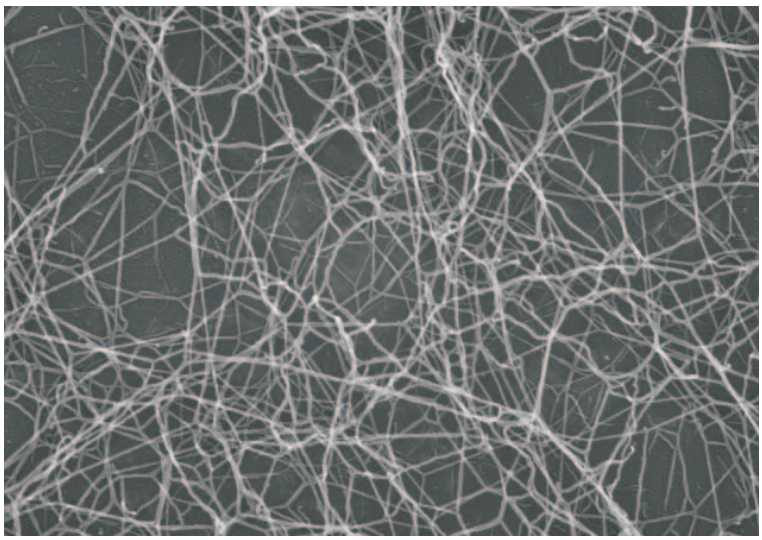
Nanomechanische Eigenschaften von Keratin 8/18 - Von Einzelfilamenten zu Netzwerken

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von: Anke Leitner aus Karlsruhe



Institut für Experimentelle Physik, Universität Ulm

ulm university universität uulm

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Axel Groß

Gutachter

1. Prof. Dr. sc. nat. ETH Zürich Othmar Marti

2. Prof. Dr. Kay-Eberhard Gottschalk

Tag der Promotion

Datum: 14.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**
1.1 Motivation und Fragestellung 1

2 Theoretische Grundlagen **5**
2.1 Aufbau der Eukaryontenzellen 5
2.1.1 Zellstruktur 5
2.1.2 Zytoskelett 6
2.1.3 Intermediärfilamente 9
2.2 Intermediärfilamentprotein Keratin 8/18 14
2.2.1 Struktur 14
2.2.2 Assemblierung 15
2.2.3 Polymorphismus 17
2.3 Freie Polymerketten 18
2.3.1 Bindungskinetiken 18
2.3.2 Worm-like-chain-Modell 28
2.4 Netzwerkmechanik 32
2.4.1 Netzwerkstruktur 33
2.4.2 Gele 35

3 Experimentelle Methoden **41**
3.1 Rasterkraftmikroskopie 41
3.1.1 Aufbau und Funktionsweise 41
3.1.2 Betriebsarten 44
3.1.3 Vorteile des Rasterkraftmikroskops 46
3.1.4 MFP 3D 47
3.2 Elektronenmikroskopie 47
3.2.1 Aufbau und Funktionsweise 48
3.2.2 Betriebsarten 48
3.3 Mikrorheologie 51
3.3.1 Aufbau und Funktionsweise 51
3.3.2 Modellbasierte Auswertung 53
3.4 Proteinpräparation 57

3.4.1 Konzentrationsbestimmung mit dem Bradfordtest 57
3.4.2 Dialyse 58
3.4.3 Assembly-Prozess 59
3.4.4 Probenpräparation 60
3.5 Zellkultur und Zellextraktion 64

4 Auswertung und Ergebnisse **65**
4.1 Einzelfilamente 65
4.1.1 Assemblykinetik 66
4.1.2 Berechnung der Persistenzlänge 78
4.1.3 Diskussion 83
4.2 Netzwerke 87
4.2.1 Dynamischer Schermodul - in vivo und in vitro 88
4.2.2 Netzwerkoptimierung 92
4.2.3 Strukturparameter von Keratin 8/18 Netzwerken 95
4.2.4 Heterogenität der Netzwerke 101
4.2.5 Struktur-Funktionsbeziehung 104
4.2.6 Dreidimensionale Netzwerkstruktur 107
4.2.7 Diskussion 110

5 Zusammenfassung **115**

6 Ausblick **123**

Abstract **127**

A Protokolle für die Proteinpräparation **129**
A.1 Bradfordtest 130
A.2 Dialyseschläuche 131
A.3 Dialyse 132
A.4 Assembly 133

Danksagung **149**

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation und Fragestellung

Seit mehreren Jahrzehnten wächst das Interesse der Naturwissenschaften an physikalischen Eigenschaften biologischer Systeme. Vor allem die Physik der Zelle als Grundbaustein jeden Lebewesens, als auch des sie umgebenden Gewebes sind von großem Interesse. Der menschliche Körper besteht aus etwa 10^{14} Zellen, welche sowohl einzeln als auch in ihrem Zusammenspiel entscheidend für eine einwandfreie Funktion sind. Hier ist sowohl die Ursache als auch eine Heilungsmöglichkeit vieler Krankheiten zu sehen. Auch bei verschiedenen Krebserkrankungen spielen die physikalischen Eigenschaften der Krebszellen eine große Rolle. Bauchspeicheldrüsenkrebs ist mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 2-3% eine der tödlichsten Krebsarten in den Industrieländern [77]. Gründe hierfür sind die aggressive Metastasierung und das Eindringen in benachbartes Gewebe. Dies setzt eine erhöhte Beweglichkeit der metastasierenden Zellen voraus, damit sie durch eine gesteigerte Zellelastizität einfacher durch kleine Poren migrieren und in umliegendes Gewebe streuen können [82]. Es wurde gezeigt, dass für die Zellsteifigkeit, und damit für die Regulation der Migration, das Zytoskelett der Zelle verantwortlich ist. Fehlfunktionen des Zytoskeletts führen somit zu signifikanten Veränderungen der Deformierbarkeit der Zellen, und in Folge dessen ihrer relativen Federkonstante als Maß für die elastische Steifigkeit [57], [14], [19]. Daher stellt das Zytoskelett der Zelle einen möglichen Ansatzpunkt bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte

zur Einschränkung von Invasion und Metastasierung für das Pankreaskarzinom dar [9].

Das Zytoskelett setzt sich aus drei Komponenten zusammen, den Aktinfilamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Alle diese drei Komponenten bilden Netzwerke, denen verschiedene Aufgaben zukommen, siehe Abschnitt 2.1.2. Hierbei spielt vor allem das Intermediärfilamentenetzwerk eine entscheidende Rolle für die mechanische Stabilität der Zellen, wohingegen Modifikationen am Aktinnetzwerk nur einen geringen Einfluß auf die Zellmechanik gezeigt haben [79]. Im speziellen Fall der einschichtigen Epithelzellen des Pankreaskarzinoms zeigt sich eine gesteigerte Exprimierung des IF-Proteins Keratin 8/18, welches ein dichtes Netzwerk um den Zellkern bildet. [30]. Aus diesem Grund sollen in der vorliegenden Arbeit die nanomechanischen Eigenschaften des IF-Proteins Keratin 8/18 untersucht werden.
Verschiedene Ansätze zeigen, dass ausgehend von kultivierten Karzinomzellen mit einem Extraktionsprotokoll das Keratinzytoskelett freigelegt werden kann, um den Beitrag zu den mechanischen Eigenschaften der Zelle zu bestimmen [14], [13]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Extraktion nicht alle Überreste der anderen Zellbestandteile entfernen kann. Um also die mechanischen Eigenschaften des reinen Keratinzytoskeletts zu bestimmen, werden in der vorliegenden Arbeit in vitro polymerisierte Netzwerke aus Keratin 8/18 untersucht. Nach der Denaturierung sind diese in vitro polymerisierten Filamente nicht von in vivo Keratinen zu unterscheiden [33]. Ein Vorteil dieses Ansatzes ist außerdem, dass die in vitro polymerisierten Filamente in verschiedenen Längen und Dichten assembliert werden können und so den Aufbau eines künstlichen Netzwerks unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen.

Ausgehend von einer Analyse der Polymerisationskinetik und der Persistenzlänge der Einzelfilamente werden die nanomechanischen Eigenschaften der Keratin 8/18 Netzwerke sowohl in vivo als auch in vitro untersucht. Dafür wird mit Hilfe der Mikrorheologie das dynamische Schermodul bestimmt und durch korrelative Rasterelektronemikroskopie die Struktur der Netzwerke quantifiziert. Diese Messungen ermöglichen es, einen Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion herzustellen. Durch die Erforschung der mechanischen Eigenschaften der in vi-

tro polymerisierten Netzwerke können die Bedingungen immer stärker verfeinert werden um das in vitro polymerisierte Netzwerk zu optimieren und sich dem extrahierten Zellnetzwerk anzunähern. Hiermit soll die vorliegende Arbeit zum Aufbau eines Bottom-Up-Modells der Zellmechanik beitragen.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die biochemischen und physikalischen Grundlagen erläutert, die zum Verständnis der durchgeführten Experimente und deren Auswertung notwendig sind.

2.1 Aufbau der Eukaryontenzellen

Eukaryonten (von griechisch eu: echt und karyon: Kern) besitzen einen mit einer Doppelmembran umhüllten Zellkern und eine komplexe innere Struktur. Bestandteile dieser Zellstruktur sind zum Beispiel die Zellorganellen oder das Zytoskelett. Dadurch unterscheiden sie sich von den Prokaryonten (von griechisch pro: vor). Diese haben weder einen Zellkern noch intrazelluläre Organellen. Die meisten Prokaryonten leben als einzellige Organismen, wohingegen alle komplexeren multizellulären Organismen, aber auch viele Einzeller, aus Eukaryonten aufgebaut sind [10]. Im folgenden Kapitel wird der Aufbau der Eukaryontenzellen betrachtet, wobei besonders auf die Struktur des Zytoskeletts und dessen Funktion eingegangen wird.

2.1.1 Zellstruktur

Die Struktur der Eukaryontenzelle besteht aus ausgedehnten Membransystemen, die bestimmte Zellbereiche in sogenannte Zellorganellen strukturieren, siehe Ab-

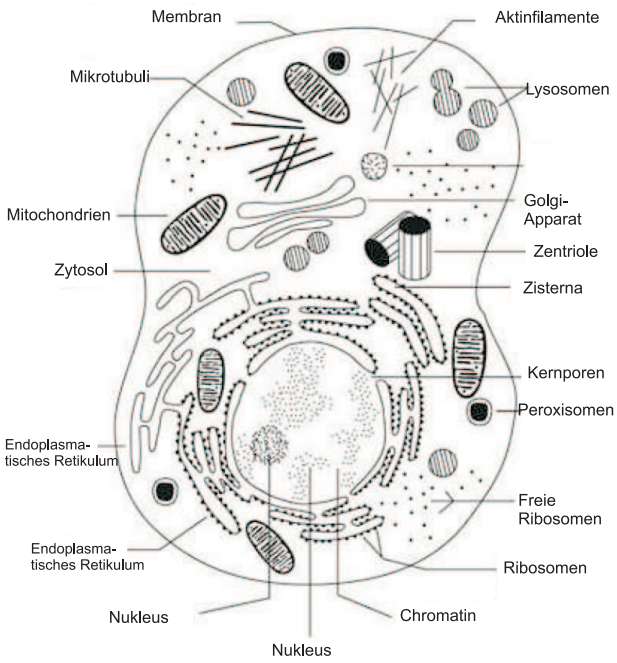


Abbildung 2.1: Aufbau einer Eukaryontenzelle aus [7].

bildung 2.1. Diese Organellen sind innerhalb einer Zelle für die verschiedensten Funktionen zuständig. Beispiele hierfür sind Mitochondrien, die die Energieversorgung in der Zelle gewährleisten oder der Golgi-Apparat, dessen Aufgabe unter anderem die Sekretbildung ist.

Um verschiedenste Aufgaben im Körper erfüllen zu können, sind Zellen in der Lage ihre Form und Steifigkeit zu verändern und sich zu bewegen. Dafür ist das Zytoskelett der Zelle zuständig. Das Zytoskelett ist ein dreidimensionales Netzwerk im Zytoplasma eukaryontischer Zellen. Eine ausführliche Beschreibung folgt im nächsten Abschnitt.

2.1.2 Zytoskelett

Das eukaryontische Zytoskelett ist ein hochkomplexes, dreidimensionales Netzwerk, bestehend aus verschiedenen Proteinfilamenten, welches sich im Zytoplasma und im Zellkern ausbreitet. Es verleiht der Zelle die Fähigkeit, zielgerichtete koordinierte Bewegungen auszuführen, dient als Transportsystem und beeinflusst ihre Form. Auch die mechanischen Eigenschaften der Zelle, wie zum Beispiel die loka-

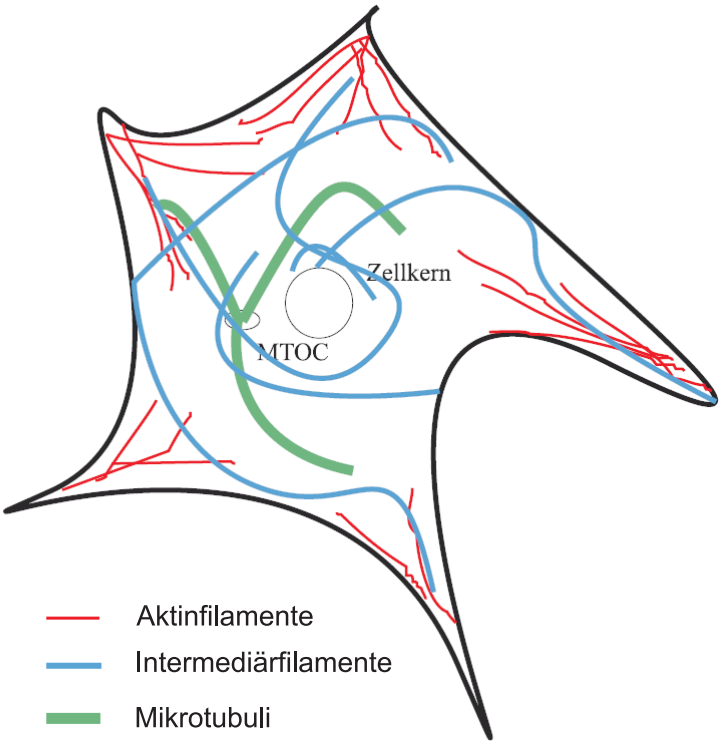


Abbildung 2.2: Verteilung der Filamenttypen in der Zelle: Aktinfilamente in rot, Intermediärfilamente in grün und Mikrotubuli in blau.

le und globale Steifigkeit und die Reaktion auf äußere Krafteinwirkung, werden maßgeblich vom Zytoskelett beeinflusst. Dabei ist es sowohl für die Übertragung von äußeren Kräften ins Zellinnere, als auch für die Reaktion der Zelle auf äußere Kräfte zuständig.
Die drei Hauptkomponenten des Zytoskeletts sind Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Zusammen bilden sie ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk, indem jedes der drei einzelnen Netzwerke spezielle Eigenschaften besitzt und unterschiedliche Aufgaben erfüllt. Die Anordnung der drei Netzwerkbestandteile ist in Abbildung 2.2 zu sehen.

- **Aktinfilamente**
  bestehen aus dem Protein Aktin. Sie haben einen Durchmesser von 5-9 nm und eine Länge zwischen 30-100 µm. Aktinfilamente kommen hauptsächlich in den äußeren Bereichen der Zelle vor und bilden dort bündelartige Strukturen. Aktin und seine Motorproteine sind für die Fortbewegung der

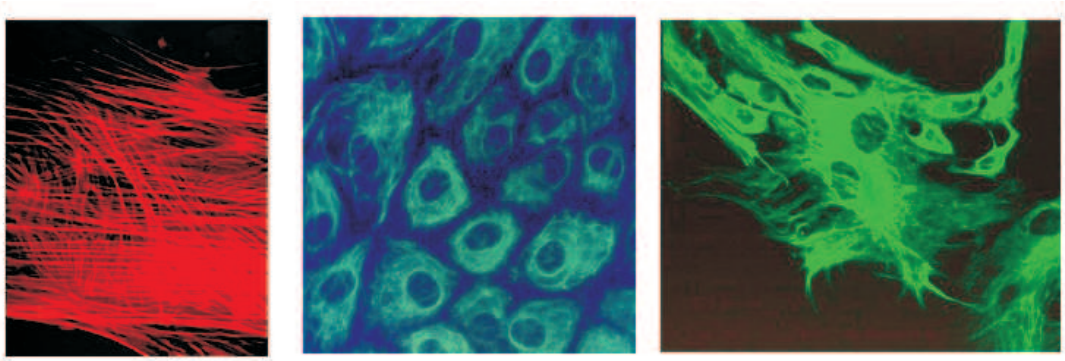


Abbildung 2.3: Fluorezenzaufnahmen von links: Aktinfilamenten, Mitte: Intermediärfilamente und rechts: Mikrotubuli aus [5].

Zelle zuständig. Durch die Verlängerung der Aktinfilamente bilden sich Zellfortsätze, die sich an der extrazellulären Matrix anheften und so die Zelle vorwärtsziehen.

- **Intermediärfilamente**
  bestehen aus verschiedenen Strukturproteinen, die in Tabelle 2.1, Abschnitt 2.1.3 zusammengefasst sind. Sie haben einen Durchmesser von 8-12 nm und sind einige 100 nm lang. Die seilartigen Filamente, die ein Netz von den fokalen Adhäsionspunkten der Zelle bis zum Zellkern bilden, sind für die mechanische Steifigkeit und Stabilität der Zelle zuständig. Eine ausführliche Beschreibung folgt in Abschnitt 2.1.3.

- **Mikrotubuli**
  bestehen aus dem Strukturprotein Tubulin. Sie haben einen Durchmesser von 25 nm und sind länger als 100 µm. Das Mikrotubulinetzwerk besteht aus Hohlzylindern, die sich radial vom Zentrosom (englisch: "Microtubuli Organising Center", abgekürzt: MTOC) ausbreiten. Das MTOC ist ein Zellorganell zur Organisation der Mikrotubuli und liegt in der Nähe des Zellkerns. Entlang der Mikrotubuli werden Stoffe innerhalb der Zelle transportiert.

Abbildung 2.3 zeigt die Verteilung von Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli in der Zelle anhand von Fluoreszenzaufnahmen.

2.1.3 Intermediärfilamente

Die Proteingruppe der Intermediärfilamentproteine besteht aus mindestens 65 bis dato bekannten Proteinen [35]. Die Primärstruktur kann für verschiedene IF-Proteine sehr unterschiedlich sein. Trotz der möglichen, signifikanten Unterschiede in der Aminosäurensequenz ist ihre Sekundärstruktur jedoch stark konserviert. Die beiden häufigsten Motive in der Sekundärstruktur für Proteine sind die α-Helix und das β-Faltblatt. Ihr schematischer Aufbau ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

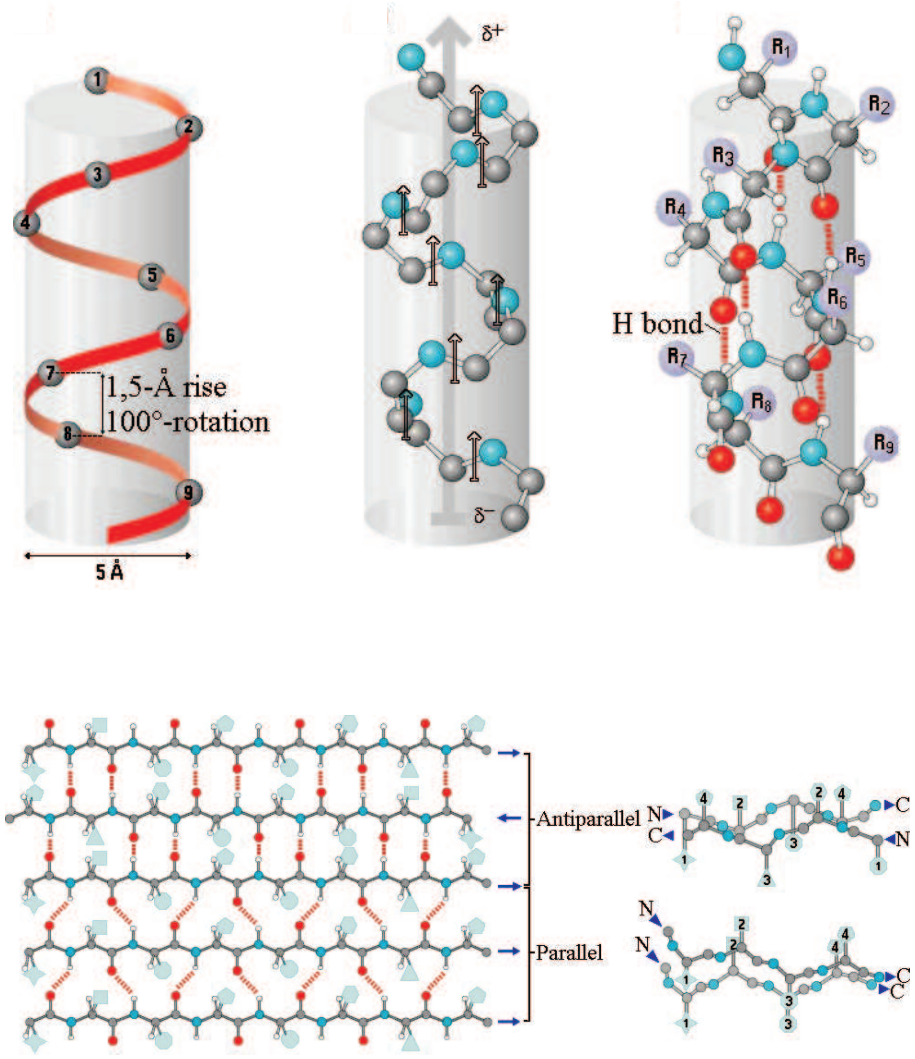


Abbildung 2.4: Sekundärstruktur der Proteine: oben: α-Helix und unten: β-Faltblatt aus [10].

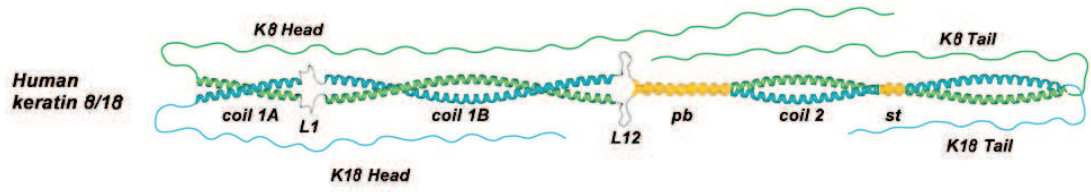


Abbildung 2.5: Struktur eines Keratin 8/18 Dimers in Form eines α-helikalen Coiled-Coils aus [33].

Das β-Faltblatt, dargestellt unten in Abbildung 2.4 besteht aus Aminosäureketten, die parallel oder antiparallel angeordnet sind. Sie wechselwirken über Wasserstoffbrückenbindungen und bilden so eine gefaltete Struktur. Entlang der Ketten ist diese Struktur auf Grund der kovalenten Bindungen sehr reissfest. Die α-Helix ist eine rechtshändig gedrehte Spirale einer Aminosäurekette. Sie kann durch die Anzahl der Aminosäuren pro Windung und durch die Ganghöhe der Schraube charakterisiert werden. Stabilisiert wird die α-Helix durch Wasserstoffbrückenbindungen, die nahezu parallel zur Achse der α-Helix verlaufen [11], siehe Abbildung 2.4 oben.
Zwei α-Helices zusammen bilden eine Doppelwendel, auch Coiled Coil genannt, siehe Abbildung 2.5. Diese sogenannte Dimerbildung entsteht durch die Heptad-Wiederholung der Aminosäuren, schematisch dargestellt in Abbildung 2.6. Dabei wiederholen sich in der α-Helix alle sieben Aminosäuren Seitenketten mit denselben Eigenschaften, die mit abcdefg (englisch: "heptad repeat") bezeichnet werden, sodass die hydrophoben Aminosäuren in den Positionen a und d einen Streifen bilden. Der hydrophobe Streifen windet sich von oben nach unten um die jeweiligen α-Helices. Die beiden einzelnen α-Helices können sich nun derart umeinander winden, dass die hydrophoben Seitenketten miteinander in Wechselwirkung treten und sich so gegenseitig von der wässrigen Umgebung abschirmen [11]. Dabei ist zu beachten, dass sich in der heptad Wiederholung nicht immer die gleichen sieben Aminosäuren wiederholen. An den entsprechenden Stellen befinden sich nur Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften, wie zum Beispiel die hydrophoben Aminosäuren auf den Positionen a und d, siehe Abbildung 2.6.

Der schematische Aufbau eines IF-Dimers ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Die Sekundärstruktur der IF-Proteine besteht aus einem ca. 45 nm langen zentralen α-helikalen Bereich, genannt Rod Domain, der an der einen Seite von der Head

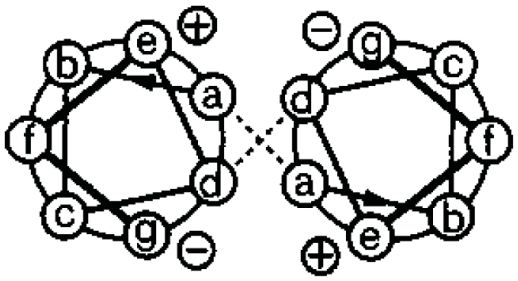


Abbildung 2.6: Wechselwirkung der hydrophoben Seitenketten im Heptad repeat [33].

Domain, einem basischen Aminobereich und auf der anderen Seite von der Tail Domain, einem sauren Carboxylbereich, beschränkt ist [30], [53], [66], [35]. Die Rod Domain ist ca. 300 Aminosäuren lang, wohingegen im Vergleich die Head und Tail Bereiche mehr als 1000 Aminosäuren enthalten können [35]. Die Rod Domain ist jedoch nicht durchgehend α-helikal. Das Coiled-Coil wird an mehreren Stellen unterbrochen. Diese Unterbrechungen teilen die Rod Domain in Coil 1A, Coil 1B und Coil 2. Coil 1A und Coil 1B sind über den Linker L1 verbunden, der nicht α-helikal ist. Zwischen Coil 1B und Coil 2 liegt der Linker L2, ein weiterer nicht α-helikaler Bereich. Im weiteren Verlauf von Coil 2 gibt es zwei Bereiche die zwar α-helikal sind, jedoch nicht als Coiled Coil, sondern parallel verlaufen, das Parallel Bundle und den Stutter.

Wie bereits beschrieben, kann die Primärstruktur von IF-Proteinen trotz ihrer generellen Sekundärstruktur stark voneinander abweichen. Dadurch gibt es verschiedene Typen von Intermediärfilamenten, siehe Tabelle 2.1.

Diese verschiedenen IF-Proteine lassen sich fünf verschiedenen Klassen (englisch: "sequence homology class", abgekürzt: SHC) zuordnen und sich in drei verschiedene Assembly-Gruppen einteilen. Die verschiedenen SHCs sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Zur Assembly-Gruppe 1 gehören SHC 1 und SHC 2, also die sauren und basischen Keratine. Zur Assembly-Gruppe 2 gehören die Desmine und Neurofilamente, SHC 3 und SHC 4. Zur dritten Gruppe gehören die Lamine, die Proteine aus der SHC 5. Die IF-Proteine aus den drei Assembly-Gruppen durchlaufen verschiedene Stufen der Polymerisation, dagestellt in Abbildung 2.7. Diese werden im Folgenden beschrieben:

Typ	**Vetreter**	**Vorkommen**
1 saure Keratine	saures Keratin	Epithelzellen
2 basische Keratine	basisches Keratin	Epithelzellen
3 Desmine	GFAP (glial fibrillar acidic protein)	Gliazellen, Astrozyten
	Desmin	Muskelzellen
	Vimentin	Zellen mesenchymaler Herkunft
	Peripherin	periphere Neuronen
	Synemin	Muskelzellen
4 Neurofilamente	NF-L	Neuronen
	NF-M	Neuronen
	NF-A	Neuronen
	Internexin	ZNS während der Entwicklung
	Nestin	neuroepitheliale Stammzellen
	Paranemin	Muskelzellen
5 Lamine	Lamin A	Zellkern
	Lamin B	Zellkern
	Lamin C	Zellkern

Tabelle 2.1: Typen von Intermediärfilamenten, aus [11], [34].

- **Assembly-Gruppe 1**
  Der Assembly-Verlauf der Keratine wird ausführlich in Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

- **Assembly-Gruppe 2**
  Der Assembly-Prozess der Assembly-Gruppe 2 besteht aus vier Schritten. Zuerst assemblieren die Dimere antiparallel zu Tetrameren. Dabei können in dieser Assembly-Gruppe sowohl Homo- als auch Heteropolymere entstehen. Ein Beispiel dafür ist Vimentin, welches sowohl als Homopolymer vorkommt, aber auch mit Desmin oder anderen IF-Proteinen der Assembly-Gruppe 2 assemblieren kann. Im zweiten Schritt assemblieren die Tetramere weiter zu sogenannten "Unit Length Filaments" (abgekürzt: ULF). Diese ULFs haben eine Länge von ca 60 nm und ihr Durchmesser ist größer als der der ausgewachsenen Filamente. Die ULFs verbinden sich longitudinal zu locker gepackten Filamenten variabler Breite, siehe Abbildung 2.7. Im letzten Schritt verdichten sich die locker gepackten Filamente radial zu ausgewachsenen Filamenten. Dieser Mechanismus der radialen Verdichtung ist noch nicht abschließend erforscht. Abbildung 2.8 zeigt verschiedene Mög-

lichkeiten, wie die Tetramere innerhalb eines Filaments gepackt sein können [35].

- **Assembly-Gruppe 3**
  Die Assembly-Gruppe 3 besteht aus den Laminen, den Zytoskelettproteinen des Zellkerns. Die Lamin Dimere assemblieren "Head-to-Tail". Hierbei grenzt immer ein Head Bereich an einen Tail Bereich und bildet als Assembly-Zwischenstufe sogenannte Protofilamente. Diese Protofilamente verbinden sich dann lateral zu ausgewachsenen Filamenten. Dabei ist die Orientierung von zwei Protofilamenten nicht festgelegt [35], siehe Abbildung 2.7.

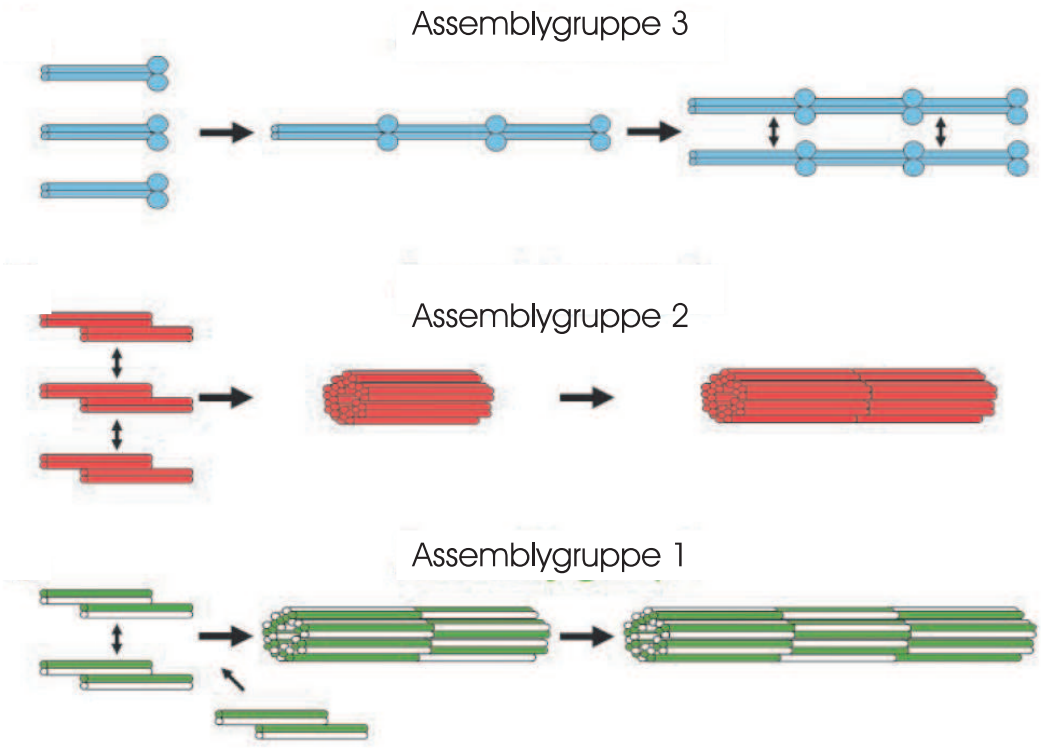


Abbildung 2.7: Die verschiedenen Assemblygruppen aus [35].

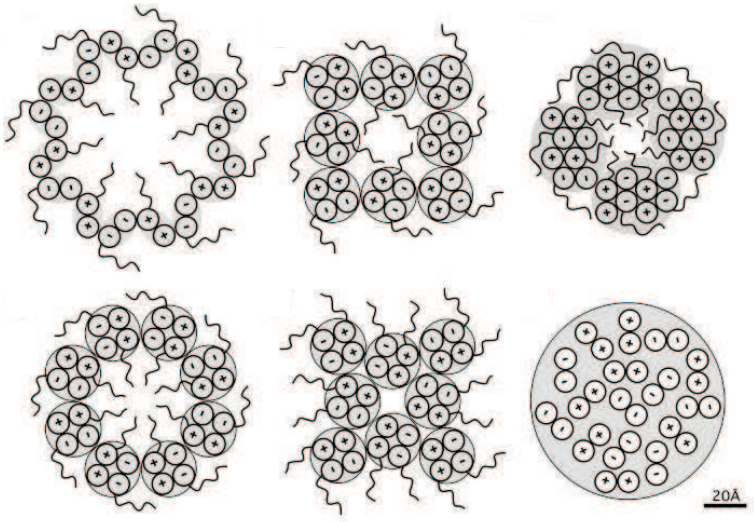


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Anordnung der Dimere im Querschnitt aus [35]. Die wellenförmigen Linien stellen die Tail Bereiche dar. Plus und Minus bezeichnen die gleich orientierten Monomere, die ein Coiled-Coil bilden.

2.2 Intermediärfilamentprotein Keratin 8/18

Keratin ist ein Sammelbegriff für verschiedene wasserunlösliche Faserproteine. Sie werden in α- und β-Keratine unterteilt. α-Keratine besitzen als Grundstruktur die α-Helix, β-Keratine das β-Faltblatt, siehe Abschnitt 2.1.3. Im folgenden Abschnitt werden die Struktur und der Polymerisationsprozess für das Intermediärfilamentprotein Keratin 8/18 beschrieben.

2.2.1 Struktur

Zytokeratine sind α-Keratinen. Bis heute sind 20 verschiedene Zytokeratine bekannt. Sie teilen sich auf in die sauren Typ 1-Keratine, CK1-CK8, und die basischen Typ 2-Keratine, CK9-CK20. Keratine bilden immer Heteropolymere, die aus einem sauren und einem basischen Keratin bestehen [74]. Das Keratin 8/18 Dimer besteht aus einem Monomer Keratin 8 aus der Gruppe der sauren Typ 1 Keratine und einem Monomer Keratin 18 aus der Gruppe der basischen Typ 2 Keratine, die zusammen ein α-helikales Coiled Coil bilden. Die allgemeine Sekundärstruktur ist in Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Die Rod Domain ist für Keratin 8/18 ungefähr 45 nm lang. Der Linker L1 besteht im Strang von Keratin 8 aus

8 Aminosäuren, die stark polar sind, und für Keratin 18 aus 7 Aminosäuren, die hautsächlich negativ geladen sind [35]. Der Linker L12 ist länger als L1 und besteht für Keratin 8 und Keratin 18 aus 18 Aminosäuren. Der Rod wird von der Head und der Tail Domain flankiert, wobei der Head für Keratin 8 aus 90 und für Keratin 18 aus 79 Aminosäuren besteht und der Tail für Keratin 8 aus 87 und für Keratin 18 aus 45 Aminosäuren. Wie alle IF-Proteine haben Keratin 8/18 Dimere die Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen, siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.4.4, in vitro Filamente zu bilden, das heißt zu assemblieren. Diese Filamente können, nachdem sie in Urea denaturiert worden sind, nicht mehr von nativen Intermediärfilamenten unterschieden werden [33].

2.2.2 Assemblierung

Der Assembly-Prozess für Keratin Intermediärfilamente unterscheidet sich von dem anderer IF-Proteine, siehe Abschnitt 2.1.3. Er besteht aus mehreren Polymerisationsschritten.
Im ersten Schritt assemblieren jeweils zwei Dimere antiparallel zu Tetrameren. Dabei müssen die zwei Dimere versetzt angeordnet sein, um sich weiter mit anderen Dimeren zusammenschließen zu können. In Abbildung 2.9 sind die möglichen Anordnungen dargestellt. A11 und A22 können weiter assemblieren, wohingegen die nicht versetzte Anordnung A12 nur selten vorkommt und nicht weiter polymerisieren kann.

Im zweiten Polymerisationsschritt entstehen "Unit Length Filaments". Dies kann über mehrere Zwischenschritte geschehen, dargestellt in Abbildung 2.9 und Abbildung 2.10. Zwei Tetramere können sich zu einem Octamer zusammenschließen oder ein Tetramer und ein Dimer bilden als Zwischenstufe ein Hexamer bis schließlich ein ULF entsteht, dargestellt in Abbildung 2.11. Assemblierungsversuche mit Mutanten haben gezeigt, dass für die ULF-Bildung der Head Bereich der Dimere verantwortlich ist [35]. Bei diesem Prozess ist die Anzahl der Moleküle pro ULF nicht genau festgelegt, siehe Abschnitt 2.2.3. Diese schrittweise Entwicklung kann für Keratin nicht detailliert verfolgt werden, da die Assemblykinetik sehr schnell ist. Für andere IF-Proteine konnten die Polymerisationsschritte dagegen mit Hilfe der analytischen Ultrazetrifuge verfolgt werden [61]. Nur bei sehr geringen Proteinkonzentrationen und kurzen Assemblyzeiten sind ULFs für Keratin

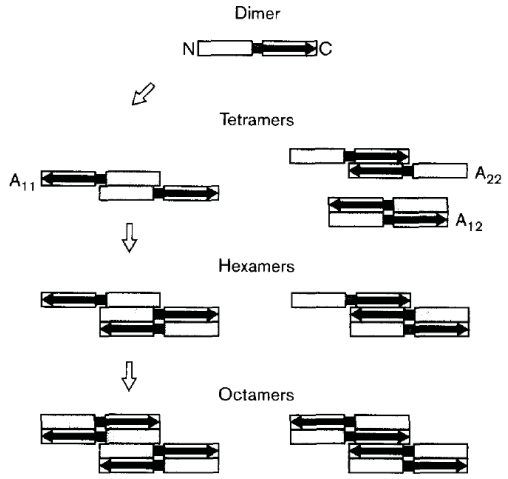


Abbildung 2.9: Mögliche Dimeranordnungen und Polymerisationsschritte aus [33].

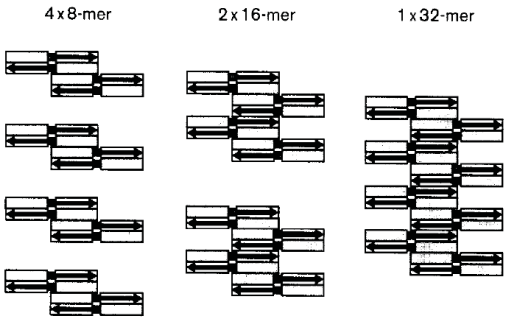


Abbildung 2.10: Bildung eines Unit Length Filaments durch Anlagerung der Oligomere aus [33].

8/18 tatsächlich in vitro beobachtet worden. Bei höheren Konzentrationen sind das radiale Wachstum, die Entstehung der ULFs, und das longitudinale Wachstum, die Verbindung der ULFs zu ausgewachsenen Filamenten, zeitlich nicht zu trennen. Beide Prozesse finden also fast simultan statt [38]. Die Assemblykinetik der Keratine ist damit sehr viel schneller als die anderer IF-Proteine aus den Assembly-Gruppen 2 und 3. Die Anordnung der Untereinheiten in einem Filament ist auch hier nicht bekannt. Mögliche Konformationen sind in Abbildung 2.8 in Abschnitt 2.1.3 dargestellt.

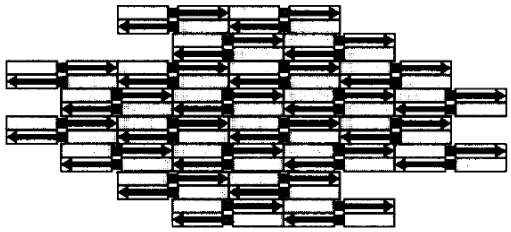


Abbildung 2.11: Longitudinale Verbindung der ULFs aus [33].

2.2.3 Polymorphismus

Polymorphismus bedeutet, dass sich sowohl entlang eines Filaments als auch bei Filamenten des gleichen Assemblys die lineare Massenverteilung (englisch: "Mass-per-length", abgekürzt MPL) und damit die Anzahl der Moleküle pro Querschnitt ändert [36]. Die Massenverteilung ist also entlang ein und desselben Filaments nicht homogen. Harald Herrmann et al. haben die lineare Massenverteilung für Keratin 8/18 Intermediärfilamente mit Hilfe der Raster-Transmissionselektronenmikroskopie (englisch: Scanning Transmission Electron Microscopy, abgekürzt: STEM) untersucht [36]. Daraus ergaben sich Häufigkeitsverteilungen über die lineare Massenverteilung in Kilodalton pro Nanometer. Da das Gewicht der Monomere in Kilodalton bekannt ist, lässt sich so die Anzahl der Moleküle pro Querschnitt berechnen. Die Verteilung für Keratin 8/18 ist in Abbildung 2.12 zusehen.

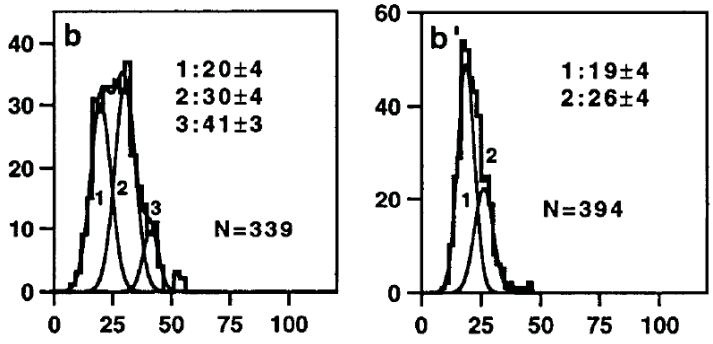


Abbildung 2.12: Polymorphismus: Häufigkeitsverteilung der linearen Massenverteilung aufgetragen über die Anzahl kDa/nm links: nach zwei Sekunden und rechts: eine Stunde nach Start der Polymerisation aus [36].

In der Häufigkeitsverteilung für den MPL-Wert nach einer Assemblydauer von zwei Sekunden treten drei Peaks auf, bei 20 ± 4 kDa/nm, 30 ± 4 kDa/nm und 41 ± 3 kDa/nm [36]. Der letzte Wert ist weniger stark ausgeprägt. Diese Werte entsprechen 16, 25 und 34 Molekülen pro Querschnitt. Nach einer Assemblyzeit von einer Stunde, d. h. für "ausgewachsen" Filamente, sind nur noch zwei Peaks bei 19 ± 4 kDa/nm und 26 ± 4 kDa/nm zu sehen [36]. Diese Werte entsprechen 16 und 21 Molekülen pro Querschnitt. Im zeitlichen Verlauf sind die zwei Peaks nach einer Stunde Assemblyzeit stärker ausgeprägt und schmäler. Diese Veränderungen weisen darauf hin, dass sich die Intermediärfilamente intern umorganisieren und Masse entlang des Filaments verschieben können.
Im Vergleich zu anderen Intermediärfilamenten, wie zum Beispiel Vimentin mit 30 und 37 Molekülen pro Querschnitt, bestehen Keratin 8/18 Intermediärfilamente aus weniger Untereinheiten pro Querschnitt [35], [36]. Sowohl die strukturellen als auch die geometrischen Unterschiede können Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Filamente haben.

Diese Abweichungen im zeitlichen Ablauf des Assembly-Prozesses der einzelnen Assembly-Gruppen und im Aufbau weisen darauf hin, dass sich die Intermediärfilament Proteine auch funktional unterscheiden und somit unterschiedliche Eigenschaften und Anwendungen im Gewebe haben [38].

2.3 Freie Polymerketten

Im folgenden Kapitel werden die Eigenschaften von freien Polymerketten beschrieben. Dabei wird sowohl auf den Polymerisationsprozess als auch auf die mechanischen Eigenschaften eingegangen. Der Großteil der hier zusammengestellten Informationen ist den Lehrbüchern "Principles of Polymer Chemistry" von Paul J. Flory und "Polymer Physics" von Michael Rubinstein und Ralph H. Colby entnommen [27], [69].

2.3.1 Bindungskinetiken

Grundsätzlich kann man die Bildung von Polymerketten aus einem Pool von Monomeren an Hand von zwei Kriterien einteilen: Die Unterscheidung in Ketten-

und Stufenpolymerisation und die Unterscheidung nach der Art der Reaktion, lineare Polykondensation oder Polyaddition.

Kettenpolymerisation und Stufenpolymerisation

Bei der Kettenpolymerisation sind nur zwei fortlaufende Bindungsmechanismen möglich. Zwei Monomere können miteinander binden oder ein Monomer kann an eine Kette binden. Bindungen zwischen zwei Ketten sind nicht erlaubt und führen zum Abbruch der Polymerisation. Die Kettenpolymerisation wird im einfachsten Fall durch die Poissonstatistik beschrieben. Da die Kettenpolymerisation bei Keratin 8/18 keine Rolle spielt, wird hier nicht weiter auf sie eingegangen.
Bei der Stufenpolymerisation sind drei Bindungsmechanismen möglich. Zusätzlich zur Monomer-Monomer-Bindung und zur Monomer-Kette-Bindung ist auch die Kette-Kette-Bindung erlaubt. Dabei können auch Ketten unterschiedlicher Länge binden. Stufenpolymerisationsprozesse werden nach P. Flory und W. H. Carothers in Polykondensation und Polyaddition unterschieden [26]. Beim Polykondensationsprozess bestehen die strukturellen Grundeinheiten der Polymerketten aus weniger Atomen als die Monomere aus denen sie geformt sind. Dies kommt daher, dass niedermolekulare Reaktionsprodukte, meistens Wasser, entstehen. Obwohl die Synthese von Zellulose und Proteinen im Labor noch nicht über einen Polykondensationsprozess durchgeführt wurde, sind sie in die Definition miteingeschlossen, da sie hydrolytisch zu Monomeren zerlegt werden können, die sich von den strukturellen Grundeinheiten nur durch ein zusätzliches Wassermolekül unterscheiden [76]. Der Polyadditionsprozess läuft ohne die Abspaltung niedermolekularer Reaktionsprodukte ab. Die strukturelle Grundeinheit und das Monomer sind also identisch. Auf die statistischen Eigenschaften von Polyaddition und Polykondensation soll im Folgenden eingegangen werden.

Polykondensation

Bei der linearen Polykondensation handelt es sich um einen Polymerisationsprozess bei dem niedermolekulare Reaktionsprodukte wie Wasser oder Alkohol entstehen. Das Modell geht von folgenden Bedingungen aus [76]:

1. Eingegangene Bindungen sind irreversibel.
2. Die Polymerisation findet solange statt, bis alle Monomere aufgebraucht sind und theoretisch in einem Polymer verknüpft sind.

3. Die funktionellen Gruppen sind voneinander isoliert.

4. Die Konzentration des Polymers in der Lösung ist so hoch, dass für die Reaktion nur Head und Tail der Polymerkette bewegt werden müssen. Dies verbietet auch die Bindung von Head und Tail derselben Polymerkette.

Sind diese Bedingungen erfüllt, ist die Ratenkonstante unabhängig von der Kettenlänge. Dann lässt sich die Molmassenverteilung, welche die Polydispersivität der Polymerlösung beschreibt, angeben. Die Bezeichnung Polymerisationsgrad und Molmasse können hier synonym verwendet werden, da sie für eine Polymersorte nur durch eine bekannte numerische Konstante verknüpft sind [76]. Betrachtet man den Polykondensationsprozess der Monomere AB

$$(AB)_N + (AB)_K -> (AB)_{N+K} \tag{2.1}$$

ist p die Wahrscheinlichkeit, dass eine Gruppe A oder B reagiert hat, sodass jede Kette aus $N+K$ Monomeren eine freie A-Gruppe und eine freie B-Gruppe an den gegenüberliegenden Enden hat. Die Wahrscheinlichkeit, dass die i-te B-Gruppe am Ende der Kette noch nicht reagiert hat, ist $(1-p)$. Sodass die Wahrscheinlichkeit, dass die Kette aus genau i Untereinheiten besteht durch

$$n_i = p^{i-1}(1-p) \tag{2.2}$$

gegeben ist. Da nur lineare Kettenpolymere betrachtet werden, ist die Wahrscheinlichkeit N_i, dass jedes willkürlich ausgewählte Molekül aus i Untereinheiten besteht, gleich dem Molenbruch der Ketten aus i Untereinheiten. Die Gesamtzahl der Ketten aus i Untereinheiten ist

$$N_i = n_i \cdot N = N(1-p)p^{i-1} \tag{2.3}$$

Hier ist N die Gesamtanzahl aller Moleküle jeder Länge. Mit N_0 als Gesamtanzahl aller Untereinheiten und

$$N = N_0(1-p) \tag{2.4}$$

folgt

$$N_i = N_0(1-p)^2 p^{i-1} \tag{2.5}$$

Vernachlässigt man die Endgruppen, ist das Molekulargewicht jeder möglichen Polymerkette direkt proportional zu ihrer Länge i und

$$W_i = \frac{iN_i}{N_0} = i(1-p)^2 p^{i-1} \tag{2.6}$$

ist die Molmassenverteilung.

Polyaddition

Der Polyadditionsprozess umfasst meistens das Aufbrechen einer Bindung im Monomer, zum Beispiel das Aufbrechen von Doppelbindungen, und die folgende Neubildung einer ähnlichen Bindung mit einem anderen Monomer. Zusätzlich dürfen bei der Reaktion keine anderen Reaktionsprodukte außer der wachsenden Polymerkette entstehen. Der Prozess teilt sich in drei Schritte [27]:

1. Ketteninitiierung: Die Polymerisation startet zum Beispiel durch die Entstehung freier Radikale (englisch: "chain initiation").

2. Kettenwachstum: Fortlaufendes Wachstum über einzelne Monomere, sodass das aktive Ende immer auf das neu hinzugefügte Monomer übertragen wird (englisch: "chain propagation").

3. Kettenterminierung: Das aktive Ende wird zerstört oder inaktiviert, sodass die Kette nicht weiterwachsen kann. Dies kann zum Beispiel durch den Zusammenschluss zweier Ketten erfolgen (englisch: "chain termination").

Betrachtet man den einfachen Fall, in dem als Abbruchreaktion der Übertrag des reaktiven Endes auf ein neues Monomer erfolgt (englisch: "chain transfer"), kann man die Raten für das Kettenwachstum und den Kettenabbruch angeben. Mit der Monomerkonzentration $[M]$, der Konzentration des Transferstoffes $[S]$ und der Konzentration der reaktiven Zentren $[M-]$ ist die Wachstumsrate $k_P[M][M-]$ und die Abbruchrate $k_{Tr}[S][M-]$. k_P und k_{Tr} sind die Ratenkonstanten für Wachstum und Abbruch der Polymerkette und

$$C_S = \frac{k_{Tr}}{K_P} \tag{2.7}$$

ist die Transferkonstante.

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Kette mit i Untereinheiten abbricht, anstatt um eine weiteres Monomer zu wachsen ist

$$1 - p = \frac{k_{Tr}[S]}{K_P[M] + k_{TR}[S]} = \frac{1}{1 + MC_S[S]} \tag{2.8}$$

Der Parameter p ist unabhängig von der Kettenlänge i und verbindet die Reaktionskinetik und die Molmassenverteilung über x_N, den durchschnittlichen Polymerisationsgrad.

$$x_N = \frac{1}{1 - p} \tag{2.9}$$

Damit ist die Wahrscheinlichkeit p_a für die Polyaddition äquivalent zu der Wahrscheinlichkeit p_k für die Polykondensation, dass eine bestimmte Gruppe bereits reagiert hat. Die Gleichungen sind also auch hier anwendbar. Allerdings muss hier beachtet werden, dass sich das Verhältnis von $[S]$ zu $[M]$ und damit auch p während des Polyadditionsprozesses ändert. Die Gesamtmenge der Polymere, die sich über eine größere Umwandlungsspanne bildet, muss als Summe kleinerer Abschnitte, für die $[S]/[M]$ als konstant angenommen werden kann, betrachtet werden.
Betrachtet man den anderen Extremfall, dass der "chain transfer" als Abbruchsreaktion vernachlässigbar ist, dann ist die Hauptabbruchsreaktion die Verbindung zweier Ketten (englisch: "chain coupling"). Jede Polymerkette besteht aus zwei Teilketten, die unabhängig voneinander gewachsen sind und erst durch die Abbruchsreaktion verbunden werden. Dann ist p die Wahrscheinlichkeit, dass das Kettenwachstum duch das Anfügen eines Monomers fortgeführt wird und $1 - p$ die Wahrscheinlichkeit für die Abbruchreaktion. Da für jeden Schritt zwei Untereinheiten benötigt werden ist

$$1 - p = \frac{2K_T[M-]}{K_P[M] + 2K_T[M-]} \tag{2.10}$$

und da jede Polymerkette am Ende aus zwei Teilketten besteht, gilt mit K_T als Ratenkonstante für die Abbruchreaktion

$$x_N = \frac{2}{1-p} = \frac{2 + K_P[M]}{K_T[M-]} \tag{2.11}$$

Für die Molmassenverteilung ergibt sich dann laut Flory [27]

$$W_x = x\,(x-1)\,p^{x-2}\frac{1}{2}\,(1-p)^3 \tag{2.12}$$

Schulz-Zimm-Verteilung (Γ-Verteilung)
Die Schulz-Zimm-Verteilung ist ein rein statistisches Modell, dass unter anderem Anwendungen in der Polymerphysik, in der Versicherungsmathematik und in der Warteschlangentheorie hat. Es werden keine speziellen Prozesse oder Reaktionen zugrunde gelegt, jedoch wird eine poissonverteilte Ankunftswahrscheinlichkeit angenommen [48]. Der beobachtete Prozess muss also mit einer Wahrscheinlichkeit stattfinden, die der Poissonverteilung folgt und die Konzentration der aktiven Zentren muss konstant bleiben. Betrachtet man die Situation, dass ein Ereignis in einem Intervall $[t_{i-1}, t_i)$ mit der Häufigkeit $N(t_i)$ auftritt, ist $N(t_i)$ für alle t_i durch eine Poisson-Verteilung beschreibbar. Folgende Vorraussetzungen müssen erfüllt sein [48]:

1. Die Anzahl der Ereignisse ist fest

$$\sum_{i=1}^{\infty} N_i = N \tag{2.13}$$

   und die N_i und N sind groß.

2. Für jedes β ergibt folgende Summe eine positive Konstante

$$\sum_{i=1}^{\infty} \frac{N_i}{N} {t_i}^{\beta} = k \tag{2.14}$$

3. Die Anzahl der Wege, auf denen das Ereignis im Intervall $[t_{i-1}, t_i)$ auftreten

kann, ist proportional zu einer Potenz von t_i

$$g_i = A{t_i}^{\alpha-1} = k \tag{2.15}$$

mit α,β und $k > 0$.

Wenn W die Anzahl der möglichen Wege ist, auf denen N unterscheidbare Ereignisse auftreten können, sodass N_i die Anzahl der Ereignisse im Intervall $[t_{i-1}, t_i)$ ist und g_i die mögliche Anzahl von Wegen im Intervall $[t_{i-1}, t_i)$, gilt:

$$W = N! \prod_{i=1}^{\infty} \frac{{g_i}^{N_i}}{N_i!} \tag{2.16}$$

Daraus ergibt sich folgendes Resultat:

$$\frac{\bar{N}_i}{N} = \frac{\Delta t[\beta(\beta k/\alpha)^{-\alpha/\beta}]}{\Gamma(\alpha/\beta)} {t_i}^{\alpha-1} \exp\left[-\frac{\alpha}{\beta}\frac{t_i^{\beta}}{k}\right] \tag{2.17}$$

Hier beschreibt $\bar{N}_i$ alle N_i für die W maximal wird.

Der Maximalwert von W für $\bar{N}_i = N_i$ ist sehr viel größer als die Werte von W, welche zu N_is gehören, die sich stark von $\bar{N}_i$ unterscheiden. Vorraussetzung hierfür ist, dass die N_i und N groß sind. Wenn T diejenige Variable ist, an der das beobachtete Ereignis zum ersten Mal auftritt, ist $\frac{\bar{N}_i}{N}$ die diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung, die mit der beliebigen Variable T verknüpft ist. Demnach ist

$$\frac{\bar{N}_i}{N} = P(t_{i-1} \leq T < t_i] \tag{2.18}$$

und die kontinuierliche Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion ist

$$\frac{\bar{N}_i}{N} = \int_{t_{i-1}}^{t_i} f(t)dt \tag{2.19}$$

In Übereinstimmung mit dem Mittelwerttheorem wird aus dem Integral in Gleichung 2.19 $\delta t f(\zeta)$ mit $(t_i - \delta t) \leq \zeta < t_i$. Wenn man für $\delta t- > 0$ Gleichung 2.17 einsetzt, ergibt sich

$$f(t) = \left[\frac{\beta}{\Gamma(\frac{\alpha}{\beta})}\frac{\alpha}{\beta k}^{\frac{\alpha}{\beta}}\right] t^{\alpha-1} \exp\left[-\frac{\alpha}{\beta}\frac{t}{k}^{\beta}\right] \tag{2.20}$$

für t, α, β und $k > 0$ und

$$\int_0^\infty f(t)dt = 1 \tag{2.21}$$

Dies ist die verallgemeinerte Γ-Verteilung.
Für $\beta = 1$ ergibt sich die Molmassenverteilung nach Schulz-Zimm zu [48]

$$W(x) = \left[\frac{(\frac{\alpha}{N})^{\alpha}}{\Gamma(\alpha)}\right] x^{\alpha-1} \exp\left(-\alpha\left(\frac{x}{N}\right)\right) \tag{2.22}$$

mit $\bar{N}$ als mittlerer Kettenlänge und x als Länge der Polymere. Die Breite der Verteilung ist durch α gegeben und ist ein Maß für die Polydispersität U:

$$U = \frac{1}{\alpha} \tag{2.23}$$

Die Polydispersität U gibt an, wie einheitlich die Länge der Polymerketten ist. Für $U = 0$ sind alle Ketten gleich lang. Je größer U ist, desto unterschiedlicher sind die Längen.

Tomski-Portet-Modell

Das Tomski-Portet-Modell ist ein quantitatives kinetisches Modell, dass die in vitro Assemblykinetik von Vimentin beschreibt. Es wurde von Stephanie Portet et al. [40], [67] aus dem Tomski-Modell entwickelt und speziell auf die Assemblierung von Intermediärfilamenten angepasst. Im Vergleich zu den vorher beschriebenen Modellen entsprechen hier die Monomere den ULFs und die Polymerketten den Filamenten, siehe Abschnitt 2.2.2. Die Vorraussetzungen für das Modell sind Stufenpolymerisation und Polyaddition, das heißt es sind sowohl ULF-ULF-Bindungen als auch ULF-Filament-Bindungen und Filament-Filament-Bindungen möglich. Zusätzlich macht das Tomski-Portet-Modell geometrische Einschränkungen, sodass die Ratenkonstanten nicht mehr unabhängig von der Filamentlänge sind. Ausgehend vom Hill-Modell [39] werden die Filamen-

te als steife zylindrische Stäbe betrachtet. Sie bewegen sich durch Diffusion und können binden, wenn sich zwei Enden treffen. Diese Bindungen sind irreversibel. Alle Filamente haben dieselben Eigenschaften und unterscheiden sich nur durch ihre Länge. Da jedoch nur die Enden reaktiv sind, tragen viele kurze Filamente mehr zur Polymerisation bei als ein langes Filament.
Ist N, die Gesamtzahl aller ULFs, konstant, dann ist F_i die Konzentration der Filamente der Länge i in Anzahl ULFs. Somit kann man N Differentialgleichungen aufstellen, die die verschiedenen Reaktionen beschreiben:

1. ULF-Bindungen

$$\frac{dF_1}{dt} = k_0 \left(-2F_1 \sum_{i=1}^{N-1} d_{1,i} F_i \right) \tag{2.24}$$

2. Filamentbindungen

$$\frac{dF_j}{dt} = k_0 \left(\sum_{i=1}^{j-1} d_{i,j-i} F_i F_{j-i} - 2F_j \sum_{i=1}^{N-j} d_{j,i} F_i \right) \tag{2.25}$$

$$j = 2, ..., N-1 \tag{2.26}$$

3. Bindungsende, das heißt alle ULFs sind in einem Filament der Länge N gebunden

$$\frac{dF_N}{dt} = k_0 \left(\sum_{i=1}^{N-1} d_{i,N-i} F_i F_{N-i} \right) \tag{2.27}$$

k_0 ist hier eine intrinsische bimolekulare Ratenkonstante und $d_{i,j} = d_{j,i}$ ist der Proportionalitätsfaktor, der die verschiedenen Längen berücksichtigt. Aus den obigen Differentialgleichungen lässt sich die Längenverteilung $F_i(t)$ mit der Durchschnittslänge

$$L_X(t) = \frac{\sum_{i=1}^{N} i F_i(t)}{\sum_{i=1}^{N} F_i(t)} \tag{2.28}$$

berechnen.

Kinetik der mittleren Kettenlänge

Alle oben im Abschnitt beschriebenen Modelle treffen Aussagen über die molare Massenverteilung, also wieviele Ketten einer bestimmten Länge, vorhanden sind. Zusätzlich kann auch die Änderung der mittleren Kettenlänge in Abhängigkeit der Polymerisationsbedingungen, wie Monomerkonzentration, Polyerisationszeit und Polymerisationstemperatur, betrachtet werden. Die Kinetik wird durch folgende Gleichung beschrieben [27]:

$$2kt = \frac{1}{c^2} - Const. \tag{2.29}$$

Hier ist k die Ratenkonstante, t die Zeit und c die Konzentration der reaktiven Enden. Mit p, dem Anteil der reaktiven Enden, die zum Zeitpunkt t reagiert haben, ist $c = (1-p)c_0$ abhängig von der Anfangskonzentration c_0. Daraus ergibt sich mit der obigen Gleichung

$$2{c_0}^2 kt = \frac{1}{(1-p)^2} - Const. \tag{2.30}$$

Mit dem durchschnittlichen Polymerisationsgrad aus Gleichung 2.9 ist $\bar{x}_n$ die mittlere Länge der Polymere und Gleichung 2.31 wird zu

$$2{c_0}^2 kt = \bar{x}_n^2 - Const. \tag{2.31}$$

$$\bar{x}_n = \sqrt{2{c_0}^2 kt + Const.} \tag{2.32}$$

Obwohl die Polymerisation der kurzen Ketten schnell erfolgt, nimmt die Wachstumsrate mit der Zeit ab. Polymerketten mit einer sehr großen Länge entstehen also erst nach unrealistisch langen Polymerisationszeiten.

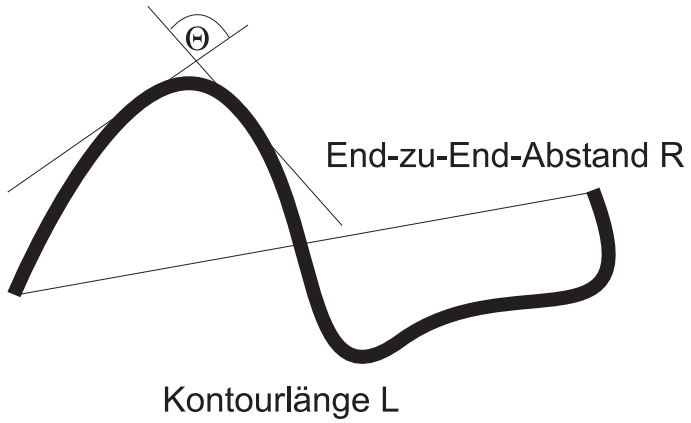


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung einer Polymerkette der Konturlänge L und dem End-zu-End-Abstand R, die unter dem Winkel θ gebogen ist.

2.3.2 Worm-like-chain-Modell

Das Worm-like-chain-Modell wurde 1939 von Kratky und Porod vorgestellt [42]. Es ist ein polymerphysikalisches Modell zur Beschreibung einzelner Polymerketten, dass einen Spezialfall des Modells einer frei rotierenden Kette darstellt. Beide Modelle schließen Wechselwirkungen zwischen Monomeren, die entlang der Kette weit voneinander entfernt sind, aus und gehen damit von idealen Polymeren aus. Zusätzlich wird angenommen, dass alle Torsionswinkel für die Polymerkette gleich wahrscheinlich und unabhängig voneinander sind. Im Worm-like-chain-Modell ist die Persistenzlänge ein Maß dafür, über welche mittlere Länge die Polymerkette ihre Richtung beibehält. Sie gibt also die Länge zwischen dem ersten und dem letzten Monomer entlang des Polymers an, die noch richtungskorreliert sind. In Abbildung 2.13 ist ein Filament dargestellt. Die Persistenzlänge wird hier durch den End-zu-End-Abstand R, die Kontourlänge l und den Winkel θ bestimmt.

Das Worm-like-chain-Modell beschreibt das Verhalten von freien, thermisch equilibrierten Polymeren, wie zum Beispiel in einer Lösung. Die Energie, die eine Polymerkette der Konturlänge l benötigt, welche unter dem Winkel θ gebogen ist, ist [44]

$$E = YI\theta^2/2l \tag{2.33}$$

Hier ist Y das Elastizitätsmodul und I das Flächenträgheitsmoment des Polymers.

Diese beiden Größen hängen über Gleichung 2.34 direkt mit der Persistenzlänge l_P zusammen [44].

$$YI = k_B T l_P \tag{2.34}$$

Hier ist k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur. Mit Gleichung 2.33 und 2.34 ist die normierte Wahrscheinlichkeitsverteilung für eine Polymerkette der Konturlänge l, die unter dem Winkel θ gebogen ist, eine Gaussfunktion [65]

$$P(\theta(l)) = \sqrt{\frac{l_P}{2\pi l}} \cdot e^{-l_P \theta^2 / 2l} \tag{2.35}$$

Aus Gleichung 2.35 lässt sich das zweite Moment des Winkels berechnen [65]

$$\langle \theta^2(l) \rangle = \frac{l}{l_P} \tag{2.36}$$

sodass die Persistenzlänge [69]

$$l_P = \frac{2}{\langle \theta^2(l) \rangle} \tag{2.37}$$

und damit die Kuhnlänge b

$$b = l_P \frac{4}{\langle \theta^2(l) \rangle} = 2 l_P \tag{2.38}$$

ist.

Für den Zusammenhang des mittleren quadratischen End-zu-End-Abstands $\langle R^2 \rangle_{3d}$ und der Persistenzlänge l_P einer in einer wässrigen Lösung äquilibrierten Polymerkette ergibt sich [26]

$$\langle R^2 \rangle_{3d} = 2 l_P l \left(1 - \frac{l_P}{l} \left(1 - e^{-l/l_P} \right) \right) \tag{2.39}$$

Kennt man den End-zu-End-Abstand und die Konturlänge entlang einer Polymer-

kette, kann die Persistenzlänge für dreidimensionale Polymere in einer Lösung aus zweidimensionalen Bildern bestimmt werden. Hier spielt der Ablagerungsvorgang auf der Oberfläche eine große Rolle [29]. Es sind zwei prinzipielle Mechanismen möglich:

- Die Polymerketten können frei auf der Oberfläche äquilibrieren, wenn die Wechselwirkungsenergie zwischen Polymer und Oberfläche in der Größenordnung der thermischen Energie der Polymerkette ist. In diesem Fall werden die elastischen Eigenschaften während des Adsorptionsprozesses beibehalten und die gemessene Persistenzlänge stimmt mit der eines Polymers in Lösung in drei Dimensionen überein. Dies ist nur der Fall, wenn die ganze Polymerkette vollständig auf der Oberfläche äquilibriert ist.

- Ist die Wechselwirkungsenergie zwischen der Polymerkette und der Oberfläche größer als die thermische Energie der Kette, wird das Polymer von der Oberfläche "eingefangen", bevor es sich äquilibrieren kann. Die Kontur auf der Oberfläche ist also eine senkrechte Projektion der dreidimensionalen Kontur in Lösung. Dieser Ablagerungsmechanismus führt zu kompakteren Polymerknäueln auf der Oberfläche, die eine kleinere scheinbare Persistenzlänge haben.

- Abhängig von der Energieverteilung und der Länge der Kette ist es möglich, dass die Ketten nicht vollständig auf der Oberfläche äquilibrieren können. Dann ist der Zusammenhang zwischen Konturlänge und End-zu-End-Abstand nicht eindeutig und es ist nur die Bestimmung einer "scheinbaren" Persistenzlänge möglich

Wenn die Polymerkette auf der Oberfläche "eingefangen" ist, muss die Wechselwirkung zwischen Polymer und Oberfläche einbezogen werden. Dabei kann eine senkrechte Projektion der dreidimensionalen Struktur aus einer wässrigen Lösung auf die Oberfläche angenommen werden [65]. Dies entspricht einer Reduzierung von drei auf zwei Dimensionen. Aus dieser Annahme ergibt sich das zweite Moment des End-zu-End-Abstandes auf der Oberfläche zu [68]

$$\langle R^2 \rangle_{2d,proj.} = \langle R^2 \rangle_x + \langle R^2 \rangle_y = \frac{2}{3} \langle R^2 \rangle_{3d} \tag{2.40}$$

und für $l \to \infty$ ist

$$\langle R^2 \rangle_{2d,proj.} = \frac{1}{3} \langle R^2 \rangle_{2d} \tag{2.41}$$

Hier ist $\langle R^2 \rangle_{3d}$ das zweite Moment des End-zu-End-Abstandes einer in Lösung äquilibrieten Polymerkette und $\langle R^2 \rangle_{2d}$ ist das zweite Moment des End-zu-End-Abstandes einer auf einer Oberfläche äquilibrierten Polymerkette.

Aus Gleichung 2.40 und Gleichung 2.41 ergibt sich der Zusammenhang zwischen dem zweiten Moment des End-zu-End-Abstands auf einer Oberfläche und der Persistenzlänge in dreidimensionaler Umgebung zu [68]

$$\langle R^2(l) \rangle = 4 l_P l \left(1 - \frac{2 l_P}{l} \left(1 - e^{-l/2l_P} \right) \right) \tag{2.42}$$

Für den Fall "eingefangener" Polymerketten lässt sich mit Gleichung 2.40 und Gleichung 2.39 die Persistenzlänge aus zweidimensionalen Bildern auf einer Oberflächen adsorbierter, nicht äquilibrierter Polymerketten berechnen.

Einfluss gelöster Gegenionen auf die Persistenzlänge semiflexibler Polymere

Die Persistenzlänge geladener Makromoleküle wird durch die Ladungen in der Umgebung beeinflusst. Geladene Polymerketten werden im Vergleich zu ungeladenen Polymerketten durch die elektrostatische Abstoßung gestreckt. Damit nimmt die Persistenzlänge zu und die Polymere werden steifer. Befinden sich geladene Makromoleküle in einer Lösung, die gelöste Gegenionen enthält, kommt es zur Kondensation der Gegenionen auf der Oberfläche des Polymers, dargestellt in Abbildung 2.14.

Dieser Vorgang wird auch Manning-Kondensation genannt [55]. Die Ladungskondensation führt dazu, dass die Persistenlänge l_P einen elektrostatischen Beitrag $l_{P,el}$ erhält und sich somit die Gesamtpersistenzlänge L_P ergibt. Der Einfluss von Ladungen auf semiflexible Polymerketten wird vorallem duch die Bijerrum-Länge l_B und die Debye-Länge κ, mit $\kappa^{-1} \sim 1\,nm$, bestimmt. Diese sind folgendermaßen definiert [71]:

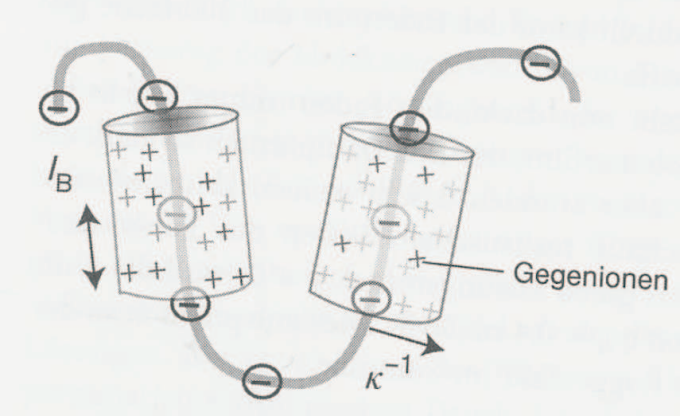


Abbildung 2.14: Manning-Kondensation aus [71].

$$L_P = l_P + l_{P,el} \tag{2.43}$$

$$l_{P,el} = \frac{l_B}{4\kappa^2}\frac{1}{{l_P}^2} \tag{2.44}$$

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 k_B T} \tag{2.45}$$

Da die Manning-Kondensation schon bei Salzkonzentrationen in der Größenordnung von wenigen nM erfolgt, spielt sie unter physiologischen Bedingungen zum Beispiel in der Zelle für c_{Ion}=400 mM eine Rolle.

2.4 Netzwerkmechanik

Allgemein werden in der Graphentheorie Systeme, die organisiert sind und deren Struktur sich als Graph modellieren lässt, als Netzwerke bezeichnet. Dabei sind vor allem komplexe Netzwerke, d. h. mit nicht-trivialen topologischen Eigenschaften, von Interesse. Polymernetzwerke sind meistens komplexe Netzwerke, sie lassen sich nicht durch Gitter oder zufällige Graphen darstellen. In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Modelle zur Charakterisierung und der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion in Polymernetzwerken vorgestellt.

2.4.1 Netzwerkstruktur

Zur Charakterisierung von Polymernetzwerken wird eine Einteilung in chemische und physikalische Netzwerke vorgenommen.

Chemische Netzwerke
In chemischen Netzwerken (englisch: "crosslinked networks") sind die Polymere über chemische Vernetzungspunkte verbunden. Dabei unterscheidet die Art der Bindung zwischen permanenten und temporären chemischen Netzwerken. Temporäre chemische Netzwerke sind über schwache chemische Bindungen, zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, verknüpft. Diese schwachen Bindungen können sich umorganisieren, indem sie sich trennen und wieder neu verbinden. In permanenten chemischen Netzwerken sind die Polymerketten über chemische Verbindungen permanent verbunden. Sie können nicht umorganisiert oder verschoben werden. Definitionsgemäß bezeichnet der Begriff "Polymernetzwerk" eigentlich nur permanente chemische Netzwerke.

Physikalische Netzwerke
Physikalische Polymernetzwerke (englisch: "entangled networks") sind Netzwerke, in denen die Polymerketten verschlauft sind und nur durch Reibung an den Überlagerungspunkten wechselwirken [20]. Es liegen keine tatsächlichen chemischen Bindungen an den Knotenpunkten vor und es handelt sich hierbei nicht um permanente Netzwerke. Die einzelnen Polymerstränge können im Netzwerk fluktuieren und sich fortbewegen (Reptation) [32], [20].

Nanomechanisches Verhalten von Polymernetzwerken
Die nanomechanischen Eigenschaften von Polymernetzwerken werden vom dynamischen Schermodul G* bestimmt. Der dynamische Schermodul macht Aussagen über die Viskoelastizität der Netzwerke und ist frequenzabhängig. Er besteht aus einem elastischen Anteil, dem Speichermodul G', und einem viskosen Anteil, dem Verlustmodul G":

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \tag{2.46}$$

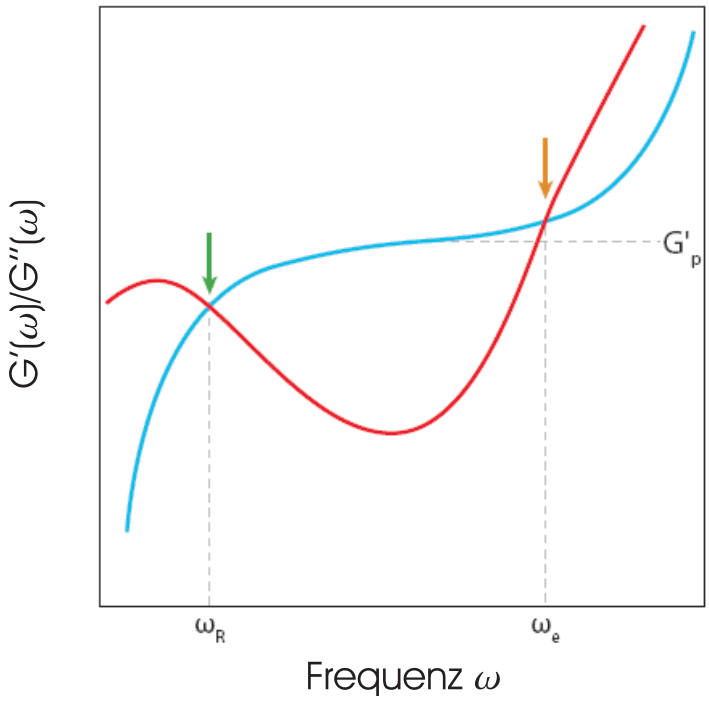


Abbildung 2.15: Frequenzabhängiges Verhalten von G' und G" eines viskoelastischen Materials aus [81].

Für rein viskose Materialien, wie Flüssigkeiten, gilt G'=0 und G" steigt linear mit der Frequenz ω an. Für rein elastische Materialien, wie reine Elastomere [28], ist G' ein konstanter frequenzunabhängiger Wert und G"=0 [81].
Das Verhalten viskoelastischer Materialien vereint das Verhalten der beiden Extreme einer Flüssigkeit und eines Festkörpers [28]. Abbildung 2.15 zeigt den frequenzabhängigen Verlauf von G' und G" am Beispiel des Zytoplasmas einer Zelle [81].

Für niedrige Frequenzen unterhalb einer Grenzfrequenz ω_R dominiert das viskose Verhalten mit $G''(\omega) > G'(\omega)$, während für $\omega > \omega_R$ das elastische Verhalten mit $G'(\omega) > G''(\omega)$ dominiert. Der nahezu konstante Wert für $G'(\omega)$ ist der sogenannte Plateaumodulus. Für Frequenzen, die größer als eine zweite Grenzfrequenz ω_e sind, steigen sowohl G' als auch G" an. Der Anstieg ist für semiflexible Polymere proportional zu $\omega^{3/4}$ und für flexible Polymer proportional zu $\omega^{1/2}$. Die beiden Grenzfrequenzen ω_R und ω_e liegen bei den zwei Überschneidungspunkten von G' und G". Die obere Grenzfrequenz ω_R ist proportional zum Kehrwert der Relaxa-

tionszeit τ_R des Netzwerks.

Der dynamische Schermodul kann mit Hilfe der "Particle-Tracking-Mikrorheologie", siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.3, bestimmt werden.

2.4.2 Gele

Es sind viele Definitionen im Umlauf, die den Zustand eines Gels beschreiben. P. H. Hermans definierte 1949 ein Gel als "ein kohärentes System aus mindestens zwei Komponenten, welches die mechanischen Eigenschaften eines Festkörpers aufweist, in dem sich beide, die gelöste Komponente, als auch das Lösungsmittel, kontinuierlich über das ganze System erstrecken". Ein Gel besteht also aus einem Polymernetzwerk, dass sich untrennbar über das ganze Volumen eines Lösungsmittels erstreckt [26]. Obwohl Gele zu einem großen Teil aus Flüssigkeit bestehen, haben sie jedoch einen Materialzustand zwischen Flüssigkeit und Festkörper. Dabei unterscheiden sie sich in zwei Punkten von unvernetzten physikalischen Netzwerken. Erstens zeigen sie auch bei kleinen Deformationsgeschwindigkeiten elastisches Verhalten [71]. Zweitens ist die Ausdehnung des Netzwerks dadurch beschränkt, dass der osmotische Druck gleich der elastischen Energiedichte durch die Dehnung des Netzwerks sein muss, das heißt die Gele können nur ein beschränktes Lösungsmittelvolumen aufnehmen [71].
Von Flory stammt die Aufteilung in verschiedene Klassen abhängig von ihrem Bindungsmechnismus [26], [27]. Dabei unterscheidet man

1. geordnete Lamellenstrukturen,
2. kovalente Polymernetzwerke,
3. ungeordnete Netzwerke, die durch Aggregation, Stellen lokaler Ordnung, gebildet werden, und
4. kleinteilig ungeordnete Strukturen.

Trotz der unterschiedlichen Vernetzungsmechanismen lassen sich viele Eigenschaften der Gele allgemein beschreiben und gelten für alle vier Untergruppen. Gerade die mechanischen Eigenschaften von Polymergelen werden maßgeblich nicht durch die Art der Bindung, sondern durch die folgenden Faktoren bestimmt

[71]:

1. die mittlere Maschengröße ζ,
2. das durchschnittliche Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten M_C,
3. die Vernetzungsdichte pro Makromolekül γ,
4. die Konzentration freier Enden.

Im Folgenden sollen zwei Modelle, die die grundlegenden Zusammenhänge zwischen den Netzwerkparametern und dem dynamischen Schermodul beschreiben, vorgestellt werden. Diese werden in der vorliegenden Arbeit auch experimentell überprüft. Von P. Flory aus dem Jahr 1953 stammt eine Beschreibung des Zusammenhang zwischen Vernetzungsdichte und dynamischem Schermodul des Netzwerks [27]. Morse und MacKintosh beschreiben eine Beziehung zwischen dem dynamischen Schermodul und der Filamentlänge zwischen zwei Kreuzungspunkten des Netzwerks und der Maschengröße [63], [54].

Flory-Modell

P. Flory beschreibt in seinem Modell für vulkanisiertes Gummi den Zusammenhang zwischen der Sol/Gelaufteilung des Netzwerks und dem Plateaumodulus. Das Modell lässt sich sowohl für Gaußsche Ketten als auch für den Bereich semiflexibler Polymere anwenden. Die verwendeten Größen sind [25], [64], [21]:

G_0 : Plateaumodul
M_C : durchschnittliches Molekulargewicht zwischen zwei Knoten
M : durchschnittliches Molekulargewicht einer Primärkette
ω_s : Solfraktion
γ : Vernetzungsdichte
c : Proteinkonzentration
T : Temperatur
R : Gas-Konstante

Die Vernetzungsdichte pro Makromolekül ist definiert als [27], [25], [64]

$$\gamma = -\frac{\ln \omega_s}{(1-\omega_s)} \tag{2.47}$$

Hier ist ω_s der Solteil des Netzwerks und $1-\omega_s$ der bereits gelierte Teil. Mit M_C als dem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten

$$M_C = -\frac{M}{\gamma(1+\omega_s)} \tag{2.48}$$

ist das Speichermodul in einem quervernetzten Polymernetzwerk [25]

$$\frac{G_0 M}{cRT} = -(1+\omega_s)\ln w_s - 2(1-\omega_s) \tag{2.49}$$

Über

$$\omega_s = \frac{-1}{\gamma} W_0(-\gamma e^{-\gamma}) \tag{2.50}$$

ergibt sich mit Gleichung 2.49 ein allgemeiner Zusammenhang zwischen der Quervernetzungsdichte γ und dem Plateaumodul G_0:

$$G_0 = a\Bigg[\log\left(\frac{-1}{b\gamma}W_0(-b\gamma e^{-b\gamma})\right)\left(-1+\frac{1}{b\gamma}W_0(-b\gamma e^{-b\gamma})\right)$$

$$-2\left(1+\frac{1}{b\gamma}W_0(-b\gamma e^{-b\gamma})\right)\Bigg] \tag{2.51}$$

Hier ist W_0 die Lambertsche-W-Funktion.

Morse-MacKintosh-Modell

Das Morse-MacKintosh-Modell beschreibt die rheologischen Eigenschaften vernetzter und verschlaufter viskoelastischer Netzwerke [54], [63]. Das Modell lässt sich auf alle Polymernetzwerke anwenden, die aus semiflexiblen Biopolymeren bei mittleren Konzentrationen, zwischen 0,4 mg/ml und 2 mg/ml, bestehen.

Die verwendeten Größen sind

G_0 : Plateaumodul
a : Größe eines Monomers
ζ : Maschengröße

l_P : Persistenzlänge
l_e : Filamentlänge zwischen zwei Vernetzungspunkten (englisch: "entanglement length")
c : Proteinkonzentration
κ : Biegesteifigkeit
T : Temperatur
k_B : Boltzmann-Konstante

Ausgehend von einem viskoelastischen Netzwerk in dem $a \ll \zeta < l_P$ gilt, werden die elastischen Eigenschaften von Polymerketten betrachtet, die zwischen zwei Vernetzungspunkten so gut wie gerade sind. Das Netzwerk wird als Ensemble von Kettenstücken der Länge l_e betrachtet, die von einem kontinuierlichen Medium umgeben sind. Hier skaliert der Plateaumodul mit [54]

$$G_0 \sim \frac{\kappa^2}{k_B T} \zeta^{-2} {l_e}^{-3} \tag{2.52}$$

Mit Gleichung 2.34 ist das Plateaumodul

$$G_0 \sim k_B T \frac{{l_P}^2}{\zeta^2 {l_e}^3} \tag{2.53}$$

abhängig von der Persistenzlänge, der Maschengröße und der Filamentlänge. Für ein dichtes Netzwerk entspricht die Maschengröße ungefähr der Filamentlänge, $l_e \simeq \zeta$ und

$$G_0 \sim k_B T \frac{{l_P}^2}{\zeta^5} \tag{2.54}$$

In Fleischer et al. [24] ist der Proportionalitätsfaktor angegeben, sodass

$$G_0 = 6 k_B T \frac{{l_P}^2}{\zeta^2 {l_e}^3} \tag{2.55}$$

Gelpunkt

Der Gelpunkt ist eine definierte Stufe im Polymerisationsprozess von Polyme-

ren mit einer Reaktivität größer als zwei [26]. Hier geschieht die Transformation der Polymerlösung von einer hauptsächlich viskosen Flüssigkeit in ein elastisches Gel. Vor dem Gel-Punkt ist das Polymer im entsprechenden Lösungsmittel löslich, nach dem Gelpunkt nicht, während lineare Polymere unabhängig vom Polymerisationsgrad löslich bleiben. Es ist möglich, den Gelpunkt zu vermeiden, indem man die Polymerisation frühzeitig stoppt oder Mengenverhältnisse benutzt, die unter gewissen Grenzen liegen. Denn auch wenn ein System Reaktanden mit einer Funktionalität höher als zwei enthält, muss es nicht zwingend gelieren. Der Gelpunkt ist also abhängig von der Polymerkonzentration, den Umgebungsbedingungen wie Temperatur usw. und der Polymerisationszeit.
Auch lineare Polymere können Gele bilden, wenn die Möglichkeit der zusätzlichen Vernetzung gegeben ist. Dies kann durch die Zugabe künstlicher Vernetzer erreicht werden.

Kapitel 3

Experimentelle Methoden

Im folgenden Kapitel werden die Techniken und Aufbauten erklärt, an denen die Experimente durchgeführt wurden. Weiter werden die experimentellen Methoden vorgestellt, auf denen die Probenpräparation basiert und diese schrittweise beschrieben.

3.1 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (englisch "Atomic Force Microscope", abgekürzt AFM) gehört zu den Rastersondenmikroskopen und wurde erstmals 1986 von G. Binnig, C. F. Quate und Ch. Gerber präsentiert [16]. Im folgenden Abschnitt werden die Funktionsweise und der prinzipielle Aufbau beschrieben.

3.1.1 Aufbau und Funktionsweise

Das AFM ist ein Rastersondenmikroskop bei dem mit Hilfe einer Sonde, dem Cantilever, die zu vermessende Oberfläche abgerastert wird. Aus der Verbiegung des Cantilevers kann die Topographie der Oberfläche berechnet werden. Ein Vorteil im Vergleich zum Rastertunnelmikroskop ist, dass das AFM auch für Messungen von nichtleitenden Oberflächen und in Flüssigkeit geeignet ist. Abhängig von Messsonde und Probe können Auflösungen bis hin zum atomaren Bereich erreicht werden.

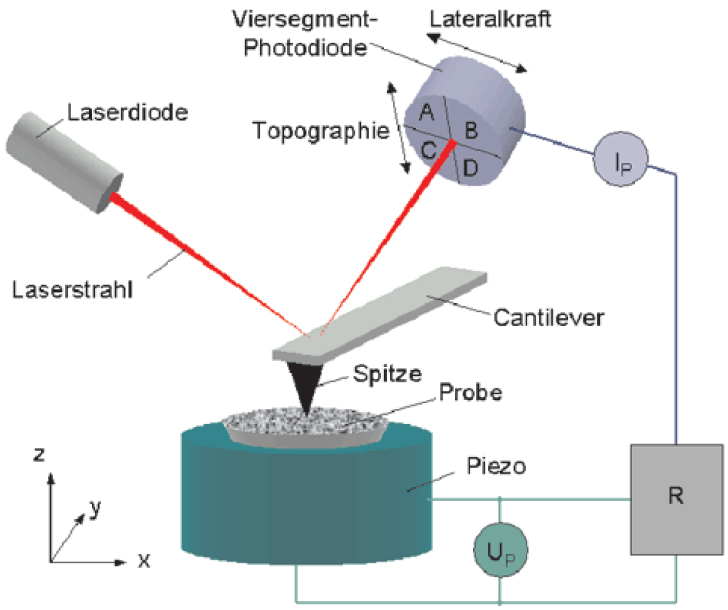


Abbildung 3.1: Prinzipieller Aufbau eines AFM aus [6].

Ein AFM ist prinzipiell aus einer Messsonde, dem Cantilever, einem Piezo-Tisch, einer Detektionseinheit und einer Steuerungseinheit aufgebaut [15]. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Cantilever kann entweder mit Hilfe des Piezos zeilenweise über die Oberfläche der Probe bewegt werden oder die Oberfläche der Probe wird zeilenweise unter der Spitze bewegt. Wird die Spitze (englisch: "Tip") in die Nähe der Probenoberfläche gebracht, treten Wechselwirkungskräfte zwischen den Atomen an der Spitze des Tips und der Probenoberfläche auf, welche den Cantilever verbiegen. Zwischen Probe und Spitze wirken sowohl anziehende als auch abstoßende Kräfte. Nähert sich der Cantilever der Probe, beginnen als erstes die van-der-Waals-Kräfte zu wirken. Dazu kommen schwächere anziehende Kräfte wie elektrostatische und magnetische Wechselwirkungen. Je geringer der Abstand zwischen Spitze und Probe, desto größer werden die zwischenmolekularen Abstoßungskräfte, deren Ursache das Pauli-Prinzip ist. Die Überlagerung der Potentiale ergibt ein Lennard-Jones-Potential, dessen Verlauf in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Die Verbiegung ist proportional zu der wirkenden Kraft und kann detektiert werden. Die gängigste Methode ist hier das Lichtzeigerprinzip. Dazu wird ein Laserstrahl auf das freie Ende des Cantilevers fokussiert und auf den Vierquadrantenfotodetektor reflektiert. Bei einer Verbiegung des Cantilevers ändert sich das Signal auf dem Vierquadrantenfotodetektor

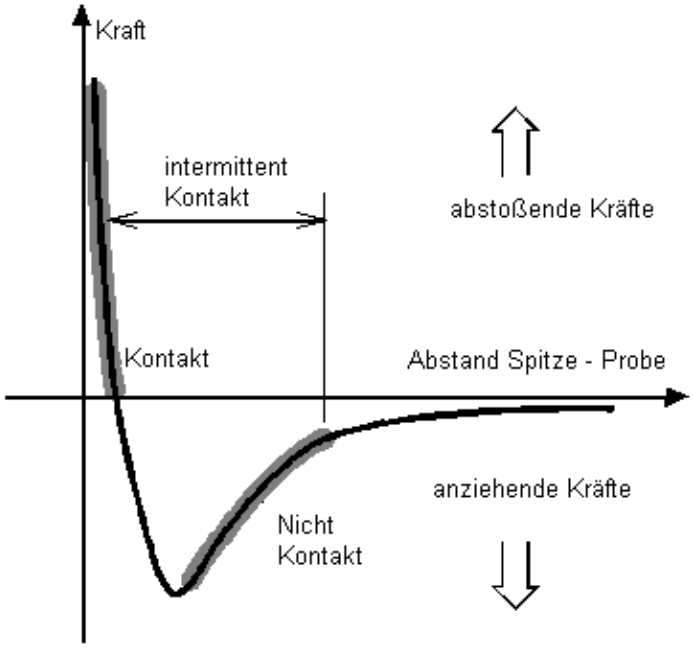


Abbildung 3.2: Kraft vs. Abstand Spitze - Probe aus [1].

entsprechend. Dabei ist das Top-Bottom-Signal ein Maß für die Verbiegung des Cantilevers in z-Richtung und das Left-Right-Signal für die Torsion des Cantilevers. So kann man sowohl die vertikale Verbiegung des Cantilevers detektieren, um ein Topographiebild zu bekommen, als auch die laterale Verbiegung, die zum Beispiel Aussagen über die Reibung zwischen Probenoberfläche und Tip ermöglicht. Das Signal des Vierquadrantenfotodetektors wird an eine Steuerungseinheit weitergeleitet, die die z-Position des Piezos reguliert.

Der Cantilever ist ein Balken, der zwischen 100 µm und 400 µm lang ist. An dessen freiem Ende sitzt der Tip, der typischerweise pyramidenförmig ist. Dieser Tip ist einige Mikrometer lang und hat an der Spitze standardmäßig einen Duchmesser zwischen 10 nm und 50 nm. Die Wechselwirkungen dieser ausgedehnten Spitze mit der Probenoberfläche führen zu einer verzerrten Abbildung der Topographie. Diese sogenannte Degradation der Bildinformation bedeutet, dass die Ausdehnung von Erhebungen auf der Probenoberfläche systematisch zu groß dargestellt wird, während Vertiefungen systematisch als zu flach dargestellt werden, siehe Abbildung 3.3. Alle Informationen, die steiler als der Tip sind, gehen auf Grund der Wechselwirkung zwischen Tip und Probenoberfläche verloren. Der Degradationseffekt der Bildinformation lässt sich jedoch teilweise korrigieren, wenn man

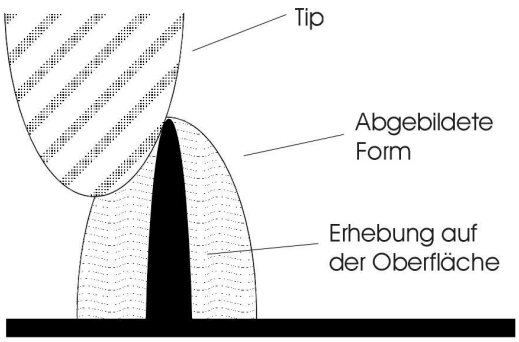


Abbildung 3.3: Degradation der Bildinformation.

die genaue Spitzenform kennt [12].

3.1.2 Betriebsarten

Betrachtet man das Kraftabstandsdiagramm in Abbildung 3.2, kann man den verschiedenen Bereichen verschiedene Betriebsarten zuordnen. Wenn der Tip in Kontakt mit der Probenoberfläche ist, wirken die abstoßenden Kräfte. Dies ist der sogenannte Kontaktmodus. Ist der Tip nicht in Kontakt mit der Probenoberfläche, jedoch im Wirkungsbereich der anziehenden van-der-Waals-Kräfte, kann im Nicht-Kontaktmodus gemessen werden. Im dazwischenliegenden Bereich befindet sich der Tip nur kurzzeitig im Kontakt mit der Probe, dies ist der Intermittierende-Kontaktmodus. Diese drei verschiedenen Betriebsarten werden im Folgenden nach dem "Springer Handbook of Nanotechnology" [15] beschrieben.

3.1.2.1 Kontaktmodus

Im Kontaktmodus befinden sich die Spitze und die Probenoberfläche in Kontakt. Hier gibt es zwei Möglichkeiten zu messen, bei konstanter Höhe (englisch: "Constant Height Mode") und bei konstanter Kraft (englisch: "Constant Force Mode"). Im Constant Force Mode wirkt auf den Cantilever eine konstante, frei wählbare Kraft. Um die Kraft auf dem Sollwert (englisch: "Setpoint") zu halten, regelt die Feedback-Schleife die Höhenposition des z-Piezos so, dass die Verbiegung des Cantilevers, also die wirkende Kraft, konstant gehalten wird. Aus der Änderung des z-Piezos lässt sich die Topographie der Probenoberfläche bestimmen. Die ver-

zögerte Reaktion der Feedback-Schleife liefert ein zweites Signal, das Deflection-Signal. Hier ist die Abweichung zwischen dem Sollwert der Cantileverauslenkung und dem tatsächlichen Wert dargestellt. In diesem Bild, eigentlich dem Fehlerbild, sind Änderungen der Topographie besonders gut zu erkennen.
Die zweite Möglichkeit im Kontakt zu messen ist der Constant Height Mode. Hierbei rastert der Cantilever in einer konstanten Höhe über die Probenoberfläche. Das Topographiebild wird aus der Cantileververbiegung berechnet. Da beim Constant-Height-Mode keine Feedback-Regelung nötig ist, kann mit sehr hoher Geschwindigkeit gemessen werden. Der Constant-Height-Mode ist jedoch nicht für empfindliche Proben oder Proben mit großem Höhenunterschied geeignet, da die Kräfte zwischen Tip und Probenoberfläche so groß werden können, dass sowohl Cantilever als auch Probe beschädigt werden.
Da die wirkende Normalkraft und auch die Lateralkräfte weiche Probenoberflächen zerstören können, ist der Contact-Mode für biologische Proben ungeeignet. Hier bietet sich der schonendere Intermittierende-Kontaktmodus an.

3.1.2.2 Intermittierende-Kontaktmodus

Beim Intermittierenden-Kontaktmodus (auch "Tapping Mode™" genannt) wird der Cantilever in der Nähe seiner Resonanzfrequenz zu Schwingungen angeregt. Nähert sich der schwingende Cantilever der Probenoberfläche, dämpfen die Wechselwirkungskräfte die Schwingungsamplitude. Die Schwingungsamplitude wird über die Vier-Quadranten-Photodiode detektiert und mit einer Feedback-Schleife auf einen Sollwert geregelt. Die Höhenänderung des z-Piezos ergibt auch hier wieder das Topographiebild der Probenoberfläche.
Zusätzlich können im Intermittierenden-Kontaktmodus die Änderung der Schwingungsamplituden und die Phasenverschiebung aufgenommen werden. Das Amplitudenbild zeigt die Abweichung der Amplitude vom Setpoint, hier sind Kanten auf der Probenoberfläche besonders gut zu erkennen. Das Phasenbild zeigt die Phasenverschiebung zwischen der piezoelektrischen Anregung des Cantilevers und der tatsächlichen Schwingung des Cantilevers. Die Phasenverschiebung enthält Informationen über Elastizitäts- und Adhäsionseigenschaften der Probenoberfläche.

Da die Spitze die Probe nur einmal pro Schwingung berührt, wirkt keine permanente Kraft auf die Probe. Dadurch ist der Intermittierende-Kontaktmodus

schonend für die Probenoberfläche und eignet sich besonders für weiche Proben.

3.1.2.3 Nicht-Kontaktmodus

Im Nicht-Kontaktmodus ist der Tip zu keinem Zeitpunkt mit der Probenoberfläche im Kontakt. Der Cantilever wird in einem Abstand von 5-15 nm zur Oberfläche zu Schwingungen angeregt. Wie beim Intermittierende-Kontaktmodus werden die Änderung der Schwingungsamplitude oder der Schwingungsfrequenz und der Phase während des Rastervorgangs gemessen. Der Nachteil des Nicht-Kontaktmodus ist, dass die hier herrschenden Kräfte deutlich geringer als die abstoßenden Kräfte im Kontaktbereich sind. Der Intermittierende-Kontaktmodus dagegen verbindet die Vorteile der Messung im Regime der abstoßenden Kräfte mit der schonenderen Behandlung für die Probenoberfläche.

3.1.3 Vorteile des Rasterkraftmikroskops

Mit einem AFM kann man bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel bei normalen Laborbedingungen, im Ultrahochvakuum oder in Flüssigkeit messen. Dabei bieten AFM-Messungen in Flüssigkeit vor allem für biologische Proben einige Vorteile. Die wirkenden Kräfte zwischen Probenoberfläche und Spitze werden verringert und die biologischen Proben können in physiologischer Umgebung abgebildet werden. Durch das Messen in definierter Pufferlösung ist garantiert, dass zum Beispiel Zellen oder Proteine in ihrer ursprünglichen Form erhalten bleiben. Die Eigenschaften der Probe werden nicht durch einen Tocknungs- oder Präparationsprozess beeinflusst. Dies muss jedoch auch bei der Wahl der Cantilever berücksichtigt werden. Da unbehandelte biologische Proben weicher und dadurch empfindlicher als zum Beispiel Festkörper wie Silizium oder andere harte Oberflächen sind, müssen hier weiche Cantilever ausgewählt werden. Die Federkonstante der in dieser Arbeit verwendeten Cantilever liegt im Bereich zwischen 0,32 N/m und 2 N/m, siehe Tabelle 3.1.

	NP-S10	**NP-S10**	**OMCL-AC240TS-W2**
Cantileverform	V-förmig	V-förmig	Rechteckig
Material	Siliziumnitrid	Siliziumnitrid	Silizium
Beschichtung:			
Rückseite	Cr + Au	Cr + Au	Al
Tip-Seite	keine	keine	keine
Federkonstante k in N/m	0,32	0,58	2
Resonanzfrequenz in kHz	40	40	70
Spitzenhöhe in µm	2,5-3,5	2,5-3,5	9-19
Spitzenradius in nm	20	20	≤ 10

Tabelle 3.1: Wichtige Cantilevergrößen, entnommen aus den jeweiligen Datenblättern der Hersteller.

3.1.4 MFP 3D

Die in der vorliegenden Arbeit angefertigten Messungen am AFM im Tapping Mode™ wurden mit dem Rasterkraftmikroskop MFP 3D von Asylum Research aufgenommen. Das MFP 3D besteht aus einem dreibeinigen Scan-Kopf, einem XY-Scan-Tisch, einer Kamera, einer invertierten Optik und einer Basis mit Steuerungseinheit [3]. Der Scankopf enthält den Cantileverhalter und den z-Piezo zur Regelung der wirkenden Kraft, während mit dem XY-Scan-Tisch die Probe zeilenweise unter dem Scankopf verschoben wird. Die Basis mit Steuerungseinheit ist die Verbindungsstelle zum Computer und ermöglicht zusätzlich verschiedene Kameralichtwege.

3.2 Elektronenmikroskopie

Das erste Elektronenmikroskop wurde Anfang der 30-ger Jahre von Ernst Ruska und Max Knoll am Fritz-Haber-Institut in Berlin gebaut [70]. Da die Abbesche Auflösungsgrenze das Auflösungsvermögen von Lichtmikroskopen auf die Hälfte der Wellenlänge limitiert, liegt es nahe, auf Elektronen auszuweichen, die eine sehr viel kleinere Wellenlänge haben. Dadurch können mit dem Elektronenmikroskop

Auflösungen bis zu 0,1 nm erreicht werden.

3.2.1 Aufbau und Funktionsweise

Im Elektronenmikroskop werden die Proben mit Elektronen bestrahlt. Der Elektronenstrahl wird durch die Wechselwirkungen mit der Probe verändert und enthält so die Bildinformation. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten, die Transmissionselektronenmikroskopie und die Rasterelektronenmikroskopie. Diese beiden Betriebsarten werden in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Der prinzipielle Aufbau eines Elektronenmikroskops besteht aus einer Elektronenkanone, den Elektronenlinsen, der Probenhalterung und den Detektoren in einem Vakuumsystem [23], genannt Säule, dargestellt in Abbildung 3.4 und 3.5. In der Elektronenkanone werden die Elektronen erzeugt, indem die Kathode, zum Beispiel ein Wolframdraht, aufgeheizt wird. Dadurch treten Elektronen ins Vakuum aus. Die Kathode befindet sich in einem negativ geladenen Wehnelt-Zylinder. In dem elektrischen Feld zwischen der Kathode und einer Anode werden die Elektronen beschleunigt und durch den Wehnelt-Zylinder zu einem Strahl gebündelt. Durch ein System aus Elektronenlinsen, den Kondensorlinsen, wird der Elektronenstrahl gesteuert und auf die Probe fokussiert [23].

3.2.2 Betriebsarten

Die verbreiteten Betriebsarten sind das Rasterelektronenmikroskop und das Transmissionselektronenmikroskop. Sie unterscheiden sich sowohl in der Art der Bilderzeugung als auch im Strahlverlauf und der geometrischen Anordnung. Die Beschreibungen folgen dem Lehrbuch "Elektronemikroskopie" von S. Flegler, J. Heckmann und K. Klomparens [23].

3.2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Ein schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops (abgekürzt: REM) ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

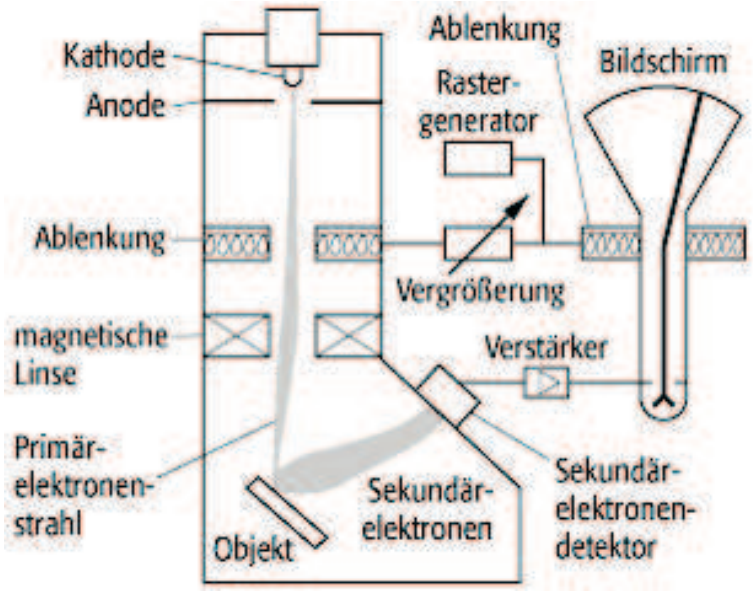


Abbildung 3.4: Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops aus [23].

Das REM erzeugt einen dünnen Elektronenstrahl, mit dem die massive Probe Bildpunkt für Bildpunkt abgerastert wird. Dabei entstehen durch die Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe zwei Arten von detektierbaren Elektronen, die Sekundärelektronen und die Rückstreuelektronen. Sekundärelektronen enstehen durch den Beschuss der Probe mit den Primärelektronen des Elektronenstrahls. Sie stammen aus den oberen Nanometern der Probenoberfläche und bilden somit die Topographie der Probe ab. Sekundärelektronen sind niederenergetisch und ermöglichen eine hohe Auflösung. Der Sekundärelektronendetektor ist seitlich schräg über der Probe angebracht. Durch die schräge Anordnung erscheinen dem Detektor nahe Details heller im Bild als weiter entfernte. Somit entsteht eine Art 3d-Effekt. Ein zweites mögliches Abbildungsverfahren ist die Detektion von Rückstreuelektronen. Die Rückstreuelektronen sind Elektronen aus dem Primärstrahl, die in tieferen Schichten der Probe elastisch gestreut werden. Die Elektronen wechselwirken hier mit Atomen die einige zehn Nanometer tief unter der Probenoberfläche liegen können. Die detektierten Elektronen liegen im Energiebereich des Primärstrahls und liefern ein Materialkontrastbild.
Die Messungen in der hier vorliegenden Arbeit wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200 aufgenommen.

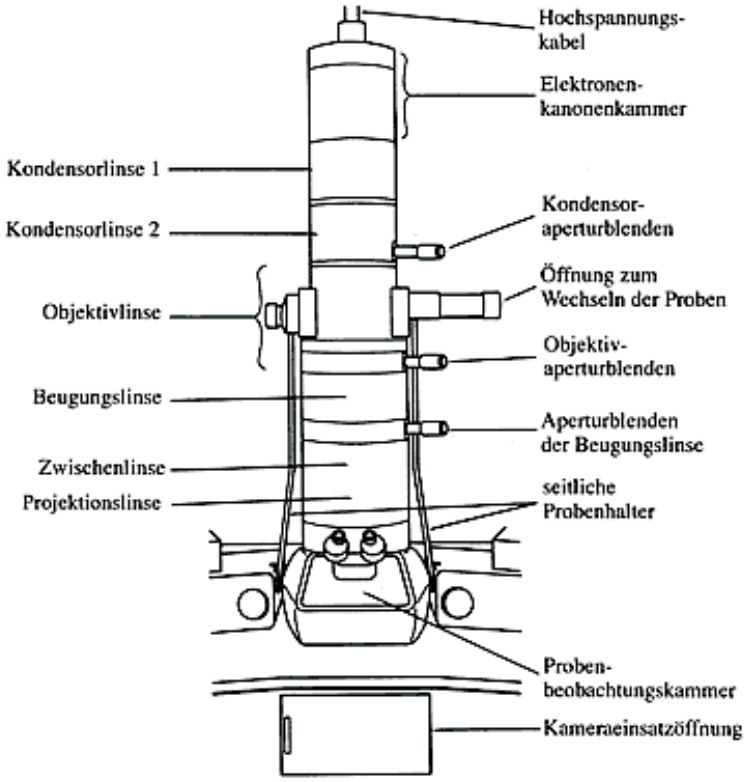


Abbildung 3.5: Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops aus [23].

3.2.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Abbildung 3.5 zeigt den schematischen Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops (abgekürzt: TEM).

Im Gegensatz zum REM durchdringen hier die Elektronen die Probe. Nach der Wechselwirkung mit der Probe erzeugt ein zweites Linsensystem ein vergrößertes Endbild. Mit dem Transmissionselektronenmikroskop können nur sehr dünne Proben, im Bereich von wenigen µm, abgebildet werden. Die Elektronen werden an der Probe gestreut und ändern ihre Bewegungsrichtung (Rutherford-Streuung). Dies führt zu einem Elektronenbeugungsbild. Der sogenannte Amplitudenkontrast tritt auf, da es in den stark streuenden Bereichen der Probe zu Elektronenverlusten kommt. Die Elektronen werden in diesen Regionen zu größeren Winkeln gestreut und durch die Blenden herausgefiltert oder sie werden absorbiert. Bei kristallinen Proben tritt hauptsächlich der Beugungskontrast auf, während bei

amorphen Proben vor allem der Streuabsorptionskontrast eine Rolle spielt. Der Streuquerschnitt der Elektronen hängt von der Ordnungszahl Z, also von den verwendeten Elementen, ab. Je höher die Elektronendichte ist, desto stärker werden die Elektronen gestreut und von der Blende herausgefiltert. Regionen mit großer Elektronendichte erscheinen also im Bild dunkler.
Die Messungen in der hier vorliegenden Arbeit wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop Philips 400 aufgenommen.

Negativ-Kontrast-Verfahren
Das Negativ-Kontrast-Verfahren ist ein Probenpräparationsverfahren für TEM-Messungen, siehe Abschnitt 3.4.4. Hier wird das Prinzip des Streuabsorptionskontrastes ausgenützt. Das verwendete Kontrastmittel, meistens Uranylacetat, hat eine deutlich höhere Ordnungszahl Z als die Probe. Wenn sich das Kontrastmittel so auf dem Substrat anlagert, dass die Strukturen, die abgebildet werden sollen, frei bleiben, erscheinen die Strukturen im Bild heller und die Umgebung dunkel.

3.3 Mikrorheologie

Die Mikrorheologie (von griechisch rhei: fließen und logos: Lehre) ist eine Methode, die Aussagen über rheologische Eigenschaften, wie Viskosität oder Schermodul, eines Mediums macht. Dafür werden kolloidale Mikropartikel in das Medium eingebettet oder an einzelne Komponenten gekoppelt. Über die Verfolgung dieser Sonden können sowohl aktiv als auch passiv nanomechanische und viskoelastische Eigenschaften untersucht werden.

3.3.1 Aufbau und Funktionsweise

Man unterscheidet zwischen aktiver und passiver Mikrorheologie. Bei der aktiven Mikrorheologie benutzt man externe Kräfte, um die kolloidalen Mikropartikel auszulenken oder zu oszillieren. Diese Kräfte können zum Beispiel durch Magnetfelder oder eine optische Pinzette ausgeübt werden. Passive Mikrorheologie hingegen detektiert die Trajektorie der kolloidalen Mikropartikel, die alleine durch die thermische Energie k_BT erfolgt. In der hier vorliegenden Arbeit wird die Pas-

sive Mikrorheologie angewandt. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Abbildung 3.7 zeigt eine Fotografie des Laboraufbaus.

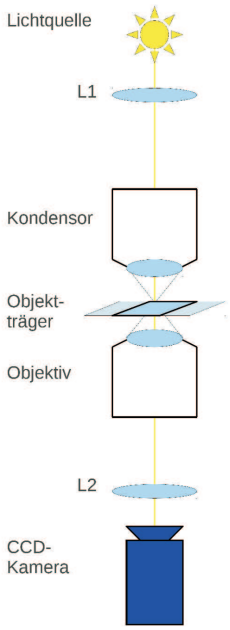


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau für die Mikrorheologie aus [22].

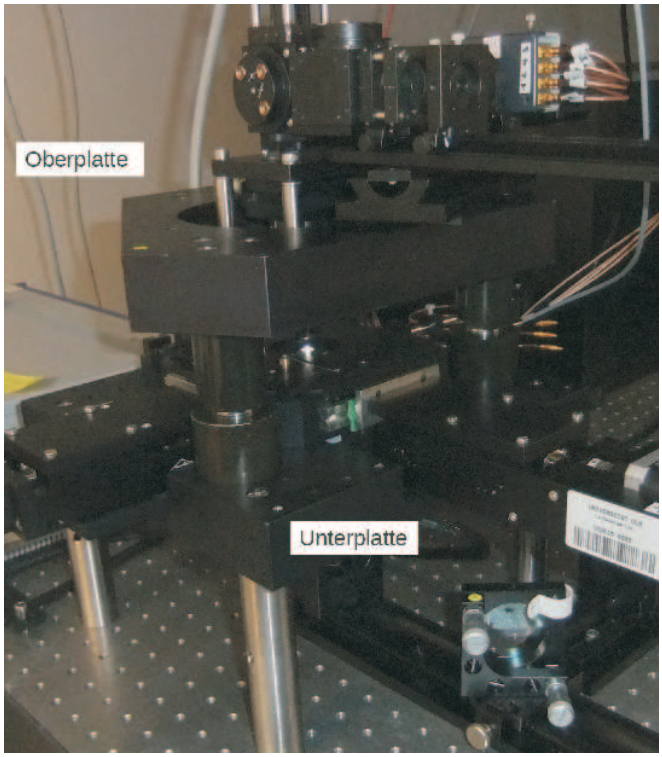


Abbildung 3.7: Aufbau für die Mikrorheologie aus [22].

Der Mikroskopaufbau besteht aus einer Weißlichtquelle, dem Kondensor, der Probenkammer und dem invertierten Öl-Imersionsobjektiv (Nikon, CFI Apo TIRF 100XH). Der obere Teil des Aufbaus, die Oberplatte, bestehend aus der Weißlichtquelle und dem Kondensorlinsensystem, kann abgenommen werden. Zwischen oberem und unterem Teil des Aufbaus, der Unterplatte, befindet sich die Probenkammer, siehe Abbildung 3.8, auf einem in XY-Richtungen verstellbaren Probentisch. Dieser Tisch kann durch Schrittmotoren (Owis GmbH LTMGo) großräumig auf einer Fläche von $10 \times 10\,\mu m$ gesteuert werden. Für kleinere Verschiebungen ist ein Piezotisch (Physikinstrumente GmbH und Co KG, P-561.3DD) mit $45 \times 45 \times 15\,\mu m$ Reichweite integriert. Zur Beobachtung der Partikelbewegung wird eine CCD-Kamera (Motion Pro X4, Imaging Solutions GmbH) mit einer maximalen Framerate von 5000 Herz benutzt. In den Aufbau ist zusätzlich op-

tional eine optische Falle integriert.
Abbildung 3.8 zeigt die Probenkammer, die aus Glasdeckgläsern besteht, die zur Deckglaskorrektur des Öl-Immersionsobjektivs (0,17 mm) passen. Das Volumen der Probenkammer ist durch einen PDMS-Einsatz (Polydimethysiloxan) variabel einstellbar. Abbildung 3.9 zeigt den Ausschnitt des Bilds der Hochgeschwindigkeitskamera, mit dem die Partikelbewegung verfolgt wird.

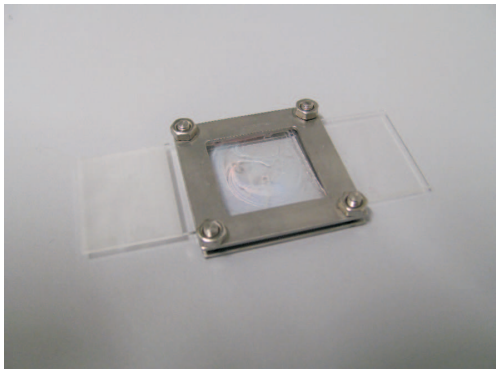


Abbildung 3.8: Probenkammer für die mikrorheologischen Messungen aus [22].

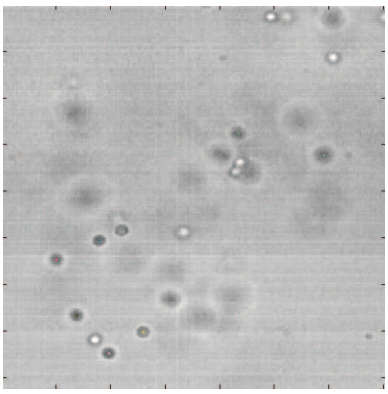


Abbildung 3.9: 20x20 µm-Auschnitt der Hochgeschwindigkeitskamera.

3.3.2 Modellbasierte Auswertung

Für die passive Mikrorheologie muss das Material weich genug sein, damit man die Brownsche Bewegung der Kolloide detektieren kann. Die thermische Bewegung hängt von der Steifigkeit der lokalen Umgebung ab und gibt so Aufschluss über die nanomechanischen Eigenschaften. Die folgende Herleitung folgt einer Zusammenfassung von M. Gardel et al. [31] und den Veröffentlichungen von T. Mason et al. [60], [59], [58]. Kolloidale Mikropartikel erfahren in einem rein viskosen Medium Diffusion oder Brownsche Bewegung. Die Verfolgung der Bewegung ergibt eine Punktwolke, die jedem Zeitpunkt eine Position zuordnet. Daraus lässt sich die zeitabhängige Positionskorrelationsfunktion eines Partikels berechnen. Diese Korrelationsfuntion wird "Mean-squared-displacement" (MSD) genannt:

$$\langle \Delta\vec{x}^2(\tau)\rangle = \langle |\vec{x}(t+\tau) - \vec{x}(t)|^2 \rangle_t \tag{3.1}$$

Hier ist $\vec{x}$ die dreidimensionale Position des Partikels und τ der Zeitabstand. Bei der Mittelung über die Zeit geht man davon aus, dass das Medium immer im thermischen Gleichgewicht ist und sich die Materialeigenschaften mit der Zeit nicht verändern. Der Diffusionskoeffizeint für die Brownsche Bewegung ergibt sich aus der Diffusionsgleichung:

$$\langle \Delta \vec{x}^2(\tau) \rangle = 2D\tau \tag{3.2}$$

Mit der Diffusionskonstante D für ein Partikel mit Radius r und η als der Viskosität des Mediums lautet die Stokes-Einstein-Gleichung

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \tag{3.3}$$

Komplexere Materialien zeigen meist sowohl viskoses als auch elastisches Verhalten, wie in Kapitel 2, Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Zusätzlich besteht eine Frequenzabhängigkeit sowie eine Abhängigkeit von der Zeit- und Längenskala, die durch die Messung untersucht wird. Auch hier kann man mit Hilfe des MSDs Aussagen über die viskosen und elastischen Eigenschaften des Mediums treffen. Ein visko-elastisches Material kann aus einem elastischen Netzwerk bestehen, dass viskos verbunden und in eine inkompressible Newtonsche Flüssigkeit eingebunden ist [47]. Im Gegensatz zu einer reinen Flüssigkeit, bei der das MSD linear verläuft, siehe Gleichung 3.2, kann das MSD in einem komplexen Material beliebig mit τ skalieren:

$$\langle \Delta \vec{x}^2(\tau) \rangle \sim \tau^\alpha \tag{3.4}$$

Dabei unterscheidet man zwischen gebremsten Diffusionsprozessen für $0 < \alpha < 1$ (Subdiffusion) und beschleunigten Diffusionsprozessen für $\alpha > 1$, (Superdiffusion). Für $\alpha = 0$ ist das Partikel lokal stark eingeschränkt, sodass keine Diffusion mehr stattfindet.

Eine Möglichkeit, die elastische Wechselwirkung mit einzubeziehen, ist, die Stokes-Einstein-Gleichung für eine rein viskose Flüssigkeit in Gleichung 3.3 zu verallgemeinern, indem man das komplexe Schermodul $G(\omega) = i\omega\eta$ einführt. Dadurch

werden auch die Materialeigenschaften berücksichtigt, die einen Beitrag zum Realteil des Schermoduls, also zu den elastischen Eigenschaften, leisten.

Betrachtet man ein kolloidales Mikropartikel der Masse m und der Geschwindigkeit $v(t)$, dann beschreibt die verallgemeinerte Langevin-Gleichung die Kräfte, die in einem komplexen Material wirken:

$$m\dot{v}(t) = F(t) - \int_0^t dt' \zeta(t-t')v(t') \tag{3.5}$$

Hier beschreibt $F(t)$ die stochastischen Kräfte der Brownschen Bewegung und die Kräfte zwischen den Partikeln. Das Integral enthält die zeitabhängige Speicherfunktion $\zeta(t)$, um die Elastizität des Netzwerks zu berücksichtigen, und die viskose Dämpfung der Flüssigkeit. Unter Berücksichtigung der Kausalität und des Gleichverteilungssatzes ergibt sich aus der Speicherfunktion die komplexe Viskosität $\eta(s)$

$$\eta(s) = \frac{\zeta(s)}{6\pi r} \tag{3.6}$$

mit der zeitabhängigen Speicherfunktion im Laplace-Raum

$$\zeta(s) = \frac{6k_BT}{s^2\langle\Delta\vec{x}^2(s)\rangle} \tag{3.7}$$

und der Laplace-Frequenz s.

Über den Zusammenhang

$$G(s) = is\eta(s) \tag{3.8}$$

ergibt sich mit Gleichung 3.7 für das Schermodul im Laplace-Raum

$$G(s) = \frac{k_BT}{\pi r s[\langle\Delta\vec{x}^2(s)\rangle]} \tag{3.9}$$

Mit der inversen Laplace-Transformation und einer einseitigen Fouriertransformation ergibt sich das komplexe Schermodul in Abhängigkeit von der Frequenz:

$$G(\omega) = \frac{k_B T}{\pi r i \omega F_u[\langle \Delta \vec{x}^2(s) \rangle]} \tag{3.10}$$

Spaltet man G in Real- und Imaginärteil, ergeben sich das Speichermodul G' und das Verlustmodul G", die über die Kramers-Kronig-Relationen miteinander verknüpft sind.

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \tag{3.11}$$

mit

$$G'(\omega) = |G(\omega)| \cos\left(\pi \frac{\alpha(\omega)}{2}\right) \tag{3.12}$$

und

$$G''(\omega) = |G(\omega)| \sin\left(\pi \frac{\alpha(\omega)}{2}\right) \tag{3.13}$$

Um die Fouriertransformation des MSDs aus Gleichung 3.10 zu bestimmen, folgt diese Arbeit der Herleitung von T. Mason [58]. Die Fouriertransformation wird hier algebraisch abgeschätzt, indem um eine Frequenz ω entwickelt wird.

$$\langle \Delta \vec{x}^2(t) \rangle = \langle \Delta \vec{x}^2 \left(\frac{1}{\omega}\right) \rangle (\omega t)^{\alpha(\omega)} \tag{3.14}$$

mit $\alpha(\omega)$ als der logarithmischen Steigung des MSDs

$$\alpha(\omega) = \left. \frac{d\langle \Delta \vec{x}^2(t) \rangle}{d \ln t} \right|_{t=1/\omega} \tag{3.15}$$

Daraus ergibt sich für das komplexe Schermodul:

$$|G(\omega)| = \frac{k_B T}{\pi r \langle \Delta \vec{x}^2(\frac{1}{\omega}) \rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)]} \tag{3.16}$$

3.4 Proteinpräparation

Die verwendeten Proteine Keratin 8 Wildtyp und Keratin 18 Wildtyp werden im Deutschen Krebsforschungszentrum in der Abteilung für Funktionelle Zellarchitektur aus Escherichia Coli Bakterien gewonnen. Zur Trennung von Protein und unerwünschten Bakterienresten wird das Verfahren der Gelchromatographie verwendet. Die Grundlage dieses Verfahrens sind Gele, die aus Partikeln mit einer definierten Porengröße bestehen. Lässt man ein Substanzgemisch aus unterschiedlich großen Molekülen durch das Gel laufen, können sich die größeren Moleküle nur im Lösungsmittel zwischen den Gelpartikeln aufhalten, während die kleineren Partikel auch in die Hohlräume der Gelpartikel hineindiffundieren. Die größeren Partikel passieren das Gel so schneller und es erfolgt eine Trennung nach den Partikelgrößen [51].
Das Protein liegt nach der Gelchromatographie in 6 M Harnstoff vor. Zur weiteren Verwendung muss eine Reihe von aufeinanderfolgenden Schritten durchlaufen werden, bevor der Assemblyprozess gestartet werden kann:

1. Konzentrationsbestimmung der zwei Proteinlösungen mit dem Bradfordtest
2. äquimolares Mischen von Keratin 8 und Keratin 18
3. Dialyse der Mischung zum Umpuffern aus dem Harnstoff- in ein Trispuffersystem
4. Konzentrationsbestimmung der Mischung mit dem Bradfordtest
5. Assemblyprozess.

3.4.1 Konzentrationsbestimmung mit dem Bradfordtest

Beim Bradfordtest wird mit einem Photometer die Absorption von Licht an Flüssigkeiten gemessen [18]. Die Absorption ist abhängig von Zusammensetzung und Konzentration der Lösung. Bestrahlt man die Lösung mit monochromatischem Licht und misst das transmittierte Licht, kann aus dem Verhältnis der Intensitäten des eingestrahlten und des transmittierten Lichts der Extinktionskoeffizient berechnet werden. Dieser ist proportional zur Konzentration der Lösung. Beim Bradfordtest verbindet sich das Protein mit einem Farbstoffkomplex, sodass das

Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschoben wird und der Extinktionskoeffizient der Farbstoff-Protein-Verbindung im Vergleich zum Farbstoff alleine ansteigt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann mit einem Photometer gemessen werden. Diese Zunahme ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Vor jeder photometrischen Messung muss eine Standardkurve zur Kalibrierung, zum Beispiel mit Rinderalbumin (englisch: "bovine serum albumin", abgekürzt: BSA), aufgenommen werden.

Zu photometrischen Messungen wird das BioPhotometer von Eppendorf verwendet. Das BioPhotometer ist ein Absorptions-Einstrahlphotometer mit Referenzstrahl und mehreren festen Wellenlängen. Die verwendete Wellenlänge lag bei 595 nm. Die Strahlungsquelle ist eine Xenon-Blitzlampe und die spektrale Zerlegung geschieht durch ein holographisches Konkavgitter. Als Strahlungsempfänger dient eine Silizium-Photodiode [8].

Der Bradfordtest wird mit dem Bradford-Farbstoff-Konzentrat von Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH) und den Küvetten (UV-Küvette, halbmikro, Brand) durchgeführt. Die Standardkurve wird mit BSA in 2 µl Schritten von 0 µl bis 10 µl gemessen. Die Proteinmenge für die Keratin 8/18 Proben beträgt pro Probe 6 µl.

Ausgehend von der mit dem Bradford Test bestimmten Konzentration der Proteinlösung können Keratin 8, mit einer Größe von 53,7041 kDa [4] und Keratin 18, mit einer Größe von 48,0577 kDa [4] äquimolar gemischt werden .

3.4.2 Dialyse

Die Dialyse ist ein osmotischer Prozess, mit dem man sehr kleine Moleküle oder Ionen aus Lösungen entfernen kann oder die Pufferumgebung (wässrige Lösung) eines Polymers austauschen kann.
Eine gängige Dialysemethode ist es, einen dünnwandigen Dialyseschlauch mit dem Protein zu befüllen und über längere Zeit unter kontrollierten Bedingungen in einem großen Volumen Puffer zu rühren. Dabei stellt sich im Schlauch dieselbe Salzkonzentration wie im umgebenden Puffer ein, das Protein bleibt jedoch im Schlauch erhalten. Der hier verwendete Dialyseschlauch (Servapor, Durchmesser 6 mm, MWCO 12.000-14.000) hat einen Porendurchmesser von ungefähr 25 Å. Die

Proteinmenge im Schlauch beträgt ca. 400 µl und das Volumen des umgebenden Puffers ca. 500 ml.
Das Protein liegt in 6 M Harnstoffpuffer vor und wird in einer Stufendialyse in einen Trispuffer (2 mM Tris, 1 mM DTT, pH-Wert 9,0) dialysiert [33]:

1. 20 Minuten bei Raumtemperatur, 400 ml 4 M Harnstoffpuffer (4 M Urea, 10 mM Tris, 2 mM DTT, pH-Wert 8,5)
2. 20 Minuten bei Raumtemperatur, 400 ml 2 M Harnstoffpuffer (2 M Urea, 10 mM Tris, 2 mM DTT, pH-Wert 8,5)
3. 20 Minuten bei Raumtemperatur, 400 ml Trispuffer (10 mM Tris, 2 mM DTT, pH-Wert 8,5)
4. über Nacht bei 4° C in Dialysepuffer (2 mM Tris, 1 mM DTT, pH-Wert 9,0)

Die genauen Herstellungsprotokolle für die Pufferlösungen befinden sich im Anhang.

3.4.3 Assembly-Prozess

Die verschiedenen Stufen des Assembly-Prozesses sind in Kapitel 2, Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Kontrollierte biochemische Umgebungsbedingungen während der Dialyse und beim Start der Polymerisation verhindern, dass die Filamentbildung schnell und unkontrolliert stattfindet. Der Assembly-Prozess kann bei verschiedenen Proteinkonzentrationen, verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Salzkonzentrationen ablaufen. Diese drei Parameter können variiert werden und beeinflussen die Filamentbildung sowohl auf der Einzelfilamentebene, als auch auf der Netzwerkebene.
Die Proteinkonzentration entscheidet darüber, ob einzelne Filamente oder Netzwerke entstehen. Je höher die Konzentration ist, desto dichter ist das Netzwerk. Bei höheren Konzentrationen treten auch deutlich häufiger natürliche y-Verzweigungen und Quervernetzungen auf. Die Proteinkonzentration beeinflusst jedoch auch die Bindungskinetik. Bei höheren Konzentrationen läuft der Assembly-Prozess schneller und es entstehen in kürzerer Zeit längere Polymerketten. Der Parameter Proteinkonzentration hängt über die Dichte der Quervernetzungen mit dem Parameter Salzkonzentration zusammen. Wenn zum Beispiel sowohl die

Proteinkonzentration als auch die Salzkonzentration reduziert werden, kann die relative Dichte der Quervernetzungen konstant bleiben.
Die Temperatur der Assembly-Lösung während der Polymerisation beeinflusst vor allem die Assemblykinetik. Bei steigender Temperatur wird die Polymerisationsgeschwindigkeit erhöht und die durchschnittliche Kettenlänge bei gleicher Assemblyzeit nimmt zu. Hier beeinflussen sowohl die Temperatur, als auch die Proteinkonzentration das Ergebnis. Auch bei höheren Temperaturen treten deutlich häufiger natürliche y-Verzweigungen und Quervernetzungen auf.
Die Salzkonzentration hat sowohl Auswirkungen auf der Einzelfilament, als auch auf der Netzwerkebene. Gelöste Gegenionen können auf der Einzelfilamentebene durch die Manning-Kondensation eine Änderung der Persistenzlänge der Filamente bewirken. Bivalente Ionen wirken als Quervernetzer und verbinden die Filamente an den Kreuzungspunkten. Wie oben bereits beschrieben, muss die Salzkonzentration immer im Zusammenhang mit der Proteinkonzentration betrachtet werden.

Die Proteinlösung liegt in Dialysepuffer bei 4° C vor. Das Standardprotkoll ist folgerndermaßen [33]:

- mit Dialysepuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnen
- Aliquot 2 x Assemblypuffer (20 mM Tris, pH-Wert 7,0) zugeben
- optional: Stoppen der Polymerisation mit 0,2% -Glutaraldehyd in Filamentpuffer [37].

Abhängig von der Wahl der Parameter Proteinkonzentration, Polymerisationszeit, Polymerisationstemperatur und Salzkonzentration Einzelfilamentlösungen, verschlaufte Netzwerke oder Gele.

3.4.4 Probenpräparation

Für die verschiedenen Messmethoden, Rasterkraftmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Mikrorheologie, werden verschiedene Verfahren zur Probenpräparation angewendet.

Im Folgenden wird das Polymerisations-Protokoll für die verschiedenen Proben beschrieben.

Standardbedingungen:

- 0,5 mg/ml Proteinkonzentration
- definierte Temperatur
- definierte Polymerisationszeit

variable Salzbedingungen:

- Polymerisation, siehe Standardbedingungen
- zusätzlich 0,1 - 2 mM $MgCl_2$

Transmissionselektronenmikroskopie
Die Proben für die Messungen im TEM werden mit dem Negativ-Kontrast-Verfahren präpariert. Als Substrat eignen sich Kupfergitter, die mit einer ca. 40-50 nm dicken Schicht Formvar und einer ca. 10 nm dicken Lage Kohlenstoff beschichtet sind [56]. Um die Oberfläche zu reinigen und zu ionisieren, werden die beschichteten Kupfergitter beglimmt und dadurch hydrophil. Dies verbessert die Anlagerung der Proteine und des Kontrastmittels auf der Oberfläche. Um den Unterschied in der Elektronenstreuung zwischen Substrat und Protein zu verbessern, wird 2% -Uranylacetat benutzt. Im Folgenden sind die aufeinanderfolgenden Schritte der Probenpräparation aufgeführt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die einzelnen Schritte direkt aufeinander erfolgen, damit die Proben nicht austrocknen:

- Polymerisation unter Standard- oder variablen Salzbedingungen
- Polymerisationszeit 10 s, 1 min, 5 min, 10 min, 20 min
- Temperatur 4° C, 20° C, 30° C, 37° C
- verdünnen auf 0,0125 mg/ml
- 10 µl für 10 s auf dem Kupfergitter absetzen lassen
- auf Filterpapier abstreifen
- in 15 µl Wassertropfen für 10 s spülen
- auf Filterpapier abstreifen
- 10 µl 2% -Uranylacetad für 15 s auf dem Kupfergitter absetzen lassen

- auf Filterpapier abstreifen

Eine ausführliche Beschreibung der Probenpräparation findet sich in [56].

Rasterkraftmikroskopie

Der Vorteil der Rasterkraftmikroskopie als bildgebendes Verfahren ist, dass die Proben weder getrocknet noch chemisch vorbehandelt werden müssen. Dadurch ist es möglich, die Filamente abzubilden, ohne dass deren mechanische Eigenschaften durch die Probenpräparation verändert werden. Das Assemblyprotokoll folgt dem Ablauf für die Standardbedingungen, siehe oben. Um die Intermediärfilamente in Pufferlösung zu messen, werden 50 µl Assembly-Lösung auf die Probenoberfläche aufgebracht. Nach einer Adhäsionszeit von 30 Sekunden muss die Probenoberfläche mit Milliporewasser gewaschen werden und anschließend wieder mit ca. 50 µl Filamentpuffer bedeckt werden, damit sie nicht austrocknet. Die Proben wurden auf frisch gespaltenem Glimmer oder gereinigten Glasdeckgläsern präpariert.

Die Reinigung der Glasoberfläche mit Piranha-Lösung umfasst folgende Schritte:

- Spülen mit Ethanol
- Spülen mit Milliporewasser
- 1 h in Piranha-Lösung (3 Teile H_2SO_4 97%, 1 Teil H_2O_2, 38%)
- 10 min in Milliporewasser im Ultraschallbad
- Trockenblasen mit Stickstoff.

Durch diese Behandlung wird die Glasoberfläche hydrophil und es entstehen Si-OH-Gruppen, die einige Stunden stabil bleiben.

Mikrorheologie

Bei der Probenpräparation für die mikrorheologischen Messungen ist es wichtig, die mechanischen Eigenschaften des Netzwerks unverändert zu erhalten. Dafür müssen die Polymernetzwerke in der Umgebung polymerisiert werden, in der anschließend auch die Messung vorgenommen werden soll. Als Sonden wurden Polystyrol-Kugeln mit einem Durchmesser von einem Mikrometer (Thermo Scientific, Duke Standards, Cat No. 4009A Polymer Microspheres in Water) direkt vor

der Polymerisation zugegeben.

Das Protokoll für die Polymerisation lautet wie folgt:

- Polymerisation unter Standard- oder variablen Salzbedingungen
- 0,01 wt % Polystyrol-Kugeln (Thermo Scientific, Duke Standards, Cat No. 4009A Polymer Microspheres in Water)
- Raumtemperatur
- Polymerisationszeit t>30 min.

Direkt nach dem Start der Polymerisation im Reaktionsgefäß muss die Polymerlösung in die Probenkammer umgefüllt werden. In der Probenkammer entsteht dann ungestört die Netzwerkstruktur. Durch späteres Pipettieren der Lösung besteht die Wahrscheinlichkeit, ein bereits entstandenes Netzwerk wieder zu zerstören und so die Eigenschaften zu verändern. Aus dem gleichen Grund müssen auch die Polystyrol-Kugeln vor dem Start der Polymerisation hinzugegeben werden. Fügt man die Partikel dem fertigen Netzwerk zu, wird zum einen durch das Pipettieren die Netzwerkstruktur zerstört und zum anderen verteilen sie sich nicht gleichmäßig.

Rasterelektronenmikroskopie
Auch bei der Probenpräparation für das REM ist es wichtig, die dreidimensionale Struktur der Probe zu erhalten. Dies wird durch die Zugabe der Polystyrol-Kugeln erreicht, die das Netzwerk stabilisieren und verhindern, dass es auf die Oberfläche kollabiert. Die Polymerisation folgt den Schritten für die Probenpräparation der Mikrorheologiemessungen. Im weiteren Verlauf wird das polymerisierte Netzwerk mit Osmium kontrastiert um den Elektronenstreukontrast zu verstärken und in einer aufsteigenden Alkoholreihe, 30% , 50% , 70% , 90% und 100% Propanol, dehydriert und mit Kohlendioxid als Translationsmedium kritisch punktgetrocknet (Critical Point Dryer CPD 030, BalTec) [45].
Um Aufladungen zu vermeiden, muss die Probe mit Metall beschichtet werden. Das getrocknete dreidimensionale Netzwerk wird hier mit einer ca. 2 nm dicken Platinschicht bedampft.

Im Idealfall wurde das polymerisierte Netzwerk nach der mikrorheologischen Mes-

sung weiter im REM gemessen, um die mechanischen Eigenschaften mit der Netzwerkstruktur zu verbinden.

3.5 Zellkultur und Zellextraktion

Um die mechanischen Eigenschaften des Keratin Zytoskeletts der Pankreaskarzinomzellen zu bestimmen, müssen alle Bestandteile der Zelle mit Ausnahme des Keratin Zytoskeletts extrahiert werden. Die Zellkultur wird mit humanen Pankreaskarzinomzellen der Zellinie Panc-1 (American Type Culture Collection, Manassas, Va) betrieben. Die Umgebungsbedingungen im Brutschrank sind 37° C und 5% CO_2.
Die Zellen wachsen für 48 Stunden auf Deckgläschen der Größe 24 x 24 mm. 24 Stunden vor der Präparation werden 3 μl einer 1 wt% -Lösung der Polystyrolkugeln (Thermo Scientific, Duke Standards, Cat No. 4009A Polymer Microspheres in Water) zugegeben. Die Zellen phagozytieren die Mikropartikel von alleine. Die Zellextraktion folgt dem Protokoll aus Beil et al 2003 [14]. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte aufgeführt:

- 30 Minuten auf Eis vorkühlen
- Zweimal mit PBS (Phosphatpuffer Dubelcco PBS, Biochrom AG) waschen
- 20 Minuten in 1 % -Triton (Triton X-100, Sigma Aldrich) in PBS inkubieren
- Sofort im Anschluss dreimal mit PBS waschen
- auf Eis mit PBS bedecken

Im Anschluss wurde das extrahierte Keratin-Zytoskelett mit Hilfe der Mikrorheologie untersucht, siehe Kapitel 4 Abschnitt 4.2.1. Um die Zellnetzwerke nach der mikrorheologischen Messung im REM abzubilden, werden die Netzwerke, wie im Abschnitt 3.4.4 für das Rasterelektronenmikroskop beschrieben, präpariert.

Kapitel 4

Auswertung und Ergebnisse

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die experimentell gewonnenen Daten ausgewertet und interpretiert worden sind.

4.1 Einzelfilamente

Mit der in Kapitel 3, Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Probenpräparation können Messungen durchgeführt werden, welche es ermöglichen, Aussagen über die Eigenschaften einzelner Keratinfilamente zu treffen. Dabei eignen sich für die Untersuchung von Einzelfilamenten die Transmissionselektronenmikroskopie und die Rasterkraftmikroskopie.
Der Vorteil der Transmissionselektronenmikroskopie ist, dass die Anzahl der Messungen, die für eine ausreichende Statistik nötig ist, in relativ kurzer Zeit erreicht werden kann. Die getrockneten Proben sind einfach zu handhaben und können über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Der Nachteil ist jedoch, dass die Probenpräparation durch den Einsatz von Fixativen und dem Trocknen der Proben bestimmte Eigenschaften der Filamente beeinflussen kann. Hier bietet sich das Rasterkraftmikroskop an, da es erlaubt, in variablen Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel einer Pufferlösung, zu messen. Die Messungen am Rasterkraftmikroskop sind jedoch sehr viel zeitaufwendiger. Ein 20 µm x 20 µm großer Ausschnitt mit einer Auflösung von 1024 Pixel x 1024 Pixel benötigt im AFM ca. eine Stunde, während die Bilder im REM innerhalb von Sekunden aufgenommen wer-

den. Da hier mit geringem Zeitaufwand eine gute Statistik erreicht werden kann, werden die Messungen am Transmissionselektronenmikroskop zur Beschreibung der Assemblykinetik genutzt. Die Messungen am Rasterkraftmikroskop werden zur Bestimmung der Persistenzlänge verwendet, da hier die mechanischen Eigenschaften der Filamente erhalten bleiben.

4.1.1 Assemblykinetik

Die Assemblykinetik der Keratin 8/18 Filamente ist von verschiedenen Parametern abhängig. Die Temperatur, die Polymerisationszeit und die Proteinkonzentration beeinflussen die Polymerisationsgeschwindigkeit und führen zu unterschiedlichen Ergebnissen für die Molmassenverteilung, siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.3. Die verschiedenen Werte für die drei Parameter sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Temperatur in °C	**Polymerisationszeit in s**	**Proteinkonzentration in mg/ml**
4	10	0,5
4	60	0,5
4	600	0,5
4	1200	0,5
22	10	0,5
22	60	0,5
22	600	0,5
22	1200	0,5
30	10	0,5
30	60	0,5
30	600	0,5
30	1200	0,5
37	10	0,5 / 0,1
37	60	0,5 / 0,1
37	300	0,5 / 0,1
37	600	0,5 / 0,1
37	1200	0,5 / 0,1

Tabelle 4.1: Variation der Parameter Polymerisationstemperatur, Assemblyzeit und Proteinkonzentration für die Assemblykinetik.



Abbildung 4.1: Beispiel für ein segmentiertes Filament im TEM-Bild zur Erstellung der Längenverteilungen, Messung von Thorsten Robel.

Unter Berücksichtigung der Parameter aus Tabelle 4.1 wurden Messungen am Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt. Aus den entstandenen Bildern konnten mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ [2] die Konturlängen der Filamente extrahiert werden. Dabei wurde jedes Filament mit einer segmentierten Linie nachgefahren, wie in Abbildung 4.1 dargestellt.

Die Länge der Linie kann mit Gleichung 4.1 in die Anzahl der enthaltenen ULFs umgerechnet werden [67]:

$$i = \frac{L - n}{m} + 1 \tag{4.1}$$

Die Umrechnung berücksichtigt, dass sich die gebundenen ULFs in einem Intermediärfilament überlappen. n ist die Länge eines freien ULFs mit $n = 58\,\text{nm}$ [33] und m ist die Länge eines gebundenen ULFs mit $m = 45,2\,\text{nm}$ [75]. Mit L, der Länge in nm, lässt sich daraus die Anzahl i der enthaltenen ULFs berechnen. Die entstehenden Verteilungen beschreiben also, wieviele Filamente unter den definierten Bedingungen eine bestimmt Anzahl ULFs enthalten.

In Kapitel 2, Abschnitt 2.3.1 wurde das Polymerisationsmodell nach Tomski und Portet vorgestellt, das die Assemblykinetik von Vimentin beschreibt [67]. Abbildung 4.2 zeigt das Tomski-Portet-Modell angewendet auf die Daten für eine

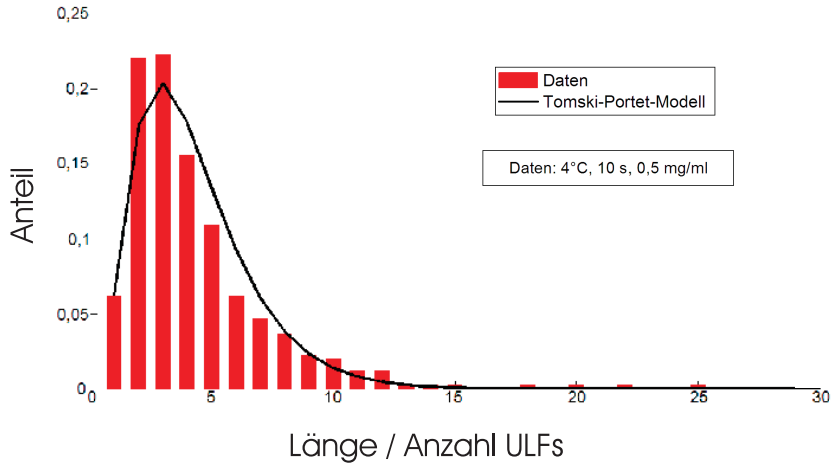


Abbildung 4.2: Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=4° C und t=10 s. Fit: Tomski-Portet Modell bei einer mittleren Filamentlänge von ungefähr vier ULFs.

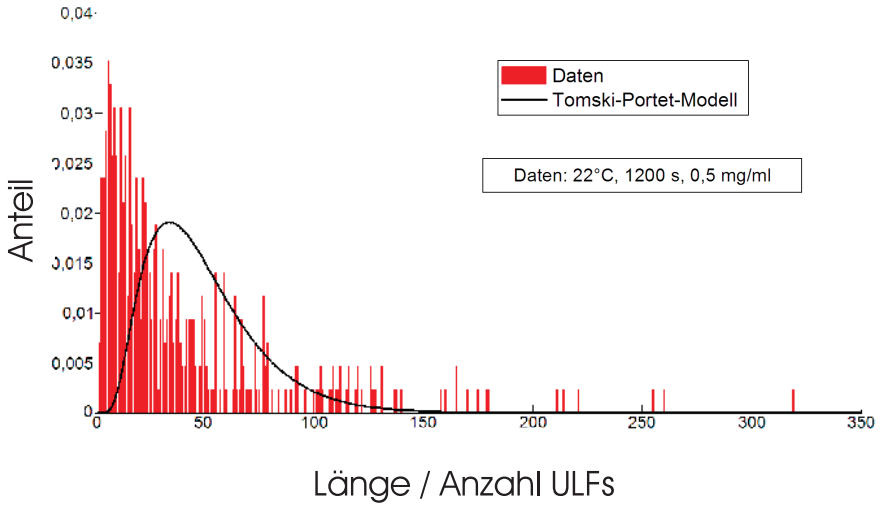


Abbildung 4.3: Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=22° C und t=1200 s. Fit: Tomski-Portet Modell bei einer mittleren Filamentlänge von ungefähr 35 ULFs.

Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml, einer Polymerisationszeit von 10 Sekunden und einer Temperatur von 4° C.

Fittet man das Modell auf die hier vorliegenden Datensätze zeigt sich, dass es für durchschnittliche Filamentlängen bis zu 9 ULFs, dies entspricht ungefähr einer Länge von 420 nm, angewendet werden kann. Für längere Filamente liegt keine Übereinstimmung mit den Daten vor, siehe Abbildung 4.3.

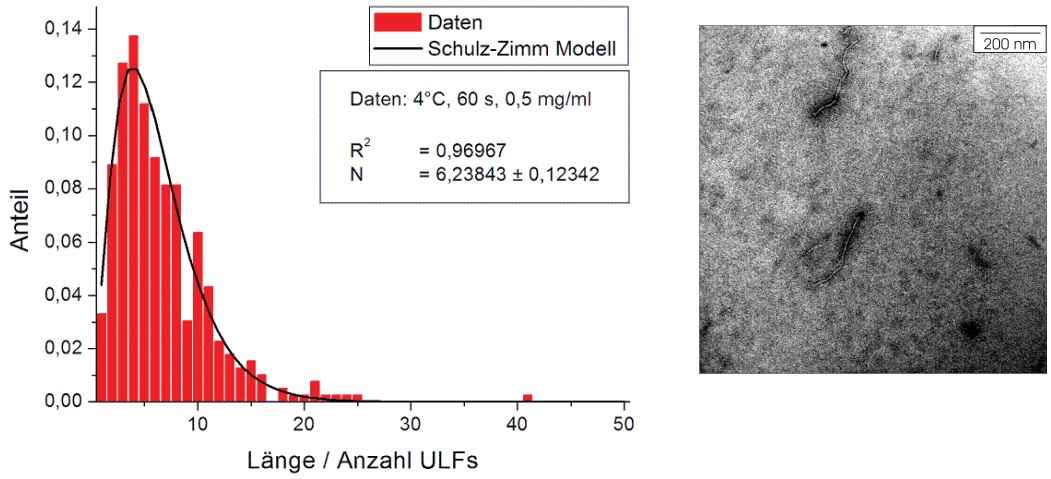


Abbildung 4.4: Links: Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=4° C und t=60 s, gefittet mit dem Schulz-Zimm-Modell, rechts: TEM-Bild für c=0,5 mg/ml, T=4° C und t=60 s.

Das Ergebnis lässt sich damit erklären, dass das Tomski-Portet-Modell die Filamente als starre Stäbe annimmt. Für Filamentlängen kleiner als die Persistenzlänge ist diese Annahme gerechtfertigt, während sie für längere Filamente zum Versagen des Modells führt. Keratin 8/18 Filamente haben eine Persistenlänge von ungefähr 420 nm, siehe Abschnitt 4.1.2, was einer Länge von ca. 9 ULFs entspricht. Das Tomski-Portet-Modell kann also nicht für Filamente, deren mittlere Filamentlänge größer als 9 ULFs ist, angewendet werden.

Kapitel 2, Abschnitt 2.3 enthält alternative Modelle der Polymerphysik für die Wachstumskinetik. Diese wurden in der Diplomarbeit von Ines Martin [56] an die Datensätze angepasst und analysiert. Dabei hat sich die Schulz-Zimm-Verteilung als das vielversprechendste Modell erwiesen. Im Folgenden werden einige beispielhafte Datensätze für eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml gezeigt und die Ergebnisse zusammengefasst. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in "Temperaturabhängige Eigenschaften von Keratin-Filamenten", Ines Martin, 2011 [56].

In Abbildung 4.4, 4.5 und 4.6 sind beispielhaft drei Verteilungen dargestellt. Bei niedrigen Temperaturen und kurzen Assembly-Zeiten, hier 4° C und 60 Sekunden, entstehen kurze reguläre Filamente, die keine Netzwerke bilden. Die mittlere Fila-

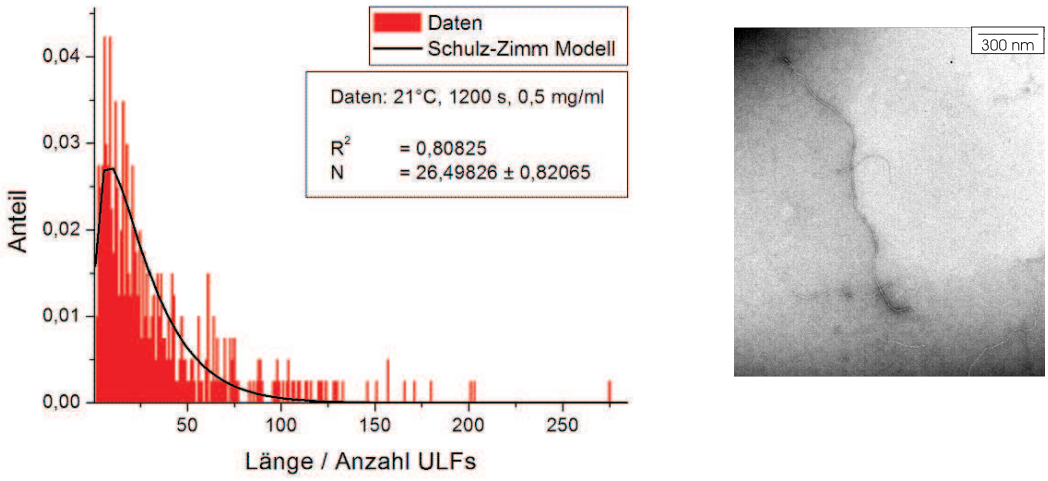


Abbildung 4.5: Links: Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=22° C und t=1200 s, gefittet mit dem Schulz-Zimm-Modell, rechts: TEM-Bild für c=0,5 mg/ml, T=21° C und t=1200 s.

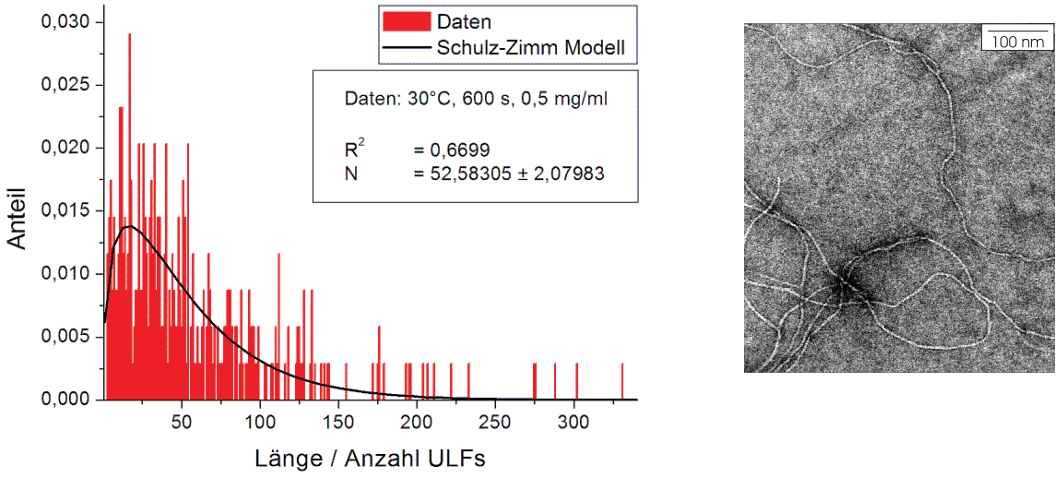


Abbildung 4.6: Links: Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=30° C und t=600 s, gefittet mit dem Schulz-Zimm-Modell, rechts: TEM-Bild für c=0,5 mg/ml, T=30° C und t=600 s.

mentlänge beträgt 6,3 ULFs, dies entspricht ca. 300 nm. In Abbildung 4.4 rechts im Bild ist ein beispielhaftes TEM-Bild mehrerer kurzer Filamente zu sehen. Polymerisieren die Filamente bei 21° C und einer Assembly-Zeit von 1200 Sekun-

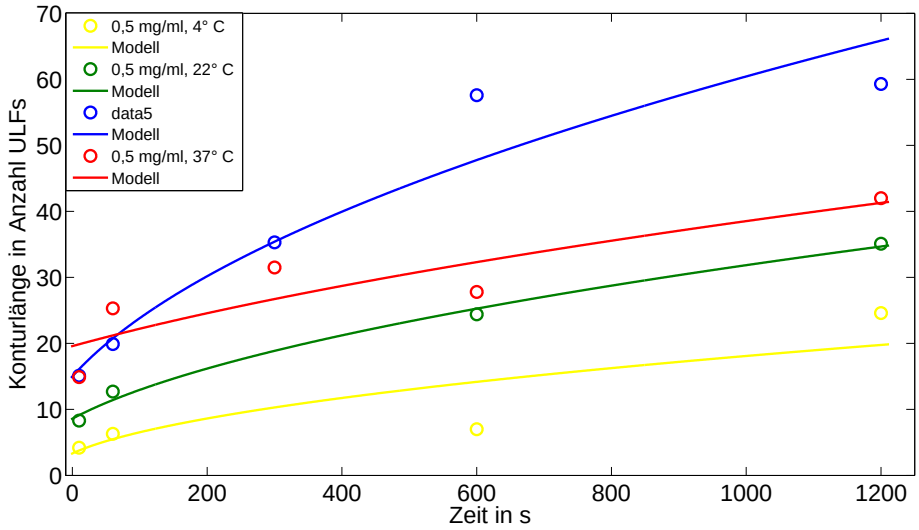


Abbildung 4.7: Längenwachstum für 0,5 mg/ml Proteinkonzetration und Polymerisationstemperaturen von 4° C, 22° C, 30° C und 37° C. Die Fits zeigen die Anpassung des Modells $L(t) = \sqrt{a \cdot t + b}$.

den, haben die Filamente eine mittlere Filamentlänge von 35,1 ULFs, ungefähr 1600 nm. In Abbildung 4.5 rechts im Bild ist ein TEM-Bild eines längeren Filaments zu sehen. Für höhere Temperaturen, wie 30° C und eine Assembly-Zeit von 600 Sekunden erhält man Filamente mit einer mittleren Filamentlänge von 57,6 ULFs, ca. 2600 nm, wie in Abbildung 4.6 rechts im TEM-Bild zu sehen ist. Die weiteren Ergebnisse für eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml sind in Tabelle 4.2 und Abbildung 4.7 zusammengefasst.

Zeit in s	10	60	300	600	1200
Temperatur					
4° C	4,2	6,3		7	24,6
22° C	8,3	12,7		24,4	35,1
30° C	15,1	19,9	35,3	57,6	59,3
37° C	14,9	25,3	31,5	27,8	42

Tabelle 4.2: Assemblykinetik für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration: mittlere Filamentlänge in Anzahl ULFs.

Wie erwartet wächst die mittlere Filamentlänge bei konstanter Temperatur mit der Polymerisationszeit und andersrum bei konstanter Zeit mit steigender Temperatur. Je länger die Polymerisationszeit ist, desto länger werden die Filamente.

In Abbildung 4.7 ist für alle Temperaturen ein Übergang in die Sättigung zu sehen. Das in Kapitel 2, Abschnitt 2.3.1 beschriebene Modell für die Änderung der mittleren Filamentlänge mit der Polymerisationszeit beschreibt einen Verlauf mit der Quadratwurzel aus der Zeit t. In Abbildung 4.7 zeigen die Fits einer Funktion der Form $L(t) = \sqrt{a \cdot t + b}$, dass die gemessenen Daten dem vorhergesagten Modellverlauf folgen. In Tabelle 4.3 sind die Fitparameter a und b zusammengefasst. Der Parameter b stellt hier das Quadrat der Anfangslänge zum Zeitpunkt t=0 dar.

Fitparameter	a	b	$\sqrt{b}$
Temperatur			
22° C	0,9698	78,56	8,8
30° C	1,851	65,65	8,1
37° C	1,049	348,7	18,7

Tabelle 4.3: Fitparameter für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration und verschiedene Polymerisationstemperaturen. Modell: $L(t) = \sqrt{a \cdot t + b}$.

Das Modell lässt jedoch außer acht, dass für das tatsächliche Experiment kein unendliches Reservoir an Dimeren zur Verfügung steht. Der Verlauf mit $\sqrt{t + c}$ geht für unendliche Polymerisationszeiten gegen unendlich, während das Assembly gegen einen Grenzwert konvergieren muss, da nur eine endliche Anzahl Dimere vorhanden ist. Außerdem sagt das Modell für t=0 eine endliche Länge der Polymere voraus, die der Wurzel aus der Konstanten b entspricht. Die Anpassung an die Daten zeigt, dass mit dem Modell für t=0 Filamentlängen berechnet werden, die so experimentell nicht möglich sind. Für 22° C beträgt die Anfangslänge ca. 9 ULFs, für 30° C ungefähr 8 ULFS und für 37° C sagt der Fit sogar eine Anfangslänge von ungefähr 19 ULFs voraus. Dies widerspricht der Annahme, dass beim Start der Polymerisation nur Dimere und Tetramere vorliegen.
Um für lange Polymerisationszeiten einen Grenzwert zu bestimmen, wurde an die Ergebnisse für die mittlere Filamentlänge eine Funktion mit exponentieller Sättigung angepasst.

Die Fits in Abbildung 4.8 zeigen eine exponentielle Annäherung der Form $L(x) = a \cdot exp(-b \cdot x) + c$. Die Parameter sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Der Parameter c ist die Sättigungsgrenze, die hier der maximalen Filamentlänge für lange Polymerisationszeiten in Anzahl ULFs entspricht. Für eine Temperatur von 22° C beträgt die Grenzlänge ca. 56 ULFs, für eine Temperatur von 30° C ungefähr 64

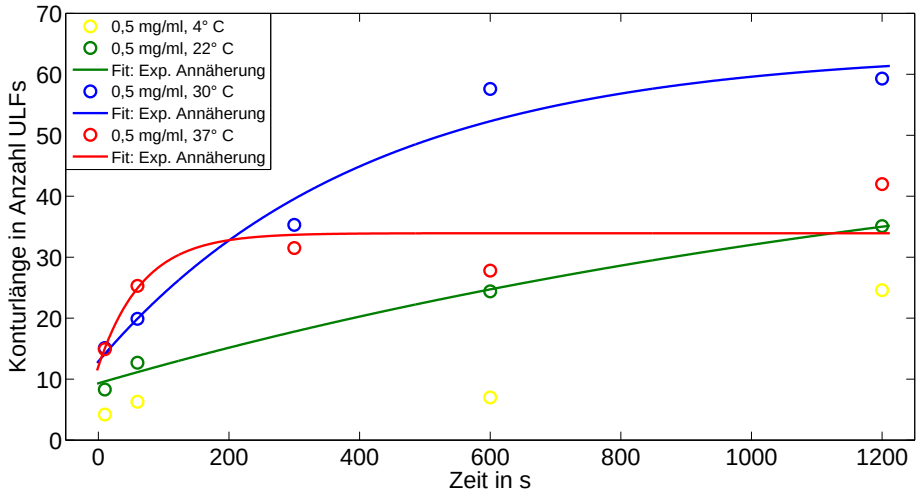


Abbildung 4.8: Längenwachstum für 0,5 mg/ml Proteinkonzetration und Polymerisationstemperaturen von 4° C, 22° C, 30° C und 37° C. Die Fits zeigen die Anpassung einer exponentiellen Annäherung der Form $L(t) = a \cdot exp(-b \cdot t) + c$.

ULFs. Bei einer Temperatur von 37° C beträgt die Grenzlänge ca. 30 ULFs und es ist kein schlüssiger Verlauf mehr erkennbar, da die mittlere Filamentlänge für längere Polymerisationszeiten sinkt. Die Ursache liegt in der Probenpräparation und der angewandten Messmethode. Vor allem längere Filamente bilden Netzwerke oder liegen in Knäueln vor. Zum einen ist es schwierig in dichten Knäueln die Filamente von Anfang bis Ende nachzuverfolgen, zum anderen werden Filamentverbände während der verschiedenen Präparationsschritte leichter von der Oberfläche gespült, siehe Problembetrachtung am Ende des Abschnitts. Dieser Effekt verfälscht die Längenmessung hin zu kürzeren Längen, da hauptsächlich lange Filamente von der Probenoberfläche abgespült werden oder nicht nachgefahren werden können.

Fitparameter	a	b	c
Temperatur			
22° C	-46,34	0,0006734	55,66
30° C	-51,06	0,002462	63,95
37° C	-21,88	0,01477	33,93

Tabelle 4.4: Fitparameter für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration und verschiedene Polymerisationstemperaturen. Modell: $L(t) = a \cdot exp(-b \cdot t) + c$.

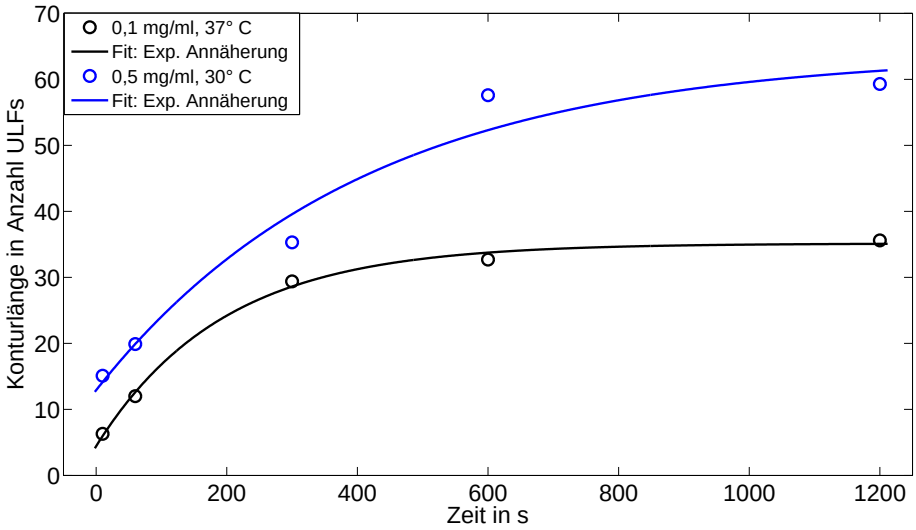


Abbildung 4.9: Längenwachstum für 0,1 mg/ml Proteinkonzetration und 37° C Polymerisationstemperatur im Vergleich zu 0,5 mg/ml Proteinkonzentration und 37° C Polymerisationstemperatur. Die Fits zeigen die Anpassung einer exponentiellen Annäherung der Form $L(t) = a \cdot exp(-b \cdot t) + c$.

Um zu klären, ob auch der Sättigungseffekt bei den anderen Polymerisationstemperaturen auf diesen Messfehler zurückzuführen ist, wurden zusätzliche Messungen bei einer um den Faktor fünf niedrigeren Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml gemacht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 und Abbildung 4.9 zusammengefasst. Die Daten wurden auch hier mit der exponentiellen Annäherung gefittet. Tabelle 4.6 zeigt die Fitparameter. Auch hier tritt ein Sättigungseffekt gegen eine Grenzlänge von ca. 36 ULFs auf.

Zeit in s	10	60	300	600	1200
Temperatur					
37° C	6,3	12	29,4	32,7	35,6

Tabelle 4.5: Assemblykinetik für 0,1 mg/ml Proteinkonzentration: mittlere Filamentlänge in Anzahl ULFs.

Vergleicht man die Assemblykinetiken für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration bei 30° C und 0,1 mg/ml Proteinkonzentration bei 37° C zeigt sich ein ähnlicher Sättigungseffekt gegen zwei unterschiedliche Grenzwerte, siehe Abbildung 4.9. Dies deutet darauf hin, dass der Sättigungseffekt nicht durch ein allgemeines Artefakt bei der Probenpräparation oder Messung entsteht, sondern tatsächlich vorhan-

Fitparameter	a	b	c
Temperatur			
37° C	-30,72	0,005162	35,14

Tabelle 4.6: Fitparameter für 0,1 mg/ml Proteinkonzentration und 37° C Polymerisationstemperatur. Modell: $L(t) = a \cdot exp(-b \cdot t) + c$.

den ist. Er kann damit erklärt werden, dass mit zunehmender Filamentlänge die Anzahl der reaktiven Enden abnimmt und so die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen, ebenso abnimmt [67]. Weiter entstehen bei höheren Proteinkonzentrationen und längeren Polymerisationszeiten dichte Netzwerke, sodass die einzelnen Filamente in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden (siehe Gel-Punkt und Problembetrachtung am Ende dieses Abschnitts). Dadurch verringert sich die Wachstumsgeschwindigkeit solange, bis die Wahrscheinlichkeit, dass sich die verbliebenen Enden noch treffen, gegen null geht.
Je höher die Temperatur ist, desto größer ist die thermische Energie der Filamente und damit auch die Brownsche Molekularbewegung, sodass die Filamentlänge bei der höheren Temperatur von 37° C auch einem höheren Grenzwert zustrebt. Weiter ist bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml die fünffache Anzahl von Dimeren vorhanden. Damit ist die Zahl der reaktiven Enden und so die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen, höher. Dies erklärt, dass bei der Proteinkonzentration c=0,5 mg/ml schon bei einer Polymerisationstemperatur von 30° C mit ungefähr 64 ULFs eine höhere Grenzlänge als bei der Proteinkonzentration c=0,1 mg/ml und der Polymerisationstemperatur von 37° C mit ungefähr 36 ULFs erreicht wird.

Gel-Punkt

Zusätzlich hat bei der Probenpräparation bei höheren Temperaturen und langen Polymerisationszeiten ein Wechsel des Assemblys in den Gelzustand stattgefunden. Das Volumen im Reaktionsgefäß bildet eine zusammenhängende, transparente, gelartige Masse, siehe Tabelle 4.7.

Bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml hat bereits bei einer Temperatur von 30° C und einer Assemblyzeit von 1200 Sekunden die Gelierung eingesetzt. In Abbildung 4.10 sind zwei TEM-Bilder der Gele zu sehen. Die Filamente bilden ein dichtes Netzwerk, in dem es nur schwer möglich ist, einzelne Filamente

Zeit in s	10	60	300	600	1200
Temperatur					
4° C					
22° C					
30° C					X
37° C			X	X	X

Tabelle 4.7: Auftreten von Gelierung bei der Probenpräparation, Proteinkonzentration 0,5 mg/ml.

nachzuverfolgen. Zusätzlich ist eine Bündelung der Filamente zu beobachten.

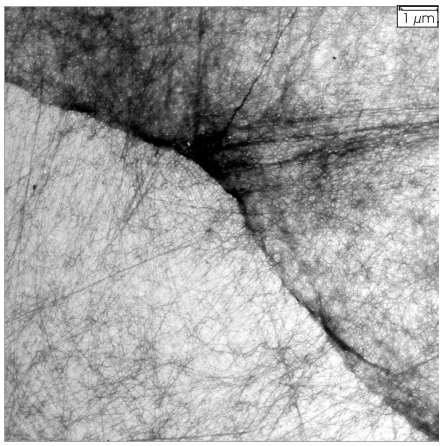


Abbildung 4.10: TEM-Bild eines Keratin Gels.

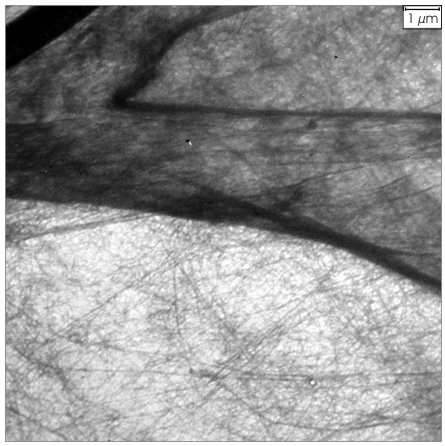


Abbildung 4.11: TEM-Bild eines Keratin Gels mit Bündelbildung.

Bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml wurde keine Gelierung beobachtet.

Die nanomechanischen Eigenschaften der Keratin 8/18 Gele werden ausführlich in Abschnitt 4.2 beschrieben.

Massenverteilung

Eine andere mögliche Darstellung ist die Massenverteilung. Dabei wird nicht nur die Anzahl der Filamente mit einer bestimmten Anzahl ULFs berücksichtigt, sondern auch, wieviel Proteinmasse anteilig in den Filamenten einer bestimmten Länge gebunden ist. Diese Darstellung berücksichtigt, dass lange Filamente zwar nur selten vorkommen, jedoch auch schon ein langes Filament einen großen Anteil der gesamten Proteinmenge enthält.

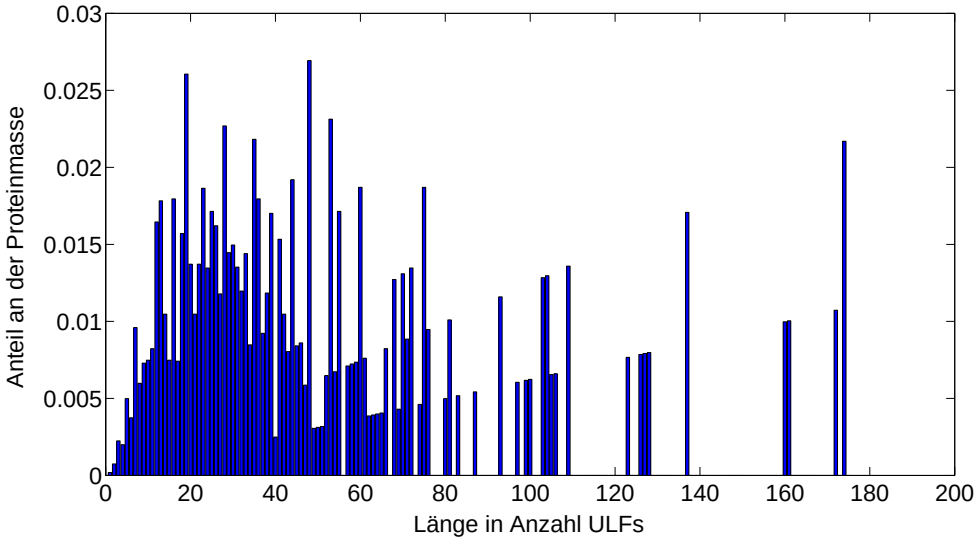


Abbildung 4.12: Massengewichtungfür 37° C Polymerisationstemperatur, 5 min Polymerisationszeit und 0,1 mg/ml Proteinkonzentration.

Abbildung 4.12 zeigt die Massenverteilung in Anzahl ULFs für eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml, eine Polymerisationszeit von 5 Minuten und eine Temperatur von 37° C. Diese Verteilung zeigt zwei signifikante Merkmale: Einen Häufigkeitspeak bei ungefähr 30 ULFs und drei Anstiege hin zu langen ULFs ab einer Länge von ca. 40 ULFs. Der berechnete Massenmittelwert liegt bei 91,7 ULFs. Dieser liegt ungefähr um einen Faktor drei höher als der in Tabelle 4.5 berechnete Mittelwert der Filamentlängen. Längere Filamente sind oft nur selten (ein- bis dreimal) zu finden. Durch die nahezu lineare Zunahme der Längen durch jedes zusätzliche ULF, siehe Gleichung 4.1, lassen sich die drei linearen Anstiege erklären. Die Massendarstellung zeigt, dass der Massenmittelwert nicht mit dem Längenmittelwert übereinstimmt. Die Häufigkeitsdarstellung der Filamentlängen ist jedoch anschaulicher und daher weiter verbreitet.

Problembetrachtung

Für die gemessenen Längen wird ein Fehler von ca. 10 % angenommen, da es schwierig ist einen genauen Fehlerwert anzugeben. Mehrere Faktoren spielen hier eine Rolle. Die Auflösung der Bilder beträgt zwischen 0,3 Pixel/nm und 1 Pixel/nm. Nimmt man beim Nachzeichnen der Konturlänge einen maximalen Fehler von ± 3 Pixel an beiden Enden des Filaments an, so ergibt sich ein maximaler Fehler

für die Länge von $\pm 6\,\mathrm{nm}$. Dieser Fehler fällt bei einer sehr selten auftretenden Mindestlänge von einem ULF der Länge 58 nm nicht stark ins Gewicht. Ein größerer Beitrag entsteht durch die systematischen Fehler. Zum einen können die Konturen der Filamente nie ganz exakt nachgefahren werden, da es nicht immer eindeutig ist, wo ein Filament beginnt oder aufhört. Dies ist vor allem in schlecht kontrastierten Bildern der Fall. Um dieses Problem zu umgehen, kann man nur Stellen mit gutem Negativkontrast auswerten und trifft dabei eine Vorauswahl, die möglicherweise das Ergebniss verfälscht. Zusätzlich bilden vor allem lange Filamente oft Knäueln oder dichte Netzwerke, in denen es nicht oder nur sehr schwer möglich ist, ein Filament zu verfolgen. Dadurch besteht generell die Möglichkeit, dass die gemessenen mittleren Filamentlängen hin zu kürzeren Werten verschoben sind.

4.1.2 Berechnung der Persistenzlänge

In diesem Abschnitt wird aus zweidimensionalen AFM-Bildern die Persistenzlänge berechnet. Dabei wird angenommen, dass die Keratin 8/18 Intermediärfilamente auf der Glimmeroberfläche vollständig äquilibriert sind, siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.3.2. Diese Annahme ist berechtigt, da die Konformation der Filamente auf der Oberfläche eher gestreckt ist und keine Schlaufen auftreten. Aktuelle Untersuchungen anderer Intermediärfilament-Proteine [61] haben ergeben, dass sich Desmin, im Gegensatz zu Vimentin [65], auch auf Glimmer äquilibrieren kann. Bei diesen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass äquilibrierte Filamente, wie es zu erwarten ist, eher gestreckte Konfigurationen annehmen und nicht in Schlaufen vorliegen. Auch die durchgeführten Monte-Carlo-Simulationen [62] bestätigen, dass für andere Intermediärfilamentproteine, wie Vimentin und Desmin, beide Extreme, vollständig äquilibriert und "gefangen", beobachtbar sind. Diese Ergebnisse und das Aussehen der ausgewählten Keratin-Intermediärfilamente spricht dafür, dass sich diese auf der Glimmeroberfläche energetisch im Gleichgewicht befinden.

Zur Berechnung der Persistenzlänge müssen aus den Bildern Filamente ausgewählt werden, die mindestens ein freies Ende haben. Das bedeutet, dass zwei sich überkreuzende Filamente nicht in ihrer ganzen Länge ausgewertet werden können, sondern in vier Filamente aufgeteilt werden müssen, die jeweils ein freies

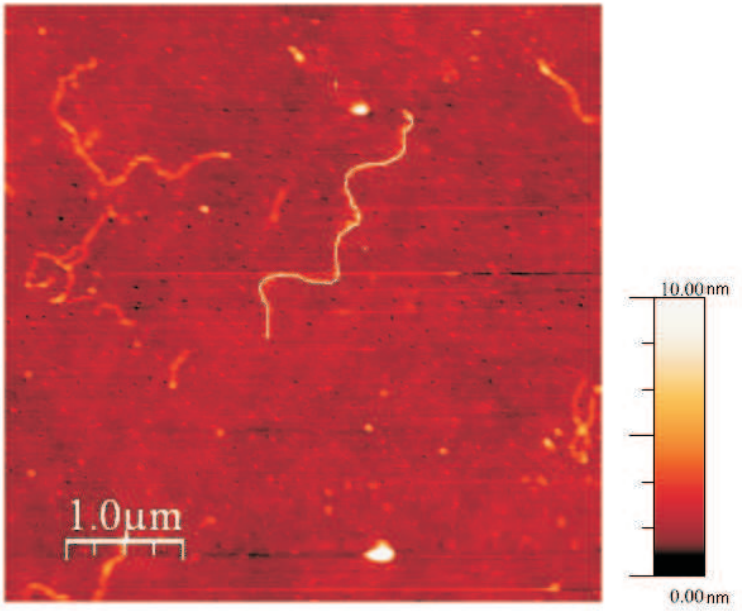


Abbildung 4.13: Nachgezeichnete Filamentkonturen in einem AFM-Bild zur Bestimmung der Persistenzlänge.

und ein festes Ende haben. Das gleiche gilt für Filamente, die aus verknäulten Ansammlungen heraus auf der Oberfläche liegen. Nur ausgehend von einem freien Ende ist die Annahme, dass die Filamente auf der Oberfläche vollständig äquilibriert sind, gerechtfertigt. In dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ [2] werden die Pixel auf Nanometer skaliert, die Konturen der Filamente nachgefahren und ihre XY-Koordinaten einzeln gespeichert, siehe Abbildung 4.13.

Für die Auswertung wurden insgesamt 500 Filamente verschiedener Konturlängen nachgezeichnet. Dieser Datensatz wurde mit Thetascan 1.0, entwickelt von Norbert Mücke [65], bearbeitet.

Wie in Kapitel 3, Abschnitt 3.4.4 beschrieben, wurden die Filamente auf zwei verschiedenen Oberflächen, gereinigtes Glas und frisch gespaltener Glimmer, präpariert. Für die beiden Oberflächen ergeben sich zwei leicht unterschiedliche Ergebnisse. Die Berechnung für Keratin 8/18 Filamente, abgesetzt auf einer gereinigten Glasoberfläche, ergibt eine Persistenlänge von $L_P = 390\,\text{nm}$. Für die Keratin 8/18 Filamente, abgesetzt auf frisch gespaltenem Glimmer, ergibt sich ein Wert für die Persistenzlänge von $L_P = 440\,\text{nm}$. Der Fehler der berechneten Werte lässt sich

nicht exakt bestimmen. Die größte Ungenauigkeit entsteht durch das Nachfahren der Filamente. Hier spielt auch die Auflösung der AFM-Bilder eine Rolle. Im Mittel soll im Folgenden also eine Persistenzlänge für Keratin 8/18 Filamente von $L_P = 420\,nm \pm 50\,nm$ angenommen werden.
Vergleicht man die Ergebnisse mit Werten aus der Literatur für andere Intermediärfilamentproteine, muss man auch hier die Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Filamenten und der Oberfläche beachten. Zum Beispiel bildet Vimentin auf einer Glimmeroberfläche sehr kompakte Strukturen [65]. Die Filamente formen Schlaufen und liegen in Kurven übereinander. Das deutet daraufhin, dass die Filamente nicht vollständig äquilibriert sind, sondern von der Glimmeroberfläche "eingefangen" wurden. Dadurch ergibt sich für die Persistenzlänge von Vimentin Filamenten auf einer Glimmeroberfläche, unter der Annahme, dass die Filamente äquilibriert sind, gemäß der Formel 2.42 ein Wert von 358 nm [65]. Im Vergleich dazu wurde auf einer Glasoberfläche ein sehr viel höherer Wert von 1107 nm berechnet [65]. Dies deutet daraufhin, dass die Annahme, die Vimentinfilamente seien auf Glimmer äquilibriert, falsch ist [65]. Desmin hingegen kann sowohl auf einer Glimmeroberfläche als auch auf einer Glasoberfläche vollständig äquilibrieren [61].
Der hier errechnete Mittelwert für die Persistenzlänge von Keratin 8/18 Intermediärfilamenten auf zwei verschiedenen Oberflächen von $420\,nm \pm 50\,nm$ liegt in der selben Größenordnung wie die Werte für andere Intermediärfilamentproteine, wie zum Beispiel Desmin [61], ist jedoch um ca. einen Faktor 3 niedriger als der für Vimentin [62]. Die Differenz lässt sich damit erklären, dass Keratin 8/18 Intermediärfilamente im Mittel nur 16 oder 21 Moleküle pro Querschnitt [36] haben, wohingegen Vimentin Filamente 30 und 37 Moleküle pro Querschnitt [36] aufweisen.

Bestimmung der Dimeranordnung mit Hilfe der Persistenzlänge

Aus der Persistenzlänge lassen sich Schlussfolgerungen ziehen, ob es sich bei den Filamenten um eine unflexible Anordnung der Dimere oder um lose Bündel handelt [61]. Dabei kann ausgehend von der Persisstenzlänge eines Dimers mit Hilfe des Flächenträgheitsmoments und Gleichung 2.34 aus Kapitel 2, Abschnitt 2.3.2 eine Bandbreite der Persistenzlänge des ausgewachsenen Filaments jeweils für die flexible und für die starre Anordnung berechnte werden.

Uyeda et al. bestimmten die Persistenzlänge eines α-helikalen Coiled-Coils auf 15-100 nm mit einem Radius von 1 nm [78], [73]. Bei einer Anordnung von 16 Monomeren im Querschnitt, das heißt 8 Dimeren, wäre der minimale Radius einer kompakten Anordnung ungefähr 3 nm. Bei einer festen Anordnung der Untereinheiten können diese nicht aneinander vorbeigleiten und es muss mit Gleichung 4.2 ein gemeinsames Flächenträgheitsmoment berechnet werden.

$$I = \frac{\pi}{4} R^4 \tag{4.2}$$

Im anderen Fall können die Dimere aneinander vorbeigleiten, sodass erst für jedes Dimer das Flächenträgheitsmoment berechnet und dann aufsummiert wird. Diese beiden Möglichkeiten ergeben eine minimale Persitenzlänge zwischen 120 nm und 800 nm für die bewegliche Anordnung und eine maximale Persistenzlänge zischen 1220 nm und 8100 nm für die starre Anordnung. Die experimentell ermittelte Persistenzlänge von 420 nm $\pm$ 50 nm liegt im Bereich zwischen 120 nm und 800 nm der starren Anordnung und weist darauf hin, dass die Dimere in einem Filament flexibel angeordnet sind und sich gegeneinander verschieben können.

Änderung der Persistenzlänge in Abhängigkeit von der Konturlänge

Der oben beschriebene Mittelwert ist aus einem Datensatz berechnet, der Konturlängen zwischen 1000 nm und 4000 nm enthält. Dies wurde durch unterschiedliche Polymerisationszeiten und Proteinkonzentrationen erreicht. Betrachtet man jedoch die Persistenzlänge in Abhängigkeit von der Konturlänge, zeigt sich, dass der errechnete Wert nicht konstant ist.

L_C **in nm**	$1000 \leq L_C < 2000$	$2000 \leq L_C < 3000$	$3000 \leq L_C \leq 4000$
L_P **in nm, Glas**	370	420	470
L_P **in nm, Glimmer**	430	410	500

Tabelle 4.8: Persistenzlänge L_P in Abhängigkeit von der Konturlänge L_C.

Tabelle 4.8 zeigt die Abhängigkeit der berechneten Persistenzlänge von der Konturlänge. Je länger die Konturlänge ist, desto höher ist der Wert für die berechnete Persistenzlänge. Eigentlich sollte die Persistenzlänge nicht längenabhängig sein. Diese Materialeigenschaft hängt zwar von der Dicke des Filaments, aber nicht von dessen Länge ab. Für die Abweichung gibt es zwei mögliche Erklärungen:

Zum einen ist es bei längeren Filamenten schwieriger die Konturen im Bildbearbeitungsprogramm zu verfolgen. Je länger die Filamente sind, desto größer ist der Bildausschnitt und desto schlechter ist die Auflösung des Bildes. Möglicherweise werden dadurch feinere Konturverläufe übergangen und die gröbere Kontur führt zu einer größeren berechneten Persistenzlänge. Zum anderen ist es möglich, dass die Annahme, dass die Filamente auf der Oberfläche thermisch im Gleichgewicht sind, für längere Filamente nicht mehr gerechtfertigt ist. Je länger die Filamente sind, desto mehr Energie brauchen sie, damit sie sich auf der Oberfläche äquilibrieren können. Bei längeren Filamenten kann es also, vielleicht auch abhängig von der Adsorptionszeit, vorkommen, dass die Filamente nur partiell äquilibriert sind und so nur eine scheinbare Persistenzlänge berechnet wird.

Änderung der Persistenzlänge in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration

Die physiologisch relevante Ionenkonzentration, wie sie in der Zelle vorkommt, liegt bei ca. 400 mM. Wie in Kapitel 2, Abschnitt 2.3.2 beschrieben, beeinflusst die Ionenkonzentration in der Umgebung durch die Manning-Kondensation der Gegenionen die Persistenzlänge der Filamente. Daher ist es sinnvoll zu überprüfen, wie sich der Wert für die Persistenzlänge in physiologischen Umgebungsbedingungen verändert. Dies soll theoretisch auf Grundlage der oben beschriebenen Gleichungen und experimentell durch die Zugabe von $MgCl_2$ während der Polymerisation erfolgen.

Im Folgenden soll der Effekt auf die Persistenzlänge am Beispiel der Zellumgebung überprüft werden [71]. In der Zelle herrscht eine durchschnittliche Ionenkonzentration von $c_{\mathrm{Ion}} = 400\,\mathrm{mM}$, damit ist die Debye-Länge $\kappa^{-1} \sim 1\,\mathrm{nm}$. Unter Standardbedingungen, 25° C und $\epsilon = 80$ ist die Bijerrum-Länge $l_B = 78\,\mathrm{nm}$. Mit Gleichung 2.44 und Gleichung 2.45 ergibt sich für eine Ionenkonzentration (mit $\kappa^{-1} \sim 1\,\mathrm{nm}$) ein elektrostatischer Beitrag zur Persistenzlänge in Höhe von $L_{P,el} = 1,2 \cdot 10^{-15}\,\mathrm{m}$. Dieser Wert ist vernachlässigbar klein und kann mit der vorliegenden Messmethode aus Kapitel 2, Abschnitt 2.3.2 nicht festgestellt werden, so dass für die experimentellen Daten keine Änderung erwartet wird. Abbildung 4.14 zeigt den Fit der Gleichung 2.42 an die Daten für die Konturlänge.

Experimentell ergibt sich also für die Persistenzlänge bei einer Magnesiumchloridkonzentration von 0,5 mM $MgCl_2$ ein Wert von L_p=440 nm. Dieser liegt im

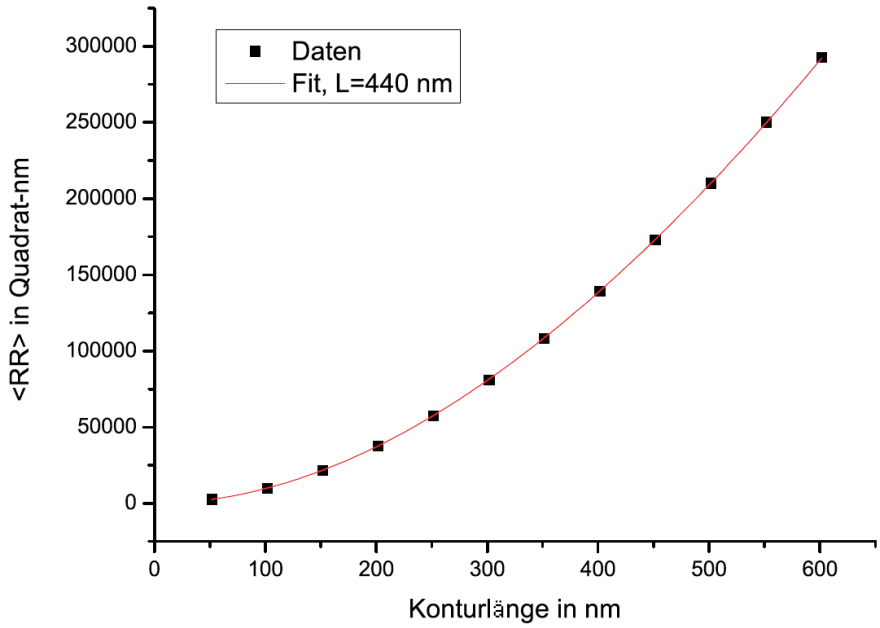


Abbildung 4.14: Persistenzlänge bei 0,5 mM $MgCl_2$: Fit des Zusammenhangs zwischen mittlerem quadratischem End-zu-End-Abstandes und Konturlänge.

Bereich des Ergebnisses ohne Magnesiumchlorid von L_p=420 ± 50 nm. Das Ergebnis stimmt mit dem oben theoretisch berechneten vernachlässigbaren Effekt für die Manning-Kondensation überein.

4.1.3 Diskussion

In den vorhergehenden beiden Abschnitten wurden die Eigenschaften von Keratin 8/18 Filamenten auf der Einzelfilamentebene untersucht. Dabei wurde sowohl die Polymerisationskinetik analysiert, als auch im Bereich der mechanischen Eigenschaften die Persistenzlänge bestimmt.

Bei der Analyse der Assemblykinetik hat sich gezeigt, dass die Geometrie der Filamente bei der Assemblierung eine entscheidende Rolle spielt. Das Tomski-Portet-Modell, welches die Filamente als starre Stäbe annimmt, fittet die Daten nur bis zu einer mittleren Filamentlänge, welche kleiner ist als die Persistenzlänge von ungefähr 420 nm. Für längere Filamente ist diese Annahme nicht mehr gerechtfertigt und führt zum Versagen des Tomski-Portet-Modells. Die Anpassung

alternativer Polymerisationsmodelle hat gezeigt, dass die Daten am besten durch die Molmassenverteilung nach Schulz-Zimm beschrieben werden. Dieses Modell trifft keine Annahmen über die Geometrie der Filamente, sondern setzt nur eine Poisson-verteilte Ankunftswahrscheinlichkeit voraus. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Filamentenden binden, ist also ein zufälliges und voneinander unabhängiges Ereignis.

Die mittlere Filamentlänge wächst mit steigenden Temperaturen und steigenden Polymerisationszeiten. Betrachtet man den Verlauf für die vier konstanten Temperaturen, entspricht dieser dem vorhergesagten Quadratwurzelverhalten aus Kapitel 2, Abschnitt 2.3.1. Je länger die Polymerisationszeit ist, desto länger ist die mittlere Filamentlänge. Die Anpassung des Modells von P. Flory der Form $L(t) = \sqrt{a \cdot t + b}$ zeigt, dass die Daten dem Modellverlauf zwar grundsätzlich folgen, aber nicht alle Annahmen des Modells mit den experimentellen Bedingungen übereinstimmen. Im Gegensatz zu der Modellannahme stehen beim Assembly keine unbegrenzte Anzahl an Grundbausteinen für die Polymerisation zur Verfügung. Die Proteinkonzentration und das Volumen sind festgelegt und damit ist nur eine begrenzte Anzahl Dimere vorhanden. Daraus folgt, dass die mittlere Filamentlänge auch für lange Polymerisationszeiten nicht wie $\sqrt{x}$ gegen unendlich gehen kann. Die theoretisch maximale Filamentlänge entspricht einer Polymerkette, in der alle Dimere verbaut sind. Außerdem sagt das Modell für den Zeitpunkt t=0 eine endliche Filamentlänge $L_0 = \sqrt{b}$ voraus. Die Anpassung an die Daten zeigt hier Werte in einer Größenordnung von mehreren ULFs, die sich abhängig von der Polymerisationstemperatur unterscheiden. Dies ist experimentell nicht realisierbar, da für t=0 nur einzelne Dimere und Tetramere vorhanden sind. Außerdem hat die Polymerisationstemperatur keinen Einfluss auf die Länge der Untereinheiten beim Start der Polymerisation.
Um für lange Polymerisationszeiten einen Grenzwert für die mittlere Filamentlänge zu bestimmen, wurde an die Daten eine exponentielle Sättigung der Form $L(t) = a \cdot exp(-b \cdot t) + c$ gefittet. Hier entspricht die Sättigungsgrenze c der mittleren Filamentlänge für lange Polymerisationszeiten in Anzahl ULFs. Bei einer Polymerisationstemperatur von 22° C beträgt die Grenzlänge ungefähr 56 ULFs und steigt für eine Temperatur von 30° C auf ca. 64 ULFs. Bei einer Temperatur von 37° C ergibt sich jedoch wieder eine niedrigere Grenzlänge von ca. 30 ULFs. Da erwartet wird, dass die mittlere Filamentlänge für längere Polymerisa-

tionszeiten und höhere Polymerisationstemperaturen wächst, wird hier von einem Messartefakt ausgegangen. Vor allem längere Filamente bilden dichte Netzwerke oder liegen in Schlaufen und Knäueln vor. Deshalb ist es möglich, dass die Filamentverbände während der verschiedenen Waschschritte der Probenpräparation leichter von der Oberfläche gespült werden. Außerdem ist es schwierig in dichten Knäueln die Filamente von Anfang bis Ende nachzuverfolgen. Dieser Effekt verfälscht die Längenmessung hin zu kürzeren Längen, da hauptsächlich lange Filamente von der Probenoberfläche abgespült werden oder nicht nachgefahren werden können.
Um auszuschließen, dass der Sättigungseffekt allgemein ein Artefakt der Probenpräparation ist, wurden die Messungen bei einer niedrigeren Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml und einer Polymerisationstemperatur von 37° C wiederholt. Auch hier wurden die Daten mit einer exponentiellen Annäherung gefittet und ein Sättigungseffekt gegen eine Grenzlänge von ca. 35 ULFs festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass der Sättigungseffekt nicht durch ein allgemeines Artefakt bei der Probenpräparation oder Messung entsteht, sondern tatsächlich vorhanden ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass mit zunehmender Filamentlänge die Anzahl der reaktiven Enden kleiner wird und so die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen, ebenso abnimmt [67]. Somit verringert sich die Polymerisationsgeschwindigkeit solange, bis die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei verbliebene Enden treffen, gegen Null geht. Die unterschiedlichen Grenzlängen lassen sich damit erklären, dass die Filamente bei einer höheren Temperatur eine höhere thermische Energie besitzen und damit auch die Brownsche Molekularbewegung größer ist. Dadurch haben die Filamentenden einen größeren Bewegungsradius und auch eine größere Wahrscheinlichkeit ein anderes Ende zu treffen. Weiter entstehen bei hohen Temperaturen und langen Polymerisationszeiten dichte Netzwerke, sodass sich die einzelnen Filamente gegenseitig in ihrer Beweglichkeit enschränken [20]. Dieser Effekt ist auch bei der Gelierung und in der Problembetrachtung am Ende dieses Abschnitts beschrieben. Dadurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen immer weiter und die Wachstumsgeschwindigkeit geht gegen Null. Die theoretische Vorstellung von einem einzigen Filament, in dem alle Dimere enthalten sind, wird also nicht erfüllt werden.
Bei der fünffachen Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml sind außerdem fünfmal so viele Dimere vorhanden. Die Zahl der reaktiven Enden und dadurch auch die

Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen, ist also höher. Dies erklärt, dass bei der höheren Proteinkonzentration schon bei einer Polymerisationstemperatur von 30° C eine höhere Grenzlänge von ungefähr 64 ULFs erreicht wird, als bei der Proteinkonzentration c=0,1 mg/ml und der Polymerisationstemperatur von 37° C mit ungefähr 35 ULFs.

Eine alternative Darstellung zur Längenverteilung ist die Massenverteilung. Die Massenverteilung macht deutlich, dass für längere Polymerisationszeiten immer häufiger längere Filamenten vorkommen. Dabei wird berücksichtigt, dass diese langen Filamente einen großen Anteil der Proteinmasse enthalten.

Wie bereits beschrieben, enstehen bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml, hohen Polymerisationstemperaturen und langen Polymerisationszeiten dichte, verschlaufte Netzwerke. Dabei findet während der Polymerisation ein Wechsel des Assemblys in den Gelzustand statt. Das Volumen im Reaktionsgefäß bildet eine zusammenhängende, transparente, gelartige Masse. Für eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml wurde zwischen einer Polymerisationszeit von 600 Sekunden und 1200 Sekunden und der Polymerisationstemperatur von 30° C der Gelpunkt erreicht. Bei einer Temperatur von 37° C trat die Gelierung schon zwischen 60 Sekunden und 300 Sekunden Polymerisationszeit auf. Bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml wurde der Gelpunkt bei den hier vorgenommenen Messungen bei einer Polymerisationstemperatur von 37° C für Polymerisationszeiten bis 1200 Sekunden nicht erreicht.

Die Berechnung der Persistenlänge ergibt für die beiden unterschiedlichen Oberflächen, Glas und Glimmer, $l_P = 420\,\text{nm} \pm 50\,\text{nm}$. Vergleicht man dieses Ergebnis mit Literaturwerten für andere Intermediärfilamentproteine, stimmen die Größenordnungen überein. Für Desmin wurde ein Wert zwischen 600 und 800 nm bestimmt [61], für Vimentin ein Wert von 1000 nm. Da Keratin 8/18 Filamente im Mittel aus 16 oder 21 Monomeren pro Querschnitt bestehen, während Vimentin Filamente durchschnittlich 30 und 37 Moleküle pro Querschnitt [36] und Desmin Filamente im Mittel 32 Monomere pro Querschnitt aufweisen [36], lässt sich die Differenz bei der Persistenzlänge durch die unterschiedlichen Dicken erklären.
Aus der Persistenzlänge lassen sich auch Schlussfolgerungen ziehen, ob es sich bei den Filamenten um eine unflexible Anordnung der Dimere oder um lose

Bündel handelt [61]. Bei einer beweglichen Anordnung von 16 Monomeren im Querschnitt, das heißt 8 Dimeren, ergibt sich eine minimale Persitenzlänge zwischen 120 nm und 800 nm. Für die starre Anordnung ergibt sich eine maximale Persistenzlänge zischen 1220 nm und 8100 nm. Die experimentell ermittelte Persistenzlänge von 420 nm ± 50 nm liegt im Bereich zwischen 120 nm und 800 nm der flexiblen Anordnung und weist darauf hin, dass die Dimere in einem Filament beweglich angeordnet sind und sich gegeneinander verschieben können.
Polymerisieren die Filamente in einer Umgebung die Ionen enthält, ändert sich durch die Manning-Kondensation die Oberflächenladung der Filamente. Dies führt über die Abnahme der eigenen Abstoßung zu einer Streckung und damit zu einer Änderung der Persistenzlänge. Die theoretisch berechnete elektrostatische Änderung ist mit $L_{P,el} = 1,2 \cdot 10^{-15}$ m nicht signifikant. Das wird auch durch die experimentellen Daten bestätigt. Die Persistenzlänge bei einer $MgCl_2$-Konzentration von 0,5 mM beträgt $L_P = 440 \pm 50$ nm. Dieser Wert liegt im Bereich des Ergebnisses der Persistenzlänge ohne die Zugabe von Magnesiumchlorid von $L_P = 420 \pm 50$ nm.

4.2 Netzwerke

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten die Eigenschaften von Keratin 8/18 Filamenten auf der Einzelfilamentebene vorgestellt worden sind, sollen im folgenden Abschnitt die nanomechanischen Eigenschaften von dreidimensionalen Keratin 8/18 Netzwerken untersucht und in Zusammenhang mit der Netzwerkstruktur gebracht werden. Dazu wird der dynamische Schermodul der Netzwerke erst mit dem dynamischen Schermodul des extrahierten Zytoskeletts von Pankreaskarzinomzellen verglichen und im Anschluss durch Zugabe künstlicher Vernetzer modifiziert und mit Hilfe korrelativer Rasterelektronenmikroskopie eine Struktur-Funktions-Beziehung entwickelt. Dabei werden sowohl der Speichermodul der Netzwerke, der die elastischen Eigenschaften eines Netzwerks darstellt, als auch der Verlustmodul, der die viskosen Eigenschaften eines Netzwerks widerspiegelt, bestimmt und verglichen.

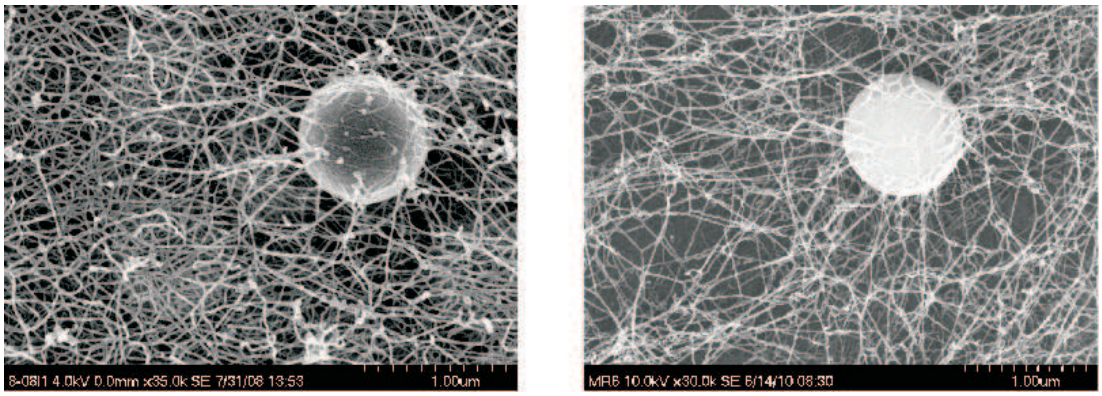


Abbildung 4.15: Vergleich: links das Zellnetzwerk und rechts das in vitro assemblierte Keratin 8/18 Netzwerk aufgenommen im REM.

4.2.1 Dynamischer Schermodul - in vivo und in vitro

Im folgenden Abschnitt wird der dynamische Schermodul des in vitro assemblierten Keratin 8/18 Netzwerks mit dem extrahierten Keratin Zytoskelett von Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie Panc-1 verglichen. Der dynamische Schermodul wurde mit dem in Kapitel 3, Abschnitt 3.3 beschriebenen Verfahren der Mikrorheologie bestimmt. Die Polymerisation folgte den in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Schritten. Die Extraktion des Keratin Zytoskeletts aus den Pankreaszellen der Zelllinie Panc-1 wurde wie in Abschnitt 3.5 erläutert durchgeführt. Die folgenden Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Diplom-Wirtschaftsphysiker Tobias Paust, Institut für Experimentelle Physik, angefertigt. Tobias Paust hat den Aufbau und die computer-basierte Auswertung entwickelt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in seiner Dissertationsschrift (Manuskript in Arbeit).

Abbildung 4.15 zeigt REM-Bilder von dem extrahierten Keratin Zytoskelett einer Pankreaskarzinomzelle auf der linken Seite und dem in vitro assemblierten Keratin 8/18 Netzwerk bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml auf der rechten Seite. Auf beiden Bildern sind Polystyrolkugeln mit 1 µm Durchmesser zu sehen. Sie verhindern, dass das dreidimensionale Netzwerk auf die Oberfläche kollabiert. Die beiden Netzwerke weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. In beiden Bildern sind sowohl gestreckte als auch gewellte, entspannte Filamente vorhanden und die Netzwerke besitzen eine ähnliche Dichte.
Bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml entsprechen also die in vitro assemblierten Keratin 8/18 Netzwerke visuell denen von extrahierten Panc-1-Zyto-

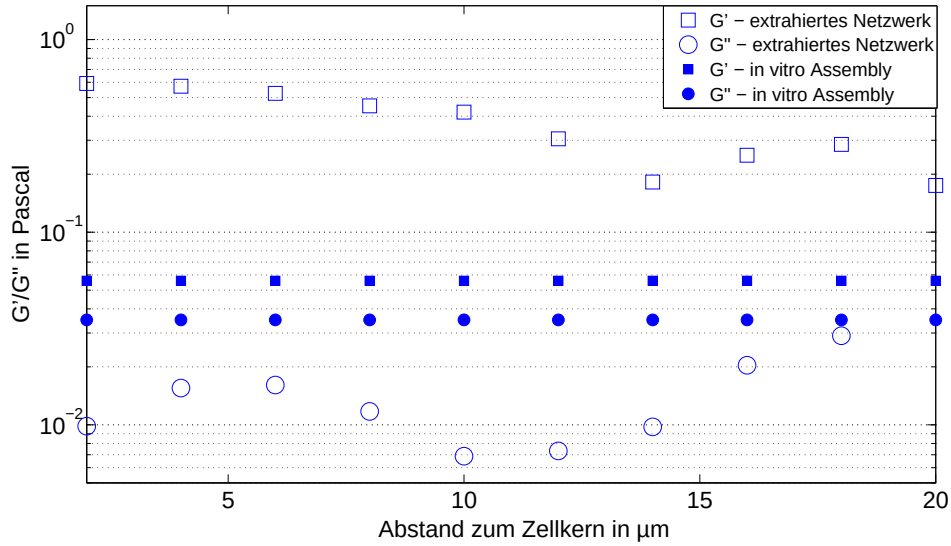


Abbildung 4.16: Vergleich des dynamischen Schermoduls von extrahierten Keratinzytoskeletten und in vitro assemblierten Keratin 8/18 Netzwerken.

skeletten. Im Folgenden sollen die mechanischen Eigenschaften beider Netzwerktypen untersucht und verglichen werden.

In einem ersten Schritt werden die Moduli von in vitro assemblierten Keratin 8/18 Netzwerken mit den Moduli von extrahierten Keratin Netzwerken von Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie Panc-1 verglichen. Die Messungen des dynamischen Schermoduls der Zellzytoskelette wurden zum Großteil von Diplom-Wirtschaftsphysiker Tobias Paust, Institut für Experimentelle Physik, angefertigt. Ebenso erfolgte die Auswertung mit dem Matlab-Programm MPT-Calc, Version 0.99 von Diplom-Wirtschaftsphysiker Tobias Paust.
Abbildung 4.16 zeigt das Speicher- und das Verlustmodul beider Netzwerktypen, G' und G", für eine feste Frequenz von $\omega = 10^{1,5}\frac{1}{s}$. Auf der x-Achse ist der Abstand zum äußeren Rand des Zellkerns in µm aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Werte für G' und G" in Pascal. Die Werte für das in vitro assemblierte Netzwerk, dargestellt durch die gefüllten Symbole, sind über den gesamten x-Bereich konstant, da kein Zellkern vorhanden ist. G' beträgt 0,056 Pa und G" 0,033 Pa. G' für das Zellnetzwerk, dargestellt durch die leeren Quadrate, ist niedriger, je größer der Abstand zum Zellkern ist. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass das Keratin 8/18 Netzwerk um den Kern dichter ist, als in der Peripherie der

Zelle [80], [41]. Die Proteinkonzentration ist also in der Zelle, im Gegensatz zum in vitro Assembly, nicht überall gleich. Für G" des Zellnetzwerks, dargestellt durch die leeren Kreise, ist keine klare Tendenz erkennbar. Der Wert schwankt stark unabhängig von der Entfernung zum Zellkern. Vergleicht man die Moduli von den in vitro und den in vivo Netzwerken, fällt auf, dass G' für das in vivo Netzwerk ungefähr um den Faktor 11 höher ist, G" jedoch ungefähr um den Faktor 3,5 niedriger. Diese Differenzen lassen sich mit den strukturellen Unterschieden zwischen den beiden Netzwerken erklären. Tabelle 4.9 stellt diese einander gegenüber.

Extrahiertes Zellnetzwerk	**In vitro Assembly**
Chemisches Netzwerk	Physikalisches Netzwerk
gesteuerte Polymerisation	Selbstassemblierung
Zugabe der Partikel	Zugabe der Partikel
nach der Polymerisation	vor der Polymerisation
Vorspannung	
Richtung	

Tabelle 4.9: Strukturelle Unterschiede zwischen dem extrahierten Netzwerk und der in vitro Polymerisation.

Der Hauptunterschied liegt im generellen Aufbau der beiden Netzwerke. Das Keratin-Zytoskelett der Zellen ist ein chemisches Netzwerk, dass mit Hilfe von Linker-Proteinen wie Plektin an den Überkreuzungspunkten der Filamente stark vernetzt ist. Das in vitro assemblierte Netzwerk hingegen ist ein physikalisches Netzwerk. An den Kreuzungspunkten können die Filamente zwar miteinander wechselwirken, es liegen jedoch keine kovalenten Bindungen vor.
Auch in der Art der Polymerisation unterscheiden sich die beiden Netzwerke. In der Zelle findet ein kontinuierlicher Auf- und Abbauprozess des Zytoskeletts statt [80], [41]. Dieser verläuft von der Peripherie der Zelle hin zum Zellkern und enthält einen Konzentrationsgradienten, sodass das Netzwerk um den Zellkern dichter ist als in den äußeren Zellbereichen. Die in vitro Polymerisation hingegen startet im ganzen Volumen gleichzeitig und unter den gleichen Bedingungen, sodass weder Konzentrationsunterschiede noch eine Vorzugsrichtung vorhanden sind.
Ein weiterer Unterschied besteht in der Zugabe der Mikropartikel. Das bereits polymerisierte, jedoch ständig fluktuierende Netzwerk der Zelle umschließt die Mikropartikel, während die Partikel beim in vitro Assembly bereits vor der Polymerisation zugegeben werden. Daher ist es hier möglich, dass durch die Brownsche

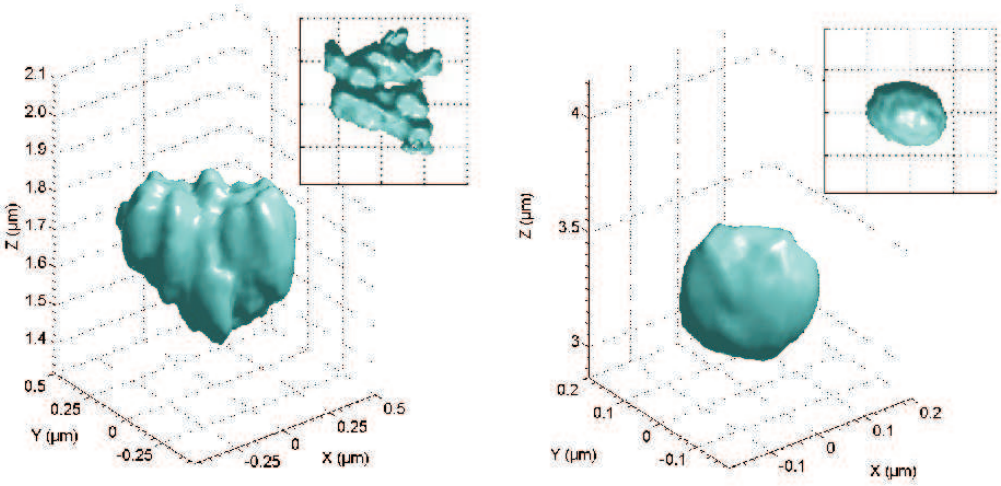


Abbildung 4.17: Punktwolke eines Mikropartikels, links im in vitro Assembly und rechts im Zellnetzwerk in der Iso-Oberflächen-Darstellung.

Bewegung des Partikels während der Polymerisation eine Aussparung im in vitro assemblierten Netzwerk entsteht.

Abbildung 4.17 verdeutlicht die strukturellen Unterschiede zusätzlich. Auf der rechten Seite ist die Punktwolke eines Mikropartikels im Zellnetzwerk in der Iso-Oberflächen-Darstellung zu sehen. Die Iso-Oberflächen-Darstellung zeigt die Äquipotentialflächen für eine gewählte Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Mikropartikels. Das Partikel ist fest im Netzwerk eingeschlossen und die Bewegung ist gleichmäßig in alle Richtungen. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Punktwolke eines Mikropartikels im in vitro Assembly in der Iso-Oberflächen-Darstellung zu sehen. Hier kann sich das Partikel sehr viel freier bewegen, was mit dem Unterschied in G' übereinstimmt, und ist sogar in der Lage ein Filament zu umzirkeln. Dies erkennt man an dem Loch in der Iso-Oberflächen-Darstellung im kleinen Einsatzbild. Zusätzlich kann man an den Aussparungen den möglichen gitterartigen Verlauf der Filamente erkennen.

Im nächsten Schritt soll nun das in vitro assemblierte Netzwerk dahingehend optimiert werden, dass sich sowohl die nanomechanischen als auch die strukturellen Eigenschaften dem extrahierten Zellnetzwerk der Pankreaskarzinomzellen annähern.

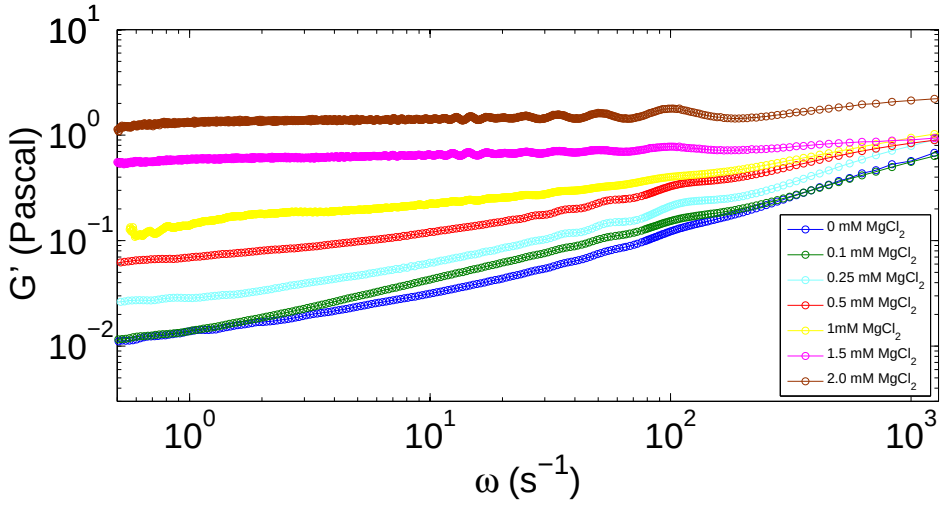


Abbildung 4.18: Speichermodul in Abhängigkeit von der $MgCl_2$ Konzentration aufgetragen über die Frequenz ω.

4.2.2 Netzwerkoptimierung

Um die Netzwerkstruktur des in vitro assemblierten Netzwerks an das Zellnetzwerk anzugleichen, bietet es sich an, chemische Crosslinker zu verwenden. Diese beheben den wichtigsten Punkt in der Liste der strukturellen Unterschiede, das Fehlen von chemischen Bindungen an den Kreuzungspunkten. In der Literatur weitverbreitet ist der Gebrauch bivalenter Ionen als chemische Crosslinker, da vermutet wird, dass diese in IF-Netzwerken eine ähnliche Funktion übernehmen wie Protein-Vernetzer in Aktin-Netzwerken [50]. Für diesen Zweck wird Magnesiumchlorid genutzt, da die zweifach positiv geladenen Ionen die negativ geladenen Filamente über ihre C-terminalen Tail-Bereiche an den Überkreuzungspunkten verbinden. Damit wird aus dem physikalischen Netzwerk (englisch: "entangled network") ein chemisches Netzwerk (englisch: "crosslinked network"). Die Auswertung der Partikeltrajektorien erfolgte auch hier mit dem Programm MPT-Calc, Version 0.99 von Diplom-Wirtschaftsphysiker Tobias Paust.
Abbildung 4.18 zeigt den frequenzabhängigen Verlauf des Speichermoduls G'. Die Farbkodierung zeigt die Änderung der Magnesiumkonzentration.

Je größer die Magnesiumkonzentration ist, desto höher ist G'. Ab einer $MgCl_2$-Konzentration von 0,25 mM ist ein signifikanter Anstieg bei G' zu beobachten.

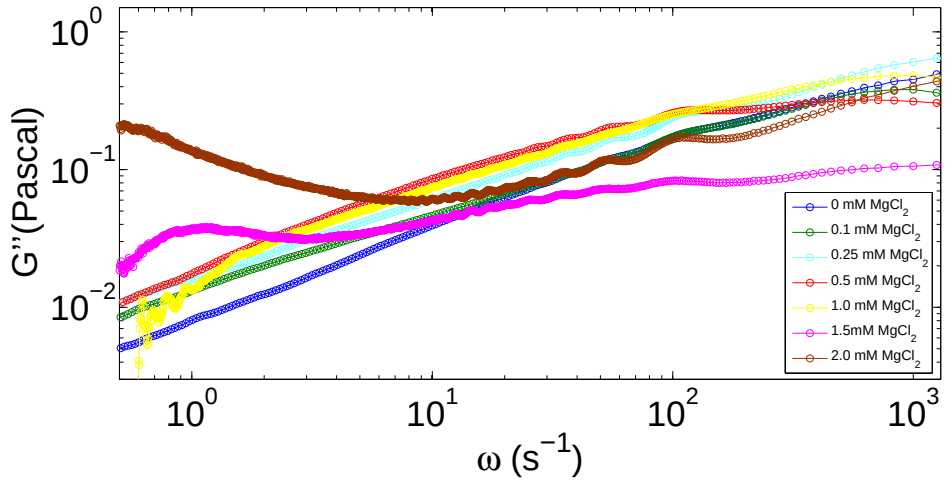


Abbildung 4.19: Verlustmodul in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration aufgetragen über die Frequenz ω.

Mit steigender $MgCl_2$-Konzentration ändert sich das frequenzabhängige Verhalten für G'. Die Frequenzabhängigkeit nimmt ab und nähert sich einem konstanten Wert. Dieses Verhalten wurde auch für Neurofilamentnetzwerke beobachtet [83]. Abbildung 4.19 zeigt den frequenzabhängigen Verlauf des Verlustmoduls G". Die Farbkodierung zeigt die Änderung der Magnesiumkonzentration. G" zeigt bis zu einer $MgCl_2$-Konzentration von 1 mM keine signifikante Änderung. Dies deutet drauf hin, dass der Beitrag von G" hauptsächlich durch den Fluss der Pufferlösung durch die Maschen des Netzwerks zustande kommt. Bei höheren $MgCl_2$-Konzentrationen ändert sich das frequenzabhängige Verhalten von G". Es tritt ein Minimum auf, dessen Position sich abhängig von der Vernetzungsdichte verschiebt. Da das Frequenzspektrum bei 0,5 $\frac{1}{s}$ die untere Grenze hat, ist das Minimum für niedrige $MgCl_2$-Konzentrationen nicht beobachtbar. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für vernetzte Aktin-Netzwerke beobachtet [52]. Vergleicht man Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19, dominiert für Konzentrationen größer als 0,1 mM das Speichermodul vor allem für niedrige Frequenzen den Verlustmodul.

Für einen genauen Vergleich zeigt Abbildung 4.20 den frequenzabhängigen Vergleich von G' und G" bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und ohne Zusatz von Magnesiumchlorid. G' und G" kreuzen sich bei zwei Frequenzen, der unteren Grenzfrequenz $\omega_R = 4,6\,\frac{1}{s}$ und der oberen Grenzfrequenz $\omega_e = 420\,\frac{1}{s}$.

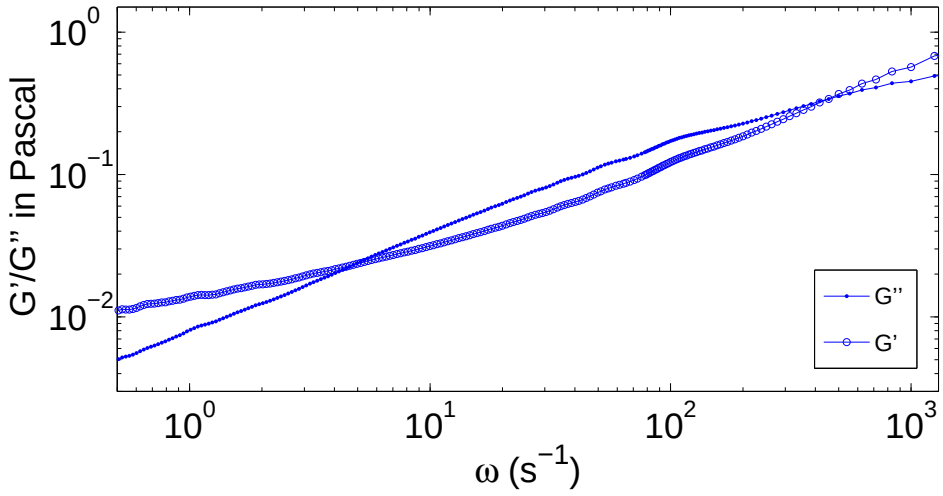


Abbildung 4.20: G' und G" der in vitro polymerisierten Netzwerke ohne Zusatz von $MgCl_2$ aufgetragen über die Frequenz ω.

Dieser Verlauf entspricht dem theoretisch vorhergesagten Verhalten in Kapitel 2, Abschnitt 2.4.1. Unterhalb der Frequenz ω_R dominiert G", zwischen den beiden Grenzfrequenzen G' und oberhalb der Frequenz ω_e steigen sowohl G' als auch G" an. Es ist jedoch für G" kein ausgeprägtes Minimum zwischen den beiden Grenzfrequenzen zu sehen.

Für $MgCl_2$-Konzentrationen von 0,1 mM und 0,25 mM verlaufen G' und G" nahezu gleich. Erst ab einer $MgCl_2$-Konzentration von 0,5 mM tritt eine Differenz auf. Abbildung 4.21 zeigt jeweils G' und G" bei einer Magnesiumchloridkonzentration von 1,5 mM und 2 mM $MgCl_2$.

Das frequenzabhängige Verhalten von G" zeigt ein Minimum, wie theoretisch in Kapitel 2, Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Der frequenzabhängige Verlauf für die beiden Module überkreuzt sich jedoch nicht. G' dominiert für beide Konzentrationen über den ganzen Frequenzbereich. Luan et al. [52] beschreiben für Aktin-Netzwerke ein ähnliches Verhalten: Für steigende Vernetzungsdichten zeigt sich im frequenzabhängigen Verlauf von G' ein Plateaumodul. Zusätzlich bildet sich im frequenzabhängigen Verlauf von G" ab einer bestimmten Vernetzungsdichte ein Minimum aus, welches sich für steigende Vernetzungsdichte hin zu höheren Frequenzen verschiebt [52].

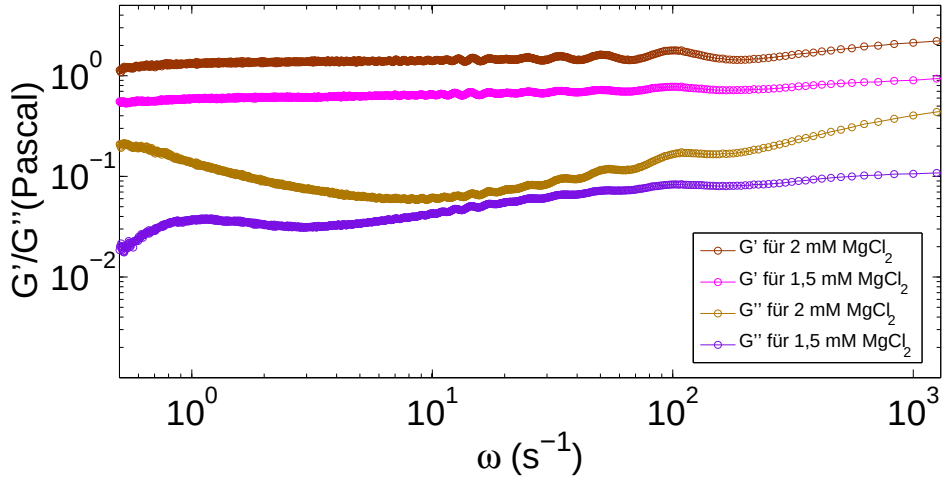


Abbildung 4.21: G' und G" der in vitro polymerisierten Netzwerke bei 1,5 mM und 2 mM $MgCl_2$ aufgetragen über die Frequenz ω.

Da das Frequenzspektrum der Messungen in der hier vorliegenden Arbeit erst bei $\omega = 0,5\,\frac{1}{s}$ beginnt, können keine Aussagen über das Minimum von G" bei niedrigeren $MgCl_2$-Konzentrationen gemacht werden. Das Frequenzspektrum ist durch die Aufnahmerate der verwendeten Hochgeschwindigkeitskamera und die benötigte Auflösung zur Auswertung der Partikelbewegung begrenzt.

4.2.3 Strukturparameter von Keratin 8/18 Netzwerken

Um die lokalen mechanischen Eigenschaften aus dem vorangehenden Abschnitt besser zu verstehen, bietet es sich an, die Struktur der Keratin 8/18 Netzwerke genauer zu untersuchen. Dabei sind vor allem, wie in Kapitel 2, Abschnitt 2.4.1 beschrieben, die Maschengröße, die Filamentlänge zwischen zwei Kreuzungspunkten und die Vernetzungsdichte entscheidend. Im folgenden Abschnitt sollen diese Parameter aus REM-Bildern bestimmt werden. Die Probenpräparation folgt den in Kapitel 3, Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Schritten und erhält soweit wie möglich die dreidimensionale Netzwerkstruktur.

Abbildung 4.22 zeigt einen Vergleich der Netzwerkstruktur bei unterschiedlichen Polymerisationsbedingungen. Das in vitro assemblierte Netzwerk unten links zeigt

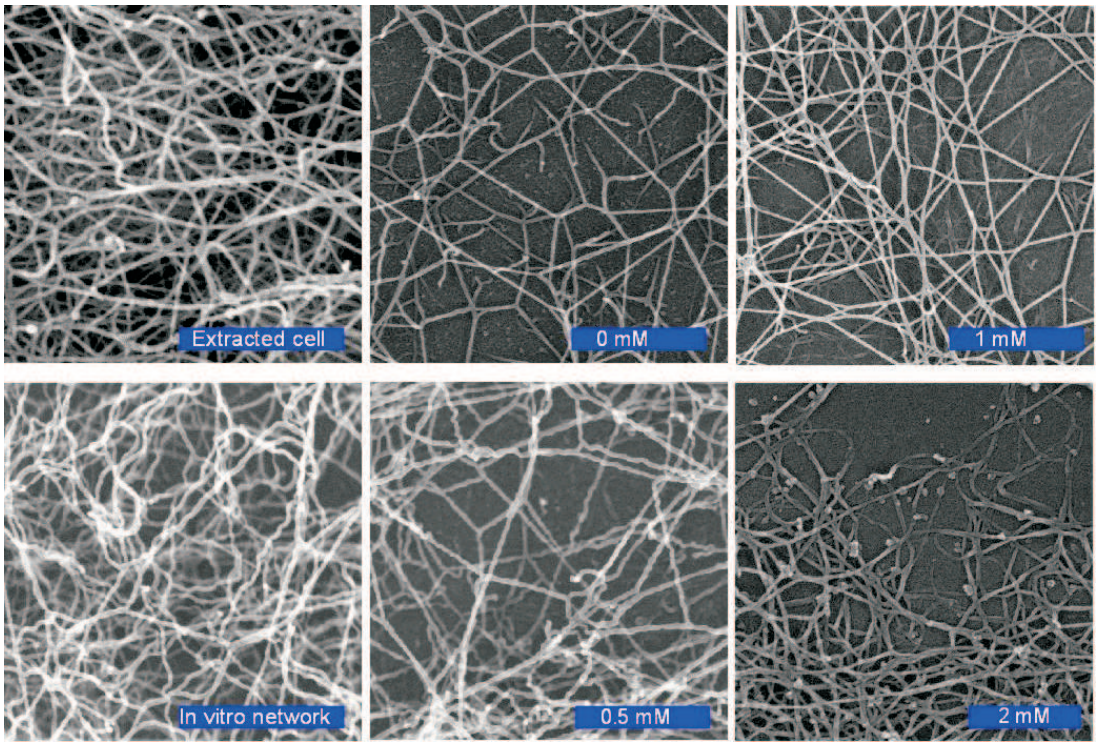


Abbildung 4.22: Änderung der Netzwerkstruktur bei unterschiedlichen Polymerisationsbedingungen. Oben links: in vivo Netzwerk 4 µm vom Zellkern entfernt, unten links: dichtes in vitro Assembly c=0,5 mg/ml, 0 mM $MgCl_2$, oben Mitte: zweilagiges in vitro Netzwerk c=0,5 mg/ml, 0 mM $MgCl_2$, unten Mitte: zweilagiges in vitro Netzwerk c=0,5 mg/ml, 0,5 mM $MgCl_2$, oben rechts: zweilagiges in vitro Netzwerk c=0,5 mg/ml, 1 mM $MgCl_2$, unten rechts: zweilagiges in vitro Netzwerk c=0,5 mg/ml, 2 mM $MgCl_2$.

eine ähnliche Morphologie wie das in vivo Netzwerk der extrahierten Panc-1-Zellen oben links. In beiden Netzwerken kommen sowohl gestreckte als auch gebogene oder gewellte Filamente vor. Die weiteren Abbildungen zeigen ein- bis zweilagige Bereiche der Netzwerke bei $MgCl_2$-Konzentrationen von 0 mM bis 2 mM. Für höhere $MgCl_2$-Konzentrationen werden die Netzwerke dichter und die Filamente kleben ab einer Konzentration von 1 mM sichtbar zusammen. Die Netzwerkstruktur ändert sich also bei steigenden $MgCl_2$-Konzentrationen. Um diese Änderung zu quantifizieren, wurden die REM-Bilder segmentiert, um die Filamentlängen zwischen zwei benachbarten Vernetzungspunkten zu messen und die Maschengröße der Netzwerke zu berechnen. Die Maschengröße wird hierbei als die Wurzel aus dem Flächeninhalt einer Masche berechnet.

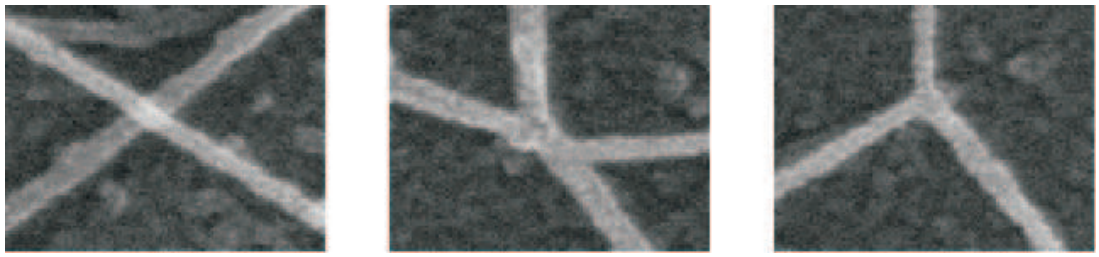


Abbildung 4.23: Mögliche Crosslinks-Konfigurationen in zweidimensionalen REM-Bildern: Links: Signalverstärkung durch Überlagerung, Mitte: Kreuzungspunkt mit Winkeländerung, rechts: y-Verzweigung.

Da das dreidimensionale Netzwerk im Elektronenmikroskop zweidimensional abgebildet wird, müssen die Bilder als Projektion aufgefasst werden und wurden nach folgenden Kriterien segmentiert:

- Bei einer Signalverstärkung (heller Punkt), siehe Abbildung 4.23 links, liegt keine Quervernetzung vor. Hier überkreuzen sich zwei unabhängige Filamente. Durch die Rückstreuung der Elektronen an mehreren Grenzflächen kommt es zu einer Signalverstärkung.

- Ein Kreuzungspunkt mit Winkeländerung, siehe Abbildung 4.23 Mitte, stellt eine Quervernetzung dar, da für diese Anordnung eine feste Bindung zwischen beiden Filamenten vorhanden sein muss.

- Eine dreifache Verzweigung, siehe Abbildung 4.23 rechts, stellt eine Quervernetzung dar, da dies eine natürliche y-Verzweigung ist.

Diese Segmentierung ist nur in REM-Bildern möglich, die nur ein oder zwei Netzwerklagen aufweisen. An Stellen mit zu dichtem Netzwerk kann man die Maschen nicht zuverlässig nachverfolgen und die Projektion von drei auf zwei Dimensionen würde die Ergebnisse zu stark verfälschen.
Die entstehenden Datensätze ergeben Häufigkeitsverteilungen für die Maschengröße und für die Konturlänge zwischen zwei Kreuzungspunkten, kurz Filamentlänge, für die verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen.

Die Verteilungen für 0 mM, 1 mM und 2 mM $MgCl_2$ bestehen aus den Werten für jeweils über 100 segmentierte Maschen. Für 0,5 mM $MgCl_2$ konnten nur 35 Maschen ausgewertet werden. Sie sind asymmetrisch und haben ein auslaufendes Ende hin zu längeren Maschengrößen. Für steigende $MgCl_2$-Konzentrationen ver-

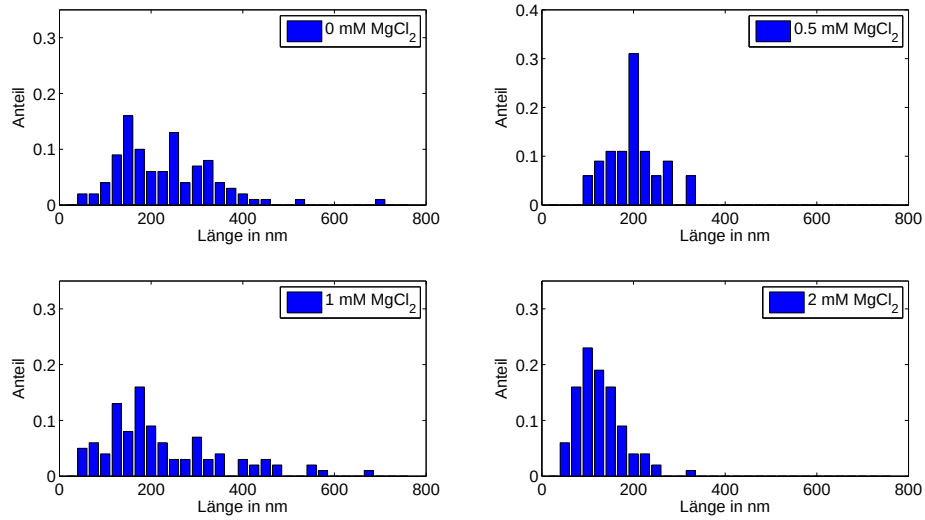


Abbildung 4.24: Häufigkeitsverteilungen der Maschengröße für $MgCl_2$-Konzentrationen von 0 mM bis 2 mM $MgCl_2$.

$MgCl_2$-Konzentration	**Mittelwert**	**Median**
0 mM	217 nm	195 nm
0,5 mM	186 nm	181 nm
1 mM	207 nm	169 nm
2 mM	115 nm	108 nm

Tabelle 4.10: Mittelwert und Median der Maschengröße in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration.

schiebt sich das Maximum hin zu niedrigeren mittleren Maschengröße. Vor allem für 2 mM $MgCl_2$ ist die Verteilung kompakter und es sind keine Maschen größer als ca. 300 nm zu finden.
In Tabelle 4.10 sind der Mittelwert und der Median der Maschengröße aus den Verteilungen in Abbildung 4.24 aufgelistet. Abbildung 4.25 zeigt den Mittelwert und den Median für die Maschengröße in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert über den gesamten Datensatz an. Für steigende $MgCl_2$-Konzentrationen sinkt die mittlere Maschengröße. Diese Veränderung einer der Strukturparameter erklärt auch den Anstieg des Schermoduls. Betrachtet man das gesamte Volumen, bedeutet eine Verkleinerung der Maschengröße eine resultierende Erhöhung der Proteinkonzentration. Das Netzwerk zieht sich also zusammen. Um einen dich-

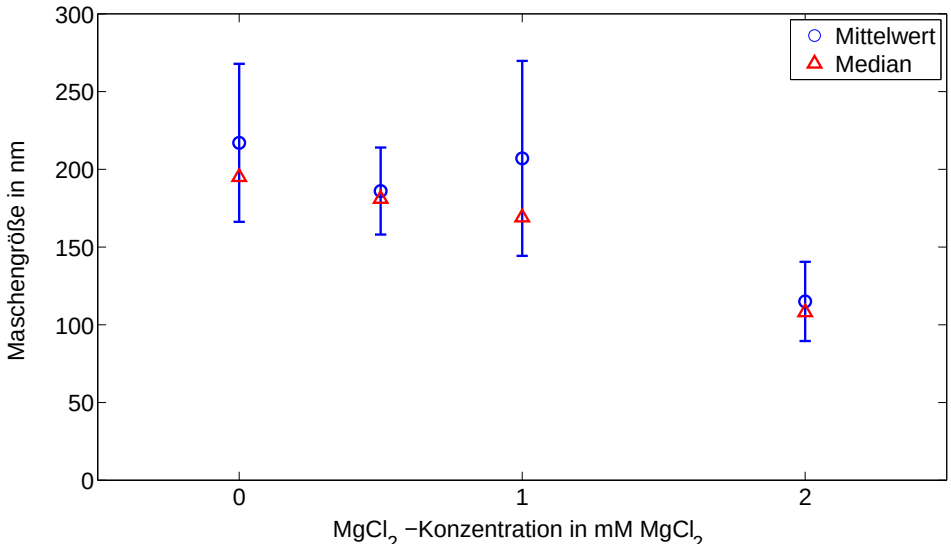


Abbildung 4.25: Mittelwert und Median der Maschengröße in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert über den gesamten Datensatz an.

teren Teil muss sich ein Bereich mit niedrigerer Proteinkonzentration oder reiner Pufferlösung anschließen. Aus der Änderung der Netzwerkstruktur ergibt sich also eine lokal höhere Proteinkonzentration und eine dichtere Vernetzung und damit auch ein höherer Speichermodul G'.

Neben der mittleren Maschengröße wird die Netzwerkstruktur auch durch die mittlere Filamentlänge charakterisiert. Tabelle 4.11 zeigt Mittelwert und Median der Filamentlänge aus den Verteilungen in Abbildung 4.26. Die Verteilungen für 0 mM, 1 mM und 2 mM $MgCl_2$ bestehen aus den Werten von jeweils über 500 segmentierten Filamenten . Für 0,5 mM $MgCl_2$ konnten nur 150 Filamente ausgemessen werden.

$MgCl_2$-Konzentration	**Mittelwert**	**Median**
0 mM	196 nm	179 nm
0,5 mM	222 nm	190 nm
1 mM	181 nm	150 nm
2 mM	126 nm	108 nm

Tabelle 4.11: Mittelwert und Median der Filamentlänge in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration.

In Abbildung 4.27 sind der Mittelwert und der Median für die Filamentlänge in

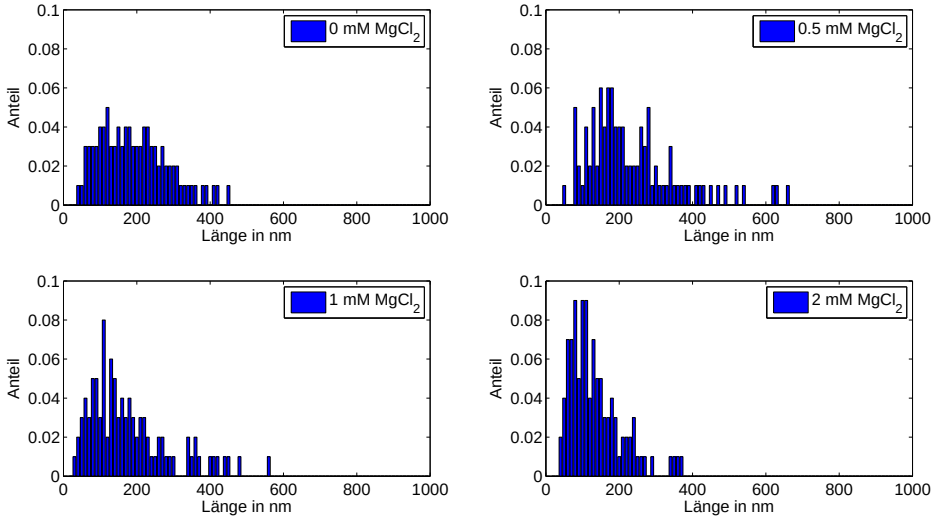


Abbildung 4.26: Häufigkeitsverteilungen der Filamentlänge für $MgCl_2$-Konzentrationen von 0 mM bis 2 mM $MgCl_2$.

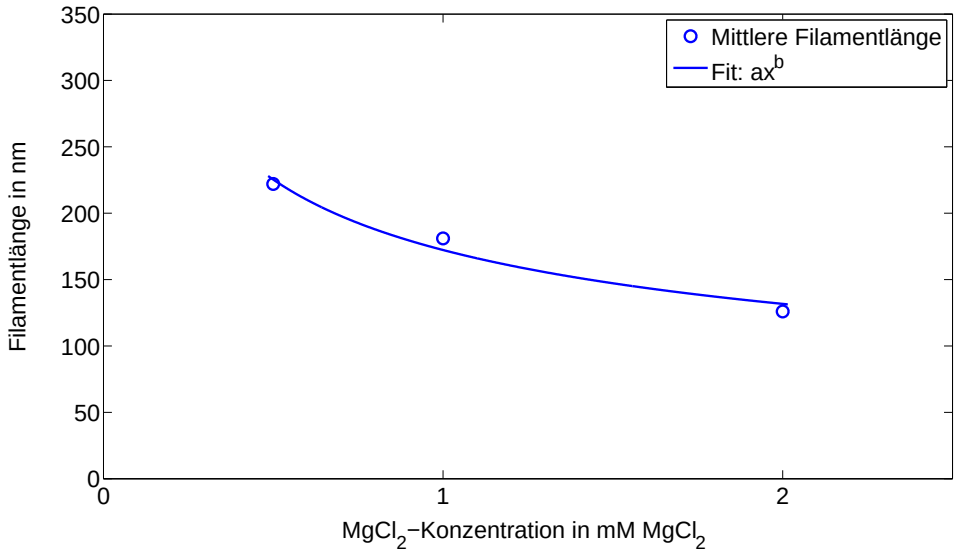


Abbildung 4.27: Fit: Mittelwert der Filamentlänge in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration, $L_C(MgCl_2) = a(MgCl_2)^b$.

Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration aufgetragen.

Für steigende $MgCl_2$-Konzentrationen sinkt auch die mittlere Filamentlänge. Für steigende $MgCl_2$-Konzentrationen verschiebt sich das Maximum hin zu niedrige-

ren mittleren Filamentlängen. Das Ergebniss passt zum Verhalten der mittleren Maschengröße. Auch hier bedeutet eine kleinere mittlere Filamentlänge, dass zwischen den Filamenten weniger Abstand besteht und somit die resultierende Proteinkonzentration steigt. An die Daten für 0,5 mM, 1 mM und 2 mM $MgCl_2$ kann eine Funktion der Form $y = ax^b$ angepasst werden, siehe Abbildung 4.27. Die resultierenden Parameter sind a=172,3 und b=-0,3874. Diese Skalierung der mittleren Filamentlänge mit der $MgCl_2$-Konzentration soll in Abschnitt 4.2.5 verwendet werden, um die Struktur-Funktions-Beziehung der Keratin-Netzwerke zu beschreiben.

4.2.4 Heterogenität der Netzwerke

In den vorhergehenden Darstellungen wurden Speicher- und Verlustmodul als Mittelwerte, gemittelt über möglichst viele Partikelbewegungen, betrachtet. Die Berechnung der Strukturparameter hat jedoch gezeigt, dass das Netzwerk für hohe $MgCl_2$-Konzentrationen ab 1 mM $MgCl_2$ nicht mehr als homogen betrachtet werden kann. Im Folgenden soll ein Vergleich von Einzelmessungen bei unterschiedlichen $MgCl_2$-Konzentrationen stattfinden.

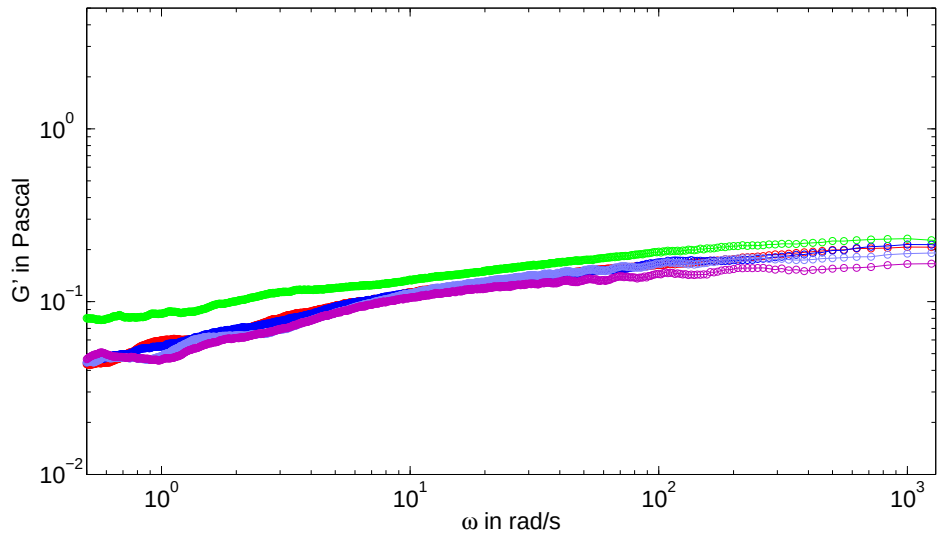


Abbildung 4.28: Speichermodul für verschiedene Partikel bei konstanter Proteinkonzentration ohne Magnesiumchlorid aus verschiedenen Messungen.

Abbildung 4.28 zeigt den Speichermodul für fünf verschiedene Partikel aus un-

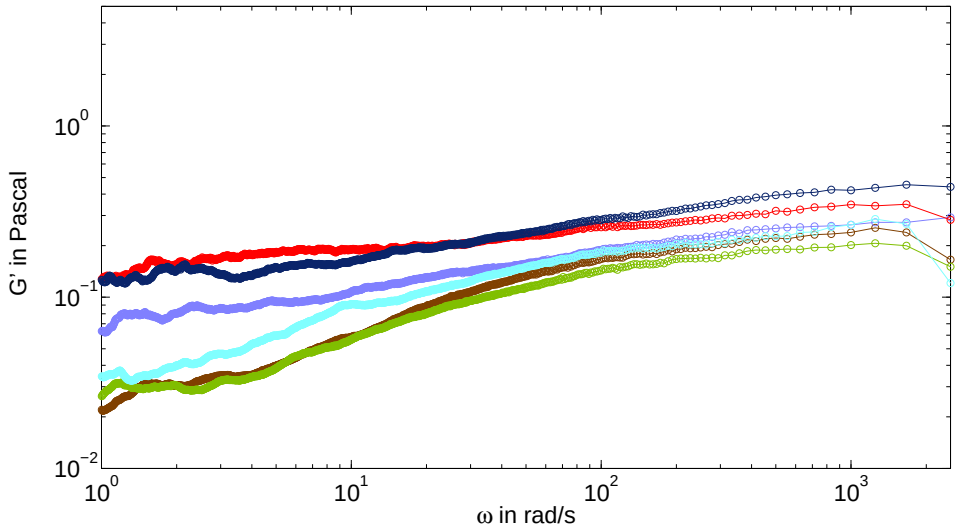


Abbildung 4.29: Speichermodul für verschiedene Partikel bei konstanter Proteinkonzentration und einer $MgCl_2$-Konzentration von 1 mM aus verschiedenen Messungen.

terschiedlichen Messungen. Jede Farbe stellt eine Einzelpartikelmessung dar. Das Assembly fand jeweils bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und ohne die Zugabe von $MgCl_2$ statt. Die Messungen für den frequenzabhängigen G' überlagern sich fast vollständig. Die Netzwerkstruktur kann also als homogen betrachtet werden.

In Abbildung 4.29 ist G' für sechs verschiedene Partikel, dargestellt durch die unterschiedlichen Farben, zu sehen. Hier fand die Polymerisation bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und einer Ionenkonzentration von 1 mM $MgCl_2$ statt. Der Mittelwert der Messungen ist wie zu erwarten gestiegen. Der frequenzabhängige Verlauf ist jeweils gleich, die einzelnen Messungen überlagern sich jedoch kaum. Der maximale Unterschied zwischen der roten Messung und der braunen Messung für $\omega = 1\,\frac{1}{s}$ ist ungefähr ein Faktor 6.

Das linke Diagramm in Abbildung 4.30 zeigt die Ergebnisse für G' von zehn verschiedenen Partikeln aus der gleichen Messung. Ein Übersichtsbild ist rechts in Abbildung 4.30 dargestellt. Die Farben zeigen die Zuordnung der Partikeln zu den Messungen. Das Assembly fand bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und einer $MgCl_2$-Konzentration von 2 mM statt. Auch hier ist der Mittelwert der

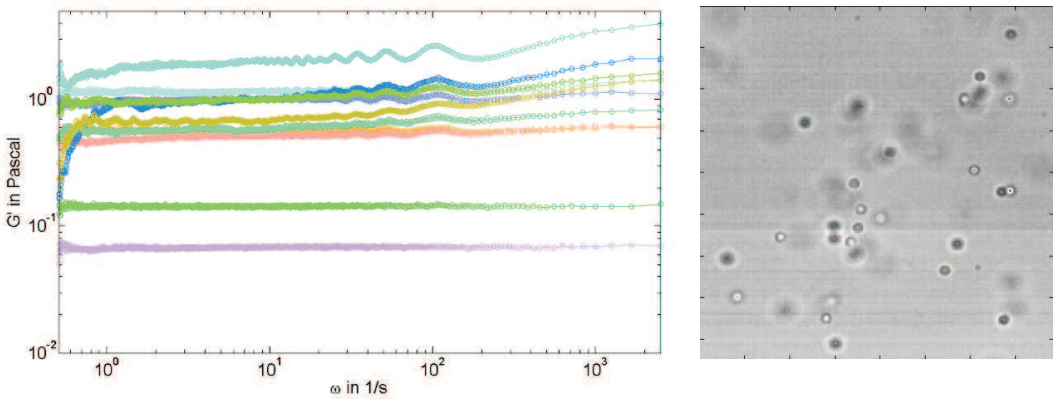


Abbildung 4.30: Links: Speichermodul für verschiedene Partikel bei konstanter Proteinkonzentration und einer $MgCl_2$-Konzentration von 2 mM aus einer Messung, rechts: 20 x20 µm Auschnitt, Überblick der gemessenen Partikel.

Messung wie zu erwarten angestiegen und die Frequenzabhängigkeit der einzelnen Messungen hat abgenommen. Die einzelnen Messungen für unterschiedliche Partikel weisen jedoch eine sehr hohe Variabilität auf. Der Unterschied zwischen der niedrigesten (lila) Messung und der höchsten (türkis) Messung beträgt ungefähr einen Faktor 16. Dies deutet darauf hin, dass über das ganze Probenvolumen kein homogenes Netzwerk mehr vorliegt.

Die Veränderung der Netzwerke von lokal und global homogenen Netzwerken hin zu global stark inhomogenen Netzwerken wird auch durch die korrelative Mikroskopie bestätigt. Abbildung 4.31 zeigt ein REM-Bild, auf dem eine starke Bündelbildung zu sehen ist. Die Polymerisation fand bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und 2 mM $MgCl_2$ statt. Die Breite des Bündels an der dünnsten Stelle, markiert durch die roten Pfeile, beträgt ca. 9,7 µm. Abbildung 4.32 zeigt ein Bild des Lichtmikroskops in dem Strukturen zu erkennen sind. Auch hier fand die Polymerisation bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und 2 mM $MgCl_2$ statt. Die einzelnen Filamente mit einem Durchmesser von 12 nm haben sich also durch die Anwesenheit des Magnesiumchlorids so zu Bündeln formiert, dass diese im Lichtmikroskop mit einer maximalen Auflösung von ca. 300 nm zu beobachten sind. Die Partikel können folglich bei ein und derselben Messung in signifikant unterschiedlichen lokalen Umgebungen, wie stark vernetzt in einem dichten Bündel oder wenig eingeschränkt an einer Stelle mit niedrigerer Netzwerkdichte, fluktuieren.

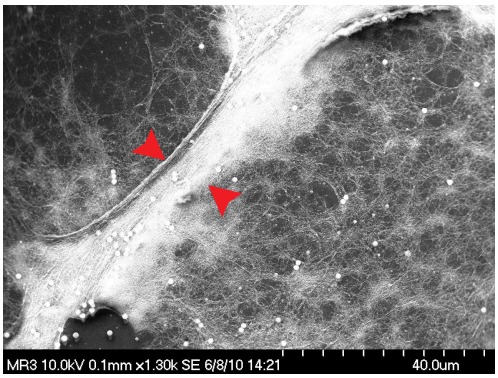


Abbildung 4.31: TEM-Bild eines Keratin Bündels, c=0,5 mg/ml, 2 mM $MgCl_2$. Die Dicke des Bündels beträgt beim roten Pfeil ca. 9,7 µm.

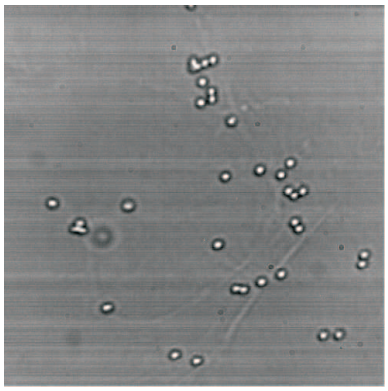


Abbildung 4.32: Lichtmikroskopaufnahme eines Keratin Bündels, Ausschnitt 20 µm, c=0,5 mg/ml, 2 mM $MgCl_2$.

Der Mittelwert über die Messungen mehrer Partikel macht daher Aussagen über das Gesamtvolumen. Er nimmt aber keine Rücksicht auf die steigende Heterogenität des Netzwerks bei steigender Ionenkonzentration. Auch die Bündelbildung, die das mechanische Verhalten stark beeinflusst, wird bei der reinen Betrachtung von Mittelwerten übersehen. Die Mikrorheologie ist also in diesem Fall ein gutes Werkzeug, lokal die Eigenschaften einer inhomogenen Netzwerkumgebung zu untersuchen.

4.2.5 Struktur-Funktionsbeziehung

Die vorherigen Abschnitte enthalten Beschreibungen der nanomechanischen Eigenschaften und der Strukturparameter Maschengröße und Filamentlänge der Keratin 8/18 Netzwerke unter verschiedenen Bedingungen. In diesem Abschnitt sollen diese Ergebnisse nun in einen Zusammenhang gebracht werden. Um Struktur und Funktion zu verbinden, werden das Flory-Modell und das Morse-MacKintosh-Modell aus Kapitel 2, Abschnitt 2.4.2 an die Daten angepasst.

Flory-Modell

Das Flory-Modell verbindet die Quervernetzungsdichte mit dem Plateaumodul für den Speichermodul des dynamischen Schermoduls, kurz Plateaumodul. Im Folgenden soll die $MgCl_2$-Konzentration als Maß für die Vernetzungsdichte be-

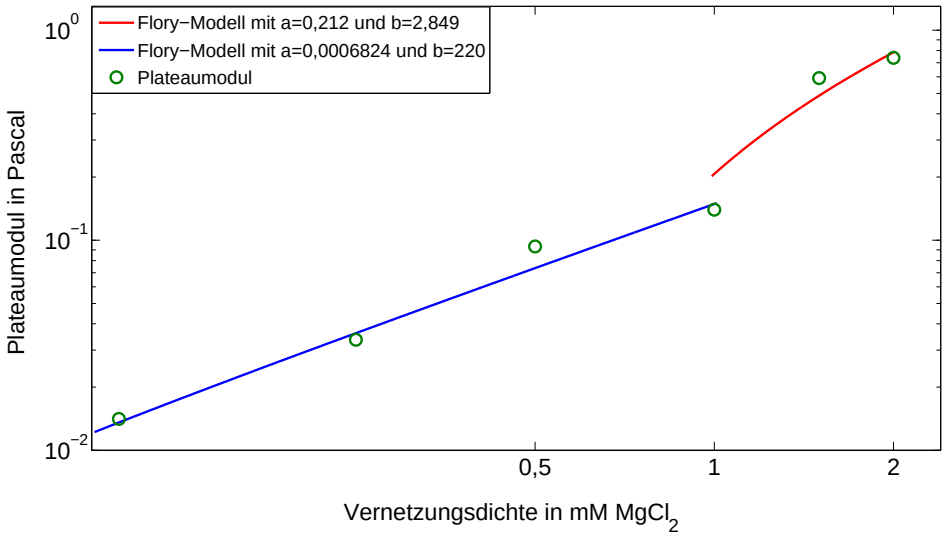


Abbildung 4.33: Plateaumodul in Abhängigkeit von der Vernetzungsdichte, gefittet mit dem Flory Modell. Der Fit ist aufgeteilt in zwei Bereiche, unterhalb und oberhalb von 1 mM $MgCl_2$.

trachtet werden. In Abbildung 4.33 ist der Plateaumodul für eine feste Frequenz $\omega = 1\,\frac{1}{s}$ gegen die $MgCl_2$-Konzentration aufgetragen. Der Fit zeigt die Anpassung des Flory-Modells aus Kapitel 2, Abschnit 2.4.2 Gleichung 2.51 an die Daten für den Plateaumodul. Für steigende Vernetzungsdichten steigt der Plateaumodul an.

Hier zeigen sich zwei Bereiche. Für geringe Vernetzungsdichten bis 1 mM $MgCl_2$ folgen die Daten dem Flory-Modell mit den Parametern a=0,0006824 und b=220. Für höhere Vernetzungsdichten ergeben sich die Parameter zu a=0,212 und b=2,849. Der Fit für kleine Vernetzungsdichten stimmt sehr gut mit den Daten überein, unterschätzt jedoch im weiteren Verlauf die Werte für höhere Vernetzungsdichten. Diese Ergebnisse lassen sich mit den strukturellen Unterschieden der beiden Bereiche (unterhalb und oberhalb der Magnesiumchloridkonzentration von 1 mM $MgCl_2$) erklären. Oberhalb von 1 mM $MgCl_2$ beginnen die Filamente zu bündeln, sodass die Steifigkeit der Verbindungen ansteigt und somit auch der Plateaumodul höher wird. Diese zwei Bereiche, die sich durch den Grad der Bündelung unterscheiden, wurden auch für Aktin-Netzwerke beobachtet [52]. Zusätzlich zu der steigenden Vernetzungsdichte trägt also auch die Bündelbildung zu der Er-

höhung des Plateaumoduls bei.

Morse-MacKintosh-Modell

Das Morse-MacKintosh-Modell beschreibt den Zusammenhang zwischen Persistenzlänge, Filamentlänge, Maschengröße und dem Plateaumodul. In Kapitel 4.1.2 zeigt die Berechnung der Persistenzlänge unter Zugabe von Magnesiumchlorid keine Änderung gegenüber dem Wert von 400 nm bei Standardbedingungen. Die Persistenzlänge kann also dem konstanten Teil in der Morse-MacKintosh-Formel zugeordnet werden. Anders verhalten sich hier die Filamentlänge und die Maschengröße. Beide Parameter nehmen mit steigender $MgCl_2$-Konzentration ab. Setzt man die Skalierungen aus dem vorhergehenden Abschnitt für die Filamentlänge 4.27 in die Morse-MacKintosh-Formel Gleichung 2.54 ein, ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$G_0 = c\frac{1}{\left(\gamma^{-0,3874}\right)^5} \tag{4.3}$$

Abbildung 4.34 zeigt den Plateaumodul, die Anpassung von Gleichung 4.3 an die Daten und die mit Gleichung 2.55 nach dem Morse-MacKintosh-Modell berechneten Daten in der doppellogharitmischen Darstellung. Die roten Kreise zeigen den gemessenen Plateaumodul für verschiedene $MgCl_2$-Konzentrationen. Die gelben Kreise zeigen den auf Grundlage der mittleren Filamentlänge aus Abschnitt 4.2.3 mit dem Morse-MacKintosh-Modell berechneten Plateaumodul. Zwischen beiden Ergebnissreihen besteht eine Abweichung um mehrere Größenordnungen (ungefähr Faktor 150). Die Skalierung des Plateaumoduls mit der Vernetzungsdichte ist für Keratin 8/18 Netzwerke also signifikant niedriger als durch das Morse-MacKintosh-Modell vorausgesagt. In blau ist der Fit des Morse-MacKintosh-Modells an die gemessenen Daten zu sehen. Der Verlauf der Daten folgt ungefähr dem Modellverlauf. Für große Vernetzungsdichten stimmen Daten und Modell überein, während für kleinere Vernetzungsdichten größere Abweichungen zu sehen sind. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch für Vimentin-Netzwerke ab einer Magnesiumchloridkonzentration von 1 mM gefunden [49].
Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Annahmen des Morse-MacKintosh-Modells, affine Deformationen isotroper Netzwerke aus semiflexiblen Filamenten, nicht erfüllt sind. Da die Deformation von Polymernetzwerken sehr strukturemp-

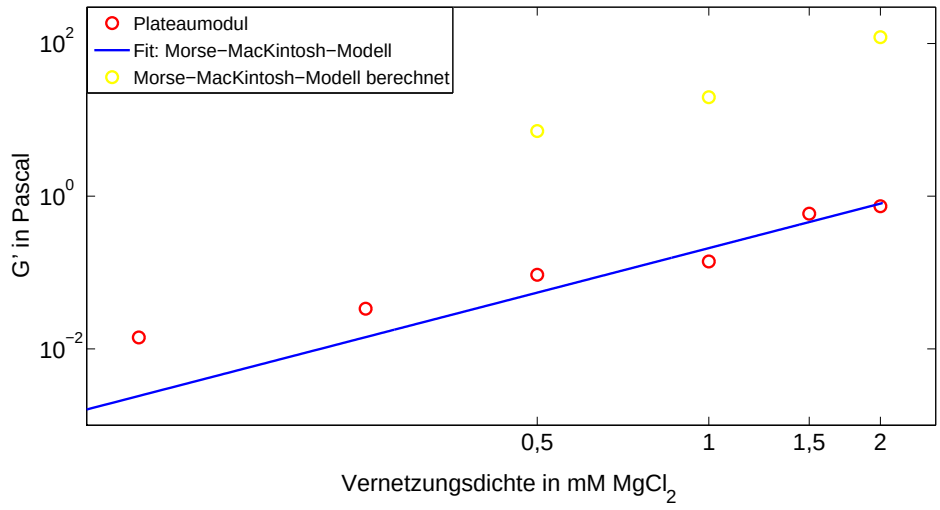


Abbildung 4.34: Plateaumodul in Abhängigkeit von der Filamentlänge mit dem Morse-MacKintosh-Modell

findlich ist, können lokale Bündelung oder Konzentrationsunterschiede, die durch das Magnesiumchlorid hervorgerufen werden, zu den Abweichungen des Plateaumoduls von der Modellvorhersage führen.

4.2.6 Dreidimensionale Netzwerkstruktur

In den vorherigen Kapiteln wurden die Parameter für die Netzwerkstruktur aus zweidimensionalen REM-Bildern extrahiert. Diese Methode hat zwei Haupteinschränkungen. Zum einen können nur Stellen auf der Probe, welche ein- bis zweilagig sind, sinnvoll ausgewertet werden. Zum anderen betrachtet man eine zweidimensionale Projektion eines dreidimensionalen Netzwerks. Mit einer dreidimensionalen Abbildungsmethode können diese Probleme vermieden werden. Ein geeignetes Verfahren ist die Elektronentomographie.
Das Tomogramm wird aus einer Kippserie senkrecht zur Achse des Elektronenstrahls von REM-Bildern berechnet. Die Probenpräparation folgt der Beschreibung in Kapitel 3, Abschnitt 3.4.4 für REM-Bilder. Bei einer Rotation von 2° pro Bild wurden 36 Bilder aufgenommen, was einer Kippung von insgesamt 70° entspricht. Dies ist die maximal mögliche Kippung des verwendeten Rasterlektronenmikroskops Hitachi S-5200. Da die Probe auf sich selbst Schatten wirft,

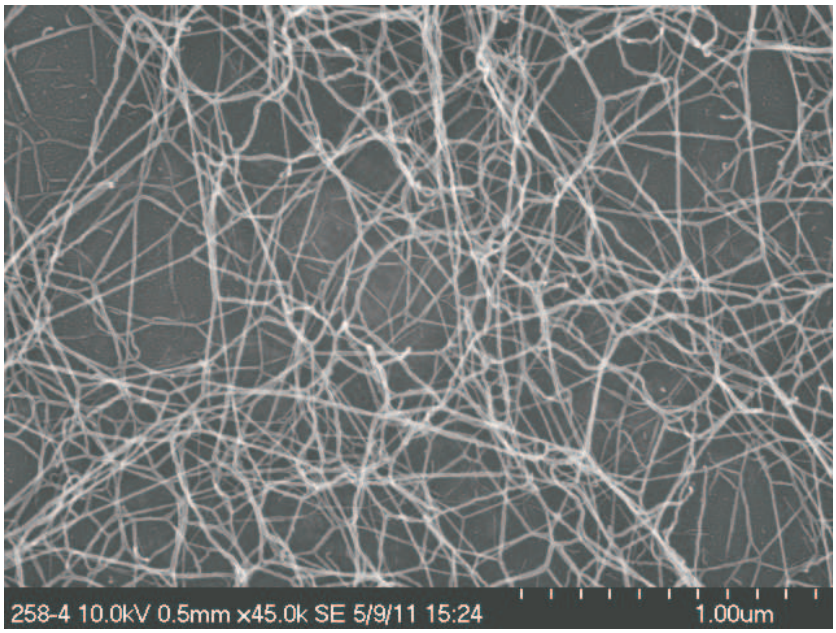


Abbildung 4.35: Zweidimensionales REM-Bild der Stelle an der das Tomogramm aufgenommen wurde.

ist es auch nicht möglich, Bilder bis zu einer Kippung von 90° aufzunehmen. Die einzelnen Bilder der Kippserie wurden mit ImageJ [2] in einen Stack geladen und das Tomogramm mit dem Programm IMOD [43] aus der Kippserie rekonstruiert. Abbildung 4.35 zeigt das zweidimensionale REM-Bild des Bildauschnitts bei dem das Tomogramm aufgenommen wurde.

Das gesamte Tomogramm befindet sich auf der DVD im Anhang. Abbildung 4.36 zeigt eine Ebene aus dem Tomogramm, die mehrere Filamente und Knotenpunkt enthält. Die roten Pfeile markieren Stellen, an denen Quervernetzungen vorliegen, die blauen Pfeile markieren Stellen, an denen sich zwei Filamente in unterschiedlichen Ebenen kreuzen. Wenn eine Quervernetzung vorliegt, liegen beide Filamente, zumindest direkt vor und nach dem Knoten, in derselben Ebene. Sie sind also beide im Bild fokussiert. Wenn sich zwei Filamente jedoch nur kreuzen, liegen sie in unterschiedlichen Ebenen, sodass nur ein Filament fokussiert ist und das andere Filament in einer höheren oder niedrigeren Ebene liegt [72]. Mit Hilfe der EM-Tomographie können die Netzwerke also dreidimensional segmentiert werden und besser zwischen echten Vernetzungspunkten und Überlagerungen unterschieden werden.

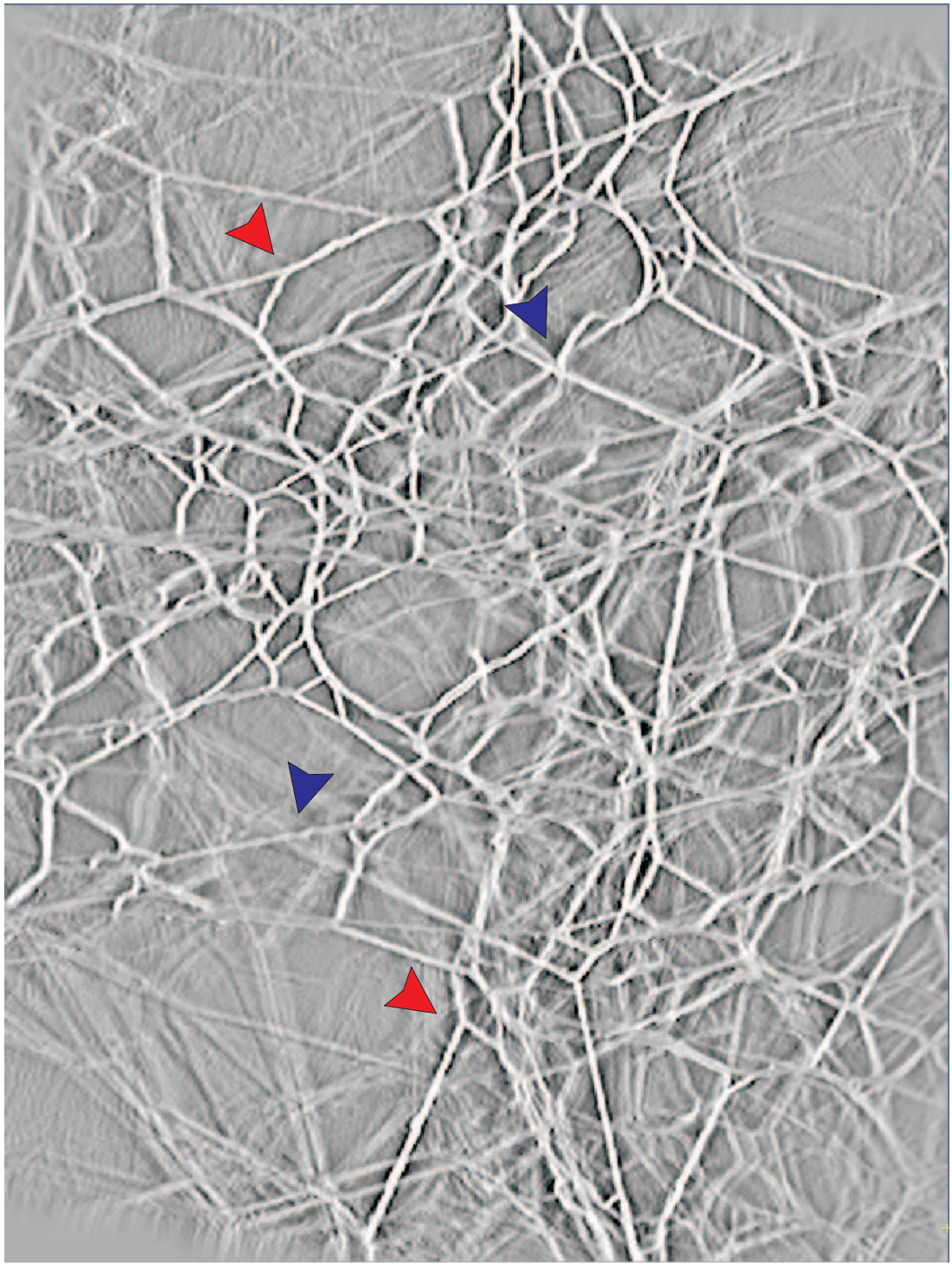


Abbildung 4.36: Ebene aus der Mitte der Tomogramms. Die roten Pfeile markieren Stellen, an denen Quervernetzungen vorliegen, die blauen Pfeile markieren Stellen, an denen sich zwei Filamente in unterschiedlichen Ebenen kreuzen.

4.2.7 Diskussion

In den vorhergehenden Abschnitten wurden die Eigenschaften von Keratin 8/18 Filamenten auf der Netzwerkebene untersucht. Dabei wurde der dynamische Schermodul der in vitroassemblierten Keratin 8/18 Netzwerke mit dem dynamischen Schermodul des extrahierten Keratin Zytoskeletts von Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie Panc-1 verglichen. Um die Unterschiede in der Morphologie zu beheben, wurde das in vitro assemblierte Netzwerk mit bivalenten Ionen chemisch vernetzt und die Struktur-Funktionsbeziehung untersucht.

Vergleicht man den dynamischen Schermodul des in vitro Assembly mit dem extrahierten Zytoskelett, fällt auf, dass sich G' und G" unterschiedlich verhalten. G' nimmt mit steigendem Abstand zum Zellkern ab, da das Zellnetzwerk um den Kern dichter ist als in der Peripherie. Der Wert liegt jedoch immer über dem konstanten G' des in vitro Assemblys von 0,056 Pascal. G" zeigt mit steigender Distanz zum Zellkern keinen klaren Verlauf, der Wert liegt jedoch immer unter dem konstanten G" für das in vitro Assembly in Höhe von 0,033 Pascal. Die unterschiedliche Morphologie der Netzwerke, das verbundene chemische Netzwerk des Zytoskeletts und das verschlaufte physikalische Netzwerk des in vitro Assembly, äußert sich also im nanomechanischen Verhalten. Zusätzlich werden die strukturellen Unterschiede in der Iso-Oberflächen-Darstellung der Punktwolke der fluktuierenden Mikropartikel deutlich. Die Partikel im extrahierten Zytoskelett sind fest im Netzwerk eingeschlossen und bewegen sich gleichmäßig in alle Richtungen. Im in vitro Assembly können sich die Partikel hingegen sehr viel freier bewegen, was mit dem Unterschied in G' übereinstimmt. Dabei können sie zum Beispiel einzelne Filamente umzirkeln, sodass in der Iso-Oberflächen-Darstellung in der Mitte ein freies "Loch" bleibt. Auch der mögliche gitterartige Verlauf der Filamente ist zu erkennen.

Chemische Vernetzer wie bivalente Ionen bieten die Möglichkeit, verschlaufte Netzwerke künstlich zu vernetzen und so die in vitro Netzwerkstruktur der Struktur des extrahierten Zytoskeletts anzupassen. Da Keratin 8/18 Filamente negativ geladen sind, wurden hier zweifach positiv geladene Magesiumchloridionen genutz um die Filamente an ihren Kreuzungspunkten zu verbinden. Dadurch steigt der Speichermodul des in vitro Assemblys mit steigender $MgCl_2$-Konzentration an. Weiter nimmt die Frequenzabhängigkeit ab und das Netzwerk verhält sich wie ein

elastischer Festkörper mit konstantem G' [83]. Betrachtet man den Plateaumodul für $\omega = 1\,\frac{1}{s}$, skaliert G' mit der $MgCl_2$-Konzentration (γ) wie $G_0 = a \cdot \gamma^b$ mit a = 0,2443 und b = 1,668. Dieses Ergebnis bestätigt Daten anderer semiflexibler Polymernetzwerke, wie Aktin, die einen Skalierungsexponenten zwischen 0,4 und 2 zeigen [46]. Für Neurofilamentnetzwerke wurde hingegen ein Skalierungsexponent von 0,6 gefunden [50]. Auch G" nimmt bei steigender $MgCl_2$-Konzentration leicht zu. Im frequenzabhängigen Verlauf tritt ab einer Konzentration von 1,5 mM $MgCl_2$ eine Minimum auf, dass sich mit steigender $MgCl_2$-Konzentration zu höheren Frequenzen verschiebt. Auf Grund der Beschränkung des Aufbaus kann das Frequenzspektrum der Messungen erst bei $0{,}5\,\frac{1}{s}$ beginnen, deshalb ist es nicht möglich, mit den hier vorliegenden Messungen Aussagen darüber zu treffen, ob das Minimum erst ab einer bestimmten Vernetzungsdichte auftritt oder für tiefere Frequenzen beobachtet werden könnte. Ein ähnliches Verhalten wurde für Aktin-Netzwerke beobachtet [52]. Auch hier nimmt für höhere Vernetzungsdichten die Frequenzabhängigkeit von G' ab und nähert sich einem konstanten Wert an. Ebenso tritt bei den Aktinnetzwerken bei G" für höhere Vernetzungsdichten ein Minimum auf, dass sich für steigende Vernetzungsdichten hin zu höheren Frequenzen verschiebt.
Entgegen der theoretischen Vorhersagen aus Kapitel 2, Abschnitt 2.4.1 überkreuzen sich die frequenzabhängigen Verläufe von G' und G" bei den künstlich verbundenen Keratin Netzwerken nicht. G' dominiert G" über den ganzen Frequenzbereich. Je höher die Vernetzungsdichte, desto größer wird die Differenz zwischen G' und G". Das Verhalten des dynamischen Schermoduls bei den verschlauften Netzwerken ohne Magnesiumchlorid folgt zwar dem theoretischen Verlauf mit zwei Grenzfrequenzen bei denen sich G' und G" kreuzen, weist jedoch kein ausgeprägtes Minimum bei G" auf.

REM-Bilder der Netzwerke bei unterschiedlichen $MgCl_2$-Konzentrationen zeigen, dass sich die Netzwerkstruktur verändert. Sowohl die mittlere Maschengröße als auch die mittlere Filamentlänge nehmen bei steigender $MgCl_2$-Konzentration ab. Das muss bedeuten, dass sich das Netzwerk "zusammenzieht" und so eine höhere resultierende Proteinkonzentration vorliegt. An einen dichteren Bereich muss sich ein Bereich mit einer niedrigeren Netzwerkdichte und damit auch Proteinkonzentration anschließen, da das System abgeschlossen ist und die Gesamtkonzentration konstant bleibt. Die Filamentlänge skaliert in Abhängigkeit der

$MgCl_2$-Konzentration mit $y = ax^b$, wobei die resultierenden Parameter a=172,3 und b=-0,3874 sind. Diese Skalierung wurde im Weiteren genutzt, um mit Hilfe des Morse-MacKintosh-Models einen Zusammenhang zwischen Vernetzungsdichte und Plateaumodulus zu entwickeln.
Die Bestimmung der Filamentlänge und Maschengröße aus zweidimensionalen REM-Bildern bedeutet, dass die Längen eine zweidimensionale Projektion sind. Zusätzlich wird die Maschengröße nicht als ein Volumen bestimmt, wie es in einem dreidimensionalen Netzwerk der Fall ist, sondern als Fläche. Diese Projektion verfälscht die Ergebnisse hin zu kleineren Längen. Mit einem dreidimensionalen Tomogramm des Netzwerks vermeidet man die Projektion und kann die Filamente im Raum segmentieren. Die Maschengröße kann in drei Dimensionen zum Beispiel als das Volumen des größten Kreises der in die Masche passt bestimmt werden. Zusätzlich haben erste Messungen gezeigt, dass das Tomogramm verlässliche Aussagen darüber liefert, ob zwei Filamente an einem Kreuzungspunkt verbunden sind oder sich in unterschiedlichen Ebenen überlagern. Bei einer Vernetzung verlaufen beide Filamente in der selben Ebene und sind so fokussiert. Eine Überlagerung muss in der zweidimensionalen Projektion anhand der Signalstärke und des Winkels zwischen den beiden kreuzenden Filamenten "aussortiert" werden. Im Tomogramm dagegen ist sie daran zu erkennen, dass die beiden Filamente nicht in der selben Ebene verlaufen und immer nur ein Filament fokussiert ist.

Die vergleichenden Messungen von extrahiertem Zytoskelett und in vitro Assembly sowie die unterschiedlichen Magnesiumchloridkonzentrationen haben eine Mittelung über die Bewegung vieler Partikel vorausgesetzt. Die Bestimmung der Netzwerkparameter Maschengröße und Filamentlänge hat jedoch gezeigt, dass die Zugabe von Magnesiumchlorid die Morphologie der Netzwerke verändert. Ausgehend von den Einzelfilamentnetzwerken bei 0 mM $MgCl_2$ entstehen bei höheren $MgCl_2$-Konzentration "verklebte" Netzwerke mit steigender Inhomogenität. Dies zeigt sich auch bei der Betrachtung der Messungen einzelner Mikropartikel: Je höher die $MgCl_2$-Konzentration ist, desto größer ist die Variabilität der einzelnen Messungen für G'. REM-Bilder der Netzwerke bestätigen eine verstärkte Bündelbildung bei höheren $MgCl_2$-Konzentrationen. Dadurch entstehen lokal Bereiche mit dichten Netzwerken oder Bündeln und einer resultierenden hohen Proteinkonzentration, sowie Bereiche mit niedrigerer Netzwerkdichte und damit auch

niedrigerer Proteinkonzentration. Abhängig davon in welchen Bereichen die Partikel fluktuieren, ergeben sich höhere oder niedrigere Werte für G'. Partikel die in dichten Bündeln eingefangen sind, detektieren durch ihre stark eingeschränkte Bewegung einen hohen Schermodul, während Partikel die in Bereichen mit einer lokal niedrigeren Proteinkonzentration fluktuieren, einen niedrigen Schermodul anzeigen. Anhand sichtbarer Bündelstrukturen im Lichtmikroskop hat sich gezeigt, dass diese Bereiche wenige Mikrometer voneinander entfernt liegen und einen bis zu einem Faktor 16 unterschiedlichen Schermodul aufweisen können.

Aus den Daten des dynamischen Schermoduls und den Strukturparametern des Netzwerks kann eine Struktur-Funktionsbeziehung hergestellt werden. Dabei wurden zum einen das Flory-Modell für gummiartige Materialien und zum anderen das Morse-MacKintosh-Modell für Biopolymernetzwerke überprüft.

Das Florymodell beschreibt den Zusammenhang zwischen der $MgCl_2$-Konzentration als Maß für die Vernetzungsdichte und dem Plateaumodul. Für steigende Vernetzungsdichten steigt wie erwartet das Plateaumodul an. Die Anpassung des Modells an die Daten erfolgt hier in zwei Bereichen, oberhalb und unterhalb einer Konzentration von 1 mM $MgCl_2$. Dabei stimmen die Daten für kleine Vernetzungsdichten mit dem Modell überein, unterschätzen aber im weiteren Verlauf das Plateaumodul für höhere Vernetzungsdichten. Für große Vernetzungsdichten besteht eine größere Abweichung der Daten von der Modellvorhersage. Die beiden Bereiche unterscheiden sich vor allem dadurch, dass ab einer Konzentration von 1 mM $MgCl_2$ Bündelungseffekte auftreten. Dadurch ändert sich die Netzwerkstruktur grundsätzlich. Die Steifigkeit der Filamentbündel steigt im Vergleich zu den Einzelfilamenten an und die Inhomogenität des Netzwerks nimmt zu. Dies verursacht einen zusätzlichen Anstieg des Plateaumoduls, der nicht alleine durch die größere Vernetzungsdichte begründet ist.

Aus dem Morse-MacKintosh-Modell wurde mit Hilfe der vorher bestimmten Skalierung der Filamentlänge mit der $MgCl_2$-Konzentration aus Abschnitt 4.2.3 ein Zusammenhang zwischen Vernetzungsdichte und Plateaumodul entwickelt. Berechnet man auf Grundlage der mittleren Filamentlänge das Plateaumodul, zeigt sich, dass zwischen den gemessenen Daten und der berechneten Ergebnisreihe eine Abweichung um mehrere Größenordnungen (ungefähr Faktor 150) besteht. Der Zusammenhang zwischen Plateaumodul und Vernetzungsdichte ska-

liert für die Keratin 8/18 Netzwerke also signifikant niedriger als durch das Morse-MacKintosh-Modell vorausgesagt. Der Datenverlauf folgt jedoch dem Modell. Für große Vernetzungsdichten stimmen Daten und Modellverlauf überein, während für kleinere Vernetzungsdichten die gemessenen Werte über dem vorhergesagten Verlauf des Modells liegen. Das Morse-MacKintosh-Modell beschreibt also nicht die Größenordnung der gemessenen Daten für das Plateaumodul, aber den Verlauf der Änderung des Plateaumoduls für steigende $MgCl_2$-Konzentrationen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Annahmen des Morse-MacKintosh-Modells, affine Deformationen isotroper Netzwerke aus semiflexiblen Filamenten, nicht erfüllt sind. Lokale Bündelung oder Konzentrationsunterschiede, die durch das Magnesiumchlorid hervorgerufen werden, können, da die Deformation von Polymernetzwerken sehr strukturempfindlich ist, zu den Abweichungen des Plateaumoduls von der Modellvorhersage führen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Assemblykinetik und die nanomechanischen Eigenschaften von in vitro assemblierten Keratin 8/18 Intermediärfilamenten auf der Einzelfilament- und auf der Netzwerkebene betrachtet.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit den Eigenschaften der Einzelfilamente. Dabei wurde in einem ersten Schritt die Kinetik des Polymerisationsprozesses untersucht. Mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops wurden die Längenverteilungen der Filamentkonturlängen für variable Temperaturbedingungen, Proteinkonzentrationen und Polymerisationszeiten gemessen. Für kleine Filamentlängen bis zu einer Persistenzlänge von ungefähr 420 nm folgt die Verteilung der mittleren Filamentlängen dem Tomski-Portet-Modell für die Assemblykinetik von Intermediärfilamenten. Für größere mittlere Filamentlängen beschreibt dieses Modell die Daten nur noch unzureichend. Da die Filamente als starre Stäbe betrachtet werden, trifft das Modell hier Annahmen über die Geometrie der Filamente, die nur für Längen kleiner als die Persitenzlänge gerechtfertigt sind. Bei einer Länge oberhalb der Persistenzlänge ist definitionsgemäß keine Korrelation mehr zwischen den Enden gegeben, sodass die Annahme starrer Stäbe nicht gerechtfertigt ist. Für längere Filamente führen die geometrischen Einschränkungen also zum Versagen des Modells.
Über alle mittleren Filamentlängen folgen die entstehenden Häufigkeitsverteilungen dem Schulz-Zimm-Modell für die Molekulargewichtsverteilung. Die Schulz-Zimm-Verteilung setzt eine Poisson-verteilte Ankunftswahrscheinlichkeit voraus,

trifft aber keine Annahmen über die Geometrie der Filamente.

Die mittlere Länge der Polymerketten ändert sich abhängig von der Proteinkonzentration des Assemblys, der Temperatur und der Polymerisationszeit. Sowohl für eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml als auch für 0,5 mg/ml steigt die mittlere Kettenlänge mit längeren Polymerisationszeiten und höheren Temperaturen an. Dabei folgt der zeitabhängige Verlauf grundsätzlich dem Polymerisationsmodell von P. Flory der Form $L(t) = \sqrt{a \cdot t + b}$. Zwei Annahmen des Modells stimmen jedoch nicht mit den experimentellen Bedingungen überein. Zum Start der Polymerisation bei t=0 ergeben sich durch die Anpassung des Modells an die Daten Filamentlängen der Länge $\sqrt{b}$. Diese widersprechen der tatsächlichen Situation in der nur Dimere und Tetramere vorliegen. Für unendlich lange Polymerisationszeiten geht das Modell von unendlich langen Polymerketten aus, da eine unbegrenzte Anzahl von Monomeren zur Verfügung steht. Experimentell ist das Assembly durch ein festes Volumen und eine feste Proteinkonzentration auf eine begrenzte Anzahl Dimere beschränkt.
Um einen Grenzwert für die mittlere Filamentlänge für lange Polymerisationszeiten zu bestimmen, wurde an die Daten eine exponentielle Sättigung der Form $L(t) = a \cdot exp(-b \cdot t) + c$ gefittet. Hier ist der Parameter c die Sättigungsgrenze, die der mittleren Filamentlänge für lange Polymerisationszeiten in Anzahl ULFs entspricht. Bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml und einer Polymerisationstemperatur von 37° C wurde ein Grenzwert von ca. 35 ULFs, ungefähr 1600 nm, erreicht. Bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml nimmt der Grenzwert mit steigender Polymerisationstemperatur zu. Die Grenzlänge beträgt für 22° C Polymerisationstemperatur ungefähr 56 ULFs, das entspricht einer Länge von ca. 2500 nm, und für eine Polymerisationstemperatur von 30° C ergibt sich eine Grenzlänge von ca. 64 ULFs, das entspricht einer ungefähren Länge von 2900 nm. Bei einer höheren Polymerisationstemperatur von 37° C sinkt die Grenzlänge entgegen der Erwartung auf ungefähr 30 ULFs, also ungefähr 1400 nm. Dieses Verhalten hängt mit einem Artefakt bei der Probenpräparation zusammen: Je länger die Filamente werden, desto eher bilden sie Netzwerke oder Verknäulungen, die leichter als einzelne Filamente durch die Waschschritte bei der Probenpräparation abgespült werden können. Zusätzlich ist es bei langen verknäulten Ansammlungen schwerer, die einzelnen Filamente von Anfang bis Ende nachzuverfolgen. Diese beiden Punkte führen dazu, dass die Messungen hin zu kürzeren Längen verfälscht wer-

den. Vor allem bei der Polymerisation mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und 37° C beeinflusst dieser Präparationseffekt die Messergebnisse signifikant.
Um auszuschließen, dass dieses Präparationsartefakt allgemein für den Sättigungseffekt verantwortlich ist, wurden die Messungen bei einer niedrigeren Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml und einer Polymerisationstemperatur von 37° C wiederholt. Da die Proteinkonzentration um den Faktor fünf niedriger ist, liegen die erwarteten Filamentlängen in einem niedrigeren Bereich, der gut nachverfolgt werden kann. Auch hier trat der Sättigungseffekt gegen eine Grenzlänge von ca. 35 ULFs mit exponentiellem Verlauf auf. Der Sättigungseffekt entsteht also nicht durch ein allgemeines Artefakt bei der Probenpräparation oder Messung, sondern ist ein tatsächlich vorhandenes Phänomen der Assemblykinetik. Eine mögliche Erklärung ist, dass mit zunehmender Filamentlänge die Anzahl der Filamente und damit der reaktiven Enden abnimmt und so die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen, kleiner wird [67]. Dadurch verringert sich die Polymerisationsgeschwindigkeit solange, bis die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei verbliebene Enden treffen, gegen Null geht.
Bei höheren Temperaturen besitzen die Filamente eine höhere thermische Energie und damit ist auch die Brownsche Molekularbewegung größer. Durch den größeren Bewegungsradius ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen größer, sodass höhere Grenzlängen erreicht werden können. Vergleicht man die Grenzlängen für die beiden verschiedenen Proteinkonzentrationen, wird bei der höheren Proteinkonzentration schon bei einer Polymerisationstemperatur von 30° C eine höhere Grenzlänge von ungefähr 64 ULFs erreicht, während bei der Proteinkonzentration c=0,1 mg/ml und der höheren Polymerisationstemperatur von 37° C nur eine Grenzlänge von ungefähr 35 ULFs erreicht wird. Da bei der fünffachen Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml fünfmal so viele Dimere vorhanden sind, ist die Zahl der reaktiven Enden und dadurch auch die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Enden treffen, höher. Dies erklärt die unterschiedlichen Grenzlängen.

Zu den Häufigkeitsverteilungen der Filamentlängen tragen die Filamente unabhängig von ihrer Länge bei. Dabei wird nicht berücksichtigt, dass sehr lange Filamente zwar nur selten vorkommen, diese aber einen großen Anteil der gesamten Proteinmasse enthalten. Eine Möglichkeit dies zu berücksichtigen ist die

Darstellung als Massenverteilung.

Wie bereits beschrieben, enstehen bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml, hohen Polymerisationstemperaturen und langen Polymerisationszeiten dichte, verschlaufte Netzwerke. Dabei bildet das Volumen im Reaktionsgefäß eine zusammenhängende, transparente, gelartige Masse. Es hat ein Wechsel des Assemblys in den Gelzustand stattgefunden. Der Gelpunkt wurde für eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml zwischen einer Polymerisationszeit von 600 Sekunden und 1200 Sekunden und der Polymerisationstemperatur von 30° C erreicht. Bei einer Temperatur von 37° C trat die Gelierung schon zwischen 60 Sekunden und 300 Sekunden Polymerisationszeit auf. Bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml und Polymerisationszeiten bis 1200 Sekunden trat der Gelierungseffekt bei den hier vorgenommenen Messungen nicht auf.

Die nanomechanischen Eigenschaften der Einzelfilamente werden durch die Persistenzlänge beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Persistenzlänge von Keratin 8/18 Filamenten aus zweidimensionalen AFM-Bildern bestimmt. Dabei ergab sich für die zwei Oberflächen Glas und Glimmer ein Mittelwert von $L_p = 420 \pm 50\,\mathrm{nm}$. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie die Persistenzlänge anderer IF-Proteine, wie zum Beispiel 600-800 nm für Desmin und 1000 nm für Vimentin. Zusätzlich weist die gemessene Persistenzlänge von ungefähr 420 nm darauf hin, dass sich Dimere innerhalb eines Filaments gegeneinander verschieben können. Liegt die Persistenzlänge von Keratin Filamenten zwischen 120 nm und 800 nm weist dies auf eine flexible Anordnung hin, während eine sehr viel größere Persistenzlänge zwischen 1220 nm und 8100 nm auf eine starre Anordnung der Dimere deuten würde.

Befinden sich die Keratin 8/18 Filamente in einer Umgebung mit gelösten Gegenionen, ändert sich die Persistenzlänge auf Grund der Manning-Kondensation. Die theoretisch berechnete Änderung von $\mathrm{L}_{P,el} = 1,2 \cdot 10^{-15}\,\mathrm{m}$ ist jedoch mit der angewandten Methode nicht messbar. Dies wurde auch durch die experimentellen Ergebnisse bestätigt. Bei einer Polymerisation mit 0,5 mM $MgCl_2$ ergab sich eine Persitenzlänge von $\mathrm{L}_{P,el} = 440\,\mathrm{nm} \pm \mathrm{nm}$. Dieses Ergebnis liegt im Bereich der Persistenzlänge ohne Magnesiumchlorid von $\mathrm{L}_P = 420 \pm 50\,\mathrm{nm}$.

Der zweite Teil der Arbeit diskutiert die Netzwerkeigenschaften von Keratin 8/18 Netzwerken. Dazu gehören nanomechanische Eigenschaften, wie der dynamische

Schermodul, und strukturelle Eigenschaften der Netzwerke, wie die Maschengröße und die Filamentlänge zwischen benachbarten Kreuzungspunkten.

In einem ersten Schritt wurde der dynamische Schermodul der in vitro assemblierten Keratin 8/18 Netzwerke mit dem der extrahierten Keratin Zytoskelette von Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie Panc-1 verglichen. Dabei nimmt der Speichermodul G' mit steigender Entfernung vom Zellkern ab und ist ungefähr einen Faktor 11 größer als der des in vitro assemblierten Netzwerks, wohingegen der Verlustmodul G" bei steigender Entfernung zum Zellkern keine klare Tendenz aufweist und ungefähr einen Faktor 3,5 kleiner ist als der Velustmodul des in vitro Netzwerks. Dieses Verhalten lässt sich mit Unterschieden in der Netzwerkstruktur erklären. Das in vitro assemblierte Netzwerk besteht aus verschlauften Einzelfilamenten mit wenigen zufälligen y-Verzweigungen, während das in vivo Netzwerk ein konstruiertes verbundenes Netzwerk ist. Auch in der Iso-Oberflächen-Darstellung der Punktwolken der fluktuierenden Mikropartikel zeigen sich die Unterschiede in der Netzwerkmorphologie. Die Partikel im extrahierten Zytoskelett bewegen sich gleichmäßig in alle Richtungen, da sie fest im Netzwerk eingeschlossen sind. Im in vitro Assembly können sich die Partikel hingegen sehr viel freier bewegen, was mit dem Unterschied bei G' übereinstimmt. Dabei ist in der Iso-Oberflächen-Darstellung der ungefähre, gitterartige Verlauf des Filamentnetzwerks zu erkennen.

Um die morphologischen Unterschiede auszugleichen, wurden in einem zweiten Schritt die in vitro assemblierten Netzwerke durch Zugabe bivalenter Magnesiumchloridionen vernetzt. Dies hat zur Folge, dass G' bei steigender $MgCl_2$-Konzentration signifikant ansteigt. Zusätzlich nimmt die Frequenzabhängigkeit ab, sodass G' für höhere Vernetzungsdichten einen nahezu konstanten Wert annimmt. Das Speichermodul des Netzwerks verhält sich also für hohe Magnesiumchloridkonzentrationen wie bei einem elastischen Festkörper mit konstantem G'. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für Neurofilamentnetzwerke festgestellt [83]. Der frequenzabhängige Verlauf zeigt für G" ab einer Ionenkonzentration von 1 mM $MgCl_2$ ein Minimum, dass sich für steigende Konzentrationen in Richtung höherer Frequenzen verschiebt. Entgegen der theoretischen Vorhersagen für einen elastischen Festkörper verschwindet G" nicht und der Schermodul des Netzwerks behält einen viskosen Anteil. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für in vitro assemblierte Aktinnetzwerke beobachtet [52]. Die frequenzabhängigen Verläufe

von G' und G" überkreuzen sich entgegen der theoretischen Vorhersagen bei den verbundenen Netzwerken nicht. G' dominiert über den ganzen Frequenzbereich, wobei die Differenz zwischen G' und G" für steigende $MgCl_2$-Konzentrationen weiter zunimmt. Nur bei den verschlauften Netzwerken ohne Magnesiumchlorid folgen G' und G" dem theoretisch vorhergesagten Verlauf und überkreuzen sich bei zwei Grenzfrequenzen. Hier tritt jedoch kein ausgeprägtes Minimum in der Frequenzabhängigkeit von G" auf.

Auch die Homogenität der Netzwerke wird durch die Zugabe von Magnesiumchlorid beeinflusst. Eine steigende $MgCl_2$-Konzentration bedeutet eine höhere Variabilität der Einzelmessungen und damit eine wachsende Heterogenität des Netzwerks bis hin zur Bündelbildung. Je höher die $MgCl_2$-Konzentration, desto größer ist der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Messungen einzelner Partikel für G'. Dies wird auch durch die REM-Bilder bestätigt. Bei höheren $MgCl_2$-Konzentrationen entstehen "verklebte" Netzwerke, die lokal dichtere Bereiche oder sogar Filamentbündel aufweisen. Abhängig davon, ob die Partikel in Bereichen mit höherer oder niedrigerer Netzwerkdichte fluktuieren, ergeben sich höhere oder niedrigere Werte für G'. Bereits Bereiche, die nur wenige Mikrometer auseinander liegen, können in derselben Messung Werte für G' aufweisen, die sich um den Faktor 16 unterscheiden.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Zusammenhang zwischen der Netzwerkstruktur und dem dynamischen Schermodul. Aus zweidimensionalen REM-Bildern wurden die Strukturparameter Maschengröße und Filamentlänge bestimmt. Sowohl die mittlere Maschengröße als auch die mittlere Filamentlänge nehmen bei steigender $MgCl_2$-Konzentration ab, was in einer Erhöhung der Proteinkonzentration des Netzwerks resultiert. An einen dichteren Bereich, in dem sich das Netzwerk "zusammenzieht", muss sich ein Bereich mit einer niedrigeren Netzwerkdichte und damit Proteinkonzentration anschließen, da die Gesamtkonzentration über das ganze Volumen konstant bleibt und das System abgeschlossen ist. Dieser Effekt erklärt auch den Anstieg des Speichermoduls G'. Die mittlere Filamentlänge verhält sich mit der $MgCl_2$-Konzentration wie $y = ax^b$, wobei die resultierenden Parameter a=172,3 und b=-0,3874 sind. Diese Skalierung ermöglicht es das Morse-MacKintosh-Modell weiterzuentwickeln. Ausgehend von dem Zusammenhang zwischen Filamentlänge und Plateaumodul kann nun eine Beziehung zwischen Vernetzungsdichte und Plateaumodul gebildet werden.

Mit Hilfe der Strukturparameter Maschengröße und Filamentlänge und der $MgCl_2$-Konzentration als Maß für die Vernetzungsdichte wurde mit dem Flory-Modell und dem Morse-MacKintosh-Modell ein Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion hergestellt. Das Flory-Modell beschreibt den Zusammenhang zwischen Vernetzungsdichte und Plateaumodul für gummiartige Materialien. Dabei nimmt das Plateaumodul für steigende Vernetzungsdichten zu. Bei der Anpassung an die Daten zeigt sich, dass es zwei Bereiche gibt. Für niedrige Vernetzungsdichten bis 1 mM $MgCl_2$ stimmen die Daten sehr gut mit dem Modell überein, unterschätzen aber im weiteren Verlauf das Verhalten des Plateaumoduls für größere Vernetzungsdichten. Ab 1 mM $MgCl_2$ muss das Modell mit einem zweiten Parametersatz an die Daten angepasst werden. Diese Aufteilung lässt sich mit dem Auftreten von Filamentbündeln ab einer Konzentration von 1 mM $MgCl_2$ erklären und wurde auch für Aktin-Netzwerke beobachtet [52]. Die Filamentbündel besitzen im Vergleich zu den Einzelfilamenten eine höhere Steifigkeit und tragen so zusätzlich zur Erhöhung des Plateaumoduls bei. Im Bereich niedrigerer $MgCl_2$-Konzentrationen spielt also vor allem die Vernetzungsdichte eine Rolle, während bei höheren $MgCl_2$-Konzentrationen ein zusätzlicher Beitrag durch die Bündelung und damit der Erhöhung der Steifigkeit das Plateaumodul beeinflusst.

Das Morse-MacKintosh-Modell kann auf Grund der in dieser Arbeit gewonnen Erkentnisse vereinfacht werden. Die Persistenzlänge für Keratin 8/18 Filament wurde zu $L_P = 420 \pm 50\,\mathrm{nm}$ bestimmt. Es hat sich gezeigt, dass die Persistenzlänge im Rahmen der Messgenauigkeit unabhängig von den verwendetetn $MgCl_2$-Konzentrationen ist. Somit kann sie dem konstanten Teil der Morse-MacKintosh-Formel zugeordnet werden. Weiter wurde für die mittlere Filamentlänge eine Skalierung in Abhängigkeit der $MgCl_2$-Konzentration als Maß für die Vernetzungsdichte bestimmt. Daraus folgt, dass sich auch aus der Morse-MacKintosh-Formel ein Zusammenhang zwischen Vernetzungsdichte und Plateaumodul ergibt. Berechnet man auf Grundlage der mittleren Filamentlänge den Plateaumodul mit der Morse-MacKintosh-Formel, besteht zwischen den gemessenen Daten und der berechneten Ergebnissreihe eine Abweichung um mehrere Größenordnungen (ungefähr Faktor 150). Die Skalierung des Plateaumoduls mit der Vernetzungsdichte ist für Keratin 8/18 Netzwerke also signifikant niedriger als durch das Morse-MacKintosh-Modell vorausgesagt. Allerdings folgt der Verlauf der Daten in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration dem Modellverlauf. Für große Vernet-

zungsdichten stimmen Daten und Modell überein, während für kleinere Vernetzungsdichten größere Abweichungen hin zu einem höheren Plateaumodul auftreten. Das Morse-MacKintosh-Modells geht von affinen Deformationen isotroper Netzwerke aus semiflexiblen Filamenten aus. Da die Deformation von Polymernetzwerken sehr strukturempfindlich ist, können lokale Bündelung oder Konzentrationsunterschiede, die durch das Magnesiumchlorid hervorgerufen werden, zu den Abweichungen des Plateaumoduls von der Modellvorhersage führen.

Die Bestimmung der Strukturparameter der Netzwerke aus zweidimensionalen REM-Bildern bedeutet, dass die Längen eine zweidimensionale Projektion sind. Durch die zweidimensionale Projektion des dreidimensionalen Netzwerks kann die Maschengröße zusätzlich nicht als ein Volumen bestimmt werden, wie es in einem dreidimensionalen Netzwerk der Fall ist, sondern als Fläche. Diese Projektion verfälscht die Ergebnisse hin zu kleineren mittleren Filamentlängen und Maschengrößen. Durch die dreidimensionale Abbildung der Netzwerke mit Hilfe der EM-Tomographie vermeidet man die Projektion und kann die Filamente im Raum segmentieren. Die Maschengröße kann in drei Dimensionen zum Beispiel als das Volumen des größten Kreises der in die Masche passt bestimmt werden. Zusätzlich liefert das Tomogramm zusätzliche Informationen darüber, ob zwei Filamente an einem Kreuzungspunkt verbunden sind oder sich in unterschiedlichen Ebenen überlagern.

Zusammenfassend stellen in vitro assemblierte Keratin 8/18 Netzwerke ein vielversprechendes Modell für das Keratin-Zytosklett der Zelle dar. Basierend auf den hier vorgenommenen Untersuchungen kann mit Hilfe weiterer Netzwerkoptimierungen ein Bottom-Up-Modell der Zellmechanik entwickelt werden.

Kapitel 6

Ausblick

Die Netzwerkeigenschaften in vitro assemblierter Keratin 8/18 Netzwerke sind nach wie vor noch nicht vollständig verstanden. In diesem Kapitel werden einige Ideen aufgezählt, die helfen sollen, ausgehend von der vorliegenden Arbeit, diese näher zu charakterisieren.

Auf der Einzelfilamentebene ist nicht nur die Assemblykinetik der Filamentlängen interessant. Auch die Entwicklung des Filamentdurchmessers während der Assemblyphasen kann aufbauend auf der hier verwendeten Probenpräparation untersucht werden. Erste Arbeiten dazu wurden in der Diplomarbeit von Ines Martin [56] geleistet. Weitergehend würde es sich anbieten, zusätzlich zu den Präparationen auf Oberflächen Messmethoden zu nutzen, die keine Wechselwirkung mit einem Substrat besitzen. Hier kommen Cryopräparationen für das REM oder auch Röntgenstreuung in Lösung in Betracht. Zusätzlich könnten mit Rastertransmissionselektronenmikroskopie (englisch: "Scanning Transmission Electron Microscopy", abgekürzt: STEM) nicht nur der Durchmesser, sondern auch die Massenverteilung entlang der Filamente gemessen werden [36].

Bei der Bestimmung der Persistenzlänge hat sich ergeben, dass die Filamente für längere Konturlängen scheinbar steifer werden. Weiterführende Messungen längerer Filamente, zum Beispiel mit einem TIRF-Mikroskop (von englisch: "Total internal reflection fluorescence", abgekürzt: TIRF), könnten helfen festzustellen, ob sich die Persitenzlänge nach längeren Äquilibrationszeiten ändert oder tatsächlich abhängig von der Konturlänge ist.

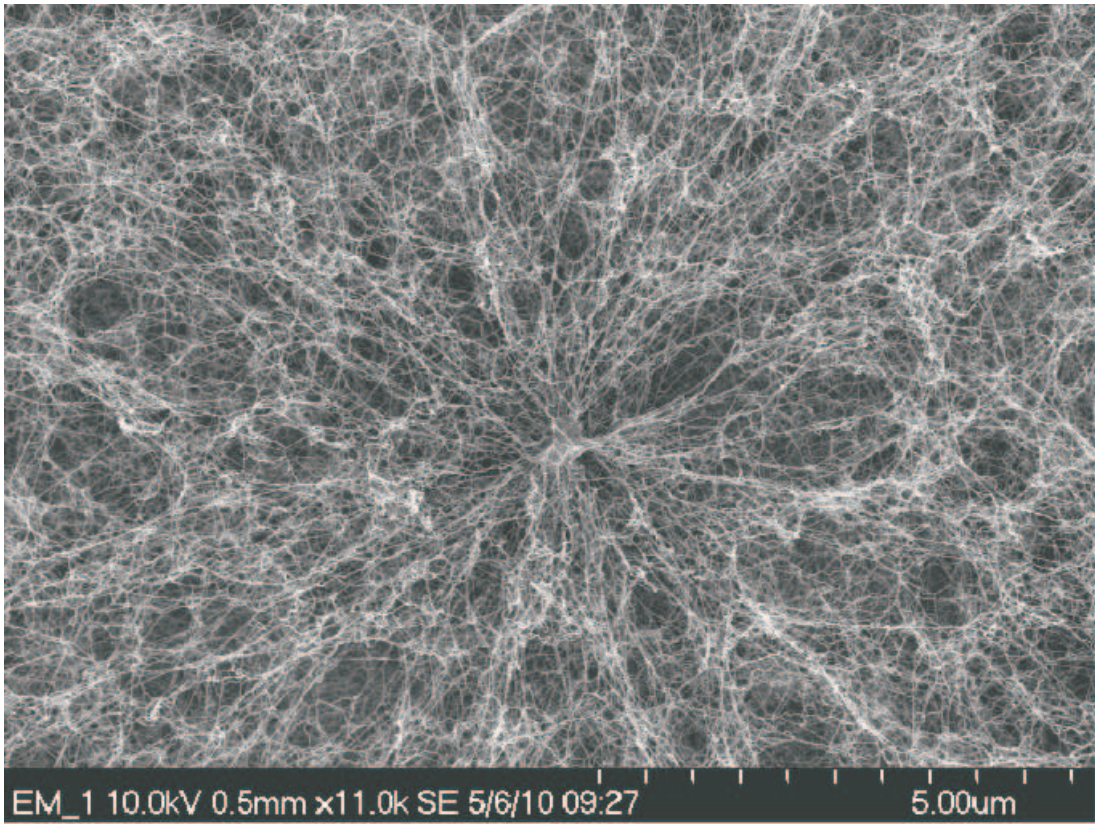


Abbildung 6.1: Radiales Keratin 8/18 Netzwerk.

Auf der Netzwerkebene können mehrere Parameter verändert werden, um das in vitro Assembly dem Zellzytoskelett anzugleichen. Die Messungen mit Magnesiumchlorid als künstlicher Vernetzer haben ergeben, dass die Filamente bei höheren Konzentrationen auf der ganzen Länge verkleben und sich so die Netzwerkstruktur massiv ändert. Um das zu verhindern, können spezifische Vernetzerproteine wie Plektin benutzt werden, die die Keratin Filamente über ihre C-terminalen Tail Bereiche verknüpfen können. Zusätzlich kann mit Plektin-beschichteten Mikropartikeln die Polymerisationsrichtung gesteuert werden. Erste Vorversuche, siehe Abbildung 6.1, haben gezeigt, dass die Filamente ausgehend von künstlichen Zentren radial polymerisieren.

Diese Änderungen des Assembly-Prozeses können helfen, das in vitro assemblierte Keratin 8/18 Netzwerk der Struktur des in vivo Keratin Zytoskeletts anzugleichen.

Der Gelpunkt wurde mit den bildgebenden Verfahren auf eine Assemblytempe-

ratur größer als 30° C und eine Polymerisationszeit zwischen 600 Sekunden und 1200 Sekunden eingegrenzt. Hier können detaillierte Messungen dazu beitragen, die präzisen Gelierungsbedingungen zu definieren. Zusätzlich können mit rheologischen Methoden Messungen der Änderung des mechanischen Verhaltens durchgeführt werden oder mit Viskosimetermessungen die Änderung der Viskosität überprüft werden. Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten mikrorheologischen Messungen wurden bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und einer Temperatur von 22° C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde keine Gelierung festgestellt. In einer temperaturkontrollierten Umgebung bei 37° C kann möglicherweise der Wechsel des Assemblys in den Gelzustand anhand der Änderung des dynamischen Schermoduls nachvollzogen werden.

Wie bereits in Kapitel 4, Abschnitt 4.2.7 besprochen, enthält die Bestimmung der Strukturparameter der Netzwerke einen Fehler durch die zweidimensionale Projektion des dreidimensionalen Netzwerks. Durch die dreidimensionale Abbildung der Netzwerke mit Hilfe der EM-Tomographie kann dieses Problem umgangen werden. Ausgehend von der dreidimensionalen Netzwerkstruktur können Modelle für die Netzwerkmechanik und Kraftübertragung in Netzwerken, wie zum Beipiel Isostatik [17], überprüft und weiterentwickelt werden. Dabei können auch Messungen mit Hilfe der aktiven Mikrorheologie zum Beispiel mit einer optischen Falle helfen, die Mechanismen der Kraftübertragung in Keratin 8/18 Netzwerken zu untersuchen.

Abstract

The purpose of this thesis was to analyze the nanomechanical properties of the intermediate filament protein keratin 8/18 on the filament and on the network level.

In a first step the assembly kinetics of single filaments were found to follow the Schulz-Zimm-distribution for molecular weights. The longer the polymerisation time and the higher the temperature are, the longer the filaments become until they reach a saturation limit. This limit depends on the protein concentration and on the temperature.

To determine the nanomechanical properties of single filaments, the persistence length was calculated from two dimensional AFM pictures. Using different substrates, the persitence length was found to be $L_P = 420\,\mathrm{nm} \pm 50\,\mathrm{nm}$. In the presence of $MgCl_2$ there was no significant change.

By increasing the protein concentration to 0.5 mg/ml, the filaments form entangled networks. These networks were found to resemble to the keratin networks extracted from human pancreatic carcinoma cells, line Panc-1. Comparing the dynamic shear moduli of both network types showed a higher storage modulus for the extracted network than for the in vitro assembly but a lower loss modulus of the extracted network than for the in vitro assembly. This divergence can be explained by structural differences between the two network types. The in vitro assembly is an entangled selfassembled network with rare y-branching events whereas the extracted cytoskeleton is a cross-linked network constructed with the help of many linker proteins.

To overcome these morphological differences, bivalent ions, such as magnesium chloride, were used as chemical cross linker. Concentrations from 0.25 mM $MgCl_2$

to 2 mM $MgCl_2$ lead to a higher storage modulus and a higher loss modulus. Additionally, the frequency dependency of the storage modulus decreases as observed for other IF proteins. For concentrations up to 1 mM $MgCl_2$ the effect on the loss modulus is not that pronounced. But for higher concentrations the frequency dependency of the loss modulus shows a minimum that shifts to higher frequencies with increasing crosslinker concentrations. This behavior is predicted by theory and has been described for crosslinked actin networks earlier.

To validate two models from polymer physics describing the relation between network structure and plateau modulus, mesh size and entanglement length were calculated from two-dimensional REM pictures. This parametrisation showed a decreasing meshsize and filament length with higher $MgCl_2$ concentrations. The resulting higher protein concentration explains the increase in the moduli with higher crosslinker concentrations.
The model proposed by Flory relates the plateau modulus with the crosslinking density. For lower $MgCl_2$ concentrations up to 1 mM the model fits the data quite well, but underestimates the plateau modulus for higher concentrations. This separation can be explained with the structural differences, mainly the occurrence of bundles, above a concentration of 1 mM $MgCl_2$. Contributing to the stiffness of the network additionally to the crosslinking effects, these bundles are expected to increase the storage modulus.
The Morse-MacKintosh-model relates the plateau modulus to the persistence length and the entanglement length of the network. By using the results above, the persistence length is found to stay constant and the entanglement length scales with the $MgCl_2$ concentration, the model can be reduced to relate crosslinker density and plateau modulus. The model highly overestimates the modulus but the data follows the characteristic trend.

Summing up, in vitro assembled keratin 8/18 networks represent a promising model system to construct a bottom-up model of cell mechanics.

Anhang A

Protokolle für die Proteinpräparation

Die Proteindimere werden im Dkfz Heidelberg aufgereinigt und liegen in 6 M Harnstoff vor.

Start:

- K 8 Monomere in 6 M Urea
- K 18 Monomere in 6 M Urea

Für die Proteinpräparation müssen die Dimerlösungen äquimolar gemischt werden und aus dem Harnstoffpuffer in ein Trispuffersystem dialysiert werde. Dafür müssen folgende Schritte durchgeführt werden:

- Bestimmung der Proteinkonzentration, siehe Protokoll Bradfordtest A.1
- K 8 und K 18 Monomere äquimolar mischen
- 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Dialyse, siehe Protokoll Dialyse A.3
- Bestimmung der Proteinkonzentration, siehe Protokoll Bradfordtest A.1
- Assembly starten, siehe Protokoll Assembly A.4

Im Anschluss können aus der Assembly-Lösung Proben für das REM, TEM, AFM

oder für mikrorheologische Messungen präpariert werden.

A.1 Bradfordtest

Zur Bestimmung der Konzentration der Proteinlösungen wird der Bradfordtest genutzt.

Bio-Rad-Lösung:

- 3 ml Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- 12 ml Milliporewasser

Bovine serum albumin (BSA) 1 mg/ml:

- 50 mg BSA
- auffüllen auf 50 ml
- in Eppendorfgefäße abfüllen und einfrieren

Kalibrierung mit BSA:

- 6 Eppendorfgefäße, pro Gefäß 1 ml Bio-Rad-Lösung
- 1. Eppendorfgefäß schließen
- 2. Eppendorfgefäß 2 µl BSA, sofort schließen und schütteln
- 3. Eppendorfgefäß 4 µl BSA, sofort schließen und schütteln
- 4. Eppendorfgefäß 6 µl BSA, sofort schließen und schütteln
- 5. Eppendorfgefäß 8 µl BSA, sofort schließen und schütteln
- 6. Eppendorfgefäß 10 µl BSA, sofort schließen und schütteln
- umfüllen in Plastikküvetten (UV-Küvette, halbmikro, Brand)
- Photometermessung

Probenwerte:

- 4 Eppendorfgefäße, pro Gefäß 1 ml Bio-Rad-Lösung

- jeweils 6 µl Protein dazu, sofort schließen und schütteln
- umfüllen in Plastikküvetten
- Photometermessung

Aus den vier ausgegebenen Konzentrationswerten muss der Mittelwert gebildet und durch sechs geteilt werden. Damit erhält man die Proteinkonzentration der Lösung in mg/ml.

A.2 Dialyseschläuche

Die Dialyseschläuche müssen vor der Verwendung ausgekocht werden. Dialyseschläuche (Servapor, 6 mm, 12.000-14.000 MWCO)

Puffer - 2l:

- 33,7 g Na-bicarbonat
- 3,72 g Ethylendiamintetraacetat
- bis 2 l mit Milliporewasser auffüllen

Kochen:

- ca 1 m Schlauch abmessen
- in 1 l Puffer auf 95° C erhitzen, 5 min kochen
- Puffer abschütten und mit Milliporewasser spülen
- 1 l Puffer dazugeben
- 5 min kochen
- Puffer abgießen
- 4 mal mit Milliporewasser spülen
- in 10% Ethanol im Kühlschrank lagern

Die Dialyseschläuche können für sechs Monate in 10% Ethanol im Kühlschrank gelagert werden.

A.3 Dialyse

Um die Proteine aus der Harnstoffumgebung in ein Trispuffersystem zu überführen, wird ein Dialyseverfahren genutzt. Dafür werden folgende Puffer benötigt:

10 M Urea - 500 ml:

- 300 g Urea (Urea, analytical grade, Serva)
- bis knapp 500 ml mit doppeldestilliertem Wasser auffüllen
- 1 Löffel Ionenaustauscher (Mixed bed resin TMD8, Sigma-Aldrich) dazu
- rühren, dabei leicht erwärmen, bis alles gelöst ist.
- Auf 500 ml auffüllen

1 x Säulenpuffer, 10 mM Tris, 2 mM DTT, pH 8,5 - 1000 ml:

- 1,21 g Tris (Trizma base, Sigma-Aldrich) abwiegen
- auf 950 ml mit dd Wasser auffüllen
- 2 ml DTT (Dithiothreitol, research grade, Serva) dazu
- pH-Wert einstellen
- auf 1000 ml auffüllen

Dialysepuffer, 2 mM Tris, 1mM DTT, pH 9,0 - 1000 ml:

- 0,24 g Tris abwiegen
- mit dd Wasser auf 950 ml auffüllen
- 1 ml DTT dazu
- pH-Wert einstellen
- auf 1000 ml auffüllen

4 M Harnstoffpuffer, 10 mM Tris, 2 mM DTT, pH 8,5 - 500 ml:

- 200 ml Harnstoff filtern
- 0,605 g Tris dazu

- mit dd Wasser auf 450 ml auffüllen
- 1 ml DTT dazu
- pH-Wert einstellen
- auf 500 ml auffüllen

Die ersten drei Dialysschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt:

- Dialyseschläuche, 6 mm, 12.000-14.000 MWCO
- 3-4 cm Schlauch abschneiden und für 15 min in ein Plastikbecher mit Harnstoffpuffer legen
- danach Schlauch mit Dialyseklammern verschließen und mit dd Wasser spülen
- 200 µl Protein in den Schlauch und zuklammern
- 20 min in 400 ml Harnstoffpuffer rühren lassen
- 200 ml abschütten und mit 200 ml 1 x Säulenpuffer auffüllen
- 20 min rühren lassen
- alles abschütten mit 400 ml 1 x Säulenpuffer auffüllen und 20 min rühren lassen
- danach in 500 ml Dialysepuffer bei 4° C über Nacht rühren lassen

Das Protein kann für zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

A.4 Assembly

Um die Polymerisation zu starten, muss der pH-Wert der Proteinlösung verringert werden.

10 x Assembly-Puffer, 100 mM Tris, pH 7,0 - 1000 ml:

- 12,114 g Tris abwiegen
- mit dd Wasser auf 900 ml auffüllen

- pH-Wert einstellen
- auf 1000 ml auffüllen

Glutaraldehyd 0,2% - 400 µl:

- 40 µl 10 x Assemblypuffer
- 3,2 µl 25% Glutaraldehyd (Glutaraldehyd 25%, Agar Scientific Ltd)
- 356,8 µl Dialysepuffer

Um die Polymerisation zu starten, muss der pH-Wert der Proteinlösung verringert werden.

- Konzentration bestimmen mit Bradford-Test
- gereinigtes Protein mit Dialysepuffer bis zur gewünschten Konzentration verdünnen
- zum Starten des Assemblys ein Zehntel der Gesamtmenge an 10 x Assemblypuffer oder die gleiche Menge an 2 x Assemblypuffer hinzufügen
- optional nach verschiedenen Zeitwerten mit 0,2% Glutaraldehyd abstoppen

Im Anschluss können aus der Assembly-Lösung Proben für das REM, TEM, AFM oder für mikrorheologische Messungen präpariert werden.

Literaturverzeichnis

[1] *http://mechmat.caltech.edu/ kaushik/park/1-2-0.htm.*

[2] *http://rsb.info.nih.gov/ij/.*

[3] *http://www.asylumresearch.com/Products/Mfp3DSA/Mfp3DSA.shtml.*

[4] *http://www.interfil.org/proteinsTypeInII.php.*

[5] *http://www.mikrophotographie.de/fluoreszenz.htm.*

[6] *http://www.nanomat.de.*

[7] *media.wiley.com/Lux/36/8536.nfg001.jpg.*

[8] *BioPhotometer Bedienungsanleitung*, Eppendorf AG, Hamburg (2005).

[9] G. Adler, *Has the biology and treatment of pancreatic diseases evolved?*, Best Pract Res Clin Gastroenterol **18**, (2004), Seiten 83–90.

[10] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter, *Handbuch der Molekularen Zellbiologie*, Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim, 4. Aufl. (1999).

[11] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 3. Aufl. (1995).

[12] J. Aue und J. T. M. DeHosson, *Influence of atomic force microscope tip-sample interaction on the study of scaling behavior*, Appl. Phys. Lett. **71**, (1997), Seiten 1347–1349.

[13] M. Beil, H. Braxmeier, F. Fleischer, V. Schmidt und P. Walther, *Quantitative analysis of keratin filament networks in scanning electron microscopy images of cancer cells*, Journal of Microscopy **220**, (2005), Seiten 84–95.

[14] M. Beil, A. Micoulet, G. von Wichert, S. Paschke, P. Walther, M. Omary, P. V. Veldhoven, U. Gern, E. Wolff-Hieber, J. Eggermann, J. Waltenberger, G. Adler, J. Spatz und T. Seufferlein, *Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells*, Nature Cell Biology **5**, (2003), Seiten 803–811.

[15] B. Bhushan, *Springer Handbook of Nanotechnology*, Springer Verlag, 2. Aufl. (2007).

[16] G. Binnig, C. Quate und C. Gerber, *Atomic Force Microscope*, Phys. Rev. Lett. **56 (9)**, (1986), Seiten 930–933.

[17] R. Blumenfeld, *Isostaticity and controlled force transmission in the cytoskeleton: a model awaiting experimental evidence*, Biophysical Journal **91**, (2006), Seiten 1970–1983.

[18] M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem. **72**, (1976), Seiten 248–254.

[19] P. Coulombe und P. Wong, *Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds*, Nature Cell Biology **6**, (2004), Seiten 699–706.

[20] M. Doi und S. Edwards, *The Theory of Polymer Dynamics*, Oxford University Press, 1. Aufl. (1986).

[21] A. Dorrestijn und K. te Nijenhus, *Viscoelastic behaviour during gelation of various molar-mass polyvinylchloride solutions and polymerization temperatures*, Colloid and Polymer Science **268**, (1990), Seiten 895–900.

[22] H.-J. Drotleff, *Zweikörpermikrorheologie an Zytoskelettsystemen*, Diplomarbeit, Universität Ulm (2011).

[23] S. Flegler, J. Heckman und K. Klomparens, *Elektronenmikroskopie*, Spektrum Akademischer Verlag (1993).

[24] F. Fleischer, R. Ananthakrishnan, S. Eckel, H. Schmidt, J. Käs, T. Svitkina, V. Schmidt und M. Beil, *Actin network architecture and elasticity in lamellipodia of melanoma cells*, The New Journal of Phxsics **9**, (2007), Seiten 1–17.

[25] P. Flory, *Effects of molecular structure on physical properties of butyl rubber*, Industrial and Engineering Chemistry **38**, (1946), Seiten 417–436.

[26] P. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Interscience Publishers, New York (1969).

[27] P. Flory, *Principles of polymer chemistry*, Cornell University Press, 9. Aufl. (1975).

[28] P. Freakley und A. Payne, *Theory and practice of engineering with rubber*, Applied Science Publishers Ltd, London, 1. Aufl. (1978).

[29] C. Frontali, E. Dore, A. Ferrauto, E. Gratton, A. Bettini, M. Pozzan und E. Valdevit, *An absolut method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs*, Biopolymers **18**, (1979), Seiten 1353–1373.

[30] E. Fuchs und K. Weber, *Intermediate Filaments: structure, dynamics, function and disease*, Annu. Rev. Biochem. **63**, (1994), Seiten 345–382.

[31] M. Gardel, M. Valentine und D. Weitz, *Microrheology*, Department of Physics and Division of Engineering and Applied Sciences .

[32] P. D. Gennes, *Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles*, The Journal of Chemical Physics **55**, (1971), Seiten 572–579.

[33] H. Herrmann und U. Aebi, *Intermediate Filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions*, Current Opinion in Structural Biology **8**, (1998), Seiten 177–185.

[34] H. Herrmann und U. Aebi, *Intermediate filaments and their associates: multitalented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics*, Current Opinion in Structural Biology **8**, (1998), Seiten 177–185.

[35] H. Herrmann und U. Aebi, *Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds*, Annu. Rev. Biochem. **73**, (2004), Seiten 749–789.

[36] H. Herrmann, M. Häner, M. Brettel, N.-O. Ku und U. Aebi, *Characterization of Distinct Early Assembly Units of Different Intermediate Filament Proteins*, J. Mol. Biol. **286**, (1999), Seiten 1403–1420.

[37] H. Herrmann, M. Häner, M. Brettel, S. A. Müller, K. N. Goldie, B. Fedtke, A. Lustig, W. W. Franke und U. Aebi, *Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: The Role of its Head, Rod and Tail Domains*, J. Mol. Biol. **264**, (1996), Seiten 933–953.

[38] H. Herrmann, T. Wedig, R. M. Porter, E. B. Lane und U. Aebi, *Characterization of Early Assembly Intermediates of Recombinant Human Keratins*, Journal of Structural Biology **137**, (2002), Seiten 82–96.

[39] T. Hill, Biophysical Journal **44**, (1983), Seiten 282–288.

[40] R. Kirmse, S. Portet, N. Mücke, U. Aebi, H. Herrmann und J. Langowski, *A quantitative kinetic model fpr the in vitro assembly of intermediate filaments for tetrameric vimentin*, Journal of Biological Chemistry **282**, (2007), Seiten 18563–18572.

[41] A. Kölsch, R. Windoffer, T. Wärflinger, T. Aach und R. Leube, *The keratin filament cycle of assembly and disassembly*, Journal of Cell Science **123**, (2003), Seiten 2266–2272.

[42] O. Kratky und G. Porod, *Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle*, Rec. Trav. Chim. **68**, (1949), Seiten 1106–1113.

[43] J. Kremer, D. Mastronarde und J. McIntosh, *Computer Visualization of 3-dimensional Image Data using IMOD*, Journal of Structural Biology **116**, (1996), Seiten 71–76.

[44] L. Landau und E. Lifshitz, *Statistical Physics*, Pergamon Press, Oxford, New York, 3. Aufl. (1980).

[45] S. Lück, M. Sailer, V. Schmidt und P. Walther, *Three-dimensional analysis of intermediate filament networks using SEM tomography*, Journal of Microscopy **239**, (2009), Seiten 1–16.

[46] H. Lee, J. Ferrer, F. Nakamura, M. Lang und R. Kamm, *Passive and active microrheology of cross-linked F-actin networks in vitro*, Acta Biomater **6**, (2010), Seiten 1207–1218.

[47] A. Levine und T. Lubensky, *One- and two-particle microrheology*, Physical Review Letters **85**.

[48] J. Lienhard und P. Meyer, *A physical basis for the generalized gamma distribution*, Quarterly of applied Mathematics **25**, (1967), Seiten 330–334.

[49] Y.-C. Lin, C. Broedersz, A. Rowat, T. Wedig, H. Herrmann, F. MacKintosh und D. Weitz, *Divalent cations crosslink vimentin intermediate filament tail domains to regulate network mechanics*, Journal of molecular biology **399**, (2010), Seiten 637–644.

[50] Y.-C. Lin, N. Yao, C. Broedersz, H. Herrmann, F. MacKintosh und D. Weitz, *Origins of elasticity in intermediate filament networks*, Physical Review Letters **104**, (2010), Seiten 0581011–0581014.

[51] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 6. Aufl. (2004).

[52] Y. Luan, O. Lieleg, B. Wagner und A. Bausch, *Micro- and macrorheological properties of isotropically cross-linked actin networks*, Biophysical Journal **94**, (2008), Seiten 699–693.

[53] A. Lupas, *Coiled Coils: new structures and new functions*, Trends Biochem. Sci. **21**, (1996), Seiten 375–382.

[54] F. MacKintosh, J. Käs und P. Janmey, *Elasticity of semiflexible biopolymer networks*, Physical Review Letters **75**, (1995), Seiten 4425–4428.

[55] G. S. Manning, *Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions*, Journal of Chemical Physics **51**, (1969), Seiten 924–933.

[56] I. Martin, *Temperaturabhängige Eigenschaften von Keratin-Filamenten*, Diplomarbeit, Universität Ulm (2011).

[57] M. Martin, K. Mueller, F. Wottawah, S. Schinkinger, B. Lincoln, M. Romeyke und J. A. Käs, *Feeling with Light for Cancer*, Proc. of SPIE **6080**.

[58] T. Mason, *Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized Stokes-Einstein equation*, Rheol Acta **39**, (2000), Seiten 371–378.

[59] T. Mason, K. Ganesan, J. V. Zanten, D. Wirtz und S. Kuo, *Particle tracking microrheology of complex fluids*, Physical Review Letters **79**, (1997), Seiten 3282–3285.

[60] T. Mason und D. Weitz, *Optical measurements of th frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids*, Physical Review Letters **74**, (1995), Seiten 1250–1253.

[61] N. Mücke, *Biophysikalische Untersuchung des muskelspezifischen Intermediärfilament-Proteins Desmin und Mutanten*, Dissertation, Rupprecht-Karls-Universität, Heidelberg (2008).

[62] N. Mücke, K. Klenin, R. Kirmse, M. Bussiek, H. Herrmann, M. Hafner und J. Langowski, *Filamentous biopolymers on surfaces: Atomic force microscopy images compared with brownian dynamics simulation of filament deposition*, Plos one **4**, (2009), Seiten 7756.

[63] D. C. Morse, *Viscoelasticity of tightly entangled solutions of semiflexible polymers*, Physical Review E **58**, (1998), Seiten 1237–1240.

[64] S. Morton und J. Ferry, *Dynamic mechanical properties of polyvinyl chloride gels*, Journal of Physical Chemistry **66**, (1962), Seiten 1639–1645.

[65] N. Mücke, L. Kreplak, R. Kirmse, T. Wedig, H. Herrmann, U. Aebi und J. Langowski, *Assessing the Flexibility of Intermediate Filaments by Atomic Force Microscopy*, Journal of Molecular Biology **335**, (2004), Seiten 1241–1250.

[66] D. Parry und P. Steinert, *Intermediate Filament structure*, Springer Verlag New York, 1. Aufl. (1995).

[67] S. Portet, N. Mücke, R. Kirmse, J. Langowski, M. Beil und H. Herrmann, *Vimentin intermediate filament formation: In vitro measurements and mathemtical modelling of the filament length distribution during assembly*, Langmuir .

[68] C. Rivetti, M. Guthold und C. Bustamante, *Scanning Force Microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis*, J. Mol. Biol. **264**, (1996), Seiten 919–932.

[69] M. Rubinstein und R. H. Colby, *Polymer physics*, Oxford University Press, 6. Aufl. (2007).

[70] E. Ruska, *Über Fortschritte im Bau und in der Leistung des magnetischen Elektronenmikroskops*, Z. Physik **87**, (1934), Seiten 580–602.

[71] E. Sackmann und R. Merkel, *Lehrbuch der Biophysik*, Wiley-VCH Verlag (2010).

[72] C. Schmid, *Ultra structural characterisation of pancreatic cancer cells' intermediate filament network*, Diplomarbeit, Universität Ulm (2011).

[73] I. Schwaiger, C. Sattler, D. Hostetter und M. Rieff, *The myosin coiled-coil is a truly elastic preotein structure*, Nature Materials **1**, (2002), Seiten 232–235.

[74] P. M. Steinert, *The two chain coiled coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-typeII heterodimer*, J. Biol. Chem. **265**, (1990), Seiten 8766–8774.

[75] P. M. Steinert, L. Marekov und D. Parry, *Diversity in intermediate filament structure*, J. Biol. Chem. **268**, (1993), Seiten 24916–24925.

[76] C. Tanford, *Physical Chemistry of Macromolecules*, John Wiley, Inc., 1. Aufl. (1961).

[77] U. Ulm, *Sonderforschungsbereich 518 - Entzündung, Regeneration und Transformation im Pankreas* (2007-2010).

[78] T. Uyeda, P. Abramson und J. Spudich, *The neck region of the myosin motor domain ants as lever arm to generate movement*, Proc. Natl. Acad. Sci. **93**, (1996), Seiten 4459–4464.

[79] N. Wang und D. Stamenovic, *Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening and growth*, Am Journal Physiol Cell Physiol **279**, (2000), Seiten 188–194.

[80] R. Windoffer, M. Beil, T. Magin und R. Leube, *The Dynamics of Keratin Intermediate Filaments in Epithelia*, Journal of Cell Biology .

[81] D. Wirtz, *Particle-Tracking microrheology of living cells: Principles and applications*, Annual Review of Biophysics **38**, (2009), Seiten 301–326.

[82] K. Wolf, I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. von Adrian, E. Deryugina, A. Stronging, E. Brocker und P. Friedl, *Compensation Mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericular proteolysis*, Journal of Cell Biology **160**, (2003), Seiten 267–277.

[83] N. Yao, C. Broedersz, Y.-C. Lin, K. Kasza, F. MacKintosh und D. Weitz, *Elasticity in ionically cross-linked neurofilament networks*, Biophysical Journal **98**, (2010), Seiten 2147–2153.

Abbildungsverzeichnis

2.1 Aufbau einer Eukaryontenzelle 6
2.2 Verteilung der Filamenttypen in der Zelle 7
2.3 Fluorezenzmarkierte Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli 8
2.4 Sekundärstruktur der Proteine: α-Helix und β-Faltblatt 9
2.5 Struktur eines α-helikalen Coiled-Coils 10
2.6 Wechselwirkung der hydrophoben Seitenketten im Heptad repeat 11
2.7 Assemblygruppen 13
2.8 Anordnung der Dimere im Querschnitt 14
2.9 Polymerisationsschritte 16
2.10 Bildung eines Unit Length Filaments 16
2.11 Longitudinale Verbindung der ULFs 17
2.12 Polymorphismus 17
2.13 Schematische Darstellung einer Polymerkette 28
2.14 Manning-Kondensation 32
2.15 Viskoelastizität 34

3.1 Prinzipieller Aufbau eines AFM 42
3.2 Kraft vs. Abstand Spitze - Probe 43
3.3 Degradation der Bildinformation 44
3.4 Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops 49
3.5 Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops 50
3.6 Aufbau für die Mikrorheologie 52
3.7 Aufbau für die Mikrorheologie 52
3.8 Probenkammer für die mikrorheologischen Messungen 53
3.9 Auschnitt Mikrorheologie 53

4.1 Beispiel für ein segmentiertes Filament im TEM-Bild 67
4.2 Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=4° C und t=10 s 68
4.3 Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=22° C und t=1200 s 68
4.4 Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=4° C und t= 60s 69
4.5 Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=22° C und t=1200 s 70
4.6 Längenverteilung für c=0,5 mg/ml, T=30° C und t=600 s 70
4.7 Längenwachstum für 0,5 mg/ml Proteinkonzetration 71
4.8 Längenwachstum für 0,5 mg/ml Proteinkonzetration 73
4.9 Längenwachstum für 0,1 mg/ml Proteinkonzetration 74
4.10 TEM-Bild eines Keratin Gels 76
4.11 TEM-Bild eines Keratin Gels mit Bündelbildung 76
4.12 Massengewichtung für 37° C, 5 min und 0,1 mg/ml. 77
4.13 Nachgezeichnete Filamentkonturen zur Bestimmung der Persistenzlänge 79
4.14 Persistenzlänge bei 0,5 mM $MgCl_2$ 83
4.15 Vergleich Zellnetzwerk - in vitro assembliertes Keratin 8/18 Netzwerk 88
4.16 Vergleich des dynamischen Schermoduls in vivo und in vitro . . . 89
4.17 Punktwolke eines Mikropartikels in der Iso-Oberflächen-Darstellung 91
4.18 Speichermodul in Abhängigkeit von der $MgCl_2$ Konzentration . . 92
4.19 Verlustmodul in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration . . . 93
4.20 G' und G" der in vitro polymerisierten Netzwerke ohne Zusatz von $MgCl_2$ 94
4.21 G' und G" der in vitro polymerisierten Netzwerke bei 1,5 mM und 2 mM $MgCl_2$ 95
4.22 Änderung der Netzwerkstruktur bei unterschiedlichen Polymerisationsbedingungen 96
4.23 Mögliche Crosslink-Konfigurationen 97
4.24 Verteilungen der Maschengröße 98
4.25 Maschengröße in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration . . . 99
4.26 Verteilungen der Filamentlänge 100
4.27 Fit: Filamentlänge in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration 100
4.28 Speichermodul für verschiedene Partikel bei 0 mM $MgCl_2$ 101
4.29 Speichermodul für verschiedene Partikel bei 1 mM $MgCl_2$ 102
4.30 Speichermodul für verschiedene Partikel bei 2 mM $MgCl_2$ 103

4.31 TEM-Bild eines Keratin Bündels 104
4.32 Lichtmikroskopaufnahme eines Keratin Bündels 104
4.33 Plateaumodul in Abhängigkeit von der Vernetzungsdichte mit dem Flory Modell 105
4.34 Plateaumodul in Abhängigkeit von der Filamentlänge mit dem Morse-MacKintosh-Modell 107
4.35 REM-Bild des Tomogramms 108
4.36 Ebene aus dem Tomogramm 109

6.1 Radiale Polymerisation 124

Tabellenverzeichnis

2.1 Typen von Intermediärfilamenten 12

3.1 Cantilevereigenschaften 47

4.1 Parameter für die Assemblykinetik 66
4.2 Assemblykinetik für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration 71
4.3 Fitparameter für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration 72
4.4 Fitparameter für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration 73
4.5 Assemblykinetik für 0,1 mg/ml Proteinkonzentration 74
4.6 Fitparameter für 0,5 mg/ml Proteinkonzentration 75
4.7 Gelierung bei der Probenpräparation 76
4.8 Persistenzlänge 81
4.9 Strukturdifferenzen 90
4.10 Maschengröße 98
4.11 Filamentlänge 99

Danksagung

Allen, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich danken:

- Prof. Dr. sc. nat. ETH Zürich Othmar Marti für das Projekt und die Betreuung dieser Arbeit, die Möglichkeit eigene Ideen umzusetzen und seine große Hilfs- und Diskussionbereitschaft,
- Prof. Dr. Kay Gottschalk für die Übernahme des Zweitgutachtens,
- Prof. Dr. Michael Beil für die vielen Ideen, Denkanstöße und hilfreichen Diskussionen,
- Tobias Paust für die gute Zusammenarbeit und für seine Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit,
- Ines Martin für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung durch ihre Diplomarbeit und für ihre Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit,
- Thorsten Robel für seine Hilfe bei Messungen und Auswertungen,
- Kirsten Dammertz für ihre Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit,
- Stefan Fischer für seine Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit,
- Ulla Nolte für ihre Hilfe bei allen biologischen Fragen,
- Anne-Marie Saier und Monika Asbach für ihre Hilfe bei allen technischen Fragen der Probenpräparation,
- Tamara Stadter für ihre Aufmunterung und Unterstützung bei all den nichtphysikalischen Problemen,

- allen Mitglieder der Arbeitsgruppe Funktionelle Zellarchitektur des Dkfz Heidelberg, vor allem Prof. Dr. Harald Herrmann-Lerdon,
- allen Mitglieder der Zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm, vor allem Prof. Dr. Paul Walther, Eberhard Schmid für die Hilfe bei der Probenpräparation und Christopher Schmid für die Hilfe bei der Aufnahme des REM-Tomopgramms,
- allen Mitglieder des Instituts für Experimentelle Physik für die gute Arbeitsatmosphäre und drei tolle Jahre.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben:

Name	Anke Leitner
Anschrift	Ulm
E-mail	anke.leitner@uni-ulm.de
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	13.08.1984
Geburtsort	Karlsruhe

Ausbildung und Promotion:

Seit April 2008	Promotion im Institut für Experimentelle Physik bei Professor Othmar Marti an der Universität Ulm; Thema: "Nanomechanische Eigenschaften von Keratin 8/18 - Von Einzelfilamenten zu Netzwerken"
Okt. 2002 - April 2008	Studium der Wirtschaftsphysik, Universität Ulm, Diplom, Gesamtnote: sehr gut (1,1)
Sept. 1996 - Juni 2002	Tulla-Gymnasium Rastatt, achtjähriger gymnasialer Bildungsweg, Leistungskurse: Mathematik, Physik, Abschlussnote: 1,9
Sept. 1992 - Juni 1996	Hans-Thoma-Grundschule Rastatt

Auslandsaufenthalt und praktische Erfahrungen:

Okt. 2006 - März 2007	Sechsmonatiges Praktikum bei der Ernst&Young AG (München) im Bereich Wirtschaftsprüfung
Jan. 2006 - Feb. 2006	Praktikum bei der Patentanwaltskanzlei Pfenning, Meinig & Partner (München)
Aug. 2005 - Jan. 2006	Studium der Physik, Universität Uppsala, Schweden

Lehrtätigkeiten:

- Leitung von Versuchen im Fortgeschrittenen Praktikum der Physik, Uni Ulm, "Nichtlineare Optik" und "Rasterkraftmikroskopie".
- Betreuung von Tutorien zur Vorlesung Physik für Naturwissenschaftler, Uni Ulm.
- Betreuung eines Tutoriums zur Vorlesung Elektrizitätslehre und Magnetismus, Uni Ulm.
- Betreuung von Diplomarbeiten und Hilfskräften.

Publikationen

Präsentationen

- DPG Frühjahrstagung Berlin 2008, Posterpräsentation: In Vitro Assembly And Characterization Of Keratin Intermediate Filaments
- FEBS Workshop, Mechanics and Dynamics of the Cytoskeleton, Potsdam 2008, Posterpräsentation: In Vitro Assembly And Characterization Of Keratin Intermediate Filaments
- Gordon research Conference Intermediate Filaments, Oxford 2008, Posterpräsentation: In Vitro Assembly And Characterization Of Keratin Intermediate Filaments
- DPG Frühjahrstagung Dresden 2009, Posterpräsentation. In vitro assembly and characterization of keratin 8/18 intermediate filaments
- International Symposium Cytoskeletal dynmaics and image analysis, Aachen 2009, Vortrag: Comparison of nanomechanical properties of in vivo and in vitro keratin 8/18 networks
- DPG Frühjahrstagung Regensburg 2010, Posterpräsentation: Comparison of nanomechanical properties of in vivo and in vitro keratin networks
- Gordon research Conference Intermediate Filaments, Tilton NH 2010, Posterpräsentation: Probing the structural conformation of polymer networks with embedded nanoparticles
- DPG Frühjahrstagung Dresden 2011, Posterpräsentation: Investigation of the nanomechanical properties of in vitro assembled keratin 8/18 networks

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die von mir vorgelegte Dissertation ist bisher nicht im In- oder Ausland in dieser oder ähnlicher Form in einem anderen Promotionsverfahren vorgelegt worden.

Ulm, den