutzt werden.

7 Ausblick

Mit Einführung der kolloidalen Sondentechnik zur Erforschung verschlaufter Biopolymer-netzwerke ist das Potential dieser Methode noch nicht ausgereizt. Alle hier vorgestellten Untersuchungen wurden ausschließlich unter Nutzung der Bewegung einzelner kolloidaler Sonden in den jeweils untersuchten Biopolymernetzwerken durchgeführt. Neben diesem Verfahren ist aber auch denkbar, mehrere Kugeln gleichzeitig auszuwerten. Damit könnten Messungen zu örtlichen Korrelationen der Sondenbewegung innerhalb des Systems realisiert werden. Wie in einer jüngsten Veröffentlichung (Crocker et al., 2000) bereits dargestellt ist, erlauben sog. *Multi-Sonden-Experimente* weitere Einblicke in Wechselwirkungsmechanismen auf molekularer Ebene, die für die Viskoelastizität der Systeme bestimmend sind.

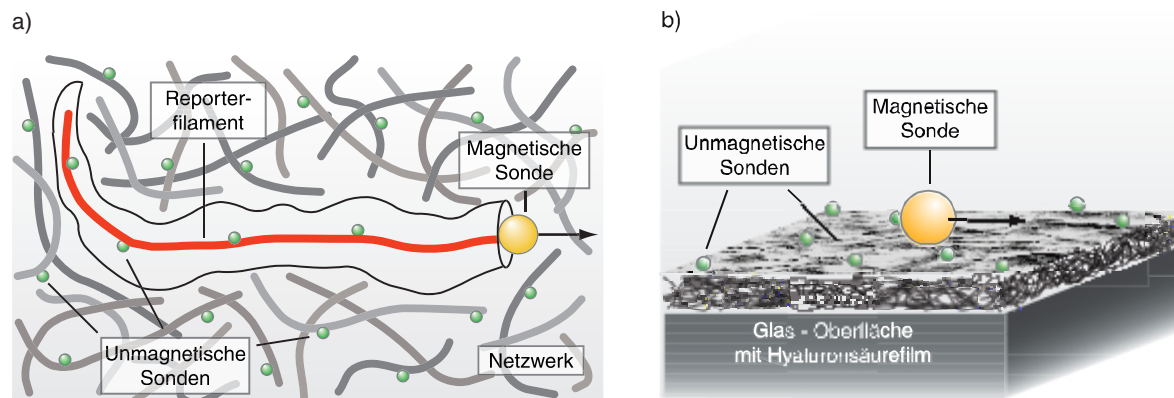


Abbildung 7-1: Schematische Darstellung zukünftig realisierbarer Multi-Sonden-Experimente mit unmagnetischen und magnetischen Sonden. a) Denkbare Szenario für Aktinnetzwerke. Durch Markierung des Reporterfilaments mit einer magnetischen und mehreren unmagnetischen Sonden wird die Wechselwirkung des Filaments mit seiner Netzwerkumgebung während eines Kraftpulses experimentell zugänglich. Die Analyse der lokalen Konformation des Filaments ermöglicht zusätzlich Abhängigkeiten des Antwortverhaltens von der individuellen Orientierung und lokalen Krümmung aufzuklären. Durch weitere unmagnetische Sonden in der Umgebung des Reporterfilaments lässt sich untersuchen, inwieweit sich die durch Auslenkung des Reporterfilaments induzierte Störung in das Netzwerk fortpflanzen.

b) Denkbare Szenario für Hyaluronsäurefilme. Durch Markierung des Films mit unmagnetischen und magnetischen Partikeln werden Untersuchungen des Deformationsfeld in MT-Experimenten innerhalb der Hyaluronsäureschicht möglich. Das während eines Kraftpulses durch die Bewegung der magnetischen Sonden induzierte Scherfeld wird durch die Beobachtung der Auslenkung der unmagnetischen Sonden messbar, wodurch genauere Angaben zur Viskoelastizität des Systems, insbesondere zum Schermodul, ermöglicht werden.

In Abbildung 7-1 sind mögliche Szenarien für zukünftige Multi-Sonden-Experimente der in dieser Arbeit untersuchten Aktinnetzwerke und Hyaluronsäurefilme dargestellt.

In Aktinnetzwerken ermöglicht die Markierung einzelner Reporterfilamente mit mehreren unmagnetischen und magnetischen Partikeln die Untersuchung der Wechselwirkung des Filaments mit seiner Netzwerkumgebung während eines Kraftpulses aber auch im nur rein thermisch angeregten Zustand (vgl. Abbildung 7-1a). Durch Messung der rein thermisch getriebenen korrelierten Bewegung unmagnetischer Partikel, die entlang der Kontur des Filaments angekoppelt sind, kann die Fluktuation des End-zu-End-Abstands semiflexibler Polymere innerhalb verschlaufter Netzwerke bestimmt werden. Die gleichzeitige Analyse des Antwortverhaltens der magnetischen und unmagnetischen Sonden während eines Kraftpulses ermöglicht Untersuchungen der Fortpflanzung der mechanischen Störung entlang der Kontur des Reporterfilaments. Dadurch kann beurteilt werden inwieweit Wechselwirkungen des Netzwerks mit dem Reporterfilament oder intrinsische Filamenteigenschaften das Antwortverhalten bestimmen. Insbesondere durch Analyse der Kontur des Filaments vor, während und nach dem Kraftpuls sind Studien denkbar, die klären können, inwieweit die Filamentkonformation (Orientierung, lokale Krümmung) das Antwortverhalten bestimmt. Die Markierung des umgebenden Netzwerks mit unmagnetischen Kugeln eröffnet zudem die Möglichkeit, während eines „Enforced Reptation“-Experiments die mechanische Störung innerhalb des Netzwerks direkt zu bestimmen.

An festkörpergestützten Hyaluronsäureschichten können Multi-Sonden-Experimente helfen, Wechselwirkungsmechanismen auf lokaler Ebene genauer aufzuklären (vgl. Abbildung 7-1b). Durch Markierung des Films mit unmagnetischen und magnetischen Partikeln werden Untersuchungen zum Deformationsfeld innerhalb der Hyaluronsäureschicht möglich, das in MT-Untersuchungen während einem Kraftpuls induziert wird. Das während des Kraftpulses durch die Bewegung der magnetischen Sonde induzierte Scherfeld kann durch gleichzeitige Analyse der Auslenkung der unmagnetischen Sonden direkt abgebildet werden. Solche Messungen sind notwendig, um elastische Module der Polymerfilme zu messen.

Multi-Sonden-Experimente an Aktinnetzwerken und Hyaluronsäurefilmen eröffnen eine Fülle neuer experimenteller Ansätze, um die Wechselwirkungsmechanismen innerhalb von Biopolymersystemen genauer zu untersuchen. Zukünftig lassen sich möglicherweise Beziehungen zwischen makroskopischen rheologischen Eigenschaften und mikroskopischer Dynamik und elastischen Eigenschaften etablieren.

V Verwendete Abkürzungen

BSA	bovine serum albumin
CLSM	confocal laser scanning microscope
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DWS	diffusing wave spectroscopy
EM	Elektronenmikroskopie
FESEM	field-emission scanning electron microscope
MSD	mean square displacement
MT	magnetic tweezers
OT	optical tweezers
PSF	point spread function
SPT	single particle tracking
WLC	wormlike chain

VI Literaturverzeichnis

1. Abdelghani-Jacquín, C. (2001): Nano-Scale Functionalization of Colloidal Probes and Surfaces and Application in Cell Biophysics. Doktorarbeit, Technische Universität München.
2. Abdelghani-Jacquín, C., M. Dichtl, L. Jakobsmeier, W. Hiller und E. Sackmann (2001): Gold Plating and Biofunctionalization of Ferromagnetic Magnetic Tweezers: Application for Local Studies of Soft Surface-Grafted Polymer Films. *Langmuir* **17**: 2129-2136.
3. Albersdörfer, A. (1999): Über das Quellverhalten und die viskoelastischen Eigenschaften ultradünner, festkörpergestützter Polyelektrolytfilme - Eine Untersuchung mittels Ellipsometrie und kolloidaler Sondentechnik. Doktorarbeit, Technische Universität München.
4. Amblard, F., A. C. Maggs, B. Yurke, A. N. Pargellis und S. Leibler (1996): Subdiffusion and Anomalous Local Viscoelasticity in Actin Networks. *Phys. Rev. Lett.* **77**: 4470-4473.
5. Ashkin, A. (1997): Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 4853-4860.
6. Ashkin, A., J. M. Dziedzic, E. Bjorkholm und S. Chu (1986): Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. *Opt. Lett.* **11**: 288-290.
7. Atkins, E. D. T., D. Meader und J. E. Scott (1980): Model for hyaluronic acid incorporating four intramolecular hydrogen bonds. *Int. J. Biol. Macromol.* **2**: 318-319.
8. Bausch, A. (1999): Mikromechanische Untersuchung des Zytoplasmas, der Zellmembran und der Adhäsion mittels Magnetischer Pinzetten. Doktorarbeit, Technische Universität München.
9. Bausch, A. R., W. Möller und E. Sackmann (1999): Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys. J.* **76**: 573-579.
10. Bausch, A. R., F. Ziemann, A. A. Boulbitch, K. Jacobson und E. Sackmann (1998): Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophys. J.* **75**: 2038-2049.
11. Bell Laboratories und L. Technologies (1999): Physical Sciences - Colloids Breakthrough. WWW-Seite: <http://www.bell-labs.com/org>
12. Beyer, D., T. M. Bohanon, G. Elender, W. Knoll, H. Ringsdorf und E. Sackmann (1996): Surface modification via reactive polymer interlayers. *Langmuir* **12**: 2514 - 2518.

13. Boulbitch, A. A. (1999): Strain of a biomembrane caused by a local tangential force: Application to magnetic tweezer measurements. *Phys. Rev. E* **59**: 3402-3407.
14. Bretscher, A. (1991): Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**: 337-374.
15. Bullitt, E. S. A., D. J. DeRosier, L. M. Coluccio und L. G. Tilney (1988): Three-dimensional Reconstruction of an Actin Bundle. *J. Cell Biol.* **107**: 597-611.
16. Burlatsky, S. F. und J. M. Deutch (1995): Solid friction in gel electrophoresis. *J. Chem. Phys.* **103**: 8216-8227.
17. Cleland, R. L. (1970): Ionic polysaccharides. IV. Free-rotation dimensions for disaccharide polymers. Comparison with experiment for hyaluronic acid. *Biopolymers* **9**: 811-824.
18. Cleland, R. L. (1977): The persistence length of hyaluronic acid: An estimate from small angle x-ray scattering and intrinsic viscosity. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**: 57-68.
19. Cleland, R. L. (1984): Viscometry and Sedimentation Equilibrium of Partially Hydrolyzed Hyaluronate: Comparison with Theoretical Models of Wormlike Chains. *Biopolymers* **23**: 647-666.
20. Comper, W. D. und T. C. Laurent (1978): Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* **58**: 255-315.
21. Crocker, J. C., M. T. Valentine, E. R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh und D. A. Weitz (2000): Two-Point Microrheology of Inhomogeneous Soft Materials. *Phys. Rev. Lett.* **85**: 888-891.
22. de Gennes, P. G. (1979): Scaling Concepts in Polymer Physics. Cornell University Press, Ithaca and London.
23. de Gennes, P. G., P. Pincus, R. M. Velasco und F. Brochard (1976): Remarks on polyelectrolyte conformation. *J. Physiol.* **37**: .
24. Dichtl, M. (1997): Anwendung kolloidaler Sonden zur Untersuchung der Reptation von Aktinfilamenten. Diplomarbeit, Technische Universität München.
25. Doi, M. und S. F. Edwards (1986): The Theory of Polymer Dynamics. Clarendon Press, Oxford.
26. Elender, G., M. Kühner und E. Sackmann (1996): Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers. *Biosensors and Bioelectronics* **11**: 565-577.
27. Everaers, R., F. Jülicher, A. Ajdari und A. C. Maggs (1999): Dynamic Fluctuations of Semiflexible Filaments. *Phys. Rev. Lett.* **82**: 3717-3720.
28. Felgner, H., R. Frank und M. Schliwa (1996): Flexural Rigidity of Microtubules Measured with the Use of Optical Tweezers. *J. Cell. Sci.* **19**: 509-516.
29. Feneberg, W., M. Westphal und E. Sackmann (2001): Dictyostelium Cells Cytoplasm as Active Visoplastic Body. *Eur. Biophys. J.*: DOI 10.1007/s002490100135.
30. Ferry, J. D. (1980): Viscoelastic Properties of Polymers. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

31. Fouissac, E., M. Milas, M. Rinaudo und R. Borsali (1992): Influences of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate. *Macromol.* **25**: 5613-5617.
32. Furusawa, K., W. Norde und J. Lyklema (1972): A method for preparing surfactant-free polystyrene latices of high surface charge. *Kolloid Z. u Z. Polymere* **250**: 908.
33. Geerts, H., M. De Brabander, R. Nuydens, S. Geuens, M. Moeremans, J. De Mey und P. Hollenback (1987): Nanovid tracking: a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy. *Biophys. J.* **52**: 775-785.
34. Gelles, J., B. J. Schnapp und M. P. Sheetz (1988): Tracking kinesin-driven movements with nanometer-scale precision. *Nature* **331**: 450-453.
35. Gisler, T. und D. A. Weitz (1999): Scaling of the Microrheology of Semidilute F-Actin Solutions. *Phys. Rev. Lett.* **82**: 1606-1609.
36. Gittes, F. und F. C. MacKintosh (1998): Dynamic shear modulus of a semiflexible polymer network. *Phys. Rev. E* **58**: R1241.
37. Gittes, F., B. Mickey, N. J. und J. Howard (1993): Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* **120**: 923-934.
38. Gittes, F., B. Schnurr, P. D. Olmsted, F. C. MacKintosh und C. F. Schmidt (1997): Microscopic Viscoelasticity: Shear Moduli of Soft Materials Determined from Thermal Fluctuations. *Phys. Rev. Lett.* **79**: 3286-3289.
39. Glasser, W. und H. Hatakeyama (1992): Viscoelasticity of Biomaterials. Oxford University Press, New York.
40. Granek, R. (1997): From Semi-Flexible Polymers to Membranes: Anomalous Diffusion and Reptation. *J. Phys. II France* **7**: 1761-1788.
41. Hallett, F. R. und G. Laurence (1974): Quasi-elastic light scattering studies of hyaluronic acid solutions. *Biochim. and Biophys. Acta* **343**: 648-655.
42. Handley, D. A. und M. A. Hayat (1989): Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
43. Hartwig, J. H. (1992): An ultrastructural approach to understanding the cytoskeleton. *In: The Cytoskeleton. A Practical Approach.* Herausgegeben von K. L. Carraway und C. A. C. Carraway. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio. 23-46.
44. Hay, E. D. (1991): Cell Biology of Extracellular Matrix. Plenum Press, New York.
45. Hiemenz, P. C. (1986): Principles of Colloid and Surface Chemistry. Marcel Dekker, Inc., New York.
46. Hinner, B., M. Tempel, E. Sackmann, K. Kroy und E. Frey (1998): Entanglement, Elasticity, and Viscous Relaxation of Actin Solutions. *Phys. Rev. Lett.* **81**: 2614-2617.
47. Hunter, J. E. I., C. Seagraves und W. P. Reinhardt (1999): Frictional effects in the simulation of polymers pulled around smooth and corrugated posts. *J. Chem. Phys.* **110**: 6066-6078.

48. Huxley, A. F. (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**: 1356-1366.
49. Isambert, H. und A. C. Maggs (1996): Dynamics and Rheology of Actin Solutions. *Macromol.* **29**: 1036-1040.
50. Janmey, P. A. (1991): Mechanical Properties of Cytoskeletal Polymers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 4-11.
51. Jensenius, H. und G. Zocchi (1997): Measuring the Spring Constant of a Single Polymer Chain. *Phys. Rev. Lett.* **79**: 5030-5033.
52. Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai und K. C. Holmes (1990): Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**: 37-44.
53. Käs, J. (1993): Formfluktuationen und Reptation einzelner Aktin-Filamente in verdünnten und halbverdünnten Aktinlösungen. Doktorarbeit, Technische Universität München.
54. Käs, J., H. Strey und E. Sackmann (1994): Direct imaging of reptation for semiflexible actin filaments. *Nature* **368**: 226-229.
55. Käs, J., H. Strey, J. X. Tang, D. Finger, R. Ezzel, E. Sackmann und P. A. Janmey (1995): F-Actin, a Model Polymer for Semiflexible Chains in Dilute, Semidilute, and Liquid Crystalline Solutions. *Biophys. J.* **70**: 609-625.
56. Kratky, O. und G. Porod (1949): Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim.* **68**: 1106-1123.
57. Kroy, K. und E. Frey (1998): Viscoelasticity of Semiflexible Polymer Solutions. *submitted for publication*: .
58. Kroy, K.-D. R. (1998): Viskoelastizität von Lösungen halbsteifer Polymere. Doktorarbeit, Technische Universität München.
59. Landau, L. D. und E. M. Lifschitz (1966): Lehrbuch der Theoretischen Physik, Bd. VI: Hydrodynamik. Akademie-Verlag, Berlin.
60. Landau, L. D. und E. M. Lifschitz (1975): Lehrbuch der Theoretischen Physik, Bd. VII: Elastizitätstheorie. Akademie-Verlag, Berlin.
61. Laurent, T. C. (1970): Structure of hyaluronic acid. *In: Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*. Herausgegeben von E. A. Balazs. Academic Press, London. 703-732.
62. MacKintosh, F. C. (1998). Persönliche Mitteilung.
63. MacKintosh, F. C. und P. A. Janmey (1997): Actin Gels. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2**: 350-356.
64. Maggs, A. C. (1997): Two plateau moduli for actin gels. *Phys. Rev. E* **55**: 7396-7400.
65. Maggs, A. C. (1998): Micro-bead mechanics with actin filaments. *Phys. Rev. E* **57**: 2091-2094.
66. Mason, T. G., H. Gang und D. A. Weitz (1996): Rheology of complex fluids measured by dynamic light scattering. *J. Mol. Struct.* **383**: 81-90.

67. Mason, T. G., G. K., J. H. van Zanten, D. Wirtz und S. C. Kuo (1997): Particle Tracking Microrheology of Complex Fluids. *Phys. Rev. Lett.* **79**: 3282-3285.
68. Mason, T. G. und D. A. Weitz (1995): Optical Measurements of Frequency-Dependent Linear Viscoelastic Moduli of Complex Fluids. *Phys. Rev. Lett.* **74**: 1250-1253.
69. Meyer, K. (1958): Chemical structure of hyaluronic acid. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17**: 1075-1077.
70. Morse, D. C. (1998a): Viscoelasticity of Concentrated Isotropic Solutions of Semiflexible Polymers. 1. Model and Stress Tensor. *Macromol.* **31**: 7030-7043.
71. Morse, D. C. (1998b): Viscoelasticity of Concentrated Isotropic Solutions of Semiflexible Polymers. 2. Linear Response. *Macromol.* **31**: 7044-7067.
72. Morse, D. C. (2001): Tube diameter in tightly entangled solutions of semiflexible polymers. *Phys. Rev. E* **63**: 031502-1 - 031502-22.
73. Müller, O., H. E. Gaub, M. Bärmann und E. Sackmann (1991): Viscoelastic Moduli of Sterically and Chemically Cross-Linked Actin Networks in the Dilute to Semidilute Regime: Measurements by an Oscillating Disk Rheometer. *Macromol.* **24**: 3111-3120.
74. Nisato, G., P. Hebraud, J.-P. Munch und S. J. Candau (2000): Diffusing-wave-spectroscopy investigation of latex particle motion in polymer gels. *Phys. Rev. E* **61**: 2879-2887.
75. Noguchi, H. (2000): Dynamics of DNA electrophoresis in dilute and entangled polymer solutions. *J. Chem. Phys.* **112**: 9671-9678.
76. Noguchi, H. und M. Takasu (2001): Dynamics of DNA in entangled polymer solutions: An anisotropic friction model. *J. Chem. Phys.* **114**: 7260-7266.
77. Odijk, T. (1983): On the statistics and dynamics of confined or entangled stiff polymers. *Macromol.* **16**: 1340.
78. Ogston, A. G. und J. E. Stanier (1951): The dimensions of the particle of the hyaluronic acid complex in synovial fluid. *Biochem. J.* **49**: 585-590.
79. Okabe, S. und N. Hirokawa (1989): Incorporation and turnover of biotin-labeled actin microinjected into fibroblastic cells: an immunoelectron microscopic study. *J. Cell Biol.* **109**: 1581-1595.
80. Ottewill, R. H. und J. N. Shaw (1967): Studies on the preparation and characterization of monodisperse polystyrene latices. *Kolloid Z. u Z. Polymere* **215**: 161.
81. Pawley, J. (1990): Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York.
82. Peters, I. M., B. G. de Groot, J. M. Schins, C. G. Figdor und J. Greve (1998): Three dimensional single-particle tracking with nanometer resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **69**: .
83. Pine, D. J., D. A. Weitz, P. M. Chaikin und E. Herbolzheimer (1988): Diffusing-Wave Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **60**: 1134-1137.
84. Pluta, M. (1988): Advanced Light Microscopy, Vol. 1 Principles and Basic Properties. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.

85. Pollard, T. D. (1981): Cytoplasmic contractile proteins. *J. Cell Biol.* **91**: 156s-165s.
86. Pollard, T. D. (1986): Actin and Actin-Binding Proteins. A Critical Evaluation of Mechanisms and Functions. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 987-1035.
87. Prieve, D. C., S. G. Biko und N. A. Frey (1990): Brownian motion of a single microscopic sphere in a colloidal force field. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **90**: 209.
88. Qian, H. (2000): Single-particle tracking: Brownian dynamics of viscoelastic materials. *Biophys. J.* **79**: 137-143.
89. Qian, H. und E. L. Elson (1999): Quantitative study of polymer conformation and dynamics by single-particle tracking. *Biophys. J.* **76**: 1598-1605.
90. Qian, H., M. P. Sheetz und E. L. Elson (1991): Single-particle tracking: analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* **60**: 910-921.
91. Rädler, J. und E. Sackmann (1993): Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *J. Phys. II France* **3**: 727-748.
92. Rennie, A. R. (2000): Glossary of Colloid and Polymer Science. WWW-Seite: <http://www.ch.kcl.ac.uk/>
93. Reynolds, O. (1886): On the theory of lubrication and its application to Mr. Beauchamp Tower's experiments, including an experimental determination of the viscosity of olive oil. *Trans. R. Soc. London* **177**: 157.
94. Rinaudo, M., M. Milas, N. Jouon und R. Borsali (1993): On some original properties of dilute polyelectrolyte solutions at low salt content: sodium hyaluronate example. *Polymer* **34**: 3710-3715.
95. Ruddies, R., W. H. Goldmann, G. Isenberg und E. Sackmann (1993): The viscoelasticity of entangled actin networks: the influence of defects and modulation by talin and vinculin. *Eur. Biophys. J.* **22**: 309-321.
96. Sackmann, E. (1994): Intra- and Extracellular Macromolecular Networks: Physics and Biological Function. *Makromol. Chem. Phys.* **195**: 7-28.
97. Saxton, M. J. und K. Jacobsen (1997): Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**: 373-399.
98. Schilling, J. (1999): Entwicklung einer Echtzeit-Bildverarbeitungssoftware und digitaler Videoaufnahmetechnik zur quantitativen Mikrorheometrie von Aktin-Netzwerken. Diplomarbeit, Technische Universität München.
99. Schmidt, C. F., M. Bärman, I. G. und S. E. (1989): Chain Dynamics, Mesh Size and Diffusive Transport in Networks of Polymerized Actin. A Quasielastic Light Scattering and Microfluorescence Study. *Macromol.* **22**: 3638-3649.
100. Schmidt, F. (1999): Mikrorheologie von Netzwerken semiflexibler Biopolymere. Doktorarbeit, Technische Universität München.
101. Schmidt, F. G., B. Hinner und E. Sackmann (2000): Microrheometry underestimates the values of the viscoelastic moduli in measurements on F-actin solutions compared to macrorheometry. *Phys. Rev. E* **61**: 5646-5653.

102. Semenov, A. N. (1986): Dynamics of Concentrated Solutions of Rigid-Chain Polymers. I. Brownian Motion of Persistent Macromolecules in Isotropic Solution. *Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **82**: 317-329.
103. Semenov, A. N. (1987): Rheological properties of a nematic solution of semiflexible macromolecules. *Sov. Phys. JETP* **66**: 712-716.
104. Soda, K. (1973): Dynamics of stiff chains: I. equation of motion. *J. Phys. Soc. Jpn.* **35**: 866-870.
105. Steinmetz, M. O., D. Stoffler, A. Hoenger, A. Bremer und U. Aebi (1997): Actin: From Cell Biology to Atomic Detail. *J. Struct. Biol.* **119**: 295-320.
106. Straub, F. B. (1942): Actin. Doktorarbeit, Universität von Szeged.
107. Strey, H. (1993): Bestimmung elastischer Eigenschaften von Zellmembranen und Zytoskelett mittels Flickerspektroskopie. Doktorarbeit, Technische Universität München.
108. Tempel, M. (1996): Aktinbindende Proteine als Membran/Zytoskelett-Koppler und als Modulatoren der Viskoelastizität von Aktinnetzwerken. Doktorarbeit, Technische Universität München.
109. Tempel, M., G. Isenberg und E. Sackmann (1996): Temperatur-induced sol-gel transition and microgel formation in α -actinin cross-linked actin networks: A rheological study. *Phys. Rev. E* **54**: 1802-1810.
110. Terbojevich, M., A. Cosani, M. Paumbo und F. Pregolato (1986): Structural properties of hyaluronic acid in moderately concentrated solutions. *Carbohydr. Res.* **149**: 363-377.
111. Tschoegl, N. W. (1989): The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
112. Ugelstad, J., L. Kilaas, P. Stenstad, T. Ellingsen, J. Bjørgum, O. Aune, T. Nils Nilsen, R. Schmid und A. Berge (1991): Magnetic Separation Techniques Applied to Cellular and Molecular Biology. *In: Preparation and Application of Monosized Composite Polymer Particles*. Herausgegeben von J. T. Kemshead. Wordsmith's Conference Publications, Bristol, UK. 235-254.
113. Vandenberg, E. T., K. Bertilsson, K. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing und L. m. I. (1991): Structure of 3-aminopropyl triethoxysilane on silicon oxide. *J. Coll. Int. Sci.* **147**: 103-118.
114. Wegner, A. (1976): Head to Tail Polymerization of Actin. *J. Mol. Biol.* **108**: 139-150.
115. Weiss, G. H. und R. J. Rubin (1983): Random walks: theory and selected applications. *Adv. Chem. Phys.* **52**: 363-505.
116. Wiese, G. R. und T. W. Healy (1970): Effect of particle size on colloid stability. *Trans. Faraday Soc.* **66**: 490.
117. Wilchek, M. und E. A. Bayer (1990): Methods in Enzymology: Avidin-Biotin Technology. Academic Press, San Diego.

118. Wilhelm, J. und E. Frey (1999): Absolute Value of the Elastic Plateau Modulus of Semiflexible Polymer Solutions. *submitted for publication*: .
119. Xu, J., V. Viasnoff und D. Wirtz (1998): Compliance of Actin Filament Networks Measured by Particle Tracking Microrheology and Diffusing Wave Spectroscopy. *Rheol. Acta* **38**: 387-398.
120. Ziemann, F. (1997): Untersuchung der lokalen viskoelastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mit einem Magnetkugel-Mikrorheometer ("Magnetic Tweezers"). Doktorarbeit, Technische Universität München.
121. Ziemann, F., J. Rädler und E. Sackmann (1994): Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead microrheometer. *Biophys. J.* **66**: 2210-2216.

Veröffentlichungen aus dem Themenkreis der Dissertation

1. M. A. Dichtl und E. Sackmann (1999): Colloidal Probe Study of Short Time Local and Long Time Reptational Motion of Semiflexible Macromolecules in Entangled Networks. *New Journal of Physics* **1**: 18.1-18.11.

2. Abdelghani-Jacquin, C., M. Dichtl, L. Jakobsmeier, W. Hiller und E. Sackmann (2001): Gold Plating and Biofunctionalization of Ferromagnetic Magnetic Tweezers: Application for Local Studies of Soft Surface-Grafted Polymer Films. *Langmuir* **17**: 2129-2136.

(Teile der Veröffentlichung fanden Erwähnung in SCIENCE EDITORS' CHOICE, *Science* (2001) **292**: 171.)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marius Dichtl
Geburtstag	15.06.1970
Geburtsort	Simbach/Inn
Familienstand	ledig

Ausbildung

1976 bis 1980	Volksschule Kirchdorf/Inn
1980 bis 1989	Gymnasium Simbach/Inn
1989	Abitur
1989 bis 1990	Wehrdienst in Freyung und Pocking
1990 bis 1997	Studium der Physik an der Technische Universität München
1997	Diplom
1997 bis 2001	Promotion in experimenteller Biophysik an der Technischen Universität München