

# STRUKTURELLE GRUNDLAGEN UND MECHANIK VON ZYTOGELEN

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt im Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Oliver Wagner  
aus Köln

Frankfurt 2000  
(DF1)

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation  
angenommen.

Dekan:

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Dancker

Datum der Disputation: 06.11.2000

*Meinen Eltern*

## DANKSAGUNG

Der Autor bedankt sich bei seinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die fachliche Unterstützung und konstruktiven Diskussionen während des gesamten Promotionsstudiums. Sein Feingefühl, mich einerseits selbstständig arbeiten zu lassen und in entscheidenden Phasen Kurskorrekturen anzuempfehlen, trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Vor allem für seine fortwährende Motivation an internationalen Kongressen teilzunehmen, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Prof. Dr. Peter Dancker danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und fachliche Unterstützung. Er hat mir in einer überaus freundlichen Geste das aufwendig herzustellende Aktin und  $\alpha$ -Aktinin in großen Mengen zur Verfügung gestellt.

Dipl.-Phys. Jörg Zinke hat entscheidend zu dem Aufbau des Miniatur-Rheometers beigetragen. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen und ich danke ihm hierfür sehr herzlich.

Dipl.-Biol. Ilonka Karl, Monika Vöth, Dipl.-Biol. Ralf Schindler und Dr. Dirk Schmitz danke ich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und anregenden Diskussionen während meiner gesamten Promotionszeit.

Dr. Ingo Höhfeld und Dipl.-Phys. Karl-Heinz Schewe gilt mein Dank für ihre Hilfestellungen zur Elektronenmikroskopie.

Dipl.-Phys. Erik von der Burg danke ich für viele klärende fachliche Gespräche.

Mein besonderer Dank geht an Peter Walzer, der in minutiöser Feinarbeit und äußerster Perfektion die sehr kleinen Komponenten des Miniatur-Rheometers gedreht hat.

Prof. Dr. Uno Lindberg und Dr. Herwig Schüler danke ich ganz besonders für die Bereitstellung des Profilins und Nicht-Muskelaktins. Ich danke ihnen auch ganz herzlich für anregende Diskussionen.

Dr. Thomas Müller-Reichert und Dr. Anthony Hyman danke ich für die Bereitstellung von PC-Tubulin.

Prof. Dr. Eberhard Unger und Dr. Wolfram Vater danke ich für die Bereitstellung von PC-Tubulin und mikrotubulärem Tubulin. Mein besonderer Dank geht an Dr. Wolfram Vater für seine Unterstützung und fachlichen Gespräche.

Dr. Jean-Francois Leterrier und Dr. Monica Odensjö-Leterrier danke ich für die Bereitstellung von Neurofilamenten, PC-Tubulin und MTP. Es war mir eine besondere Ehre und Freude, fachkundige Diskussionen mit ihnen zu führen.

MA Vivian Wagner danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern gilt mein Dank für ihre Unterstützung.

## INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
2	EINLEITUNG.....	9
2.1	Bedeutung der Zellmechanik.....	9
2.1.1	Physiologische Signifikanz der Zellmechanik am Beispiel der Interaktion von Glykolyse- enzymen an Aktin.....	9
2.1.2	Aus der Ultraschallmikroskopie resultierende Fragestellungen zur Zellmechanik.....	10
2.2	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2.3	Grundlagen.....	11
2.3.1	Grundlagen zu dem ORR.....	11
2.3.2	Was ist Viskoelastizität?.....	11
2.3.3	Grundlagen zu den untersuchten Zytoskelettelementen und wechselwirkender Proteine bzw. Toxine.....	12
2.3.3.1	Aktin.....	12
2.3.3.1.1	Cytochalasin und Phalloidin.....	13
2.3.3.2	Aktin-assoziierte Proteine.....	14
2.3.3.2.1	Profilin.....	14
2.3.3.2.2	$\alpha$ -Aktinin.....	14
2.3.3.3	Glykolyseenzyme.....	15
2.3.3.3.1	Funktionale Dualität zytoskelettärer Proteine und Enzyme der Glykolyse durch Mikrokompartimentierung.....	15
2.3.3.3.2	Reziprozität durch supramolekulare Assoziationen zytoskelettärer Proteine mit Enzymen der Glykolyse.....	15
2.3.3.3.3	Metaboliten Kanalisierung.....	16
2.3.3.3.4	Untersuchte Enzyme.....	16
2.3.3.3.4.1	Aldolase.....	16
2.3.3.3.4.2	LDH.....	16
2.3.3.3.4.3	Hexokinase.....	17
2.3.3.4	Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierte Proteine.....	17
2.3.3.4.1	Taxol und Colchizin.....	18
2.3.3.5	Neurofilamente.....	18
2.4	Fragestellungen und experimentelle Strategien.....	19
2.4.1	Unterscheidet sich die Mechanik von ATP-F-Aktin, ADP-F-Aktin und AMPPNP-F-Aktin? ...	19
2.4.2	Wie verändern depolymerisierende bzw. stabilisierende Substanzen die Viskoelastizität zytoskelettärer Elemente?.....	20
2.4.3	Kann die Mikrokompartimentierung löslicher Enzyme durch Phasenseparation oder durch die Organisation am Zytoskelett erklärt werden?.....	20
2.4.4	Untersuchung der mechanischen Belastbarkeit von Aktin- und Mikrotubuligelen.....	20
2.4.5	Unterscheidet sich die zeitliche Änderung der Schalldämpfung von der zeitlichen Ände- rung der Viskoelastizität während der Polymerisation von Aktin?.....	20
2.4.6	Modulation der Mechanik von Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten durch bin- dende Proteine.....	20
3	MATERIAL UND METHODEN.....	22
3.1	Reagenzien.....	22
3.2	Proteine.....	22
3.3	Der Stabschwinger (ORR).....	23
3.4	Theorie zur Messmethode.....	25
3.4.1	Berechnung der Viskosität.....	25
3.4.2	Berechnung der Schallgeschwindigkeit und des Elastizitätsmoduls.....	28
3.4.3	Berechnung der absoluten Schallgeschwindigkeit.....	30
3.4.4	Berechnung der Amplitude der Glasfaserschwingung.....	30
3.4.5	Berechnung der Schalldämpfung.....	30
3.5	Mikro-Kugelfallviskosimeter.....	30

3.6 Dichtebestimmungen .....	32
3.7 Elektronenmikroskopie.....	33
3.8 Kosedimentation und SDS-Gel.....	33
3.9 Extinktionsmessungen.....	33
4 ERGEBNISSE .....	35
4.1 Präzision von ORR-Messungen und der Einfluss von Scherkräften auf F-Aktin.....	35
4.1.1 Vergleich der mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter und dem ORR gemessenen Viskositäten newtonscher und nicht-newtonscher Flüssigkeiten .....	35
4.1.2 Einfluss von Scherkräften auf die Polymerisation von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin.....	37
4.1.3 Frequenzabhängige Änderungen der Elastizität von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin.....	39
4.2 Viskoelastizität von polymerisierendem Muskelaktin und Tubulin .....	39
4.2.1 Einfluss von Taxol, MAPs, Colchizin und Kalzium auf die Viskoelastizität von Mikrotubuli.....	42
4.2.2 Einfluss von Cytochalasin D und Phalloidin auf die Viskoelastizität von Aktin Gelen .....	43
4.3 Viskoelastizität von Nicht-Muskelaktin mit und ohne Profilin .....	46
4.4 Änderung der Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin mit und ohne $\alpha$ -Aktinin, Profilin und Cytochalasin D .....	49
4.5 Modulation der Mechanik von Aktin durch Enzyme der Glykolyse .....	53
4.5.1 Einfluss von Hexokinase und ATP auf die Viskoelastizität von Aktin.....	53
4.5.2 Modulation der Viskoelastizität von Aktin durch Aldolase.....	57
4.5.3 Einfluss der LDH auf die Polymerisation von Aktin und Bindung der LDH an filamentöses und nicht-filamentöses Aktin .....	60
4.6 Mechanik von Neurofilamenten mit und ohne assoziierten Mikrotubuli.....	64
5 DISKUSSION.....	67
5.1 Vergleich des ORR mit herkömmlichen Rheometern.....	67
5.2 Präzision von ORR-Messungen.....	68
5.3 Viskoelastische Eigenschaften von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gelen.....	68
5.3.1 Manipulation der Viskoelastizität von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gelen durch amplitudenvariante Deformationen im Nanometerbereich.....	68
5.3.2 Manipulation der Viskoelastizität von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gelen durch frequenzvariante Deformationen im Nanometerbereich.....	69
5.4 Konzentrationsabhängigkeit der Viskoelastizität von F-Aktin- und Mikrotubuligelen .....	70
5.4.1 Konzentrationsabhängigkeit der Viskoelastizität von F-Aktin .....	70
5.4.2 Konzentrationsabhängigkeit der Viskoelastizität von Mikrotubuligelen .....	71
5.5 Biphasischer Elastizitätsverlauf während der Polymerisation von Aktin und Tubulin.....	72
5.6 Mechanik von Profilin:Aktin .....	73
5.6.1 Vergleich der Viskoelastizität von Muskel- und Nicht-Muskelaktin.....	73
5.6.2 Modulation der Viskosität von Nicht-Muskelaktin durch Profilin .....	74
5.6.3 Modulation der Elastizität von Nicht-Muskelaktin durch Profilin .....	74
5.7 Modulation der Viskoelastizität von Aktin durch Glykolyseenzyme.....	75
5.7.1 Funktionale Analogie des Einflusses von Hexokinase, Phalloidin und Cytochalasin D auf die Polymerisation von Aktin .....	75
5.7.2 Einfluss der LDH auf die Polymerisation von Aktin und Bindung der LDH an filamentöses und nicht-filamentöses Aktin .....	76
5.7.3 Modulation der Viskoelastizität von Aktin durch die Aldolase.....	78
5.7.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen zur Studie der Interaktion von Glykolyseenzymen an Aktin .....	79
5.8 Bestimmung höher geordneter Strukturen filamentösen Aktins mit der zeitvarianten Schalldämpfungsanalyse .....	80

5.9	Viskoelastizität von Intermediärfilamenten am Beispiel der Neurofilamente .....	81
5.9.1	Mechanische Eigenschaften von Neurofilamenten.....	81
5.9.2	Interaktion von Neurofilamenten mit Mikrotubuli .....	82
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	84
7	ANHANG .....	86
7.1	Technische Zeichnungen zum ORR.....	86
7.2	Software.....	89
7.2.1	Kurzfassung der Software zur ORR-Steuerung nach Zinke (1995) .....	89
7.2.2	Makros zur Automatisierung der Datenauswertung in Origin 6.0.....	89
7.2.3	Software zur Kugelfallviskosimeter-Steuerung .....	91
7.3	Betriebsanleitung zum ORR .....	94
8	LEBENS LAUF UND VERÖFFENTLICHUNGEN.....	97
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	99
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	100

## 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	„Bovine serum albumin“
CD	Cytochalasin D
DTT	Dithiotreitol
EC	„Enzyme commission's classification number“
EGTA	(Bis-Carbaminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
F-Aktin	fibrilläres Aktin
FBP	Fruktose-1,6-bis-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP-DH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
Glc	Glukose
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
KCl	Kaliumchlorid
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lakat-Dehydrogenase
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MES	2(N-morpholino)ethansulfonsäure
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MT	Mikrotubuli
MTP	mikrotubuläres Protein (= Tubulin + ca. 20 % MAPs)
$NAD^+$	oxidiertes Nikotinamiddinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinamiddinukleotid
NF	Neurofilamente
ORR	„Oscillating rod rheometer“
PAA	Polyacrylamid
PFK	Phosphofruktokinase
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PGM	Phosphoglycerat-Mutase
$P_i$	anorganisches Phosphat ( $PO_4^{2-}$ -Ionen)
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PK	Pyruvat-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKN	Protein Kinase N
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TPI	Triosephosphat-Isomerase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
$V_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

## 2 EINLEITUNG

---

Zum Verständnis der Zellmechanik wurden im Rahmen dieser Arbeit die viskoelastischen Eigenschaften einzelner Zytoskelettelemente *in vitro* untersucht. Dies erforderte die Entwicklung eines Miniatur-Rheometers, welches nur geringe Scherkräfte erzeugt und somit die fragilen zytoskelettären Filamente nicht zerstört. Das für diese Arbeit entwickelte Gerät wird im Folgenden beschrieben und die gemessenen mechanischen Parameter der Zytoskelettelemente vorgelegt und diskutiert.

### 2.1 Bedeutung der Zellmechanik

Die Bewegung von Amöben wurde bereits 1873 mit einer eversiblen Sol-Gel-Transformation erklärt. Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die Verflüssigung und Verfestigung des Protoplasmas durch ein sich kontrahierendes, drei-dimensionales Netzwerk beschrieben (De Bruyn, 1947). Erst in neuerer Zeit wurde gezeigt, dass dieses Netzwerk ein Aktin-basiertes System ist (Pollard und Ito, 1970), welches mit Myosin und einer großen Zahl weiterer Proteine assoziiert ist, welche die Polymerisation und Quervernetzung von Aktin regulieren (Pollard und Cooper, 1986; Hartwig und Kwiatkowski, 1991). Neben der Steuerung der Motilität und der formgebenden Funktion (Cooper, 1991; Stossel 1993) ist Aktin auch an der Regulation und Kompartimentierung des Kohlehydrat-Metabolismus beteiligt (Überblick: Clarke und Masters 1976; Bereiter-Hahn et al., 1997). Ferner konnte gezeigt werden, dass ein intaktes Aktinnetzwerk für das Funktionieren von Signaltransduktionsketten (Huleux et al., 1989) und des Proteinbiosyntheseapparates (Hesketh, 1994) erforderlich ist. Auch Mikrotubuli haben neben der einerseits formgebenden Funktion und ihrer Beteiligung an der Zellmotilität (Karl und Bereiter-Hahn, 1998), regulatorische Funktionen. Immunofluoreszenz-Aufnahmen zeigen z.B. mit Mikrotubuli kolokalisierte Ribosomen (Schumacher et al., 1995), die mit verschiedenen, spezifischen mRNAs angereichert sind (Hamill et al., 1994).

Neben den stäbchenartigen Mikrotubuli und dem semi-flexiblen F-Aktin (Käs et al., 1996) gehören die flexiblen Intermediärfilamente zu den stabilsten Zytoskelettelementen, die auch noch großen Deformationen standhalten (Janmey et al., 1998). Intermediärfilamente stabilisieren zelluläre Strukturen und organisieren die Verteilung und Interaktion intrazellulärer Organellen. Sogar nach der Degradation des Aktin- und Mikrotubulinnetzwerkes ist der Zellkern noch stabil mit der Zellmembran über Intermediärfilamente verbunden (Maniotis et al., 1997). Daher wird dem Intermediärfilament-Netzwerk eine dominierende Rolle zur Erhaltung der Zellform nach mechanischer Belastung zugesprochen. *In vitro*-Versuche zeigen, dass die Untereinheiten von Intermediärfilamenten Einzelstrang- und Supercoil-DNA binden können und es enge strukturelle Beziehungen zu genregulatorischen und Kernmatrix Proteinen gibt (Traub, 1995). Abnormalitäten im Keratinnetzwerk epidermaler Zellen gehören zu den Ursachen vieler genetischer Krankheiten (Fuchs, 1996). Die intrazelluläre Organisation des Intermediärfilament-Netzwerkes wird durch Proteinkinasen und Phosphatasen kontrolliert (Inagaki et al., 1996). Das kleine GTP-bindende Protein Rho ist bekannt als Bindeglied zwischen der Membranrezeptor-vermittelnden Signaltransduktionskette und dem Zytoskelett (Machesky und Hall, 1996). So führt das Binden der aktiven (GTP-gebundenen) Form von Rho an die p128 PKN oder die p164 Rho-Kinase zur Phosphorylierung von Intermediärfilamenten, welches die Filamente reorganisiert (Matsuzawa et al., 1998).

#### 2.1.1 Physiologische Signifikanz der Zellmechanik am Beispiel der Interaktion von Glykolyseenzymen an Aktin

Eine frühe Studie von Otto Warburg (1926) wies eine deutlich gesteigerte aerobe Glykolyse von Tumorzellen nach. Sogar in Gegenwart von Sauerstoff produzieren maligne Zellen über die Glykolyse mehr Laktat als gesunde Zellen (Sanford et al., 1970). Gleichzeitig wird mit zunehmender Laktatproduktion der Pentosephosphatzyklus stärker genutzt und die Aktivität des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung eingeschränkt (Lowry et al., 1993). Gründe dafür können strukturelle Unterschiede des Zytoskeletts von gesunden und malignen Zellen sein, die unterschiedliche Assoziationen und Kompartimentierungen von Glykolyseenzymen an das Zellskelett bedingen. Invasive Tumorzellen haben z.B. weniger Stressfasern und sind stärker abgerundet als gesunde Zellen (Pokorna et al., 1994). Diese strukturellen Unterschiede von gesunden Zellen modulieren gleichzeitig den Zellstoffwechsel dahingehend, dass die Produktion von energiereichen Phosphaten stärker aktiviert wird (Bereiter-Hahn et al., 1997). Umgekehrt kann auch die erhöhte Expression bestimmter Enzyme (z.B. Hexokinase) in Tumorzellen das Zytoskelett modifizieren (Rempel et al., 1996). Mit dem Hexokinase Inhibitor 2Desoxyglukose konnte Gibbins (1972) die Migration von Epithelzellen für kurze Zeit stoppen, wobei sich gleichzeitig der intrazelluläre ATP-Gehalt nicht veränderte.

## EINLEITUNG

Das Hormon Insulin steuert neben dem Glukose-Transport auch die Bindung einer Vielzahl von Glykolyseenzymen an Aktin (Chen und Masters, 1988) sowie die Umstrukturierung des Zytoskeletts nach Aktivierung von Signaltransduktionsketten. Ein Beispiel hierfür ist die Insulin-induzierte, starke Akkumulation von Pinozytosevesikeln und einem Plasmamembran-„ruffling“, welches einhergeht mit der Aktivierung einer Proteinkinase (Tsakiridis et al., 1999).

### 2.1.2 Aus der Ultraschallmikroskopie resultierende Fragestellungen zur Zellmechanik

Da die physiologische Bedeutung der Zellmechanik im Laufe der letzten 30 Jahre immer offensichtlicher wurde (s.o.), entwickelte man eine Vielzahl von Methoden zur Aufklärung der viskoelastischen Eigenschaften der Zelle. Mit den meisten Methoden kann man die Elastizität von Zellen mittels kurzzeitiger Deformationen berechnen. Hierzu zählen z.B. das Ansaugen eines Teils einer Zelle in Kapillaren (Hiramoto, 1987), das Schlagen von Zellen mit einem winzigen Ball (Duszyk et al., 1989), die Bestimmung der Auslenkung von Magnetkügelchen an der Zelloberfläche (Bausch et al., 1998) oder das „Kratzen“ an der Zelloberfläche mit einer Nadelspitze, deren Abmessungen im atomaren Bereich liegt (Kraftmikroskopie) (Rotsch et al., 1997; Lekka et al., 1999). Diese Methoden sind allerdings mehr oder weniger destruktiv - auch durch methodisch bedingte Vorbehandlungen der Zellen. Eine nicht-destruktive Methode zur Untersuchung lokaler mechanischer Eigenschaften von Zellen ist die akustische Mikroskopie (Bereiter-Hahn, 1987; Bereiter-Hahn, 1995). Abbildungen mit dem Ultraschallmikroskop erreichen annähernd die laterale Auflösung eines Lichtmikroskops. Der Kontrast beruht hier jedoch auf Unterschieden in Dichte, Topografie, Elastizität und Viskosität. Änderungen lokaler Elastizitäten (welche im direkten Zusammenhang zur Ausbreitung des Ultraschalls stehen, s.u.) während der Zellbewegung zeigen, dass F-Aktin das dominierende Zytoskelettelement ist, welches die Spannung im Zellkortex und entlang der Stressfasern erzeugt (Lüers et al., 1992; Bereiter-Hahn und Lüers, 1998; Karl und Bereiter-Hahn, 1999). Mikrotubuli und Intermediärfilamente (z.B. Vimentin) sind homogen in der Zelle verteilt und tragen zu den basalen akustischen Eigenschaften bei (Bereiter-Hahn et al., 1995a). Zerstört man die Mikrotubuli durch Colzemid-Zugabe, so entwickelt die Zelle lokal höhere Elastizitäten (Karl und Bereiter-Hahn, 1998), die mit der Ausbildung von Stressfasern einhergehen (Kajstura und Bereiter-Hahn, 1993). Das steife Mikrotubuligerüst der Zelle dient als Antagonist zu der durch das Aktomyosinsystem aufgebauten (proximalen) Spannung und somit gleichzeitig als Speicher mechanischer Energie (Buxbaum und Heidemann, 1992). Eine Folge lokaler Elastizitätsänderungen kann aber auch ein Materialflux (Zytoplasma mit freien Organellen) aufgrund transients hydrostatischer Druckdifferenzen innerhalb der Zelle sein. Umgekehrt moduliert der durch den (Dynein-vermittelten) Transport von Organellen bedingte Flux lokal die mechanischen Eigenschaften der Zelle (Bereiter-Hahn und Lüers, 1994).

Resultieren nun lokale Elastizitätsänderungen motiler Zellen von bis zu 5 GPa (Lüers et al., 1992) aus z.B. der erhöhten Rigidität neu formierter Aktinbündel? Oder ist dies eine Folge von Spannungsdifferenzen im Zellkortex durch lokale Änderungen des hydrostatischen Drucks? Oder handelt es sich um einen Mischeffekt aus beiden Ereignissen? Ein Verständnis der Zellmechanik ist daher neben der Kenntnis von lokalen Tugordruckdifferenzen (s. Bereiter-Hahn und Strohmeier, 1987) nur möglich, wenn die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zytoskelettelemente bekannt sind bzw. die Änderung der Mechanik während der Interaktion der Elemente untereinander und mit spezifisch bindenden Proteinen.

## 2.2 Zielsetzung der Arbeit

Wie oben beschrieben, kann die Mechanik der Zelle besser verstanden werden, wenn die mechanischen Eigenschaften der Einzelemente bekannt sind. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit ein Rheometer auf der Basis der Ultraschalldetektion (ORR<sup>1</sup>, Wagner et al., 1996) nach Kojro et al. (1996) weiterentwickelt werden, welches es ermöglicht, die Viskosität, Elastizität und Schalldämpfung von Zytogelen synchron zu bestimmen. Der Aufbau und die Weiterentwicklung des Gerätes sowie die Programmierung einer Software zur Steuerung eines Mikro-Kugelfallviskosimeters ist ein Teil dieser Arbeit. Die Anwendung der beiden Geräte zur Untersuchung der Mechanik von Zytogelen bildet einen weiteren Teil. EM-Aufnahmen der Proben werden mit den rheologischen Befunden verglichen und Zusammenhänge zwischen der Morphologie der Zyto-Netzwerke und den mechanischen Parametern diskutiert. Zur Untersuchung der Interaktion glykolytischer Enzyme an Aktin werden, sofern erforderlich, Enzymaktivitäten bestimmt und Kosedimentationsversuche durchgeführt.

---

<sup>1</sup> Engl. „oscillating rod rheometer“ (Rheometer messen per Definition Deformationen und das Fließen von Stoffen, Franke, 1969).

## 2.3 Grundlagen

### 2.3.1 Grundlagen zu dem ORR

Die Funktionsweise des ORR basiert auf einer kleinen Glasfaser (2 mm x 50  $\mu\text{m}$ ), welche in die zu untersuchende Lösung (10-150  $\mu\text{l}$ ) eintaucht und zur Resonanzschwingung angeregt wird. Bei Viskositätsänderungen (z.B. während der Polymerisation von Aktin) ändert sich das Schwingungsverhalten der Glasfaser. Mithilfe der bekannten Resonanzfrequenz der Glasfaser und der Dichte der Flüssigkeit kann die Viskosität der Flüssigkeit berechnet werden (siehe Material und Methoden). Die sehr kleinen Schwingungen (1-100 nm) werden von einem phasensensitiven akustischen Mikroskop detektiert. Gleichzeitig können über eine Ultraschallmessstrecke Schallgeschwindigkeit (entspricht der Volumenelementelastizität) und Schalldämpfung der Lösung bestimmt werden. Alle mechanischen Parameter werden mit einer zeitlichen Auflösung von 1 Hz synchron aufgenommen. Die Methode ist nicht-destruktiv, da die Schwingungsamplitude des Viskositätssensors in etwa dem Durchmesser der untersuchten Polymere entspricht. Da die Messkammer nicht versiegelt ist, können während der Messung weitere Substanzen zu der Probe zugefügt und somit direkt zeitlich aufgelöste Protein-Protein-Interaktionen beobachtet werden.

### 2.3.2 Was ist Viskoelastizität?

Wie oben erwähnt, erlaubt die Methode des ORR die Bestimmung viskoelastischer Eigenschaften von Zytogelen. Der Begriff „Viskoelastizität“ soll nun kurz erläutert werden: werden Flüssigkeiten deformiert, so erfahren sie eine innere Reibung, basierend auf den Kräften, die zwischen den Flüssigkeitsschichten wirken. Um eine Molekülschicht über eine andere gleiten zu lassen, bedarf es einer äußeren Krafteinwirkung. Diese mechanische Eigenschaft wird mit der physikalischen Größe Viskosität (Zähigkeit) beschrieben, die ein Maß für die Reibung darstellt. Amorphe Stoffe, wie z.B. flüssiges Glas, Glycerin oder die meisten Polymere, zeigen viskoelastisches Verhalten, welches von der Frequenz der Deformation abhängt: bei langsamen bzw. niederfrequenten, periodischen Deformationen lassen sie zunächst viskoses Verhalten erkennen, d.h. es treten geschwindigkeitsabhängige Reibungskräfte auf. Beim Anlegen einer konstanten Spannung (Zug oder Druck) erfolgt eine zeitabhängige Dehnung, d.h. der Endwert der Auslenkung wird, mit einer für das betreffende Material typischen Relaxationszeit  $\tau$ , exponentiell erreicht (Gerthsen et al., 1989).

Bei ruckartigen bzw. hochfrequenten, periodischen Verformungen zeigen viskoelastische Stoffe das elastische Verhalten eines Festkörpers gemäß dem Hookeschen Gesetz, d.h. die Dehnung folgt linear der Spannung (z.B. bei geringen Auslenkungen einer Feder). Das Elastizitätsmodul beschreibt hier das Verhältnis von Spannung zur Dehnung. Nach Erreichen der Proportionalitätsgrenze folgt die Spannung der Dehnung nicht mehr linear, sondern sie beginnt zu sinken. Unterhalb der Elastizitätsgrenze bilden sich jedoch die Verformungen zurück. Erhöht man die Spannung über die Elastizitätsgrenze hinaus, erreicht man die Reißdehnung und die Spannung sinkt bis zum Reißen des Körpers.

Bei viskoelastischen Flüssigkeiten wird also beim viskosen Fließen mechanische Arbeit in der Regel nicht sofort vollständig in Reibungswärme verwandelt, sondern z.T. vorübergehend elastisch gespeichert. Ist die Viskosität von Flüssigkeiten abhängig von der Scherrate und der Scherspannung, spricht man von nicht-newtonischen Flüssigkeiten (Bergmann und Schäfer, 1992).

Viskoelastische Systeme können durch Modelle beschrieben werden, die elastische Federn mit viskosen Dämpfern (engl. „dash-pot“) kombinieren. Sind elastische (energiespeichernde) und viskose (dissipative) Elemente in Reihe geschaltet, spricht man von einem Maxwellelement (Abb. 2-1 a). Das Voigt-Element (Abb. 2-1 b) beschreibt das Verhalten viskoelastischer Systeme etwas genauer: bei konstanter Krafteinwirkung relaxiert die Deformation in einen konstanten Wert. Der Endzustand ist somit festkörperähnlich.

## EINLEITUNG

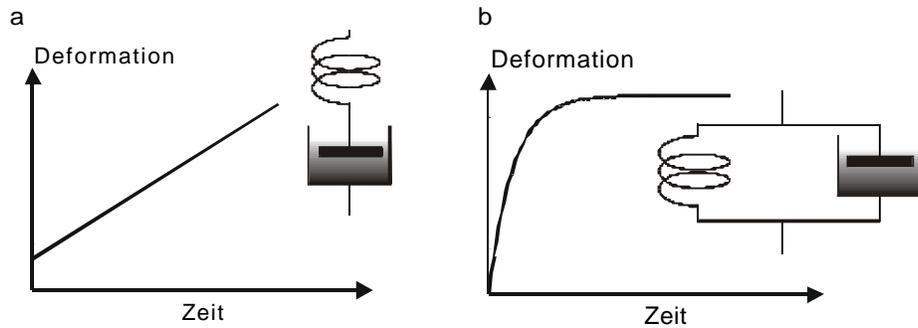


Abb. 2-1 a, b: (a) Im Maxwellelement werden der elastische und viskose Term seriell verknüpft. Der Graph stellt die zeitliche Veränderung der Deformation bei konstanter Krafteinwirkung dar. (b) Im Voigt-Element werden der elastische und viskose Term parallel verknüpft. Die Deformation erfährt während der konstanten Krafteinwirkung eine Relaxation und verläuft danach konstant.

Durch Kombinationen von Maxwell- und Voigt-Elementen lassen sich komplexe Drei-, Vier-, ...,  $n$ -Elemente-Modelle erstellen. Abb. 2-2 zeigt ein mögliches Vierelemente-Modell, welches das rheologische Verhalten vieler Flüssigkeitstypen erklärt (Ferry, 1980).

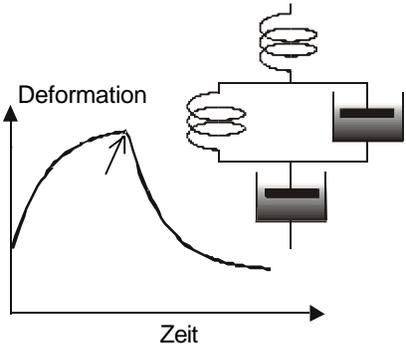


Abb. 2-2: Vierelemente-Modell: ein Maxwell-Element mit eingeschobenem Voigt-Element beschreibt das typische rheologische Verhalten vieler viskoelastischer Flüssigkeiten. Die zunächst konstante Krafteinwirkung wird zu einem definiertem Zeitpunkt (Pfeil) zurückgenommen, wodurch die Deformation graduell abnimmt und sich einem Minimalwert annähert.

### 2.3.3 Grundlagen zu den untersuchten Zytoskelettelementen und wechselwirkender Proteine bzw. Toxine

#### 2.3.3.1 Aktin

Die Eigenschaft, des monomeren, globulären G-Aktins in ein nichtkovalentes, helikales Filament polymerisieren zu können, ist fundamental für seine biologische Aktivität in eukaryotischen Zellen. In Nicht-Muskelzellen ist die Polymerisation/Depolymerisation ein dynamischer Prozess, der durch assoziierte Proteine reguliert wird. Die Änderungen der mittleren Filamentlängen bewirken Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften des Zytoplasmas. Daher finden sich zahlreiche Studien zur Aufklärung der Funktion und Struktur von Aktin (Überblick: z.B. Kabsch und Vandekerckhove, 1992).

Derzeit konkurrieren zwei Modelle zur dreidimensionalen Struktur von Aktin (Durchmesser etwa 6 nm), die durch Kristalle von 1:1-Komplexen aus Profilin und Aktin (Schutt et al., 1993) bzw. DNase I und Aktin (Kabsch et al., 1990) gewonnen werden. Das sogenannte Schutt-Lindberg-Modell (Schutt et al., 1995a, b) liefert in Abwesenheit divalenter Metallionen eine F-Aktin-Struktur, die einem flachen, streifigen Band ähnelt, während in Gegenwart divalenter Metallionen das Aktinmonomer im sogenannten Holmes-Lorenz-Modell (Lorenz et al., 1993) in zwei große und zwei kleine Subdomänen unterteilt wird, wobei das ATP sich in der Spalte zwischen den beiden Domänen befindet. Aktin ist im Profilin-Aktin-Kristall in einem „open state“, d.h. die Spalte ist verglichen zum DNase I-Aktin-Kristall („tight state“) um  $10^\circ$  geöffnet.

Das Holmes-Lorenz-Modell wird häufiger zitiert, da die Konditionen des Kristallierungspuffers den Konditionen des Polymerisationspuffers entsprechen und DNase I an das Minus-Ende des Filaments bindet, wodurch es eine Nachbaruntereinheit nachahmt (Carlier et al., 1991). Das Holmes-Lorenz-Modell bietet

ferner die Möglichkeit, die schnellen Konformationsänderungen von GAktin während der Zugabe von divalenten Metallionen (noch vor der Nukleibildung) zu erklären. So zeigte sich, dass Magnesium mit dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des ATPs interagiert und auf diese Weise eine Gestaltänderung des Proteins bewirkt (Valentin-Ranc und Carlier, 1989). Der Austausch des langsam dissoziierenden, fest gebundenen Kalzium-Ions gegen ein Magnesium-Ion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Magnesium-induzierten Aktinpolymerisation *in vitro*, wobei Aktin auch mit Kalzium alleine polymerisiert, während die Nukleation, Elongation und die ATP-Hydrolyse verlangsamt sind (Nowak et al., 1988).

Neben der hochaffinen Bindungsstelle für Magnesium und Kalzium existiert darüber hinaus eine Bindungsstelle für niedrigere Affinitäten mono- oder divalenter Metallionen. Das Binden von Kationen an dieser Stelle ist der erste Schritt der Polymerisation und wird als „Monomer-Aktivierungsschritt“ bezeichnet (Zimmerle und Frieden, 1988). Die darauffolgende Elongation hängt davon ab, ob die Rate der Keimstehung höher ist als die Rate des Zerfalls der Nuklei (Pollard und Cooper, 1986). Aktintrimere können aber auch durch bindende Proteine wie Gelsolin oder  $\alpha$ -Aktinin stabilisiert werden, was die Lag-Phase der Keimbildung erheblich verkürzt (Vandekerckhove, 1990). Einzelne Filamente können sich während der Elongationsphase auch spontan longitudinal (Ende an Ende) zusammenschließen, was man als „annealing“ bezeichnet (Murphy et al., 1988).

Die an die Aktinpolymerisation gekoppelte Hydrolyse des ATPs führt zu einem Flux von Untereinheiten innerhalb des Filaments, da die Enden des Filaments unterschiedliche kritische Konzentrationen haben (Wegner, 1976). Die kritische Konzentration ist eine Gleichgewichtskonstante und beschreibt das Verhältnis der Rate der dissoziierenden Monomere zu den Raten der assoziierten Monomere, welche sich für ATP-Aktin und ADP-Aktin unterscheiden: es finden also insgesamt acht Gleichgewichtsreaktionen am Aktinfilament statt. So beträgt die kritische Konzentration für ATP-Aktin etwa  $0,1 \mu\text{M}$  und die für ADP-Aktin  $5 \mu\text{M}$ , da die Assoziationsrate für ATP-Aktin 10-mal höher und die Dissoziationsrate 5-mal niedriger als für ADP-Aktin ist (Pollard, 1984).

Die ATP-Hydrolyse besteht aus zwei zeitlich voneinander unterschiedlichen Schritten: erstens, die irreversible Spaltung des ATPs und zweitens, die reversible, langsame Freisetzung des Phosphates, welches mit einer erheblichen Erhöhung der freien Energie einhergeht. Da das Binden des Phosphates ein reversibler Prozess ist, können ADP-F-Aktinuntereinheiten auch noch nach der Polymerisation Phosphate binden, woraus eine Stabilisation der Filamente resultiert (Dancker und Fischer, 1989).

Der Flux der Untereinheiten und die verzögerte ATP-Hydrolyse bewirken, dass die Anzahl der Untereinheiten am Plus-Ende während der Elongation zunehmend mit ATP assoziiert sind. Während der steady-state-Phase verschwindet jedoch nach Carlier (1991) diese „ATP-Kappe“ vollständig und es treten stattdessen vermehrt Untereinheiten mit assoziiertem ADP- $P_i$  auf. Auch lässt sich nach Carlier (1991) das *in vitro*-steady-state-Modell nicht allein mit einem „treadmilling“ erklären, denn der Autorin zufolge ist der Prozess wesentlich dynamischer und gleicht einer „dynamischen Instabilität“, z.B. aufgrund einer extensiven Depolymerisation einzelner Filamente, eingeleitet durch die destabilisierende Wirkung der ATP-Hydrolyse. Die Zelle müsste für das Aufrechterhalten dieses dynamischen Prozesses viel ATP aufwenden. Daher werden nach der Polymerisation die Enden mit „capping“-Proteinen (z.B. Gelsolin am Plus-Ende oder Arp 2/3 am Minus-Ende) blockiert, was die Filamente stabilisiert und Energie spart (Borisy und Svitkina, 2000).

#### 2.3.3.1.1 Cytochalasin und Phalloidin

Die Polymerisation von Aktin kann aber auch durch kleine, natürlich vorkommende, organische Moleküle, die fest an Aktin binden, wie Cytochalasine und Phalloidine, beeinflusst werden. Diese Moleküle werden verwendet, um fundamentale Aspekte der Aktinpolymerisation und die Rolle von Aktin in biologischen Prozessen zu untersuchen. Funktionell gesehen ähneln sie Plus-Ende „capping“-Proteinen, welche die Polymerisation beschleunigen und die Filamente kürzen. Cytochalasine gehören zu einer Gruppe von Pilzmetaboliten, die die Zellmembran permeabilieren, ein „Aufweichen“ der Zelle bewirken, das „Ruffling“ und die Motilität stoppen sowie ein Abrunden der Zelle bedingen (Schliwa, 1982; Bereiter-Hahn und Lüers, 1994, 1998). Cytochalasine binden an das Plus-Ende der Aktinfilamente, was die Assoziation und die Dissoziation von Untereinheiten stark verlangsamt. Der Mechanismus der Filamentkürzung ist noch unklar. Es zeigen auch nicht alle Studien eine Kürzung von Filamenten durch Cytochalasin (vgl. Cooper, 1987). Dennoch wird allgemein angenommen, dass Cytochalasine an die Untereinheiten inmitten eines Filaments binden können, wodurch z.B. nach einer geringen mechanischen Scherung, Brüche induziert werden (Bonder und Mooseker, 1986). Die funktionale Ähnlichkeit von Phalloidin mit „capping“-Proteinen resultiert aus einer Erniedrigung der Dissoziationsrate der Monomere an den Filamentenden (Coluccio und Tilney, 1984), was die kritische Konzentration um das 10- bis 20-fache herabsetzt (Estes et al., 1981).

Phalloidin (ein bitykisches Oktapeptid) lagert sich longitudinal alle  $5,5 \text{ nm}$  an das Filament in der Nähe der ATP-Bindungsstelle an (Steinmetz et al., 1998), was möglicherweise durch sterische Behinderung

## EINLEITUNG

die von Dancker und Hess (1990) beobachtete verzögerte Phosphat-Freisetzung bedingt. Auch wurden durch Phalloidin induzierte Brüche an Filamenten beobachtet (Wagner et al., 1999), was z.B. typisch für das Verhalten des „capping“-Proteins Gelsolin ist.

### 2.3.3.2 Aktin-assoziierte Proteine

#### 2.3.3.2.1 Profilin

Die Motilität von Zellen wird primär durch die Polymerisation und die Depolymerisation von Aktin gesteuert (Stossel, 1993). Die Regulation des G/F-Verhältnisses erfolgt durch „capping“-Proteine, quervernetzende Proteine und „sequestering“-Proteine (Vandekerckhove, 1990; Hartwig und Kwiatkowski, 1991; Sun et al., 1995). Eines der bedeutendsten und in seiner Funktion und Wirkungsweise komplexeste, G-Aktin-bindende und „sequestering“-Protein ist das Profilin (z.B. Cedergren-Zeppezauer et al., 1994). Es reguliert die Aktinpolymerisation auf zweierlei Art und Weise: in Gegenwart von  $MgCl_2$  bindet es sehr effizient G-Aktin und der resultierende Profilin/G-Aktin-Komplex wird dann an das Plus-Ende „eskortiert“ (Carlier und Pantaloni, 1994), was letztlich die „turnover“-Rate am Filament fördert. Wenn die Plus-Enden blockiert sind (z.B. von Gelsolin „gecapped“), fungiert Profilin als einfaches „sequestering“-Protein (Theriot und Mitchison, 1993), wodurch in der Zelle der G-Aktin Pool aufrecht erhalten wird. Sind die Plus-Enden blockiert kann Profilin auch das „sequestering“-Protein Thymosin- $\beta_4$  vom G-Aktin verdrängen (Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Pantaloni and Carlier, 1993; Perelroizen et al., 1996). Da Thymosin- $\beta_4$  die Aktinmonomerkonzentration puffert, wirkt Profilin gleichzeitig am Plus-Ende stark polymerisationsfördernd (Kang et al., 1999). Diese Dualität ist auch *in vivo* evident: mikroinjiziert man Profilin in Ratten-Nierenzellen, wird eine Abnahme von TRITC-Phalloidin-markiertem F-Aktin sichtbar, wohingegen nach Injektion des Profilin-Aktin-Komplexes die Menge an F-Aktin deutlich erhöht ist (Cao et al., 1992). Gleichzeitig stabilisiert eine Überexpression von menschlichem Profilin in klonalen Zell-Linien die Aktinfilamente (Finkel et al., 1994). Nicht zuletzt ist Profilin an der Aktin-basierten Motilität von *Listeria monocytogenes* beteiligt (Theriot et al., 1994).

#### 2.3.3.2.2 $\alpha$ -Aktinin

Neben den Aktin-bindenden Proteinen, die primär eine regulatorische Funktion haben, also das G/F-Verhältnis kontrollieren, existieren Aktin-bindende Proteine, die einzelne Aktinfilamente miteinander verbinden und demnach eine strukturelle Funktion haben. Proteine, die mehr als ein Aktinfilament binden, werden gewöhnlich als Aktin-bündelnd oder Aktin-quervernetzend bezeichnet. Aktinbündel sind parallel angeordnete Aktinfilamente, wie sie auch in Stressfasern, Mikrovilli oder den Stereozilien der Haarzellen zu finden sind. Ein Aktinnetzwerk ist eine isotrope Anordnung von Aktinfilamenten, wie man sie auch im Zellkortex beobachtet (Small, 1981; Stossel, 1984).  $\alpha$ -Aktinin ist ein ubiquitäres Aktin-quervernetzendes Protein in Muskel- und Nichtmuskelzellen. Es zählt zu der Spektrin-Superfamilie und ist ein Dimer aus zwei identischen Peptiden mit je 100 kDa (Meyer und Aebi, 1990), welches in EM-Aufnahmen als 30-40 nm langes Stäbchen mit globulären Strukturen an den Enden zu sehen ist (Podlubnaya, 1975).

$\alpha$ -Aktinin aus Muskelzellen ist ein Kalzium-insensitives Aktin-quervernetzendes Protein. Einige  $\alpha$ -Aktinine aus Nichtmuskelzellen oder aus Zellen der glatten Muskulatur sind kalziumsensitiv. Eine Ausnahme bildet etwa das Kalzium-insensitive  $\alpha$ -Aktinin aus *Acanthamoeba* (Pollard und Cooper, 1986). Dieses  $\alpha$ -Aktinin kann z.B. die Viskosität und Rigidität von Aktinringen um das 40-fache erhöhen (Sato et al., 1987). Der Effekt hängt jedoch von der Frequenz, mit der das Aktin/ $\alpha$ -Aktinringel deformiert wird, ab. Bei niedrigen Deformationsraten ( $< 10^{-3}$  Hz) ist die Änderung der Viskoelastizität des Gels kaum messbar, da sich das  $\alpha$ -Aktinin im Millisekundenbereich umarrangieren kann (Meyer und Aebi, 1990; Xu et al., 1998). Dieses Phänomen wird als „dynamic crosslinking“ bezeichnet und kann das Verhalten des  $\alpha$ -Aktinin-reichen Zellkortex erklären, der unter schnellen Verformungen nahezu festkörperähnliche Eigenschaften hat und sich andererseits, z.B. während der Zytokinese, erheblich verformen kann (Bray et al., 1986).

Mischungen aus Aktin mit niedrigen Konzentrationen von Muskel- $\alpha$ -Aktinin bilden ein homogenisotropes Netzwerk, das sich in EM-Aufnahmen von Aktin ohne  $\alpha$ -Aktinin kaum unterscheidet. Dennoch sind ihre mechanischen Eigenschaften unterschiedlich: ein Aktin/ $\alpha$ -Aktinringel verhält sich im Vergleich zu reinem Aktin nahezu wie ein Festkörper. Hohe Konzentrationen von  $\alpha$ -Aktinin (z.B. molares Verhältnis Aktin/ $\alpha$ -Aktinin = 1:10) zeigen in EM-Bildern stark gebündeltes F-Aktin. Solche Gele unterscheiden sich aber in ihren mechanischen Eigenschaften von reinem Aktin nur kaum, da die kurzen, fast parakristallinen Bündel sehr steif sind und aneinander vorbeigleiten können (Wachsstock et al., 1993).

### 2.3.3.3 Glykolyseenzyme

#### 2.3.3.3.1 Funktionale Dualität zytoskelettärer Proteine und Enzyme der Glykolyse durch Mikrokompartimentierung

Lehrbücher beschreiben zytosolische, biochemische Reaktionen als diffusionsbeschränkte und vollständig in Lösung ablaufende chemische Prozesse (z.B. Stryer, 1995). Ausnahmen hiervon bilden intermediäre Metabolismen, die mit einer Organelle assoziiert sind (z.B. Mitochondrium) oder einen Komplex bilden, wie etwa die Fettsäure-Synthase. Eine Reihe von Arbeiten zeigen aber, dass z.B. die Enzyme der Glykolyse nicht nur in der löslichen Phase des Zytoplasmas lokalisiert sind, sondern auch an Aktin und Mikrotubuli binden und das Monomer-Polymer Verhältnis beeinflussen (z.B. Bereiter-Hahn et al., 1995b, Bereiter-Hahn et al., 1997). Somit kann einigen Enzymen des Kohlehydrat-Metabolismus eine funktionale Dualität zugesprochen werden. Es scheint unmittelbar schlüssig, dass der räumliche Verband zytosolischer Enzyme physiologische Vorteile bietet, denn die Organisation an sich ist ein fundamentales Charakteristikum biologischer Systeme. Im Zytosol werden durch die Mikrokompartimentierung zudem lokal hohe Enzym- und Substratkonzentrationen geschaffen, die den Ablauf biochemischer Prozesse beschleunigen.

#### 2.3.3.3.2 Reziprozität durch supramolekulare Assoziationen zytoskelettärer Proteine mit Enzymen der Glykolyse

In den 1960er Jahren wurden die Glykolyseenzyme Aldolase, GAP-DH, LDH und PFK in den I-Banden der Muskelfasern lokalisiert (Arnold und Pette, 1968). Später stellte sich heraus, dass die Aldolase und die GAP-DH im äquimolaren Verhältnis fest an Aktin gebunden sind. Etwas weniger fest sind die Enzyme PFK, PK und G6P-Isomerase gebunden und nur leicht mit F-Aktin assoziiert sind die TPI, PGM, PGK, Enolase und Hexokinase (Clarke und Masters, 1975). Die Bindungsstudien erfolgten über die Methoden der Kopräzipitation, der differentiellen Ultrazentrifugation bzw. der Affinitätschromatografie. Eine Erhöhung der katalytischen Aktivität der Enzyme durch die Bindung an Aktin wurde für die PFK (Pette, 1975), die Aldolase (Walsh et al., 1977), der GAP-DH, sowie der LDH (Poglazov und Livanova, 1986) gemessen. Demnach partizipiert Aktin nicht nur an der Zellformgebung und der Steuerung der Zellmotilität, sondern kompartimentiert und reguliert darüber hinaus die Aktivität der löslichen Enzyme der Glykolyse. Auch stellte man eine hohe Korrelation zur phylogenetischen Stabilität der Proteine Aktin, GAP-DH und Aldolase fest (Cohen, 1973).

Warum die hohe Zahl aktin gebundener Proteine im Muskel den Kontraktionsprozess nicht beeinträchtigt ist unklar, denn ungefähr an jedem sechsten Aktinmonomer bindet ein Glykolyseenzym und an jedem siebten ein Troponin bzw. Tropomyosin<sup>2</sup>. Die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsstudien können allerdings von der tatsächlichen *in vivo*-Situation abweichen (Clarke und Masters 1976).

Die Interaktion glykolytischer Enzyme mit den Elementen des Zytoskeletts beschränkt sich nicht nur auf Aktin. So ist beispielsweise die Aldolase und die GAP-DH nicht an die Aktinfragmente der Erythrozyten-Membran, sondern an das Bande-3-Protein gebunden (Yu und Steck, 1975). Fest an Mikrotubuli binden etwa die GAP-DH (Durrieu et al., 1987) bzw. die PFK und die Aldolase (Lehotzky et al., 1993). Die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsstudien können jedoch auch hier von der tatsächlichen *in vivo*-Situation abweichen. Minaschek et al. (1992) fanden in Zellextrakten keine an Mikrotubuli-assoziierte GAP-DH oder Aldolase. Schindler et al. (2000) zeigten dagegen *in vivo* eine Assoziation von Aldolase mit Vimentin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Es darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass globuläre Proteine in physiologischen Salzlösungen auch unspezifisch mit Aktin interagieren. So wiesen - neben der von O'Reilly und Clarke (1993) gefundenen spezifischen Aktinbindungsstelle der Aldolase - Lakatos und Minton (1991) auch unspezifische Interaktionen der Aldolase mit dem Aktinfilament nach. Sogar BSA und Cytochrom c, die keine Aktinbindemotive haben, binden nach dieser Studie unspezifisch an F-Aktin. Demnach könnte Mikrokompartimentierung ebenfalls durch das Modell der Phasenseparation erklärt werden. Die Enzyme werden hierbei in der dreidimensionalen, zytosolischen Phase durch Phasenseparationen, aufgrund nichtspezifischer Protein-Protein-Interaktionen, kompartimentiert (Walter und Brooks, 1995). Die Interaktion der Enzyme untereinander und mit dem Zytoskelett findet hierbei also lediglich durch elektrostatischer Anziehungs- und Abstoßungskräften statt, wonach funktionale Einheiten entstehen könnten. Auch einzelne dieser Phasen könnten nach diesem Modell untereinander interagieren.

<sup>2</sup> Beispiel typischer zytosolischer Proteinkonzentrationen (gerundet): 150  $\mu$ M Aktin, 200  $\mu$ M Aldolase, 300  $\mu$ M GAP-DH, 100  $\mu$ M PGK, 100  $\mu$ M TPI, 75  $\mu$ M LDH. Metabolite: 5 mM Glukose, 80  $\mu$ M FBP, 4 mM Laktat, 0,4 mM Pyruvat, 8 mM ATP, 0,1 mM ADP, 0,5 mM NAD<sup>+</sup>, 0,05 mM NADH (nach Srivastava und Bernhard, 1986)

### 2.3.3.3.3 Metaboliten Kanalisierung

Glykolyseenzyme sind auch huckepack-ähnlich aneinander gebunden, was FRET-Messungen<sup>3</sup> zeigen. So bindet beispielsweise die LDH, die Aldolase und die PGK an die GAP-DH, oder die TPI und die PFK an die Aldolase. Enzymassoziationen bieten neben der strukturellen Organisation gleichzeitig die Möglichkeit zum gezielten Transfer von Metaboliten („metabolite channeling“) (Srivastava und Bernhard, 1986). Vorteile einer Substratkanalisierung durch Enzymkomplexe bestehen erstens darin, dass die enzymatischen Reaktionen gezielt an definierten Orten im Zytoplasma ablaufen, zweitens, dass sie unabhängig von Gleichgewichtsreaktionen sind, drittens, dass die Substrate näher und schneller am reaktiven Zentrum der Enzyme sind und schließlich viertens, dass chemisch labile Substrate (z.B. Phosphoenolpyruvat, 1,3-bis-Phosphoglycerat) durch den Enzymkomplex geschützt wären (Ovádi, 1991). Da innerhalb der Zelle die Enzymkonzentrationen sehr hoch sind<sup>4</sup>, und ohnehin nur wenig Lösungsmittelfreiraum zur Diffusion von Metaboliten vorhanden ist, ist das Metaboliten-Kanalierungsmodell schlüssiger als ein Diffusions-Transfer-Modell (Masters et al., 1987).

### 2.3.3.3.4 Untersuchte Enzyme

#### 2.3.3.3.4.1 Aldolase

Eine frühe Arbeit von Starlinger (1967) zeigt, dass die Absorption der Aldolase im Skelettmuskel der Ratte mit der Länge der elektrischen Stimulation des Muskels ansteigt. Ein Jahr später weisen Arnold und Pette (1968) nach, dass die Aldolase direkt an die Strukturproteine des Muskels assoziiert ist. In den 1970er und 1980er Jahren folgten einige Studien, die eine *in vitro*-Interaktion von Aldolase an F-Aktin zeigen (Clarke und Masters, 1974; Clarke und Masters, 1975; Morton et al., 1977; Knull et al., 1980; Bronstein und Knull, 1981; Masters et al., 1981). Diese Studien zeigen auch, dass die kinetischen Parameter  $V_{max}$  und  $K_M$  der Aldolase durch Aktin erhöht werden und dass FBP die Bindung der Aldolase an Aktin kompetitiv inhibiert. Wenn Troponin und Tropomyosin an Aktin assoziiert sind (sogenanntes  $\epsilon$ -konstituiertes, dünnes Filament), dann ist die katalytische Aktivität der Aldolase am höchsten (4-fach). Clarke und Masters (1975) wiesen nach, dass 50 % der Muskelaldolase an das dünne Filament der I-Banden gebunden ist.

Da die Aldolase ein Tetramer ist und jedes Monomer eine Bindungsstelle für Aktin besitzt, kann sie F-Aktin auch quervernetzen (Pagliaro und Taylor, 1988). Eine spezifische Aktinbindungsstelle der Aldolase wurde über das kompetitive Verhalten eines monoklonalen Antikörpers mit der Aldolase an Aktin von O'Reilly und Clarke (1993) und von Wang et al. (1996) beschrieben. *In vivo* wurde die Aldolase in stationären 3T3 Zellen an Stressfasern assoziiert und in Bereichen von aktiven „ruffles“ oder der „leading edge“ von motilen Zellen gefunden (Wang et al., 1997). Die Aldolase ist demnach auch an der Steuerung der Zellmotilität beteiligt. Die Zugabe von FBP oder 2-Desoxyglukose zu permeabilisierten Zellen kann andererseits die Assoziation von Aldolase an Aktin vollständig aufheben (Kao et al., 1999).

#### 2.3.3.3.4.2 LDH

Die LDH ist das erste Enzym am Ende der Glykolyse-Kette und zählt zu den Schlüsselenzymen des Kohlehydratstoffwechsels, denn an dieser Stelle wird entschieden, ob NADH über die oxidative Phosphorylierung oder über die Reduktion von Pyruvat zu Laktat oxidiert wird.

Es sind fünf Isoenzyme der LDH bekannt, die sich in ihren katalytischen Eigenschaften und der Substratwirkung unterscheiden. Während der LDH-H<sub>4</sub>-Typ in Geweben mit aerobem Metabolismus (Herzmuskel) dominiert, ist der LDH-M<sub>4</sub>-Typ charakteristisch für Gewebe mit anaerober Glykolyse (Skelettmuskel). Aufgrund dessen entsteht ein charakteristisches Verteilungsmuster, das den spezifischen Stoffwechselvorgängen in den verschiedenen Geweben angepaßt ist. Die hohe Substrataffinität des M<sub>4</sub>-Typs und die hohe Umsatzgeschwindigkeit bedingen eine schnelle Umsetzung von Pyruvat. Im Gegensatz dazu hat der H<sub>4</sub>-Typ eine wesentlich geringere Substrataffinität und setzt Pyruvat viel langsamer um, wodurch Pyruvat akkumuliert wird. In solchen Geweben wird Pyruvat über den Zitratzyklus und die Atmungskette oxidiert. Bei Substratüberschuss erfolgt bei beiden Typen eine Aktivitätshemmung (Lehninger et al., 1998).

<sup>3</sup> „Fluorescence resonance energy transfer“-Methode nach Jovin und Arndt-Jovin (1989). Die Methode erlaubt die Detektion reversibler Interaktionen zweier Moleküle, die verschiedene Fluorochrome gebunden haben. Die Reduktion der Fluoreszenz des Donors („quenching“) durch Resonanzenergieübertragungen des Akzeptors gibt Aufschluss über den Abstand der beiden Moleküle (bzw. der Fluorochrome) und demnach über ihr Bindungsverhalten.

<sup>4</sup> Eine homogenisierte Zelle hat eine Proteinkonzentration von 150-250 mg/ml, was bereits kristallinen Verhältnissen entspräche (Srivastava und Bernhard, 1986).

Clarke und Masters (1975) fanden Mitte der Siebziger-Jahre heraus, dass 50 % der Muskel-LDH an das dünne Filament der I-Banden bindet. In Gegenwart von Laktat als Substrat wird die Enzymaktivität dieser LDH um das 2,5-fache gesenkt (Kirillina et al., 1989). Umgekehrt beobachteten Blum und Bereiter-Hahn (1991) in Gegenwart von Pyruvat als Substrat eine nahezu verdoppelte Aktivität der an Aktin gebundenen LDH. Diese reziproken Effekte lassen sich dadurch erklären, dass das Binden an Aktin den Zerfall der LDH in ihre (vier) Untereinheiten nach NADH-Sättigung verhindert (Ehmann und Hultin, 1973). Die LDH wird auch an die GAP-DH assoziiert vorgefunden, wodurch sie möglicherweise direkt mit ihrem Coenzym NADH versorgt wird (Srivastava und Bernhard, 1986).

#### 2.3.3.3.4.3 Hexokinase

Die Hexokinase ist das erste Enzym der Glykolysekette und gleichzeitig das Schrittmacherezym. Man unterscheidet in Säugerzellen vier Isoformen der Hexokinase, die durch ihr unterschiedliches Laufverhalten in der Gelelektrophorese charakterisiert sind. Die Isoformen III zeichnen sich durch ein Molekulargewicht von 100 kDa aus und weisen eine Sequenzhomologie von etwa 70 % auf (Aleshin et al., 1998). Die Hexokinase IV hat ein Molekulargewicht von 50 kDa und bindet nur Glukose als Substrat (daher auch die Bezeichnung Gukokinase), wohingegen die Isoformen III auch D-Glukose, D-Mannose und D-Fruktose phosphorylieren. Neben dem Metabolit bindet die Hexokinase einen  $Mg^{2+}$ -ATP-Komplex, wobei nicht-komplexiertes ATP das Enzym kompetitiv inhibiert. Das freie Enzym erscheint in der Röntgenstruktur auffällig zweilappig, während der Enzym-Substrat-Komplex einem geschlossenen Kiefer ähnelt. Durch das Zueinanderbewegen der Domänen gelangt die Glukose in unmittelbare Nachbarschaft des ATPs, was die Übertragung des Phosphates begünstigt („induced fit“) (Bennet und Seitz, 1980).

Man findet die Hexokinase vor allem fest an der äußeren Mitochondrienmembran gebunden vor. Eine Desorption kann durch G6P und ATP eingeleitet werden (Rose und Warms, 1967). Die  $K_M$  für G6P der löslichen Hexokinase ist um einiges niedriger als die der an Mitochondrien assoziierten (Tuttle und Wilson, 1970). Knull et al. (1973) haben gezeigt, dass das Verhältnis der löslichen und der gebundenen Form der Rattenhirn-Hexokinase mit dem Energiestatus des Gehirnes zusammenhängt und gut mit dem intrazellulären ATP und G6P Gehalt korreliert. Demnach kann die Steuerung des Kohlehydratmetabolismus durch das Binden von Glykolyseenzymen an zytosolische Strukturen erklärt werden. Neben der membrangebundenen und löslichen Form wurde die Hexokinase auch an Aktinfilamenten assoziiert vorgefunden (Minaschek et al., 1992).

#### 2.3.3.4 Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Neben Aktin gehören die Mikrotubuli zu den Hauptkomponenten des eukaryotischen Zytoskeletts. Sie haben strukturelle, organisatorische und „motile“ Funktionen. Als strukturelles Element verleihen sie der Zelle ihre definierte Form und bilden auch spezialisierte Strukturen wie Zilien und Flagellen aus. Als Organisator dienen sie als ein Schienensystem zum Dynein/Kinesin-vermittelten Transport von Organellen und definieren die räumliche Verteilung des Golgi-Apparates sowie des endoplasmatischen Reticulums. Als „motile Struktur“ können sie auch selbst Kräfte generieren, wie etwa während der - durch die Depolymerisation der Kinetochor-Mikrotubuli-angetriebenen - Chromosomentrennung (Coue et al., 1991).

Die inhärente Polarität der Mikrotubuli (Durchmesser 25 nm) resultiert aus der einheitlichen Orientierung der unsymmetrischen Tubulinheterodimere in den Protofilamenten. Im Vergleich zum Minus-Ende findet die Polymerisation in die (typischerweise 13 lateral verbundenen) Protofilamente am Plus-Ende schneller statt. *In vitro* benötigt die Tubulinpolymerisation  $Mg^{2+}$ -Ionen, Wärme und einen „nichtspezifischen thermodynamischen Verstärker“ (Howard und Timasheff, 1988) wie z.B. Glycerin.

Tubulin besitzt zwei Bindungsstellen für GTP, wobei das GTP, welches an der E-Seite (engl. „exchangeable site“) der  $\beta$ -Untereinheit bindet, das hydrolysierbare ist. Daher zeigt vermutlich die  $\beta$ -Untereinheit auch zum Plus-Ende und die  $\alpha$ -Untereinheit zum Minus-Ende. Die verzögerte Hydrolyse des GTPs, nach dem Einbau der Tubulin-Einheit am Plus-Ende, hat einen destabilisierenden Effekt auf den Mikrotubulus (Hyman et al., 1995). Da GTP-Tubulin nur langsam vom Ende dissoziiert, wächst eine „Kappe“ aus GTP-Tubulin an, die dieser Destabilisation entgegenwirkt. Diese „Kappe“ verhindert auch den Verlust von GDP-Tubulin, welches zwei bis dreimal schneller vom Plus-Ende dissoziiert als GTP-Tubulin. Die dynamische Instabilität ist die Folge eines sehr langsamen Wachstums des Mikrotubulus (z.B. wenn freies Tubulin fehlt, bei kalten Temperaturen oder in Gegenwart von  $Ca^{2+}$ ), denn in diesem Fall ist am Plus-Ende das meiste GTP-Tubulin bereits hydrolysiert, was wiederum eine rapide Dissoziation von Tubulin am Plus-Ende zur Folge hat (Mitchison und Kirschner, 1984; Hyman und Karsenti, 1996). EM-Aufnahmen zeigen, dass sich die Protofilamente während des Schrumpfens von dem Tubulus „wegkräuseln“ (z.B. Mandelkow et al., 1991). Dieser Umstand impliziert, dass Protofilamente selbst weniger rigide sind, der Mikrotubulus aber eine starke intrinsische Spannung hat. Diese Spannung trägt möglicherweise zusätzlich zu dem drastischen Schrumpfen am Plus-Ende bei (Bereiter-Hahn, 1978). *In*

*in vivo* wird das extensive Schrumpfen der Mikrotubuli durch die Proteine Op18 (auch Stathmin genannt) und XKCM1 induziert. *In vitro* binden diese Proteine fest an Tubulin und werden daher als Tubulin-„sequestering“-Proteine bezeichnet. Neben diesen Mikrotubuli-destabilisierenden Proteinen gehören die MAPs und das MTOC<sup>5</sup> zu den Mikrotubuli-stabilisierenden Proteinen, welche auch *in vivo* zusammen mit Op18 und XKCM1 die Dynamik der Mitose-Spindel regulieren (Walczak, 2000).

MAPs erscheinen in EM-Aufnahmen als etwa 32 nm lange, filamentöse Strukturen, die sich in einer helikalen Anordnung, lateral von dem Mikrotubulus wegstrecken. Ein kurzer Teil dieser starr erscheinenden, jedoch hoch flexiblen Filamente, ist rechtwinklig in die Furchen zwischen den Protofilamenten eingelagert (Weiss et al., 1987). Neben der stabilisierenden Funktion fördern MAPs auch die Polymerisation von Mikrotubuli. Besonders repräsentativ sind MAP1a und b, MAP2a, b und c, sowie MAP4, tau-Protein und ein 205 kDa MAP. Das neuronale MAP2 und das tau-Protein haben deutliche Homologien, während sich MAP1 durch seine Mikrotubuli-Bindungsmotive unterscheidet, aber auch vermehrt in Axonen gefunden wird. MAP4 unterscheidet sich von MAP1, MAP2 und tau vor allem durch sein ubiquitäres Vorkommen (Chapin und Bulinski, 1994).

Mikrotubuli werden allgemein als „klebrig“ bezeichnet, wodurch vermehrt Proteine aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte koeluiert werden. Dieser Umstand hat zur Folge, dass nicht alle Mikrotubuli-assoziierten Proteine strukturelle bzw. regulatorische Funktionen haben. Zu diesen Proteinen gehören Glykolyseenzyme, wie die GAP-DH oder die Aldolase, einige Kinasen (z.B. PKA) und auch Proteine der Biosynthese, wie z.B. EF-1 $\alpha$ . Nicht zuletzt wurden Ribonukleoproteine mit assoziierter mRNA und an Membranrezeptoren gekoppelte Proteine, wie Dynamin oder G-Proteine, koeluiert. In der Zelle dienen Mikrotubuli für diese Proteine möglicherweise als transiente „Anker“. ATP-verbrauchende Motorproteine, wie Kinesine (wandern zum Plus-Ende<sup>6</sup>) oder Dynein (wandert zum Minus-Ende und „biegt“ Zilien und Flagellen), binden zwar fest an Mikrotubuli, lassen sich aber nicht zusammen mit Tubulin aufreinen (Mandelkow und Mandelkow, 1995).

### 2.3.3.4.1 Taxol und Colchizin

Taxol, die erste chemische Verbindung, die einen Taxan-Ring aufwies, wird als Zytostatikum eingesetzt (Wani et al., 1971). Es stört die Mitose, indem es (im Gegensatz zu Colchizin, Podophyllotoxin und Vinblastin) die Tubulinpolymerisation *fördert*. Taxol polymerisiert *in vitro* Tubulin auch ohne GTP und sogar schon ab 10 °C, eine Temperatur, die sich destabilisierend auf Tubulinoligomere auswirkt. Der genaue Wirkungsmechanismus von Taxol und Colchizin ist noch unklar. Die freie Energie der Bindung von Taxol an die  $\beta$ -Untereinheit des Tubulins beträgt ungefähr -3 kcal/mol, wohingegen die von Colchizin nur -0,5 kcal/mol beträgt und Colchizin demnach mehr Energie für das Überwinden von sterischen Behinderungen und geometrischen Spannungen benötigt. Daher verändert Taxol möglicherweise den Polymerisationsmechanismus nicht qualitativ (Howard und Timasheff, 1988).

### 2.3.3.5 Neurofilamente

Ishikawa et al. zeigten 1968 mit EM-Aufnahmen Filamente, deren Durchmesser 7-11 nm betragen, also genau zwischen dem Durchmesser von Aktin (5-7 nm) und Mikrotubuli (25 nm) lagen und daher als Intermediärfilamente bezeichnet wurden (bzw. auch 10 nm Filamente). Sie ließen sich weder mit dem Subfragment 1 dekorieren (wie für Aktin gezeigt) noch durch Colchizin depolymerisieren (wie für Mikrotubuli gezeigt) und erschienen in der unlöslichen Phase des Zellhomogenisats. Im Elektronenmikroskop unterscheiden sie sich zwar kaum von Aktinfilamenten, differieren jedoch in ihren molekularen Massen nach der Auftrennung durch die Gelelektrophorese.

Nach der Aminosäuresequenz beträgt das Molekulargewicht der Neurofilamente zwar ungefähr 70-130 kDa, im SDS-Gel wandern sie aber aufgrund der Ladungseigenschaften ungewöhnlich langsam und können demnach ein augenscheinliches Molekulargewicht von bis zu 1000 kDa haben (Herrmann und Aebi, 1998).

Die Intermediärfilamente besitzen eine gemeinsame, zentrale, stäbchenartige Domäne, welche aus zwei  $\alpha$ -helikalen Untereinheiten („coiled-coil“) besteht. Flankiert wird diese zentrale Einheit von einem nicht- $\alpha$ -helikalen aminoterminalen „Kopf“ und einem carboxyterminalen „Schwanz“ (Parry und Steinert, 1995). Diese Homodimere polymerisieren zunächst zu Tetrameren und dann in Filamente mit einem Durchmesser von etwa 10 nm. Den Prozess der Intermediärfilament-Polymerisation teilen Herrmann und Aebi

<sup>5</sup> Mikrotubuli sind in der Zelle mit ihrem Minus-Ende an das „microtubule-organizing centre“ (MOTC) gebunden, welches das  $\gamma$ -Tubulin-vermittelte Wachsen der Plus-Enden in das Zytoplasma fördert. Vor der Nukleation muss das Tubulin durch den zytoplasmatischen Chaperonkomplex TCP-1 gefaltet werden.

<sup>6</sup> Einige Ausnahmen wie ncd oder Kar3 wandern zum Minus-Ende.

(1998) in drei Schritte auf: erstens, die *schnelle Bildung* (< 10 Sekunden) von etwa 60 nm langen Filament-Einheiten durch laterale Assoziationen von Tetrameren und Oktameren, welche selbst durch anti-parallele Anlagerung (ungefähr um die Hälfte der Länge gegeneinander verschoben) von zwei bis vier Dimeren entstehen. Zweitens, die *Elongation* sogenannter „unreifer“ Filamente durch longitudinales Zusammenschließen („annealing“) zu langen Polymeren (> 20 µm) und drittens, die *Verdichtung* („compaction“) von „unreifen“ Filamenten zu „reifen“ Intermediärfilamente (nach 5 bis 60-minütiger Elongation).

Während der Verdichtung kann es zu einem Umarrangieren von Dimeren, Tetrameren oder Oktameren kommen, wodurch Intermediärfilamente sich in ihre Protofilamente entwirren können. Dennoch entstehen Intermediärfilamente nicht - wie zunächst angenommen - allein durch den seitlichen Zusammenschluss von Protofilamenten (Herrmann et al., 1996).

Neben der stabilisierenden Funktion, während des langandauernden Wachstumsprozesses der Axone, bieten die Neurofilamente gleichzeitig ein Gerüst zur Organisation von Mitochondrien und Mikrotubuli (Hirokawa, 1991). Den Neurofilamenten gemeinsam sind drei Untereinheiten, die nach ihrem Molekulargewicht eingeteilt werden: NF-H (200 kDa), NF-M (160 kDa) und NF-L (70 kDa). Die Polymerisation der kleinen Untereinheit NF-L bildet das Herzstück des Neurofilaments. Die Untereinheiten NF-H und NF-M haben ein langes carboxyterminales Ende, welches zwar durch sein Fehlen die Polymerisation beeinflussen würde, aber für den Zusammenschluss der Filamente nicht zwingend notwendig ist (Nagakawa et al., 1995). *In vivo* verbinden die langen Seitenarme dieser Untereinheiten Neurofilamente untereinander und mit Mitochondrien und Mikrotubuli (Leterrier et al., 1991). Phosphorylierungen repetitiver Sequenzen der Neurofilament-Seitenarme korrelieren mit Aktivitäten des axonalen Transportes und der dichten Bündelung von Neurofilamenten an den Ranvier-Ringen der Nervenzellen. Hyperphosphorylierte Epitope von Neurofilamenten findet man in Verbindung mit pathologisch abnormen Akkumulationen von Neurofilamenten in Nervenzellen (Mata et al., 1992). Die Interaktionen zwischen den Seitenarmen der Neurofilamente untereinander und etwa mit Mikrotubuli bildet die Grundlage zur Erzeugung hochviskoser Gele *in vitro* (Leterrier und Eyer, 1987), deren Konsistenz eine Funktion der Seitenarm-Phosphorylierung ist (Eyer und Leterrier, 1988). Die Zugabe von Aluminium-Ionen moduliert die Viskosität von gelösten Neurofilamenten, was von physiologischer Signifikanz ist, denn diese Ionen sind Ursache einiger Neuropathien (Leterrier et al., 1992).

## 2.4 Fragestellungen und experimentelle Strategien

In den vorherigen Kapiteln wurde die Signifikanz der Zellmechanik beschrieben. So stimmen die mit dem Ultraschallmikroskop gemessenen, lokal hohen, elastischen Werte gut mit der Verteilung von Stressfasern überein. Intermediärfilamente und Mikrotubuli tragen zu den basalen akustischen Werten bei, wobei die Zerstörung der Mikrotubuli die Elastizität der Zelle dennoch deutlich moduliert. Daher resultiert die Viskoelastizität des Zytoplasmas aus den mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zytoskelettelementen, ihrer Interaktion untereinander und der Modulation ihres Monomer/Polymer-Verhältnisses durch bindende Proteine. Erst die Kenntnis der mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zytoskelettelemente ermöglichen ein besseres Verständnis der Zellmechanik. Zwar ist die zufällige Verteilung von Polymeren und Polymernetzwerken *in vitro* nur eine unvollkommene Repräsentation des hochgeordneten Zytoskeletts in einer lebenden Zelle, dennoch müssen zunächst die physikalischen und biochemischen Grundlagen anhand experimentell durchführbarer und erklärbarer *in vitro*-Systeme und -Modelle geschaffen werden.

Die Bestimmung mechanischer Parameter einzelner zytoskelettärer Elemente in wässriger Lösung erfordert jedoch ein Rheometer, welches zur Vermeidung der Zerstörung der feinen Zytoskelettelemente nur geringe Scherkräfte erzeugt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Gerät entwickelt, welches diesem Anspruch genügt. Die Funktionsweise des Gerätes wird im Folgenden detailliert beschrieben. Ferner werden die mit dem Rheometer gemessenen mechanischen Parameter zytoskelettärer Elemente (mit und ohne spezifisch bindender Proteine und Toxine) vorgelegt und diskutiert.

Hinsichtlich der Sensitivität des neuartigen Rheometers und der Möglichkeit scherkraftabhängige Messungen durchzuführen, sowie „online“ Substanzen zu der Probe hinzuzugeben, ergeben sich folgende spezielle Fragestellungen:

### 2.4.1 Unterscheidet sich die Mechanik von ATP-F-Aktin, ADP-F-Aktin und AMPPNP-F-Aktin?

Janmey et al. veröffentlichten 1990, dass die Elastizität von ATP-Aktin im Vergleich zu ADP-Aktin höher ist. Es folgten Publikationen von Pollard et al. (1992) und Newman et al. (1993), die diese Befunde widerlegten, da den Autoren zufolge die von Janmey et al. (1990) gemessenen Elastizitätsunterschiede zu gering waren. Die sehr sensitive Methode des ORR liefert möglicherweise zusätzliche Informationen zur Aufklärung dieses Phänomens, denn die physiologische Bedeutung der Beobachtung von Janmey et al. (1990) ist offensichtlich, da Tumorzellen eine gesteigerte aerobe Glykolyse (z.B. Bereiter-Hahn et al.,

## EINLEITUNG

(1990) ist offensichtlich, da Tumorzellen eine gesteigerte aerobe Glykolyse (z.B. Bereiter-Hahn et al., 1997) mit einer gleichzeitig veränderten Elastizität aufweisen (z.B. Lekka et al., 1999).

Es soll daher mit dem ORR die Modulation der Mechanik während der Polymerisation von ATP-G-Aktin in Gegenwart von Hexokinase und Glukose untersucht werden. Weiterhin werden Wechselwirkungen von Aktin mit dem nicht- (bzw. nur sehr langsam) hydrolysierbaren ATP-Analogen AMPPNP untersucht.

### *2.4.2 Wie verändern depolymerisierende bzw. stabilisierende Substanzen die Viskoelastizität zytoskelettärer Elemente?*

Bereiter-Hahn und Lüers (1998) beobachteten mit dem akustischen Mikroskop ein Aufweichen des Zellsaums und eine Richtungsänderung von XTH-2 Zellen nach lokaler Freisetzung von Cytochalasin D. Ferner zeigten Karl und Bereiter-Hahn (1998) deutliche Elastizitätsänderungen nach der Behandlung von Zellen mit Colchizin. Unklar bei diesen Studien ist jedoch, inwieweit die sehr hohen Änderungen lokaler Elastizitäten mit den Änderungen der mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zytoskelettelemente durch die Zellgifte erklärt werden können. Daher soll mit dem ORR der Einfluss von Cytochalasin D und Phalloidin auf die Polymerisation von Aktin sowie Colchizin (bzw. Kalzium) und Taxol auf die Polymerisation von Tubulin untersucht werden.

### *2.4.3 Kann die Mikrokompartimentierung löslicher Enzyme durch Phasenseparation oder durch die Organisation am Zytoskelett erklärt werden?*

Es soll die Frage beantwortet werden, ob Enzymkomplexe innerhalb der Zelle durch spezifische Interaktionen mit dem Zytoskelett oder lediglich durch Clusterbildung, also aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte zwischen den Enzymen, resultieren. Nichtspezifische Interaktionen können von spezifischen Interaktionen unterschieden werden, wenn die Interaktionen Reziprozitäten aufweisen, d.h., wenn die Bindung eines Enzyms an ein Zytoskelettelement z.B. substratspezifisch erfolgt und gleichzeitig das G/F-Verhältniss des Polymers moduliert wird. Auch könnte die Aktivität des Enzyms nach der Bindung an das Zytoskelettelement moduliert werden. In diesem Falle wäre die Theorie der Mikrokompartimentierung durch spezifische Interaktionen konsistenter als die Theorie der relativen, nicht-spezifischen Phasenseparation.

Untersucht werden mögliche reziproke Interaktionen von Aktin mit den drei Schrittmacherezymen der Glykolyse: der Hexokinase, der Aldolase und der LDH.

### *2.4.4 Untersuchung der mechanischen Belastbarkeit von Aktin- und Mikrotubuligelen*

Die mechanische Belastbarkeit und Verformung von Zellen ist von physiologischer Bedeutung. Ein Beispiel ist die enorme reversible Verformung von Erythrozyten während des Durchtritts durch feine Blutkapillaren. Die Schwingungsamplitude des ORR-Viskositätssensors kann in einem Bereich von 1-150 nm verändert werden, was eine Untersuchung der mechanischen Belastbarkeit von F-Aktin und Mikrotubulilösungen erlaubt. Im Falle einer mechanischen Zerstörung der Filamente sollte sich die Viskosität der Lösungen ändern. Weiterhin soll überprüft werden, ob quervernetzende Proteine die mechanische Belastbarkeit erhöhen können. Da eine höhere Belastbarkeit von Zytogelen während Messungen mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter durch die hohe Scherkraft der Kugel zu erwarten ist, werden die mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter erhaltenen Daten mit den Daten von ORR-Messungen verglichen.

Auch die Schwingungsfrequenz des Sensors kann verändert und so die Elastizität eines Gels abhängig von der Deformationsfrequenz (vgl. Sato et al., 1987) gemessen werden. Für sehr elastische Gele sollte die Steifheit mit steigender Deformationsfrequenz zunehmen.

### *2.4.5 Unterscheidet sich die zeitliche Änderung der Schalldämpfung von der zeitlichen Änderung der Viskoelastizität während der Polymerisation von Aktin?*

Messungen der Schalldämpfung während der Polymerisation zytoskelettärer Elemente wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Man hat lediglich die Schallabsorption verschiedener gelöster, globulärer Proteine gemessen (Cho et al., 1985). Es wird deshalb hier untersucht, ob sich die Schalldämpfung auch während der Polymerisation von Aktin, Tubulin und Intermediärfilamenten verändert, und ob sich die Kinetik möglicherweise von dem Verlauf der Viskosität und der Schallgeschwindigkeit unterscheidet.

### *2.4.6 Modulation der Mechanik von Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten durch bindende Proteine*

Die mit dem ORR synchron gemessenen mechanischen Parameter Viskosität, Schallgeschwindigkeit und Schallabsorption werden auch während der Interaktion von Zytoskelettelementen mit spezifisch

bindenden Proteinen untersucht. Mit diesen Versuchsansätzen soll, in Gegenwart physiologischer Salzkonzentrationen, die *in vivo*- Situation genähert werden. Exemplarisch für Aktin-bindende Proteine sollen ein quervernetzendes ( $\alpha$ -Aktinin) und ein GAktin-bindendes Protein (Profilin) sein. Für Mikrotubuli werden Viskoelastizitäten mit und ohne MAPs gemessen. Ferner wird die Viskoelastizität von Neurofilamenten während der Interaktion mit Mikrotubuli untersucht.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

#### 3.1 Reagenzien

G-Aktinpuffer: 2 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT und 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. Polymerisationslösung: 50 mM KCl und 2 mM MgCl<sub>2</sub>.

PC<sup>7</sup>-Tubulin- und MTP-Puffer (f. Kap. 4.2): 80 mM PIPES-NaOH (pH 6,7), 1 mM GTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA und 1 mM DTT.

PC-Tubulinpuffer (f. Kap. 4.6): 20 mM MES-Puffer (pH 6,8), 1 mM GTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0,4 M Saccharose und 90 % D<sub>2</sub>O. 5 % DMSO zur Polymerisation.

NF-Puffer: wie PC-Tubulinpuffer für Kap. 4.6 mit zusätzlich 0,8 M Saccharose und 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Hexokinasepuffer: 2 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 2 mM oder 0,2 mM ATP (je nach Versuchsansatz), 0,5 mM DTT, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM PMSF.

SDS-PAGE:

Trenngel 10 %: PAA 30 %, Tris 1,5 M (pH 8,8), SDS 10 %, APS 10 %, TEMED 0,03 %.

Sammelgel 5 %: PAA 1,5 %, Tris 1,5 M (pH 6,8), SDS 10 %, APS 10 %, TEMED 0,03 %.

Färbelösung (500 ml): Coomassie R250 1 g, Coomassie G250 0,25 g, Ethanol 98 %. 212,5 ml, Methanol 25 ml, Essigsäure 50 ml, Aqua bidest 212,5 ml.

Proteinpuffer: Roti-Load Fertigpuffer (4-fach).

Entfärbelösung: Essigsäure 7,5 %.

Elektrodenpuffer (5-fach) pro Liter: Tris 15,1 g, Glycin 72,0 g, SDS 10 % 50 ml.

Folgende Reagenzien wurden über Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) bezogen:

ATP, Cytochalasin D, DTT, D-Glukose, GTP, Laktat, MES, NADH, NAD<sup>+</sup>, Oxamat, PIPES-NaOH, PMSF, Pyruvat, Roti-Load und TRIS-HCl.

Folgende Reagenzien wurden über Merck KGaA (Darmstadt, Germany) bezogen:

CaCl<sub>2</sub>, KCl und MgCl<sub>2</sub>.

Folgende Reagenzien wurden über Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) bezogen:

Polyacrylamid (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid), Ammoniumperoxodisulfat, Coomassie Brilliantblau R250, Coomassie Brilliantblau G250, SDS ultra pure.

#### 3.2 Proteine

G-Aktin wurde aus Kaninchen-Muskel nach der Methode von Spudich und Watt (1971) isoliert.

$\alpha$ -Aktinin wurde aus Hühnermagen präpariert (Feramisco und Burridge, 1980). Muskelaktin und  $\alpha$ -Aktinin wurden großzügigerweise von Prof. Dr. P. Dancker (TU Darmstadt) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

$\beta$ -G-Aktin und Profilin wurden aus Kälber-Thymus nach der Methode von Rozycki et al. (1991) und Lindberg et al. (1988) isoliert. Diese Proteine wurden freundlicherweise von Prof. Dr. U. Lindberg (Universität von Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt.

PC-Tubulin vom Rinderhirn (f. Kap. 4.2), zusätzlich aufgereinigt durch drei Polymerisations- und Depolymerisationszyklen, MAP- und Glycerin-frei, war eine freundliche Spende von Dr. T. Müller-Reichert und Dr. A. Hyman (EMBL-Institut in Heidelberg). Es wurde nach der Methode von Ashford und Hyman (1998) präpariert.

MTP vom Schweinehirn wurde nach einer von Vater et al. (1983) modifizierten Methode von Shelanski et al. (1973) hergestellt und freundlicherweise von Dr. W. Vater für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Neurofilamente (molares Verhältnis NF-H:NF-M:NF-L = 2:3:7) von der Ratte wurden nach der Methode von Leterrier und Eyer (1987) und Letterier et al. (1996) eluiert.

PC-Tubulin vom Schweinehirn (f. Kap. 4.6), zusätzlich aufgereinigt durch drei Polymerisations- und Depolymerisationszyklen, MAP- und Glycerin-frei, wurde hergestellt nach der Methode von Shelanski et al. (1973).

PC-Tubulin vom Schweinehirn und Neurofilamente vom Rattenhirn wurden von Dr. M. Odensjö-Leterrier und Dr. J. F. Letterier (INSERM Université 298, C.H.R.U, France) isoliert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

GPT vom Schweineherz (EC 2.6.1.2), Hexokinase Typ I vom Rinderherzen (EC 2.7.1.1), LDH Typ H<sub>4</sub> vom Rinderherzen (EC 1.1.1.27) und Aldolase Typ X vom Kaninchenmuskel (EC 4.1.2.13) wurden über Sigma-Aldrich Chemie GmbH (P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany) bezogen.

---

<sup>7</sup> Engl. „phosphocellulose-tubulin“: über eine Phosphozellulose-Säule aufgereinigtes Tubulin (MAP-frei).

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Die Endkonzentrationen der Proteine wurden mit folgenden Molekulargewichten berechnet: Aldolase = 158 kDa (Tetramer), Aktin = 42 kDa (Monomer),  $\alpha$ -Aktinin = 200 kDa (Dimer), GPT = 115 kDa (Dimer), Hexokinase = 99 kDa (Tetramer), LDH = 140 kDa (Tetramer), Neurofilamentprotein ca. 1000 kDa (NF-H:NF-M:NF-L = 2:3:7) (Homodimer), Profilin = 15 kDa (Monomer), Tubulin = 110 kDa (Heterodimer).

Vor den rheologischen Messungen wurden die Proteinlösungen in Vakuum für mindestens 10 Minuten entgast, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, die die Messungen sonst stark beeinflussen würden.

Das Volumen der Proben betrug 80-120  $\mu$ l.

### 3.3 Der Stabschwinger (ORR)

Ein Glasstäbchen<sup>8</sup> (2 mm lang mit einem Durchmesser von 50  $\mu$ m), das mit einem Ende auf einem Piezoröhrchen befestigt ist, taucht in die zu untersuchende Lösung ein und wird zu transversalen Schwingungen angeregt (1-4 kHz, je nach Viskosität der Flüssigkeit und Länge der Glasfaser) (Abb. 3-1).

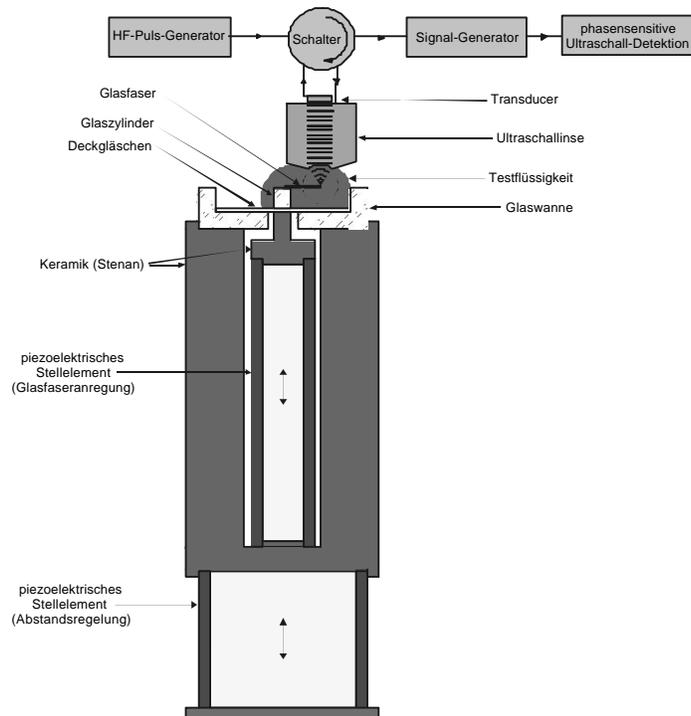


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des ORR. In die zu untersuchende Lösung taucht eine Glasfaser ein, welche über ein Piezoröhrchen zu transversaler Oszillation angeregt wird. Die Resonanzfrequenz und die Dichte der Flüssigkeit sind eine Funktion der dynamischen Viskosität der Probe. Die sehr kleinen Schwingungen ( $> 1$  nm) der Glasfaser werden über ein phasensensitives Ultraschallmikroskop detektiert. Die Ultraschallmessstrecke zwischen Glasfaser und Ultraschalllinse erlaubt die synchrone Bestimmung der Schallgeschwindigkeit und der Schalldämpfung der Lösung.

Die Resonanzfrequenz der Glasfaser ist neben anderen Parametern (z.B. Dichte der Flüssigkeit) eine Funktion der dynamischen Viskosität der Flüssigkeit. Die extrem kleinen Auslenkungen der Glasfaser (in der Regel 1-150 nm, je nach Viskosität der Flüssigkeit) werden von einem phasensensitiven akustischen Mikroskop detektiert (s. Grill et al., 1996 bzw. Hillmann et al., 1994). Hierbei werden hochfrequente, elektrische Pulse (1 GHz) über einen Quarzkristall (Transducer) in elastische Longitudinalwellen umgewandelt, die in einen Saphir<sup>9</sup> koppeln und auf die Spitze der Glasfaser fokussiert werden. Die von der Glasfaser reflektierten Kugelwellen gelangen dann wieder in die Ultraschalllinse und werden von dem

<sup>8</sup> Das Glasstäbchen wird aus einem gewöhnlichen Glasfaserkabel isoliert.

<sup>9</sup> Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany.

Transducer in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die große Schallgeschwindigkeitsdifferenz zwischen Saphir und z.B. Wasser (11.100 m/s:1.500 m/s bei 26 °C) bewirkt aufgrund der unterschiedlichen Brechungswinkel, dass die Kalotte als Sammellinse wirkt, deren Fokus annähernd am Krümmungsmittelpunkt liegt. Die laterale Auflösung der Linse beträgt bei einem Öffnungswinkel von 50° etwa 1 µm, der Arbeitsabstand etwa 50 µm.

Ein Schalter (Abb. 3-1) gibt abwechselnd entweder HF-Pulse auf die Ultraschalllinse oder das empfangene Signal zu Verstärker- und Filterkomponenten weiter (Abb. 3-2). Mit einem Boxcar-Integrator<sup>10</sup> kann ein frei wählbares „Gate“ (Zeitfenster) festgelegt werden, um Störsignale und Linsenechos auszuschließen. Auch mittelt das Gerät die empfangenen Ultraschallpulse (bis zu 14.000 Messwerte pro Sekunde) und generiert Schaltpulse zur Steuerung des Frequenzgenerators.

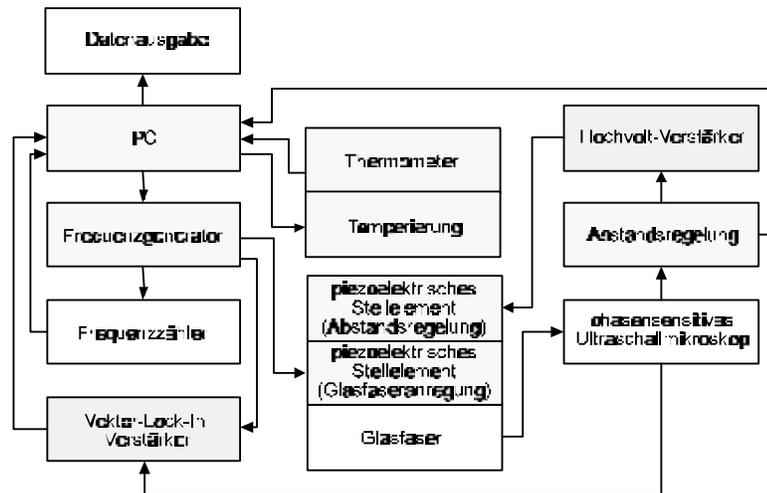


Abb. 3-2: Blockdiagramm des Messaufbaus.

Die Frequenz der Schwingungsamplitude der Glasfaser wird über einen Regelkreis auf die Resonanzfrequenz eingestellt. Hierbei wird die Phase der elektrischen Anregungsfrequenz, die am Piezo zur Glasfaseranregung anliegt, mit der vom akustischen Mikroskop detektierten Phase der Faserschwingung verglichen und mit Hilfe eines Vektor-Lock-In Verstärkers<sup>11</sup> (durch Änderung der Glasfaseranregungsfrequenz) auf  $\pi/2$  eingestellt.

Die Ultraschallmessstrecke zwischen der Glasfaser und der Linse erlaubt die Bestimmung der Schallgeschwindigkeit der Lösung, die eine Funktion der Dichte und der Volumenelastizität der Probe ist (s. Kap. 3.4.2). Ändert sich die Schallgeschwindigkeit der Lösung, kommt es zu einer Phasenverschiebung zwischen der generierten 1 GHz Schwingung und dem detektierten Ultraschallsignal (z.B. wäre das Ultraschallsignal verzögert, wenn die Schallgeschwindigkeit der Lösung abnimmt). Korrigiert wird diese Phasenverschiebung durch die Änderung des Abstandes zwischen der Faserspitze und der Ultraschalllinse, indem der keramische Aufbau von einem zweiten, größeren Piezoröhrchen (Abstandsregelung, Abb. 3-1) entweder angehoben (im Falle einer verringerten Schallgeschwindigkeit) oder gesenkt wird (im Falle einer erhöhten Schallgeschwindigkeit). Die Spannung die an dem Stellelement zur Abstandsregelung anliegt ist demnach ein Maß für die Schallgeschwindigkeitsänderung und wird zusammen mit der Resonanzfrequenz der Glasfaser in einen PC eingelesen.

Die Linsenhalterung ist an einem Kugellager befestigt, das auf einem xy-z Tisch (sogenannter Nanoblock) sitzt. Zum Austausch der zu untersuchenden Flüssigkeiten kann die Ultraschalllinse daher weggeschwenkt werden (Abb. 3-3). Nach dem Probenaustausch schnappt die Linsenhalterung mit einer anhaftenden Stahlkugel auf ein planes Glas, welches einem Magneten anliegt, der fest mit dem Nanoblock verbunden ist. Durch diese Konstruktion (Detailzeichnungen: s. Kap. 7.1) verliert die Linse auch im Nanometerbereich ihre zuvor definierte Position nicht, wodurch nach dem Probenaustausch in der Regel ein erneutes Fokussieren entfällt.

<sup>10</sup> Programmable Gated Signal Averager and Digital Delayed Pulse Sequence Generator, Analog Speed Instruments GmbH, Kelkheim/Ts., Germany.

<sup>11</sup> Model SR810, Stanford Research System Inc., California, U.S.A.

Die Amplitude des von der Glasfaser Spitze reflektierten sinusförmigen Ultraschallsignals wird auf einem Oszilloskop abgebildet und kann durch Veränderung der Position der Ultraschalllinse zur Glasfaser mit den Mikrometerschrauben in x-y-z Richtung (s. Abb. 3-3) maximiert werden.

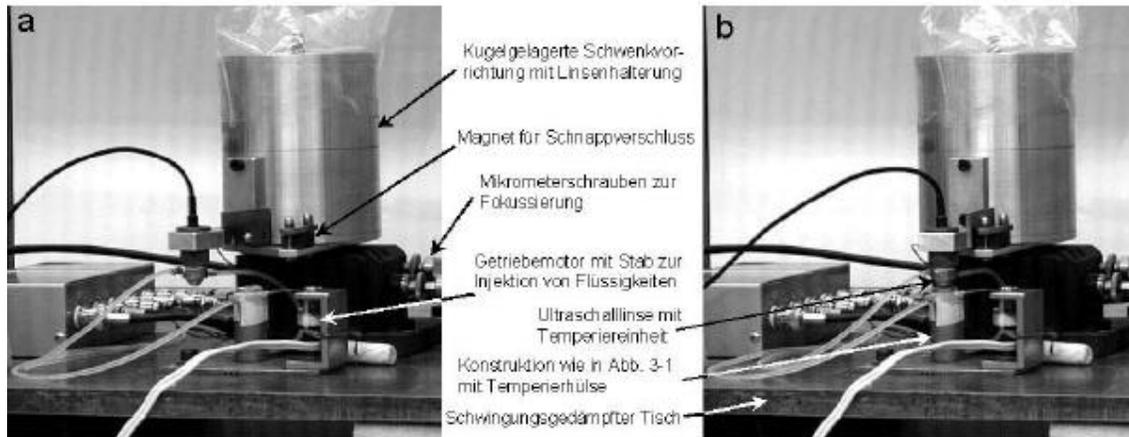


Abb. 3-3 a, b: Zwei Positionen der Schwenkvorrichtung. (a) Die Ultraschalllinse ist von der Messkammer weggeschwenkt. (b) Die Ultraschalllinse ist auf die Glasfaser fokussiert. An ein Plastikstäbchen, das an einem Motor befestigt ist, können Flüssigkeitstropfen von 5-10 µl angefügt werden und während der Messung zu der Probe-erschütterungsfrei - hinzugegeben werden. Die Linse und der Aufbau (analog Abb. 3-1) werden getrennt über ein Kühlsystem temperiert. Der Temperaturfühler (Pt-100 Element) befindet sich aussen an der Glaswanne.

Der Einsatz von Keramik-Werkstoffen (z.B. Stenan, Abb. 3-1) reduziert in hohem Maße unerwünschte mechanische Drift (Detailzeichnungen: s. Kap. 7.1). Zusätzlich steht der erschütterungssensitive Aufbau auf einem schwingungsgedämpften Tisch.

Eine Kurzfassung der Software zur ORR-Steuerung sowie eine detaillierte Anleitung zur Bedienung des ORR befindet sich im Anhang (Kap. 7.2.1 und 7.3).

Die Auswertung der hohen Datenmenge (z.B. 12.800 Datenpunkte pro 20 Minuten Messzeit) wird mit einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Software (Kap. 7.2.2) bewerkstelligt.

### 3.4 Theorie zur Messmethode

#### 3.4.1 Berechnung der Viskosität

Die Schwingung eines an einem Ende fixierten Stabes kann mit folgender Gleichung beschrieben werden (Meyer und Neumann, 1979):

$$M \cdot \ddot{x} + R \cdot \dot{x} + k \cdot x = A \cos(\omega_A t) \quad (1)$$

(Trägheitskraft + Reibungskraft + Anregungskraft = Rückstellkraft)

mit  $x$  = Auslenkung des Stabes,  $M$  = effektive Masse des Stabes (Massenmitnahme einbezogen),  $R$  = Reibungskonstante,  $k$  = Federkonstante,  $A$  = Amplitude der einwirkenden Kraft und  $\omega_A$  = Anregungsfrequenz.

$M$  und  $R$  kann beschrieben werden mit:

$$M = m_g + \rho (a + b \delta + c \delta^2) \quad (2)$$

$$R = \rho b' \delta \omega_A \quad (3)$$

mit  $m_g$  = Masse des Stabes (ohne anhaftende Flüssigkeit),  $\rho$  = Dichte der Flüssigkeit,  $a, b, b', c$  = geometrische Konstanten des Stabes und

$$\delta = \sqrt{\frac{2\eta}{\rho\omega}} \quad (4)$$

mit  $\delta$  = Eindringtiefe der Scherwelle in einer Flüssigkeit (Lamb, 1932) (Abb. 3-4),  $\eta$  = dynamische Viskosität und  $\omega$  = Schwingungsfrequenz der Glasfaser =  $2 \pi f$  (mit  $f \approx 4$  kHz).

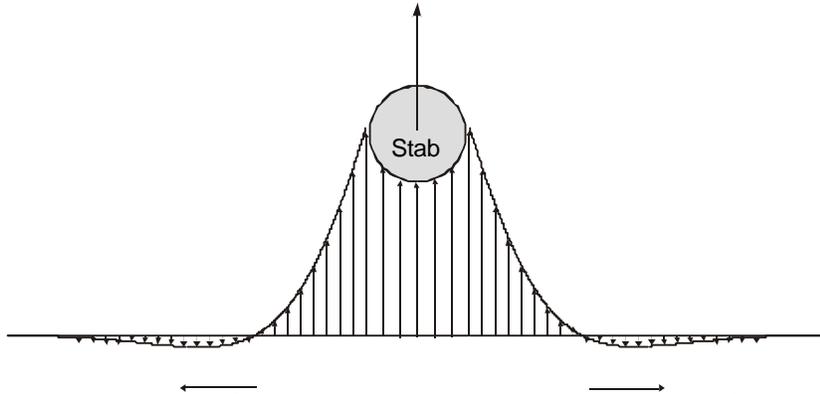


Abb. 3-4: Momentane Geschwindigkeitsverteilung (vertikale Pfeile) einer Scherwelle, die von einem schwingenden Stab (Vorderansicht) in einer viskosen Flüssigkeit durch Massenmitnahme erzeugt wird. Die Flüssigkeitsschicht, die dem Stab am Nächsten anliegt, hat die höchste Geschwindigkeit, die wiederum mit den nachfolgenden Schichten aufgrund von Reibungskräften abnimmt.

Je höher die erzeugte Scherwelle, desto mehr nimmt auch die oszillierende Masse des Stabes zu, was als „Massenmitnahmeeffekt“ beschrieben wird (Landau und Lifshitz, 1987). Parallele Flüssigkeitsschichten können jedoch nur bei laminaren Strömungen entstehen. Die Laminarität wird durch die Größe der Reynoldszahl bestimmt. Wird die sogenannte kritische Reynoldszahl überschritten, entsteht eine turbulente Strömung mit Verwirbelungen der Flüssigkeitsschichten. Mit  $Re_{max} = 0,0375$  (Zinke, 1995) ist allerdings bei dem hier beschriebenen Aufbau eine rein laminare, stationäre Strömung zu erwarten.

Da die erzeugte Scherwelle in etwa der Dimension der Glasfaser entspricht, kann sie sich in dem gegebenen Flüssigkeitsvolumen in ihrer vollen Größe ausbreiten, was bei herkömmlichen Platte-Platte- oder Zylinder-Platte-Rheometern<sup>12</sup> nicht der Fall ist. Ferner können Oberflächeneffekte bei Rotationsrheometern nicht ausgeschlossen werden, weil der Sensor nicht - wie beim ORR - vollständig in die Lösung eintaucht, sondern an ihr anhaftet. ORR-Messungen oder z.B. Messungen mit dem von Ziemann et al. (1994) entwickelten Magnetkugel-Rheometer<sup>13</sup> (engl. „magnetic bead micro-rheometer“) verlaufen daher im Vergleich zu herkömmlichen Rotationsrheometern präziser.

Die Lösung der Differentialgleichung (1) lautet:

$$\ddot{x}(t) = a(\omega) \cos(\omega t - \varphi(\omega)) \quad (5)$$

mit  $a(\omega)$  = Schwingungsamplitude des Stabes und  $\varphi(\omega)$  = Phasenverschiebung zwischen der Anregungsfrequenz am Piezo und der Frequenz der freien Glasfaserschwingung.

Überprüft werden kann die Theorie nach dieser Gleichung durch Bestimmung der Phasenlagen der Glasfaserschwingung bei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen für verschieden stark viskose Flüssigkeiten (Abb. 3-5). Aufgrund des Massenmitnahmeeffektes wird bei höheren Frequenzen mehr Flüssigkeit mitgenommen als bei niedrigeren. Daher sind bei hohen Frequenzen auch die Phasenverschiebungen größer.

Da bei  $90^\circ$  die Schwingungsamplitude der Glasfaser annähernd maximal ist und die Kurven sich noch gut aufspalten, wurde im weiteren Verlauf bei einer Phasenlage von  $\varphi = \pi/2$  gemessen. Bei hohen Fre-

<sup>12</sup> Rotationsrheometer nutzen den Zusammenhang zwischen einwirkender Kraft und Verformbarkeit der Probe, wobei die Viskosität proportional zur Schubspannung und Deformation ist (z.B. Weissenberg-Rheometer, Satoh et al., 1985 oder Janmey-Torsions-Pendel, Janmey, 1991). Die Flüssigkeit befindet sich z.B. zwischen zwei Platten, wobei eine Platte parallel zur zweiten in Rotation versetzt. Gemessen wird das Drehmoment und die Winkelgeschwindigkeit, die beide mit der Viskosität verknüpft sind (Janmey, 1991).

<sup>13</sup> Der Viskoelastizitäts-Sensor ist hier eine zur Schwingung angeregte Magnetkugel, die vollständig in die Lösung eintaucht. Die Auslenkung der Kugel ist eine Funktion der Dichte und Viskosität der Flüssigkeit. Die Elastizität wird über das von der Kugel beschriebene Scherfeld bestimmt (Ziemann et al., 1994).

quenzen (> 3 kHz) wird mehr Flüssigkeit mitbewegt als bei niedrigeren und die Phasenlage wird nur von den Unterschieden in der Dichte beeinflusst (vgl. Gl. 1).

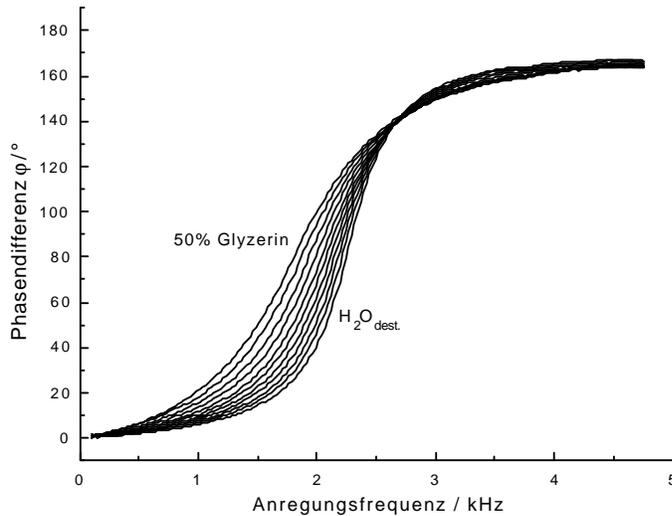


Abb. 3-5: Beispiel für Phasenverschiebungen  $\varphi$  der Glasfaserschwingung bei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen. Gemessen wurden Wasser-Glyzeringemische (5-50 % Glycerin) und destilliertes Wasser. Bei höheren Schwingungsfrequenzen der Glasfaser wird durch Massenmitnahme mehr Flüssigkeit mitgenommen, was die Phasendifferenz erhöht.

Aus Gleichung (1) und (5) folgt eine von Kojro et al. (1996) beschriebene Phasengleichung:

$$\frac{\left(\frac{\omega_0^2}{\omega_A^2}\right) - 1}{\rho} = \alpha + \left(\beta + \frac{\beta'}{\tan \varphi}\right) \delta + \gamma \delta^2 \quad (6)$$

mit  $\omega_0$  = Resonanzfrequenz der Glasfaser in Vakuum (näherungsweise in Luft, vgl. Kap. 7.3.4) und  $\alpha, \beta, \beta', \gamma$  = geometrische Konstanten der Apparatur mit  $\beta' = -\beta(\tan \varphi)$ .

Die geometrischen Konstanten  $\alpha, \beta$  und  $\gamma$  werden für Flüssigkeiten bekannter Viskosität (vgl. Abb. 3-7)

durch Auftragung von  $\frac{\left(\frac{\omega_0^2}{\omega_A^2}\right) - 1}{\rho}$  (Gl. 6) gegen das Quadrat der Eindringtiefe der Viskositätsscherwelle

$\delta^2 = \frac{2\eta}{\rho\omega}$  (Gl. 4) ermittelt (Abb. 3-6). Die Datenpunkte können dann durch die Näherungsfunktion

$$f(\delta^2) = a + b \cdot \sqrt{\delta^2} + c \cdot \delta^2 \quad (7)$$

beschrieben, und die Apparatekonstanten näherungsweise durch die Parameter  $a, b$  und  $c$  berechnet werden.

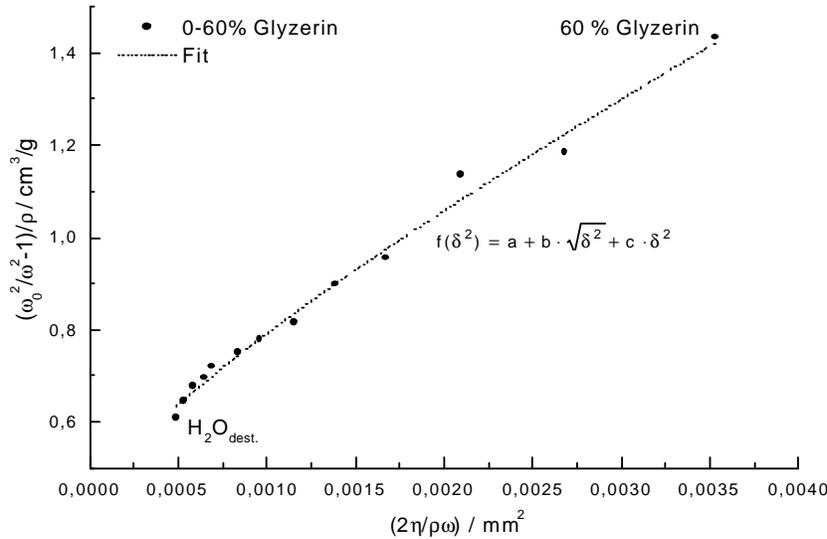


Abb. 3-6: Berechnung der Apparatekonstanten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$  durch Auftragung der Größe  $(\omega_0^2/\omega^2-1)/\rho$  gegen die (quadratische) Eindringtiefe der Scherwelle für Flüssigkeiten bekannter Viskosität. Mit einer Näherungsfunktion  $f(\delta^2)$  können die geometrischen Konstanten durch die Parameter  $a$ ,  $b$  und  $c$  annähernd beschrieben werden.

Gleichung (6) nach der dynamischen Viskosität  $\eta$  aufgelöst:

$$\eta = \left( \frac{\left( \beta + \frac{\beta'}{\tan \varphi} \right) \sqrt{\frac{\omega_A \rho}{8}}}{\gamma} + \sqrt{\frac{\left( \beta + \frac{\beta'}{\tan \varphi} \right)^2 \omega_A \rho}{8\gamma^2} + \left( \frac{\omega_0^2}{\omega_A^2} - 1 \right) \frac{\omega_A}{2\gamma} - \frac{\alpha \omega_A \rho}{2\gamma}} \right)^2 \quad (8)$$

Die SI-Einheit der Viskosität ist Pa s ( $= \frac{\text{N} \cdot \text{s}}{\text{m}^2} = \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}}$ ) bzw. mPa s (Millipascalsekunde). Eine früher ge-

bräuchliche Einheit war Poise: 1 mPa s ist 0,01 Poise = 1 cP (Zentipoise) in  $\frac{\text{dyn} \cdot \text{s}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{g}}{\text{cm} \cdot \text{s}}$ .

Die Messgenauigkeit der Viskosität von Wasser liegt bei etwa  $\pm 0,5 \%$ . Für Proteinlösungen kann der Messfehler je nach Konzentration zwischen 0,5 % und 6 % liegen. Die Temperaturstabilität liegt bei  $\pm 0,15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Temperaturschwankungen in diesem Bereich verursachen Viskositätsschwankungen von etwa 0,2 %.

### 3.4.2 Berechnung der Schallgeschwindigkeit und des Elastizitätsmoduls

In Flüssigkeiten und Gasen können Schallwellen als Dichte- und Druckschwankungen bezeichnet werden. Die Ausbreitung erfolgt hauptsächlich in Form von Longitudinalwellen. In Festkörpern breiten sich Schallwellen als Longitudinalwellen oder Transversalwellen aus. Die Schallgeschwindigkeit der Longitudinalwellen ist jedoch größer als die der Transversalwellen.

Die Schallgeschwindigkeit (z.B. für Wasser bei 26  $^\circ\text{C}$  = 1500 m/s, Kroebel and Mahrt, 1976) ist verknüpft mit der Wellenlänge  $\lambda$  der akustischen Welle und der Betriebsfrequenz  $\nu$  der Ultraschalllinie:

$$c_{\text{aqua}} = \lambda \cdot \nu = 1,5 \mu\text{m} \cdot 1 \text{ GHz} = 1500 \text{ m/s} \quad (9)$$

(Die tatsächliche Wegstrecke des Ultraschalls ist  $2 \times 1,5 \mu\text{m}$ , da der Schall erst von der Linse zur Glasfaser gelangt, um dann wieder zurück zur Linse reflektiert zu werden).

Wie unter 3.3 beschrieben, werden die während Schallgeschwindigkeitsänderungen hervorgerufenen Phasenmodulationen des empfangenen akustischen Signals durch Änderungen des Abstandes ( $\Delta z$ )

zwischen der Ultraschalllinse und der Glasfaser kompensiert. Daher kann Gleichung (9) auch geschrieben werden zu:

$$c_{\text{aqua}} = (n \cdot \lambda_0 + \Delta Z) \cdot v = (k \cdot V_{\text{piezo}}) \cdot v \quad (10)$$

mit  $n$  = Anzahl der Wegstrecken des Ultraschalls,  $v$  = Frequenz der Schallwelle,  $k$  = Kalibrierungskonstante für Wasser =  $\frac{c_{\text{aqua}}}{V_{\text{piezo}} \cdot v}$  und  $V_{\text{piezo}}$  = Spannung am piezoelektrischen Stellelement zur Abstandsregelung.

Gleichung (11) beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Kompressionsmodul  $K$  und der Schallgeschwindigkeit  $c$ .

$$c = \sqrt{\frac{K + \frac{4}{3} \cdot G}{\rho}} \quad (11)$$

mit  $K$  = Kompressionsmodul in GPa (Gigapascal),  $G$  = Schermodul in GPa und  $\rho$  = Dichte der Flüssigkeit in  $\text{g/cm}^3$  (Bergmann und Schäfer, 1990).

Das Kompressionsmodul wird auch als Volumenelastizität bezeichnet. Es beschreibt das (negative) Verhältnis des *Druckes* ( $-p$ ) der auf eine Flüssigkeit einwirkt zur *relativen Volumenänderung* der Flüssigkeit ( $\Delta V/V$ ). Das Schermodul  $G$ , auch Schub- oder Torsionsmodul genannt, bezeichnet das Verhältnis der *Scherspannung* ( $F_s/A$  = Scherkraft pro Fläche) zur *Scherung* ( $\Delta x/l$  = Formveränderung eines Körpers pro Längeneinheit) eines elastischen Körpers. Gewöhnlich ist  $G \ll K$ , daher kann Gleichung (11) näherungsweise ausgedrückt werden durch:

$$c = \sqrt{\frac{K}{\rho}} \quad (12)$$

Das Elastizitätsmodul (Young's Modul) wird meist zur Charakterisierung von Festkörpern herangezogen. Es beschreibt das Verhältnis der *Spannung* (engl. „stress“) ( $F/A$  = Kraft pro Fläche), die auf einen Körper einwirkt, zur dadurch entstandenen *Dehnung* (engl. „strain“) ( $\Delta l/l$  = relative Längenänderung). Das Kompressionsmodul steht mit dem Elastizitätsmodul in folgendem Zusammenhang (Franke, 1969):

$$K = \frac{E}{3 \cdot (1 - 2\mu)} \quad (13)$$

mit  $\mu$  = Poisson-Verhältnis (z.B. für Aktinfilamente etwa 0,4, Schmidt et al., 1996).

Das Poisson-Verhältnis ist der Quotient aus der *Querkontraktion* ( $\Delta d/d$  = Dickenänderung) und der *Dehnung* ( $\Delta l/l$  = relative Längenänderung) eines elastischen Körpers.

Nach Gl. (13) ist das Elastizitätsmodul 0,6-mal größer als das Kompressionsmodul. Letzteres wird auch als Kompressibilität  $\kappa$  ( $= 1 / K$ ) bezeichnet.

Kurzbeschreibung und Zusammenfassung der o.g. Module:

E (Elastizitätsmodul)	Spannung / Dehnung (engl. „stress“ / „strain“)
K (Kompressionsmodul)	Druck / Volumenänderung
G (Schermodul)	Scherspannung / Scherung
$\mu$ (Poisson-Verhältnis)	Querkontraktion / Dehnung

Messfehler während Schallgeschwindigkeitsmessungen können durch thermische Schwankungen entstehen (maximaler Messfehler:  $\pm 0,4$  m/s).

### 3.4.3 Berechnung der absoluten Schallgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der absoluten Schallgeschwindigkeit der Lösung, wird die Spannung am Piezo zur Abstandsregelung (s. Abb. 3-1) schrittweise verändert bis ein 360° Phasen shift des Ultraschallsignals erreicht ist. Aus den Daten kann dann nach Gl. (10) die absolute Schallgeschwindigkeit der Lösung berechnet werden (maximaler Messfehler:  $\pm 0,5$  m/s).

### 3.4.4 Berechnung der Amplitude der Glasfaserschwingung

Die Amplitude der Glasfaserschwingung wird aus der Wellenlänge  $\lambda$  und der Amplitudenmodulation  $\varphi$  des Ultraschallsignals berechnet:

$$A = \frac{\lambda}{2} \cdot \frac{\varphi}{360^\circ} \quad (14)$$

mit  $A$  = Schwingungsamplitude der Glasfaser,  $\lambda$  = Wellenlänge der longitudinalen akustischen Welle und  $\varphi$  = Phasenlage des Ultraschallsignals.

### 3.4.5 Berechnung der Schalldämpfung

Die akustische Dämpfung ( $S$ ) ist die Intensitätsabnahme der Amplitude ( $A$ ) einer akustischen Welle zwischen zwei Messpunkten  $x_1$  und  $x_2$ :

$$S = 20 \cdot \log \left( \frac{A_{x_1}}{A_{x_2}} \right) \quad (15)$$

Die Dämpfung von Wasser bei einer Temperatur von 25 °C beträgt etwa 50 dB/mm (Bergmann-Schäfer, 1990).

Die Schalldämpfung entsteht aufgrund der Reflektion, Streuung, Brechung und Absorption von Schall. Die ersten drei Parameter basieren auf Inhomogenitäten der Flüssigkeit. Die Absorption hängt mit der Viskosität und der thermischen Leitfähigkeit (thermische Relaxation) der Flüssigkeit zusammen. Die thermische Relaxation ist jedoch für Flüssigkeiten vernachlässigbar (Cracknell, 1980). Der Zusammenhang zur Viskosität kann folgendermaßen beschrieben werden:

$$S = 8 \pi^3 \eta / 3 \rho c^3 \quad (16)$$

mit  $S$  = Schalldämpfung,  $\eta$  = Viskosität,  $\rho$  = Dichte und  $c$  = Schallgeschwindigkeit der Flüssigkeit.

## 3.5 Mikro-Kugelfallviskosimeter

Die Scher-Viskosität newtonscher Flüssigkeiten, sprich Flüssigkeiten ohne elastisches Verhalten, wird meist mit einem Kugelfallviskosimeter oder Kapillarviskosimeter gemessen. Das für diese Arbeit verwendete Mikro-Kugelfallviskosimeter<sup>14</sup> wurde zum einen zur Bestimmung der Viskosität von Eichlösungen für das ORR (Abb. 3-7) und zum anderen zur Untersuchung des Einflusses höherer Scherkräfte auf Zytogele eingesetzt. Ferner eignet es sich auch aufgrund seiner vergleichsweise einfachen Bedienung gut für Studien mit sehr vielen Versuchsansätzen (vgl. Kap. 4.5.3).

<sup>14</sup> Die Viskositäten von Glycerin/Wasser-Gemischen wurden mit einem kommerziellen Mikro-Kugelfallviskosimeter (HAAKE Mess-Technik GmbH u. Co., Karlsruhe, Germany) bestimmt.

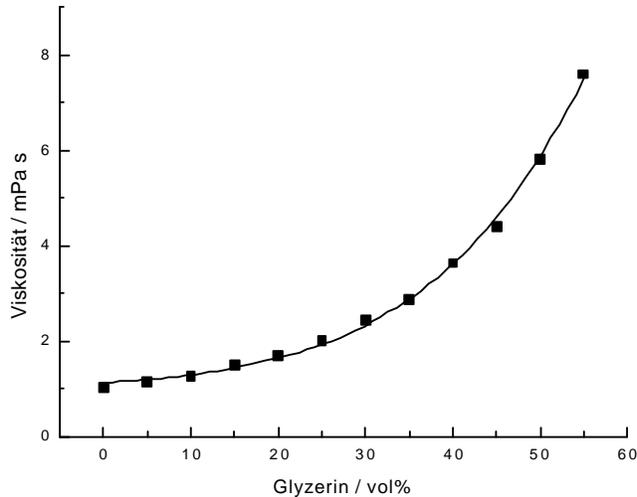


Abb. 3-7: Mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter gemessene Viskositäten von Glycerin/Wasser-Gemischen (0-60 % Glycerin, 20 °C) zur Ermittlung der Gerätekonstanten für das ORR (vgl. Abb. 3-6). Der typische, exponentiell zunehmende, Kurvenverlauf für amorphe Flüssigkeiten wurde mit einem Gauss-Fit genähert<sup>15</sup> und beschreibt die ansteigende Scherverzähnung von Molekülschichten mit zunehmender innerer Reibung (vgl. Landau und Lifshitz, 1987).

Die Probenflüssigkeit (300 µl) wird bei diesem Viskosimeter mitsamt einer Stahlkugel (3,06 mm) in eine Glasspritze aufgezogen. Eine Halterung garantiert eine definierte Schräglage der Spritze zur Beschleunigung der Kugel. Die Kugel fällt dann durch zwei Lichtschranken, die eine digitale Stopuhr schalten. Die Fallzeit in Millisekunden kann an einem LED-Display abgelesen werden.

Die dynamische Viskosität wird über eine Ableitung der Stokes'schen Widerstandsgleichung berechnet:

$$\eta = k_{\text{cal}} \cdot (\rho_{\text{ku}} - \rho_{\text{fl}}) \cdot t \quad (17)$$

mit  $\eta$  = dynamische Viskosität,  $\rho_{\text{ku}}$  = Dichte der Stahlkugel (7.8 g/cm<sup>3</sup>),  $\rho_{\text{fl}}$  = Dichte der Flüssigkeit (g/cm<sup>3</sup>),  $t$  = Fallzeit (ms) und dem Kalibrierungsfaktor  $k_{\text{cal}} = \frac{\eta_{\text{H}_2\text{O}}}{(\rho_{\text{ku}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}}) \cdot t}$

mit  $\eta_{\text{H}_2\text{O}}$  = standardisierter Wert für Wasser von 0,9 mPa s bei 25 °C.

Der Kalibrierungsfaktor eliminiert geometrische Differenzen verschiedener Kombinationen aus Kugel und Spritze.

Typische Fallzeiten sind: 0,6 Sekunden für Wasser, 0,9 Sekunden für 10 µM Aktin, 2,6 Sekunden für 50 % Glycerin. Die Messgenauigkeit der Apparatur beträgt etwa  $\pm 1$  %. Aufgrund der - zum ORR vergleichsweise hohen - Scherkräfte kann der Messfehler jedoch bei höheren F-Aktinkonzentrationen (> 5 µM) bis zu 8 % betragen.

Zur Erleichterung der Datenverarbeitung wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Software entwickelt, die neben der Datenaufnahme und Umrechnung der Fallzeit in die dynamische Viskosität, eine automatisierte Spritzenkalibrierung sowie die Steuerung der Temperatureinheit gewährleistet (Kap. 7.2.3).

Häufig wird in der Literatur die mit Kugelfallviskosimetern gemessene Viskosität als „apparent viscosity“ angegeben. Sie hat die Einheit s/cm, also die Fallzeit, welche die Kugel pro Wegstrecke benötigt, um durch das flüssigkeitsgefüllte Rohr zu fallen. So beträgt die „apparent viscosity“ von z.B. 24 µM Aktin nach MacLean-Fletcher und Pollard (1980) etwa 50-100 s/cm (die gemessenen Werte werden oft statt in s/cm in cP angegeben, was allerdings der dynamischen Viskosität mit der SI-Einheit mPa s entspräche und demnach unsachgemäß ist).

<sup>15</sup> Microcal Origin 6.0 Software. Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, U.S.A.

## MATERIAL UND METHODEN

Viskositäten von Zytogelen werden auch mit Kapillarviskosimetern gemessen. Mit Hilfe sogenannter Ostwald-Kapillarrohren lässt sich, unter Anwendung des Hagen-Poiseuille'schen Gesetzes, die spezifische Viskosität von Flüssigkeiten bestimmen. Hagen und Poiseuille fanden einen direkten Zusammenhang zwischen der Volumenstromstärke in einer Kapillare, der Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende der Kapillare, dem Radius und der Länge der Kapillare sowie der Viskosität der Lösung. Als Volumenstromstärke bezeichnet man das Flüssigkeitsvolumen, welches in einer bestimmten Zeit durch eine Röhre mit einem bestimmten Querschnitt strömt. Nach dem Ohmschen Gesetz der Hydrodynamik ist für newtonsche Flüssigkeiten die Beziehung zwischen der Volumenstromstärke und der Druckdifferenz linear (Kohlrausch, 1985).

Die mit Kapillarrohren ermittelte spezifische Viskosität ( $\eta_{sp}$ ) ist dimensionslos:

$$\eta_{sp} = (t_{prot} - t_{puffer}) / (t_{puffer}) \quad (18)$$

mit  $t_{puffer}$  = Fließzeit des Puffers und  $t_{prot}$  = Fließzeit der Proteinlösung (nach Olmsted and Borisy, 1973)

Die kinematische Viskosität erhält man durch die Division der dynamischen Viskosität, ausgedrückt in Stokes ( $1 \text{ Stokes} = 1 \text{ cm}^2 / \text{s}$ ):

$$\eta_{kin} = \eta / \rho \quad (19)$$

Die SI-Einheit ist  $\text{m}^2/\text{s}$ .

Mit der Kenntnis der relativen Viskosität ( $\eta_{rel} = \eta_{sp} + 1$ ) kann auch die dynamische Viskosität in cP (bzw. mPa s) ausgedrückt werden (Cooper und Pollard, 1982):

$$\eta = \eta_{rel} (\rho_{prot} / \rho_{puffer}) \eta_{puffer} \quad (20)$$

mit  $\rho_{prot}$  = Dichte der Proteinlösung,  $\rho_{puffer}$  = Dichte des Puffers und  $\eta_{puffer}$  = Viskosität des Puffers.

Die Scherraten sind hier aber sehr hoch ( $> 1000 \text{ s}^{-1}$ ), weshalb man die Kapillarviskosimetrie auch als „high shear“ und die Kugelfallviskosimetrie ( $< 10 \text{ s}^{-1}$ ) als „low shear“ Viskosimetrie bezeichnet (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980; Cooper und Pollard, 1982).

### 3.6 Dichtebestimmungen

Die Dichten der Eichlösungen wurden mit einem herkömmlichen Pyknometer<sup>16</sup> bestimmt (Abb. 3-8).

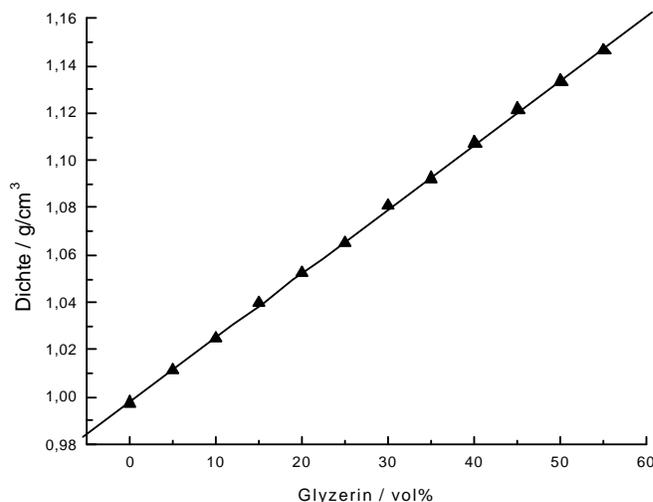


Abb. 3-8: Dichtebestimmung von Glycerin/Wasser-Gemischen (0-60 % Glycerin) bei 20 °C mit einem Pyknometer.

<sup>16</sup> Firma Fischer, Frankfurt, Germany.

Zur Bestimmung der Dichten der Proteinlösungen und Puffer wurde jeweils 1 ml der Probe in ein Eppendorf-Cap pipettiert und das Gewicht (abzüglich Tara des Caps) mit einer Feinwaage<sup>17</sup> bestimmt. Das Ergebnis wurde aus 5 Messungen gemittelt. Die Standardabweichung betrug  $\pm 0,0041 \text{ g/cm}^3$ . Die Dichten verschieden hoher Proteinlösungen und der Pufferlösungen schwankten zwischen 0,98-1,02  $\text{g/cm}^3$  (vgl. Wagner, 1995) und wurden daher im weiteren Verlauf mit  $1 \text{ g/cm}^3$  genähert.

### 3.7 Elektronenmikroskopie

Aktinfilamente wurden nach der Methode von Cooper und Pollard (1982) negativ kontrastiert. G-Aktin wird hierfür in einer feuchten Kammer bis zu 40 Minuten mit dem Polymerisationssalz (und z.B. bindender Proteine) inkubiert (Tropfengröße 50  $\mu\text{l}$ ). Die kohlebedampften<sup>18</sup> und beglimmten Kupfernetzchen (engl. „EM-Grids“) legt man dann für eine Minute auf den Tropfen. Die überschüssige Lösung wird durch kurzes Antippen der Kante des Netzchens auf ein Kleenex entfernt. Das Netzchen legt man dann für 15 Sekunden auf einen Tropfen Uranylacetat (1 %) und danach wird die überschüssige Lösung wieder abgesaugt. Mit dieser nach Cooper und Pollard (1982) modifizierten Methode kann das Brechen von Filamenten durch mechanischen Stress weiter vermindert werden.

Wenn polymerisiertes Aktin für EM-Aufnahmen direkt aus der Messkammer des ORR mit einer Pipette entnommen wurde, dann wurden die Pipettenspitze etwas gekürzt zur Verminderung von Scherkräften (nach Janmey et al., 1994).

Die EM-Grids wurden mir einem Zeiss 902 Transmissionselektronenmikroskop betrachtet. Zur Kontrastverstärkung benutzt man eine Spektrometereinheit, die es erlaubt, inelastische Elektronen, also Elektronen mit hohem Energieverlust, auszublenden, wodurch der Kontrast des Präparates erhöht wird.

Digitale Bilder wurden mit einer an einen Bildkontrast-Verstärker<sup>19</sup> angeschlossenen CCD-Kamera aufgenommen und hinsichtlich Bildschärfe und Kontrast mit einer Bildverarbeitungssoftware<sup>20</sup> weiterverarbeitet. Die Bildvergrößerungen berechnete man durch den Vergleich von Aufnahmen von 6 nm Goldpartikeln.

### 3.8 Kosedimentation und SDS-Gel

G-Aktin wird zusammen mit weiteren Proteinen (je nach Versuchsansatz) 40 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert. Danach zentrifugiert<sup>21</sup> man die Lösung (150  $\mu\text{l}$ ) für 1,5 Stunden bei 125.000 g (4 °C). Die Proteine der Überstände und der Pellets wurden nach der Methode von Laemmli (1970) elektrophoretisch in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteinbanden mit einer Coomassieblaulösung angefärbt.

### 3.9 Extinktionsmessungen

Die zu untersuchenden Lösungen vermischt man in einem Eppendorf-Cap und überführt sie in eine Mikro-Küvette. Die Messung wird dann sofort gestartet und die Extinktion aufgenommen<sup>22</sup>.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann die Reaktionsgeschwindigkeit ( $v$ ) eines Enzyms durch seine Volumenaktivität (U/ml) ausgedrückt werden ( $U = \text{Units} = \text{Umsatz eines } \mu\text{mols Substrat pro Minute}$ ):

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot t} \quad (21)$$

<sup>17</sup> Marke Mettler AT261 DeltaRange FACT, Fa. Mettler, Giessen, Germany.

<sup>18</sup> Die Beglimmung und Kohlebedampfung erfolgte mit einer Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage Typ MED 020, Firma Baltec, Balzers, Liechtenstein.

<sup>19</sup> Modell Argus-20, Hamamatsu Photonics, Herrsching, Germany.

<sup>20</sup> Photoshop 5.0, Adobe Systems Inc., San Jose, California, U.S.A.

<sup>21</sup> Beckman Ultrazentrifuge, Optima TLX (Rotor: TLA 45), Fa. Beckman, München, Germany.

<sup>22</sup> Spektralphotometer der Marke Spectronic 3000 Array, Fa. Milton Roy (Vertrieb: Fa. Fisher, Frankfurt, Germany).

## MATERIAL UND METHODEN

mit  $E = \text{Extinktion} = -\ln I/I_0$  ( $I = \text{vom Medium durchgelassene Lichtintensität}$ ,  $I_0 = \text{Anfangsintensität}$ ),  $\epsilon = \text{molarer Absorptionskoeffizient}$  (in  $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $d = \text{Schichtdicke der Küvette}$  (1 cm),  $c = \text{Stoffmengenkonzentrationen}$  (mol/l)

Für eine NADH-Messung bei 340 nm kann für  $\epsilon = 6,22 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  eingesetzt werden. Es gilt dann:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E}{6,22} / \text{min (U / ml)} \quad (22)$$

Für die spezifische Aktivität (U / mg) gilt:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \text{Volumenaktivität} / \text{Enzymkonzentration} \quad (23)$$

Nach der Michaelis-Menten Kinetik nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ( $v$ ) mit steigender Substratkonzentration solange zu, bis sie einen Sättigungswert erreicht hat. Ein für ein Enzym wichtiger Wert ist der  $K_M$ -Wert, welcher die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit angibt. Da die Geschwindigkeit/Substrat-Kurve in der Regel einen hyperbolischen bzw. sigmoidalen Verlauf hat, kann man  $K_M$  durch eine Lineweaver-Burk Auftragung graphisch ermitteln.

4 ERGEBNISSE

4.1 Präzision von ORR-Messungen und der Einfluss von Scherkräften auf F-Aktin

4.1.1 Vergleich der mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter und dem ORR gemessenen Viskositäten newtonscher und nicht-newtonscher Flüssigkeiten

Zur Überprüfung der Funktionsweise des ORR wurden Viskositäten von Glycerin/Wasser-Gemischen (0-50 %) mit dem ORR und einem kommerziellen Mikro-Kugelfallviskosimeter gemessen und miteinander verglichen. Die Unterschiede der Viskositäten betragen nur  $\pm 0,04$  mPa s (Abb. 4-1). Mit zunehmender Glycerinkonzentration nimmt die Viskosität exponentiell zu, was typisch für amorphe Flüssigkeiten ist (vgl. Kap. 3.5). Vergleicht man Abb. 4-1 mit Abb. 3-7 wird die Temperaturabhängigkeit der Viskosität deutlich: die Viskosität von 50 % Glycerin ist bei 20 °C (Abb. 3-7) etwa 1,5-mal höher als bei 25 °C (Abb. 4-1).

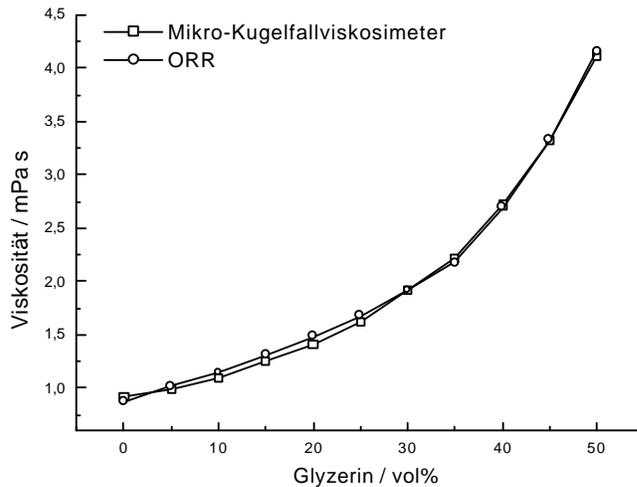


Abb. 4-1: Mit dem ORR und einem kommerziellen Mikro-Kugelfallviskosimeter gemessenen Viskositäten von Glycerin/Wasser-Gemischen (0-50 % Glycerin) bei 25 °C. Die Unterschiede betragen nur  $\pm 0,04$  mPa s. Aufgrund zunehmender Scherverzahnungen der Flüssigkeitsschichten steigt die Viskosität mit steigender Glycerin-Konzentration exponentiell an.

Vergleicht man die Viskositäten von F-Aktin (2-10  $\mu$ M), so fällt auf, dass die mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter gemessenen steady-state-Viskositäten und auch Elongationsraten etwa 1,5-mal niedriger sind als die mit dem ORR gemessenen (Abb. 4-2). Ursache sind die nur sehr geringen Scherkräfte, die das ORR erzeugt, denn die Schwingungsamplitude des Viskositätssensors liegt im Nanometerbereich (vgl. Abb. 4-3).

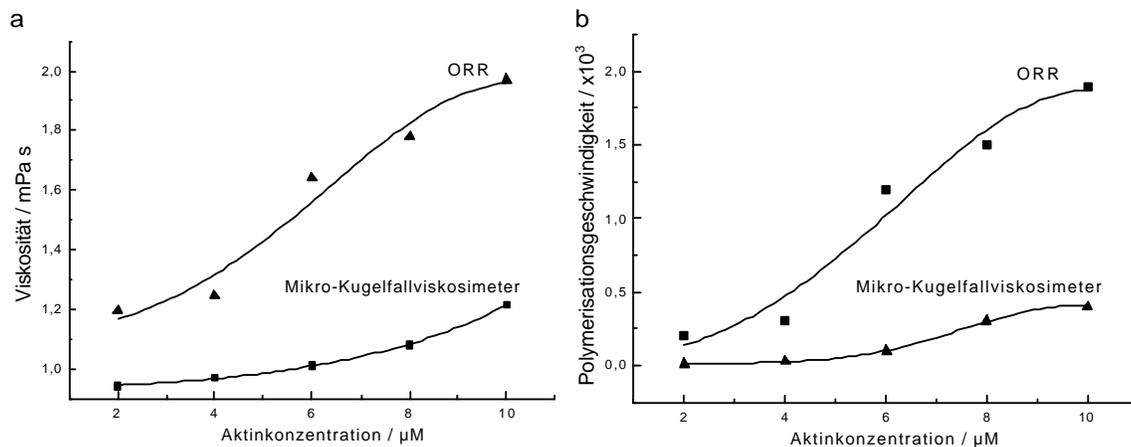
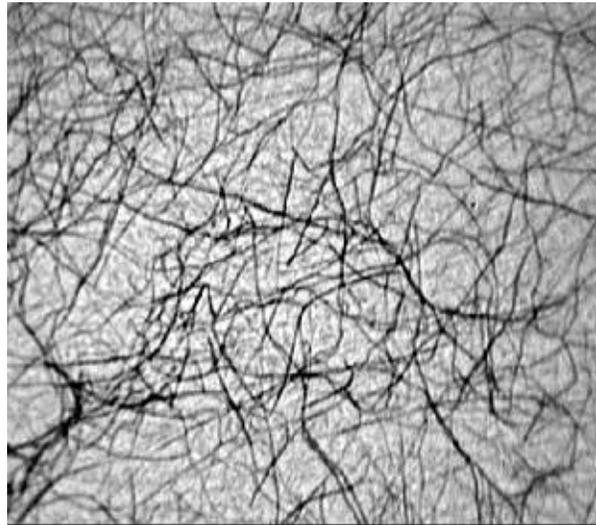


Abb. 4-2 a, b: Vergleich der (a) Viskositäten und (b) Polymerisationsgeschwindigkeiten von F-Aktin (2-10  $\mu$ M), die mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter (n) und dem ORR ( ) gemessen wurden. Die Unterschiede lassen sich auf

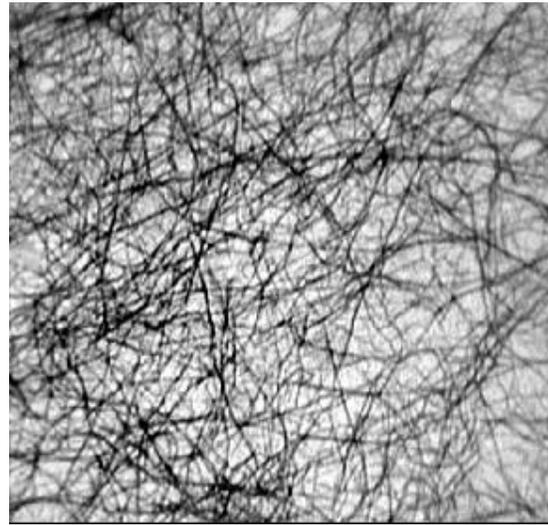
## ERGEBNISSE

hohe (Kugelfall) und geringe (ORR) Scherkräfte zurückführen. Die Polymerisationsraten wurden bestimmt durch die Berechnung der Steigung des linearen Viskositätsanstieges (entspricht der Elongationsphase) während der Polymerisation von Aktin. Die Symbole stellen Mittelwerte aus 2-4 Messungen dar. Der Gauss-Fit (durchgezogene Linie) zeigt einen annähernd sigmoidalen Kurvenverlauf. Die Standardabweichung von 6 unabhängig durchgeführten Messungen einer gleichen Aktinkonzentration ( $10 \mu\text{M}$ ) mit dem ORR betrug  $\pm 0,06 \text{ mPa s}$  (Daten nicht gezeigt). Die gemessenen Dichten betragen  $0,98 \text{ g/cm}^3 \pm 0,015 \text{ g/cm}^3$  (Daten nicht gezeigt).

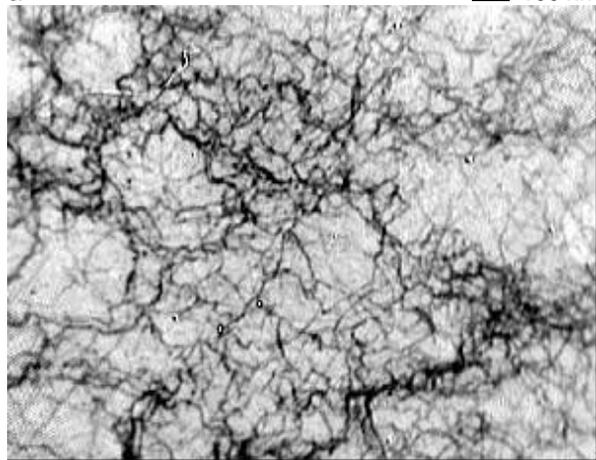
EM-Aufnahmen zeigen, dass nach Benutzung des Mikro-Kugelfallviskosimeter das sonst homogen-isotrope Aktinengeflecht (Tafel 4-1 a und b) in einen heterogen-anisotropen Zustand übergeht (Tafel 4-1 c und d). Die Kugel erzeugt deshalb hohe, das Aktinnetz deformierende, Scherkräfte.



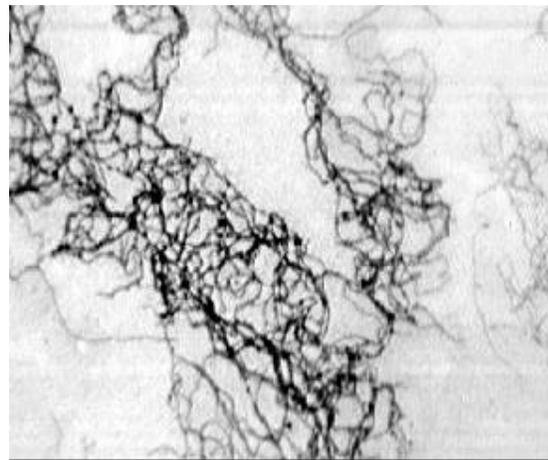
a 100 nm



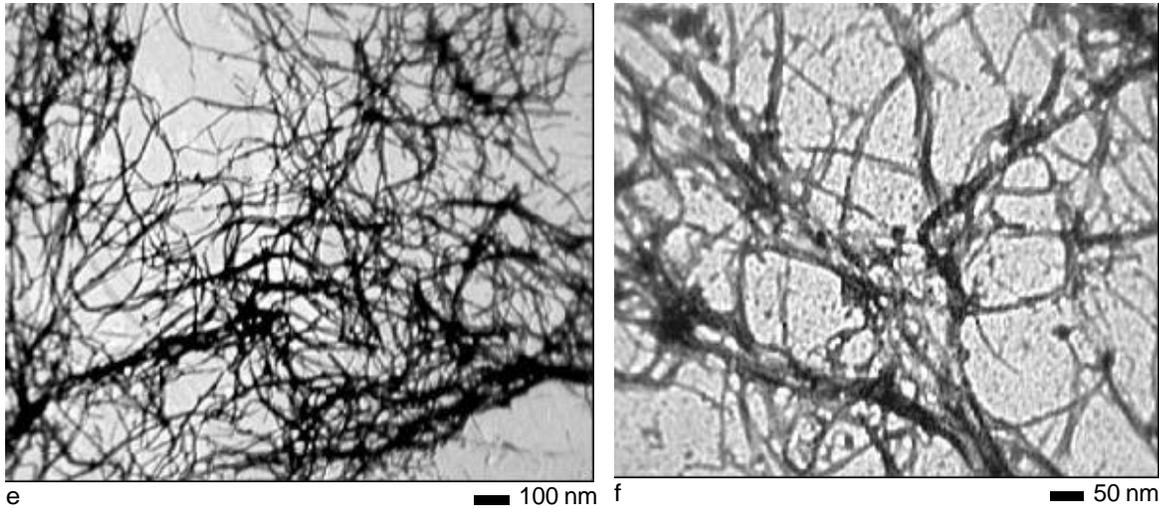
b 100 nm



c 100 nm



d 100 nm



Tafel 4-1 a-f: (a, b) EM-Aufnahmen von 5  $\mu\text{M}$  negativ gefärbtem Aktin, dessen Viskosität 20 Minuten im ORR gemessen wurde. (c, d) 5  $\mu\text{M}$  Aktin, dessen Viskosität 20 Minuten im Mikro-Kugelfallviskosimeter gemessen wurde. (e und f) 5  $\mu\text{M}$  Aktin mit 0,33  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Aktinin (molares Verhältnis Aktin:  $\alpha$ -Aktinin = 15:1).

#### 4.1.2 Einfluss von Scherkräften auf die Polymerisation von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, müssen die Scherkräfte so gering wie möglich gehalten werden, um präzise Viskositätsdaten zu erhalten. Mit dem ORR können auch bei Schwingungsamplituden  $< 1$  nm immer noch Viskositäten gemessen werden, wobei die Daten dann (messbedingt) leicht verrauschen (z.B. Viskosität in Abb. 4-3 a,  $> 1000$  Sekunden, oder b,  $> 2250$  Sekunden).

Während der Polymerisation von Aktin wird die Schwingungsamplitude der Glasfaser aufgrund der steigenden Viskosität der Flüssigkeit zunehmend gedämpft (etwa 0,12 nm/s pro 0,03 mPa s). Man kann die Schwingungsamplituden aber auch während der Messung durch Änderung der Spannung am Piezo zur Glasfaseranregung beliebig verändern. Ändert man demnach die Amplitude während der Polymerisation von 100  $\mu\text{M}$  Aktin manuell in 3 nm Schritten (z.B. von 1,5-29 nm, Abb. 4-3 a ab 1000 Sekunden), so verändert sich trotz höherer Scherkräfte die Viskosität der Lösung nicht (Abb. 4-3 a). Ebenso wird die Viskosität von 50  $\mu\text{M}$  F-Aktin auch bei impulsartiger Erhöhung der Amplitude von 20 nm auf 60 nm nicht beeinflusst (Abb. 4-3 b).

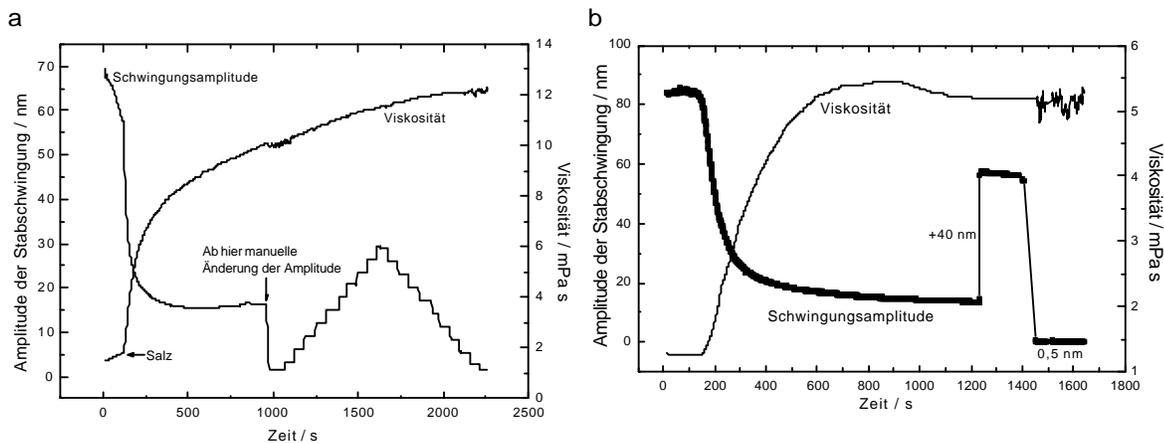


Abb. 4-3 a, b: Dynamische Viskosität und Schwingungsamplitude während der Polymerisation von (a) 100  $\mu\text{M}$  und (b) 50  $\mu\text{M}$  Aktin. (a) Die Online-Zugabe von 50 mM KCl und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  zur Polymerisationsinduktion ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Ein weiterer Pfeil zeigt den Zeitpunkt der manuellen Änderung der Schwingungsamplitude, welche zunächst auf 1,5 nm gesenkt und dann in 3 nm Schritten bis 29 nm erhöht wurde. Änderungen der Glasfaseramplitude in diesem Bereich beeinflussen die Viskositätsmessung nicht. (b) Die Salzzugabe erfolgte bei 80 Sekunden. Ab etwa 950 Sekunden nimmt die Viskosität (vermutlich aufgrund einer Umorientierung der Filamente) leicht ab. Dennoch wurde die Viskosität durch eine plötzliche Erhöhung des Hubes um 40 nm nicht weiter beeinflusst. Nach Absenkung der Amplitude auf 0,5 nm konnte die Viskosität - zwar mit einem verstärkten Rauschen - immer noch gemessen werden.

## ERGEBNISSE

Die Viskosität niedriger Aktinkonzentrationen ( $24 \mu\text{M}$ ) kann durch impulsartige Änderungen der Schwingungsamplitude um einige zehn Nanometer beeinflusst werden. Ein Beispiel ist in Abb. 4-4 (a) dargestellt: die Glasfaserauslenkung wird um  $34 \text{ nm}$  manuell erhöht (beginnend bei  $11 \text{ nm}$ ), was die Viskosität des Aktinbündels um  $56 \%$  reduziert. Umgekehrt erhöht eine sprunghafte Absenkung der Glasfaserauslenkung die Viskosität. Eine darauffolgende zyklische Erhöhung und Senkung der Schwingungsamplitude in  $65 \text{ nm}$  Schritten (Abb. 4-4 a,  $> 300 \text{ Sekunden}$ ) führt zu einer zyklischen Modulation der Viskosität, wobei sich das Ausmaß der Modulation (bei gleichbleibenden Scherkräften) mit der Zeit verringert.

Die Zugabe von  $1,6 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Aktinin zu  $24 \mu\text{M}$  Aktin (molares Verhältnis Aktin:  $\alpha$ -Aktinin =  $15:1$ ) erhöht die Viskosität um etwa das Zweifache (Abb. 4-4 b), was konsistent mit den Ergebnissen von z.B. Holmes et al. (1971) ist. Gleichzeitig wird die Schersteifigkeit durch Bündelung der Filamente (vgl. Tafel 4-1 e und f) erhöht, denn impulsartig-zyklische Änderungen der Glasfaserauslenkung in  $38 \text{ nm}$  Schritten ändert die Viskosität um nur  $8 \%$  (vgl. Abb. 4-4 a: ohne  $\alpha$ -Aktinin ändert sich die Viskosität bei  $34 \text{ nm}$  Sprüngen um  $56 \%$ ). Sehr niedrige Änderungen der Schwingungsamplitude (Abb. 4-4 b,  $> 100 \text{ Sekunden}$ ) führen auch hier zu einem verrauschten Messergebnis (vgl. Abb. 4-3).

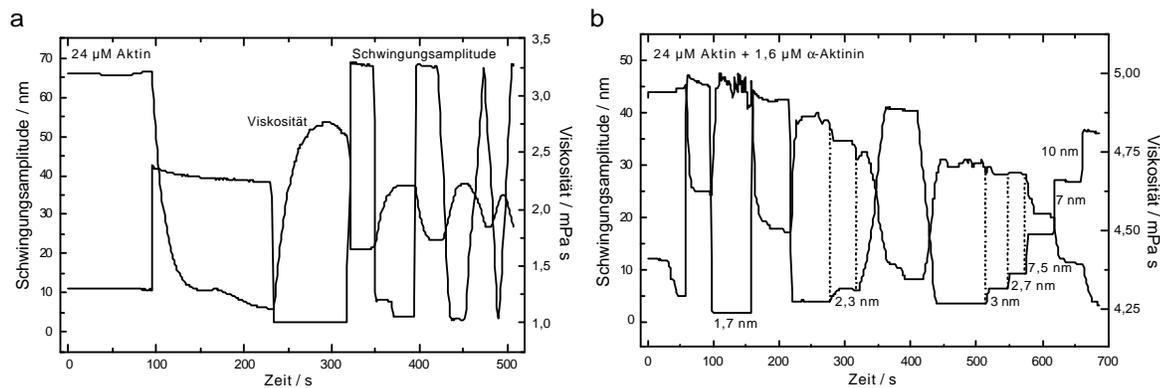


Abb. 4-4 a, b: Durch impulsartige Änderungen der Schwingungsamplitude modulierte Viskosität von (a)  $24 \mu\text{M}$  F-Aktin und (b)  $24 \mu\text{M}$  F-Aktin mit  $1,6 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Aktinin. (a) Eine Erhöhung der Schwingungsamplitude um  $35 \text{ nm}$  erniedrigt die Viskosität um  $56 \%$ . (b) Das Ausmaß der durch Scherkräfte induzierten Viskositätsänderungen kann durch die Zugabe von  $\alpha$ -Aktinin um das 7-fache reduziert werden.

Zum Vergleich wurde die Viskosität des Aktinpuffers als eine Funktion der Schwingungsamplitude gemessen (Abb. 4-5 a). Die Messung ergab, dass sich die Viskosität bei Auslenkungen von  $\pm 20 \text{ nm}$  um  $\pm 0,01 \text{ mPa s}$  änderte. Diese Schwankungen sind sehr gering und belaufen sich im Rahmen der Standardabweichung von  $\pm 0,005 \text{ mPa s}$  (vgl. 75-minütige Messung der Viskosität des Aktinpuffers: Abb. 4-5 b). Die Viskosität von Mikrotubulilösungen (mit und ohne MAPs) ( $25\text{-}75 \mu\text{M}$ ) konnte man durch manuelle Änderungen der Schwingungsamplitude nicht beeinflussen (Daten nicht gezeigt), was vermutlich mit der hohen Steifigkeit dieser Polymere zusammenhängt.

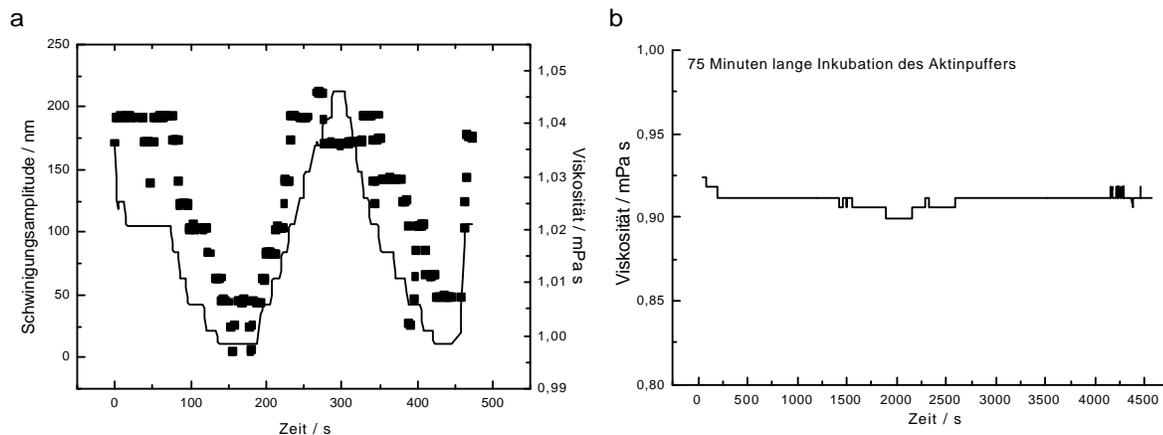


Abb. 4-5 a, b: (a) Viskosität des Aktinpuffers als eine Funktion der Schwingungsamplitude. Eine Hubänderung von  $\pm 20 \text{ nm}$  bewirkte eine Änderung des Messwertes von nur  $\pm 0,01 \text{ mPa s}$ . (b) Langzeitinkubation (75 Minuten) des Aktinpuffers im ORR: die Standardabweichung der Viskosität beträgt nur  $\pm 0,005 \text{ mPa s}$ .

#### 4.1.3 Frequenzabhängige Änderungen der Elastizität von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin

Mit dem ORR wird die Elastizität der Flüssigkeit im Bereich des Konus der Ultraschalllinse bestimmt, also im Bereich zwischen Glasfaser und Linsenöffnung (vgl. Abb. 3-1). EM-Aufnahmen von polymerisiertem Aktin, das keinen äußeren Scherkräften ausgesetzt wurde, zeigen eine homogene Verteilung der Filamente (Tafel 4-1 a und b). Daher wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die im Konus der Ultraschalllinse bestimmte Elastizität repräsentativ für die Elastizität der gesamten Flüssigkeit ist.

Die Elastizität nicht-newtonscher Flüssigkeiten steht in enger Beziehung zur Deformationsrate des Gels (vgl. Kap. 2.3.2). Deshalb soll die Elastizität von Aktin mit und ohne „versteifendem“  $\alpha$ -Aktinin als Funktion der Frequenz der Glasfaserauslenkung bestimmt werden. Nach Abb. 3-6 beträgt die Eindringtiefe der Scherwelle für 5-60 % Glycerin (entspricht nach Abb. 3-7 1-8 mPa s) 200-600  $\mu$ m. Bei einem Arbeitsabstand der Linse von 50  $\mu$ m sollten sich folglich Deformationen der Flüssigkeit (im Konus der Ultraschalllinse) durch die mit der Glasfaser erzeugten Viskositätsscherwellen noch ausreichend bemerkbar machen. Abb. 4-6 zeigt, dass die Elastizität von F-Aktin mit  $\alpha$ -Aktinin (molares Verhältnis 15:1) in einem Bereich von 0,05-33 kHz frequenzabhängig war, wohingegen die Elastizität von Aktin ohne  $\alpha$ -Aktinin der zunehmenden Deformationsfrequenz nicht folgte. F-Aktin kann demnach zusammen mit  $\alpha$ -Aktinin mechanische Energie speichern, während Aktin alleine eher dissipative Eigenschaften hat (vgl. Kap. 2.3.2).

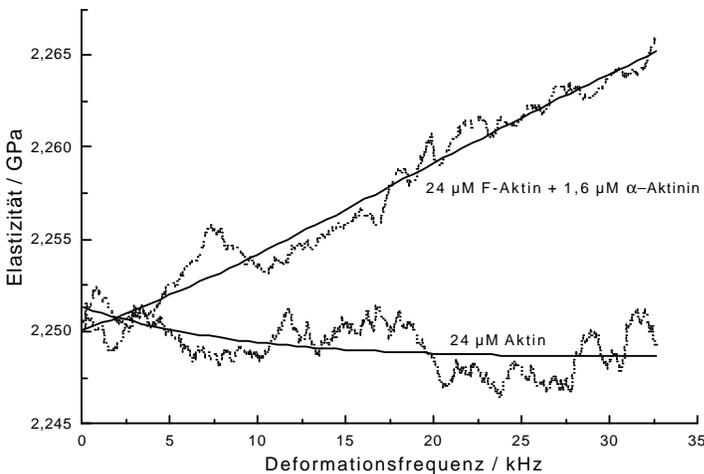


Abb. 4-6: Elastizität von 24  $\mu$ M F-Aktin mit und ohne 1,6  $\mu$ M  $\alpha$ -Aktinin (30 Minuten Inkubationszeit) als eine Funktion der Deformationsfrequenz (0,05-33 kHz) bei einer mittleren Schwingungsamplitude von 15 nm (Daten nicht gezeigt). Die durchgezogenen Linien zeigen den besten Fit der Kurven. Obwohl die Kurven aus 2 (Aktin) bis 4 (Aktin/ $\alpha$ -Aktinin) Messungen gemittelt wurden, schwanken die ermittelten Daten wegen ungenauer Temperierung der Probe. Dennoch ist eine Frequenzabhängigkeit der Elastizität des Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gels im Vergleich zu Aktin alleine evident. Die Frequenz wurde (computergesteuert) sekundlich um 15 Hz erhöht.

Für diese Art der Elastizitätsbestimmung muss man den Regelkreis zur Einstellung der Resonanzfrequenz der Glasfaser ausschalten, denn die Oszillationsfrequenz der Glasfaser soll anschließend beliebig variiert werden (z.B. von 0,05-33 kHz). Da zur Viskositätsbestimmung dagegen die Resonanzfrequenz der Glasfaser benötigt wird (Kap. 3.4.1), muss hier auf die Viskositätsbestimmung verzichtet werden.

#### 4.2 Viskoelastizität von polymerisierendem Muskelaktin und Tubulin

Das vorherige Kapitel hat gezeigt, dass ORR-Messungen nicht-destruktiv sind und Messungen elastischer Eigenschaften von Aktin erlauben. Eine weitere Besonderheit des ORR besteht in der synchronen Bestimmung der Viskosität und der Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von Aktin und Tubulin. Während der Messung können ferner weitere Substanzen (erschütterungsfrei) zu der Probe hinzugefügt werden. Daher beginnen ORR-Messungen mit der G-Aktinlösung, wobei nach einem definierten Zeitpunkt die Polymerisationssalze zugegeben werden. Demzufolge kann man auch die genaue Dauer der Lag-Phase der Polymerisation bestimmen (Abb. 4-7).

## ERGEBNISSE

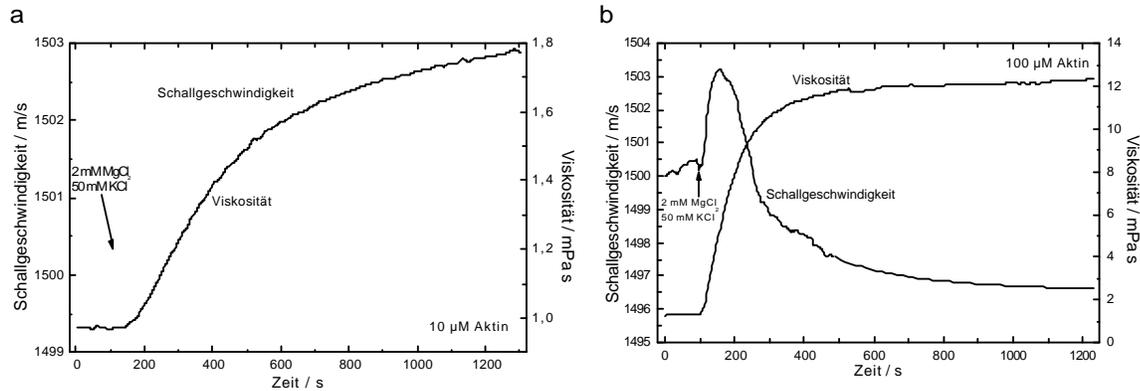


Abb. 4-7 a, b: Dynamische Viskosität und Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von (a) 10  $\mu\text{M}$  Aktin und (b) 100  $\mu\text{M}$  Aktin. Die Erhöhung der Schallgeschwindigkeit vor der Salzzugabe ist auf die Erwärmung der kalten G-Aktinlösung zurückzuführen. Der Anstieg der Schallgeschwindigkeit nach der Salzzugabe betrug etwa 2 m/s für 10  $\mu\text{M}$  Aktin und 3 m/s für 100  $\mu\text{M}$  Aktin. Während der Polymerisation von (a) 10  $\mu\text{M}$  Aktin steigt die Schallgeschwindigkeit nur gering an (0,5 m/s). Dagegen ist bei (b) 100  $\mu\text{M}$  Aktin ein deutlicher Abfall zu verzeichnen. Die Messungen zeigen typische Verläufe von 5 (10  $\mu\text{M}$  Aktin) bzw. 3 (100  $\mu\text{M}$  Aktin) voneinander unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichungen der Viskosität und der Schallgeschwindigkeit betragen für 10  $\mu\text{M}$  Aktin 3% und für 100  $\mu\text{M}$  Aktin 5%.

Die Änderung der Schallgeschwindigkeit vor der Salzzugabe ist auf die Erwärmung der kalten G-Aktinlösung zurückzuführen. Der Anstieg der Schallgeschwindigkeit nach der Salzzugabe resultiert einerseits aus der Salzzugabe und andererseits aus der Bildung elastischer Aktin-Nuklei, die sich erst später zu semi-flexiblen Filamenten zusammenschließen. Das Salz alleine erhöht die Schallgeschwindigkeit des Aktinpuffers um etwa 1,5 m/s (Daten nicht gezeigt). Der Anteil der Schallgeschwindigkeitserhöhung während der Bildung der Aktin-Nuklei beträgt demnach etwa 0,5 m/s für 10  $\mu\text{M}$  Aktin (Abb. 4-7 a) und etwa 1,5 m/s für 100  $\mu\text{M}$  Aktin (Abb. 4-7 b).

Nach der Elongationsphase der Aktinpolymerisation, welche dem schnellen Viskositätsanstieg entspricht (vgl. z.B. Cooper und Pollard, 1982), erfolgt eine zweite Phase der Schallgeschwindigkeitsänderung. Hier kann sich die Kompressibilität der Lösung aufgrund zunehmender Hydratisierung der Proteine ändern (s.u. Kap. 5.4). Daher variiert die Schallgeschwindigkeit für geringe Proteinlösungen nur kaum (Abb. 4-7 a), wohingegen höher konzentrierte Proteinlösungen „komprimierbarer“ werden, was sich in einer Schallgeschwindigkeitsabnahme niederschlägt (Abb. 4-7 b).

Eine biphasische Modulation der Schallgeschwindigkeit wurde auch während der Polymerisation von Tubulin beobachtet (Abb. 4-8). Die Polymerisation von PC-Tubulin wurde durch die Zugabe von 5 % DMSO vor der Messung und durch Erwärmung der Lösung von 4 °C auf 37 °C induziert.

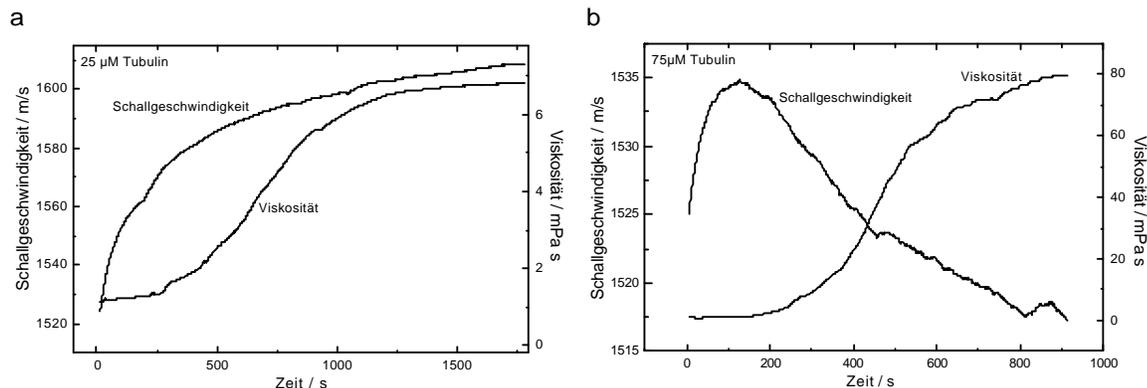


Abb. 4-8 a, b: Änderung der dynamischen Viskosität und der Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von (a) 25  $\mu\text{M}$  Tubulin und (b) 75  $\mu\text{M}$  Tubulin. (a) Während der Polymerisation von 25  $\mu\text{M}$  Tubulin (induziert durch Erwärmung der Lösung und Zugabe von 5 % DMSO vor der Messung), steigt die Schallgeschwindigkeit um 70 m/s an. (b) Für höhere Proteinkonzentrationen nimmt die Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von Tubulin ab.

Noch vor einer messbaren Viskositätserhöhung kommt es zu einem sehr deutlichen Anstieg der Schallgeschwindigkeit. Die Vermutung liegt nahe, dass ein Teil der anfänglichen Schallgeschwindigkeitserhöhung

hung durch die Erwärmung der Lösung erfolgt. Daher wurde die Schallgeschwindigkeit während der Erwärmung des eiskalten Tubulinpuffers auf 37 °C bestimmt und mit der Erhöhung der Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von 10 µM Tubulin verglichen (Abb. 4-9).

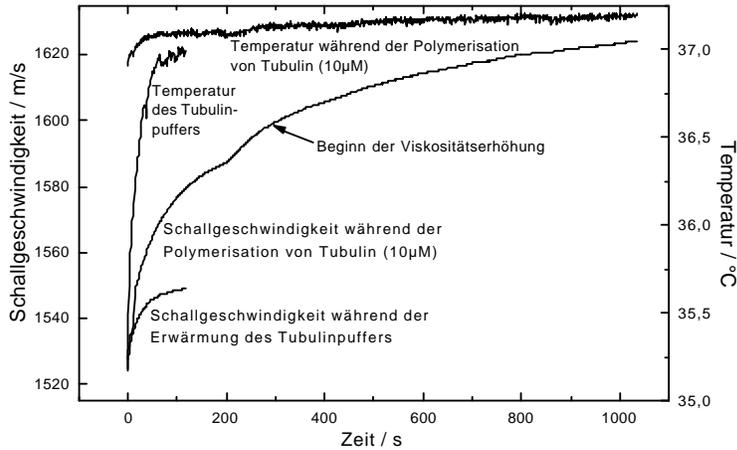


Abb. 4-9: Temperatur- und Schallgeschwindigkeitsverlauf während der Erwärmung (0-37 °C) von Tubulinpuffer und 10 µM Tubulin. Innerhalb weniger Sekunden (etwa 30-50 Sekunden) erreichen die Lösungen ihre Soll-Temperatur (37 °C). Im Vergleich zur Schallgeschwindigkeitserhöhung während der Polymerisation von 10 µM Tubulin (60 m/s) ist die Schallgeschwindigkeitserhöhung während der Erwärmung des Tubulinpuffers (6 m/s) nur gering. Die Schallgeschwindigkeit von Wasser bei 37 °C beträgt 1524 m/s (vgl. Weast, 1971). Die Grafik zeigt charakteristische Kurven von je 5 gleichen Versuchsansätzen.

Nach Abb. 4-9 ist die Schallgeschwindigkeitserhöhung während der Polymerisation von Tubulin etwa um das 10-fache höher als die Schallgeschwindigkeitserhöhung während der Erwärmung des Puffers. Die Schallgeschwindigkeit des Puffers steigt pro °C um etwa 0,2 m/s an, was 10-mal niedriger ist als der von Kroeber und Mart (1976) bestimmte Schallgeschwindigkeitsanstieg für Wasser von 2 m/s pro °C und auf die Immobilisation des Wassers durch Hydrathüllenbildung zurückzuführen ist.

Abb. 4-10 zeigt zusammenfassend die steady-state-Viskosität bzw. -Elastizität verschieden hoch konzentrierter F-Aktin- und Mikrotubuli-Suspensionen. Für 2-100 µM F-Aktin wurde eine Viskosität von 1,3-9,4 mPa s und ein Elastizitätsmodul von 2,229-2,254 GPa bestimmt, für 10-100 µM Mikrotubuli eine Viskosität von 1,5-124 mPa s und ein Elastizitätsmodul von 2,288-2,547 GPa.

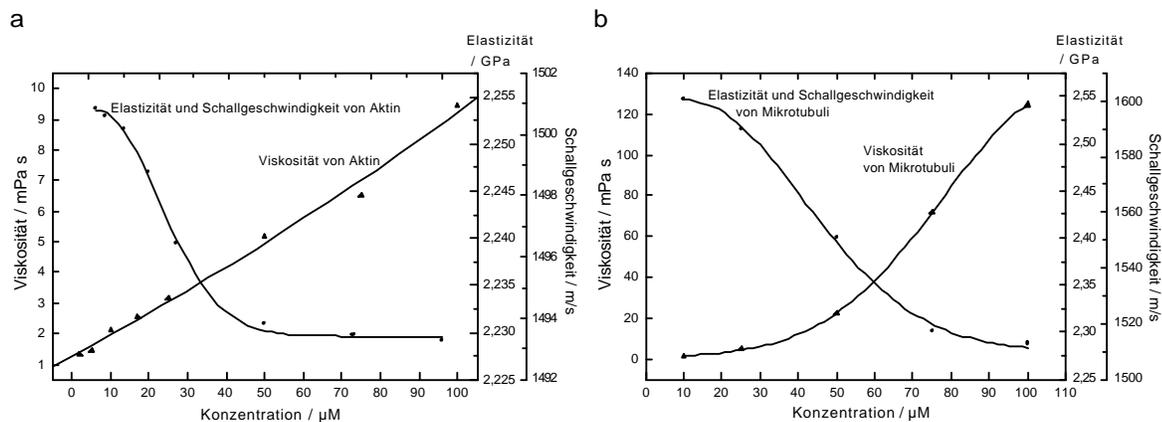


Abb. 4-10 a, b: Viskoelastizität von (a) F-Aktin- und (b) Mikrotubuligelten. Viskosität = ( ), Elastizität und Schallgeschwindigkeit = ( ). F-Aktinlösungen wurden bei 25 °C und Mikrotubulilösungen bei 37 °C gemessen. Die durch die Salzzugabe bedingte Schallgeschwindigkeitserhöhung von 1,5 m/s wurde von den Elastizitätswerten von Aktin abgezogen. Ebenso wurde die durch die Erwärmung des Tubulinpuffers bedingte Schallgeschwindigkeitserhöhung von 0,2 m/s pro °C von den Elastizitätswerten der Mikrotubuli abgezogen. Die Symbole repräsentieren den mittleren Durchschnitt aus 2-5 Messungen.

Während der Polymerisation niedrig molarer Aktinkonzentrationen (2 µM) wurde eine Schallgeschwindigkeitserhöhung bis zu 1,3 m/s - abzüglich der Schallgeschwindigkeit des Salzes von 1,5 m/s - ( 1,69 kPa) und von höher molaren (100 µM) eine Schallgeschwindigkeitsabnahme von 7 m/s ( 49

## ERGEBNISSE

kPa) gemessen. Während der Polymerisation von Tubulin (10-100  $\mu\text{M}$ ) moduliert die Schallgeschwindigkeit von +48 bis -12 m/s (abzüglich der Schallgeschwindigkeitszunahme während der Erwärmung des Puffers), was einem Elastizitätsmodul von 2,3-0,1 MPa entspricht.

Der konzentrationsabhängige Verlauf der Elastizität nähert sich für beide Zytoskelettelemente einem Minimalwert an (Abb. 4-10). Ein Überschreiten dieser spezifischen Proteinkonzentration kann den Aggregatzustand der Filamentnetzwerke demnach nicht mehr verändern. Daher ist die konzentrationsbedingte Elastizitätsabnahme eine Funktion der Packungsdichte der Filamente, die auf eine nematische Phasentransition von flüssig zu flüssig-kristallin deutet. Diese Phasentransition erfolgt bei F-Aktin zwischen 8 und 50  $\mu\text{M}$  und bei Mikrotubuli zwischen 25 und 85  $\mu\text{M}$  (Abb. 4-10).

Die konzentrationsbedingte Abnahme der Elastizität ist lediglich eine Funktion der filamentösen Form der Proteine. Dies wird im Hinblick auf die sich nur gering verändernde Viskoelastizität vor der Polymerisation (s. Abb. 4-7 und Abb. 4-8) deutlich. Daher kann man sogenannte Proteinkonzentrationseffekte ausschließen.

### 4.2.1 Einfluss von Taxol, MAPs, Colchizin und Kalzium auf die Viskoelastizität von Mikrotubuli

Wie oben gezeigt, kommt es während der Polymerisation von Aktin und Tubulin noch vor einer wahrnehmbaren Viskositätssteigerung zur Ausbildung festkörperähnlicher Strukturen, welche den Schall besonders schnell leiten. Im Falle von Tubulin können diese Strukturen polymorphe Tubulin-Oligomere, wie z.B. Ringstrukturen, Spiralen oder plane Wälle aus Protofilamenten sein, wie sie Unger et al. (1990) in der frühen Phase der Polymerisation anhand einer detaillierten EM-Studie gezeigt haben. Dass diese Nuklei *de facto* den starken Schallgeschwindigkeitsanstieg bedingen, kann man überprüfen, indem die Bildung von Tubulin-Oligomeren aus Tubulin-Heterodimeren durch Zugabe von Taxol zu Tubulin unter ungünstigen Polymerisationsbedingungen gefördert wird. Abb. 4-11 zeigt, dass geringe Konzentrationen von PC-Tubulin (z.B. 15  $\mu\text{M}$ ) bei 25 °C und ohne die Zugabe von 5 % DMSO kaum polymerisieren. Zwar steigt die Schallgeschwindigkeit innerhalb von 20 Minuten um 6 m/s an, jedoch kann man durch die Taxolzugabe eine weitere Schallgeschwindigkeitserhöhung um etwa das Doppelte (12 m/s) innerhalb von 5 Minuten einleiten.

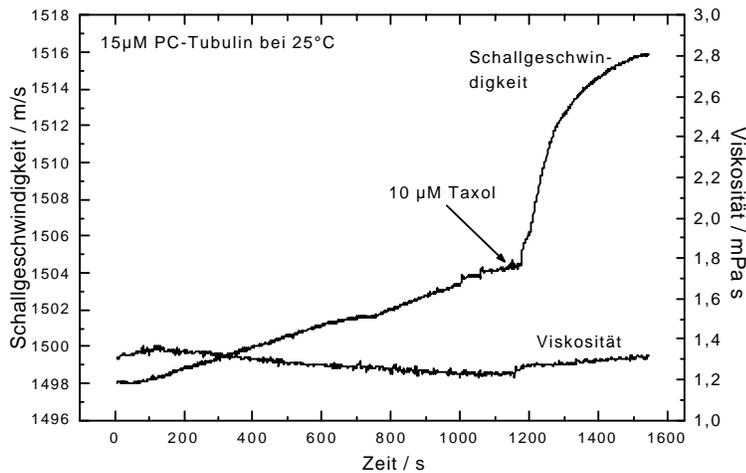


Abb. 4-11: Schallgeschwindigkeitserhöhung während der Inkubation geringer Tubulinkonzentrationen bei 25 °C (ohne DMSO) vor und nach der Zugabe von Taxol.

Der geringe Schallgeschwindigkeitsanstieg vor der Taxolzugabe verweist auf die spontanen Formationen weniger Tubulin-Oligomere.

ORR-Messungen sollten ferner Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Viskoelastizität von Mikrotubuli ohne MAPs (Abb. 4-8, Abb. 4-10 b) von Mikrotubuli mit assoziierten MAPs (mikrotubuläres Protein, MTP) unterscheidet. Abb. 4-12 zeigt, dass sich die Viskosität nach der Zugabe von GTP (1 mM) während der Inkubation geringer MTP-Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) bei 37 °C kaum verändert, während die Schallgeschwindigkeit bereits deutlich ansteigt. Mit steigenden MTP-Konzentrationen nimmt die steady-state-Schallgeschwindigkeit - wie für Aktin und MAP-freien Mikrotubuli gezeigt - ab. Die Viskosität ist im Vergleich zu Aktin (bei gleichen Proteinkonzentrationen) ungefähr doppelt so hoch und im Vergleich zu PC-Tubulin ungefähr dreimal niedriger. Die Elastizität ist im Vergleich zu F-Aktin durchschnittlich nur 4 % höher und 3 % niedriger im Vergleich zu MAP-freien Mikrotubuli (vgl. Abb. 4-10).

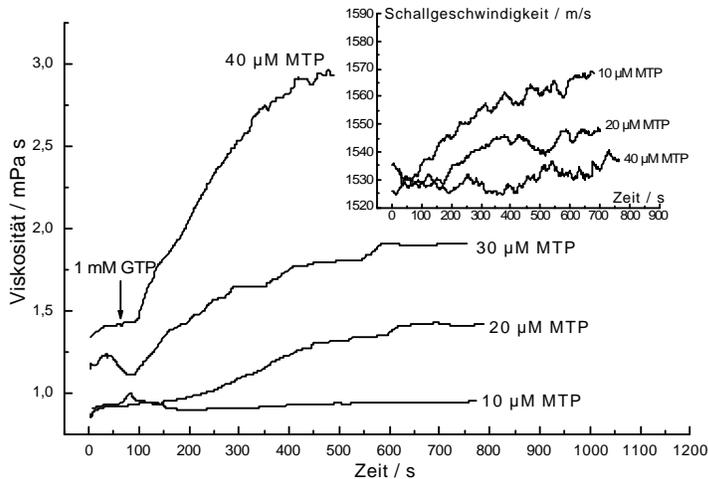


Abb. 4-12: Zeitliche Änderung der Viskoelastizität von polymerisierendem mikrotubulärem Protein (Tubulin mit etwa 20 % MAPs). Die Polymerisation wurde durch die Online-Zugabe von 1 mM GTP bei 37 °C induziert. Geringe Konzentrationen von MTP erhöhen die Viskosität der Lösung nicht, wohingegen die Schallgeschwindigkeit deutlich ansteigt. Die Viskositäten von Mikrotubuli aus mikrotubulärem Protein sind etwa dreimal niedriger als die Viskositäten von Mikrotubuli aus PC-Tubulin (vgl. Abb. 4-10). Die Schallgeschwindigkeit fällt mit zunehmenden MTP-Konzentrationen.

Die Zugabe von Kalzium und Colchizin senkt die Viskosität von Mikrotubuli aus mikrotubulärem Protein (Abb. 4-13). Colchizin depolymerisiert Mikrotubuli nicht vollständig, sondern zu Protofilamenten, Spiralen und anderen alternierenden amorphen Aggregaten. Kalzium depolymerisiert Mikrotubuli dagegen nahezu vollständig in die einzelnen Heterodimere (Saltarelli und Pantaloni, 1982). Dass sich die Schallgeschwindigkeit nach der Zugabe von Kalzium und Colchizin nicht verändert, zeigt, dass bereits die Tubulin-Heterodimere bzw. die Tubulin-Oligomere (und nicht die Mikrotubuli alleine) primär die Rigidität dieser Flüssigkeiten bedingen.

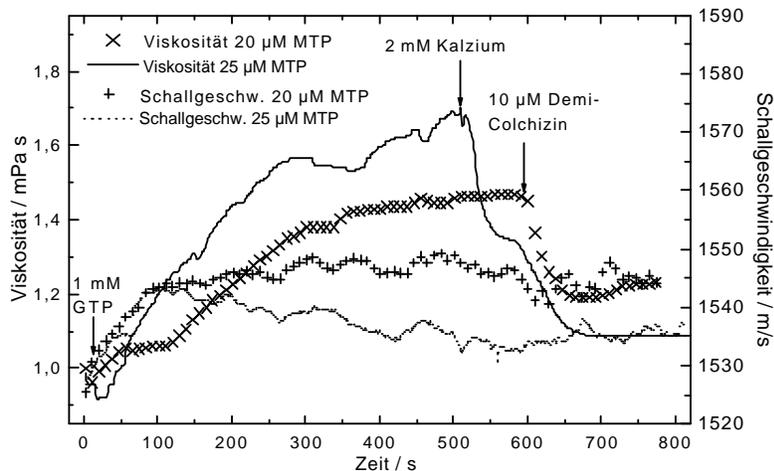


Abb. 4-13: Einfluss von Colchizin und Kalzium auf die Viskoelastizität von Mikrotubuli aus mikrotubulärem Protein. In beiden Fällen nimmt die Viskosität, aber nicht die Elastizität ab. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass primär die aus Tubulin gebildeten Oligomere (und weniger die Mikrotubuli als solche) die elastischen Eigenschaften dieser Gele bedingen.

#### 4.2.2 Einfluss von Cytochalasin D und Phalloidin auf die Viskoelastizität von Aktin

Durch die Zugabe von Substanzen, welche die Polymerisation von Tubulin beeinflussen, konnte im vorangegangenen Kapitel nachgewiesen werden, dass die Elastizität von Mikrotubuligelen durch die intrinsische Elastizität der Tubulin-Oligomere dominiert wird. Auch der Einfluss von Cytochalasin D und Phalloidin könnte Aufschluss über die Entstehung des biphasischen Elastizitätsverlaufes während der Polymerisation von Aktin geben.

## ERGEBNISSE

Der Einfluss von Cytochalasin D auf die Polymerisation von Aktin wurde zunächst in einem Vorversuch mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter bestimmt (Abb. 4-14 a, b) und anschließend Messungen mit dem ORR durchgeführt (Abb. 4-14 c). Da die Viskosität von Aktin eine Funktion der Filamentlängen ist (vgl. z.B. Janmey et al., 1994) und Cytochalasin D die Aktinfilamente „schneidet“ (s. Kap. 2.3.3.1.1 und Tafel 4-2), nimmt die Viskosität mit steigender Cytochalasin D-Konzentration ab (Abb. 4-14 a). Gleichzeitig wirkt Cytochalasin D als Nukleator und beschleunigt die Polymerisation (Abb. 4-14 c). Dieser Effekt konnte nur mit dem ORR beobachtet werden (vgl. Abb. 4-14 b und c), denn die Polymerisationssalze können beim Mikro-Kugelfallviskosimeter nicht während der Messung zugegeben, d.h. die Messung kann erst nach dem Mischen der Substanzen begonnen werden.

Auch fällt bei den Kugelfallmessungen nach Erreichen der steady-state-Viskosität die Zähigkeit der Flüssigkeit aufgrund zunehmender Scherkräfte, welche das Aktinnetz deformieren und wodurch Filamente gebrochen werden, ab. Für niedrige Aktinkonzentrationen (Daten nicht gezeigt) oder in Anwesenheit hoher Cytochalasin D-Konzentrationen und höheren Aktinkonzentrationen (Abb. 4-14 b, Aktin:CD = 10:1), ist diese Scherkraft-induzierte Abnahme nicht zu sehen. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass der Einfluss der Kugel auf das Aktinnetzwerk dann am höchsten ist, wenn die Filamente am längsten und demnach ausreichend vernetzt sind.

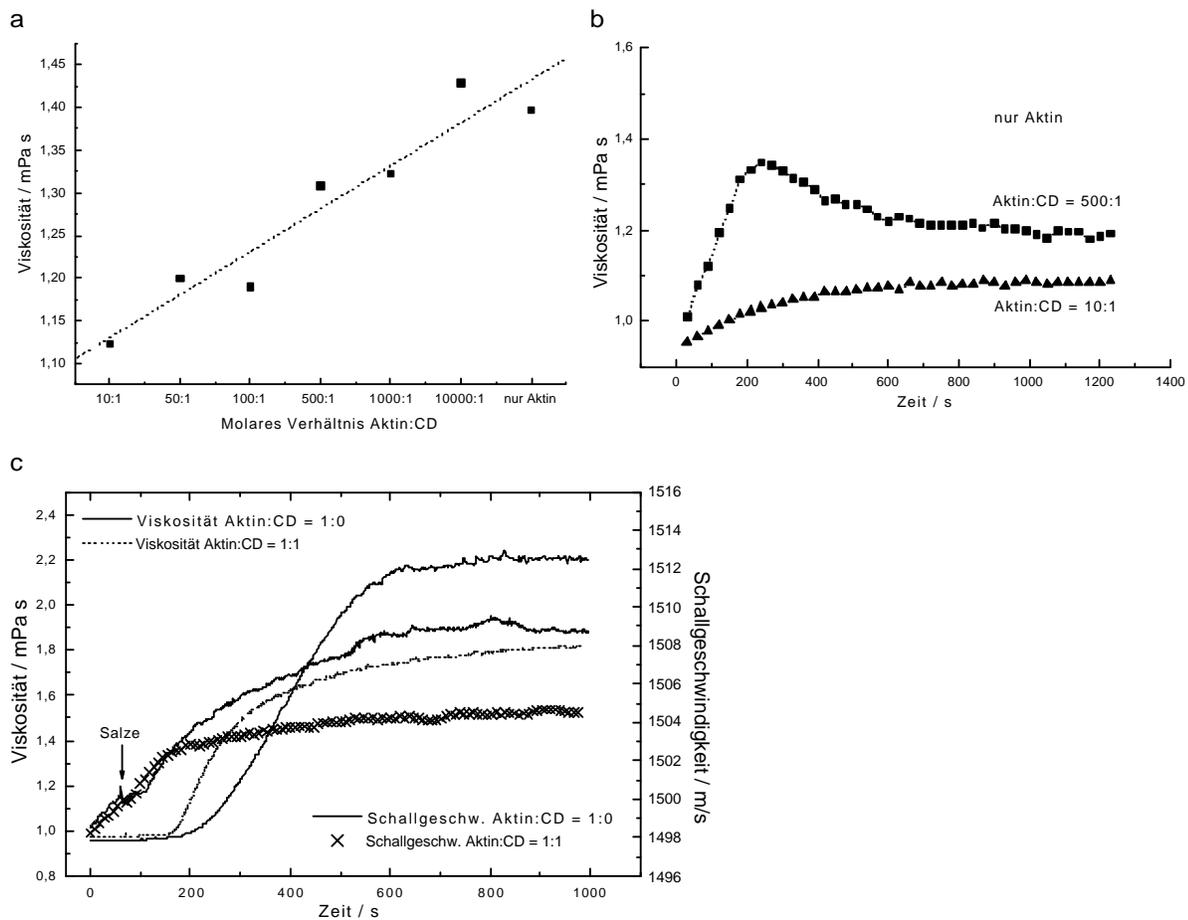


Abb. 4-14 a-c: Einfluss von Cytochalasin D auf die Viskosität und Elastizität von F-Aktin. (a, b) Viskositätsbestimmungen mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter, (c) viskoelastische Messungen mit dem ORR. (a) Steady-state-Viskosität von F-Aktin mit verschiedenen Cytochalasin D-Konzentrationen (gemittelt aus je 3 Messungen). (b) Einzelmessungen von polymerisierendem Aktin mit und ohne Cytochalasin D. (c) ORR-Messungen zeigen, dass Cytochalasin D (10  $\mu$ M) die Polymerisation von Aktin beschleunigt und die Lag-Phase verkürzt.

Der Einfluss von Cytochalasin D auf die Viskosität von Aktin unterscheidet sich dennoch von dem Zugabezeitpunkt: polymerisiert Aktin zusammen mit Cytochalasin D, so ist die Viskositätsabnahme, wie oben gezeigt, im Vergleich zu unbehandeltem Aktin deutlich verringert. Gibt man hingegen Cytochalasin D (18  $\mu$ M) zu bereits polymerisiertem Aktin (18  $\mu$ M), nimmt die Viskosität nur geringfügig, die Elastizität aber deutlich ab (Abb. 4-15 a). Diese Elastizitätsabnahme hängt von der Cytochalasin D-Konzentration (Abb.

4-15 b) ab. (Vor der Cytochalasin D Zugabe nimmt die Schallgeschwindigkeit aufgrund der erhöhten Kompressibilität für Aktinkonzentrationen ca. >15  $\mu\text{M}$  ab).

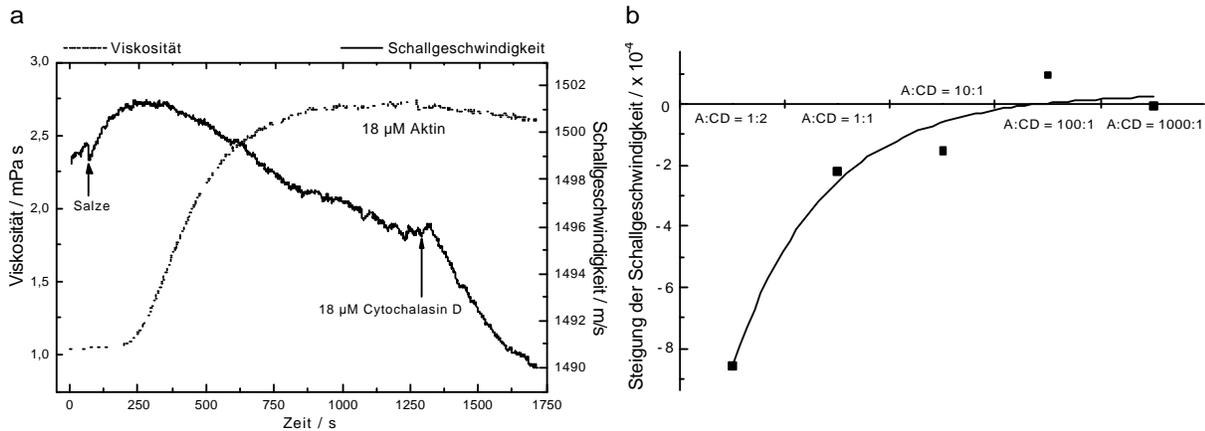
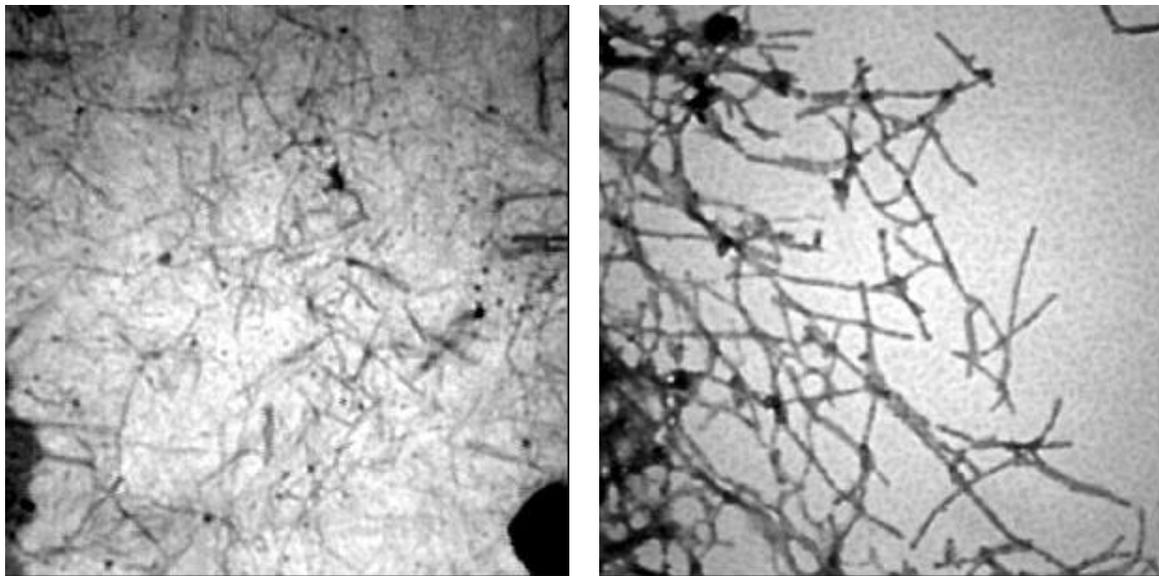


Abb. 4-15 a, b: Einfluss von Cytochalasin D auf die Viskoelastizität von polymerisiertem Aktin. (a) Die Viskositätsabnahme nach der Zugabe von Cytochalasin D zu bereits polymerisiertem Aktin ist nur gering. Der anfängliche Abfall der Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von Aktin ist auf die konzentrationsbedingte Senkung des Kompressionsmoduls zurückzuführen. Nach der Zugabe von Cytochalasin D (Aktin:CD = 1:1) ist diese Abnahme jedoch stärker. Die Steigungen dieser Elastizitätsabnahme nach der Zugabe verschiedener Cytochalasin D-Konzentrationen (zu 18  $\mu\text{M}$  F-Aktin) sind in (b) dargestellt.



Tafel 4-2 a, b: EM-Aufnahmen von negativ gefärbtem Aktin (5  $\mu\text{M}$ ) mit (a) 5  $\mu\text{M}$  und (b) 0,05  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D. Die Filamente sind deutlich kürzer als für unbehandeltes Aktin gezeigt (vgl. Tafel 4-1 a, b).

Phalloidin (5  $\mu\text{M}$ ) erhöhte sehr deutlich die Polymerisationsgeschwindigkeit und die steady-state-Viskosität von 10  $\mu\text{M}$  Aktin (Abb. 4-16 a; vgl. z.B. Abb. 4-7 a oder Abb. 4-17 „Muskelaktin“). Die Elastizität hingegen fiel (bei gleichbleibender Viskosität) deutlich ab, was, neben der verminderten Steifheit, EM-Aufnahmen zufolge auch auf die Entstehung kurzer Filamente zurückzuführen ist (Abb. 4-16 b). Da die Viskosität eine Funktion der Filamentlänge ist (Abb. 4-14), wäre jedoch zu erwarten, dass die Viskosität nach der Entstehung kurzer Filamente abfällt. Abb. 4-16 b zeigt gleichwohl, dass neben kurzen Filamenten auch lange Filamente gegenwärtig sind, die die stabile Viskosität bedingen. Diese Inhomogenität der Filamentlängenverteilung ist für Cytochalasin D behandeltes Aktin nicht evident (Tafel 4-2), was sich auch in einem leichten Viskositätsabfall niederschlägt (Abb. 4-15 a).

## ERGEBNISSE

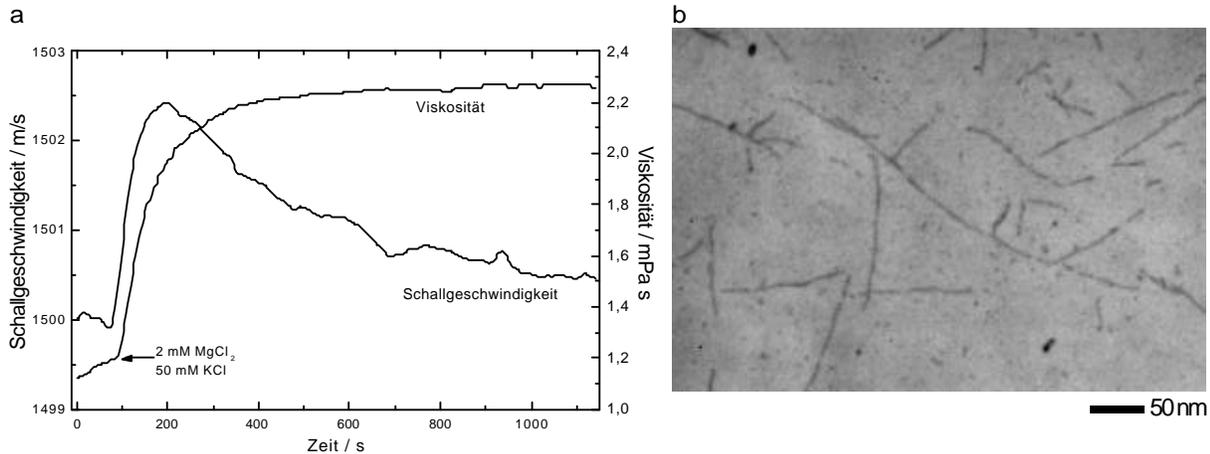


Abb. 4-16 a, b: (a) Zeitlicher Verlauf der Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von 10  $\mu\text{M}$  Aktin mit 5  $\mu\text{M}$  Phalloidin. Die Polymerisationsgeschwindigkeit und das Ausmaß der Viskosität sind im Vergleich zu Aktin ohne Phalloidin erhöht (vgl. Abb. 4-7 a). (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  Aktin mit 2,5  $\mu\text{M}$  Phalloidin. Die kurzen Filamente bedingen möglicherweise den in (a) gemessenen Elastizitätsverlust kurz vor dem Erreichen der steady-state-Viskosität. Das gleichzeitige Vorhandensein längerer Filamente bedingt eine stabile Viskosität.

### 4.3 Viskoelastizität von Nicht-Muskelaktin mit und ohne Profilin

Die ersten beiden Kapitel des Ergebnisteils haben gezeigt, dass sich die Viskoelastizität von Aktin- und Mikrotubuligelen unterscheidet und durch bindende Proteine, wie  $\alpha$ -Aktinin und MAPs, modulierbar ist. Neben quervernetzenden Proteinen dominieren in der Zelle vor allem G-Aktin-bindende Proteine, die das G/F-Verhältnis kontrollieren (vgl. Kap. 2.3.3.2). Profilin ist ein ubiquitäres, G-Aktin-bindendes Protein in Nicht-Muskelzellen (Kap. 2.3.3.2.1). Sein natürlicher Bindungspartner ist das Nicht-Muskelaktin ( $\beta\gamma$ -Aktin). ORR-Messungen sollten zunächst zeigen, ob sich Muskelaktin ( $\alpha$ -Aktin) mechanisch von Nicht-Muskelaktin unterscheidet. Abb. 4-17 zeigt, dass sowohl die steady-state Viskosität und die Polymerisationsgeschwindigkeit als auch die Elastizität von  $\beta\gamma$ -Aktin im Vergleich zu  $\alpha$ -Aktin erhöht sind.

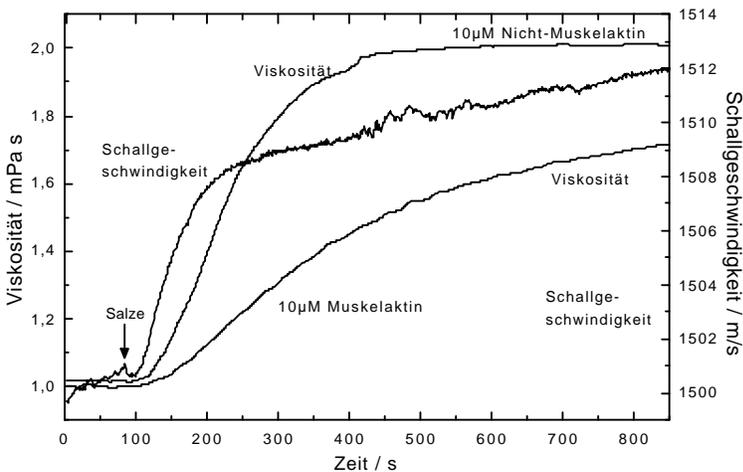


Abb. 4-17: Viskositäts- und Schallgeschwindigkeitsänderungen während der Polymerisation von Muskelaktin und Nicht-Muskelaktin. Die Polymerisationsrate und die steady-state-Viskosität ist von Nicht-Muskelaktin höher als die von Muskelaktin. Bei beiden Proteinen nimmt die Schallgeschwindigkeit bereits vor einer detektierbaren Viskositätsänderung zu. Gezeigt sind typische Kinetiken von 5 unabhängig durchgeführten Messungen.

Die Zugabe von Profilin im Verhältnis von 0,25-1 Mol pro Mol Aktin erhöht die Viskosität und setzt die Elastizität während der Polymerisation von  $\beta\gamma$ -Aktin (Abb. 4-18) herab. Ebenso erhöht auch die Online-Zugabe von 1 Mol Profilin zu 1 Mol Aktin die Viskosität der Lösung (Abb. 4-18 d). Profilin im Überschuss (5 Mol Profilin pro Mol Aktin) inhibiert die Polymerisation von Aktin (Nebengrafik in Abb. 4-18 a).

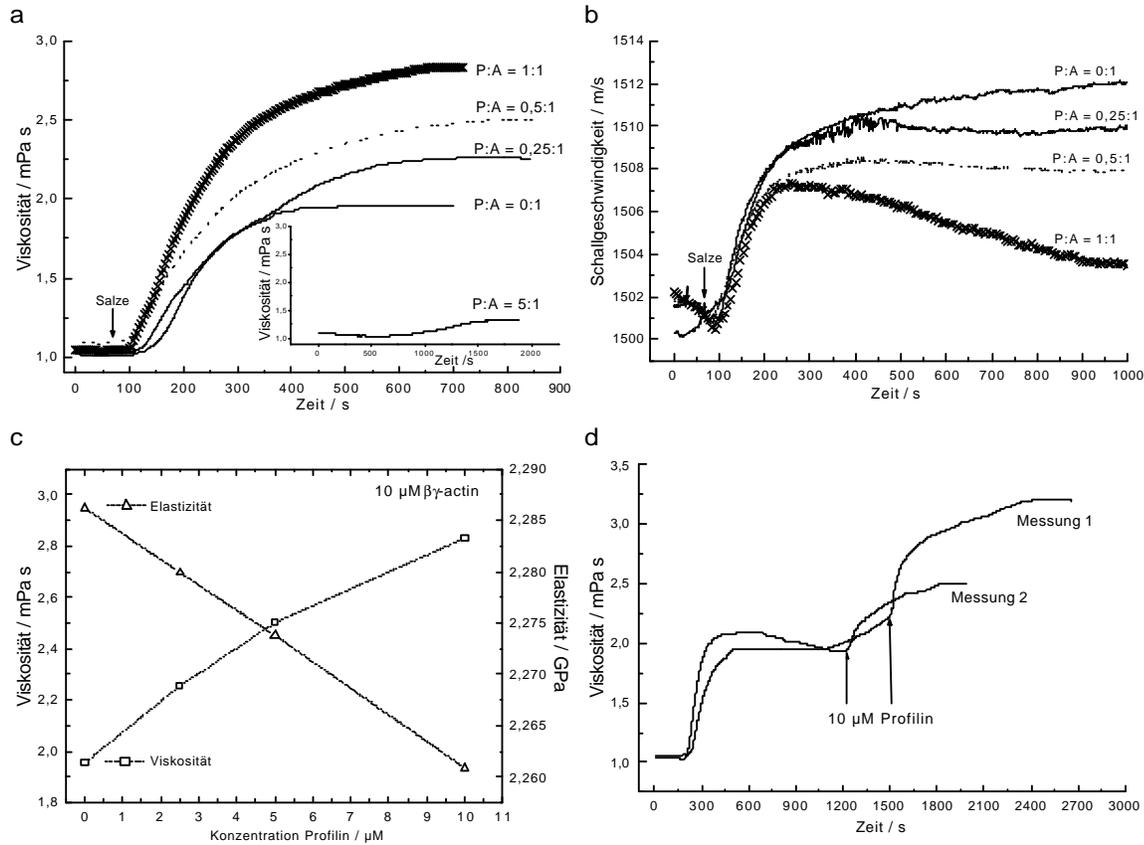
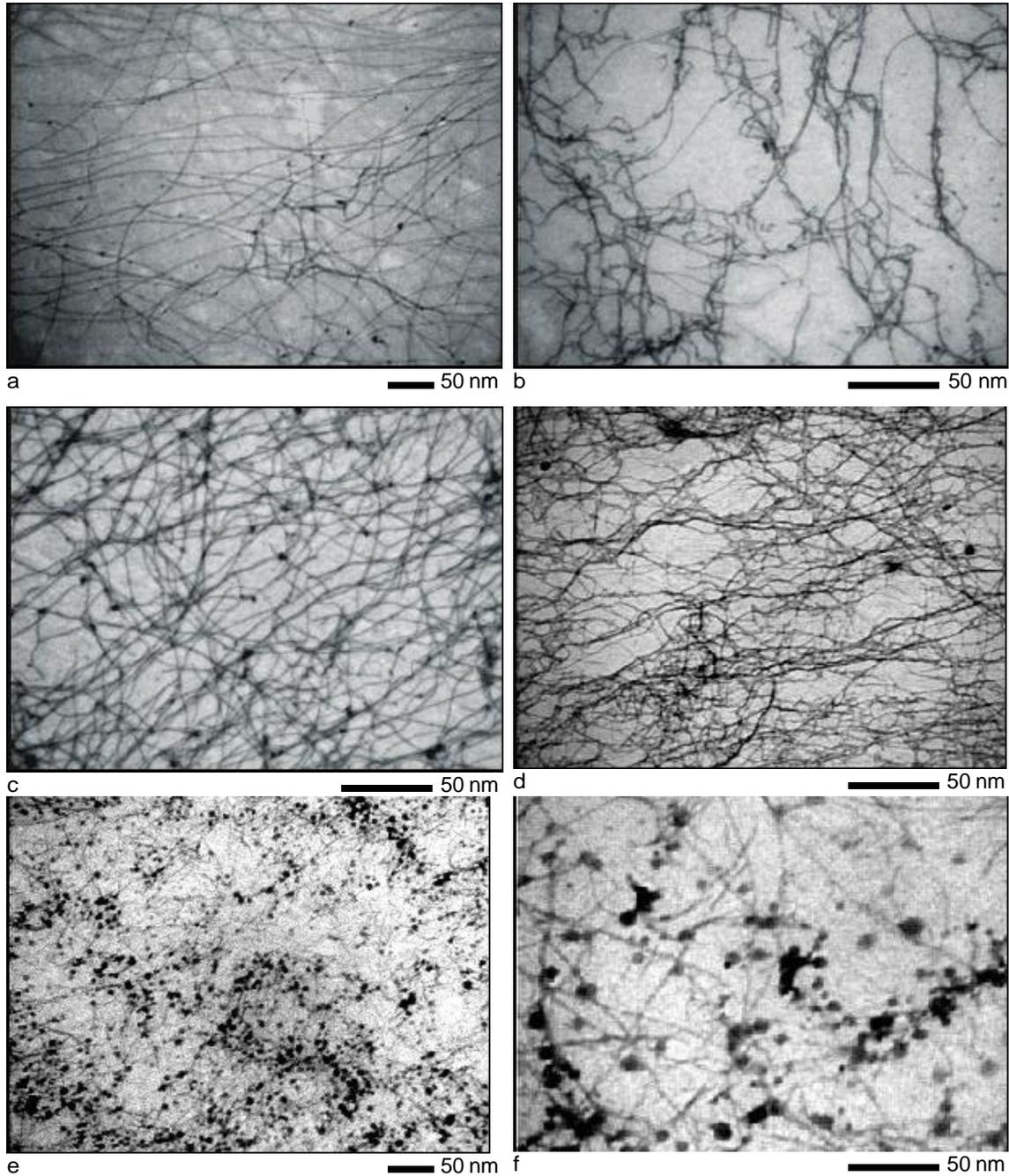


Abb. 4-18 a-d: Zeitliche Änderung der (a) Viskosität und (b) Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von  $\beta\gamma$ -Aktin mit und ohne Profilin. (a) Die Viskosität nimmt mit steigender Profilinkonzentration zu, während Profilin im Überschuss (Nebengrafik) die Polymerisation hemmt. (b) Die Schallgeschwindigkeit nimmt mit steigender Profilinkonzentration ab. Schallgeschwindigkeitsänderungen vor der Salzzugabe sind auf Temperierungen der Lösung zurückzuführen. Die Steigung der Schallgeschwindigkeit nach der Salzzugabe verläuft bei allen Versuchsansätzen parallel. Die Grafiken zeigen gemittelte Kurven aus drei bis fünf Messungen. Die Standardabweichung der Viskosität betrug  $\pm 0,15$  mPa s und der Schallgeschwindigkeit  $\pm 0,8$  m/s. (c) Grafische Auftragung der aus den Grafiken (a) und (b) ermittelten steady-state-Viskositäten und Elastizitäten. (d) Auch die Zugabe von Profilin zu bereits polymerisiertem  $\beta\gamma$ -Aktin bewirkt eine Viskositätserhöhung (zwei Einzelmessungen sind gezeigt).

Die Abnahme der Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von  $\beta\gamma$ -Aktin mit zunehmender Profilinkonzentration (Abb. 4-18 b) verweist auf eine erhöhte Kompressibilität der Proteinlösung. Ein ähnlicher Effekt wurde im vorherigen Kapitel für Aktin mit zunehmender Filamentpackungsdichte beobachtet. EM-Aufnahmen zeigen, dass die Filamente nach der Profilin-Zugabe dichter gepackt sind (Tafel 4-3 a-d). Eine Besonderheit stellt hingegen das Erscheinungsbild von Aktin mit Profilin im molaren Verhältnis Profilin:Aktin = 0,25:1 (Tafel 4-3 e, f) dar: hier sind nicht-filamentöse Strukturen sichtbar, die aufgrund ihrer festkörperähnlichen Eigenschaften den Schall besonders schnell leiten, was Messungen der absoluten Schallgeschwindigkeit ergeben (Abb. 4-19).

## ERGEBNISSE



Tafel 4-3 a-f: EM-Aufnahmen von negativ gefärbtem  $\beta\gamma$ -Aktin nach 40-minütiger Polymerisation. (a,b)  $5\mu\text{M}$   $\beta\gamma$ -Aktin, (c, d)  $5\mu\text{M}$   $\beta\gamma$ -Aktin mit  $5\mu\text{M}$  Profilin, (e, f)  $5\mu\text{M}$   $\beta\gamma$ -Aktin mit  $1,5\mu\text{M}$  Profilin. (a) Die meisten Filamente von reinem  $\beta\gamma$ -Aktin sind lang und gerade, dennoch gab es vereinzelt Bereiche mit (b) umeinander gewundenen Filamenten. (c) Dicht gepackte und lange Filamente wurden für Konzentrationen P:A = 1:1 gefunden. (e, f) Für niedrige Profilinkonzentrationen scheinen sich vermehrt nicht-filamentöse Strukturen (dunkle Flecken) zu bilden. Für jeden Versuchsansatz wurden 3-6 Grids betrachtet und typische Bereiche aufgenommen.

Da die EM-Aufnahmen und die Messungen der absoluten Schallgeschwindigkeit unterschiedliche und voneinander unabhängig durchgeführte Versuchsansätze darstellen, ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um durch Präzipitationen bedingte Effekte handelt. An dieser Stelle sei erwähnt, dass ORR-Messungen im Falle von Proteinausfällungen aufgrund starker Schwankungen der Schallsignalamplitude nahezu undurchführbar sind, bzw. sich in stark schwankenden Viskositätswerten ausdrücken.

Abb. 4-19 zeigt, dass nach der Zugabe von Profilin ( $10\mu\text{M}$ ) zu polymerisiertem  $\beta\gamma$ -Aktin ( $10\mu\text{M}$ ) die Elastizität im Vergleich zu  $\beta\gamma$ -Aktin ohne Profilin erhöht ist. Bemerkenswert ist auch die starke Abnahme

der (absoluten) Elastizität (s. Kap. 3.4.3) von  $\beta\gamma$ -Aktin nach 40-minütiger Inkubationszeit im ORR (Abb. 4-19 P:A = 0:1), was (relative) Schallgeschwindigkeitsmessungen nicht ergeben (Abb. 4-18 b). Daher wurden Langzeitmessungen von  $\beta\gamma$ -Aktin mit und ohne Profilin durchgeführt (Abb. 4-20).

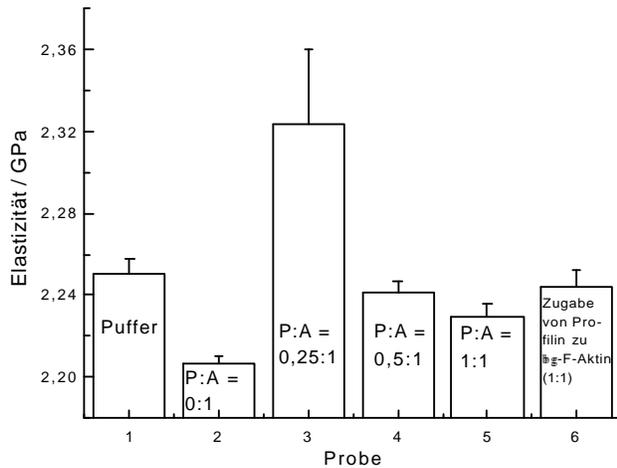


Abb. 4-19: Bestimmung der Volumen-Elastizität des Aktinpuffers, von polymerisiertem  $\beta\gamma$ -Aktin mit und ohne Profilin, sowie nach der Zugabe von Profilin (10  $\mu\text{M}$ ) zu polymerisiertem  $\beta\gamma$ -Aktin (10  $\mu\text{M}$ ). Die Inkubationszeit der Lösungen vor der Bestimmung der absoluten Schallgeschwindigkeit betrug etwa 40 Minuten.

Es ließ sich hierbei feststellen, dass nach längerer Inkubationszeit von  $\beta\gamma$ -Aktin im ORR die Elastizität bei gleichbleibender Viskosität abnahm (Abb. 4-20 a). Diese Abnahme wird durch Profilin verzögert (Abb. 4-20). Für Muskelaktin wurde ein solcher Elastizitätsverlust nicht beobachtet (Abb. 4-7 a bzw. für leicht abweichende Aktinkonzentrationen: Abb. 4-29 bzw. Abb. 4-30 b). EM-Aufnahmen zeigen gleichzeitig auch vereinzelt  $\beta\gamma$ -Aktinfilamente, welche einander umschlingen (Tafel 4-3 b), was auf den Verlust intrinsischer Elastizität hinweist.

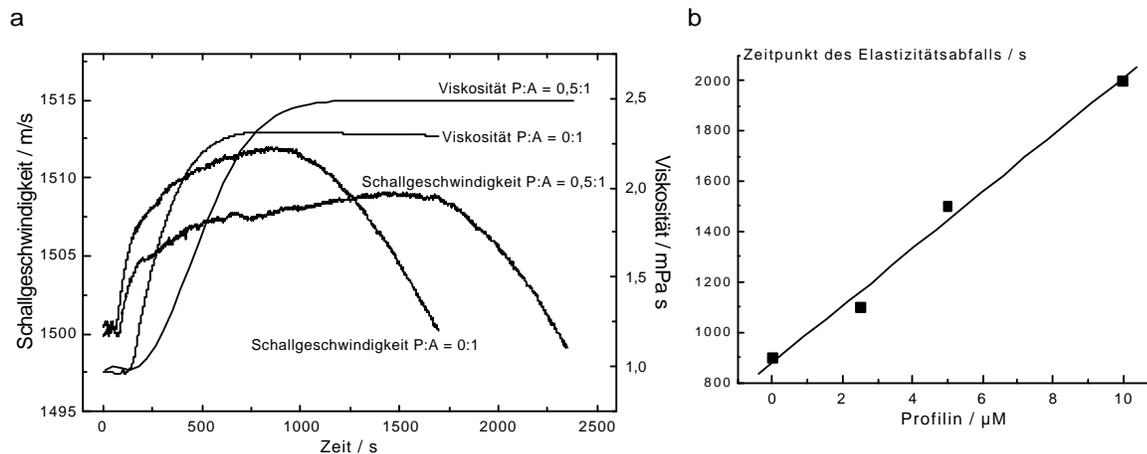


Abb. 4-20 a, b: (a) Elastizitätsverlust von  $\beta\gamma$ -Aktin (10  $\mu\text{M}$ ) nach längerer Inkubation im ORR. Der Elastizitätsabfall ist verzögert, wenn Aktin zusammen mit Profilin polymerisiert. (b) Zeitpunkt des Elastizitätsabfalls für verschieden hohe Profilinkonzentrationen.

#### 4.4 Änderung der Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin mit und ohne $\alpha$ -Aktinin, Profilin und Cytochalasin D

Es wurde bisher gezeigt, dass Messungen mit dem ORR zerstörungsfrei sind und dass sich die Verläufe der Viskosität und Elastizität während der Polymerisation von Aktin und Tubulin zeitlich voneinander unterscheiden. Neben dem sigmoidalen Verlauf der Viskositätszunahme wurde ein biphasischer Elastizitätsverlauf beschrieben, der bereits vor einer erkennbaren Viskositätszunahme beginnt. Die Elastizität ist eine Funktion der Packungsdichte und der Quervernetzung von F-Aktin und Mikrotubuli. Die hohe Elastizität von Mikrotubuligelen ist auf die Rigidität der Tubulin-Oligomere zurückzuführen. Auch durch die Profilin-Zugabe induzierte nicht-filamentöse Aktin-Aggregate tragen erheblich zur Elastizität von Aktin-

## ERGEBNISSE

len bei. Möglicherweise trägt auch in der Zelle neben der filamentösen, die globuläre Form der Zytoskelettelemente maßgeblich zur Elastizität bei (s. Diskussion).

Mit dem ORR kann man synchron zur Viskosität und Elastizität noch einen dritten mechanischen Parameter messen, nämlich die Schalldämpfung. Für newtonsche Flüssigkeiten wie Glycerin nimmt sie mit steigender Viskosität zu (Abb. 4-21).

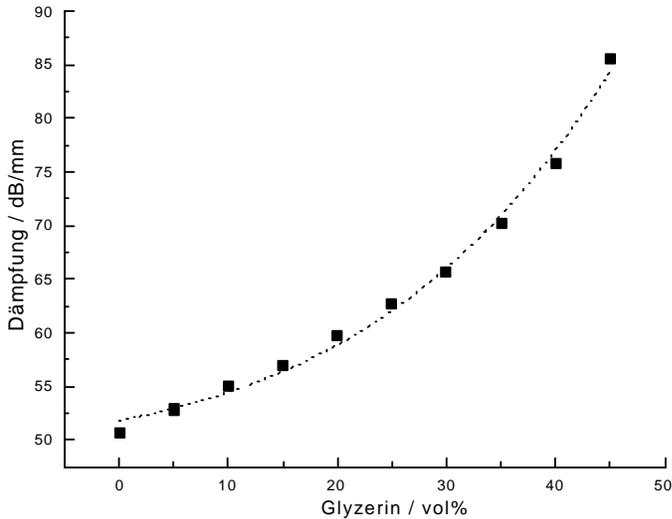
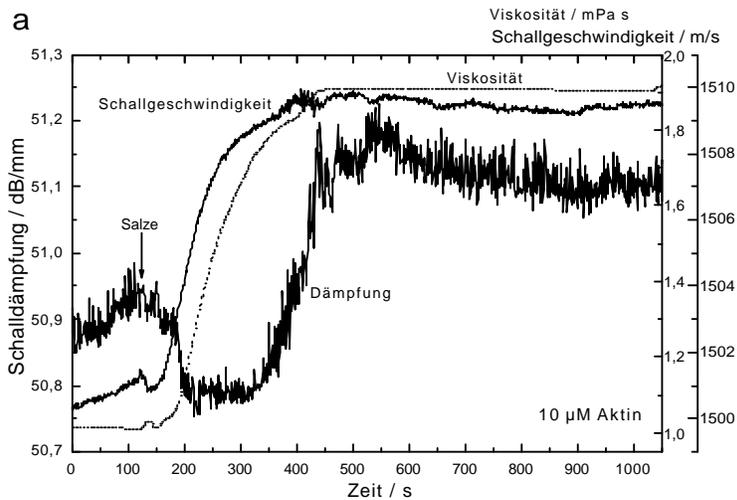


Abb. 4-21: Mit dem ORR bestimmte Schalldämpfung verschiedener Glycerin/Wasser-Gemische (0-45% Glycerin).

Ebenso verändert sich die Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin (Abb. 4-22). Der zeitliche Verlauf der Schalldämpfung beginnt zunächst mit einer Abnahme während des ersten starken Anstiegs der Schallgeschwindigkeit und des ersten leichten Anstiegs der Viskosität, bewegt sich also synchron zur Entstehung von Aktinprimern. Kurz vor dem Erreichen der steady-state-Schallgeschwindigkeit verläuft die Schalldämpfung kurze Zeit konstant. Etwa kurz vor Beginn des Viskositätsmaximums beginnt die Schalldämpfung stark anzusteigen.



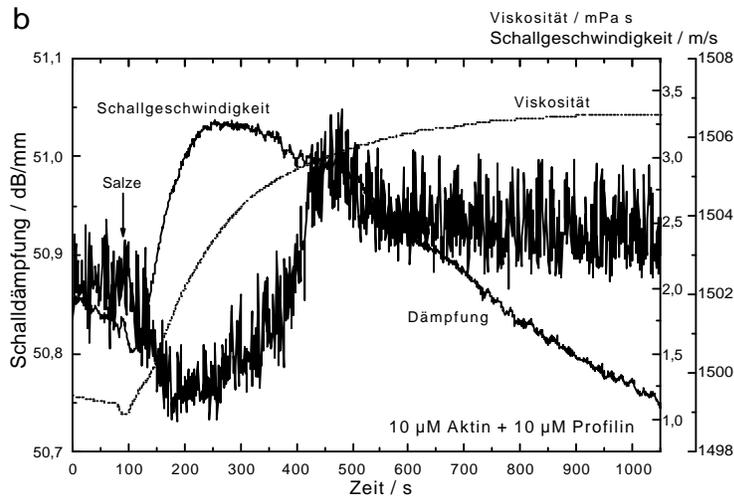


Abb. 4-22 a, b: Drei mit dem ORR synchron gemessene mechanische Parameter während der Polymerisation von (a)  $\beta\gamma$ -Aktin (10  $\mu\text{M}$ ) und (b)  $\beta\gamma$ -Aktin (10  $\mu\text{M}$ ) mit Profilin (10  $\mu\text{M}$ ). (a) Während der Primer-Bildung (gekennzeichnet durch einen starken Schallgeschwindigkeitsanstieg) nimmt die Schalldämpfung zunächst ab und verläuft während des starken Viskositätsanstiegs konstant. Kurz vor dem Erreichen des Viskositätsmaximums, beginnt die Schalldämpfung stark anzusteigen. (b) Der charakteristische Verlauf der Schalldämpfung ist unabhängig von der durch Profilin induzierten Schallgeschwindigkeitsabnahme. Die Salzzugabe erfolgte in (a) nach 120 Sekunden und in (b) nach 100 Sekunden. Der in (a) gezeigte charakteristische Verlauf der Schalldämpfung wurde etwa 15-mal reproduziert.

Im weiteren Verlauf wurde überprüft, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Schalldämpfung und der Schallgeschwindigkeit besteht. Hierzu wurde Aktin (10  $\mu\text{M}$ ) mit Profilin (10  $\mu\text{M}$ ) polymerisiert, denn letzteres induziert nach Abb. 4-18 (b) eine Abnahme der Schallgeschwindigkeit bei gleichbleibender Viskosität.

Es zeigte sich, dass sich durch die Variation der Schallgeschwindigkeit der Verlauf der Schalldämpfung nicht änderte, während die Höhe der Dämpfung sich von reinem Aktin unterschied. Diese Abnahme der Schalldämpfung ist eine Funktion der Profilinkonzentration (Abb. 4-23).

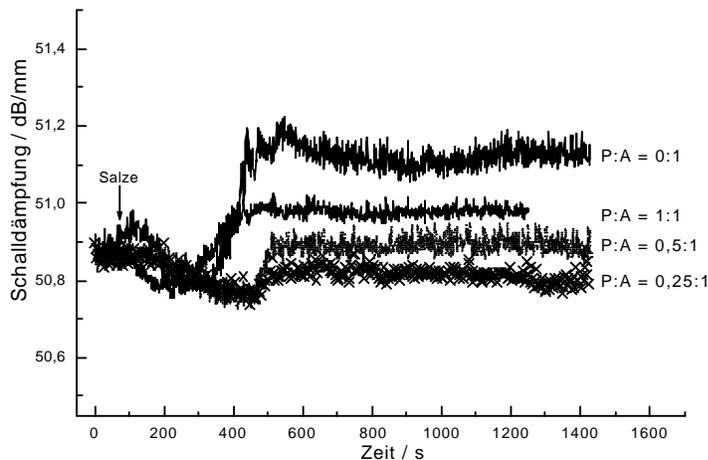


Abb. 4-23: Zeitlicher Verlauf der Schalldämpfung während der Polymerisation von  $\beta\gamma$ -Aktin mit verschiedenen Profilinkonzentrationen. Die Schalldämpfung wird durch Profilin deutlich moduliert. Die Kurven zeigen typische Verläufe von 3-5 wiederholten Experimenten.

Der charakteristische Verlauf der Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin ist auch für Muskelaktin evident (Abb. 4-24). Hier nimmt die Schalldämpfung während der Elongationsphase der Polymerisation gleichfalls stark zu. Während dieser Phase der Polymerisation kommt es zu lateralen und longitudinalen Zusammenschlüssen von Filamenten (Kap. 2.3.3.1). Ob daher ein Zusammenhang zur Quervernetzung von Aktin und der Schalldämpfung besteht, sollte durch die Zugabe von  $\alpha$ -Aktinin nachgewiesen werden (Abb. 4-25).

## ERGEBNISSE

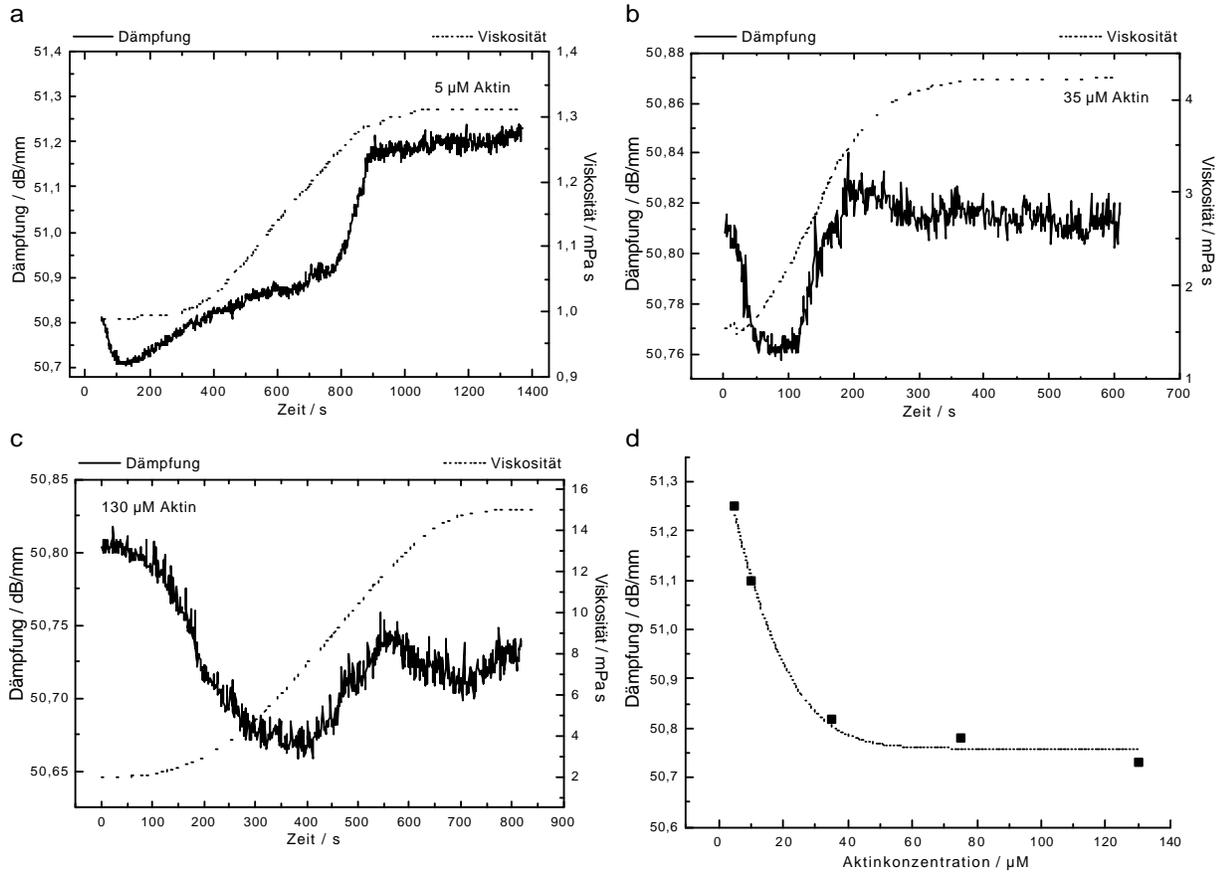


Abb. 4-24 a-d: Zeitlicher Verlauf der Dämpfung während der Polymerisation von (a) 5  $\mu\text{M}$ , (b) 35  $\mu\text{M}$  und (c) 130  $\mu\text{M}$  Aktin. Während der Lag-Phase der Polymerisation nimmt die Dämpfung zunächst ab. Diese Abnahme ist für niedrigere Konzentrationen stärker als für höhere. Erst nach Erreichen des etwa halben Viskositätsmaximums beginnt die Dämpfung anzusteigen. Dieser Anstieg ist für niedrige Aktinkonzentrationen stärker als für höhere. (d) Dämpfung während der steady-state-Viskosität für verschiedene Aktinkonzentrationen. Die Dämpfung nimmt mit steigender Aktinkonzentration ab.

Es zeigte sich, dass die Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin mit  $\alpha$ -Aktinin während der frühen Phase der Polymerisation deutlich zunimmt (Abb. 4-25). Es besteht demnach ein Zusammenhang zwischen der Schalldämpfung und der Quervernetzung von Aktin.

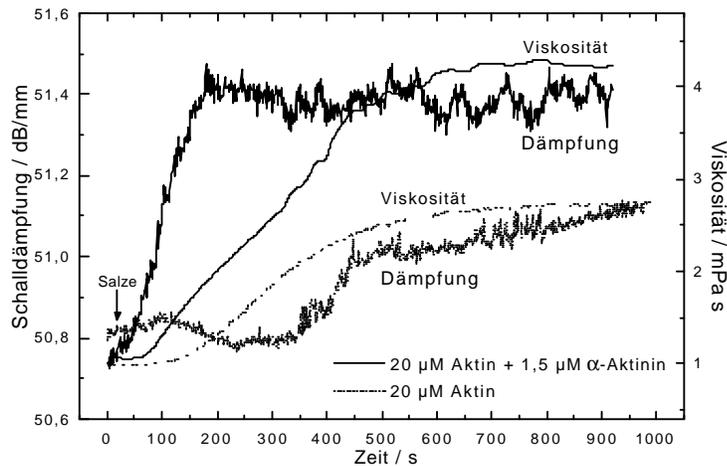


Abb. 4-25: Zeitlicher Verlauf der Schalldämpfung während der Polymerisation von Muskelaktin mit und ohne  $\alpha$ -Aktinin. Die Erhöhung der Viskosität nach der  $\alpha$ -Aktinin-Zugabe indiziert die Ausbildung eines isotropen Netzwerkes durch  $\alpha$ -Aktinin (vgl. Abb. 4-4 und Holmes et al., 1971). Die Schalldämpfung während der Polymerisation von reinem

Aktin nimmt vor allem in der Endphase des starken Viskositätsanstieges zu. Mit  $\alpha$ -Aktinin dagegen nimmt die Schalldämpfung schon in der frühen Phase des Viskositätsanstieges zu. Die Salzzugabe erfolgte hier nach 60 Sekunden.

Zur weiteren Überprüfung des Befundes wurde die Schalldämpfung während der Polymerisation von Muskelaktin mit Cytochalasin D bestimmt, denn letzteres verringert das Ausmaß der Quervernetzung von Aktin (vgl. Tafel 4-2 und Tafel 4-1). Die Versuche demonstrieren, dass sich die Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin mit zunehmender Cytochalasin D-Konzentration verringert (Abb. 4-26).

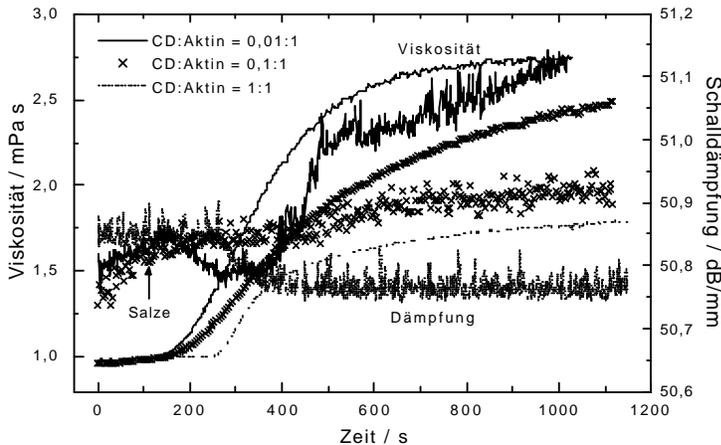


Abb. 4-26: Zeitlicher Verlauf der Schalldämpfung und der Viskosität während der Polymerisation von Muskelaktin (18  $\mu$ M) mit Cytochalasin D (18  $\mu$ M, 1,8  $\mu$ M, 0,18  $\mu$ M). Das Ausmaß der Schalldämpfung und der Viskosität wird mit zunehmender Cytochalasin D-Konzentration vermindert. Die Salzzugabe erfolgte nach 120 Sekunden.

Während der Polymerisation von Tubulin (mit und ohne MAPs) konnte man aufgrund starker Streuungen keine klar definierte Kinetik der Schalldämpfung bestimmen. Dies war lediglich für sehr niedrige Tubulin-konzentrationen in Saccharose-D<sub>2</sub>O-Puffer (s. Kap. 4.6) möglich.

#### 4.5 Modulation der Mechanik von Aktin durch Enzyme der Glykolyse

##### 4.5.1 Einfluss von Hexokinase und ATP auf die Viskoelastizität von Aktin

Zu Beginn der 1990er Jahre diskutierte man die Frage, ob ATP die Elastizität von Aktin erhöht. Es wurden hierzu unabhängig von drei Gruppen (Janmey et al., 1990; Pollard et al., 1992; Newman et al., 1993) Studien mit Hilfe von Platte-Platte-Rheometern durchgeführt. Während die Gruppe Janmey et al. (1990) einen signifikanten Effekt beobachtete, konnten die Gruppen Pollard et al. (1992) und Newman et al. (1991) nur eine schwache Modulation der Steifigkeit von Aktin durch ATP nachweisen. Messungen mit dem ORR zeigen einen deutlichen Effekt von ATP auf die Steifigkeit von Aktin. Verglichen wurde zunächst die Viskoelastizität von gelöstem Aktin mit 0,2 mM ATP bzw. 2 mM ATP (Abb. 4-27 a, b: Kreuze bzw. Kreise). Mit Erhöhung der ATP-Konzentration polymerisierte Aktin (17  $\mu$ M) so schnell, dass keine eindeutige Lag-Phase mehr gemessen wurde. Dennoch erfolgte während allen Messungen eine Salzzugabe nach etwa 30 Sekunden. Die steady-state-Viskosität und Elastizität sind deutlich erhöht, wobei sich kein Unterschied zwischen der Wirkung von dialysiertem und nicht-dialysiertem ATP zeigte (Daten nicht gezeigt). In EM-Aufnahmen sind in Gegenwart hoher ATP-Konzentrationen stark gebogene und rigide erscheinende Filamente zu sehen (Tafel 4-4 a, b; vgl. Tafel 4-1 a, b).

# ERGEBNISSE

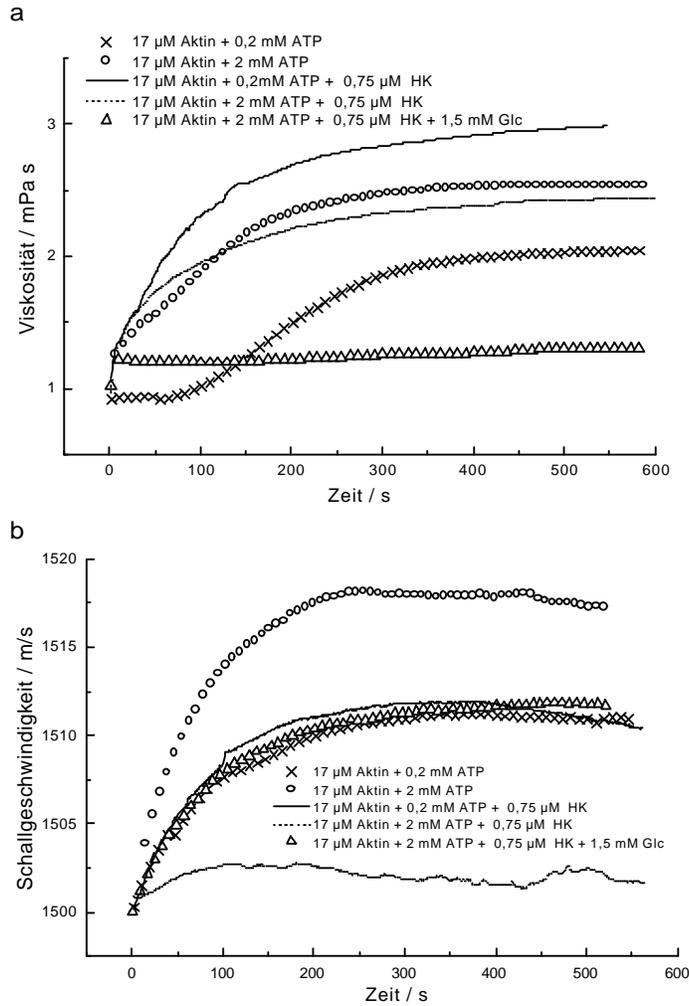
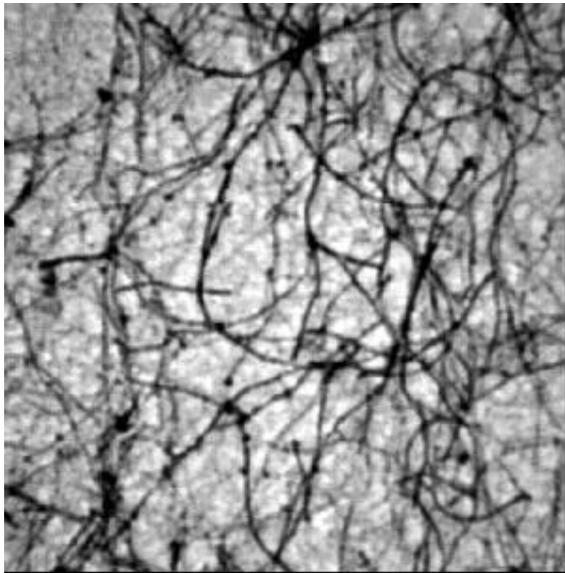
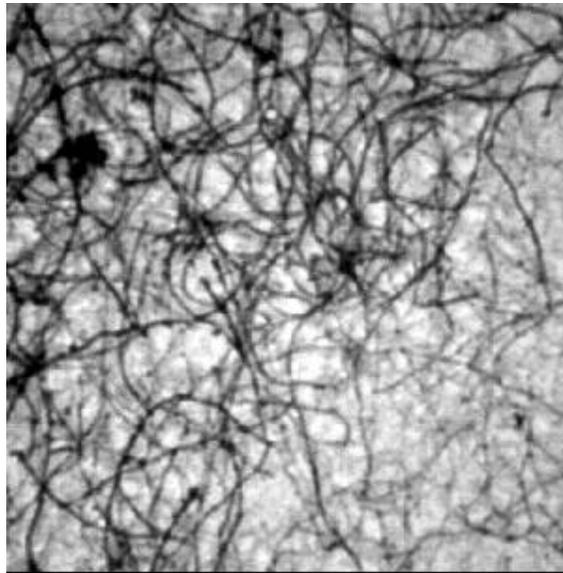


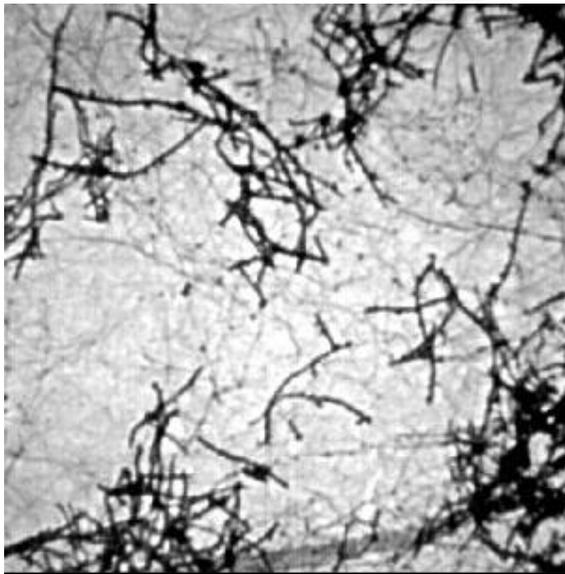
Abb. 4-27 a, b: Einfluss von ATP (0,2 mM und 2 mM) und Hexokinase (0,75  $\mu$ M) auf die Viskoelastizität von Aktin (17  $\mu$ M). (a) Sowohl ATP (2 mM) als auch Hexokinase (0,75  $\mu$ M) erhöhen die Viskosität von Aktin. Die vollständige Umsetzung von ATP zu ADP + Pi durch Zugabe von Glukose (1,5 mM) zu Aktin/Hexokinase (molares Verhältnis 23:1) hemmt die Polymerisation von Aktin. (b) ATP (2 mM) erhöht die Steifigkeit von Aktin (17  $\mu$ M). Zusammen mit Hexokinase wird dieser Effekt jedoch gehemmt. Nach Zugabe von Glukose oder Senkung der ATP-Konzentration (von 2 mM auf 0,2 mM) verläuft die Schallgeschwindigkeit ähnlich den Kontrollbedingungen (nur Aktin). Die Salzzugabe erfolgte jeweils nach etwa 30 Sekunden. Die Grafiken zeigen gemittelte Kurven aus 3-5 unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.



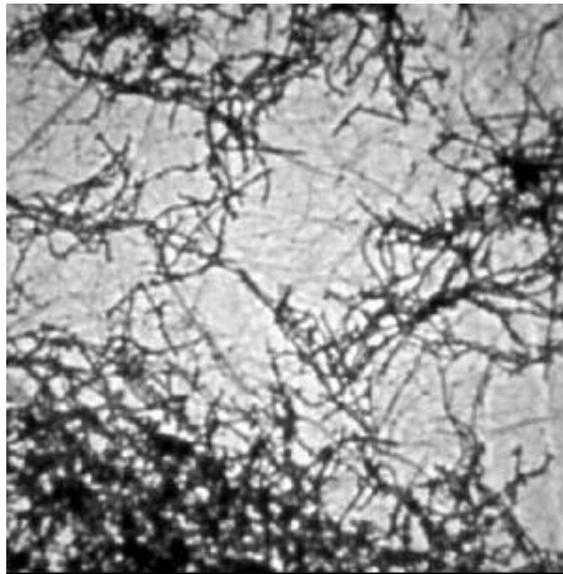
a  100 nm



b  100 nm

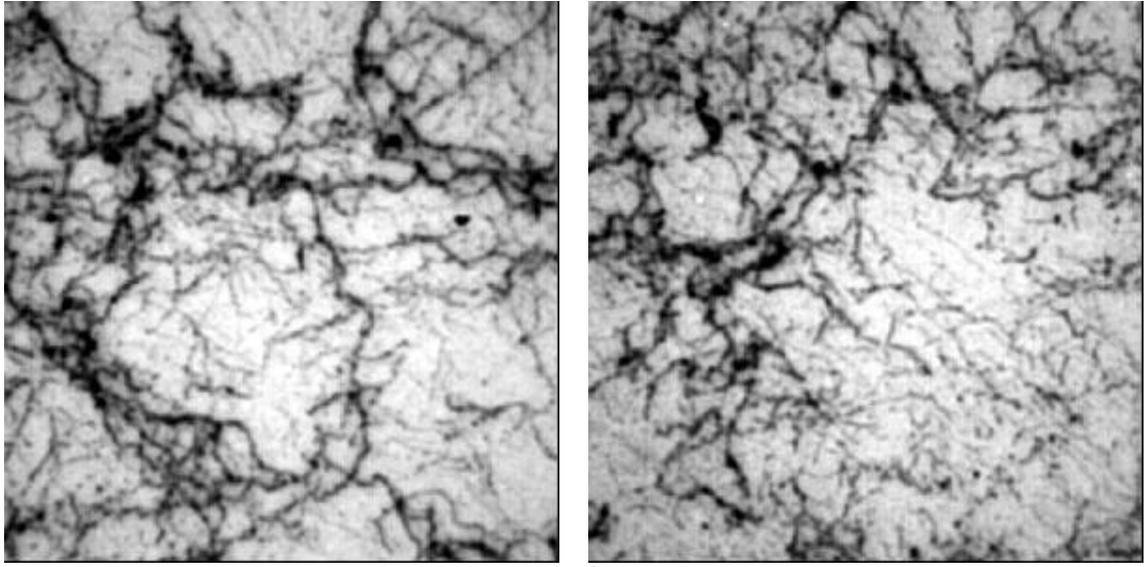


c  100 nm



d  100 nm

## ERGEBNISSE



e f  
Tafel 4-4 a-f: EM-Aufnahmen von negativ gefärbtem Aktin (17  $\mu\text{M}$ ) mit (a, b) 2 mM ATP, (c, d) 2 mM ATP, 0,75  $\mu\text{M}$  Hexokinase, (e, f) 0,2 mM ATP und 0,75  $\mu\text{M}$  Hexokinase. (a, b) Man erkennt lange und scheinbar sehr rigide, dennoch stark gebogene Filamente. (c, d) Vor allem kurze Filamente sind zu sehen. (e, f) Die Filamente scheinen „gekräuselt“ und „aufgeweicht“. Die Aufnahmen zeigen Bereiche typischer Morphologien der Filamente aus (je Ansatz) 6 untersuchten Kupfernnetzchen. Aufgrund der hohen Proteinkonzentration wurden Stellen mit weniger dichtem Aktin ausgewählt.

Nach der Zugabe von Hexokinase (0,75  $\mu\text{M}$ ) und Glukose (1,5 mM) zu Aktin (17  $\mu\text{M}$ ) und ATP (2 mM) nimmt die Viskosität deutlich ab und die Schallgeschwindigkeit verläuft ähnlich den Kontrollbedingungen (nur Aktin) (Abb. 4-27, Dreiecke). Die enzymatische Umsetzung des ATPs durch den Hexokinase/Glukose-Komplex hemmt demnach die Polymerisation von Aktin, wobei die Bildung der Aktin-Trimere - aufgrund des gemessenen Schallgeschwindigkeitszuwachses - weiterhin stattfindet. Der Einfluss des ATPs auf die Viskoelastizität von Aktin mit Hexokinase kann durch die sukzessive Änderung der Glukosekonzentration moduliert werden (Abb. 4-28). Die Abnahme der Viskoelastizität von Aktin/Hexokinase mit steigender Glukosekonzentration - und demnach fallender ATP-Konzentration - ist hierbei evident.

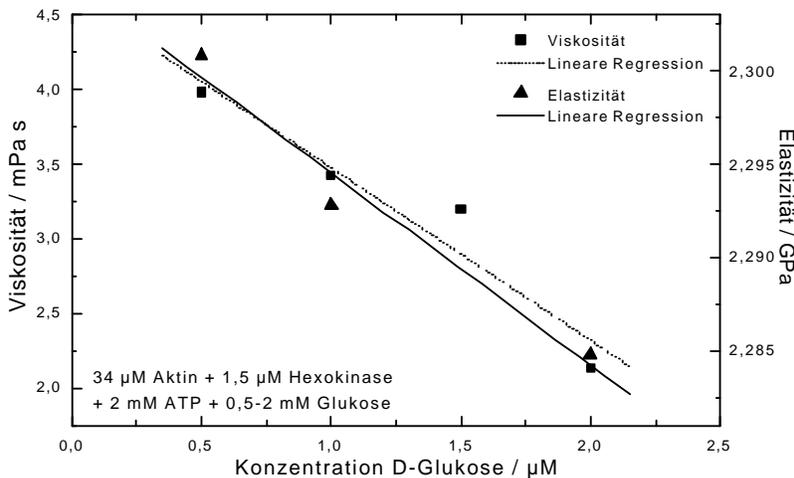


Abb. 4-28: Modulation der Viskoelastizität von Aktin/Hexokinase (molares Verhältnis 23:1) durch Glukose. Mit zunehmender enzymatischer Umsetzung des ATPs durch den Hexokinase/Glukose-Komplex nimmt auch die Viskoelastizität von Aktin ab.

Lässt man unter den gleichen Versuchsbedingungen (17  $\mu\text{M}$  Aktin, 0,75  $\mu\text{M}$  Hexokinase, 2 mM ATP) die Glukose weg, so nimmt die Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von Aktin nicht zu (Abb. 4-27, gepunktete Linien). Dennoch ist die Viskosität im Vergleich zu den Kontrollbedingungen erhöht. EM-Aufnahmen zeigen für diese Versuchsbedingungen vorwiegend kurze Filamente (Tafel 4-4 c, d).

Dies erklärt zwar die geringe Elastizität, nicht jedoch die erhöhte Viskosität. Das EM-Bild zeigt allerdings nur einen Bereich wenig dichten Aktins. Tatsächlich war die Masse der Filamente für diesen Versuchsansatz wesentlich höher (siehe z.B. linke untere Ecke in Tafel 4-4 d), was die Zähigkeit der Flüssigkeit erklärt.

Auch Hexokinase alleine fördert die Polymerisation von Aktin (Abb. 4-27 a, durchgezogene Linie). Die Schallgeschwindigkeit verläuft unter diesen Bedingungen wie für Aktin ohne Hexokinase (Abb. 4-27 b, durchgezogene Linie). Die Aktinfilamente einer solchen Suspension erscheinen in EM-Aufnahmen leicht „gekräuselt“ und „aufgeweicht“ (Tafel 4-4 e, f).

Es liegt nahe, den Einfluss des ATPs auf die Steifigkeit der Filamente mit einer verzögerten  $P_i$ -Freisetzung (in Gegenwart hoher ATP-Konzentrationen) zu erklären, die nach Dancker und Fischer (1989) die Filamente stabilisiert. Daher wurde der Einfluss des nicht-hydrolysierbaren (bzw. nur sehr langsam hydrolysierbaren) ATP-Analogons AMPPNP auf die Viskoelastizität von Aktin untersucht (Abb. 4-29).

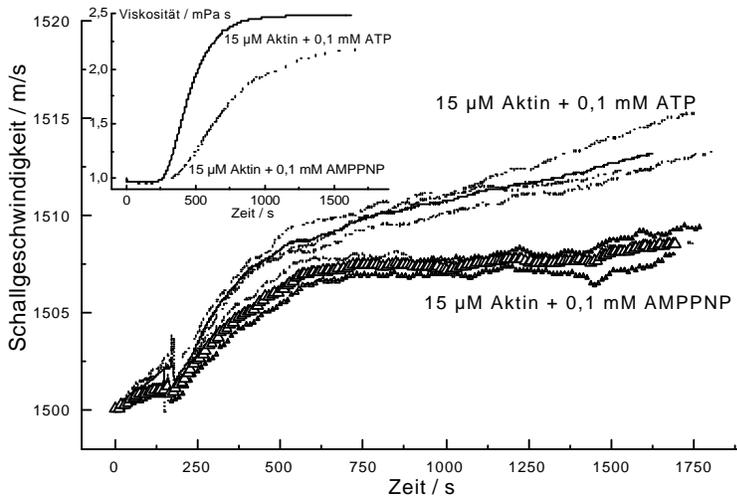


Abb. 4-29: Einfluss des ATP-Analogons AMPPNP auf die Viskoelastizität von Aktin (15 µM). Die Viskoelastizität von AMPPNP-Aktin ist geringer als die von ATP-Aktin. Es wurden je Versuchsansatz drei Messungen durchgeführt, wobei abwechselnd ATP-Aktin und AMPPNP-Aktin vermessen wurde. Die Peaks der Schallgeschwindigkeit > 130 Sekunden zeigen den Zeitpunkt der Salzzugabe an. Die Grafiken präsentieren gemittelte Kurven. Die Standardabweichung der Viskosität betrug 5 %. Für die Schallgeschwindigkeit sind Einzelmessungen als gestrichelte Linien eingezeichnet. Die dicken Linien zeigen die Mittelungen der Einzelmessungen. Der Puffer enthält im AMPPNP-Versuchsansatz etwa 0,015 mM ATP.

Die Messungen ergeben, dass AMPPNP die Schallgeschwindigkeitszunahme, die steady-state-Viskosität und die Polymerisationsrate von Aktin herabsetzt.

Folgende Tabelle fasst die Ergebnisse dieses Kapitels zusammen:

Aktin	Viskosität	Elastizität	Morphologie (EM-Bilder)
+ 0,2 mM ATP	0	0	isotropes Netzwerk (s. Tafel 4-1 a, b)
+ 2 mM ATP	+	+	gebogene und „rigide“ Filamente
+ 0,2 mM ATP + HK	+	0	„gekräuselte“ und „aufgeweichte“ Fil.
+ 2 mM ATP + HK	+	-	dichtes Netzwerk aus kurzen Fil.
+ 2 mM ATP + HK + Glc	-	0	kein Unterschied zur Kontrolle
+ AMPPNP	-	-	-

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 4.5.1.. 0 = Kontrollbedingungen, keine Änderung; + = fördernder Effekt; - = hemmender Effekt.

#### 4.5.2 Modulation der Viskoelastizität von Aktin durch Aldolase

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass die Hexokinase alleine polymerisationsfördernd wirkt. In Gegenwart von Glukose wird ATP enzymatisch gespalten, wodurch die Polymerisation von Aktin gehemmt ist. Hexokinase in Gegenwart hoher ATP-Konzentrationen „schneidet“ Aktinfilamente, wobei dieser Effekt durch die Zugabe von Glukose aufgehoben werden kann. Diese Befunde sprechen für eine komplexe Reziprozität für das Glykolyseenzym und Aktin. Daher wurde der Einfluss eines weiteren „Schrittma-

## ERGEBNISSE

cherenzym“ der Glykolyse, der Aldolase, auf die Mechanik von Aktin untersucht. ORR-Messungen zeigen, dass auch die Aldolase die Viskoelastizität von Aktin beeinflusst. Verwendet man eine Aldolasekonzentration, die gleich oder niedriger der Aktinkonzentrationen ist, so ist das Polymerisationsausmaß von F-Aktin verringert. Gibt man allerdings das Substrat der Aldolase, nämlich FBP hinzu, so zeigt sich ein polymerisationsfördernder Effekt (Abb. 4-30).

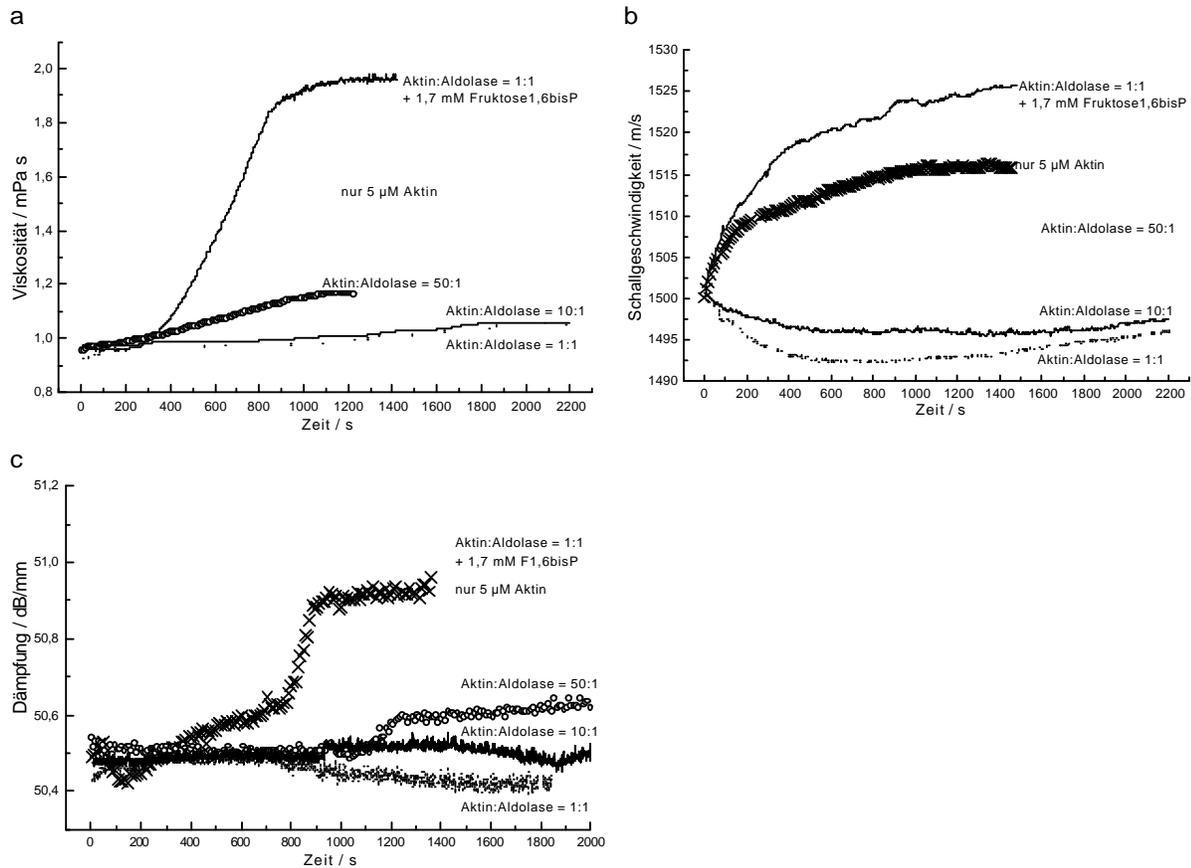


Abb. 4-30 a-c: Viskoelastizität von Aktin (5  $\mu$ M) während der Interaktion mit Aldolase. (a) Aldolase alleine hemmt konzentrationsbedingt die Polymerisation von Aktin. Durch die Zugabe des Substrates FBP wird die Polymerisation gefördert. Auch die (b) Elastizität und die (c) Dämpfung wird durch die Aldolase in ähnlicher Weise moduliert. Die Salzzugabe erfolgte nach 80 Sekunden. Gezeigt sind typische Verläufe von 2-4 unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Die Standardabweichung für die Messungen betrug 4 %.

Die polymerisationsfördernde Wirkung der Aldolase in Gegenwart von FBP hängt damit zusammen, zu welchem Zeitpunkt das Polymerisationssalz und FBP zugegeben wird. So tritt die fördernde Wirkung erst dann ein, wenn FBP vor der Salzzugabe zu Lösungen aus Aktin und Aldolase (molares Verhältnis 1:1) zugegeben wird (Abb. 4-31 a, dicke Linie). Wird erst das Salz und dann FBP zugegeben, wirkt die Aldolase hemmend auf die Polymerisation (gepunktete Linie). Die Zugabe von FBP zu Aktin mit Rindersealbumin (BSA) wirkt leicht viskositätserhöhend (Abb. 4-31 a, Dreiecke) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4-31 a, durchgezogene Linie). FBP alleine hat keinen Einfluss auf die Polymerisation von Aktin (Abb. 4-31 a, durchgezogene Linie).

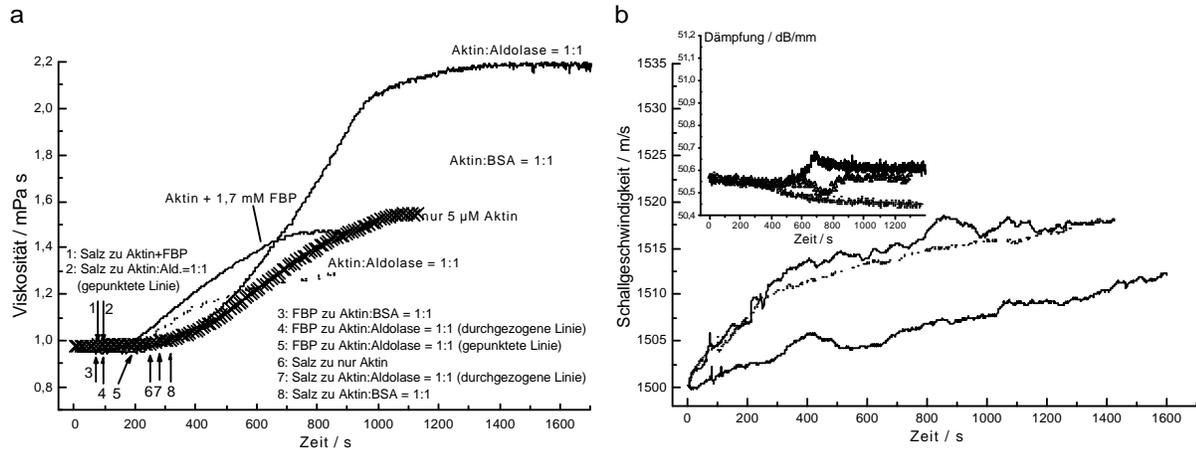


Abb. 4-31 a, b: Auswirkung des Zugabezeitpunktes von FBP und Polymerisationsalz auf die Mechanik von Aktin/Aldolase-Lösungen. (a) Aldolase wirkt dann polymerisationsfördernd, wenn das Salz erst nach der FBP-Zugabe beigemischt wird (dicke Linie). Wird erst das Salz und dann FBP zugegeben, ist die Polymerisation leicht gehemmt (gepunktete Linie). FBP alleine hat keine Wirkung auf die Viskosität von F-Aktin (durchgezogene Linie und Dreiecke) (BSA wirkt erfahrungsgemäß leicht viskositätserhöhend). (b) Das Ausmaß der Dämpfung entspricht in etwa der Höhe der Viskositätszunahme. Die Höhe der Schallgeschwindigkeitszunahme ist von der Zugabe der Aldolase abhängig.

BSA wirkt aufgrund seiner polyelektrischen Ladungen leicht viskositätserhöhend auf Aktin (Abb. 4-31 a, Dreiecke), was konsistent mit Befunden von Griffith und Pollard (1982) oder Lindner und Ralston (1997) ist. Die Schallgeschwindigkeitsmessungen zeigen, dass Aldolase zusammen mit FBP, ob polymerisationsfördernd oder nicht, zu höheren Elastizitätswerten führt (Abb. 4-31 b). Das Ausmaß der Dämpfung verhält sich in etwa gemäß der Höhe der Viskosität.

Inwieweit die Online-Zugabe von Aldolase die Viskosität von polymerisierendem Aktin verändert, war von näherem Interesse. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Aldolase zu polymerisierendem Aktin keinen Einfluss auf die folgende Viskositätszunahme hat (Abb. 4-32 a, Kreuze: das Salz wurde vor dem Start der Messung zugegeben).

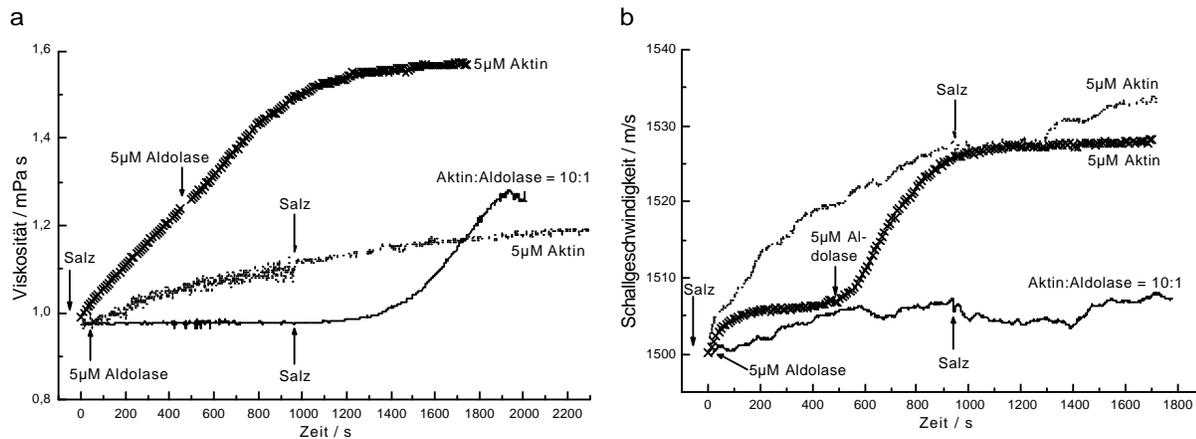


Abb. 4-32 a, b: Einfluss der Online-Zugabe von Aldolase auf die Viskoelastizität von polymerisierendem Aktin. (a) Die Zugabe von Aldolase zu polymerisierendem Aktin hat keinen Einfluss auf die Viskosität von Aktin (Kreuz: das Salz wurde kurz vor dem Starten der Messung hinzugegeben). Aldolase induziert die Polymerisation von Magnesium-freien Aktin, jedoch ist die Höhe des Viskositätszuwachses nur gering (gepunktete Linie). Eine weitere Salzzugabe hat keinen Einfluss auf die hemmende Wirkung der Aldolase (gepunktete Linie), wohingegen bei niedrigeren Aldolasekonzentrationen die Salzzugabe die Polymerisation von Aktin induziert (durchgezogene Linie). (b) Die Zugabe von Aldolase zu polymerisierendem Aktin erhöht die Schallgeschwindigkeit der Aktinlösung (Kreuz). Die Zugabe von Aldolase zu Magnesium-freien Aktin bewirkt eine deutliche Erhöhung der Schallgeschwindigkeit (gepunktete Linie).

## ERGEBNISSE

Gibt man die Aldolase nach einer nur kurzen Inkubationszeit (50 Sekunden) von Magnesium-freien G-Aktin zu der Lösung, so induziert sie zwar die Polymerisation von Aktin, die Höhe der Viskositätszunahme ist aber nur gering (Abb. 4-32 a, gepunktete Linie). Eine weitere Salzzugabe hat keinen Einfluss auf die Polymerisation. Der Einfluss von Magnesium auf das Wirken der Aldolase kann dadurch erklärt werden, dass nach Boehringer (1973) Aldolase in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen durch ATP kompetitiv gehemmt wird und demnach FBP nicht enzymatisch spaltet (s. Kap. 5.6.3). Die Zugabe der Aldolase zu polymerisierendem Aktin führt dennoch in beiden Fällen - ob vor oder nach der Salzzugabe - zu einer deutlichen Schallgeschwindigkeitszunahme (Abb. 4-32 b, Kreuze und durchgezogene Linie). Inkubiert man 15 Minuten lang Aktin mit nur geringen Mengen Aldolase (molares Verhältnis Aktin:Aldolase = 10:1), so kann durch die Zugabe von  $MgCl_2$  und KCl die Polymerisation später eingeleitet werden (Abb. 4-32 a, durchgezogene Linie). Auffällig ist, dass die Salzzugabe zu Aktin/Aldolaselösungen die Schallgeschwindigkeit nicht erhöht (Abb. 4-32 b, durchgezogene und gepunktete Linie).

Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels:

	Online-Zugabe	Viskosität	Elastizität
G-Aktin + Aldolase	$Mg^{2+}$	- -	- -
G-Aktin + Aldolase + FBP	$Mg^{2+}$	+ +	+ +
G-Aktin + Aldolase + $Mg^{2+}$	FBP	-	+
G-Aktin	Aldolase	+	+
F-Aktin	Aldolase	0	+ +

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 4.5.2. Die erste Spalte zeigt die im ORR vorinkubierte Proteinlösung. Die zweite Spalte zeigt die Lösungen, die später „online“ zugegeben wurden. Der folgende Effekt auf die Viskosität und Elastizität der Lösungen ist in der dritten Spalte dargestellt, mit: + = leicht erhöht, + + = stark erhöht, - = leicht erniedrigt, - - = stark erniedrigt, 0 = kein Effekt.

### 4.5.3 Einfluss der LDH auf die Polymerisation von Aktin und Bindung der LDH an filamentöses und nicht-filamentöses Aktin

Es wurde bisher nachgewiesen, dass die Glykolyseenzyme Hexokinase und Aldolase das G/F-Verhältnis von Aktin beeinflussen. Diese Effekte können nicht mit einer unspezifischen Interaktion (wie für BSA gezeigt) erklärt werden, da sie substratspezifisch sind bzw. durch kompetitive Hemmung unterschiedlich voneinander verlaufen. Auch die LDH, eines der Schlüsselenzyme der Glykolyse, sollte hinsichtlich einer möglichen substratspezifischen Bindung an Aktin untersucht werden. Das Enzym bindet zwei Substrate sowie ein Coenzym und kann durch Oxamat kompetitiv inhibiert werden. Aufgrund der Fülle der hierdurch entstehenden Kombinationen möglicher Versuchsansätze wurden die Viskositätsmessungen mit dem leicht zu bedienenden Mikro-Kugelfallviskosimeter durchgeführt. Da die Enzymaktivität der LDH eine Funktion des NADH-Umsatzes ist, wurden zusätzlich Extinktionsmessungen vorgenommen. Weiterhin wurden Kosedimentationsversuche angesetzt, da die Bindung der LDH an filamentöses bzw. nicht-filamentöses Aktin in der Literatur bisher kaum beschrieben wurde.

Viskositätsmessungen demonstrieren, dass bereits das Coenzym der LDH- $H_4$ , je nach Oxidationsstatus, einen Einfluss auf die Polymerisation von Aktin hat. So wirkt NADH (3 mM) zusammen mit LDH- $H_4$  (1  $\mu$ M) polymerisationsfördernd auf Aktin (18  $\mu$ M), während die oxidierte Form des Coenzym (3 mM  $NAD^+$ ) keinen Einfluss auf die Polymerisation hat (Abb. 4-33). Die LDH- $H_4$  alleine beeinflusst die Polymerisation von Aktin nicht (Daten nicht gezeigt).

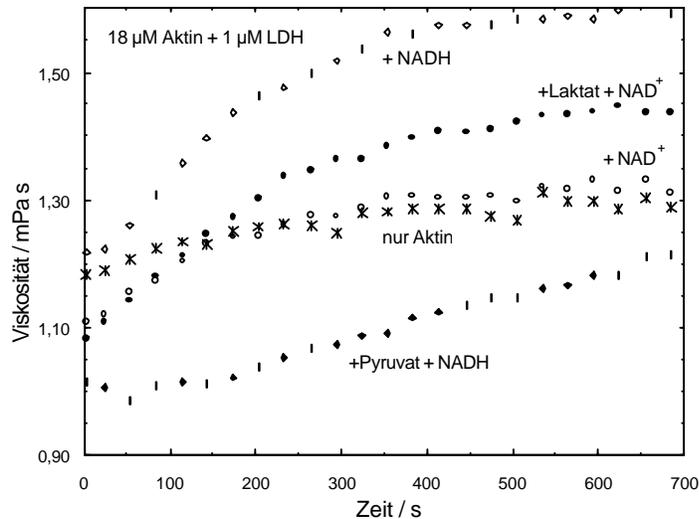


Abb. 4-33: Zeitliche Änderung der Viskosität während der Polymerisation von Aktin (18  $\mu\text{M}$ ) mit LDH- $\text{H}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von NADH (3 mM),  $\text{NAD}^+$  (3 mM), Pyruvat (1,5 mM) und Laktat (1,5 mM). NADH wirkt zusammen mit LDH- $\text{H}_4$  polymerisationsfördernd, während nach der Zugabe von Pyruvat die Polymerisation gehemmt wird.  $\text{NAD}^+$  alleine hat keinen Einfluss auf die Polymerisation, dagegen ist nach Zugabe von Laktat die steady-state-Viskosität erhöht. Die Aktinpolymerisation wurde 30 Sekunden vor dem Starten der Messung durch die Zugabe von 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 50 mM KCl induziert. Die Kurven repräsentieren Mittelwerte aus jeweils drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Kugelfallviskosimeter-Messungen. Die Standardabweichung betrug  $\pm 0,12$  mPa s.

Die Zugabe des Substrates Pyruvat (1,5 mM) kehrt den polymerisationsfördernden Effekt von NADH nahezu um: die Polymerisationsgeschwindigkeit und das Ausmaß der Polymerisation sind stark erniedrigt (Abb. 4-33). Gleichzeitig zeigen Extinktionsmessungen, dass unter diesen Bedingungen auch die Laktat-Synthese gehemmt ist (Abb. 4-34 a). Umgekehrt fördert Laktat zusammen mit  $\text{NAD}^+$  die Polymerisation von Aktin (Abb. 4-33) mit einer gleichzeitig erhöhten Pyruvat-Synthese (in Gegenwart von GPT<sup>23</sup>) (Abb. 4-34 b). Die Umsatzgeschwindigkeit von LDH- $\text{H}_4$  ohne Aktin beträgt nach den Daten aus Abb. 4-34 (a) und nach Gl. (22)  $6,4 \cdot 10^{-2} \Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ .

Die Ergebnisse nach Abb. 4-33 und Abb. 4-34 zeigen eine Reziprozität für die Enzyme Aktin und LDH, denn im Falle einer Hemmung der Aktinpolymerisation durch die LDH ist auch die Enzymaktivität der LDH gehemmt und im Falle einer Förderung der Aktinpolymerisation ist die LDH-Aktivität erhöht.

<sup>23</sup> Die Zugabe der GPT war unerlässlich, da die enzymatische Umsetzung von Laktat zu Pyruvat sonst zu schnell ablief. Die GPT ist ferner ein fester Bestandteil des Energiestoffwechsels der Zellen und sollte daher im Sinne einer Annäherung an die *in vivo* Situation nicht fehlen.

## ERGEBNISSE

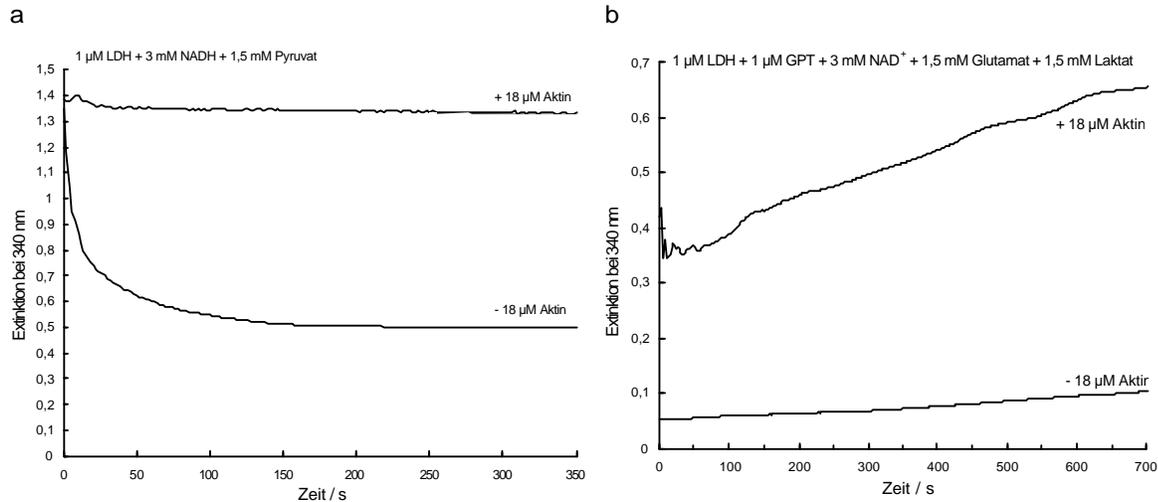


Abb. 4-34 a, b: Spektralphotometrische Messung des NADH-Gehaltes während der enzymatischen Umsetzung von (a) Pyruvat zu Laktat und (b) Laktat zu Pyruvat, jeweils mit und ohne Aktin. (a) Die Laktsynthese wird in Gegenwart von Aktin nahezu gehemmt. (b) Umgekehrt wurde erst mit Aktin (und GPT) eine Pyruvat-Synthese gemessen. Die Zunahme des NADH-Peaks mag an den Verlauf einer Polymerisationskinetik erinnern, zeigt aber zunächst nur, dass die LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von Aktin, ob G- oder F-Aktin, Pyruvat synthetisiert (der Aktin-Peak liegt - ähnlich dem NAD<sup>+</sup>-Peak - bei 290 nm). Die Aktinpolymerisation wurde 10 Sekunden vor dem Starten der Messung durch die Zugabe von 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM KCl induziert. Die Kurven zeigen typische Einzelmessungen von 2-3 reproduzierten Versuchen. Die Standardabweichung betrug  $\pm 0,1$  nm.

Kosedimentationsversuche zeigen, dass die LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von NADH alleine nicht pelletiert (Abb. 4-35 a), d.h., der polymerisationsfördernde Effekt des Coenzym (Abb. 4-33) hängt nicht mit einer Wechselwirkung zwischen der LDH-H<sub>4</sub> und der filamentösen Form von Aktin zusammen. Die Zugabe von Pyruvat hingegen bewirkt ein leichtes Pelletieren der LDH-H<sub>4</sub>, das durch die Gegenwart von NAD<sup>+</sup> und Laktat noch verstärkt wird (Abb. 4-35 b). Auch die Zugabe von GPT und Glutamat (anstatt von Laktat) führt zu einem deutlichen Sedimentieren der LDH-H<sub>4</sub>.

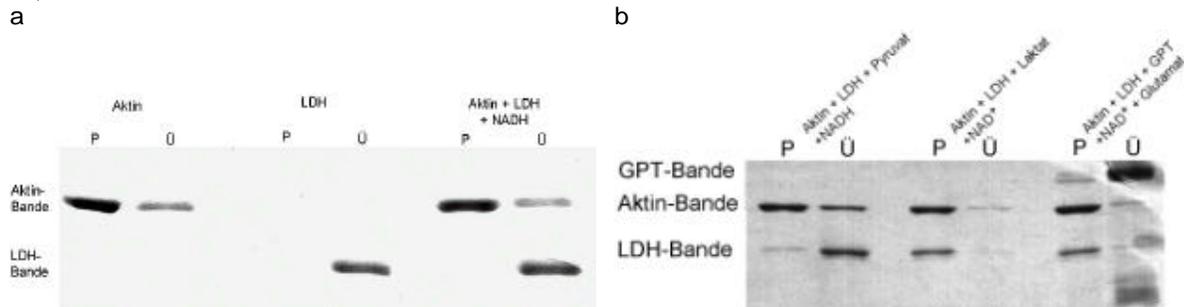


Abb. 4-35 a, b: Kosedimentation von Aktin (10 µM) mit und ohne LDH-H<sub>4</sub> (5 µM) bzw. NADH/NAD<sup>+</sup> (3 mM) und Pyruvat/Laktat (1,5 mM). (a) Die LDH-H<sub>4</sub> erscheint mit Aktin und NADH im Überstand. Der Effekt ist unabhängig von der Gegenwart von NADH (Daten nicht gezeigt). (b) Die Zugabe von Pyruvat bedingt ein Pelletieren der LDH-H<sub>4</sub>, welches mit Laktat stärker ist. Auch mit GPT und Glutamat (statt Laktat) pelletiert die LDH-H<sub>4</sub>.

Die Gründe für das deutliche Sedimentieren der LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von Aktin, Laktat und NAD<sup>+</sup> (Abb. 4-35 b) sollten durch weitere Kosedimentationsversuche näher untersucht werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die LDH-H<sub>4</sub> auch ohne Aktin (mit Laktat, NAD<sup>+</sup> und GPT) sedimentiert (Abb. 4-36). Zusammen mit den Befunden aus Abb. 4-35 kann geschlossen werden, dass alleine die Gegenwart von Laktat und NAD<sup>+</sup> ein Sedimentieren der LDH-H<sub>4</sub> bewirkt, was möglicherweise durch die Bildung von LDH-Aggregaten bedingt ist (s. Kap. 5.7.2).

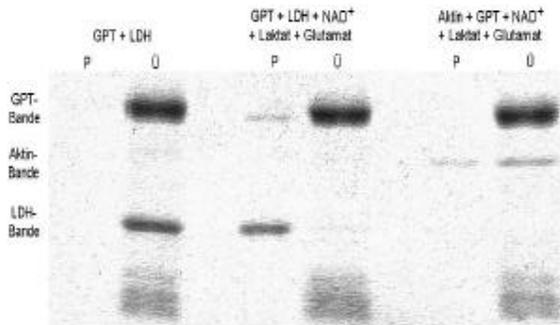


Abb. 4-36: Einfluss von GPT auf das Sedimentationsverhalten von LDH-H<sub>4</sub> und Aktin. GPT alleine bewirkt nicht das in Abb. 4-35 (b) beobachtete Pelletieren der LDH-H<sub>4</sub>. Erst mit Laktat und NAD<sup>+</sup> (ohne Aktin) sedimentiert die LDH-H<sub>4</sub>. In Gegenwart von GPT, NAD<sup>+</sup> und Laktat ist ferner vermehrt G-Aktin zu sehen (ohne LDH-H<sub>4</sub>).

Es stellte sich im Folgenden die Frage, ob die beobachteten Effekte, wie die Aggregation von LDH-H<sub>4</sub>-Molekülen bzw. die Modulation der Aktinpolymerisation durch die LDH-H<sub>4</sub>, mit einer kompetitiven Inhibierung der LDH-H<sub>4</sub> durch Oxamat, beeinflusst werden können. *In praxi* hemmt die LDH-H<sub>4</sub> zusammen mit Oxamat die Polymerisation von Aktin (unabhängig davon, ob Pyruvat oder Laktat im Ansatz ist) (Abb. 4-37 a). Wie zu erwarten, ist auch die Enzymaktivität gehemmt (Abb. 4-37 b). Ebenso wird das Pelletieren der LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von NAD<sup>+</sup> und Laktat durch Oxamat vermindert (vgl. Abb. 4-37 c mit Abb. 4-35 b). Gibt man ferner GPT und Glutamat hinzu, so pelletiert die LDH-H<sub>4</sub> wieder stärker (Abb. 4-37 c). Die niedrigen Viskositätswerte in Abb. 4-37 (a) lassen sich mit einem hohen Anteil nicht-filamentösen Aktins erklären, der sich, im Falle der Gegenwart von Pyruvat, auch in einer ausgeprägten Aktinbande im Überstand ausdrückt (Abb. 4-37 c). In Gegenwart von Laktat wurde eine solche ausgeprägte Aktinbande im Überstand jedoch nicht gefunden, was nicht konsistent mit den Viskositätsmessungen ist.

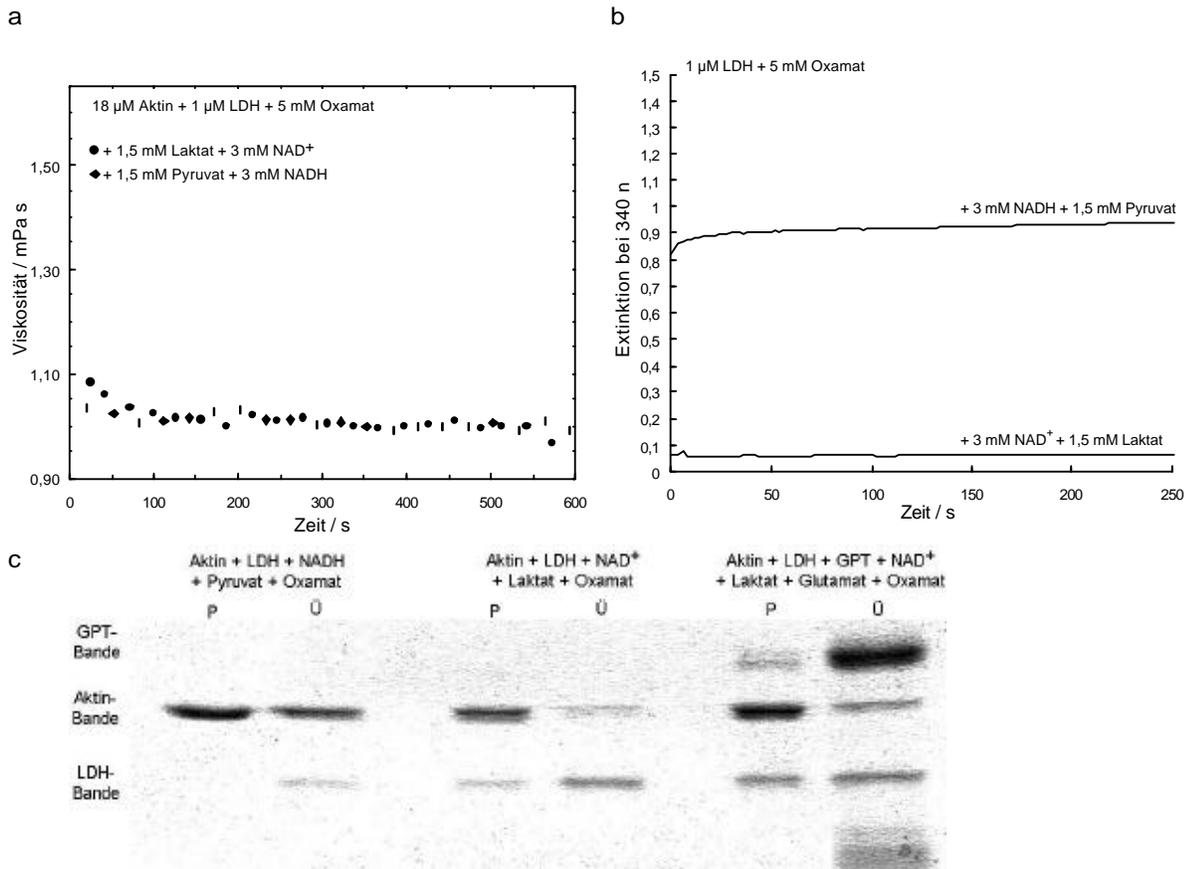


Abb. 4-37 a-c: Einfluss von Oxamat auf die Interaktion der LDH-H<sub>4</sub> mit Aktin. (a) Eine Viskositätszunahme durch polymerisierendes Aktin wurde in Gegenwart von LDH-H<sub>4</sub> und Oxamat nicht gemessen, wobei es keinen Unterschied macht, ob Pyruvat oder Laktat anwesend sind (Oxamat alleine hat keinen Einfluss auf die Polymerisation von

## ERGEBNISSE

Aktin; Daten nicht gezeigt). Es handelt sich um gemittelte Kurven aus drei Messungen. Die Standardabweichung betrug  $\pm 0,08$  mPa s. (b) Oxamat hemmt - wie zu erwarten - die Pyruvat- bzw. Laktat-Synthese. Es sind typische Kurven aus zwei reproduzierten Versuchen abgebildet. Standardabweichung:  $\pm 0,15$  nm für Pyruvat und  $\pm 0,05$  für Laktat. (c) Das in Abb. 4-35 (b) gezeigte Sedimentieren der LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von Aktin, Laktat und NAD<sup>+</sup> wird durch Oxamat vermindert. Auch mit GPT ist das Sedimentieren der LDH-H<sub>4</sub> weniger stark als ohne Oxamat (vgl. Abb. 4-35 b, dritter Ansatz).

Die Modulation der Aktinpolymerisation durch die LDH und ihre Bindung an Aktin ist demnach eine Funktion der Aktivität der LDH: ist das Enzym kompetitiv inhibiert, so findet weder eine Aktinpolymerisation (Abb. 4-37 a) noch das in Abb. 4-35 b beobachtete starke Sedimentieren, sprich ein „clustern“ des Enzyms, statt.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels 4.5.3:

Aktin + LDH	Viskosität	LDH-Aktivität	LDH im Pellet	Verstärkte Aktinbände im Überstand
+ NADH	+		nur	
+ NAD <sup>+</sup>	0		keine Daten	
+ NADH + Pyruvat	-	-	schwach	ja
+ NAD <sup>+</sup> + Laktat	+	+	stark	nein
+ NADH + Pyr. + Oxamat	-	-	nein	ja
+ NAD <sup>+</sup> + Lak. + Oxamat	-	-	schwach	nein

Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse der Viskositätsmessungen mit den Ergebnissen der Extinktionsmessungen und den Kosedimentationsversuchen. + = fördernder Effekt, - = hemmender Effekt, 0 = kein Effekt. Die Höhe der steady-state-Viskosität steht im positiven Zusammenhang zur Höhe der Enzymaktivität und der Aggregation der LDH-H<sub>4</sub>. Niedrige steady-state-Viskositäten gehen (in den meisten Fällen) mit einem erhöhten Anteil nicht-filamentösen Aktins im Überstand einher.

### 4.6 Mechanik von Neurofilamenten mit und ohne assoziierten Mikrotubuli

Das letzte Kapitel dieser Arbeit befasst sich mit der Mechanik von Intermediärfilamenten. Repräsentativ für diese Gruppe zytoskelettärer Elemente soll das Neurofilament sein.

Die Polymerisation der Neurofilamentproteine in Saccharose-D<sub>2</sub>O-Puffer kann durch die Zugabe von 5 mM MgCl<sub>2</sub> eingeleitet werden. ORR-Messungen, die kurz nach der Salzzugabe gestartet wurden, zeigen, dass die Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation zunächst fällt, um dann nach etwa 10 Minuten konstant anzusteigen. Die Dämpfung steigt mit zunehmender Bündelung der Neurofilamente gleichfalls konstant an (Abb. 4-38).

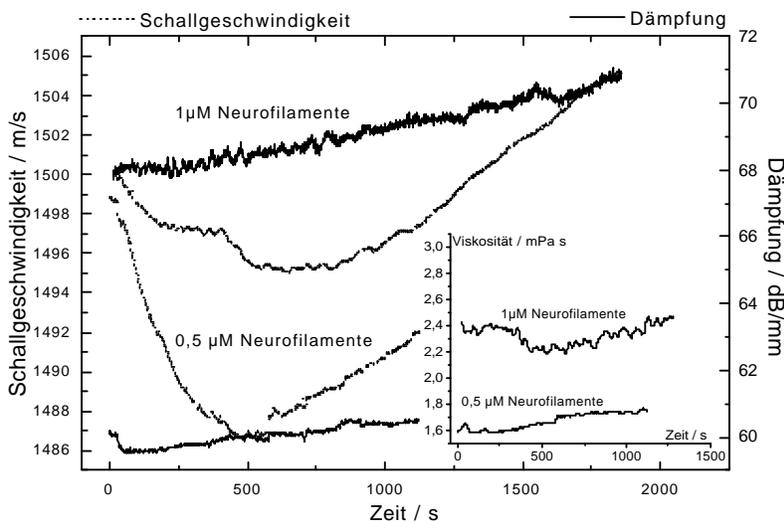


Abb. 4-38: Mechanik von Neurofilamenten (molares Verhältnis NF-H:NF-M:NF-L = 2:3:7) während der Inkubation im ORR bei 25 °C. Die Schalldämpfung steigt für beide Konzentrationen (0,5 und 1 μM) konstant an, wohingegen die Schallgeschwindigkeit zunächst fällt, um dann nach 500-800 Sekunden konstant anzusteigen. Während dieses Anstieges nimmt auch die Viskosität der Lösung zu. Die Schalldämpfung ist im Vergleich zu Aktin 10-20 dB/mm höher.

Der Schallgeschwindigkeitsanstieg während des Bündelungsprozesses von Neurofilamenten weist gleichzeitig auf eine zunehmende Steifheit der Filamente hin, was möglicherweise eine Folge der „compaction“-Phase ist (s. Kap. 2.3.3.5). Auch die Viskosität steigt während dieser Phase leicht an (Neben- grafik in Abb. 4-38). Bei höher konzentrierten Neurofilamenten (1  $\mu\text{M}$ ) wurden starke Schwankungen in der Viskosität gemessen, die wahrscheinlich auf Fluktuationen im Sol-Gel-Gleichgewicht deuten (was auf ein periodisches Ent- und Verwirren der Neurofilamente in ihre Protofilamente hinweist, vgl. Kap. 2.3.3.5). Die Fluktuationen korrelieren nicht mit Temperaturschwankungen (Daten nicht gezeigt).

Anschließend folgte die Untersuchung der Interaktion von MAP-freien Mikrotubuli mit Neurofilamenten. Hierzu wurden im ORR zu 15  $\mu\text{M}$  MAP-freien Mikrotubuli (in 5 % DMSO) nach 25-minütiger Inkubation 0,15  $\mu\text{M}$  Neurofilamente beigemischt (Abb. 4-39). Die Schallgeschwindigkeitszunahme von 15 m/s verweist auf die Bildung elastischer Mikrotubuli (vgl. Kap. 4.2). Der Anstieg der Schalldämpfung um 2 dB/mm deutet möglicherweise auf Interaktionen einzelner Mikrotubuli während der langen Inkubationszeit. Nach der Zugabe von Neurofilamenten stieg die Viskosität deutlich an.

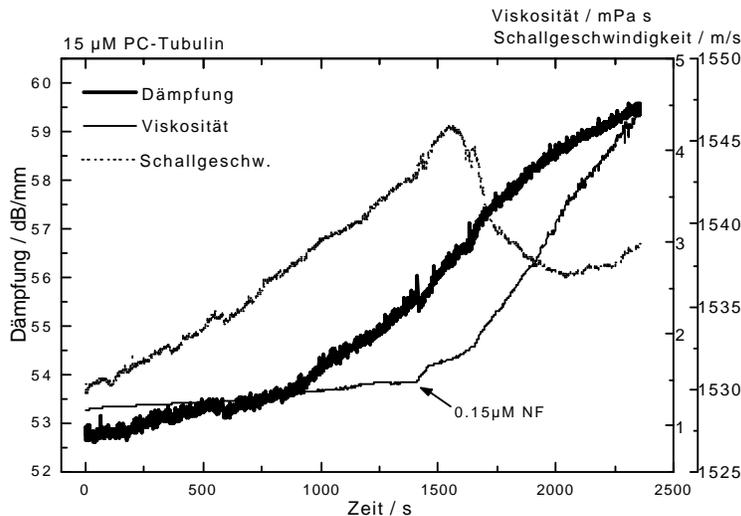


Abb. 4-39: Mechanik von 15  $\mu\text{M}$  PC-Tubulin vor und nach der Zugabe von 0,15  $\mu\text{M}$  Neurofilamenten bei 37 °C. Vor der Zugabe der Neurofilamente nehmen alle drei mechanischen Parameter konstant zu. Nach der Zugabe der Neurofilamente nimmt die Viskosität des Zytogels deutlich zu, während die Schallgeschwindigkeit abfällt. Gleichzeitig nähert sich die Schalldämpfung logarithmisch einem Sättigungswert an. Die Grafik zeigt eine typische Messung von drei durchgeführten Versuchen.

Die Schallgeschwindigkeitsabnahme, etwa 3 Minuten nach der Zugabe der Neurofilamente, zeigt einen ähnlichen Verlauf wie er während des Bündelungsprozesses der Neurofilamente alleine (Abb. 4-38) beobachtet wurde (wobei in Abb. 4-38 die Bündelung durch die Zugabe von 5 mM  $\text{MgCl}_2$  induziert wurde, was in Abb. 4-39 nicht der Fall war).

Ob der Viskositätsanstieg nach der Zugabe der Neurofilamente (Abb. 4-38) eine Folge der Aggregation der Neurofilamente oder der Aggregation von Tubulin-Oligomeren ist, sollte eine Herabsetzung der Tubulinkonzentration nahe der kritischen Konzentration klären. Abb. 4-40 zeigt, dass die Viskosität tatsächlich nach der Zugabe der Neurofilamente auch bei sehr geringen Tubulinkonzentrationen (4  $\mu\text{M}$ ) ansteigt.

Da eine Nukleotiddiphosphokinase an die Neurofilamente assoziiert ist (Aamodt und Williams, 1984a), sollte auch die Online-Zugabe von ATP untersucht werden (Abb. 4-40).

## ERGEBNISSE

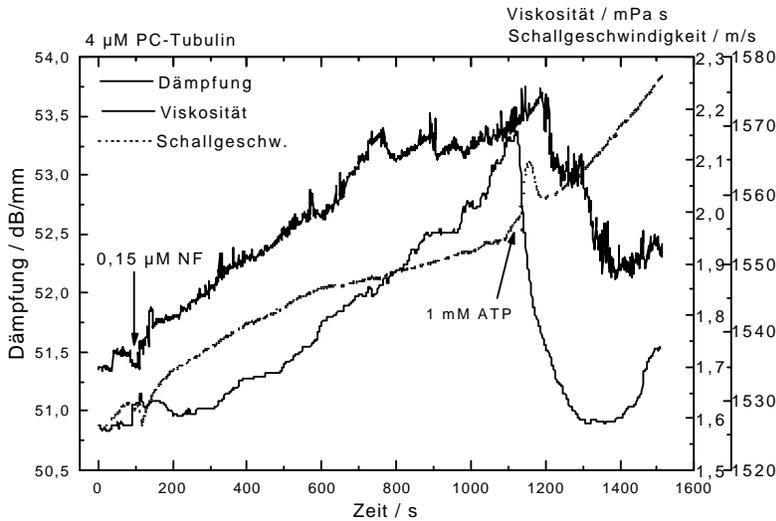


Abb. 4-40: Änderung der Mechanik von 4 µM PC-Tubulin nach der Zugabe von 0,15 µM Neurofilamenten und 1 mM ATP. Nach der Zugabe der Neurofilamente nehmen alle drei mechanischen Parameter zu. Die Zugabe von ATP führt erst zu einer erheblichen Abnahme der Viskosität. Gleichzeitig steigt die Schallgeschwindigkeit um 10 m/s an, um nach einer Minute um den gleichen Wert wieder abzufallen. Anschließend sinkt die Schalldämpfung um 1,5 dB/mm. Die Viskoelastizität nimmt nach der ATP-Zugabe mit einer höheren Steigung zu als vor der ATP-Zugabe. Die Grafik zeigt eine typische Messung zweier reproduzierter Experimente.

Es zeigte sich, dass nach der Zugabe von ATP zu einer Lösung aus Mikrotubuli und Neurofilamenten (molares Verhältnis 27:1) die Viskosität auf die Hälfte ihres Ausgangswertes abfällt. Zeitgleich nimmt die Elastizität innerhalb von 30 Sekunden um 10 m/s zu, um dann wieder um den gleichen Wert innerhalb von 30 Sekunden abzufallen, wobei anschließend die Schalldämpfung um 1,5 dB/mm sinkt.

## 5 DISKUSSION

---

### 5.1 Vergleich des ORR mit herkömmlichen Rheometern

Die Monomer/Polymer Transition zytoskelettärer Elemente bildet die molekulare Basis zur Kontrolle der Zellform, Motilität, Migration und Invasivität von Zellen. Die Änderungen der Filamentlängen werden durch bindende Proteine kontrolliert, wodurch sich die viskoelastischen Eigenschaften des Zytoplasmas ändern. Die Kenntnis der mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zytoskelettelemente *in vitro* (mit und ohne bindender Proteine) ist die Grundlage zum Verständnis der Zellmechanik. Daher wurden zahlreiche Rheometer zur Bestimmung der Fließeigenschaften des Zytoplasmas entwickelt. Ein typisches Rheometer ist ein Rotationsrheometer. Die Flüssigkeit befindet sich hier zwischen zwei Platten bzw. einer Platte und einem Kegel, dessen Rotationsfrequenz eine Funktion der Viskoelastizität der Flüssigkeit ist. Beispiele hierfür sind das Zaner-Viskoelastometer (Zaner et al., 1981) oder das Janmey'sche Torsionspendel (Janmey, 1991). Im Vergleich zum ORR wirken sich die nur unvollständige Ausbreitung der Viskositätsscherwelle, hohe Scherkräfte sowie deutliche Oberflächeneffekte nachteilig auf die Messpräzision aus.

Exaktere Ergebnisse liefern daher Rheometer, deren Sensor vollständig in die Lösung eintaucht. Neben dem ORR ist als Beispiel das oszillierende Magnetkugel-Rheometer (Zaner et al., 1989; Ziemann et al., 1994) zu erwähnen, welches auch geeignet ist, die Viskoelastizität des Zytoplasmas von lebenden Zellen zu bestimmen. Valberg und Albertini (1985) schätzen mit dieser Methode die Viskosität des Zellplasmas von Makrophagen aus dem Lungenepithel auf 13 kPa s (die Magnetkugeln sind so klein, dass Tiere sie mit der Luft einatmen können).

Ein Scherkraft-unabhängiges Rheometer ist das spektroskopische Rheometer von Wirtz („diffusing wave spectroscopy microrheometer“) (Palmer et al., 1999). Mechanische Parameter, wie das Elastizitätsmodul der Flüssigkeit, werden hier auf der Basis der Lichtstreuung berechnet. Auch mit dem ORR erfolgt die Berechnung des Elastizitätsmoduls frei von Scherkräften, da lediglich die Schallgeschwindigkeit der Flüssigkeit bei 1 GHz bestimmt wird. Relaxationszeiten von Makromolekülen liegen im Bereich von 10 GHz (Cracknell, 1980), wodurch bei einer Anregung von 1 GHz die intrinsische Mechanik der Moleküle nicht beeinflusst wird. Aber auch die Viskositätsmessungen erfolgen zerstörungsfrei wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt.

Neben der synchronen Detektion des Young's Moduls, der dynamischen Viskosität und der Schalldämpfung, bietet das ORR im Vergleich zu anderen Rheometern ferner die Möglichkeit, auch während der Messung noch Substanzen der Probe zuzufügen. Somit können zeitlich hoch aufgelöste (> 1 Hz) Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 4-18 d, Abb. 4-32 oder Abb. 4-39) oder der Einfluss von Toxinen auf die Mechanik zytoskelettärer Elemente (Abb. 4-11, Abb. 4-13 oder Abb. 4-15) beobachtet werden. Die Messprobe wird durch die Zugabe weiterer Flüssigkeiten meist nur mit einem 20tel ihres Volumens verdünnt. Dieser Verdünnungseffekt verändert jedoch nicht die Viskosität der Probe (z.B. Abb. 4-32, Kreuze: die Aldolase-Zugabe wirkt sich nur auf die Elastizität aus). Ferner können Messungen bis > 75 Minuten ohne detektierbare Einflüsse durch Verdunstungen der Probe durchgeführt werden (Abb. 4-5 b). Die Bestimmung von Polymerisationskinetiken sind aber meist nur bis zum Erreichen der Viskositäts- bzw. Elastizitätsgleichgewichtszustände instruktiv. Daher erfolgten die Messungen in der Regel nicht länger als 40 Minuten.

Scherkraft-unabhängige Messungen der Aktinpolymerisation können auch mit fluoreszenzmarkiertem Aktin erfolgen, da die Quantenausbeute während der G/F-Transition zunimmt. Bei diesen Messungen wird das Ausmaß der Polymerisation gleich der Länge der Filamente gesetzt. Da aber auch nicht-filamentöses Aktin bzw. kurze Filamente die Viskosität einer Lösung erhöhen können (s. Abb. 4-16; vgl. Abb. 4-18 a, P:A = 0,25:1 und Tafel 4-3 e, f; vgl. Abb. 4-27 a, gepunktete Linie und Tafel 4-4) sind diese Messungen nur hinlänglich genau. Die Fluorochrome können zudem Aktinbindungsstellen maskieren bzw. besetzen, was die Bestimmung des Einflusses von Aktin-bindenden Proteinen auf die Polymerisation von Aktin erschwert (vgl. Perelroizen et al., 1996).

Die Aktinpolymerisation kann auch mit der Photospektrometrie zerstörungsfrei bestimmt werden, da sich die optische Dichte von Aktin während der G- zu F-Transition ändert. Nach Cooper und Pollard (1982) ist die Lichtstreuung proportional zur Polymer-masse. Infolgedessen können auch hier nicht-filamentöse Strukturen unterhalb der kritischen Konzentration nicht detektiert werden. Umgekehrt werden die Messungen insignifikant, wenn die Filamentlängen 90 nm überschreiten (Wegner und Engel, 1975).

Weitere Methoden zur Bestimmung der Aktinpolymerisation bestehen u.a. in der Auswertung der Filamentlängen mit Hilfe von EM-Aufnahmen oder der Bestimmung der Polymermasse mittels Ultrazentrifugation. Im ersten Fall können jedoch Artefakte wie Eintrocknungseffekte das Ergebnis beeinflussen, im letzten Fall bewirken hohe Scherkräfte das Brechen von Filamenten (Cooper und Pollard, 1982).

## 5.2 Präzision von ORR-Messungen

Die mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter und dem ORR gemessenen steady-state-Viskositäten und Polymerisationsraten unterscheiden sich deutlich (Abb. 4-2) aufgrund unterschiedlich hoher Scherkräfte: EM-Aufnahmen von Aktin nach Messungen mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter zeigen ein heterogen-anisotropes Aktinnetzwerk (Tafel 4-1 c, d), während die Flüssigkeit aus dem ORR lange und homogen-isotrop verteilte Aktinfilamente zeigt (Tafel 4-1 a, b). Offenbar deformieren die Kugel und der durch sie verursachte Flüssigkeitsstrom die Aktinfilamente und orientieren das Aktinengeflecht im Flüssigkeitsstrom, was die Viskosität der Flüssigkeit herabsetzt.

Zaner und Stossel (1983) begründeten ebenso die mit dem Zaner-Viskoelastometer beobachtete Scherkraft-abhängige Viskositätsabnahme von Aktin ( $\leq 24 \mu\text{M}$ ) durch die zunehmende Parallelorientierung von Aktinfilamenten im Flüssigkeitsstrom. Mit zunehmender Konzentration behindern sich die Filamente gegenseitig in ihrer freien Rotation, was zu einem festkörperähnlichen Verhalten führt, also die Elastizität des Gels steigt und gleichzeitig die Viskosität fällt. Dass der Effekt der Parallelorientierung von Filamenten mit der Filamentlänge zunimmt, zeigt Abb. 4-14 b: bei niedrigen Cytochalasin D-Konzentrationen sind die Filamente noch hinlänglich lang, um durch die Kugel im Flüssigkeitsstrom orientiert zu werden, was die charakteristische Abnahme der Viskosität kurz nach dem Erreichen der steady-state-Phase belegt. Mit zunehmender Cytochalasin D-Konzentration werden die Filamente kürzer (Tafel 4-2) und der Effekt der Viskositätsabnahme durch Parallelorientierung verschwindet.

Ebenso viskositätsmindernd wirkt sich das Brechen von Aktinfilamenten durch hohe Scherkräfte aus: Maruyama et al. (1974) wiesen nach, dass Aktinfilamente durch die hohe Scherrate im Kapillarviskosimeter zerstört werden. Für eine  $24 \mu\text{M}$  Aktinlösung werden bei einer Scherrate  $>100 \text{ s}^{-1}$  Viskositätswerte zwischen 0,5 und 1 mPa s gemessen. Wird die Scherrate auf  $5 \text{ s}^{-1}$  abgesenkt, können Viskositäten von bis zu 5 mPa s bestimmt werden. Dieser Wert liegt höher, als der mit dem ORR bestimmten von 3 mPa s für  $24 \mu\text{M}$  Aktin, was auf unterschiedliche Filamentlängenverteilungen oder Kontaminationen von Aktin-bindenden Proteinen (z.B. ABP oder CapZ) zurückzuführen ist. Letztere erhöhen die Viskosität, da sie quervernetzend wirken (Jen et al., 1982).

Nach einer geläufigen Annahme fördern höhere Scherkräfte die Polymerisationsrate von Aktin (Cooper und Pollard, 1982; Ferri und Grazi, 1982). Erklärt wird dies durch eine Erhöhung von Aktin-Oligomeren, die durch das Brechen von Aktinfilamenten entstehen und als Polymerisationskeime wirken. Diese Annahme kann jedoch nach Abb. 4-2 b nicht verallgemeinert werden, denn ORR-Messungen (mit sehr niedrigen Scherkräften, Abb. 4-3) ergeben höhere Polymerisationsraten als Messungen mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter (mit vergleichsweise sehr hohen Scherkräften).

Messungen mit dem ORR und dem Mikro-Kugelfallviskosimeter zeigen eine annähernd sigmoidale Zunahme der steady-state-Viskosität und der Polymerisationsrate mit zunehmender Aktinkonzentration (Abb. 4-2). Dieser Kurvenverlauf spricht für eine mit steigender Aktinkonzentration zunehmende Bündelung und Packung der Filamente (vgl. Tang and Janmey, 1996) sowie spontanen Quervernetzungen (vgl. Griffith and Pollard, 1982) über Aktin-Aktin-Kontakte (Hori et al., 1995). Möglich ist die Ausbildung eines Netzwerkes über Aktin-Aktin-Kontakte nach dem „lateral slipping“-Modell von Bremer und Aebi (1992). Demnach öffnet sich das Aktinfilament alle 2-6 Untereinheiten, was nach Ansicht von Carlier et al. (1996) zu Paarungen von Aktinuntereinheiten zweier Aktinfilamente führen kann und dadurch Filamente quervernetzt.

Die Standardabweichung der Viskositäten newtonscher Flüssigkeiten beträgt für beide Geräte (ORR und Kugelfallviskosimeter)  $1 \% \pm 0,5 \%$  (vgl. Abb. 4-1). Die Standardabweichungen der Viskositäten nicht-newtonscher Flüssigkeiten können dagegen bis zu 6 % (je nach Aktinkonzentration) betragen (Abb. 4-2). Die Ursache besteht, wie oben erwähnt, in einer variierenden Filamentlängenverteilung und Homogenität des Aktinnetzes. Letztere ist auch durch die Art der Präparation des Aktins bedingt. So kann z.B. eine an die Spudich/Watt-Präparation anschließende Gelfiltration weitere „cross-linker“ entfernen, die nach Zaner und Hartwig (1988) auch die mechanischen Eigenschaften von F-Aktin ändern. Auch die Bildung winzig kleiner Luftblasen kann rheologische Messungen stark beeinflussen, weshalb die Proteinlösungen vor den Messungen entgast werden. Aus den genannten Gründen schwanken die mit den verschiedensten Rheometern untersuchten und in der Literatur beschriebenen mechanischen Parameter von F-Aktin bis zu zwei Größenordnungen, was den Vergleich der Werte untereinander beträchtlich erschwert (s. Janmey et al., 1994).

## 5.3 Viskoelastische Eigenschaften von Aktin und Aktin/a-Aktinin Gelen

### 5.3.1 Manipulation der Viskoelastizität von Aktin und Aktin/a-Aktinin Gelen durch amplitudenvariante Deformationen im Nanometerbereich

Wie oben beschrieben sind die erzeugten Scherkräfte des ORR-Viskositätssensors äußerst gering (etwa 15 nm Auslenkung bei 3 kHz Oszillationsfrequenz). Während der Polymerisation von Aktin wird die Schwingungsamplitude der Glasfaser aufgrund der steigenden Viskosität der Flüssigkeit zunehmend gedämpft (etwa 0,12

nm/s pro 0,03 mPa s). Je nach Proteinkonzentration wird so die Schwingungsamplitude von etwa 80-100 nm auf etwa 520 nm reduziert. Diese Abnahme zu noch geringeren Auslenkungen der Glasfaser verringert zusätzlich den Einfluss von Scherkräften auf das F-Aktin. Auch die schrittweise Erhöhung der Schwingungsamplitude von 2 auf 30 nm reduziert die Viskosität einer F-Aktinlösung nicht (Abb. 4-3 a). Ebenso verläuft die Messung für Aktinkonzentrationen  $> 50 \mu\text{M}$  zerstörungsfrei, wenn die Amplitude impulsartig um mehrere zehn Nanometer erhöht wird (Abb. 4-3 b).

Für niedrige Aktinkonzentrationen ( $< 25 \mu\text{M}$ ) kann die steady-state-Viskosität durch eine impulsartige Erhöhung der Schwingungsamplitude der Glasfaser reduziert werden (Abb. 4-4 a). Die Aktinfilamente sind hier weniger dicht gepackt (vgl. Kap. 5.4.1) und ein Umlagern, Deformieren und auch Brechen der Filamente ist möglich. Wird die Schwingungsamplitude wieder gesenkt, erfolgt nach kurzer Zeit eine Viskositätszunahme, da sich das Aktinnetz wieder regeneriert, weil das deformierte Netz aufgrund seiner Elastizität nach Zurücknahme der Scherung wieder in seine isotrope Ausgangsform relaxieren kann. Ferner können gebrochene Filamente sich longitudinal zusammenschließen („annealing“). Die Elastizität des Aktinnetzwerkes kann man durch die Zugabe von  $\alpha$ -Aktinin erhöhen, wodurch das Aktinnetz deutlich resistenter gegen Deformationen mit der Glasfaser wird (Abb. 4-4 b).

Sato et al. (1985), Newman et al. (1993) und Janmey et al. (1994) beschrieben F-Aktin ( $24\text{-}36 \mu\text{M}$ ) als elastisches, isotropes Polymernetzwerk, das nach Deformationen wieder in seine Ausgangsform relaxiert. Deformiert man Aktin im Rotationsrheometer durch das Gegeneinanderverschieben der Platten um nur 1-20 % (bei 1 rad/s mit maximal 10 Pa Scherkraft), kommt es zunächst zu einem „hardening“-Effekt, wodurch die Elastizität durch vermehrte Selbstassoziation der Filamente plötzlich stark ansteigt. Eine über 20 %ige Deformation lässt das Aktinnetz reißen, wobei sich das Netz nach einigen Minuten wieder regeneriert. Über 100 %ige Deformationen führen dagegen zu irreversiblen Schäden am Aktinnetz, das dann zudem kein elastisches Verhalten mehr zeigt. Bei diesen Versuchen wird das gesamte Volumen des Gels zwischen zwei Platten deformiert. Bei den oben genannten Experimenten mit dem ORR wird dagegen nur eine „Mikrodeformation“ innerhalb des Aktinnetzes eingeleitet. Auch hier kann das Aktinnetz offenbar zum Teil irreversibel deformiert werden, denn bei periodischer Applikation hoher Scherkräfte nimmt die Viskosität sukzessiv ab (Abb. 4-4 a,  $> 300$  Sekunden). Die polymerisationsfördernde Wirkung von  $\alpha$ -Aktinin (Holmes et al., 1971) reduziert diesen Effekt allerdings (Abb. 4-4 b).

### 5.3.2 Manipulation der Viskoelastizität von Aktin und Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gelen durch frequenzvariante Deformationen im Nanometerbereich

Wie oben gezeigt, kann sich durch die leichte Verformbarkeit des Aktinnetzes die Viskosität der Lösung massiv ändern. *In vivo* bringt das quervernetzende Protein  $\alpha$ -Aktinin das Aktinnetz im Zellkortex in eine stabile Form. *In vitro* zeigt sich die Rigidität eines  $\alpha$ -Aktinin/Aktin-Gels in seiner Abhängigkeit von der Deformationsfrequenz, was ein Charakteristikum viskoelastischer Flüssigkeiten ist (vgl. Kap. 2.3.2).

Die durch den ORR erzeugte Scherkraft besteht aus zwei Komponenten: erstens, der Kraft, die durch das Ultraschallsignal (1 GHz) erzeugt wird und zweitens, der Kraft, die die Oszillation der Glasfaser (0,5-3 kHz bei etwa 1-15 nm) hervorbringt. Die Komponente des Ultraschalls kann aufgrund der extrem hohen Frequenz (und sehr kleiner Amplitude) als nicht-destruktiv betrachtet werden, da, wie bereits erwähnt, erst ab 10 GHz Resonanzen von Makromolekülen zu erwarten sind. Die durch die Glasfaser erzeugte Scherkraft ist für kleine Amplituden ebenfalls nicht-destruktiv und verändert auch die Elastizität von Aktin ( $24 \mu\text{M}$ ) im Frequenzbereich von 50 Hz bis 33 kHz bei einer mittleren Schwingungsamplitude von 15 nm nicht (Abb. 4-6). Erst mit zunehmender Quervernetzung und Bündelung der Aktinfilamente wird mit steigender Deformationsfrequenz mechanische Energie durch die Anspannung der Fibrillen elastisch gespeichert. Daher nimmt das Elastizitätsmodul von Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gelen (molares Verhältnis 12:1) mit zunehmender Deformationsfrequenz zu, was typisch für einen viskoelastischen Körper ist.

Ein ähnliches Experiment führten Sato et al. (1987) und Wachsstock et al. (1993) mit einem Platte-Kegel-Rheometer durch, allerdings für wesentlich niedrigere Frequenzen und großflächigere Deformationen ( $10^{-4}$  bis 1 Hz bei einer Amplitude von  $8 \mu\text{m}$  und einer maximalen Deformation von 1 %). In Einklang mit den Befunden der vorliegenden Arbeit ändert sich das Schermodul  $G'$  („dynamic storage modulus“) von F-Aktin ( $24 \mu\text{M}$ ) nur unwesentlich mit der Deformationsfrequenz, wohingegen nach der Zugabe von  $\alpha$ -Aktinin ( $1,6 \mu\text{M}$ ) ein deutlicher Anstieg gemessen wurde. Gleichzeitig nimmt die dissipative Komponente  $G''$  („dynamic loss modulus“), sprich die Viskosität, ab. Bei diesen Versuchen wird das vollständige Gel zwischen zwei Platten deformiert, also die Elastizität des gesamten Aktinnetzwerkes bestimmt. Bei Verwendung des ORR wird dagegen nur ein Teil des Netzwerkes deformiert. Da man aber mit beiden Methoden ähnliche Resultate erzielt, kann davon ausgegangen werden, dass die Mechanik einzelner Bereiche des Aktinnetzes zur Elastizität des gesamten Netzwerkes beiträgt. Dieser Befund ist konsistent mit dem Tensegrity-Model von Ingber (1993), welches besagt, dass jedes einzelne Aktinfilament bzw. Aktinbündel (Stressfaser) zur gesamten Elastizität der Zelle beiträgt. Das Aktinnetzwerk wird hier im architektonischen Sinne als eine Vielzahl elastischer Federn dargestellt,

## DISKUSSION

die über Gelenke (Aktin-bindende Proteine) untereinander und mit der Zellmembran verbunden sind, wobei die Form des Netzwerkes durch die stützende Funktion starrer Stäbe (Mikrotubuli) stabilisiert wird.

### 5.4 Konzentrationsabhängigkeit der Viskoelastizität von F-Aktin- und Mikrotubuligelen

#### 5.4.1 Konzentrationsabhängigkeit der Viskoelastizität von F-Aktin

Mit herkömmlichen Rheometern kann man die Elastizität einer Flüssigkeit als eine Funktion der Rotationsfrequenz der Platten beschreiben und durch das Schermodul  $G'$  ausdrücken. Mit dem ORR wird die Elastizität der Lösung über die Schallgeschwindigkeit bestimmt, welche im direkten Verhältnis zum Kompressions- und Schermodul der Flüssigkeit steht (Gl. 11). Das Schermodul ist jedoch wesentlich kleiner als das Kompressionsmodul. So beträgt nach Janmey et al. (1994) das Schermodul eines  $50 \mu\text{M}$  F-Aktin gels etwa  $100 \text{ Pa}$  und nach ORR-Messungen (Abb. 4-10 und Gl. 13) das Kompressionsmodul eines gleichmolaren F-Aktin gels  $3,72 \text{ GPa}$ .

Das Kompressionsmodul für Proteinlösungen kann in zwei Komponenten aufgeteilt werden. Es besteht zum einen aus dem vergleichsweise hohen Kompressionsmodul des Lösungsmittels (z.B. Wasser bei  $25^\circ\text{C} = 3,74 \text{ GPa}$ ) und zum anderen aus dem wesentlich geringeren Kompressionsmodul des Proteins (z.B. für  $50 \mu\text{M}$  Aktin =  $20 \text{ kPa}$ , abzüglich der Elastizität des Aktinpuffers). Mit zunehmender Proteinkonzentration nimmt gleichzeitig die Volumenfraktion des Proteins zu, also die Komponente mit dem niedrigeren Kompressionsmodul, wodurch das gesamte Kompressionsmodul erniedrigt ist:

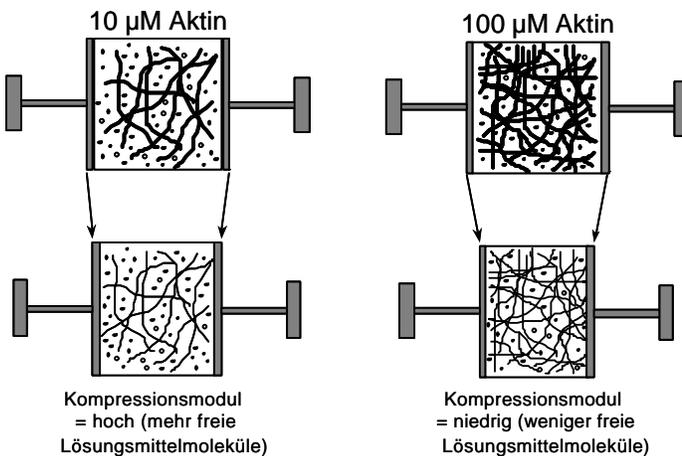


Abb. 5-1: Modell zur Veranschaulichung der konzentrationsbedingten Abnahme der Elastizität von F-Aktin (und Mikrotubuli) nach Abb. 4-10. Das Kompressionsmodul einer Proteinlösung kann in zwei Komponenten eingeteilt werden: die des Lösungsmittels und die des Proteins. Proteinfilamente sind im Vergleich zum Lösungsmittel leichter komprimierbar, besitzen daher ein niedrigeres Kompressionsmodul. Mit zunehmender Proteinkonzentration nimmt die Komponente des niedrigeren Kompressionsmoduls zu und daher das gesamte Kompressionsmodul ab.

Ferner binden die Polymere weniger Lösungsmittelmoleküle als die Monomere. Daher nimmt mit zunehmender Hydratation der Filamente das gesamte Kompressionsmodul ab. Suzuki et al. (1996) beobachteten, dass dem Lösungsmittel  $1 \text{ ml}$  Wasser pro  $\text{mg}$  Protein während der Polymerisation von Aktin entzogen wird, wodurch sich das Kompressionsmodul erniedrigte. Dass die konzentrationsbedingte Abnahme des Elastizitätsmoduls eine Funktion der filamentösen Form der Proteine ist und kein Proteinkonzentrationseffekt, zeigt die sich nur gering verändernde Viskoelastizität vor der Polymerisation (z.B. Abb. 4-7 und Abb. 4-8).

Schallgeschwindigkeitsmessungen von Aktinlösungen haben bisher nur Suzuki et al. (1996) durchgeführt, wiewohl lediglich für sehr hohe Proteinkonzentrationen. Auch wurden die Messungen nicht während der Polymerisation von Aktin durchgeführt. Die Autoren verwendeten eine sogenannte „sing-around pulse“-Methode: die Probe wird hierbei mit einer Piezokeramik beschallt ( $5 \text{ MHz}$ ) und der reflektierte, zeitversetzte Schall gemessen (s. Tamura et al., 1993). So wurde für F-Aktin im Vergleich zu G-Aktin eine Abnahme der Kompressibilität gemessen. Die Schallgeschwindigkeit von  $50 \mu\text{M}$  Aktin unterschied sich von  $100 \mu\text{M}$  Aktin nur um  $1,5 \text{ m/s}$ . Diese geringen Änderungen stimmen in etwa mit den Daten aus Abb. 4-10 (a) überein. Die Abbildung zeigt ferner, dass zwischen  $50$  und  $100 \mu\text{M}$  Aktin bereits die höchste Packungsdichte der Filamente erreicht ist, weshalb auch nur geringe Schallgeschwindigkeitsunterschiede detektiert werden können.

Die Autoren bestimmten weiterhin eine positive spezifische adiabatische Kompressibilität von G-Aktin mit  $9,3 \cdot 10^{-12} \text{ Pa}^{-1}$  und eine negative Kompressibilität von F-Aktin mit  $-12,7 \cdot 10^{-12} \text{ Pa}^{-1}$ . Die partielle spezifische adiabatische Kompressibilität  $\beta_s$  ( $\text{Pa}^{-1}$ ) wurde bestimmt mit:

$$\beta_s = \frac{\beta_0}{v_0} \left( -\frac{2 \cdot 10^3}{u_0} + \left( \frac{\Delta u}{c} \right)_{\lim c \rightarrow 0} - \frac{1}{\rho_0} + 2v_0 \right) \quad (24)$$

mit  $\beta_0 = 1/(\rho_0 u_0^2) =$  adiabatische Kompressibilität des Lösungsmittels ( $\text{Pa}^{-1}$ ),  $v_0 =$  spezifische Volumen der Proteinlösung ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) (über Densitometrie bestimmt),  $u_0 =$  Schallgeschwindigkeit des Lösungsmittels ( $\text{cm/s}$ ),  $\Delta u = u - u_0$  (mit  $u =$  Schallgeschwindigkeit der Proteinlösung) und  $\rho_0 =$  Dichte des Lösungsmittels ( $\text{g/ml}$ ).

Mit dieser Gleichung kann die spezifische adiabatische Kompressibilität mit den Daten der vorliegenden Arbeit berechnet werden:

Mit  $v_0 = 0,632 \text{ cm}^3/\text{g}$  (nach der Berechnung von Suzuki et al., 1996),  $\rho_0 = 0,998$ ,  $u_0 = 149800 \text{ cm/s}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and  $\left( \frac{\Delta u}{c} \right)_{\lim c \rightarrow 0} = -10 \text{ cm/s}$  (berechnet nach Abb. 4-10 a) errechnet sich ein Wert für  $\beta_s$  von  $-6,9 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ , welcher

um zwei Größenordnungen höher ist als der von Suzuki et al. (1996) berechnete von  $-12,7 \cdot 10^{-12} \text{ Pa}^{-1}$ .

Die Unterschiede sind in den verwendeten, unterschiedlich hohen Proteinkonzentrationen begründet. Suzuki et al. (1996) berechneten  $\left( \frac{\Delta u}{c} \right)_{\lim c \rightarrow 0}$  mit hochmolaren Proteinkonzentrationen ( $50\text{-}145 \text{ } \mu\text{M}$ ), wohingegen

$\left( \frac{\Delta u}{c} \right)_{\lim c \rightarrow 0}$  nach den vorliegenden Daten mit hohen *und* niedrigen Konzentrationen ( $2\text{-}100 \text{ } \mu\text{M}$ ) berechnet wurde.

Ferner können unterschiedliche Filamentlängenverteilungen, Packungsdichten, Luftblasen und Kontaminationen zu verschiedenen Messergebnissen führen. Möglicherweise liefert auch die Wahl der Anregungsfrequenz ( $5 \text{ MHz}$  im Vergleich zu  $1 \text{ GHz}$ ) unterschiedliche Ergebnisse.

#### 5.4.2 Konzentrationsabhängigkeit der Viskoelastizität von Mikrotubuligelen

Es gibt nur wenige Studien, die sich mit den viskoelastischen Eigenschaften von Mikrotubuligelen befassen. Olmsted und Borisy (1973) haben mit einem Ostwald Kapillarviskosimeter verschiedene Konzentrationen von Mikrotubuli ( $10\text{-}110 \text{ } \mu\text{M}$ ) vermessen und erhielten eine ähnlich sigmoidal verlaufende steady-state-Viskositätskurve wie in Abb. 4-10 b dargestellt. Der Kurvenverlauf kann, ähnlich wie für Aktin (Abb. 4-10 a), mit einer zunehmenden Interaktion der Polymere aufgrund schwacher Affinitäten mit steigender Proteinkonzentration erklärt werden. Dies führt zu einer erhöhten Parallelorientierung und Seite-an-Seite-Aggregation der Polymere was niedrigere Viskositätswerte zur Folge hat.

Eine deutliche Viskositätserhöhung durch MAP-freie Mikrotubuli ist jedoch nur dann messbar, wenn die Polymere miteinander interagieren. Die Affinitäten der Mikrotubuli untereinander sind allerdings äußerst gering (vgl. Sato et al., 1988), sodass während der Inkubation von Tubulin bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  eine wahrnehmbare Viskositätserhöhung erst bei höheren Konzentrationen ( $> 15 \text{ } \mu\text{M}$ ) messbar ist (Abb. 4-8, Abb. 4-39), was konsistent mit den Befunden von Leterrier et al. (1984) oder Sato et al. (1988) ist. An dieser Stelle sei auch das leichte Denaturieren von Mikrotubuli aus PC-Tubulin erwähnt. Im Falle einer Denaturierung in der ORR-Messkammer wären Messungen jedoch unmöglich, da dies zu einem starken Rauschen des empfangenen Signals führen würde. Gleichzeitig schützt die Polymerisation von Tubulin die Polymere vor Denaturationen (Leterrier, 1999).

Auch für Mikrotubuli in Lösung zeigte sich eine konzentrationsbedingte Abnahme der steady-state-Elastizität (Abb. 4-10 b), die vermutlich eine zunehmende Packungsdichte der Röhren anzeigt. Packungsvolumina verschiedener Mikrotubulikonzentrationen wurden von Brown und Berlin (1985) bestimmt. Mit der Methode der Ultrazentrifugation berechneten sie ein standardisiertes Packungsvolumen von MAP-freien Mikrotubuli von  $10,3 \pm 2,3 \text{ } \mu\text{l}/\text{mg}$  Protein. Die Elongation der Elastizitätskurve in Abb. 4-10 b (Boltzmann-Fit), welche sich einem Minimalwert annähert, führt zu einem Wert von  $120 \text{ } \mu\text{M}$ , welcher *de facto* der von Brown und Berlin (1985) berechneten höchsten Packungsdichte der Filamente entspricht.

Die steady-state-Elastizität von Mikrotubuli ändert sich nach Abb. 4-10 b am stärksten zwischen  $25 \text{ } \mu\text{M}$  und  $85 \text{ } \mu\text{M}$ . Nach Buxbaum et al. (1987) und Sato et al. (1988) beginnt in diesem Bereich eine nematische Phasentransition von zufällig orientierten, flexiblen Mikrotubuli zu einer flüssigkristallinen Struktur mit parallel geordneten, starren Röhren. Auch für Aktin kann die schnelle Elastizitätsänderung zwischen  $15 \text{ } \mu\text{M}$  und  $50 \text{ } \mu\text{M}$  (Abb. 4-10a) eine solche Phasentransition anzeigen. Die höchste Packungsdichte läge dann für Aktin bei etwa  $60 \text{ } \mu\text{M}$ , also die Hälfte der o.g. Mikrotubulikonzentration, obwohl das Aktinfilament ungefähr vier mal dünner ist als ein

Mikrotubulus. Der Grund liegt gegebenenfalls in der enorm hohen Oberflächenladung von Aktin, die zu einer außergewöhnlich großen Hydrathülle führt (vgl. Cantiello et al., 1991<sup>24</sup>). Dennoch ist die Entstehung nematischer Phasen nicht ein Merkmal aller gelöster zytoskelettärer Polymere, denn Fibrin bildet z.B. einen Flüssigkristall allein durch isotrope Quervernetzungen, also ohne laterale Aggregationen (Janmey et al., 1991).

Die Viskosität von Mikrotubuli mit assoziierten MAPs (mikrotubuläres Protein, MTP) unterschied sich von der Viskosität von MAP-freien Mikrotubuli und von F-Aktin, denn sie ist im Vergleich zu MAP-freien Mikrotubuli bei gleicher Proteinkonzentration annähernd dreimal niedriger und im Vergleich zu F-Aktin annähernd doppelt so hoch. Die Elastizität von Mikrotubuli mit MAPs ist im Vergleich zu MAP-freien Mikrotubuli durchschnittlich nur 3 % niedriger und im Vergleich zu F-Aktin 4 % höher (vgl. Abb. 4-10 und Abb. 4-12). Griffith und Pollard (1982) zeigten mit einem Ostwald-Kapillarviskosimeter, dass sich die Viskosität von 40  $\mu\text{M}$  MTP nicht von der Viskosität von 24  $\mu\text{M}$  Aktin unterschied (1 mPa s). Sie führten darüber hinaus Messungen mit einem Miniatur-Kugelfallviskosimeter durch, wobei sie für eine 40  $\mu\text{M}$  MTP-Lösung eine kaum wahrnehmbare, jedoch für eine 24  $\mu\text{M}$  Aktinlösung eine deutliche Viskositätssteigerung bestimmten. Die Unterschiede zu den ORR-Messungen (MTP hat eine doppelt höhere Viskosität als gleichmolares F-Aktin) sind möglicherweise auf die hohen Scherkräfte zurückzuführen, die mit Ostwald-Kapillarviskosimetern bzw. Kugelfallviskosimetern erzeugt werden (s.o.). Leterrier et al. (1991) haben mit einem Miniatur-Kugelfallviskosimeter eine Viskosität von etwa 9 mPa s für 80  $\mu\text{M}$  MTP (60-minütige Inkubationszeit) gemessen. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der mit dem ORR gemessenen Viskosität von MTP, wenn man davon ausgeht, dass die Viskosität etwa linear mit zunehmender MTP-Konzentration ansteigt (Abb. 4-12).

### 5.5 Biphasischer Elastizitätsverlauf während der Polymerisation von Aktin und Tubulin

Während der Polymerisation von Aktin und Tubulin wurde bereits vor einer detektierbaren Viskositätsänderung ein Anstieg der Schallgeschwindigkeit gemessen. In dieser ersten Phase der Elastizitätsänderung bilden sich Nukleationskeime, die den Schall besonders schnell leiten. Während der Polymerisation von Aktin ist diese Änderung gering (0,5-1,5 m/s für 10-100  $\mu\text{M}$  Aktin, Abb. 4-7). Für Tubulin (10-25  $\mu\text{M}$ ) beträgt der Anstieg dagegen bis zu 60 m/s (Abb. 4-8, Abb. 4-9). Dieser deutliche Anstieg der Elastizität während der Tubulinpolymerisation kann dadurch erklärt werden, dass starre Tubulin-Oligomere gebildet werden, die festkörperähnliche Eigenschaften besitzen. Eine breite Vielfalt solcher Oligomere, wie z.B. Ringe, Spiralen, 10 nm Fibrillen, ebene Platten und Reifen-ähnliche Strukturen, wurden von Unger et al. (1990) und Vater et al. (1995) detailliert beschrieben. In der Tat konnte die Zugabe von Taxol zu unpolymerisiertem Tubulin eine deutliche Schallgeschwindigkeitssteigerung induzieren (Abb. 4-11). Die während dieser Schallgeschwindigkeitszunahme nicht zunehmende Viskosität weist darauf hin, dass sich *de facto* keine Mikrotubuli gebildet haben. Denn erst die Vernetzung von Mikrotubuli erhöht die Viskosität einer Lösung, was die Zugabe von Mikrotubuli-abbauenden Substanzen wie Colchizin oder Kalzium zeigt (Abb. 4-13).

Die anfänglich starke Elastizitätssteigerung während der Polymerisation von Tubulin ist also primär der Bildung von Oligomeren und weniger der Bildung von Mikrotubuli zuzuschreiben. Auch erhöht sich die Viskoelastizität von Tubulin nicht durch quervernetzende MAPs (Abb. 4-12). Die Schallgeschwindigkeitsänderung ist hierbei zudem nicht biphasisch. Daraus folgt, dass Mikrotubuli durch die stark polymerisationsfördernde Wirkung der MAPs (Herzog und Weber, 1978; Wiche, 1989) bereits sehr früh gebildet werden, wodurch sich die Viskosität der Lösung erhöht.

Die Schallgeschwindigkeitssteigerung während der ersten Phase der Elastizitätszunahme korreliert überdies nicht mit der Erwärmung des Tubulinpuffers zu Beginn der Messung (Abb. 4-9). Ebenso wird die Elastizität durch die Zugabe von Colchizin oder Kalzium nicht beeinflusst (Abb. 4-13), wodurch Mikrotubuli zwar in oligomere Strukturen fragmentiert werden, jedoch nicht vollständig zu Dimeren depolymerisieren (Saltarelli und Pantaloni, 1982). Auch Sato et al. (1988) zeigten mit einem Rotationsrheometer, dass sich Mikrotubuli und Tubulinoligomere in einem Konzentrationsbereich von 10-20  $\mu\text{M}$  in ihrer Elastizität nicht unterscheiden.

Nach dem schnellen Viskositätsanstieg während der Aktin- und Tubulinpolymerisation, folgt eine zweite Phase der Schallgeschwindigkeitsänderung. Während dieser Phase nimmt, wie oben bereits diskutiert, die Elastizität konzentrationsbedingt, aufgrund zunehmender Hydratisierung der Polymere (Abb. 5-1), ab.

Die Vermutung liegt nahe, dass der Effekt der konzentrationsbedingten Elastizitätsabnahme systemimmanent ist. Durch die Oszillation der Glasfaser könnten Filamente zunehmend aus dem Fokus verdrängt werden und somit Schallgeschwindigkeitsänderungen bedingen. In diesem Fall müsste aber die Schallgeschwindigkeit ansteigen, denn die Kompressibilität des Lösungsmittels ist geringer als die der „weichen“ Proteinfilamente.

<sup>24</sup> Die Autoren postulieren, dass aufgrund dieses Phänomens F-Aktin als elektrisches Kabel betrachtet werden kann, welches intrazelluläre Signale vermittelt.

Auch könnte ein Herabsinken des mit steigender Proteinkonzentration an Gewicht zunehmenden Polymernetzwerkes die Viskoelastizität der Lösung verändern. In diesem Fall würde aber ein Herabgleiten des Netzwerkes von der Glasfaser die Resonanzfrequenz der Glasfaser erhöhen, woraus sich eine niedrigere Viskosität ergäbe. Da aber während des gemessenen, konzentrationsbedingten Elastizitätsabfalls die Viskosität gleich bleibt bzw. sogar ansteigt (Abb. 4-7, Abb. 4-8), kann auch dieser Effekt ausgeschlossen werden. Zudem beträgt die Höhe der erzeugten Viskositätsscherwelle etwa 500  $\mu\text{m}$  (Abb. 3-6), wodurch im Fokusbereich (mit einer Höhe von 50  $\mu\text{m}$ ) eine ausreichende Durchmischung der Flüssigkeit gewährleistet ist. EM-Aufnahmen zeigen ferner eine isotrope und homogene Verteilung von Aktinfilamenten nach der Entnahme aus dem ORR (Tafel 4-1 a, b).

## 5.6 Mechanik von Profilin:Aktin

### 5.6.1 Vergleich der Viskoelastizität von Muskel- und Nicht-Muskelaktin

G-Aktin-bindende Proteine bilden die Grundlage zur Kontrolle der G/F-Transition von Aktin, welche die Viskoelastizität der Zelle reguliert. Profilin zählt zu den wichtigsten G-Aktin-bindenden Proteinen und kann *in vitro* sowohl mit Muskelaktin als auch mit Nicht-Muskelaktin interagieren. In der Literatur werden jedoch Unterschiede im Bindungsverhalten von Profilin an Aktin aus verschiedenen Zellextrakten beschrieben. So fanden Larsson and Lindberg (1988), dass Rinderhirn-Profilin die Viskosität von Rinderhirn-Aktin stärker reduziert, als die von Aktin aus Muskelzellen. Daher wurden für diese Arbeit Aktin und Profilin verwendet, die aus derselben Quelle, nämlich dem Kälber-Thymus, stammen.

Die mechanischen Eigenschaften von Muskelaktin und Nicht-Muskelaktin (aus dem Kälber-Thymus) unterscheiden sich: Viskosität und Schallgeschwindigkeit von Nicht-Muskelaktin waren gegenüber dem Muskelaktin deutlich erhöht (Abb. 4-17). Bemerkenswert ist, dass das  $\beta\gamma$ -Aktin nach der verwendeten Präparationsmethode von Rozycki et al. (1991) äußerst rein ist (Schüler, 1999) und es sich daher nicht um einen viskositätserhöhenden Effekt durch rückständige „cross-linker“ handeln kann (vgl. Jen et al., 1982). Die kritische Konzentration zur Polymerisation von Muskel- und Nichtmuskelaktin ist nahezu identisch (Gordon et al., 1977). Unterschiede in der Polymerisationsgeschwindigkeit und im Polymerisationsausmaß wurden bisher nur nach einem deutlichem Absenken der Temperatur (5°C) beschrieben. In diesem Falle polymerisiert Muskelaktin etwa 10-mal besser als Nicht-Muskelaktin (Rubenstein, 1990).

In EM-Aufnahmen unterscheiden sich Muskelaktin und Nicht-Muskelaktin nur dahingehend, dass für Nicht-Muskelaktin teilweise umschlungene Filamente gefunden wurden (vgl. Tafel 4-1 a, b mit Tafel 4-3 a, b). Stark „gekräuselte“ Filamente mögen einerseits auf einen intrinsischen Elastizitätsverlust hinweisen, andererseits kann der Effekt des „Umwindens von Filamenten“ auch eine gegenseitige, elastische Verstärkung bedeuten. Daher können EM-Aufnahmen diesen Effekt nur unzureichend erklären. Dennoch ist zu erwähnen, dass in der Literatur Unterschiede in der Steifheit eines einzelnen Aktinfilaments mit und ohne Tropomyosin beschrieben wurden. Mit der Methode der *in vitro*-Nanomanipulation fanden Kojima et al. (1994) eine Erhöhung der Steifheit eines einzelnen 1  $\mu\text{m}$  langen Aktinfilaments durch Tropomyosin um etwa 50 %. Zwar ist das Young's Modul von Tropomyosin um etwa eine Größenordnung höher (10 GPa) als das von Aktin (2 GPa)<sup>25</sup>, doch könnte das gegenseitige Umwickeln von Aktinfilamenten eine beachtliche Erhöhung der Steifheit mit sich führen. Ein Vergleich der Elastizitäten von einzelnen Muskelaktinfilamenten und Nicht-Muskelaktinfilamenten gibt es bisher nicht. Wie auch immer, nach längerer Inkubationszeit scheint das Netzwerk aus Nicht-Muskelaktin seine Elastizität (bei gleichbleibender Viskosität) zu verlieren (Abb. 4-20). Dieser Effekt wurde für Muskelaktin nicht beobachtet (Abb. 4-7 a, bzw. von 10  $\mu\text{M}$  abweichende Aktinkonzentrationen: Abb. 4-29 bzw. Abb. 4-30 b). Möglicherweise ist der Elastizitätsverlust bereits in der Stabilität des Monomers begründet, denn Schüler et al. (2000) fanden, dass die thermische Stabilität von  $\alpha$ -G-Aktin wesentlich höher ist als die des  $\beta\gamma$ -G-Aktins. Die beiden Isoformen unterscheiden sich nur in einigen wenigen Aminosäuren, primär am aminoterminalen Ende. So haben z.B. die  $\alpha$ -Aktin-Isoformen (Nichtmuskel und glatter Muskel), im Gegensatz zu den  $\beta\gamma$ -Aktin-Isoformen (Herz-, Gefäß- und Skelettmuskel), ein zusätzliches Cystein gemeinsam (Vandekerckhove und Weber, 1978). Diese Unterschiede sind in der Subdomäne 1 (nach dem Holmes-Lorenz-Modell, s. Kap. 2.3.3.1) des Aktinmoleküls lokalisiert, wobei es „unwahrscheinlich ist“ Herman (1993), dass dadurch signifikante Unterschiede in der monomeren bzw. filamentösen Struktur des Aktins entstehen. Ferner sind die Aktin-Bindungsdomänen für divalente Kationen und Nukleotide nahezu identisch zwischen den Isoformen. Darüber hinaus scheint das aminoterminal Ende eine funktionelle Bedeutung zu haben: das Entfernen des aminoterminalen Restes von Hefe-Aktin führt beispielsweise zu spontanen Bündelungen von F-Aktin (Cook et al., 1992).

<sup>25</sup> Das Young's Modul eines einzelnen Aktinfilaments ist demnach Nahe der Seide (7 GPa) oder Kollagen (5 GPa) (Kojima et al., 1994).

### 5.6.2 Modulation der Viskosität von Nicht-Muskelaktin durch Profilin

Die Wechselwirkung von Profilin mit polymerisierendem Aktin wird häufig fluorometrisch mit Pyren-markiertem G-Aktin bestimmt. Da jedoch Profilin nur schwach an Pyren-markiertes Aktin bindet (Perelroizen et al., 1996; Vinson et al., 1998; Kang et al., 1999), wird zur Verstärkung des Profilin-Effektes am Minus-Ende, das Plus-Ende durch die Zugabe von Gelsolin oder CapZ blockiert. Dies verhindert allerdings die Detektion denkbarer Wechselwirkungen von Profilin mit dem Plus-Ende. Die polymerisationshemmende Wirkung von Profilin ist in Abwesenheit von Magnesium erhöht, weshalb häufig nur die Interaktion von Profilin mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktin beschrieben wird (z.B. Larsson and Lindberg, 1988). Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht-„gecapptes“ Aktin unter physiologischen Ionenbedingungen (2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 mM ATP) verwendet.

Es zeigte sich, dass die Polymerisation von Aktin unter diesen Bedingungen durch Profilin gefördert wird, wenn die Profilinkonzentration gleich oder geringer als die Konzentration des Aktins ist (Abb. 4-18 a). Erst wenn die Profilinkonzentration deutlich höher ist (Profilin:Aktin = 5:1), tritt ein polymerisationshemmender Effekt ein (Nebengrafik in Abb. 4-18 a). Diese Beobachtung weicht von den Messungen von Korenbaum et al. (1998) ab, die eine reduzierte Fluoreszenz von  $\beta\gamma$ -Aktin (aus Rinderhirn) während der Interaktion mit menschlichem, mutagenem Profilin gemessen haben. Es ist jedoch nicht möglich, mit der Methode der Fluorometrie zwischen filamentösem und nicht-filamentösen Aktin-Aggregaten zu unterscheiden (Cooper und Pollard, 1982), weshalb die Messungen ungenau werden (s. Kap. 5.1). Andererseits haben Perelroizen et al. (1996) keine Reduktion der Fluoreszenz während der Polymerisation von Muskel- $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin mit zunehmendem Profilin (aus Rinderhirn) festgestellt. Auch für äquimolare Verhältnisse von Aktin zu Profilin bleibt die Fluoreszenz gegenüber reinem Aktin unverändert. Ein ähnlich geringer Effekt durch Profilin (aus Kälber-Thymus) auf die Polymerisation von  $\beta\gamma$ - $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin (aus Rinderhirn) wurde von Giehl et al. (1994) mit einem Ostwald-Viskosimeter bestimmt. Pflanzliches Profilin erhöht sogar leicht die Viskosität von Muskel- $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin und  $\beta\gamma$ - $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin (Profilin:Aktin = 1:1). Auch hier senkt erst Profilin im Überschuss (Profilin:Aktin = 4:1) die Viskosität von Aktin.

Die Befunde von Giehl et al. (1994) sind demnach konsistent mit den Daten der vorliegenden Arbeit. Ebenso stimmen die Messungen von Ruhlandt et al. (1994) mit den ORR-Messungen überein. Die Autoren haben mit einem Kugelfallviskosimeter eine erhöhte Viskosität von Aktin (aus Rinderherz) in Gegenwart niedriger Konzentrationen pflanzlichen Profilins (Aktin:Profilin = 1) und eine Reduktion der Viskosität von Aktin bei Profilin im Überschuss gemessen.

Ruhlandt et al. (1994) nehmen an, dass es zwei Aktinbindungsstellen für Profilin mit verschiedenen Affinitäten gibt. Diese Annahme beruht auf einer Arbeit von Valenta et al. (1993), die das Binden von Profilin an zwei verschiedene Aktinbindungsstellen mit Antikörpern blockierten. Dieses Modell erklärt auch die Befunde der vorliegenden Arbeit, wonach niedrige Konzentrationen von Profilin die Polymerisation von Aktin fördern und erst Profilin im Überschuss die Polymerisation hemmt.

Auch die Online-Zugabe von Profilin zu F-Aktin (P:A = 1:1) erhöht die Viskosität (Abb. 4-18 d) in Übereinstimmung mit dem Modell von Carlier und Pantaloni (1994). Nach diesem Modell bindet Profilin unpolymerisiertes ATP-G-Aktin und „eskortiert“ es an das Plus-Ende der Aktinfilamente.

### 5.6.3 Modulation der Elastizität von Nicht-Muskelaktin durch Profilin

Das vorherige Kapitel hat demonstriert, dass Profilin nicht nur als ein simples „sequestering“ und polymerisationshemmendes Protein angesehen werden kann. Dass Profilin, je nach molaren Verhältnissen, einerseits die Polymerisation fördert und andererseits die Polymerisation hemmt, kann durch die Existenz zweier Aktinbindungsstellen für unterschiedliche Affinitäten erklärt werden. Die Wahl des Bindungspartners, der ionalen Bedingungen und auch der Methode, führen zu den in der Literatur beschriebenen großen Differenzen des Effektes von Profilin auf Aktin.

Der polymerisationsfördernde Effekt kann folgendermaßen erklärt werden: erstens, Profilin erhöht massiv die Austauschrate von ADP-G-Aktin zu ATP-G-Aktin (Mockrin und Korn, 1980; Goldschmidt-Clermont et al., 1992), zweitens, die Affinität von Profilin zu ATP-G-Aktin ist höher als zu ADP-G-Aktin<sup>26</sup> (Vinson et al., 1998), und drittens, Profilin fügt ATP-G-Aktin vermehrt an das Plus-Ende an (Tilney et al., 1983). Nach der Addition des Profilin-ATP-G-Aktin-Komplexes an das Plus-Ende, dissoziiert Profilin aufgrund seiner niedrigen Affinität zu ATP-F-Aktin, wodurch das Filament um eine ATP-Aktin-Einheit gewachsen ist (Pollard and Cooper, 1984; Pring et al., 1992).

Durch die verstärkte Addition von ATP-Aktin an das Plus-Ende kommt es aber auch zu einer erhöhten Elastizität (Abb. 4-19 und Abb. 4-20), denn ATP bzw. die ATP-Hydrolyse erhöht die Elastizität von Aktin (vgl. Abb. 4-27 b und Abb. 4-29). Auch scheinen die Filamente einer Lösung aus 10  $\mu\text{M}$  Aktin und 10  $\mu\text{M}$  Profilin im Vergleich zu Aktin ohne Profilin (Tafel 4-3 a, b) dichter gepackt zu sein (Tafel 4-3 c, d), wodurch die Elastizität zu-

<sup>26</sup> *In vivo* wirkt das kleine Aktin-bindende Protein ADF/Cofilin hierbei kontraregulatorisch, da es stark an ADP-G-Aktin bindet (Carlier et al., 1999).

sätzlich ansteigen könnte. Gleichzeitig bedingt eine zunehmende Profilinkonzentration einen erhöhten Entzug des Lösungsmittel durch Hydratation des monomeren Proteins, welches die Kompressibilität der Lösung erhöht (Abb. 4-18 b).

Die hohe Elastizität nicht-filamentöser Aktin-Aggregate (Tafel 4-3 e, f), das in Gegenwart geringer Profilinkonzentrationen entsteht (Abb. 4-19), entspricht etwa der Elastizität von 60  $\mu\text{M}$  Tubulin (Abb. 4-10). Auch Sato et al. (1988) fanden, dass nicht-filamentöses Aktin ähnliche mechanische Eigenschaften hat wie unpolymerisiertes Tubulin. Möglicherweise tragen die nicht-filamentösen Formen zytoskelettärer Proteine bedeutend zur Elastizität von Zellen bei. Hierbei ist zu erwähnen, dass das Verhältnis von Profilin zu Aktin in Zellen etwa 1:4 beträgt (Vinson et al., 1998) und der dominierende Einfluss von Profilin auf die Elastizität von Aktin bei eben diesem molaren Verhältnis (Abb. 4-19) erfolgt. *In vivo* wird der Einfluss von Profilin auf Aktin jedoch durch das G-Aktin-bindende Protein Thymosin- $\beta_4$  reguliert (Pantaloni und Carlier, 1993). Die Bedeutung von G-Aktin zur Kontrolle der Zellform haben u.a. Cassimeris et al. (1990) belegt: eine Verschiebung des G/F-Aktin-Gleichgewichts zugunsten des Monomers kontrolliert die Ausbildung der Lamelle von Leukozyten. Auch zeigt sich nach der Kollision zweier XTE-Zellen<sup>27</sup> an der Kontaktzone der Lammellen ein kleiner Saum verdichteter Aktin Depositionen (Bereiter-Hahn und Lüers, 1994).

## 5.7 Modulation der Viskoelastizität von Aktin durch Glykolyseenzyme

### 5.7.1 Funktionale Analogie des Einflusses von Hexokinase, Phalloidin und Cytochalasin D auf die Polymerisation von Aktin

Die Elastizität zytoskelettärer Elemente kann durch bindende Proteine bzw. Toxine erheblich moduliert werden, was in den vorangegangenen Kapiteln verdeutlicht wurde. Doch nicht alle bindenden Proteine, wie  $\alpha$ -Aktinin, Profilin oder MAPs, haben nur eine formgebende Funktion bzw. regulieren das Monomer/Polymer Verhältnis. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass einzelne Aktin-bindende Proteine eine funktionale Dualität aufweisen. So regulieren einige Proteine der Glykolyse nicht nur die Viskoelastizität von Aktin, sondern werden selbst in ihrer enzymatischen Aktivität von Aktin reziprok kontrolliert.

Der Einfluss glykolytischer Enzyme auf die Mechanik von Aktin ist zudem abhängig von der Gegenwart der jeweiligen Substrate der Enzyme. Im Falle der Hexokinase ist eines ihrer Substrate, das ATP, gleichzeitig das Substrat von Aktin selbst. Daher schließen Studien zur Untersuchung der Wechselwirkung von Hexokinase und Glukose auf ATP-Aktin ebenso die Betrachtung des Einflusses von ATP auf die Polymerisation bzw. auf die Stabilität von Aktin mit ein. Die Bedeutung der stabilisierenden Wirkung von ATP und Pyrophosphat kann man durch die Behandlung von F-Aktin mit depolymerisierenden Agenzien wie SDS oder Kaliumjodid nachweisen (Dancker und Fischer, 1989). Janmey et al. (1990) haben eine Erhöhung der Elastizität von F-Aktin durch ATP mit einem Torsions-Pendel gemessen. Diese Befunde wurden jedoch von Pollard et al. (1992) und Newman et al. (1993) entkräftet, da die rheologischen Unterschiede zu gering und auf Filamentlängenvariationen zurückzuführen seien. Mit dem ORR wurde nach Erhöhung der ATP-Konzentration von 0,2 mM auf 2 mM ATP eine gesteigerte Viskoelastizität von gelöstem F-Aktin gemessen (Abb. 4-27, Kreise). Durch die Zugabe von Hexokinase und Glukose wird die ATP-Konzentration reduziert, was die Viskoelastizität von F-Aktin senkt (Abb. 4-28). Ohne ATP polymerisiert Aktin nur schwach, was sich in einer stark reduzierten Viskosität manifestiert (Abb. 4-27 a, Dreiecke). Die Elastizität unterscheidet sich dennoch nicht von der Elastizität der Kontrolle (vgl. Dreiecke und Kreise in Abb. 4-27). Es bilden sich also auch in Gegenwart von ADP ausreichend Aktin-Nuklei, die die Elastizität der Lösung bedeutend erhöhen.

Hexokinase alleine wirkt wie ein „capping“-Protein (z.B. Gelsolin oder Villin, Hartwig und Kwiatkowski, 1991; Pollard und Cooper, 1986): es reduziert die Lag-Phase und erhöht die Polymerisationsrate sowie die steady-state-Viskosität (Abb. 4-27 a, durchgezogene und gepunktete Linie). Gleichzeitig nimmt die Elastizität in Gegenwart von 2 mM ATP stark ab (Abb. 4-27 b, gepunktete Linie), was nach den EM-Aufnahmen (Tafel 4-4 c und d) auf die Bildung kurzer Filamente zurückzuführen ist. Trotz dieser kurzen Filamente ist die Viskosität höher als die der Kontrolle, was mit der deutlichen polymerisationsfördernden Wirkung der Hexokinase, und demnach einer erhöhten Filamentendkonzentration, begründet ist.

Bereiter-Hahn et al. (1999) haben fluorometrisch (mit Pyren-markiertem G-Aktin) einen polymerisationsfördernden Effekt der Hexokinase (Aktin:Hexokinase = 23:1) bestimmt, der sich in einer erhöhten steady-state-Viskosität und Polymerisationsgeschwindigkeit niederschlug. Glukose minderte diesen Effekt erst ab Konzentrationen von 2 mM, was nur partiell konsistent mit den Ergebnissen nach Abb. 4-28 ist, da hier bereits ein viskositätsmindernder Effekt ab Glukosekonzentrationen > 0,5 mM gemessen wurde.

Auch Phalloidin besitzt eine funktionale Ähnlichkeit mit „capping“-Proteinen. Es fördert die Polymerisation und setzt die Elastizität von F-Aktin (Abb. 4-16 a) durch „Schneiden“ (Abb. 4-16 b) herab. Eine „severing“-Aktivität von Phalloidin wurde allerdings bisher in der Literatur nicht beschrieben. Neuere Arbeiten zeigen aber, dass

<sup>27</sup> „Xenopus tadpole epidermis“-Zellen (Epidermiszellen von Kaulquappen).

sich das Phalloidin, ähnlich dem Cytochalasin D, in die Furchen der „long“-Pitch Helix des Aktinfilaments einlagert (Steinmetz et al., 1998), was möglicherweise das Brechen von Filamenten, eingeleitet durch geringe Scheerungen (z.B. beim Eintrocknen des Aktinbündels auf dem EM-Grid), erleichtert.

Die funktionale Ähnlichkeit von Cytochalasin D mit dem „capping“-Protein Gelsolin wurde u.a. von Tellam und Frieden (1982) beschrieben. ORR-Messungen zeigen eine deutliche, den „capping“-Proteinen gemeinsame, nukleierende Wirkung von Cytochalasin D (Abb. 4-14 b, c). Die „severing“-Aktivität von Cytochalasin D wird durch das Erscheinen kurzer Filamente in EM-Aufnahmen (Tafel 4-2) sowie durch die Abnahme der Viskosität deutlich (Abb. 4-14 c). Gibt man jedoch Cytochalasin D „online“ zu bereits polymerisiertem Aktin, so ist die Viskositätsabnahme im Vergleich zur Elastizitätsabnahme nur unmerklich (Abb. 4-15 a). Das Toxin „weicht“ hier also die Filamente lediglich „auf“.

Die Ähnlichkeit des Verhaltens von Hexokinase mit „capping“-Proteinen (Nukleator, „severing activity“) kann den tatsächlichen molekularen Mechanismus nicht erklären. Deshalb sind weitere Studien, wie z.B. Immungold-Markierungen zur genauen Lokalisation des Enzyms (am gesamten Filament oder nur an den Enden) sowie die Bestimmung weiterer Polymerisationskinetiken in Gegenwart von Plus- und Minus-Enden „capping“-Proteinen (z.B. Gelsolin, DNase I) erforderlich. Auch bleibt unklar, warum die Elastizität in Gegenwart von Hexokinase und geringerer ATP-Konzentrationen (0,2 mM ATP) ähnlich wie die Kontrolle verläuft (Abb. 4-27, durchgezogene Linie). EM-Aufnahmen zeigen indes für diesen Ansatz wesentlich längere Filamente (Tafel 4-4 e, f) als in Gegenwart höherer ATP-Konzentrationen (Tafel 4-4 c, d). ATP könnte möglicherweise die Bindung der Hexokinase an Aktin modulieren. So ist bekannt, dass die Bindung von  $\alpha$ -Aktinin an Aktin durch Erhöhung der ATP-Konzentration deutlich geschwächt ist (Singh et al., 1981). In den Kapiteln 5.7.2 und 5.7.3 werden zwei weitere Beispiele einer substratspezifischen Bindung glykolytischer Enzyme an Aktin beschrieben.

Typisch für „capping“-Proteine ist darüber hinaus, dass sie Aktin-Nuklei stabilisieren (Pollard und Cooper, 1986), wodurch die Wahrscheinlichkeit des Zerfalls der Primer gemindert und die Wahrscheinlichkeit einer anschließenden Elongation erhöht wird. Eichhorn (1998) zeigte mit Kosedimentationsversuchen, dass Rinder-Hexokinase (4  $\mu$ M) nicht an polymerisiertes Muskelaktin (10  $\mu$ M) (ob mit oder ohne 7  $\mu$ M desoxy-D-Glukose) bindet, was einen stabilisierenden Einfluss auf Aktin-Trimere nicht ausschließt. Auch belegt die Abb. 4-27 (b), dass die Elastizität von Aktin (17  $\mu$ M) in Gegenwart von Hexokinase (0,75  $\mu$ M) und ATP (0,2 mM), durch eine etwaige Anlagerung des Proteins an das Filament, nicht erhöht ist (wie in Abb. 4-32 b für Aldolase gezeigt). Andererseits wies Eichhorn (1998) ein deutliches Binden von Hexokinase aus Hefe an Muskel-F-Aktin nach. Dass die Wahl der Herkunft des Bindungspartners maßgeblich für die Bindungsaffinitäten von Proteinen ist, zeigt auch eine Studie von Pollard (1984), die keinen polymerisationsfördernden Effekt von Hexokinase aus Hefe auf *Acanthamoeba* Aktin feststellt. Pollard (1984) wies ferner nach, dass ADP-Aktin eine geringere Polymerisationsrate und -ausmaß als ATP-Aktin aufweist, was mit den Befunden analog Abb. 4-27 (a, grüne Kurve) übereinstimmt.

Der Effekt von Hexokinase und Glukose auf die Polymerisation von ATP-Aktin ist vergleichbar mit dem Effekt von AMPPNP auf die Polymerisation von Aktin (Nebengrafik in Abb. 4-29). Auch Cooke (1975) zeigte, dass die Aktinpolymerisation in Gegenwart von AMPPNP im Vergleich zu ATP verzögert ist. Dass die Viskosität von ATP-Aktin höher ist als die von ADP-Aktin oder AMPPNP-Aktin kann mit einer verlängerten „ATP-Kappe“ am Plus-Ende erklärt werden, die das Aktinfilament nach Pollard (1984) stabilisiert. Dies erklärt auch die erhöhte Elastizität nach der Zugabe hoher ATP-Konzentrationen (2 mM) zu Aktin (Abb. 4-27, Kreise) und dem Erscheinen „steifer“ Aktinfilamente in EM-Aufnahmen (Tafel 4-4 a und b).

Nach den Betrachtungen von Carlier (1991) tragen die Aktinfilamente statt einer „ATP-Kappe“ eine „ADP-P<sub>i</sub>-Kappe“. Dessen ungeachtet bewirkt nach Ansicht von Carlier (1991) erst die Freisetzung des Phosphates eine Destabilisierung des Filaments (vgl. Kap. 2.3.3.1), was bereits eine frühere Arbeit von Dancker und Hess (1990) zeigte. Eine weitverbreitete Ansicht ist ferner, dass das Aktinfilament eine intrinsische Dynamik besitzt, die sich in einem Öffnen der Helix alle 2-6 Untereinheiten manifestiert (Reisler, 1993) und als „lateral slipping“-Modell bezeichnet wird (Bremer und Aebi, 1992). Dieses Entwirren der Helix ist bei ADP-F-Aktin stärker als bei ATP-F-Aktin (Bremer et al., 1991) und erklärt nur dann die Befunde der vorliegenden Arbeit, wenn „ein Entwirren der Helix“ auch gleichzeitig „einen Verlust der intrinsischen Elastizität“ durch Spannungsminderung bedeutet. Im Gegensatz hierzu kann ein vermehrtes Öffnen der Helix aber auch bedeuten, dass über Aktin-Aktin-Kontakte benachbarter Filamente mehr Querverbindungen ausgebildet werden, wodurch die Elastizität des Netzwerkes erhöht wird.

### 5.7.2 Einfluss der LDH auf die Polymerisation von Aktin und Bindung der LDH an filamentöses und nicht-filamentöses Aktin

Polymerisationsfördernde Effekte, wie im vorherigen Kapitel für die Hexokinase gezeigt, können gegebenenfalls auch durch nicht-spezifische Interaktionen mit Aktin erfolgen. So wurde für eine Reihe von Proteinen, wie Histone, RNase A oder Polylysine, nachgewiesen, dass sie mit dem „klebrigen“ Aktinfilament unspezifisch in-

teragieren und quervernetzend wirken, wodurch die Viskosität von F-Aktin erhöht wird (Griffith und Pollard, 1982). Im Falle der Hexokinase wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch auch gezeigt, dass die Interaktion mit Aktin deutlich durch definierte ATP-Konzentrationen moduliert werden kann, was auf eine spezifische Interaktion weist. Auch für die LDH-H<sub>4</sub> konnte eine spezifische Interaktion mit Aktin nachgewiesen werden. So fördert sie zunächst die Polymerisation von Aktin in Gegenwart ihres Coenzym NADH (Abb. 4-33). Gibt man zusätzlich Pyruvat hinzu, so wird dieser Effekt nahezu umgekehrt.

Blum und Bereiter-Hahn (1991) zeigten mit einem Ostwald-Viskosimeter einen deutlich gegensätzlichen Effekt, denn die LDH-H<sub>4</sub> (1 µM) förderte hier zusammen mit Pyruvat (1,5 mM) und NADH (3 mM) die Polymerisation von Aktin (22 µM). Höhere Pyruvatkonzentrationen (3 mM) hingegen minderten das Ausmaß der Polymerisation. Die Polymerisationsgeschwindigkeit war in Gegenwart von LDH-H<sub>4</sub> und Oxamat leicht abgeschwächt. Messungen mit dem Mikro-Kugelfallviskosimeter ergaben ebenso, dass die Zugabe von Oxamat die Polymerisation von Aktin vollständig inhibiert (Abb. 4-37 a). Die Zugabe von Oxamat inhibiert ferner die Bildung von LDH-H<sub>4</sub>-Aggregaten, welche sonst nach der Kosedimentation mit Aktin und Pyruvat im Überstand erscheinen (vgl. Abb. 4-35 b und Abb. 4-37 c, jeweils erster Ansatz). Extinktionsmessungen zeigen, dass Oxamat, wie zu erwarten, die Umsatzgeschwindigkeit der LDH-H<sub>4</sub> verringert (vgl. Abb. 4-34 a und Abb. 4-37 b), während F-Aktin die Enzymaktivität vollständig inhibiert (Abb. 4-34 b).

Blum und Bereiter-Hahn (1991) konnten ferner den in der Literatur vielseitig beschriebenen polymerisationsfördernden Effekt von BSA (z.B. Griffith und Pollard, 1982; Lakatos und Minton, 1991; Lindner und Ralston, 1997; vgl. auch Abb. 4-31 a) nicht nachweisen. Dies ist möglicherweise auf die, im Vergleich zum Kugelfallviskosimeter („low shear“), unsensitiven Methode der Kapillarviskosimetrie („high shear“) (s. Kap. 3.5) zurückzuführen.

FRET-Messungen zeigen, dass die LDH-H<sub>4</sub> alleine fest an G-Aktin bindet (molares Verhältnis Aktin:LDH = 1:7). Die Zugabe von 1 mM Pyruvat (und NADH) mindert diese Bindung noch nicht; erst eine Verdoppelung der Pyruvatkonzentrationen löst die LDH-H<sub>4</sub> vom Aktinmonomer (Bereiter-Hahn et al., 1999). Ein solcher „sequestering“-Effekt durch das verstärkte Binden der LDH-H<sub>4</sub> an G-Aktin in Gegenwart niedriger Pyruvatkonzentrationen erklärt die in Abb. 4-33 dargestellte Viskositätsminderung. Allerdings unterscheiden sich die in Abb. 4-33 dargestellten Versuche von den Arbeiten von Bereiter-Hahn et al. (1999) hinsichtlich der niedriger eingesetzten LDH-Konzentration (Aktin:LDH = 18:1). Dieses molare Verhältnis wurde gewählt, um nicht-spezifische Interaktionen der beiden Proteine zu vermeiden.

Neben der polymerisationshemmenden Wirkung der LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von Pyruvat und NADH (Abb. 4-33) zeigte sich ein weiterer Effekt während der Interaktion der LDH-H<sub>4</sub> mit Aktin, als auch die Enzymaktivität der LDH-H<sub>4</sub> eingeschränkt ist (Abb. 4-34, a). Dieser Befund ist konsistent mit einer Studie von Kirillina et al. (1989), die eine 2,5-fache Aktivitätsminderung der an das dünne Filament assoziierten Muskel-LDH ergab. Umgekehrt wird die Aktivität der LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von Laktat und NAD<sup>+</sup> (sowie GPT und Glutamat) durch Aktin gesteigert (Abb. 4-34 b). Unter diesen Versuchsbedingungen wird reziprok die Polymerisation von Aktin gefördert (Abb. 4-33).

Die Extinktionsmessungen nach Abb. 4-34 (a) sind konsistent mit einer Arbeit von Poglazov und Livanova (1986), die eine Verringerung von  $V_{max}$  der LDH vom Schweinemuskel (0,6 µM) nach der Interaktion mit Aktin (10 µM) bestimmten. Gleichzeitig wird durch das Binden der LDH an Aktin die  $K_M$  für NADH (0,12 mM) von 2 µM auf 5 µM erhöht. Auch bestimmten die Autoren eine sehr niedrige Dissoziationskonstante von  $8 \times 10^{-3}$  µM für die Bindung der LDH an Aktin, was konsistent mit den FRET-Messungen von Bereiter-Hahn et al. (1999) ist. Dass durch die Bindung der LDH an Aktin die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Glykolyseenzym deutlich reduziert und gleichzeitig die Affinität für NADH erhöht ist, wäre z.B. im Falle einer Laktat-Azidose (Blutansäuerung bei erhöhter Glykolyseaktivität) ein sinnvoller Regulationsmechanismus, insofern hierbei nicht nur die Laktat-Produktion gehemmt (Poglazov und Livanova, 1986), sondern auch das Enzym durch die Bindung an F-Aktin immobilisiert würde.

Kosedimentationsversuche zeigen nach der Zugabe von Pyruvat eine leichte „Verschiebung“ der LDH-H<sub>4</sub> vom Überstand ins Pellet (vgl. Abb. 4-35 a, dritter Ansatz und Abb. 4-35 b, erster Ansatz). Diese „Verschiebung“ ist noch stärker, wenn statt Pyruvat das Substrat Laktat zugegeben wird (Abb. 4-35 b, zweiter Ansatz). Ein „clustern“ der LDH-H<sub>4</sub> bedeutet zudem gleichzeitig eine Aktivitätsminderung, denn meist ist die Aktivität des Monomers höher als die des Tetramers (Minton und Wilf, 1981).

Der Effekt des Aggregierens ist mehr durch das Coenzym NAD<sup>+</sup>, als durch Laktat oder Aktin bedingt: die LDH-H<sub>4</sub> pelletiert erstens auch dann, wenn man das Laktat weglässt (in Gegenwart von GPT und Glutamat) (Abb. 4-35 b, dritter Ansatz), und zweitens, wenn man kein Aktin zugibt (Abb. 4-36, zweiter Ansatz). Die Schwächung dieses Effektes durch Oxamat zeigt, dass eine Aktivitätsminderung der LDH-H<sub>4</sub> durch einen kompetitiven Inhibitor (vgl. Abb. 4-37, b) auch das Aggregieren beeinflusst (vgl. Tabelle 3).

Die physiologische Signifikanz einer NAD<sup>+</sup>-induzierten Aggregation der LDH gewinnt im Falle einer Laktat-Azidose an Bedeutung, denn hierbei wäre ein höherer NAD<sup>+</sup>-Spiegel im Blut zu erwarten, welcher dann gleichzeitig die Aktivität der LDH durch ein „clustern“ mindert.

Bereiter-Hahn et al. (1995b) wiesen nach, dass nach dem Blockieren der G<sub>1</sub>-Phase von XTH-2 Zellen durch Desoxyguanosin die in dieser Phase des Zellzyklus dominierenden Stressfasern nahezu vollständig verschwinden. Gleichzeitig bildeten sich an den Zellen Lammellen und Mikrospikes aus und die Laktat-Produktion nimmt bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch zu. Mit der Reduktion der Stressfasern könnte auch die LDH desorbiert werden und dadurch die Aktin-induzierte Inhibierung der Enzymaktivität (Abb. 4-34 a) gemindert werden. Eine hierdurch gesteigerte Laktatproduktion würde wiederum die Polymerisation von Aktin an der Lamelle begünstigen (analog den Befunden aus Abb. 4-33). Kontraregulatorisch wirkt sich dann der anschließend erhöhte NAD<sup>+</sup>-Spiegel aus, welcher ein „clustern“ der LDH (analog Abb. 4-35 b, zweiter Ansatz) fördert und somit die Aktivität des Enzyms einschränkt.

### 5.7.3 Modulation der Viskoelastizität von Aktin durch die Aldolase

Die beobachteten Effekte während der Interaktion der LDH mit Aktin sind substratspezifisch und synergetisch: wird z.B. die Polymerisation von Aktin durch die LDH (substratspezifisch) inhibiert, ist auch gleichzeitig die Enzymaktivität eingeschränkt (vgl. Tabelle 3). Daher erfolgt die Interaktion zwischen Aktin und der LDH nicht unspezifisch, etwa aufgrund eines „macromolecular crowding“-Effektes oder elektrostatischen Wechselwirkungen (vgl. Minton und Wilf, 1981; Walsh und Knull, 1988).

Eine solchermaßen deutliche Reziprozität wurde bisher nur ansatzweise für die Aldolase beschrieben. So zeigten Wang et al. (1996) mit der Kugelfallviskosimetrie, dass eine 30-minütige Inkubation von 12 µM Aktin mit 0,4 µM Aldolase (Aktin:Aldolase = 30:1) bei 37 °C ein Gel erzeugt. Weniger Aldolase (Aktin:Aldolase = 50:1) erhöht die Viskosität von Aktin dagegen nur leicht und durch hohe Aldolasekonzentrationen (Aktin:Aldolase = 8:1) die Viskosität leicht erniedrigt wird. Die Gelierung durch die Aldolase begründeten die Autoren damit, dass das Glykolyseenzym quervernetzend wirken kann, weil jede Untereinheit des Tetramers ein Aktinbindemotiv besitzt. ORR-Messungen zeigen, dass sowohl hohe als auch niedrige Aldolasekonzentrationen die Viskosität von Aktin (5 µM) mindern (Abb. 4-30 a), wobei der Effekt eine Funktion der Konzentration der Aldolase ist. Eine Gelierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet, was womöglich in der niedrig gewählten Aktinkonzentrationen und dem geringen ORR-Probenvolumen (100 µl) begründet ist.

Die Erniedrigung der Viskosität von F-Aktin in Gegenwart höherer Aldolasekonzentrationen begründeten Wang et al. (1996) damit, dass die Aldolase unter diesen Bedingungen sehr effektiv Aktinfilamente bündelt, wodurch Parakristallin-ähnliche Strukturen gebildet werden, welche, im Gegensatz zu langen Filamenten, nur kaum Viskositätserhöhend wirken. Neben Wang et al. (1996) wiesen auch Morton et al. (1977), Stewart et al. (1980) und Weichselsdorfer (1998) Aktin/Aldolase-Parakristalle in EM-Aufnahmen nach. Die deutlich reduzierte Schallgeschwindigkeit während der Polymerisation von 5 µM Aktin mit 5 bzw. 0,5 µM Aldolase (Abb. 4-30 b) ist demnach eine Folge der Ausbildung eines heterogen-anisotropen Aktinnetzes mit Aktin/Aldolase-Parakristallen (vgl. Weichselsdorfer et al., 1998)<sup>28</sup>. Auch die geringe Schalldämpfung (Abb. 4-30 c) ist ein Hinweis auf die Bildung eines sehr inhomogenen Aktinnetzes (s. Kap. 5.8).

Maciver et al. (1991) haben mit einem Miniatur-Kugelfallviskosimeter eine leichte Viskositätserhöhung von gelöstem F-Aktin (5 µM) nach der Zugabe geringer Aldolasekonzentrationen (Aktin:Aldolase = 50:1) gemessen, was konsistent mit den Befunden von Wang et al. (1996) ist. Im Gegensatz zu Wang et al. (1996) hat die Gruppe Maciver et al. (1991) jedoch einen deutlichen Anstieg der Viskosität (ohne Gelierung) in Gegenwart höherer Aldolasekonzentrationen (Aktin:Aldolase = 10:1) gefunden, was nicht mit den Befunden der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Ferner haben Maciver et al. (1991) mit einem Weissenberg-Rheometer eine Erhöhung der Elastizität von 10 µM Aktin nach der Zugabe von 5 µM Aldolase gemessen. Die Inkubationszeiten betragen allerdings etwa 5 Stunden, was wohl zu einer Sol-Gel-Transformation führen muss, die die Elastizität deutlich erhöht.

Wang et al. (1996) fanden, dass die durch höhere Aldolasekonzentrationen (2 µM) induzierte Gelierung von Aktin (24 µM) nach der Zugabe von 20 µM FBP vollständig gehemmt wird. ORR-Messungen zeigen sogar, dass hohe Aldolasekonzentrationen (5 µM) zusammen mit hohen FBP-Konzentrationen (1,7 mM) die Polymerisation von Aktin (5 µM) fördern. Dieser Effekt kann nicht der Wirkung der Aldolase alleine zugesprochen werden, denn FBP reduziert die Bindung der Aldolase an Aktin kompetitiv (Wang et al., 1996). Daher scheint die Aktinpolymerisation durch nichtspezifische Ladungsinteraktionen aufgrund der schlichten Gegenwart der Aldolase gefördert zu werden, was einem „macromolecular crowding“-Effekt entspräche (vgl. Minton und Wilf, 1981; Griffith und Pollard, 1982; Walsh und Knull, 1988; Lindner und Ralston, 1997, Abb. 4-31 a: BSA-Kurve).

Fluorometrische Messungen können zu den ORR-Messungen völlig gegensätzliche Effekte zeigen. So fanden Bereiter-Hahn et al. (1999) eine gesteigerte Fluoreszenzzunahme während der Polymerisation von Aktin (36 µM) mit Aldolase (2,5 µM) (Aktin:Aldolase = 14:1), die Zunahme andererseits nach der Zugabe von FBP deutlich vermindert wurde. Erklärt werden können diese zu den ORR-Messungen (Abb. 4-30) unterschiedlichen

<sup>28</sup> Die elektronenmikroskopischen Studien von Weichselsdorfer (1998) wurden synchron zu den Messungen nach Abb.4-30 durchgeführt (mit dem gleichen Aktin, der gleichen Aldolase und unter den gleichen Versuchsbedingungen).

Befunde damit, dass eine erhöhte Fluoreszenzzunahme, sprich eine erhöhte Aktinpolymerisation, die synchrone Entstehung von Aktin/Aldolase-Parakristalle nicht ausschließt. Letztere erhöhen - wie oben erwähnt - die Viskosität der Lösung nur kaum. Andererseits können mit dem ORR auch höhere Viskositäten gemessen werden (z.B. nach der Zugabe von FBP, Abb. 4-30), wenn die Filamentlängen 90 nm überschreiten, wohingegen Fluoreszenzmessungen bei diesen Längen bereits insignifikant werden (Wegner und Engel, 1975). Für die verwendeten Aktinkonzentrationen (36  $\mu\text{M}$ ) ist nach Käs et al. (1996) sogar eine durchschnittliche Filamentlänge von 20  $\mu\text{m}$  zu erwarten.

Bereiter-Hahn et al. (1999) zeigten ferner mit der FRET-Methode, dass die Aldolase in Gegenwart von FBP stark an G-Aktin bindet. Dieser Befund erklärt auch die in Abb. 4-31 (a) gezeigten Beobachtungen, dass die polymerisationsfördernde Wirkung von Aldolase in Gegenwart von FBP davon abhängt, ob lediglich G-Aktin oder bereits Nukleationskeime vorhanden sind. Denn gibt man zu einem äquimolaren Gemisch aus G-Aktin und Aldolase erst das Polymerisationssalz und etwa 3 Minuten später FBP hinzu, dann wird die Polymerisation von Aktin nicht gefördert (Abb. 4-31 a). Erst wenn FBP vor der Salzzugabe zu einem Gemisch aus G-Aktin und Aldolase beigemischt wird, zeigt sich ein viskositäts erhöhender Effekt (Abb. 4-31 a, vgl. Abb. 4-30 a). Diese Effekte können auch mit der kompetitiven Hemmung der Aldolase durch ATP (Boehringer, 1973) erklärt werden: der vorinkubierte Komplex aus G-Aktin und FBP-Aldolase führt zu einer sterischen Maskierung der Bindungsstelle für Magnesium an die Aldolase, wodurch die enzymatische Umsetzung von FBP durch die Aldolase gehemmt wird. Die Vorinkubation des Aktin/Aldolase-Komplexes zusammen mit Magnesium hebt die kompetitive Hemmung des ATPs auf, wodurch FBP gespalten wird, was offenbar die polymerisationsfördernde Wirkung von FBP kompensiert (vgl. Tabelle 2).

Dennoch ist in beiden Fällen, ob die Zugabe von FBP vor oder nach dem Polymerisationssalz erfolgt, die Schallgeschwindigkeit erhöht (Abb. 4-31 b). Diese Beobachtung zeigt, dass sich ein Teil der Aldolase auch an das Aktinfilament anlagert und dadurch dessen Steifigkeit erhöht. Auch die Online-Zugabe von Aldolase zu F-Aktin führt zu einem deutlichen Anstieg der Schallgeschwindigkeit (Abb. 4-32 b, Kreuze). Die Anlagerung von Aldolase an einzelne Aktinfilamente konnte z.B. mit Immunogold-Markierungen von Weichseldorfer (1998) gezeigt werden. Ebenso zeigen eine Reihe von Arbeiten eine *in vivo*-Assoziation mikroinjizierter (fluorochromierter) Aldolase entlang von Stressfasern (Pagliaro und Taylor 1988; Pagliaro und Taylor 1992; Wang et al., 1997).

#### 5.7.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen zur Studie der Interaktion von Glykolyseenzymen an Aktin

Folgende Tabelle fasst die dualen Effekte zwischen den untersuchten glykolytischen Enzymen und Aktin zusammen (Viskosität von F-Aktin: + = erhöht, - erniedrigt, 0 = kein Effekt; katalytische Aktivität der Glykolyseenzyme: K+ = erhöht, K- = erniedrigt, K0 = keine Veränderung von  $V_{\text{max}}$  und  $K_{\text{M}}$ ):

Hexokinase	+ / <sup>1</sup> K-	LDH-H <sub>4</sub>	0
Hexokinase + ATP	+	LDH-H <sub>4</sub> + NADH	+
Hexokinase + ATP + Glc	-	LDH-H <sub>4</sub> + NAD <sup>+</sup>	0
Aldolase	- / <sup>1</sup> K-	LDH-H <sub>4</sub> + NADH + Pyruvat	- / K-
Aldolase + FBP	+	LDH-H <sub>4</sub> + NAD <sup>+</sup> + Laktat	+ / K+

Tabelle 4: Modulation des Monomer/Polymer-Verhältnisses von Aktin durch Glykolyseenzyme und die reziproke Modulation der Enzymaktivität durch Aktin.

<sup>1</sup>Bereiter-Hahn et al. (1997)

Die spezifische Bindung glykolytischer Enzyme an Aktin liefert deutliche Belege für die Annahme, dass nicht-membrangebundene Enzyme *in vivo* an dem Zytoskelett organisiert sein könnten. Zwischen den Glykolyseenzymen (einschließlich der LDH) und Aktin wurden deutliche Synergien beobachtet: einerseits modulieren die Enzyme das G/F-Verhältnis von Aktin, andererseits moduliert Aktin die Aktivität der Enzyme. Diese Befunde sind konsistent mit der Theorie der Mikrokompartimentierung, stimmen aber nicht mit der Theorie der Phasenseparation überein, die davon ausgeht, dass lokale, hohe Enzymkonzentrationen innerhalb der Zelle durch relative, nicht-spezifische Phasenseparation (Walter und Brooks, 1995) erzeugt werden. Dennoch sollten nicht allen mit Aktin oder Mikrotubuli koeluierten Proteinen gleich eine strukturelle Funktion zugesprochen werden. Beide Polymere sind außergewöhnlich „klebrig“, ziehen also aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen Proteine an (Mandelkow und Mandelkow, 1995). Sogar BSA und Cytochrom c, die keine Aktinbindemotive haben, binden unspezifisch an F-Aktin (Lakatos und Minton, 1991). Durch solche unspezifischen Wechselwirkungen könnten „zufällig“ Zytoskelett/Enzym-Cluster entstehen, die dann zu den von Walter und Brooks (1995) vorgeschlagenen Phasenseparationen führen. Dieses Modell erklärt aber nicht die in der Einleitung beschriebenen Befunde von Bereiter-Hahn et al. (1995b), Rempel et al. (1996) oder Tsakiridis et al. (1999), die eine deutliche funktionale Dualität zwischen Zytoskelett und den Enzymen der Glykolyse nachweisen konnten (vgl.

## DISKUSSION

Kap. 2.3.3.3.1). Auch kann die Theorie der Phasenseparation nicht die Reziprozität für Aktin und PFK (Pette, 1975), Aktin und Aldolase (Walsh et al., 1977; diese Studie) sowie Aktin und GAP-DH bzw. LDH (Poglazov und Livanova, 1986; diese Studie) erklären (vgl. Kap. 2.3.3.3.2.).

### 5.8 Bestimmung höher geordneter Strukturen filamentösen Aktins mit der zeitvarianten Schalldämpfungsanalyse

Die Vorteile des ORR bestehen in der nicht-destruktiven und synchronen Bestimmung dreier mechanischer Parameter: der dynamischen Viskosität, der Schallgeschwindigkeit und der Schalldämpfung. Es wurde gezeigt, dass sich die zeitlichen Verläufe dieser drei Parameter während der Polymerisation von Aktin deutlich voneinander unterscheiden (Abb. 4-22).

Die Interpretation von Schalldämpfungsänderungen ist diffizil. Es handelt sich um einen komplexen physikalischen Parameter (s. Kap. 3.4.5), der mit der Absorption mechanischer Energie verknüpft ist und daher auch mit der Frequenz und Geschwindigkeit des Ultraschalls sowie der Viskosität zusammenhängt. Mit Gleichung 16 (Kap. 3.4.5) wurde überprüft, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der gemessenen Schallgeschwindigkeit und der Viskosität zur gemessenen Schalldämpfung besteht. Die Schalldämpfung ist indes annähernd gleich der Viskosität, da im Nenner die Schallgeschwindigkeit durch die dritte Potenz eingeht, wodurch sich kleine Änderungen der Schallgeschwindigkeit (etwa während der Polymerisation von Aktin, also nur wenige Meter pro Sekunde) kaum auf den gesamten Quotienten auswirken. Dies ist auch nach Abb. 4-22 (b) ersichtlich, wonach eine Abnahme der Schallgeschwindigkeit durch die Zugabe von Profilin induziert wurde und sich die Schalldämpfung in ihrem charakteristischen Verlauf offensichtlich nicht veränderte. Das Ausmaß der Schalldämpfung wurde dennoch durch Profilin (10  $\mu\text{M}$ ) reduziert. Dieser Effekt ist ferner abhängig von der Profilinkonzentration (Abb. 4-23). Diese Befunde belegen, dass der Verlauf der Schalldämpfung vorwiegend eine Funktion der Streuung des Schalls ist und mit der zeitlichen und räumlichen Modifizierung höher geordneter Polymerstrukturen verknüpft ist.

In Flüssigkeiten komplexer Makromoleküle ist die Schalldämpfung eine Funktion der intrinsischen Energie der Moleküle, also der Vibrations-, Translations- und Rotationsenergie (Cracknell, 1980). Daher steht die Abnahme der Schalldämpfung während des starken Schallgeschwindigkeitsanstieges und der Lag-Phase der Polymerisation (Abb. 4-22, Abb. 4-26 durchgezogene Linie) im Zusammenhang mit der Entstehung der Aktintrimere: durch den Zusammenschluss der globulären Aktinmonomere zu den stäbchenförmigen Trimeren wird zusätzliche Energie für die Freiheitsgrade Vibration und Rotation benötigt. Diese Energie wird der Energie des Ultraschalls entzogen, was sich an einer Abnahme der Schallintensität ablesen lässt. Mit der Zugabe von Profilin werden größere Molekülkomplexe gebildet (sogenannte Profilin<sub>4</sub>-Aktin Tetramere, Babich et al., 1996), was sich in einer länger anhaltenden Abnahme der Schallintensität ausdrückt (Abb. 4-23).

Während der Elongationsphase der Aktinfilamente, also während der schnell ansteigenden Viskosität, bleibt die Schalldämpfung zunächst konstant. Erst nach dem Erreichen des etwa halben Viskositätsmaximums steigt die Dämpfung stark an (Abb. 4-22, Abb. 4-26 durchgezogene Linie). Zu diesem Zeitpunkt ist eine Dichte an Filamenten erreicht, die ein longitudinales Zusammenschließen der Filamente bzw. eine seitliche Aggregation der Filamente zulässt (Griffith and Pollard, 1982; Tang and Janmey, 1996). Möglich ist auch die Ausbildung eines Netzwerkes über Aktin-Aktin-Kontakte nach dem „lateral slipping“-Modell von Bremer und Aebi (1992) (s. Kap. 5.2).

Durch die Zugabe von  $\alpha$ -Aktinin, welches das F-Aktin schon in der frühen Phase der Polymerisation in ein dreidimensionales Netzwerk „drängt, indem es das ‚annealing‘ der Filamente stört“ (Colombo et al., 1993), beginnt die Schalldämpfung *de facto* auch schon früher deutlich anzusteigen (Abb. 4-25). Umgekehrt wird durch die Zugabe von Cytochalasin D die Ausbildung eines homogen-isotropen Netzwerkes und die Bündelung von Filamenten inhibiert (vgl. Tafel 4-1 a, b und Tafel 4-2). Dieser Sachverhalt schlägt sich in einer Reduktion dieser Phase des starken Schalldämpfungsanstiegs nieder. In Gegenwart sehr hoher Cytochalasin-Konzentrationen bleibt die Phase des schnellen und starken Schalldämpfungsanstieges sogar aus (Abb. 4-26).

Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass die Intensität der Schalldämpfung mit dem Grad der Vernetzung, dem Ausmaß der „Seite-an-Seite-Aggregation“ und dem „annealing“ von Filamenten zusammenhängt. Auch an lebenden Zellen wurde mit der Ultraschallmikroskopie im Bereich der Peripherie von XTH-2 Zellen eine signifikante Korrelation von Aktinbündeln mit hohen Schalldämpfungswerten gefunden (Lüers et al., 1992).

Die Dämpfung nimmt, ähnlich der Elastizität, mit zunehmender Aktinkonzentration ab (Abb. 4-24 d) und nähert sich einem Minimalwert an. Dies deutet auf eine konzentrationsbedingte Phasentransition, wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, die nicht nur hinsichtlich der Elastizität (vgl. Abb. 4-10 a), sondern auch hinsichtlich der Dämpfung zwischen 25 und 60  $\mu\text{M}$  Aktin erfolgt. Auch ist das Ausmaß des starken Dämpfungsanstiegs während der Elongationsphase abhängig von der Aktinkonzentration. Für niedrige Aktinkonzentrationen steigt die Dämpfung während der schnellen Viskositätszunahme (innerhalb etwa 150 Sekunden) um etwa 0,4 dB/mm an (Abb. 4-24

a), wohingegen für hohe Konzentrationen die Dämpfung in dieser Phase nur um etwa 0,07 dB/mm ansteigt (Abb. 4-24 c). Hier besteht ein Zusammenhang mit der räumlichen Ausdehnung des Aktinnetzwerkes. Bei niedrigen Aktinkonzentrationen kann sich das Aktinnetzwerk homogen-isotrop im Raum ausbreiten (Tafel 4-1 a, b). Bei höheren Konzentrationen ( $> 10 \mu\text{M}$ ) erscheint das Aktinnetzwerk im Elektronenmikroskop bereits äußerst dicht gepackt mit einer sehr geringen Maschenweite (typisches Erscheinungsbild: linke untere Ecke in Tafel 4-4 d). Im Falle einer, durch die Wirkung von  $\alpha$ -Aktinin eingeleiteten, homogen-isotropen Ausbreitung des Netzes (Abb. 4-25), ist auch die Zunahme der Schalldämpfung erhöht. Im Falle eines durch die Wirkung von Cytochalasin D sehr inhomogen-anisotropen Netzwerkes fällt die Schalldämpfung dagegen entsprechend geringer aus (Abb. 4-26).

Die zeitliche Änderung der Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Cho et al. (1985) bestimmten die Schallabsorption von globulären Proteinen nach der Methode von Eggers und Funck (1973) bei einer Anregungsfrequenz von 1-100 MHz. Die Flüssigkeit befindet sich bei dieser Methode zwischen zwei Quarz-Transducern, die als akustische Resonatoren fungieren. Die Amplitude der zwischen den Resonatoren reflektierten Schallwelle verändert sich, sobald sich der Absorptionskoeffizient der Flüssigkeit ändert. Cho et al. (1985) fanden einen direkten Zusammenhang der Schallabsorption globulärer Proteine (u.a. Myoglobin, BSA, Ribonuclease A,  $\alpha$ -Chymotrypsin A) mit der Anregungsfrequenz (1-100 MHz), der Temperatur (4-45 °C), dem pH-Wert (2-12) und der Konzentration der Proteine. Die Schalldämpfung wurde auch durch die Zugabe hoher Salzkonzentrationen (bis zu 0,2 M KCl) nicht beeinflusst. ORR-Messungen zeigen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Zugabe des Polymerisations-salzes und der Schalldämpfung (Daten nicht gezeigt). Cho et al. (1985) fanden zudem keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der Hydratation der (globulären) Proteine und der Schallabsorption. Auch dies ist konsistent mit den Befunden der vorliegenden Arbeit, denn ORR-Messungen ergaben keinen Zusammenhang zwischen der G-Aktinkonzentrationen und der Schalldämpfung. Erst nach der Salzzugabe, also während der Polymerisation, die einhergeht mit einem Lösungsmittelentzug (Kap. 5.4), ändert sich die Schalldämpfung abhängig von der Proteinkonzentration (Abb. 4-22 bis 4-26).

## 5.9 Viskoelastizität von Intermediärfilamenten am Beispiel der Neurofilamente

### 5.9.1 Mechanische Eigenschaften von Neurofilamenten

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die *in vitro*-Mechanik der zwei wichtigsten Zytoskelettelemente, des Aktins und der Mikrotubuli, beschrieben. Erst neuere Untersuchungen stellen die Bedeutung der Intermediärfilamente hinsichtlich ihrer formgebendenden Funktion (Janmey et al., 1998) und der Beteiligung an regulatorischen, intrazellulären Prozessen, wie z.B. der Signaltransduktion, in den Vordergrund (Matsuzawa et al., 1998).

Die Polymerisation von Neurofilamentprotein wurde von Herrmann und Aebi (1998) beschrieben (s. Kap. 2.3.3.5). Demnach folgt einer schnellen Polymerisation der Homodimere zu Trimeren und Oktameren ( $< 10$  Sekunden) eine Phase der Elongation (5 bis 60-minütig) und darauf eine Verdichtungsphase, wobei es hier auch zu intrafilamentösen Umorganisationen kommen kann. Obwohl die eigentliche Phase der Polymerisation von Monomeren zu Oktameren nur sehr kurz ist, und Viskositätsanstiege von Neurofilamentlösungen eher eine Folge von Aggregationen von Protofilamenten, also longitudinalen Zusammenschlüssen („annealing“) und Bündelungen („compaction“) ist, wird der Begriff „Polymerisation“ beibehalten.

Die kritische Konzentration zur Polymerisation von Neurofilamenten beträgt etwa  $1,5 \mu\text{M}$  (Leterrier und Eyer, 1987). Daher war es von besonderem Interesse viskoelastische Messungen von sehr niedrigen Neurofilamentkonzentrationen mit der sensitiven ORR-Methode durchzuführen. Hierbei zeigte sich, dass für niedrige Neurofilamentkonzentrationen ( $0,5-1 \mu\text{M}$ ) die Viskosität und die Schalldämpfung linear zunimmt, wobei das Ausmaß der Zunahme von der Proteinkonzentration abhängt (Abb. 4-38). Die Schallgeschwindigkeit nimmt zunächst ab und steigt nach etwa 500-800 Sekunden konstant an, was auf Änderungen der elastischen Eigenschaften der Polymere während der Elongationsphase zeigt. Möglicherweise deutet die Schallgeschwindigkeitsabnahme auf eine  $\text{Mg}^{2+}$ -eingeleitete Relaxation der Neurofilamente durch intrafilamentöse Konformationsänderungen (Leterrier, 1999). Paul Janmey und Jean-Francois Leterrier haben Flexibilitätsänderungen nach der Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  zu Neurofilamenten mit einem Torsionspendel bestimmt. Für höhere Proteinkonzentrationen ( $1 \mu\text{M}$ ) macht sich diese Relaxation weniger bemerkbar, da die Filamente eine höhere Steifigkeit haben (Leterrier, 1999). Eine „lag-Phase der Elastizitätszunahme“ haben Leterrier et al. (1996) mit dem Janmey'schen Torsionspendel gemessen. Erst nach etwa 100 Minuten nahm die Elastizität von  $2-3 \mu\text{M}$  Neurofilamenten sehr schnell zu. Ferner fanden die Autoren einen Zusammenhang zwischen der Zunahme der Scherelastizität ( $G'$ ) und dem Grad der Vernetzung der Neurofilamente während der Polymerisation, was sich in EM-Bildern und in einem Viskositätsanstieg ( $G''$ ) zeigte und mit EM-Aufnahmen dokumentiert wurde.

Bemerkenswert sind die deutlichen Schwankungen der Viskosität (Nebengrafik in Abb. 4-38), die auf intrafilamentöse Umstrukturierungen hinweisen, also Entwirrungen und Verwirrungen von Filamenten, wie sie von Herrmann und Aebi (1998) beschrieben wurden. Diese Schwankungen steigen für höhere Proteinkonzentrationen mit zunehmender Schallgeschwindigkeit an (s. Abb. 4-38: Viskosität von 1  $\mu\text{M}$  Neurofilamenten nach 500 Sekunden). Bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C und den eingesetzten sehr niedrigen Proteinkonzentrationen sind keine ausgeprägten Filament-Netzwerke zu erwarten, was auch Viskositätsmessungen von Leterrier und Eyer (1987) bzw. Messungen der optischen Dichte von Leterrier et al. (1984) während der Polymerisation von Neurofilamentprotein bestätigen. Daher resultieren diese Schwankungen eher aus intrafilamentösen denn aus interfilamentösen Umorganisationen.

Intrafilamentöse Molekülbewegungen können ebenso mit der „dynamic light scattering“-Methode registriert werden. Bei dieser Methode der Lichtstreuungsmessung können molekulare Bewegungen im Nanometerbereich (10-100 nm) gemessen werden. Wählt man eine niedrige Proteinkonzentration, so hängt die Messung weder von der Filamentlänge noch von Quervernetzungen ab. Im Vergleich zu Aktin und Mikrotubuli zeigen nach dieser Methode Neurofilamente starke intramolekulare Schwankungen (Leterrier et al., 1996), was möglicherweise die beobachteten Viskositätsschwankungen analog Abb. 4-38 (Nebengrafik) erklärt.

Die mit dem ORR gemessenen Viskositäten der Neurofilamentlösungen (Nebengrafik in Abb. 4-38) entsprechen etwa den in der Literatur beschriebenen Kugelfall-viskosimetrisch bestimmten Werten (Leterrier und Eyer, 1987; Leterrier et al., 1992; Eyer et al., 1989). Der Einfluss der durch die Kugel erzeugten Scherkräfte auf die Viskosität von Neurofilamenten ist, im Gegensatz zu Aktinlösungen (vgl. Kap. 5.2), demnach gering. Die im Vergleich zu Aktin und Mikrotubuli sehr hohe Resistenz der Intermediärfilamente gegen Deformationen (sogenannte „compliance“ = Dehnbarkeit) wurde für Neurofilamente (Leterrier et al., 1996) aber auch für Vimentin (Janmey et al., 1991) und Keratin (Ma et al., 1999) sowie Desmin und Fibrin (Janmey et al., 1998) nachgewiesen. Diese Flexibilität wird den lockeren Verbindungen zwischen den Intermediärfilament-Untereinheiten zugesprochen, die sich, im Gegensatz zu Aktin oder Mikrotubuli, gegeneinander verschieben können (Janmey et al., 1998). Auch modulierten impulsartige Änderungen von Glasfaserauslenkungen die Viskosität von sehr niedrigen Neurofilamentlösungen ( $< 0,5 \mu\text{M}$ ) nicht (Daten nicht gezeigt).

In Kapitel 5.7 wurde gezeigt, dass die Schalldämpfung ein mechanischer Parameter ist, der in Zusammenhang mit der Bildung komplexer makromolekularer Strukturen steht. Die Schalldämpfung von sehr niedrig konzentrierten Neurofilamentlösungen ist schon zu Beginn der Messung um ein Vielfaches höher (Abb. 4-38) als von ungefähr gleichmolaren F-Aktinlösungen (Abb. 4-24 d). Aufgrund der hohen Flexibilität der sehr komplex strukturierten Protofilamente aus Neurofilamentprotein und dem Entstehen immer vielschichtigerer Anordnungen, wird der Schall zunehmend absorbiert. Die konstante Zunahme der Schalldämpfung ist ein möglicher Indikator für geringere Bündelungs- bzw. Quervernetzungsvorgänge, welche über Stunden anhalten können (Gou et al., 1998). Interfilamentöse Verbindungen semiparalleler Neurofilamente wurden *in vitro* anhand von EM-Aufnahmen (z.B. Leterrier und Eyer, 1987; Leterrier et al., 1996; Gou et al., 1998) und *in vivo* in NF-M (Neurofilament-querverbindender Seitenarm) transfizierten Zellen (z.B. Nagakawa et al., 1995) gezeigt.

Auch die Schallgeschwindigkeit steigt während der Polymerisation der Neurofilamentproteine konstant an, was sich von der Kinetik des Elastizitätszuwachses niedrig konzentrierter Aktinlösungen unterscheidet (Abb. 4-7 a). Die Schallgeschwindigkeitszunahme innerhalb von 15 Minuten liegt etwa zehnfach höher als die von etwa gleichmolaren Aktinlösungen (Abb. 4-10 a). Dies deutet zwar auf eine erhöhte Steifigkeit des Gels, schließt aber nicht unbedingt eine größere Flexibilität durch erhöhte Dehnbarkeit der Neurofilamente (Leterrier et al., 1996; Janmey et al., 1998) aus. Daher ist die Bezeichnung „semi-flexibel“ für Aktinfilamente und „flexibel“ für Intermediärfilamente nach Käs et al. (1996) noch gerechtfertigt.

### 5.9.2 Interaktion von Neurofilamenten mit Mikrotubuli

Niedrige Konzentrationen MAP-freien Tubulins ( $< 15 \mu\text{M}$ ) erhöhen die Viskosität kaum (z.B. Leterrier et al., 1984, vgl. Kap. 4.2). Die Polymerisation von Tubulin zu höher geordneten Oligomerstrukturen mit festkörperähnlichen Eigenschaften kann jedoch an der Zunahme der Schallgeschwindigkeit beobachtet werden (Abb. 4-39, vgl. Abb. 4-11). Der Anstieg der Schalldämpfung während der Polymerisation kann mit der Verwendung des Saccharose/D<sub>2</sub>O-haltigen Puffers erklärt werden, welcher zur Erhaltung der Stabilität der später zugegebenen Neurofilamente unerlässlich ist. Ohne Saccharose/D<sub>2</sub>O wurde während der Polymerisation von Tubulin keine eindeutige Schalldämpfungskinetik bestimmt (s. Kap. 4.4). Die Zugabe sehr geringer Neurofilamentkonzentrationen bewirkt einen deutlichen Anstieg der Viskosität und gleichzeitig einen deutlichen Abfall der Elastizität (Abb. 4-39). Eine durch Neurofilamente (3  $\mu\text{M}$ ) induzierte Viskositätszunahme von PC-Tubulinlösungen (18  $\mu\text{M}$ ) wurde auch von Leterrier et al. (1984) beobachtet. Etwa 3 Minuten nach der Zugabe der Neurofilamente, nimmt die Elastizität der Lösung ab, um dann nach ca. 6 Minuten wieder anzusteigen (Abb. 4-39). Die Schallgeschwindigkeitsabnahme nach der Zugabe von Neurofilamentprotein zeigt einen ähnlichen Verlauf, wie er während der Polymerisation von Neurofilamenten ohne Tubulin (Abb. 4-38) beobachtet wurde, wobei

dort die Polymerisation durch die Zugabe von  $MgCl_2$  (5 mM) induziert wurde (Neurofilamente polymerisieren etwa 5-mal langsamer ohne 5 mM  $MgCl_2$ , Letterier und Eyer, 1987).

Die deutliche Abnahme der Schallgeschwindigkeit (Abb. 4-39) lässt sich dadurch erklären, dass die an den Neurofilamenten assoziierte GTPase das GTP der Pufferlösung (bzw. an Mikrotubuli gebundenes GTP) spaltet (Aamodt und Williams, 1984b), wodurch die Tubulin-Protofilamente destabilisiert werden, was wiederum die Elastizität des Gels verringert. Der Viskositätsanstieg resultiert demnach aus der Polymerisation von Neurofilamenten, die durch die Zugabe von Tubulin induziert wird. Umgekehrt fördert Tubulin die Polymerisation von Neurofilamenten (Letterier et al., 1984), wodurch später (Abb. 4-39, > 2000 Sekunden) vermehrt Tubulinoligomere entstehen können, welche anschließend die Viskoelastizität des Gels erhöhen.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass der Viskositätsanstieg nach der Zugabe der Neurofilamente ein Mischeffekt aus der Polymerisation von Neurofilamenten und Tubulin ist, zeigt Abb. 4-40: nach der Herabsetzung der Tubulinkonzentration auf einen Wert, der nahe der kritischen Konzentration zur Polymerisation ist (4  $\mu M$ ), wurde nach der Zugabe von 0,15  $\mu M$  Neurofilamente immer noch ein Viskositätsanstieg gemessen. Der Anstieg der Viskosität ist etwa halb so hoch wie die Viskositätszunahme nach der Zugabe von 0,15  $\mu M$  Neurofilamente zu 15  $\mu M$  Tubulin (Abb. 4-39). Der Viskositätszuwachs ist demnach eine Funktion der beigemischten Neurofilamente.

Die physiologische Bedeutung der Interaktion von Mikrotubuli mit Neurofilamenten zeigt sich im langsamen axonalen Transport, denn hier werden die Untereinheiten der Neurofilamente Mikrotubuli-vermittelt transportiert (Papazozomenos et al., 1985).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass Neurofilamente die Polymerisation von MTP durch Wechselwirkungen mit den MAPs inhibieren (Letterier et al., 1982). Umgekehrt ist die polymerisationsfördernde Wirkung der Neurofilamente auf PC-Tubulin durch eine leichte Kontamination von MAPs (etwa 0,5 % MAPs liegen gebunden an den Neurofilamenten vor) begründet (Letterier et al., 1984). Der Mechanismus wird dadurch erklärt, dass in Gegenwart niedriger MAP-Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit für jedes Molekül, eine Bindungsstelle am Neurofilament und am Mikrotubuli zu finden (ein MAP kann gleichzeitig an ein Neurofilament und an einen Mikrotubulus binden), sehr hoch ist, wohingegen die Bindungsstellen am Neurofilament bei hohen MAP-Konzentrationen bereits durch einzelne MAPs besetzt sind. Dies verhindert Querverbindungen zwischen Neurofilamenten und Mikrotubuli und setzt somit die Viskosität herab (Aamodt und Williams, 1984a).

ATP kann nach einer Studie von Aamodt und Williams (1984b) über die Neurofilament-assoziierte Nukleotid-diphosphokinase GTP aus GDP regenerieren. Dies könnte sich positiv auf die Stabilität der Tubulinoligomere auswirken. In der Tat wurde nach der Online-Zugabe von 1 mM ATP ein kurzzeitiger (1-minütiger) Elastizitätsanstieg von 0,1 MPa gemessen (Abb. 4-40), der auf die Bildung GTP-induzierter Tubulinoligomere mit hoher Elastizität (Kap. 5.5) schließen lässt. Der Peak nimmt später wieder ab, weil die Neurofilament-assoziierte GTPase das GTP wieder spaltet, wodurch die Tubulinoligomere wieder destabilisiert werden.

Zu erwarten war zudem die folgende Abnahme der Viskosität, denn ATP stimuliert die Degeneration von Neurofilamenten (Gou und Letterier, 1995; Gou et al., 1995), die durch eine Ubiquitin<sup>29</sup>-vermittelte Proteolyse der Neurofilamente (durch einen 26S Proteasomkomplex) erfolgt, wobei die proteolytischen Enzyme auch noch nach der Elution an das Neurofilament gebunden vorliegen. Ubiquitin-assoziierte Proteine sind Bestandteile intraneuronaler Einschlüsse, welche in zahlreichen neurodegenerativen Nervenzellen gefunden werden, in paarig-helikalen Filamenten (PHF) der Alzheimer Krankheit, den Lewy-Körperchen der Parkinsonschen Krankheit oder den Skein-artigen Filamenten der Amyotrophen-Lateralen-Sklerose (ALS). In den Lewy-Körperchen und den Skein-artigen Filamenten wurden auch abnorme Neurofilament-Aggregate gefunden (Gou und Letterier, 1995). Letterier et al. (1991) fanden, dass höhere ATP-Konzentrationen (0,5 mM) die Viskosität von Neurofilamenten erniedrigen. Dies geht einher mit einer Aktivierung der Neurofilament-assoziierten Proteinkinase. Die Autophosphorylierung betrifft primär die langen, carboxyterminalen Seitenarme der NF-H- und NF-M-Untereinheiten, was eine Inhibition der spezifischen Phosphorylierungstellen durch monoklonale Antikörper ergab. Diese spezialisierten Stellen der NF-H- und NF-M-Untereinheiten binden vermutlich auch das Tubulin (Letterier et al., 1991). Die Autophosphorylierung ist sehr wahrscheinlich auch ein Regelmechanismus des Sol-Gel-Gleichgewichts *in vivo*, was zu abnormen hyperphosphorylierten Neurofilament-Aggregaten führen kann (Gou et al., 1995). Bemerkenswert ist die zur ATP-induzierten Viskositätsabnahme von NF-MT-Lösungen zeitversetzte Abnahme der Schalldämpfung (Abb. 4-40). Eine mögliche Erklärung wäre, dass zunächst Quervernetzungen der Neurofilamente mit Tubulinoligomeren gelöst werden (was die Viskosität herabsetzt) und sich dann erst die Neurofilamente entwirren (wodurch die Schalldämpfung herabgesetzt wird).

<sup>29</sup> Ubiquitin ist ein in tierischen und pflanzlichen Zellen weit verbreitetes Hitzeschockprotein, das in die Zersetzung abnormaler oder kurzlebiger Proteine involviert ist (Hochstrasser, 1995).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

Die G/F-Transition zytoskelettärer Elemente bildet die molekulare Basis zur Kontrolle der Zellform, Motilität, Migration und Invasivität von Zellen. Die Änderungen der Filamentlängen werden durch bindende Proteine kontrolliert, wodurch sich die viskoelastischen Eigenschaften des Zytoplasmas ändern. Die Kenntnis der mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zytoskelettelemente *in vitro* (mit und ohne bindende Proteine) ist die Grundlage zum Verständnis der Zellmechanik. Daher wurde eine nicht destruktive Methode zur Bestimmung viskoelastischer Eigenschaften von Gelen und Flüssigkeiten entwickelt. Als Viskositätssensor dient ein kleines Glasstäbchen, welches in der zu untersuchenden Flüssigkeit in seiner Resonanzfrequenz schwingt. Aufgrund der Zähigkeit der Flüssigkeiten kommt es zur Mitbewegung angrenzender Flüssigkeitsschichten. Die Eindringtiefe der erzeugten Scherwellen ist eine Funktion der Viskosität und der Dichte der Flüssigkeit. Die extrem kleinen Auslenkungen (1-100 nm) des Sensors werden von einem phasensensitiven akustischen Mikroskop detektiert, welches gleichzeitig die Detektion des Elastizitätsmoduls der Flüssigkeit ermöglicht.

Nach Aufbau und Weiterentwicklung des Gerätes wurde die Viskoelastizität während der Polymerisation von Aktin, Tubulin und Neurofilamentprotein gemessen sowie während der Interaktion der Polymere mit einer Reihe spezifisch bindender Proteine, wie z.B.  $\alpha$ -Aktinin, Profilin, Glykolyseenzyme, MAPs bzw. Zellgiften wie Cytochalasin D, Phalloidin, Colchizin und Taxol.

Im Vergleich zu F-Aktinlösungen ist die dynamische Viskosität von Mikrotubulilösungen um eine Zehnerpotenz und die Schallgeschwindigkeit um etwa 100 m/s höher. Die Viskoelastizität von Nicht-Muskelaktin ist im Vergleich zu Muskelaktin etwa dreimal höher. Die steady-state-Viskositäten von F-Aktin- und Mikrotubulilösungen nähern sich mit steigender Proteinkonzentration einem Maximalwert an, wohingegen die Elastizitäten sich einem Minimalwert annähern, was auf eine nematische Phasentransition zurückzuführen ist. Der Schallgeschwindigkeitsverlauf während der Polymerisation von Aktin und Tubulin ist biphasisch: er nimmt zunächst vor messbaren Viskositätsänderungen zu, was hinsichtlich des Aktins auf eine Zunahme steifer Aktinprimer und hinsichtlich des Tubulins auf die Bildung oligomerer Strukturen mit hoher intrinsischer Steifigkeit zurückzuführen ist. Für Proteinkonzentrationen  $>20 \mu\text{M}$  fällt dann die Schallgeschwindigkeit nach dem Erreichen des Viskositätsmaximums ab, was durch eine erhöhte Volumenkompressibilität infolge zunehmender Hydratation der Polymere begründet ist. Versuche mit polymerisationsfördernden bzw. depolymerisierenden Agenzien wie Taxol bzw. Colchizin und Kalzium zeigen, dass die hohe Elastizität von Mikrotubulilösungen durch die intrinsische Elastizität der Tubulinoligomere dominiert wird.

Die Viskosität von Mikrotubuli mit assoziierten MAPs (MTP) ist im Vergleich zu F-Aktin ungefähr doppelt so hoch und im Vergleich zu PC-Tubulin ungefähr dreimal niedriger. Die Elastizität von MTP ist im Vergleich zu F-Aktin durchschnittlich 4 % höher und 3 % niedriger im Vergleich zu MAP-freien Mikrotubuli. Die Assoziationen von Neurofilamenten an Mikrotubuli induzierte einen Viskositätsanstieg, während die Elastizität fiel, was auf eine Destabilisation der Mikrotubuli während der Interaktion zurückzuführen ist. Die Destabilisation ist möglicherweise eine Folge einer GTP-Hydrolyse durch die an den Neurofilamenten assoziierte GTPase.

Neben den zeitlich voneinander unabhängigen Verläufen der Schallgeschwindigkeit und der Viskosität konnte mit Hilfe der Detektion der Schalldämpfung während der Polymerisation von Aktin eine weitere zeitlich unabhängig verlaufende Kinetik bestimmt werden, welche mit der Quervernetzung und der Filamentlänge zusammenhängt. Die Schalldämpfung von Neurofilamenten ist im Vergleich zu F-Aktin etwa 10-mal höher. Während der Polymerisation von Tubulin, mit und ohne MAPs, konnte aufgrund hoher Schallreflexionen, bedingt durch die festkörperähnlichen Strukturen, keine klar definierte Schalldämpfungskinetik bestimmt werden.

Die Elastizität von Aktinfilamenten (1 mg/ml) hängt nicht mit der Deformationsfrequenz (0,05-33 kHz) zusammen. Nach der Zugabe von  $\alpha$ -Aktinin steigt jedoch die Elastizität mit der Frequenz gemäß dem Verhalten eines elastischen Körpers an. Auch durch die Zugabe hoher ATP-Konzentrationen (2 mM) kann die Elastizität von Aktin erhöht werden. Impulsartige Modulationen der Schwingungsamplitude von  $\pm 30$  nm senkten die Viskosität von Aktinfilamenten ( $< 25 \mu\text{M}$ ) um 50 %, was auf ein Zerschlagen und Umorientieren von Filamenten zurückzuführen ist. Durch die Zugabe von  $\alpha$ -Aktinin waren diese Viskositätsänderungen siebenmal niedriger. Die Viskosität von Aktinfilamenten  $> 50 \mu\text{M}$  konnte durch impulsartige Erhöhungen der Schwingungsamplitude ( $> 40$  nm) nicht verringert werden. Ebenso wurden die Viskositäten von Tubulinfilamenten (15-100  $\mu\text{M}$ ) und Neurofilamentlösungen ( $> 0,5 \mu\text{M}$ ) durch impulsartige Deformationen im Nanometerbereich (10-100 nm) nicht beeinflusst.

Niedrige Profilinkonzentrationen (Aktin:Profilin = 1) fördern die Polymerisation von  $Mg^{2+}$ - $\beta\gamma$ -Aktin. Ebenso führt die Zugabe von Profilin (Aktin:Profilin = 1:1) zu bereits polymerisiertem Aktin zu einer Viskositätszunahme. Profilin im Überschuss (Aktin:Profilin = 1:5) hemmt die Polymerisation von  $Mg^{2+}$ - $\beta\gamma$ -Aktin. Im Gegensatz zu Muskelaktin verliert Nicht-Muskelaktin nach einiger Zeit (> 40 Minuten) seine Elastizität. Dieser Elastizitätsverlust kann durch die Zugabe von Profilin verzögert werden. Nach der Zugabe geringer Profilinkonzentrationen zu  $\beta\gamma$ -Aktin wurde anhand von EM-Aufnahmen vermehrt nicht-filamentöse Aktin-Aggregate gezeigt, welches besonders hohe Elastizitätswerte aufwies. Zusammen mit den rheologischen Befunden für Aktin- und Mikrotubulilösungen kann geschlossen werden, dass nicht-filamentöse Formen zytoskelettärer Elemente (Tubulinoligomere, Aktintrimere, G-Aktincluster) in hohem Maße zur Elastizität von Zellen beitragen.

Hexokinase fördert die Polymerisation von Aktin. In Gegenwart hoher ATP-Konzentrationen wirkt sie durch Fragmentierung von Aktinfilamenten elastizitätsmindernd. In Gegenwart von Glukose wird dieser Effekt aufgehoben.

LDH-H<sub>4</sub> fördert in Gegenwart ihres Coenzym NADH die Polymerisation von Aktin. Gibt man zusätzlich Pyruvat hinzu, so wird dieser Effekt nahezu umgekehrt. Unter diesen Bedingungen ist ferner die Enzymaktivität der LDH-H<sub>4</sub> eingeschränkt. Umgekehrt fördert die LDH-H<sub>4</sub> in Gegenwart von Laktat und NAD<sup>+</sup> die Polymerisation von Aktin, wobei gleichzeitig die Enzymaktivität der LDH-H<sub>4</sub> erhöht ist. Diese Befunde sprechen für eine deutliche Reziprozität zwischen LDH-H<sub>4</sub> und Aktin.

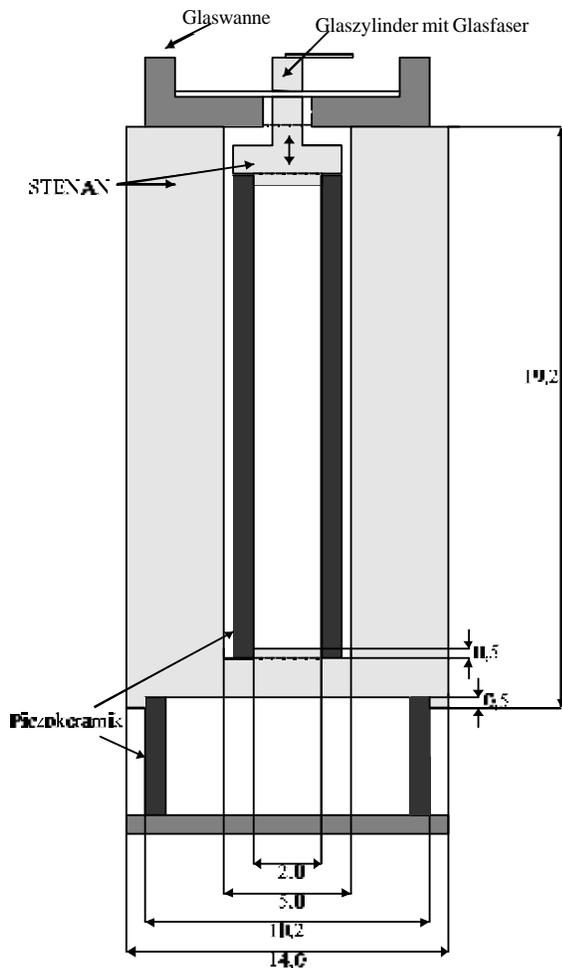
Aldolase reduziert deutlich die Viskoelastizität von F-Aktin, was in der Bildung von F-Aktin-Aldolase-Parakristallen begründet ist. Die Zugabe des Substrates FBP erhöht hingegen die Viskoelastizität von F-Aktin. Der Effekt hängt jedoch davon ab, ob Magnesium-Ionen an den Aldolase-G-Aktin-Komplex binden. Wird Aldolase zu polymerisierendem Aktin zugegeben, so bleibt die Viskosität der Lösung unverändert, während die Elastizität zunimmt. In diesem Falle wird die Steifigkeit der Filamente durch die Anlagerung der Aldolase erhöht.

Zytosolische, nicht-membrangebundene Enzyme, wie die Aldolase, Hexokinase und LDH binden demnach an F-Aktin und modulieren seine Mechanik. Das Ausmaß der Modulation hängt von der Konzentration der Enzyme sowie der Gegenwart der jeweiligen Substrate ab. Ferner moduliert Aktin reziprok die Aktivität der Enzyme.

7 ANHANG

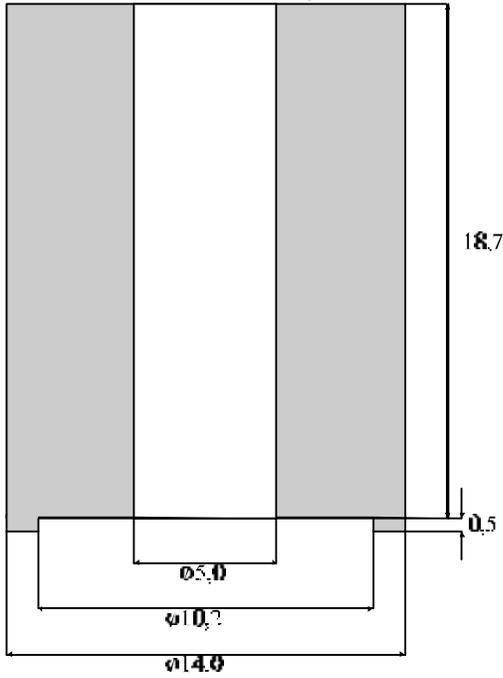
7.1 Technische Zeichnungen zum ORR

1. Grundaufbau

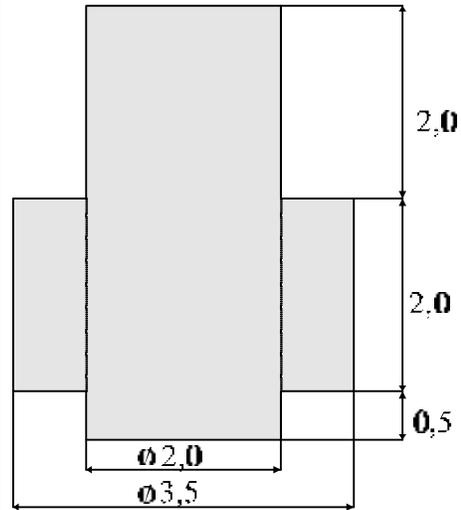


Anleitung zum Grundaufbau: Sämtliche Komponenten werden mit Nagellack verbunden. Ausnahme: Glasfaser mit Glaszylinder, Glaszylinder mit Deckgläschen und Deckgläschen mit Glaswanne. Diese Bauteile werden mit einem Zweikomponentenkleber (z.B. aus Epoxid-Harz) verklebt. Die inneren und äußeren Stromzuleitungen der Piezoröhrchen werden mit Indium verlötet. Für das kleine Piezoröhrchen reicht Niederstrom-Spulendraht mit Lackisolierung. Das große Piezoröhrchen muss mit Kabeln verlötet werden, die für Ströme bis zu 300 Volt geeignet sind.

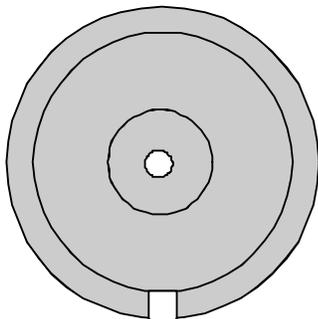
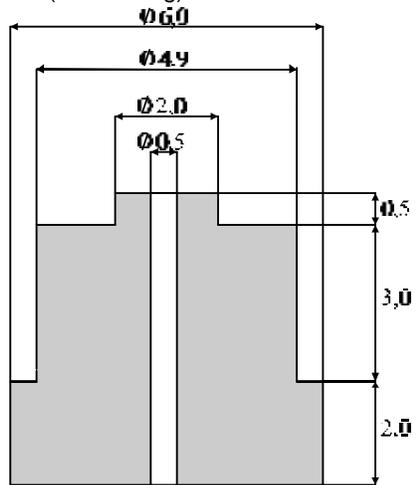
2. Keramikaufsatz für das große Piezoröhrchen



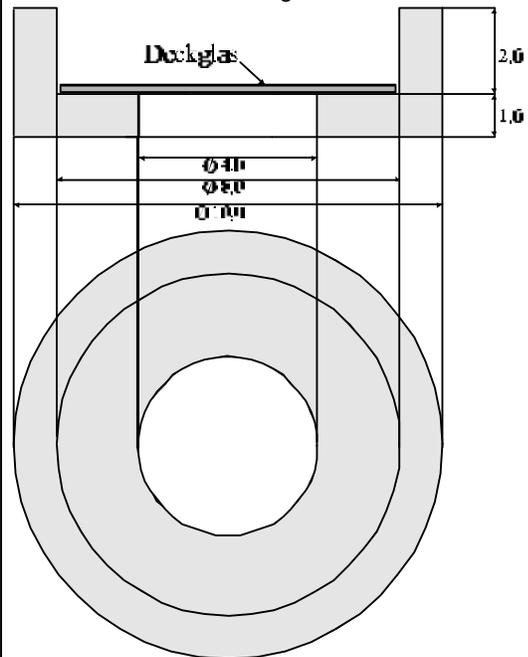
3. Oberer Aufsatz des kleinen Piezoröhrchens



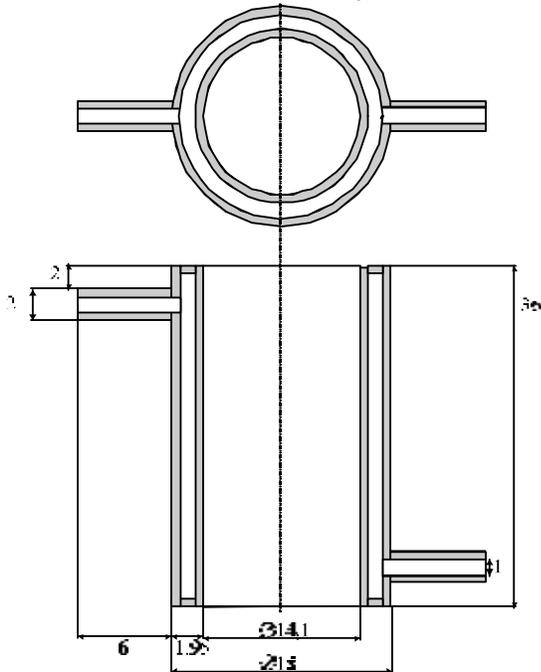
4. Keramischer Unterbau des kleinen Piezoröhrchens mit Stromzuleitungen innen (Hohlraum) und außen (Einkerbung)



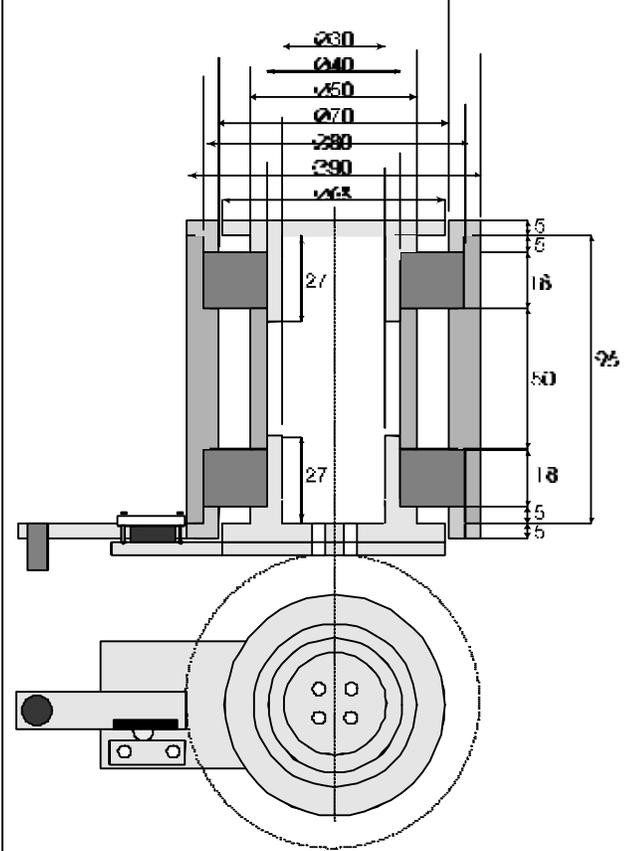
5. Glaswanne mit Deckgläschen



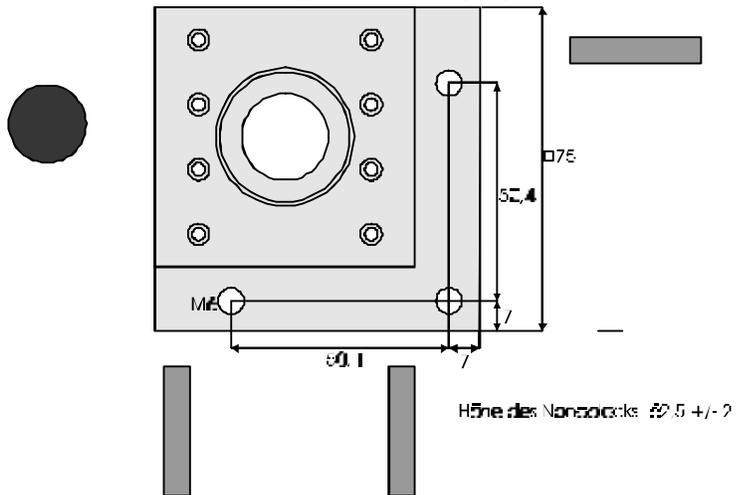
6. Temperierhülse (aus Messing)



7. Linsenhalterung mit Schnappverschluss und der kugelgelagerten Schwenkvorrichtung



8. Grundplatte mit Bohrungen zur Befestigung des XYZ-Tisches



## 7.2 Software

### 7.2.1 Kurzfassung der Software zur ORR-Steuerung nach Zinke (1995)

#### Anfangsinitialisierung

- Initialisierung der Karten
- Wahl der Betriebsart des Frequenzzählers und des Vektor-Lock-In
- Frequenz einstellen für die Aufnahme der kompletten Frequenz-Phasen-Beziehung

#### Eingaben

- Dateiname angeben - Datei öffnen
- Messintervall (für Datei) angeben
- Gesamte Messzeit angeben
- Dichte angeben
- Temperatur eingeben - Ausgabe an DA-Wandler
- Taste drücken um Zeitmessung zu beginnen
- Taste drücken zum Starten der Messung

#### Vormessung

- Messung des Messbereichs und interne Frequenz des Lock-In
- Geschwindigkeitseichung (AD-Wandler auslesen - Amplitudenregler)

#### Messroutine

- Bei gegebener Frequenz Phasenoffset durch Integrierer im Boxcar ausrechnen
- Temperaturregler auslesen (AD-Wandler auslesen)
- Amplitudenregler auslesen (AD-Wandler auslesen)
- Dämpfungsregler ausmessen (AD-Wandler auslesen)
- Frequenzzähler auslesen
- Viskosität ausrechnen
- Zeit messen und warten bis Zeitkonstante für Phasenmessung erreicht wurde
- Phasenbeziehung messen (Lock-In)
- Berechnung der Frequenzänderung über Abweichung vom Phasensollwert
- Frequenzänderung an Lock-In in DA-Wandler wegen VCO
- Schreiben der Meßwerte in die Datei
- Abfragung nach möglichen Änderungen der Meßparameter
  - Gesamtzeit der Messung
  - Intervallgröße
  - Sollphase
  - Messung abbrechen
  - Temperaturänderung
  - Pause
  - Sollphase
  - Meßbereich am Lock-In umschalten
  - zurück zur Messroutine

#### Ende

- Neue Messung? - zurück zum Anfang
- DA-Wandler auf null setzen

### 7.2.2 Makros zur Automatisierung der Datenauswertung in Origin 6.0

1. Korrektur von Sprüngen im Schallgeschwindigkeitsverlauf durch Initialisierung des ZReglers während der Messung

```

getn -s (Enter limit value: current is $(limvx) for breaks >$(limdat)) limvx;
get col(vx) -e numPoints;
br=0;
repeat $(numPoints)
{
  zz1=1;zz2=2;
  yy1=1;yy2=2;
  limit %H_vx;
  limdat=(limit.ymax-limit.ymin)/limvx;
  repeat $(numPoints)
  {
    p1=(col(vx)[zz1]);p2=(col(vx)[zz2]);
    q1=(col(Elast)[yy1]);q2=(col(Elast)[yy2]);
    p3=p2-p1;q3=q2-q1;
  }
}

```

## ANHANG

```

if (p3>0) flag=1;
if (p3<0) flag=-1;
if (p3<0) p3=p3*(-1);if (q3<0) q3=q3*(-1);
if (p3>limdat) {br=br+1;break;};
else zz1=zz1+1;zz2=zz2+1;yy1=yy1+1;yy2=yy2+1;
type -q Corr. vx+Elast. Searching for breaks >$(limdat)... Row: $(zz2) of $(numPoints). Found: $(br)
breaks.;
if (numPoints==zz2) break 1;
};
repeat $(numPoints)
{
if (flag==1) {(col(vx)[zz2])=p2-p3;(col(Elast)[yy2])=q2-q3};
if (flag==-1) {(col(vx)[zz2])=p2+p3;(col(Elast)[yy2])=q2+q3};
type -q Corr. vx+Elast. Correcting data... Row: $(zz2) of $(numPoints). Found: $(br) breaks.;
if (numPoints==zz2) break;
else zz2=zz2+1;yy2=yy2+1;
p2=(col(vx)[zz2]);q2=(col(Elast)[yy2]);
};
};

```

2. Korrektur von Pausen im Zeitverlauf bedingt durch das Aufsetzen von Flüssigkeitstropfen am Motor bzw. durch Neufokussierungen

```

get col(Zeit.s.) -e numPoints;
br=0;
limdat=4;
repeat $(numPoints)
{
zz1=1;zz2=2;
yy1=1;yy2=2;
repeat $(numPoints)
{
p1=(col(Zeit.s.)[zz1]);p2=(col(Zeit.s.)[zz2]);
q1=(col(Zeit.m.)(yy1));q2=(col(Zeit.m.)(yy2));
p3=p2-p1;q3=q2-q1;
if (p3>0) flag=1;
if (p3<0) flag=-1;
if (p3<0) p3=p3*(-1);if (q3<0) q3=q3*(-1);
if (p3>limdat) {br=br+1;break;};
type -q Corr. Zeit. Searching for breaks>$(limdat)sec. ... Row: $(zz2) of $(numPoints). Found:
$(br) breaks.;
else zz1=zz1+1;zz2=zz2+1;yy1=yy1+1;yy2=yy2+1;
if (numPoints==zz2) break 1;
};
repeat $(numPoints)
{
if (flag==1) {(col(Zeit.s.)(zz2))=p2-p3;(col(Zeit.m.)(yy2))=q2-q3};
if (flag==-1) {(col(Zeit.s.)(zz2))=p2+p3;(col(Zeit.m.)(yy2))=q2+q3};
type -q Corr. Zeit. Correcting data... Row: $(zz2) of $(numPoints). Found: $(br) breaks.;
if (numPoints==zz2) break;
else zz2=zz2+1;yy2=yy2+1;
p2=(col(Zeit.s.)(zz2));q2=(col(Zeit.m.)(yy2));
};
};
};

```

3. Änderung der vx-Anfangswerte nach Temperatur-Drifts

```

getn -s (Enter value:) firstVx;
get col(vx) -e numPoints;
(col(Vx)[1])=firstVx;
zz1=1;zz2=2;zz3=3;
repeat $(numPoints)
{
p1=(col(Vx)[zz1]);p2=(col(Vx)[zz2]);p3=(col(Vx)[zz3]);

```

```

p4=p3-p2;
(col(Vx)[zz2])=p1+p4;
type -q Set vx to the given first value. Correcting data... Row: $(zz3) of $(numPoints);
if (numPoints==zz3) break;
else zz1=zz1+1;zz2=zz2+1;zz3=zz3+1;
};

```

### 7.2.3 Software zur Kugelfallviskosimeter-Steuerung

```

10 CLS
20 RESET: CLEAR
30 ON ERROR GOTO 2200
40 REM
50 REM
60 REM Die "Flaggen" dieses Programms bedeuten:
70 REM FLAG=Es wurde das Menü "Viskosität/Temperaturabhängigkeit" gewählt
80 REM FLAG2=Die Ist-Temperatur entspricht der gewünschten End-Temperatur
90 REM FLAG3=Es wurde gerade das DC-5 (Routine ab Zeile 1590) ausgelesen
100 REM      (DC-5 muß zwei mal hintereinander ausgelesen werden)
110 REM FLAG4=Wie FLAG3 nur für die DC-5-Routine ab Zeile 550
120 REM FLAG5=Damit nicht immer "BITTE WARTEN..." etc. geschrieben wird
130 REM FLAG6=Es wurde bei einer Zweiintervallmessung die Start-Temperatur
140 REM      gegen die Ist-Temperatur und die erste End-Temperatur gegen die
150 REM      zweite End-Temperatur ausgetauscht
160 REM FLAG7=Es wurde der Menü-Punkt "Bei Erreichen der End-Temperatur wird
170 REM      die Messung beendet" gewählt
180 REM FLAG8=Es wurde der Menü-Punkt "Einstellen der Soll-Temperatur" gewählt
190 REM
200 REM
210 PRINT "PROGRAMM ZUR STEUERUNG DES MIKRO-KUGELFALLVISKOSIMETERS"
220 PRINT "      UND DER DC5-TEMPERIEREINHEIT"
230 PRINT ""
240 PRINT ""
250 PRINT "Bitte einen Menüpunkt wählen:"
260 PRINT ""
270 PRINT "(1) Viskosität messen"
280 PRINT "(2) Kalibrierungsfaktor bestimmen"
290 PRINT "(3) Viskosität/Temperaturabhängigkeit messen"
300 PRINT "(4) Soll-Temperatur einstellen"
310 PRINT "(5) Zurück zu DOS"
320 PRINT ""
330 INPUT "Ich wähle Nr.: ", KAL$
340 IF KAL$="5" THEN GOTO 1900
350 IF KAL$="4" THEN GOTO 390
360 IF KAL$="3" THEN GOTO 600
370 IF KAL$="2" THEN GOTO 1080
380 IF KAL$="1" THEN GOTO 450
390 CLS
400 FLAG$="X" : FLAG4$="" : FLAG5$="" : FLAG8$="X"
410 INPUT "Bitte die Soll-Temperatur eingeben (zB. 24.8°C = 25): ", START$
420 CLS: PRINT "BITTE WARTEN..."
430 START=VAL(START$)
440 GOTO 780
450 CLS
460 SHELL "dir /p/w"
470 INPUT "Bitte Datei mit Kalibrierungsfaktor eingeben: ", KDATEI$
480 OPEN "I", #3, KDATEI$
490 INPUT #3, KFAKTOR
500 CLOSE #3
510 CLS
520 IF MESSTOP$="X" THEN GOTO 1170: ELSE GOTO 530
530 PRINT "Soll die Messung nach einer bestimmten Zeit abgebrochen werden ?"
540 INPUT "(Pro Minute werden zwei Messungen durchgeführt) (j/n): ", JA$
550 IF JA$<>"n" THEN IF JA$<>"j" THEN PRINT "FALSCH EINGABE":GOTO 540
560 IF JA$="n" THEN GOTO 590 : ELSE GOTO 570
570 CLS: INPUT "Bitte Stopzeit angeben (zB. nach 35 min. = 00:35:00): ", STOPZEIT$
580 SPZT$="X"
590 GOTO 1170
600 CLS
610 FLAG$="X" : FLAG4$="" : FLAG5$=""
620 INPUT "Sollen zwei Temperaturintervalle gefahren werden ? (j/n): ", JA$
630 IF JA$<>"n" THEN IF JA$<>"j" THEN PRINT "FALSCH EINGABE":GOTO 620
640 IF JA$="n" THEN GOTO 660 : ELSE GOTO 650
650 ZWEITEMP$="X"

```

## ANHANG

```
660 INPUT "Soll die Messung nach Erreichen der End-Temperatur beendet werden ? (j/n): ",JA$
670 IF JA$<>"n" THEN IF JA$<>"j" THEN PRINT "FALSCH EINGABE":GOTO 660
680 IF JA$="n" THEN GOTO 700 : ELSE GOTO 690
690 MESSTOP$="X"
700 INPUT "Bitte Start-Temperatur eingeben (zB. 24.8°C = 25): ",START$
710 REM ° = Alt+248
720 IF ZWEITEMP$="X" THEN GOTO 730 : ELSE GOTO 760
730 INPUT "Bitte die erste zu erreichende Temperatur eingeben (zB. 40.4°C = 40): ",ENDE$
740 INPUT "Bitte die zweite zu erreichende Temperatur eingeben (zB. 15.9°C = 16): ",ZWTMP$
750 GOTO 770
760 INPUT "Bitte End-Temperatur eingeben (zB. 40.4°C = 40): ",ENDE$
770 START=VAL(START$):ENDE=VAL(ENDE$):ZWTMP=VAL(ZWTMP$):MSTOP=VAL(MSTOP$)
780 OPEN "COM2:4800,N,8,1,CS0,DS0,CD0"AS#4
790 D$=""
800 E$=""
810 PRINT #4,D$
820 X=ASC(INPUT$(1,#4))
830 IF X=10 THEN 860
840 E$=E$+CHR$(X)
850 GOTO 820
860 IF FLAG4$="X" THEN GOTO 870 : ELSE GOTO 880
870 FLAG4$="" : GOTO 790
880 T$=LEFT$(E$,LEN(E$)-7)
890 TE$=RIGHT$(T$,LEN(T$)-3):TEST=VAL(TE$)
900 IF START<>TEST THEN GOTO 910 : ELSE GOTO 990
910 IF FLAG5$="X" THEN GOTO 790 : ELSE GOTO 920
920 IF FLAG8$="X" THEN GOTO 970
930 PRINT "" : PRINT "START-TEMPERATUR ENTSPRICHT NICHT DER IST-TEMPERATUR !"
940 PRINT "" : INPUT "Soll gewartet werden, bis die Start-Temperatur erreicht ist ? (j,n):",JA$
950 IF JA$<>"n" THEN IF JA$<>"j" THEN PRINT "FALSCH EINGABE":GOTO 940
960 IF JA$="n" THEN GOTO 990 ELSE:PRINT "" :PRINT "BITTE WARTEN...":FLAG5$="X"
970 TES$="S 0"+START$:TEST$=TES$+"00":PRINT#4,TEST$:FLAG4$="X":GOTO 790
980 IF TEST=START THEN GOTO 990 : ELSE GOTO 790
990 CLOSE#4
1000 IF FLAG8$="X" THEN GOTO 1010 : ELSE GOTO 450
1010 CLS:PRINT "Die Soll-Temperatur von "START$"°C wurde erreicht."
1020 PRINT ""
1030 PRINT "Eventuell noch einen Augenblick warten bis die exakte Temperatur
1040 PRINT "erreicht ist."
1050 PRINT ""
1060 INPUT "BITTE EINE TASTE DRÜCKEN", SOLLTASTE$
1070 GOTO 10
1080 CLS
1090 INPUT "Dateinamen für Kalibrierungsfaktor eingeben: ",KALNAM$
1100 OPEN KALNAM$ FOR OUTPUT AS #3
1110 CLS:PRINT "Soll die Messung nach einer bestimmten Zeit abgebrochen werden ?"
1120 INPUT "(Pro Minute werden zwei Messungen durchgeführt) (j/n): ",JA$
1130 IF JA$<>"n" THEN IF JA$<>"j" THEN PRINT "FALSCH EINGABE":GOTO 1120
1140 IF JA$="n" THEN GOTO 1170 : ELSE GOTO 1150
1150 INPUT "Bitte Stopzeit angeben (zB. nach 35 min. = 00:35:00): ",STOPZEIT$
1160 SPZT$="X"
1170 CLS
1180 INPUT "Dichte der Flüssigkeit: ",DICHTKAL
1190 DIV=1
1200 MITTEL=0
1210 IF KAL$="2" THEN GOTO 1220: ELSE GOTO 1280
1220 CLS
1230 PRINT "(Nach Computerkaltstart jetzt Reset-Taste am IF-1 betätigen)
1240 PRINT ""
1250 PRINT ""
1260 INPUT "MESSUNG DURCH ENTER STARTEN...":ENTER$
1270 GOTO 1370
1280 CLS
1290 INPUT "Dateinamen für Meßwerte angeben: ",NAM$
1300 CLS
1310 PRINT "(Nach Computerkaltstart jetzt Reset-Taste am IF-1 betätigen)
1320 PRINT ""
1330 PRINT ""
1340 INPUT "MESSUNG DURCH DRÜCKEN EINER TASTE STARTEN...":ENTER$
1350 OPEN NAM$ FOR OUTPUT AS #1
1360 CLS
1370 SHELL "time 0"
1380 CLS
1390 IF KAL$="2" THEN GOTO 1410
1400 OPEN "COM2:4800,N,8,1,CS0,DS0,CD0"AS#4
```

```

1410 OPEN "COM1:110,N,8,2,RS,CS0,DS0,CD0"AS#2
1420 PRINT#2,CHR$(32)      'REM send space character (20H)
1430 FOR I=1 TO 500:NEXT   'REM wait 0.2 seconds
1440 PRINT#2,CHR$(3)      'REM no parity; 2 stop bits
1450 FOR I=1 TO 500:NEXT   'REM wait 0.2 seconds
1460 PRINT "ESC drücken zum Abbrechen und Speichern (einen Meßwert abwarten)"
1470 PRINT "-----"
1480 IF KAL$<>"2" THEN GOTO 1520
1490 PRINT "Zeit", "Fallzeit", "K-Faktor", "K-Mittel"
1500 PRINT ""
1510 IF KAL$="2" THEN GOTO 1540
1520 PRINT "Zeit", "Fallzeit", "Viskosität", "Temperatur"
1530 PRINT ""
1540 A$=""
1550 TIM$=TIMES
1560 C$=INPUT$(1,#2):IF C$=" " THEN 1560
1570 A$=C$
1580 FOR I=1 TO 5
1590     X=ASC(INPUT$(1,#2)) 'REM Get one character
1600     A$=A$+CHR$(X)
1610 NEXT
1620 IF KAL$="2" THEN GOTO 1630 : ELSE GOSUB 1910
1630 GOTO 1640
1640 IF KAL$="2" THEN GOTO 1650:ELSE GOTO 1750
1650 KALFAKT=.914/(7.8-DICHTKAL)*(VAL(LEFT$(A$,LEN(A$)-2))/1000)
1660 MITTEL=KALFAKT+MITTEL
1670 MIT=MITTEL/DIV
1680 DIV=DIV+1
1690 PRINT TIM$, LEFT$(A$,LEN(A$)-2), KALFAKT, MIT
1700 IF SPZT$="X" THEN GOTO 1710 : ELSE GOTO 1720
1710 IF LEFT$(TIM$,LEN(TIM$)-3)=LEFT$(STOPZEIT$,LEN(STOPZEIT$)-3) THEN GOTO 1840
1720 IF FLAG7$="X" THEN GOTO 1840 : ELSE GOTO 1730
1730 INKE$=INKEY$: IF INKE$=CHR$(27) GOTO 1840
1740 GOTO 1550
1750 VISCO=KFAKTOR*(7.8-DICHTKAL)*(VAL(LEFT$(A$,LEN(A$)-2))/1000)
1760 PRINT TIM$, LEFT$(A$,LEN(A$)-2), VISCO, G$
1770 PRINT#1,TIM$, LEFT$(A$,LEN(A$)-2), VISCO, G$
1780 IF KAL$<>"2" THEN GOTO 1790
1790 IF SPZT$="X" THEN GOTO 1800 : ELSE GOTO 1810
1800 IF LEFT$(TIM$,LEN(TIM$)-3)=LEFT$(STOPZEIT$,LEN(STOPZEIT$)-3) THEN GOTO 1860
1810 IF FLAG7$="X" THEN GOTO 1860 : ELSE GOTO 1820
1820 INKE$=INKEY$: IF INKE$=CHR$(27) GOTO 1860
1830 GOTO 1550
1840 PRINT#3, MIT
1850 GOTO 1880
1860 PRINT#1, "Dichte: ", DICHTKAL
1870 PRINT#1, "Kalibrierungsfaktor: ", KFAKTOR
1880 CLOSE #1,#2,#3,#4
1890 GOTO 10
1900 CLS : END
1910 D$="I"
1920 E$=""
1930 PRINT #4,D$
1940 X=ASC(INPUT$(1,#4))
1950 IF X=10 THEN 1980
1960 E$=E$+CHR$(X)
1970 GOTO 1940
1980 IF FLAG3$="X" THEN GOTO 2150 : ELSE GOTO 1990
1990 F$=LEFT$(E$,LEN(E$)-4)
2000 G$=RIGHT$(F$,LEN(F$)-3)
2010 IF FLAG2$="X" THEN GOTO 2120
2020 IF FLAG$="X" THEN GOTO 2030 : ELSE GOTO 2130
2030 IF START=ENDE THEN GOTO 2120
2040 CEL$=LEFT$(G$,LEN(G$)-3)
2050 IF START>ENDE THEN GOTO 2060 : ELSE GOTO 2070
2060 CELS=VAL(CEL$)-1 : CELSI$=STR$(CELS) : GOTO 2080
2070 CELS=VAL(CEL$)+1 : CELSI$=STR$(CELS)
2080 IF CELS=ENDE THEN GOSUB 2160 : ELSE GOTO 2090
2090 CELX$=RIGHT$(CELSI$,LEN(CELSI$)-1)
2100 CELSIUS$="S 0"+CELX$ : CELSIUS$=CELSIUS$+"00"
2110 PRINT #4,CELSIUS$ : FLAG3$="X" : GOTO 1910
2120 IF MESSTOP$="X" THEN GOTO 2140 : ELSE GOTO 2130
2130 RETURN
2140 FLAG7$="X" : RETURN
2150 FLAG3$="" : GOTO 2130

```

## ANHANG

```
2160 IF ZWEITEMP$="X" THEN GOTO 2170 : ELSE GOTO 2190
2170 IF FLAG6$="X" THEN GOTO 2190: ELSE GOTO 2180
2180 START=CELS:ENDE=ZWTMP:FLAG6$="X":RETURN
2190 FLAG2$="X" : RETURN
2200 CLS:IF 57=ERR THEN GOTO 2240 ELSE GOTO 2210
2210 PRINT "DATEI "KDATEI$" NICHT VORHANDEN !"
2220 INPUT "EVENTUELL. KALIBRIERUNG ERST DURCHFÜHREN. BITTE EINE TASTE DRÜCKEN",TASTES$
2230 CLOSE#3:RESUME 10
2240 INPUT "RESET-TASTE AM IF-1 WURDE BETÄTIGT. BITTE EINE TASTE DRÜCKEN",RESE$
2250 GOTO 2230
```

### 7.3 Betriebsanleitung zum ORR

#### 1. Inbetriebnahme

##### Aktion

1. Strom einschalten.
2. PCs einschalten.
3. Wasserstand im Wasserbad prüfen.
4. Anschlüsse des Wasserbades prüfen.
  
5. Wasserbad einschalten.
6. Wasserhahn aufdrehen.
7. Linsenkel überprüf.
  
8. Luftstand am Tisch überprüf.
  
9. ELSAM einschalten
10. ELSAM konfigurieren.
11. Frequenz einstellen.
12. Frequenz überprüf.
13. Zweikanal-Oszilloskop „grounden“.
14. Boxcar-Menü wähl
15. Kaltlichtlampe einschalten und ausrichten

##### Bemerkung

Roter Kippschalter am Rack unten rechts.  
ELSAM-PC und ORR-PC.  
Wasser muss bis zur Markierung stehen.  
Kleine Schläuche müssen angeschlossen sein, sonst umstecken.  
Einschalten mit Kippschalter, dann Reset-Taste.  
Hahn bis Markierung aufdrehen.  
Kabel der Ultraschalllinse für das Rheometer muss angeschraubt sein, sonst Kabel mit beiliegendem Schraubenschlüssel vorsichtig anschließen.  
Markierung der Füße am schwingungsgedämpften Tisch sollte ca. 1,5 cm hoch sein.  
Schlüssel auf „Off-Position“ drehen (falsch beschriftet).  
LM-Taste drücken, anschließend IFG-Taste drücken, Verstärkung auf 120 einstellen.  
Freq.exe am ELSAM-PC ausführen. Frequenz auf 1 GHz einstellen und Programm mit Alt+F beenden.  
Am Frequenzzähler 3x Taste Frequency drücken. Display sollte etwa 1 GHz anzeigen.  
GD-Tasten drücken. Punkt auf Mitte des Fadenkreuzes einstellen. GD-Tasten wieder lösen.  
Am Boxcar mit Pfeil-Tasten ins Setup-Menü. Mit Shift+Pfeiltasten im Menü bewegen. 1. Menü = 1, 2. Menü auf Nr. 7 („copy to“) einstellen.  
Lampe auf Position 4 einschalten.

#### 2. Messen

##### Aktion

1. Ultraschalllinse wegschwenken.
2. Glaswanne beschicken.
3. Ultraschalllinse über Probe schwenken.
4. Auf das Glasfaserende fokussieren.
5. Kreis zentrieren.
6. Schwenkarm mit Lösung beladen.
7. Klappe schließen und verriegeln.
8. Messprogramm aufrufen.

##### Bemerkung

Metallzylinder im Uhrzeigersinn drehen. Vorsicht, schnappt evtl. zurück und könnte Deckglas an der Schnappvorrichtung zerbrechen.  
50-120µl Flüssigkeit einpipettieren. Vorsicht, Glasfaser nicht abbrechen. Nicht mit dem Arm auf den Tisch aufstützen.  
Nicht zu stark zurückschnappen lassen.  
Mit Mikrometerschrauben maximalen Kreisdurchmesser am Oszilloskop einstellen. Zum Sichtbarmachen des Kreises auf Bodenplatte klopfen.  
Kreis im Averager-Menü des Boxcars zentrieren. Zahl jeweils mit den Pfeil-Tasten verändern und mit Enter-Taste bestätigen.  
Auf den Schlauchteil des Arms Lösung geben und Höhe des Hebels in Bezug auf die Linse prüfen.  
Die Klappe der Messhaube verschließen.  
locki.exe am ORR-PC ausführen (z.B. mit t.bat); Programm mit Strg+F9 kompilieren und starten.

9. Dateiname und Mess-Parameter eingeben	Dichte und ggf. anfängliche Schallgeschwindigkeit.
10. Z-Regler einschalten	Schalter an der Z-Reglerkarte nach oben legen (On-Position). Reset-Taste drücken. Kreis-Segment muss auf $\Phi = 90^\circ$ sein.
11. Messung beginnen	Fragen mit Enter am ORR-Rechner bestätigen. Nach dem Start keine Erschütterungen im Raum!
12. Vorwärmphase	Hysterese der Piezos berücksichtigen und auf Stabilität der Schallgeschwindigkeit achten. Während der Messung darauf achten, dass Hochspannung nicht über 450 V.
13. Messung mit „e“ beenden	Messung kann auch mit „b“ kurzzeitig zum Nachfokussieren oder für ein Z-Regler-Reset unterbrochen werden. „a“ führt zum Menü „Amplitudenrampe“.
14. Z-Regler ausschalten (WICHTIG!).	Schalter an ZReglerkarte wieder nach oben legen (Off-Position).
3. Bestimmung der absoluten Schallgeschwindigkeit in Wasser	
Aktion	Bemerkung
1. Ultraschalllinse wegschwenken.	s.o.
2. Entgastes Wasser einfüllen.	s.o.
3. Ultraschalllinse über Probe schwenken.	s.o.
4. Auf Glasfaser fokussieren.	s.o.
5. Messsignal zentrieren.	s.o.
6. Messapparatur schließen.	s.o.
7. Z-Regler auf „direkt“.	Kippschalter an Z-Regler-Karte „Direkt“-Position schalten. Z-Regler muss auf „Off“-Position sein.
8. Meßprogramm aufrufen.	s.o.
9. Dateiname und Parameter eingeben.	„Schallgeschwindigkeit“ muss den Wert „0“ haben!
10. Messung starten.	Besonders ruhig verhalten!
11. Z-Regler auf Position „Integrierer“.	Nach Aufforderung durch das Programm Kippschalter „Integrierer“ auf „on“.
12. Messung starten	„Normale“ Messung starten.
13. Messung beenden.	Nur kurz messen und dann beenden.
14. Textbearbeitungsprogramm aufrufen.	Textbearbeitungsprogramm aufrufen und den Wert „sw“ in der Datei <i>Dateiname.par</i> notieren.
15. Messprogramm starten	s.o.
16. „sw“-Wert eintragen	Im Programm den „sw“-Wert ändern.
17. Messung starten	Schritte 1-13 wiederholen.
4. Bestimmung der Resonanzfrequenz der Glasfaser in Luft	
Aktion	Bemerkung
1. Plexiglaskasten herunternehmen.	Vorsicht: Kabel nicht spannen.
2. Mit Binokular auf Glasfaser fokussieren.	Oberen Teil des Binokulars vom Binokulartisch abnehmen. So platzieren, dass das Objektiv der mittleren Vergrößerung auf der Getriebemotor-Halterung aufliegt. Auf Glasfaser Spitze fokussieren.
3. Amplitude am Vektor-Lock-In auf 0,8	Am Vektor-Lock-In die Taste AMP drücken und mit dem Drehrad die Amplitude auf 0,8 einstellen.
4. Glasfaseranregung verstärken.	Die Glasfaseranregung kann verstärkt werden, indem zwischen dem Lock-In-Verstärker und dem Anregungspiezo <u>eine</u> Verstärkereinheit des Hochspannungsverstärkers zwischengeschaltet wird. Kabel entsprechend verbinden.
5. Resonanzfrequenz bestimmen.	Taste FREQ am Lock-In-Verstärker drücken. Frequenz langsam zwischen 3 und 5 kHz variieren bis im Binokular die Spitze der Glasfaser leicht verschwommen erscheint (tatsächlich wird hier also nach dem Amplitudenmaximum gesucht, welches bei der geringen Reibung aber sehr genau bei $\varphi =$

## ANHANG

6. Glasfaserverstärkung rückgängig. 90° liegt). Resonanzfrequenz notieren.  
Anregungspiezo wieder direkt mit Lock-In-Verstärker verbinden.
7. Plexiglaskasten aufsetzen. Nicht auf den Tisch aufstützen.
8. Resonanzfrequenz der Glasfaser in Luft in das Programm eintragen. Den notierten Wert in das Feld „Resonanzfrequenz der Glasfaser in Luft“ eintragen.

## 8 LEBENS LAUF UND VERÖFFENTLICHUNGEN

---

### 1. Lebenslauf

Name: Oliver Ingvar Johannes Eduard Wagner

Geburtsdatum: 29.01.1968

Geburtsort: Köln

Familienstatus: ledig

Schulbildung

1974-1980 Grundschule und Förderstufe in Dietzenbach

1980-1987 Gymnasialer Zweig der Gesamtschule Heinrich-Mann in Dietzenbach

Zivildienst

1987-1989 Zivildienst im katholischen Pfarramt in Nieder-Roden

Hochschulbildung

1989-1995 Hauptfach: Biologie (Prof. Dr. Bereiter-Hahn), Nebenfächer: Mikrobiologie (Prof. Dr. Kröger) und Biophysik (Prof. Dr. Polith)

02.11.1995 Diplomprüfung: Schriftlich: 1, Mündlich 2

Anstellung als Diplom-Biologe

15.12.1995-15.05.1996 Institut für Dermatologie und Venerologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt

Promotionsstudium

16.05.1996-06.11.2000 Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für kinematische Zellforschung der J. W. Goethe-Universität Frankfurt

Benotung der Promotionsleistung zu dem Thema „Strukturelle Grundlagen und Mechanik von Zytogelen.“:

Dissertation: sehr gut (magna cum laude)

Disputation: sehr gut (magna cum laude)

Gesamtnote: sehr gut (magna cum laude)

### 2. Lehre: Betreuung von vier 6-wöchigen Zellbiologischen Großpraktika und vier 3wöchigen Nebenfach-Praktika für Biochemiker

### 3. Vorträge und Poster an internationalen Tagungen

24.03.1996 Symposium der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Hamburg

Vortrag: "The oscillating rod viscosimeter: A new method for simultaneous measurement of dynamic viscosity and velocity of sound in cytogels using nanometer strains"

04.10.1996 Symposium für Biomechanik in Frankfurt

Vortrag: „Messung mechanischer Eigenschaften von Cytogelen“

06.12.1996 1. Doktorandensymposium der J. W. Goethe Universität Frankfurt

Vortrag: „Rheologische Untersuchungen cytoplasmatischer Gele“

10.02.1997 Symposium für Bionik in Jena

Vortrag: „Mechanik von Cytogelen“

Mai 1997 AICHEM '97 / JWGU Frankfurt Forschung Entwicklung Projekte

Ausstellung und Präsentation des ORR

22.04.1998 3rd European Research Conference: Biophysics of Cytoskeleton / Obernai (Frankreich)

Poster: "Viscoelastic properties of f-actin, microtubules, f-actin/ $\alpha$ -actinin and f-actin/hexokinase determined in microliter volumes with a novel non-invasive method"

11.10.1999 ACAS'99: Mechanical Properties of Cells and Tissues / Augustusburg

Vortrag: "Mechanical properties of SAM based rheometry of cytogels."

20.10.1999 1<sup>st</sup> Munich Symposium on Cell Dynamics / Martinsried

Poster: "Mechanical properties of polymerizing non-muscle and muscle actin and upon interaction with profilin, cytochalasin D and  $\alpha$ -actinin."

### 4. Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Bereiter-Hahn, J., J. Airas, S. Blum, G. Minaschek, A. K. Mittal, O. Wagner, and H. Fasold. 1999. Reciprocal modulation of actin polymerization, cell motility and glycolytic enzyme activity. In: *Endocytobiology VII (Conference Proceedings)*

Wagner, O., and J. Bereiter-Hahn. 1996. The oscillating rod viscosimeter: A new method for simultaneously measurement of dynamic viscosity and velocity of sound in cytogels using nanometer strains. *Eur. J. Cell. Biol.* 69:469S

## LEBENS LAUF

Wagner, O., J. Zinke, P. Dancker, W. Grill, and J. Bereiter-Hahn. 1999. Viscoelastic properties of f-actin, microtubules, factin/ $\alpha$ -actinin and factin/hexokinase determined in microliter volumes with a novel non-invasive method. *Biophys. J.* 76:2784-2796.

Wagner, O., P. Hofmann, D. Langer, H. Schüler, P. Dancker, and J. Bereiter-Hahn. 2000. Sound attenuation of polymerizing actin reflects supramolecular structures: viscoelastic properties of actin gels modified by cytochalasin, profilin and  $\alpha$ -actinin. *Biochem. J.*, accepted for publication.

### Eingereichte Veröffentlichungen

Bereiter-Hahn, J., I. Karl, M. Riehle, T. van der Steen, O. Wagner, L. Zylderberg, W. Grill, and T. Kundu. Characterization of Cells and Tissues by acoustic microscopy.

Frank, R., O. Wagner, E. Weichselsdorfer, V. Niggli, J. Bereiter-Hahn and H. U. Keller. Effects of 2,3-Butanedione Monoxime (BDM) on shape and locomotion of Walker 256 carcinosarcoma cells and actin polymerization.

Schindler, R., E. Weichselsdorfer, O. Wagner, D. Schmitz, and J. Bereiter-Hahn. Aldolase-localisation in cultured cells: cell-type and substrate-specific regulation of cytoskeletal associations.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2-1: Maxwell- und Voigt-Element .....	12
Abb. 2-2: Vierelemente-Modell .....	12
Abb. 3-1: Schematische Darstellung des ORR .....	23
Abb. 3-2: Blockdiagramm des Messaufbaus .....	24
Abb. 3-3: Zwei Positionen der Schwenkvorrichtung .....	25
Abb. 3-4: Momentane Geschwindigkeitsverteilung einer Scherwelle .....	26
Abb. 3-5: Beispiel für Phasenverschiebungen $\varphi$ der Glasfaserschwingung .....	27
Abb. 3-6: Berechnung der Apparatekonstanten $\alpha$ , $\beta$ , $\beta'$ , $\gamma$ .....	28
Abb. 3-7: Viskositäten von Glycerin/Wasser-Gemischen bei 20 °C .....	31
Abb. 3-8: Dichten von Glycerin/Wasser-Gemischen bei 20 °C .....	32
Abb. 4-1: Viskositäten von Glycerin/Wasser-Gemischen bei 25 °C .....	35
Abb. 4-2: Viskositäten von F-Aktin / Vgl. ORR und Kugelfallviskosimeter .....	35
Abb. 4-3: Einfluss der Schwingungsamplitude auf die Viskosität von F-Aktin .....	37
Abb. 4-4: Einfluss der Schwingungsamplitude auf Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gele .....	38
Abb. 4-5: Einfluss der Schwingungsamplitude auf Aktinpuffer .....	38
Abb. 4-6: Einfluss der Deformationsfrequenz auf Aktin/ $\alpha$ -Aktinin Gele .....	39
Abb. 4-7: Viskoelastizität während der Polymerisation von Aktin .....	40
Abb. 4-8: Viskoelastizität während der Polymerisation von Tubulin .....	40
Abb. 4-9: Temperatur und Schallgeschwindigkeit von Tubulinpuffer .....	41
Abb. 4-10: Viskoelastizität von F-Aktin- und Mikrotubuligen .....	41
Abb. 4-11: Schallgeschwindigkeit von Tubulin bei 25 °C mit und ohne Taxol .....	42
Abb. 4-12: Viskoelastizität von Mikrotubuli mit MAPs .....	43
Abb. 4-13: Einfluss von Colchizin und $Ca^{2+}$ auf die Viskoelastizität von MT .....	43
Abb. 4-14: Einfluss von CD auf die Viskosität von F-Aktin (Kugelfall) .....	44
Abb. 4-15: Einfluss von CD auf die Viskoelastizität von F-Aktin (ORR) .....	45
Abb. 4-16: Einfluss von Phalloidin auf die Viskoelastizität von F-Aktin .....	46
Abb. 4-17: Viskoelastizität von Muskel- und Nicht-Muskelaktin .....	46
Abb. 4-18: Einfluss von Profilin auf die Viskoelastizität von F-Aktin .....	47
Abb. 4-19: Absolutes Kompressionsmodul von Profilin:Aktin .....	49
Abb. 4-20: Elastizitätsverlust von $\beta\gamma$ -Aktin .....	49
Abb. 4-21: Schalldämpfung verschiedener Glycerin/Wasser-Gemische .....	50
Abb. 4-22: Schalldämpfung von polymerisierendem Aktin mit u. ohne Profilin .....	51
Abb. 4-23: Schalldämpfung von Aktin mit versch. Profilinkonzentrationen .....	51
Abb. 4-24: Schalldämpfung von 5 $\mu$ M, 35 $\mu$ M und 130 $\mu$ M Aktin .....	52
Abb. 4-25: Schalldämpfung von Aktin mit und ohne $\alpha$ -Aktinin .....	52
Abb. 4-26: Schalldämpfung von Aktin mit und ohne Cytochalasin D .....	53
Abb. 4-27: Einfluss von ATP und Hexokinase auf die Viskoelastizität von Aktin .....	54
Abb. 4-28: Modulation der Mechanik von Aktin/Hexokinase durch Glukose .....	56
Abb. 4-29: Einfluss von AMPPNP auf die Viskoelastizität von Aktin .....	57
Abb. 4-30: Viskoelastizität von Aktin während der Interaktion mit Aldolase .....	58
Abb. 4-31: Online-Zugabe von FBP und $Mg^{2+}$ zu Aktin/Aldolase .....	59
Abb. 4-32: Online-Zugabe von Aldolase und $Mg^{2+}$ zu F-Aktin .....	59
Abb. 4-33: Viskosität von Aktin mit LDH, NADH, $NAD^+$ , Pyruvat und Laktat .....	61
Abb. 4-34: Enzymaktivität der LDH mit und ohne Aktin .....	62
Abb. 4-35: Kosedimentation von Aktin mit und ohne LDH .....	62
Abb. 4-36: Einfluss von GPT auf die Kosedimentation von Aktin mit LDH .....	63
Abb. 4-37: Einfluss von Oxamat auf die Interaktion der LDH mit Aktin .....	63
Abb. 4-38: Mechanik von Neurofilamenten .....	64
Abb. 4-39: Interaktion von Mikrotubuli mit Neurofilamenten .....	65
Abb. 4-40: Einfluss von ATP auf die Interaktion von MT mit Neurofilamenten .....	66
Abb. 5-1: Modell der konzentrationsbedingten Abnahme der Elastizität .....	70
Tafel 4-1: Aktin aus ORR und Kugelfallviskosimeter sowie Aktin/ $\alpha$ -Aktiningel .....	37
Tafel 4-2: Aktin mit und ohne Cytochalasin D .....	45
Tafel 4-3: $\beta\gamma$ -Aktin mit und ohne Profilin .....	48
Tafel 4-4: Aktin mit 2 mM ATP, 2 mM bzw. 0,2 mM ATP und 0,75 $\mu$ M HK .....	56

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

- Aamodt, E. J., and R. C. Williams, Jr. 1984a. Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments *in vitro*. *Biochemistry* 23:6023-6031.
- Aamodt, E. J., and R. C. Williams, Jr. 1984b. Association of microtubules and neurofilaments *in vitro* is not mediated by ATP. *Biochemistry* 23:6031-6035.
- Aleshin, A. E., C. Zeng, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, H. J. Fromm, and R. B. Honzatko. 1998. The mechanism of regulation of hexokinase: new insight from the crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and glucose-6-phosphate. *Structure* 6:36-50.
- Arnold, H., and D. Pette. 1968. Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of muscle. *Eur. J. Biochem.* 6:163-171.
- Ashford, J. A., S. S. L. Andersen, and A. A. Hyman. 1998. Preparation of tubulin from bovine brain. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2<sup>nd</sup> ed.*, Academic Press, London, UK. pp. 205-212.
- Babich, M., L. R. P. Foti, L. L. Sykaluk, and C. R. Clark. 1996. Profilin forms tetramers that bind to g-actin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218:125-131.
- Bausch, A. R., F. Ziemann, A. A. Boulbitch, K. Jacobson, and E. Sackmann. 1998. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophys. J.* 75:2038-2049.
- Bennet, W. S., and T. A. Seitz. 1980. Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose: I Structure determination and refinement at 3.5 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 140:183-209.
- Bereiter-Hahn, J. 1978. A model for microtubular rigidity. *Eur. J. Cell Biol.* 17:298-300.
- Bereiter-Hahn, J. 1987. Scanning acoustic microscopy visualizes cytomechanical responses to cytochalasin D. *J. Microsc.* 146:29-39.
- Bereiter-Hahn, J., and R. Strohmeier. 1987. Hydrostatic pressure in metazoan cells in culture: its involvement in locomotion and shape generation. In: *Cytomechanics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 261-272.
- Bereiter-Hahn, J., and H. Lüers. 1994. The role of elasticity in the motile behavior of cells. In: *Biomechanics of active movement and division of cells*. NATO ASI Ser. 84 H, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 181-230.
- Bereiter-Hahn, J. 1995. Probing biological cells and tissues with acoustic microscopy. In: *Advances in Acoustic Microscopy*, Plenum Publ. Corp., New York. pp. 79-115.
- Bereiter-Hahn, J., I. Karl, H. Lüers, and M. Vöth. 1995a. Mechanical basis of cell shape: investigations with the scanning acoustic microscope. *Biochem. Cell. Biol.* 73:337-348.
- Bereiter-Hahn, J., C. Stübig, and V. Heymann. 1995b. Cell cycle related changes in f-actin distribution are correlated with glycolytic activity. *Exp. Cell Res.* 218:551-560.
- Bereiter-Hahn, J., J. Airas, and S. Blum. 1997. Supramolecular associations with the cytomatrix and their relevance in metabolic control: protein synthesis and glycolysis. *Zoology* 100:1-24.
- Bereiter-Hahn, J., and H. Lüers. 1998. Subcellular tension fields and mechanical resistance of the lamella front related to the direction of locomotion. *Cell Biochem. Biophys.* 29:243-262.
- Bereiter-Hahn, J., J. Airas, S. Blum, G. Minaschek, A. K. Mittal, O. Wagner, and H. Fasold. 1999. Reciprocal modulation of actin polymerisation, cell motility and glycolytic enzyme activity. In: *Endocytobiology VII (Conference Proceedings)*
- Bergmann, L., and C. Schäfer. 1990. Lehrbuch der Experimentalphysik Bd. 1. In: *Mechanik-Akustik-Wärme*, Walter de Gruyter, 10. Aufl., Berlin.
- Blum, S., and J. Bereiter-Hahn. 1991. Interactions of actin filaments with LDH. *Endocyt. Cell Res.* 7:231-244.
- Boehringer. 1973. Biochemica information I+II. *Boehringer Mannheim*
- Bonder, E. M., and M. S. Mooseker. 1986. Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament. *J. Cell Biol.* 102:282-288.
- Borisy, G. G., and T. M. Svitkina. 2000. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:104-112.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bray, D., J. Health, and D. Moss. 1986. The membrane associated 'cortex' of animal cells: its structure and mechanical properties. *J. Cell. Sci.* 4:71-88S.
- Bremer, A., R. C. Millonig, R. Sutterlin, A. Engel, T. D. Pollard, and U. Aebi. 1991. The structural basis for the intrinsic disorder of the f-actin filament: the lateral slipping model. *J. Cell Biol.* 115:689-703.
- Bremer, A., and U. Aebi. 1992. The structure of the f-actin filament and the actin molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:20-26.
- Bronstein, W. W., and H. R. Knull. 1981. Interaction of muscle glycolytic enzymes with thin filament proteins. *Can. J. Biochem.* 59:494-499.
- Brown, P. A., and R. D. Berlin. 1985. Packing volume of sedimented microtubules: regulation and potential relationship to an intracellular matrix. *J. Cell Biol.* 101:1492-1500.
- Buxbaum, R. E., T. Dennerll, S. Weiss, and S. T. Heidemann. 1987. F-actin and microtubule suspensions as indeterminate fluids. *Science* 235:1511-1514.
- Buxbaum, R. E., and S. R. Heidemann. 1992. An absolute rate theory model for tension control of axonal elongation. *J. Theor. Biol.* 155:409-426.
- Cantiello, H. F., C. Patenaude, and K. Zaner. 1991. Osmotically induced electrical signals from actin filaments. *Biophys. J.* 59:1284-1289.

- Cao, L., G. G. Babcock, P. A. Rubenstein, and Y. Wang. 1992. Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells. *J. Cell Biol.* 117:1023-1029.
- Carlier, M.-F. 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266:1-4.
- Carlier, M.-F., and D. Pantaloni. 1994. Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin  $\beta_4$  and profilin. *Sem. Cell Biol.* 5:183-191.
- Carlier, M.-F., D. Didry, I. Erk, J. Lepault, M. L. Van Troys, J. Vandekerckhove, I. Perelroizen, H. Yin, Y. Doi, and D. Pantaloni. 1996. T $\beta_4$  is not a simple g-actin sequestering protein and interacts with f-actin at high concentration. *J. Biol. Chem.* 271:9231-9239.
- Carlier, M.-F., F. Ressay, and D. Pantaloni. 1999. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/Cofilin. *J. Biol. Chem.* 274:33827-33830.
- Cassimeris, L., H. McNeill, and S. H. Zigmond. 1990. Chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes contain 2 populations of actin filaments that differ in their spatial distributions and relative stabilities. *J. Cell Biol.* 110:1067-1075.
- Cedergren-Zeppezauer, E.S., N. C. Goonesekere, M. D. Rozycki, J. C. Myslik, Z. Dauter, U. Lindberg, and C. E. Schutt. 1994. Crystallization and structure determination of bovine profilin at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 240:459-475.
- Chapin, S. J., and J. C. Bulinski. 1994. Cellular microtubules heterogeneous in their content of microtubule-associated protein-4 (MAP4). *Cell Motil. Cytoskel.* 27:133-149.
- Chen, N. H., and C. Masters. 1988. The influence of insulin and glucagon on the interactions between glycolytic enzymes and cellular structure. *Biochem. Int.* 16:903-911.
- Cho, K. C., W. P. Leung, H. Y. Mok, and C. L. Choy. 1985. Ultrasonic absorption in myoglobin and other globular proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 830:36-44.
- Clarke, F. M., and C. J. Masters. 1974. On the association of glycolytic components in skeletal muscle extracts. *Biochim. Biophys. Acta* 358:193-207.
- Clarke, F. M., and C. J. Masters. 1975. On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 381:37-46.
- Clarke, F. M., and C. J. Masters. 1976. Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes. *Int. J. Biochem.* 7:359-365.
- Cohen, P. T., G. S. Omenn, A. G. Motulsky, S. H. Chen, and E. R. Giblett. 1973. Restricted variation of the glycolytic enzymes of human brain and erythrocytes. *Nature, New Biol.* 241:229-233.
- Colombo, R., I. DalleDonne, and A. Milzani. 1993.  $\alpha$ -actinin increases actin filament end concentration by inhibiting annealing. *J. Mol. Biol.* 230:1151-1158.
- Coluccio, L. M., and L. G. Tilney. 1984. Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation. *J. Cell Biol.* 99:529-535.
- Cook, R. K., W. T. Blake, and P. A. Rubenstein. 1992. Removal of the aminoterminal acidic residues of yeast actin: studies *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 267:9430-9436.
- Cooke, R. 1975. The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. *Biochemistry* 14:3250-3256.
- Cooper, J. A., and T. D. Pollard. 1982. Methods to measure actin polymerization. *Meth. Enzymol.* 85:182-210.
- Cooper, J. A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473-1478.
- Cooper, J. A. 1991. The role of actin polymerization in cell motility. *Annu. Rev. Physiol.* 53:585-605.
- Coue, M., V. A. Lombillo, and J. R. McIntosh. 1991. Microtubule depolymerisation promotes particle and chromosome movement *in vitro*. *J. Cell Biol.* 112:1165-1175.
- Cracknell, A. P. 1980. *Ultrasonics, Wykeham Publ., London.*
- Dancker, P., and I. Low. 1979. Complex influence of cytochalasin B on actin polymerization. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.* 34:555-557.
- Dancker, P., and S. Fischer. 1989. Stabilization of actin filaments by ATP and inorganic phosphate. *Z. Naturforsch.* 44:698-704.
- Dancker, P., and L. Hess. 1990. Phalloidin reduces the release of inorganic phosphate during actin polymerization. *Biochim. Biophys. Acta* 1035:197-200.
- De Bruyn, P. P. H. 1947. Theories of amoeboid movement. *Quart. Rev. Biol.* 22:1-24.
- De La Cruz, E. M., and T. D. Pollard. 1994. Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments. *Biochemistry* 33:14387-14392.
- Durrieu, C., F. Bernier-Valentin, and B. Rousset. 1987. Binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to microtubules. *Mol. Cell Biochem.* 74:55-65.
- Duszyk, M., B. Schwab 3d, G. I. Zahalak, H. Qian, E. L. Elson. 1989. Cell poking: quantitative analysis of indentation of thick viscoelastic layers. *Biophys. J.* 55:683-690.
- Eggers, F., and T. Funck. 1973. Ultrasonic measurements with milliliter liquid samples in the 0.5-100 MHz range. *Rev. Sci. Inst.* 44:969-976.
- Ehmann, J. D., and H. O. Hultin. 1973. Substrate inhibition of soluble and bound lactate dehydrogenase (isoenzyme 5). *Arch. Biochem. Biophys.* 154:471-475.
- Eichhorn, A. 1998. Untersuchungen zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen F-Aktin und Hexokinase durch die Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine. *Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany.*
- Estes, J. E., L. A. Selden, and L. C. Gershman. 1981. Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of actin. *Biochemistry.* 20:708-712.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Eyer, J. and J. F. Leterrier. 1988. Influence of the phosphorylation state of neurofilament proteins on the interactions between purified filaments *in vitro*. *Biochem. J.* 252:655-660.
- Eyer, J., W. G. McLean, and J.-F. Leterrier. 1989. Effect of a single dose of  $\beta,\beta'$ -iminodipropionitrile *in vivo* on the properties of neurofilaments *in vitro*: comparison with the effect of iminodipropionitrile added directly to neurofilaments *in vitro*. *J. Neurochem.* 52:1759-1765.
- Feramisco, J. R., and K. Burridge. 1980. A rapid purification of alpha-actinin, filamin, and a 130,000-dalton protein from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 255:1194-1199.
- Ferri, A., and E. Grazi. 1982. Mechano-chemical energy transduction in biological systems. The effect of mechanical stimulation on the polymerization of actin: a kinetic study. *Biochem. J.* 205:281-284.
- Ferry, J. 1980. *Viscoelastic properties of polymers*, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley, New York.
- Finkel, T., J. A. Theriot, K. R. Dose, G. F. Tomaselli, and P. J. Goldschmidt-Clermont. 1994. Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1510-1514.
- Franke, H. 1969. *Lexikon der Physik, Franckh'sche Verlagshandlung, W. Keller & Co, 3. Aufl., Stuttgart.*
- Fuchs, E. 1996. The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu. Rev. Genet.* 30:197-231.
- Gerthsen, C., H. O. Kneser, und H. Vogel. *Physik, Springer Verlag, 16. Aufl., Berlin.*
- Gibbins, J. R. 1972. Metabolic requirements for epithelial migration as defined by the use of metabolic inhibitors in organ culture. *Exp. Cell Res.* 71:329-337.
- Giehle, K., R. Valenta, M. Rothkegel, M. Ronsiek, H.-G. Mannherz, and B. M. Jockusch. 1994. Interaction of plant profilin with mammalian actin. *Eur. J. Biochem.* 226:681-689.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., M. I. Furman, D. Wachsstock, D. Safer, V. T. Nachmias, and T. D. Pollard. 1992. The control of actin nucleotide exchange by thymosin  $\beta_4$  and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell* 3:1015-1024.
- Gordon, D. J., J. L. Boyer, and E. D. Korn. 1977. Comparative biochemistry of non-muscle actins. *J. Biol. Chem.* 252:8300-8309.
- Gou, J. P., and J. F. Leterrier. 1995. Possible involvement of ubiquitination in neurofilament degradation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 217:529-538.
- Gou, J. P., J. Eyer, and J. F. Leterrier. 1995. Progressive hyperphosphorylation of neurofilament heavy subunits with aging. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 215:368-376.
- Gou, J. P., T. Gotow, P. A. Janmey, and J. F. Leterrier. 1998. Regulation of neurofilament interactions *in vitro* by natural and synthetic polypeptides sharing Lys-Ser-Pro sequences with the heavy neurofilament subunit NF-H: neurofilament crossbridging by antiparallel sidearm overlapping. *Med. Biol. Eng. Comput.* 36:371-387.
- Griffith, L. M., and T. D. Pollard. 1982. Cross-linking of actin filament networks by self-association and actin-binding macromolecules. *J. Biol. Chem.* 257:9135-9142.
- Grill W., K. Hillmann, K. U. Würz, and J. Wesner. 1996. Scanning ultrasonic microscopy with phase contrast. In: *Advances in Acoustic Microscopy, Plenum Publ. Corp., New York.* pp. 167-218.
- Hamill, D., J. Davis, J. Drawbridge, and K. A. Suprenant. 1994. Polyribosome targeting to microtubules: enrichment of specific mRNAs in a reconstituted microtubule preparation from sea urchin embryos. *J. Cell Biol.* 127:973-984.
- Hartwig, J. H., and D. J. Kwiatkowski. 1991. Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:87-97.
- Herman, I. M. 1993. Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:48-55.
- Herrmann, H., M. Häner, M. Brettel, S. A. Müller, K. N. Goldie, B. Fedtke, A. Lustig, W. W. Franke, and U. Aebi. 1996. Structure and assembly of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J. Mol. Biol.* 264:933-953.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 1998. Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. *Subcell. Biochem.* 31:319-361.
- Herzog, W., and K. Weber. 1978. Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerisation *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 92:1-8.
- Hesketh, J. 1994. Translation and the cytoskeleton: a mechanism for targeted protein synthesis. *Mol. Biol. Rep.* 19:233-243.
- Hillmann, K., W. Grill, and J. Bereiter-Hahn. 1994. Determination of ultrasonic attenuation in small samples of solid material by scanning acoustic microscopy with phase contrast. *J. Alloys Compounds* 211/212:625-627.
- Hiramoto, Y. 1987. Evaluation of cytomechanical properties. In: *Cytomechanics, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.* pp. 31-46.
- Hirokawa, N. 1991. The neural cytoskeleton. *Wiley-Liss & Sons, New York.* pp. 5-72.
- Hisanaga, S., and N. Hirokawa. 1988. Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J. Mol. Biol.* 20:297-305.
- Hochstrasser, M. 1995. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:215-223.
- Holmes, G. R., D. E. Goll, and A. Suzuki. 1971. Effect of  $\alpha$ -actinin on actin viscosity. *Biochim. Biophys. Acta* 253:240-253.
- Hori, K., F. Morita, F. Matsuzawa, and S. Aikawa. 1995. Actin-actin contact: chemical cross-linking between actin and the 2.6-kDa peptide from subdomain 4 of actin. *J. Biochem.* 118:1232-1238.
- Howard, W. D., and S. N. Timasheff. 1988. Linkages between the effects of taxol, colchicine, and GTP on tubulin polymerization. *J. Biol. Chem.* 263:1342-1364.

- Huleux, C., C. Dreux, V. Imhoff, A. M. Chambaut-Guerin, and B. Rossignol. 1989. Microfilaments and cellular signal transduction: effect of cytochalasin D on the production of cAMP, inositol phosphates and on calcium movements in rat parotid glands. *Biol. Cell* 67:61-65.
- Hyman, A. A., D. Chrétien, I. Arnal, and R. H. Wade. 1995. Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-( $\alpha,\beta$ )-methylenediphosphonate. *J. Cell Biol.* 128:117-125.
- Hyman, A. A., and E. Karsenti. 1996. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 84:401-410.
- Inagaki, M., Y. Matsuoka, K. Tsujimura, S. Ando, T. Tokui, T. Takahashi, and N. Inagaki. 1996. Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. *BioEssays* 18:481-487.
- Ingber, D. E. 1993. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 104:613-627.
- Ishikawa, H., R. Bischoff, and H. Holtzer. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 38:538-555.
- Janmey, P. A., S. Hvidt, G. F. Oster, J. Lamb, T. D. Stossel, and J. H. Hartwig. 1990. Effect of ATP on actin stiffness. *Nature* 347:95-99.
- Janmey, P. A. 1991. A torsion pendulum for measurement of the viscoelasticity of biopolymers and its application to actin networks. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 22:41-53.
- Janmey, P. A., U. Euteneuer, P. Traub, and M. Schliwa. 1991. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J. Cell Biol.* 113:155-160.
- Janmey, P. A., S. Hvidt, J. Käs, D. Lerche, A. Maggs, E. Sackmann, M. Schliwa, and T. P. Stossel. 1994. The mechanical properties of actin gels. Elastic modulus and filament motions. *J. Biol. Chem.* 269:32503-32513.
- Janmey, P. A., J. V. Shah, K. P. Janssen, and M. Schliwa. 1998. Viscoelasticity of intermediate filament networks. *Subcell. Biochem.* 31:381-397.
- Jen, C. J., L. V. McIntire, and J. Bryan. 1982. The viscoelastic properties of actin solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 216:126-132.
- Jovin, T. M., and J. Arndt-Jovin. 1989. Luminescence digital imaging microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18:271-308.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. Pai, and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347:37-44.
- Kabsch, W., and J. Vandekerckhove. 1992. Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:49-76.
- Kajstura, J., and J. Bereiter-Hahn. 1993. Disruption of microtubules induced formation of actin fibrils in density-inhibited 3T3 cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 17:1023-1031.
- Kang, F., D. L. Purich, and F. S. Southwick. 1999. Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration. *J. Biol. Chem.* 274:36963-36972.
- Kao, A. W., Y. Noda, J. H. Johnson, J. E. Pessin, and A. R. Saltiel. 1999. Aldolase mediates the association of f-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 274:17742-17747.
- Karl, I., and J. Bereiter-Hahn. 1998. Cell contraction caused by microtubule disruption is accompanied by shape changes and an increased elasticity measured by scanning acoustic microscopy. *Cell Biochem. Biophys.* 29:225-241.
- Karl, I., and J. Bereiter-Hahn. 1999. Tension modulates cell surface motility: a scanning acoustic microscopy study. *Cell Motil. Cytoskel.* 43:349-359.
- Käs, J., H. Strey, J. X. Tang, D. Finger, R. Ezzell, E. Sackmann, and P. A. Janmey. 1996. F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semidilute, and liquid crystalline solutions. *Biophys. J.* 70:609-625.
- Kirillina, V. P., V. I. Stabrovskaya, and Yu. S. Borovikov. 1989. Lactate dehydrogenase-induced conformational changes of f-actin in myosin-free ghost single fibres. *Gen. Physiol. Biophys.* 8:435-446.
- Knull, H. R., W. F. Taylor, and W. W. Wells. 1973. Effect of energy metabolism on *in vivo* distribution of hexokinase in brain. *J. Biol. Chem.* 248:5414-5418.
- Knull, H. R., W. W. Bronstein, P. DesJardins, and W. G. Niehaus, Jr. 1980. Interaction of selected brain glycolytic enzymes with an F-actin-tropomyosin complex. *J. Neurochem.* 34:222-225.
- Kohrausch, F. 1985. *Praktische Physik, Band 1, B.G. Teubner, 23. Aufl., Stuttgart.*
- Kojima, H., A. Ishijima, and T. Yanagida. 1994. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by *in vitro* nanomanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:12962-12966.
- Kojro, Z., E. v. d. Burg, J. Zinke, K. Hillmann, and W. Grill. 1996. Viscosity shear waves and mass drag effect in liquids. *Z. Phys. B.* 101:433-439.
- Korenbaum, E., P. Nordberg, C. Björkegren-Sjögren, C. E. Schutt, U. Lindberg, and R. Karlsson. 1998. The role of profilin in actin polymerization and nucleotide exchange. *Biochemistry* 37:9274-9283.
- Kroebel, W., and K.-H. Mahrt. 1976. Recent results of absolute sound velocity measurements in pure water and sea water at atmospheric pressure. *Acustica* 35:154-164.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lakatos, S., and A. P. Minton. 1991. Interactions between globular proteins and f-actin in isotonic saline solution. *J. Biol. Chem.* 266:18707-18713.
- Lamb, H. 1932. *Hydrodynamics, Dover Publications, 6. ed., New York.*
- Landau, L. D., and E. M. Lifshitz. 1987. Course of theoretical physics. Vol. 6. In: *Fluid mechanics, Pergamon Press, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford, New York, Frankfurt.*

## LITERATURVERZEICHNIS

- Larsson, H., and U. Lindberg. 1988. The effect of divalent cations on the interaction between calf spleen profilin and different actins. *Biochim. Biophys. Acta* 953:95-105.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox. 1998. *Prinzipien der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, 2. Aufl., Heidelberg, Berlin, Oxford*, pp. 467
- Lehotzky, A., M. Telegdi, K. Liliom, and J. Ovadi. 1993. Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules - quantitative evaluation of the mutual effects. *J. Biol. Chem.* 268:1088-1089.
- Lekka, M., P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, and A. Z. Hryniewicz. 1999. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.* 28:312-316.
- Leterrier, J. F., R. K. H. Liem, and M. L. Shelanski. 1982. Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J. Cell Biol.* 95:982-986.
- Leterrier, J. F., J. Wong, R. K. H. Liem, and M. L. Shelanski. 1984. Promotion of microtubule assembly by neurofilament-associated microtubule-associated proteins. *J. Neurochem.* 43:1385-1391.
- Leterrier, J. F., and J. Eyer. 1987. Properties of highly viscous gels formed by neurofilaments *in vitro*. A possible consequence of a specific inter-filament cross-bridging. *Biochem. J.* 245:93-101.
- Leterrier, J. F., J. Eyer, D. G. Weiss, and M. Lindén. 1991. *In vitro* studies of the physical interactions between neurofilaments, microtubules and mitochondria isolated from the central nervous system. In: *The living cell in four dimensions*. *Am. Inst. Phys. Conf. Proc.* 226:91-105.
- Leterrier, J. F., D. Langui, A. Probst, and J. Ulrich. 1992. A molecular mechanism for the induction of neurofilament bundling by aluminium ions. *J. Neurochem.* 58:2060-2070.
- Leterrier, J. F., J. Käs, J. Hartwig, R. Vegners, and P. A. Janmey. 1996. Mechanical effects of neurofilament cross-bridges. *J. Biol. Chem.* 271:15687-15694.
- Leterrier, J. F. 1999. *Persönliche Mitteilung*.
- Lindberg, U., C. E. Schutt, E. Hellsten, A.-C. Tjäder, and T. Hult. 1988. The use of poly(L-proline)-Sephacryl in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 967:391-400.
- Lindner, R. A., and G. B. Ralston. 1997. Macromolecular crowding: effects on actin polymerization. *Biophys. Chem.* 66:57-66.
- Lorenz, M., D. Popp, and K. C. Holmes. 1993. Refinement of the f-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* 234:826-836.
- Lowry, O. H., S. J. Berger, J. G. Carter, M. M. Y. Chi, J. K. Manchester, J. Khor, and M. E. Pusatterri. 1983. Diversity of metabolic patterns in human brain tumors: enzymes of energy metabolism and related metabolites and co-factors. *J. Neurochem.* 41:994-1010.
- Lüers, H., K. Hillmann, J. Litniewski, and J. Bereiter-Hahn. 1992. Acoustic microscopy of cultured cells. Distribution of forces and cytoskeletal elements. *Cell Biophys.* 18:279-293.
- Ma, L., J. Xu, P. A. Coulombe, and D. Wirtz. 1999. Keratin filament suspensions show unique micromechanical properties. *J. Biol. Chem.* 274:19145-19151.
- Machesky, L. M., and A. Hall. 1996. Rho: a connection between membrane receptor signaling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 6:304-310.
- Maciver, S. K., D. H. Wachsstock, W. H. Schwarz, and T. D. Pollard. 1991. The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with alpha-actinin. *J. Cell Biol.* 115:1621-1628.
- MacLean-Fletcher, S. D., and T. D. Pollard. 1980. Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:18-27.
- Mandelkow, E.-M., E. Mandelkow, and R. A. Milligan. 1991. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.* 114:977-991.
- Mandelkow, E., and E.-M. Mandelkow. 1995. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:72-81.
- Maniotis, A. J., C. S. Chen, and D. E. Ingber. 1997. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:849-854.
- Maruyama, K., M. Kaibara, and E. Fukada. 1974. Network of f-actin in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 371:20-29.
- Masters, C. J., D. J. Winzor, and L. W. Nichol. 1981. Binding of aldolase to actin-containing filaments. Quantitative reappraisal of the interactions. *Biochem. J.* 195:297-299.
- Masters, C. J., S. Reid, and M. Don. 1987. Glycolysis - new concepts in an old pathway. *Mol. Cell Biochem.* 76:3-14.
- Mata, M., N. Kupina, and D. J. Fink. 1992. Phosphorylation-dependent neurofilament epitopes are reduced at the node of Ranvier. *J. Neurocytol.* 21:199-210.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15:2208-2216.
- Matsuzawa, K., H. Kosako, I. Azuma, N. Inagaki, and M. Inagaki. 1998. Possible regulation of intermediate filament proteins by Rho-binding kinases. *Subcell. Biochem.* 31:423-435.
- Meyer, E., and E.-G. Neumann. 1979. *Physikalische und Technische Akustik, Friedrich Vieweg & Sohn, Braunschweig, Wiesbaden, Germany*.
- Meyer, R. K., and U. Aebi. 1990. Bundling of actin filaments by alpha-actinin depends on its molecular length. *J. Cell Biol.* 110:2013-2024.
- Minaschek, G., U. Gröschel-Stewart, S. Blum, and J. Bereiter-Hahn. 1992. Microcompartmentation of glycolytic enzymes in cultured cells. *Eur. J. Cell Biol.* 58:418-428.

- Minton, A., and J. Wilf. 1981. Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 20:4821-4826.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-242.
- Mockrin, S. C., and E. D. Korn. 1980. *Acanthamoeba* profilin interacts with g-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 19:5359-5362.
- Morton, D. J., F. M. Clarke, and C. J. Masters. 1977. An electron microscope study of the interaction between fructose diphosphate aldolase and actin-containing filaments. *J. Cell. Biol.* 74:1016-1023.
- Murphy, D. B., R. O. Gray, W. A. Grasser, and T. D. Pollard. 1988. Direct demonstration of actin filament annealing *in vitro*. *J. Cell Biol.* 106:1947-1954.
- Nagakawa, T., J. Chen, Z. Zhang, Y. Kanai, and N. Hirokawa. 1995. Two distinct functions of the carboxy-terminal tail domain of NF-M upon neurofilament assembly: cross-bridge formation and longitudinal elongation of filaments. *J. Cell Biol.* 129:411-429.
- Newman, J., K. S. Zaner, K. L. Schick, L. C. Gershman, L. A. Selden, H. J. Kinoshian, J. L. Travis, and J. E. Estes. 1993. Nucleotide exchange and rheometric studies with f-actin prepared from ATP- or ADP-monomeric actin. *Biophys. J.* 64:1559-1566.
- Nowak, E., H. Strzelecka-Golaszewska, and R. Goody. 1988. Kinetics of nucleotide and metal ion interaction with g-actin. *Biochemistry* 27:1785-1792.
- Olmsted, J. B., and G. G. Borisy. 1973. Characterization of microtubule assembly in porcine brain extracts by viscometry. *Biochemistry* 12:4282-4289.
- O'Reilly, G., and F. M. Clarke. 1993. Identification of an actin binding region in aldolase. *FEBS Lett.* 321:69-72.
- Ovádi, J. 1991. Physiological significance of metabolite channeling. *J. Theor. Biol.* 152:1-22.
- Pagliaro, L., and D. T. Taylor. 1988. Aldolase exists in both the fluid and solid phases of cytoplasm. *J. Cell Biol.* 107:981-991.
- Pagliaro, L., and D. L. Taylor. 1992. 2-Deoxyglucose and cytochalasin D modulate aldolase mobility in living 3T3 cells. *J. Cell Biol.* 118:859-863.
- Palmer, A., T. G. Mason, J. Xu, S. C. Kuo, and D. Wirtz. 1999. Diffusing wave spectroscopy microrheology of actin filament networks. *Biophys. J.* 76:1063-1071.
- Pantaloni, D., and M. -F. Carlier. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin  $\beta_4$ . *Cell* 75:1007-1014.
- Papasozomenos, S. C., L. I. Binder, P. K. Bender, and M. R. Payne. 1985. Microtubule-associated protein 2 within axon of spinal motor neurons: association with microtubules and neurofilament in normal and  $\beta$ ,  $\beta'$ -iminodipropionitrile treated axons. *J. Cell Biol.* 100:74-85.
- Parry, D. A. D., and P. M. Steinert. 1995. *Intermediate filament structure*, Springer-Verlag, Berlin.
- Perelroizen, I., D. Didry, H. Christensen, N. Chua, and M. -F. Carlier. 1996. Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in actin assembly. *J. Biol. Chem.* 271:12302-12309.
- Pette, D. 1975. Some aspects of supramolecular organization of glycogenolytic and glycolytic enzymes in muscle. *Acta Histochemica* 14:47-68.
- Podlubnaya, Z. A., L. A. Tskhovrebova, M. M. Zalishtsbvili, and G. A. Stefanenko. 1975. Electron microscopic study of alpha-actinin. *J. Mol. Biol.* 92:357-359.
- Poglavov, B. F., and N. B. Livanova. 1986. Interaction of actin with the enzymes of carbohydrate metabolism. *Adv. Enzyme Regul.* 25:297-305.
- Pokorna, E., P. Jordan, C. O'Neill, D. Zicha, C. Gilbert, and P. Vesely. 1994. Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell Motil. Cytoskel.* 28:25-33.
- Pollard, T. D., and S. Ito. 1970. Cytoplasmic filaments of *Amoeba proteus*. I. The role of filaments in consistency changes and movements. *J. Cell Biol.* 46:267-289.
- Pollard, T. D. 1984. Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Biol.* 99:769-777.
- Pollard, T. D., and J. A. Cooper. 1984. Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* 23:6631-6641.
- Pollard, T. D., and J. A. Cooper. 1986. Actin and actin binding proteins. A critical evaluation of mechanism and function. *Annu. Rev. Biochem.* 55:987-1035.
- Pollard, T. D., I. Goldberg, and W. H. Schwarz. 1992. Nucleotide exchange, structure, and mechanical properties of filaments assembled from ATP-actin and ADP-actin. *J. Biol. Chem.* 267:20339-20345.
- Pring, M., A. Weber, and M. R. Bubb. 1992. Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* 31:1827-1836.
- Reisler, E. 1993. Actin molecular structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:41-47.
- Rempel, A., S. P. Mathupala, and P. L. Pedersen. 1996. Glucose catabolism in cancer cells: regulation of the type II hexokinase promoter by glucose and cyclic AMP. *FEBS Lett.* 385:233-237.
- Rose, I. A., and J. V. B. Warms. 1967. Mitochondrial hexokinase. *J. Biol. Chem.* 242:1635-1645.
- Rotsch, C., F. Braet, E. Wisse, and M. Radmacher. 1997. AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell Biol. Int.* 21:685-696.
- Rozycki, M., C. E. Schutt, and U. Lindberg. 1991. Affinity chromatography-based purification of profilin:actin. *Meth. Enzymol.* 196:100-118.
- Rubenstein, P. A. 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12:309-315.
- Ruhlandt, G., U. Lange, and F. Grolig. 1994. Profilins purified from higher plants bind to actin from cardiac muscle and to actin from a green alga. *Plant Cell Physiol.* 35:849-854.
- Saltarelli, D., and D. Pantaloni. 1982. Polymerization of the tubulin-colchicine complex and guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. *Biochemistry* 21:2996-3006.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Sanford, K. K., B. E. Barker, R. Parshad, B. B. Westfall, M. W. Woods, J. L. Jackson, D. R. King, and E. V. Peppers. 1970. Neoplastic conversion *in vitro* of mouse cells: cytologic, chromosomal, enzymatic, glycolytic, and growth properties. *J. Natl. Cancer Inst.* 45:1071-1096.
- Sato, M., G. Leimbach, W. H. Schwarz, and T. D. Pollard. 1985. Mechanical properties of actin. *J. Biol. Chem.* 260:8585-8592.
- Sato, M., W. H. Schwarz, and T.D. Pollard. 1986. *Acanthamoeba* profilin affects the mechanical properties of non-filamentous actin. *J. Biol. Chem.* 261:10701-10706.
- Sato, M., W. H. Schwarz, and T.D. Pollard. 1987. Dependence of the mechanical properties of actin/ $\alpha$ -actinin gels on deformation rate. *Nature* 325:829-830.
- Sato, M., W. H. Schwarz, S. C. Selden, and T. D. Pollard. 1988. Mechanical properties of brain tubulin and microtubules. *J. Cell Biol.* 106:1205-1211.
- Schindler, R., E. Weichselsdorfer, O. Wagner, D. Schmitz, and J. Bereiter-Hahn. Aldolase-localisation in cultured cells: cell-type and substrate-specific regulation of cytoskeletal associations. (*In preparation*)
- Schliwa, M. 1982. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J. Cell Biol.* 92:79-91.
- Schliwa, M. 1986. The cytoskeleton. An introductory survey. In: *Cell biology monographs, Vol. 13, Springer Verlag, Wien*. pp. 322
- Schmidt, F. G., F. Ziemann, and E. Sackmann. 1996. Shear field mapping in actin networks by using magnetic tweezers. *Eur. Biophys. J.* 24:348-353.
- Schüler, H. 1999. *Persönliche Mitteilung*
- Schüler, H., U. Lindberg, C. E. Schutt, and R. K. Karlsson. 2000. Thermal unfolding of g-actin monitored with the DNase I-inhibition assay. *Eur. J. Biochem.* 267:476-486.
- Schumacher, J. M., K. Lee, S. Edelhoff, and R. E. Braun. 1995. Spnr, a murine RNA-binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J. Cell Biol.* 129:1023-1032.
- Schutt, C. E., J. C. Myslik, M. D. Rozycki, N. C. W. Goonesekere, and U. Lindberg. 1993. The structure of crystalline profilin- $\beta$ -actin. *Nature* 365:810-816.
- Schutt, C. E., M. D. Rozycki, J. Chik, and U. Lindberg. 1995a. Structural studies on the ribbon-to-helix transition in profilin:actin crystals. *Biophys. J.* 68:12-18S.
- Schutt, C. E., M. D. Rozycki, J. C. Myslik, and U. Lindberg. 1995b. A discourse on modeling f-actin. *J. Struct. Biol.* 115:186-198.
- Shelanski, M. L., F. Gaskin, and C. R. Cantor. 1973. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70:765-768.
- Singh, I., D. E. Goll, R. M. Robson, and M. H. Stromer. 1981. Effect of  $\alpha$ -actinin on actin structure. *Viscosity studies. Biochim. Biophys. Acta* 669:1-6.
- Small, J. V. 1981. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J. Cell Biol.* 91:695-705.
- Spudich, J. A., and S. Watt. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 246:4866-4871.
- Srivastava, D. K., and S. A. Bernhard. 1986. Metabolite transfer via enzyme enzyme complexes. *Science* 234:1081-1086.
- Starlinger, V. H. 1967. Binding of aldolase to the particulate fraction in rat muscle homogenates. *Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem.* 348:864-870.
- Steinmetz, M. O., D. Stoffler, S. A. Müller, W. Jahn, B. Wolpensinger, K. N. Goldie, A. Engel, H. Faulstich, and U. Aebi. 1998. Evaluating atomic models of f-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative. *J. Mol. Biol.* 276:1-6.
- Stewart, M., D. J. Morton, and F. M. Clarke. 1980. Interaction of aldolase with actin-containing filaments. Structural studies. *Biochem. J.* 186:99-104.
- Stossel, T. P. 1984. Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* 99:15-21S.
- Stossel, T. P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260:1086-1094.
- Stryer, L. 1991. *Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.*
- Sun, H.-Q., K. Kwiatkowska, and H. L. Yin. 1995. Actin monomer binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:102-110.
- Suzuki, N., Y. Tamura, and K. Mihashi. 1996. Compressibility of specific volume of actin decrease upon G to F transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1292:265-272.
- Tamura, Y., N. Suzuki, and K. Mihashi. 1993. Adiabatic compressibility of myosin subfragment-1 and heavy meromyosin with or without nucleotide. *Biophys. J.* 65:1899-1905
- Tang, J. X., and P. A. Janmey. 1996. The polyelectric nature of f-actin and the mechanism of actin bundle formation. *J. Biol. Chem.* 271:8556-8563.
- Tellam, R., and C. Frieden. 1982. Cytochalasin D and platelet gelsolin accelerate actin polymer formation. A model for regulation of the extent of actin polymer formation *in vivo*. *Biochemistry* 21:3207-3214.
- Theriot, J. A., and T. J. Mitchison. 1993. The three faces of profilin. *Cell* 75:835-838.
- Theriot, J. A., J. Rosenblatt, D. A. Portnoy, P. J. Goldschmidt-Clermont, and T. J. Mitchison. 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76:505-517.
- Tilney, L. G., E. M. Bonder, L. M. Coluccio, and M. S. Mooseker. 1983. Actin from *Thyone* sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J. Cell Biol.* 97:112-124.
- Traub, P. 1995. Intermediate filaments and gene regulation. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 27:377-400.
- Tsakiridis, T., P. Tong, B. Matthews, E. Tsiani, P. J. Bilan, A. Klip, and G. P. Downey. 1999. Role of the actin cytoskeleton in insulin action. *Microsc. Res. Tech.* 47:79-92.

- Tuttle, J. P., and J. E. Wilson. 1970. Rat brain hexokinase. A kinetic comparison of soluble and particulate forms. *Biochim. Biophys. Acta* 212:185-188.
- Unger, E., K. J. Böhm, and W. Vater. 1990. Structural diversity and dynamics of microtubules and polymorphic tubulin assemblies. *Electron Microsc. Rev.* 3:355-395.
- Valberg, P. A., and D. F. Albertini. 1985. Cytoplasmic motions, rheology, and structure probed by a novel magnetic particle method. *J. Cell Biol.* 101:130-140.
- Valenta, R., F. Ferreira, M. Grote, I. Swoboda, S. Vrtala, M. Duchene, R. B. Meagher, E. Henerle-Bors, D. Kraft, and O. Scheiner. 1993. Profilin is a novel actin binding protein in plants. *Eur. J. Cell Biol.* 60:156S.
- Valentin-Ranc, C., and M.-F. Carlier. 1989. Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta gamma-bidentate CrATP to actin. *J. Biol. Chem.* 264:20871-20880.
- Vandekerckhove, J. 1990. Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:41-50.
- Vandekerckhove, J., and K. Weber. 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 122:783-802.
- Vater, W., K. J. Böhm, and E. Unger. 1983. Effects of DNA on the taxol stimulated *in vitro* assembly of microtubule protein from porcine brain. *Studio Biophys.* 97:49-60.
- Vater, W., W. Fritzsche, A. Schaper, K. J. Böhm, E. Unger, and T. M. Jovin. 1995. Scanning force microscopy of microtubules and polymorphic tubulin assemblies in air and liquid. *J. Cell Science* 108:1063-1069.
- Vinson, V. K., E. M. De La Cruz, H. N. Higgs, and T. D. Pollard. 1998. Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry* 37:10871-10880.
- Wachsstock, D. H., W. H. Schwarz, and T. D. Pollard. 1993. Affinity of  $\alpha$ -actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophys. J.* 65:205-214.
- Wagner, O. 1995. Untersuchungen zur Mechanik cytoplasmatischer Gele. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany.*
- Wagner, O., and J. Bereiter-Hahn. 1996. The oscillating rod viscosimeter: a new method for simultaneously measurement of dynamic viscosity and velocity of sound in cytogels using nanometer strains. *Eur. J. Cell. Biol.* 42:469S
- Wagner, O., J. Zinke, P. Dancker, W. Grill, and J. Bereiter-Hahn. 1999. Viscoelastic properties of f-actin, microtubules, f-actin/ $\alpha$ -actinin, and f-actin/hexokinase determined in microliter volumes with a novel nondestructive method. *Biophys. J.* 76:2784-2796.
- Walczak, C. E. 2000. Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:52-56.
- Walsh, T. P., F. M. Clarke, and C. J. Masters. 1977. Modification of the kinetic parameters of aldolase on binding to the actin-containing filaments of skeletal muscle. *Biochem. J.* 165:165-167.
- Walsh, J. L., and H. R. Knull. 1988. Heteromeric interactions among glycolytic enzymes and of glycolytic enzymes with f-actin: effects of poly(ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta* 952:83-91.
- Walter, H., and D. E. Brooks. 1995. Phase separation in cytoplasm, due to macromolecular crowding, is the basis for microcompartmentation. *FEBS Lett.* 361:135-139.
- Wang, J., A. J. Morris, D. R. Tolan, and L. Pagliaro. 1996. The molecular nature of the f-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* 271:6861-6865.
- Wang, J., D. R. Tolan, and L. Pagliaro. 1997. Metabolic compartmentation in living cells: structural association of aldolase. *Exp. Cell Res.* 237:445-451.
- Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 5:2325-2327.
- Warburg, O. 1926. *Über den Stoffwechsel der Tumore*, Springer Verlag, Berlin, pp. 263.
- Weast, R. C. 1971. Handbook of chemistry and physics. In: *A ready-reference book of chemical and physical data*, The Chemical Rubber Company, 51. ed., Cleveland, Ohio.
- Wegner, A., and J. Engel. 1975. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophys. Chem.* 3:215-225.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerisation of actin. *J. Mol. Biol.* 108:139-150.
- Weichselsdorfer, E. 1998. Untersuchung zur Feinstruktur der Wechselwirkung von Glykolyseenzymen mit Elementen des Cytoskeletts. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany.*
- Weiss, D. G., G. M. Langford, and R. D. Allen. 1987. Implications of microtubules in cytomechanics: static and motile aspects. In: *Cytomechanics*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 100-113.
- Wiche, G. 1989. High-Mr microtubule associated proteins: properties and functions. *Biochem. J.* 259:1-12.
- Xu, J., D. Wirtz, and T. D. Pollard. 1998. Dynamic cross-linking by  $\alpha$ -actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *J. Biol. Chem.* 273:9570-9576.
- Yu, J., and T. L. Steck. 1975. Associations of band-3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 250:9176-9184.
- Zaner, K. S., R. Fotland, and T.P. Stossel. 1981. Low-shear, small volume, viscoelastometer. *Rev. Sci. Instrum.* 52:85-87.
- Zaner, K., and T. P. Stossel. 1983. Physical basis of the rheological properties of f-actin. *J. Biol. Chem.* 258:11004-11009.
- Zaner, K. S., and J. H. Hartwig. 1988. The effect of filament shortening on the mechanical properties of gel-filtered actin. *J. Biol. Chem.* 263:4532-5436.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Zaner, K. S., and P. A. Valberg. 1989. Viscoelasticity of f-actin measured with magnetic microparticles. *J. Cell. Biol.* 109:2233-2243.
- Ziemann, F., J. Rädler, and E. Sackmann. 1994. Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using magnetic bead micro-rheometer. *Biophys. J.* 66:2210-2216.
- Zimmerle, C. T., and C. Frieden. 1988. Effect of pH on the mechanisms of actin polymerisation. *Biochemistry* 27:7766-7772.
- Zinke, J. 1995. Entwicklung eines Miniatur-Viskosimeters zur Bestimmung der Viskosität biologischer Substanzen. *Diplomarbeit im Fachbereich Physik der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany.*