

**Experimentelle Untersuchung der
Lokalisationsröhre von
Aktinfilamenten in halbverdünnten
Lösungen in Abhängigkeit von der
Gegenionkonzentration und der
Vororientierung in drei Dimensionen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dipl.-Phys.

Evelin Madita Jaschinski

aus
Oelde

Bonn, März 2014

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

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

Tag der Promotion: 23.06.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Das Protein Aktin ist ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts nahezu aller eukaryotischen Zellen. Die Rolle der Aktinfilamente für biologische Prozesse in lebenden Zellen ist von höchster Komplexität. *In vitro* polymerisiertes Aktin ist ein geeignetes biomimetisches Modellsystem, um unter definierten Versuchsbedingungen diese Mechanismen zu verstehen. Zudem sind Aktinfilamente Vertreter für semiflexible Polymere, deren mechanische und dynamische Eigenschaften maßgeblich durch ihre Biegesteifigkeit bzw. Persistenzlänge bestimmt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dynamik von *in vitro* polymerisiertem Aktin mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei der Fokus auf die Fluktuation der Filamente in halbverdünnten Aktinlösungen gelegt wurde. Aufgrund der thermischen Energie fluktuieren die Filamente in einem Raum, welcher durch die Wechselwirkung mit umliegenden Filamenten eingeschränkt ist. Im theoretischen Modell werden diese topologischen Einschränkungen durch das Röhrenmodell berücksichtigt, welches die Wechselwirkungen durch einen röhrenartigen Käfig um die Filamente repräsentiert. In einer vorhergehenden Dissertationsarbeit konnte bereits von Dr. Inka Kirchenbüchler gezeigt werden, dass die Röhrenradien heterogen verteilt sind. Die Verteilungen der Röhrenradien in Abhängigkeit der Konzentration sind zudem in sehr guter Übereinstimmung mit der Segment-Fluid-Theorie, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Kroy (Universität Leipzig) entwickelt wurde. Aus dem Vergleich der Theorie mit den experimentellen Ergebnissen folgte die Vermutung, dass nematische Ordnung einen Einfluss auf die Radien der Lokalisationsröhren haben könnte. Da die Aktinlösungen in Kapillaren untersucht wurden, könnten die Aktinfilamente während der Probenpräparation durch das Befüllen entlang einer Vorzugsrichtung ausgerichtet worden sein.

Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Vorgeschichte der Probe, insbesondere durch den Scherfluss, auf die Filamentordnung und Filamentdynamik bestimmt. Zur Untersuchung der Lokalisationsröhre in Abhängigkeit der Ordnung, wurden Mikrokapillaren und makroskopische Kammern verwendet. Dazu wurden die Fluktuationen von fluoreszenzgefärbten Aktinfilamenten in einem unmarkierten Hintergrund an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Um die Ordnung der markierten Filamente in den

Probengefäßen quantifizieren zu können, wurde der Ordnungsparameter in drei Dimensionen berechnet. Die Auswertung ergab, dass die Ordnungsparameter in den Kapillaren zu jeder Aktinkonzentration signifikant höher waren als in der Kammer. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich der Ordnungsparameter mit zunehmender Segment- wie auch Filamentlänge zu höheren Werten verschiebt. Während in der Kammer die Filamente in Ebenen parallel zur Beobachtungsebene isotrop verteilt waren, waren sie senkrecht zu diesen nur wenig ausgerichtet. Im Vergleich dazu ordneten sich die Filamente in den Kapillaren entlang einer Vorzugsrichtung an, welche durch die Kapillarbefüllung induziert wurde.

Die Kraft, die während der Kapillarbefüllung auf die Filamente wirkte, wurde für zwei Kapillaren unterschiedlicher Größe abgeschätzt. Dazu wurden die Kontaktwinkel, die Oberflächenspannungen von Aktinlösungen und die Füllgeschwindigkeiten in den Kapillaren mit Aktinlösung und Wasser gemessen und anschließend mit diesen Ergebnissen die Scherspannung und Scherrate berechnet. Ein Vergleich dieser Ergebnisse zeigte, dass die Filamente durch die Kapillarbefüllung mit einer Scherrate von bis zu 1400 s^{-1} geschert wurden. Das Verhältnis der Scherspannung zu Scherrate definierte eine effektive Viskosität, welche überraschenderweise für Aktinlösungen bei diesen Scherraten mit der Viskosität von Wasser übereinstimmte.

Da somit die gleichen Kräfte in den beiden Kapillaren wirkten, wurden die Filamente gleichermaßen ausgerichtet. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut damit überein, dass der berechnete Ordnungsparameter in beiden Kapillaren identisch war.

Die Ergebnisse der Lokalisationsröhre in Abhängigkeit des Ordnungsparameters stimmten mit den Annahmen der Onsager-Theorie überein. Die Röhrenradienverteilungen in der makroskopischen Kammer verschoben sich signifikant zu niedrigeren Werten relativ zu den Verteilungen in den Kapillaren. Ein Vergleich der Segment-Fluid-Theorie mit den Experimenten zeigte eine bessere Übereinstimmung für die Werte der Röhrenradien in der makroskopischen Kammer, jedoch waren die Fitparameter immer noch ca. fünfmal kleiner als erwartet. Zudem wurde ein zusätzlicher Fitparameter in der Segment-Fluid-Theorie berücksichtigt, der die Ordnungsparameter aus den experimentell bestimmten Röhrenradienverteilungen vorhersagte und in guter Übereinstimmung mit den aus den Experimenten berechneten Werten des Ordnungsparameters für die Kapillare ist.

Um die polyelektrische Natur der Aktinfilamente zu berücksichtigen, wurden die Röhrenradien zudem in Abhängigkeit der Gegenionen analysiert. Um die Lokalisationsröhren bei Magnesiumionenkonzentrationen unterhalb des Phasenübergangs von isotrop verteilten zu gebündelten Aktinfilamenten zu messen, wurden mittels Lichtstreuemessungen die Konzentrationen des Phasenübergangs bestimmt. Anschließend wurden die Fluktuationen

nen in der makroskopischen Kammer unter physiologischen Pufferbedingungen mit denen bei erhöhter Magnesiumionenkonzentration im Puffer verglichen. Aus diesen Messungen folgte, dass die Aktinfilamente bei erhöhten Magnesiumionenkonzentrationen relativ zum physiologischen Puffer stärker fluktuierten und daher die Lokalisationsröhrenradien signifikant zu höheren Werten verschoben waren.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Lokalisationsröhre sowohl von der Ordnung der Filamente als auch von der Gegenionkonzentration abhängig ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Rolle des Aktins in der Zellbiologie	1
1.1.1	Eigenschaften des Biopolymers Aktin	2
1.2	Aktin als Modellsystem semiflexibler Polymere	4
1.3	Theoretische Grundlagen der physikalischen Eigenschaften semiflexibler Polymere	6
1.3.1	Das „Wormlike-Chain“-Modell (WLC)	6
1.3.2	Das Röhrenmodell	8
1.3.3	Die Segment-Fluid Theorie (SFT)	10
1.4	Nematische Ordnung in Polymeren	12
1.4.1	Einführung in die Physik der Flüssigkristalle	12
1.4.2	Statistische Physik zur Beschreibung der nematischen Ordnung in Flüssigkristallen	13
1.4.3	Induzierte Ausrichtung von Aktinfilamenten	15
1.5	Polyelektrolyt-Effekte	17
1.5.1	Grundlagen der Polyelektrolyt-Effekte	17
1.5.2	Polyelektrolyt-Effekte von Aktinfilamenten	19
1.6	Motivation und Ziel der Arbeit	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Aufreinigung der α -Aktin Isoform aus Kaninchenskelettmuskeln	23
2.2	Probenpräparation	24
2.2.1	Probenpräparation für Messungen der Lokalisationsröhre und der Orientierungsbestimmung in Kammer und Kapillare	26
2.2.2	Probenpräparation für Messungen der Lokalisationsröhre in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration	26
2.2.3	Probenpräparation für statische Lichtstremessungen	27
2.2.4	Probenpräparation für Messungen der Oberflächenspannung	27
2.2.5	Probenpräparation für Messungen der Kapillarbefüllung	27

2.2.6	Probenpräparation zur Bestimmung der Punktspreizfunktion	27
2.3	Probengefäße	28
2.4	Beobachtung der Kapillarbefüllung mit Aktinlösungen	30
2.5	Messung der Oberflächenspannung mit der Wilhelmy-Platten-Methode . .	31
2.6	Beobachtung der Bündelung von F-Aktin mittels Lichtstreuung	32
2.6.1	Einführung in die statische und dynamische Lichtstreuung	32
2.6.2	Versuchsaufbau zur statischen Lichtstreuung	33
2.7	Messung der Ordnung und der Lokalisationsröhre von F-Aktin am konfo- kalen Fluoreszenzmikroskop	34
2.7.1	Einführung in die konfokale Fluoreszenzmikroskopie	34
2.7.2	Einstellungen des konfokalen Fluoreszenzmikroskops	35
2.7.3	Einstellungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop zur Messung der Punktspreizfunktion (PSF)	37
2.7.4	Bestimmung der Linienspreizfunktion (LSF)	38
2.8	Bestimmung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten	40
2.9	Bestimmung und Definition des Ordnungsparameters	43
2.9.1	Bestimmung von Filamentkoordinaten und deren Abstände mit dem kommerziellen Programm IMARIS	43
2.9.2	Berechnung des Ordnungsparameters	45

3 Ordnungsbestimmung von Aktinfilamenten in Mikrokapillaren und in makroskopischen Kammern **47**

3.1	Untersuchung des Ordnungsparameters in Abhängigkeit der Segment- und Filamentlänge	47
3.1.1	Bestimmung der Filamentlängenverteilung	47
3.1.2	Ordnungsparameter S in Abhängigkeit der Filamentlänge	48
3.1.3	Ordnungsparameter S in Abhängigkeit der Segmentlänge	50
3.2	Direkter Vergleich des Ordnungsparameters in den Kapillaren und in der makroskopischen Kammer	52
3.3	Verteilung der Eigenwerte und Eigenvektoren in der Kapillare und in der makroskopischen Kammer	54

4 Messung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Ordnung **57**

4.1	Ergebnisse	57
4.1.1	Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopi- schen Kammer	57

4.1.2	Statistischer Vergleich der Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopischen Kammer	61
4.1.3	LSF-korrigierte Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopischen Kammer	63
4.1.4	Statistischer Vergleich der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopischen Kammer	67
4.1.5	Vergleich zwischen Experimenten und Theorie	69
5	Flüssigkeitsdynamik in der Kapillare	73
5.1	Theorie der Kapillarbefüllung	73
5.2	Ergebnisse	76
5.2.1	Bestimmung der Füllgeschwindigkeit und des Kontaktwinkels	76
5.2.2	Bestimmung der Oberflächenspannung	77
5.2.3	Bestimmung dimensionsloser Größen in der Mikrofluidik	79
5.2.4	Abschätzung der Kapillarkräfte	80
6	Messung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten in Abhängigkeit von Gegenionen	83
6.1	Ergebnisse	83
6.1.1	Statische Lichtstremessungen an Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration	83
6.1.2	Messung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration	85
7	Diskussion der Ergebnisse	91
7.1	Einfluss der Probenpräparation auf die Ordnung von Aktinfilamenten in Mikrokapillaren und in der makroskopischen Kammer	91
7.1.1	Längenverteilung von Aktinfilamenten	91
7.1.2	Vergleich des Ordnungsparameters in den Kapillaren und in der makroskopischen Kammer	92
7.2	Diskussion über die ordnungsabhängigen Lokalisationsröhren von Aktinfilamenten	96
7.2.1	Vergleich der Lokalisationsröhre in der großen Kapillare und der makroskopischen Kammer	96
7.2.2	Diskussion der Abweichungen zwischen Experiment und Theorie	97
7.2.3	Vergleich der Lokalisationsröhre in beiden Mikrokapillaren	98
7.3	Einfluss der Kapillarkräfte auf Aktinfilamente	99

7.4	Diskussion über die Lokalisationsröhren von Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration	99
8	Ausblick	101
9	Anhang	103
9.1	Auflistung aller verwendeter Geräte, Chemikalien und Materialien	103
9.2	Pufferzusammensetzung	106
9.3	Abkürzungsverzeichnis	107

1 Einleitung

1.1 Die Rolle des Aktins in der Zellbiologie

Das Zytoskelett besteht aus einem hochdynamischen Netzwerk aus Biopolymeren. Dieses ermöglicht der Zelle ihre Funktion entsprechend der Umgebung anzupassen. In eukaryotischen Zellen ist das Zytoskelett aus drei unterschiedlichen Typen von Filamenten aufgebaut, aus den Intermediärfilamenten, den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten. Durch das Zusammenspiel aller Komponenten des Zytoskeletts können vielfältige, komplexe Zellprozesse realisiert werden. Die Filamenttypen unterscheiden sich in vielen Merkmalen, unter anderem in ihren Biegesteifigkeiten, Längen und Durchmessern, wodurch sie spezifische mechanische und elastische Eigenschaften aufweisen. Intermediärfilamente sind flexible Polymere, welche einen Durchmesser von ungefähr 10 nm aufweisen und der Zelle mechanische Stabilität verleihen [3]. Mikrotubuli sind dagegen steifer. Diese Polymere formen lange Hohlzylinder mit einem Außendurchmesser von 25 nm [47]. In Zellen bilden sie ein sternähnliches Netzwerk und können so den intrazellulären Transport unterstützen [49]. Die letzte Komponente des Zytoskeletts bilden die Aktinfilamente. Sie sind zu einem helikalen Doppelstrang mit einem Durchmesser von ungefähr 8 nm geformt [52, 60, 33, 45]. Aktinfilamente sind steifer als Intermediärfilamente, jedoch sind sie flexibler als Mikrotubuli. Mittels Aktin-bindender Proteine (ABP), welche unter anderem Filamentlängen regulieren, eine Vernetzung zu einem dreidimensionalen Gel bewirken oder die Kopplung zur Plasmamembran herstellen, übernimmt Aktin in der Zelle zahlreiche Funktionen [114]. Aktinfilamente ordnen sich in der Zelle beispielsweise zu kontraktilen Bündeln, Netzwerken und auch Gelen an und stabilisieren dadurch die Form der Zelloberfläche, tragen zur Zellbewegung bei oder sind an der Kraftgenerierung oder -übertragung beteiligt [114, 15, 6, 76].

Alle Filamentkomponenten des Zytoskeletts sind aus Monomere als Untereinheiten aufgebaut. Da sich ständig Monomere an die jeweiligen Filamente anlagern und ablösen können, ist das Zytoskelett ständig im Umbau und hochdynamisch. Zudem können erst durch den Einsatz von Helferproteinen die Verknüpfungen zu anderen Zellbestandteilen hergestellt

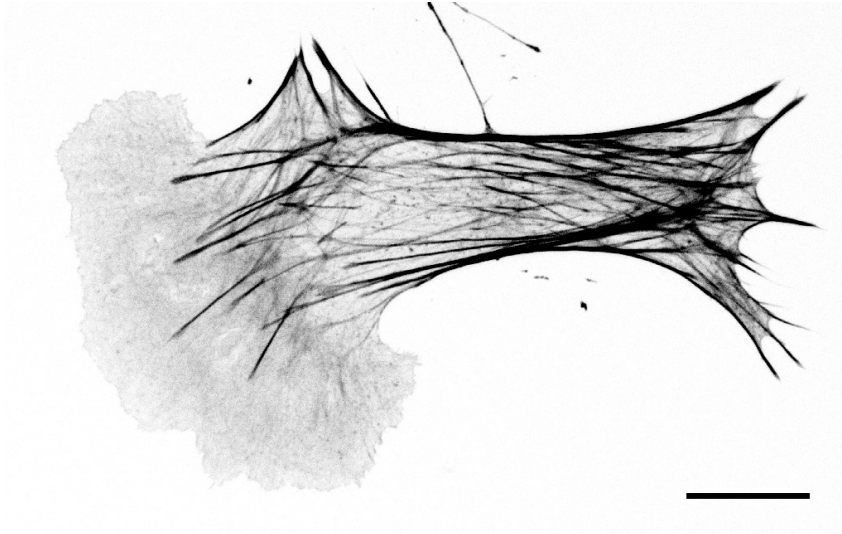


Abbildung 1.1: Immunfluoreszenzfärbung des Aktins: Hier ist das Aktinzytoskelett eines Fibroblasten dargestellt; die Grauwerte sind invertiert; Maßstab = 20 μm ; (Bild bereitgestellt von Simone Stiefel, ICS-7).

werden und so Zellprozesse kontrolliert ablaufen [3]. In Abbildung 1.1 ist ein Fibroblast gezeigt, wobei Aktin angefärbt ist. An dieser Zelle ist die Vielfalt der Aktinfilamentkonformation verdeutlicht. Einerseits können sich die Filamente zu Bündeln anordnen und andererseits im Lamellipodium dichte Netzwerke formen.

Aufgrund der Vielzahl von hochkomplexen Zellprozessen ist eine Entschlüsselung der Funktion jedes einzelnen Bestandteils der Zelle und ihr kombiniertes Zusammenspiel eine große Herausforderung. Um einem detaillierten Verständnis näher zu kommen, eignen sich biomimetische Modellsysteme [5, 93, 43, 9]. Mittels dieser Modellsysteme können quantitative Modelle aufgestellt, chemische und physikalische Eigenschaften einzelner Komponenten studiert und diese gezielt in Anwendungen umgesetzt werden. *In vitro* polymerisierte Aktinfilamente sind Beispiele für semiflexible Polymere, so dass an ihnen unter anderem die mechanischen und dynamischen Eigenschaften speziell für diese Substanzklasse erprobt werden können [109, 29, 48].

1.1.1 Eigenschaften des Biopolymers Aktin

Das Protein Aktin wurde erstmals im Jahr 1942 vom Biochemiker Straub aus Kaninchenmuskelzellen extrahiert [130]. Aktin zählt zu den hochgradig konservierten Proteinen, deren Aminosäuresequenz sich im Laufe der Evolution kaum geändert hat. Die kleinste Untereinheit wird globuläres Aktin, kurz G-Aktin, genannt. Dieses besteht aus 375 Ami-

nosäuren [37] und weist ein Molekulargewicht von 42 kDa¹ auf [72]. In Anwesenheit von Adenosintriphosphat (kurz ATP) und Salzen (z.B. Mg²⁺, Ca²⁺) können sich die Monomere zu filamentösem Aktin, welches auch F-Aktin genannt wird, zu einer Doppelhelix mit einer Ganghöhe von 36 nm anordnen [60, 108, 70]. Diese Filamentbildung wird im Folgenden detailliert erläutert. Die Polymerisation von globulärem zu filamentösem Aktin durchläuft drei Phasen. Oosawa und Kasai konnten zeigen, dass diese Phasen mit einer Nukleation und anschließender Verlängerung verknüpft sind [104]. In Abbildung 1.2 ist der prozentuale Anteil an G-Aktin, welcher zu Filamenten polymerisiert ist, in Abhängigkeit der Zeit in den unterschiedlichen Phasen dargestellt. Am Anfang stoßen die Monomere zufällig zusammen. Dadurch können sie spontan Dimere bilden, welche jedoch instabil sind und wieder in Monomere zerfallen können. Der für die Filamentbildung notwendige Schritt ist die Anlagerung eines weiteren Monomers zum Trimer. Dieses Trimer ist sehr instabil, da sich sofort weitere Monomere anlagern. Deshalb wird dieses Trimer auch Keim genannt. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich an ein Dimer ein weiteres Monomer anlagert ist gering, so dass die Bildung von Oligomeren am Anfang verzögert ist. Diese erste Phase wird daher auch Verzögerungsphase I genannt. In der darauffolgenden Wachstums- oder Verlängerungsphase (Phase II) lagern sich weitere Monomere in Form eines helikalen Doppelstranges an beiden Seiten des Keims an, so dass Filamente gebildet werden. Die Reaktionsrate k_{on} [M⁻¹s⁻¹], mit welcher die Monomere angelagert werden, ist dabei abhängig von der Konzentration an ungebundenem Monomer, also dem G-Aktin. Gleichzeitig werden aber auch Monomere vom Filament abgebaut, wobei die Reaktionsrate k_{off} [s⁻¹] für den Abbau konzentrationsunabhängig ist [143]. Zudem ist die Geschwindigkeit, mit welcher sich die Monomere anlagern, für beide Enden unterschiedlich. Das Ende, welches schneller polymerisiert, wird als *Plus-Ende* und dasjenige, welches langsamer polymerisiert, als *Minus-Ende* bezeichnet [141]. Die Anlagerung der Monomere an das Filament erfolgt so lange, bis die Monomerkonzentration auf denjenigen Wert abgefallen ist, bei dem das kritische Gleichgewicht erreicht ist. Diese Konzentration heißt kritische Monomerkonzentration C_c . Ist dieser Wert erreicht, dann werden genauso viele Monomere an das Filament angelagert wie abgebaut und ein dynamischer Gleichgewichtszustand stellt sich ein (Phase III). Für die Geschwindigkeitskonstanten gilt in dieser Phase:

$$k_{\text{off}} = C_c \cdot k_{\text{on}}. \quad (1.1)$$

Die Konstanten k_{on} bzw k_{off} in der Gl. 1.1 sind Mittelwerte, da sich die Konstanten am *Plus-Ende* und *Minus-Ende* unterscheiden. Insgesamt folgt ein Tretmühleneffekt (engl.

¹kDa=1000 Da. Das Einheitenzeichen Da (Dalton) wird als Synonym für die atomare Masseneinheit $1\text{u} = 1,6605 \cdot 10^{-27}$ kg verwendet.

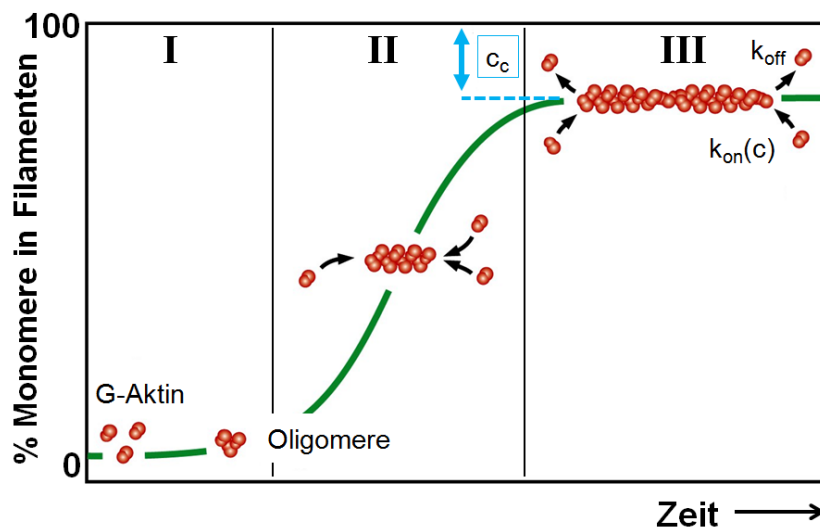


Abbildung 1.2: Darstellung der Aktinpolymerisation: In Verzögerungsphase I stoßen zufällig Monomere zusammen und wachsen zu einem stabilen Oligomer an, welcher den Keim bildet. In der Verlängerungsphase II polymerisieren weitere Monomere an den Keim, so dass sie ein helikales, doppelsträngiges Filament formen. In der Gleichgewichtsphase III ist ein stationärer Zustand und eine kritische Konzentration C_c an G-Aktinmonomeren erreicht. Die Anzahl an angelagerten Monomeren entspricht der Anzahl der Monomere, welche abgebaut werden. Modifiziert nach [3].

treadmilling), da aufgrund der unterschiedlichen Ratenkonstanten insgesamt eine Nettoanlagerung am *Plus-Ende* und ein Nettoabbau von Monomeren am *Minus-Ende* resultiert [142]. Die Länge der Filamente bleibt während dieses Prozesses erhalten.

Um Versuche an *in vitro* polymerisierten Aktinfilamenten durchführen zu können, muss der Tretmühleneffekt unterdrückt werden. Dies kann mit Phalloidin, einem Gift des grünen Knollenblätterpilzes (*AMANITA PHALLOIDES*), erreicht werden [146]. Nach Bindung an Aktin befindet sich dieses bitykliche Heptapeptid zwischen drei Monomeren und fördert die Keimbildung [98, 144]. Zudem wird die Depolymerisation unterbunden, das Filament stabilisiert und die kritische Monomerkonzentration C_c sehr stark herabgesetzt [21, 40, 18].

1.2 Aktin als Modellsystem semiflexibler Polymere

Biopolymere weisen viele physikalische Eigenschaften auf, welche zum großen Teil von der Biegesteifigkeit dominiert werden [115]. Die Biegesteifigkeit B ist ein Maß für die Flexibilität von Polymerketten [32] und kann räumlich durch die so genannte Persistenzlänge L_p charakterisiert werden. Diese legt eine Längenskala fest, auf welcher fluktuierende Poly-

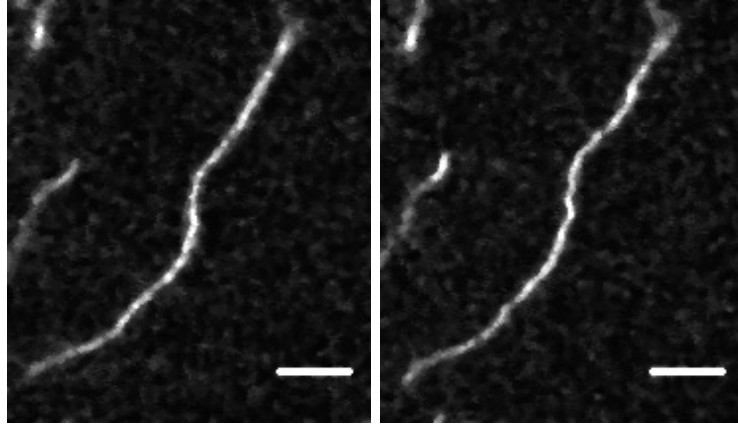


Abbildung 1.3: Mikroskopieaufnahme zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten eines fluoreszenzmarkierten Aktinfilaments im Hintergrund eines unmarkierten Aktinnetzwerks. Für detaillierte Informationen zur Messung siehe Abschnitt 2.8; Maßstab = 5 μm .

mere aufgrund der thermischen Energie $k_B \cdot T$ verformt werden [51]. Die Biegesteifigkeit ist über die Gleichung

$$B = L_p k_B T, \quad (1.2)$$

mit der Persistenzlänge verknüpft, wobei k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur sind. In Abbildung 1.3 ist exemplarisch eine Fluoreszenzaufnahme eines *in vitro* polymerisierten Aktinfilaments dargestellt. Um Aussagen über die Steifigkeit von Aktinfilamenten treffen zu können, werden diese theoretisch durch eine parametrisierte Raumkurve $\vec{r}(s)$ dargestellt, welche in Abbildung 1.4 skizziert ist. Das in Abbildung 1.3 gezeigte Filament fluktuiert aufgrund der Brownschen Bewegung, so dass sich die Konformationen des Filaments zu beiden Zeitpunkten unterscheiden. Diese Konformationsänderung wird theoretisch durch die Fluktuation der Tangenten $\vec{t}(s)$ an die parametrisierte Raumkurve $\vec{r}(s)$ beschrieben.

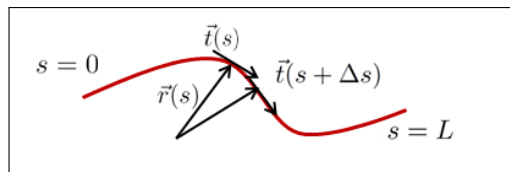


Abbildung 1.4: Parametrisierte Raumkurve $\vec{r}(s)$ mit Bogenlänge s , Konturlänge L und den Tangenten $\vec{t}(s)$ und $\vec{t}(s + \Delta s)$.

Für die Orientierungs-Korrelationsfunktion der Tangenten an die Raumkurve K_t gilt [83, 32]:

$$K_t = \langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(s + \Delta s) \rangle = K_0 \cdot e^{-\frac{\Delta s}{L_p}}. \quad (1.3)$$

Die Persistenzlänge L_p wird somit durch die Tangentenkorrelation definiert. Gemäß ihrer




$L_p \gg L$		steif
$L_p \ll L$		flexibel
$L_p \approx L$		semiflexibel

Abbildung 1.5: Klasseneinteilung der Polymere gemäß ihrer Steifigkeiten.

Steifigkeiten werden Polymere in folgende drei Klassen eingeteilt (vgl. Abbildung 1.5): Ist die Persistenzlänge wesentlich größer als die Konturlänge ($L_p \gg L$), so sind die Polymere steif. Wenn die Konturlänge hingegen wesentlich größer als die Persistenzlänge ist ($L \gg L_p$), dann sind die Polymere flexibel. Sind beide Längen der Polymere vergleichbar ($L \approx L_p$), so gehören sie der Klasse der semiflexiblen Polymere an.

Die *in vitro* polymerisierten Aktinfilamente wurden in dieser Arbeit mit Phalloidin stabilisiert (vgl. Abschnitt 1.1.1) und weisen eine Persistenzlänge von $L_p \approx 17 \mu\text{m}$ auf [85, 66, 105, 47]. Da diese Länge vergleichbar mit der Konturlänge von F-Aktin ist mit $\langle L \rangle = 22 \mu\text{m}$ (vgl. Tabelle 3.1), gehören Aktinfilamente der Klasse der semiflexiblen Polymere an [74].

1.3 Theoretische Grundlagen der physikalischen Eigenschaften semiflexibler Polymere

1.3.1 Das „Wormlike-Chain“-Modell (WLC)

Faserartige Polymere können durch das Wormlike-Chain-Modell beschrieben werden, welches auf das Modell von Kratky und Porod zurückgeht [79]. Die Polymere werden als dünne, flexible Stäbchen mit endlicher Biegesteifigkeit B betrachtet (vgl. Gl. 1.3). Diese können im Modell nach Saitô durch eine differenzierbare, mit Bogenlänge s parametrisierte Raumkurve $\vec{r}(s)$ der Länge L dargestellt werden, welche zuvor in Abbildung 1.4 eingeführt wurde und für welche die Gleichung 1.3 der Orientierungs-Korrelations-Funktion mit Persistenzlänge L_p gültig ist [116]. Aus der Forderung, dass die mit diesem Modell beschriebenen Polymere inkompressibel sind, folgt für die Tangenten $|\vec{t}(s)| = 1$. Die elastische Energie dieses Systems ist durch die Krümmung festgelegt:

$$E = \int_0^L \frac{1}{2} B \left(\frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right)^2 ds. \quad (1.4)$$

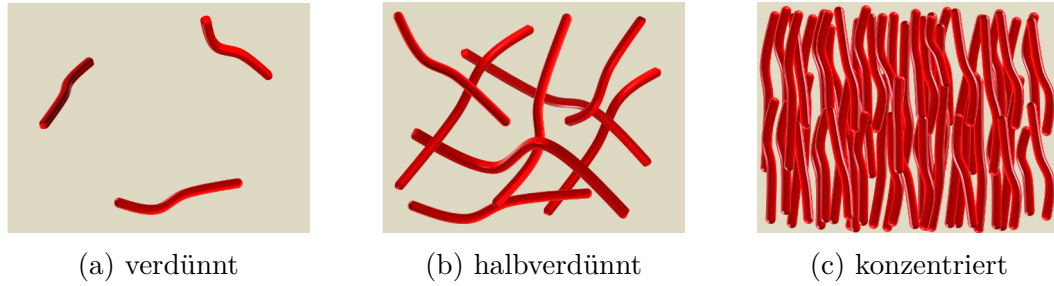


Abbildung 1.6: Klassifizierung der Konzentrationsbereiche.

Die physikalischen Eigenschaften von Polymerlösungen hängen sowohl vom Lösungsmittel, der Temperatur als auch von ihrer Konzentration c ab. Durch die Konzentrationsabhängigkeit werden die Polymerlösungen in drei Klassen eingeteilt und zwar verdünnt, halbverdünnt und konzentriert (vgl. Abbildung 1.6) [32]. Für steife Stäbchen mit Konzentration c ist die Einteilung von ihrer Länge L und ihrem Durchmesser d abhängig, so gilt nach Khokhlov und Semenov [120]:

a) verdünnte Lösungen: $c \ll L^{-3}$

Die Wechselwirkung zwischen den Polymeren ist vernachlässigbar gering. Die Polymere liegen räumlich getrennt voneinander und können unabhängig fluktuieren.

b) halbverdünnte Lösungen: $L^{-3} \ll c \ll L^{-2}d^{-1}$

Der Abstand der Polymere ist so gering, dass sie überlappen, verschlaufen und auf diese Weise eine isotrope Lösung bilden. In diesem Konzentrationsbereich beeinflussen sich die Polymere stark, so dass die Fluktuationen nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können.

c) konzentrierte Lösungen: $L^{-2}d^{-1} \ll c$

Wird die Dichte der Polymere in der Lösung erhöht, so ist die sterische Abstoßung so stark, dass sich die Polymere ausrichten, analog dem Prozess in einem Flüssigkristall (vgl. Abschnitt 1.4).

In aktuellen Forschungsarbeiten zu *in vitro* polymerisierten Aktinfilamenten werden diese Konzentrationsbereiche untersucht [5, 124, 135, 48]. Aufgrund der Polydispersität von Aktinfilamenten ist der Übergang zwischen unterschiedlichen Bereichen kontinuierlich. Da die mittleren Filamentlängen in dieser Arbeit zwischen $13\ \mu\text{m}$ und $22\ \mu\text{m}$ liegen, gehören die Aktinlösungen mit $c_{\text{Aktin}} = 0,2 - 0,8\ \text{mg/ml}$ unter Berücksichtigung der Ganghöhe der Aktinfilamente von $36\ \text{nm}$ der Klasse der halbverdünnten Lösungen an [60]. Sie bilden ein verschlauftes Polymernetzwerk. Der mittlere Abstand zwischen Filamentverschlaufungen ist die so genannte Maschenweite ξ (vgl. Abbildung 1.7). Diese ist sowohl von der Filamentlänge L als auch von der Konzentration c_{Aktin} abhängig. Sei ρ_0 die Konturlängendichte,

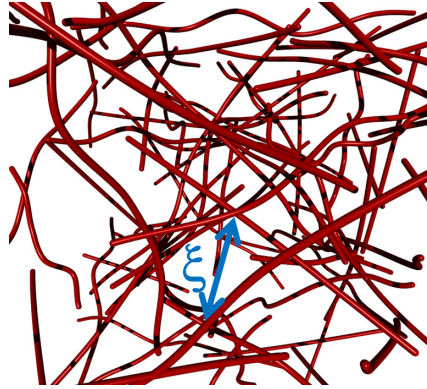


Abbildung 1.7: Darstellung eines halbverdünnten Polymernetzwerks: In dem gegebenen Volumen sind so viele Filamente enthalten, dass sie Verschlaufungen ausbilden und ein isotropes Netzwerk gebildet wird. Der mittlere Abstand benachbarter Filamente wird Maschenweite ξ genannt (Bild bereitgestellt von Dr. Ronald Springer, ICS-7).

welche über die Gleichung

$$\rho_0 = c \cdot L \quad (1.5)$$

definiert ist, dann ist die Maschenweite proportional zur Konturlängendichte:

$$\xi \propto (\rho_0)^{-1/2} = (c_{\text{Aktin}} \cdot L)^{-1/2}. \quad (1.6)$$

1.3.2 Das Röhrenmodell

Die Wechselwirkungen zwischen verschlauften Polymeren in einem Netzwerk zu berechnen oder gar abzuschätzen ist hochkomplex. Um die Beschreibung aller topologischen Einschränkungen zu berücksichtigen, führte im Jahr 1976 S. F. Edwards das Modell der Röhre für Schmelzen und flexible Polymere ein [36]. Das Modell wurde von T. Odijk für steife Stäbchen und von A. N. Semenov für semiflexible Polymere erweitert [99, 119].

Das Prinzip des Röhrenmodells ist in Abbildung 1.8 visualisiert. Die durchgezogene grüne Linie repräsentiert in Abbildung 1.8 ein Testfilament. Dieses Testfilament wird aufgrund der Brownschen Bewegung fluktuieren. Die das Testfilament umgebenden Filamente schränken den Raum ein, in welchem dieses fluktuieren kann. Dieser Raum ist vergleichbar mit einem röhrenähnlichen Käfig und wird theoretisch durch ein harmonisches Potential beschrieben [99]. Innerhalb dieser Röhre kann das Filament fluktuieren. Zwei weitere Konformationsmöglichkeiten zu zwei unterschiedlichen Zeiten sind als grün-gestrichelte Linien dargestellt. Das Testfilament wurde willkürlich ausgewählt und auch dieses Filament trägt trivialerweise zu Bewegungseinschränkungen der anderen Filamente bei.

Die dynamischen Eigenschaften von Polymeren in verschlauften Netzwerken werden durch

die Filamentlänge L , die Maschenweite ξ , die Persistenzlänge L_p , den Filamentdurchmesser d und die so genannte Verschlaufungslänge (engl. entanglement length) L_e festgelegt. Letztere beschreibt den mittleren Abstand zwischen zwei benachbarten Kollisionspunkten eines Testpolymers mit der Röhre. Alle Fluktuationen mit Wellenlängen, die kleiner als die Maschenweite sind, relaxieren sehr schnell innerhalb von 10 ms [121]. Fluktuationen senkrecht zur Filamentachse werden transversale und diejenigen parallel zur Filamentachse longitudinale Fluktuationen genannt. Für alle Anregungswellenlängen, die kleiner oder gleich der Verschlaufungslänge sind, also $\Lambda \leq L_e$, dominieren transversale Fluktuationen, welche in wenigen Sekunden relaxieren [30, 65]. Fluktuationen auf Längenskalen, die größer als die der Verschlaufungslänge sind, beeinflussen die longitudinalen Fluktuationen und unter anderem die Röhrendynamik. Durch Diffusion parallel zur Längsachse der Röhre können Filamente ihre Röhre verlassen, wobei die Diffusionskonstante invers proportional zur Länge $D_{\text{rep}} \propto L^{-1}$ ist. Dieses Phänomen wird Reptation genannt [24]. Die in bisherigen Forschungsarbeiten bestimmten Diffusionskoeffizienten liegen zwischen $D_{\text{rep}} = 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ und $D_{\text{rep}} = 10^{-17} \text{ m}^2/\text{s}$ [71, 30, 65]. Die Reptationszeit, welche die Zeit festlegt bis ein Filament seine Röhre vollständig verlässt bzw. bis ein Filament über seine Länge L reptiert ist, ist folgendermaßen von der Filamentlänge abhängig [94]:

$$\tau_{\text{rep}} = \frac{L^2}{\pi^2 D_{\text{rep}}} \propto L^3. \quad (1.7)$$

Für durchschnittliche Filamentlängen von $22 \mu\text{m}$ ergeben sich so Reptationszeiten von ungefähr 10^6 s , bis ein Filament vollständig aus seiner Röhre diffundieren kann.

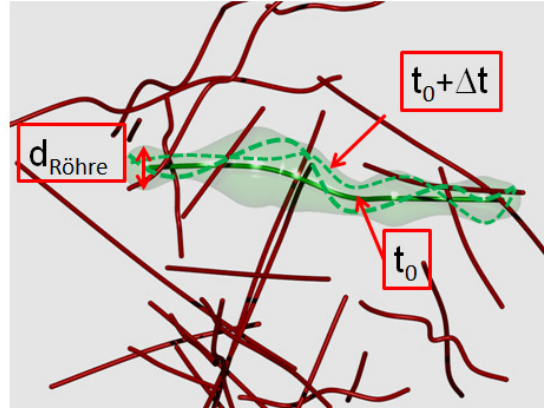


Abbildung 1.8: Bewegungseinschränkung eines Filaments im röhrenähnlichen Käfig: Die durchgezogene grüne Linie ist ein willkürlich ausgewähltes Testfilament. Der Raum, in welchem das Testfilament fluktuieren kann, wird Röhre genannt, wobei $d_{\text{Röhre}}$ der Durchmesser ist und durch die umliegenden Filamente bestimmt wird. Zwei weitere Konformationsmöglichkeiten zu zwei unterschiedlichen Zeiten sind als grün-gestrichelte Linien dargestellt (Bild bereitgestellt von Dr. Ronald Springer, ICS-7).

1.3.3 Die Segment-Fluid Theorie (SFT)

Seitdem in Experimenten zur Aktinfluktuation die Abmessungen der Röhre, die so genannten Röhrenradien, von mehreren Arbeitsgruppen bestimmt wurden, ist ein aktuelles Forschungsthema die Formulierung eines mikroskopischen Röhrenmodells [72, 71, 112, 48, 30, 137, 49]. Zudem konnte bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Röhrenradius eine asymmetrische Verteilung aufweist [112, 48]. Parallel zur Forschungsarbeit von Dr. Inka Kirchenbüchler wurde von unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe von Prof. Kroy (Universität Leipzig) die so genannte Segment-Fluid Theorie aufgestellt, welche es erlaubt die Röhrenradienverteilung in einem mikroskopischen Modell vorherzusagen. Der Röhrenradius wird im Rahmen einer Näherung, die nur Paarwechselwirkungen zwischen Test- und Nachbarfilament berücksichtigt (engl. Binary Collision Approximation, kurz BCA), abgeschätzt [95]. Dabei befinden sich die beiden kollidierenden Filamente in jeweils einer Röhre, die innerhalb des Modells durch ein harmonisches Potential repräsentiert wird. Die, nach Ausintegrieren der Polymerfluktuationen erhaltene, effektive (durch sterische) Paarwechselwirkung entspricht der durch die topologischen Einschränkungen eingeführte Röhre. Dies erlaubt eine selbstkonsistente Berechnung der Stärke des Einsperrpotentials [50] und damit der mittleren Verschlaufungslänge $L_e \ll L_p$

$$L_e = \left(\frac{\alpha}{8}\right)^{-2/5} \cdot \rho^{-2/5} \cdot L_p^{1/5} \quad (1.8)$$

und den mittleren Röhrenradius $\langle R \rangle \ll L_e$

$$\langle R \rangle = (4\alpha)^{-3/5} \cdot \rho^{-3/5} \cdot L_p^{1/5}, \quad (1.9)$$

wobei $\alpha = 0,502$ ist.

Die Berechnung der Wechselwirkungen von Polymeren im Netzwerk beruht auf der Annahme, dass die Paarkollisionen entlang des Testpolymers unabhängig voneinander, also nicht korreliert, sind. Es wird angenommen, dass auf dieser Skala der Röhrenradius konstant ist. Basierend auf den Arbeiten von Glaser et al. kann die Röhrenradienverteilung $P(r)$ durch die analytische Approximation

$$P(r) = N \exp \left[-6,79 r^{-8/3} \right] r^{-8/3 \cdot 6,79 - 1} \quad (1.10)$$

beschrieben werden, wobei $N = 2,42958 \cdot 10^3$ die Normalisierungskonstante und $r = R/\langle R \rangle$ ist [48, 50]². Um die Verteilung $P(R)$ der Röhrenradien abzuschätzen, wird das aus der Paarkollision erhaltene Einsperrpotential über den Bereich des Testpolymers gemittelt, in dem (im Mittel) nur diese eine Kollision wirkt. Auf diese Weise erhielten Glaser et al. [48, 50] eine Segment-Fluid-Beschreibung, bestehend aus wechselwirkenden Polymerabschnitten mit einer Länge L_{Seg} , die dem mittleren Abstand der Kollisionen und damit der Verschlaufungslänge L_e entspricht.

²Die Gleichung 1.10 ist nach Kommunikation mit Marc Lämmel (Arbeitsgruppe Prof. Kroy, Universität Leipzig) hier korrigiert dargestellt.

1.4 Nematische Ordnung in Polymeren

1.4.1 Einführung in die Physik der Flüssigkristalle

In der Natur existieren Substanzen, welche gleichzeitig mechanische Eigenschaften sowohl eines Festkörpers als auch einer Flüssigkeit aufweisen. Diese Materialien werden als Flüssigkristalle bezeichnet [26]. In einem Festkörperkristall sind die Molekülgruppen regelmäßig angeordnet, wobei die Schwerpunktlage der Moleküle theoretisch durch ein Punktgitter beschrieben werden kann. Kristalle weisen eine Fernordnung auf, welche in Experimenten mittels Röntgenbeugung durch schmale Reflektionsmaxima nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu sind die reflektierten Intensitätsverteilungen bei Röntgenbeugung an Flüssigkeiten sehr breit, da die Moleküle in diesen keine Fernordnung haben.

Insgesamt existiert eine Vielzahl an unterschiedlichen, flüssigkristallinen Phasen [26]. Im Folgenden wird die so genannte nematische Phase näher erläutert (siehe Abbildung 1.9). Nematische Kristalle werden bevorzugt von länglichen Molekülen oder helikalen Makromolekülen gebildet, wie Desoxyribonukleinsäure (kurz DNA), aromatische Polyamide u.v.m. [26, 120]. Die folgenden Hauptmerkmale charakterisieren einen Nematen [26]:

1. Die Schwerpunktpositionen benachbarter Moleküle sind unkorreliert, so dass diese keine Fernordnung aufweisen.
2. Die längsten Achsen der Moleküle im Nematen richten sich alle parallel zueinander aus. Diese Richtung, in welche sich die Filamente ausrichten, wird nematischer Direktor \vec{n} genannt.
3. Die Vorzugsrichtung im Raum ist willkürlich, kann jedoch durch Kräfte vorgegeben werden.
4. Die Zustände \vec{n} und $-\vec{n}$ sind ununterscheidbar.
5. Zudem können nur solche Substanzen nematische Phasen ausbilden, deren Moleküle identisch zu ihrem Spiegelbild aufgebaut sind.

Im Hinblick auf Scherkräfte ist zum dritten Punkt hinzuzufügen, dass sich der nematische Direktor innerhalb eines kleinen Winkelbereichs in Richtung der wirkenden Scherkraft ausrichtet (vgl. Abschnitt 1.4.3) [86].

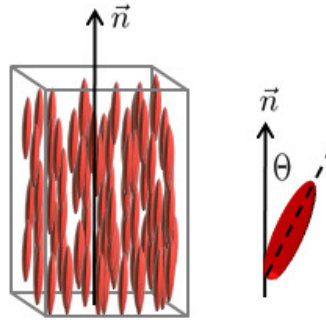


Abbildung 1.9: Darstellung der nematischen Phasen in einem Flüssigkristall. \vec{n} wird nematischer Direktor genannt. Der Winkel θ wird von dem nematischen Direktor \vec{n} und der längsten Molekülachse eingeschlossen.

Um den Ordnungsgrad in der nematischen Phase bestimmen zu können, wurde der Ordnungsparameter für steife Stäbchen definiert [26]:

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2(\theta) - 1 \rangle, \quad (1.11)$$

wobei der Winkel θ von dem nematischen Direktor \vec{n} und der längsten Molekülachse eingeschlossen wird (vgl. Abbildung 1.9). In der nematischen Phase sind alle Moleküle parallel zum nematischen Direktor ausgerichtet, so dass die längste Molekülachse mit dem nematischen Direktor einen Winkel von $\theta = 0$ oder $\theta = \pi$ einschließt und der Ordnungsparameter $S = 1$ wird. Wenn die Moleküle gleichverteilt in jeder Raumrichtung liegen, so ist der Zustand isotrop und der Ordnungsparameter wird $S = 0$.

1.4.2 Statistische Physik zur Beschreibung der nematischen Ordnung in Flüssigkristallen

Eine der wichtigsten statistischen Theorien zur Beschreibung der Orientierung in Flüssigkristallen ist die Onsager-Theorie [101]. Mit Hilfe dieser kann der isotrop-nematische Phasenübergang für lange, steife Stäbchen in halbverdünnten Lösungen erklärt werden. Die statistische Mechanik zu nematischen Phasen ist aufgrund der Komplexität nach wie vor ein wichtiges Forschungsthema [149]. Die Onsager-Theorie wird im Folgenden vorgestellt. Gegeben seien N stabförmige Makromoleküle der Länge L und mit Durchmesser d gelöst in einem Volumen V . Dabei gelten die folgenden Annahmen [26]:

- Aufgrund des ausgeschlossenen Volumens können sich die Stäbchen nicht durchdringen. Die einzige auf die Stäbchen wirkende Kraft ist die sterische Abstoßung (siehe Abbildung 1.10).

- Der Volumenanteil der Stäbchen in Lösung beträgt $\phi = \pi c L d^2 / 4$, wobei $c = N/V$ die Konzentration ist.
- Die Stäbchen sind wesentlich länger als die Abmessung des Durchmessers: $L \gg d$.

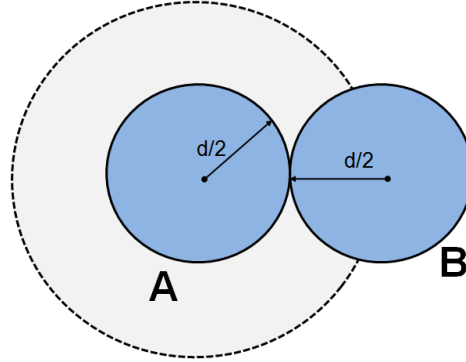


Abbildung 1.10: Darstellung des ausgeschlossenen Volumens: Da sich die Kugeln A und B nicht durchdringen können, ist der Raum von Kugel A nicht für das Zentrum der Kugel B erreichbar. Bild modifiziert nach [132].

Die Freie Energie kann mittels der Konzentration $c = N/V$, der Orientierungsentropie ΔS_{or} und dem Virialkoeffizienten B_2 folgendermaßen durch die Virialentwicklung angenähert werden [100]:

$$F = F_0 + Nk_B T [\ln(c) + \Delta S_{or} + B_2 c]. \quad (1.12)$$

Dabei ist $k_B T$ die thermische Energie und F_0 eine additive Konstante. Mit Einführung der Orientierungsverteilungsfunktion (engl. orientational distribution function, kurz ODF) $f(\vec{n})$ gilt, dass $c f(\vec{n}) d\Omega_n$ die Anzahl an Stäbchen pro Einheitsvolumen ist, die im Raumwinkelbereich von $d\Omega_n$ alle in Richtungen \vec{n} liegen, wobei die Normierung $\int f(\vec{n}) d\Omega = 1$ gilt [120]. Nach Onsager wird die freie Energie durch die Summe folgendermaßen angenähert:

$$F = F_0 + Nk_B T \left[\ln(c) + \int f(\vec{n}) \ln(4\pi f(\vec{n})) d\Omega_n + \frac{1}{2} c \int f(\vec{n}_1) f(\vec{n}_2) B(\gamma) d\Omega_{n_1} d\Omega_{n_2} \right]. \quad (1.13)$$

Der erste Term beschreibt den Anteil der translatorischen Bewegung. Der zweite Term entspricht dem Verlust der Orientierungsentropie ΔS_{or} in der nematischen Phase verglichen zur isotropen Phase. Der dritte Term beschreibt den Anteil, der durch den Effekt des ausgeschlossenen Volumens resultiert. Aus der Virialentwicklung folgt für den Koeffizienten $B_2(\gamma) = 2L^2 d \sin(\gamma)$, wobei γ der Winkel zwischen zwei Stäbchen ist. Wenn nur sterische Abstoßungskräfte wirken, verteilen sich die Stäbchen isotrop und das ausgeschlossene Volumen wird maximal. Ist allerdings die im Volumen gelöste Konzentration an

Stäbchen größer als ein Schwellwert c_0 , dann wird das ausgeschlossene Volumen dadurch minimiert, dass sich die Stäbchen parallel anordnen, und sich so die Translationsentropie erhöht. Die Gleichgewichtsverteilungsfunktion $f(\vec{n})$ folgt aus der Minimierung der freien Energie beschrieben durch Gl. 1.13, wofür Onsager diese Ansatzfunktion einsetzte [100]:

$$f(\theta) = \frac{a}{4\pi \sinh a} \cosh(a \cos(\theta)). \quad (1.14)$$

Dabei ist θ der Winkel, der von einem Teststäbchen und dem nematischen Direktor eingeschlossen wird und a der Variationsparameter, der so angepasst wird, dass die Freie Energie minimal wird. Demzufolge ist die isotrope Phase durch $a = 0$ und $f = \pi/4$ und die nematische Phase durch $a \gg 1$ und $f(\theta) \propto \exp(a\theta^2/2)$ gekennzeichnet. Somit ergibt sich für den Ordnungsparameter

$$S = \frac{1}{2} \int f(\theta) (3 \cos^2(\theta) - 1) \sin(\theta) d\theta. \quad (1.15)$$

Von Flory wurde zuerst erkannt, dass auch semiflexible Makromoleküle eine Ordnung analog der eines Flüssigkristalls aufweisen können [42]. Khoklov, Semenov und Odijk erweiterten die Onsager-Theorie auf semiflexible Makromoleküle [75, 100].

1.4.3 Induzierte Ausrichtung von Aktinfilamenten

Experimentell konnten mittels Doppelbrechung, Fluoreszenzmikroskopie und Kleinwinkelröntgenstreuung die isotropen und nematischen Zustände sowie deren Phasenübergänge an *in vitro* polymerisierten Aktinfilamenten untersucht werden [5, 124, 135, 46, 129]. Die Ergebnisse für die Schwellwertkonzentration c_0 , bei welcher der Phasenübergang einsetzt, unterscheiden sich in den Arbeiten und sind stark von der Probenpräparation abhängig, da der Übergang von der Aktinkonzentration und Filamentlänge abhängig ist. In der Arbeit von Furukawa et al. folgen Schwellwerte von $c_0 = 2 \text{ mg/ml}$ für Filamentlängen von $L = 4,9 \mu\text{m}$ und $c_0 > 3 \text{ mg/ml}$ für Filamentlängen von $L = 0,6 \mu\text{m}$. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Aktinfilamente sich ausrichten, wenn sie in einem nematischen Lösungsmittel, wie z.B. einer Lösung von nematisch angeordneten fd-Viren, gelöst werden [31]. Zudem wurde untersucht, dass die räumliche Begrenzung und der Einschluss durch die umgebenden Wände von Aktinfilamenten zur Ausrichtung dieser führt [78, 124, 5].

Des Weiteren können Aktinfilamente auch bei Konzentrationen unterhalb der kritischen Konzentration c_0 des Phasenübergangs ausgerichtet werden, indem Scherkräfte auf diese wirken. Dieser Effekt ist in Abbildung 1.11 skizziert. Zu sehen sind zwei Platten der Flä-

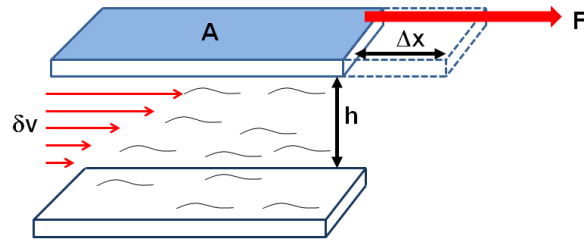


Abbildung 1.11: Erläuterung der Scherkraft: Durch die auf die obere Platte der Fläche A wirkende tangentielle Kraft, wird diese relativ zur unteren Platte bewegt, so dass sich im Medium zwischen den Platten ein Geschwindigkeitsgradient ausbildet.

che A im Abstand h , wobei die obere Platte relativ zur unteren Platte frei beweglich ist. Wirkt an der oberen Platte die Kraft F , so wird die obere Platte mit der Geschwindigkeit v relativ zu unteren Platte bewegt. Auf das zwischen den Platten befindliche Medium wirkt die Spannung

$$\tau = \frac{F}{A}. \quad (1.16)$$

Dadurch bildet sich ein Geschwindigkeitsgradient entlang der Höhe h aus, welcher die Scherrate

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial v}{\partial h} \quad (1.17)$$

definiert.

Das Verhältnis von Scherspannung zu Scherrate

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}, \quad (1.18)$$

wird dynamische Viskosität μ genannt. Flüssigkeiten, welche einen linearen Zusammenhang zwischen Scherrate und Scherspannung aufweisen, werden Newtonsche Flüssigkeiten genannt. Lösungen von verschlauften Aktinfilamenten, wie alle weiteren Polymerlösungen oberhalb der Überlapp-Konzentration weisen jedoch ein nicht-Newtonsches Fließverhalten auf [22, 32, 59, 91, 121].

Wenn das Medium aus einer Lösung von Aktinfilamenten besteht, so richten diese sich parallel zur wirkenden Scherkraft F aus, auch wenn die Aktinkonzentration kleiner als der Schwellwert c_0 ist [67, 20, 19, 57].

1.5 Polyelektrolyt-Effekte

1.5.1 Grundlagen der Polyelektrolyt-Effekte

Polymere, welche ionisierbare Gruppen aufweisen, werden Polyelektrolyte genannt. Durch Dissoziation dieser in polaren Medien tragen sie kovalent gebundene anionische oder kationische Gruppen. Durch die Anwesenheit gelöster Salze werden die Ladungen der ionischen Gruppen jedoch abgeschirmt oder sogar kompensiert. Dabei lagern sich an die Oberfläche des geladenen Makromoleküls entweder eine diffuse Gegenionatmosphäre oder Gegenionen an, welche die Ladung des Polymers abschirmen. Letztere sind an der Oberfläche lokalisiert. Dieser Effekt wird Gegenionkondensation genannt und ist besonders von der Form des Makromoleküls (Kugel, Ebene, Zylinder) abhängig [89, 90]. Die den Effekt beschreibende Theorie nach Manning basiert auf der Poisson-Boltzmann Gleichung, welche die elektrostatische Wechselwirkung eines frei beweglichen Ladungsträgers mit seinen Gegenionen beschreibt:

$$\Delta U = - \sum_{i=1}^n \frac{z_i e_0 c_i}{\epsilon_0 \epsilon} \exp\left(-\frac{z_i e_0 U(r)}{k_B T}\right), \quad (1.19)$$

wobei i ($i = 1, 2, 3 \dots n$) die Ionensorte mit Ladungszahl z_i nummeriert, c_i die Ionenkonzentration, $U(r)$ das Potential, $k_B T$ die thermische Energie, e_0 die Elementarladung ($e_0 = 1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ C}$) und ϵ_0 bzw. ϵ die Dielektrizitätskonstanten des Vakuums oder des Mediums sind ($\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \frac{\text{C}}{\text{Vm}}$) [115]. Dabei wird bildlich angenommen, dass jeder Ladungsträger von einer Atmosphäre an Gegenionen umgeben ist. Durch Anwendung der Debye-Hückel-Theorie, welche für kleine Konzentrationen und geringe Potentiale $z_i e_0 U(r) \ll k_B T$ gültig ist, kann die Gleichung 1.19 nach einer Taylorentwicklung der Exponentialfunktion gelöst werden, so dass für das Potential $U(r)$ des Ladungsträgers umgeben von Gegenionen folgt

$$U(r) \propto \frac{\exp(-\kappa r)}{r}. \quad (1.20)$$

Das Inverse der Abklinglänge κ

$$\frac{1}{\kappa} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{z_i^2 e_0^2 c_i}{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}} \quad (1.21)$$

wird Debye-Abschirmlänge genannt [115]. Obwohl die Debye-Hückel-Theorie nicht berücksichtigt, dass die effektive Oberflächenladung des Makromoleküls durch die diffuse Gegenionatmosphäre reduziert wird, behält die Theorie an Gültigkeit, da sie die Dichte

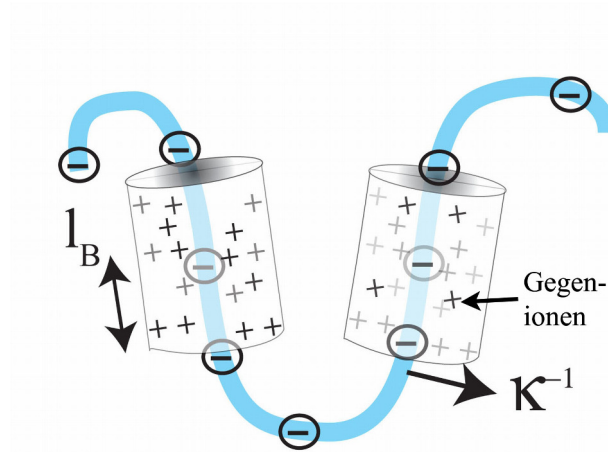


Abbildung 1.12: Darstellung der Gegenionatmosphäre um ein anionisches flexibles Makromolekül: Die elektrostatische Wechselwirkungsenergie nimmt mit der Debye-Länge κ^{-1} radial vom Zentrum des Polymers ab, wo sich die negativen Ladungen befinden. Die Bjerrum-Länge begrenzt den Bereich der Atmosphäre, welcher die Gegenionen enthält. Bild übernommen von [115].

der Gegenionkonzentration in der Atmosphäre um den Ladungsträger beschreibt, welche im Mittel genau eine Überschussladung enthält.

Eine weitere Länge, welche das Verhalten von Ionen in Polyelektrolytlösungen beschreibt, ist die Bjerrum-Länge

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon k_B T}. \quad (1.22)$$

Wenn sich zwei Ladungen im Abstand l_B befinden, so entspricht die thermische Energie gleich der elektrostatischen Energie. In Abbildung 1.12 ist ein flexibles Makromolekül dargestellt, welches von zwei Gegenionatmosphären umgeben ist. Der Bereich, in welchem sich Gegenionen anhäufen, wird durch l_B begrenzt. Das elektrostatische Wechselwirkungspotential zwischen der negativen Ladung auf dem Makromolekül mit den umliegenden positiven Gegenionen klingt mit der Debye-Länge κ^{-1} ab. Für lange Polymere hoher Ladungsdichte wurde die Debye-Hückel-Theorie nicht bestätigt, so dass Manning an der theoretischen Beschreibung weiter forschte [89]. Dabei wird das lange Polymer durch einen unendlich langen, dünnen Zylinder mit linearer Ladungsdichte $b = \frac{\text{Oberflächenladung}}{\text{Länge}}$ repräsentiert. Der Manning-Parameter ζ_M ist das Verhältnis zwischen der Bjerrum-Länge und dem linearen Ladungsabstand b für monovalente Ionen

$$\zeta_M = \frac{l_B}{b}. \quad (1.23)$$

Dabei werden zwei Fälle unterschieden:

- (I) $\zeta_M < 1$: Die Gegenionen können sich frei im Raum bewegen.
- (II) $\zeta_M > 1$: Die Gegenionen lokalisieren sich auf die Oberfläche oder zumindest in die Nähe der Ladungen entlang des Zylinders und kondensieren, was zur Folge hat, dass die gesamte Ladung des Zylinders erniedrigt wird.

Insgesamt kondensieren die Gegenionen folgenden Anteil der Polyelektrolytlösung

$$\Theta_M = \left(1 - \frac{1}{z\zeta_M}\right), \quad (1.24)$$

wobei z die Wertigkeit der Gegenionen ist.

1.5.2 Polyelektrolyt-Effekte von Aktinfilamenten

Wenn die globulären Untereinheiten des Aktins zu Filamenten polymerisieren, kommen sich die Ladungen so nah, dass Aktinfilamente von polyelektrolytischer Natur sind. Laut Manning können Aktinfilamente theoretisch durch einen dicken Zylinder beschrieben werden [90]. Durch diese Beschreibung wurde ein Wert $\zeta_{\text{krit.}}$ eingeführt, welcher durch die Wertigkeit der Gegenionen, die Debye-Länge κ^{-1} , der Ladungsdichte b und dem Filamentdurchmesser a folgendermaßen bestimmt wurde [90]:

$$\zeta_{\text{krit.}} = -1/z \cdot \ln(\kappa b) [\kappa a \cdot K_1(\kappa a)/K_0(\kappa a)]. \quad (1.25)$$

Dabei sind K_0 und K_1 modifizierte Besselfunktionen. Gemäß der Manning-Theorie findet Ladungskondensation genau dann statt, wenn $\zeta_{\text{krit.}} \leq \zeta_M$ ist. Unter physiologischen Pufferbedingungen beträgt der lineare Ladungsabstand ungefähr $b = 0,25$ nm [131]. Unter Standardbedingungen mit $\epsilon = 80$ für Wasser und $T = 20^\circ\text{C}$ ergibt sich eine Bjerrum-Länge von $l_B = 0,71$ nm. Daraus folgte, dass $\zeta_M = 2,8$ und $\zeta_{\text{krit.}} = 6,3/z$ ist [90]. Nach Abschätzung durch Manning können demnach monovalente Gegenionen nicht an Aktinfilamente kondensieren. Im Gegensatz dazu würden drei- oder vierwertige mit großer Wahrscheinlichkeit zur Gegenionkondensation führen. Nach Manning liegen zweiwertige Ionen an der Schwelle, bei welcher der Effekt der Kondensation auftreten kann [90].

Der Prozess der Aktinbündelung von *in vitro* polymerisierten Aktinfilamenten

Werden zum physiologischen Puffer multivalente Ionen, Aktin-bindende Proteine oder Polyamide hinzugefügt, die eine gewisse Schwellwertkonzentration übersteigen, so ordnen

sich Aktinfilamente zu Bündeln an [131, 147, 82, 16]. Da die Versuche in dieser Arbeit nur mit Magnesiumionen durchgeführt wurden, wird im weiteren Verlauf des Abschnitts nur auf die Beschreibung der Bündelung in Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen eingegangen.

Da Aktinfilamente im physiologischen Puffer mit $\text{pH} = 7$ negativ geladen sind, stoßen sie sich auf kurzen Reichweiten ab. Durch die Anwesenheit von Gegenionen wird die elektrische Abstoßung erniedrigt. Bei einer genügend hohen Konzentration an Gegenionen richten sich die Filamente parallel zueinander aus und kommen sich so nah, dass in ihrem Zwischenraum eine Atmosphäre aus Gegenionen vorhanden ist, welche an der Oberfläche der Filamente kondensieren und so eine effektive Anziehung zwischen beiden Filamenten verursachen [110, 103]. In Abbildung 1.13 ist eine solche Kondensation dargestellt. Die theoretische Erklärung für diese Anziehung wird nach wie vor erforscht. Nach Oosawa bedeutet die Kondensation von Gegenionen keineswegs eine Fixierung an die Filamente. Sie seien in axialer Richtung zwischen den Filamenten beweglich und können so Dichtefluktuationen erzeugen [102, 103]. Ein weiteres Modell zieht in Betracht, dass die Ionen dermaßen korreliert sind, dass sie ein Gitter bilden [123]. Angelini et al. konnten experimentell die Organisation von Gegenionen beobachten und zogen das Resultat, dass sich zwischen zwei Aktinfilamenten eindimensionale Dichtewellen ausbilden, welche mit einer Verdrehung der Filamente einhergehen [7, 8]. Die genauen Anteile von Fluktuationen der Gegenionen, Van-der-Waals-Kräfte etc., welche die Anziehung der Filamente erzeugen und somit die Bündelung begünstigen, sind noch nicht bekannt [41]. Tang et al. konnten zeigen, dass für eine Aktinkonzentration von $0,5 \text{ mg/ml}$ die Bündelungseffizienz von der Ordnungszahl abhängt. Sie zeigten, dass das Bündeln in Anwesenheit von Co^{2+} bei $5,5 \text{ mM}$ und von Mg^{2+} bei 27 mM einsetzt. Innerhalb weniger Minuten ist die Breite der Aktinbündel gesättigt, jedoch wachsen sie über einen längeren Zeitraum in der Länge heran [82].

Die Dynamik der Aktinbündelung sowie die Kräftebestimmung kurz vor und während der Bündelung sind demnach noch nicht verstanden und das Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten.

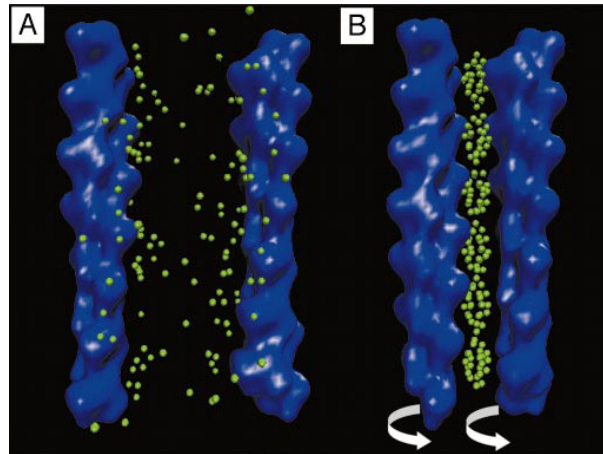


Abbildung 1.13: Darstellung der Gegenionkondensation und Anziehung zweier Aktinfilamente: In A sind zwei Filamente dargestellt, welche von Gegenionen umgeben sind. Da die Konzentration dieser gering ist, kondensieren keine Gegenionen und die Filamente sind im elektrostatischen Gleichgewicht. In B sind so viele Gegenionen vorhanden, dass diese an der Oberfläche der Aktinfilamente kondensieren und so die Oberflächenladung erniedrigen, was wiederum die Abstoßungskräfte vermindert. Zwischen beiden Filamenten wirkt eine effektive Anziehung, welche durch Anlagerung weiterer Filamente Aktinbündel bildet. Bild übernommen aus [7].

1.6 Motivation und Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Bestimmung der dynamischen Eigenschaften von Aktinfilamenten in halbverdünnten Lösungen ($c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml} - 0,4 \text{ mg/ml}$) in Abhängigkeit der Ordnung und Gegenionkonzentration. Dabei wurde der Fokus auf die Fluktuationsamplituden von Aktinfilamenten und somit auf die Lokalisationsröhre gelegt (vgl. Abschnitt 1.3.2). Da Phalloidin-stabilisierte Filamente Konturlängen von einigen μm aufweisen, sind sie sehr gut für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet.

In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits die Fluktuationen von Aktinfilamenten und die daraus resultierenden Röhrenradienverteilungen analysiert werden [84]. Die experimentellen Ergebnisse sind zwar in guter Übereinstimmung mit der Segment-Fluid Theorie, doch existiert bei der kleinsten gemessenen Konzentration $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ ein sehr auffälliger Unterschied zur Theorie. Darüber hinaus weicht der Fitparameter, welcher die Polymerlänge pro Volumen wiedergibt, vom erwarteten Wert um ein Sechsfaches ab [48]. Die Messungen der Röhrenradien wurden in Kapillaren durchgeführt. Die Resultate gaben erste Hinweise darauf, dass in diesen Kapillaren die Aktinfilamente entlang einer Vorzugsrichtung ausgerichtet wurden, was zu der Abweichung der Theorie von den Experimenten führen könnte [48]. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Filamentfluktuationen in isotropen Lösungen zu untersuchen und erneut die Theorie an die experimentell bestimmten

Röhrenradienverteilungen anzupassen. Für die Realisierung isotrop verteilter Filamente wurden die Aktinlösungen in makroskopischen Kammern untersucht. Durch Weiterentwicklung der Segment-Fluid-Theorie in der Arbeitsgruppe von Prof. Kroy (Universität Leipzig) wurde zudem die Ordnung der Filamente in der Anpassung der Theorie berücksichtigt.

Des Weiteren wurde die Ordnung in den Mikrokapillaren und der makroskopischen Kammer berechnet, um sicherzustellen, dass die Lokalisationsröhre unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen bezüglich der Ordnung in den Probengefäßen bestimmt wurde. Für den Nachweis, dass die Filamente sich in den Probengefäßen zum einen entlang einer Vorzugsrichtung und zum anderen isotrop verteilen, wurden für jede Aktinkonzentration Ordnungsparameter bestimmt. Mit Hilfe des kommerziellen Programms IMARIS wurden dazu die Filamentkoordinaten ermittelt und der Ordnungsparameter in drei Dimensionen berechnet. In bisherigen Forschungsarbeiten wurde die Orientierung und Dynamik von Aktinfilamenten von Mikroskopieaufnahmen in zwei Dimensionen bestimmt [5, 134, 31, 136]. Da die Konturlängen von Aktinfilamenten besonders vom Puffer, der Probenpräparation und der Aufreinigung abhängen, war für eine exakte Bestimmung der Längenverteilung, der Ordnung und der dynamischen Eigenschaften eine Analyse der Filamente in drei Dimensionen erforderlich. Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit aus Fluoreszenzaufnahmen von Aktinfilamenten deren Position in drei Dimensionen und anschließend ihre Ordnung im Raum zu bestimmen.

Weiterhin war ein Ziel dieser Arbeit die Lokalisationsröhre in zwei Kapillaren unterschiedlicher Größe zu bestimmen und den Einfluss der räumlichen Geometrie auf die Ordnung der Filamente abzuschätzen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass ein räumlicher Einschluss von Filamenten oder ein Scherfluss erheblichen Einfluss auf die mechanischen und dynamischen Eigenschaften haben kann [5, 124, 135]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Mikrokapillaren mehrfach in Experimenten zur Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten eingesetzt wurden [55, 147, 129]. Daher war in dieser Arbeit zusätzlich von Interesse den Krafteinfluss auf die Filamente abzuschätzen, die sich durch das Befüllen der Kapillare ergeben.

Durch die noch nicht vollständig verstandene Kationen-induzierte Bündelung von Aktinfilamenten motiviert, ist die Untersuchung an *in vitro* polymerisierten Aktinfilamenten stets von aktueller Bedeutung. Die Analyse des Polymernetzwerks in Abhängigkeit von Gegenionen und die effektiven Anziehungskräfte zwischen Filamenten sind von der Theorie noch nicht vollständig erfasst. Daher war es Ziel dieser Arbeit den Einfluss von schwachen, attraktiven Wechselwirkungen, die durch eine Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration im physiologischen Puffer induziert wurde, auf die Röhrenradienverteilung zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Aufreinigung der α -Aktin Isoform aus Kaninchenskelettmuskeln

Nach dem Protokoll von Spudich und Watt [126] wurde Aktin aus der Rücken- und Oberschenkelmuskulatur eines Kaninchens isoliert und in Form von Acetonpulver in Fraktionen zu je 10 g bei -20°C gelagert. Das Ansetzen des G- und 10xF-Puffers erfolgte analog zu den Arbeiten von Marta Romanowska und Dr. Inka Kirchenbüchler [112, 84], wobei in dieser Arbeit die Konzentration der Puffersubstanz Tris auf insgesamt 5 mM erhöht wurde. Die genauen Zusammensetzungen der Substanzen aller in dieser Arbeit verwendeten Puffer (G-Puffer, 10xF-Puffer und 10xF-Mg-Puffer) sind in Abschnitt 9.2 tabelliert.

Des Weiteren erfolgte die Aufreinigung des Aktins aus dem Acetonpulver nach einem leicht abgeänderten Protokoll von MacLean-Fletcher und Pollard bzw. von Pardee und Spudich [88, 106]. Sofern nicht explizit anders angegeben, fanden alle Arbeitsschritte im Kühlraum bei 4°C statt. Die erste Aufgabe bestand in der Extraktion des Aktins aus dem Acetonpulver. Dazu wurden 10 g des Pulvers mit 200 ml G-Puffer rehydriert¹ und für 30 min auf Eiswasser gerührt. Im Anschluss wurde die aufgequollene Aktinlösung für 20 min bei 4°C mit maximal 17700 g zentrifugiert. Der Überstand Ü1 wurde durch drei Lagen Verbandsmull in einen Erlenmeyerkolben gefiltert und das Sediment erneut mit 200 ml G-Puffer für 30 min auf Eiswasser gerührt. Die Zentrifugation wurde wiederholt und der Überstand mit frischem Verbandsmull durch drei Lagen zum Überstand Ü1 hinzugegeben, das Sediment jedoch wurde verworfen. Im Folgenden wurde der Überstand im Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur für 90 min polymerisiert, indem KCl und MgCl_2 hinzugefügt und auf Endkonzentrationen von $c_{\text{KCl}} = 50 \text{ mM}$ und $c_{\text{MgCl}_2} = 2 \text{ mM}$ gebracht wurden. Danach wurde die viskose Lösung für 15 min auf Eiswasser gerührt. Tropomyosin konnte dadurch von Aktin gelöst werden, dass langsam KCl ($c_{\text{KCl}} = 0,8 \text{ M}$) hinzugefügt und die Lösung weiterhin für 90 min auf Eiswasser gerührt wurde. Um das polymerisierte Aktin von übrigen Bestandteilen zu lösen, wurde die Lösung für 2 h bei 4°C mit maxi-

¹Dieser Puffer wurde für mindestens 15 min vorgekühlt.

mal 168000 g zentrifugiert. Das resultierende Sediment enthielt dabei das polymerisierte Aktin, da dieses ein höheres Molekulargewicht als die übrigen Bestandteile aufweist. Das Sediment wurde in G-Puffer resuspendiert, wobei das gesamte Volumen maximal 16 ml betrug. Nach Homogenisierung wurde die Lösung in Dialyseschläuche pipettiert und gegen 1 L G-Puffer für 36 h dialysiert. Nach jeweils 12 h fand ein Pufferaustausch statt.

Einen Tag vor der Aufreinigung wurde die FPLC (engl. Fast protein liquid chromatography) mit einer 20%-igen Ethanollösung für 24 h gereinigt und so die Säule bzw. das Säulenmaterial unter Druck gesetzt. Am Tag der Aufreinigung wurde mit der Äquilibrierung der Säule mit G-Puffer begonnen. Diese dauerte so lange an, bis sich ein stabiler Gleichgewichtswert der UV-Absorptionsintensität einstellte (nach ca. 37 h).

Frühestens 2 h nach dem letzten Pufferwechsel wurde die Lösung aus den Dialyseschläuchen für 2 h bei 4 °C mit maximal 103000 g zentrifugiert. Der gesamte Überstand, bis auf 0,5 cm über dem Sediment, wurde in ein Falcontube pipettiert und in der FPLC nach dem Größenausschlussprinzip aufgetrennt. Dabei geschieht die Auftrennung von großen Molekülen hin zu kleinen Molekülen in Fraktionsgefäße. Erfahrungsgemäß wurde nach 900 – 1200 min die Intensitätsspitze der UV-Absorptionslinie erreicht. Dieser Intensitätsverlauf gibt die relative Menge an Aktin in den unterschiedlichen Fraktionen an (vgl. Abbildung 2.1).

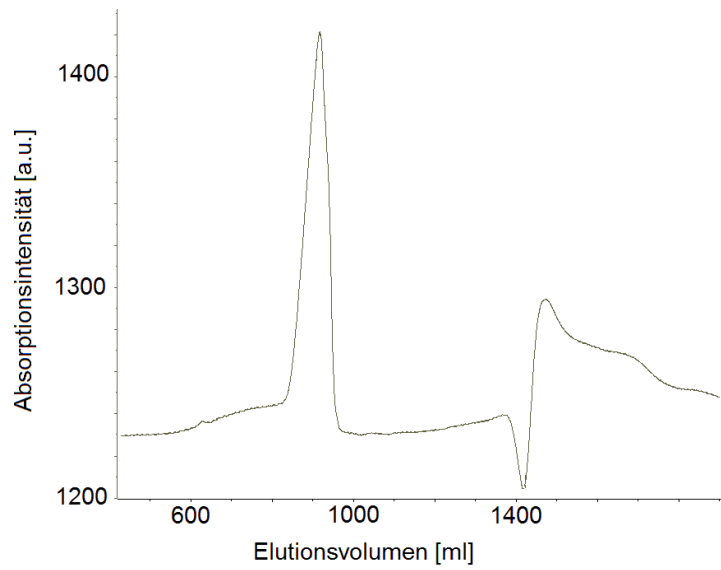
Für anschließende Versuche mit Aktinlösungen wurde die Fraktion mit dem höchsten Intensitätswert und eine Fraktion rechts vom Intensitätsmaximum bei größerem Elutionsvolumen gewählt. Die absolute Aktinkonzentration wurde am Nanodrop-Spektrometer bei $\lambda = 290$ nm wie folgt bestimmt:

$$c_{Aktin} = \frac{E}{\epsilon \cdot d}, \quad (2.1)$$

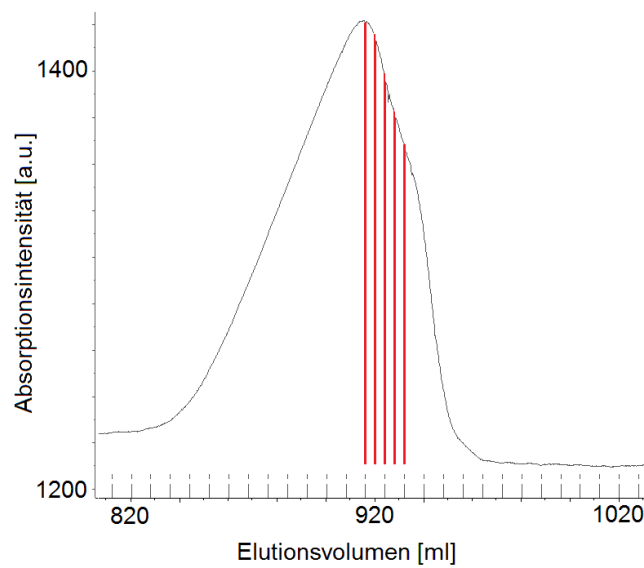
wobei E die gemessene Extinktion, $\epsilon = 0,617 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ der Extinktionskoeffizient [84] und $d = 0,1$ cm die Schichtdicke ist. Das fraktionierte Aktin wurde verschlossen in Fraktionsröhrchen im Kühlraum bei 4 °C für maximal 17 Tage gelagert.

2.2 Probenpräparation

Das aufgereinigte Aktin wurde in globulärer Form im G-Puffer gelagert. Nach Fraktionierung betrug die gesamte Aktinkonzentration ungefähr 8 mg/ml. Da alle Versuche an filamentösem Aktin und bei niedrigeren Konzentrationen als 8 mg/ml durchgeführt wurden, bestand die erste Aufgabe darin, die Aktinlösung mit G-Puffer auf die gewünschte Konzentration zu verdünnen und das G-Aktin zu F-Aktin mit F-Puffer zu polymeri-



(a)



(b)

Abbildung 2.1: Chromatographische Auflösung von Aktin: (a) Hier ist die aufgenommene Absorptionsintensität in Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom 30.06.2013 dargestellt. Das Intensitätsmaximum gibt das Elutionsvolumen wieder, bei welchem die Aktinlösung die höchste Reinheit und Konzentration enthält. (b) Hier ist die Intensitätsspitze vergrößert dargestellt. Der rot schraffierte Bereich gibt das Volumen an, welches für die Versuche verwendet wurde.

sieren. Um die Polymerisation des G-Aktins zu initiieren, wurden zweiwertige Ionen und ATP in Form des 10xF-Puffers zur Aktinlösung hinzugefügt²(vgl. Abschnitt 1.1.1). Die Menge des 10xF-Puffers in den Proben betrug dabei jeweils 10% des Probenvolumens, so dass bei Verdünnung auf eine bestimmte Aktinkonzentration das Volumen des 10xF-Puffers mitberücksichtigt wurde. Das Ansetzen der Lösungen fand im Kühlraum bei 4 ° statt und die Polymerisation bei Raumtemperatur. In den folgenden Abschnitten werden die Probenpräparationen für die verschiedenen Versuche erläutert. Die Proben wurden je nach Versuch in einer makroskopischen Kammer (engl. Lab-Tek Chamber) und/oder in Mikrokapillaren untersucht (vgl. Abschnitt 2.3).

2.2.1 Probenpräparation für Messungen der Lokalisationsröhre und der Orientierungsbestimmung in Kammer und Kapillare

Vor jeder Messung wurde jeweils 1 ml einer unmarkierten und 0,1 ml einer fluoreszenzmarkierten Aktinlösung im Kühlraum angesetzt und bei Raumtemperatur in 1 ml Reaktionsgefäßen polymerisiert. Die Filamente der letzteren Lösung wurden zuvor mit TRITC-Phalloidin im äquimolaren Verhältnis markiert (vgl. Abschnitt 2.7.2). Die Endkonzentration an Aktin wurde für diese Versuche zwischen $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ variiert. Nach einer Polymerisationszeit von 75 min wurde anschließend in einem dritten Reaktionsgefäß die unmarkierte und die fluoreszenzmarkierte Aktinlösung in einem Volumenverhältnis von 1000:1 gemischt, wobei für alle Arbeitsschritte die Pipettenspitzen abgeschnitten wurden [84].

2.2.2 Probenpräparation für Messungen der Lokalisationsröhre in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration

Ein Teilziel dieser Arbeit war die Aktinfluktuationen in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration zu bestimmen. Die Variation der Magnesiumionenkonzentration wurde dadurch erzielt, dass die Menge an MgCl_2 im Puffer geändert wurde. Dafür wurde ein dritter Puffer, der so genannte 10xF-Mg-Puffer, als Stocklösung angesetzt und in Aliquots bei -20°C gelagert. Dieser 10xF-Mg-Puffer enthielt die selben Substanzen wie der 10xF-Puffer, jedoch wurde in diesem die Konzentration an MgCl_2 um das 25-fache erhöht. Vor jedem Versuchstag wurden die F-Puffer frisch aufgetaut und sowohl ATP als auch DTT hinzugefügt. Aus einem Gemisch des 10xF-Puffers und 10xF-Mg-Puffers wurde schließlich

²Um ein stabiles Fluoreszenzsignal des Farbstoffes zu erhalten, wurde an jedem Versuchstag ein neuer, zuvor aliquotierter 10xF-Puffer aufgetaut.

die benötigte Konzentration an MgCl_2 eingestellt. Dieser Puffer wird im Folgenden mit einem (*) markiert und 10xF-Mg*-Puffer genannt.

Die markierte Aktinlösung wurde mit dem 10xF-Puffer und die unmarkierte Lösung mit dem 10xF-Mg*-Puffer polymerisiert. Die Proben wurden analog zu Abschnitt 2.2.1 präpariert und in die Kammer gefüllt. Die Endkonzentration an Aktin wurde für diese Versuche zwischen $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ variiert.

2.2.3 Probenpräparation für statische Lichtstremessungen

Die Versuche zur statischen Lichtstreuung wurden an Aktinlösungen mit $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ durchgeführt. Pro Aktinkonzentration wurde die Mg^{2+} -Konzentration zwischen $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ und $c_{\text{Mg}^{2+}} = 50 \text{ mM}$ im 10xF-Mg*-Puffer pro Messtag variiert. Analog zu Abschnitt 2.2.2 wurde eine 1 ml unmarkierte Aktinlösung mit 10xF-Mg*-Puffer polymerisiert. Die Aktinlösung, welche die gewünschte Menge an Mg^{2+} -Konzentration enthielt, wurde in einem 1 ml-Reaktionsgefäß angesetzt, mit einer Pipette vorsichtig vermischt und in eine Küvette mit einem Fassungsvermögen von 400 μl überführt. Die Küvette wurde verschlossen und die Aktinlösung für 12 h im Kühlraum bei 4°C polymerisiert, um Luftblasenbildung zu vermeiden.

2.2.4 Probenpräparation für Messungen der Oberflächenspannung

Für die Messung der Oberflächenspannung wurden unmarkierte Aktinlösungen mit $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ analog zu Abschnitt 2.2.1 in Reaktionsgefäßen zu je 3 ml angesetzt. Die Lösung wurde in einer flachen Lochschale mit Durchmesser $\varnothing = 35 \text{ mm}$ polymerisiert.

2.2.5 Probenpräparation für Messungen der Kapillarbefüllung

Für die Beobachtung der Kapillarbefüllung wurden unmarkierte Aktinlösungen zwischen $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ analog zu Abschnitt 2.2.1 in Reaktionsgefäßen angesetzt.

2.2.6 Probenpräparation zur Bestimmung der Punktspreizfunktion

Um die Punktspreizfunktion mittels lokalisierter, fluoreszierender Kugeln bestimmen zu können, wurde eine 0,8 %-ige Agaroselösung angesetzt. Diese Agaroselösung wurde in der

Mikrowelle erhitzt und für 30 s bei Raumtemperatur abgekühlt. Zuletzt wurden die Kugeln in dieser Lösung im Verhältnis 1 : 10^4 vermischt und in die Kammern und Kapillaren überführt.

2.3 Probengefäße

In dieser Arbeit wurden die Aktinlösungen in zwei unterschiedlichen Probengefäßen untersucht. Diese Probengefäße waren entweder makroskopische Kammern (engl. Lab-Tek Chamber, kurz LTC) oder Mikrokapillaren (vgl. Abbildung 2.2). Die Kammer ist 5 mm hoch und hat eine Grundfläche von 64 mm^2 . Von den Kapillaren wurden zwei unterschiedlicher Größe verwendet. Die in dieser Arbeit so genannte große Kapillare weist eine Höhe von $H_1 = 0,1\text{ mm}$, eine Weite von $W_1 = 2\text{ mm}$ und eine Länge von $L_1 = 50\text{ mm}$ auf. Die Abmessungen der kleinen Kapillare betragen $H_2 = 0,05\text{ mm}$, $W_2 = 1\text{ mm}$ und $L_2 = 50\text{ mm}$.

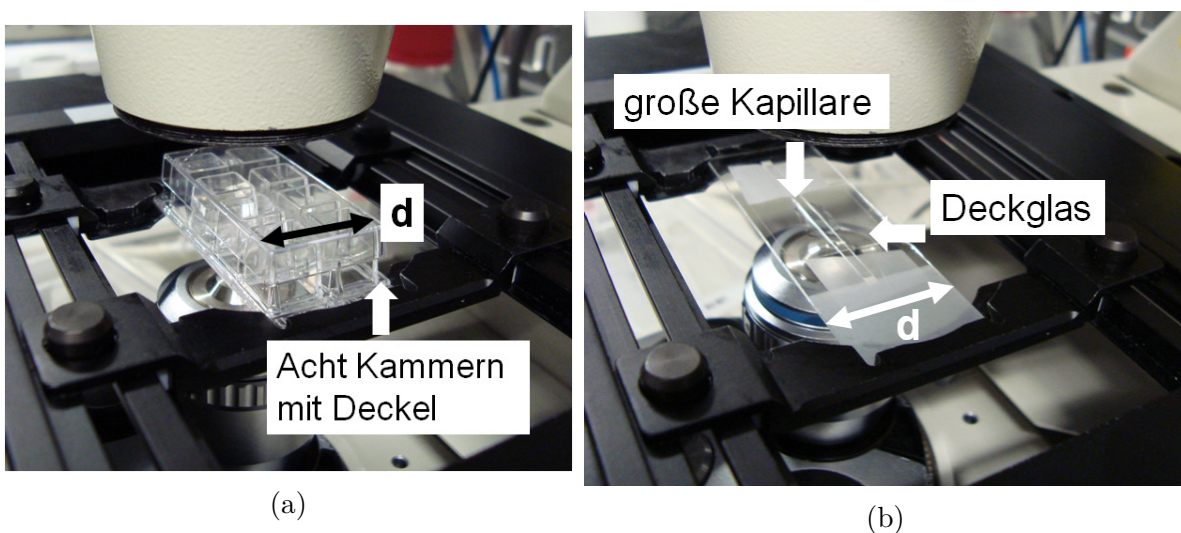


Abbildung 2.2: Abbildungen der Probengefäße, welche auf einem Mikroskopisch montiert sind. In (a) sind 8 Kammern dargestellt, welche mit einem Deckel bedeckt sind, um Verdunstung zu verhindern. Die Breite d beträgt $d = 21\text{ mm}$. In (b) ist eine große Kapillare dargestellt, welche auf einem Objektträger geklebt ist. Mit Öl ist ein Deckglas auf die Kapillare fixiert, um die Deckglasdickenkorrektur des Objektivs optimal auszunutzen. Die Breite d beträgt $d = 26\text{ mm}$.

Nach Polymerisation der Aktinlösungen (siehe Abschnitt 2.2) wurden die Probengefäße gefüllt.

Um die auf die Filamente wirkenden Kräfte so gering wie möglich zu halten, wurde die Spitze der verwendeten Pipette abgeschnitten. So langsam wie möglich wurde die polymerisierte Aktinlösung in die Pipette gesaugt und anschließend in die Kammer gefüllt. Dabei

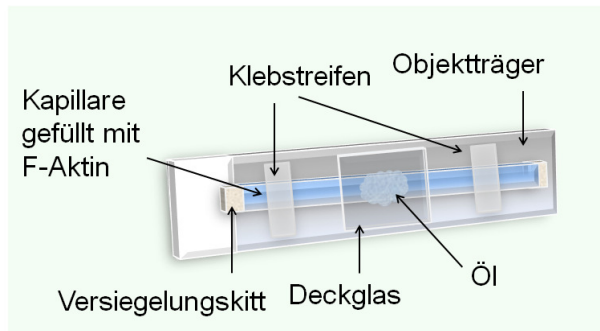


Abbildung 2.3: Erweiterung der Kapillarwand zur Deckglasdickenkorrektur. Dargestellt ist eine mit Versiegelungskitt verschlossene Kapillare, welche mit einem Klebstreifen auf einem Objektträger fixiert ist. Ein Tropfen Öl auf der Kapillare verbindet Kapillare und Deckglas optisch und vergrößert auf diese Weise künstlich die Kapillarwand zur optimalen Deckglasdickenkorrektur.

wurde die Kammer schräg gehalten. Die Lösung wurde langsam entlang der Kammerwand pipettiert, so dass die Füllung der Kammer langsam ablaufen und so der systematische Fehler durch die Präparation gering gehalten werden konnte. Nachdem die Kammer gefüllt war, äquilibrierte die Lösung 20 min vor der Messung. In Abbildung 2.2a ist die Kammer auf einem Objektträger dargestellt.

Die Kapillaren waren elektrostatisch aufgeladen, nachdem diese aus der Verpackung entnommen wurden. Daher wurden diese vor Benutzung zwischen 24 h und 48 h in ultrareinem, destilliertem Wasser gelagert und anschließend mit Stickstoff getrocknet. Jeweils eine Kapillare wurde in ein Reaktionsgefäß gestellt, in welchem sich die Aktinlösung befand. Durch Kapillarkräfte wurde diese mit Aktinlösung gefüllt (vgl. Abschnitt 5) und mit Hämatokrit-Versiegelungskitt verschlossen. Nach Säuberung der Kapillare wurde diese auf ein Objektträger fixiert.

Der Korrekturring des Objektivs kann auf Deckglasdicken zwischen 0,14 und 0,19 mm eingestellt werden. Da die Wände der Kapillaren jedoch dünner als 0,14 mm waren, wurden diese Wände unter Berücksichtigung der Brechungsindizes n_r künstlich erweitert (vgl. Abbildung 2.3). Dadurch konnte der Korrekturring am Objektiv und somit die Optik optimal eingestellt werden. Die Wanddicke der großen Kapillare ($n_r = 1,47$) betrug 0,1 mm und wurde mit einem Deckglas ($n_r = 1,52$) der Dicke 0,055 – 0,08 mm erweitert. Die Wanddicke der kleinen Kapillare ($n_r = 1,47$) betrug 0,05 mm und wurde mit einem Deckglas ($n_r = 1,52$) der Dicke 0,08 – 0,12 mm erweitert. Für die Fixierung der Deckgläser wurde auf die jeweilige Kapillare ein Tropfen Immersionsöl ($n_r = 1,52$) gegeben und so für Messungen am inversen, konfokalen Mikroskop die Oberflächenspannung zwischen Öl und Kapillarwand ausgenutzt. Nachdem die Kapillare gefüllt und zusammen mit einem Deckglas auf den Objektträger fixiert wurde, relaxierte die Lösung 20 min vor der Messung. In Abbildung 2.2b ist die große Kapillare mit fixiertem Deckglas auf einem Objektträger dargestellt.

2.4 Beobachtung der Kapillarbefüllung mit Aktinlösungen

Der Versuchsaufbau zur Aufnahme der Kapillarbefüllung ist in Abbildung 2.4 skizziert. Vor dem Versuch wurde auf dem Objektisch eines invertierten Mikroskops ein Objektträger befestigt. Die Kapillare wurde analog zu der Skizze 2.5 auf dem Objektträger fixiert. Die polymerisierte Aktinlösung (200 μl) wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vor die Kapillaröffnung pipettiert. Während der Messung durchleuchtete das Licht einer Quecksilberdampfampe die Kapillare. Die Bilder der Kapillare wurden durch ein Objektiv (Plan Neofluar, $2.5\times$) auf dem Bildsensor der sCMOS-Kamera abgebildet. Die in dieser Arbeit verwendete monochrome 16-bit sCMOS-Kamera weist eine Sensorgröße von $(16,6 \times 14) \text{ mm}^2$ auf und besteht aus einer Matrix mit 2560×2160 Pixeln. Die physikalische Pixelgröße beträgt $6,5 \mu\text{m}^2$. Um Randeffekte bei der Auswertung vernachlässigen zu können, wurde bei jeder Messung auf die Kapillarmitte fokussiert und dieser Bereich mit der Kamera aufgenommen. Das Sichtfeld war durch das Objektiv limitiert. Um Rechen- und Speicherauslastung zu minimieren, wurde somit der Pixelbereich auf 2560×1080 Pixel reduziert. Zudem wurden Signale aus je 2×2 Pixeln zusammengefasst und abgespeichert. Mit einer Bildrate von 90 Hz und einer Bestrahlungsdauer von 5 ms wurde eine Messung für insgesamt 20 s gestartet. Erst nach dem Start der Messung wurde F-Aktin vor die Kapillaröffnung pipettiert, so dass die Kapillarbefüllung im gesamten, ausgeleuchteten Sichtfeld aufgenommen werden konnte. Um Abbildungsfehler bei der Aufnahme des sich fortbewegenden Meniskus zu vermeiden, wurde der „Global Shutter“ verwendet, welcher die gleichzeitige Beleuchtung aller Pixel im ausgewählten Bereich ermöglicht.

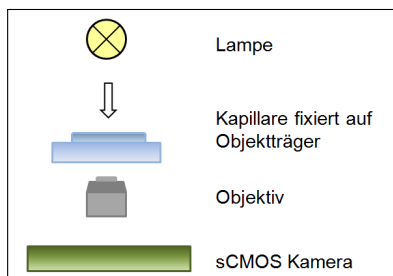


Abbildung 2.4: Skizzierung zum Versuchsaufbau der Kapillarbefüllung: Eine Lampe beleuchtet die auf dem Objektträger fixierte Kapillare. Das Durchlicht wird über das Objektiv vergrößert von der Kamera aufgenommen.

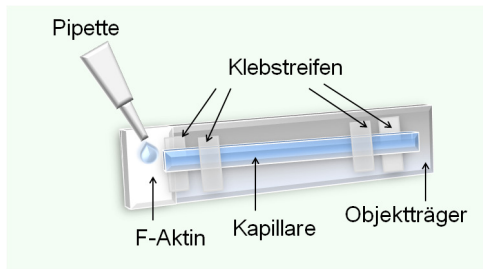


Abbildung 2.5: Präparation der Kapillare zur Beobachtung der Kapillarfällung. Die leere Kapillare wurde mit Klebstreifen auf einem Objektträger fixiert. Mit einer Pipette wurde das F-Aktin vor die Kapillaröffnung positioniert, so dass sich die Kapillare durch die Kapillarkräfte füllen konnte. Damit die Aktinlösung nicht unter die Kapillare fließen konnte, wurden unter die Kapillare zusätzlich Klebstreifen befestigt.

2.5 Messung der Oberflächenspannung mit der Wilhelmy-Platten-Methode

Die Oberflächenspannung von Aktinfilamenten wurde mit einem in unserem Institut (Nico Hampe, ICS-7) etabliertem Versuchsaufbau bestimmt. Die Schale mit polymerisiertem Aktin wurde auf eine Waage gestellt. Als Wilhelmy-Plättchen diente Filterpapier. Die Abmessungen sind in Tabelle 2.1 aufgelistet³. Vor Gebrauch der Filter wurden diese vollständig in die Aktinlösung getaucht, um geringste Aufnahmen der Lösung durch den Filter während der Messungen zu vermeiden. Dieser Filter wurde danach an einer Schnur befestigt, welche von einem motorisierten, linear beweglichen Verschiebetisch in vertikaler Richtung positioniert werden konnte. Die Ansteuerung des Verschiebetisches wurde von Georg Dreissen, ICS-7, mit MATLAB programmiert. Zunächst fand ein Nullabgleich der Waage über die Messung des Taragewichts der Schale inklusive Aktinlösung statt. Die Messung wurde gestartet und das Plättchen in vertikaler Richtung der Schale mit 2 mm/s verschoben. Zeitgleich wurde der Gewichtswert der Schale mit einer Rate von 6 Hz über eine serielle Schnittstelle an den Computer übertragen. Wenn der Filter die Oberfläche der Aktinlösung erreichte, benetzte die Lösung das Plättchen und das angezeigte Gewicht nahm ab. Nach 5 s wurde der Filter mit 2 mm/s vertikal von der Oberfläche der Aktinlösung herausgezogen. Aus Wägedifferenz ΔM kann mit Hilfe des Umfangs und der Gravitationsbeschleunigung die Oberflächenspannung γ folgendermaßen bestimmt werden (vgl. Abbildung 5.4) [1]:

$$\gamma = \frac{\Delta M \cdot g}{U}. \quad (2.2)$$

³Der systematische Fehler des Messschiebers beträgt $\sigma_{sys} = 0,03$ mm.

Tabelle 2.1: Filterabmessungen.

c_{Aktin} [mg/ml]	Filternummer	Dicke [mm]	Breite [mm]
0,2	1	0,33	9,16
	2	0,32	9,24
0,8	3	0,32	9,14
	4	0,32	9,26

2.6 Beobachtung der Bündelung von F-Aktin mittels Lichtstreuung

2.6.1 Einführung in die statische und dynamische Lichtstreuung

Die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie erfolgt durch Absorption und Streuung. Trifft elektromagnetische Strahlung auf Materie so werden durch das zeitlich veränderliche elektrische Feld die Elektronen des Streumaterials zu Schwingungen angeregt. Dadurch wird ein sich änderndes Dipolmoment $\vec{p} = \alpha \cdot \vec{E}$ induziert, wobei α die Polarisierbarkeit und \vec{E} die elektrische Feldstärke ist. Dieser Dipol emittiert wiederum Strahlung, welcher der Streustrahlung entspricht. Bleiben Frequenz und Phase nach Ablenkung der Primärstrahlung erhalten, dann ist die Streuung elastisch bzw. kohärent. Diese Art der Dipolstrahlung unterscheidet sich zur Ausgangsstrahlung nur in der Ausbreitungsrichtung, Intensität und eventuell in der Polarisation. Die Analyse der Intensitäts- und Richtungsabhängigkeiten wird in der statischen Lichtstreuung dazu verwendet Molmassen, Gyrationenradien oder auch den zweiten Virialkoeffizienten zu bestimmen [28, 151, 152, 58]. In Bezug auf Aktin konnte mit dieser Methode beispielsweise zum einen der Zeitverlauf der Polymerisation [141] und zum anderen die Bündelung von F-Aktin in Abhängigkeit von Gegenionen, Proteinen und Polymeren untersucht werden [131, 62]. Ist die Streustrahlung hingegen nicht in Phase mit der Ausgangsstrahlung und unterscheidet sich auch die Frequenz von derjenigen der Primärstrahlung, so wird dieser Streuprozess inelastisch oder auch inkohärent genannt. Der Unterschied in der Frequenz und Phase kann auf die Brownsche Molekularbewegung zurückgeführt werden. Da die Teilchen durch diese in der Lösung diffundieren, ist die Frequenz der Streustrahlung Doppler-verschoben. Die Analyse der Frequenzverteilung ist Aufgabe der dynamischen Lichtstreuung. Speziell für semiflexible Polymere wurde der Strukturfaktor von Kroy und Frey theoretisch hergeleitet, wodurch experimentell der Übergang der Filamentdynamik vom einzelnen Filament zum Ensemble erklärt werden konnte [81, 121].

2.6.2 Versuchsaufbau zur statischen Lichtstreuung

Eine Teilaufgabe dieser Arbeit war die Bestimmung der Konzentration an Gegenionen, bei welcher Aktinfilamente in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich von $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ bis $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ gerade noch nicht gebündelt haben. Die Analyse der Intensitätsabhängigkeit der Streustrahlung kann darüber Aufschluss geben, so dass hier die statische Lichtstreuung an Aktinlösungen in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration analysiert wurde. Da die Polarisierbarkeit von Aktinfilamenten durch einen Tensor 2. Stufe beschrieben wird, ist die Berechnung des elektrischen Feldes des Streulichts nicht trivial [81]. Daher wurde vereinfacht angenommen, dass die Aktinfilamente, aufgrund ihres geringen Durchmessers von $d = 8 \text{ nm}$ [52, 45, 60], das Rayleigh-Kriterium $d \leq \lambda/20$ erfüllen und die Streuintensität proportional zu d^6 ist [118].

Bisherige Forschungsergebnisse zeigen, dass Aktinfilamente mit $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ bei Magnesiumionenkonzentrationen von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 50 \text{ mM}$ mit großer Sicherheit Bündel gebildet haben [131]. Daher wurde diese Konzentration an Magnesiumionen als Startwert gewählt und mit jeder weiteren Messung $c_{\text{Mg}^{2+}}$ reduziert. Die Lichtstreuung wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer bei Raumtemperatur gemessen. In Abbildung 2.6 ist der Aufbau des Geräts skizziert. Als Lichtquelle diente eine 450W-Xenonlampe. Die Anregungswellenlänge konnte über zwei optische Gitter eingestellt werden, wobei hier $\lambda_{\text{anr}} = 500 \text{ nm}$ gewählt wurde. Die Küvette wurde nach einer Polymerisationszeit von 12 h im Kühlraum in das Spektrometer positioniert. Durch Variation der Spaltbreite konnte die Intensität der Ausgangsstrahlung reguliert werden. Die Spaltbreite betrug $0,70 \text{ nm}$ für Messungen bei $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $0,76 \text{ nm}$ bei $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$. In der Probenkammer traf die Strahlung auf die Aktinlösung und wurde an den Filamenten oder gegebenenfalls an den Bündeln gestreut. Die Streustrahlung wurde in einem Winkel von 90° zur einfallenden Strahlung durch einen Spalt in den Emissionsmonochromator geleitet. Die Streustrahlung

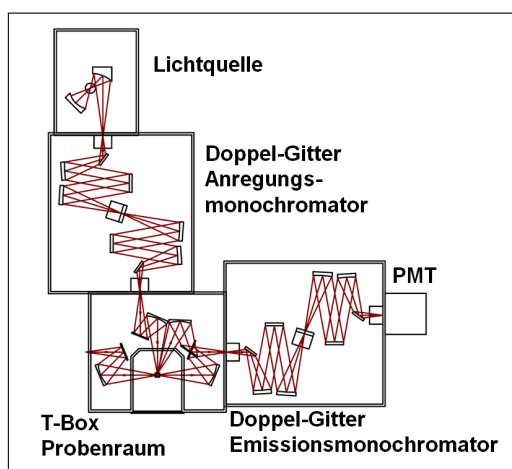


Abbildung 2.6: Aufbau des Spektrometers Fluorolog3 Model FL3-22. Eine Xenonlampe dient als Lichtquelle. Zwei optische Gitter spalten das Licht in die Spektralfarben auf, wobei die Strahlung der eingestellten Wellenlänge ($\lambda = 500 \text{ nm}$) auf die Blende gelenkt wird. Die Photonen treffen auf die Küvette und werden an den Aktinfilamenten gestreut. Die Streustrahlung wird durch einen Spalt auf weitere Gitter gelenkt und schließlich vom PMT detektiert. Bild modifiziert nach [61].

wurde von diesem Monochromator selektiert und durchlief einen Spalt bevor sie vom Photomultiplier (PMT) detektiert wurde. Die Spaltbreite wurde unter Berücksichtigung des Detektionslimits von 10^6 so eingestellt, dass ein maximales Streusignal detektiert werden konnte. Die Breite wurde bei $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ auf $0,70 \text{ nm}$ und bei $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ auf $0,74 \text{ nm}$ eingestellt.

2.7 Messung der Ordnung und der Lokalisationsröhre von F-Aktin am konfokalen Fluoreszenzmikroskop

2.7.1 Einführung in die konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Der Grundstein der Lichtmikroskopie wurde im Jahr 1873 durch Ernst Abbe gelegt, welcher aus dem Beugungsverhalten an Gittern das Auflösungsvermögen bestimmte [107]. Durch weitere großartige Forschungsarbeiten wurde im Jahr 1908 das erste Fluoreszenzmikroskop von Köhler und Siedentopf realisiert [113]. Ein großer Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass durch Markierung mit Fluorochromen spezifisch unterschiedlich ausgewählte Objekte innerhalb einer Probe untersucht werden können. Die Stokes-Verschiebung der Farbstoffmoleküle ermöglicht die Trennung von Anregungs- und Emissionsstrahlung mittels geeigneter Filtersätze [128]. Im Jahr 1957 wurde das erste konfokale Rastermikroskop (engl. Laser scanning microscope, kurz LSM) gebaut [77, 92]. Im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie kann durch diese Technik Streulicht unterdrückt, ein besserer Kontrast und eine Auflösung der Probe in drei Dimensionen erreicht werden [140]. Bei der konventionellen Mikroskopie erfolgt die Beleuchtung der gesamten Proben gleichzeitig, während idealerweise im konfokalen System von der Probe in der Fokusebene nur ein beugungsbegrenzter Punkt bestrahlt wird. Durch den Einsatz von Galvanometerspiegeln wird zeilenweise Bildpunkt für Bildpunkt in der Fokusebene abgerastert. Das konfokale System zeichnet sich nun durch die so genannte konfokale Blende (engl. Pinhole) aus, welche sich vor dem Detektor befindet. Durch diese Blende kann das Emissionslicht aus der Fokusebene den Detektor erreichen, was auch Tiefendiskriminierung genannt wird. Dadurch können optische Schnittebenen der Probe erzeugt werden, welche wiederum eine axiale Auflösung der Probe ermöglichen. Das Emissionslicht außerhalb der Fokusebene wird durch die Blende blockiert. Der konfokale Blendendurchmesser legt die konfokale Schichtdicke fest, welcher die Breite der Fokusebene in axialer Richtung bestimmt und somit den Anteil der Emissionsstrahlung außerhalb der Fokusebene

2.7 Messung der Ordnung und der Lokalisationsröhre von F-Aktin am konfokalen Fluoreszenzmikroskop

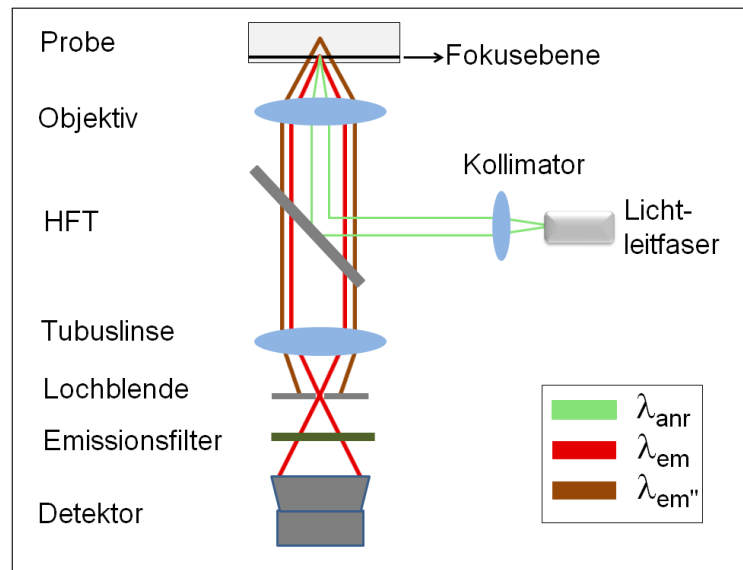


Abbildung 2.7: Strahlengang in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Die Anregungsstrahlung mit Wellenlänge des Lasers λ_{anr} wird durch den HFT von der Emissionsstrahlung getrennt. Nur das Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene mit der Wellenlänge λ_{em} kann durch die Lochblende hindurch detektiert werden. Die Strahlung, welche aus den Ebenen außerhalb der Fokusebene resultiert, ist mit λ_{em}'' gekennzeichnet. Diese wird nicht vom Detektor aufgenommen, so lange die Öffnung der Lochblende nicht weit genug geöffnet wird.

definiert.

Anhand Abbildung 2.7 wird im Folgenden detailliert das Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erläutert. Die Anregung der fluoreszenzmarkierten Probe erfolgt durch Laserstrahlung, welche über den dichroitischen Spiegel mit dem Objektiv auf das Präparat fokussiert wird. Das Emissionslicht ist zu längeren Wellenlängen verschoben. Durch die Wahl eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur kann ein großer Anteil des Fluoreszenzlichts zur Bildentstehung beitragen. Der dichroitische Spiegel ist ein Hauptfarbteiler (HFT), welcher nun das Anregungs- vom Emissionslicht trennt. Über einen weiteren Nebenfarbteiler, auch Sperrfilter genannt, können weitere Wellenlängen gefiltert werden, so dass nur die gewünschte Emissionswellenlänge detektiert wird. Durch die konfokale Lochblende wird nur das Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene detektiert. Das Licht außerhalb dieser kann die Blende nicht passieren und wird blockiert.

2.7.2 Einstellungen des konfokalen Fluoreszenzmikroskops

In dieser Arbeit wurde für alle Mikroskopieaufnahmen ein inverses, konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendet. Als abbildendes System diente das Objektiv C-Apochromat 63x/1.2 W Korr. Alle Experimente zu Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtempe-

ratur durchgeführt. Wie in Abschnitt 1.1.1 erläutert, dient Phalloidin zur Stabilisierung des F-Aktins. Die fluoreszierenden Derivate des Phalloidins oder auch TETRAMETHYL-RHODAMINE B ISOTHIOCYANATE (kurz TRITC-) Phalloidin werden zur Fluoreszenzmarkierung von Aktinfilamenten verwendet, wobei TRITC kovalent an Phalloidin gebunden ist [148, 80]. In dieser Arbeit werden die Aktinfilamente auch mit TRITC-Phalloidin markiert. Die Absorptionsmaxima dieses Farbstoffes liegen zwischen $\lambda_{\text{anr}} = 540 - 545 \text{ nm}$ und die der Emission zwischen $\lambda_{\text{em}} = 570 - 573 \text{ nm}$. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte mit einem HeNe-Laser, welcher bei $\lambda_{\text{anr}} = 543 \text{ nm}$ emittiert. Der Hauptfarbteiler trennte das Anregungs- vom Emissionslicht. Zusätzlich wurde die Emissionsstrahlung durch einen NebenfARBteiler gefiltert, wobei nur Wellenlängen größer als $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ vom Photomultiplier detektiert wurden. Aufgrund der Bindungskinetik und der damit verbundenen Dissoziation des Phalloidins vom Aktin nahm das Fluoreszenzsignal mit der Zeit ab bzw. es verschlechterte sich das Signal zu Rausch Verhältnis [4, 27]. Daher wurden alle fluoreszenzmarkierten Proben nach einer Polymerisationszeit von 1 h und einer Äquilibrierungszeit von 20 min für maximal zwei weitere Stunden mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Diese Zeitdauer ist ein empirischer Richtwert, der auch in anderen Arbeitsgruppen verwendet wurde [134].

Einstellungen zur Messung der Lokalisationsröhre

Die Versuche zur Messung der Aktinfilamentfluktuationen wurden entsprechend der Arbeit von Dr. Inka Kirchenbüchler (geb. Lauter) durchgeführt [84]. Die Fluktuationen wurden in der Mitte der Probengefäße (Kapillaren und Kammer) bestimmt und ausschließlich Filamente, die einen Mindestabstand zur Wand von $20 \mu\text{m}$ in der großen Kapillare und der Kammer sowie von $10 \mu\text{m}$ in der kleinen Kapillare aufwiesen, wurden aufgenommen. Zudem wurden nur Aktinfilamente berücksichtigt, welche sich vollständig im konfokalen Volumen befanden. Die Lochblende wurde soweit geöffnet, bis die konfokale Schichtdicke 2, 3 μm betrug. Unter Einhaltung des Nyquist-Abtasttheorems betrug die Pixelgröße $0,13 \times 0,13 \mu\text{m}^2$ [96, 107]. Von je einem Filament wurde eine Zeitserie von 150 s aufgenommen, wobei die Grauwerttiefe je Einzelbild 12 Bit, die Bildrate 1 s^{-1} und Belichtungsdauer 800 ms betrug. Eine Zeitserie ist eine Aufnahme eines Objekts zu unterschiedlichen Zeiten in gleichmäßigen Abständen.

Einstellungen zur Orientierungsmessung von Aktinfilamenten

Die Messung der Ordnung von Aktinfilamenten erfolgte analog zur Fluktuationmessung in der Mitte der Systeme und unter denselben Bedingungen bezüglich des Wandabstandes. Die konfokale Schichtdicke wurde soweit geschlossen, bis der Durchmesser in dem Mini-

mum des ersten Beugungsscheibchens (vgl. Abbildung 2.8) liegt, so dass nur Licht der Fokusebene den Detektor erreichen konnte. Für Messungen der Orientierung wurden keine Zeitserien, sondern dreidimensionale Volumina aufgenommen. Dieses konnte realisiert werden, indem Bildstapel aufgenommen wurden, welche aus einer Aneinanderreihung von xy-Ebenen in z-Richtung bestehen. Unter Einhaltung des Nyquist-Abtasttheorems betrug die Voxelgröße $0,13 \times 0,13 \times 0,49 \mu\text{m}^3$. Die gesamte Bildgröße in der Fokusebene betrug 676×676 Pixel. Die Anzahl der xy-Ebenen variierte, wobei der Ebenenabstand $0,49 \mu\text{m}$ betrug (vgl. Tabelle 2.2). Die minimale Ebenenanzahl $\min(N_{\text{Ebene}})$ war 34 und entspricht $17 \mu\text{m}$, und damit mindestens der Persistenzlänge der stabilisierten Aktinfilamente. Die Grauertiefe je Einzelbild betrug 12 Bit und die Belichtungsdauer 600 ms.

Tabelle 2.2: Auflistung der Ebenenanzahl in allen Probengefäßen. \tilde{n} ist die Anzahl der Bildstapel pro Aktinkonzentration je Probengefäß; $\langle N_{\text{Ebene}} \rangle$ ist die mittlere Anzahl der xy-Ebenen, die aufgenommen wurden bzw. die mittlere Ebenenanzahl, aus welcher die Bildstapel bestehen; $\sigma_{N_{\text{Ebene}}}$ ist die Standardabweichung der Ebenenanzahl; $\min(N_{\text{Ebene}})$ ist die minimale Ebenenanzahl, die ausgewertet wurde.

Probengefäß	c [mg/ml]	\tilde{n}	$\langle N_{\text{Ebene}} \rangle$	$\sigma_{N_{\text{Ebene}}}$	$\min(N_{\text{Ebene}})$
Kammer	0,2	11	98	35	60
	0,4	6	87	21	50
	0,6	8	99	36	55
	0,8	6	87	14	71
große Kapillare	0,2	10	108	26	81
	0,4	13	100	27	60
	0,6	8	99	18	82
	0,8	6	57	21	34
kleine Kapillare	0,4	7	74	25	34
	0,6	6	70	14	42

2.7.3 Einstellungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop zur Messung der Punktspreizfunktion (PSF)

Die Probengefäße wurden analog zur Füllung mit Aktinlösung (vgl. Abschnitt 2.3) mit der Agarose-Kugel-Mischung gefüllt. Die Einstellungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop entsprechen den selben Einstellungen wie in Abschnitt 2.7.2 zur Messung der Lokalisationsröhre. Von den fluoreszierenden Kugeln wurden Bildstapel aufgenommen, wobei die Voxelgröße $(40 \times 40 \times 90) \text{ nm}^3$ betrug. Zu jeder Kugel wurden 81 xy-Ebenen gespeichert, so dass die gesamte Kugel abgebildet werden konnte.

2.7.4 Bestimmung der Linienspreizfunktion (LSF)

In Abbildung 2.8 ist das Bild einer fluoreszierenden Kugel dargestellt, welches wie im Abschnitt 2.7.3 beschrieben, aufgenommen wurde. Ein optisches System kann die Kugel nicht ideal, sondern nur verwaschen abbilden. Das Zentrum der 3-dim. PSF in der Fokusebene ist kreisförmig und entspricht dem Airy-Scheibchen. Senkrecht zu dieser xy-Ebene ist das Zentrum ellipsenförmig. Da der Durchmesser von Aktinfilamenten kleiner als das optische Auflösungsvermögen $d = 0,51 \cdot \frac{\lambda}{NA} = 0,51 \cdot \frac{543 \text{ nm}}{1,2} \approx 231 \text{ nm}$ ist, sind die Bilder der Objekte, hier der Aktinfilamente, verwaschen. Die Filamente sind keine Punktobjekte, sondern Objekte, die aus aneinandergereihten Punkten zusammengesetzt sind. Daher ist das Bild eines Filaments nicht mit der PSF, sondern mit der so genannten Linienspreizfunktion, kurz LSF, verbreitert. Die LSF ist das Abbild einer Linie und entspricht einer Aneinanderreihung mehrerer PSF, deren Ausläufer der Intensitätsverteilungen überlappen. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Die Intensitätsverteilung senkrecht zu dieser Linie wird LSF genannt. Mathematisch gesehen ist die LSF eine Faltung der PSF f in der Fokusebene mit einer Linie l und zwar $(f \otimes l)(x') = \int_{-\infty}^{\infty} f(x)l(x' - x)dx$.

Die PSF wurde regelmäßig zu den Versuchen aufgenommen und mit einer Linie in x-Richtung gefaltet. Die Intensitätsverteilung der PSF und LSF in der Fokusebene können durch eine Gauß-Verteilung $\phi(x)$ angenähert werden. Die Standardabweichung der Gauß-Anpassung definiert analog zu Abschnitt 2.8 die Abmessung der LSF. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Da die Aktinfilamente mit der LSF verbreitert sind, müssen die Röhrenradien $\langle r \rangle$ (vgl. Abschnitt 2.8) um die Abmessung der LSF $\langle r_{\text{LSF}} \rangle$ korrigiert werden. Da die Gaußfunktion gegenüber Faltungen invariant ist, kann mit Hilfe der charakteristischen Funktion $\phi_x(t)$ ⁴ die Gauß-Verteilung $\phi(x)$ berechnet werden, dass für die korrigierten Röhrenradien gilt:

$$\phi_x(t) = \phi_y(t) \cdot \phi_z(t) = e^{-\frac{1}{2}(r_{\text{korrr}}^2 + r_{\text{LSF}}^2)t^2} = e^{-\frac{1}{2}r^2t^2}, \quad (2.3)$$

wobei r_{korrr} der korrigierte Röhrenradius⁵, r_{LSF} die Breite der LSF und r der gemessene Röhrenradius sind. Somit folgt

$$\langle r_{\text{korrr}} \rangle = \sqrt{\langle r \rangle^2 - \langle r_{\text{LSF}} \rangle^2}. \quad (2.4)$$

⁴Die charakteristische Funktion entspricht der Fouriertransformierten der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion.

⁵Bei einer Messung der Aktinfilamente ohne Verbreiterung ergäbe sich dieser Werte direkt.

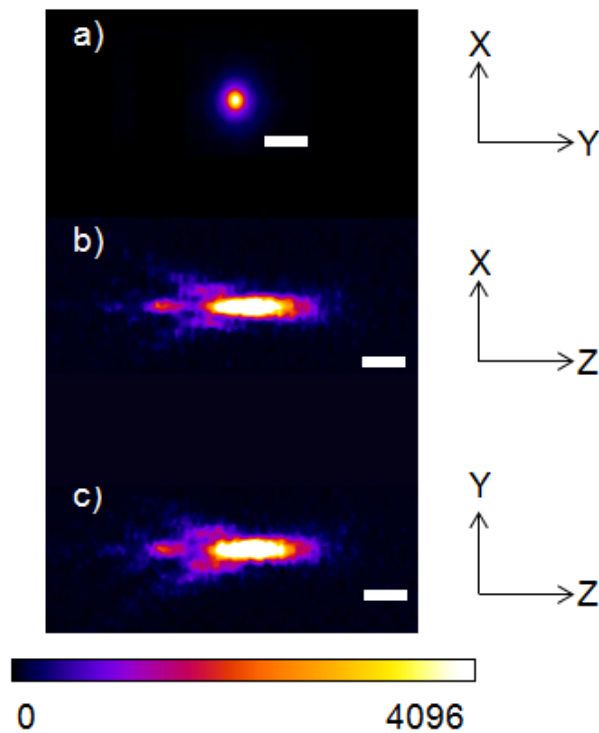


Abbildung 2.8: Darstellung der PSF: in (a) ist die 3-dim PSF in die xy-Ebene projiziert. Das Zentrum wird auch Airy-Scheibchen genannt; Maßstab = $1\ \mu\text{m}$; in (b) ist der Querschnitt der 3-dim. PSF in der xz-Ebene und in (c) in der yz-Ebene dargestellt. Das Zentrum ist ellipsenförmig. In (b) und (c) ist befindet sich das Deckglas auf der linken Seite; Maßstab = $1\ \mu\text{m}$.

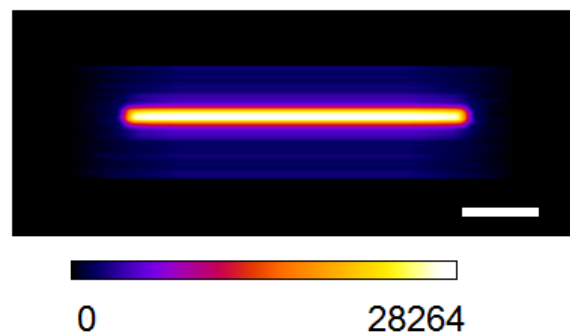


Abbildung 2.9: Darstellung der LSF: Die Faltung einer Linie mit der PSF in der xy-Ebene ergibt eine verbreiterte Linie, die LSF; (Falschfarbendarstellung) Maßstab = $2\ \mu\text{m}$.

Tabelle 2.3: Mittlere Abmessungen der LSF: Hier sind die Mittelwerte $\langle r_{LSF} \rangle$ der Intensitätsverteilungen, die Standardabweichungen $\sigma_{r_{LSF}}$ der LSF sowie die Anzahl fluoreszierender Kugeln N_{Kugel} aufgelistet.

Probengefäß	$\langle r_{LSF} \rangle$ [nm]	$\sigma_{r_{LSF}}$ [nm]	N_{Kugel}
große Kapillare	128	7	11
	121	11	20
kleine Kapillare	114	8	17
Kammer $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$	120	10	15
	117	4	20
Kammer $c_{\text{Mg}^{2+}} \geq 3 \text{ mM}$	123	11	10

2.8 Bestimmung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten

Die Lokalisationsröhre wurde in Abschnitt 1.2 eingeführt. Da die Röhre den freien Raum repräsentiert, in welchem ein Filament fluktuiert, wurden die Momentaufnahmen ausgewertet, welche den Fluktuationen des Filaments entsprechen. Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben betrug die Aktinkonzentration in dieser Arbeit zwischen $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ und die Bildrate, mit welcher die Aktinfluktuation aufgenommen wurde ungefähr 1 Hz. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass unter diesen Versuchsbedingungen bereits 30 Aufnahmen ausreichend wären, um die gesamte Röhre abzubilden [84]. Zudem zeigte sich in dieser Arbeit, dass unter Verwendung des 10xF-Mg*-Puffers, welcher eine im Vergleich zum 10xF-Puffer erhöhte Konzentration an MgCl_2 enthält, mindestens 50 Momentaufnahmen von den Filamenten die vollständige Röhre abbilden. Um ein erhöhtes Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erhalten, wurden für alle Fluktuationmessungen 150 Bilder je Filament aufgenommen, wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben ist. Die Einzelaufnahmen wurden gemittelt, um im Anschluss aus der Überlagerung aller 150 Bilder den Radius der Röhre bestimmen zu können (vgl. Abbildung 2.10).

Aktive Konturen zur Filamentkonturbestimmung

Um die Abmessungen der Röhre bestimmen zu können, wurde als Erstes die Kontur bestimmt. Dafür wurde von Dr. Norbert Kirchgeßner, ICS-7, ein Programm geschrieben, welches auf dem Prinzip der aktiven Kontur, auch Snake genannt, basiert [73]. Der aktiven Kontur wird eine Biege- und Dehnungselastizität und dem Graustufenbild ein Potential zugeordnet. Je besser die Kontur mit dem Objekt im Bild übereinstimmt, desto geringer ist die Energie. Die Anpassung der aktiven Kontur ist somit ein Energieminimierungsproblem. Im Bild wurden manuell Punkte eingezeichnet, welche als Startwerte

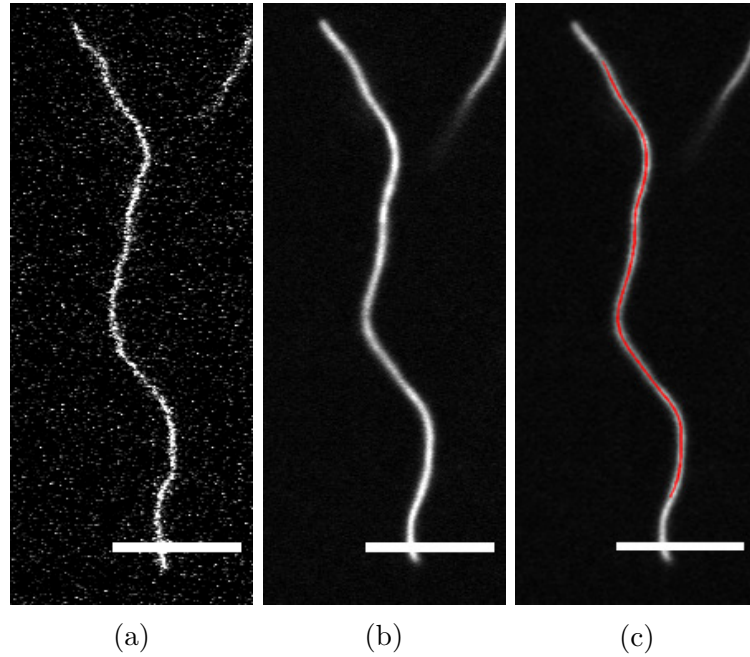


Abbildung 2.10: Einzelfilamentaufnahme und Darstellung der Lokalisationsröhre: In (a) ist eine Einzelaufnahme eines Aktinfilaments in der Kammer zu $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ dargestellt. In (b) ist die Überlagerung von 150 Bildern des in (a) gezeigten Filaments. Die Überlagerung gibt alle 150 Aktinkonfigurationen wieder, welche den Fluktuationen entsprechen und somit die Röhre bilden. In (c) ist die parametrisierte Kurve dargestellt, welche durch das Zentrum der Röhre verläuft. Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

für das Programm übergeben wurden. Die Energie musste den Anforderungen genügen, dass scharfe Kanten ausgeschlossen wurden, dass die Punkte auf der Kontur gleichverteilt generiert wurden und dass die Energie ein lokales Minimum an der Position des Objektes im Bild aufwies, demnach dort, wo die Intensität am höchsten war. Nach Ausführung des Programms für ein Bild, welches aus der Überlagerung der 150 Einzelaufnahmen bestand, wurde eine Punktabfolge im äquidistanten Abstand von 500 nm wiedergegeben, welche zentral auf der Lokalisationsröhre lag. Die Enden der Filamente unterlagen anderen topologischen Einschränkungen als diejenigen Abschnitte des restlichen Filaments. Zudem berücksichtigt das Röhrenmodell nur unendliche lange Filamente. Daher wurden für die weitere Auswertung die Enden der Punktabfolge auf der Röhre, ungefähr $2 \mu\text{m}$ pro Ende, nicht mitberücksichtigt.

Bestimmung der Lokalisationsröhrenradien

Die Bestimmung der Röhrenradien erfolgte analog zu der Arbeit von Dr. Inka Kirchenbühler [84]. Die durch die aktive Kontur erhaltene Punktabfolge wurde mit einer approximierten Spline vierten Grades mit einer Bogenlänge s parametrisiert. Dabei wurde der

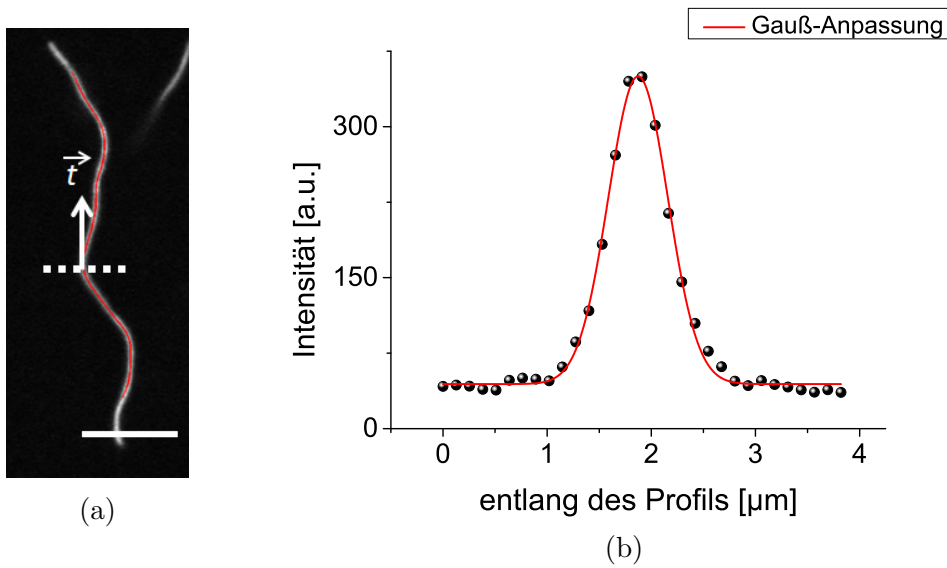


Abbildung 2.11: Bestimmung der Röhrenradien: Gaußanpassung entlang der Filamentkontur. In (a) ist die Lokalisationsröhre und parametrisierte Kurve $f(s)$ gezeigt. Zudem ist eine Tangente an $f(s)$ gezeichnet. Senkrecht zu dieser Tangente ist eine gestrichelte Linie markiert. Entlang dieser Linie bzw. entlang dieses Profils wird an das Intensitätsprofil eine Gaußfunktion angepasst; Maßstab = $10\ \mu\text{m}$. In (b) ist das Intensitätsprofil und die Anpassung der Gaußfunktion gezeigt. Der Radius der Lokalisationsröhre ist definiert über die Standardabweichung und wird Röhrenradius r genannt. Der Radius der Röhre entlang dieses Profils beträgt $r = 0,28\ \mu\text{m}$.

Spline so angenähert, dass die Polynome sich im Abstand von ca. $2\ \mu\text{m}$ in den Knotenpunkten berühren. Die resultierende, parametrisierte Kurve $f(s)$ ist in Abbildung 2.10c dargestellt und liegt genau in der Mitte der Lokalisationsröhre. Senkrecht zu den Tangenten von $f(s)$ wurde der Radius der Lokalisationsröhre bestimmt. Die optische Auflösung beträgt $130\ \text{nm}$. Unter Einhaltung des Nyquist-Abtasttheorems wurde alle halbe Pixel ($65\ \text{nm}$) entlang der Röhre an das Intensitätsprofil senkrecht zu den Tangenten (entlang der Röhrenkontur) eine Gaußfunktion angepasst. Die Standardabweichung der Gaußfunktion definiert den Radius der Lokalisationsröhre, den so genannten Röhrenradius r :

$$f(x) \propto \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{(x - x_{max})}{r}\right)^2\right). \quad (2.5)$$

2.9 Bestimmung und Definition des Ordnungsparameters

In Abschnitt 2.7 wurde die Aufnahmetechnik von dreidimensionalen Bildstapeln beschrieben. Ein Teilziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Filamentordnung in diesen Bildstapeln. Die Ordnung wird durch den Ordnungsparameter quantifiziert (vgl. Abschnitt 1.4). Um diesen Ordnungsparameter auswerten zu können, mussten zuvor die Koordinaten der Filamente im Bildstapel bestimmt werden. Daher wird in diesem Abschnitt erklärt, wie zunächst die Filamentkoordinaten der Bildstapel ermittelt wurden. Darauf folgend wird anhand eines exemplarischen Bildstapels schrittweise erläutert, wie der Ordnungsparameter berechnet wird. Die Analysemethode des Ordnungsparameters ist in Zusammenarbeit mit Dr. Ronald Springer entwickelt worden.

2.9.1 Bestimmung von Filamentkoordinaten und deren Abstände mit dem kommerziellen Programm Imaris

Die erste Herausforderung war, die Koordinaten der Filamente im Bildstapel zu bestimmen. Dafür wurde jeder Bildstapel nacheinander analysiert. Zuerst wurden die Grauwertübergänge der Bildstapel mit einem Medianfilter mit $3 \times 3 \times 1$ Filterkern mit dem Bildverarbeitungsprogramm FIJI geglättet und anschließend in dem Programm IMARIS 7.6.4 weiter bearbeitet⁶ (Abbildung 2.12a). Mit dem Computermauszeiger wurden die Filamente manuell in der xy-Ebene „abgefahren“, wobei auf diese Weise an IMARIS Startwerte übergeben wurden. Die in diesem Schritt erzeugte Linie gibt den mit dem Mauszeiger „abgefahrenen Weg“ (engl. traced path) wieder und bildet das Rückgrat. In Abhängigkeit des lokalen Intensitätsmaximums wurden automatisch die Werte in z-Richtung senkrecht zur xy-Ebene generiert. Zuletzt wurde durch das Programm diese Linie intensitäts- und krümmungsabhängig zentriert (Abbildung 2.12b)⁷. Bei dieser Auswertung erfolgte die Markierung aller Filamente mit einer Mindestlänge von 2 μm . Zusätzlich wurden auch solche Filamente ausgewertet, welche die begrenzenden Wände des Bildstapels durchstoßen und eine Mindestlänge von 17 μm aufwiesen. Die Mindestlänge entsprach dabei der Persistenzlänge des Phalloidin-stabilisierten Aktins. Durch diese Arbeitsschritte wurden die Filamentkoordinaten des Bildstapels in drei Dimensionen bestimmt. In Abbildung 2.12c sind zum einen ein Filament durch eine Linie und zum anderen die von IMARIS generierten Punkte durch Kugeln repräsentiert. Je höher die Krümmung ist, desto mehr Punk-

⁶Dafür wurden die Module MEASUREMENTPRO und FILAMENTTRACER der Firma BITPLANE benötigt.

⁷Der von der Software verwendete Algorithmus zur Zentrierung der Filamente ist von der Firma BITPLANE nicht veröffentlicht.

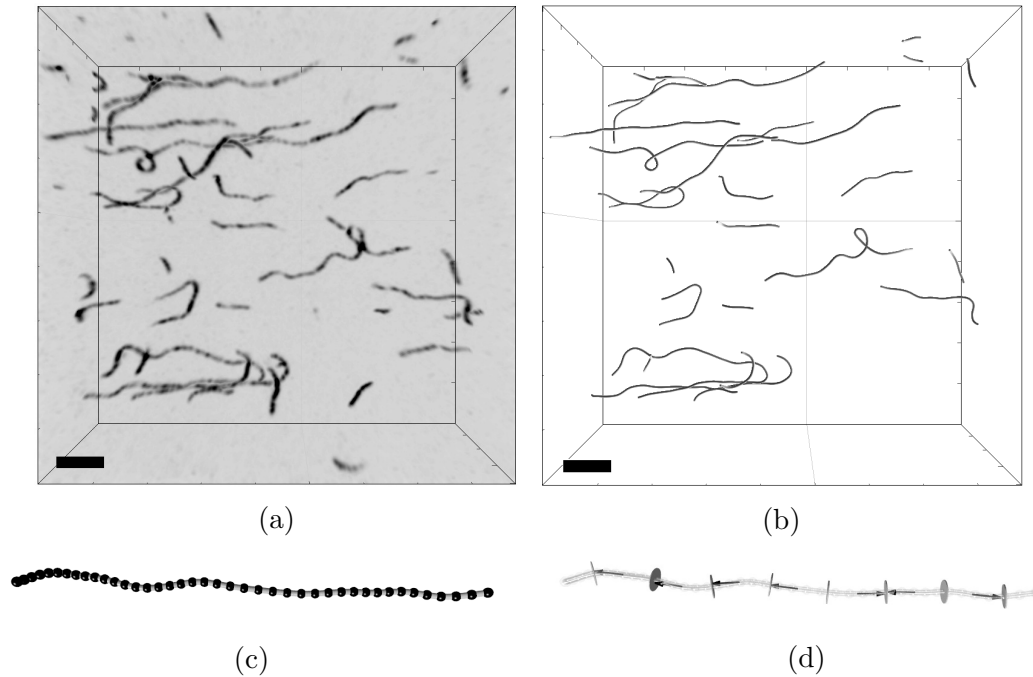


Abbildung 2.12: Analysemethoden zur Ordnungsauswertung: (a) Ein mit dem LSM aufgenommener dreidimensionaler Bildstapel ist hier mit dem Programm IMARIS dargestellt. Maßstab = 10 μm . (b) Hier sind alle markierten Filamente aus (a) visualisiert. Dabei wurden alle Filamente mit einer Mindestlänge von 2 μm markiert und zusätzlich auch solche Filamente, welche die begrenzenden Wände des Bildstapels durchstoßen und eine Mindestlänge von 17 μm aufweisen. Diese Linien in (b) repräsentieren die Filamentkoordinaten nach Optimierung durch IMARIS. Maßstab = 10 μm . (c) zeigt ein Beispielfilament aus Abbildung (b), wobei die Kugeln die von IMARIS ausgegebenen Koordinaten darstellen. (d) Hier ist die Einteilung des Filaments in Segmente getrennt durch Scheibchen dargestellt. Jedem Segment wird ein Eigenvektor \mathbf{p}_1 zugewiesen (vgl. Abschnitt 2.9.2). (Bild (c) und (d) bereitgestellt von Dr. Ronald Springer, ICS-7).

te wurden generiert. Die Abstände der ausgegebenen Punkte sind nicht äquidistant. In Tabelle 2.4 ist für jede Konzentration zu jedem Probengefäß die Anzahl ausgewerteter Bildstapel \tilde{n} , die mittlere Anzahl generierter Punkte $\langle P \rangle$, der mittlere Abstand $\langle dp \rangle$, die Streuung des mittleren Abstandes σ_{dp} und der maximale Abstand dp_{\max} aufgelistet. Die Koordinaten der Filament-skelettierenden Hilfslinien wurden als Rückgabewerte ausgegeben, als Punktliste (x_i, y_i, z_i) abgespeichert und im weiteren Verlauf mit MATLAB 2012A ausgewertet. Durch Anpassung eines kubischen Spline an die Filamentkoordinaten werden Zwischenwerte interpoliert.

Tabelle 2.4: Auflistung der auflösungsbegrenzenden Punktabstände; \tilde{n} entspricht der Anzahl der Bildstapel, $\langle P \rangle$ ist die mittlere Punktzahl pro Bildstapel, $\langle dp \rangle$ ist der mittlere Abstand zwischen zwei Punkten aller Bildstapel einer Konzentration und σ_{dp} die entsprechende Streuung, dp_{\max} ist der maximale Abstand der zur gegebenen Konzentration ausgewertet wurde.

Probengefäß	c [mg/ml]	\tilde{n}	$\langle P \rangle$	$\langle dp \rangle$ [μm]	σ_{dp} [μm]	dp_{\max} [μm]
Kammer	0,2	11	892	0,65	0,25	2,16
	0,4	6	1322	0,66	0,28	1,75
	0,6	8	828	0,64	0,26	2,13
	0,8	6	781	0,56	0,20	1,30
große Kapillare	0,2	10	822	0,65	0,22	1,65
	0,4	13	877	0,66	0,26	2,11
	0,6	8	481	0,70	0,31	2,10
	0,8	6	857	0,61	0,20	2,08
kleine Kapillare	0,4	7	1689	0,78	0,36	4,25
	0,6	6	1707	0,66	0,27	1,94

2.9.2 Berechnung des Ordnungsparameters

Alle markierten Filamente eines Bildstapels zu jeder Konzentration und in allen Probengefäßen wurden in Segmente der Länge L_S , auch Segmentlänge genannt, eingeteilt (vgl. Abbildung 2.12d). Unter Berücksichtigung des optischen Auflösungsvermögens und des mittleren Koordinatenabstandes $\langle dp \rangle$ betrug die minimale Segmentlänge $L_S = 1 \mu\text{m}$. Die Filamentkoordinaten inklusive Zwischenwerte sind durch die Punktliste $\tilde{\mathbf{x}}_i = (x_i, y_i, z_i)$ dargestellt. Gegeben sei die gesamte Punktzahl \tilde{N} pro Bildstapel. Um im Folgenden die Rechenschritte zu erleichtern, wird der Schwerpunkt in den Koordinatenursprung transformiert $\mathbf{x}_i = \tilde{\mathbf{x}}_i - \mathbf{x}_M$, so dass $\sum_{i=1}^{\tilde{N}} \mathbf{x}_i = 0$. Das gemittelte dyadische Produkt

$$\langle \mathbf{x}_i \mathbf{x}_i \rangle = \mathbf{X} = \frac{1}{\tilde{N}} \sum_{i=1}^{\tilde{N}} \mathbf{x}_i \cdot \mathbf{x}_i^T \quad (2.6)$$

definiert den Gyrationstensor [133]. Mittels Hauptachsentransformation wird der Tensor \mathbf{X} diagonalisiert, wobei χ_i die Eigenwerte sind. Daraus folgt $\mathbf{D} = \text{diag}(\chi_1, \chi_2, \chi_3)$, wobei $\chi_1 > \chi_2 > \chi_3$. Da \mathbf{X} eine symmetrische Matrix ist, kann ein Satz voller Eigenvektoren \mathbf{p}_i und somit eine neue orthogonale Matrix $\tilde{\mathbf{P}}$ berechnet werden, so dass gilt $\mathbf{X} = \tilde{\mathbf{P}} \mathbf{D} \tilde{\mathbf{P}}^T$. Der Eigenvektor \mathbf{p}_1 zum größten Eigenwert χ_1 definiert die Hauptausrichtung eines Segments (vgl. Abbildung 2.12d), wobei $\chi_1 \gg \chi_2, \chi_3$ ist.

Das gemittelte dyadische Produkt über alle N Eigenvektoren \mathbf{p}_1 , demnach über alle N Segmente pro Bildstapel, ist $\mathbf{P} = N^{-1} \sum_{i=1}^N \mathbf{p}_i \cdot \mathbf{p}_i^T$. Die Matrix \mathbf{p} ist erneut ein symmetrischer Tensor mit $\sum_i p_{ii} = 1$ [2, 35]. Nach Diagonalisierung des Tensors \mathbf{P} ergeben sich die Eigenwerte λ_i , wobei $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3$ gilt. Die Eigenvektoren zu den Eigenwerten geben

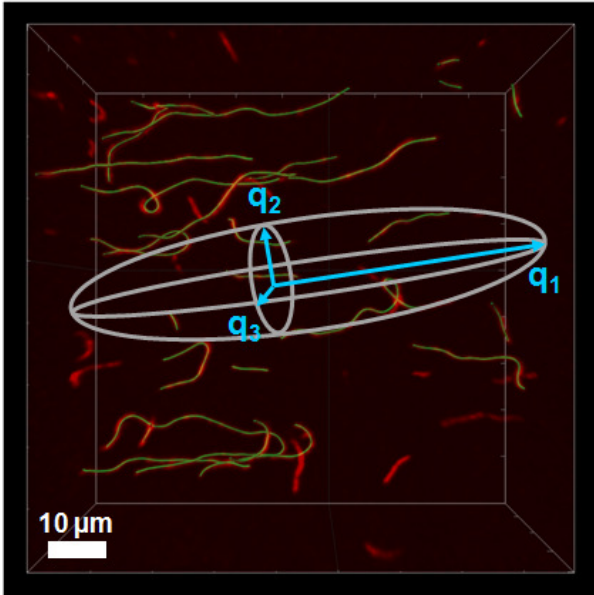


Abbildung 2.13: Skizzierung der Eigenvektoren \mathbf{q}_i in Bildstapel: Die Eigenvektoren bilden die Hauptachsen des Ellipsoids. Die Länge der Achsen sind zu den Eigenwerten λ_i proportional.

Auskunft über die Ausrichtung der Filamente in einem Bildstapel. Der Eigenvektor zum größten Eigenwert gibt die Hauptausrichtung der Filamente in einem Bildstapel wieder. Dieser wird auch Direktor genannt. Eine Aussage über den Ordnungszustand in einem Bildstapel kann getroffen werden mittels des Ordnungsparameters

$$S = \frac{3\lambda_1 - 1}{2}, \text{ wobei } \lambda_i \in \left[\frac{1}{3} \dots 1\right] \text{ und } S \in [0 \dots 1], \quad (2.7)$$

entsprechend dem Standard-Ordnungsparameter [26] (vgl. Abschnitt 1.4)

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2(\theta) - 1 \rangle. \quad (2.8)$$

Das Ergebnis der letzten Hauptachsentransformation ist in Abbildung 2.13 skizziert. Die Eigenvektoren \mathbf{q}_i zu den Eigenwerten λ_i spannen ein Ellipsoid auf, wobei \mathbf{q}_i die Hauptachsen sind. Die Länge der Hauptachsen, also die Form des Ellipsoids, wird mit dem Absolutwert der Eigenwerte gewichtet, wobei $\sum_i \lambda_i = 1$. Je höher der Wert des Eigenwerts λ_i , desto höher ist das Maß der Ausrichtung in Richtung von \mathbf{q}_i .

3 Ordnungsbestimmung von Aktinfilamenten in Mikrokapillaren und in makroskopischen Kammern

3.1 Untersuchung des Ordnungsparameters in Abhängigkeit der Segment- und Filamentlänge

3.1.1 Bestimmung der Filamentlängenverteilung

Aktinlösungen weisen nach *in vitro* Polymerisation von globulärem zu filamentösem Aktin polydisperse Längenverteilungen auf [68, 52, 74]. Daher wurde der Ordnungsparameter in beiden Probengefäßen in Abhängigkeit der Filamentlänge L_{Fil} und Segmentlänge L_S untersucht. Da von IMARIS die Koordinaten der einzelnen Filamente ausgegeben wurden, konnte darüber die Filamentlänge berechnet werden. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der mittleren Längenverteilungen für jedes Probengefäß aufgelistet. Die gesamte Filamentanzahl N_{ges} ist die Summe über alle Filamente und $\langle L_{\text{Fil}} \rangle$ die mittlere Filamentlänge in den Bildstapeln für eine Konzentration.

In Abbildung 3.1 ist die Längenverteilung der Filamente in den Kapillaren und der Kammer dargestellt. Die relative Häufigkeitsdichte ist in beiden Abbildungen in Abhängigkeit der Länge aufgetragen. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt jeweils $5 \mu\text{m}$ (vgl. Abbildung 3.1a). Trotz unterschiedlicher Probengefäße und Aktinaufreinigungen stimmen die Einhüllenden der Histogramme überein (vgl. Abbildung 3.1b). Diese visualisieren die exponentielle Längenverteilung (vgl. Abbildung 3.1c) [104, 68]. Daher wurden die Häufigkeiten der Filamentlängen in verschiedenen Probengefäßen pro Klasse gemittelt. Diese gemittelten Werte wurden in Abhängigkeit der Filamentlänge aufgetragen und durch eine exponentielle Funktion $y = a \cdot \exp(-x/l_k)$ angepasst. Die Anpassung dieser Funktion wurde dabei mit der Standardabweichung gemittelt, die aus der Mittelwertbildung pro Klasse

Tabelle 3.1: Mittlere Filamentlängen: Durch die von IMARIS ausgegebenen Koordinaten kann die Filamentlänge berechnet werden. N_{ges} ist die Summe aller Filamente und $\langle L_{\text{Fil}} \rangle$ die mittlere Filamentlänge aus allen Bildstapeln für eine Konzentration.

	große Kapillare		Kammer		kleine Kapillare	
c [mg/ml]	N_{ges}	$\langle L_{\text{Fil}} \rangle$ [μm]	N_{ges}	$\langle L_{\text{Fil}} \rangle$ [μm]	N_{ges}	$\langle L_{\text{Fil}} \rangle$ [μm]
0,2	242	22	291	21	-	-
0,4	435	17	392	13	471	19
0,6	189	15	296	14	383	18
0,8	154	20	188	14	-	-

berechnet wurde. Nach Anpassung der exponentiellen Funktion beträgt die Abklinglänge $l_k = (14,4 \pm 0,7) \mu\text{m}$.

Durch die Übereinstimmung der Längenverteilungen in den Probengefäßen war somit sichergestellt, dass bezüglich der Filamentlängen konstante Versuchsbedingungen gegeben waren.

3.1.2 Ordnungsparameter S in Abhängigkeit der Filamentlänge

Die Filamente eines jeden Bildstapels wurden in Abhängigkeit der Länge l in folgende Klassen eingeteilt *i*) $l \leq 10 \mu\text{m}$; *ii*) $10 \mu\text{m} \leq l \leq 20 \mu\text{m}$; *iii*) $20 \mu\text{m} \leq l \leq 30 \mu\text{m}$; *iv*) $l \geq 30 \mu\text{m}$ *v*) $0 \mu\text{m} \leq l \leq 1000 \mu\text{m}$. Die letzte Längenklasse gibt an, dass alle Filamentlängen berücksichtigt wurden. Bei dieser Analyse wurde die Segmentlänge konstant bei $L_S = 1 \mu\text{m}$ gehalten. Der Ordnungsparameter wurde mit der Anzahl N_i der Segmente pro Bildstapel gewichtet

$$\langle S \rangle = \frac{\sum_{i=1}^{\tilde{n}} N_i S_i}{\sum_{i=1}^{\tilde{n}} N_i}, \quad (3.1)$$

da die Segmentanzahl pro Bildstapel variierte. Die Streuung des Ordnungsparameters wird mit der Anzahl \tilde{n} der Bildstapel zu einer Konzentration gewichtet

$$\sigma_{\langle S \rangle} = \frac{\sigma_S}{\sqrt{\tilde{n}}}, \quad (3.2)$$

da die Anzahl der Bildstapel pro Konzentration variierte. In Abbildung 3.2 ist die Filamentlängenabhängigkeit des mittleren Ordnungsparameters in der großen Kapillare (Abbildung 3.2a) und in der Kammer (Abbildung 3.2b) dargestellt. Die Anzahl der Segmente, welche in die Auswertung einfließen, liegt zwischen 200 ($L_{\text{Fil}} = (0 - 10) \mu\text{m}$) und

3.1 Untersuchung des Ordnungsparameters in Abhängigkeit der Segment- und Filamentlänge

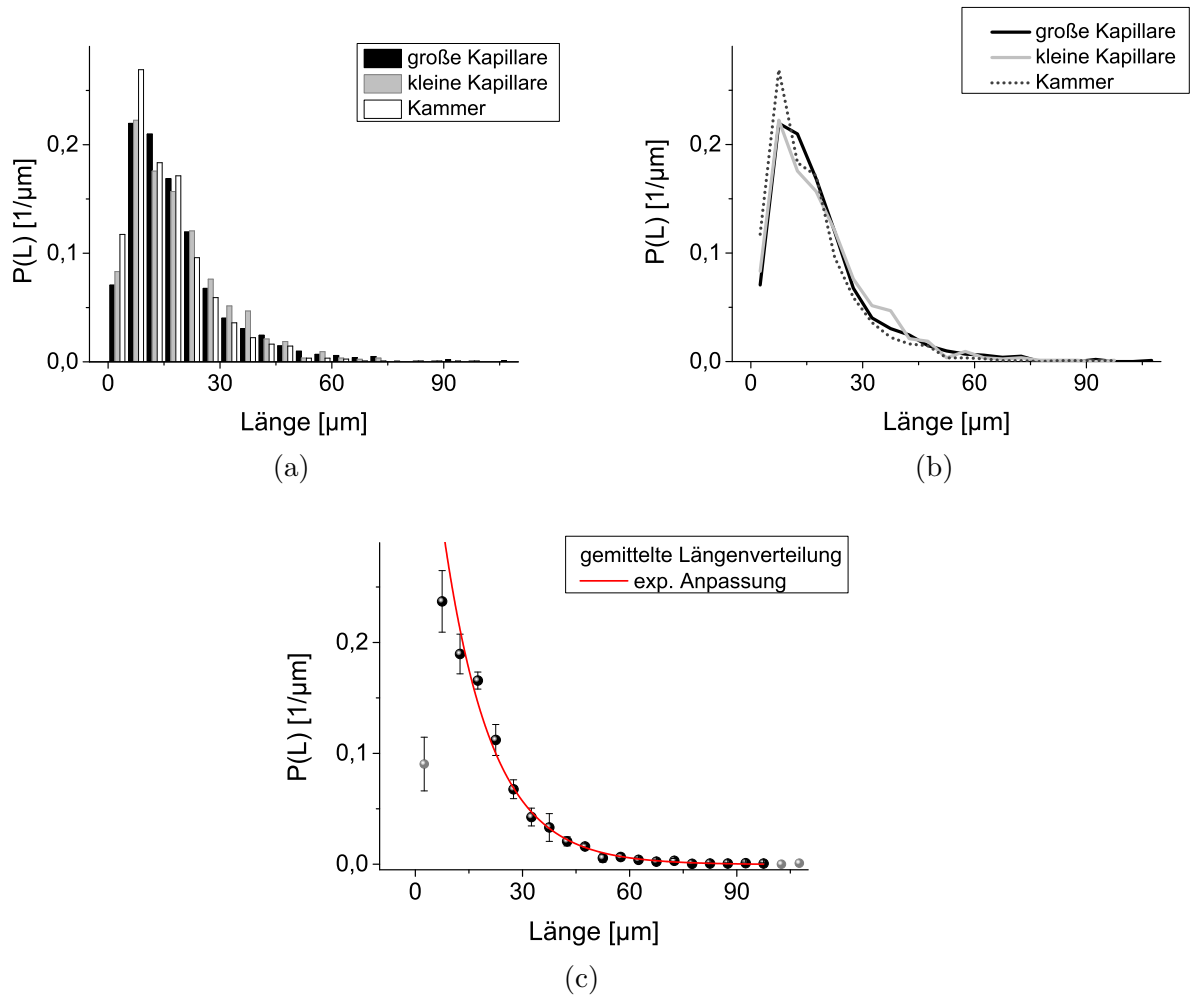


Abbildung 3.1: Längenverteilung der Filamente in den Kapillaren und in der Kammer: $P(L)$ beschreibt die relative Häufigkeitsdichte. In den Histogrammen (a) betragen die Klassenbreiten der Längen jeweils $5\ \mu\text{m}$. Trotz unterschiedlicher Probengefäße und Aufreinigungen überlappen die Längenverteilungen zu unterschiedlichen Probengefäßen. In (c) ist die gemittelte Längenverteilung dargestellt. Diese fallen exponentiell ab.

2400 ($L_{\text{Fil}} = (0 - 1000) \mu\text{m}$). Als Erstes werden die Ergebnisse des mittleren Ordnungsparameters in der großen Kapillare beschrieben. Für die niedrigste Aktinkonzentration $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ ändert sich der Ordnungsparameter signifikant ab Filamentlängen der Klasse $l \geq 30 \mu\text{m}$. Für $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ sind die Ordnungsparameter jeder Filamentlängensklasse signifikant unterschiedlich und verschieben sich zu höheren Werten von $S = 0,34$ auf $S = 0,75$ mit wachsender Filamentlänge. Die Ordnungsparameter für Filamente in Längensklassen $20 \mu\text{m} \leq l \leq 30 \mu\text{m}$ und höher unterscheiden sich nicht mehr signifikant für $c_{\text{Aktin}} = 0,6 \text{ mg/ml}$. Für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ überlappen die Ordnungsparameter aller Längensklassen bei $S = 0,75$, mit Ausnahme für Filamentlängen $l \leq 10 \mu\text{m}$. Der Ordnungsparameter für diese liegt bei $S = 0,47$. Für die große Kapillare kann zusammengefasst werden, dass der Ordnungsparameter mit steigender Filamentlänge zunimmt und zwischen $S = 0,34$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ mit Filamentlängen $l \leq 10 \mu\text{m}$ und $S = 0,75$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ mit Filamentlängen $l \geq 30 \mu\text{m}$ variiert.

Des Weiteren werden die Ergebnisse des mittleren Ordnungsparameters in der Kammer erläutert. Für die hier gewählten Längensklassen sind die Ordnungsparameter von der einen zur nächsthöheren Klasse nicht signifikant unterschiedlich. Für Aktinkonzentrationen ab $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ ist die Tendenz zu sehen, dass die Ordnung mit zunehmender Filamentlänge wächst. Dabei unterscheiden sich die Ordnungsparameter der Klasse mit $l \leq 10 \mu\text{m}$ signifikant von denen zu der Klasse mit Filamentlängen $l \geq 30 \mu\text{m}$. Somit nimmt der Ordnungsparameter mit steigender Filamentlänge zu und variiert zwischen $S = 0,22$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ mit Filamentlängen $l \leq 10 \mu\text{m}$ und $S = 0,44$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ mit Filamentlängen $l \geq 30 \mu\text{m}$.

3.1.3 Ordnungsparameter S in Abhängigkeit der Segmentlänge

Die Filamente eines jeden Bildstapels wurden in Abhängigkeit folgender Segmentlängen L_S untersucht: *i*) $s = 1 \mu\text{m}$; *ii*) $s = 5 \mu\text{m}$; *iii*) $s = 15 \mu\text{m}$; *iv*) $s = 25 \mu\text{m}$. Bei dieser Analyse wurden alle vorkommenden Filamentlängen berücksichtigt. Demnach wurde keine Einteilung in Längensklassen vorgenommen. Der Ordnungsparameter wurde analog Gl. 3.1 und Gl. 3.2 gemittelt. In Abbildung 3.3 ist die Segmentlängenabhängigkeit des mittleren Ordnungsparameters in der großen Kapillare (Abbildung 3.3a) und in der Kammer (Abbildung 3.3b) dargestellt. Die Anzahl der Segmente, welche in die Auswertung einfließen, liegt zwischen 20 ($L_S = 25 \mu\text{m}$) und 7292 ($L_S = 1 \mu\text{m}$). Als Erstes werden die Ergebnisse des mittleren Ordnungsparameters in der großen Kapillare beschrieben. Zu jeder Aktinkonzentration kann dieselbe Beobachtung gemacht werden. Der Ordnungsparameter für die Segmentlängen $L_S = 1 \mu\text{m}$ unterscheidet sich nicht signifikant von den Werten zu $L_S = 5 \mu\text{m}$, wohl aber zu den Werten mit Segmentlängen $L_S = 15 \mu\text{m}$ und

3.1 Untersuchung des Ordnungsparameters in Abhängigkeit der Segment- und Filamentlänge

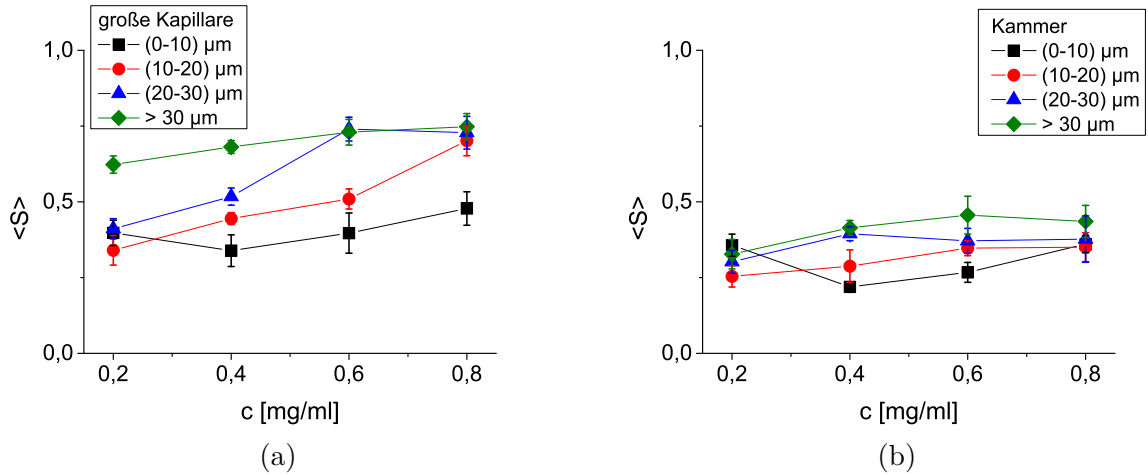


Abbildung 3.2: Filamentlängenabhängigkeit des Ordnungsparameters: Hier ist der mittlere Ordnungsparameter in Abhängigkeit der Aktinkonzentration zu unterschiedlichen Filamentlängenklassen dargestellt. In der Kapillare (a) verschiebt sich der Ordnungsparameter signifikant zu höheren Werten bei wachsender Filamentlänge. In der Kammer (b) ist die selbe Tendenz auszumachen, obwohl die Ordnungsparameter für die hier gewählten Längenklassen von der einen zur nächsthöheren Klasse nicht signifikant unterschiedlich sind.

$L_S = 25 \mu\text{m}$. Somit nimmt der Ordnungsparameter mit steigender Segmentlänge zu und variiert zwischen $S = 0,43$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $L_S = 1 \mu\text{m}$ und $S = 0,93$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ und $L_S = 25 \mu\text{m}$.

Des Weiteren werden die Ergebnisse des mittleren Ordnungsparameters in der Kammer erläutert. Für die Aktinkonzentration $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ unterscheiden sich die Werte des Ordnungsparameters für Segmentlängen $L_S = 1 \mu\text{m}$, $L_S = 5 \mu\text{m}$ und $L_S = 15 \mu\text{m}$ nicht signifikant. Die Ordnungsparameter für Filamente, die in Segmente der Länge $L_S = 15 \mu\text{m}$ und $L_S = 25 \mu\text{m}$ eingeteilt wurden, unterscheiden sich signifikant von den Werten zu $L_S = 1 \mu\text{m}$ und $L_S = 5 \mu\text{m}$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,6 \text{ mg/ml}$. Somit nimmt der Ordnungsparameter mit steigender Segmentlänge zu und variiert zwischen $S = 0,24$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ mit $L_S = 1 \mu\text{m}$ und $S = 0,56$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ mit $L_S = 25 \mu\text{m}$.

Durch die Einteilung der Filamente in Segmente wurden bei der Bestimmung des Ordnungsparameters nur Filamente ausgewertet, deren Konturlängen mindestens so groß wie die Segmente waren ($L_S \leq l$). Filamente hingegen, deren Konturlängen demnach kleiner als die Segmentlänge waren, gingen nicht in die Auswertung mit ein.

Wenn man die Filamente in Klassen unterschiedlicher Länge gemäß Abschnitt 3.1.2 einteilt, kann wiederum gezeigt werden, dass der Ordnungsparameter von der Segmentlänge abhängig ist. Daher wurde in dieser Arbeit die Abhängigkeit des Ordnungsparameters

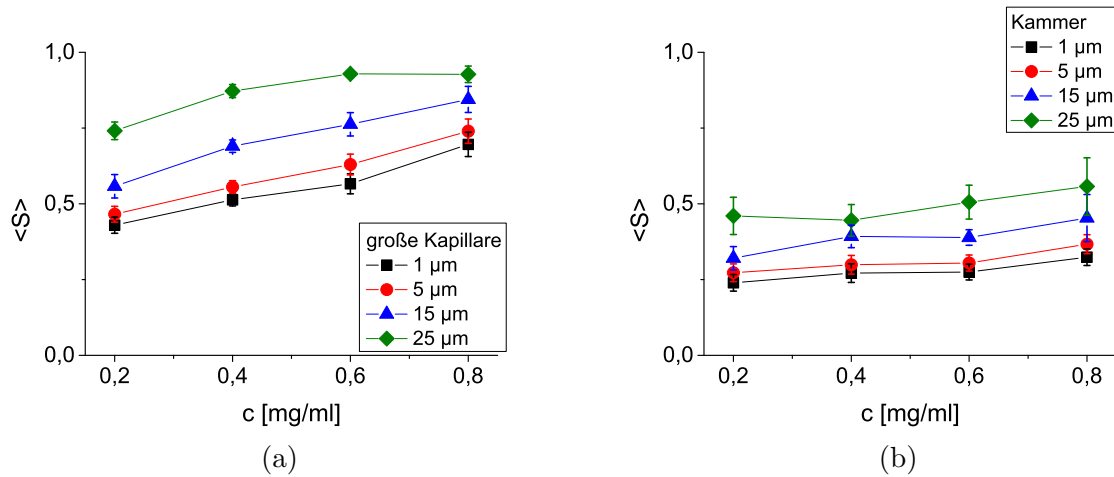


Abbildung 3.3: Segmentlängenabhängigkeit des Ordnungsparameters: Hier ist der mittlere Ordnungsparameter in Abhängigkeit der Aktinkonzentration zu unterschiedlichen Segmentlängen dargestellt. In der Kapillare (a) verschiebt sich der Ordnungsparameter zu höheren Werten bei wachsender Segmentlänge. In der Kammer (b) ist dieselbe Tendenz zu sehen.

von der Segmentlänge auch für Filamente mit unterschiedlichen Längen bestimmt. Dies soll beispielhaft an Filamenten gezeigt werden, deren Konturlängen größer als $20 \mu\text{m}$ aber kürzer als $30 \mu\text{m}$ sind (vgl. Abbildung 3.4). Die Anzahl der Segmente, welche in die Auswertung des Ordnungsparameters für die Filamente in der Kapillare einfließen, liegt zwischen 15 ($L_S = 25 \mu\text{m}$) und 1923 ($L_S = 1 \mu\text{m}$) und für die Filamente in der Kammer zwischen 7 ($L_S = 25 \mu\text{m}$) und 1640 ($L_S = 1 \mu\text{m}$). Die Ordnungsparameter zu jeder Aktinkonzentration unterscheiden sich signifikant für die Segmentlängen $L_S = 1 \mu\text{m}$ und $L_S = 25 \mu\text{m}$ in beiden Probengefäßen.

3.2 Direkter Vergleich des Ordnungsparameters in den Kapillaren und in der makroskopischen Kammer

In Abbildung 3.5 sind Ergebnisse des Ordnungsparameters in allen verwendeten Probengefäßen dargestellt. Die Segmentlänge beträgt $L_S = 1 \mu\text{m}$ und alle Filamentlängen fließen in die Auswertung ein. Der Ordnungsparameter ist in den Kapillaren zu jeder Aktinkonzentration signifikant größer als in der Kammer. Die Werte in den Kapillaren sind ähnlich. Zudem wächst der Ordnungsparameter in den Kapillaren als Funktion der Aktinkonzentration.

3.2 Direkter Vergleich des Ordnungsparameters in den Kapillaren und in der makroskopischen Kammer

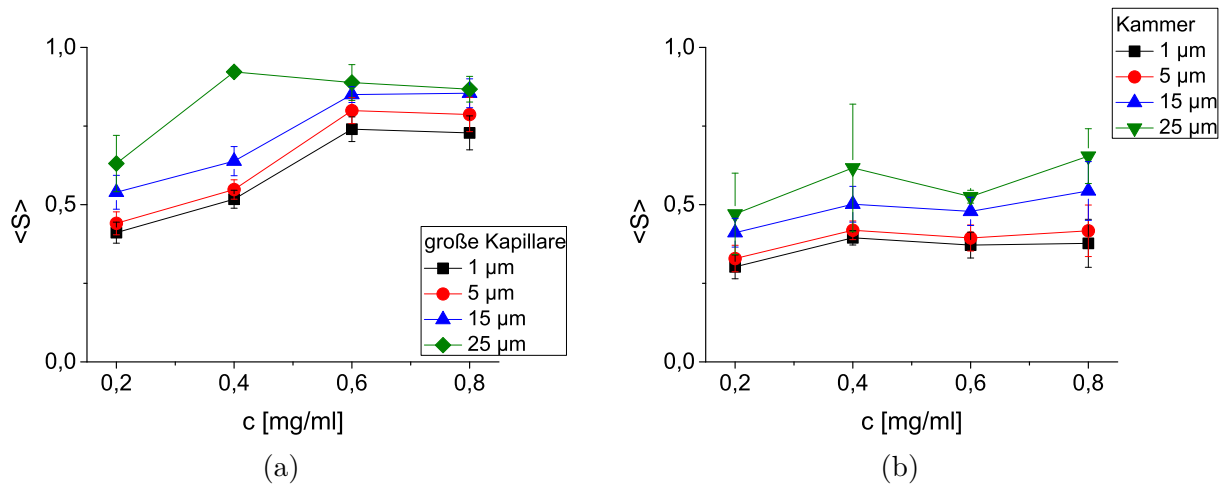


Abbildung 3.4: Segmentlängenabhängigkeit des Ordnungsparameters der Filamentlängensklasse $20 \mu\text{m} \leq l \leq 30 \mu\text{m}$: Hier ist der mittlere Ordnungsparameter in Abhängigkeit der Aktinkonzentration zu unterschiedlichen Segmentlängen von Filamenten dargestellt, welche Längen zwischen $20 \mu\text{m}$ und $30 \mu\text{m}$ aufweisen. In der Kapillare (a) verschiebt sich der Ordnungsparameter zu höheren Werten bei wachsender Segmentlänge. In der Kammer (b) ist dieselbe Tendenz zu sehen.

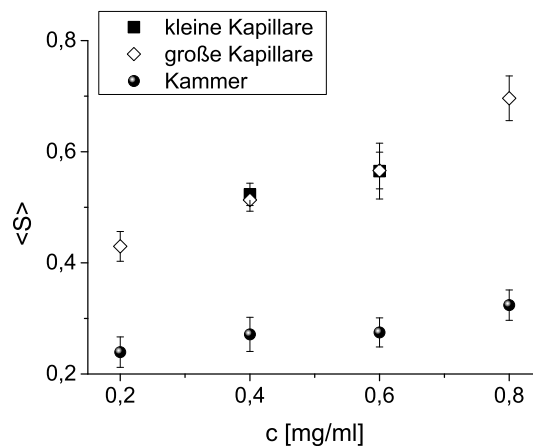


Abbildung 3.5: Direkter Vergleich des Ordnungsparameters in allen Probengefäßen: Der Ordnungsparameter wächst in Kapillaren als Funktion der Aktinkonzentration und ist signifikant größer als in der Kammer.

3.3 Verteilung der Eigenwerte und Eigenvektoren in der Kapillare und in der makroskopischen Kammer

Um das Maß der Ordnung in jede der drei Raumrichtungen beschreiben zu können, wurden zusätzlich die Verteilungen der Eigenwerte und Eigenvektoren analysiert.

Wie in vorherigen Abschnitten beschrieben, werden die Filamente in Segmente eingeteilt. Die Ausrichtung jedes Segments wird durch den Eigenvektor \mathbf{p}_1 wiedergegeben (vgl. Abschnitt 2.9). Im Folgenden werden die Ausrichtungen der Eigenvektoren von Filamenten in der großen Kapillare mit denen in der Kammer verglichen. Die Analyse erfolgte exemplarisch für die Aktinkonzentration $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$. Die Filamente wurden dafür in Segmente der Länge $1 \mu\text{m}$ eingeteilt. In Abbildung 3.6 sind die Endpunkte der Eigenvektoren auf einer Halbkugel mit Radius $1 \mu\text{m}$ dargestellt, wobei die Grundfläche der Halbkugel in der xy -Ebene liegt. Die Grauwerte entsprechen der z -Koordinate. Das Koordinatensystem entspricht den Richtungen im Bildstapel, welcher am konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurde. Die xy -Ebene entspricht der Fokusebene und z zeigt in die axiale Richtung. In Abbildung 3.6a sind die Ergebnisse für die große Kapillare dargestellt. Die meisten Eigenvektoren sind parallel zur x -Achse ausgerichtet. Die Eigenvektoren streuen um $y=0$ und sind kaum in z -Richtung orientiert. In Abbildung 3.6b sind die Ergebnisse für die Kammer dargestellt. Die Eigenvektoren in der xy -Ebene sind isotrop verteilt. In der Kammer sind mehr Eigenvektoren in z -Richtung ausgerichtet als in der Kapillare.

In Abbildung 3.7 sind die Häufigkeitsverteilungen der Eigenwerte in beiden Probengefäßen dargestellt. Bei dieser Analyse wurde nicht die Abhängigkeit von der Aktinkonzentration untersucht. Die Eigenwerte setzen sich aus den Eigenwerten aller Aktinkonzentrationen zusammen. Die Filamente wurden in Segmentlängen mit $L_S = 1 \mu\text{m}$ eingeteilt. Alle Filamentlängen fließen in die Auswertung ein. Die Klassenbreite beträgt $0,05$. In die Auswertung gehen 37 Bildstapel, aufgenommen in der großen Kapillare, und 31 Bildstapel, aufgenommen in der Kammer, ein. Wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben, wird die Orientierung jedes Segments durch einen Eigenvektor repräsentiert. Das dyadische Produkt dieser Eigenvektoren liefert eine symmetrische Matrix. Nach Hauptachsentransformation besteht die Diagonalmatrix aus neuen Eigenwerten, welche Informationen über die gesamte Ausrichtung der Filamente in einem Bildstapel enthalten. Das Maß der Ordnung pro Bildstapel ist durch den Ordnungsparameter $S \propto \lambda_1$ charakterisiert (vgl. Gl. 2.7). Die Verteilungen in Abbildung 3.7a repräsentieren folgende Filamentausrichtung in der Kapillare: Die Verteilung der größten Eigenwerte λ_1 überlappt nicht mit den Verteilungen

3.3 Verteilung der Eigenwerte und Eigenvektoren in der Kapillare und in der makroskopischen Kammer

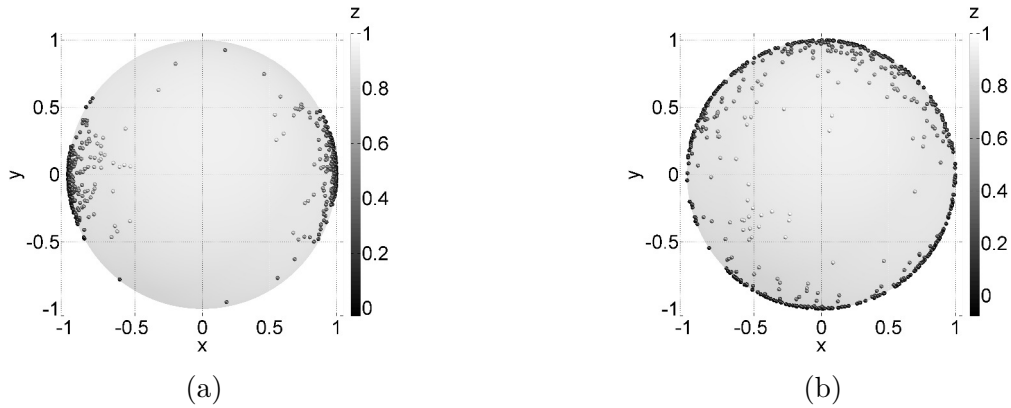


Abbildung 3.6: Verteilungen der Eigenvektoren zu $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ in beiden Probengefäßen: Alle Filamentlängen fließen in die Auswertung ein. Die Endpunkte der Eigenvektoren für alle Segmente mit $L_S = 1 \mu\text{m}$ eines exemplarischen Bildstapels in der großen Kapillare (a) und in der Kammer (b) sind auf einer Halbkugel dargestellt. Die Grundfläche der Halbkugel liegt in der xy-Ebene. Der Grauwert entspricht der z-Koordinate (Bild (a) und (b) bereitgestellt von Dr. Ronald Springer, ICS-7).

der anderen beide Eigenwerte. Dies zeigt eine Vorzugsrichtung an. Zudem sind weniger Filamente in der Ebene senkrecht zu dieser Vorzugsausrichtung angeordnet. Die Verteilungen der Eigenwerte λ_2 und λ_3 überlappen, dennoch sind die Werte von λ_2 zu höheren Absolutwerten gegenüber λ_3 verschoben. Die Filamente, welche in der Ebene senkrecht zur Vorzugsrichtung liegen, sind demnach nicht völlig isotrop verteilt. Die Verteilungen in Abbildung 3.7b repräsentieren folgende Filamentausrichtung in der Kammer: Die Verteilungen der Eigenwerte λ_1 und λ_2 überlappen. Die Eigenwerte λ_3 weisen relativ zu den anderen kleinere Absolutwerte auf. Somit sind die Filamente hauptsächlich in einer Ebene ausgerichtet. Da die Verteilung von λ_1 im Vergleich zu der Verteilung von λ_2 zu höheren Eigenwerten verschoben ist, sind die Filamente in dieser Ebene jedoch nicht vollkommen isotrop verteilt.

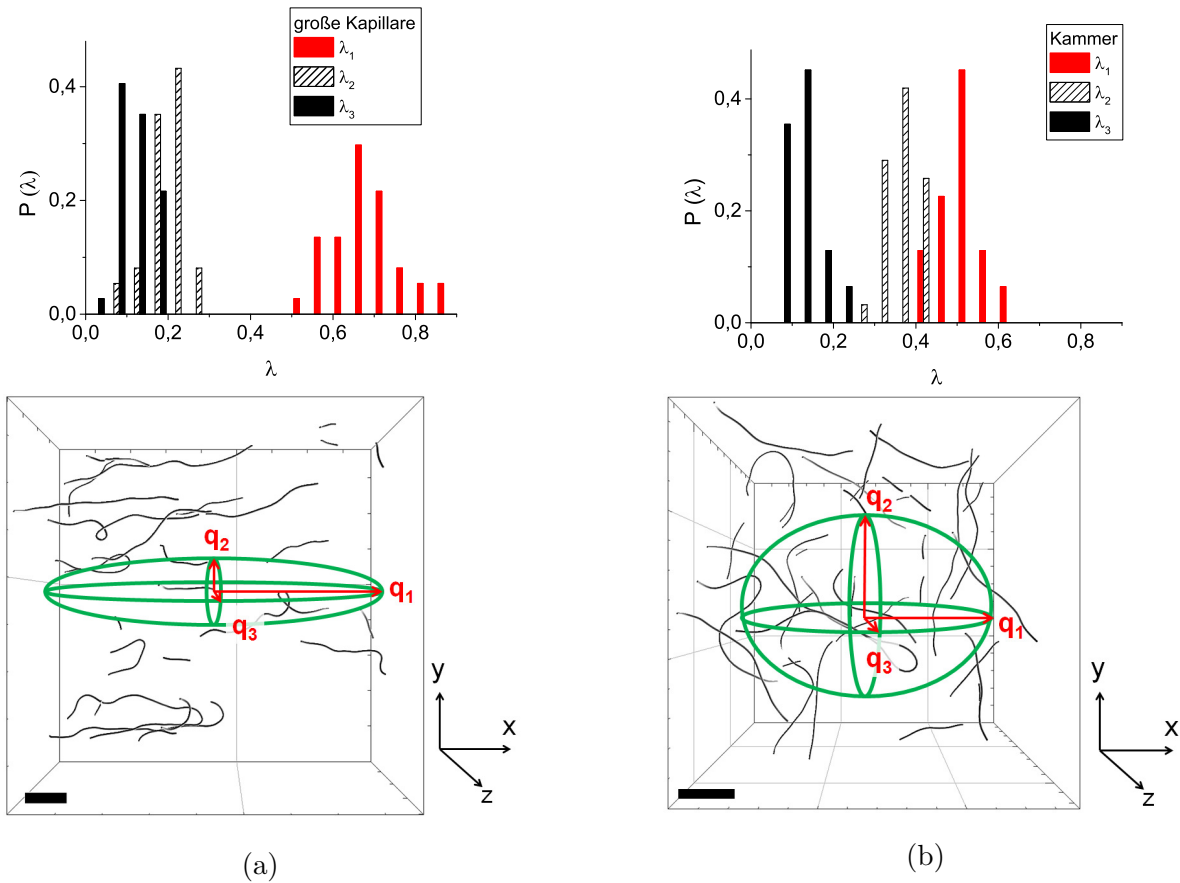


Abbildung 3.7: Verteilungen der Eigenwerte, welche die Gesamtorientierung je Bildstapel wiedergeben: Die Segmentlänge beträgt $L_S = 1 \mu\text{m}$. Alle Filamentlängen fließen in die Auswertung ein. Die Aktinkonzentration beträgt $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$. In (a) sind die Häufigkeitsverteilungen der Eigenwerte $P(\lambda_i)$, berechnet für die große Kapillare und in (b) für die Kammer, dargestellt. Zudem ist für jedes Probengefäß ein repräsentativer Bildstapel dargestellt. In diesen ist je ein Ellipsoid skizziert. Die Längen der Hauptachsen \mathbf{q}_i des Ellipsoids werden durch die Eigenwerte λ_i gewichtet. Daher ist das Ellipsoid in (a) zigarrenförmig und unterscheidet sich zu dem in (b) gezeigten Ellipsoid. Da hier die Eigenwerte λ_1 und λ_2 , fast gleichgroß sind, sind auch die Achsen \mathbf{q}_1 und \mathbf{q}_2 nahezu gleichlang im Gegensatz zur Achse \mathbf{q}_3 , in welcher die wenigsten Filamente ausgerichtet sind; Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

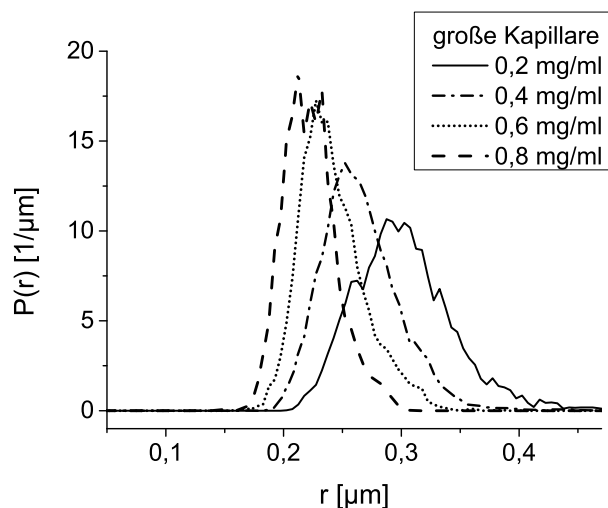
4 Messung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Ordnung

4.1 Ergebnisse

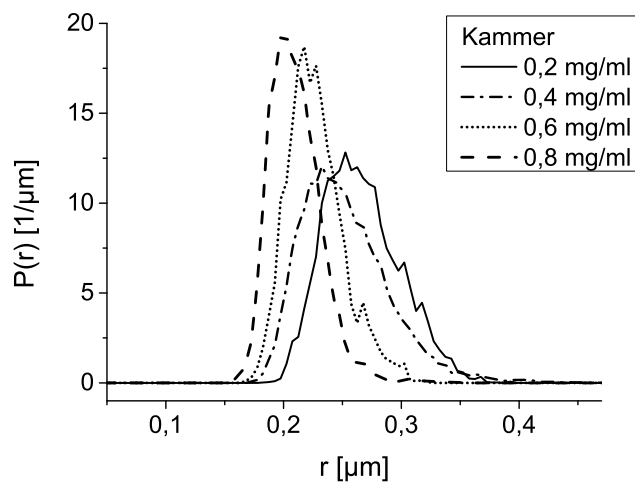
In diesem Kapitel werden die Verteilungen der Röhrenradien verglichen, welche für die makroskopische Kammer und die Mikrokapillaren bestimmt wurden. Zunächst folgt ein Vergleich der Röhrenradienverteilungen, welche aus den Rohdaten bestimmt wurden und anschließend ein Vergleich der Röhrenradienverteilungen nach LSF-Korrektur.

4.1.1 Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopischen Kammer

In Abbildung 4.1 sind die Röhrenradienverteilungen in der großen Kapillare und in der Kammer dargestellt. Mit zunehmender Aktinkonzentration wird die Röhrenradienverteilung in beiden Probengefäßen zu kleineren Werten verschoben. In der Abbildung 4.2 werden die Verteilungen zu jeweils einer Aktinkonzentration in beiden Probengefäßen gegenübergestellt. Die Verteilungen der Röhrenradien in den Kammern sind verglichen zu denjenigen in der großen Kapillare zu kleineren Werten verschoben. In Abbildung 4.3 werden die Röhrenradienverteilungen zu den Aktinkonzentrationen $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,6 \text{ mg/ml}$ verglichen, welche für beide Kapillaren berechnet wurden.



(a)



(b)

Abbildung 4.1: Röhrenradienverteilungen in der großen Kapillare und der makroskopischen Kammer: Mit zunehmender Aktinkonzentration verschieben sich die Röhrenradien in beiden Probengefäßen zu kleineren Werten. Die Röhrenradienanzahl ist in den Tabellen 4.1 und 4.2 aufgelistet.

4.1 Ergebnisse

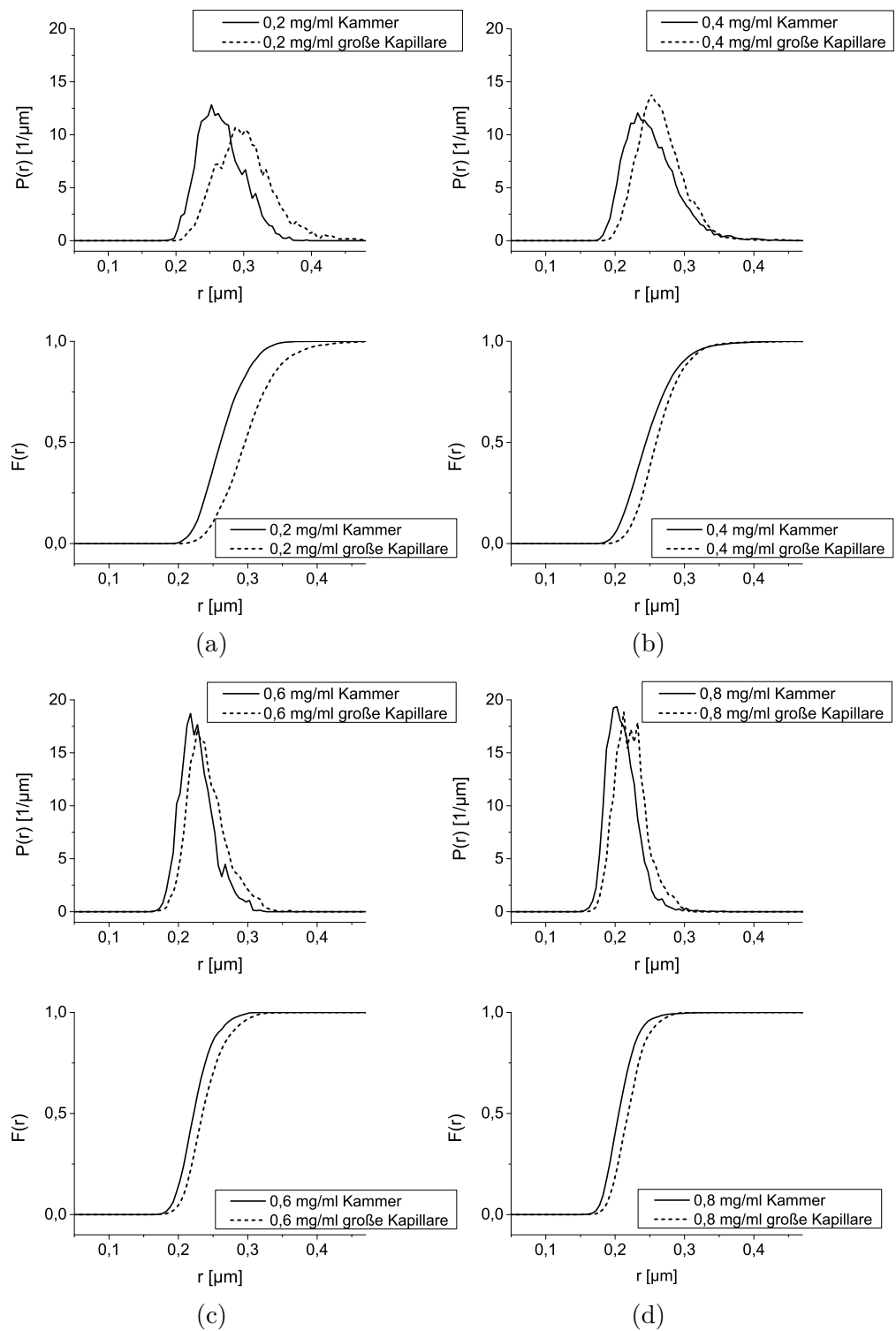


Abbildung 4.2: Vergleich der Röhrenradienverteilungen in der großen Kapillare und in der makroskopischen Kammer zu allen Aktinkonzentrationen: Zu jeder Aktinkonzentration verschieben sich die Röhrenradien in der Kammer zu kleineren Werten relativ zu denen in der Kapillare.

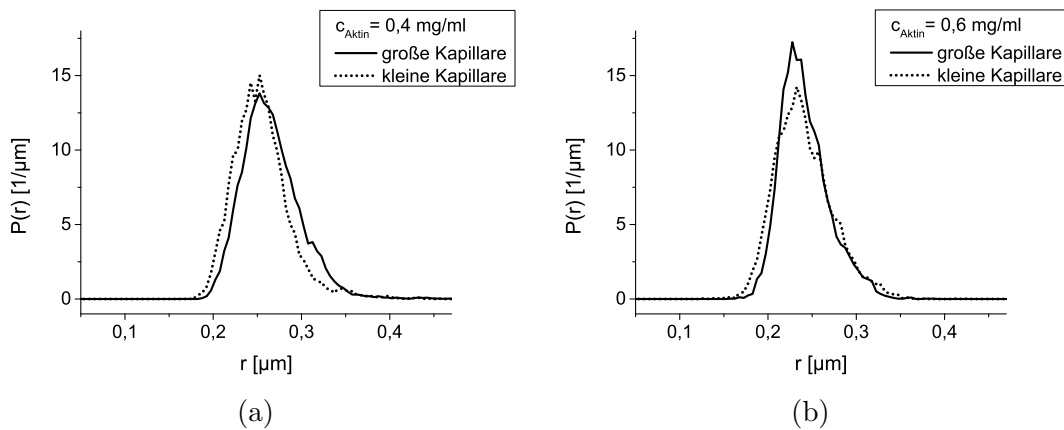


Abbildung 4.3: Vergleich der Röhrenradienverteilungen in beiden Kapillaren.

In den Tabellen 4.1 und 4.2 sind die mittleren Röhrenradien $\langle r \rangle$ und die Standardabweichungen σ_r der Röhrenradien in allen Probengefäßen zusammengefasst. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8).

Tabelle 4.1: Mittlere Röhrenradien in den Kapillaren: Hier sind für beide Kapillaren die Mittelwerte $\langle r \rangle$ der Röhrenradien, die Standardabweichungen σ_r sowie die Anzahl ausgewerteter Röhrenradien m bzw. k aufgelistet.

$c[\text{mg/ml}]$	große Kapillare			kleine Kapillare		
	$\langle r \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_r [\mu\text{m}]$	m	$\langle r \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_r [\mu\text{m}]$	k
0,2	0,302	0,042	8768	-	-	-
0,4	0,266	0,033	22060	0,254	0,032	8921
0,6	0,241	0,028	8200	0,240	0,032	9340
0,8	0,223	0,023	3312	-	-	-

Tabelle 4.2: Mittlere Röhrenradien in der Kammer: Hier sind für die Kammer die Mittelwerte $\langle r \rangle$ der Röhrenradien, die Standardabweichungen σ_r sowie die Anzahl ausgewerteter Röhrenradien n aufgelistet.

$c[\text{mg/ml}]$	Kammer		
	$\langle r \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_r [\mu\text{m}]$	n
0,2	0,267	0,032	8301
0,4	0,252	0,038	22914
0,6	0,227	0,024	4158
0,8	0,210	0,022	4773

4.1.2 Statistischer Vergleich der Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopischen Kammer

Die Anwendung des Kolmogorov-Smirnov Signifikanztests auf die Röhrenradienverteilung liefert eine Aussage darüber, ob die Verteilungen in den unterschiedlichen Probengefäßen signifikant unterschiedlich sind.

In der Auswertung wurden die Röhrenbreiten entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8). In theoretischen Arbeiten von Glaser und Kroy wurde angenommen, dass auf einer gewissen Längenskala, der so genannten Segmentlänge $L_{\text{seg}} = 4 \cdot \langle r_{\text{korrr}} \rangle^{2/3} \cdot L_p^{1/3}$, der Röhrenradius konstant ist (vgl. Abschnitt 1.3.3) [50]. Dabei ist $L_p = 17 \mu\text{m}$ die Persistenzlänge und r_{korrr} sind die korrigierten Röhrenradien zur jeweiligen Aktinkonzentration in den Probengefäßen. Da die äquidistanten Abstände a entlang der Filamentkontur kleiner als die Segmentlänge L_{seg} sind, bestand die erste Aufgabe darin die Anzahl statistisch unabhängiger Röhrenradien zu bestimmen. Dazu wurde zu jeder Aktinkonzentration c die Anzahl der insgesamt ausgewerteten Röhrenradien m (bzw. k , n) bestimmt und in eine effektive Gesamtfilamentlänge $L_{\text{ges,m}} [\mu\text{m}]$ umgerechnet: $L_{\text{ges,m}} = m \cdot a$. Das Verhältnis dieser effektiven, gesamten Filamentlänge zur Segmentlänge legt die Stichprobengröße, also die Anzahl statistisch unabhängiger Röhrenradien M' , fest. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.3, 4.4 und 4.5 zusammengefasst. In den Tabellen 4.6 und 4.7 sind die Ergebnisse des Signifikanztests aufgelistet. Zunächst wird der Prüfwert

$$\text{PW} = \sqrt{\left(\frac{N' + M'}{N' \cdot M'}\right)} \quad (4.1)$$

berechnet. Die Prüfgröße

$$D = \sup |F_n(x) - F_m(x)| \quad (4.2)$$

wird mit MATLAB bestimmt. Ist die Prüfgröße D größer als der kritische Wert $D_{\text{krit.}} = k \cdot \text{PW}$ so sind die Verteilungen in der Kammer und der Kapillare zu einer fixen Konzentration c signifikant unterschiedlich. Für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% beträgt $k = 1,22$ [111]. Ein Vergleich zwischen der großen Kapillare und der Kammer ergibt, dass die Röhrenradienverteilungen zu jeder Aktinkonzentration signifikant unterschiedlich sind (vgl. Tabelle 4.6). Ein Vergleich beider Kapillaren zeigt, dass die Verteilungen für $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ signifikant unterschiedlich sind, für $c_{\text{Aktin}} = 0,6 \text{ mg/ml}$ jedoch nicht (vgl. Tabelle 4.7).

Tabelle 4.3: Bestimmung der Stichprobengröße der Röhrenradien in der großen Kapillare: Zu jeder Aktinkonzentration c wurde die Röhrenradienanzahl m bestimmt. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt. Daraus kann eine gesamte Filamentlänge $L_{\text{ges},m}$ berechnet werden. Die Stichprobengröße M' ist der Quotient aus $L_{\text{ges},m}$ und der Segmentlänge $L_{\text{seg},m}$.

große Kapillare				
c [mg/ml]	Röhrenradienanzahl m	Filamentlänge $L_{\text{ges},m}$ [μm]	Segmentlänge $L_{\text{seg},m}$ [μm]	Stichprobengröße M'
0,2	8768	569,92	4,33	132
0,4	22060	1433,90	3,88	369
0,6	8200	533,00	3,59	148
0,8	3312	215,28	3,30	65

Tabelle 4.4: Bestimmung der Stichprobengröße der Röhrenradien in der kleinen Kapillare: Zu jeder Aktinkonzentration c wurde die Röhrenradienanzahl k bestimmt. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt. Daraus kann eine gesamte Filamentlänge $L_{\text{ges},k}$ berechnet werden. Die Stichprobengröße K' ist der Quotient aus $L_{\text{ges},k}$ und der Segmentlänge $L_{\text{seg},k}$.

kleine Kapillare				
c [mg/ml]	Röhrenradienanzahl k	Filamentlänge $L_{\text{ges},k}$ [μm]	Segmentlänge $L_{\text{seg},k}$ [μm]	Stichprobengröße K'
0,2	-	-	-	-
0,4	8921	579,87	3,82	152
0,6	9340	607,10	3,65	166
0,8	-	-	-	-

Tabelle 4.5: Bestimmung der Stichprobengröße der Röhrenradien in der Kammer: Zu jeder Aktinkonzentration c wurde die Röhrenradienanzahl n bestimmt. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt. Daraus kann eine gesamte Filamentlänge $L_{\text{ges},n}$ berechnet werden. Die Stichprobengröße N' ist der Quotient aus $L_{\text{ges},n}$ und der Segmentlänge $L_{\text{seg},n}$.

Kammer				
c [mg/ml]	Röhrenradienanzahl n	Filamentlänge $L_{\text{ges},n}$ [μm]	Segmentlänge $L_{\text{seg},n}$ [μm]	Stichprobengröße N'
0,2	8301	539,57	3,94	137
0,4	22914	1489,41	3,76	396
0,6	4158	270,27	3,44	79
0,8	4773	310,25	3,18	98

Tabelle 4.6: Signifikanztest der Röhrenradienverteilungen $P(r)$ in der Kammer und großen Kapillare: Der Prüfwert PW ist durch die Stichprobengrößen bestimmt und legt die kritische Größe $D_{\text{krit.}}$ fest. Die Prüfgröße D ist durch das Supremum der kumulierten Verteilungen $F(r)$ definiert.

Signifikanztest von $P(r)$ in der Kammer und großen Kapillare				
c [mg/ml]	Prüfwert PW	Prüfgröße D	kritischer Wert $D_{\text{krit.}}$	
	$= \sqrt{\frac{(N'+M')}{(N' \cdot M')}}$	$= \sup F_n(r) - F_m(r) $	$= 1,22 \cdot \text{PW}$	
0,2	0,1220	0,3779	0,1488	$D > D_{\text{krit.}}$
0,4	0,0724	0,2072	0,0883	$D > D_{\text{krit.}}$
0,6	0,1393	0,2134	0,1700	$D > D_{\text{krit.}}$
0,8	0,1600	0,2384	0,1952	$D > D_{\text{krit.}}$

Tabelle 4.7: Signifikanztest der Röhrenradienverteilung $P(r)$ in beiden Kapillaren: Der Prüfwert PW ist durch die Stichprobengrößen bestimmt und legt die kritische Größe $D_{\text{krit.}}$ fest. Die Prüfgröße D ist durch das Supremum der kumulierten Verteilungen $F(r)$ definiert.

Signifikanztest von $P(r)$ in beiden Kapillaren				
c [mg/ml]	Prüfwert PW	Prüfgröße D	kritischer Wert $D_{\text{krit.}}$	
	$= \sqrt{\frac{(K'+M')}{(K' \cdot M')}}$	$= \sup F_k(r) - F_m(r) $	$= 1,22 \cdot \text{PW}$	
0,2	-	-	-	-
0,4	0,0963	0,1472	0,1175	$D > D_{\text{krit.}}$
0,6	0,1131	0,0739	0,1379	$D < D_{\text{krit.}}$
0,8	-	-	-	-

4.1.3 LSF-korrigierte Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopischen Kammer

In Abbildung 4.4 sind die LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in der großen Kapillare und in der Kammer dargestellt. Wie bereits bei den Rohdaten gezeigt, sind die Röhrenradienverteilungen mit zunehmender Aktinkonzentration in beiden Probengefäßen zu kleineren Werten verschoben. In Abbildung 4.5 werden die Verteilungen zu jeweils einer Aktinkonzentration in beiden Probengefäßen gegenübergestellt. Für die Kammer sind auch die LSF-korrigierten Verteilungen der Röhrenradien verglichen zu denjenigen in der großen Kapillare zu kleineren Werten verschoben. In Abbildung 4.6 werden die Röhrenradienverteilungen zu den Aktinkonzentrationen $c_{\text{Aktin}} = 0,4$ mg/ml und $c_{\text{Aktin}} = 0,6$ mg/ml verglichen, welche für beide Kapillaren berechnet wurden. Beide Verteilungen überdecken sich fast vollständig.

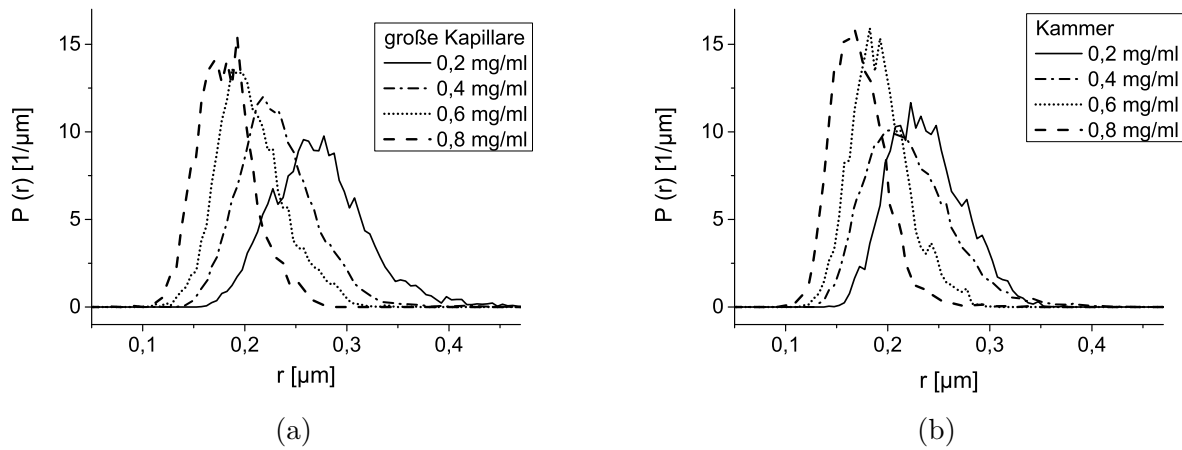


Abbildung 4.4: LSF-korrigierte Röhrenradienverteilungen in der großen Kapillare und in der makroskopischen Kammer: Mit zunehmender Aktinkonzentration verschieben sich die Röhrenradien in beiden Probengefäßen zu kleineren Werten. Die Röhrenradienanzahl ist in den Tabellen 4.8 und 4.9 aufgelistet.

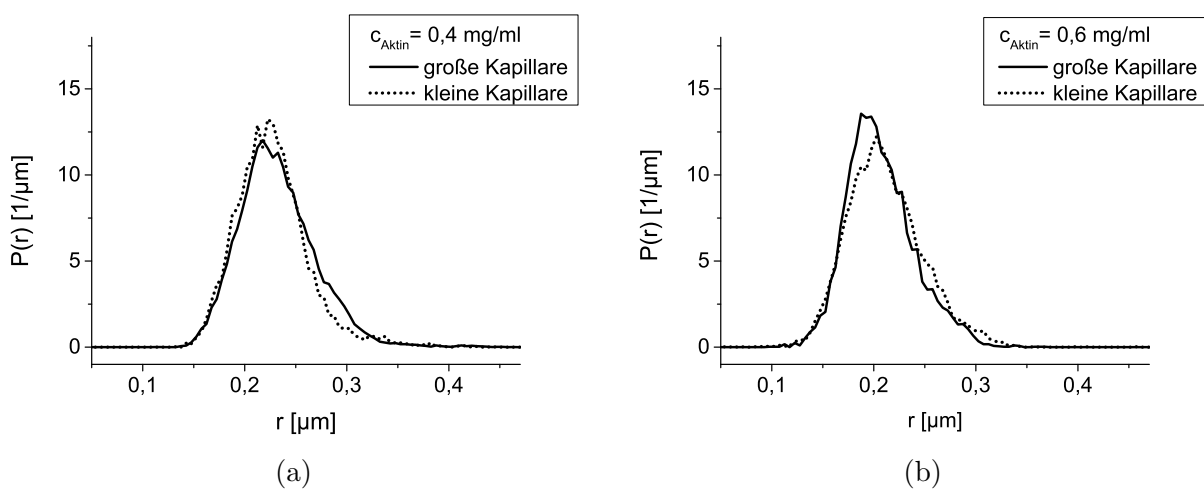


Abbildung 4.6: Vergleich der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in beiden Kapillaren: Die Verteilungen zu jeweils einer Konzentration liegen übereinander.

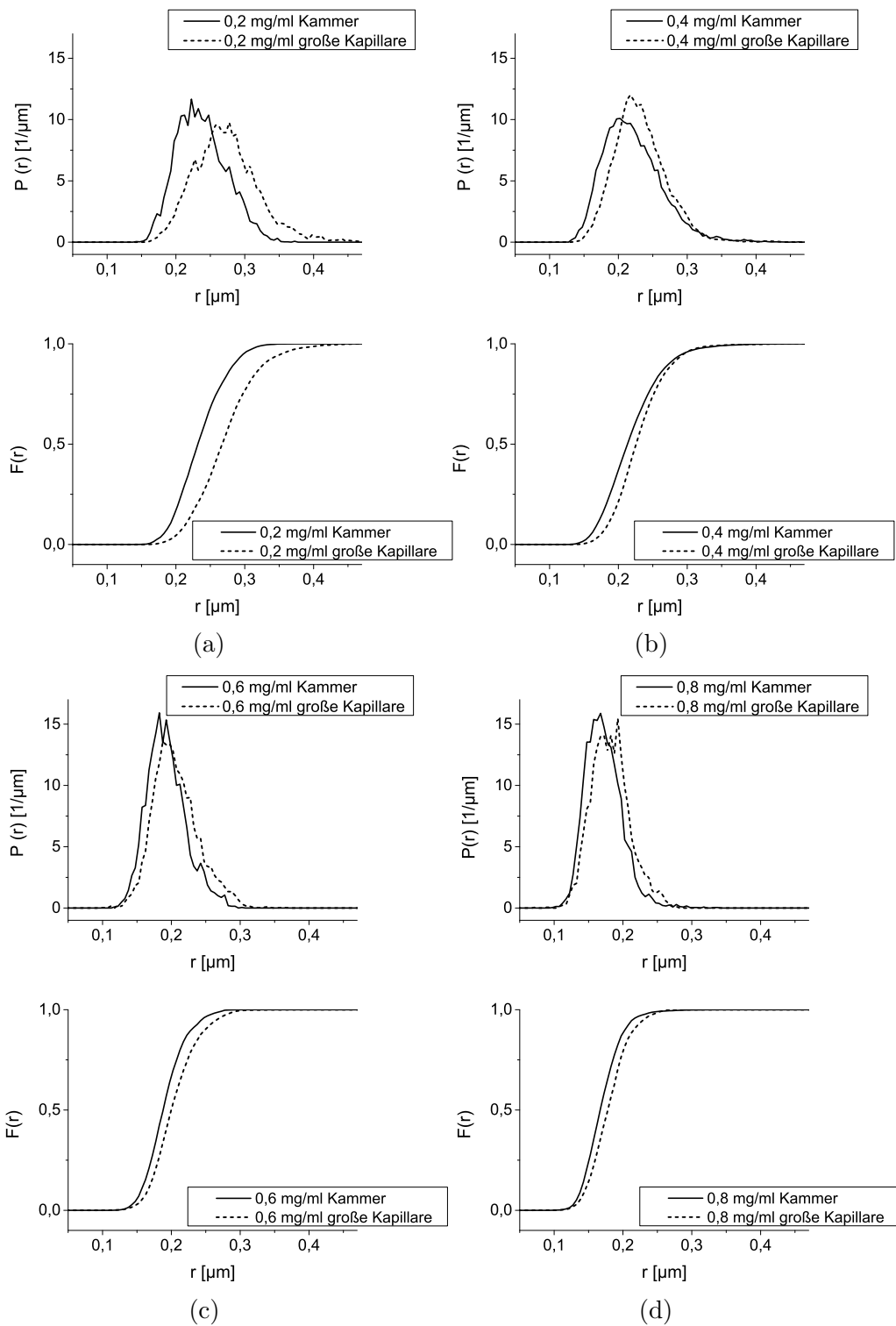


Abbildung 4.5: Vergleich der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in der großen Kapillare und der makroskopischen Kammer zu allen Aktinkonzentrationen: Zu jeder Aktinkonzentration verschieben sich die Röhrenradien in der Kammer zu kleineren Werten relativ zu denen in der Kapillare.

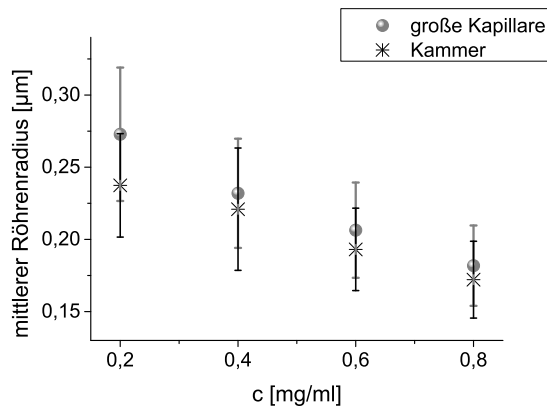


Abbildung 4.7: Mittlerer Röhrenradius in Abhängigkeit der Aktinkonzentration: Die Streuung um den Mittelwert $\langle r_{\text{korrr}} \rangle$ entspricht der Standardabweichung $\sigma_{r_{\text{korrr}}}$ nach Mittelung aller Röhrenradien r_{korrr} zu je einer Aktinkonzentration pro Probengefäß.

In den Tabellen 4.8 und 4.9 sind die mittleren LSF-korrigierten Röhrenradien $\langle r \rangle$ und die Standardabweichungen σ_r der Röhrenradien in allen Probengefäßen zusammengefasst und in Abbildung 4.7 abgebildet. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8).

Tabelle 4.8: Mittlere LSF-korrigierte Röhrenradien in den Kapillaren: Hier sind für beide Kapillaren die Mittelwerte $\langle r_{\text{korrr}} \rangle$ der Röhrenradien, die Standardabweichungen $\sigma_{r_{\text{korrr}}}$ sowie die Anzahl ausgewerteter Röhrenradien m bzw. k aufgelistet.

c[mg/ml]	große Kapillare			kleine Kapillare		
	$\langle r_{\text{korrr}} \rangle$ [µm]	$\sigma_{r_{\text{korrr}}}$ [µm]	m	$\langle r_{\text{korrr}} \rangle$ [µm]	$\sigma_{r_{\text{korrr}}}$ [µm]	k
0,2	0,273	0,046	8768	-	-	-
0,4	0,232	0,038	22060	0,227	0,036	8921
0,6	0,206	0,033	8200	0,211	0,037	9340
0,8	0,182	0,028	3312	-	-	-

Tabelle 4.9: Mittlere LSF-Röhrenradien in der Kammer: Hier sind für die Kammer die Mittelwerte $\langle r_{\text{korrr}} \rangle$ der Röhrenradien, die Standardabweichungen $\sigma_{r_{\text{korrr}}}$ sowie die Anzahl ausgewerteter Röhrenradien n aufgelistet.

c[mg/ml]	Kammer		
	$\langle r_{\text{korrr}} \rangle$ [µm]	$\sigma_{r_{\text{korrr}}}$ [µm]	n
0,2	0,237	0,036	8301
0,4	0,221	0,042	22914
0,6	0,193	0,029	4158
0,8	0,172	0,027	4773

4.1.4 Statistischer Vergleich der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in den Kapillaren und der makroskopischen Kammer

Der Signifikanztest wird analog zu den Rohdaten durchgeführt. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt. Dieser Abstand ist kleiner als die Segmentlänge, von welcher angenommen wird, dass auf dieser Längenskala der Röhrenradius konstant ist. Somit wurde zuerst analog Abschnitt 4.1.2 die Anzahl statistisch unabhängiger Röhrenradien bestimmt. Die Anzahl ausgewerteter LSF-korrigierter Röhrenradien entspricht denen der Rohdaten (vgl. Tabellen 4.3, 4.4 und 4.5). Somit ist die Stichprobengröße, also die Anzahl statistisch unabhängiger Röhrenradien, der LSF-korrigierten Daten verglichen zu den Rohdaten identisch.

Die Prüfgröße D wird mit MATLAB bestimmt. Ein Vergleich der Prüfgröße D mit dem kritischen Wert D_{krit} ergibt, dass alle Röhrenradienverteilungen für jede Aktinkonzentration signifikant unterschiedlich sind, mit Ausnahme der Verteilungen zu $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$. Die Verteilungen in beiden Kapillaren überlappen und sind nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Tabelle 4.11).

Tabelle 4.10: Signifikanztest der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen $P(r_{\text{korr}})$ in der Kammer und der großen Kapillare: Der Prüfwert PW ist durch die Stichprobengröße bestimmt und legt die kritische Größe D_{krit} fest. Die Prüfgröße D ist durch das Supremum der kumulierten Verteilungen $F(r)$ definiert.

Signifikanztest von $P(r_{\text{korr}})$ in der Kammer und großen Kapillare				
c [mg/ml]	Prüfwert PW	Prüfgröße D	kritischer Wert D_{krit}	
	$= \sqrt{\frac{(N'+M')}{(N' \cdot M')}}}$	$= \sup F_n(r_{\text{korr}}) - F_m(r_{\text{korr}}) $	$= 1,22 \cdot \text{PW}$	
0,2	0,1220	0,6040	0,1488	$D > D_{\text{krit}}$
0,4	0,0724	0,1601	0,0883	$D > D_{\text{krit}}$
0,6	0,1393	0,1702	0,1700	$D > D_{\text{krit}}$
0,8	0,1600	0,1586	0,1952	$D > D_{\text{krit}}$

Tabelle 4.11: Signifikanztest der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilung $P(r_{\text{korrr}})$ in beiden Kapillaren: Der Prüfwert PW ist durch die Stichprobengröße bestimmt und legt die kritische Größe $D_{\text{krit.}}$ fest. Die Prüfgröße D ist durch das Supremum der kumulierten Verteilungen $F(r)$ definiert.

Signifikanztest von $P(r_{\text{korrr}})$ zu beiden Kapillaren				
c [mg/ml]	Prüfwert PW	Prüfgröße D	kritischer Wert $D_{\text{krit.}}$	
	$= \sqrt{\frac{(K'+M')}{(K' \cdot M')}}}$	$= \sup F_k(r_{\text{korrr}}) - F_m(r_{\text{korrr}}) $	$= 1,22 \cdot \text{PW}$	
0,2	-	-	-	-
0,4	0,0963	0,0719	0,1175	$D < D_{\text{krit.}}$
0,6	0,1131	0,0690	0,1379	$D < D_{\text{krit.}}$
0,8	-	-	-	-

4.1.5 Vergleich zwischen Experimenten und Theorie

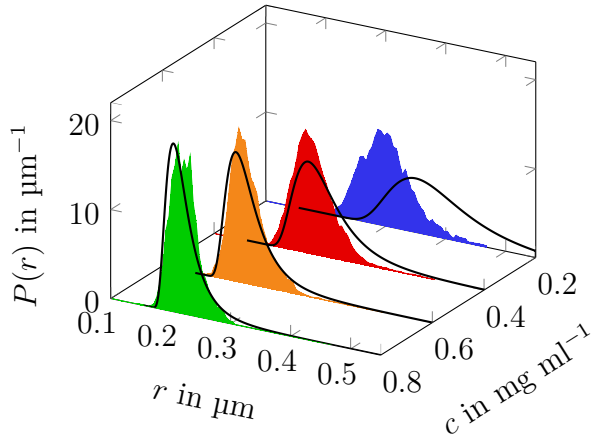
In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Röhrenradienverteilung mit denen der SMF-Theorie (vgl. Abschnitt 1.3.3) verglichen. In der Abbildung 4.8 ist die Anpassung der SMF-Theorie gemäß Gleichung 1.10 an die experimentell bestimmten Röhrenradienverteilungen dargestellt. Die Fitparameter sind dabei zum einen das Verhältnis von Kontur- und Verschlaufungslänge $\epsilon_L = L/L_e$ und zum anderen die Konturlängendichte $\rho_0 = c \cdot L$, wobei $\epsilon_L = 1$ und $\rho_0 = 39 \mu\text{m}^{-2} \cdot c [\text{mg/ml}]$ erwartet wird [48, 95].

Für Aktinkonzentrationen von $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ bis $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ stimmen Theorie und Experiment sehr gut überein, wobei dies nicht für die Anpassung bei $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ gilt. Für beide Fitparameter resultieren nach Anpassung der Funktion gemäß Gleichung 1.10 an die Verteilungen der Röhrenradien in der großen Kapillare und in der Kammer kleinere Werte als erwartet (vgl. Tabelle 4.12). Die Konturlängenkonzentration ist bis zu $6,4\times$ kleiner als erwartet und ϵ_L nur halb so groß wie vorausgesagt.

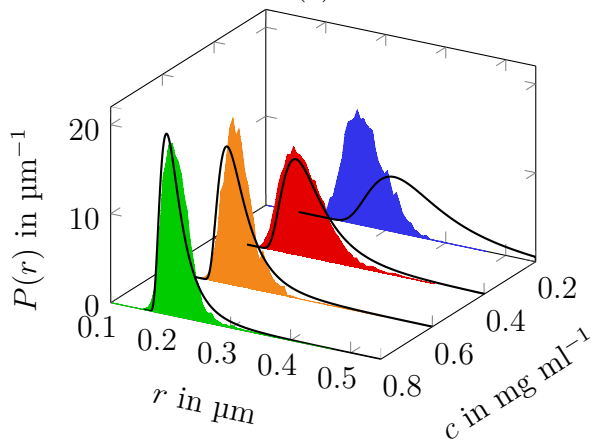
Tabelle 4.12: Ergebnisse der Fitparameter nach Anpassung der Funktion analog Gleichung 1.10.

Probengefäß	ϵ_L	$\rho_0 [\mu\text{m}^{-2}\text{mg/ml}]$
Kapillare	0,55	6,11
Kammer	0,42	7,47

Da die SMF-Theorie für die Röhrenradienverteilung eine isotrope Verteilung der Filamente voraussetzt, wurde in einem nächsten Schritt die Ordnung der Filamente berücksichtigt, indem die Paarkollisionen in der BCA-Rechnung entsprechend angepasst wurden. Dazu wurde, analog zu Onsagers Vorgehensweise bei der Beschreibung nematischer Lösungen, eine Verteilung der Winkel zwischen den zwei kollidierenden Polymersegmenten eingeführt und über alle möglichen Paarkonfigurationen gemittelt. Es liegt nahe, diese Verteilung durch die von Onsager hergeleitete Ansatzfunktion zu approximieren. Damit erhält man mit dem Ordnungsparameter S' , gemäß Gl. 1.14 direkt aus der Winkelverteilung einen weiteren freien Fitparameter S' für die Röhrenradienverteilung. In Abbildung 4.9 sind die theoretischen an die experimentellen Verteilungen angepasst. Die Anpassung scheinen durch den dritten, freien Parameter geeigneter zu sein. Die Fitparameter ϵ_L und ρ_0 sind verglichen zu der Anpassung ohne Berücksichtigung der Filamentorientierung zwar größer, jedoch immer noch kleiner als erwartet (vgl. Tabelle 4.13). Der aus diesen Anpassungen erhaltene Wert für S' wird in den Abbildungen 4.10 und 4.11 mit den aus den Experimenten bestimmten Ordnungsparametern für die Kammer und die große Kapillare (vgl.



(a)



(b)

Abbildung 4.8: Vergleich der SMF- Theorie mit den Ergebnissen der experimentell bestimmten Röhrenradienverteilungen: In (a) sind die Ergebnisse der Anpassung an die Röhrenradienverteilungen, welche für die große Kapillare bestimmt wurden, angepasst und in (b) für diejenigen in der Kammer (Bilder bereitgestellt von Marc Lämmel, Universität Leipzig).

Abschnitt 3.1.2) verglichen. Ein Vergleich der Ordnungsparameter für die Kapillare zeigt, dass der theoretisch bestimmte Ordnungsparameter vergleichbar mit den experimentell bestimmten Werten ist, wenn die Filamente Längen zwischen $20 \mu\text{m}$ und $25 \mu\text{m}$ aufweisen. Für die Kammer liegen die theoretisch bestimmten Werte für den Ordnungsparameter bei wesentlich höheren Werten, als in den Experimenten beobachtet wurden.

Tabelle 4.13: Ergebnisse der Fitparameter nach Anpassung von Gleichung 1.10, wobei der Ordnungsparameter als zusätzlicher Fitparameter gewählt wurde.

Probengefäß	ϵ_L	ρ_0 [$\mu\text{m}^{-2}\text{mg/ml}$]
Kapillare	0,76	11,5
Kammer	0,60	14,2

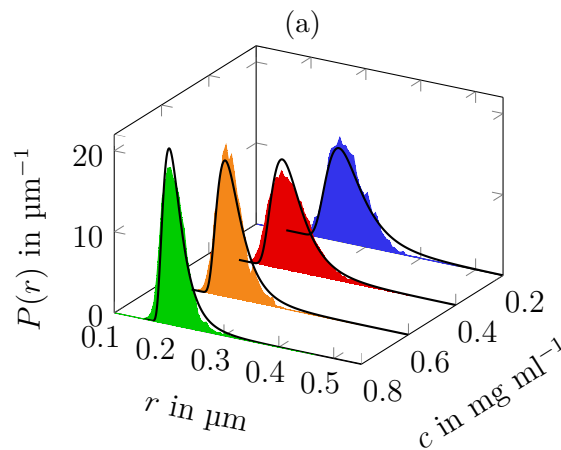
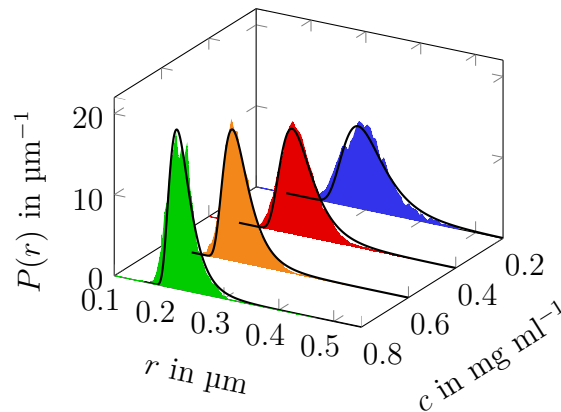


Abbildung 4.9: Vergleich der SMF- Theorie mit den Ergebnissen der experimentell bestimmten Röhrenradienverteilung, wobei die Ordnung als zusätzlich freier Parameter gewählt wurde. In (a) sind die Ergebnisse der Anpassung an die Röhrenradienverteilungen, welche für die große Kapillare bestimmt wurden, angepasst und in (b) für diejenigen in der Kammer (Bilder bereitgestellt von Marc Lämmel, Universität Leipzig).

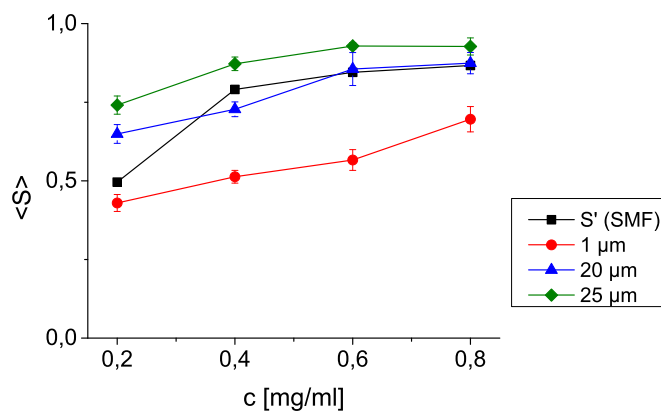


Abbildung 4.10: Vergleich der aus den Experimenten resultierenden, mittleren Ordnungsparameter mit den theoretisch bestimmten Ordnungsparametern S' für die große Kapillare.

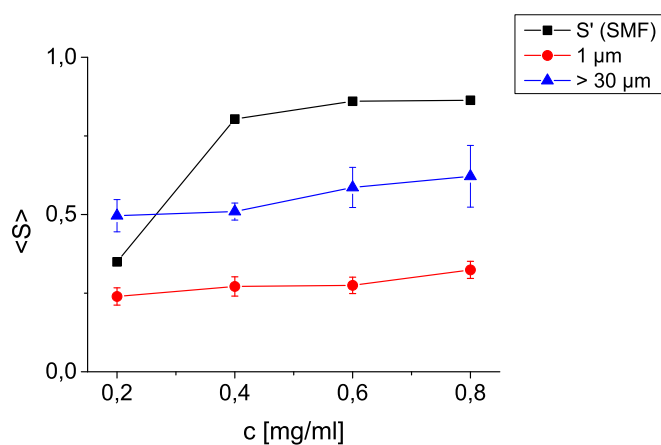


Abbildung 4.11: Vergleich der aus den Experimenten resultierenden, mittleren Ordnungsparameter mit den theoretisch bestimmten Ordnungsparametern S' für die Kammer.

5 Flüssigkeitsdynamik in der Kapillare

5.1 Theorie der Kapillarbefüllung

Die Beschreibung der Probenpräparation in Abschnitt 2.2 fasst zusammen, wie Kapillaren mit Aktinlösung gefüllt werden. Durch die Verwendung dieser Mikrokapillaren werden die Aktinfilamente erheblichen Kräften ausgesetzt. „Selbst wenn die mittleren Füllgeschwindigkeiten klein sind, können die Scherraten aufgrund der Nähe der Kapillarwände sehr groß werden“ (frei übersetzt nach [11]). Der Fokus dieses Abschnitts wird auf die Abschätzung der auf die Filamente wirkenden Kräfte während des Befüllens gelegt. Daher wird im Folgenden eine kurze Einführung in die Mikrofluidik gegeben.

Um die Lösungsfindung von komplexen Systemen zu vereinfachen, wurden dimensionslose Größen eingeführt, welche die Relationen von Kräften oder Energien beschreiben. Die erste Größe ist die Reynoldszahl

$$Re = \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{viskose Kräfte}} = \frac{\text{dynamischer Druck}}{\text{Scherspannung}} = \frac{\rho \cdot v \cdot H}{\mu} = \frac{\rho \cdot v^2}{\mu \cdot v/H}, \quad (5.1)$$

wobei ρ die Dichte, v die Füllgeschwindigkeit, H die Kapillarhöhe und μ die dynamische Viskosität ist [11]. Sie ist das Verhältnis der Trägheitskraft zu viskosen Kräften oder gleichbedeutend das Verhältnis des dynamischen Drucks zur Scherspannung. Das Studium der Strömungsmechanik mit kleinen Reynoldszahlen ($Re \ll 20$) wird Mikrohydrodynamik genannt. Bei solch kleinen Werten für Re ist die Strömung laminar [11].

Eine weitere dimensionslose Größe ist die Kapillarzahl

$$Ca = \frac{\text{viskose Kraft}}{\text{Oberflächenspannungskraft}} = \frac{\text{viskose Kraft}}{\text{Kapillarkräfte}} = \frac{v \cdot \mu}{\gamma}, \quad (5.2)$$

wobei γ die Oberflächenspannung ist [11, 63]. Die Kapillarzahl Ca vergleicht die viskose Kraft mit der Oberflächenspannungskraft bzw. mit der Kapillarkraft. Je kleiner Ca ist, desto kleiner ist der Effekt des dynamischen Kontaktwinkels [38].

Weiterhin kann die Bond-Zahl (engl. Bond number, kurz Bo) mit der Gravitationsbeschleunigung $g = 9,8 \text{ m/s}^2$ bestimmt werden

$$Bo = \frac{\text{Schwerkraft}}{\text{Oberflächenspannungskraft}} = \frac{\rho \cdot g \cdot H^2}{\gamma}. \quad (5.3)$$

Sie gibt das Verhältnis von Schwerkraft zur Oberflächenspannungskraft wieder [63].

Um die Geschwindigkeiten und Druckabfälle in der Kapillare bestimmen zu können, müssen die Navier-Stokes-Gleichungen gelöst werden. Eine numerische Lösung für rechteckige Kapillaren ergibt ein parabolisches Flussprofil, wobei die Herleitung in [122, 10] beschrieben ist.

Die Oberflächenspannung γ ist eine Kraft pro Längeneinheit [N/m] bzw. die pro Fläche gespeicherte freie Enthalpie [J/m²]. In Abbildung 5.1a sind die spezifischen Grenzflächenenergien der Grenzflächen gasförmig, flüssig und fest dargestellt. Aus der Energieminimierung folgt das Gesetz von Young [138, 25]:

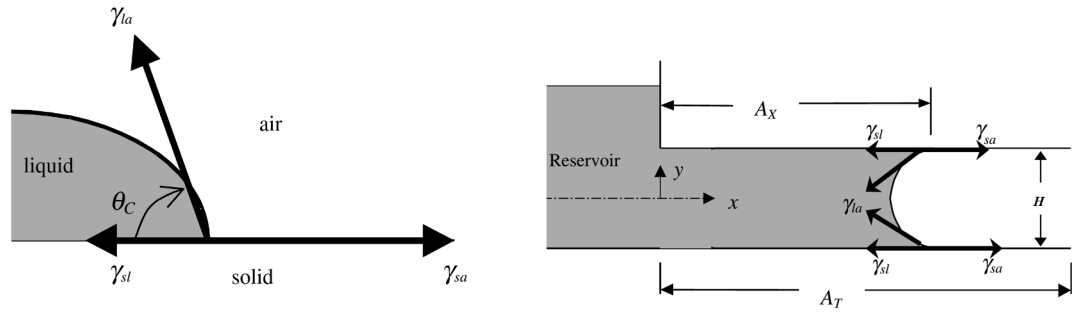
$$\gamma_{sa} = \gamma_{sl} + \gamma_{la} \cos(\Theta_c), \quad (5.4)$$

wobei Θ_c der Kontaktwinkel ist. Nach Yang et al. [150] setzt sich die gesamte Energie in der Mikrokapillare aus Abbildung 5.1b aus vier Energieanteilen zusammen: $E_{\text{ges}} = E_0 + E_1 + E_2 + E_3$. E_0 ist die im Reservoir gespeicherte Energie. E_1 beschreibt die Grenzflächenenergie fest/gasförmig. E_2 ist die Grenzflächenenergie fest/flüssig und der letzte Energieterm E_3 besteht aus der Grenzflächenenergie flüssig/gasförmig. Nach Yang et al. [150] und Huang et al. [63] kann das Laplace Gesetz für Mikrokapillaren aus der Minimierung dieser Energie $F_{ges} = -dE_{ges}/dx$ berechnet werden zu

$$\Delta p = \frac{2(H + W)\gamma \cdot \cos(\Theta_c)}{WH}, \quad (5.5)$$

wobei W die Weite und H die Höhe der Kapillare sind.

Wenn eine Kapillare in ein Gefäß mit Flüssigkeit eingetaucht wird, dann erfolgt ein Anstieg der Flüssigkeit in einer Kapillare nach Jurins Gesetz, wenn $\gamma_{sa} > \gamma_{sl} + \gamma_{la} \cos(\Theta_c)$. Das System gewinnt an potentieller Energie, während der Meniskus in der Kapillare steigt und verliert dabei gleichzeitig an Grenzflächenenergie [11, 23]. Die Zeitabhängigkeit des Befüllens von Kapillaren bzw. der Position der Meniskusfront $L(t)$ wurde zuerst von Washburn und Lucas studiert [139, 87] und von Dreyer, Stange und Fries erweitert [34, 127, 44]. In der Veröffentlichung von Fries und Dreyer [44] ist detailliert die Zeitabhängigkeit der Kapillarbefüllung abhängig von den jeweils dominierenden Kräften in drei Zeitregimen eingeteilt. Nach Dreyer und Huang gilt für das erste Zeitregime, $L_1(t) \propto t^2$, für das zweite



(a) Grenzflächen eines Tropfens; a steht für air (dt. Luft), s für solid (dt. fest) und l für liquid (dt. flüssig); γ_{ij} repräsentiert die Oberflächenspannung der jeweiligen Grenzschicht i, j , Θ_C ist der Kontaktwinkel; modifiziert übernommen von [150].

(b) Die Skizze einer Mikrokapillare; das Reservoir ist links abgebildet; H ist die Kapillarlänge, A_x ist die benetzte Fläche der Länge x , A_T ist gesamte Fläche der Kapillarlänge l ; modifiziert übernommen von [150].

Abbildung 5.1: Youngs Gesetz und Darstellung der Oberflächenspannung in einer Mikrokapillare.

Zeitregime $L_2(t) \propto t$ und für das Dritte $L_3(t) \propto t^{1/2}$, welches dem Lucas-Washburn Gesetz entspricht [34, 63].

Wenn der Fluss durch die Kapillare eine stationäre Strömung ist, dann verschwindet die resultierende Kraft auf ein innerhalb der Kapillare befindliches Volumenelement, welches durch die Kapillarwände begrenzt ist. Die durch den hydrostatischen Druckgradienten $\partial P/\partial z$ resultierende Kraft wird durch den Reibungswiderstand der Flüssigkeit mit den Kapillarwänden ausgeglichen. Diese Reibungskraft ist die auf die Kapillarwand wirkende Scherspannung [17, 125]. Nach Son kann daraus für rechteckige Kapillaren die im Bezug auf den Umfang gemittelte Wandscherspannung

$$\tau_w = \left(\frac{\Delta p}{2L} \right) \left(\frac{WH}{H+W} \right) = \left(\frac{\Delta p H}{2L} \right) \left(\frac{1}{H/W + 1} \right) \quad (5.6)$$

hergeleitet werden [125]. Für Newtonsche Flüssigkeiten gilt der Zusammenhang zwischen Scherspannung, τ , und Scherrate, $\dot{\gamma}$,

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma}, \quad (5.7)$$

wobei μ die dynamische Viskosität ist. Für sowohl Newtonsche als auch nicht-Newtonsche Flüssigkeiten kann die scheinbare Scherrate (engl. apparent shear rate), $\dot{\gamma}_a$, nach

White [145] bestimmt werden zu:

$$\gamma_a = \left(\frac{6Q}{WH^2} \right) \left(1 + \left(\frac{H}{W} \right) \right) \cdot f^* \left(\frac{H}{W} \right), \quad (5.8)$$

mit dem Volumenstrom $Q = A \langle v \rangle = WH \langle v \rangle$. Die Funktion $f^* \left(\frac{H}{W} \right)$ ändert sich dabei mit den geometrischen Abmessungen der Kapillare. Für das Verhältnis Kapillarahöhe H zu Kapillarweite W $H/W = 0,05$ beträgt $f^*(0,05) = 0,9365$ [53, 125].

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Bestimmung der Füllgeschwindigkeit und des Kontaktwinkels

In diesem Abschnitt wird die Geschwindigkeit bestimmt, mit welcher die Kapillare die Aktinlösung einsaugt. In Abbildung 5.2 ist eine Momentaufnahme des Meniskus und eine Zeitserie für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ dargestellt. Der Ausschnitt der Kapillare, welcher aufgenommen wurde, entspricht der Mitte der Kapillare, da in dieser die Fluktuationen der Aktinfilamente bestimmt wurden.

Die Daten wurden in FIJI eingelesen. Eine horizontale Linie wurde innerhalb der Kapillare eingezeichnet und der Verlauf des Grauwerts entlang der Linie in Abhängigkeit der Zeit ausgewertet (vgl. Abbildung 5.3). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer von Georg Dreissen, ICS-7, geschriebenen MATLAB-Funktion. Mit Hilfe dieser wurden die Positionen des Meniskus auf der Linie in Abhängigkeit der Zeit ausgegeben. Die Positionen bzw. die Distanz, die der Punkt auf dem Meniskus über die Zeit entlang der Linie zurückgelegt hat, ist in Abbildung 5.3c gezeigt.

Das Profil des Meniskus war nicht bei jeder Kapillarbefüllung symmetrisch. Daher wurden im oberen, mittleren und unteren Teil der Kapillare Linien eingezeichnet und der zeitliche Verlauf der Menisken entlang dieser drei Linien bestimmt. Für jede verwendete Kapillare wurden demnach drei Geschwindigkeiten ermittelt.

Da sich die Füllgeschwindigkeiten zu unterschiedlichen Aktinkonzentrationen nicht signifikant unterschieden, wurde über alle Konzentrationen und alle drei Positionen in der Kapillare gemittelt.

Für 17 unterschiedliche große Kapillaren wurden insgesamt 51 Geschwindigkeiten bestimmt. Für diese große Kapillare resultiert eine mittlere Füllgeschwindigkeit von $\langle v_{\text{gr., Aktin}} \rangle = 24 \text{ mm/s}$ ($\sigma = 3 \text{ mm/s}$). Für 18 unterschiedliche kleine Kapillaren wur-

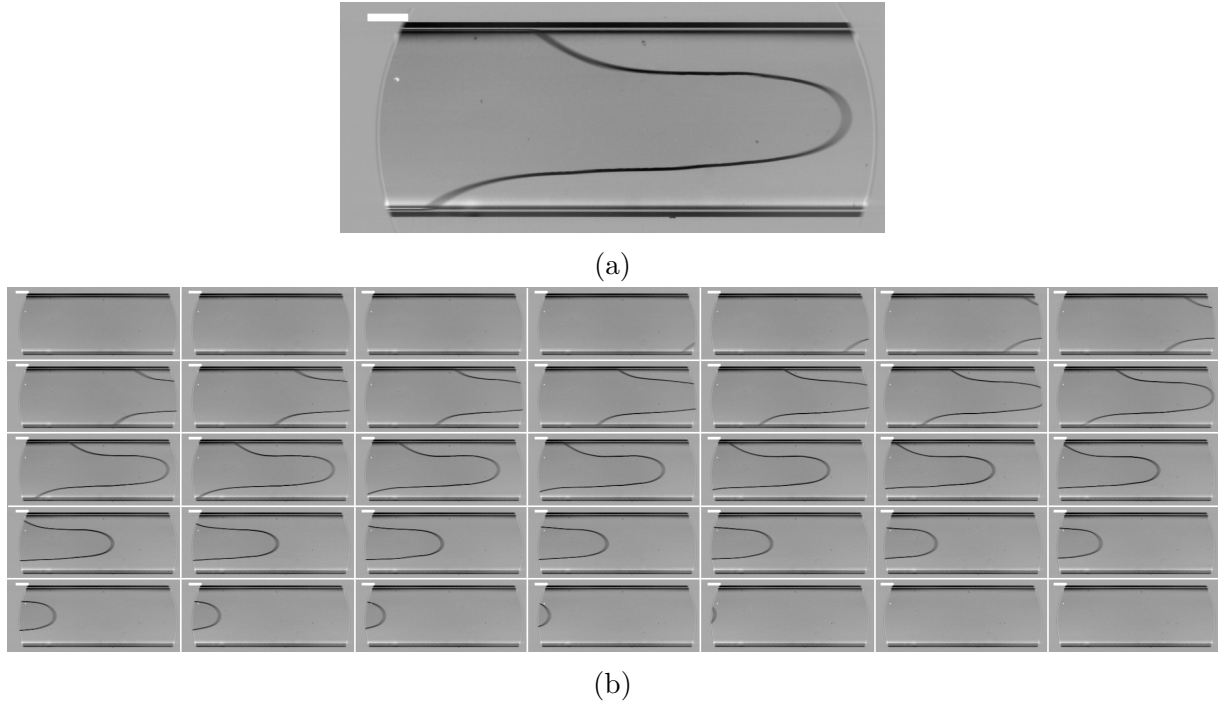


Abbildung 5.2: Beispiel zur Kapillarbefüllung für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ in der großen Kapillare: in (a) ist der gesamte Meniskus zu einem willkürlich gewählten Zeitpunkt dargestellt. Die Aktinlösung wird von rechts in die Kapillare eingesaugt. Die Linien an den abgebildeten Kapillarenden zeigen den Rand des kreisförmigen Gesichtsfeldes; in (b) ist die Zeitserie im Zeitabstand von $\Delta t = 0,01 \text{ s}$ abgebildet, welche den Prozess der Kapillarbefüllung zeigt. Maßstab = $0,5 \text{ mm}$.

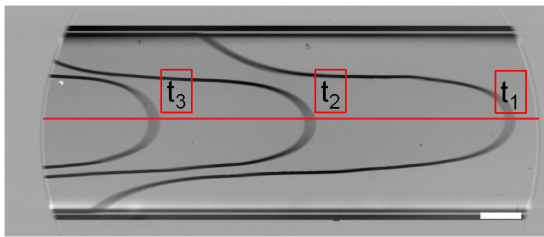
den insgesamt 54 Geschwindigkeiten bestimmt. Für diese kleine Kapillare resultiert eine mittlere Füllgeschwindigkeit von $\langle v_{\text{kl., Aktin}} \rangle = 8 \text{ mm/s}$ ($\sigma = 3 \text{ mm/s}$).

Zusätzlich wurde die mittlere Füllgeschwindigkeit der Kapillaren mit hochreinem Wasser bestimmt. Sowohl in der kleinen als auch in der großen Kapillare wurden neun Geschwindigkeiten bestimmt. Für die große Kapillare resultiert eine mittlere Füllgeschwindigkeit von $\langle v_{\text{gr., H}_2\text{O}} \rangle = 20 \text{ mm/s}$ ($\sigma = 5 \text{ mm/s}$). Für die kleine Kapillare resultiert $\langle v_{\text{kl., H}_2\text{O}} \rangle = 11 \text{ mm/s}$ ($\sigma = 1 \text{ mm/s}$).

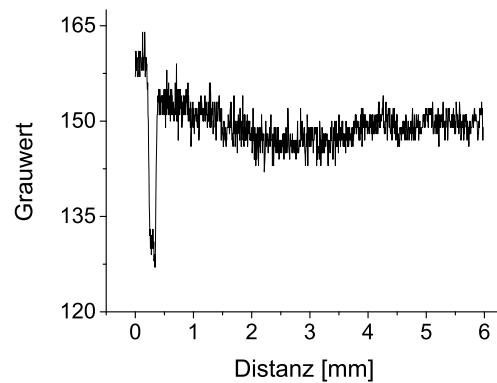
In den Kapillaren wurden mit der Software FIJI insgesamt n_{Θ_c} Kontaktwinkel bestimmt. Nach Mittelung über alle Konzentrationen resultiert ein mittlerer Kontaktwinkel für Aktinlösungen $\langle \Theta_{\text{gr.}} \rangle = 40^\circ$ ($\sigma = 13^\circ, n_{\Theta_c} = 33$) für die große Kapillare und $\langle \Theta_{\text{kl.}} \rangle = 46^\circ$ ($\sigma = 11^\circ, n_{\Theta_c} = 35$) für die kleine Kapillare.

5.2.2 Bestimmung der Oberflächenspannung

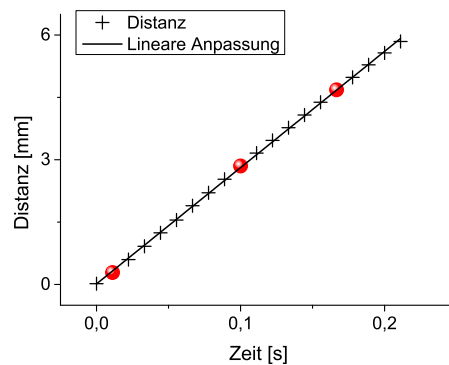
Die Oberflächenspannung γ wird von den Aktinlösungen zu den Konzentrationen $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ bestimmt. Zu jeder Konzentration werden zwei



(a) Überlagerung von Bildern zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten t_1 , t_2 und t_3 während der Kapillarfällung. Der Verlauf des Meniskus wurde über die Zeit entlang der roten Linie bestimmt; Maßstab = 0,5 mm.



(b) Grauwertverteilung entlang der roten Linie aus (a) zum Zeitpunkt t_1 .



(c) Geschwindigkeitsverlauf des Meniskus in der großen Kapillare: Die roten Punkte entsprechen den Zeitpunkten der Menisken auf der in (a) eingezeichneten roten Linie.

Abbildung 5.3: Beispiel zur Auswertung des Geschwindigkeitsverlaufs in der großen Kapillare.

unabhängige Proben angesetzt und zu jeder Probe fünf bzw. sechs Messungen durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.5). Ein Beispiel für eine Kraftkurve ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Während der Zeit, in welcher das Filterpapier die Aktinlösung nicht berührt, ist die Gewichtskraft der Aktinlösung konstant. Sobald die Aktinlösung das Filterpapier benetzt, sinkt der Wägewert. Das Filterpapier verbleibt 5 Sekunden in der Lösung bzw. an der Oberfläche und wird anschließend wieder hochgefahren. Instantan mit dem Reißen der Benetzung nimmt der Wägewert wieder zu. Dabei ist vor und nach Benetzung ein Unterschied der Gewichtskraft von 10 mg an Aktinlösung durch Verdunstung zu verzeichnen. Die durch die Kreuze markierten Stellen in der Kraftkurve geben den Wägeunterschied ΔM an, aus welchem mit Hilfe des Umfangs die Oberflächenspannung gemäß Gl. 2.2

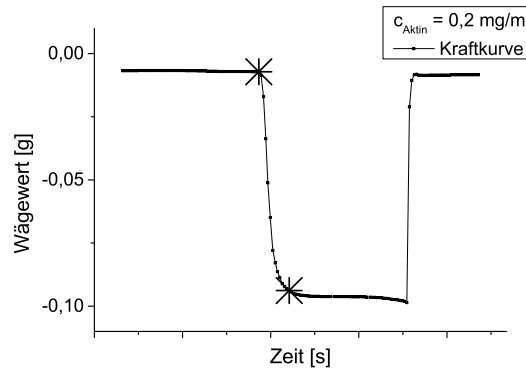


Abbildung 5.4: Kraftkurve zur Bestimmung der Oberflächenspannung für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$: Sobald die Aktinlösung das Filterpapier benetzt, nimmt der Wägewert ab. Die durch die Kreuze markierten Stellen in der Kraftkurve geben den Kraftunterschied an, aus welchem die Oberflächenspannung abgeschätzt werden kann.

Tabelle 5.1: Insgesamt wurden zu einer Probe N_{ges} Messungen gemacht. Daraus kann die mittlere Unterschied der Gewichtskraft $\langle \Delta M \rangle \pm \sigma_{\Delta M} [\text{mg}]$ berechnet werden. Zudem ist der Umfang des Filterpapiers angegeben.

c [mg/ml]	N_{ges}	$\langle \Delta M \rangle [\text{mg}]$	$\sigma_{\Delta M} [\text{mg}]$	$U_{\text{Filter}} [\text{mm}]$
0,2	5	87,36	0,70	18,98
0,2	5	81,66	0,43	19,12
0,8	5	91,62	1,31	18,94
0,8	6	89,92	1,06	19,16

berechnet werden kann (vgl. Abbildung 5.4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 und 5.2 zusammengefasst. Aus der Mittlung beider Proben pro Konzentration folgt eine Oberflächenspannung von $\langle \gamma_{02} \rangle = 44 \pm 2 \text{ mN/m}$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $\langle \gamma_{08} \rangle = 47 \pm 1 \text{ mN/m}$ für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$.

5.2.3 Bestimmung dimensionsloser Größen in der Mikrofluidik

Die Ergebnisse dieses Abschnitts sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

In diesem Kapitel stehen die Indizes c=gr. bzw. c=kl. für die jeweils verwendete große Kapillare und kleine Kapillare. Mit der Gravitationsbeschleunigung $g = 9,8 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$, der Kapillarehöhe $H_{\text{gr.}} = 0,1 \text{ mm}$ bzw. $H_{\text{kl.}} = 0,05 \text{ mm}$ und der Oberflächenspannung $\gamma_{08} = 47 \text{ mN/m}$ bzw. $\gamma_{0,2} = 44 \text{ mN/m}$ konnte die Bond-Zahl gemäß der Gl. 5.3 bestimmt werden. Das Ergebnis ist $Bo_{02,\text{gr.}} = 4,5 \cdot 10^{-7}$ bzw. $Bo_{08,\text{gr.}} = 1,7 \cdot 10^{-6}$ für die große Kapillare und $Bo_{02,\text{kl.}} = 1,1 \cdot 10^{-7}$ bzw. $Bo_{08,\text{kl.}} = 4,2 \cdot 10^{-7}$ für die kleine Kapillare. Da Bo in beiden

Tabelle 5.2: Berechnung der Oberflächenspannung: Mit den Werten aus Tabelle 5.1 und Gleichung 2.2 wurde die Oberflächenspannung γ berechnet. Hier sind die mittleren Werte $\langle \gamma \rangle$ und Standardabweichungen σ_γ angegeben.

c [mg/ml]	$\langle \gamma \rangle$ [mN/m]	σ_γ [mN/m]
0,2	45,1	0,4
0,2	41,9	0,2
0,8	47,4	0,7
0,8	46,0	0,5

Kapillaren wesentlich kleiner als 1 ist, dominiert die Oberflächenspannungskraft. Da die Füllgeschwindigkeit von Wasser vergleichbar mit derjenigen von Aktinlösungen war, wurde zur Berechnung der Kapillarzahl die dynamische Viskosität des Aktins der des Wassers gleichgesetzt zu $\mu = 1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{Ns}}{\text{m}^2}$ (siehe Tabelle 5.4). Für die Kapillarzahl resultiert gemäß Gl. 5.2 $Ca_{02,\text{gr.}} = 5,5 \cdot 10^{-4}$ und $Ca_{08,\text{gr.}} = 5,1 \cdot 10^{-4}$ für die große Kapillare und $Ca_{02,\text{kl.}} = 1,8 \cdot 10^{-4}$ und $Ca_{08,\text{kl.}} = 1,7 \cdot 10^{-4}$ für die kleine Kapillare. Für beide Kapillaren ist $Ca \approx 1 \cdot 10^{-4}$. Somit dominieren Oberflächenspannungskräfte bzw. Kapillarkräfte gegenüber Viskositätskräften. Zusätzlich ist der Effekt des dynamischen Kontaktwinkels vernachlässigbar [38]. Da in den Versuchen in dieser Arbeit der Meniskus immer in der Mitte der Kapillare aufgenommen wurde und dieser Bildausschnitt ca. 5 mm betrug, wurde in dieser Arbeit für den Kontaktwinkel $\Theta = \Theta_0 = \text{const.}$ angenommen. Mit der Dichte für Wasser $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 10^3 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$ ist die Reynoldszahl $Re_{\text{gr.}} = 1,2$ und $Re_{\text{kl.}} = 0,4$ und somit wesentlich kleiner als 2000. Daher ist der Fluss in der Kapillare wirbelfrei, also laminar. Innere Reibungskräfte sind gegenüber Trägheitskräften dominant.

5.2.4 Abschätzung der Kapillarkräfte

Mit den oben errechneten Werten folgt für den Kapillardruck gemäß Gl. 5.5 $\Delta p_{02,\text{gr.}} = 700 \text{ N/m}^2$ und $\Delta p_{08,\text{gr.}} = 750 \text{ N/m}^2$ für die große Kapillare bzw. $\Delta p_{02,\text{kl.}} = 1300 \text{ N/m}^2$ und $\Delta p_{08,\text{kl.}} = 1400 \text{ N/m}^2$ für die kleine Kapillare. Der Volumenstrom Q beträgt für die große Kapillare $Q_{\text{gr.}} = 4,8 \text{ mm}^3/\text{s}$ bzw. für die kleine Kapillare $Q_{\text{kl.}} = 0,4 \text{ mm}^3/\text{s}$. Nach Younggon Son kann die Wandscherspannung mit Gl. 5.6 berechnet werden. Dies ergibt $\tau_{02,\text{gr.}} \approx 670 \text{ mN/m}^2$ und $\tau_{08,\text{gr.}} \approx 720 \text{ mN/m}^2$ für die große Kapillare bzw. $\tau_{02,\text{kl.}} \approx 610 \text{ mN/m}^2$ und $\tau_{08,\text{kl.}} \approx 650 \text{ mN/m}^2$ für die kleine Kapillare. Die scheinbare Scherrate (vgl. Gl. 5.8) beträgt mit $f^*(0,05) = 0,94$ $\dot{\gamma}_{\text{gr.}} = 1400/\text{s}$ in der großen Kapillare und $\dot{\gamma}_{\text{kl.}} = 940/\text{s}$ in der kleinen Kapillare.

Analog zu newtonschen Flüssigkeiten, bei welcher die Scherspannung linear proportional

5.2 Ergebnisse

zur Scherrate ist, kann für Aktinlösungen eine effektive Viskosität eingeführt werden

$$\mu_{\text{eff}} = \tau_w / \dot{\gamma}, \quad (5.9)$$

welche für die Aktinlösungen zwischen $\mu_{\text{eff}} = 0,5 \text{ mPas}$ und $\mu_{\text{eff}} = 0,7 \text{ mPas}$ in beiden Kapillaren betrug.

Tabelle 5.3: Direkter Vergleich relevanter Größen der Flüssigkeitsdynamik in beiden Kapillaren für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$.

Größen	große Kapillare		kleine Kapillare	
c_{Aktin} [mg/ml]	0,2	0,8	0,2	0,8
Kapillarhöhe H [mm]	0,1		0,05	
Kapillarweite W [mm]	2		1	
Kapillarlänge L [mm]	50		50	
	Füllgeschwindigkeiten			
v_{Aktin} [mm/s]	24 ± 8		8 ± 3	
	Dimensionslose Größen			
Viskosität μ_{H_2O} [mNs/m ²]	1		1	
Θ_c [°]	40 ± 13		46 ± 11	
γ [mN/m]	44	47	44	47
Bond-Zahl Bo	$4,5 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$4,2 \cdot 10^{-7}$
Kapillarzah Ca	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$
Reynoldszahl Re	1,2		0,4	
	Größen zur Kraftabschätzung			
Volumenstrom Q [mm ³ /s]	4,8		0,4	
Kapillardruck Δp [N/m ²]	700	750	1300	1400
Wandscherspannung τ_w [mN/m ²]	670	720	610	650
Wandscherrate $\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	1400		940	
effektive Viskosität $\mu_{\text{eff}} = \frac{\tau_w}{\dot{\gamma}}$ [mNs/m ² = mPas]	0,5	0,5	0,6	0,7

Tabelle 5.4: Bestimmung der Viskosität von Wasser in den Mikrokapillaren

Größen	große Kapillare	kleine Kapillare
v_{H_2O} [mm/s]	20 ± 5	11 ± 1
Θ_c [°]	46 ± 14	46 ± 3
Volumenstrom Q [mm ³ /s]	4,0	0,6
Kapillardruck Δp [N/m ²]	1100	2100
Wandscherspannung τ_w [mN/m ²]	1,0	1,0
Wandscherrate $\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	1200	1300
effektive Viskosität $\mu_{\text{eff}} = \frac{\tau_w}{\dot{\gamma}}$ [mNs/m ² = mPas]	0,9	0,8

Zur Validierung der Methode wurde die Viskosität von destilliertem Wasser bestimmt. Dafür wurden für die große Kapillare $n_{\Theta_c} = 7$ und für die kleine Kapillare $n_{\Theta_c} = 4$ Kontaktwinkel bestimmt. Nach Mittelung der Kontaktwinkel folgte $\Theta_{c,H_2O} = 46^\circ$ (vgl. Tabelle 5.4). Die Oberflächenspannung beträgt $\gamma_{H_2O} = 73$ mN/m [11]. Nach Berechnung des Kapillardrucks, der Scherrate und der Scherspannung resultiert die effektive Viskosität für Wasser, welche vergleichbar mit dem Erwartungswert $\mu_{\text{eff}} = 1$ mPas ist [54]. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5.4 aufgelistet.

Die wesentlichen Größen, welche in die Kraftabschätzung eingehen, sind die Abmessungen der Kapillaren, die Oberflächenspannungen, der Kontaktwinkel und die Füllgeschwindigkeiten. Da die Fehler der Füllgeschwindigkeiten bis zu 38% der Mittelwerte betragen, stimmt die effektive Viskosität von destilliertem Wasser mit denjenigen von Aktin, die bei Scherraten von ca. 1400 s^{-1} bzw. 900 s^{-1} bestimmt wurden, innerhalb der Fehler überein.

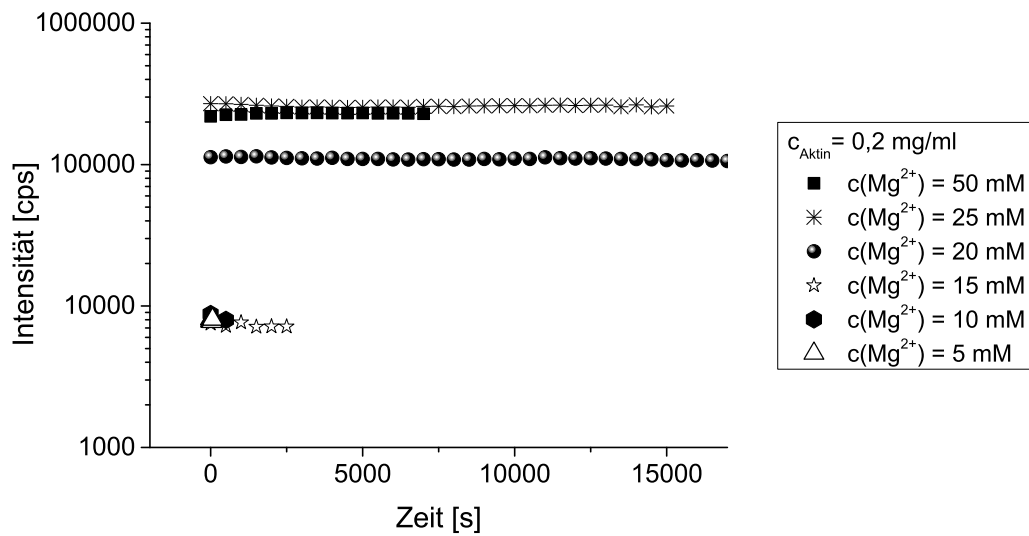
6 Messung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten in Abhängigkeit von Gegenionen

6.1 Ergebnisse

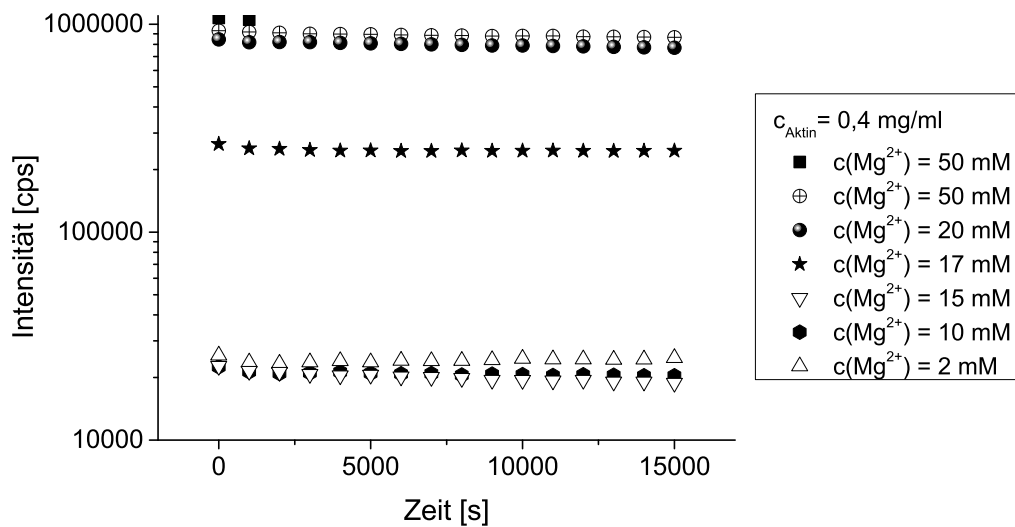
Eine Teilaufgabe dieser Arbeit war die Bestimmung der Röhrenradienverteilungen von Aktinfilamenten in Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration. Zunächst war es Ziel der Lichtstremessungen den Phasenübergang von Aktinfilamenten zu Aktinbündel in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration zu bestimmen. Bei der Magnesiumionenkonzentration, bei welcher die Aktinfilamente gerade noch keine Bündel gebildet haben, wurde die Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten in darauffolgenden Messungen bestimmt.

6.1.1 Statische Lichtstremessungen an Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration

Die Ergebnisse der statischen Lichtstremessung an Aktinfilamenten zu den Konzentrationen $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ bei Variation der Magnesiumionenkonzentration sind in der Abbildung 6.1 zusammengefasst. Die Messung zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ dient als Vergleichsmessung, da dies die Menge an Magnesiumionen ist, die im G-Puffer enthalten ist. Für beide Aktinkonzentrationen gelten dieselben Beobachtungen. Für $c_{\text{Mg}^{2+}} > 15 \text{ mM}$ steigt die gestreute Intensität um eine Größenordnung. Der Anstieg der gestreuten Intensität ist ein Anzeichen für das Einsetzen der Aktinbündelung. Daher wurden die Fluktuationen von Aktinfilamenten in Abhängigkeit von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ gemessen (vgl. Abschnitt 6.1.2). Die gestreute Intensität für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ liegt in derselben Größenordnung wie die bei Verwendung von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ im physiologischen G-Puffer. Daher wird angenommen, dass bei $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ Aktinbündelung nicht dominiert.



(a) $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$



(b) $c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$

Abbildung 6.1: Ergebnisse der statischen Lichtstreuung an Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration: Für beide Aktinkonzentrationen steigt die gestreute Intensität um eine Größenordnung für $c_{\text{Mg}^{2+}} > 15 \text{ mM}$. Nur jeder 1000. Datenpunkt ist hier gezeigt.

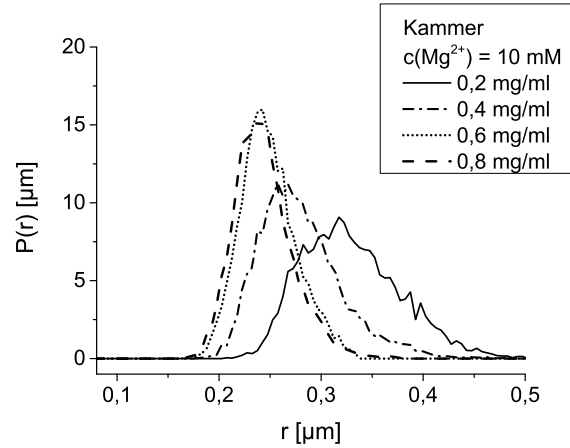


Abbildung 6.2: Röhrenradienverteilung in der makroskopischen Kammer zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$.

6.1.2 Messung der Lokalisationsröhre von Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration

Röhrenradienverteilungen in Abhängigkeit der Magnesiumionkonzentration

In Abbildung 6.2 sind die Röhrenradienverteilungen in der Kammer zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ dargestellt. Die Röhrenradienverteilungen werden mit zunehmender Aktinkonzentration zu kleineren Werten verschoben. Die Ergebnisse zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ aus Abbildung 4.1b dienen als Vergleichsmessungen. In den Abbildung 6.3 werden die Verteilungen jeweils einer Aktinkonzentration zu beiden Magnesiumionkonzentrationen gegenübergestellt. Für jede Aktinkonzentration fluktuieren die Filamente stärker, wenn die Konzentration von Magnesiumionen von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ auf $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ erhöht wird. Die Röhrenradien sind relativ zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ zu höheren Werten verschoben.

In der Tabelle 6.1 sind die mittleren Röhrenradien $\langle r \rangle$ und die Standardabweichungen σ_r der Röhrenradien in Abhängigkeit der Magnesiumionkonzentration aufgelistet. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8).

Statistischer Vergleich der Röhrenradienverteilungen in Abhängigkeit der Magnesiumionkonzentration

Der Signifikanztest und die Analyse wird analog Abschnitt 4.1.4 durchgeführt. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt. Dieser Abstand ist kleiner als die Segmentlänge, so dass für diese Auswertung

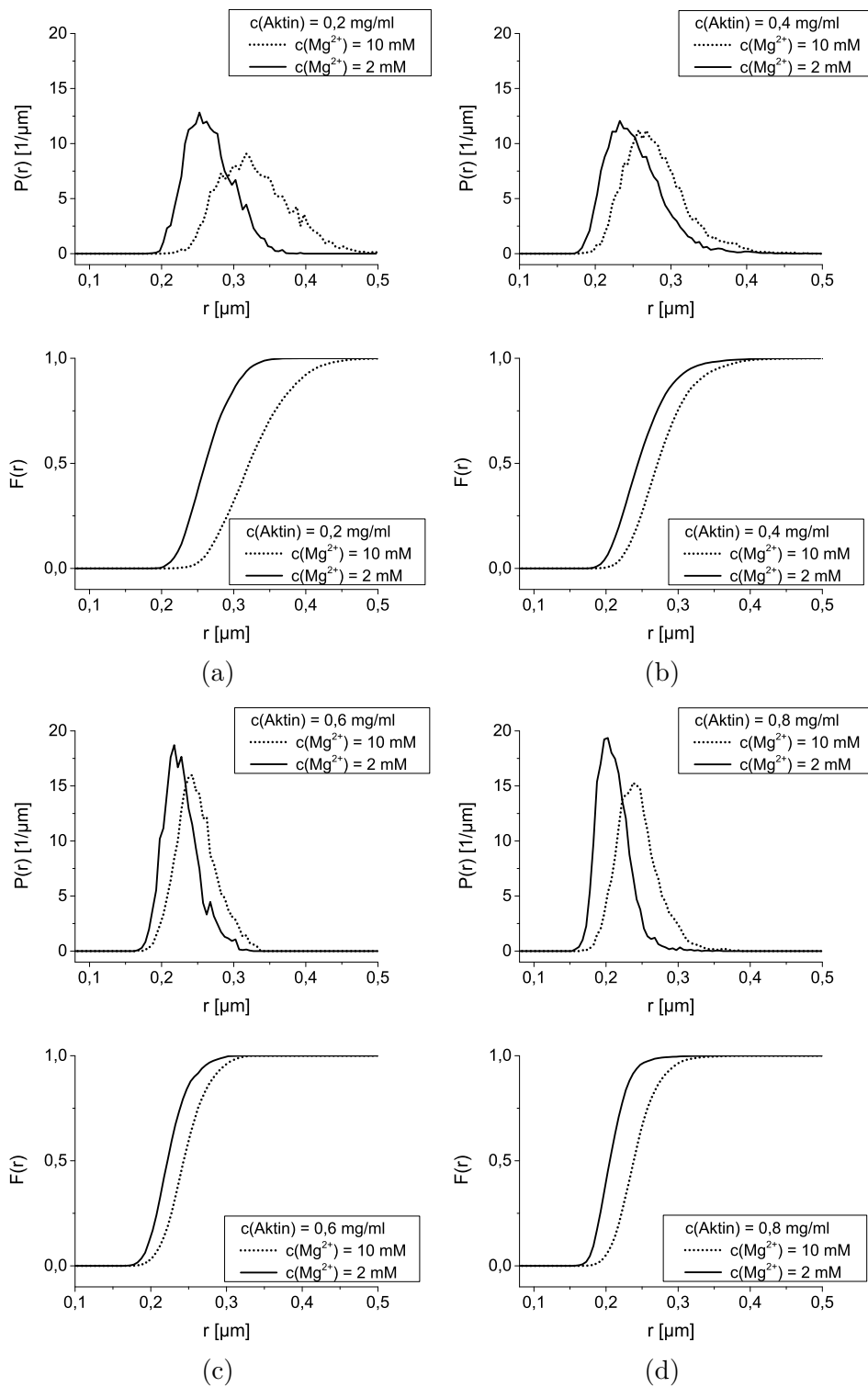


Abbildung 6.3: Vergleich der Röhrenradienverteilung zu unterschiedlichen $c_{\text{Mg}^{2+}}$ für Messungen in der makroskopischen Kammer: Für jede Aktinkonzentration fluktuieren die Filamente stärker, wenn die Magnesiumionenkonzentration von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ auf $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ erhöht wird.

Tabelle 6.1: Vergleich der mittleren Röhrenradien in der Kammer für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ und $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$: Hier sind die Mittelwerte $\langle r \rangle$ der Röhrenradien, die Standardabweichungen $\sigma_{\langle r \rangle}$ sowie die Anzahl n bzw. j ausgewerteter Röhrenradien aufgelistet. Die Daten zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ entsprechen den Werten aus Tabelle 4.2.

$c[\text{mg/ml}]$	$c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$			$c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$		
	$\langle r \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_r [\mu\text{m}]$	n	$\langle r \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_r [\mu\text{m}]$	j
0,2	0,267	0,032	8301	0,329	0,048	7584
0,4	0,252	0,038	22914	0,280	0,041	8029
0,6	0,227	0,024	4158	0,248	0,027	6426
0,8	0,210	0,022	4773	0,244	0,029	7701

die Stichprobengröße durch das Verhältnis der effektiven Gesamtfilamentlänge zur Segmentlänge festgelegt wurde (vgl. Abschnitt 4.1.4).

In Tabelle 6.2 ist die Anzahl unabhängiger Röhrenradien angegeben. Diese Stichprobengröße, Prüfwert, Prüfgröße und kritischer Wert werden analog zu Abschnitt 4.1.2 berechnet (vgl. Tabelle 6.3). Das Ergebnis zeigt, dass die Verteilungen aller Röhrenradien in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration signifikant unterschiedlich sind.

Tabelle 6.2: Bestimmung der Stichprobengröße der Röhrenradien in der Kammer für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$: Zu jeder Aktinkonzentration c wurde die Röhrenradienanzahl j bestimmt. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt. Daraus kann eine gesamte Filamentlänge $L_{\text{ges},j}$ berechnet werden. Die Stichprobengröße J' ist der Quotient aus $L_{\text{ges},j}$ und der Segmentlänge $L_{\text{seg},j}$.

Kammer				
$c [\text{mg/ml}]$	Röhrenradienanzahl j	Filamentlänge $L_{\text{ges},j} \mu\text{m}$	Segmentlänge $L_{\text{seg},j} \mu\text{m}$	Stichprobengröße J'
0,2	7584	492,96	4,66	106
0,4	8029	521,89	4,08	128
0,6	6426	417,69	3,69	113
0,8	7701	500,57	3,63	138

LSF-korrigierte Röhrenradienverteilungen in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration

In Abbildung 6.4 sind die LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in der Kammer zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ dargestellt. Wie zuvor bei den Rohdaten gezeigt, wurden die LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen mit zunehmender Aktinkonzentration zu kleineren Werten verschoben. Die Ergebnisse zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ aus Abbildung 4.4b dienen als Vergleichsmessungen. In Abbildung 6.5 werden die Verteilungen jeweils einer Aktinkonzentration zu beiden Magnesiumionenkonzentrationen gegenübergestellt. Für jede Aktinkonzen-

Tabelle 6.3: Signifikanztest der Röhrenradienverteilung $P(r)$ in der Kammer für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ und $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$: Der Prüfwert PW ist durch die Stichprobengrößen bestimmt und legt die kritische Größe $D_{\text{krit.}}$ fest. Die Prüfgröße D ist durch das Supremum der kumulierten Verteilungen $F(r)$ definiert. Für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% beträgt $k = 1,22$.

Signifikanztest von $P(r)$ in der Kammer für unterschiedliche $c_{\text{Mg}^{2+}}$				
c [mg/ml]	Prüfwert PW	Prüfgröße D	kritischer Wert $D_{\text{krit.}}$	
	$= \sqrt{\frac{(J'+N')}{(J' \cdot N)}}$	$= \sup F_j(r) - F_n(r) $	$= 1,22 \cdot \text{PW}$	
0,2	0,1294	0,8259	0,1578	$D > D_{\text{krit.}}$
0,4	0,1017	0,2974	0,1240	$D > D_{\text{krit.}}$
0,6	0,1467	0,3477	0,1789	$D > D_{\text{krit.}}$
0,8	0,1321	0,5166	0,1612	$D > D_{\text{krit.}}$

tration fluktuieren die Filamente stärker, wenn die Konzentration von Magnesiumionen von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ auf $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ erhöht wird. Die korrigierten Röhrenradien sind relativ zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ zu höheren Werten verschoben.

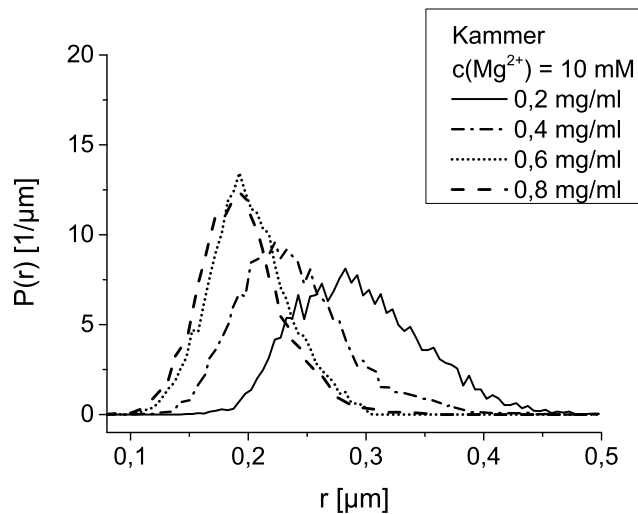


Abbildung 6.4: LSF-korrigierte Röhrenradienverteilungen in der Kammer für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$.

In der Tabelle 6.4 sind die mittleren Röhrenradien $\langle r \rangle$ und die Standardabweichungen σ_r der Röhrenradien in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration aufgelistet. Die Röhrenradien wurden entlang der Filamentkontur in äquidistanten Abständen von $a = 0,065 \mu\text{m}$ bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8).

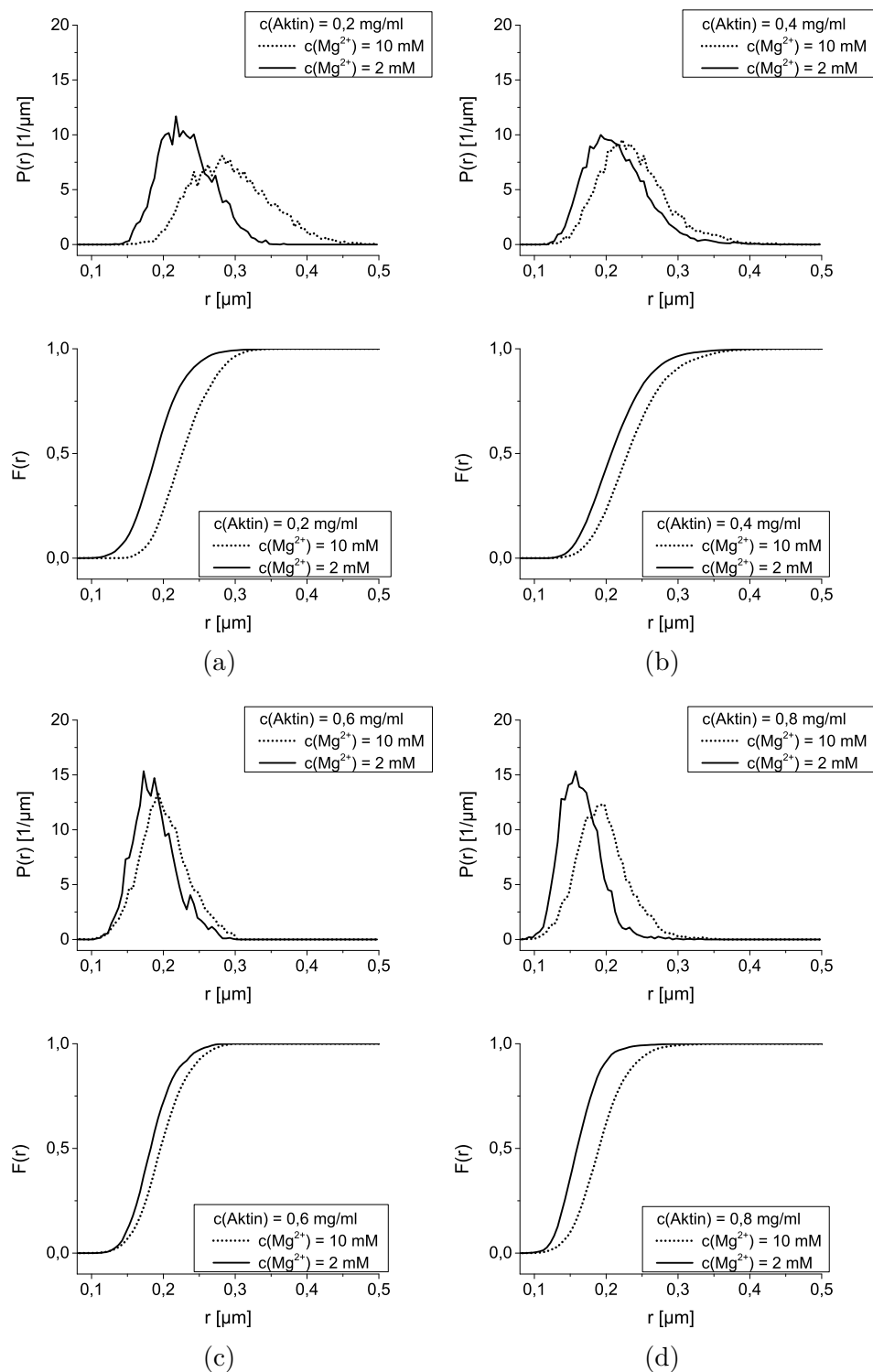


Abbildung 6.5: Vergleich der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration: Für jede Aktinkonzentration fluktuieren die Filamente stärker, wenn die Magnesiumionenkonzentration von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ auf $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ erhöht wird.

Tabelle 6.4: Vergleich der LSF-korrigierten mittleren Röhrenradien in der Kammer für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ und $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$: Hier sind für beide Kammern die Mittelwerte $\langle r_{\text{korrr}} \rangle$ der Röhrenradien sowie die Standardabweichungen $\sigma_{r_{\text{korrr}}}$ aufgelistet. Die Daten zu $c_{\text{Mg}^{2+}}$ entsprechen den Werten in Tabelle 4.9.

$c[\text{mg/ml}]$	$c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$			$c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$		
	$\langle r_{\text{korrr}} \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_{r_{\text{korrr}}} [\mu\text{m}]$	n	$\langle r_{\text{korrr}} \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_{r_{\text{korrr}}} [\mu\text{m}]$	j
0,2	0,237	0,036	8301	0,305	0,052	7584
0,4	0,221	0,042	22914	0,250	0,045	8029
0,6	0,193	0,029	4158	0,215	0,031	6426
0,8	0,172	0,027	4773	0,210	0,033	7701

Statistischer Vergleich der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration

Die Berechnung der Prüfwerte, der Prüfgröße und des kritischen Wertes erfolgte gemäß Abschnitt 6.1.2. Die Berechnung der Prüfgröße und des kritischen Wertes ergibt, dass die Verteilungen aller LSF-korrigierten Röhrenradien in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration signifikant unterschiedlich sind (vgl. Tabelle 6.5).

Tabelle 6.5: Signifikanztest der LSF-korrigierten Röhrenradienverteilung $P(r_{\text{korrr}})$ in der Kammer für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ und $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$: Der Prüfwert PW ist durch die Stichprobengrößen bestimmt und legt die kritische Größe $D_{\text{krit.}}$ fest. Die Prüfgröße D ist durch das Supremum der kumulierten Verteilungen $F(r)$ definiert. Für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % beträgt $k = 1,22$.

Signifikanztest von $P(r_{\text{korrr}})$ in der Kammer für $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$ und $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$				
$c [\text{mg/ml}]$	Prüfwert PW	Prüfgröße D	kritischer Wert $D_{\text{krit.}}$	
	$= \sqrt{\frac{(J'+N')}{(J' \cdot N)}}$	$= \sup F_j(r_{\text{korrr}}) - F_n(r_{\text{korrr}}) $	$= 1,22 \cdot \text{PW}$	
0,2	0,1294	0,8259	0,1578	$D > D_{\text{krit.}}$
0,4	0,1017	0,2974	0,1240	$D > D_{\text{krit.}}$
0,6	0,1467	0,3477	0,1789	$D > D_{\text{krit.}}$
0,8	0,1321	0,5166	0,1612	$D > D_{\text{krit.}}$

7 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Vorgeschichte der Probenpräparation einen wesentlichen Einfluss auf die Ordnung von Aktinfilamenten in halbverdünnten Lösungen hat. Besonders durch den Scherfluss während der Befüllung von Mikrokapillaren konnte gezeigt werden, dass die Filamente entlang einer Vorzugsrichtung ausgerichtet waren. Im Gegensatz dazu verteilten sich die Filamente in makroskopischen Kammern isotrop in einer Ebene. Die Ordnungsparameter in den Kapillaren und makroskopischen Kammern wurden verglichen, um den Einfluss der Scherausrichtung auf die dynamischen Eigenschaften, insbesondere auf die Fluktuationsamplituden, zu bestimmen. Die Fluktuation von Aktinfilamenten hängt sowohl von dieser Ordnung als auch von der Konzentration an Gegenionen ab. Die Ergebnisse werden in diesem Kapitel diskutiert und in den aktuellen Stand der Forschung eingeordnet.

7.1 Einfluss der Probenpräparation auf die Ordnung von Aktinfilamenten in Mikrokapillaren und in der makroskopischen Kammer

7.1.1 Längenverteilung von Aktinfilamenten

Ein Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der Filamentlängen von Aktin ergab, dass diese unabhängig von der Probenpräparation sind (vgl. Abbildung 3.1). Das Befüllen der Kammer mit der Pipette und das Einsaugen von Aktinlösungen in die Kapillaren haben keinen Einfluss auf die Längenverteilung. Da die Filamente, welche für die Messungen in der kleinen Kapillare präpariert wurden, zu einem späteren Zeitpunkt (demnach aus einer zusätzlichen Aktinaufreinigung) isoliert wurden, kann zudem gefolgert werden, dass die Längenverteilung unabhängig von der Aufreinigung ist. Die Polydispersität von Aktinfilamenten bestimmt die Dynamik wesentlich. Dadurch, dass die Mittelwerte der Filamentlängen und die Verteilungen in unterschiedlichen Probengefäß in guter Übereinstimmung sind, war somit gewährleistet, dass gleiche Versuchsbedingungen bezüglich der

Filamentlänge vorlagen. Die Anpassung der Häufigkeitsverteilungen durch eine exponentielle Verteilung ist mit früheren Forschungsarbeiten in guter Übereinstimmung [104, 68].

7.1.2 Vergleich des Ordnungsparameters in den Kapillaren und in der makroskopischen Kammer

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des Ordnungsparameters und dessen Längen- wie auch Segmentlängenabhängigkeit für die Kammer und die Kapillaren diskutiert. Anschließend werden mögliche Gründe für die Unterschiede des Ordnungsparameters in den Probengefäßen erörtert. Die Ergebnisse des Ordnungsparameters müssen als Mittelwert der Filamentordnung über einen Zeitraum von 2 Stunden betrachtet werden, da aufgrund der Phalloidinkinetik und der damit zusammenhängenden Abnahme des Signal-zu-Rausch-Verhältnis keine länger andauernden Messungen realisierbar waren (vgl. Abschnitt 2.7.2).

Die Ordnung von Filamenten in der makroskopischen Kammer

Die Bestimmung des Ordnungsparameters von Aktinfilamenten in der makroskopischen Kammer lieferte folgende Ergebnisse: Die Ordnung ist bei gleichen Segment- und Filamentlängen statistisch unabhängig von der Aktinkonzentration. Daraus kann geschlossen werden, dass Aktinlösungen im halbverdünnten Konzentrationsbereich in der makroskopischen Kammer keine unterschiedlichen Ordnungen aufweisen. Zudem fällt der Ordnungsparameter nicht wie erwartet auf $S = 0$ ab (vgl. Abbildung 3.2b, 3.3b, 3.5). Folglich waren die Filamente in der Kammer nicht in drei Dimensionen isotrop verteilt. Dieses Ergebnis wird auch unter Berücksichtigung der Eigenwertverteilung bestätigt (vgl. Abbildung 3.7b). Bei isotroper Filamentanordnung würden die Eigenwertverteilungen bei $\lambda_i = 1/3$ überlappen. Die Verteilungen der Eigenwerte zeigen jedoch, dass die Filamente in Ebenen liegen, da $\lambda_3 \ll \lambda_1, \lambda_2$ ist. In diesen Ebenen sind die Filamente nahezu isotrop verteilt $\lambda_1 \approx \lambda_2$. Ergänzend dazu hat die Auswertung der Eigenvektoren \mathbf{p}_i bestätigt, dass die Filamente hauptsächlich in der Fokusebene liegen. Da die Fokusebene parallel zur Grundfläche der makroskopischen Kammer ist, wird zum einen vermutet, dass sich die Aktinfilamente durch das Befüllen der Kammer mit einer Pipette schichtweise als zweidimensionales, verschlauftes Netzwerk anordnen. Die Wechselwirkung mit den Wänden könnte eine Ordnung parallel zur Grundfläche der Kammer induziert haben, welche durch zusätzliche Filament-Wechselwirkung bis in die Kammermitte reicht. Zum anderen wird vermutet, dass die Aktinfilamente aktiv durch das Pipettieren als verschlauftes Netzwerk Ebene für Ebene angeordnet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass selbst nach einer

7.1 Einfluss der Probenpräparation auf die Ordnung von Aktinfilamenten in Mikrokapillaren und in der makroskopischen Kammer

Relaxationszeit von mehreren Stunden für $c_{\text{Aktin}} = 1,0 \text{ mg/ml}$ keine isotrope Aktinlösung in drei Dimensionen beobachtet wurde [55].

Ein weiteres Ergebnis in dieser Arbeit ist, dass die Ordnung von Filamenten in der Kammer von der Konturlänge abhängt (vgl. Abbildung 3.2b). Je länger die Filamente sind, desto höher ist der Ordnungsparameter. Dieses Ergebnis kann wie folgt erklärt werden: Aus der Literatur ist bekannt, dass Scherflüsse selbst bei kleinen Reynoldszahlen zu einer Ausrichtung von Objekten führen [14]. Die längenabhängige Ausrichtung kann demzufolge dadurch begründet sein, dass durch das Befüllen der Kammer mit der Pipette kleine Scherkräfte auf die Filamente gewirkt haben. Die Konturlängen-abhängige Zunahme der Ordnung durch Scherkräfte ist besonders durch zwei Faktoren bestimmt. Zum einen konnte bereits in vielen Forschungsarbeiten gezeigt werden, dass sich längere Filamente leichter entlang einer Vorzugsrichtung ausrichten als kürzere [97, 20, 134]. Zum anderen relaxieren nach Befüllung der Kammer die Filamente in Abhängigkeit ihrer Länge in einen Gleichgewichtszustand. Hinner et al. konnten zeigen, dass dabei die Relaxationszeit τ_r dem Potenzgesetz $\tau_r \propto L^{3/2}$ gehorcht [59]. Diese Beziehung zwischen der Filamentlänge und Relaxationszeit begründet demnach zusätzlich die Filamentlängenabhängigkeit des Ordnungsparameters. Innerhalb der Messzeit von zwei Stunden könnten kürzere Filamente demnach schon relaxiert sein, doch je länger die Filamente waren, umso höher war der Ordnungsgrad, der in dieser Zeit durch die längeren Relaxationszeiten noch nachgewiesen werden konnte. Zusammengefasst beruht die Längenabhängigkeit des Ordnungsparameters darauf, dass zum einen durch Scherkräfte längere Filamente leichter ausgerichtet werden als kürzere und zum anderen die längeren Filamente langsamer als kürzere relaxieren.

Ergänzend konnte nachgewiesen werden, dass sich mit zunehmender Segmentlänge der Ordnungsparameter zu höheren Werten verschiebt. Dieser Effekt ist unter anderem durch die Konturlängenabhängigkeit des Ordnungsparameters bedingt. Wie eben beschrieben weisen Filamente mit längeren Konturlängen höhere Ordnungsparameter auf. Bei der Segmentlängen-abhängigen Auswertung werden aber nur die Filamente in die Auswertung mit einbezogen, welche Konturlängen aufweisen, die mindestens so groß wie die willkürlich gewählte Segmentlänge sind, also $L \geq L_S$. Alle kürzeren Filamente werden somit nicht berücksichtigt, was die höheren Werte des Ordnungsparameters relativ zu kleineren Segmentlängen begründet.

Die Abhängigkeit von der Segmentlänge enthält jedoch noch eine zusätzliche physikalische Information. Der Trend der Segmentlängenabhängigkeit resultiert auch dann, wenn nur Filamente einer bestimmten Länge bzw. Längensklasse ausgewertet wurden (vgl. Abbildung 3.3b und 3.4). Bei der Wahl einer Segmentlänge L_S ist der Ordnungsparameter

(zu einer fixen Konzentration) ein Mittelwert der Ordnungen, die sich für alle kleineren Segmentlängen (bei dieser Konzentration) ergeben würde. Demnach repräsentiert die Abhängigkeit des Ordnungsparameters von der Segmentlänge eine Längenskala, auf welcher die Korrelation der Ordnungen einzelner Segmente und somit eine Nahordnung beschrieben werden kann. In Anlehnung an die Tangentenkorrelation, welche die Flexibilität von Filamenten charakterisiert, wird durch die Korrelation der Ordnung aufeinanderfolgender Segmente die Steifigkeit des Filaments auf Längenskalen der Segmentlänge bestimmt. Während die Tangentenkorrelation mit dem Abstand entlang der Konturlänge abfällt, steigt hier die Segmentlängen-abhängige Korrelation. Je höher die Längenskala der Segmente wird, desto weniger werden Unordnungen auf kleineren Längenskalen berücksichtigt.

Die Ordnung von Filamenten in der Mikrokapillare

Ein weiteres Teilergebnis dieser Arbeit ist, dass die Ordnung von Filamenten in der großen Kapillare zunimmt, je höher sowohl die Aktinkonzentration als auch die Filament- und die Segmentlängen sind (vgl. Abbildung 3.2a, 3.3a, 3.5).

Während des Befüllens der Kapillaren entstanden Scherspannungen von ungefähr 700 mN/m^2 (vgl. Abschnitt 5.2.4). Durch diese wurden die Filamente entlang der längsten Kapillarachse parallel zur Scherkraft ausgerichtet. Diese Ausrichtung kann durch die Analyse der Eigenwertverteilung bestätigt werden (vgl. Abbildung 3.6a). Die Eigenvektoren lagen nämlich in der Fokusebene (xy-Ebene) und waren zusätzlich vermehrt parallel zur x-Achse ausgerichtet, welche der Richtung der längsten Kapillarachse entspricht. Die Ausbildung dieser Vorzugsrichtung wird durch die Ergebnisse der Eigenwertverteilung unterstützend repräsentiert, da die Eigenwertverteilung von λ_1 signifikant zu höheren Werten im Vergleich zu den Verteilungen von λ_2 und λ_3 verschoben ist.

Wie zuvor für die makroskopische Kammer beschrieben, sind die Scherausrichtung und Relaxationszeit von der Filamentlänge abhängig. Die Filamentlängen- und Segmentlängenabhängigkeit des Ordnungsparameters kann daher analog zum Abschnitt über die Ordnung von Filamenten in der Kammer interpretiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich der Ordnungsparameter in Abhängigkeit der Aktinkonzentration zu höheren Werten verschiebt (vgl. Abbildung 3.2a, 3.3a). Zudem konnte beobachtet werden, dass für Filamentlängen in den Klassen $20 \mu\text{m} \leq l \leq 30 \mu\text{m}$ und höher bei $c_{\text{Aktin}} = 0,6 \text{ mg/ml}$ der Ordnungsparameter in die Sättigung geht und sich nicht mehr von den Werten für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ unterscheidet (vgl. Abbildung 3.2a, 3.4). Für Aktinkonzentrationen von $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$ überlappen zudem die Ordnungsparameter trotz unterschiedlicher Filamentlängenklassen (vgl. Abbildung 3.2a). Solch ein Sättigungswert

7.1 Einfluss der Probenpräparation auf die Ordnung von Aktinfilamenten in Mikrokapillaren und in der makroskopischen Kammer

des Ordnungsparameters, der unabhängig von der Filamentlänge war, konnte schon zuvor bei nematischen Flüssigkristallen beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.2a, 3.4) [134, 97]. Die Sättigung wurde in der Literatur damit erklärt, dass selbst bei ausgeprägter Ordnung Filamente noch Verschlaufungen bilden können und somit, durch den semiflexiblen Charakter und die Tendenz Verschlaufungen zu bilden, $S = 1$ nicht erreicht werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen sind jedoch geringer, als die in einem isotrop-nematischen Übergang, so dass für die obere Grenze des Ordnungsparameters nicht nur die Verschlaufung entscheidend sein kann [46]. Ein weiterer Einfluss, welcher die konzentrationsabhängige Zunahme des Ordnungsparameters erklären könnte, ist der räumliche Einschluss durch die Kapillarwände. Alvarado et al. haben nachgewiesen, dass Aktinfilamente bei Konzentrationen von $c_{\text{Aktin}} = 0,5 \text{ mg/ml}$ höhere Ordnungen aufweisen, wenn sie in Kammern polymerisiert werden, deren Wandabmessungen Aspektverhältnisse größer als zwei aufweisen [5]. Soares et al. konnten zuvor ähnliches beobachten [124]. In diesen beiden Arbeiten waren die Filamente keiner Scherkraft ausgesetzt und zeigten dennoch eine Vorzugsrichtung. Daher kann die Vermutung aufgestellt werden, dass in der großen Kapillare zum einen durch die Kapillarkräfte und zum anderen durch die Anwesenheit der parallelen Platten im Abstand von $100 \mu\text{m}$ die Aktinfilamente in einer Vorzugsrichtung ausgerichtet wurden. Für ein Testfilament sind die Kapillarwände, zusätzlich zu den umliegenden Filamenten bzw. Lokalisationsröhren, Hindernisse, welche die Diffusion beeinflussen. Die räumliche Einschränkung durch die Wände könnte die Reptation der Filamente in ihrer Röhre verlangsamen, analog zur Verlangsamung bei relativ zum physiologischen Puffer erhöhten Magnesiumionenkonzentrationen [55].

Die Unterschiede des Ordnungsparameters in den Mikrokapillaren und in der makroskopischen Kammer

Unter Berücksichtigung gleicher Filament- und Segmentlängen werden in diesem Abschnitt zunächst die Unterschiede des Ordnungsparameters zwischen den Mikrokapillaren und der makroskopischen Kammer diskutiert. Im Anschluss werden die Ergebnisse des Ordnungsparameters in beiden Kapillaren verglichen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ordnungsparameter zu jeder Aktinkonzentration in den Kapillaren signifikant größer ist als in der makroskopischen Kammer. Diese Ergebnisse können wie folgt interpretiert werden (vgl. Abbildung 3.5): Da die Längenverteilungen in allen Probengefäßen übereinstimmen, können die Unterschiede des Ordnungsparameters zwischen Kammer und Kapillare nicht durch die Filamentlängen erklärt werden, sondern resultieren aus den Kapillarkräften und dem räumlichen Einschluss durch die Kapillarwände. Da die Kammer wesentlich langsamer als die Kapil-

lare befüllt wurde, wird angenommen, dass die durch die Pipette induzierten Scherkräfte wesentlich kleiner waren, als die in der Kapillare durch die Wandscherspannung induzierten Scherkräfte. Die Ergebnisse nach Auswertung des Ordnungsparameters und die der Lokalisationsröhre sind in beiden Probengefäßen zu jeder Aktinkonzentration direkt vergleichbar, denn die Filamente in der Kammer sind in parallelen Ebenen zur Fokusebene des konfokalen Mikroskops isotrop verteilt und in der Kapillare in parallelen Ebenen zur Fokusebene in Richtung der x-Achse ausgerichtet (vgl. Abschnitt 3.3). Somit stellen beide Probengefäße zwei unterschiedliche Versuchsbedingungen in zwei Dimensionen für die Lokalisationsröhre dar, nämlich eines, in welchem die Filamente isotrop verteilt, und eines, in welchem sie entlang einer Achse ausgerichtet sind.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Ordnungsparameter für zwei Aktinkonzentrationen ($c_{\text{Aktin}} = 0,4 \text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,6 \text{ mg/ml}$) in beiden Kapillaren identisch ist (vgl. Abbildung 3.5). Dieses Ergebnis kann mit Hilfe der Kraftabschätzung in der Kapillare interpretiert werden (vgl. Abschnitt 5.2.4). Der Kapillardruck und somit die Scherspannung sind in der kleinen Kapillare fast doppelt so hoch wie in der großen Kapillare. Da der Volumenstrom in der großen Kapillare jedoch fast zwölfmal so hoch ist wie in der kleinen Kapillare und dieser proportional zur Scherrate ist, ist die Scherrate in der großen Kapillare höher. Daraus folgt, dass die effektive Viskosität in beiden Probengefäßen nahezu gleich ist. Somit haben ähnlich starke Kräfte in beiden Kapillaren auf die Filamente gewirkt, welches zu einer vergleichbaren Ordnung in diesen Probengefäßen führte.

7.2 Diskussion über die ordnungsabhängigen Lokalisationsröhren von Aktinfilamenten

7.2.1 Vergleich der Lokalisationsröhre in der großen Kapillare und der makroskopischen Kammer

Da die Filamente in der Kammer isotrop in zwei Dimensionen verteilt sind und in der Kapillare eine Vorzugsrichtung aufweisen, konnte die Lokalisationsröhre demnach unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen bezüglich der Ausrichtung untersucht werden. Da die Röhrenradienkorrektur mittels der LSF die Röhrenradien lediglich zu kleineren Werten verschiebt, werden die Ergebnisse der Rohdaten und LSF-korrigierten Daten simultan diskutiert.

In dieser Arbeit konnten die Röhrenradienverteilungen von Aktinfilamenten in Kapillaren

in Abhängigkeit der Aktinkonzentration, wie sie in der Doktorarbeit von Dr. Inka Kirchenbüchler beschrieben wurde, reproduziert werden [84, 48]. Sowohl in den Kapillaren als auch in der makroskopischen Kammer wird die Asymmetrie der Röhrenradienverteilung $P(r)$ und damit die Dynamik des röhrenartigen Käfigs um das Filament bestätigt. Mit zunehmender Aktinkonzentration verschieben sich die Verteilungen zu kleineren Röhrenradien (vgl. Abbildung 4.1a, 4.1b 4.4a, 4.4b). Durch den Kolmogorov-Smirnov Signifikanztest wurde bewiesen, dass die Röhrenradienverteilungen in der großen Kapillare und in der Kammer zu jeder Aktinkonzentration für ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch unterschiedlich sind. Die Ausnahme bilden die LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen für $c_{\text{Aktin}} = 0,8 \text{ mg/ml}$. Ein möglicher Grund könnte die Auflösungsgrenze des Mikroskops sein. Röhrenradien, welche diese unterschreiten, können nicht aufgelöst werden und die Verteilungen scheinen identisch zu sein. Die Abnahme der Röhrenradien in der makroskopischen Kammer relativ zu denen in der Kapillare stimmt mit Onsagers Theorie überein [101]. Wie in Abschnitt 3.3 geschildert, sind die Filamente in der Kammer in den Ebenen parallel zur Fokusebene des Mikroskops isotrop verteilt und in der Kapillare entlang der x-Achse ausgerichtet. Aus der Theorie folgt, dass im Gleichgewichtszustand die freie Energie dann minimal ist, wenn sich die Filamente isotrop anordnen, weil dann die Entropie maximal ist. Dies bedeutet wiederum, dass das ausgeschlossene Volumen vergrößert wird und folglich die Filamente weniger freien Fluktuationsraum haben. Der Röhrenradius würde im Vergleich zu ausgerichteten Filamenten kleiner werden, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt.

7.2.2 Diskussion der Abweichungen zwischen Experiment und Theorie

Die Segment-Fluid-Theorie, welche von unseren Kooperationspartnern (Arbeitsgruppe Prof. Kroy, Universität Leipzig) aufgestellt wurde, beschreibt die Verteilung der Röhrenradien und wurde mit den experimentell bestimmten Verteilungen verglichen. Die Fitparameter waren zum einen das Verhältnis von Kontur- und Verschlaufungslänge $\epsilon_L = L/L_e$ und zum anderen die Konturlängendichte $\rho_0 = c \cdot L$.

Die Werte der Fitparameter in der Kapillare sind mit den Werten, welche zuvor in der Arbeit von Dr. Inka Kirchenbüchler bestimmt wurden, vergleichbar [48]. Der Parameter für die Konturlängendichte ist im Vergleich zur Arbeit von Glaser et. al [48] zwar höher, aber dennoch um mindestens einen Faktor von 5,2 zu klein. Zudem weist die Anpassung der theoretischen Verteilungen an die experimentell ermittelten Verteilungen für $c_{\text{Aktin}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ nach wie vor einen deutlichen Unterschied auf. Da die SMF-Theorie

eine isotrope Verteilung der Aktinfilamente voraussetzt, wurde vermutet, dass die Anpassungen an Röhrenradienverteilungen, welche für Aktinfilamente in der makroskopischen Kammer bestimmt wurden, besser seien. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Trotz isotroper Filamentverteilung in der makroskopischen Kammer stimmen die Fitparameter für diese Kammer nicht mit den Erwartungen überein. Die Messungen der Röhrenverteilungen für isotrop verteilte Filamente ergab somit keine bessere Übereinstimmung der Theorie mit den Experimenten. Weitere Ursachen für den Unterschied zwischen Theorie und Experiment wurden bereits in der Arbeit von Dr. Inka Kirchenbücher aufgeführt [84]. In dieser wurde unter anderem angemerkt, dass besonders kollektive Moden (gemäß der Effektiven-Moden-Theorie nach Morse [95]) den Unterschied zwischen Theorie und Experiment begründen könnten. Um den Einfluss der Filamentausrichtung zu bestimmen, wurden unter Berücksichtigung der Ansatzfunktion von Onsager in der SMF-Theorie (vgl. Gl. 1.14) Fitparameter für die Ordnung bestimmt, welche die Ordnung der Filamente bei gegebenen Röhrenradienverteilungen voraussagen. Ein Vergleich dieses Ordnungsparameters mit dem in dieser Arbeit für die große Kapillare bestimmten ist in guter Übereinstimmung für Filamente mit Konturlängen von $20\ \mu\text{m}$. Da für die Auswertung der Röhrenradien nur Filamente am Mikroskop aufgenommen wurden, deren Konturlängen mindestens so groß wie die Persistenzlänge sind, ist der Wert für den Fitparameter der Ordnung ein realistischer Wert. Die Ordnungsparameter, welche für die makroskopische Kammer vorausgesagt wurden, stimmen mit den in dieser Arbeit bestimmten Ordnungsparametern nicht überein. Da in der Theorie die absoluten Filamentlängen nicht berücksichtigt werden, kann der Unterschied der Ordnungsparameter nicht durch Längenverteilungen begründet sein. Eine weitere Ursache für den Unterschied der drei Fitparameter könnte die Dynamik der Röhre selbst sein. Deshalb könnten mögliche Änderungen der Fluktuationsamplituden über lange Zeiten ($t \gg 150\ \text{s}$) die Abweichung der Theorie von den Experimenten erklären.

7.2.3 Vergleich der Lokalisationsröhre in beiden Mikrokapillaren

Die LSF-korrigierten Röhrenradienverteilungen waren bei Aktinkonzentrationen von $c_{\text{Aktin}} = 0,4\ \text{mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,6\ \text{mg/ml}$ nicht signifikant unterschiedlich. Das Ergebnis entspricht den Erwartungen, da zum einen die auf die Filamente wirkenden Scherkräfte während der Befüllung vergleichbar hoch und zum anderen die Ordnungsparameter unter Berücksichtigung gleicher Filament- und Segmentlängen gleich sind.

7.3 Einfluss der Kapillarkräfte auf Aktinfilamente

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Kapillaren mit polymerisierter Aktinlösung und destilliertem Wasser fast mit der gleichen Geschwindigkeit gefüllt werden (vgl. Tabelle 5.3). Nach Son [125] wurde mit diesen Füllgeschwindigkeiten und den Kapillarabmessungen die Scherrate bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Filamente durch die Kapillarbefüllung mit Raten bis zu 1400 s^{-1} geschert wurden. Da die mittleren Filamentlängen in den Kapillaren nicht kürzer sind als in der Kammer (vgl. Tabelle 3.1), kann vermutet werden, dass diese hohen Scherraten kein Reißen der Filamente induzieren. Zudem konnte durch Bestimmung der Oberflächenspannung und des Kontaktwinkels der Kapillardruck und daraus die Scherspannung bestimmt werden. Über das Verhältnis der Scherspannung zur Scherrate wurde die effektive Viskosität bestimmt. Bei Scherraten von ungefähr 1000 s^{-1} wurde gezeigt, dass die polymerisierten Aktinlösungen effektive Viskositäten aufweisen, welche mit der des Wassers vergleichbar sind. Dieses Ergebnis ist nicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Literatur [117], trotz vergleichbarer Scherraten und Aktinkonzentrationen. Dieser Unterschied kann daraus folgen, dass die Scherraten, die in den Versuchen von Sato et al. eingestellt wurden, kontinuierlich von $0,01\text{ s}^{-1}$ auf 1000 s^{-1} erhöht wurden, während in dieser Arbeit die Scherrate durch die Kapillarbefüllung konstant war.

7.4 Diskussion über die Lokalisationsröhren von Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Gegenionkonzentration

Zunächst werden die Ergebnisse der Lichtstreuung und anschließend die der Röhrenradienverteilungen thematisiert.

In den Lichtstreuungen wurde die gestreute Intensität an Aktinlösungen ($c_{\text{Aktin}} = 0,2\text{ mg/ml}$ und $c_{\text{Aktin}} = 0,4\text{ mg/ml}$) in Abhängigkeit der Magnesiumionkonzentration $c_{\text{Mg}^{2+}}$ bestimmt. Für $c_{\text{Mg}^{2+}} > 15\text{ mM}$ konnte ein Sprung in den Intensitätsspektren analog eines Phasenübergangs erster Ordnung beobachtet werden, welcher einen Hinweis auf die Bildung von Aktinbündelung gibt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Literatur [131]. Tang et al. zeigten, dass mit steigender Konzentration an Kaliumchlorid die Menge an zweiwertigen Ionen erhöht werden muss, damit Aktinfilamente sich zu Bündeln anordnen [131]. Für eine Aktinkonzentration von $c_{\text{Aktin}} = 0,2\text{ mg/ml}$ und einer Kaliumchloridkonzentration von $c_{\text{KCl}} = 150\text{ mM}$ konnten sie Aktinbündel bei

$c_{\text{Mg}^{2+}} = 25 \text{ mM}$ beobachten. Da die Konzentration an Kaliumchlorid im Puffer in dieser Arbeit kleiner ist ($c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mM}$), setzte die Aktinbündelung wie erwartet bei niedrigeren Werten von $c_{\text{Mg}^{2+}}$ ein ($c_{\text{Mg}^{2+}} > 15 \text{ mM}$).

Eine Anforderung an die Messungen der Filamentfluktuationen war, dass diese in Abhängigkeit von Konzentrationen an Magnesiumionen durchgeführt wurden, bei welchen noch keine Aktinbündel erwartet werden. Eine Bestätigung, dass in dieser Arbeit die Lokalisationsröhre für Aktinlösungen bestimmt wurde, welche zumindest nicht von Aktinbündeln dominiert waren, liefert der Vergleich mit der Literatur von He et al. [55]. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass der Schermodul für $c_{\text{Aktin}} = 1 \text{ mg/ml}$ bei Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration auf bis zu $c_{\text{Mg}^{2+}} = 16 \text{ mM}$ im Puffer unverändert bleibt¹. Somit kann für die Messung der Lokalisationsröhre sichergestellt werden, dass in der makroskopischen Kammer noch ein isotropes, verschlaufes Aktinnetzwerk bestehen bleibt. Die Vermutung, dass sich bei $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ dennoch wenige Bündel gebildet oder Umorientierungen der Filamente stattgefunden haben, wird durch theoretische Arbeiten von Borukhov et al. bestätigt [13]. Sie behaupteten, dass Polyelektrolyte in Abhängigkeit von Gegenionen durch eines von drei von ihnen vorgestellten Phasendiagrammen beschreibbar sei. In jedem dieser Phasendiagramme existieren Koexistenzen von isotropen Netzwerken und Aktinbündel bzw. von isotropen Netzwerken und Netzwerken, in welchen sich die stäbchenförmigen Polyelektrolyte umorientiert haben. Diese Phase wird in der Veröffentlichung „cubatic phase“ genannt und beschreibt Filamente, die sich willkürlich in drei Richtungen senkrecht zu einander anordnen. Zudem konnten Wong et al. mittels Doppelbrechung an Aktinlösungen zeigen, dass Koexistenzen von isotropen Netzwerken und Bündeln wahrscheinlich sind [147]. Basierend auf diesem Hintergrund können die Röhrenradienverteilungen in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration folgendermaßen interpretiert werden: Die Röhrenverteilungen (sowohl die der Rohdaten als auch der LSF-korrigierten Daten) unterscheiden sich zu jeder Aktinkonzentration signifikant und sind zu höheren Werten verschoben, wenn mehr Magnesiumionen ($c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$) im Puffer vorhanden sind als im physiologischen Puffer ($c_{\text{Mg}^{2+}} = 2 \text{ mM}$) (vgl. Abbildung 6.3). In Anlehnung an die Veröffentlichungen von Borukhov und Wong, wird angenommen, dass sich in der Aktinlösung neben isotrop verteilten Aktinfilamenten auch Aktinbündel befinden oder lokal Bereiche existieren können, in welchen sich die Filamente umorientiert haben. Möglicherweise ist die Zahl der Kollisionspartner der Röhren aller übrigen Filamenten erniedrigt. Die Filamente in ihrer Röhre hätten folglich einen größeren Fluktuationsraum zur Verfügung, woraus die Verschiebung des Röhrenradius zu höheren Werten resultieren könnte.

¹Diese Arbeitsgruppe verwendetet eine Menge an Kaliumchlorid von $c_{\text{KCl}} = 50 \text{ mM}$ im Puffer.

8 Ausblick

Viele Arbeitsgruppen haben gegenwärtig den Fokus ihrer Forschungsarbeiten zur Gegenionkondensation von Biopolymeren auf die Untersuchung der Bündelstruktur oder auf die Untersuchung der Phasenübergänge von Biopolymeren bei Variation der Gegenionen gelegt [64, 69, 147]. Dennoch ist wenig über die Dynamik, speziell von Aktinfilamenten, während des Phasenübergangs von isotrop verteilten zu gebündelten Filamenten bekannt. He et. al [56] haben bereits gezeigt, dass die Diffusion von Aktinfilamenten in der nematischen Phase (bei $c_{\text{Aktin}} = 4,0 \text{ mg/ml}$) aufgrund von Gegenionkondensation mit Magnesiumionen langsamer abläuft als unter physiologischen Pufferbedingungen. Bei Untersuchung der Diffusion parallel zur Filamentachse in isotropen Aktinlösungen ($c_{\text{Aktin}} = 1,0 \text{ mg/ml}$) konnten sie hingegen zeigen, dass diese Diffusion nicht von den Gegenionen beeinflusst wird.

Da in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt wurde, dass die Magnesiumionen einen Einfluss auf die transversalen Fluktuationen haben, muss im nächsten Schritt nachgewiesen werden, ob die Filamente bei Magnesiumionenkonzentrationen von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$ bereits Bündel bilden oder sich lokal zu definierten Strukturen, wie kürzlich gezeigt werden konnte [69], umorientieren und damit die Zunahme des Röhrenradius relativ zur Konzentration im physiologischen Puffer begründen. Zur Realisierung der dafür benötigten Experimente könnte das Verhältnis der markierten zu unmarkierten Aktinfilamente erhöht und weitere Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, um die Anordnung der Filamente in drei Dimensionen zu analysieren.

Darüber hinaus wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen theoretisch vorausgesagt, dass Aktinfilamente bei niedrigeren Konzentrationen bündeln, wenn sie durch minimale Scherkräfte entlang einer Vorzugsrichtung ausgerichtet werden [12, 39]. Für die Untersuchung der Dynamik und der lokalen Filamentorientierung in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration bei gleichzeitiger Vororientierung der Filamente, bieten die Mikrokapillaren eine optimale Möglichkeit.

Des Weiteren könnte untersucht werden, inwieweit die Wände der makroskopischen Kammer die Filamentorientierung beeinflussen. Eine Möglichkeit wäre die Abklinglängen zu bestimmen oder die Filamentorientierung im Raum bei einem möglichst großen Abstand

von der Grundfläche der Kammer. Dies könnte mit einem LD-Objektiv, wie z.B LD C-Apochromat 63x/1.15 W Corr M27, realisiert werden, da mit diesem ein Arbeitsabstand von fast 0,6 mm erreicht werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zukünftige Versuche zur dynamischen Analyse von Aktinfilamenten in Abhängigkeit der Gegenionen für ein Verständnis der Kräfteverteilung während der Bündelung unerlässlich sind. Um die polyelektrolytische Natur der Aktinfilamente in der Segment-Fluid-Theorie zu berücksichtigen, können mit Hilfe dynamischer Messungen die Wechselwirkungen von geladenen Aktinfilamenten mit Gegenionen zu einem besseren Verständnis beitragen.

9 Anhang

9.1 Auflistung aller verwendeter Geräte, Chemikalien und Materialien

Tabelle 9.1: Verwendete Programme

<i>Name</i>	<i>Version</i>	<i>Herausgeber</i>
Imaris	Imaris x64 7.6.4 Imaris x64 7.6.5	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
MATLAB	2012 A32-Bit 2012 A64-Bit	The MathWorks, Massachusetts (USA)
FIJI is just ImageJ	1.47a (64-Bit)	Wayne Rasband, National Institute of Health (Washington D.C., USA)
Solis	4.22.30005.0 (64-Bit)	Andor Technologies, Connecticut (USA)
Zeiss LSM Image Browser	4.20.121	Carl Zeiss MircoImaging GmbH, Jena
Origin	9.0G 32-Bit	Origin Lab; Northampton (USA)
Datamax	2.2	Jobin Yvon Horiba, Unterhaching

Tabelle 9.2: Technische Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Hersteller</i>
Zentrifuge	Avanti-J-20XP Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor	Ja-10	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Optima LE-80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor	Type-45 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor	Type-60 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Homogenisator	Counce, 17 ml loose	Wheaton, Millville, NJ (USA)
Nanodrop	ND-100	Peqlab, Erlangen
Flüssigkeits- chromatographie	Äkta FPLC; UPC-900	GE Healthcare, München
Chromatographiesäule	XK50/100	GE Healthcare, München
Säulenmaterial	Sephacryl S-300	GE Healthcare, München
Mikroskop	LSM 510	Zeiss, Jena
Objektiv	C-Apochromat 63x/1.2W corr	Zeiss, Jena
Mikroskop	Axiovert 200	Zeiss, Jena
Objektiv	Plan-Neofluar 2.5x/0.075 pol	Zeiss, Jena
Fluoreszenz- spektrometer	Fluorolog 3-22	Jobin Yvon Horiba; Unterhaching
Kamera	Zyla sCmos	Andor Technologies, Connecticut (USA)
Waage	Labstyle 204	Mettler-Toledo, Gießen
Messschieber	IP 67	Garant, Hoffmann Group, München
Schrittmotor	MDrive 2 3	Steinmeyer, Feinmeß, Dresden

Tabelle 9.3: Verbrauchsmaterialien

<i>Name</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Hersteller</i>
Verbandmull	Gazin	Lohmann Rauscher, Neuwied
Dialyseschläuche	Spectra/Por No.4; MWCO 12-14000 Da	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	1, 5 ml Safe-Lock	Eppendorf, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	2 ml Safe-Lock	Eppendorf, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	1, 5 ml Safe-Lock (blickdicht)	Eppendorf, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	BD-Falcon, 15 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kammerobjektträger	Lab-Tek- Chambers	Thermo Scientific, Braunschweig
Rechteckige Kapillaren	W5010-50	Vitrocom, Shipley, UK
Rechteckige Kapillaren	W5005-50	Vitrocom, Shipley, UK
Küvette	115F-QS, 400 ml	Hellma Analytics, Müllheim
Deckgläser	No.00	Menzel, Braunschweig
Deckgläser	No.0	Menzel, Braunschweig
Objektträger	AA00000112E	VWR, Darmstadt

Tabelle 9.4: Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Hersteller</i>
Trizma Base	T1503	Sigma, Taufenkirchen
CaCl ₂	1.02382.0500	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	M2670	Sigma, Taufenkirchen
KCl	P933	Sigma, Taufenkirchen
Adenosintriphosphat	A2383	Sigma, Taufenkirchen
Dithiothreitol	1.11474.005	Merck, Darmstadt
TRITC-Phalloidin	P1951	Sigma, Taufenkirchen
Polysterene Latex Beads	PSF R 3256	Magspheres, California
Agarose	A9539	Sigma, Taufenkirchen

9.2 Pufferzusammensetzung

Das Ansetzen des G- und 10xF-Puffers erfolgte analog der Arbeiten von Frau Romanowska und Frau Dr. Kirchenbüchler [112, 84], wobei in dieser Arbeit die Konzentration an Tris auf insgesamt 5 mM erhöht wurde. Die Zusammensetzung des 10xF-Mg-Puffers resultierte aus den Versuchen aus Abschnitt 6.1.1. Jeder Puffer wurde so angesetzt, dass nach Zugabe von Tris Base, CaCl₂, DTT und ATP der pH-Wert gemessen und anschließend mit HCl auf pH=8 titriert wurde. Für die Polymerisation von Aktin wurde die Lösung mit 1/10 10xF-Puffer bzw. 10xF-Mg-Puffer versetzt. Nach Auftauen dieser Puffer wurden frisch 5,0 mM ATP und 2,0 mM DTT hinzugegeben. Die genauen Anteile der Substanzen aller in dieser Arbeit verwendeten Puffer (G-Puffer, 10xF-Puffer und 10xF-Mg-Puffer) sind in der Tabelle 9.5 aufgelistet.

Die unterschiedlichen Puffer sind folgendermaßen zusammengesetzt:

Tabelle 9.5: Pufferzusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten G-, 10xF-, und 10xF-Mg-Puffer

<i>G-Puffer</i>	<i>10xF-Puffer</i>	<i>10xF-Mg-Puffer</i>
5 mM Tris Base	50 mM Tris Base	50 mM Tris Base
0,2 mM CaCl ₂	2,0 mM CaCl ₂	2,0 mM CaCl ₂
0,2 mM DTT	1,0 M KCl	1,0 M KCl
0,2 mM ATP	20 mM MgCl ₂	500 mM MgCl ₂
pH=8,0	pH=8,0	pH=8,0
	+ 5,0 mM ATP	+5,0 mM ATP
	+2,0 mM DTT	+2,0 mM DTT

9.3 Abkürzungsverzeichnis

a	Abstand entlang Filamentkontur analysierter Röhrenradien
A	Fläche
$\alpha = 0,05$	Signifikanzniveau
ABP	Aktin-bindende Proteine
ATP	Adenosintriphosphat
B	Biegesteifigkeit
b	linearer Ladungsabstand
Bo	Bond-Zahl
$c = c_{\text{Aktin}}$	Aktinkonzentration
$c_{\text{Mg}^{2+}}$	Magnesiumionenkonzentration
Ca	Kapillarzahl
C_c	Kritische Monomerkonzentration
D	Prüfgröße im Kolmogorov-Smirnov Signifikanztest
$D_{\text{krit.}}$	kritischer Wert im Kolmogorov-Smirnov Signifikanztest
D_{rep}	Diffusionskoeffizient der Reptation
DTT	Dithiothreitol
e_0	Elementarladung
E	Biegeenergie
ϵ	Dielektrizitätskonstante
ϵ_L	Fitparameter der SFM-Theorie
g	Gravitationsbeschleunigung
γ	Oberflächenspannung
Gl.	Gleichung

$\dot{\gamma}$	Wandscherrate
H	Kapillarhöhe
h	Stunde
HeNe	Helium-Neon
j	Röhrenradienanzahl in der Kammer in Anwesenheit von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$
J'	Stichprobenanzahl in der Kammer in Anwesenheit von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 10 \text{ mM}$
k	Röhrenradienanzahl in der kleinen Kapillare
K'	Stichprobenanzahl in der kleinen Kapillare
κ^{-1}	Debye-Abschirmungslänge
k_{B}	Boltzmann-Konstante
K_t	Korrelationskoeffizient
k_{on}	Ratenkonstante der Monomeranlagerung
k_{off}	Ratenkonstante des Monomerabbaus
L	Kapillarlänge
l_{B}	Bjerrum-Länge
L_{Fil}	Filamentlänge
$L_{\text{ges},j}$	Gesamte Filamentlänge berechnet aus Röhrenradienanzahl j
$L_{\text{ges},k}$	Gesamte Filamentlänge berechnet aus Röhrenradienanzahl k
$L_{\text{ges},m}$	Gesamte Filamentlänge berechnet aus Röhrenradienanzahl m
$L_{\text{ges},n}$	Gesamte Filamentlänge berechnet aus Röhrenradienanzahl n
L_{P}	Persistenzlänge
L_{S}	Segmentlänge
L_{seg}	Segmentlänge berechnet mit Hilfe der Segment-Fluid-Theorie
LSF	Linienpreisfunktion

LSM	konfokales Mikroskop
λ_i	Eigenwerte
Λ	Anregungswellenlänge
m	Röhrenradienanzahl in der großen Kapillare
M'	Stichprobenanzahl in der großen Kapillare
ΔM	Wägeunterschied
μ	Viskosität
μ_0	chemisches Referenzpotential
μ_{eff}	Effektive Viskosität
min	Minuten
<i>min</i>	Minimum
n	Röhrenradienanzahl in der makroskopischen Kammer
n_r	Brechungsindex
N'	Stichprobenanzahl in der makroskopischen Kammer
N	Segmentanzahl pro Bildstapel
N_{Kugel}	Anzahl fluoreszierender Kugeln
\tilde{n}	Anzahl der Bildstapel
\tilde{N}	Punktanzahl pro Bildstapel
N_{ges}	Summe über alle Filamente pro Konzentration
\vec{p}_i	Eigenvektoren zu Eigenwerten χ_i
$\langle P \rangle$	Mittlerer Punktabstand pro Bildstapel
$\langle dp \rangle$	Mittlerer Abstand zwischen zwei Punkten
dp_{max}	Maximaler Abstand zwischen zwei Punkten
Δp	Kapillardruck

$P(r)$	Wahrscheinlichkeitsverteilung der Röhrenradien
PSF	Punktspreizfunktion
PW	Prüfwert im Kolmogorov-Smirnov Signifikanztest
\vec{q}_i	Eigenvektoren zu Eigenwerten λ_i
r	Röhrenradius
r_{korrr}	LSF-korrigierter Röhrenradius
r_{LSF}	Abmessung der LSF
$\langle r \rangle$	Mittlerer Röhrenradius
$\langle r_{\text{korrr}} \rangle$	Mittlerer LSF-korrigierter Röhrenradius
ρ	Dichte
ρ_0	Fitparameter der SMF-Theorie
ρ_p	Konturlängendichte
Re	Reynoldszahl
S	Ordnungsparameter
σ	Standardabweichung
S_{or}	Orientierungsentropie
sup	Supremum
τ	Wandscherspannung
τ_r	Relaxationszeit
τ_{rep}	Reptationszeit
Θ_i	Kontaktwinkel in Kapillare i
Θ_M	Anteil der kondensierten Gegenionen
U	Umfang
$U(r)$	Wechselwirkungspotential

v_i	Füllgeschwindigkeit in Kapillare i
W	Kapillarweite
χ_i	Eigenwerte
ξ	Maschenweite
ζ_M	Manning-Parameter
z_i	Ladungszahl der Ionensorte i

Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Rudolf Merkel für die spannende Themenstellung und noch viel mehr für zahlreiche, intensive Diskussionsrunden, in welchen ich immerwährend dazulernen konnte und welche mich stets in meiner Arbeit motivierten.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Ulrich Kubitscheck für die Übernahme des Koreferats.

Besonders danke ich Dr. Inka Kirchenbüchler für die großartige Einführung und Einarbeitung, für aufschlussreiche Diskussionen und für eine schöne Bürozeit.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Ronald Springer für zahlreiche, intensive Diskussionen und für die große Hilfe und Geduld rund um Matlab. Ich danke dir wirklich sehr für deine motivierende Unterstützung während dieser drei Jahre. Es hat einfach nur Spaß gemacht mit dir zu arbeiten.

Ebenso danke ich Georg Dreissen für die Hilfe bei Matlab und Diskussionen.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Klaus Kroy und Marc Lämmel vom Institut für theoretische Physik der Universität Leipzig für eine erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank Marc für die vielen Diskussionen und die Korrektur meiner Arbeit.

Dr. Bernd Hoffmann, Dr. Erik Noetzel, Nils Hersch und Lukas Bethlehem danke ich sehr für die Aktinisolation.

Ich danke Nico Hampe für die Hilfe bei den Messungen der Oberflächenspannungen.

Ebenfalls danke ich Dr. Kevin Küpper für viele Erklärungen zur Kameratechnologie.

Ich möchte mich bei Ronald, Marc, Simone, Lena und Gloria für die Korrektur meiner Arbeit bedanken.

Zudem danke ich oftmals meinem Freund Sebastian für die kritische Durchsicht der Arbeit. Miriam und Nina danke ich oftmals spontan meine Arbeit korrigiert zu haben.

Ich danke meinen Kollegen und Kolleginnen des ICS-7 für eine tolle Arbeitsatmosphäre. Besonders werde ich die letzte Zeit mit Gloria, Lena und Ronald in schöner Erinnerung behalten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Von ganzem Herzen danke ich euch für eure Unterstützung, euer Vertrauen, eure Liebe.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Adamson and A. Gast. *Physical Chemistry of Surfaces*. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [2] S. G. Advani and C. L. Tucker. The use of tensors to describe and predict fiber orientation in short fiber composites. *Journal of Rheology*, 31:751–784, 1987.
- [3] B. Alberts. *Molecular Biology of the Cell: Reference edition*. Garland Science, New York, fifth edition, 2008.
- [4] P. G. Allen, C. B. Shuster, J. Käs, C. Chaponnier, P. A. Janmey, and I. M. Herman. Phalloidin binding and rheological differences among actin isoforms. *Biochemistry*, 35:14062–14069, 1996.
- [5] J. Alvarado, B. M. Mulder, and G. H. Koenderink. Alignment of nematic and bundled semiflexible polymers in cell-sized confinement. *Soft Matter*, 10:2329–2468, 2014.
- [6] R. Ananthakrishnan and A. Ehrlicher. The forces behind cell movement. *International Journal of Biological Sciences*, 3:303–317, 2007.
- [7] T. E. Angelini, H. Liang, W. Wriggers, and G. C. L. Wong. Like-charge attraction between polyelectrolytes induced by counterion charge density waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:8634–8637, 2003.
- [8] T. E. Angelini, H. Liang, W. Wriggers, and G. C. L. Wong. Direct observation of counterion organization in F-actin polyelectrolyte bundles. *The European Physical Journal E*, 16:389–400, 2005.
- [9] A. Bausch and K. Kroy. A bottom-up approach to cell mechanics. *Nature Physics*, 2:231–238, 2006.
- [10] S. Bendib and O. Français. Analytical study of microchannel and passive microvalve; application to micropump simulation. *Proc. SPIE, Proceeding, Design, Characterization, and Packaging for MEMS and Microelectronics*, 4593:283–291, 2001.
- [11] J. Berthier and P. Silberzan. *Microfluidics for Biotechnology*. Artech House integrated microsystems series. Artech House, Norwood, MA, second edition, 2010.
- [12] I. Borukhov and R. F. Bruinsma. Raft instability of biopolymer gels. *Physical Review Letters*, 87:158101, 2001.

- [13] I. Borukhov, R. F. Bruinsma, W. M. Gelbart, and A. J. Liu. Structural polymorphism of the cytoskeleton: a model of linker-assisted filament aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:3673–3678, 2005.
- [14] F. P. Bretherton. The motion of rigid particles in a shear flow at low reynolds number. *Journal of Fluid Mechanics*, 14:284–304, 1962.
- [15] C. Ciobanasu, B. Faivre, and C. Le Clainche. Actin dynamics associated with focal adhesions. *International Journal of Cell Biology*, 2012:941292–941300, 2012.
- [16] M. M. A. E. Claessens, C. Semmrich, L. Ramos, and A. R. Bausch. Helical twist controls the thickness of F-actin bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:8819–8822, 2008.
- [17] A. Collyer and D. Clegg. *Rheological Measurement*. Elsevier Applied Science, London, New York, 1988.
- [18] L. M. Coluccio and L. G. Tilney. Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation. *The Journal of Cell Biology*, 99:529–535, 1984.
- [19] J. A. Cooper and T. D. Pollard. Methods to measure actin polymerization. *Methods in Enzymology*, 85:182–210, 1982.
- [20] J. D. Cortese and C. Frieden. Microheterogeneity of actin gels formed under controlled linear shear. *The Journal of Cell Biology*, 107:1477–1487, 1988.
- [21] P. Dancker, I. Löw, W. Hasselbach, and W. Wieland. Interaction of actin with phalloidin: Polymerization and stabilization of F-actin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 400:407–414, 1975.
- [22] P. de Gennes. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, New York, 1979.
- [23] P. de Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quere. *Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves*. Springer, New York, 2004.
- [24] P. G. de Gennes. Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles. *The Journal of Chemical Physics*, 55:572–579, 1971.
- [25] P. G. de Gennes. Wetting: statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics*, 57:827–863, 1985.
- [26] P. G. de Gennes and J. Prost. *The Physics of Liquid Crystals*. International Series of Monographs on Physics. Clarendon Press, Oxford, 1995.
- [27] E. M. De La Cruz and T. D. Pollard. Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species. *Biochemistry*, 35:14054–14061, 1996.

- [28] P. Debye. Light scattering in solutions. *Journal of Applied Physics*, 15:338–342, 1944.
- [29] M. A. Deriu, T. C. Bidone, F. Mastrangelo, G. Di Benedetto, M. Soncini, F. M. Montevecchi, and U. Morbiducci. Biomechanics of actin filaments: a computational multi-level study. *Journal of Biomechanics*, 44:630–636, 2011.
- [30] M. A. Dichtl and E. Sackmann. Colloidal probe study of short time local and long time reptational motion of semiflexible macromolecules in entangled networks. *New Journal of Physics*, 1:18.1–18.11, 1999.
- [31] Z. Dogic, J. Zhang, A. W. C. Lau, H. Aranda-Espinoza, P. Dalhaimer, D. E. Discher, P. A. Janmey, R. D. Kamien, T. C. Lubensky, and A. G. Yodh. Elongation and fluctuations of semiflexible polymers in a nematic solvent. *Physical Review Letters*, 92:125503–1–125503–4, 2004.
- [32] M. Doi and S. Edwards. *The Theory of Polymer Dynamics*. International series of monographs on physics. Clarendon Press, Oxford, 1988.
- [33] R. Dominguez and K. C. Holmes. Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics*, 40:169–186, 2011.
- [34] M. Dreyer, A. Delgado, and H.-J. Path. Capillary rise of liquid between parallel plates under microgravity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 163:158 – 168, 1994.
- [35] C. Eberhardt and A. Clarke. Fibre-orientation measurements in short-glass-fibre composites. Part I: automated, high-angular-resolution measurement by confocal microscopy. *Composites Science and Technology*, 61:1389–1400, 2001.
- [36] S. F. Edwards. The statistical mechanics of polymerized material. *Proceedings of the Physical Society*, 92:9–16, 1967.
- [37] M. Elzinga, J. H. Collins, W. M. Kuehl, and R. S. Adelstein. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70:2687–2691, 1973.
- [38] H. B. Eral, D. J. C. M. 't Mannetje, and J. M. Oh. Contact angle hysteresis: a review of fundamentals and applications. *Colloid and Polymer Science*, 291:247–260, 2013.
- [39] A. V. Ermoshkin and M. Olvera de la Cruz. Polyelectrolytes in the presence of multivalent ions: Gelation versus segregation. *Physical Review Letters*, 90:125504, 2003.
- [40] J. Estes, L. Selden, and L. Gershman. Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry*, 20:708–712, 1981.
- [41] H. Fazli, S. Mohammadinejad, and R. Golestanian. Salt-induced aggregation of stiff polyelectrolytes. *Journal of Physics. Condensed Matter*, 21:424111, 2009.

- [42] P. J. Flory. Statistical thermodynamics of semi-flexible chain molecules. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 234:60–73, 1956.
- [43] E. Frey. Physics in cell biology: Actin as a model system for polymer physics. *Advances in Solid State Physics*, 41:345–356, 2001.
- [44] N. Fries and M. Dreyer. The transition from inertial to viscous flow in capillary rise. *Journal of Colloid and Interface Science*, 327:125 – 128, 2008.
- [45] T. Fujii, A. H. Iwane, T. Yanagida, and K. Namba. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature*, 467:724–728, 2010.
- [46] R. Furukawa, R. Kundra, and M. Fechheimer. Formation of liquid crystals from actin filaments. *Biochemistry*, 32:12346–12352, 1993.
- [47] F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, and J. Howard. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *The Journal of Cell Biology*, 120:923–934, 1993.
- [48] J. Glaser, D. Chakraborty, K. Kroy, I. Lauter, M. Degawa, N. Kirchgeßner, B. Hoffmann, R. Merkel, and M. Giesen. Tube width fluctuations in F-Actin solutions. *Physical Review Letters*, 105:3–6, 2010.
- [49] J. Glaser and K. Kroy. *Biopolymers*, chapter Fluctuations of Stiff Polymers and Cell Mechanics. InTech, 2010.
- [50] J. Glaser and K. Kroy. Tube-width fluctuations of entangled stiff polymers. *Physical Review E*, 84:1–7, 2011.
- [51] P. Gutjahr, R. Lipowsky, and J. Kierfeld. Persistence length of semiflexible polymers and bending rigidity renormalization. *Europhysics Letters*, 76:994, 2006.
- [52] J. Hanson and J. Lowy. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *Journal of Molecular Biology*, 6:46 – 60, 1963.
- [53] J. P. Hartnett and M. Kostic. Heat transfer to Newtonian and non-Newtonian fluids in rectangular ducts. volume 19 of *Advances in Heat Transfer*, pages 247 – 356. Elsevier, 1989.
- [54] W. Haynes. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 94th edition, 2013.
- [55] J. He, M. Mak, Y. Liu, and J. Tang. Counterion-dependent microrheological properties of F-actin solutions across the isotropic-nematic phase transition. *Physical Review E*, 78:011908, 2008.
- [56] J. He, J. Viamontes, and J. Tang. Counterion-induced abnormal slowdown of F-actin diffusion across the isotropic-to-nematic phase transition. *Physical Review Letters*, 99:068103, 2007.

- [57] E. Helfer, P. Panine, M.-F. Carrier, and P. Davidson. The interplay between viscoelastic and thermodynamic properties determines the birefringence of F-actin gels. *Biophysical Journal*, 89:543–553, 2005.
- [58] P. Hiemenz and R. Rajagopalan. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, Inc, New York, third edition, 1997.
- [59] B. Hinner, M. Tempel, E. Sackmann, K. Kroy, and E. Frey. Entanglement, elasticity, and viscous relaxation of actin solutions. *Physical Review Letters*, 81:2614, 1998.
- [60] K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347:44–49, 1990.
- [61] Horiba Group. Fluorolog-3 - Operation Manual. Technical report, Japan, 2002.
- [62] M. Hosek and J. Tang. Polymer-induced bundling of F actin and the depletion force. *Physical Review E*, 69:1–9, 2004.
- [63] W. Huang, Q. Liu, and Y. Li. Capillary filling flows inside patterned-surface microchannels. *Chemical Engineering & Technology*, 29:716–723, 2006.
- [64] F. Huber, D. Strehle, and J. Käs. Counterion-induced formation of regular actin bundle networks. *Soft Matter*, 8:931–936, 2012.
- [65] H. Isambert and A. C. Maggs. Dynamics and rheology of actin solutions. *Macromolecules*, 29:1036–1040, 1996.
- [66] H. Isambert and P. Venier. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:11437–11444, 1995.
- [67] P. A. Janmey, S. Hvidt, J. Käs, D. Lerche, A. Maggs, E. Sackmann, M. Schliwa, and T. P. Stossel. The mechanical properties of actin gels. *Journal of Biological Chemistry*, 269:32503–32513, 1994.
- [68] P. A. Janmey, J. Peetermans, K. S. Zaner, T. P. Stossel, and T. Tanaka. Structure and mobility of actin filaments as measured by quasielastic light scattering, viscometry, and electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 261:8357–8362, 1986.
- [69] P. A. Janmey, D. R. Slochower, Y.-H. Wang, Q. Wen, and A. Cebers. Polyelectrolyte properties of filamentous biopolymers and their consequences in biological fluids. *Soft Matter*, 10:1439–1449, 2014.
- [70] H. Kang, M. J. Bradley, B. R. McCullough, A. Pierre, E. E. Grintsevich, E. Reisler, and E. M. De La Cruz. Identification of cation-binding sites on actin that drive polymerization and modulate bending stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109:16923–16927, 2012.
- [71] J. Käs, H. Strey, and E. Sackmann. Direct imaging of reptation for semiflexible actin filaments. *Nature*, 368:226–229, 1994.

- [72] J. Käs, H. Strey, J. X. Tang, D. Finger, R. Ezzell, E. Sackmann, and P. A. Janmey. F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semidilute, and liquid crystalline solutions. *Biophysical Journal*, 70:609–625, 1996.
- [73] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos. Snakes: Active contour models. *International Journal of Computer Vision*, 1:321–331, 1988.
- [74] S. Kaufmann, J. Käs, W. Goldmann, E. Sackmann, and G. Isenberg. Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes a direct demonstration. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 314:203–205, 1992.
- [75] A. R. Khokhlov and A. N. Semenov. Liquid-crystalline ordering in the solution of long persistent chains. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 108:546 – 556, 1981.
- [76] D. Kirchenbüchler, S. Born, N. Kirchgeßner, S. Houben, B. Hoffmann, and R. Merkel. Substrate, focal adhesions, and actin filaments: a mechanical unit with a weak spot for mechanosensitive proteins. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 22:194109, 2010.
- [77] A. Köhler. Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik.*, 10:433–440, 1893.
- [78] S. Köster, D. Steinhauser, and T. Pfohl. Brownian motion of actin filaments in confining microchannels. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17:S4091–S4104, 2005.
- [79] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 68:1106–1122, 1949.
- [80] S. J. Kron and J. A. Spudich. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83:6272–6276, 1986.
- [81] K. Kroy and E. Frey. Dynamic scattering from solutions of semiflexible polymers. *Physical Review E*, 55:3092–3101, 1997.
- [82] G. Lai, R. Coridan, O. Zribi, R. Golestanian, and G. Wong. Evolution of growth modes for polyelectrolyte bundles. *Physical Review Letters*, 98:98–101, 2007.
- [83] L. D. Landau and E. M. Lifshitz. *Statistical Physics*. Pergaman:Oxford, third edition, 1980.
- [84] I. Lauter. *Untersuchung mechanischer und dynamischer Eigenschaften von polymerisierten Aktinlösungen*. Diss., Univ. Bonn, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2011.
- [85] L. Le Goff, O. Hallatschek, E. Frey, and F. Amblard. Tracer studies on F-actin fluctuations. *Physical Review Letters*, 89:258101, 2002.

- [86] F. Leslie. Some constitutive equations for liquid crystals. *Archive for Rational Mechanics and Analysis*, 28:265–283, 1968.
- [87] R. Lucas. Über das Zeitgesetz des kapillaren Aufstiegs von Flüssigkeiten. *Kolloid-Zeitschrift*, 23:15–22, 1918.
- [88] S. MacLean-Fletcher and T. D. Pollard. Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 96:18–27, 1980.
- [89] G. S. Manning. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions i. Colligative properties. *The Journal of Chemical Physics*, 51:924–933, 1969.
- [90] G. S. Manning. Counterion condensation on charged spheres, cylinders, and planes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111:8554–8559, 2007.
- [91] T. G. Mason, T. Gisler, K. Kroy, E. Frey, and D. A. Weitz. Rheology of F-actin solutions determined from thermally driven tracer motion. *Journal of Rheology*, 44:917–928, 2000.
- [92] M. Minsky. Microscopy apparatus, 1961. US Patent 3,013,467.
- [93] C. Mohrdieck, F. Dalmas, E. Arzt, R. Tharmann, M. M. Claessens, A. Bausch, A. Roth, E. Sackmann, C. H. Schmitz, J. Curtis, W. Roos, S. Schulz, K. Uhrig, and J. Spatz. Biomimetic models of the actin cytoskeleton. *Small*, 3:1015–1022, 2007.
- [94] D. C. Morse. Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semiflexible polymers: 2. Linear response. *Macromolecules*, 31:7044–7067, 1998.
- [95] D. C. Morse. Tube diameter in tightly entangled solutions of semiflexible polymers. *Physical Review E*, 63:031502, 2001.
- [96] H. Nyquist. Certain topics in telegraph transmission theory. *Transactions of the American Institute of Electrical Engineers*, 47:617–644, 1928.
- [97] T. Oda, K. Makino, I. Yamashita, K. Namba, and Y. Maéda. Effect of the length and effective diameter of F-actin on the filament orientation in liquid crystalline sols measured by x-ray fiber diffraction. *Biophysical Journal*, 75:2672–2681, 1998.
- [98] T. Oda, K. Namba, and Y. Maéda. Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophysical Journal*, 88:2727–2736, 2005.
- [99] T. Odijk. The statistics and dynamics of confined or entangled stiff polymers. *Macromolecules*, 16:1340–1344, 1983.
- [100] T. Odijk. Theory of lyotropic polymer liquid crystals. *Macromolecules*, 19:2313–2329, 1986.

- [101] L. Onsager. The effects of shape on the interaction of colloidal particles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51:627–659, 1949.
- [102] F. Oosawa. Counterion fluctuation and dielectric dispersion in linear polyelectrolytes. *Biopolymers*, 9:677–688, 1970.
- [103] F. Oosawa. *Polyelectrolytes*. Marcel Dekker, New York, 1971.
- [104] F. Oosawa and M. Kasai. A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *Journal of Molecular Biology*, 4:10–21, 1962.
- [105] A. Ott, M. Magnasco, A. Simon, and A. Libchaber. Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Physical Review E*, 48:1642–1645, 1993.
- [106] J. D. Pardee and J. A. Spudich. Purification of muscle actin. *Methods in Enzymology*, 85 Pt.B:164–181, 1982.
- [107] J. Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer, Berlin, third edition, 2006.
- [108] T. D. Pollard and M. S. Mooseker. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *Journal of Cell Biology*, 88:654–659, 1981.
- [109] T. Pujol, O. du Roure, M. Fermigier, and J. Heuvingh. Impact of branching on the elasticity of actin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109:10364–10369, 2012.
- [110] J. Ray and G. S. Manning. An attractive force between two rodlike polyions mediated by the sharing of condensed counterions. *Langmuir*, 10:2450–2461, 1994.
- [111] H. Rinne. *Taschenbuch der Statistik*. Harri Deutsch GmbH, Frankfurt am Main, 2008.
- [112] M. Romanowska, H. Hinsch, N. Kirchgeßner, M. Giesen, M. Degawa, B. Hoffmann, E. Frey, and R. Merkel. Direct observation of the tube model in F-actin solutions: Tube dimensions and curvatures. *Europhysics Letters*, 86:26003, 2009.
- [113] F. Rost. *Fluorescence Microscopy*. Fluorescence Microscopy. Cambridge University Press, Cambridge and New York, 1995.
- [114] E. Sackmann. Intra- and extracellular macromolecular networks: physics and biological function. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 195:7–28, 1994.
- [115] E. Sackmann and R. Merkel. *Lehrbuch der Biophysik*. Lehrbuch Physik. Wiley-VCH-Verlag, Berlin, 2010.
- [116] N. Saitô, K. Takahashi, and Y. Yunoki. The statistical mechanical theory of stiff chains. *Journal of the Physical Society of Japan*, 22:219–226, 1967.

- [117] M. Sato, G. Leimbach, W. H. Schwarz, and T. D. Pollard. Mechanical properties of actin. *Journal of Biological Chemistry*, 260:8585–8592, 1985.
- [118] J. Seinfeld and S. Pandis. *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change*. A Wiley-Interscience publication. John Wiley and Sons, New Jersey, second edition, 2006.
- [119] A. N. Semenov. Dynamics of concentrated solutions of rigid-chain polymers. Part 1. Brownian motion of persistent macromolecules in isotropic solution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*, 82:317, 1986.
- [120] A. N. Semenov and A. R. Khokhlov. Statistical physics of liquid-crystalline polymers. *Soviet Physics Uspekhi*, 31:988, 1988.
- [121] C. Semmrich, T. Storz, J. Glaser, R. Merkel, A. R. Bausch, and K. Kroy. Glass transition and rheological redundancy in F-actin solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:20199–20203, 2007.
- [122] R. Shah and A. London. *Laminar flow forced convection in ducts: a source book for compact heat exchanger analytical data*. Academic Press, 1978.
- [123] B. I. Shklovskii. Wigner crystal model of counterion induced bundle formation of rodlike polyelectrolytes. *Physical Review Letters*, 82:3268–3271, 1999.
- [124] M. Soares e Silva, J. Alvarado, J. Nguyen, N. Georgoulia, B. M. Mulder, and G. H. Koenderink. Self-organized patterns of actin filaments in cell-sized confinement. *Soft Matter*, 7:10631–10641, 2011.
- [125] Y. Son. Determination of shear viscosity and shear rate from pressure drop and flow rate relationship in a rectangular channel. *Polymer*, 48:632–637, 2007.
- [126] J. A. Spudich and S. Watt. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *The Journal of Biological Chemistry*, 246:4866–4871, 1971.
- [127] M. Stange, M. E. Dreyer, and H. J. Rath. Capillary driven flow in circular cylindrical tubes. *Physics of Fluids*, 15:2587–2601, 2003.
- [128] G. G. Stokes. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142:463–562, 1852.
- [129] A. Suzuki, T. Maeda, and T. Ito. Formation of liquid crystalline phase of actin filament solutions and its dependence on filament length as studied by optical birefringence. *Biophysical Journal*, 59:25–30, 1991.
- [130] A. G. Szent-Györgyi. The early history of the biochemistry of muscle contraction. *The Journal of General Physiology*, 123:631–641, 2004.

- [131] J. X. Tang and P. A. Janmey. The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin bundle formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:8556–8563, 1996.
- [132] I. Teraoka. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002.
- [133] D. N. Theodorou and U. W. Suter. Shape of unperturbed linear polymers: polypropylene. *Macromolecules*, 18:1206–1214, 1985.
- [134] J. Viamontes, S. Narayanan, A. Sandy, and J. Tang. Orientational order parameter of the nematic liquid crystalline phase of F-actin. *Physical Review E*, 73:061901–10, 2006.
- [135] J. Viamontes, P. Oakes, and J. Tang. Isotropic to nematic liquid crystalline phase transition of F-actin varies from continuous to first order. *Physical Review Letters*, 97:118103, 2006.
- [136] L. Vonna, L. Limozin, A. Roth, and E. Sackmann. Single-filament dynamics and long-range ordering of semiflexible biopolymers under flow and confinement. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21:9635–9643, 2005.
- [137] B. Wang, J. Guan, S. M. Anthony, S. C. Bae, K. S. Schweizer, and S. Granick. Confining potential when a biopolymer filament reptates. *Physical Review Letters*, 104:1–4, 2010.
- [138] J. Y. Wang, S. Betelu, and B. M. Law. Line tension approaching a first-order wetting transition: Experimental results from contact angle measurements. *Physical Review E*, 63:031601–1 –10, 2001.
- [139] E. Washburn. The Dynamics of capillary flow. *Physical Review*, 17:273–283, 1921.
- [140] R. H. Webb. Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 59:427–471, 1996.
- [141] A. Wegner. Head to tail polymerization of actin. *Journal of Molecular Biology*, 108:139–150, 1976.
- [142] A. Wegner. Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *Journal of Molecular Biology*, 161:607–615, 1982.
- [143] A. Wegner and J. Engel. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophysical Chemistry*, 3:215–225, 1975.
- [144] H. Wendel and P. Dancker. Influence of phalloidin on both the nucleation and the elongation phase of actin polymerization. Measurement of actin polymerization. 915:199–204, 1987.
- [145] F. White. *Fluid Mechanics*. McGraw-Hill, New York, third edition, 1994.

- [146] T. Wieland. Interaction of phallotoxins with actin. *Advances in Enzyme Regulation*, 15:285–300, 1976.
- [147] G. C. L. Wong, A. Lin, J. X. Tang, Y. Li, P. A. Janmey, and C. R. Safinya. Lamellar phase of stacked two-dimensional rafts of actin filaments. *Physical Review Letters*, 91:1–4, 2003.
- [148] E. Wulf, A. Deboen, F. Bautz, H. Faulstich, and T. Wieland. Fluorescent phalloxin a tool for the visualization of cellular actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:4498–4502, 1979.
- [149] X. Xiao and P. Sheng. Generalized Onsager theory of liquid crystals. *Physical Review E*, 88:062501, 2013.
- [150] L.-J. Yang, T.-J. Yao, and Y.-C. Tai. The marching velocity of the capillary meniscus in a microchannel. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14:220–225, 2004.
- [151] B. H. Zimm. Molecular theory of the scattering of light in fluids. *The Journal of Chemical Physics*, 13:141–145, 1945.
- [152] B. H. Zimm. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 16:1093–1099, 1948.