

Technische Universität München
Physik Department
Lehrstuhl für Biophysik E22

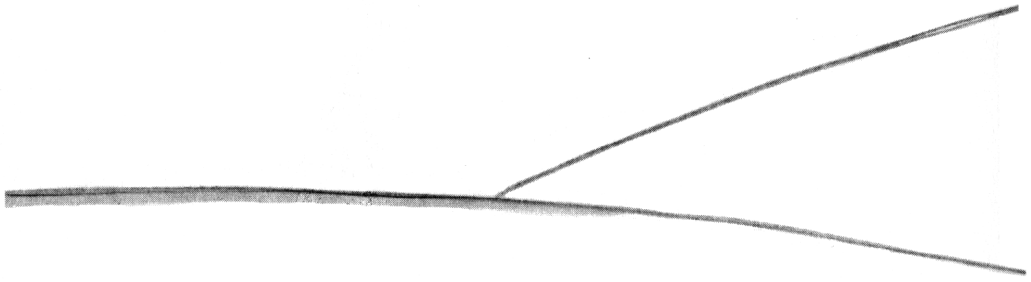
Messung mechanischer Eigenschaften von Biomolekülen und Biopolymeren

Andreas Schneider

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Friedrich
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schliwa,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 15.07.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 08.09.2003 angenommen.



Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Zytoskelett als Strukturmerkmal der Zelle	3
2.2	Molekulare Motoren	5
2.3	Messungen mechanischer Eigenschaften von Zytoskelett- Proteinen	6
2.4	Die optische Falle	8
2.5	Kraftmikroskopie	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Mikrotubuli	11
3.1.1	Aufreinigung von Tubulin	12
3.2	Axoneme	14
3.2.1	Kultivierung der Algen	15
3.2.2	Aufreinigung der Axoneme	15
3.3	Kinesin und Kinesinkonstrukte	17
3.3.1	Rekombinantes <i>Neurospora crassa</i> Vollängen Kinesin .	17
3.3.2	Verkürzte Kinesinkonstrukte	18
3.4	Chimäre Konstrukte aus Titin und Kinesin	19
3.5	Primer und Vektoren	20
3.5.1	Verwendete Vektoren	20
3.5.2	Primer	20
3.6	Klonierung der Konstrukte	21
3.7	Die optische Falle	24
3.7.1	Aufbau der Laser-Pinzette	24
3.8	Probenpräparation für die Laserfallen-Experimente	27

INHALTSVERZEICHNIS

3.9	Kraftmikroskopie	28
3.9.1	Aufbau und Arbeitsweise des Kraftmikroskopes	28
3.9.2	Das Kraftspektrometer	29
3.9.3	Kraft–Abstands–Kurven	31
4	Theoretische Grundlagen	34
4.1	Lichtkräfte in der optischen Falle	34
4.1.1	Qualitative Beschreibung der Lichtkräfte	34
4.1.2	Das Gauß'sche Bündel	35
4.1.3	Kraftwirkung im Rayleigh–Bereich	37
4.1.4	Kraftwirkung im Mie–Bereich	39
4.2	Charakterisierung des Meßparameters Biegesteifigkeit	40
4.2.1	Elastizitätstheorie zur Biegung von langen, dünnen Stäben	40
4.2.2	Biegung durch eine Punktkraft	43
4.2.3	Einfluß der hydrodynamischen Reibungskraft auf einen gebogenen Stab	44
4.3	Elastische Kräfte in Proteinen	46
4.3.1	Das „Worm–like chain“ Modell	46
4.3.2	Die superhelikale Struktur	49
5	Messung der Biegesteifigkeit von Mikrotubuli	52
5.1	Ergebnisse	52
5.1.1	Darstellung der Meßwerte	52
5.1.2	Kontrollmessungen an undekorierten Mikrotubuli	53
5.1.3	Biegesteifigkeitsmessungen mit Kinesin und Kinesin– Konstrukten	56
5.2	Diskussion	59
5.2.1	Gültigkeit der theoretischen Modelle	59

5.2.2	Vergleich mit anderen Gruppen	62
5.2.3	Einfluß des Kinesins auf die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli	65
6	Kraftmikroskopische Untersuchung des Kinesins	68
6.1	Motivation	68
6.2	Untersuchungen an Vollängen Kinesin	68
6.3	Untersuchungen an chimären Molekülen aus Kinesin und Titin	71
Anhang A: Verwendete Puffer und Medien		74
Anhang B: Makros für Igor PRO und NIH Image		77
Literatur		90
Abkürzungen		100
Danksagung		102
Lebenslauf		104

1 Zusammenfassung

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Bestimmung der Biegesteifigkeit von Mikrotubuli. Diese wurde in Gegenwart verschiedener Nukleotide oder Bindepartner mit Hilfe einer optischen Falle gemessen. Um dies unter standardisierten Bedingungen durchführen zu können, wurde eine Temperaturregelung am Mikroskop appliziert und eine Präparationsvorschrift erarbeitet, um mit Kinesin dekorierte Mikrotubuli für die Messungen in der optischen Falle zugänglich zu machen.

Gemessen wurden mit GTP polymerisierte Mikrotubuli in Gegenwart der Nukleotide GTP und AMP-PNP. Dabei ergab sich ein signifikanter Anstieg der Biegesteifigkeit. Mit GTP in der Meßlösung wurde ein Wert von $2,3 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$ gemessen. Durch die Zugabe von AMP-PNP wurden die Mikrotubuli um einen Faktor zwei bis drei steifer, und es ergab sich eine Biegesteifigkeit von $6,1 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$.

Für Dekorationsversuche (Versuche, bei denen Proteine an der Oberfläche der Mikrotubuli gebunden werden) wurde das konventionelle Kinesin des filamentösen Pilzes *Neurospora crassa* gewählt. Es handelt sich hier um ein Motormolekül, das Ladung entlang der Mikrotubuli transportiert. Um einen möglichen Einfluß der verschiedenen Kinesin-Domänen auf die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli bestimmen zu können wurden drei verschiedene bakteriell exprimierte Konstrukte eingesetzt. Neben dem dimeren Vollängen-Protein wurde ein stark verkürztes Konstrukt verwendet, das neben der katalytisch aktiven Einheit, die an den Mikrotubulus bindet, noch das Scharnier enthält, um eine Dimerisierung zu gewährleisten. Als drittes wurde ein Konstrukt gewählt, das nur aus der katalytischen Domäne besteht und dadurch monomer ist.

Für eine dichte Belegung der Mikrotubuli mit den Konstrukten wurden diese mit AMP-PNP *in rigor* gebunden. Bei einem Vergleich der Biegesteifigkeitswerte läßt sich kein statistisch relevanter Unterschied zu der Referenz ohne Dekoration feststellen. Zwischen den einzelnen Konstrukten sind jedoch deutliche Unterschiede in der Wirkung auf die Mikrotubuli festzustellen. So weist das kurze dimere Konstrukt die Tendenz auf, die Mikrotubuli weicher zu machen ($4,2 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$). Sowohl das monomere ($9,2 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$) als auch das Vollängen-Konstrukt ($11,6 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$) führen tendenziell zu einer Versteifung der Mikrotubuli.

Neben den Biegesteifigkeitsmessungen wurden Strukturuntersuchungen am Schwanzbereich des Kinesins durchgeführt. Die Zielsetzung bestand darin, die

1 ZUSAMMENFASSUNG

Stabilität und Länge von superhelikalen Sequenzabschnitten zu bestimmen. Als Instrument hierzu wurde ein Kraftspektrometer verwendet.

Neben dem Vollängenkinesin wurden einige Titin–Kinesin–Chimären vermessen, die speziell für diese Fragestellung kloniert wurden. Titin–Domänen waren kraftspektrometrisch gut erforscht und wurden wegen ihrer leichten Identifizierbarkeit in den Meßkurven gewählt. Auch wurde angestrebt, eine räumlich aufgelöste Messung der Stabilität von superhelikalen Strukturen zu erhalten. Dies war jedoch wegen eines starken Haftens des Kinesin Schwanzes auf der Unterlage nicht möglich.

Aus den Meßkurven ließen sich dennoch einige Aussagen machen. Es konnte eine Obergrenze für die Stabilität der superhelikalen Strukturen von 15 pN bestimmt werden. Zudem existiert ein Strukturelement, bestehend aus wenigen Aminosäuren, das bei einer Kraft von etwa 30 pN aufbricht.

2 Einleitung

2.1 Das Zytoskelett als Strukturmerkmal der Zelle

Im Jahr 1665 machte Robert Hooke mit einem einfachen Mikroskop eine wichtige Entdeckung. Er erkannte in dünnen Schnitten von Kork abgegrenzte Flächen, die er Zellen nannte. Die Erforschung der Zellen wurde jedoch erst im 19. Jahrhundert, als Mikroskope kommerziell erhältlich waren, vorangetrieben.

Lange Zeit wurde die Zelle als ein mit Protein und Organellen gefüllter Sack ohne eine innere strukturelle Ordnung betrachtet. Nur langsam setzte sich die Erkenntnis durch, daß das Zellinnere in einem hohen Maße strukturiert ist. In diesem Prozess wurden immer mehr Strukturen in den Zellen charakterisiert [102]. So wurde beispielsweise im Jahre 1833 von Brown der Zellkern entdeckt. 1857 beschrieb Kolliker Mitochondrien in Muskelzellen [62].

Einen weiteren wichtigen Schritt stellte die Entwicklung von Markierungsmethoden durch Histologen, wie Retzius und Cajal, dar, die sich im ausgehenden 19. Jahrhundert abspielte. Auf diese Weise wurde die Lokalisation von Objekten, die nicht direkt beobachtbar sind, ermöglicht [26].

Bis in das späte 19. Jahrhundert hinein verbesserte sich die Auflösung der Lichtmikroskope kontinuierlich [80]. Als jedoch die theoretische Auflösungsgrenze durch Mikroskope von Zeiss 1886 erreicht wurde, mußten neue Techniken für einen genaueren Einblick in die Zellen entwickelt werden. Die 30er Jahre des 20. Jahrhunderts brachten hier einen bedeutenden Fortschritt. Die Interferenz-Mikroskopie, entwickelt durch Lebedeff, und die Phasenkontrast-Mikroskopie, aufgebracht von Zernicke, ermöglichten eine detaillierte Beobachtung von unmarkierten lebenden Zellen [1].

Durch die Elektronenmikroskope, die seit 1939 kommerziell erhältlich sind, wurde die Auflösung von Strukturen in fixierten Präparaten stark verbessert. So klärte Fawcett 1954 die Struktur von Flagellen, haarförmigen Fortsätzen zur Fortbewegung bestimmter Zellen, auf, die einen Durchmesser von lediglich 200 nm haben (Siehe Abb. 2 auf S. 14). Auch die Anordnung von Proteinen im Inneren der Zellen konnte untersucht werden [27].

Aufgrund der hohen Ordnung, die gegen die Entropie innerhalb der Zelle aufrecht erhalten wird, muß es Mechanismen geben, die gerichtet Material durch die Zelle transportieren. Bevor allerdings auf diese Transportmechanismen eingegangen wird, soll zunächst einmal das Zytoplasma beschrieben werden, jene zähflüssige Masse, in die die Organellen eingebettet sind. Das

Zytoplasma füllt die gesamte Zelle aus. In ihm werden fast alle Proteine synthetisiert. Es ist ein Gemisch aus Wasser, Proteinen und Ionen. Durchzogen wird es vom Zytoskelett.

Dieses ist ein komplexes Netzwerk, das aus drei verschiedenen Gruppen von Filamenten und einer Vielzahl daran bindender Proteine besteht [19]. Die Filamentgruppen sind: Intermediärfilamente, Aktinfilamente und Mikrotubuli, geordnet nach ihrer Steifigkeit. Alle Filamente setzen sich aus einer jeweils typischen Anordnung identischer Untereinheiten zusammen. Die Intermediärfilamente beschreiben eine heterogene Gruppe von sehr flexiblen Filamenten aus Proteinen wie Vimentin, Desmin oder Lamin [16]. Der Durchmesser der wie ein Seil geformten Intermediärfilamente beträgt etwa 10 nm. Aktinfilamente sind wie eine zweisträngige Helix geformt und werden aus dem Protein Aktin aufgebaut [52]. Mikrotubuli bestehen aus Tubulin und bilden lange Hohlzylinder, die aus 11 bis 16 Protofilamenten zusammengesetzt sind. Tubulin ist ein Protein, das in verschiedenen Isoformen existiert. Zwei dieser Isoformen, α - und β -Tubulin, bilden ein Dimer, das den eigentlichen Grundbaustein der Mikrotubuli darstellt. Durch eine alternierende Anordnung von α - und β -Untereinheiten erhält das Filament eine Polarität. Dabei wird das Ende als Minusende bezeichnet, an dem die α -Untereinheiten sitzen. Das Ende, das die β -Untereinheiten exponiert, ist das Plusende [97]. Die Monomere haben ein Molekulargewicht von 55 kDa und eine Größe von etwa $4 \times 4 \times 4$ nm [14]. Der entstehende Mikrotubulus erreicht einen Aussendurchmesser von etwa 24 nm.

Entgegen der Vorstellung, die man mit dem Begriff Skelett verbindet, ist das Zytoskelett kein starres Gebilde sondern hochdynamisch. Das Zytoskelett bietet den Zellen sowohl Stabilität, als auch die Möglichkeit der Fortbewegung. Es ist somit dafür geschaffen, den jeweiligen Bedürfnissen der Zelle, seien sie durch äußere Einflüsse bedingt oder von zelleigenen Notwendigkeiten getrieben, zu dienen.

Eine Sorte von Intermediärfilamenten, das Lamin, bildet ein Netzwerk direkt unter der inneren Kernmembran, das Kernlamina genannt wird. Eine andere Sorte, das Keratin, verbindet Epithel-Zellen untereinander und nimmt dadurch Zugspannungen auf.

Aktin ist direkt unterhalb der Zellmembran im sogenannten Kortex am stärksten angereichert und bildet dort ein zweidimensionales Netzwerk, das der Zelle Stabilität verleiht. In Filopodien, Oberflächenausstülpungen, die unter anderem für die Fortbewegung wichtig sind, ist Aktin das mengenmäßig häufigste Protein. Auch das gesamte Zytoplasma ist von Aktinfilamenten durchzogen [52].

Mikrotubuli erfüllen vielfältige Aufgaben. In Zilien und Flagellen, die einer Reihe von Zellen zur Fortbewegung dienen, bilden sie das Grundgerüst [27, 37]. In Axonen von Nervenzellen befinden sie sich als Transportsystem, an dem Vesikel befördert werden können [41]. Auch im Zytoplasma eukaryontischer Zellen wird diese Aufgabe übernommen. Über die Wechselwirkung mit Mikrotubuli wird die Positionierung von Organellen bestimmt. Die Mikrotubuli wachsen von einem Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) aus. Auch bilden die Mikrotubuli Strukturen, die nur in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus auftreten, wie die mitotische Spindel [48].

2.2 Molekulare Motoren

Sowohl Aktinfilamente als auch Mikrotubuli weisen durch die asymmetrische Form der Untereinheiten eine polare Struktur auf. Diese erschließt eine weitere Aufgabe dieser beiden Filamentsysteme, nämlich die des Transportes von Zellbestandteilen mit Hilfe sogenannter Motormoleküle entlang dieser Filamente. Die Polarität wird von den molekularen Motoren als Grundlage für eine gerichtete Bewegung genutzt.

Alle diese Motormoleküle besitzen auf Grund ihrer Funktion ein gemeinsames funktionales Strukturelement. Dies ist die katalytische Domäne, oft auch als Kopf bezeichnet, die an das Filament bindet und durch ATP-Hydrolyse Energie bereitstellt. Selbst dieses verbindende Element unterscheidet sich deutlich zwischen den unterschiedlichen Motoren. Die Größe reicht von etwa 350 Aminosäuren bei den Kinesinen über 800 Aminosäuren bei den Myosinen bis hin zu etwa 4000 Aminosäuren beim Dynein.

Bisher sind drei Superfamilien zytoskelettaler Motoren bekannt, die sich über grundsätzliche Strukturmerkmale, Aufbau wichtiger Untereinheiten und verwendetes Filamentsystem definieren.

Dabei sind die Dyneine am besten konserviert. Sie lassen sich in die Gruppe der zytoplasmatischen [91] und der axonemalen [77] Dyneine unterteilen. Als Filamentsystem werden Mikrotubuli verwendet.

Phylogenetische Untersuchungen der beiden anderen Superfamilien von Motoren, der Kinesine und Myosine, haben ergeben, daß es mindestens 13 Klassen von Kinesinen [43], sowie mindestens 16 Klassen von Myosinen gibt [87]. Da immer noch neue Kinesine und Myosine entdeckt und charakterisiert werden, ist es sehr wahrscheinlich, daß jeweils zwanzig oder mehr Klassen existieren.

Auch wenn viele grundsätzliche Aspekte zwischen den Kinesinen und den Myosinen gleich sind, so gibt es doch motorspezifische Charakteristika, die diese Motoren unterscheiden. Ein grundsätzliches Charakteristikum ist das verwendete Filamentsystem. Während Myosine auf Aktinfilamenten laufen, benutzen Kinesine das Mikrotubuli-System [24]. Des Weiteren können die Kinesine aufgeteilt werden in solche, die in Richtung des schnell wachsenden (Plus-) Endes, sowie solche, die in Richtung des langsam wachsenden (Minus-)Endes wandern. Die Myosine bewegen sich nach bisherigen Erkenntnissen fast alle in Richtung des Plus-Endes der Aktinfilamente. Nur die Mitglieder der Myosin VI-Familie bewegen sich zum Minusende hin. Diese Unterschiede in der Bewegung könnten aus der Anordnung der Filamentsysteme in der Zelle resultieren. Während die Mikrotubuli großteils mit ihren Minus-Enden in einem Mikrotubuli Organisationszentrum verankert sind, durchziehen die Aktinfilamente die Zelle in einem ungeordneten Netzwerk.

Ein weiterer Unterschied ist der Domänen-Aufbau der Proteine. Im Myosin sitzt bis auf eine Ausnahme der Kopf am N-terminalen Ende [72], wohingegen er im Kinesin sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende gefunden werden kann. Einige Kinesine haben ihre katalytische oder Motordomäne sogar in der Mitte des Moleküls [43]. Als letztes soll noch eine Eigenheit der Schwanz-Regionen der Moleküle erwähnt werden. In Myosinen sind in diesem Bereich viele Homologien zu anderen Molekülen zu finden. Darunter befinden sich Plekstrin-Homologie (PH) Domänen, Talin-Homologie Domänen, *src*-Homologie 3 (SH3)-Domänen und viele mehr. Bei Kinesinen sind wesentlich weniger dieser zu anderen Proteinen homologen Domänen eingebunden.

2.3 Messungen mechanischer Eigenschaften von Zytoskelett-Proteinen

Das Zytoskelett stellt eine Besonderheit der eukaryontischen Zellen dar, von dem in Bakterienzellen nur proprietäre Vorläufer existieren [25]. Durch ihre vielfältigen Funktionen in eukaryontischen Zellen sind die Zytoskelett-Proteine ein zentraler und lebenswichtiger Bestandteil dieser Zellen. Ihre mechanischen Eigenschaften sind daher von großem Interesse.

Intermediärfilamente sind gewöhnlich seilförmig aufgebaut und besitzen eine hohe Belastbarkeit gegenüber mechanischen Zugbelastungen. Aus diesem Grund finden sich diese Filamente verstärkt dort, wo die Zellen hohen Belastungen ausgesetzt sind. So sind sie in großer Zahl in Muskelzellen zu finden. Auch in Epithelzellen haben sie wichtige Aufgaben. Dort verbinden die

Keratine sogar die Zellen untereinander. Zudem ist innerhalb der Kernmembran ein dichtes Geflecht von Lamin, die sogenannte Kernlamina zu finden. Die Persistenzlänge dieser relativ weichen Polymere liegt beispielsweise beim Desmin bei weniger als $1\ \mu\text{m}$ [46]. Die Messung der Persistenzlänge – und damit auch der Biegesteifigkeit – wurde hier mit quasi-elastischer Lichtstreuung durchgeführt. Die geringe Steifigkeit ist schon durch die Art der Belastung zu erklären, der sie standhalten müssen. Dies zeigt sich auch im Aufbau der Filamente. Das derzeitige Modell beschreibt die Intermediärfilamente als Fasern, die sich wie bei einem Hanfseil spiralförmig um eine Kernfaser legen. Somit wird die Resistenz gegen Zugbelastungen auf Kosten einer sehr schwachen lateralen Belastbarkeit erkaufte.

Aktinfilamente haben die Aufgabe, der Zelle eine Struktur zu geben. Sie müssen jedoch hochdynamisch sein, da sie einen wichtigen Beitrag zur Zellbewegung bei der Bildung von Pseudopodien leisten. Dabei treten sie nicht als Einzelfilamente auf, sondern sind sowohl mechanisch als auch chemisch durch quervernetzende Proteine zu einem Netzwerk zusammengeschlossen. Direkt unter der Plasmamembran befindet sich ein dichtes Netzwerk von Aktinfilamenten, das der Zelle Stabilität gibt. Eine weitere Aufgabe des Aktin ist die Beteiligung an der Zellteilung. In der Teilungsfurche bildet sich ein Ring aus Aktin, der mit Hilfe von Myosin immer weiter kontrahiert wird, bis sich die Tochterzellen trennen können [76]. Die wohl bekannteste Aufgabe ist die Muskelkontraktion. In Muskelzellen liegen eine Vielzahl von Aktinfilamenten parallel zueinander und ragen in die Zwischenräume der Myosinfilamente. Bei der Kontraktion des Muskels greifen die Myosinköpfe die Aktinfilamente, wodurch diese an den Myosinfilamenten entlanggleiten und dadurch den Muskel verkürzen.

Aufgrund der räumlichen Anordnung von Aktin in der Zelle wurde das Augenmerk zunächst auf die Eigenschaften von Aktinnetzwerken oder Aktin Gelen gelenkt [70]. Deren Eigenschaften lassen sich mit Rheologie am besten beschreiben. Beim Übergang zur Messung von Biegesteifigkeiten einzelner Filamente wurden fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente beobachtet und deren thermische Fluktuation ausgewertet [54]. Dabei ergibt sich eine Persistenzlänge von $18\ \mu\text{m}$. Dies ist deutlich höher als bei den Intermediärfilamenten. Somit kann das Aktinfilament auch einer Belastung durch Verbiegung standhalten.

Mikrotubuli stellen das steifste Filamentsystem des Zytoskeletts dar. Dabei ist ihre strukturelle Anordnung in der Zelle verschieden von den beiden

anderen bereits erwähnten Filamentsystemen. Sie sind nicht etwa zu einem ungeordneten Netzwerk verbunden, sondern wohl geordnet. Im allgemeinen findet sich ein MTOC, von dem aus die Mikrotubuli polymerisiert werden. Durch die geordnete Anordnung sind Mikrotubuli auch dazu prädestiniert, gerichteten Transport in der Zelle zu organisieren.

Eine weitere wichtige Aufgabe der Mikrotubuli ist, die Zellform zu stabilisieren. Durch die Nähe des Zentrosoms zum Zellkern ist es der Zelle möglich, die Lage des Zellkerns mit Hilfe der Mikrotubuli zu bestimmen und stabilisieren. Dies dient als Grundlage für die räumliche Anordnung des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums [73].

Aus diesen Gründen ist es notwendig, daß die Mikrotubuli sich einer hohen Biegekraft widersetzen können. In der Tat übersteigt die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli die anderer Zytoskelettfilamente bei weitem. In der Persistenzlänge schlägt sich das in einem besonders hohen Wert von 0,34 mm bis 9,8 mm, je nach Quelle, nieder [17, 23, 67].

2.4 Die optische Falle

Mikrotubuli haben den großen Vorteil gegenüber anderen Zytoskelettfilamenten, daß sie in einem Lichtmikroskop beobachtet werden können. Im Phasenkontrast können sie mit einer nachgeschalteten Kontrastverstärkung sichtbar gemacht werden und es bedarf keiner Fluoreszenzmarker oder anderer Hilfsmittel, die grundsätzlich einen Einfluß auf die Struktur des zu betrachtenden Proteins haben können.

Doch wie ist mit einem Mikroskop eine Meßapparatur denkbar, mit der man die Biegesteifigkeit von Mikrotubuli messen kann? Einige Ansätze nutzen die Energie, die durch die thermische Bewegung Kräfte auf den Mikrotubulus ausübt. Doch gibt es weitere Möglichkeiten, gezielt zu manipulieren?

Es ist möglich, einen Laserstrahl so zu lenken, daß er Kräfte auf bestimmte Objekte ausüben kann. Dazu muß ein geweiteter Laserstrahl durch eine geeignete Optik stark fokussiert werden. Nahe dem Fokuspunkt befindliche optisch hoch brechende, kugelförmige Objekte erfahren dann eine anziehende Kraft zum Fokuspunkt hin, wenn sie sich in niedrig brechenden Medien befinden [81]. Dieser Effekt ist mit geometrischer Optik leicht zu beschreiben. Befindet sich die Kugel unterhalb des Fokus, so bewirkt sie eine Einengung des gebrochenen Strahles und wird dadurch nach oben getrieben. Befindet sie sich seitlich vom Fokus, so lenkt sie den Strahl ab und erfährt eine Kraft in

Richtung des Fokuspunktes. Eine derart gestaltete Apperatur wird optische Falle oder Laserfalle genannt.

Für kugelförmige Objekte gibt es eine Vielzahl von Anwendungen der optischen Falle. So wurden Filamente zwischen Kugeln gespannt, oder Kräfte einzelner Motorproteine mit Hilfe von Kugeln gemessen. Es wurden aber auch gezielt Zellorganellen manipuliert [7, 57].

Der Mikrotubulus kann näherungsweise als Hohlzylinder betrachtet werden. Somit weist er in der Richtung senkrecht zu seiner Kontur ein kreisförmiges Profil auf. Durch dieses läßt sich mit einer rotationssymmetrischen Laserfalle orthogonal eine Kraft ausüben, während keine – oder nur sehr geringe – laterale Kräfte auftreten. Somit eignet sich eine optische Falle, Messungen zur Biegesteifigkeit von Mikrotubuli durchzuführen.

2.5 Kraftmikroskopie

Neben der Möglichkeit, Objekte mit Licht abzubilden, gibt es noch weitere Abbildungstechniken. Eine davon ist die Kraftmikroskopie. Sie wurde im Jahr 1986 in der Gruppe von Binnig entwickelt [11]. Oberflächen können mit dieser Technik lateral bis zu einer Auflösung von wenigen Nanometern und im Höhenprofil auf weniger als 1 Ångström (Å) abgebildet werden. Das Prinzip der Kraftmikroskopie besteht darin, die Kräfte zu messen, die von der Unterlage auf eine feine Abtastnadel ausgeübt werden. Um diese Technik zur Abbildung von Oberflächen zu nutzen, wird das Kraftprofil gerastert und daraus ein dreidimensionales Modell rekonstruiert.

Neben der Möglichkeit, dreidimensionale Kraftprofile aufzuzeichnen, kann auch nur in einer Dimension gearbeitet werden. Diese Methode wird auch als Kraftspektroskopie bezeichnet, da man ein Kraftspektrum entlang einer bestimmten Trajektorie aufnimmt. Hauptsächlich wird diese Technik verwendet, um die strukturellen Eigenschaften von DNA und Makromolekülen zu untersuchen [60, 105]. Ein an der Unterlage gebundenes Makromolekül wird dazu mit der Spitze des Kraftmikroskopes gegriffen und gedehnt. Dabei kann durch die Größe der benötigten Kraft und den Verlauf des Kraftprofils, gegen die Entfernung zwischen Spitze und Unterlage aufgetragen, auf bestimmte Eigenschaften des Moleküls geschlossen werden. So ist es möglich, Größe und Stabilität einzelner globulärer Domänen zu ermitteln. Auch die Kraft, die durch eine superhelikale Struktur aufgenommen wird, sowie die Länge der Struktur, kann bestimmt werden [84].

2 EINLEITUNG

In der hier vorliegenden Arbeit zur Aufklärung der Struktur von Biomolekülen wurde die Methode der Kraftspektroskopie angewendet. Dabei wurde der Versuch unternommen, die Struktur des Schwanzbereiches von Kinesin zu bestimmen, da bisher keine direkten Messungen an diesem Bereich des Kinesins möglich waren.

3 Material und Methoden

3.1 Mikrotubuli

Bei den Mikrotubuli handelt es sich um röhrenförmige Proteinfilamente, die einen Innendurchmesser von 15 nm und einen Aussendurchmesser von etwa 24 nm haben. Sie erreichen eine Länge von mehreren 10 bis einigen 100 μm . Der Hohlzylinder besteht *in vivo* aus 13 oder 14 Protofilamenten während *in vitro* zwischen 11 und 15 Protofilamenten, abhängig von den Pufferbedingungen, gebildet werden. Diese Protofilamente wiederum bauen sich aus Tubulin-Dimeren auf. Zur Polymerisation von Mikrotubuli *in vitro* sind

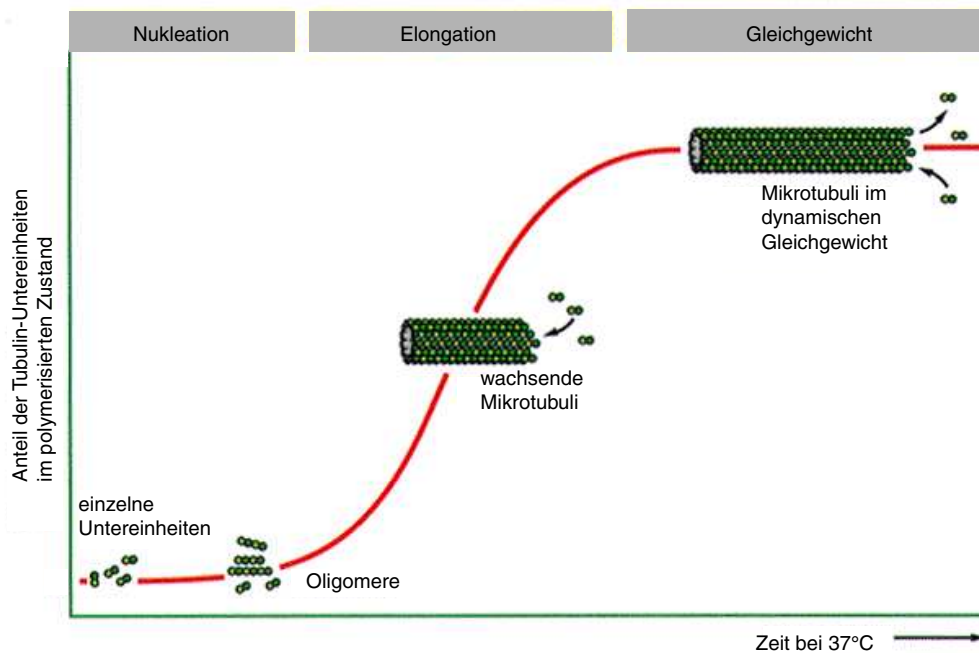


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Polymerisationsreaktion von Mikrotubuli. Bei der Zeit Null wird eine Mischung von Tubulin und GTP in Puffer auf 37°C erwärmt. In der Anlaufphase formen einzelne Tubulin-Moleküle metastabile Aggregate, von denen einige Nukleationskeime für Mikrotubuli bilden. In der schnellen Wachstumsphase binden Untereinheiten an die Enden von bestehenden Mikrotubuli. In der Gleichgewichtsphase laufen Polymerisation und Depolymerisation mit der gleichen Geschwindigkeit ab, da die kritische Konzentration erreicht ist. Die Dynamik wird zur Vereinfachung nur an einem Mikrotubulus-Ende dargestellt. [1]

Mg²⁺-Ionen und GTP nötig. Die optimale Temperatur beträgt 37°C, wobei auch eine Temperatur von 30°C ausreichend ist. Eine zu niedrige Temperatur führt bei unstabilierten Mikrotubuli zu einer raschen Depolymerisationsreaktion. Bei der Nukleation bilden sich zunächst flache Tubulin-Blätter aus kurzen Protofilamenten, die sich schnell zu einem Ring zusammenschließen. Aus dieser Struktur heraus läuft die weitere Polymerisation ab [3]. Dabei wachsen die Filamente vor allem am Plusende, während die Polymerisation am Minusende deutlich langsamer verläuft. Im Gleichgewichtszustand ist ein beständiger Umsatz von Tubulin-Einheiten zu beobachten. Bei der kritischen Konzentration besteht ein Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation. *In vivo* dienen meist γ -Tubulin Ringe, bereits im Zytoplasma vorgeformte Strukturen, als Nukleationskeime.

In den hier präsentierten Experimenten wurden Axoneme als Nukleationskeime verwendet. Der Vorteil hiervon besteht darin, daß sich so nur Mikrotubuli mit einer definierten Anzahl von 13 Protofilamenten bilden können.

3.1.1 Aufreinigung von Tubulin

Mikrotubuli können aus Schweinehirn gewonnen werden [69, 101]. Dabei befindet sich das Tubulin in der zytosolischen Fraktion des aufgeschlossenen Schweinehirns. Die Isolation beruht auf einer mehrfachen Polymerisation und Depolymerisation, sowie einer Ionenaustausch-Chromatographie über eine Phosphozellulose-Säule.

Die zur Reinigung von Tubulin benötigten Puffer sind in Anhang A aufgeführt. Die im folgenden angegebenen Rotoren bezeichnen die am Institut zur Präparation eingesetzten Rotoren.

Reinigungsprotokoll

Erster Tag Etwa 700 g frisches Schweinehirn wurden auf Eis zügig von restlichem Bindegewebe, Adern und Hirnhaut gesäubert. Diese gereinigten Hirne wurden mit derselben Menge an kaltem Puffer A gemischt und in einem handelsüblichen Mixer homogenisiert.

Das Homogenisat wurde in einem GSA-Rotor (Sorvall, Hanau) bei 4°C und 27 000 g 70 Minuten zentrifugiert. Durch die niedrige Temperatur und den geringen ATP-Gehalt depolymerisieren die zytosolischen Mikrotubuli, und das Tubulin befindet sich im Überstand.

Dem Überstand wurden 2 mM ATP aus dem ATP-Stock zugegeben. Anschließend wurde er mit 25% (v/v) Glycerin versetzt und in einem Becherglas bei 35°C geschwenkt. Dadurch polymerisiert das Tubulin erneut zu Mikrotubuli. Diese wurden durch eine Ultrazentrifugation bei 32°C und 138 000 g (Rotor 45Ti, Beckmann) über 45 Minuten sedimentiert. Durch diesen Schritt wird ein Großteil der löslichen zytosolischen Proteine abgetrennt.

Das Sediment wurde in 5 ml kaltem Puffer C aufgenommen und über einen Zeitraum von 25 Minuten auf Eis depolymerisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (42.1Ti, Beckmann) für 30 Minuten bei 4°C und 100 000 g wurde dem Überstand erneut ATP zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Durch ein Aufwärmen auf 35°C wurde die Polymerisation gestartet.

Nach 30 Minuten erfolgte eine erneute Zentrifugation für 60 Minuten bei 35°C und 84 000 g (Rotor 42.1Ti). Der Überstand wurde verworfen, während die Sedimente vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung über Nacht erfolgte bei -80°C.

Zweiter Tag Zunächst mußte eine Phosphozellulose-Säule (50 ml P-11, Whatman) gefüllt und mit Puffer D equilibriert werden.

Das am Vortag eingefrorene Mikrotubuli-Sediment wurde aufgetaut, in einem Homogenisator mit 50 ml Puffer B versetzt, homogenisiert und für 25 Minuten auf Eis inkubiert.

Bei 4°C und 100 000 g wurde das Homogenisat im Rotor 42.1Ti für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10% (v/v) DMSO und 2 mM ATP versetzt.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad wurden die Mikrotubuli im Rotor 42.1Ti bei 84 000 g und 35°C 60 Minuten abzentrifugiert.

Das Sediment wurde mit 5 ml Puffer D versetzt und erneut im Homogenisator auf Eis für 30 Minuten depolymerisiert. Durch eine Zentrifugation bei 80 000 g und 4°C (Rotor 70.1Ti, 30 Minuten) wurden Präzipitate abgetrennt.

Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Puffer D bei einer Flußrate von 0,1 ml/min. Das Tubulin befindet sich im Durchfluß, während die MAPs, die die wesentlichen Restverunreinigungen sind, an die Säule binden.

Die Fraktionen mit einer Proteinkonzentration von mehr als 2 mg/ml wurden vereinigt, mit 0,1 mM GTP versetzt und portionsweise in flüssigem Stickstoff

3 MATERIAL UND METHODEN

eingefroren. Eine typische Präparation ergibt 12 ml Eluat mit einer Konzentration von 12-18 mg/ml. Bei einer Lagerung bei -80°C bleibt das Tubulin für mindestens 12 Monate stabil.

3.2 Axoneme

Axoneme bilden die Kernstruktur von Zilien und Flagellen. Sie sind aus Tubulin und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen aufgebaut. Die Struktur der Axoneme wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie aufgeklärt [27]. Bei Schnitten findet man zwei zentrale einzelne Mikrotubuli, die von neun speziell geformten „Doublets“ umgeben sind. Jedes „Doublet“ besteht aus einem 13-zähligen kompletten Ring von Protofilamenten und einem 11-zähligen diesem Ring angeschlossenen Ringsegment.

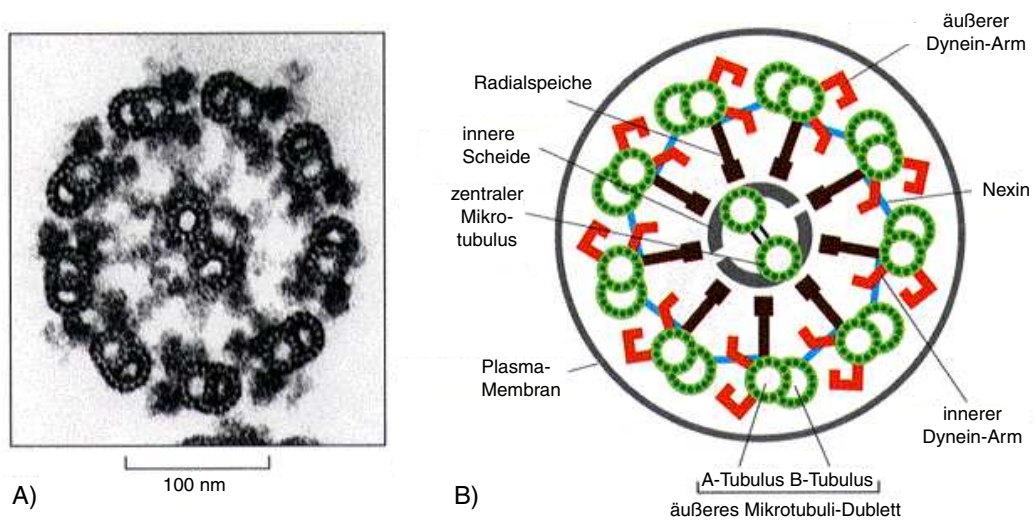


Abbildung 2: Anordnung der Mikrotubuli in Axonemen. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts durch das Flagellum einer Algenzelle (Chlamydomonas). Die charakteristische „9+2“-Anordnung der Mikrotubuli ist deutlich zu erkennen. B) Skizze des Querschnitts mit den wichtigsten Bestandteilen des Axonems [1]

Axoneme dienen als Nukleationskeime für Mikrotubuli, da an dem geschlossenen Ring des „Doublets“ durch Polymerisation ein Mikrotubulus wachsen kann (Siehe Abbildung 2). Solche Mikrotubuli sind aufgrund der Keimstruktur aus 13 Protofilamenten aufgebaut. Durch die Eigenschaft der Axoneme,

gut auf gereinigten und Poly-L-Lysin beschichteten Glasflächen zu haften, erhält man Mikrotubuli, die an einem Ende an der Unterlage fest verankert sind.

Zur Verwendung kamen aus den Flagellen der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* aufgereinigte Axoneme.

3.2.1 Kultivierung der Algen

Die Algen wurden aus der Sammlung von Algenkulturen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen als Festkultur bezogen. Bei einer Lagerung an einem kühlen (idealerweise 15-18⁰C) und schattigen aber nicht dunklen Ort sind diese Einzeller mindestens 6 Monate überlebensfähig. Die Bezugsquelle ist über die Internet-Adresse <http://www.gwdg.de/~epsag/phykologia/epsag.html> erreichbar.

Für die Isolation der Axoneme werden die *Chlamydomonas*-Algen in Flüssigmedium gezüchtet. Hierzu werden 1-Liter Glasflaschen mit Nährmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 7 auf Seite 74) gefüllt und autoklaviert [103]. Anschließend wird mit einigen Algenzellen, entweder aus der Festkultur oder von einer flüssigen Vorkultur, angeimpft. Die Kultur wird durch einen Gummistopfen hindurch mit Druckluft steril belüftet. Bei einer täglichen Beleuchtungsdauer von 14 Stunden mit einer 20W Halogenlampe wird die Kultur über 2-3 Wochen gezogen, bis sie sich tief grün verfärbt hat.

3.2.2 Aufreinigung der Axoneme

Die Reinigungsvorschrift zur Isolation der Axoneme von *Chlamydomonas reinhardtii* wurde aus verschiedenen Protokollen zusammengestellt. Die wesentlichen Schritte stammen von Allen und Borisy [2].

Alle verwendeten Glasgefäße müssen wegen der Empfindlichkeit der Algen vollkommen frei von Detergens-Resten sein. Sowohl starke Scherung, als auch Detergens können zu einem vorzeitigen abwerfen der Flagellen mit dem damit verbundenen Verlust für die Präparation führen.

Die Zusammensetzungen der Puffer sind in Anhang A nachzulesen.

Die ersten Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Aus einem Liter dicht gewachsener Flüssigkultur werden zunächst die Algen portionsweise in 50 ml Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) für 8 Minuten bei 450 g (Heraeus Microfuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde

3 MATERIAL UND METHODEN

jeweils verworfen. Die Sedimente wurden zweimal durch vorsichtiges Schwenken in 50 ml Puffer W aufgenommen und 8 Minuten bei 450 g (Heraeus Microfuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgegossen. Dieser Schritt wäscht Reste von Nährsalzen aus. In einem anschließenden Schritt wurden die Sedimente in 50 ml Puffer A aufgenommen und erneut abzentrifugiert (Heraeus Microfuge, 8 Minuten, 450 g).

Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Schritte auf Eis und die Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt.

Die beiden Sedimente wurden in jeweils 10 ml Puffer B aufgenommen, kräftig gemischt und für fünf Minuten ruhen gelassen. Dadurch werden die Zellen unter Streß gesetzt und werfen die Flagellen ab. Die Detergens-Konzentration reicht jedoch nicht dazu aus, die Zellwand zu zerstören. Durch eine Zentrifugation in der Heraeus Microfuge (8 Minuten, 450 g) wurden die Zellen sedimentiert.

Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde in 15 ml Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) auf jeweils ein Milliliter eines 20%igen (w/v) Saccharosekissens in Puffer B geschichtet und erneut in der Heraeus Microfuge (8 Minuten, 450 g) zentrifugiert. Durch diesen Schritt wird eine bessere Abtrennung von groben Verunreinigungen erzielt.

Der Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge 45 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert.

Die Sedimente wurden jeweils in 1 ml Puffer C aufgenommen, in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 30 Minuten lang inkubiert. Dieser Schritt entfernt die Dyneine aus der Axonemen-Struktur. Das ist notwendig, um ein Gleiten der Mikrotubuli des Axonems gegeneinander in Gegenwart eines Nukleotids zu verhindern.

Nach einer Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge (30 Minuten, 15 800 g) folgten zwei Waschschrte, um die Axoneme in den Arbeitspuffer zu überführen. Dazu wurden die Sedimente jeweils in 500 µl Puffer AP100 aufgenommen und in der Eppendorf Tischzentrifuge (10 Minuten, 8 000 g) zentrifugiert.

Abschließend wurden die Sedimente in je 150 µl AP100 aufgenommen, portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch eine Lagerung bei -80°C können die so präparierten Axoneme mindestens 6 Monate verwendet werden.

3.3 Kinesin und Kinesinkonstrukte

Die Kinesine gehören zu den Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen. Diese Motoren binden an die Mikrotubuli und wandeln chemische Energie, die sie aus der Hydrolyse von ATP gewinnen, in kinetische Energie um. Motormoleküle sind unidirektional und können entsprechend ihrer Bewegungsrichtung in Plusend- und Minusend-gerichtete Motoren eingeteilt werden. Tierische konventionelle Kinesine sind aus zwei schweren und zwei leichten Ketten aufgebaut. Im Gegensatz dazu stehen die konventionellen Kinesine der niederen Organismen, wie beispielsweise Pilze. Diesen fehlen die leichten Ketten [93]. Der Organismus *Neurospora crassa* zählt zu den Ascomyceten und damit zu den Pilzen [89]. Das *Neurospora crassa*-Kinesin (NcKin) ist ein Plusend-gerichteter Motor.

Die Struktur der konventionellen Kinesine besteht aus 9 Domänen. Diese sind beim NcKin auf folgende Sequenzabschnitte verteilt: Die katalytische Domäne, auch Kopf oder Motor genannt, besteht aus den Aminosäuren 1-342. Der Hals von AS 343 bis 372 beeinflusst zusätzlich die Aktivität des Kopfes, weshalb er ebenfalls dem katalytisch aktiven Teil zuzuordnen ist. Das Scharnier erstreckt sich zwischen AS 373 und 433, die Helix I umfaßt AS 434-554. Daran schließt sich der Knick (AS 555-628) und die zweite Helix (AS 629-719) an. Die Region von der ersten bis zur zweiten Helix wird auch Stiel genannt und enthält mit den Helizes I und II zwei superhelikale („coiled-coil“) Sequenzabschnitte. Anschließend folgt nach einer kurzen verbindenden Domäne (AS 720-742) der superhelikale Schwanz mit den Aminosäuren 743-863 und die globuläre Schwanzdomäne, die bis zum Ende der Sequenz bei AS 928 reicht [55, 85, 86].

Bisher ist nur der Aufbau des Kopfes und ein Teil des Halses aus röntgenkristallographischen Untersuchungen bekannt [58]. Der restliche Hals-Bereich ist zu variabel und kann daher aus den Röntgenstreu-Daten nicht modelliert werden. Längere Konstrukte konnten bisher nicht kristallisiert werden. Für die Vorhersage der Domänenstruktur im Schwanzbereich wurden sowohl die elektronenmikroskopischen Bilder als auch Vorhersagen über die Bildung von Superhelices nach dem „Paircoil“ Programm verwendet [9, 18].

3.3.1 Rekombinantes *Neurospora crassa* Vollängen Kinesin

In der vorliegenden Arbeit wurde bakteriell in *Escherichia coli* exprimiertes Protein verwendet. Dieses ist über eine Säulenaufreinigung sehr sauber und in großen Mengen zu bekommen. Mit diesem Protein durchgeführte funktionale

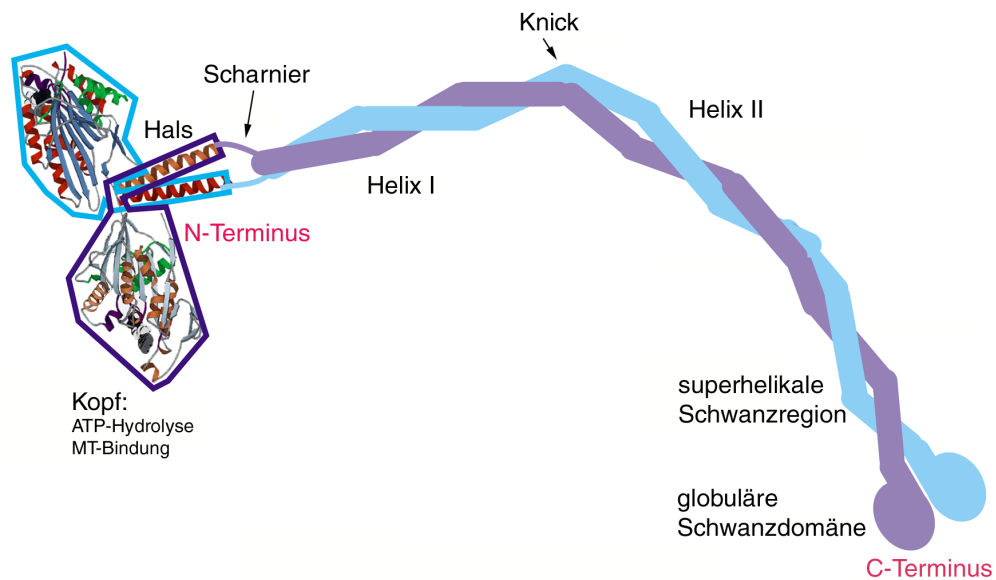


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des *Neurospora crassa* Kinesins. Im Kopf und Hals ist die aus Röntgenstruktur-Analysen erhaltene Struktur dargestellt. (Nach [104])

Messungen („Gliding assays“) führen zu den gleichen Ergebnissen, wie mit Wildtyp-Kinesin [68].

3.3.2 Verkürzte Kinesinkonstrukte

Die Bindung zwischen Mikrotubulus und Kinesin findet im Bereich des Kopfes statt [44]. Deshalb ist es essentiell, daß bei einer Verkürzung des Kinesins diese Domäne komplett erhalten bleibt. Das kürzeste in dieser Arbeit verwendete Konstrukt besteht lediglich aus dieser katalytischen Domäne und endet nach der Aminosäure 343. Bei diesem Konstrukt handelt es sich um ein monomeres Protein [53].

Zur Dimerisierung sind die Aminosäuren der Hals- und Scharnier-Region nötig. Während sich Konstrukte bis zur Aminosäure 383 aufgrund der gemessenen Werte für Stokes Radius und Svedberg-Konstante monomeresch

verhalten, ergibt sich bei Konstrukten ab einer Länge von 391 Aminosäuren ein dimerer Zustand. Um ein eindeutig dimeres Konstrukt zu verwenden wurde NcKin433 gewählt, ein Konstrukt, das sowohl die komplette Hals- als auch Scharnier-Domäne enthält. Die Motilität dieses Konstruktes unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen des Vollängen-Konstruktes [53].

3.4 Chimäre Konstrukte aus Titin und Kinesin

Das Muskelprotein Titin, das auch als Connectin bekannt ist, ist modular aufgebaut und besteht hauptsächlich aus Fibronectin III (Fn3)- und diversen einander strukturell ähnlichen Immunglobulin (Ig)-Domänen [71, 98]. Dabei überbrückt ein einzelnes Titin Molekül die gesamte Spanne zwischen der Z-Scheibe und der M-Linie in der quergestreiften Muskulatur von mehr als $1\ \mu\text{m}$ [36].

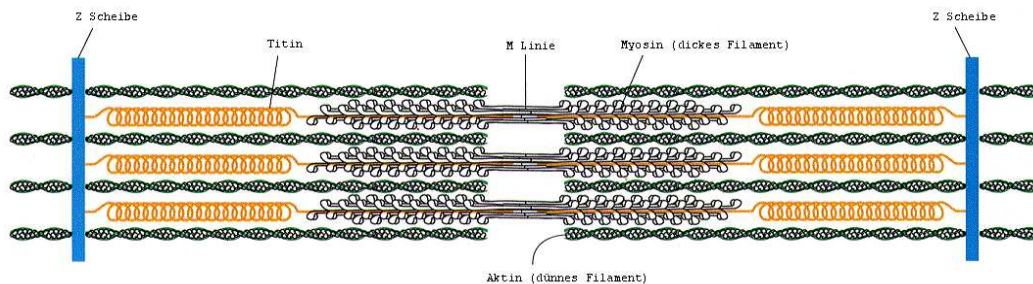


Abbildung 4: Lokalisation des Titin im Muskel Sarkomer. Jedes einzelne Titin erstreckt sich von der Z-Scheibe zur M-Linie – eine Strecke von mehr als $1\ \mu\text{m}$. Ein Teil des Moleküls ist fest mit den Myosin-Molekülen im dicken Filament verbunden, der Rest ist elastisch und dient als Feder. Die Muskelkontraktion erfolgt durch eine koordinierte Interaktion zwischen den Myosinköpfen des dicken Filaments und dem Aktin des dünnen Filaments. [1]

Die Kraft-Auslenkungs-Kurven von einzelnen Ig-Domänen wurden mit dem Kraftmikroskop recht genau erforscht und geben ein signifikantes und einfach zu erkennendes Muster [83]. Solch einen „Fingerabdruck“ bei kraftmikroskopischen Messungen zu haben hat den Vorteil, daß überprüfbar ist, ob das gemessene Molekül auch wirklich dem gewünschten Molekül entspricht.

Da die helikale Struktur des Kinesinstiels untersucht werden sollte, wurde der Kopf des Kinesins durch vier Ig-Domänen des Titins ersetzt. Somit lassen sich kraftmikroskopischen Kurven der Titin–Kinesin–Chimäre zuordnen, wenn zumindest einzelne Titin–Peaks auftreten.

3.5 Primer und Vektoren

3.5.1 Verwendete Vektoren

Die Klonierungen bauen auf den folgenden Vektoren auf:

pT7-7 [90], pET3d (Novagen, Madison), pET33 (Novagen, Madison)

3.5.2 Primer

oTitin1+B

5'-CGG GAT CCG CTA ATA GAA GTG GAA AAG CC-3'

Dieser Primer führt direkt vor der kodierenden Sequenz der Titin Domäne Ig27 eine *Bam*HI-Schnittstelle ein.

oTitinRp4-EcoRI

5'-GGA ATT CTC CCG ATC CTC AAT GTC AAG TTT TCC TGA GG-3'

Dieser Primer fügt am Ende der Sequenz der Titin–Domäne Ig30 eine *Eco*RI- und eine *Mlu*I-Schnittstelle ein. Zur Verwendung für die Klonierung kam die *Eco*RI-Schnittstelle. Die *Mlu*I-Schnittstelle kann für Kontrollspaltungen verwendet werden, da sie nahe des Starts der kodierenden Sequenz im Vektorrückgrat ein zweites Mal schneidet.

oNK342+MluIEcoRI

5'-GGA ATT CAC GCG TGC CGG CCG AGC TGA AGC AGA TGC-3'

Direkt vor Aminosäure 342 des Kinesins werden eine *Eco*RI- und eine *Mlu*I-Schnittstelle eingefügt.

NcKin-STOP-26bp-NheI-NotI

5'-CTA TAT CTA GCG GCC GCT GCT AGC TTA CGA CTT CTG GAA GAA CCA
ACT CG-3'

Hierbei handelt es sich um einen reversen Primer, der das Stop-Kodon, sowie, im nicht kodierenden Bereich, eine *NheI*- und eine *NotI*-Schnittstelle enthält.

NcKin2144fwd

5'-GCA CCT CAA GGC TTT GGT CG-3'

Dieser Primer diene bei allen C-terminal verkürzten Konstrukten als 5'-Primer für die PCR.

NK823L821C-StopAgeNot-

5'-GCG AGT TAG CGG CCG CTC AAC CGG TCG CCA TAC ATT TGC GCT CGG C-3'

Dieser Primer führt ein Cystein in der a-Position bei AS 821, sowie eine *AgeI*-Schnittstelle und ein anschließendes Stop-Kodon nach AS 823 ein. Im nicht kodierenden Bereich befindet sich eine *NotI*-Schnittstelle zum Klonieren des PCR-Fragments in den Vektor.

NK849-LEACEG-

5'-GCG AGT TAG CGG CCG CTT AAC CGG TGC CTT CGC ATG CTT CCA GCT TGT GAT TCG CCT GGG CCA TC-3'

NK849-LEASEG-

5'-GCG AGT TAG CGG CCG CTT AAC CGG TGC CTT CGG ATG CTT CCA GCT TGT GAT TCG CCT GGG CCA TC-3'

Der Name dieser Primer enthält die Aminosäure-Sequenz, die jeweils nach der Position 849 der NcKin-Sequenz eingefügt wird. Das Cystein befindet sich hierbei in der d-Position einer perfekten Helix-Sequenz. Schnittstellen und Stop-Kodon werden wie bei Primer NK823L821C-StopAgeNot- eingeführt.

3.6 Klonierung der Konstrukte

Bei den verkürzten Kinesinkonstrukten wurden im Rahmen dieser Arbeit auf vorhandene Vektoren zurückgegriffen. Für die Klonierungen der verschiedenen Titin-Kinesin-Konstrukte, wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vier Titin Ig-Domänen aus einem Titinvektor entnommen. Diese wurden in einen Kinesinvektor eingebaut, um das Fusionsprotein zu erhalten.

Zur Expression des Vollängen-Kinesins wurde der Vektor pT12.1 verwendet, der unter der Kontrolle des T7-Promotors Kinesin exprimiert und von

Ulrike Majdic auf einem pT7.7-Vektor aufbauend kloniert wurde [68]. Die C-terminal verkürzten reinen Kinesin-Konstrukte NcKin343 und NcKin433 enthalten jeweils am C-Terminus ein reaktives Cystein. Diese Sequenz (bestehend aus den Aminosäuren PSIVHRKCF) entstammt der Aktinsequenz [35, 50]. Der Vektor pNK343 wurde von Franz Schwarz, der Vektor pNK433 von Günther Wöhlke kloniert.

Für die Untersuchungen im Kraftmikroskop an chimären Molekülen wurde auf den von Lucia Driller konstruierten Vektor pET33-S1,S4 (im Hintergrund des pET33-Vektors kloniert), der die kodierende Sequenz eines NcKin928 mit N-terminalem T7- und His-tag enthält, aufgebaut. Als Zwischenschritt wurde der Vektor pET33b-NcKin Δ 1-342-stop erzeugt, bei dem der Kinesin-Schwanz ab der Aminosäure 343 exprimiert wird. Dazu wurde mit den Primern oNK342+MluIEcoRI und NcKin-STOP-26bp-NheI-NotI auf dem Vektor pET33-S1,S4 eine PCR durchgeführt. Anschließend wurden sowohl der Vektor pET33-S1,S4 als auch das PCR-Produkt mit *Hind*III und *Eco*RI verdaut. *Eco*RI schneidet den Vektor zwischen den N-terminalen Erweiterungen und dem Beginn der Kinesinsequenz. *Hind*III schneidet bei Aminosäure 482 der Kinesinsequenz. Durch Ligation des 430 bp großen PCR-Fragments in den Vektor erhält man den Vektor pET33b-NcKin Δ 1-342-stop.

Der Vektor pTitin enthält in einem pET-3d Vektor die globulären Titin-Domänen Ig27 bis Ig34. Um die Domänen Ig27 bis Ig30 zu erhalten wurde eine PCR mit den Primern oTitin1+B und oTitinRp4-EcoRI durchgeführt. Die so erhaltenen vier Titin-Domänen wurden über einen Verdau mit *Bam*HI und *Eco*RI in den Vektor pET33b-NcKin Δ 1-342-stop eingefügt, wodurch man den Vektor pET33b-Titin1_4NcKin342-928stop erhielt.

Um die auf den meisten Oberflächen stark klebrige globuläre Domäne am C-terminalen Ende zu entfernen oder ein Vernetzen nahe dem C-terminalen Ende des superhelikalen Schwanzbereiches mit einem Cystein in der passenden Helix-Position zu erzielen, wurden drei weitere Vektoren kloniert. Der Vektor pET33b-Titin1_4NcKin342-823stop enthält bei AS 821 ein Cystein in a-Position der Helix. Dieses Konstrukt enthält – ebenso wie die beiden folgenden Vektoren – direkt vor dem Stop-Kodon zwei zusätzliche Aminosäuren, um eine *Age*I-Schnittstelle einzufügen. Für den Vektor pET33b-Tit_NcKin849LEASEGstop wurden nach Aminosäure 849, der letzten, die bei dem „paircoil“-Algorithmus [9] mit 100% Wahrscheinlichkeit helikal ist, sechs Aminosäuren einer perfekten Helix angehängt. Hierbei wurde in der d-Position ein Cystein eingefügt, da sich in dieser Position am leichtesten eine kovalente Bindung zwischen den beiden Helizes des Dimers ausbildet. Der Vektor pET33b-Tit_NcKin849LEASEGstop wurde in derselben Weise

aufgebaut, jedoch ohne ein querverbindendes Cystein einzufügen.

Für alle drei im letzten Absatz genannten Vektoren wurde jeweils eine PCR auf dem Vektor pET33b-Titin1_4NcKin342-928stop durchgeführt und über einen Verdau mit *Aat*II und *Not*I mit anschließender Ligation der gewünschte Vektor erzeugt. Für den Vektor pET33b-Titin1_4NcKin342-823stop wurden die beiden Primer NcKin2144fwd und NK823L821C-StopAgeNot- verwendet. Mit den Primern NcKin2144fwd und NK849-LEACEG- wurde die PCR für den Vektor pET33b-Tit_NcKin849LEACEGstop durchgeführt, die Primer NcKin2144fwd und NK849-LEASEG- wurden für die Erzeugung des Vektors pET33b-Tit_NcKin849LEASEGstop eingesetzt.

Zur Verwendung kamen die verkürzten Kinesinkonstrukte bei den Biegesteifigkeitsmessungen. Das rekombinante Vollängen-Kinesin wurde sowohl für Biegesteifigkeitsmessungen als auch für kraftspektrometrische Untersuchungen eingesetzt. Die Fusionsproteine aus Titin und Kinesin wurden für die kraftspektrometrischen Untersuchungen kloniert.

3.7 Die optische Falle

Bereits 1909 erkannte Debye, daß man mit Licht eine Kraft auf Kugeln ausüben kann [21]. Die grundlegenden theoretischen Arbeiten, auf denen alle Typen von optischen Fallen basieren, stammen von A. Ashkin [4]. Dabei reicht das Spektrum der Fallen von gekreuzten Strahlbündeln, wie sie in optischen Gittern verwendet werden bis hin zu Einstrahl-Gradientenkraftfallen, wie sie beispielsweise zum Sortieren von Zellen oder – wie in der vorliegenden Arbeit – zum Greifen von Mikrotubuli verwendet werden. Die Einstrahl-Gradientenfalle wurde 1978 von A. Ashkin vorgeschlagen und zusammen mit J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm und S. Chu im Jahre 1986 realisiert [5, 6].

3.7.1 Aufbau der Laser-Pinzette

Das Prinzip der Laser-Pinzette beruht auf der Ausnutzung der Kräfte, die bei der Beugung von Licht entstehen. Da diese Kräfte sehr gering sind, ist eine starke Lichtquelle, wie sie ein Laser darstellt, nötig. Um mit einem einzelnen Strahl eine Fallenwirkung zu erzielen, muß dieser zuerst aufgeweitet und anschließend stark fokussiert werden. Dazu bieten sich konventionelle Lichtmikroskope an, die mit hochauflösenden Objektiven versehen sind. Bei einer unendlich-korrigierten Optik ist die Einkopplung des Lasers einfach. Man benötigt einen freien Eingang am Mikroskop – wie im vorliegenden Fall einen Auflichteinsatz – um den parallelen Laserstrahl auf die rückseitige Apertur des Objektivs zu schicken. Durch die hohe numerische Apertur der hochauflösenden Objektive und den geringen Arbeitsabstand erfolgt damit eine starke Fokussierung unter gleichzeitiger hoher Intensitätsausnutzung. Durch die spezielle Optik fällt der Punkt der höchsten Fallenwirkung in die Objektebene.

Zur Nutzung der Laser-Pinzette über ein bloßes Beobachten hinaus benötigt man ein probates Detektionssystem. Dabei hängt es von der Anwendung ab, ob ein bildgebendes Verfahren mit einer mäßigen Zeit- und Ortsauflösung oder ein nicht bildgebendes Verfahren, jedoch mit deutlich höherer zeitlicher und örtlicher Auflösung verwendet wird.

Als nicht bildgebendes Verfahren ist eine Abbildung des Fokuspunktes auf eine Quadrantendiode am gebräuchlichsten. Durch die Veränderung der Helligkeitsunterschiede zwischen den Diodenpaaren lassen sich Positionsänderungen des zu beobachtenden Objektes in x- und y-Richtung (in der Fokusebene) bis hin zu einer Genauigkeit in der Größenordnung von 1 nm bei einer gleichzeitigen Auslesefrequenz von bis zu 100 kHz detektieren. Durch die

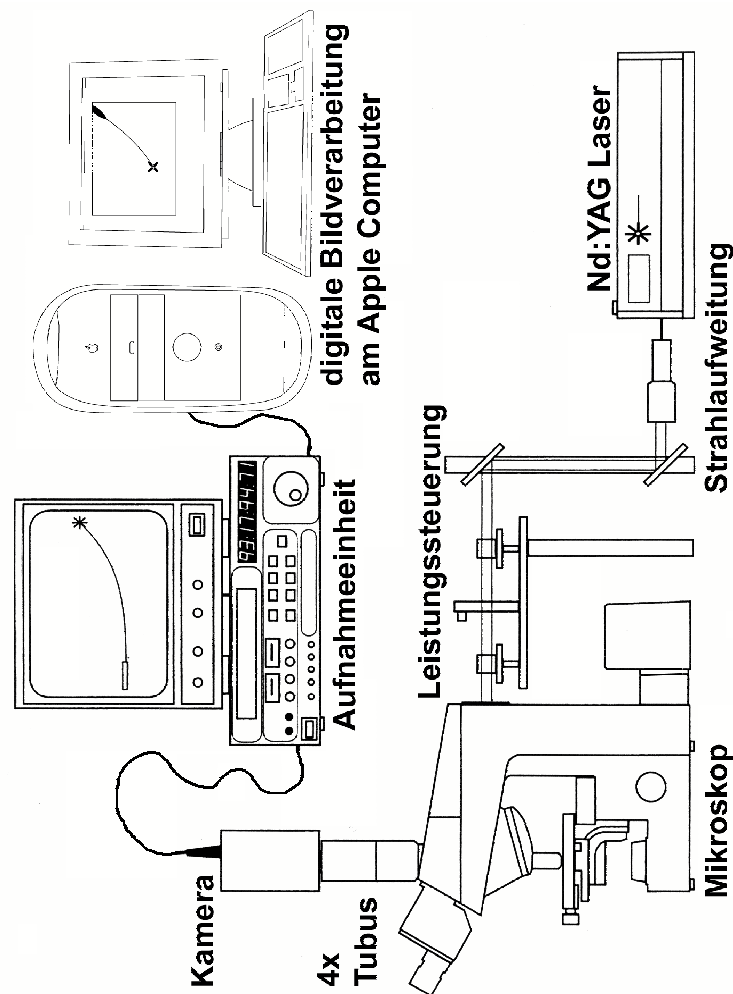


Abbildung 5: Aufbau der Laserfalle

Veränderung der auf die Dioden eingestrahelten Gesamtintensität läßt sich sogar – bei einer konstanten Beleuchtungsstärke – die z-Position auf etwa 10 nm genau bestimmen. Auf diese Weise lassen sich Fallentypen bauen, die über eine Rückkopplungs-Schleife die Kraft konstant halten.

Bei den bildgebenden Verfahren wird eine hochauflösende analoge oder digitale Kamera verwendet. Diese wird auf ein Videoband oder direkt auf einen Computer ausgelesen. Aufgrund der Limitierungen durch die maximale Beleuchtungsstärke und der damit geringen Lichtintensität, sowie der optischen Auflösungsgrenze, lassen sich mit dieser Methode deutlich geringere räumliche und zeitliche Auflösungen erzielen. Aufgrund optischer Beschränkungen lassen sich zwar kleine Objekte, wie beispielsweise Mikrotubuli, mit genügend

großem Kontrast darstellen, sie lassen sich aber bei geringerem Abstand, als etwa die halbe Wellenlänge des zur Beobachtung eingesetzten Lichtes, nicht mehr unterscheiden. Sofern keine gekühlten Kameras verwendet werden, ist es auch wenig sinnvoll, hohe Bildfrequenzen zu verwenden, da das Rausch-Signal-Verhältnis dadurch zu stark ansteigt. Eine Aufzeichnung auf Videoband läßt grundsätzlich keine höhere Beobachtungsfrequenz als 50 Hz zu (bei einer Trennung der Halbbilder im PAL-Standard). Relative Bewegungen einzelner Objekte lassen sich bei ausreichendem Kontrast bis auf etwa 10 nm genau bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Falle verwendet, wie sie in Abb. 5 dargestellt ist. Als krafterzeugende Lichtquelle wird ein kontinuierlich arbeitender Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm verwendet (Spectron SL 903). Das gaußförmige Strahlbündel wird durch eine Fernglasoptik (Rodenstock) auf einen Durchmesser von etwa 7 mm aufgeweitet und über das Aufficht-Fenster in das Mikroskop (Zeiss Axioskop) eingekoppelt. Als weitere Elemente befinden sich eine Umlenkeinheit, um den Strahl auf das Fenster einzujustieren, und eine Leistungssteuerung im Strahlengang. Letztere besteht aus zwei polarisierenden Strahlteiler-Würfeln sowie einer $\lambda/2$ -Platte zwischen ihnen.

Zur Aufnahme der Mikrotubuli-Dynamik wurde eine Newvicon-Kamera (Hamamatsu C2400) mit einem vorgeschalteten Vierfachtubus verwendet. Das Auslesen und Aufzeichnen der Bilddaten erfolgte über einen Videorekorder (Panasonic AG-7350) mit nachgeschaltetem Kontrollmonitor (Burle). Als Rechner zur Digitalisierung und anschließenden Auswertung wurde ein PowerMacintosh 9500/200 mit einer „Scion LG3“-Bildverarbeitungskarte verwendet. Sequenzen von Bildausschnitten des aufgenommenen Videos wurden mit der NIH Image-Software in den Speicher eingelesen und anschließend auf Festplatte gespeichert.

Zur Auswertung der so erzeugten Daten wurden Implementierungen für NIH Image verwendet, die von Marius Dichtl, Florian Ziemann und Jörg Schilling entwickelt und von mir auf Programmversion 1.62 portiert wurden. Des Weiteren wurden in Zusammenarbeit mit Christian Horn Makros für NIH Image, sowie Igor Pro 3.16b entwickelt, die im Anhang B abgedruckt sind.

3.8 Probenpräparation für die Laserfallen-Experimente

An die Probenkammer werden hohe Ansprüche gestellt, da einerseits die Axoneme, die im wesentlichen aus Tubulin bestehen, binden, andererseits die Mikrotubuli, die von diesen aus polymerisieren aber auf der gesamten Länge frei und möglichst parallel zum Deckglas sein sollen. Solange die Mikrotubuli nicht dekoriert sind, ist dies kein großes Problem, sobald jedoch Kinesin anwesend ist, tendiert es dazu, die Mikrotubuli an die Glasoberflächen zu heften.

Zur Reinigung der Glasoberflächen von Verschmutzungen und Fett wurden zunächst sowohl die Deckgläser als auch die Objektträger über Nacht in konzentrierter Salpetersäure geschüttelt. Zum Stoppen dieses Ätz-Vorganges wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden getrocknet und staubdicht verschlossen, während die Deckgläser zunächst in einem Teflonhalter getrocknet und anschließend beschichtet wurden.

Für die Beschichtung der Deckgläser wurde eine Lösung von 0,01 mg/ml Poly-L-Lysin in bidest. Wasser angesetzt. Davon wurden für 18x18 mm je 10 μ l, für 25x25 mm Deckgläser je 20 μ l auf einen Parafilm pipettiert und die Deckgläser für 10 Minuten daraufgelegt. Diese Beschichtung sorgt dafür, daß Tubulin gut binden und an der Oberfläche haften kann. Diese Eigenschaft ist für die Anheftung der Axoneme vorteilhaft. Mit Poly-L-Lysin beschichtete und getrocknete Deckgläser sind für etwa zwei Wochen verwendbar. Danach hat sich die Oberfläche so stark verändert, daß ein Blocken, wie es anschließend beschrieben wird, nicht mehr effektiv möglich ist.

Am Versuchstag werden aus *Chlamydomonas reinhardtii* aufgereinigte Axoneme in 20-50 μ l AP100 verdünnt und in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur auf die beschichtete Seite des Deckglases pipettiert. Nach 10 Minuten wird die Flüssigkeit, die die nicht gebundenen Axoneme enthält, abgenommen und durch eine Block-Lösung ersetzt. Diese enthält 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml Casein und 1 mg/ml Glycin. Alle drei Proteine lagern sich an die Oberflächen an und schirmen Ladungen ab. Dabei sollen das kleine Protein Casein und die neutrale Aminosäure Glycin eventuelle Poren zwischen den BSA-Molekülen schließen. Auf diese Weise soll ein Anlagern der Mikrotubuli und Kinesine an die Oberfläche so weit wie möglich reduziert werden.

Auf einen gereinigten Objektträger werden mit Klebeband (Tesa Fotostrip) Abstandshalter geklebt, die gleichzeitig als seitliche Begrenzer für eine Flußkammer dienen. Aus Objektträger und Deckglas wird eine Meßkammer erzeugt, indem die Ränder mit VALAP (Vaseline, Lanolin und Paraffin zu

jeweils gleichen Teilen) versiegelt werden. Diese wird auf dem Mikroskopisch befestigt und über das Objektiv beheizt. Nach etwa 20 Minuten wird die Flußkammer an beiden Seiten geöffnet und mit einer Pipettenspitze die Polymerisationslösung (Siehe Tabelle 11 in Anhang A) zugegeben, während auf der anderen Seite überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt wird. Schließlich wird die Kammer erneut mit VALAP verschlossen. Sobald die Mikrotubuli eine Länge von ungefähr $10\ \mu\text{m}$ erreicht haben, wird die Polymerisationslösung durch eine Meßlösung (Siehe Tabelle 12 in Anhang A) ersetzt. Da Kinesin schnell spezifisch an Mikrotubuli bindet, kann unmittelbar nach der Zugabe der Meßlösung mit den Biegesteifigkeitsmessungen begonnen werden.

3.9 Kraftmikroskopie

Das Kraftmikroskop wurde 1986 in der Gruppe von Binnig entwickelt [11]. Es gehört zur Gruppe der Rastersonden-Nahfeldtechniken.

3.9.1 Aufbau und Arbeitsweise des Kraftmikroskopes

Eine Abtastspitze wird an einer weichen Blattfeder befestigt und tritt in direkten Kontakt mit der Probe. Dabei wird die Feder ausgelenkt. Diese Auslenkung wird mittels eines auf die Blattfeder fokussierten Laserstrahles detektiert. Die Quantifizierung erfolgt durch eine Zweisegment-Photodiode. Bei kleinen Auslenkungen ist das Differenzsignal der Segmente proportional zur Auslenkung der Blattfeder.

Die Probe wird auf einem segmentierten Röhrenpiezo befestigt und kann durch Anlegen einer Spannung an die Segmente in allen drei Dimensionen bewegt werden. Durch ein Scannen der Oberfläche in x- und y-Richtung kann im Rechner ein Höhenprofil der Probe rekonstruiert und somit die Oberfläche modelliert werden.

Konnte man in der Anfangszeit nur Festkörperoberflächen hochauflösend abbilden, so wurden mit der Zeit eine Vielzahl neuer Betriebsmodi entwickelt, die die unterschiedlichsten Untersuchungen zulassen. Mittlerweile ist es möglich, viskoelastische Eigenschaften von Zellen zu bestimmen [79]. Auch auf dem Gebiet der Nanotechnologie hat die Kraftmikroskopie Einzug gehalten. Durch die Entwicklung ultrascharfer und harter Spitzen können, wie mit einem winzigen Meißel, Strukturen in Halbleiteroberflächen eingeritzt [99],

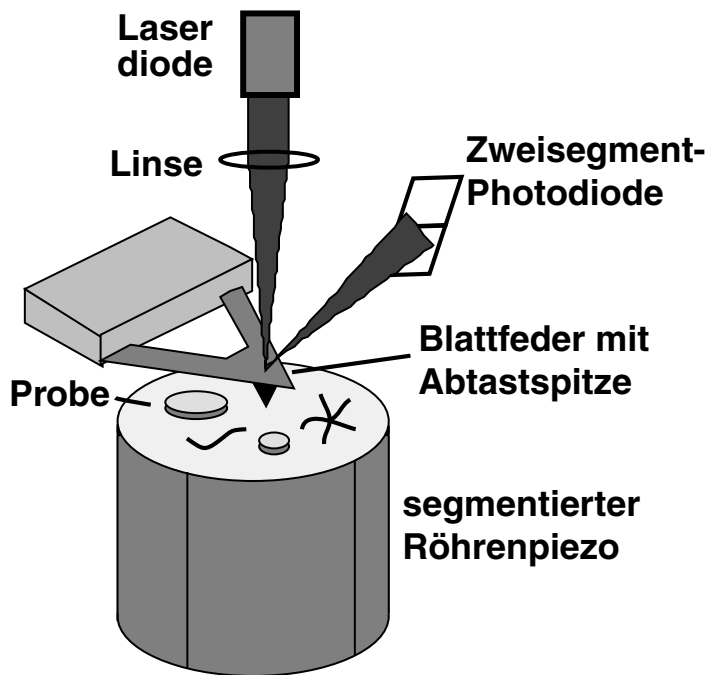


Abbildung 6: *Prinzip des Kraftmikroskopes*

oder durch das Anlegen einer Spannung lokale Oxidschichten aufgewachsen werden [74].

Ein großer Vorteil der Kraftmikroskope gegenüber anderen hochauflösenden Techniken liegt darin, daß auch in Flüssigkeit gearbeitet werden kann. Dadurch ist es möglich, Proteine unter nahezu physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Sogar Konformationsänderungen, die zwingend ein funktionelles Molekül voraussetzen, eines Proteins können beobachtet werden [34]. Für die in Zusammenarbeit mit Clara Sattler durchgeführten Messungen wurde ein spezialisiertes AFM verwendet, ein sogenanntes Kraftspektrometer.

3.9.2 Das Kraftspektrometer

Ziel der Messungen mit einem Kraftspektrometer ist die möglichst genaue Detektion von Kräften, die in einzelnen Polymeren oder Makromolekülen auftreten. Diese Kräfte werden durch das Detektionssystem nur durch Bewegung in der z-Richtung bestimmt.

Da sich laterale Bewegungen auf der Probe auf die Größe der gemessenen Kräfte auswirken, ist es wichtig, diese zu minimieren. Die in herkömmlichen

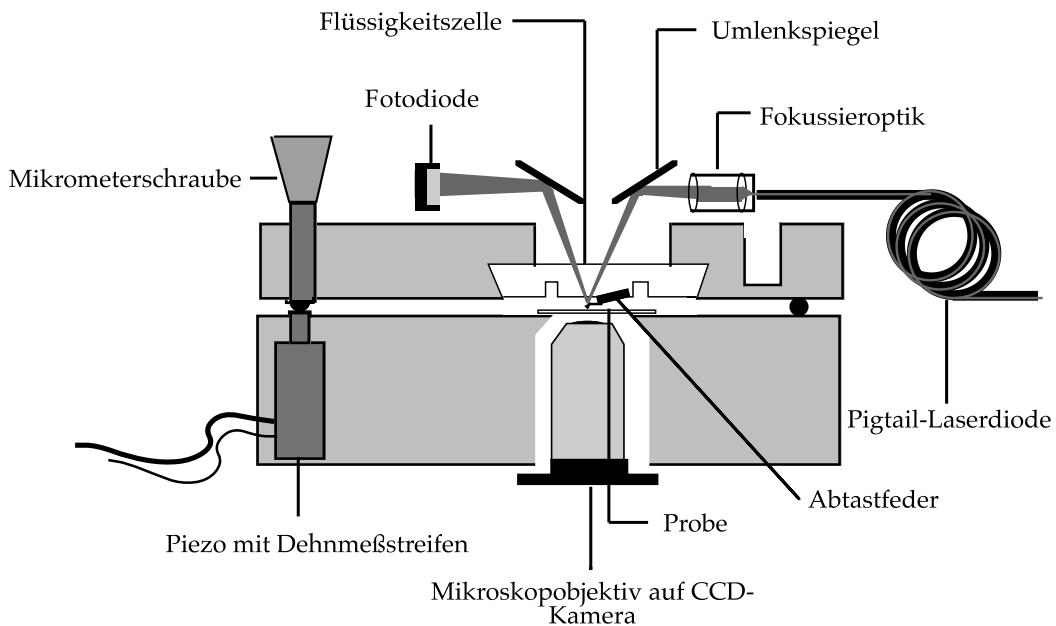


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Kraftspektrometers

Kraftmikroskopen üblicherweise verwendeten Röhrenpiezos lassen jedoch keine exakte Entkopplung der drei Raumrichtungen zu. Durch eine entsprechende Probenpräparation, bei der die zu untersuchenden Moleküle hinreichend dicht und homogen auf der Unterlage verteilt sind, kann auf eine laterale Bewegung ganz verzichtet werden. Das Kraftspektrometer läßt nur einen Bewegungsfreiheitsgrad zu und ist in Abbildung 7 dargestellt.

Für einen mechanisch stabilen Aufbau werden zwei massive Aluminiumplatten verwendet. Diese sind auf einer Seite mit einem Gelenk verbunden. Auf der anderen Seite wird der Abstand durch eine Mikrometerschraube und einen Piezoversteller geregelt. Auf der unteren Platte wird die Probe platziert, während an der oberen Platte die Abtastspitze befestigt wird. Mit der Mikrometerschraube kann eine Grobeinstellung vorgenommen und das Beladen des Mikroskops ermöglicht werden. Mittels des Piezoverstellers werden die Platten sehr präzise gegeneinander bewegt. Dadurch wird eine genaue Kontrolle des Abstandes zwischen Spitze und Probe erzielt. Die Detektion der Auslenkung der Abtastspitze erfolgt wie in herkömmlichen Kraftmikroskopen durch die Auswertung des Reflexes eines Laserstrahls, der auf die Spitze ausgerichtet ist, die sogenannte Lichtzeiger-Methode (Siehe Abb. 6).

3.9.3 Kraft–Abstands–Kurven

In Abb. 8 ist eine typische Meßkurve des Kraftspektrometers dargestellt. In a) und b) ist die Auslenkung des „Cantilevers“ gegen den Verstellweg des Piezo–Elementes aufgetragen. Die Eindrückkurve ist von rechts nach links aufgenommen. Zunächst ist der „Cantilever“ noch frei und schwingt um seine Ruhelage, während er an die Oberfläche angenähert wird. Sobald das Substrat berührt wird, erfährt der „Cantilever“ eine Kraft und wird in dem Maße ausgelenkt, in dem das Piezo–Element die Abtastspitze gegen die Oberfläche zu bewegen versucht.

Falls sich eine Wechselwirkung zwischen den Molekülen in der Probe und der Abtastspitze in der Phase des Eindrückens ausgebildet hat, werden diese Moleküle bei der Rückstellbewegung gedehnt und lenken dadurch den „Cantilever“ aus, bis sie abreißen und der „Cantilever“ wieder in seine Ruheposition zurückkehrt.

Aus dem Meßverlauf ist ersichtlich, welche Anwendungsmöglichkeiten es für das Kraftspektrometer gibt. Aus der Analyse der Eindrückkurve kann beispielsweise der osmotische Druck von Polymerfilmen bestimmt werden [75, 100]. Auch ist es möglich, die lokale Elastizität von lebenden Zellen zu ermitteln [79]. Da hierzu jedoch die Geometrie der Spitze recht genau bekannt sein muß, sind Kontrollmessungen nötig, die mit jeder einzelnen verwendeten Spitze wiederholt werden müssen, da jeder „Cantilever“ unterschiedlich ist. In der Rückstellbewegung lassen sich Abrisskräfte bestimmen. Wenn ausgeschlossen werden kann, daß diese Kräfte von unspezifischen Wechselwirkungskräften zwischen Spitze und Probe stammen, so können auf diesem Wege Ligand–Rezeptor–Bindungskräfte gemessen werden [33].

Für Messungen wie die eben beschriebenen ist die Auftragung der Kraft gegen den Verstellweg des Piezos ausreichend. Für eine Messung der Elastizität in Abhängigkeit vom Abstand der Spitze zur Probenoberfläche wird eine andere Auftragung benötigt, da die gewünschten Daten hier nicht direkt zugänglich sind. Ganz deutlich wird das an den Stellen der Meßkurven, an denen die Meßspitze in Kontakt mit der Probe ist. Hier ergibt sich eine Gerade mit endlicher Steigung, während die Meßspitze an der Oberfläche verharrt und nicht in diese eindringt. Folglich müßte die Flanke der Kraft–Abstands–Messkurve an der Oberfläche senkrecht abfallen, um die Elastizität wiederzugeben.

Kraft–Abstands–Kurven lassen sich mit einer einfachen Rechenoperation ermitteln, da die benötigten Informationen schon in den Kraftkurven enthalten sind. Um den Abstand a der Spitze vom Substrat zu bestimmen, muß die

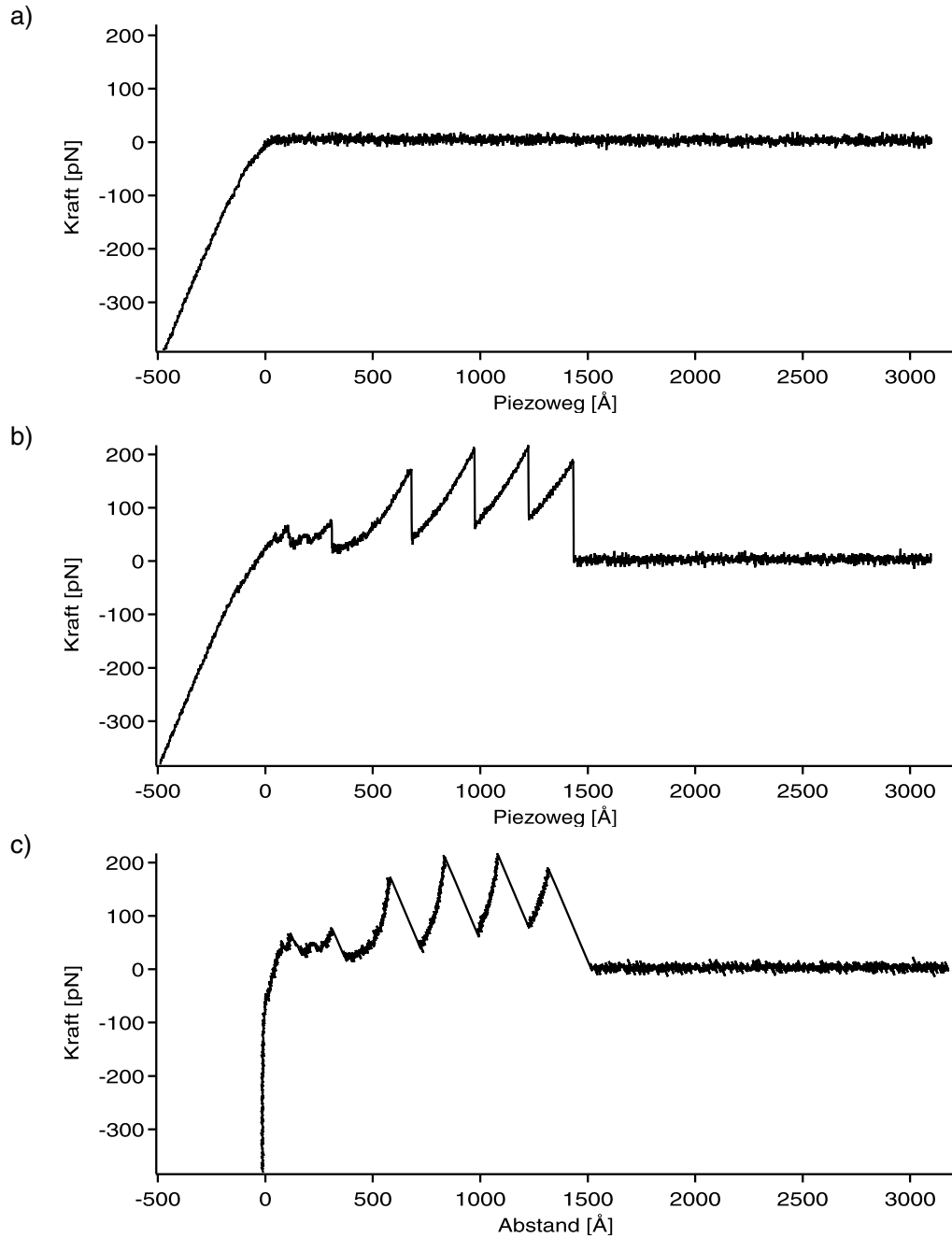


Abbildung 8: Kraftkurven eines Kraftspektrometers. Dargestellt sind: a) Eindrückkurve, b) Rückziehkurve und c) Kraft–Abstands–Kurve (berechnet aus b).

Verbiegung des Cantilevers von dem Piezo-Weg z abgezogen werden. Die Verbiegung kann aus dem Differenzsignal der Photodiode p_{a-b} abgelesen werden. Zur Skalierung dieses Signals ist die endliche Steigung s der Kraftkurve auf dem harten Substrat nötig, die aus dem Signal der Eindrückkurve berechnet werden kann [82]. Der Abstand Spitze Substrat berechnet sich so zu:

$$a = z - s \cdot p_{a-b} \quad (1)$$

In den Kraft-Abstands-Kurven lassen sich direkt die Kräfte ablesen, die auf ein zwischen Spitze und Substrat befindliches Molekül ausgeübt werden. Daraus kann die Elastizität des Moleküls bestimmt werden. Auf die Theorie zur Elastizität wird im folgenden Kapitel eingegangen.

4 Theoretische Grundlagen

Gegenstand der Arbeit waren zum einen Messungen von Biegesteifigkeiten einzelner Biomoleküle in einer optischen Falle und zum anderen Dehnungsexperimente in einem Kraftmikroskop. Um die Kraftwirkung und die Materialparameter zu charakterisieren und verstehen zu können, werden zunächst die theoretischen Grundlagen erörtert.

Zuerst wird auf die Ursachen der Krafterzeugung in der Laserfalle eingegangen. Im Anschluß wird das verwendete Modell für die Biegemessungen vorgestellt, und der Weg beschrieben, auf dem der Materialparameter Biegesteifigkeit gewonnen wurde. Schließlich folgt eine Betrachtung der strukturabhängigen Elastizität von Proteinen, die Grundlage zur Aussagekraft der gemessenen Kraft–Auslenkungs–Kurven bei den Dehnungsexperimenten ist.

4.1 Lichtkräfte in der optischen Falle

4.1.1 Qualitative Beschreibung der Lichtkräfte

Zunächst soll die Laserfalle rein qualitativ beschrieben werden. Im Bild der Wellenoptik ist der elektromagnetische Feldgradient zu betrachten. Dieser ist im Fokus des Laserstrahls maximal. In einem dielektrischen Teilchen wird durch diesen Feldgradienten ein Dipolmoment erzeugt [49]. Bei einem höheren Brechungsindex als dem des umgebenden Mediums wird dieser Dipol durch die Lorentz–Kraft in Richtung des maximalen Gradienten gezogen. Im Falle eines geringeren Brechungsindex entsteht eine entgegengerichtete Kraft.

In der Anwendung der geometrischen Optik ergibt sich eine sehr anschauliche Darstellung. Bei einer Brechung an der Ein- und Austrittsfläche eines dielektrischen Objektes – bevorzugt einer Kugel – ergibt sich jeweils eine Richtungsänderung des betrachteten Lichtstrahles und daraus resultierend eine Impulsänderung. Aufgrund der Impulserhaltung muß daher eine Kraft, in der Geometrie eines auf einen Punkt fokussierten Strahlbündels, auf das Objekt wirken, die grundsätzlich auf den Fokuspunkt gerichtet ist (Siehe auch Abb. 10 auf S. 39).

Da der von Photonen übertragene Impuls gering ist, benötigt man eine intensive Lichtquelle, wie sie nur ein Laser darstellt, sowie einen großen Öffnungswinkel des fokussierten Strahles, der durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur erzielt wird.

Über die Lichtkräfte gibt es nur für einfache Geometrien der gefangenen Objekte, wie Vollkugeln und Vollzylinder quantitative Aussagen. Das größte Problem für eine theoretische Beschreibung stellt die Modellierung des stark fokussierten Lichtbündels dar. Bei sehr kleinen Objekten, deutlich unterhalb der Lichtwellenlänge λ (Rayleigh–Streuung) kann das Feld durch eine ebene Welle genähert werden. Dieser Fall trifft beispielsweise auf direkt gegriffene Mikrotubuli zu. Sind die Objekte deutlich größer als λ (Mie–Bereich), dann lassen sich die Kräfte mit Lichtstrahlen in der geometrischen Optik erklären. In der Zellbiologie ist oftmals der Übergangsbereich, um $1 \mu\text{m}$, interessant. Um auch diesen Bereich modellieren zu können, wurde eine verallgemeinerte Lorenz–Mie–Theorie entwickelt, mit der sich auch das stark fokussierte Lichtbündel der Einstrahl–Falle beschreiben läßt [39, 66, 81].

4.1.2 Das Gauß’sche Bündel

Zur quantitativen Bestimmung der Lichtkräfte benötigt man eine möglichst genaue Beschreibung des Strahlbündels. In der verwendeten optischen Falle wurde ein Nd:YAG-Laser verwendet, der in der TEM₀₀-Mode betrieben wird. Die Eigenschaften des hierdurch erzeugten Lichtbündels sollen nun kurz beschrieben werden.

Ein Lichtstrahl, wie er in der geometrischen Optik verwendet wird, zeichnet sich dadurch aus, daß er beliebig dünn ist und geradlinig aus dem Unendlichen kommt, um wieder im Unendlichen zu verschwinden. Diese Definition ist nur für den Grenzfall $\lambda \rightarrow 0$ gültig. Hierbei gibt der Lichtstrahl die Richtung des Energieflusses an und steht senkrecht auf der Richtung der elektromagnetischen Welle.

Ein reales Strahlbündel folgt natürlich nicht diesen künstlichen Bedingungen, sondern einer radialen Gauß’schen Intensitätsverteilung. Fokussiert man es, so entsteht ein Gauß’sches Bündel, wie es in Abb. 9 dargestellt ist.

Die maximale Intensität im Fokus beträgt

$$I_0 = \frac{2P}{\pi w_0^2} \quad (2)$$

wobei P für die Laserleistung und w_0 für den minimalen Bündelradius an der Taille steht. Die Intensitätsverteilung in der Fokusebene folgt einer Gauß–Funktion und wird durch

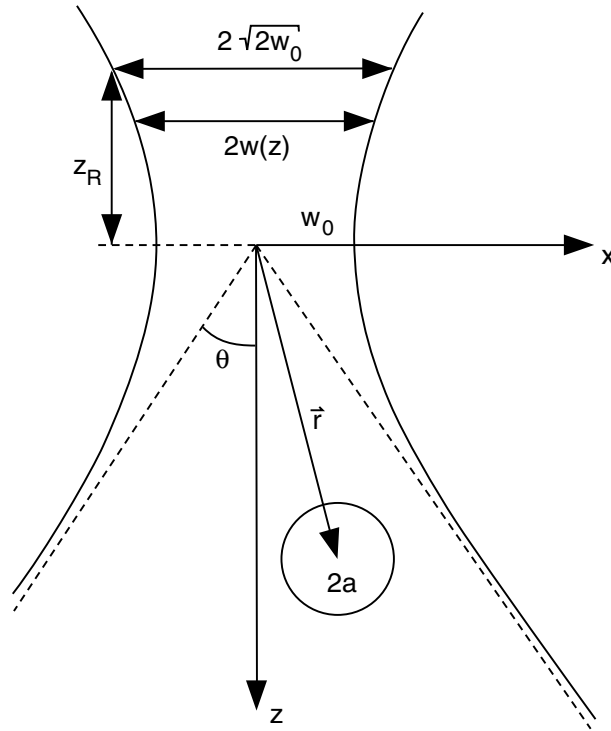


Abbildung 9: Gauß'sches Bündel: Eine Kugel mit dem Radius a befindet sich in der Position \vec{r} im Gauß'schen Bündel. Die Strahltaile hat einen Durchmesser von $2w_0$ und eine Länge von $2z_R$. 2Θ ist der Öffnungswinkel des Lichtkegels. Die durchgezogenen Randlinien bezeichnen die Positionen, an denen die radiale Intensität auf den e -ten Bruchteil der Maximalintensität abgefallen ist. (Nach [29])

$$I(x, y) = I_0 \cdot e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{w_0^2}} \quad (3)$$

beschrieben. Die in Abb. 9 dargestellten Bündelgrenzen stellen die Position dar, an der die Intensität senkrecht zur Strahlachse auf den e -ten Bruchteil der Maximalintensität abgefallen ist. Der Bündelradius ist eine Funktion des Abstandes z von der Strahltaile $z_0 = 0$.

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (4)$$

Dabei bezeichnet z_R die Distanz in z -Richtung, an der sich der Strahl – von der Taille aus gemessen – um den Faktor $\sqrt{2}$ verbreitert hat. Diese Länge

wird auch als Rayleigh-Länge bezeichnet.

Durch die Strahl-Verbreiterung ändert sich die Maximalintensität abhängig von der z -Position wie

$$I(z) = \frac{I_0}{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (5)$$

Zusammenfassend läßt sich also die Intensität an einem beliebigen Punkt im Raum relativ zu dem Zentrum der Strahltaile bestimmen als

$$I(\vec{r}) = \frac{\frac{2P}{\pi w_0^2}}{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \cdot e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{w_0^2 \left(1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2\right)}} \quad (6)$$

Bei starker Bündelung des Lichtes ergeben sich Abweichungen von dieser idealisierten Betrachtung. Auch treten Beugungseffekte und Abbildungsfehler am Objektiv, sowie an Grenzflächen auf, die zu weiteren Diskrepanzen mit den idealisierten Bedingungen führen. Eine quantitative Auswertung der Gleichung 6 in Bezug auf die verwendete Falle kommt daher nicht in Betracht, für ein prinzipielles Verständnis sind die Abweichungen jedoch unerheblich.

4.1.3 Kraftwirkung im Rayleigh-Bereich

Bei Objekten, deren Größe deutlich kleiner als die Wellenlänge des zum einfangen verwendeten Lichtes ist ($d \ll \lambda$), befindet man sich in dem sogenannten Rayleigh-Bereich. Das Licht wird hier als elektromagnetische Welle beschrieben, die in dem Objekt ein Dipolmoment induziert. Dabei wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem induzierten Feld um ein Punkt-Dipol-Feld handelt. Die durch das Licht auf den Dipol wirkende Kraft kann in zwei Komponenten aufgespalten werden. Die eine ist die Streukraft, die andere die Gradientenkraft.

Als Ursache der Streukraft gilt die Impulsänderung beim Vorgang der Streuung des Lichtes. Das in Form einer Kugelwelle gestreute Licht besitzt einen mittleren Impuls von Null und daher übernimmt das streuende Teilchen den Impuls der eingestreuenden Strahlung. Die Streukraft wirkt in Richtung der Ausbreitungsrichtung des Lichtes.

In dem Teilchen wird ein Dipolmoment induziert, das mit dem elektromagnetischen Feld des Lichtes wechselwirkt. Daraus resultiert eine Lorentzkraft, die entlang des stärksten Feldgradienten wirkt und daher hier als Gradientenkraft bezeichnet wird. Bei Objekten mit einem höheren Brechungsindex n_p als dem des umgebenden Mediums (n_m) weist die Kraft in Richtung der höchsten Felddichte.

Die Gradientenkraft \vec{F}_{grad} resultiert aus der Wechselwirkung des induzierten Dipolmoments \vec{p} mit dem Feldgradienten,

$$\vec{F}_{grad}(\vec{r}, t) = [\vec{p}(\vec{r}, t) \cdot \nabla] \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (7)$$

oder

$$\vec{F}_{grad}(\vec{r}) = 2\pi a^3 \left(\frac{n_{\text{eff}}^2 - 1}{n_{\text{eff}}^2 + 2} \right) \varepsilon_0 n_m^2 \nabla \langle E^2(\vec{r}, t) \rangle \quad (8)$$

In Gleichung 8 wurde für den Dipol

$$\vec{p}(\vec{r}, t) = 4\pi a^3 \left(\frac{n_{\text{eff}}^2 - 1}{n_{\text{eff}}^2 + 2} \right) \varepsilon_0 n_m^2 \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (9)$$

eingesetzt. Dabei wird die elektrische Feldkonstante mit ε_0 , die effektive optische Dichte des Partikels relativ zum umgebenden Medium mit $n_{\text{eff}} = n_p/n_m$ und der Radius des Partikels mit a bezeichnet.

Um die Streukraft \vec{F}_{streu} ausdrücken zu können, wird die Energiestromdichte (Poynting-Vektor) $\vec{S}(\vec{r}, t) = \vec{E}(\vec{r}, t) \times \vec{H}(\vec{r}, t)$ benötigt, die durch das elektromagnetische Feld der einfallenden Strahlung bestimmt ist. \vec{E} und \vec{H} stellen das elektrische und magnetische Feld dar. Mit dem Streuquerschnitt C_{streu} :

$$C_{\text{streu}} = \frac{8\pi}{3} (ka)^4 a^2 \left(\frac{n_{\text{eff}}^2 - 1}{n_{\text{eff}}^2 + 2} \right)^2 \quad (10)$$

sowie

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} n_m \quad (11)$$

ergibt sich die Streukraft folgendermaßen:

$$\vec{F}_{\text{streu}}(\vec{r}) = \frac{n_m}{c} C_{\text{streu}} \langle \vec{S}(\vec{r}, t) \rangle = \hat{s} \frac{8\pi}{3} (ka)^4 a^2 \left(\frac{n_{\text{eff}}^2 - 1}{n_{\text{eff}}^2 + 2} \right)^2 \frac{n_m}{c} I(\vec{r}) \quad (12)$$

Der Einheitsvektor in Ausbreitungsrichtung des Lichtes wird dabei mit \hat{s} bezeichnet. c ist die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum.

Durch einen Kräftevergleich der Gradienten- mit der Streukraft läßt sich bei ausreichender Fokussierung des Strahles feststellen, daß sich ein stabiles Potentialminimum knapp unterhalb der Taille bildet.

4.1.4 Kraftwirkung im Mie-Bereich

Sind die zu fangenden Objekte deutlich größer als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes ($d \gg \lambda$), dann spricht man vom sogenannten Mie-Bereich. In diesem Bereich kann die geometrische Optik angewandt werden. Das heißt, unser zu betrachtendes Strahlbündel besteht aus vielen unendlich dünnen Strahlen, die an dem Objekt gebeugt und reflektiert werden.

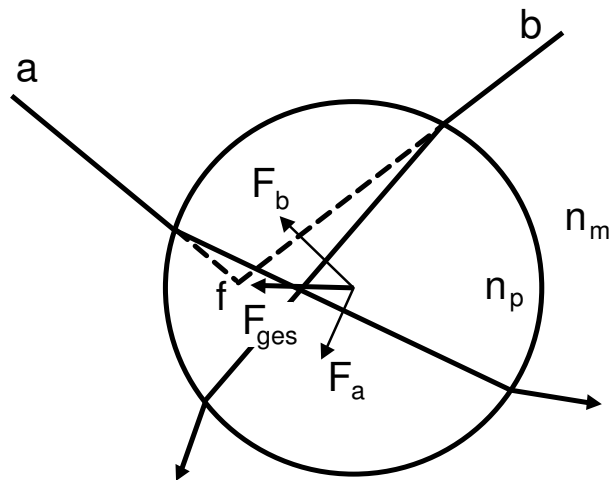


Abbildung 10: Kräfte im Mie-Bereich. Gezeigt ist eine Kugel, die seitlich außerhalb des Fokus eines Lichtbündels sitzt. Durch die Brechung des Lichtes an der Kugel, deren Brechungsindex höher als der des umgebenden Mediums ist, entstehen Kräfte F_i , deren Summe F_{ges} in Richtung des Fokus f ohne Anwesenheit der Kugel weist.

Zunächst wird der Effekt der Reflexion vernachlässigt. Bei einer Betrachtung dessen, was mit zwei symmetrisch um die Bündel-Achse liegenden Lichtstrahlen passiert, können gut die Kräfte beschrieben werden, die von dem

gesamten Bündel auf die Kugel ausgeübt werden. Bei einer seitlichen Ablenkung der Kugel, wie es in Abbildung 10 dargestellt ist, wird eine seitliche Ablenkung des Lichtbündels verursacht. Integriert man die Kräfte aller gebrochenen Strahlen auf, so ergibt sich grundsätzlich eine Gesamtkraft F_{ges} , die in Richtung des Fokus des Bündels ohne Anwesenheit der Kugel weist. Befindet sich die Kugel unterhalb des Fokus, so wird das Strahlbündel durch diese fokussiert, befindet sie sich oberhalb, so wird es aufgeweitet.

Wird zusätzlich zur Brechung die Reflexion betrachtet, so ist festzustellen, daß diese, vergleichbar mit der Streukraft im Rayleigh-Bereich, die Kugel im wesentlichen vor sich her treibt. Somit ergibt sich auch im Mie-Bereich – bei hinreichend hoher Bündelung – ein Potentialminimum leicht unterhalb der Strahltaile.

Bei der Verwendung der Laserfalle zur direkten Manipulation von Mikrotubuli spielt der Mie-Bereich keine Rolle, da der Durchmesser der Mikrotubuli (24 nm) deutlich kleiner ist als die Wellenlänge des Strahlbündels (1064 nm). Die Wirkung der Falle ist jedoch mit der geometrischen Optik leichter zu verstehen und anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß kein grundsätzlicher Unterschied zwischen den beiden Regimes besteht.

4.2 Charakterisierung des Meßparameters Biegesteifigkeit

Zur Behandlung der Biegung eines Mikrotubulus werden die Methoden der linearen Elastizitätstheorie angewandt. Vereinfachend wird der Mikrotubulus als langer, dünner Stab betrachtet. Bei einem Durchmesser von etwa 24 nm und einer Länge von ca. 10 μm ist die Bedingung erfüllt, daß der Durchmesser klein sein muß im Vergleich zur Länge. Auch wird der Stab in der Theorie als isotrop betrachtet [63]. Auf einer Nanometer-Skala widerspricht das zwar der Realität, da hier die Struktur der Tubulin-Moleküle auszumachen ist, bei der Betrachtung eines kompletten Stabes spielt dies jedoch keine entscheidende Rolle.

4.2.1 Elastizitätstheorie zur Biegung von langen, dünnen Stäben

Zur Untersuchung der Biegung wird ein kleiner Stababschnitt betrachtet, dessen Krümmungsradius R groß gegenüber der Abschnittslänge ist. Deshalb wird die Biegung als schwach bezeichnet. Der Stab wird in einem bestimmten Bereich gedehnt, und in einem anderen komprimiert. Der Verlauf der Nor-

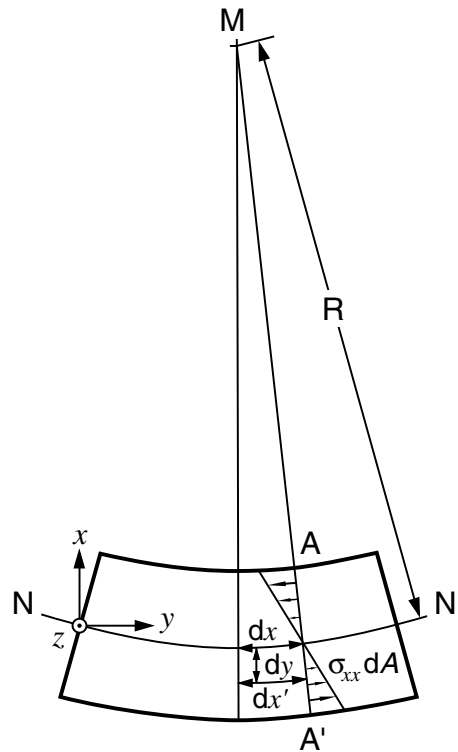


Abbildung 11: Schnitt durch einen kurzen Abschnitt eines gebogenen Stabes. Die Linie $\overline{NN'}$ beschreibt den Verlauf der Spannungsneutralität, M ist der Krümmungsmittelpunkt, R stellt den Krümmungsradius dar. Die Länge des ungebogenen Stabsegmentes ist dx , im Abstand dy von der neutralen Linie ist sie dx' . Der Verlauf der inneren Spannung σ_{xx} ist entlang der Linie $\overline{AA'}$ angedeutet. Skizziert nach [10].

Die Spannung σ_{xx} wird in der Abbildung 11 entlang der Linie $\overline{AA'}$ skizziert. Im Stab entsteht eine Fläche (entsprechend $\overline{NN'}$ in der Schnittzeichnung), in der die Spannung σ_{xx} parallel zur Stabachse verschwindet [10, 32, 63]. In diese Fläche, die auch *neutrale Fläche* genannt wird, wird der Koordinatenursprung gelegt. Dabei bestimmt die Richtung des ungebogenen Stabes die x -Achse, die Biegerichtung die y -Achse.

Um die relative Dehnung in jedem Punkt des Stabes zu quantifizieren werden die folgenden Überlegungen angestellt. Die Länge dx des Stababschnittes in der neutralen Fläche bleibt unverändert, während sie sich im Abstand y auf die Länge dx' verändert. Bei einem Krümmungsradius R der neutralen Fläche lassen sich dx und dx' als Bogenelemente von Kreisen mit den Radien R und $R+y$ auffassen. Daraus ergibt sich die Relation

$$dx' = \frac{R+y}{R}dx = \left(1 + \frac{y}{R}\right) dx \quad (13)$$

und somit eine relative Längenänderung im Abstand y von der neutralen Fläche zu

$$\frac{dx' - dx}{dx} = \frac{y}{R} \quad (14)$$

Aufgrund des Hook'schen Gesetzes ist die relative Längenänderung proportional zur Kraft pro Flächeneinheit, der Spannung σ_{xx} . Hieraus folgt:

$$\sigma_{xx} = E \frac{y}{R} \quad (15)$$

wobei E das Elastizitätsmodul des Stabmaterials darstellt.

Zu den lokalen Längenänderungen wird durch die inneren Kräfte zudem ein Drehmoment M_z bewirkt. Dieses wird auch als *Biegemoment* bezeichnet:

$$M_z = \int_A y dF = \int_A y \sigma_{xx} dA = \frac{E}{R} \int_A y^2 dA = \frac{EI_z}{R} \quad (16)$$

A bezeichnet hierbei die Querschnittsfläche. Der Ausdruck $I_z = \int_A y^2 dA$ stellt das *Flächenträgheitsmoment* dar und wird im folgenden nur noch als I bezeichnet.

Wie im vorlaufenden dargestellt, läßt sich bei einem isotropen Stab das Elastizitätsmodul E und das Flächenträgheitsmodul I separieren. Im Fall des anisotropen Mikrotubulus läßt sich nur die Biegesteifigkeit EI als gesamtes darstellen.

Zu weiteren Berechnungen zur Biegesteifigkeit wird noch einmal Formel 16 aufgegriffen. Bei der Betrachtung der gesamten Kontur eines gebogenen Stabes läßt sich diese auch folgendermaßen ausdrücken [12]:

$$M = EI \frac{\frac{d^2y}{dx^2}}{\sqrt{\left(1 + \left(\frac{dy}{dx}\right)^2\right)^3}} \quad (17)$$

Unter der Annahme einer schwachen Biegung ist die erste Ableitung der Biegelinie $\frac{d}{dx}y$ klein gegen eins und kann deshalb vernachlässigt werden. Somit vereinfacht sich Gleichung 17 zu

$$M = EI \frac{d^2 y}{dx^2} \quad (18)$$

Durch fortgesetztes Ableiten erhält man zunächst die lokale Kraft

$$F = EI \frac{d^3 y}{dx^3} \quad (19)$$

und schließlich die Kraft pro Längeneinheit

$$f = EI \frac{d^4 y}{dx^4} \quad (20)$$

4.2.2 Biegung durch eine Punktkraft

Zunächst soll eine Kraft F_{\perp} betrachtet werden, die punktförmig am freien Ende des Mikrotubulus angreift und senkrecht auf seiner Ruhelage steht. Aus den Formeln 18 und 19 ergibt sich die Relation

$$M = F_{\perp}(L - x) \quad (21)$$

Durch Einsetzen unter den Randbedingungen für ein fest eingespanntes Ende:

$$y|_{x=0} = 0 \quad (22)$$

und

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{x=0} = 0 \quad (23)$$

und zweimalige Integration läßt sich die Biegelinie $y_{\perp}(x)$ zu

$$y_{\perp}(x) = \frac{F_{\perp} L^3}{6EI} \cdot \left[- \left(\frac{x}{L} \right)^3 + 3 \left(\frac{x}{L} \right)^2 \right] \quad (24)$$

und die maximale Auslenkung am freien Ende zu

$$y_{\perp}(L) = \frac{F_{\perp} L^3}{3EI} \quad (25)$$

bestimmen.

4.2.3 Einfluß der hydrodynamischen Reibungskraft auf einen gebogenen Stab

Wirkt an Stelle der Punktkraft ein linearer Kraftgradient auf den Stab, so läßt sich die Kraftdichte f als Funktion der maximalen Kraftdichte f_{\max} darstellen als

$$f = f_{\max} \frac{x}{L} = EI \frac{d^4 y}{dx^4} \quad (26)$$

Somit ergibt sich die Biegelinie zu

$$y(x) = \frac{f_{\max} L^4}{120EI} \left[\left(\frac{x}{L} \right)^5 - 10 \left(\frac{x}{L} \right)^3 + 20 \left(\frac{x}{L} \right)^2 \right] \quad (27)$$

und die maximale Auslenkung beträgt

$$y(L) = \frac{11 f_{\max} L^4}{120EI} \quad (28)$$

Bei schwachen Auslenkungen ($x \ll L$) sind die Terme höherer Ordnung in der Biegelinie vernachlässigbar und die Kontur des Stabes als Parabel zu betrachten.

Um den Effekt der hydrodynamischen Reibungskraft auf einen gebogenen Mikrotubulus näher zu untersuchen, wird zunächst die Wechselwirkung der Flüssigkeit mit dem Mikrotubulus betrachtet. Bei der Wechselwirkung von Objekten mit Flüssigkeiten wird zwischen zwei Grenzfällen unterschieden, der laminaren Strömung, bei der die Reibung maßgeblich ist, und der turbulenten Strömung, bei der die Trägheit entscheidenden Einfluß hat. Ein Maß hierfür stellt die Reynolds-Zahl dar [40]. Ein Wert von weniger als eins charakterisiert eine vorwiegend laminare Strömung, bei Werten größer eins spricht man von einer turbulenten Strömung. Je weiter der Wert von eins abweicht, um so deutlicher ist der entsprechende Strömungscharakter ausgeprägt. Die Reynolds-Zahl berechnet sich aus der Formel

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot v \cdot a}{\eta} \quad (29)$$

Für die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sind $\rho = 1 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$ die Dichte und $\eta = 1 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m}\cdot\text{s}$ die Viskosität des wäßrigen Puffers. v

beschreibt die Geschwindigkeit des Objektes, die typischerweise etwa $10 \mu\text{m/s}$ beträgt. Für a , welches die charakteristische Länge des Objektes ausdrückt, wird $10 \mu\text{m}$ als typische Länge der Mikrotubuli eingesetzt. Daraus ergibt sich eine Reynolds-Zahl von $\text{Re} = 10^{-4}$, weshalb Trägheitseffekte vernachlässigt werden können [42].

Vereinfachend wird der Mikrotubulus als Zylinder betrachtet. Da durch die niedrige Reynolds-Zahl keine Trägheitseffekte zu berücksichtigen sind, wird die auftretende Kraft instantan in Bewegung umgesetzt. Die Geschwindigkeit dieser Bewegung ist durch die Reibung in der umgebenden Flüssigkeit bestimmt. Unter der Annahme einer parabelförmigen Biegelinie ergibt sich ein linearer Kraftdichte-Anstieg entlang der Mikrotubuli-Kontur [94, 95]. Somit beträgt die Geschwindigkeit $v = 0$ am fest eingespannten Ende und nimmt linear mit $v = v_{\max} \frac{x}{L}$ zu bis $v = v_{\max}$ am freien Ende. Dies führt zu einer von der Auslenkung des freien Endes $y(L)$ abhängigen Maximalgeschwindigkeit

$$v_{\max} = \frac{11\pi\eta y(L)L^4}{60EI \ln \frac{L}{2d}} \quad (30)$$

Bei den durchgeführten Biegemessungen wurde die Auslenkung des freien Endes aus der Ruhelage im zeitlichen Verlauf analysiert. Aus der vorhergehenden Gleichung ergibt sich für den zeitlichen Verlauf der Endposition

$$\Delta y(t) = y(L, t) = \frac{11\pi\eta v_{\max} L^4}{60EI \ln \left(\frac{L}{2d}\right)} \quad (31)$$

Des weiteren ist der zeitliche Verlauf der maximalen Geschwindigkeit abhängig von der Position des Mikrotubulus-Endes:

$$v_{\max}(t) = \frac{\partial}{\partial t} \Delta y(t) \quad (32)$$

Aus den Gleichungen 31 und 32 ergibt sich für den zeitlichen Verlauf der Auslenkung eine Differentialgleichung erster Ordnung, die sich zu

$$\frac{\Delta y(t)}{\Delta y(0)} = e^{-\frac{60 \ln \left(\frac{L}{2d}\right)}{11\pi\eta L^4} \cdot EI \cdot t} \quad (33)$$

lösen läßt. Für die Berechnung der Biegesteifigkeit muß durch eine Kurvenanpassung der Exponent bestimmt werden. Dieser hängt für kleine Auslenkungen nicht von der Auslenkung ab und enthält zudem nur bekannte oder

einfach zu messende Parameter. Der Durchmesser des Mikrotubulus d (24 nm) und die Viskosität η des verwendeten Puffers (10^{-3} kg/m·s) sind bekannt und die Länge L des jeweils beobachteten Mikrotubulus läßt sich auf etwa 100 nm genau bestimmen.

4.3 Elastische Kräfte in Proteinen

Für die biologische Funktion der Proteine ist der strukturelle Aufbau essentiell. Oft bilden Aminosäuren, die in der Sequenz weit voneinander getrennt sind, gemeinsame Strukturen. So wird beispielsweise die ATP-Bindungstasche des *N. crassa* Kinesins von vier Motiven gebildet. Diese umfassen die Aminosäuren 14-17, 88-95, 202-207 und 235-240. Die Polypeptid-Stränge, aus denen sich Proteine zusammensetzen falten sich nicht zufällig. Spezifische intramolekulare Bindungen führen zu einer festgelegten Struktur. Für ihre Untersuchung stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Dazu zählen zirkulare Dichroismus-Spektroskopie, NMR (Magnetische Kernresonanz)-Spektroskopie, Infrarot-Spektroskopie oder auch Kraftspektroskopie. Für den Schwanz-Bereich des Kinesin-Moleküls wurde die Kraftspektroskopie gewählt. Als Grundlage sollen hier die Modelle zur Elastizität von Polypeptidketten erläutert werden.

4.3.1 Das „Worm-like chain“ Modell

Zur Elastizität einer Kette tragen grundsätzlich zwei Anteile bei. Für den ersten wird die Anzahl der Konformationen betrachtet, die die Kette bei einer bestimmten Dehnung einnehmen kann. Dieser Beitrag wird als Entropie bezeichnet. Bei geringer Dehnung ist der Hauptteil der Kraft einer Kette durch den Entropieanteil gegeben. Wächst die Kraft, so kommt ein weiterer Anteil zum Tragen. Dabei handelt es sich um die enthalpischen Kräfte, die aus der Verbiegung von Bindungswinkeln herrühren.

Zunächst soll die Gauß'sche Kette kurz betrachtet werden. Hierbei handelt es sich um ein einfaches Modell, in dem nur entropische Kräfte auftreten können. Ein Molekül wird durch eine Kette von steifen Stäben (Länge ϕ) modelliert. Diese sind in ihren Endpunkten frei drehend verbunden und auch ein gegenseitiges Durchdringen der Stäbe ist möglich. Bei einer Segmentlänge ϕ , die weit unterhalb der Konturlänge L liegt, ergibt sich die Kraftantwort des Moleküls auf eine Dehnung zu

$$F(x) = \frac{k_B T \phi}{l_K L} \quad (34)$$

wobei l_K die Kuhn'sche Segmentlänge ist und für das Molekül individuell angepasst wird. Eine Polypeptidkette würde in diesem Modell wie eine ideale Feder reagieren.

Geht man zu größeren Dehnungen der Kette über, so ist eine Grundvoraussetzung des eben beschriebenen Modells nicht mehr erfüllt. Die Segmente können nicht mehr ungeordnet sein sondern sind durch die äußere Kraft vorwiegend an dieser ausgerichtet. Als erweitertes Modell kommt hier das „Freely Jointed Chain“ (FJC)–Modell zum tragen. Hierbei ist das Polymer erneut in n starre Stäbe der Länge l_K unterteilt, die mit flexiblen Gelenken miteinander verbunden sind. Wechselwirkungen auf eine längere Distanz werden nicht in Betracht gezogen. Unter diesen Annahmen kann die Dehnung x in Abhängigkeit der Kraft F ausgedrückt werden.

$$x(F) = L \left[\coth \left(\frac{Fl_K}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fl_K} \right] = LL \left(\frac{Fl_K}{k_B T} \right) \quad (35)$$

Die Funktion $\mathbf{L}(x)$ bezeichnet die Langevin Funktion $e^x - e^{-x} - \frac{1}{x}$. Für den Fall sehr kurzer Segmente oder einer langen Konturlänge (Grenzwert für $x \ll L$) läßt sich eine Näherungslösung zur inversen Langevin Funktion \mathbf{L}^{-1} angeben.

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_K} \mathbf{L}^{-1} \left(\frac{x}{L} \right) \quad (36)$$

Bei geringen Auslenkungen bleibt immer noch ein elastisches Verhalten entsprechend des Hook'schen Gesetzes erhalten. Dieses wird aber durch andere Effekte bei größeren Auslenkungen überlagert.

Um nun auch Dehnungseffekte des Moleküles an sich in Betracht zu ziehen, kann die Gleichung 35 erweitert werden. Wurde zuvor eine Kette von starren Stäben betrachtet, so werden diese nun durch Federn ersetzt. Da diese zusätzliche Elastizität ein genaues Wissen über Bindungswinkel und -längen sowie deren Änderung erfordert, das meist nicht vorhanden ist, wird die Elastizitätskonstante κ als Parameter zur Anpassung verwendet. Typische Werte liegen im Bereich 1 Nm^{-1} [51].

$$x(F) = LL \left(\frac{Fl_K}{k_B T} \right) \left(1 + \frac{F}{\kappa L} \right) \quad (37)$$

Mit diesem erweiterten FJC-Modell können beispielsweise Polysaccharide gut beschrieben werden. Für eine Reihe anderer Polymere werden bestimmte Aspekte jedoch nicht durch solch ein einfaches Modell erklärt. Aus diesem Grund soll hier noch ein weiteres Modell eingeführt werden. Es handelt sich um das „Worm-like Chain“ (WLC)-Modell. Die Vorteile dieses Modells kommen hauptsächlich bei steifen Polymeren zum Tragen.

Wie der Name des Modells schon andeutet, wird hierbei das Polymer nicht durch steife Stäbe beschrieben, sondern durch eine kontinuierliche Kurve, eine „wurmformige Kette“. Das Modell, das auf Kratky und Porod zurückgeführt wird [59], beschreibt ein Polymer als einen homogenen Faden mit konstanter Biegesteifigkeit. Obwohl hierbei sowohl entropische als auch enthalpische Effekte berücksichtigt werden, ist die Dehnung weiterhin durch die Konturlänge des Polymers limitiert. Die folgende Näherungslösung stellt einen Ausdruck für die Kraft-Ausdehnungs-Beziehung dar, die bis hin zu einigen 100 pN gute Ergebnisse liefert.

$$F(x) = \frac{(k_B T)^2}{B} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L}\right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right] = \frac{k_B T}{p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L}\right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right] \quad (38)$$

Die Persistenzlänge p ist ein Maß für die Flexibilität des Moleküls. B stellt den Biegemodulus des Polymers dar. Aus dem Zusammenhang zwischen Biegemodulus und Persistenzlänge ist ersichtlich, daß die Persistenzlänge von der angelegten Kraft abhängig ist. So fällt die Persistenzlänge der Titin Ig-Domänen von 8 Å bei geringen äußeren Kräften bis auf 4 Å bei angelegten Kräften von mehr als 50 pN ab. Die Persistenzlänge zeigt an, über welche Distanz zwei Punkte auf der Kette sich korreliert bewegen. Bei einem geringeren Abstand als p kann das Molekül als starr angesehen werden und zwei Punkte auf der Kontur bewegen sich synchron, während die Korrelation bei Abständen größer p verloren geht.

Bei sehr kleinen Auslenkungen aus der Ruhelage nivellieren sich die Abweichungen des FJC- und des WLC-Modells. In diesem Grenzfall hängen die Kuhn'sche Segmentlänge und die Persistenzlänge über die Gleichung $l_K = 2p$ zusammen. Beide Modelle verhalten sich wie eine ideale elastische Feder. Zur Beschreibung des elastischen Verhaltens von DNS oder des Muskelproteins Titin wurde das WLC-Modell erfolgreich eingesetzt.

Obwohl das WLC-Modell bereits entropische und enthalpische Effekte einbezieht, ist es noch kein ideales Modell. Bei stark gestreckten Konformationen

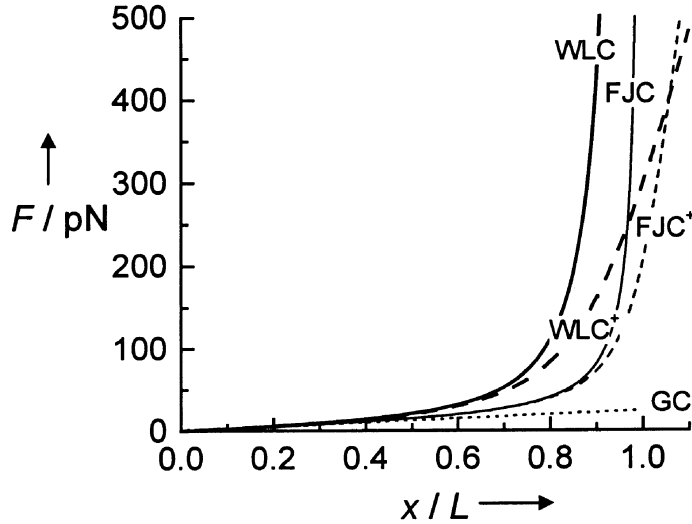


Abbildung 12: Vergleich der verschiedenen Modelle. Ein + bezeichnet jeweils die um die enthalpischen Terme erweiterten Modelle. Da die einzelnen Segmente im FJC-Modell unabhängig sind, ist diese Kette außerordentlich weich. Die in den Formeln verwendeten Parameter sind: $T=293.15$ K, $l_K=5$ Å, $p=2.5$ Å, $\kappa=50$ N/m, $\Phi=2500$ pN. (Entnommen aus [51])

muß die Elastizität der Kette in Betracht gezogen werden. Um diesen Effekt mit einzubeziehen, wurde das WLC-Modell nochmals erweitert.

$$F(x) = \frac{k_B T}{p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L} + \frac{F}{\Phi} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{F}{\Phi} - \frac{1}{4} \right] \quad (39)$$

Hierbei bezeichnet der Parameter Φ die interne Steifigkeit der Polymerkette. Ein Vergleich der Kraft–Auslenkungs–Kurven der verschiedenen Modelle zeigt die Abbildung 12.

4.3.2 Die superhelikale Struktur

Erhält man bei globulären Domänen eine Kraft–Auslenkungs–Kurve, die sich wie das WLC-Modell verhält und zu einem kontinuierlich wachsenden Kraftanstieg bei wachsender Auslenkung führt, so unterscheidet sich die Kurve von superhelikalen Strukturen stark davon. Zur Beschreibung des prinzipiell-

len Verlaufes sollen die Daten von Myosin II aus der Kaninchen Muskulatur dienen, da diese superhelikale Struktur am besten beschrieben ist.

Bei sehr geringen Auslenkungen steigt die Kraft kaum an. In diesem Stadium wird keine laterale Kraft auf die superhelikale Struktur ausgeübt, sondern das komplett gefaltete Molekül gestreckt. Anschließend steigt die Kraft an, bis die helikale Struktur beginnt aufzubrechen. Dies führt jedoch nicht, wie das von globulären Strukturen bekannt ist, zu einem Einbruch der Kraft, sondern es ergibt sich ein Plateau von nahezu konstanter Kraft. Schließlich steigt die Kraft wieder stark an, sobald das gesamte Molekül entfaltet ist und die Polypeptidkette gestreckt wird. Die theoretischen Grundlagen sollen nun genauer beleuchtet werden.

Während bei geringen Auslenkungen die Elastizität des Moleküls den wesentlichen Kraftbeitrag liefert, führen bei größeren Kräften strukturelle Veränderungen zu zusätzlichen Auslenkungen. Dabei wird postuliert, daß sich die einzelnen Domänen in zwei verschiedenen Zuständen befinden können, in einem gefalteten und einem ungefalteten.

Für die superhelikale Struktur wird nun angenommen, daß sie sich aus kleinen Segmenten zusammensetzt. Diese können unabhängig voneinander Entfalten und Rückfalten. Die Konturlänge dieser Segmente ändert sich dabei von l_1 im gefalteten zu l_2 im ungefalteten Zustand, während sich die Persistenzlänge von p_1 auf p_2 verringert. Die Konturlänge kann also zu

$$L_c = n_1 l_1 + n_2 l_2 \quad (40)$$

berechnet werden, wobei n_1 und n_2 die Anzahl der Segmente bezeichnet, die gefaltet bzw. ungefaltet sind. Des weiteren soll mit dem Ausdruck $x(F, p)$ die relative Ausdehnung bezeichnet werden, die ein Segment mit der Persistenzlänge p bei einer angelegten äußeren Kraft F im Verhältnis zu seiner Konturlänge im WLC-Modell einnimmt. Somit ergibt sich die kraftabhängige Ausdehnung zu

$$L(F) = n_1 l_1 x_1(F, p_1) + n_2 l_2 x_2(F, p_2) \quad (41)$$

Die freie Energie bestimmt, in welchem Zustand sich die einzelnen Segmente befinden. Im thermischen Gleichgewicht ist das Verhältnis von gefalteten und ungefalteten Molekülteilen, abhängig von der Kraft F , wie folgt:

$$\frac{n_2(F)}{n_1(F)} = e^{\frac{-\Delta G(F)}{k_B T}} \quad (42)$$

Die freie Energie $\Delta G(F)$ hängt von der Kraft ab. Die Abhängigkeit kann nach Bell [8] durch die Formel

$$\Delta G(F) = \Delta G(0) - F[l_2x_2(F) - l_1x_1(F)] \quad (43)$$

ausgedrückt werden. Zur Erklärung soll hier die Kramers Theorie für Reaktionsraten in einem System mit zwei Zuständen herangezogen werden. In diesem Fall gibt es einen gefalteten und einen ungefalteten Zustand, die durch eine Energiebarriere voneinander getrennt sind, deren Scheitelpunkt Δx_U von der Gleichgewichtslänge des gefalteten und Δx_F von der des ungefalteten Zustandes entfernt liegt. Die Energiebarrieren zum Übergang zwischen den beiden Zuständen betragen entsprechend $\Delta G_U(0)$ für den gefalteten und $\Delta G_F(0)$ für den ungefalteten Ausgangszustand. Somit ergeben sich für die Faltungsrate $\kappa_F(0)$ und die Entfaltungsrate $\kappa_U(0)$ folgende Gleichungen:

$$\kappa_F(0) = \omega e^{-\frac{\Delta G_F(0)}{k_B T}} \quad \text{bzw.} \quad \kappa_U(0) = \omega e^{-\frac{\Delta G_U(0)}{k_B T}} \quad (44)$$

Unter dem Einfluß einer äußeren Kraft verschieben sich die Raten. Nach dem zuvor erwähnten linearen Modell von Bell [8] berechnen sich diese wie folgt.

$$\kappa_F(F) = \omega e^{-\frac{\Delta G_F(0) + F\Delta x_F}{k_B T}} = \kappa_F(0) e^{-\frac{F\Delta x_F}{k_B T}} \quad (45)$$

sowie

$$\kappa_U(F) = \omega e^{-\frac{\Delta G_U(0) - F\Delta x_U}{k_B T}} = \kappa_U(0) e^{-\frac{F\Delta x_U}{k_B T}} \quad (46)$$

Da der ungefaltete Zustand bei der superhelikalen Struktur um das 2,5-fache länger als der gefaltete Zustand ist, und man sich bei Untersuchungen mit dem Kraftspektrometer im Gleichgewichtszustand befindet, bildet sich in den Kraftkurven ein Plateau aus. Die Höhe dieses Plateaus bestimmt, bei welcher Energie sich die Struktur entfaltet. Im Falle von Myosin II ergibt sich eine benötigte Kraft von 20-25 pN, was einem Unterschied in der freien Energie ohne angelegte Kraft von $2,3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ entspricht [84].

5 Messung der Biegesteifigkeit von Mikrotubuli

5.1 Ergebnisse

Mikrotubuli treten in vielen verschiedenen Typen von Zellen auf, in denen sie unter anderem die Aufgabe haben, den Zellen Stabilität zu verleihen. Aus diesem Grund müssen sie hohen Beanspruchungen widerstehen können. Es ist bisher unklar, ob die Zelle aktiv die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli verändert, dies wäre jedoch möglich. Einige Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) besitzen solche Eigenschaften [30, 65]. Neben den MAPs, die fest an die Mikrotubuli binden und diese stabilisieren und versteifen gibt es noch weitere Moleküle, die im Normalfall nur temporär daran binden. Die Motormoleküle, wie Kinesin und Dynein laufen unter ATP-Hydrolyse je nach ihren spezifischen Eigenschaften von einem Einzelschritt bis zu mehreren Mikrometern entlang der Mikrotubuli. Ihr Einfluß auf die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli ist daher von Interesse.

5.1.1 Darstellung der Meßwerte

Da es in der Literatur allgemein üblich ist, für die Biegesteifigkeitsmessungen Mittelwert und Standardabweichung anzugeben, soll dies in meinen Ausführungen auch gemacht werden. Da es sich bei der Verteilung der hier präsentierten Meßwerte jedoch nicht um eine Gauß'sche Verteilung handelt, wird auch die Verteilung selbst in Betracht kommen. Dazu sollen als Zahlenwerte sowohl der Median, als auch die 25%- und 75%-Werte betrachtet werden. Als Darstellung der Verteilung selbst sollen zwei Methoden verwendet werden. Zum einen werden die gemessenen Werte mit der aus der Genauigkeit der Messung selbst bestimmten Gewichtung in Kanäle einsortiert. Diese Darstellung ist wegen der Willkürlichkeit der Kanalweite und einer damit leicht veränderbaren Verteilungsfunktion für eine Auswertung nicht sehr brauchbar, wird jedoch wegen ihrer besseren Anschaulichkeit trotzdem verwendet. Des weiteren soll eine Darstellung der aufsummierten Gewichte gegen die Biegesteifigkeit gezeigt werden. Dabei wird von der kleinsten gemessenen Biegesteifigkeit beginnend das Gewicht des gemessenen Wertes zu den Gewichten aller kleineren gemessenen Werte addiert und schließlich die Gesamtsumme auf eins normiert. Somit erhält man bei einer Gauß'schen Verteilung eine sigmoidale Kurve, sowie bei einer schiefen Verteilung eine

der Verteilung entsprechende Kurve, aus der man direkt Median, 25%- und 75%-Wert ablesen kann.

Zum Vergleich von verschiedenen Messungen wird ein Test benötigt, der unabhängig von der Art der Verteilung ist. Für die kleine Anzahl von Einzelmessungen, die pro Meßreihe vorliegen, hat sich der Wilcoxon-Test als der geeignetste herausgestellt [15]. Hierbei wird die Hypothese aufgestellt, daß zwei Reihen die gleiche Biegesteifigkeit zur Grundlage haben. Mit einer gewissen Fehlerwahrscheinlichkeit läßt sich dann diese Hypothese ablehnen und somit die Aussage machen, die beiden Reihen sind auf einem bestimmten Signifikanzniveau unterschiedlich. Als signifikant unterschiedlich werden nur Reihen bezeichnet, bei denen die Gleichheitshypothese eine maximale Wahrscheinlichkeit von 5% erreicht.

5.1.2 Kontrollmessungen an undekorierten Mikrotubuli

Zur Überprüfung der Konsistenz der gemessenen Daten mit solchen, die in früheren Messungen mit derselben Methode ermittelt und publiziert wurden [30], wurden Messungen an undekorierten Mikrotubuli durchgeführt. Alle in diesem Kapitel beschriebenen Messungen wurden bei einer Kamertemperatur von 32°C durchgeführt. Durch die lokale Erwärmung durch das Laserlicht der optischen Falle [28] ergibt sich somit eine maximale Temperatur von 34°C nahe des Fallenfokus. Diese Temperatur wurde aus zwei Gründen gewählt, die für eine ausreichend lange Meßdauer essentiell sind. Zum einen neigen unstabilierte Mikrotubuli bei Temperaturen unter 30°C dazu, schnell zu depolymerisieren und damit die verfügbare Meßdauer zu reduzieren. Zum anderen verlieren die als Bindepartner verwendeten Motormolekül-Konstrukte, wie in Motilitäts-Assays festgestellt, ab einer Temperatur von etwa 33°C ihre Funktionalität und damit möglicherweise auch für die Biegesteifigkeitsmessungen wichtige Strukturelemente.

Die Probenpräparation erfolgte wie bereits in Kapitel 3.8 ausgeführt. In einem ersten Schritt wurde dabei durch eine hohe Tubulinkonzentration (15 μM) in der Polymerisationslösung das Wachstum der Mikrotubuli von den Axonemen aus gefördert, während der Meßlösung lediglich so viel Tubulin zugegeben wurde, wie nötig, um das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation zu erhalten (etwa 7 μM). Mikrotubuli können nur an den Axonemen entstehen, da in der Lösung keine Nukleationskeime vorhanden sind.

Es wurden zwei Serien von Messungen an undekorierten Mikrotubuli durchgeführt. Die erste enthielt nur das Nukleotid GTP in der Meßlösung, was

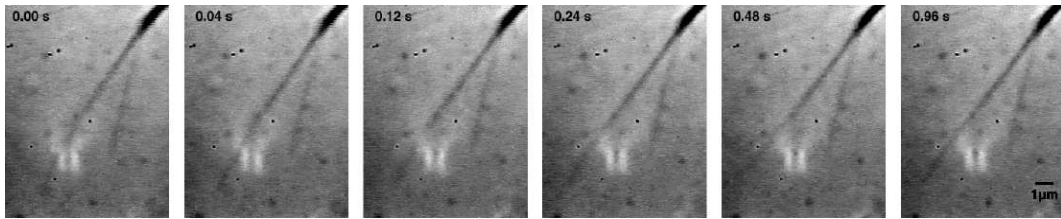


Abbildung 13: Einzelbilder aus der Sequenz einer Rückstellbewegung. Zum Zeitpunkt 0 wird der Laser der optischen Falle abgeschaltet und die gespeicherte Biegeenergie führt zu einer exponentiell abnehmenden Rückstellbewegung.

als Vergleich zu den Messungen von H. Felgner et al. herangezogen werden kann [30]. In der zweiten wurde zusätzlich das Nukleotid AMP-PNP zugegeben. Seine Aufgabe ist es, bei den späteren Dekorationsversuchen mit Kinesin zu einer *in rigor*-Bindung dieser Moleküle an den Mikrotubulus zu führen. Ein möglicher Nukleotid-Austausch im Mikrotubulus und eine damit verbundene Steifigkeitsänderung muß jedoch auch in Betracht gezogen werden.

Für eine Meßserie wurden jeweils an einzelnen Mikrotubuli Messungen durchgeführt. Zur Ermittlung eines Einzelmesswertes wurde ein Mikrotubulus mit der optischen Falle ausgelenkt und die nach dem Abschalten der Falle resultierende Rückbewegung durch manuelle Nachbearbeitung einer auf Video aufgenommenen Filmsequenz bestimmt. In Abbildung 13 sind einige Bilder einer solchen Sequenz dargestellt. Die resultierende normierte Auslenkungskurve ist in Abb. 14 gezeigt. Die Aufnahme­frequenz ist durch die Videorate auf 25 Bilder/Sekunde limitiert. Einzelbilder wurden nur ausgewertet, wenn das Mikrotubulus-Ende vom Auge hinreichend gut detektiert werden konnte. Zusätzlich zum Exponentialkoeffizienten der Kurve der Rückstellbewegung wurde noch die Länge des Mikrotubulus benötigt. Diese wurde aus einem Bild bestimmt, auf dem das am Axonem sitzende Ende und das freie Ende besonders deutlich zu erkennen waren. Dies war nötig, da die Länge in der vierten Potenz in den Messwert eingeht. Schon ein Fehler in der Messung der Länge von 6% ergibt einen Fehler von 28% in der Biegesteifigkeit. Aus diesem Grund wurde auch die Länge grundsätzlich nur an Bildern bestimmt, auf denen der Mikrotubulus kaum oder nicht gebogen war.

Bei den Messungen an undekorierten Mikrotubuli ohne Zugabe des nicht hydrolysierbaren Nukleotids AMP-PNP wurde eine Biegesteifigkeit von $(2,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$ errechnet. Dieser Wert liegt etwas unterhalb des Vergleichswertes von $(3,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$ [31]. Dieser Unterschied kann jedoch durchaus auf die geringe Anzahl von Einzelmessungen und Unterschie-

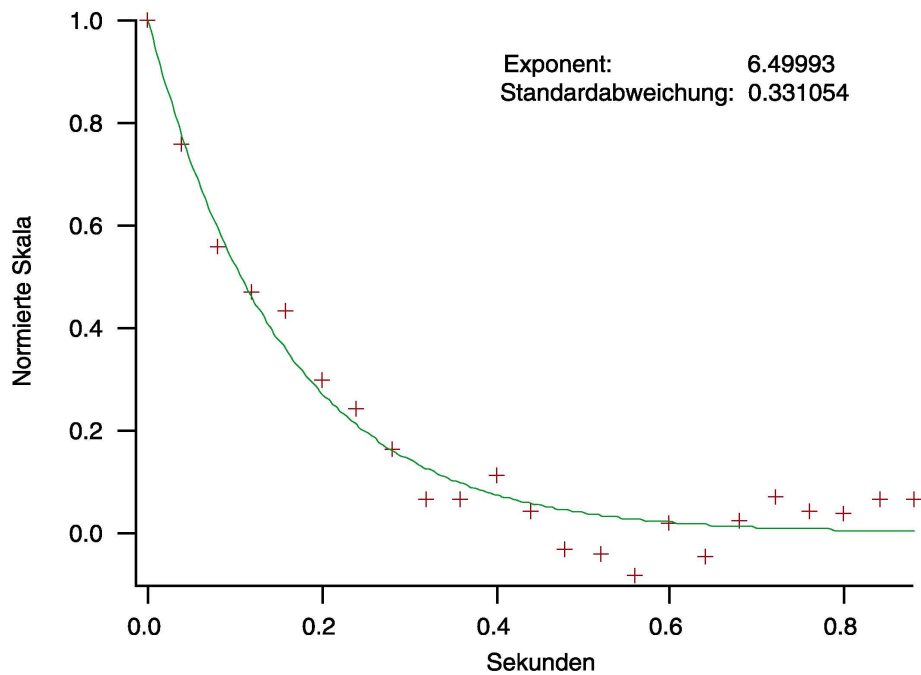


Abbildung 14: Auslenkung des Mikrotubulus aus Abbildung 13, aufgetragen gegen die Zeit. Die Auslenkung zum Zeitpunkt 0 ist auf eins normiert. Die durchgezogene Linie stellt die angepasste Exponentialfunktion dar.

de in der Temperatur zurückzuführen sein. In beiden Experimenten wurden jeweils 16 einzelne Mikrotubuli vermessen.

Durch die Zugabe von AMP-PNP ergab sich eine deutliche Versteifung der Mikrotubuli. Der Mittelwert stieg um das zwei- bis dreifache auf einen Wert von $(6,1 \pm 0,8) \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$. Diese Steigerung wurde mit dem Wilcoxon-Test überprüft und ist auf einem Signifikanzniveau von 1% unterschiedlich von der Steifigkeit der Mikrotubuli ohne AMP-PNP. Eine normierte Darstellung der kumulativen gewichteten Wahrscheinlichkeiten, aufgetragen gegen die Biegesteifigkeit, ist in Abbildung 15 dargestellt. Recht eindrucksvoll lässt sich die Verschiebung mit bzw. ohne AMP-PNP auch darstellen, wenn die Biegesteifigkeitswerte, mit dem Gewicht der Einzelmessung gewichtet, in Kanäle einsortiert werden (Abb. 16). In diesem Fall wurde eine Breite der Kanäle von $2,5 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$ gewählt. Ohne AMP-PNP im Puffer weist nur ein kleiner Anteil von etwa 10 % der Mikrotubuli eine Biegesteifigkeit von mehr als $5 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$ auf, während bei einem AMP-PNP-haltigen Puffer kein einziger Mikrotubulus weicher als $5 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$ war.

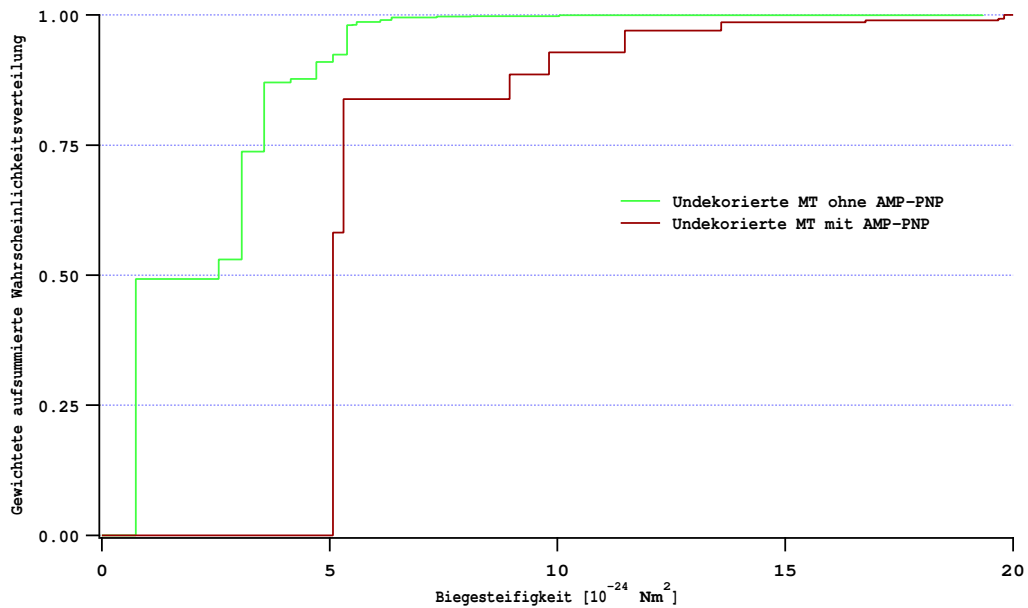


Abbildung 15: Kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Biegesteifigkeiten von undekorierten Mikrotubuli in Gegenwart und Abwesenheit von AMP-PNP

5.1.3 Biegesteifigkeitsmessungen mit Kinesin und Kinesin-Konstrukten

Um die Hypothese zu prüfen, daß Kinesin die Biegesteifigkeit von Mikrotubuli erhöht, wurde eine Serie von verschiedenen Kinesin-Konstrukten als Bindepartner verwendet. Dabei wurde das Nukleotid AMP-PNP verwendet, um eine *in rigor*-Bindung der Konstrukte mit dem Mikrotubulus zu erzwingen. Wie bereits gezeigt, verändert sich die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli in Gegenwart von AMP-PNP deutlich. Dies sollte bei der Interpretation der Meßwerte in Betracht gezogen werden.

Zur Verwendung kamen ausnahmslos rekombinant erzeugte Konstrukte von Kinesin aus dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa*, exprimiert in *E. coli*. Zusätzlich zum Vollängenprotein, NcKin928, wurden zwei verkürzte Konstrukte untersucht. Als minimale aktive Einheit ist ein Konstrukt verfügbar, das nur aus der katalytischen Domäne besteht. Diese 343 Aminosäuren lange Einheit weist in ATPase-Assays eine hohe ATP-Hydrolyse auf, so daß erwartet werden kann, daß die Domänenfaltung richtig, und dadurch eine normale Bindeaktivität am Mikrotubulus gegeben ist [53]. Dieses stark verkürzte Konstrukt besitzt keine Anteile, die eine Dimerisierung ermöglichen, weshalb es

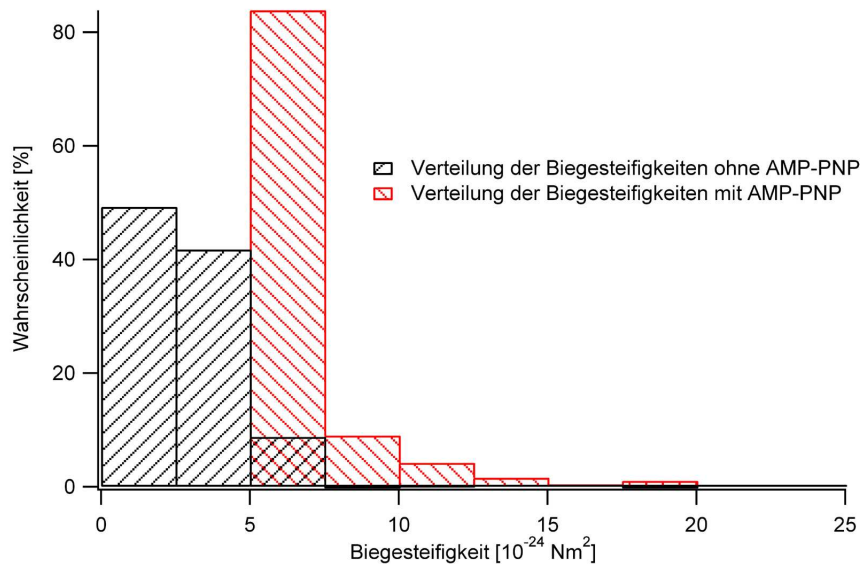


Abbildung 16: Darstellung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Biegesteifigkeiten von undekorierten Mikrotubuli, abhängig von der Anwesenheit von AMP-PNP im Puffer

sich hier um ein monomeres Molekül handelt. Im weiteren wird dieses Konstrukt mit NcKin343 bezeichnet.

Neben den beiden bisher beschriebenen Konstrukten soll noch ein weiteres mit einer Länge von 433 Aminosäuren in Betracht kommen. Durch die zusätzlichen Sequenzanteile von Hals und Scharnier dimerisiert dieses Konstrukt. Weder von der ATP-Hydrolyseaktivität, noch von der Laufgeschwindigkeit unterscheidet sich dieses Konstrukt vom Vollängen-Protein. Die Länge ist dem Monomeren NcKin343 vergleichbar. Damit besitzt das NcKin433 ausgewählte Eigenschaften der beiden anderen Konstrukte.

Mit dieser Zusammenstellung sollte der Einfluß von einzelnen Bestandteilen des Kinesin-Moleküls auf die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli erforscht werden. Es können Effekte unterschieden werden, die die katalytische Domäne, die Dimerisierung oder der Schwanzbereich verursachen. Einen Überblick über die gemessenen Biegesteifigkeiten gibt die Tabelle 1. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß sich durch das monomere NcKin343, ebenso wie durch das komplette Protein NcKin928, eine Tendenz zur Versteifung der Mikrotubuli ergab, während das kurze dimere Konstrukt NcKin433 tendenziell zu einer Aufweichung der Mikrotubuli führte.

5 MESSUNG DER BIEGESTEIFIGKEIT VON MIKROTUBULI

Meßbedingung	AMP- PNP	Anzahl Messungen	Biegesteifigkeit in 10^{-24} Nm ²
MT undekoriert	-	16	$2,3 \pm 0,4$
MT undekoriert	+	10	$6,1 \pm 0,8$
MT mit NcKin343	+	31	$9,2 \pm 0,7$
MT mit NcKin433	+	17	$4,2 \pm 0,5$
MT mit NcKin928	+	14	$11,6 \pm 0,6$

Tabelle 1: Überblick über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Biegesteifigkeiten von Mikrotubuli, unter verschiedenen Bedingungen gemessen.

Es ist nur eine Tendenz erkennbar, da die Unterschiede zum Mikrotubulus ohne Bindepartner, aber mit AMP-PNP, nicht statistisch relevant sind. Über die statistische Relevanz der Meßwert-Unterschiede nach der Wilcoxon-Methode soll die Tabelle 2 Aufschluß geben.

AMP-PNP	NcKin343	NcKin433	NcKin928	
1 %	1 %	5 %	1 %	undekoriert
	↯	↯	↯	AMP-PNP
		1 %	↯	NcKin343
			5 %	NcKin433

Tabelle 2: Statistische Relevanz der Unterschiede zwischen den ermittelten Biegesteifigkeiten nach der Wilcoxon-Methode. In der Tabelle kann man ablesen, ob ein Signifikanzniveau für die Ablehnung der Gleichheit der ermittelten Meßwerte für den Vergleich der oberhalb und nach rechts notierten Serien von weniger als 5% oder 1% erreicht wurde. Das Zeichen ↯ bezeichnet die Aussage, daß die Meßwerte auf dem geforderten Signifikanzniveau nicht unterscheidbar waren.

Zur Veranschaulichung sind die kumulativen Häufigkeitsverteilungen von allen bezeichneten Experimenten in der Abbildung 17 gemeinsam dargestellt. Die undekorierten Mikrotubuli mit AMP-PNP stehen zwischen den mit NcKin433 dekorierten und den mit NcKin343 bzw. NcKin928 dekorierten Mikrotubuli.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß zwar absolut gesehen kein Unterschied festgestellt werden konnte zwischen undekorierten und dekorierten Mikrotubuli in Anwesenheit von AMP-PNP, zwischen den verschiedenen Konstrukten

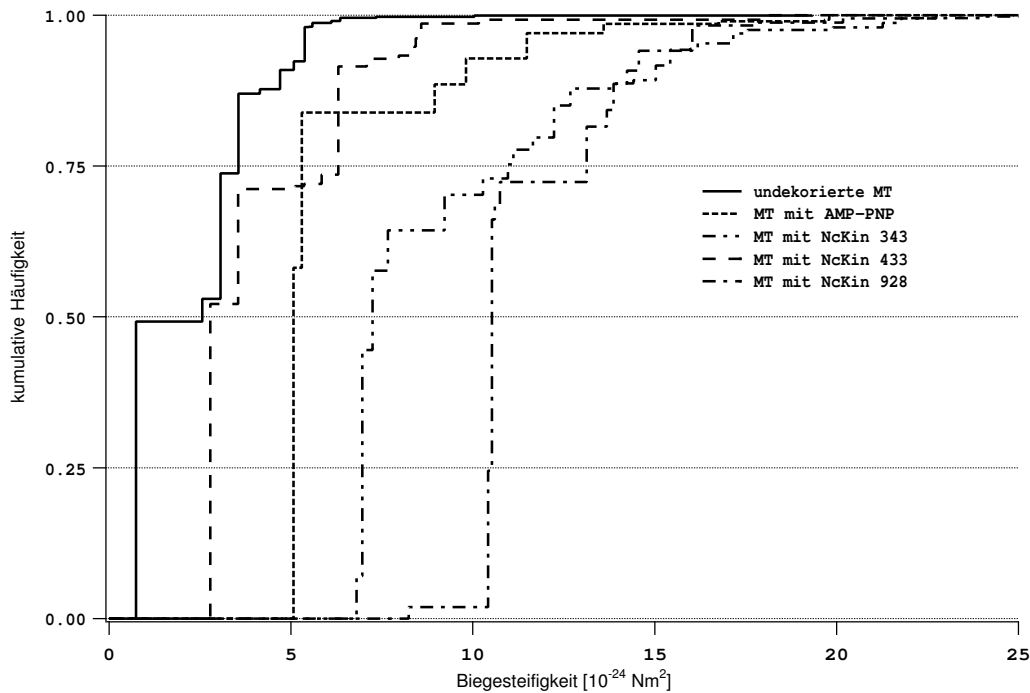


Abbildung 17: Kumulative Häufigkeitsverteilung der Biegesteifigkeiten für die verschiedenen aufgeführten Bindepartner. Das Konstrukt NcKin433 führt tendenziell zu einer Aufweichung der MT, während NcKin343 und NcKin928 zu einer Versteifung führen.

traten jedoch statistisch relevante Unterschiede in der Biegesteifigkeit auf, die im folgenden diskutiert werden sollen.

5.2 Diskussion

5.2.1 Gültigkeit der theoretischen Modelle

Zunächst soll erwogen werden, ob die verwendeten Modelle der Elastizitätstheorie und Hydrodynamik für die gemachten Experimente zu brauchbaren Ergebnissen führen.

Elastizitätstheorie unter der Annahme schwacher Biegungen: Die wohl bedeutendste Vereinfachung ist die Reduktion des Mikrotubulus auf einen homogenen Hohlzylinder. Da jedoch durch die hier verwendeten Meßmethoden kein Zugriff auf die einzelnen Komponenten des Elastizitätstensors

möglich ist, kann auch kein Elastizitätsmodul E für den Mikrotubulus angegeben werden, sondern nur das Produkt mit dem Trägheitsmodul I , die Biegesteifigkeit EI . In manchen Veröffentlichungen werden zwar auch Elastizitätsmodule angegeben [38], diese gelten jedoch nur für einen isotropen, homogenen Hohlzylinder mit den Maßen des Mikrotubulus.

Des weiteren wird die lineare Elastizitätstheorie angewendet. Das bedeutet, daß die Kraft F linear mit der verursachten Längenänderung zusammenhängt. In diesem Fall gilt das Hooke'sche Gesetz $F = E\Delta l/l$. Diese Annahme ist jedoch nur bis zu einer bestimmten Längenänderung $\Delta l/l$ gültig. Typische Grenzwerte für die Gültigkeitsgrenze liegen, abhängig vom Material, zwischen 0,1 und 0,001 [10]. Bei einem angenommenen Krümmungsradius von $10 \mu\text{m}$, was bei einem $15 \mu\text{m}$ langen Mikrotubulus schon einen rechten Winkel zwischen den Tangenten an die beiden Enden bedeutet, ergibt sich nach Gleichung 14 auf Seite 42 ein Wert von 0,0012. Zwar sind Biomaterialien in ihren Eigenschaften oft stark abweichend von anderen Werkstoffen, da die erhaltenen Längenänderungen jedoch nahe an den Werten der elastisch instabilsten Materialien liegen, ist die Anwendung der linearen Elastizitätstheorie durchaus zu rechtfertigen.

Eine weitere Vereinfachung stellt der Übergang von der Biegelinie aus Gleichung 17 zu 18 für schwache Biegungen dar. Als Voraussetzung dazu muß die Steigung der Biegelinie vernachlässigbar gegen eins sein. Erfüllt ist diese Bedingung, wenn der Kosinus des Verhältnisses aus Auslenkung zu Länge, mit einem Geometriefaktor K multipliziert, nahe eins ist. Dieser Geometriefaktor K wird maximal für den Fall einer Punktkraft am Ende des Mikrotubulus und erreicht dort den Wert 1,5. Bei einer Auslenkung von 20% ergibt sich für $\cos(K\Delta y/L)$ ein Wert von 0,96. Da dieses Auslenkungs-Längen-Verhältnis nicht überschritten wurde, ist die Theorie der schwachen Biegung gerechtfertigt.

Hydrodynamik: Die Berechnung der Kräfte, die durch den hydrodynamischen Fluß an einer Kugel entstehen ist analytisch lösbar. Für einen homogenen Zylinder, der in der Strömung gebogen wird, ergibt sich bei der Berechnung eine Differentialgleichung vierter Ordnung [67]. Etliche Theoretiker haben versucht, eine Näherungslösung hierfür zu bestimmen. Die Kraftdichte f_c , die durch eine konstante Strömung der Geschwindigkeit v_c auf einen Zylinder der Länge L mit dem Durchmesser d durch eine Flüssigkeit der Dichte ρ und der Viskosität η in der Entfernung h von einer Grenzfläche, an diesem Zylinder auftritt, kann nach verschiedenen Modellen zusammengefaßt werden in der Formel

$$f_c = \frac{K_1 \pi \eta v_c}{K_2 + K_3 \ln(K_4)} \quad (47)$$

Dabei stellt K_4 eine Komposition aus den oben angegebenen Parametern dar. In Tabelle 3 sind die Parameter K_1 bis K_4 für verschiedene Modelle angegeben. Außerdem ist abzulesen, inwieweit die Auslenkung eines Stabendes abweicht von der in dieser Arbeit verwendeten nach dem Doi-Modell. Da in dem logarithmischen Term die verschiedensten Parameter auftreten, wurde zur Berechnung der Abweichung zwischen den Modellen angenommen, daß ein Mikrotubulus gemessen wird, der $5 \mu\text{m}$ lang ist und einen Durchmesser von 28 nm besitzt. Für das Medium wurde eine Dichte von $\rho = 1 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-3}$ und eine Viskosität von $\eta = 1 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$ angenommen. Der Abstand zur Grenzfläche betrug 300 nm und die Strömungsgeschwindigkeit wurde zu $v_c = 10 \mu\text{m/s}$ angenommen.

	K_1	K_2	K_3	K_4	$\Delta y / \Delta y_{Doi}$
Ashkin [29]	8	-0,81	1	$2L/d$	1,8
Takaisi [42]	4	0	1	$4h/d$	1,2
Doi [94]	4	0	1	$L/2d$	1,0
Broersma [47]	4	0,886	1	L/d	0,75
Tirado [47]	4	0,84	1	L/d	0,74
Burgers [42]	4	0,5	1	$2L/d$	0,71
Hunt [47]	2	0	1	$2h/d + \sqrt{(2h/d)^2 - 1}$	0,60
Landau [64]	8	-0,077	-1	$v_c d \rho / 2 \eta$	0,40
Lamb [42]	8	-0,077	-1	$v_c d \rho / 8 \eta$	0,14

Tabelle 3: Parameter für einige hydrodynamische Modelle zur Bestromung eines Zylinders

Während bei einer Gültigkeit des Modells von Ashkin eine Überschätzung der Biegesteifigkeit um 80% die Folge wäre, würde bei der Gültigkeit des Modells von Lamb die Biegesteifigkeit um 86% unterschätzt. Das hydrodynamische Modell nach Doi wurde ausgewählt, da es bereits bei früheren Messungen an Mikrotubuli verwendet wurde (vgl. [31, 61, 94]). Somit ist eine Vergleichbarkeit der Daten gegeben, die mit ähnlichen Methoden von anderen Gruppen gemessen wurden. Es kann jedoch nicht behauptet werden, daß die Verwendung des Modelles von Doi zu numerisch richtigen Biegesteifigkeiten führt. Zudem sind relative Steifigkeitsänderungen unabhängig vom verwendeten Modell zu ermitteln.

Zur Bestimmung des korrekten hydrodynamischen Modells müßte ein homogener zylindrischer Stab mit bekannter Biegesteifigkeit beströmt werden. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich. Daher müssen die Absolutwerte der ermittelten Daten stets unter dem Blickwinkel der Unsicherheit in der Wahl des hydrodynamischen Modells betrachtet werden.

5.2.2 Vergleich mit anderen Gruppen

Die Biegesteifigkeit von Mikrotubuli zu messen wurde schon von etlichen Gruppen durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Techniken angewendet, um zu diesem Ziel zu gelangen. So wurde die thermische Bewegung von freien oder an einem Ende gebundenen Mikrotubuli gemessen, künstlich Kräfte ausgeübt durch das Polymerisieren gegen eine Barriere oder durch das Auslenken mit einer Laserfalle, oder die Kraft durch die Strömung des Mediums ausgenutzt.

Erstautor	verwendete Methode	Mittelwert	Standardabweichung
Tran [92]	optische Falle	6,8	3,9
Felgner [31]	optische Falle	3,7	0,8
Schneider	optische Falle	2,3	0,4
Dye [23]	Fluß	1,4	0,4
Venier [94, 95]	Fluß	4,3	1,0
Kurz [61]	Fluß	35,8	9,5
Maier [67]	Fluß	41	0,6
Cassimeris [17]	therm. Bewegung	17,5	2,2
Gittes [38]	therm. Bewegung	21,5	0,8
Mickey [73]	therm. Bewegung	26	2
Dogterom [22]	therm. Bewegung	34	7

Tabelle 4: Übersicht über die Meßwerte für die Biegesteifigkeit von unstabilierten Mikrotubuli, die mit GTP polymerisiert wurden. Die Biegesteifigkeits-Werte, sowie deren Standardabweichungen, sind in Einheiten von 10^{-24} Nm^2 angegeben. Aufgeführt ist jeweils der Erstautor der Publikation.

Neben den verschiedenen Meß-Techniken wurden außerdem verschiedene Methoden gewählt, um die Mikrotubuli zu stabilisieren. Je nach den Rahmenbedingungen war teilweise keine Stabilisierung nötig. Einige Gruppen benutzten Taxol zur Stabilisierung, manche das nicht hydrolysierbare GTP-Analog

GMPCPP. GMPCPP führte bei allen Gruppen zu einer Versteifung im Vergleich zu unstabilierten Mikrotubuli, während Taxol bei den meisten Gruppen die Biegesteifigkeit verminderte. Da bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen grundsätzlich auf eine Stabilisierung verzichtet wurde, sollen nur die Messungen anderer Gruppen an unstabilierten Mikrotubuli in Betracht kommen. Eine Auflistung der gefundenen Ergebnisse ist in Tabelle 4 zu finden.

Auffällig beim Vergleich der ermittelten Meßdaten ist die Streuung der Absolutwerte über einen Bereich von mehr als einer Größenordnung. Beim Vergleich der Biegesteifigkeiten innerhalb der verschiedenen angewendeten Meßmethoden sind deutliche Unterschiede festzustellen. Während die Messungen mit optischen Fallen durchgängig niedrige Werte für die Biegesteifigkeit ergaben, lagen die aus der thermischen Bewegung ermittelten Daten deutlich höher. Bei den Gruppen, die den hydrodynamischen Fluß als Kraftquelle nutzten, wurde sowohl der höchste, als auch der niedrigste ermittelte Wert für die Biegesteifigkeit erzielt.

Die Messungen der Gruppe um Tran sind mit einem großen Fehler behaftet. Damit läßt sich der Unterschied zu den Messungen von Felgner *et al.* begründen. Der Mittelwert der Messungen von Felgner *et al.* liegt deutlich innerhalb der einfachen Standardabweichung von Tran *et al.*, weshalb sich ein großer Überlapp der Wahrscheinlichkeitsverteilungen ergibt. Im Vergleich zu den Messungen von Felgner *et al.* weisen die für die vorliegende Arbeit gemessenen Mikrotubuli eine erheblich niedrigere Biegesteifigkeit auf. Der Mittelwert liegt um knapp 40% unter den Referenzwerten. Bei der Betrachtung müssen jedoch die Rahmenbedingungen für die Versuchsdurchführung betrachtet werden. Während bei den hier präsentierten Messungen die Temperatur konstant bei 32°C gehalten wurde, wurden die bei Felgner *et al.* präsentierten Daten bei einer Temperatur von 25°C ermittelt.

Die Gruppe um Kis hat sich der Frage gewidmet, wie die Biegesteifigkeit von Mikrotubuli von der Temperatur abhängt [56]. Dazu wurden Mikrotubuli auf einem löchrigen Substrat adhiert und über den Löchern mit Hilfe der Spitze eines Kraftmikroskops durchgebogen. Diese Messungen wurden an denselben Mikrotubuli über einen weiten Temperaturbereich zwischen 5°C und 42°C durchgeführt. Dabei änderte sich die Biegesteifigkeit im Bereich zwischen 5°C und 20°C kaum, wohingegen sie im anschließenden Bereich bis 37°C auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Wertes abfiel. Erklären läßt sich das durch eine Verminderung der lateralen Interaktionen zwischen den Protofilamenten bei steigender thermischer Energie. Durch eine Interpolation der dargestellten Daten läßt sich bestimmen, daß sich zwischen 25°C und 32°C

5 MESSUNG DER BIEGESTEIFIGKEIT VON MIKROTUBULI

die Biegesteifigkeit um knapp die Hälfte verringert. Dies konnte durch den Vergleich der hier präsentierten mit den von H. Felgner an derselben Anlage gemessenen Daten bestätigt werden.

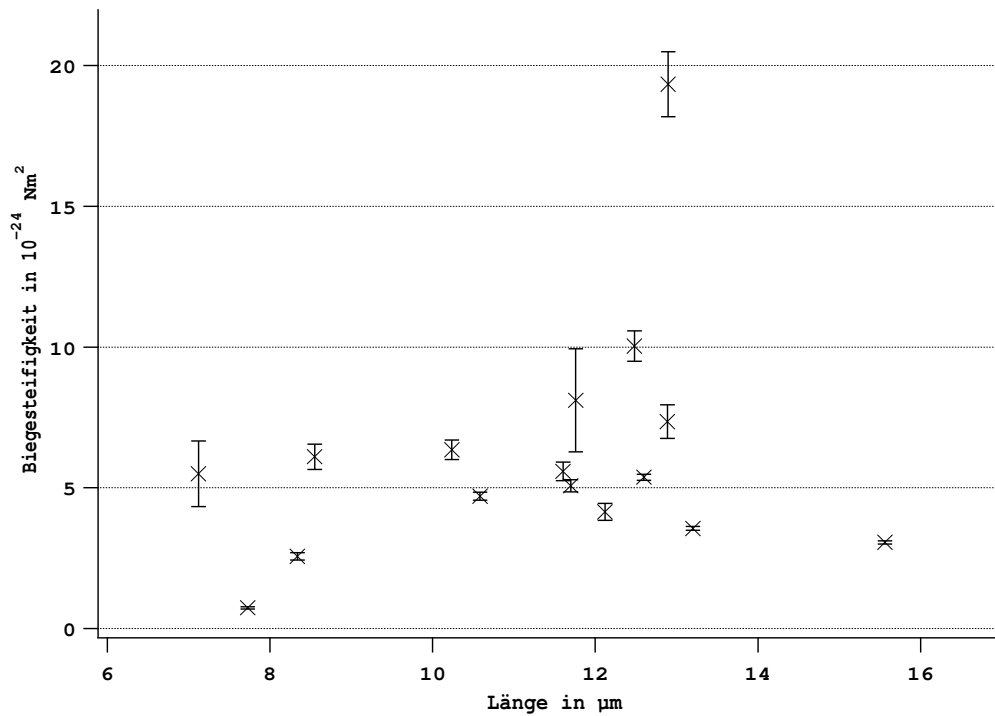


Abbildung 18: *Biegesteifigkeiten der undekorierten Mikrotubuli, aufgetragen über der Länge. Die Verteilung weist keine Abhängigkeit von der Länge der Mikrotubuli auf.*

Ein Hauptkritikpunkt an der Messung der Biegesteifigkeit mit der optischen Falle liegt in der Vernachlässigung des Einflusses der Grenzfläche auf die Hydrodynamik. Bei der Bewegung eines Körpers durch eine Flüssigkeit entsteht eine Scherwelle. Befindet sich der Körper nahe an einer Begrenzung der umgebenden Flüssigkeit, so wird diese Scherwelle durch die Grenzfläche beeinflusst und erhöht die effektive Viskosität des umgebenden Mediums. Für den Fall einer Kugel wurde die Entfernungsabhängigkeit der Viskosität von einer Oberfläche gemessen [78]. Ein merklicher Effekt tritt dabei erst ab einer Entfernung von weniger als einem Kugeldurchmesser auf. Abhängig davon, welche Größe bei einem einseitig eingespannten Zylinder die relevante Größe für den Grenzflächeneffekt ist, kann es sein, daß die Mikrotubuli in den hier präsentierten Messungen eine höhere Viskosität als die tatsächliche verspüren.

Bei den durchgeführten Messungen befanden sich die Mikrotubuli etwa 300 nm vom Deckglas entfernt. Bei einem Durchmesser von 24 nm bedeutet das etwa 12 Mikrotubulidurchmesser. Bei einer Länge von 5 μm bis 20 μm sollte eine deutliche Längenabhängigkeit festzustellen sein, falls die effektive Viskosität von diesem Parameter abhinge. Wie in Abbildung 18 für die undekorierten Mikrotubuli exemplarisch dargestellt, ist dies nicht der Fall. Somit wird davon ausgegangen, daß das verwendete Modell nicht korrigiert werden muß.

5.2.3 Einfluß des Kinesins auf die Biegesteifigkeit der Mikrotubuli

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für Kinesin-dekorierte Mikrotubuli stellt sich zunächst die Frage nach der Besetzungsdichte. Daher soll hier eine Abschätzung über die Verhältnisse zwischen Kinesin-Molekülen und polymerisierten Tubulin-Dimeren gemacht werden.

In den Proben befanden sich lediglich auf dem Deckglas Mikrotubuli, da diese von den Axonemen aus polymerisiert wurden. Der Puffer, der das unpolymersierte Tubulin und eventuell polymerisierte Mikrotubuli, die aber nicht an die Oberfläche gebunden hatten, enthielt, wurde nach einer Polymerisationszeit, die zu Mikrotubuli mit einer Länge von etwa 10 μm führte, ausgetauscht. Dabei enthielt der Meßpuffer nur noch eine ausreichende Menge an Tubulin, um ein rasches Depolymerisieren der Mikrotubuli zu verhindern. Dabei betrug die über die gesamte Fläche gemittelte Mikrotubuli-Belegung weniger als 5%. Da die Mikrotubuli von Axonemen aus polymerisiert wurden, kann davon ausgegangen werden, daß sie sich in den meisten Fällen aus 13 Protofilamenten zusammensetzen. Bei einem Durchmesser des Mikrotubulus von 24 nm und einer Länge des Tubulin-Dimers von 8 nm ergibt sich so bei einer Probenkammerdicke von 50 μm eine effektive Volumen-Konzentration an polymerisiertem Tubulin von weniger als 0,1 μM .

Die Reinheit der verwendeten Kinesinkonstrukte ist in Abbildung 19 an Hand eines Coomassie-Gels gezeigt. Verunreinigungen machen einen geringen Anteil an der Proteinmenge aus und werden vernachlässigt. Die Proteinmenge wurde durch einen Bradford-Test bestimmt. Dabei ergaben sich die in der Tabelle 5 dargestellten Proteinmengen und Konzentrationen.

Im Meßpuffer wurden 28 μl der Probe mit dem gewünschten Kinesinkonstrukt in einem Volumen von 60 μl verwendet. Somit wurde das in der Ausgangslösung am geringsten konzentrierte Vollängenkonstrukt NcKin928 0,85 μM eingesetzt. Selbst bei einem Verlust von mehr als 80% des Kine-

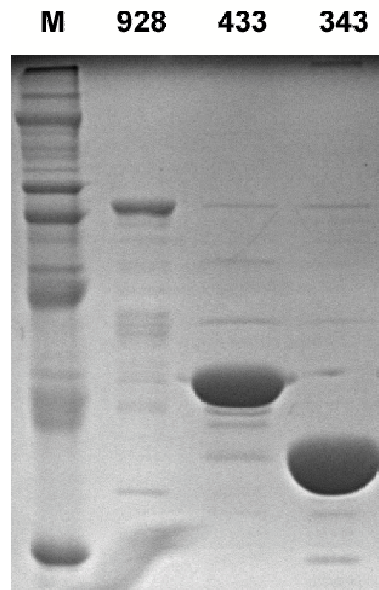


Abbildung 19: SDS-PAGE Gel zur Darstellung der Reinheit der verwendeten Kinesinkonstrukte. Aufgetragen sind von links nach rechts: HMW-Proteinmarker (M), Vollängen Kinesin (NcKin928), dimerisierbares verkürztes Konstrukt (NcKin433) und katalytische Domäne des Neurospora Kinesins (NcKin343). Es wurden gleiche Probenvolumina aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.

sinkonstruktes durch unspezifische Adhäsion und andere Effekte ist noch ein Überschuß an Kinesin im Vergleich zu Tubulin vorhanden.

Wie in Veröffentlichungen von Vilfan *et al.* und Skiniotis *et al.* beschrieben, reichen molare Verhältnisse von 1,5:1 (Kinesin-Kopf:Tubulin-Dimer) aus, um eine vollständige Dekoration des Mikrotubulus zu erzielen [88, 96]. Werden Monomere Kinesinkonstrukte verwendet, so führt eine hohe Kinesinkonzentration grundsätzlich zu einer weitgehend gleichmäßigen Dekoration. Bei der Verwendung von Dimeren werden zum Teil ein, zum Teil beide Köpfe

Protein	Molekulargewicht	Konz. [mg/ml]	Molarität
NcKin928	102,4 kDa	0,19	1,8 μ M
NcKin433	48,2 kDa	0,77	16 μ M
NcKin343	38,4 kDa	2,02	53 μ M

Tabelle 5: Ausgangskonzentrationen der verwendeten Kinesinkonstrukte

gebunden, je nachdem, ob der zweite Kopf noch eine freie Bindestelle findet. Somit entsteht eine Hülle von Kinesin Köpfen, die durch den anderen Kopf des Dimers gebunden sind. Dies führt zu einer effektiven Erhöhung des Mikrotubulus–Radius, die nicht berücksichtigt wurde. Auf diesen Effekt wird noch eingegangen.

Für monomere Kinesinkonstrukte wurden keine Untersuchungen durchgeführt. Daher ist nicht bekannt, ob diese Konstrukte die Struktur der Mikrotubuli verändern. Es wäre jedoch zu erwarten, daß sie einen ähnlichen Effekt wie dimere Konstrukte haben. Bei dimeren Konstrukten von Rattenkinesin wurde festgestellt, daß eine *in rigor* Bindung an den Mikrotubulus eine strukturelle Veränderung in der β -Tubulinuntereinheit bewirkt, die dadurch eine Rotation nach aussen und zu der α -Untereinheit hin oder eine Verschiebung der Domänen zueinander, mit einem nach außen hin gleichen Resultat, durchmacht [45].

Sollte das monomere Konstrukt die Struktur des β -Tubulins nicht verändern, so wäre eine festere Bindung zwischen der α - und der β -Untereinheit des Tubulins durch das angelagerte Kinesin–Monomer für die gestiegene Biegesteifigkeit eine mögliche Erklärung. Eine Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers des Mikrotubulus kann als alleiniger Grund praktisch ausgeschlossen werden. Hierfür wäre ein Anwachsen der Dicke von 24 nm ohne Kinesin auf über 100 nm mit gebundenem Kinesin für einen Mikrotubulus mit 10 μm Länge nötig. Dies ist jedoch mit einem Molekül wie Kinesin nicht möglich.

Durch die angesprochenen strukturellen Veränderungen ließe sich eine Veränderung der Biegesteifigkeiten durch die beiden dimeren Kinesinkonstrukte in die gleiche Richtung gut argumentieren. Da jedoch das kurze dimere NcKin433 zu einer tendenziellen Aufweichung der Mikrotubuli führt, das Vollängen–Konstrukt NcKin928 jedoch signifikant höhere Biegesteifigkeitswerte ergibt, greift diese Argumentation nicht. Wie schon für das monomere Konstrukt aufgezeigt, kann auch ein veränderter Durchmesser des Filamentes durch verschiedene Bindepartner nicht als Ursache auftreten, da diese Effekte zu klein wären. Daher kann leider nicht abschließend geklärt werden, welche Effekte Veränderungen in den Biegesteifigkeiten verursachen. Strukturelle Veränderungen der einzelnen Tubulin–Monomere, sowie Klammerungseffekte von Untereinheiten durch ein verbindendes Kinesin sind jedoch am wahrscheinlichsten.

6 Kraftmikroskopische Untersuchung des Kinesins

6.1 Motivation

Kinesine stellen eine wichtige Gruppe von Motorproteinen dar. Sie sind im Transport von Vesikeln zur Zellperipherie wichtig. Der Aufbau der Kopfdomäne wurde durch Röntgenstrukturanalyse am Proteinkristall aufgedeckt. Für den Domänenbau des Proteins C-terminal des Halsbereiches sind keine Strukturdaten verfügbar. Aufgrund von Hinweisen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen und von Programmen zur Vorhersage von superhelikaler Struktur wurde der Domänenbau modelliert. Ein direkter Nachweis mit einer hochauflösenden Methode steht allerdings noch aus. Werden in Modellen auch nur geringe Fehler bei der Bestimmung der Entropie oder Enthalpie gemacht, so wäre eine komplett andere Konformation begünstigt. Obwohl die Faltung eines Proteins nur zu einem Energiegewinn von 20 bis 60 kJ/mol führt, belaufen sich die zu berücksichtigenden Energiebeiträge aus Enthalpie (Wasserstoffbrücken, van der Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkung) und Entropie (Konformation, assoziiertes Wasser) auf einige Millionen kJ/mol [13].

Die Struktur des superhelikalen Myosinschwanzes wurde erfolgreich mit der Kraftspektroskopie untersucht. Deshalb wurde hier der Versuch unternommen, diese Methode auch auf das Kinesin anzuwenden.

6.2 Untersuchungen an Vollängen Kinesin

Zunächst wurde ein in *E. coli* exprimiertes Vollängen Kinesin im Kraftspektrometer betrachtet. Da für diese Art der Untersuchungen wichtig ist, wie sauber die Präparation ist, wurde eine Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 19 auf Seite 66 dargestellt. Es ist deutlich sichtbar, daß sich nur geringe Mengen an Verunreinigungen in der Probe befinden. So lange keine gesicherten Informationen über die Strukturmerkmale der Kraftkurven vorliegen, wird versucht, Ähnlichkeiten aufzudecken, die charakteristisch für das zu untersuchende Molekül sind.

Das Kinesin wurde im Puffer AP100 verdünnt, ein Tropfen hiervon auf ein Polyamin-beschichtetes Deckglas aufgetragen und in das Kraftspektrometer eingespannt. Als Spitze wurden goldbeschichtete Cantilever verwendet. Drei typische Meßkurven an Kinesin sind in der Abbildung 20 dargestellt.

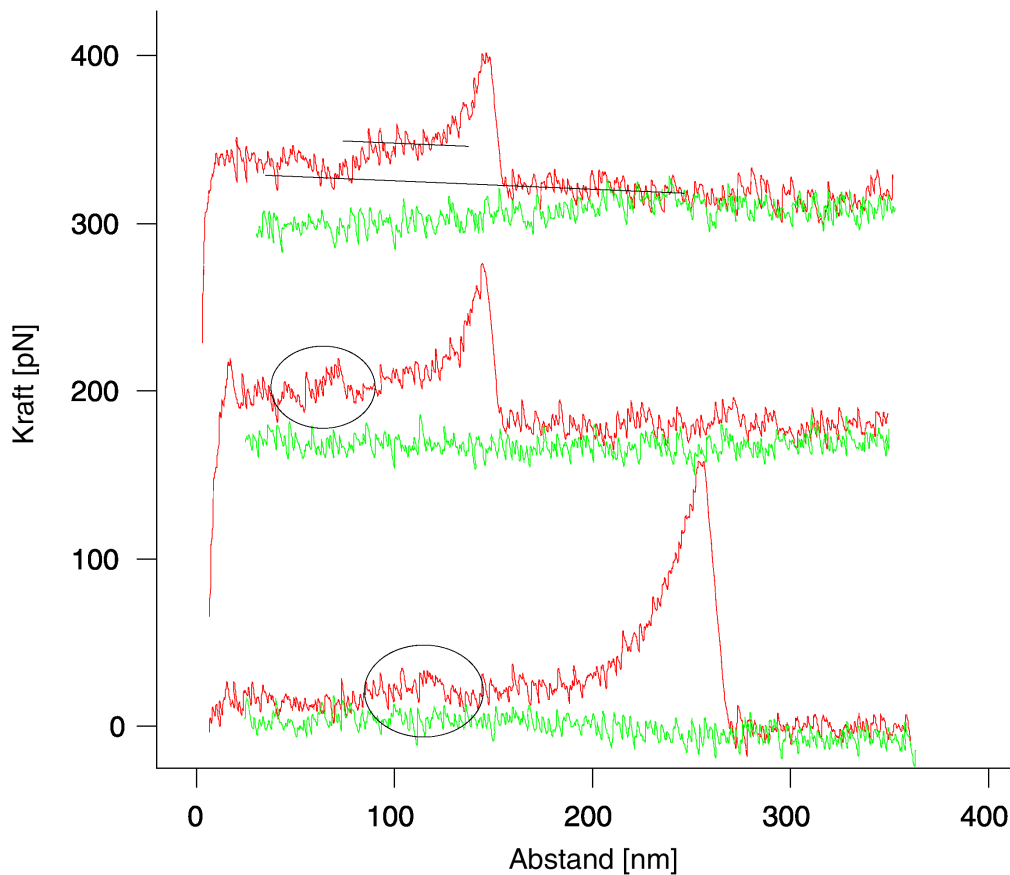


Abbildung 20: *Eindrück- und Rückziehkurve für drei verschiedene gemessene Vollängen Kinesin-Moleküle. Einzelne schwache Strukturmerkmale sind zu erkennen. So ist, besonders deutlich in der obersten Kurve zu sehen, ein leichtes Plateau angedeutet. Ein Einbruch der Kraft auf einem sehr niedrigen Kraftniveau wurde ebenfalls bei mehreren Kraftkurven beobachtet. Ein Plateau (zwei parallele Linien) und zwei Krafteinbrüche (Kreise) sind exemplarisch durch schwarze Linien markiert.*

Die maximal beobachtete Länge bis zum Abreißen des Moleküls von der Spitze beträgt etwa 250 nm. Dies entspricht einer Kettenlänge von etwa 700 AS im ungefalteten Zustand [84]. Auffällig ist der flache Verlauf der Meßkurve. Offensichtlich brechen die Strukturen des Kinesins schon bei sehr geringen Kräften auf.

In der zweiten und dritten Meßkurve wurde jeweils ein kleiner Einbruch bei sehr geringer Kraft markiert. Bei der mittleren Kurve befindet sich dieser Einbruch sehr nahe an oft auftretenden anfänglichen Kraftschwankungen, die durch unerwünschte Wechselwirkungen entstehen. Dabei könnte es sich um ein kurzes Protein handeln, das sich zusätzlich zu dem gewünschten zwischen Spitze und Oberfläche befindet und bei etwa 80 nm Abstand abreißt. Bei der unteren Kurve ist der Einbruch in der Kraft nicht besonders klar ausgeprägt. Es könnte sich daher auch um eine thermische Fluktuation handeln. Da solche Einbrüche jedoch bei vielen Messungen auftraten, wird angenommen, daß sie ein charakteristisches Merkmal der Kinesinstruktur darstellen.

Außerdem kann in allen drei Kurven ein Plateau unterschiedlicher Ausprägung beobachtet werden. Dieses wurde in der obersten Kurve der Abbildung durch die Linien angedeutet. Die Grundlinie ist nicht horizontal, da der Messung eine Temperaturdrift des Piezo-Stellelementes überlagert ist. Ein Plateau läßt auf eine superhelikale Struktur schließen. Lassen sich andere Domänen bis zu einer bestimmten Kraft dehnen, um dann in einem einzigen Ereignis den Übergang von der gefalteten in die ungefaltete Konformation zu vollziehen, so reagieren superhelikale Strukturen mit einer elastischen Verformung. Durch einen Anstieg der Kraft wird sie, wie andere Strukturen auch, zunächst in eine gestreckte Konformation gebracht. Steigt die Kraft weiter an, so entfalten die Helixwindungen nacheinander. Dadurch streckt sich das Molekül auf etwa das 2,5-fache bei seiner vollständigen Entfaltung. Trägt eine Aminosäure in der gefalteten Struktur etwa 1,4 Å zur Länge bei, so sind es in der entfalteten zirka 3,6 Å [84].

Das Plateau bei den superhelikalen Sequenzstücken des Myosin II, dem im Muskel aktiven Myosin, ist bei einer Kraft von 20 pN bis 25 pN zu finden. Im Vergleich dazu kann die superhelikale Kinesinstruktur nur Kräfte von etwa 5 pN bis 10 pN kompensieren. Das thermische Rauschen weist eine Intensität von etwa 5 pN auf, wodurch das Definieren des Beginns und Endes eines Plateaus erschwert wird.

Mit diesem Ansatz konnten erste Ergebnisse zu Strukturmerkmalen im Schwanzbereich des Kinesins gewonnen werden. Um jedoch nähere Einzelheiten zu erforschen, waren Überlegungen und Versuche nötig, die im folgenden Abschnitt aufgezeigt werden.

6.3 Untersuchungen an chimären Molekülen aus Kinesin und Titin

Für die kraftmikroskopischen Untersuchungen ist nur die Schwanzregion des Kinesins wichtig. Es ist nicht relevant, ob das Protein katalytisch aktiv ist. Die Kopfdomäne des Kinesins kann somit ausgetauscht oder entfernt werden. Zur leichteren Zuordnung von gemessenen Kraft–Abstands–Kurven ist es hilfreich, Domänen zu besitzen, die einen bekannten Verlauf des Graphen aufweisen. Ein möglicher Kandidat hierfür sind die Ig-Domänen des Muskelproteins Titin. Diese sind gut erforscht und weisen ein charakteristisches Muster in den Meßkurven auf [83].

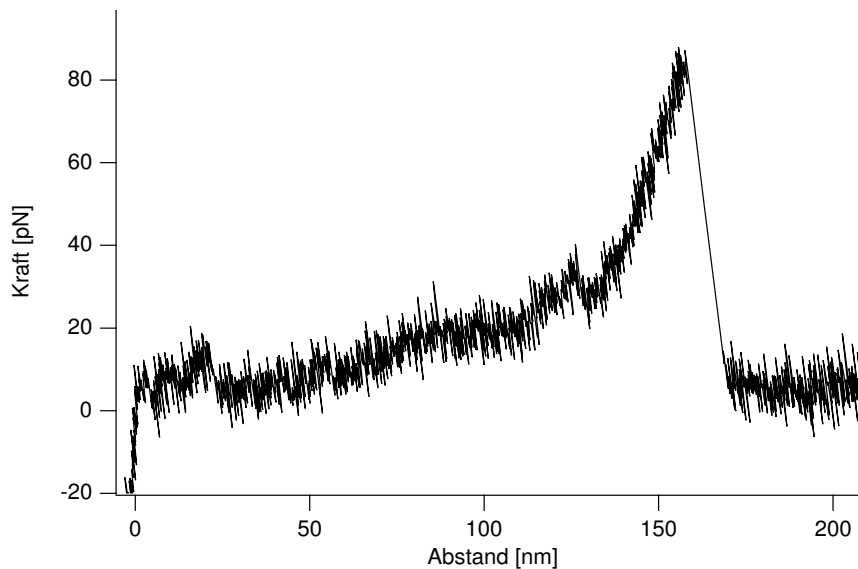


Abbildung 21: *Meßkurve einer Titin–Kinesin–Chimäre. Nach einem schwach ausgeprägten Plateau ist bei einem Abstand von etwa 130 nm das aufbrechen einer kleinen Struktur zu beobachten.*

Wie bereits im Materialteil in den Kapiteln 3.4 und 3.6 ab Seite 19 angeführt, wurden einige chimäre Proteine entworfen, die aus Titin– und Kinesin–Domänen bestehen. Allen Konstrukten gemeinsam ist der Austausch des Kinesin–Kopfes durch vier Titin–Domänen (Ig27–Ig30). Dabei gab es zwei Zielsetzungen für die Verwendung der Chimären. Zum einen sollte das Molekül zwischen dem C-terminalen Kinesin–Schwanz und den N-terminalen Titin–Domänen gegriffen werden. Dadurch ist eine eindeutige Zuordnung von kleinen Kräften zum Kinesin Schwanz möglich. Zum anderen wurde der Ansatz verfolgt, ein dimeres Konstrukt C-terminal querzuverbinden. Auf diese

Weise sollte ein „unzipping“ des superhelikalen Schwanzes erzielt werden. Da mit dieser Methode die Struktur wie ein Reißverschluß entfaltet wird, ist eine orts aufgelöste Zuordnung von stabilen und labilen Domänen möglich.

Im Verlauf der Messungen stellte sich heraus, daß nicht nur, wie erwartet, die globuläre Schwanzdomäne an der Unterlage gut haftet, sondern auch weitere Teile des Schwanzes. Es war mit keinem der verwendeten Konstrukte möglich, ein „unzipping“ der superhelikalen Kinesinstruktur zu beobachten. Auch konnte nicht mit Hilfe der Titin-Domänen eine Lokalisation der superhelikalen Abschnitte bestimmt werden, da in den Diagrammen die bei niedriger Kraft gemessenen Strukturen vor den markanten Titin-Spitzen nicht homogen genug waren.

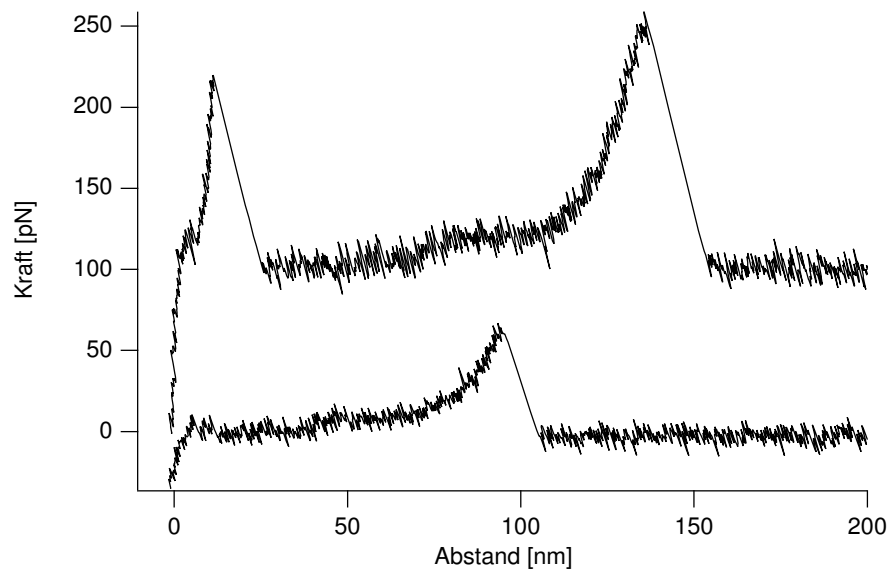


Abbildung 22: *Meßkurven an Titin-Kinesin-Chimären mit C-terminal verkürztem Kinesin. Es ist zu erkennen, daß sich ein Plateau bei einer Kraft von etwa 10-15 pN ausbildet.*

Die chimären Konstrukte konnten jedoch dazu verwendet werden, die am Vollängen-Kinesin durchgeführten Messungen zu bestätigen. In Abbildung 21 ist die Meßkurve eines Moleküles dargestellt, bei dem nur der Kopf durch vier Titin-Domänen ausgetauscht wurde. Zunächst sind Oberflächeneffekte zu beobachten, bevor sich ein schwaches Plateau ausbildet. Dieses weist jedoch am Anfang keinen klaren Anstieg der Kraft auf, was darauf schließen läßt, daß schon bei den durch die thermische Fluktuation erzielten Kräften extrem schwache Strukturen aufzubrechen beginnen. Bei einem Abstand von ungefähr 80 nm erreicht das Plateau eine Kraft von circa 15 pN. Dies ist etwa

um den Faktor 2 niedriger als die am Myosin II gemessenen Kräfte. Bei 130 nm ist ein Einbruch in der Kraft zu erkennen, der durch eine kleine Struktur verursacht wird. Diese globuläre Struktur ist nur geringfügig stabiler als die superhelikale Struktur.

In Abbildung 22 sind zwei Meßkurven von C-terminal verkürzten Chimären dargestellt. In beiden ist gut ein ausgeprägtes Plateau bei geringer Kraft zu erkennen. Es befindet sich ebenfalls auf einem Niveau von etwa 10-15 pN.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Strukturuntersuchungen am Kinesin konnten somit die starke Vermutung bestätigen, daß sich superhelikale Sequenzanteile im Kinesinschwanz befinden. Die Obergrenze für ihre Stabilität konnte unter den verwendeten Rahmenbedingungen auf maximal 15 pN festgelegt werden. Außerdem befinden sich nicht-helikale Strukturen im Schwanzbereich, die aus wenigen 10 Aminosäuren bestehen und einen Einbruch der Kraft bei 30 pN bewirken. Um quantitative Aussagen über die Größe der superhelikalen Domänen zu machen, sind weitere Messungen und Klonierungen nötig. Eine weitere Fragestellung, die dabei beantwortet werden könnte, ist die nach „Trigger-Sequenzen“, Sequenzabschnitten, die die Stabilität einer superhelikalen Struktur kontrollieren.

Anhang A: Verwendete Puffer und Medien

Chemikalie	Konzentration
Na-Pipes	100 mM
MgCl ₂	2 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ml
TAME	10 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin	1 µg/ml
Aprotinin	1 µg/ml
NaOH/HCl	pH = 6.9

Tabelle 6: Arbeitspuffer AP100

Chemikalie	%(w/v) in Stammlösung	Zugabe pro Liter Medium [ml]
Spurenelemente	Siehe Tabelle 8	1
Na Citrat • 2H ₂ O	10	5
FeCl ₃ • 6H ₂ O	1	1
CaCl ₂	4	1
MgSO ₄ • 7H ₂ O	10	3
NH ₄ NO ₃	10	3
KH ₂ PO ₄	10	3
K ₂ HPO ₄	10	3

Tabelle 7: Zusammensetzung des Nährmediums für *Chlamydomonas reinhardtii*

Chemikalie	Konzentration (g/l)
H ₃ BO ₃	1,00
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	1,00
MnSO ₄ • H ₂ O	0,31
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,20
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,20
CuSO ₄	0,04

Tabelle 8: Bestandteile der Spurenelement-Stammlösung für das *Chlamydomonas reinhardtii* Nährmedium

	Puffer A	Puffer B	Puffer C	Puffer D	ATP-Stock
Na-Pipes	100 mM	500 mM	100 mM	100 mM	100 mM
EGTA	2 mM	2 mM	1 mM	2 mM	2 mM
MgSO ₄	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
DTT	1 mM		1 mM	1 mM	1 mM
ATP	0,1 mM		1 mM	0,05 mM	100 mM
NaOH	pH = 6,9	pH = 6,9	pH = 6,9	pH = 6,9	pH = 6,9

Tabelle 9: Puffer für die Reinigung von Tubulin aus Schweinehirn

	Puffer W	Puffer A	Puffer B	Puffer C
Hepes	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
MgSO ₄		5 mM	5 mM	5 mM
EDTA		0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
Mercaptoethanol		0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
NON-IDET			0,4 % (v/v)	
KCl				0,6 M
NaOH	pH = 7,5	pH = 7,5	pH = 7,5	pH = 7,5

Tabelle 10: Reinigungspuffer für die Axonemen-Präparation

Tubulin	1,5 mg/ml
GTP	10 mM
AP100	(siehe Tab. 6 auf S. 74)

Tabelle 11: *Polymerisationslösung*

Tubulin	0,7 mg/ml
Kinesinkonstrukt	0,1 - 1,0 mg/ml
GTP	6,7 mM
AMP-PNP	6,7 mM
AP100	(siehe Tab. 6 auf S. 74)

Tabelle 12: *Zusammensetzung der Meßlösung*

Anhang B: Makros für Igor PRO und NIH Image

Makros für Igor PRO 3.16b

Im folgenden Makro wird aus den, von der in NIH Image durchgeführten Rohdatenauswertung, erhaltenen Positionen der Exponentialkoeffizient berechnet, der in die Biegesteifigkeitsmessungen eingeht. Im Makro „Biegen mit Shiftcorrection“ werden eventuelle Erschütterungen oder anderweitige Bewegungen des fixen Hintergrunds zur Berechnung einbezogen, im Makro „Biegen ohne Shiftcorrection“ werden diese nicht berücksichtigt.

```
Macro Biegen_mit_Shiftcorrection()
silent1
Variable j
Variable i=0
Variable lang=DimSize(xpos,0)
Make/O/D/N=(lang) Distanz
Make/O/D/N=1 Expcoeff
Make/O/D/N=3 Expfirst
do
xpos(i) -= Particlex(Slice(i))
ypos(i) -= Particley(Slice(i))
i += 1
while (i<lang)
Display ypos vs xpos
j = Slice(0)
Slice -= j
Make/O/D/N=(lang) Fitwave
i = -1
do
i+=1
Distanz(i)=sqrt((xpos(0)-xpos(i))^2+(ypos(0)-ypos(i))^2)
while (i < lang)
CurveFit exp Distanz /X=Slice /D
Expfirst = W_coef
Distanz = Distanz - Expfirst(0)
Distanz = Distanz / Expfirst(1)
Display Distanz vs Slice
FuncFit singleexp Expcoeff Distanz /X=Slice/D=Fitwave
```

Anhang B

```
AppendToGraph Fitwave vs Slice
ModifyGraph rgb(Fitwave)=(0,0,65535)
Textbox/N=text0/F=0/S=3 "\\{\\"Exponent = %g\\",Expcoeff(0)*25}"
End Macro

Macro Biegen_ohne_Shiftcorrection()
silent 1
Variable j
Variable i=0
Variable lang=DimSize(xpos,0)
Make/O/D/N=(lang) Distanz
Make/O/D/N=1 Expcoeff
Make/O/D/N=3 Expfirst
Display ypos vs xpos
j = Slice(0)
Slice -= j
Make/O/D/N=(lang) Fitwave
i = -1
do
i+=1
Distanz(i)=sqrt((xpos(0)-xpos(i))^2+(ypos(0)-ypos(i))^2)
while (i < lang)
CurveFit exp Distanz /X=Slice /D
Expfirst = W_coef
Distanz = Distanz - Expfirst(0)
Distanz = Distanz / Expfirst(1)
Display Distanz vs Slice
FuncFit singleexp Expcoeff Distanz /X=Slice/D=Fitwave
AppendToGraph Fitwave vs Slice
ModifyGraph rgb(Fitwave)=(0,0,65535)
Textbox/N=text0/F=0/S=3 "\\{\\"Exponent = %g\\",Expcoeff(0)*25}"
End Macro

function/D singleexp(w,x)
Wave/D w
Variable/D x
return(exp(-w[0]*x))
end
```

Aus den in NIH Image bestimmten Anfangs- und Endpunkten wurden mit dem Makro MT_Längenbestimmung Längen in Pixeln errechnet. Die Biege-

steifigkeitswerte der einzelnen Mikrotubuli und deren Standardabweichung wurden aus diesen Längen und den Exponentialkoeffizienten, die mit den soeben beschriebenen Makros bestimmt wurden, errechnet.

```

Macro MT_Langenbestimmung()
Variable i=DimSize(x0,0)
Make/O/D/N=(i) length
length=sqrt((x0-x1)^2+(y0-y1)^2)
EndMacro

Macro EI_Bestimmung()
silent 1
Variable i=DimSize(a,0)
Variable j=0
Make/O/D/N=(i) EI,EIstdev
Make/O/D/N=3 EIvalues | i=0: Mittelwert; i=1: sigma intern; i=2: sigma
extern
Make/O/D/N=5 EItemp | Temporaere Ablagen fr Zwischenwerte;
0=sum(EIstdev)^-2
length /= 25
do
EI(j)=a(j)*5.77e-4*length(j)^4/ln(0.05/length(j))
EIstdev(j) = astdev(j)*5.77e-4*length(j)^4/ln(0.05/length(j))
j+=1
while(j<i)
j=0
EItemp = 0
do
EItemp(0) += EIstdev^-2
EItemp(1) += EI*EIstdev^-2
j += 1
while(j<i)
EIvalues(0)=EItemp(1)/EItemp(0)
EIvalues(1)=sqrt(1/EItemp(0))
j=0
do
EItemp(2) += EIstdev(j)^-2*(EI(j)-EIvalues(0))^2
j += 1
while(j<i)
EIvalues(2)=sqrt(EItemp(2)/((i-1)*EItemp(0)))
print "Mittelwert:"+num2str(EIvalues(0))+" Sigma

```

Anhang B

```
intern:"+num2str(EIvalues(1))+" Sigma extern:"+num2str(EIvalues(2))
EndMacro
```

Das folgende Makro wurde dazu verwendet, gewichtete Verteilungen darzustellen.

```
Macro Aufsummieren(selectwave)
Variable i,j
String selectwave
Prompt selectwave,"Aufzusummierende Wave",popup,WaveList("*,",",",",")
i = DimSize($selectwave,0)
j = 0
silent 1
do
j += 1
$selectwave(j) += $selectwave(j-1)
while (j<(i-1))
$selectwave/=$selectwave(j)
print i
EndMacro
```

Dieses Macro sortiert gewichtete oder ungewichtete Verteilungen in die spezifizierten Kanäle und stellt das Ergebnis als Graph dar. Mittelwert, Standardabweichung und Anzahl der Messpunkte, sowie höchster und niedrigster Messwert werden in einem extra Fenster ausgegeben.

```
Macro Distribution(sw,breite_x, Kanal, achsenb_x,selectwave,selectweight)
Variable i, sw,minx, channelwidthx, addx, tt_sum
String achsenb_xs="Biegesteifigkeit"
String selectwave=""
String selectweight=""
Prompt sw,"Weighted distribution?",popup,"yes;no"
Prompt selectweight,"Select standard deviation
wave",popup,WaveList("*,",",",",")
";_none_"
String Note_selectwave=""
Prompt selectwave,"Select Wave for gaussian distribution
",popup,WaveList("*,",",",",")
Variable achsenb_x=3
Prompt achsenb_x,"X-axis label ",popup,"velocity [ $\mu$ m/sec];time
[sec];Biegesteifigkeit"
```

```
Variable /D breite_x=0.5
Prompt breite_x, "max X-value "
Variable Kanal=10
Prompt Kanal,"distribution "
tt_sum=0
Note_selectwave = "N_" + Selectwave
Silent 1
if (achsenb_x==2)
achsenb_xs="time [sec]"
endif
if (achsenb_x==1)
achsenb_xs="velocity [ $\mu$ m/sec]"
endif
if (sw==2)
Make/O/N=(DimSize($selectwave,0)) nonweight
selectweight="nonweight"
nonweight=1
endif
String resultwave=("Dist_"+selectwave)[0,39]
WaveStats/Q $selectwave
minx = 0
channelwidthx = breite_x
channelwidthx /= Kanal
Make/O/D/N=(Kanal) $resultwave
KillWaves $resultwave
Make/O/D/N=(Kanal) $resultwave
i = DimSize($selectwave,0)
do
i -= 1
tt_sum = tt_sum + (($selectweight(i))^-2)
addx = floor(($selectwave(i) - minx) / channelwidthx)
if (addx == Kanal)
addx -= 1
endif
$resultwave(addx) += ($selectweight(i))^-2
while (i > 0)
$resultwave=($resultwave/tt_sum)*100
SetScale/P x,(minx),(channelwidthx),"",$resultwave
Display $resultwave as resultwave
ModifyGraph mode=5
SetAxis/A/E=1/N=1 bottom
```

Anhang B

```
SetAxis/A/N=1/E=1 left
ModifyGraph hbFill=4,rgb=(8738,8738,8738)
Label /Z left, "number [%]"
Label /Z bottom, achsenb_xs
Textbox/C/N=text0 /A=RT /E=0 /F=0 " number (data points)
"+num2str(V_npnts)
if (achsenb_x==1)
NewNotebook /F=0/N=$Note_selectwave
Notebook $Note_selectwave text=" Data analysed from WAVE >"+Selectwave+"<
\r \r"
Notebook $Note_selectwave text=" average velocity "+num2str(V_avg)+"
µm/sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" standard deviation +/-"+num2str(V_sdev)+"
µm/sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" minimum velocity "+num2str(V_min)+"
µm/sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" maximum velocity "+num2str(V_max)+"
µm/sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" number of measures "+num2str(V_npnts)+"
\r"
endif
if (achsenb_x==2)
NewNotebook /F=0/N=$Note_selectwave
Notebook $Note_selectwave text=" Data analysed from WAVE >"+Selectwave+"<
\r \r"
Notebook $Note_selectwave text=" average time "+num2str(V_avg)+" sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" standard deviation +/-"+num2str(V_sdev)+"
sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" minimum time "+num2str(V_min)+" sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" maximum time "+num2str(V_max)+" sec \r"
Notebook $Note_selectwave text=" number of measures "+num2str(V_npnts)+"
\r \r"
Notebook $Note_selectwave text=" total time "+num2str(tt_sum)+" sec \r"
endif
if (achsenb_x==3)
NewNotebook /F=0/N=$Note_selectwave
Notebook $Note_selectwave text=" Data analysed from WAVE > "+Selectwave+"<
\r \r"
Notebook $Note_selectwave text=" average bending stiffness
"+num2str(V_avg)+" \r"
Notebook $Note_selectwave text=" standard deviation +/-
```



```

"+num2str(V_sdev)+"\r"
Notebook $Note_selectwave text=" minimum bending
stiffness"+num2str(V_min)+" \r"
Notebook $Note_selectwave text=" maximum bending
stiffness"+num2str(V_max)+"\r"
Notebook $Note_selectwave text=" number of measures "+num2str(V_npnts)+"
\r \r"
endif
End Macro

```

Das folgende Macro gibt statistisch relevante Werte aus. Diese sind: Mittelwert und Standardabweichung, sowie kleinster, 25%-, 50%-, 75%- und größter Werte – jeweils für die gewichtete und ungewichtete Darstellung errechnet.

```

Macro MeanValues(selectwave,selectweight)
Variable i,j
String selectwave=""
String selectweight=""
Prompt selectwave,"Select bending stiffness wave",popup,WaveList("*,",",",",")
Prompt selectweight,"Select weight wave",popup,WaveList("*,",",",",")
String Note_selectwave = "N_"+ selectwave
Silent 1
String Ergebniswave="Erg_"+selectwave
Make/O/N=12 $Ergebniswave
// Used positions in Ergebniswave: 0 = unweighted average
// 1 = unweighted standard deviation
// 2 = weighted average
// 3 = standard deviation of weighted average
// 4 = lowest bending stiffness
// 5 = highest bending stiffness
// 6 = 25% value unweighted
// 7 = median unweighted
// 8 = 75% unweighted
// 9 = 25% value weighted
// 10 = median weighted
// 11 = 75% value weighted
$Ergebniswave=0
i = DimSize($selectwave,0)
WaveStats/Q/R=[1] $selectwave
$Ergebniswave(0)=V_avg
$Ergebniswave(1)=V_sdev

```

Anhang B

```
do
i -= 1
$Ergebniswave(2) += $selectwave(i)*($selectweight(i)-$selectweight(i-1))
while(i>1)
i = numpnts($selectwave)
do
i -= 1
$Ergebniswave(3) += ($selectweight(i)-$selectweight(i-1))*($selectwave(i)
-Ergebniswave(2))^2
while(i>1)
i = numpnts($selectwave) - 1
$Ergebniswave(3) = sqrt($Ergebniswave(3)/i)
$Ergebniswave(4) = $selectwave(1)
$Ergebniswave(5) = $selectwave(i)
$Ergebniswave(6) = ((4-mod((i+1),4))*$selectwave(floor((i+1)/4))+
mod((i+1),4) *$selectwave((floor((i+1)/4)+1)))/4
$Ergebniswave(7) = ((2-mod((i-1),2))*$selectwave((floor((i-1)/2)+1))+
mod((i-1),2) *$selectwave((floor((i-1)/2)+2)))/2
$Ergebniswave(8) = ((4-mod((i+1),4))*$selectwave(i-floor((i+1)/4)+1)+
mod((i+1),4) *$selectwave((i-floor((i+1)/4))))/4
do
i -= 1
while($selectweight(i)>=0.75)
$Ergebniswave(11) = ($selectwave(i+2)-$selectwave(i+1))/($selectweight(i+1)
-$selectweight(i))*(0.75-$selectweight(i+1))+$selectwave(i+2)
i += 1
do
i -= 1
while($selectweight(i)>=0.5)
$Ergebniswave(10) = ($selectwave(i+2)-$selectwave(i+1))/($selectweight(i+1)
-$selectweight(i))*(0.5-$selectweight(i+1))+$selectwave(i+2)
i += 1
do
i -= 1
while($selectweight(i)>=0.25)
$Ergebniswave(9) = ($selectwave(i+2)-$selectwave(i+1))/($selectweight(i+1)
-$selectweight(i))*(0.25-$selectweight(i+1))+$selectwave(i+2)
NewNotebook /F=0/N=$Note_selectwave
Notebook $Note_selectwave text="Calculation of important evaluation values
of Wave >"+selectwave+"< \r \r"
Notebook $Note_selectwave text="Mean value of non weighted values:"
```

```

"+num2str($Ergebniswave(0))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="Standard deviation of non weighted values:
"+num2str($Ergebniswave(1))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="Mean value of weighted values:
"+num2str($Ergebniswave(2))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="Standard deviation of weighted values:
"+num2str($Ergebniswave(3))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="Minimum value:
"+num2str($Ergebniswave(4))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="Maximum value:
"+num2str($Ergebniswave(5))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="25 % value non weighted/weighted:
"+num2str($Ergebniswave(6))+"/"+num2str($Ergebniswave(9))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="Median non weighted/weighted:
"+num2str($Ergebniswave(7))+"/"+num2str($Ergebniswave(10))+"\r"
Notebook $Note_selectwave text="75 % value non weighted/weighted:
"+num2str($Ergebniswave(8))+"/"+num2str($Ergebniswave(11))+"\r"
end

```

Makro für NIH Image 1.62

Die verwendeten Rohdaten für das im folgenden abgedruckte Makro waren TIFF-Stapel, die von NIH Image geöffnet werden können. Da die Bilder der Mikrotubuli im Phasenkontrast ohne eine Hintergrundsubtraktion schlecht zu erkennen sind, wurde eine Eigenart des menschlichen Auges ausgenutzt. In animierten Bildern wird ein statistisches Rauschen stark unterdrückt und so auch noch aus sehr schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen die Information verfügbar gemacht. Die Position des freien Mikrotubulus-Endes müßte mit dem Mauszeiger detektiert werden. Sie wurde in eine tabellarische Liste geschrieben, die anschließend von den Igor PRO Makros weiterverarbeitet wurde.

```

var
  aktposmark, aktposwind, xstart, ystart, xend, yend, width:integer;
{global variables for marker, MT position}
  aktposname:string;

procedure CheckForStack;
begin
  if nPics=0 then begin

```

Anhang B

```
    PutMessage('This macro requires an image or stack.');
```

```
    exit;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
macro 'Manual MT Length Measurement [N]';
```

```
var
```

```
    slice, curSlice, anim, picnum,xpos, ypos, i, j, lrs, ana, ane,
```

```
k:integer;
```

```
begin
```

```
    CheckForStack;
```

```
    SetCursor('cross');
```

```
    picnum:= PicNumber;
```

```
    curSlice:= SliceNumber;
```

```
    NewTextWindow('Data');
```

```
    Write('IGOR'chr(13));
```

```
    Write('WAVES/I Slice xpos ypos'chr(13)'BEGIN'chr(13));
```

```
    ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key to skip
```

```
slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to exit');
```

```
    SelectPic(picnum);
```

```
    slice:= nSlices;
```

```
    xpos:=0;
```

```
    ypos:=0;
```

```
    anim:=0;
```

```
    lrs:=0;
```

```
    i:= curSlice;
```

```
repeat
```

```
    SelectSlice(i);
```

```
    if (anim>=0) then begin
```

```
        ana:=i-3;
```

```
        ane:=i+3;
```

```
        if ana<1 then begin
```

```
            ana:=1;
```

```
        end;
```

```
        if ane>nSlices then begin
```

```
            ane:=nSlices;
```

```
        end;
```

```
        if anim=0 then begin
```

```
            if lrs=0 then begin
```

```
                ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key to
```

```
skip slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to exit'chr(13)'no
```

```
values saved'chr(13)chr(13)'animation from Slice 'ana' to 'ane');
    end
    else begin
        ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key
to skip slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to
exit'chr(13)'last position'chr(13)'slice: 'lrs' X: 'xpos' Y: 'ypos'
'chr(13)'animation from slice 'ana' to 'ane');
        end;
    end
    else begin
        if lrs=0 then begin
            ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key to
skip slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to exit'chr(13)'no
values saved'chr(13)chr(13)'animation from Slice 'ana' to 'ane'
'chr(13)'slice: 'anim' skipped');
            end
        else begin
            ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key
to skip slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to
exit'chr(13)'last position'chr(13)'slice: 'lrs' X: 'xpos' Y: 'ypos'
'chr(13)'animation from slice 'ana' to 'ane' 'chr(13)'slice: 'anim'
skipped');
            end;
        end;
        for j:=ana to ane do begin
            SelectSlice(j);
            wait (0.05);
        end;
        SelectSlice(i);
    end;
    anim:=0;
    repeat until(KeyDown('shift') or KeyDown('option') or
KeyDown('control') or Button);
    if KeyDown('control') then begin
        ana:=i-3;
        ane:=i+3;
        if ana<1 then begin
            ana:=1;
        end;
        if ane>nSlices then begin
            ane:=nSlices;
```

Anhang B

```
end;
anim:=-1;
if lrs=0 then begin
    ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key to skip
slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to exit'chr(13)'no
values saved'chr(13)chr(13)'animation from Slice 'ana' to 'ane'
'chr(13)'user activated animation');
end
else begin
    ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key to skip
slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to exit'chr(13)'last
position'chr(13)'slice: 'lrs' X: 'xpos' Y: 'ypos' 'chr(13)'animation from
slice 'ana' to 'ane' 'chr(13)'user activated animation');
end;
for j:=ana to ane do begin
    SelectSlice(j);
    wait (0.05);
end;
SelectSlice(i);
end
else begin
    if KeyDown('option') then begin
        SelectWindow('Data');
        Write('END'chr(13));
        ShowMessage('data aquisition finished'chr(13)chr(13)'user defined
end');
        SetCursor('arrow');
        exit;
end;
if KeyDown('shift') then begin
    ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key
to skip slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to
exit'chr(13)chr(13)chr(13)chr(13)'slice: 'i' skipped');
    Wait(0.2);
    anim:=i;
end
else begin
    GetMouse(xpos,ypos);
    ShowMessage('mousebutton for MT position'chr(13)'Shift-key
to skip slice'chr(13)'Ctrl-key to animate'chr(13)'Alt-key to
exit'chr(13)chr(13)'slice: 'i' X: 'xpos' Y: 'ypos');
```

```
    SelectWindow('Data');
    Write(' 'i' 'xpos' 'ypos);
    Write(chr(13));
    SelectPic(picnum);
    lrs:=i;
    Wait(0.3);
end;
i:=i+1;
end;
until (i>slice);
SelectWindow('Data');
Write('END'chr(13));
ShowMessage('data aquisition finished'chr(13)chr(13)'end of stack');
SetCursor('arrow');
end;
```

Literatur

- [1] ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. UND WATSON, J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, 3. Ausg.
- [2] ALLEN, C. UND BORISY, G. G. (1974) Structural Polarity and Directional Growth of Microtubules of *Chlamydomonas* Flagella, *Journal of Molecular Biology*, **90**, S. 381–402.
- [3] ARNAL, I., KARSENTI, E. UND HYMAN, A. A. (2000) Structural Transitions at Microtubule Ends Correlate with Their Dynamic Properties in *Xenopus* Egg Extracts, *Journal of Cell Biology*, **149**, S. 767–774.
- [4] ASHKIN, A. (1970) Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure, *Physical Review Letters*, **24**, S. 156–159.
- [5] ASHKIN, A. (1978) Trapping of Atoms by Resonance Radiation Pressure, *Physical Review Letters*, **40**, S. 729–732.
- [6] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J. M., BJORKHOLM, J. E. UND CHU, S. (1986) Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles, *Optics Letter*, **11**, S. 288–290.
- [7] BAYOUDH, S., MEHTA, M., RUBINSZTEIN-DUNLOP, H., HECKENBERG, N. R. UND C., C. (2001) Micromanipulation of Chloroplasts Using Optical Tweezers, *Journal of Microscopy*, **203**, S. 214–222.
- [8] BELL, G. I. (1978) Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells, *Science*, **200**, S. 618–627.
- [9] BERGER, B., WILSON, D. B., WOLF, E., TONCHEV, T., MILLA, M. UND KIM, P. S. (1995) Predicting Coiled Coils by Use of Pairwise Residue Correlations, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **92**, S. 8259–8263.
- [10] BERGMANN, L. UND SCHAEFER, C. (1998) *Mechanik, Relativität, Wärme, Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 1*, Walter de Gruyter.
- [11] BINNIG, G., QUATE, C. F. UND GERBER, C. (1986) Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters*, **56**, S. 930–933.

-
- [12] BÖGE, A. (1992) Mechanik und Festigkeitslehre, Vieweg, Braunschweig.
- [13] BRANDEN, C. UND TOOZE, J. (1991) Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, New York.
- [14] BRINKLEY, W. (1997) Microtubules: a Brief Historical Perspective, *Journal of Structural Biology*, **118**, S. 84–86.
- [15] BRONSTEIN, I. N. UND SEMENDJAJEW, K. A. (1991) Taschenbuch der Mathematik, 25. Ausgabe, Teubner, Stuttgart, Kap. 5.2.3.5, S. 688–689.
- [16] CARY, R. B. UND KLYMKOWSKY, M. W. (1992) Finding Filament Function, *Current Biology*, **2**, S. 43–45.
- [17] CASSIMERIS, L., GARD, D., TRAN, P. T. UND ERICKSON, H. P. (2001) XMAP215 is a Long Thin Molecule That Does Not Increase Microtubule Stiffness, *Journal of Cell Science*, **114**, S. 3025–3033.
- [18] COY, D. L., HANCOCK, W. O., WAGENBACH, M. UND HOWARD, J. (1999) Kinesin's Tail Domain is an Inhibitory Regulator of the Motor Domain, *Nature Cell Biology*, **1**, S. 288–292.
- [19] DARNELL, J. E., LODISH, H. F. UND BALTIMORE, D. (1990) Molecular Cell Biology, Scientific American Books, New York.
- [20] DE SAINT-EXUPERY, A. (1999) Der kleine Prinz, Karl Rauch Verlag, Düsseldorf, 7. Ausg.
- [21] DEBYE, P. (1909) Der Lichtdruck auf Kugeln von beliebigem Material, *Annalen der Physik*, **30**, S. 57.
- [22] DOGTEROM, M. UND YURKE, B. (1997) Measurement of the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules, *Science*, **278**, S. 856–860.
- [23] DYE, R. B., FINK, S. P. UND WILLIAMS, R. C. (1993) Taxol-Induced Flexibility of Microtubules and Its Reversal by MAP-2 and Tau, *Journal of Biological Chemistry*, **268**, S. 6847–6850.
- [24] ENDOW, S. A. (2000) Molecular Motors - a Paradigm for Mutant Analysis, *Journal of Cell Science*, **113**, S. 1311–1318.
- [25] ERICKSON, H. P. (1997) FtsZ, a Tubulin Homologue in Prokaryote Cell Division, *Trends in Cell Biology*, **7**, S. 362–367.

- [26] FAWCETT, D. W. (1986) A Textbook of Histology, Saunders, Philadelphia, 11. Ausg.
- [27] FAWCETT, D. W. UND PORTER, K. R. (1954) A Study of the Fine Structure of Ciliated Epithelia, *Journal of Morphology*, **94**, S. 221–281.
- [28] FELGNER, H. (1993) Die LaserPinzette. Charakterisierung und Eichung der Lichtkräfte einer optischen Einstrahl-Falle im Lichtmikroskop, Diplomarbeit, TU München.
- [29] FELGNER, H. (1998) Messung mechanischer Eigenschaften von einzelnen Zytoskelettproteinen mit einer Laser-Pinzette, Doktorarbeit, TU München.
- [30] FELGNER, H., FRANK, R., BIERNAT, J., MANDELKOW, E. M., MANDELKOW, E., LUDIN, B., MATUS, A. UND SCHLIWA, M. (1997) Domains of Neuronal Microtubule-Associated Proteins and Flexural Rigidity of Microtubules, *Journal of Cell Biology*, **138**, S. 1067–1075.
- [31] FELGNER, H., FRANK, R. UND SCHLIWA, M. (1996) Flexural Rigidity of Microtubules Measured with the Use of Optical Tweezers, *Journal of Cell Science*, **109**, S. 509–516.
- [32] FEYNMAN, R. P., LEIGHTON, R. B. UND SANDS, M. (1991) Elektromagnetismus und Struktur der Materie, Vorlesungen über Physik, Band 2, Oldenbourg.
- [33] FLORIN, E.-L., MOY, V. T. UND GAUB, H. E. (1994) Adhesive Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs, *Science*, **264**, S. 415–417.
- [34] FRITZ, M., RADMACHER, M., KACHER, C. M., WEISS, I., THOMPSON, N., HANSMA, H. UND HANSMA, P. K. (1998) Direkt Observation of Proteins and Their Motion by Atomic Force Microscopy, *European Journal of Cell Biology*, **75**, S. 20.
- [35] FUNATSU, T., HARADA, Y., HIGUCHI, H., TOKUNAGA, M., SAITO, K., ISHII, Y., VALE, R. D. UND YANAGIDA, T. (1997) Imaging and Nano-Manipulation of Single Biomolecules, *Biophysical Chemistry*, **68**, S. 63–72.
- [36] FÜRST, D. O., OSBORN, M., NAVE, R. UND WEBER, K. (1988) The Organization of Titin Filaments in the Half-Sarcomere Revealed by Monoclonal Antibodies in Immunoelectron Microscopy; a Map of

- Ten Non-Repetitive Epitopes Starting at the Z Line Extends Close to the M Line, *Journal of Cell Biology*, **106**, S. 1563–1572.
- [37] GIBBONS, I. R. (1981) Cilia and Flagella of Eucaryotes, *Journal of Cell Biology*, **91**, S. 107s–124s.
- [38] GITTES, F., MICKEY, B., NETTLETON, J. UND HOWARD, J. (1993) Flexural Rigidity of Microtubules and Actin Filaments Measured from Thermal Fluctuations in Shape, *Journal of Cell Biology*, **120**, S. 923–934.
- [39] GOUESBET, G. (1994) Generalized Lorenz-Mie Theory and Applications, *Particle & Particle Systems Characterization*, **11**, S. 22–34.
- [40] HAHN, D. UND WAGNER, S. (1985) Kohlrausch Praktische Physik, Band 1, Teubner, Stuttgart, 23. Ausgabe.
- [41] HALL, Z. W. (1992) An Introduction to Molecular Neurobiology, Sinauer, Sunderland, MA.
- [42] HAPPEL, J. UND BRENNER, H. (1973) Low Reynolds Number Hydrodynamics, Noordhoff, Leyden.
- [43] HIROKAWA, N. (1998) Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport, *Science*, **279**, S. 519–526.
- [44] HIROKAWA, N., PFISTER, K. K., YORIFUJI, H., WAGNER, M. C., BRADY, S. T. UND BLOOM, G. (1989) Submolecular Domains of Bovine Brain Kinesin Identified by Electron Microscopy and Monoclonal Antibody Decoration, *Cell*, **56**, S. 867–878.
- [45] HIROSE, K., LÖWE, J., ALONSO, M., CROSS, R. A. UND AMOS, L. A. (1999) 3D Electron Microscopy of the Interaction of Kinesin with Tubulin, *Cell Structure and Function*, **24**, S. 277–284.
- [46] HOHENADL, M., STORZ, T., KIRPAL, H., KROY, K. UND MERKEL, R. (1999) Desmin Filaments Studied by Quasi-Elastic Light Scattering, *Biophysical Journal*, **77**, S. 2199–2209.
- [47] HUNT, A. J., GITTES, F. UND HOWARD, J. (1994) The Force Exerted by a Single Kinesin Molecule Against a Viscous Load, *Biophysical Journal*, **67**, S. 766–781.
- [48] HYAMS, J. F. UND LLOYD, C. W. (1993) Microtubules, Wiley-Liss, New York.

- [49] IBACH, H. UND LÜTH, H. (1995) Festkörperphysik, Springer, Berlin, Kap. 11, S. 292–324.
- [50] ITAKURA, S., YAMAKAWA, H., TOYOSHIMA, Y. Y., ISHIJIMA, A., KOJIMA, T., HARADA, Y., YANAGIDA, T., WAKABAYASHI, T. UND SUTOH, K. (1993) Force-Generating Domain of Myosin Motor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **196**, S. 1504–1510.
- [51] JANSHOFF, A., NEITZERT, M., OBERDÖRFER, Y. UND FUCHS, H. (2000) Force Spectroscopy of Molecular Systems - Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules, *Angewandte Chemie International Edition*, **39**, S. 3212–3237.
- [52] KABSCH, W. UND VANDEKERCKHOVE, J. (1992) Structure and Function of Actin, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **21**, S. 49–76.
- [53] KALLIPOLITOU, A., DELUCA, D., MAJDIC, U., LAKÄMPER, S., CROSS, R., MEYHOFER, E., MORODER, L., SCHLIWA, M. UND WOEHLKE, G. (2001) Unusual Properties of the Fungal Conventional Kinesin Neck Domain from *Neurospora crassa*, *EMBO Journal*, **20**, S. 6226–6235.
- [54] KÄS, J., STREY, H., BÄRMANN, M. UND SACKMANN, E. (1993) Direct Measurement of the Wave-Vector-Dependent Bending Stiffness of Freely Flickering Actin Filaments, *Europhysical Letters*, **21**, S. 865–870.
- [55] KIRCHNER, J., SEILER, S., FUCHS, S. UND SCHLIWA, M. (1999) Functional Anatomy of the Kinesin Molecule *in vivo*, *EMBO Journal*, **18**, S. 4404–4413.
- [56] KIS, A., KASAS, S., BABIĆ, B., KULIK, A. J., BENOÎT, W., BRIGGS, G. A. D., SCHÖNENBERGER, C., CATSICAS, S. UND FORRÓ, L. (2002) Nanomechanics of Microtubules, *Physical Review Letters*, **89**, S. 248101.
- [57] KOJIMA, H., MUTO, E., HIGUCHI, H. UND YANAGIDA, T. (0) Mechanics of Single Kinesin Molecules Measured by Optical Trapping Nanometry, *Biophysical Journal*, **73**, S. 2012–2022.
- [58] KOZIELSKI, F., SACK, S., MARX, A., THORMÄHLEN, M., SCHÖNBRUNN, E., BIOU, V., THOMPSON, A., MANDELKOW, E.-M. UND MANDELKOW, E. (1997) The Crystal Structure of Dimeric

- Kinesin and Implications for Microtubule-Dependent Motility, *Cell*, **91**, S. 985–994.
- [59] KRATKY, O. UND POROD, G. (1949) *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-bas*, **68**, S. 1106.
- [60] KRAUTBAUER, R., POPE, L. H., SCHRADER, T. E., ALLEN, S. UND GAUB, H. E. (2002) Discriminating Small Molecule DNA Binding Modes by Single Molecule Force Spectroscopy, *FEBS Letters*, **510**, S. 154–158.
- [61] KURZ, J. C. UND WILLIAMS, R. C. (1995) Microtubule-Associated Proteins and the Flexibility of Microtubules, *Biochemistry*, **34**, S. 13374–13380.
- [62] LACEY, A. J., ed. (1989) *Light Microscopy in Biology. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK.
- [63] LANDAU, L. D. UND LIFSCHITZ, E. M. (1987) *Elastizitätstheorie, Lehrbuch der Theoretischen Physik, Band 7*, Akademie-Verlag Berlin.
- [64] LANDAU, L. D. UND LIFSCHITZ, E. M. (1991) *Hydrodynamik, Lehrbuch der Theoretischen Physik, Band 6*, Akademie-Verlag Berlin.
- [65] LUDIN, B., ASHBRIDGE, K., FÜNFSCHILLING, U. UND MATUS, A. (1996) Functional Analysis of the MAP2 Repeat Domain, *Journal of Cell Science*, **109**, S. 91–99.
- [66] MAHEU, B., GRÉHAN, G. UND GOUESBET, G. (1987) Generalized Lorenz-Mie Theory. First Exact Values and Comparisons with the Localized Approximation, *Applied Optics*, **26**, S. 23–25.
- [67] MAIER, C. (2001) *Entwicklung einer neuen mikromechanischen Methode zur Messung der Biegesteifigkeit von einzelnen Mikrotubuli*, Doktorarbeit, TU München.
- [68] MAJDIC, U. (1999) *Untersuchungen zur Geschwindigkeits- und Polaritätsdetermination bei Kinesinen*, Doktorarbeit, LMU München.
- [69] MANDELKOW, E.-M., HERMANN, M. UND RÜHL, U. (1985) Tubulin Domains Probed by Limited Protolysis and Subunit-specific Antibodies, *Journal of Molecular Biology*, **185**, S. 311–327.

- [70] MARUYAMA, K., KAIBARA, M. UND FUKADA, E. (1974) Rheology of F-actin. I. Network of F-Actin in Solution, *Biochimica Biophysica Acta*, **371**, S. 20–29.
- [71] MARUYAMA, K., MATSUBARA, S., NATORI, R., NONOMURA, Y., KIMURA, S., OHASHI, K., MURAKAMI, F., HANDA, S. UND EGUCHI, G. (1977) Connectin, an Elastic Protein of Muscle: Characterization and Function, *Journal of Biochemistry*, **82**, S. 317–337.
- [72] MERMALL V., POST, P. L. UND MOOSEKER, M. S. (1998) Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic and Signal Transduction, *Science*, **279**, S. 527–533.
- [73] MICKEY, B. UND HOWARD, J. (1995) Rigidity of Microtubules Is Increased by Stabilizing Agents, *Journal of Cell Biology*, **130**, S. 909–917.
- [74] MINNE, S. C., SOH, H. T., FLUECKIGER, P. UND QUATE, C. F. (1994) Fabrication of 0,1 μm MOSFET with the AFM, *Applied Physics Letters*, **66**, S. 703–705.
- [75] O’SHEA, S. J., WELLAND, M. E. UND RAYMENT, T. (1993) An Atomic Force Microscope Study of Grafted Polymers on Mica, *Langmuir*, **9**, S. 1826–1835.
- [76] PELHAM, R. J. UND CHANG, F. (2002) Actin Dynamics in the Contractile Ring During Cytokinesis in Fission Yeast, *Nature*, **419**, S. 82–86.
- [77] PORTER, M. E. (1996) Axonemal Dyneins: Assembly, Organization and Regulation, *Current Opinon in Cell Biology*, **8**, S. 10–17.
- [78] PRALLE, A., FLORIN, E.-L., STELZER, E. H. K. UND HÖRBER, J. K. H. (1998) Local Viscosity Probed by Photonic Force Microscopy, *Applied Physics A*, **66**, S. S71–S73.
- [79] RADMACHER, M., FRITZ, M., KACHER, C. M., CLEVELAND, J. P. UND HANSMA, P. K. (1996) Measuring Viscoelastic Properties of Human Platelets with the Atomic Force Microscope, *Biophysical Journal*, **70**, S. 556–567.
- [80] RAMSAY, J. A. (1971) *Moderne Biologie, Experimentelle Grundlagen*, Wilhelm Goldmann Verlag München.

-
- [81] REN, K. F., GRÉHAN, G. UND GOUSBET, G. (1996) Prediction of Reverse Radiation Pressure by Generalized Lorenz-Mie Theory, *Applied Optics*, **35**, S. 2702–2710.
- [82] RIEF, M. (1997) Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen, Doktorarbeit, LMU München.
- [83] RIEF, M., GAUTEL, M., SCHEMMELE, A. UND GAUB, H. E. (1998) The Mechanical Stability of Immunoglobulin and Fibronectin III Domains in the Muscle Protein Titin Measured by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*, **75**, S. 3008–3014.
- [84] SCHWAIGER, I., SATTLER, C., HOSTETTER, D. R. UND RIEF, M. (2002) The Myosin Coiled-Coil is a Truly Elastic Protein Structure, *Nature Materials*, **1**, S. 232–235.
- [85] SEEBERGER, C., MANDELKOW, E. UND MEYER, B. (2000) Conformational Preferences of a Synthetic 30mer Peptide from the Interface Between the Neck and the Stalk Regions of Kinesin, *Biochemistry*, **39**, S. 12558–12567.
- [86] SEILER, S., KIRCHNER, J., HORN, C., KALLIPOLITOU, A., WOHLKE, G. UND SCHLIWA, M. (2000) Cargo Binding and Regulatory Sites in the Tail of Fungal Conventional Kinesin, *Nature Cell Biology*, **2**, S. 333–338.
- [87] SELLERS, J. R. (2000) Myosins: a Diverse Superfamily, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1496**, S. 3–22.
- [88] SKINIOTIS, G., SURREY, T., ALTMANN, S., GROSS, H., SONG, Y.-H., MANDELKOW, E. UND HOENGER, A. (2003) Nucleotide-Induced Conformations in the Neck Region of Dimeric Kinesin, *EMBO Journal*, **22**, S. 1518–1528.
- [89] STEINBERG, G. UND SCHLIWA, M. (1995) The *Neurospora* Organelle Motor: a Distant Relative of Conventional Kinesin with Unconventional Properties, *Molecular Biology of the Cell*, **6**, S. 1605–1618.
- [90] TABOR, S. UND RICHARDSON, C. C. (1990) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions., *Journal of Biological Chemistry*, **265**, S. 8322–8328.

- [91] TANAKA, Y., ZHANG, Z. UND HIROKAWA, N. (1995) Identification and Molecular Evolution of New Dynein-Like Protein Sequences in Rat Brain, *Journal of Cell Science*, **108**, S. 1883–1893.
- [92] TRAN, P. T., PARSONS, S. F., STERBA, R., WANG, Z., SHEETZ, M. P. UND SALMON, E. D. (1995) Direct Measurement of Microtubule Flexural Rigidity with the Laser Trap, *Molecular Biology of the Cell*, **6**, S. 260a.
- [93] VALE, R. UND FLATTERICK, R. J. (1997) The Design Plan of Kinesin Motors, *Annual Reviews of Cell Developmental Biology*, **13**, S. 745–777.
- [94] VENIER, P., MAGGS, A. C., CARLIER, M.-F. UND PANTALONI, D. (1994) Analysis of Microtubule Rigidity Using Hydrodynamic Flow and Thermal Fluctuations, *Journal of Biological Chemistry*, **269**, S. 13353–13360.
- [95] VENIER, P., MAGGS, A. C., CARLIER, M.-F. UND PANTALONI, D. (1995) Analysis of Microtubule Rigidity Using Hydrodynamic Flow and Thermal Fluctuations (Correction), *Journal of Biological Chemistry*, **270**, S. 17056.
- [96] VILFAN, A., FREY, E., SCHWABL, F., THORMÄHLEN, M., SONG, Y.-H. UND MANDELKOW, E. (2001) Dynamics and Cooperativity of Microtubule Decoration by the Motor Protein Kinesin, *Journal of Molecular Biology*, **312**, S. 1011–1026.
- [97] WADE, R. H. UND HYMAN, A. A. (1997) Microtubule Structure and Dynamics, *Current Opinion in Cell Biology*, **9**, S. 12–17.
- [98] WANG, K., MCCLURE, J. UND TU, A. (1979) Titin: Major Myofibrillar Components of Striated Muscle, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **76**, S. 3698–3702.
- [99] WENDEL, M., LORENZ, H. UND KOTTHAUS, J. P. (1994) Sharpened Electron Beam Deposited Tips for High Resolution Atomic Force Microscope Lithography and Imaging, *Applied Physics Letters*, **65**, S. 1775–1777.
- [100] WIGREN, R., BILLSTEN, P., ERLANDSSON, R., LÖFÅS, S. UND LUNDSTRÖ, I. (1995) Force Measurements on a Hydrogel with an SFM, *Journal of Colloid and Interface Science*, **174**, S. 521–523.

- [101] WILLIAMS, R. C. UND LEE, J. C. (1982) Preparation of Tubulin from Brain, *Methods in Enzymology*, **85**, S. 376–385.
- [102] WILSON, E. B. (1925) *The Cell in Heredity and Development*, MacMillan, 3. Ausgabe.
- [103] WITMAN, G. B. (1986) Isolation of Chlamydomonas Flagella and Flagellar Axonemes, *Methods in Enzymology*, **134**, S. 280–290.
- [104] WOEHLEKE, G. UND SCHLIWA, M. (2000) Walking on Two Heads: The Many Talents of Kinesin, *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, **1**, S. 50–58.
- [105] ZHUANG, X. UND RIEF, M. (2003) Single-molecule Folding, *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, S. 88–97.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Kraftmikroskop (Atomic Force Microscope)
AMP-PNP	Adenosin-5'-[β , γ -imido]triphosphat
AP100	Arbeitspuffer, 100 mM Pipes
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	Vollentsalztes Wasser, über eine Reinstwasseranlage (Barnstead) aufgereinigt
bp	Basenpaar, Grundbaustein der \rightarrow DNA
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Vakuumlichtgeschwindigkeit ($2,99 * 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$)
Da	Dalton ($\hat{=} 1,66 * 10^{-27} \text{ kg}$)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ϵ_0	elektrische Feldkonstante ($8,85 * 10^{-12} \frac{\text{As}}{\text{Vm}}$)
e	Euler'sche Zahl ($\approx 2,718$)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
FJC	„Freely Jointed Chain“, Modell zur Beschreibung von Polymeren
g	Maß für die Erdbeschleunigung ($9,81 \frac{\text{kg}\cdot\text{m}}{\text{s}^2}$)
GMPCPP	Guanylyl-(α , β)-methyl-diphosphonat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
His-tag	Sequenz von 6 oder 8 Histidinen
k_B	Boltzmann Konstante ($1.380658 * 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$)
kDa, kD	1.000 Dalton
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
ml	Milliliter
MT	Mikrotubulus
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
NcKin	<i>Neurospora Crassa</i> Kinesin
Nd:YAG	Neodym...
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Kernspin-Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, Methode zur Amplifizierung von DNA
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

WLC	„Worm-Like Chain“, Modell zur Beschreibung von Polymeren
x,y	Koordinaten senkrecht zur Strahlrichtung der Laserfalle bzw. senkrecht zur Zugrichtung der AFM-Spitze
z	Strahlrichtung der Laserfalle bzw. Zugrichtung der AFM-Spitze
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent

Danksagung

Eine Doktorarbeit kann unter Garantie nicht von einem Menschen allein erledigt werden. Deswegen soll hier all denjenigen gedankt werden, die, wie auch immer geartet, zu dem Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Zunächst einmal geht der Dank an Herrn Sackmann. Durch Ihre Vermittlung und Ihre Bereitschaft, meinen Doktorvater zu machen, bin ich auf einen Haufen Biologen gestossen, die mich die nächsten fünf Jahre verfolgen sollten ...

Dann möchte ich Herrn Schliwa danken, daß er es so lange mit einem Physiker ausgehalten hat, der sowieso immer nur so exotische Dinge messen will, von denen man als Biologe nie verstehen wird, für was die nützlich sind ...

Einer, der dafür wesentlich mehr Verständnis hatte, war Matthias Rief. Herzlichen Dank für die zwar leider nicht so ergebnisreiche aber trotzdem erfolgreiche Zusammenarbeit ...

Einer bemerkenswerten Persönlichkeit gebührt ein besonderer Dank. Ich glaube, ich werde es nie verstehen, wie man neben einem Philosophie- und einem Physikstudium noch so viel Zeit für andere Aktivitäten haben kann. Wenn du, Clara Sattler, mir den Trick verraten könntest, wie man die Zeit verlangsamt, wär ich dir noch tausendmal mehr dankbar ...

Auch Günther Woehlke und den Leuten aus seiner Gruppe sei Dank für so manche Tips und Diskussionen. Manches mal ging's auch um für die Arbeit so wichtige Dinge wie Photographie oder Astronomie ...

Vielen Dank für so manche Arbeit, die ihr mir abgenommen habt und die angenehme Atmosphäre, will ich auch an die TAs und sonstigen Angestellten - Evi Praetorius, Sabine Fuchs, Frau Koser, Frau Lorenz, Sepp Grimm, Maria Beer, Nici Brusis, Manuela Ludwig, Renate Dombi (ich hoffe die Liste ist komplett) - los werden.

So manchen Rat und viel tatkräftige Unterstützung bekam ich auch von unserem MeisterRalph Gräf und von Lucia Driller. Und nicht nur das, sondern so manche Feier oder sportliche Aktivität hat massig Spaß gemacht.

Manchmal braucht man einfach Freunde. Da ist es schön, wenn der Kontakt nicht nur in der Arbeit da ist. Sei es Tanzen, Spieleabende oder so manche andere Gelegenheit, am Institut hat sich so manche Freundschaft gebildet. Danke Andrea Hestermann, Christian Horn, Thomas Giebing und Irene Schulz.

Danke an die Graftschaft, daß ihr mich als Einmann-Arbeitsgruppe immer wieder bei Euch aufgenommen habt, und das nicht „nur“ als Knecht, sondern als Top-Physiker.

Auch im Kehlitobbi bin ich so manches mal hängengeblieben, wenn es darum ging, die Aspirinschublade zu plündern. Die Schleichers waren schon immer ein ganz besonderes Völkchen, bei dem Rat und Hilfe genau so wichtig war, wie Spaß zu haben.

Bestimmt habe ich jetzt viele Namen noch nicht erwähnt. Seid bitte nicht traurig, jeder Einzelne am Institut hat auf seine Art dazu beigetragen, daß es niemals langweilig wurde oder ich aufgegeben hätte. Vielen Dank Euch Allen!

Ein besonderer Dank geht auch an meine Familie, die mich die ganze Zeit unterstützt hat, auch wenn mancher nie verstand, wieso ich nicht sagen konnte, wann ich endlich fertig werde.

Zuletzt Danke an Paulo Coelho und Antoine de Saint-Exupery für die wunderbaren Bücher, die sie geschrieben haben.

SDG

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andreas Schneider
Geburtstag	22. April 1972
Geburtsort	Dachau
Familienstand	ledig

Ausbildung

Sept. 1978 - Juli 1982	Grundschule Dachau-Süd
Sept. 1982 - Juli 1991	Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
10. Juli 1991	Abitur
Okt. 1991 - Sept. 1992	Grundwehrdienst
Nov. 1992 - März 1997	Studium der Physik an der Technischen Universität München
Apr. 1997 - Mai 1998	Diplomarbeit zum Thema „Einfluß von Talin auf die Netzwerkeigenschaften und membranbindenden Eigenschaften von Aktin“
Juni 1998	Diplom
Aug. 1998 - Sept. 2003	Promotion in experimenteller Biophysik an der TU München und am Institut für Zellbiologie der LMU München