GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT
GÖTTINGEN

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Bachelorarbeit

Charakterisierung aktiver Mikrotubuli Netzwerke

Characterization of active microtubule networks

angefertigt von

Tobias Strübing

aus Hohenmölsen

am Max Planck Institut für Dynamik und Selbstorganisation

Abgabedatum: 6. September 2018

Erstgutachterin: Dr. Isabella Guido

Zweitgutachter: Prof. Dr. Eberhard Bodenschatz

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Theorie **3**

2.1 Polymerisation der Mikrotubuli 3

3 Materialien und Methoden **7**

3.1 Oszillierende Mikrotubuli 7

3.1.1 Herstellen der Mikrotubuli 7

3.1.2 Herstellung der bewegenden Bündel 7

3.2 Mikrotubuli Netzwerke 8

3.2.1 Kontraktion in Astern 8

3.2.2 PDMS Mikrofluid Kanäle 8

3.2.3 Kontraktion im PDMS Kanal 9

3.2.4 Mikroskopie 9

3.2.5 Analyse 10

4 Auswertung und Diskussion **11**

4.1 Fehlerrechnung 11

4.2 Oszillierende Mikrotubuli 11

4.2.1 Bewegende Bündel 11

4.3 Netzwerke 13

4.3.1 Kontraktion in Astern 13

4.3.2 Kontraktion der Schichtdicke 17

4.3.3 Musterbildung 27

4.3.4 Fourieranalyse der Musterbildung 35

5 Zusammenfassung und Ausblick **39**

6 Verwendete Protokolle **41**

6.1 Mikrotubuli 41

6.2 Bewegende Bündel 41

7 Programme **45**

7.0.1 Kontraktion auswerten 45

7.0.2 Analyse der Musterbildung 49

1 Einleitung

Das Cytoskelett besteht aus Mikrotubuli, Aktin und Intermediärfilamenten und ist, zusammen mit Crosslinkern und molekularen Motoren, für die Selbstorganisation im Inneren der Zelle verantwortlich. Des Weiteren ist es für den Transport im Inneren, die Zellteilung, die Fortbewegung und die Form der Zelle zuständig [9]. Weiterhin bleibt aber unklar, wie die Interaktion zwischen Filamenten, verschiedenen Motorproteinen und anderen Bestandteilen die Netzwerkbildung beeinflusst [4]. Es besteht die Möglichkeit Versuche *in-vivo* und *in-vitro* durchzuführen, wobei der Nachteil von *in-vivo* die große Anzahl der Bestandteile im Cytoskelett und die Komplexität der Interaktionen ist [9]. Der Vorteil von *in-vitro* liegt darin, dass man die einzelnen Bausteine getrennt voneinander untersuchen und variieren kann. Andere Arbeiten zeigten bisher, dass durch die Verbindung von Mikrotubuli und Dynein eine Kontraktion zu beobachten ist [4]. Durch das Austauschen des Motorproteins zu Kinesin wurde ebenfalls eine Asternbildung, ein kontrahierendes oder expandierendes Verhalten festgestellt [9],[4].

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Verbindung der Mikrotubuli und des Kinesin I *in-vitro*. Dabei wurde eine Asternbildung in einem Kanal aus doppelseitigem Klebeband sowie eine Kontraktion in einem PDMS-Mikrofluid-Kanal beobachtet. In diesem Kanal konnte auch eine Kontraktion mit anschließender Expansion beobachtet werden, was so noch nicht zuvor beobachtet werden konnte. Die Kontraktion erfolgte nur in der xy-Ebene, während die Expansion in allen Ebenen stattfand. Eine wellenförmige Musterbildung in der z-Ebene war ebenfalls zu erkennen. Zur Visualisierung wurde dabei ein Fluoreszenzmikroskop benutzt. Die Zusammensetzung der Mikrotubulilösung war dabei stets die gleiche.

Um die Kontraktion und die Musterbildung auszuwerten, wurde die Programmiersprache Python mit den Bibliotheken matplotlib, SciPy und OpenCV verwendet.

2 Theorie

2.1 Polymerisation der Mikrotubuli

Microtubuli sind rohrförmige Strukturen mit einem Außendurchmesser von 25 nm und einer Wandstärke von 4 nm, die aus 13 Protofilamenten bestehen. Diese Filamente bestehen wiederum aus geladenen α und β Dimeren. Da alle Protofilamente die gleiche Polarität haben, befinden sich an einem Ende die α- und am anderen die β-Monomere. Ein Mikrotubuli besitzt ein plus- und ein minus Ende, was aber nichts über die Ladung aussagt. Diese Enden sind ein wichtiger Faktor für die Laufrichtung von Kinesin und Dynein. Die Spiralanordnung der Mikrotubuli entsteht dadurch, dass die angrenzenden Protofilamente etwa um etwa 1 nm versetzt sind [1, S.426]. Der Aufbau ist in Abbildung 2.1 zu sehen. Die einfache Polymerisation kann wie in Gleichung 2.1 und die Depolymerisation wie in Gleichung 2.2 beschrieben werden [3, S.419]. Zur Veranschaulichung dient Abbildung 2.2.

$$\frac{dn}{dt} = +k_{on}\,[M] \tag{2.1}$$

$$\frac{dn}{dt} = -k_{off} \tag{2.2}$$

$$[M]_c = k_{off}/k_{on} \tag{2.3}$$

Dabei ist $\frac{dn}{dt}$ die Änderungsrate, $[M]$ die Konzentration der freien Monomere in der Lösung, k_{on} die Geschwindigkeitskonstante der Polymerisation und k_{off} die Geschwindigkeitskonstante der Depolymerisation. Die minimale Konzentration für die Polymerisation ist $[M]_c$ und wird durch Gleichung 2.3 dargestellt.
Bei dem beschriebenen Modell wird die Hydrolyse vernachlässigt. Wenn man diese mit in Betracht zieht nimmt man an, dass die Bausteine asymmetrisch sind und dass diese Guanosintriphosphat (GTP) in sich tragen, welches dann zu Guanosin-

diphosphat (GDP) hydrolysiert. Des Weiteren geht man von chemisch ungleichen Monomeren aus. Das alles führt zu einem unterschiedlich schnellen Wachstum der Enden, was in Abbildung 2.3 anschaulich gemacht ist. Die Hydrolyse führt zu einem dynamischen Prozess, dem Treadmilling, wobei man hier das plus($^+$)- und minus($^-$)-Ende und die Änderungsrate der beiden Enden getrennt betrachtet. [3, S.422]

$$\frac{dn^+}{dt} = k_{on}^+ [M] - k_{off}^+ \tag{2.4}$$

$$\frac{dn^-}{dt} = k_{on}^- [M] - k_{off}^- \tag{2.5}$$

Hierbei ist $[M]$ die Konzentration der freien GTP Proteine. Diese beiden Raten führen folglich auch zu verschiedenen kritischen Konzentrationen. Wenn beide gleich sind, folgt daraus, dass beide Enden simultan wachsen und schrumpfen. In dem Fall, dass die beiden Konzentrationen nicht gleich sind kann es dazu kommen, dass das plus-Ende wächst, während das minus-Ende schrumpft. Setzt man $\frac{dn^+}{dt}$ und $-\frac{dn^-}{dt}$ gleich, erhält man, durch umstellen der Gleichung, die treadmilling Konzentration $[M]_{ss}$ in Abhängigkeit der beiden Änderungsraten des Polymers[3, S. 423]:

$$[M]_{ss} = \frac{k_{off}^+ + k_{off}^-}{k_{on}^+ + k_{on}^-} \tag{2.6}$$

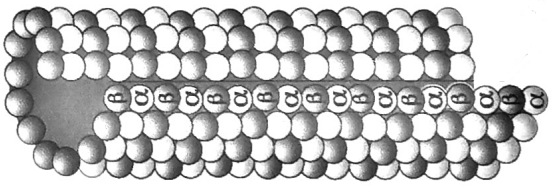


Abb. 2.1: Ein Mikrotubuli bestehend aus 13 Protofilamenten, die aus α und β Dimeren zusammengesetzt sind [1, S. 426].

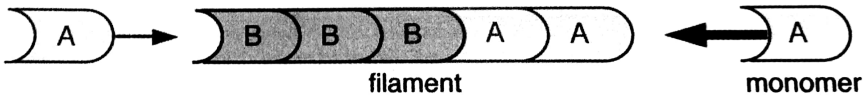


Abb. 2.2: Die einfache Polymerisation in der angekommen wird, dass A und B gleich sind [3, S. 419].

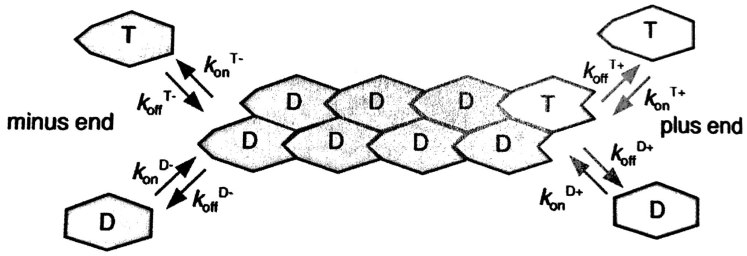


Abb. 2.3: Die Bausteine stellen folgendes dar: T = Tubulin, welches GTP enthält, D = Tubulin, welches GDP enthält. Die Aufnahme und die Abgabe benötigt mindestens acht ungleiche Änderungskonstanten (k_{off}, k_{on}). Da die Bausteine asymmetrisch sind, binden sie in einer bevorzugten Ausrichtung [3, S. 420].

Unter dynamischer Instabilität bei den Mikrotubuli versteht man den Auf- und Abbau der Monomere an den Enden. Dabei wachsen die Mikrotubuli so lange, bis sie zufällig eine Katastrophe erfahren und depolymerisieren. Das Filament baut sich dann ab, rettet sich und baut sich wieder auf. Diesen Vorgang kann man gut in Abbildung 2.4 erkennen [2, S. 615]. Die Häufigkeit dieser Katastrophen verringert und die der Rettungen erhöht sich linear bei einer monomer Konzentration über $[M]_c$ aus Gleichung 2.3. Somit finden beide Prozesse bei höherer Konzentration seltener statt [3, S.424].

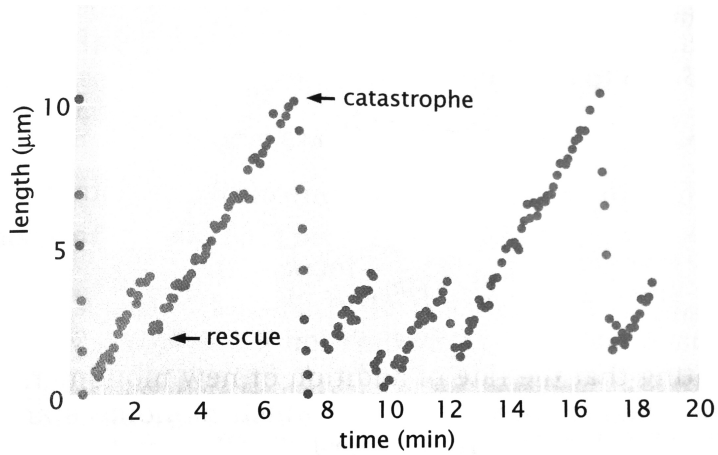


Abb. 2.4: Länge der Mikrotubuli aufgetragen gegen die Zeit. Man kann erkennen, dass diese sich abbauen, wenn eine Katastrophe stattfindet, und sich dann wieder retten können und erneut aufbauen [2, S. 617].

3 Materialien und Methoden

3.1 Oszillierende Mikrotubuli

3.1.1 Herstellen der Mikrotubuli

Die genauen Bezeichnungen, Bezugsquellen und Bestellnummern der Chemikalien sind in Kapitel 6 genannt. Um die Mikrotubuli herzustellen, heizt man den Ofen auf 37°C vor und beginnt 4 μl Tubulin, 6.78 μl M2B (bestehend aus PIPES, $MgCl_2$, EGTA), 1.22 μl $MgCl_2$(50mM), 1.5 μl DMSO(50%) und 1.5 μl GTP in dieser Reihenfolge zu vermischen. Nun lässt man dies für 30 - 45 Minuten im Ofen polymerisieren. Man stellt dann aus 990μl M2B, welches man auf 37°C erhitzt, und 10 μl Taxol eine verdünnte Lösung her. Von dieser fügt man nun 185 μl hinzu, um die Depolymerisation zu verhindern und somit auch die dynamische Instabilität zu stoppen, wobei die Konzentration von Taxol nicht größer als 10 μM sein sollte. Das Protokoll zur Herstellung ist in Kapitel 6.1 noch einmal zusammengefasst zu sehen. Das Herstellen der Mikrotubuli stellt die Grundlage aller folgenden Versuche dar.

3.1.2 Herstellung der bewegenden Bündel

Um die Bündel herzustellen, benötigt es eine gewisse Routine, die erst nach etlichen Versuche hergestellt ist. Es muss schnell und gewissenhaft gearbeitet werden, um ein gutes Ergebnis zu erzielen.
Der Ofen wird vor dem Beginn des Experiments auf 37°C vorgeheizt. Man mixt sich zuerst DTT mit einer Konzentration von 50mM und 10mM. Des Weiteren empfiehlt es sich, vorher 237.5 μl 68mM $MgCl_2$ mit 12.5 μl Taxol zu mischen und dies in dem Ofen aufzubewahren. Dabei ist auf ein sorgfältiges Mischen zu achten, da sonst Kristalle entstehen könnten, die den Versuch negativ beeinflussen. Alle Chemikalien sollten während des Mischens in einem mit Eis gefüllten Gefäß aufbewahrt werden. Um die Kinesin-Mischung (K-S) herzustellen benötigt man 8 μl Streptavidin, 14 μl

Kinesin und 0.5 μl 50 mM DTT. Diese Mischung wird nun mindestens 10 Minuten in Eis gelagert. Währenddessen kann man die anderen Chemikalien mischen. Für die aktive Mischung (AM) benötigt man 6 μl Trolox, 1.7 μl PK, 16.6 μl PEG, 5.5 μl M2B und 3.25 μl 10 mM DTT. Jetzt kümmert man sich um die Mikrotubuli Mischung (MT), die aus 4 μl Tubulin, 1.78 μl M2B, 1.22 μl $MgCl_2$, 1.5 μl DMSO(50%), 5 μl PEG und 1.5 μl GTP besteht. Nun fügt man zu der AM noch 1 μl Glucose, 0.65 μl Katalase und 1.3 μl Glucose-Oxidase hinzu. Die K-S erhält noch 5.5 μl M2B. Von der K-S mischt man nun 4 μl mit 2 μl ATP in die AM. Die finale Mixtur besteht aus 15 μl MT, 29 μl AM und 5.8 μl $MgCl_2$+Taxol. Dies lässt man nun, nach gewünschter Länge der Bündel, 30 bis 45 Minuten bei 37 °C im Ofen polymerisieren. Das Protokoll findet man in Kapitel 6.2.

3.2 Mikrotubuli Netzwerke

3.2.1 Kontraktion in Astern

Dieser Versuch wurde so durchgeführt, dass es einen möglichst immer gleich großen Kanal gibt, in dem sich die Bündel befinden. Es wird doppelseitiges Klebeband mit einer Höhe von 100 μm verwendet. Das Klebeband wird geschnitten und dann, mit einem geringen Abstand, auf einen Coverslip geklebt. Dieser ist mit PLL-g-PEG beschichtet, um das Kleben der Mikrotubuli auf der Oberfläche zu verhindern. Nachdem der Kanal eingerichtet ist wird ein weiterer Coverslip von oben geklebt, sodass es den ganzen Kanal bedeckt. Die Mikrotubuli Mischung wurde mit einer Pipette und mit Hilfe der Kapillarkraft in den Kanal gebracht, um dann an beiden Seiten mit Silikonfett verschlossen zu werden. Es ist darauf zu achten, dass der Kanal vollständig verschlossen ist, da sonst ein Fluss entstehen könnte. Dieser würde die Messung negativ beeinflussen.

3.2.2 PDMS Mikrofluid Kanäle

Um solche Kanäle herzustellen benötigt man einen Silicone-Wafer, der mit Fotolithografie hergestellt wird. Diesen Wafer säubert man, indem man ihn erst mit Isopropanol, dann mit Wasser und dann mit Aceton abspült. Anschließend wird er mit Druckluft getrocknet. Nun wird in einer Schale eine Mischung von 60g PDMS und 6g Härter angerührt. Da dabei viele Blasen entstehen, die die Qualität der

Kanäle beeinflussen, wird alles in ein Vakuum gegeben. Durch ständiges aufbringen und ablassen des Vakuums verschwinden die Blasen. Die, die sich auf der Unterseite des Wafers befinden müssen vollständig beseitigt werden, da dieser beim Herausschneiden der Kanäle sonst zerbrechen könnte. Nachdem alle Blasen beseitigt sind, lässt man alles für 45 Minuten bei 75°C im Ofen. Nun schneidet man die Kanäle aus und beklebt sie mit Klebestreifen. Danach sticht man, unter der Sicherheitswerkbank, die Zugänge mit einem Durchmesser von 0.75 mm in den Kanal. Dieser wird anschließend mit der später bindenden Oberfläche nach oben mit einem Ultraschall gereinigten Coverslip in den Plasmacleaner gegeben. Dann legt man den Kanal mit der gereinigten Seite auf das Coverslip. Nun gibt man den Kanal mit dem Coverslip für 5 Minuten bei 75°C in den Ofen, um die Verbindung zwischen beiden stärker zu machen. Jetzt kann man die Schläuche in die gestanzten Zugänge einführen und die gewünschte Flüssigkeit einleiten. Die dünnen Schläuche haben die Maße 0.3mm ID x 0.76 mm OD und die Dickeren haben die Maße 0.56mm ID x 1.07mm OD. Die verwendeten Einmal-Injektions-Kanülen haben die Durchmesser 0.45mm und 0.60 mm. Der Mikrofluidkanal hat eine Breite von 0.15cm, eine Länge von 3.8cm und eine Höhe von 100μm.

3.2.3 Kontraktion im PDMS Kanal

Man befestigt einen Schlauch an einer Spritze und fügt eine Mischung von 10 μl PLL-g-PEG und 90 μl 10mM HEPES in den Kanal und lässt dies für mindestens 30 Minuten einwirken. Die Oberfläche ist danach mit PLL-g-PEG beschichtet und die Mikrotubuli kleben nicht mehr daran. Nun wird der Kanal noch 3 mal mit M2B ausgewaschen und danach wird die Bündelmischung aus Kapitel 3.1.2 eingefügt. Diese Konfiguration sollte nun so schnell wie möglich unter dem Mikroskop untersucht werden, um den Anfang der Kontraktion nicht zu verpassen.

3.2.4 Mikroskopie

Für die, in der Arbeit zu sehenden, Aufnahmen wurden die Fluoreszenzmikroskope Olympus IX72 mit der Kamera Photometrics CoolSNAP HQ und einem DeltaVision-System und das Olympus FluoView FV1000 benutzt. Da das Tubulin mit HiLyte Fluor 488 gelabelt ist, werden die Aufnahmen mit einer Anregung von 440-460 nm und einer Emission von 500-520 nm gemacht. Die erstellten Auf-

nahmen sind z-Stacks, welche in definierten Zeitabständen aufgenommen werden. Mit Hilfe von dem Programm Fiji können diese Daten ausgelesen und bearbeitet werden.

3.2.5 Analyse

Da in den erhaltenen Daten viel Rauschen zu sehen ist, wird ein Rauschunterdrückungsfilter benutzt. Es handelt sich dabei um einen bilateraler Filter, da dieser die Kanten erhält, welche benötigt werden. Das Bildmaterial wird anschließend in ein Graustufenbild umgewandelt, um danach mit einem Schwellenwert gefiltert zu werden. Dabei ist zu beachten, dass man diesen so wählt, dass die Pixel des Hintergrunds den Wert null und die des Netzwerkes eins haben. Bei der Kontraktion der Schichtdicke ist das Netzwerk nicht vollständig geschlossen und erschwert somit die Analyse. Diese Lücken werden mit einer morphologischen Operationen beseitigt, dem Closing. Als Strukturelement wird eine NxM Matrix in Form eines Rechtecks verwendet, da dieses für die hier behandelte Analyse am besten geeignet ist. Als nächstes sucht man die Konturen des Netzwerkes und wählt die, die die größte Fläche einschließt als interessant aus und legt ein Rechteck darum. Die Höhe des Rechteckes ist dabei die Breite des Netzwerks und somit W(t) aus Gleichung 4.3. W_0 ist die Anfangsbreite, die im Programm abgespeichert wurde. Der Fit wird mit Hilfe von SciPy ausgeführt, wobei die Gleichung 4.4 benutzt wird. Mit matplotlib wird anschließend ein Plot mit den im Programm berechneten Werte erstellt.
Die grundlegende Analyse bei den Astern ist in den ersten Schritten gleich wie die bei der Schichtdicke und besteht aus dem Umwandeln des Bildes in Graustufen und festlegen eines Schwellenwerts. Die Anzahl der weißen Pixel verringert sich im Falle einer Kontraktion und kann somit als Indikator zur Analyse benutzt werden. Diese ist ähnlich wie in Gleichung 4.3, nur dass W(t) hierbei die Anzahl der weißen Pixel zur Zeit t und W_0 die Anzahl zur Zeit t=0 darstellt.
Die dreidimensionalen Strukturen werden auf Muster untersucht. Dabei werden die Maxima der Intensität ermittelt und der Abstand zwischen diesen gemessen. Durch eine Fourieranalyse kann man eine Ortsfrequenz finden, mit der man die Wellenlänge berechnen und das Signal reproduzieren kann. Alle Plots werden mit matplotlib angefertigt und SciPy gefittet.

4 Auswertung und Diskussion

4.1 Fehlerrechnung

Der hier angegebene Mittelwert wurde wie folgt berechnet:

$$\langle x \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i \tag{4.1}$$

Wobei n die Anzahl der Stichproben und x_i den i-ten Messwert darstellt. Der dabei angenommene Fehler ist der mittlere quadratische Fehler des Mittelwerts Δx_{stat} [7, S.24]:

$$\Delta x_{stat} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{1}{n\,(n-1)} \sum_{i=1}^{n} \left(x_i - \langle x \rangle\right)^2} \tag{4.2}$$

Dabei stellt s den mittleren quadratischen Fehler der Einzelmessungen dar und wird auch als Standardabweichung bezeichnet.

4.2 Oszillierende Mikrotubuli

4.2.1 Bewegende Bündel

Die aktiven Bündel wurden durch die Kombination von Mikrotubuli und Kinesin I hergestellt. Dabei war ihre Bewegung mit bloßem Auge schwer zu erkennen und konnte durchaus erst in der Zeitaufnahme sichtbar gemacht werden. Die Geschwindigkeit der Bewegung wurde durch die ATP Konzentration beeinflusst [5], wobei diese mit Erhöhung zunimmt und mit Verringerung abnahm. In Abbildung 4.1 ist die zu erwartende Bewegung zu sehen. Durch ständiges wiederholen der Experimente ist es gelungen, einen sicheren Umgang mit der Herstellung zu erhalten. Die entstandenen Mikrotubulibündel bewegten sich aktiv, wobei man aber nicht genau sagen konnte wie viele Mikrotubuli sich zu einem Bündel vereint haben.

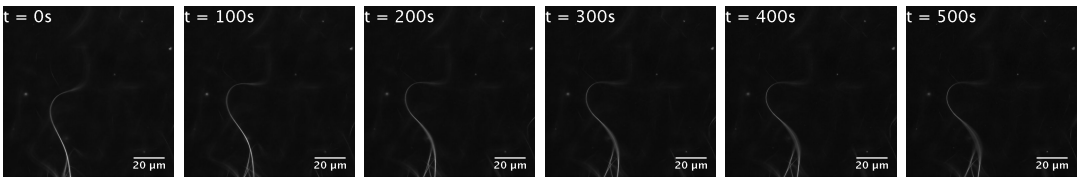


Abb. 4.1: Ein Bündel aus Mikrotubuli zu verschiedenen Zeiten.

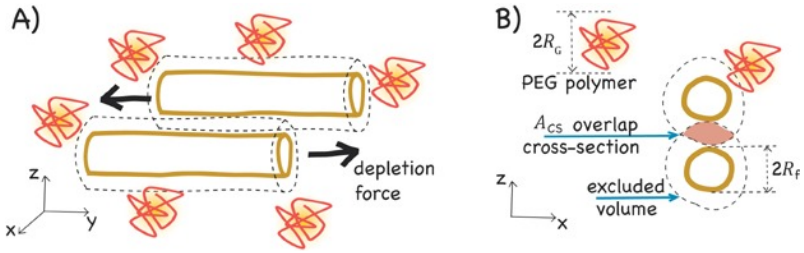


Abb. 4.2: Einfluss von PEG auf die Mikrotubuli [6].

Die Kraft, die diese Bündel erzeugte, ist die depletion Force, welche durch PEG erzeugt wurde. Dabei werden die PEG Polymere als Sphären mit dem Radius of gyration R_g angenommen. Das durch die Mikrotubuli belegte Volumen ist nicht zugänglich für die Polymere. Dadurch kann der Massenschwerpunkt der Polymere nicht näher als R_g an die Oberfläche der Filamente kommen und diese sind mit einem 'excluded volume' umgeben. Durch Reduzierung dieses Volumens erhöht man den Platz der Polymere und ihre Entropie. Ein Weg um das Volumen zu verringern und damit die Entropie zu erhöhen, ist eine Bildung von Bündeln der Filamente [6]. Dabei entsteht ein überlapptes Volumen, in welchem sich das Kinesin bewegen kann. Dies ist in Abbildung 4.2 gezeigt.
Zwischenzeitlich gab es Probleme mit Artefakten, die die Bewegung der Bündel negativ beeinflusst haben. Der Versuch wurde so modifiziert und durchgeführt, dass bei jedem mal eine andere Chemikalie auf Fehler überprüft wurde. Es stellte sich dabei heraus, dass diese Artefakte durch zu altes PEP entstanden sind. Diese Fehler sind in Abbildung 4.3A zu sehen. Es wurde neues PEP hergestellt, wobei aufgefallen ist, dass man dieses sorgfältig und lange mischen muss, um es komplett aufzulösen. Die nun entstandenen Aufnahmen in Abbildung 4.3B sind ohne Störungen und damit ist die Bewegung der Mikrotubuli auch nicht mehr eingeschränkt.

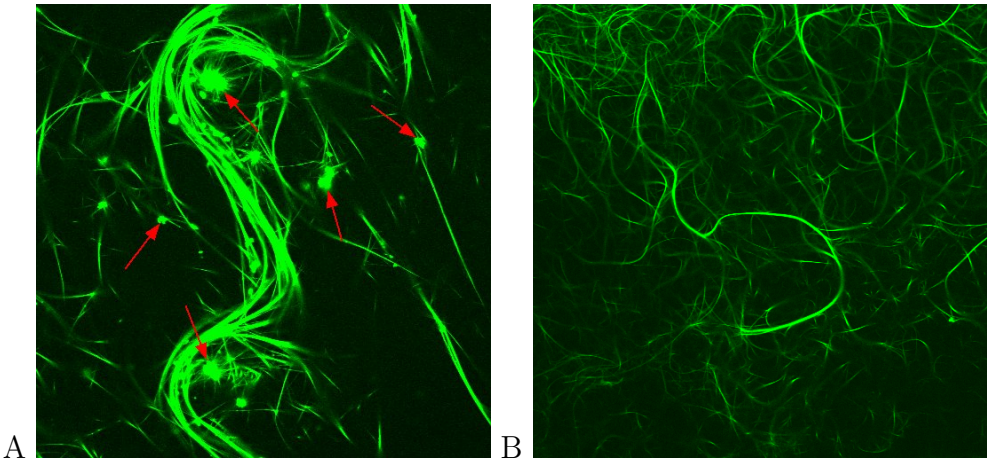


Abb. 4.3: A) Die roten Pfeile weisen auf die, vom PEP, verursachten Artefakte hin. B) Mit neuem PEP sind diese beseitigt.

4.3 Netzwerke

4.3.1 Kontraktion in Astern

Durch das Einbringen der Bündel aus Protokoll 6.2 in einen, mit doppelseitigen Klebestreifen erstellten Kanal, sollte eine Kontraktion erreicht werden. Um den Kanal zu befüllen wurde eine Pipette benutzt. Dabei entstand eine Kontraktion in Astern, was in der Abbildung 4.5A und B zu sehen ist. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Tubulinkonzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Es war zu erwarten, dass mit Erhöhung der Konzentration die Länge der Mikrotubuli sinkt und die Anzahl dieser zunimmt und umgekehrt. Die Astern wurden nicht einzeln ausgewertet sondern zusammen, wobei das Programm 7.0.1 genutzt wurde. Dabei wurden die hellen Pixel, welche die Mikrotubuli darstellen, analysiert und gegen die Zeit geplottet, was in Abbildung 4.6 und 4.7 zu sehen ist. Auszüge der Analyse sind in Abbildung 4.4 zu finden. Zu sehen sind die mikroskopierten Bilder, welche mit einem Schwellenwert versehen wurden.
Bei einer Konzentration von 0,8 μg/μl und einer Polymerisationsdauer von 45 Minuten waren große und wenige Astern zu beobachten, was in Abbildung 4.5A zu sehen ist. Dies war durch lange und wenige Mikrotubuli zu erklären, die durch hohe Tubulinkonzentration und lange Polymerisation zu Stande kamen. Bei einer höheren Konzentration von 1.16 μg/μl und einer niedrigeren Inkubationsdauer von 30 Minuten waren mehr, aber dafür kleinere Astern zu erkennen, was an den kürzeren

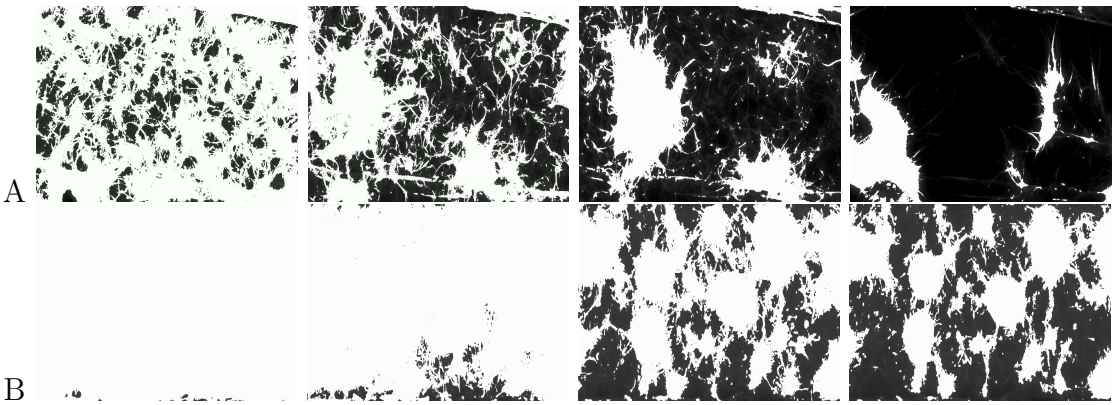


Abb. 4.4: Die Hellen Pixel sind Bestandteil des Netzwerkes. A) Versuch aus Plot 4.6 und Abbildung 4.5A. B) Versuch aus Plot 4.7 und Abbildung 4.5B.

Mikrotubuli zu erklären war. Kürzer sind diese, weil die Inkubationszeit verringert und die Tubulinkonzentration erhöht wurde. Dies ist in Abbildung 4.5B zu sehen. Es war zu erkennen, dass sich das Netzwerk mit zunehmender Zeit kontinuierlich kontrahierte. Dabei benötigte das mit geringer Tubulinkonzentration 800 Minuten bis es im vollständig kontrahierten Zustand war. Es fiel auf, dass dieses im Vergleich zu dem Netzwerk mit mehr Tubulin schneller kontrahierte. Dies hatte die vollständige Kontraktion nach 2500 Minuten erreicht, was aber daran lag, dass es später begann. Wenn man diese Verzögerung von 700 Minuten abzieht kommt man auf eine Kontraktionszeit von 1800 Minuten wie man in Abbildung 4.7 erkennen kann. Durch diese Versuche konnte also eine Kontraktion des Netzwerkes *in-vitro* festgestellt werden. Die Zeiten der Plots wurden aus den Logdateien des DeltaVision Mikroskops erstellt.

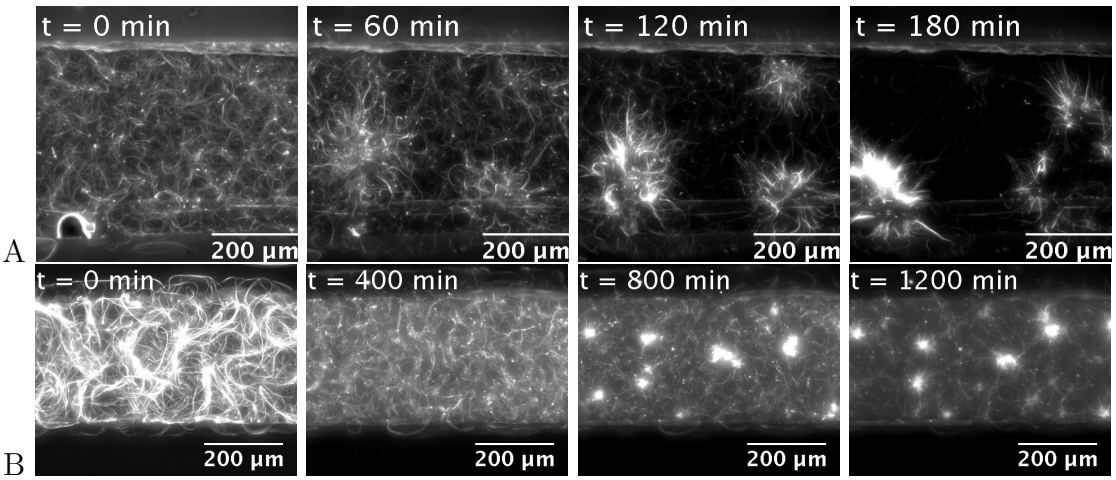


Abb. 4.5: Kontraktion des Mikrotubuli Netzwerks in einem, mit doppelseitigem Klebeband erstellten, Kanal. Die Beobachtungszeiten sind in den Bildern angegeben. A) Der verwendete Kanal hat eine Breite von $W_0 \approx 400$ μm. Die Konzentration von Tubulin beträgt 0.8 μg/μl und die Inkubationszeit ist 45 Minuten. B) Der verwendete Kanal hat eine Breite von $W_0 \approx 300$ μm. Die Konzentration von Tubulin beträgt 1.16 μg/μl und die Inkubationszeit ist 30 Minuten.

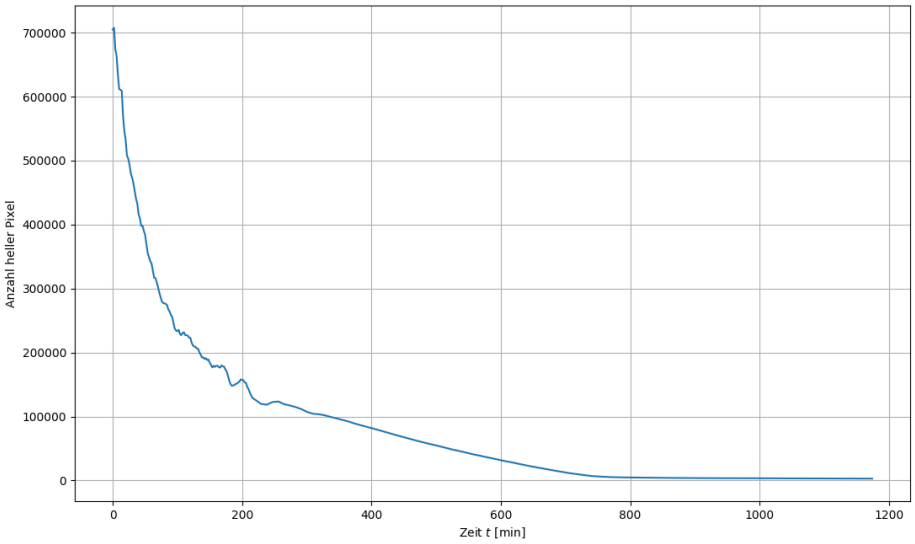


Abb. 4.6: Anzahl der hellen Pixel gegen die Zeit aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass das Netzwerk kontrahiert, da die Anzahl der hellen Pixel mit zunehmender Zeit abnimmt.

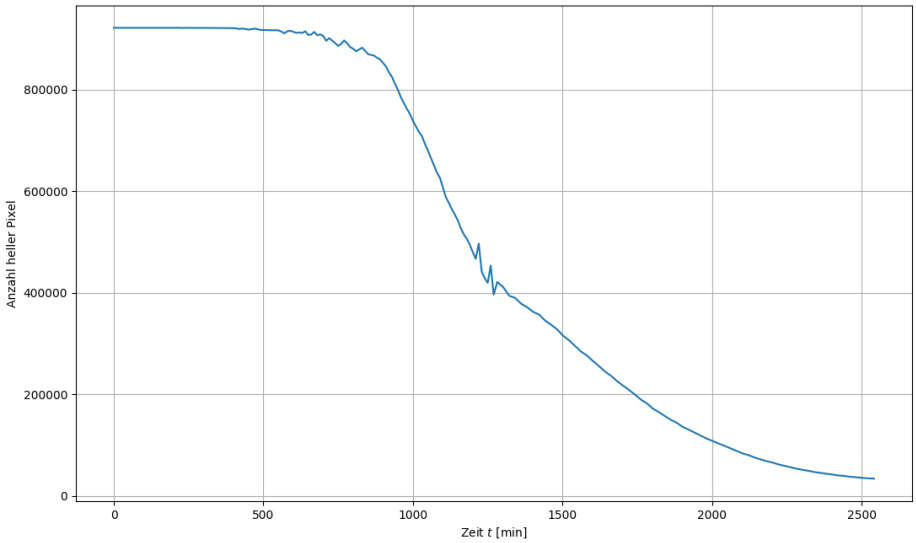


Abb. 4.7: Anzahl der hellen Pixel gegen die Zeit aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass das Netzwerk kontrahiert. Das, zwischen Minute 1000 und 1500 entstandene, Artefakt kam durch das Mikroskop zustande und wurde nicht vom Netzwerk erzeugt.

4.3.2 Kontraktion der Schichtdicke

Durch Zuschneiden der Kanäle per Hand konnte keine Kontraktion der Schichtdicke wie in Paper [4] erkannt werden. Deshalb wurden bei weiteren Versuchen PDMS-Mikrofluid-Kanäle benutzt, die eine klare Geometrie garantierten. Die Kontraktion der Schichtdicke wurde erst durch Benutzen dieser Kanäle möglich. Hierbei waren am Ende keine Astern wie im Kapitel 4.3.1 zu sehen sondern eine Verringerung der Schichtdicke im Kanal. Die Zusammensetzung der in den Kanal eingebrachten Lösung blieb gleich.
Das Netzwerk wurde dabei bei geringer Vergrößerung so unter dem Mikroskop betrachtet, dass man die ganze Versuchskammer sehen konnte. Dabei war eine Kontraktion $\epsilon(t)$ zu sehen, die man wie in Gleichung 4.3 beschreiben kann [4].

$$\epsilon(t) = \frac{W_0 - W(t)}{W_0} \tag{4.3}$$

Hierbei ist $W(t)$ die Breite des Netzwerks bei der Zeit t und W_0 die Anfangsbreite. Diese Funktion kann durch eine exponentielle Relaxation dargestellt werden [4]:

$$\epsilon(t) \simeq e_\infty \left[1 - e^{-\frac{(t-T_c)}{\tau}}\right]. \tag{4.4}$$

Hierbei ist e_∞ der Wert der finalen Kontraktion, T_c die Zeit die vergeht, bevor die Kontraktion beginnt und τ die charakteristische Zeit der Kontraktion, welche durch den Fit der Messdaten bestimmt wird. T_c konnte bei diesen Versuchen vernachlässigt werden, da die Kontraktion unverzüglich begann.
Es wurde zwischen nematischer, einer Ausrichtung der Mikrotubuli mit einer Vorzugsrichtung ohne in Schichten geordnet zu sein, und isotropischer Phase, einer richtungsunabhängigen Orientierung, in einem Netzwerk unterschieden, was in Abbildung 4.8 zu sehen ist.

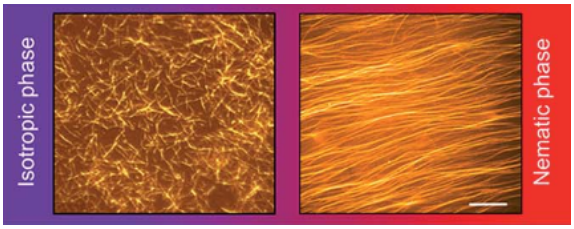


Abb. 4.8: Isotropische und nematische Phase. Scale bar: 20 μm [10].

Durch Beobachten der z-Ebene wurde festgestellt, dass die Kontraktion nur in der

xy-Ebene stattfand und sich wie eine exponentielle Relaxation verhielt, die mit Gleichung 4.4 dargestellt werden kann. Durch Wiederholen der Versuche konnten statistische Fehler erstellt werden, wie die Standardabweichung und der mittlere quadratische Fehler des Mittelwerts aus Gleichung 4.2.
Die Analyse wurde durch das Anbringen einer Kontur an das Netzwerkes durch Programm 7.0.1 ermöglicht. Dadurch erhielt man die Breite des Netzwerkes und konnte die Kontraktion aus Gleichung 4.3 berechnen und plotten. Die Analyse ist in Abbildung 4.9 gezeigt. Insgesamt wurden 7 Kontraktionen ausgewertet um Da-

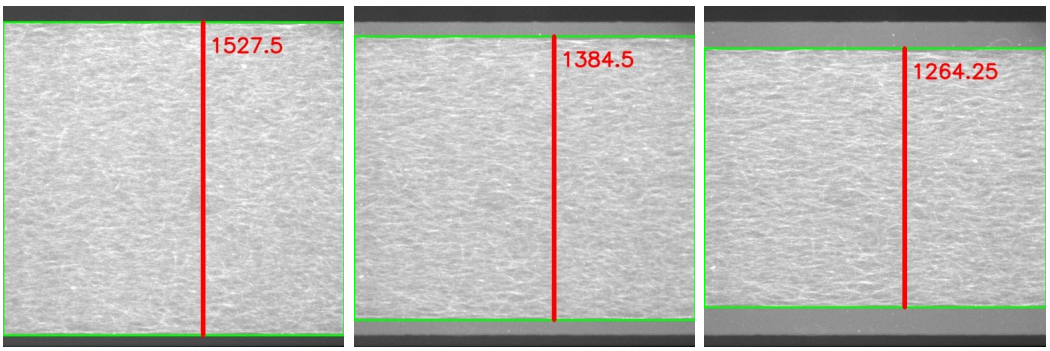


Abb. 4.9: Hier ist zu erkennen, wie ein Rechteck um das kontrahierende Netzwerk gelegt wurde. Die Zahl in der Abbildung ist die Breite $W(t)$ in μm.

ten für τ und e_∞ zu erhalten. Dabei wurde unterschieden, wie sehr die Netzwerke sich kontrahieren. Man unterscheidet zwischen starker und schwacher Kontraktion, wobei die finale Schichtdicke der starken Kontraktion am Ende geringer ist als bei der Schwachen.
Bei den ersten Versuchen fiel auf, dass eine Verschmutzung im Netzwerk zu sehen war. Diese ist in Abbildung 4.10 zu sehen und stand im Verdacht eine weitere Kontraktion zu verhindern. Nachdem neues PEP, M2B und $MgCl_2$ gemischt wurde, sind diese weitestgehend verschwunden. In Abbildung 4.11 ist eine Probe nach Erneuerung dieser Chemikalien zu sehen. Der Versuch in Abbildung 4.10 wurde nicht ausgewertet, da die Messwerte durch die Verschmutzungen nicht mit denen der sauberen Proben zu vergleichen sind.
Der Versuchsaufbau aller ausgewerteten Versuche war gleich. Die Ergebnisse der Messungen mit dem Programm 7.0.1 sind in Tabelle 4.1 und in Abbildung 4.12 dargestellt.

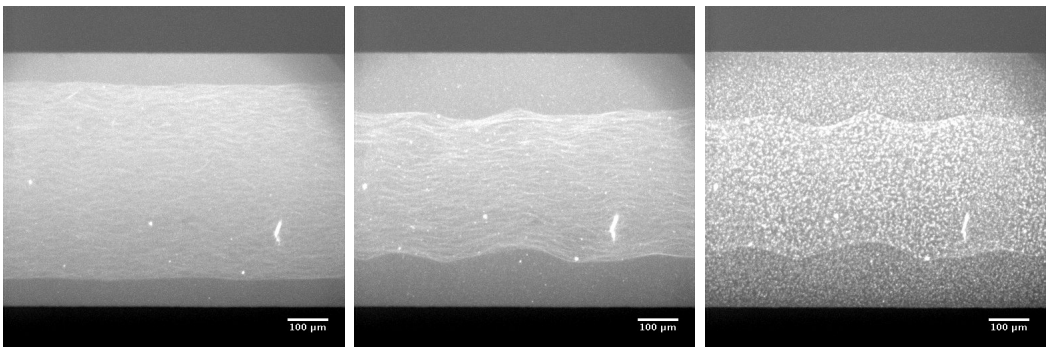


Abb. 4.10: Hier ist die Kontraktion eines Mikrotubuli Netzwerks zu sehen mit anschließender Verschmutzung am Ende, die vermutlich eine weitere Kontraktion verhindert. Diese Aufnahme hat eine Dauer von 19 Stunden.

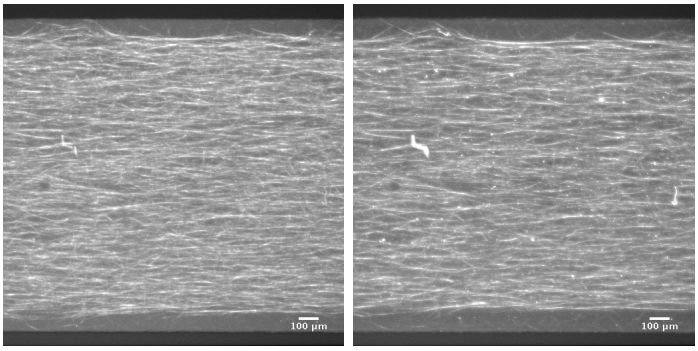
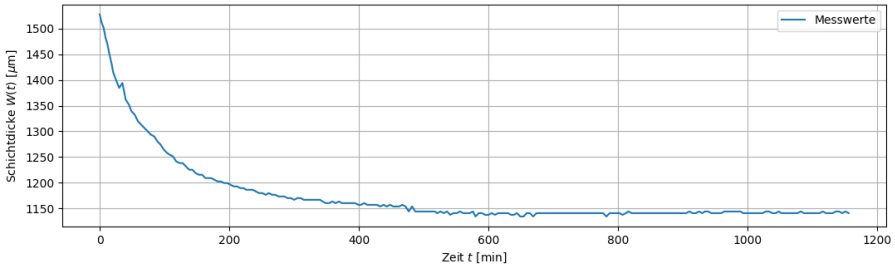
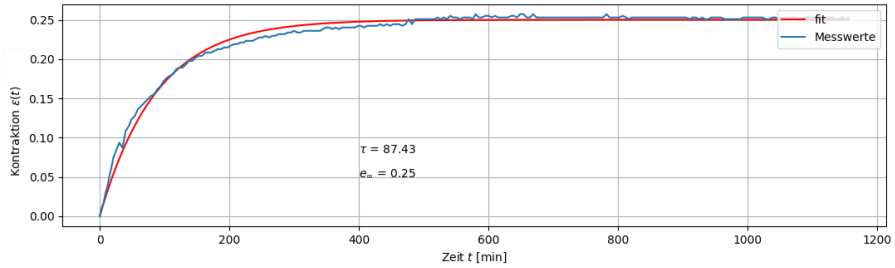


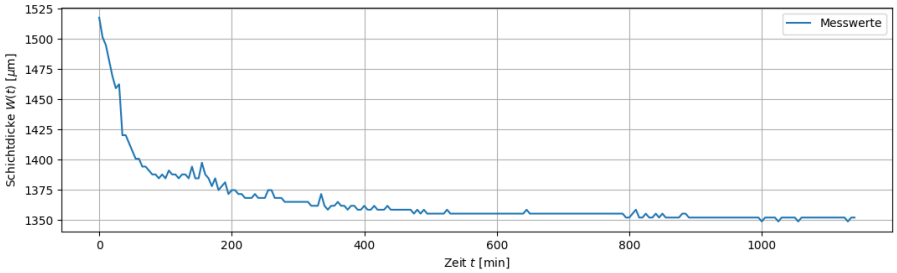
Abb. 4.11: Hier ist die Kontraktion eines Mikrotubuli Netzwerks mit neu hergestellten Chemikalien zu sehen. Diese Aufnahme zeigt das Netzwerk ebenfalls für 19 Stunden und es sind am Ende sehr wenige Verschmutzungen zu sehen.

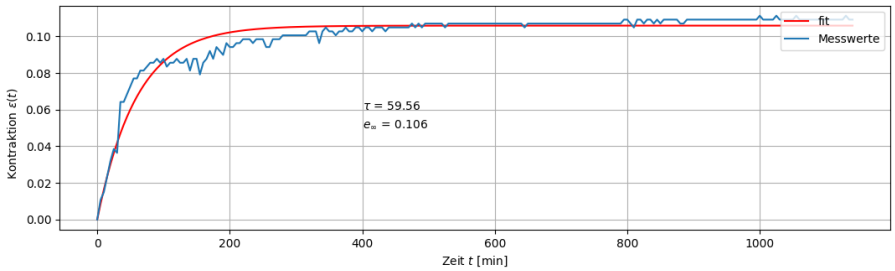
A


Messwerte
Schichtdicke $W(t)$ [μm]
Zeit t [min]

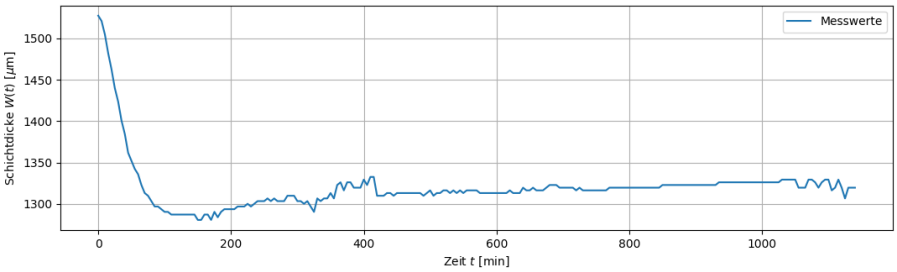

fit
Messwerte
τ = 87.43
e_∞ = 0.25
Kontraktion $\varepsilon(t)$
Zeit t [min]

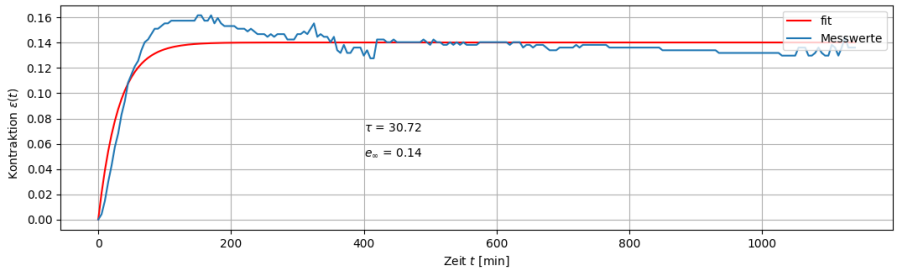
B


Messwerte
Schichtdicke $W(t)$ [μm]
Zeit t [min]

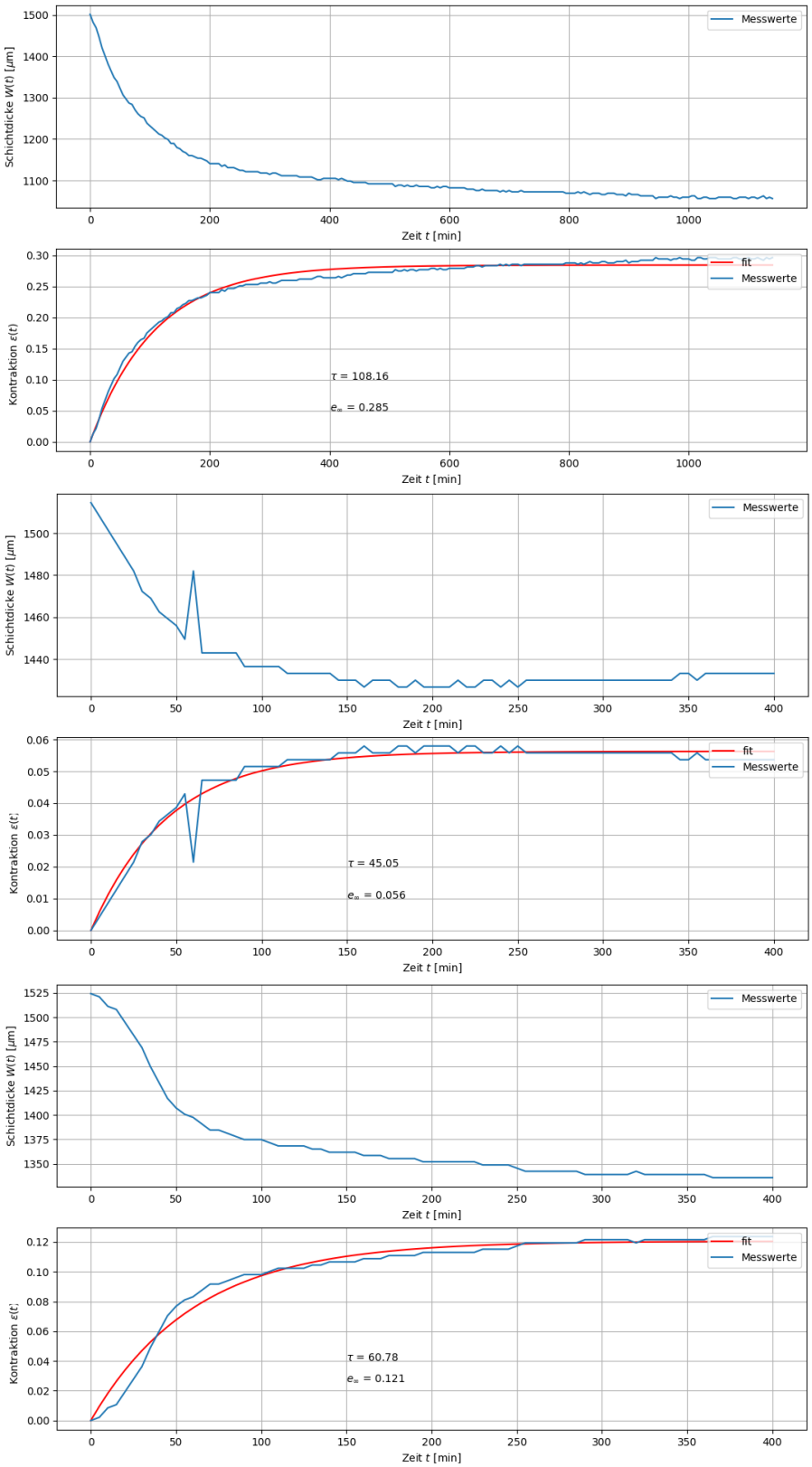

fit
Messwerte
τ = 59.56
e_∞ = 0.106
Kontraktion $\varepsilon(t)$
Zeit t [min]

C


Messwerte
Schichtdicke $W(t)$ [μm]
Zeit t [min]


fit
Messwerte
τ = 30.72
e_∞ = 0.14
Kontraktion $\varepsilon(t)$
Zeit t [min]

D


Messwerte
Schichtdicke W(t) [µm]
Zeit t [min]
fit
Messwerte
Kontraktion ε(t)
τ = 108.16
e∞ = 0.285
Zeit t [min]
Messwerte
Schichtdicke W(t) [µm]
Zeit t [min]
fit
Messwerte
Kontraktion ε(t)
τ = 45.05
e∞ = 0.056
Zeit t [min]
Messwerte
Schichtdicke W(t) [µm]
Zeit t [min]
fit
Messwerte
Kontraktion ε(t)
τ = 60.78
e∞ = 0.121
Zeit t [min]

E

F

G

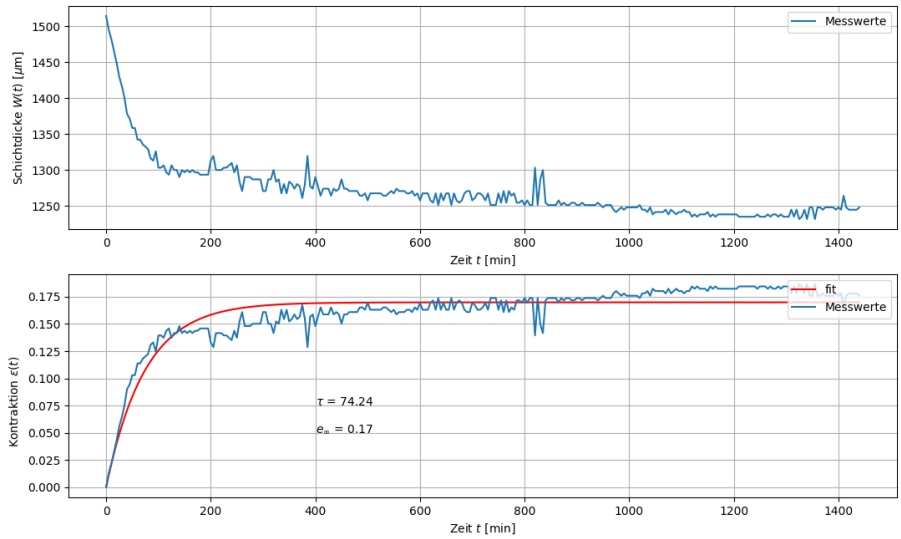


Abb. 4.12: Hier wurden die Schichtdicke und die Kontraktion gegen die Zeit geplottet. Die durch den Fit erhaltenen Werte für τ und e_∞ sind jeweils in dem unteren Plot enthalten. Die Einheit von τ ist Minuten. Das leichte ansteigen der Messwerte bei C) ist durch die Ausdehnung des Netzwerkes durch die Strukturbildung zu erklären. Durch an den Rändern klebenden Mikrotubuli ist die Kurve bei G) sehr ungleichmäßig.

Die in Abbildung 4.12C, E und F zu sehenden Versuche zeigten erstmals nicht nur eine Kontraktion in der xy-Ebene sondern auch in der z-Ebene. Da dies zu einer Expansion führte konnten die Versuche 4.12E und 4.12F, im Sinne der Kontraktion, nur bis zur Zeit von 400 Minuten sinnvoll analysiert werden. Auf die Kontraktion der z-Ebene wird dann im Kapitel 4.3.3 eingegangen. Bei der schwachen Kontraktion erhält man demnach $\langle\tau\rangle = 54.1 \pm 3.3$ und $\langle e_\infty\rangle = 0.118 \pm 0.008$. Bei der Starken

Abbildung	Kontraktion	τ[min]	e_∞	Schichtdicke[μm]	Kontraktionszeit[min]
4.12A	stark	87.43	0.25	1125	600
4.12B	schwach	59.56	0.106	1355	600
4.12C	schwach	30.72	0.14	1225	200
4.12D	stark	108.16	0.285	1090	1000
4.12E	schwach	45.05	0.056	1430	200
4.12F	schwach	60.78	0.12	1340	400
4.12G	schwach	74.24	0.17	1240	1200

Tab. 4.1: Messwerte der Kontraktion mit Klassifizierung der Kontraktionsart.

erhält man $\langle\tau\rangle = 97.8 \pm 7.3$ und $\langle e_\infty\rangle = 0.268 \pm 0.012$. Da mehr Messwerte zur schwachen Kontraktion vorhanden sind lässt diese sich genauer auswerten. Da es sich hierbei um eine Relaxation handelt, ist nach einer Zeit von $t = 3 \cdot \tau$ 95% der Kontraktion erreicht. Es lässt sich feststellen, dass mit größerer charakteristischen Zeit auch die Kontraktionsdauer steigt. Dies folgt aus Gleichung 4.4:

$$\epsilon(3\tau) = e_\infty \left[1 - e^{-\frac{3\tau}{\tau}}\right]$$
$$\epsilon(3\tau) = e_\infty \cdot 0.95.$$

Bei der schwachen Kontraktion sind 95% der Kontraktion schon nach 162 Minuten und bei der Starken nach 293 Minuten erreicht. Man erkennt, dass die schwache Kontraktion im Mittelwert fast doppelt so schnell kontrahiert wie die Starke. Der Wert $\langle e_\infty\rangle$ ist bei der starken Kontraktion im Mittelwert mehr als doppelt so groß wie der der Schwachen, worauf man auf eine geringere finale Schichtdicke schließen kann.
Es ist nicht klar welcher Faktor zu diesen unterschiedlichen Verhalten geführt hat, da der Versuchsaufbau und die Durchführungen immer gleich waren. Lediglich das Auswaschen des PLL-g-PEG aus dem Kanal war leicht unterschiedlich. Es wurde in weiteren Versuchen immer darauf geachtet alles gleich zu machen aber die Ergebnisse weichten trotzdem voneinander ab. Nach der Kontraktion folgte eine Musterbildung in der z-Ebene mit einhergehender Expansion in der xy-Ebene. Bei diesen Versuchen wurde also erstmals die Kontraktion und Expansion eine Netzwerks im gleichen Versuch beobachtet. Diese beiden Vorgänge wurden bisher nur getrennt betrachtet[9]. In den Abbildungen 4.16A und 4.16B ist zu sehen was bei dem Plot 4.12E und 4.12F nach nach 400 Minuten passierte. Das Netzwerk breitete sich fast wieder bis zur ursprünglichen Kanalbreite aus.
Alle in dieser Arbeit zu sehenden Versuche wurden mit einem Schlauchdurchmesser von 0.3mm ID x 0.76 mm OD durchgeführt. Der Durchmesser wurde erst vergrößert als die Kontraktion und Musterbildung nicht mehr stattfanden. Bisher ist noch unbekannt was dies verursachte. Dies muss durch weitere Versuche herausgefunden werden. Es war zu beobachten, dass die Kontraktion nur stattfand, wenn die Bündel anfangs eine nematische Ausrichtung hatten, was in Abbildung 4.9 zu sehen ist. Bei einer isotropen Ausrichtung war meist weder Kontraktion noch Struktubildung zu sehen. So eine richtungsunabhängige Ausrichtung ist in Abbildung 4.13 zu sehen. Durch Vergrößerung des Schlauchdurchmessers auf 0.56mm ID x 1.07mm OD wurde

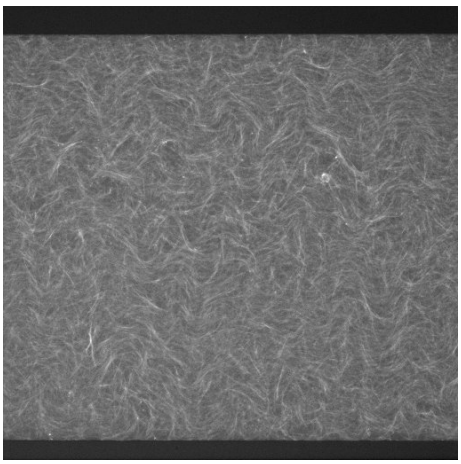


Abb. 4.13: Richtungsunabhängige (isotropische) Ausrichtung der Bündel.

versucht eine nematische Ausrichtung zu erhalten, was aber nicht erfolgreich war. Ein weiterer Faktor ist die Geschwindigkeit, mit der die Flüssigkeit in den Kanal eingebracht wird. In Kapitel 4.3.1 wurde die Flüssigkeit mit Hilfe der Kapillarkraft in den Kanal eingebracht, was zu einer wesentlich geringeren Geschwindigkeit führte. Dies wiederum führt nicht zu einer nematischen Ausrichtung und dadurch auch zu keiner Kontraktion der Schichtdicke. Es wurde festgestellt, dass die Ergebnisse besser waren, wenn die Einbringung schnell geschah. Des Weiteren könnte man den Versuch verbessern, indem man die Konzentration von ATP verringert, sodass die Kontraktion verlangsamt wird und man mehr Zeit zur Verfügung hat, um den Prozess der Ordnung am Anfang genauer zu beobachten.
Es wurde auch versucht eine Kontraktion zu erhalten, indem man die depletion Force, die vom PEG erzeugt wird, vernachlässigt. Dabei führte man den gleichen Versuch durch mit dem Unterschied, dass PEG durch M2B ersetzt wurde. Es wurde die Bildung eines aktiven Gels beobachtet, welches sich kontrahierte, aber eine Musterbildung blieb aus. Dies war ein wichtiger Kontrollversuch, welcher in Abbildung 4.14 zu sehen ist, um die Abhängigkeit der Kontraktion und Musterbildung vom PEG zu zeigen. Trotz nematischer Ausrichtung der Mikrotubuli, wie in Abbildung 4.15 zu sehen, kam es nicht zu einer Musterbildung. Diese Ausrichtung kommt vermutlich auch durch einen Fluss, der im Kanal stattfand. Es fällt auf, dass bei den Aufnahmen mit PEG die Mikrotubuli sichtbar sind, obwohl nur diese mit einer 4x Vergrößerung aufgenommen wurden. Ohne PEG sind die einzelnen Mikrotubuli erst mit einer 60x Vergrößerung, wie in Abbildung 4.15B, zu sehen. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 4.15A ein Versuch mit PEG bei einer Vergrößerung von 40x gezeigt.

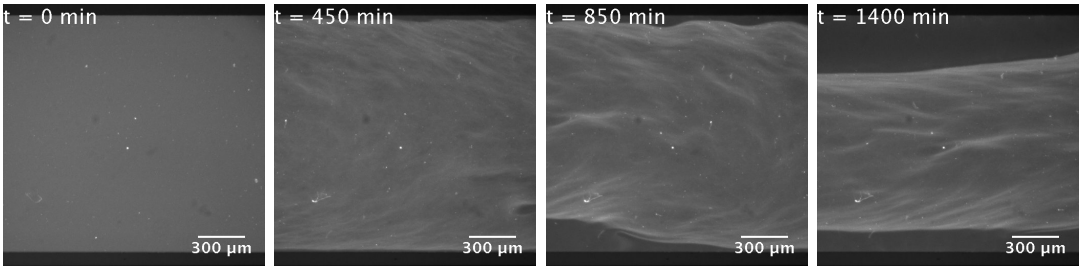


Abb. 4.14: Versuch ohne PEG. Es ist eine Kontraktion vorhanden, obwohl die depletion Force nicht vorhanden ist.

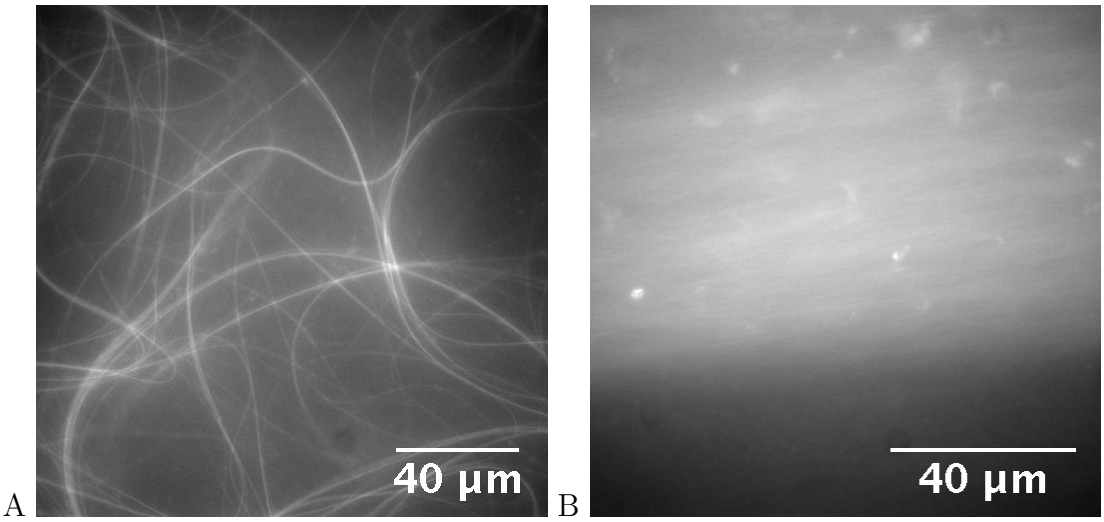
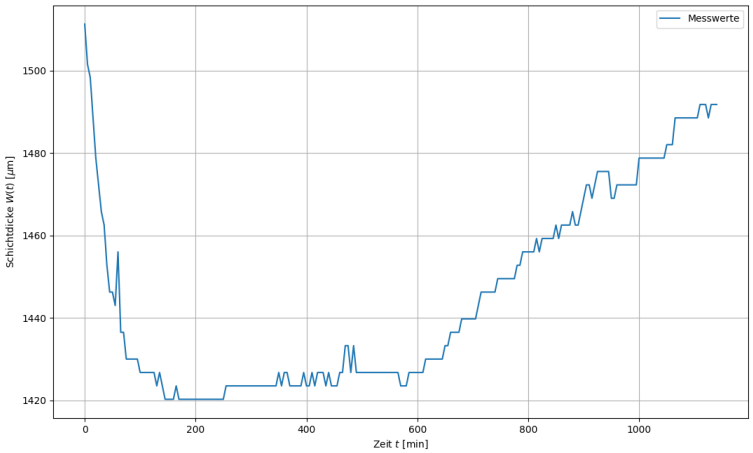


Abb. 4.15: A) Netzwerk mit PEG bei einer 40x Vergrößerung nach der turbulenten Strömung. B) Nematische Ausrichtung der Mikrotubuli bei einer 60x Vergrößerung nach der Kontraktion.

A



B

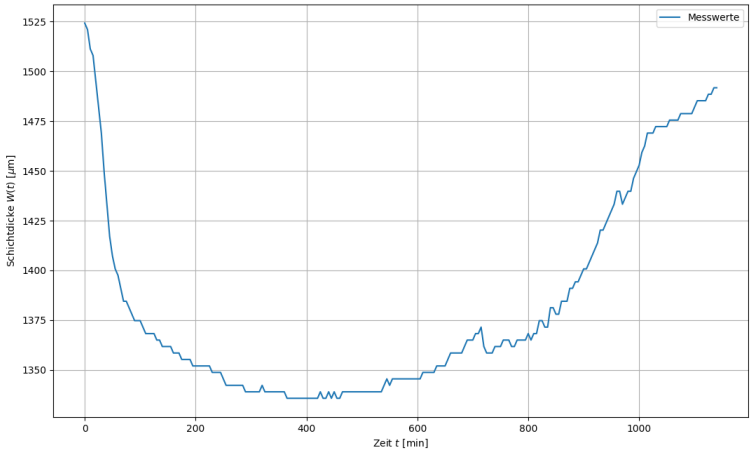


Abb. 4.16: In diesen Plots ist erst eine Kontraktion mit darauffolgender Expansion zu beobachten. Dabei ist A) der Versuch aus Abbildung 4.12E und B) der aus Abbildung 4.12F.

4.3.3 Musterbildung

Es konnte beobachtet werden, dass sich das Netzwerk in der z-Ebene ausbreitet und Muster bildete. Dies geschah nach der Kontraktion der Schichtdicke. Dabei wurde festgestellt, dass dies zu unterschiedlichen Zeiten geschah. Sie wurde mehrmals nach 19 oder mehr Stunden aber auch nach 45 Minuten beobachtet. Im Anschluss auf diese Kontraktion folgte eine turbulente Strömung. Beispiele sind in Abbildung 4.17, 4.18 und 4.19 zu sehen. Da man nie wusste, zu welchem Zeitpunkt diese Kontraktion stattfindet, wurde die Dauer der Aufnahme auf 24 Stunden erhöht. Dieses Phänomen wurde nur in der Mikrofluidkammer beobachtet. Turbulente Strömungen waren bei den ersten Versuchen nicht zu beobachten, da das Netzwerk am Ende aufhörte sich zu kontrahieren. Es konnte ein immer gleicher Ablauf beobachtet werden. Das Netzwerk fing an sich zu kontrahieren, bildete die dreidimensionalen Strukturen und brach dann in turbulente Strömungen aus, wobei dieser Ablauf mit zunehmender Zeit immer schneller auftrat. Am Ende der Versuchsreihe war es nur noch in den ersten Sekunden möglich eine dreidimensionale Struktur zu sehen.

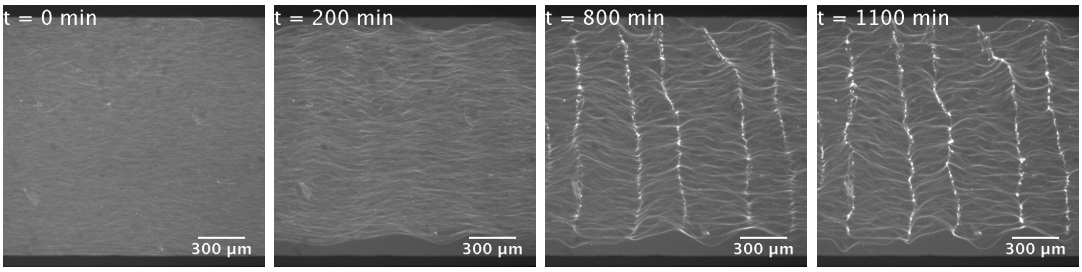


Abb. 4.17: Bei dieser Aufnahme ist erst eine Kontraktion in der y-Ebene mit folgender Kontraktion in der z-Ebene zu sehen. Diese fand aber erst nach 350 Minuten statt.

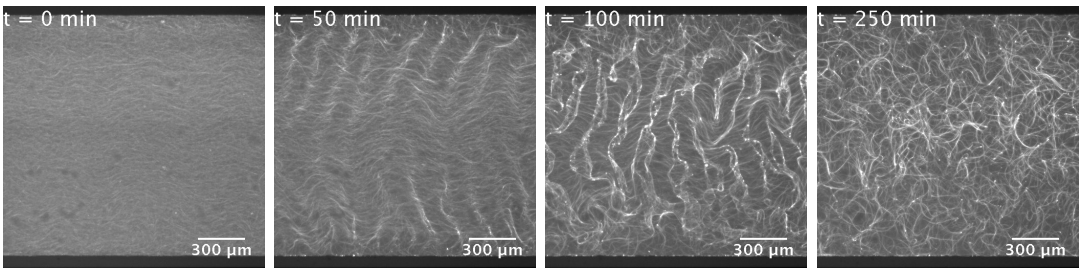


Abb. 4.18: Bei selbem Versuchsaufbau wie in Abbildung 4.17 findet hier die Kontraktion schon nach 50 Minuten statt. Danach folgt eine turbulente Strömung.

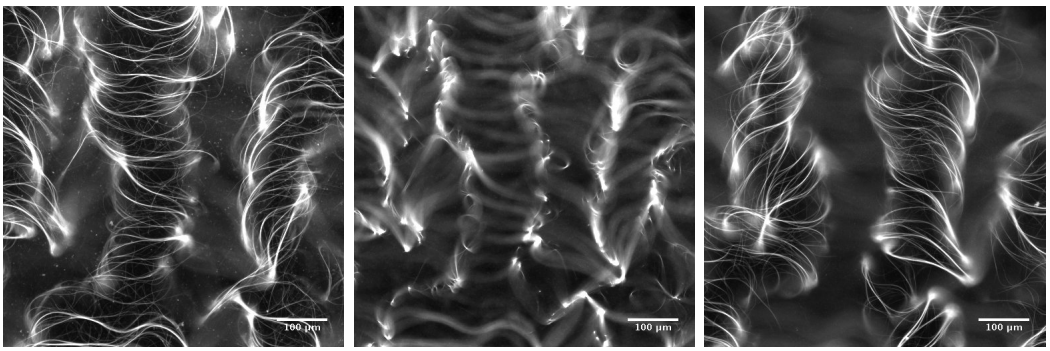


Abb. 4.19: Hier ist eine detaillierte Aufnahme der z-Ebene zu sehen. Das erste Bild stellt die unterste, das zweite die mittlere und das dritte die oberste z-Ebene nach einer Musterbildung dar. Es wurde eine 10x Vergrösserung benutzt.

Als Analyse wurde geprüft wie sich der Abstand der einzelnen Intensitätsmaxima von Probe zu Probe verhält. Dabei wurde dieser mit Programm 7.0.2 gemessen und verglichen. In Abbildung 4.20 ist zu sehen, wie das Programm aus den Bildern die Funktion der Intensitätsmaxima erzeugte. Die erhaltenen Messwerte wurden dann mit Hilfe von Programm 7.0.2 so bearbeitet, dass die konvexen Strukturen den Wert eins und die konkaven Strukturen den Wert null haben. Dies ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Dabei wird als Konvex die Struktur bezeichnet, die am grössten z-Wert scharf ist und Konkav ist die scharfe Struktur am kleinsten z-Wert, was ist in Abbildung 4.23 gezeigt ist. Mit dieser Funktion wurde in Kapitel 4.3.4 eine Fourieranalyse durchgeführt, da eine Periodizität vermutet wurde. Eine schematische Darstellung der Musterbildung ist in Abbildung 4.22 zu sehen.
Die erste Auswertung die durchgeführt wurde, ist die Messung der Abstände zwischen konvexen und konkaven Stellen im Netzwerk, welche sich immer abwechselten. Dabei wurde bei jedem Versuch der Abstand der konvexen und der konkaven Strukturen mit dem mittleren quadratischen Fehler des Mittelwerts angegeben und das Verhältnis zwischen dem Konvexen Abstand d_{konv} und dem Konkaven Abstand d_{konk} mit dem dazugehörige Fehler bestimmt. Die Messwerte aus Abbildung 4.24, die mit dem Programm 7.0.2 bestimmt wurden, sind in Tabelle 4.2 zu finden. Die daraus berechneten Werte sind in Tabelle 4.3 zu sehen. Es ist zu sehen, dass die Werte der konvexen - und konkaven Breite sich in den Abbildungen 4.24B und C sehr unterscheiden aber das Verhältnis trotzdem nah beieinander liegt. Diese Versuche sind auch die, bei denen man eine unterschiedliche Breite der beiden Strukturen fest-

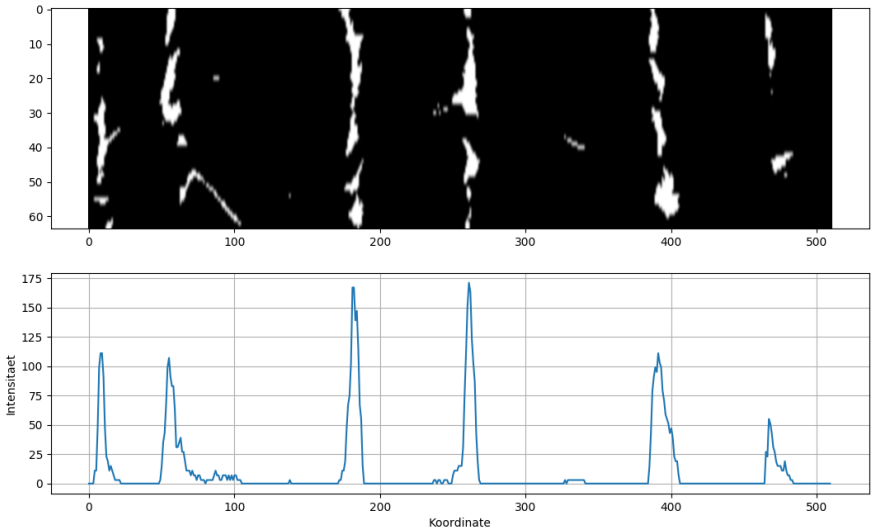


Abb. 4.20: Auf dem oberen Bild ist der ausgeschnittene Bildbereich der Aufnahme zu sehen. Unten ist dann die Intensität gegen die Koordinate geplottet. Der Wert der Intensität entsteht durch den Mittelwert der Pixel in einer Spalte.

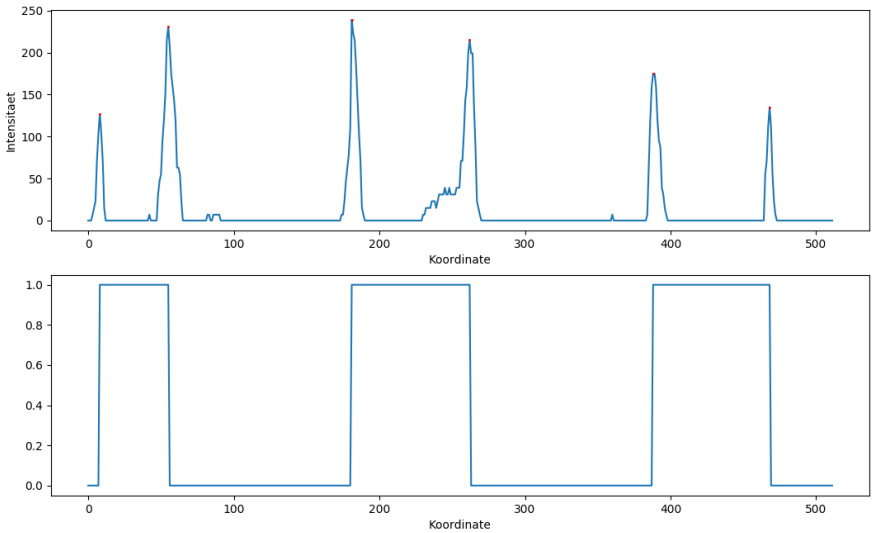


Abb. 4.21: Oben ist die Intensitätsverteilung aus Abbildung 4.20 zu sehen. Dabei sind die Maxima als rote Punkte dargestellt. Unten ist die daraus entstandene Rechteckfunktion abgebildet.

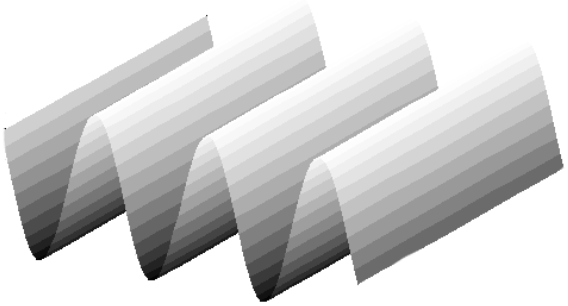


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der Musterbildung. Erzeugt mit gnuplot.

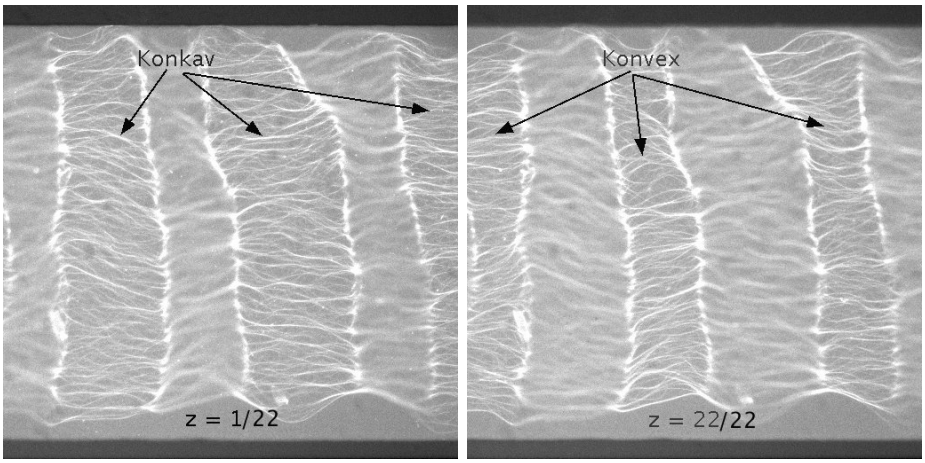


Abb. 4.23: Hier sind die konvexen und konkaven Strukturen des Netzwerks zu sehen. Bei z=1, an der untersten Ebene der Probe, sind die konkaven und bei z=22 die konvexen Strukturen scharf zu sehen.

stellen kann. Das ist bei den anderen Versuchen nur bedingt möglich. Man erkennt dies auch an dem Verhätniss $\frac{\langle d_{konv} \rangle}{\langle d_{konk} \rangle}$ was nah an eins liegt und damit impliziert, dass $\langle d_{konv} \rangle$ und $\langle d_{konk} \rangle$ fast gleich sind. Bei den Versuchen in Abbildung 4.24A und E fand keine vollständige Musterbildung statt. Man konnte lediglich am oberen und unteren Rand vermuten wo sich das Muster gebildet hätte. Deshalb wurden von oben nach unten Linien gezogen und diese Abstände ausgewertet. Die turbulente Strömung formte sich im Laufe der Zeit immer schneller bis keine Strukturen mehr sichtbar waren.

Es wurde vermutet, dass es an der Art der Einbringung der Mikrotubuli in den Mikrofluidkanal liegt. Es war zu beobachten, dass ein gutes Resultat erzielt werden konnte, wenn die Mikrotubuli nematisch ausgerichtet waren.

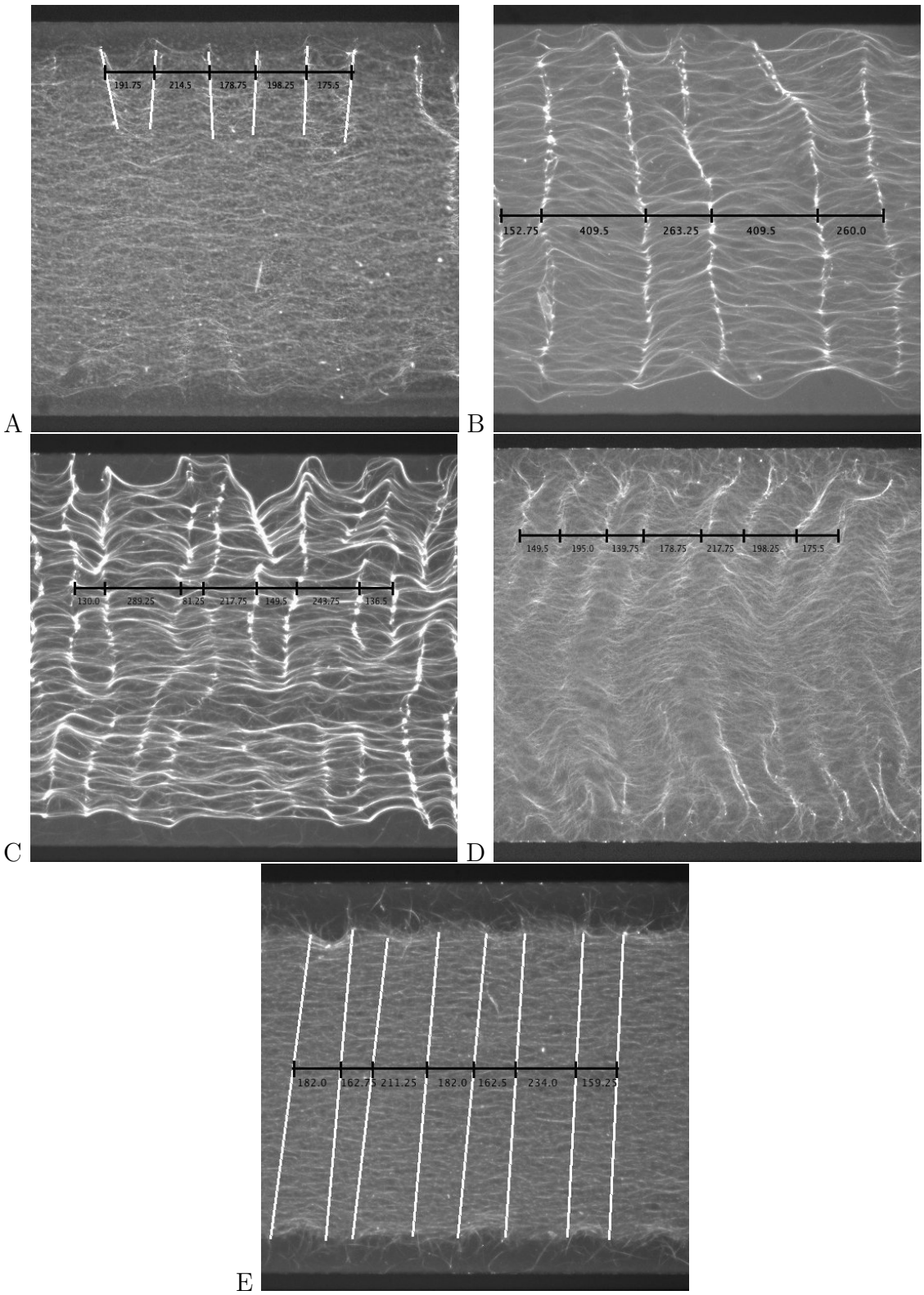


Abb. 4.24: Hier ist die Musterbildung der verschiedenen Versuche zu sehen. Die ermittelten Abstände sind in den Abbildungen eingezeichnet.

Abb. 4.24A				
$d_{konv}[\mu\text{m}]$	191.75	178.75	175.5	
$d_{konk}[\mu\text{m}]$	214.5	198.25		
Abb. 4.24B				
$d_{konv}[\mu\text{m}]$	152.75	263.25	260.0	
$d_{konk}[\mu\text{m}]$	409.5	409.5		
Abb. 4.24C				
$d_{konv}[\mu\text{m}]$	130.0	81.25	136.5	149.5
$d_{konk}[\mu\text{m}]$	289.25	217.75	243.75	
Abb. 4.24D				
$d_{konv}[\mu\text{m}]$	195.0	178.75	198.25	
$d_{konk}[\mu\text{m}]$	149.5	139.75	217.75	175.5
Abb. 4.24E				
$d_{konv}[\mu\text{m}]$	182.0	211.25	162.5	159.25
$d_{konk}[\mu\text{m}]$	162.75	182.0	234.0	

Tab. 4.2: Messwerte von Abständen der Musterbildung.

Abbildung	$\langle d_{konv}\rangle[\mu\text{m}]$	$\langle d_{konk}\rangle[\mu\text{m}]$	$\frac{\langle d_{konv}\rangle}{\langle d_{konk}\rangle}$	Zeit bis Musterbildung [min]
4.24A	182.0 ± 5.0	206.4 ± 8.1	0.88 ± 0.06	1145
4.24B	225.3 ± 36.3	409.5 ± 0	0.55 ± 0.09	400
4.24C	124.3 ± 14.9	250.3 ± 20.9	0.50 ± 0.10	1000
4.24D	190.7 ± 6.0	170.6 ± 17.4	1.12 ± 0.15	50
4.24E	178.8 ± 11.9	192.9 ± 21.3	0.93 ± 0.16	1445

Tab. 4.3: Berechnete Werte der Musterbildung.

Wegen Zeitmangel war nicht möglich eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt die Versuche systematisch zu reproduzieren.
Der dritte Versuch ist in Abbildung 4.24C zu sehen. Hier fällt auf, dass $\langle d_{konv}\rangle$ grösser ist als $\langle d_{konk}\rangle$ was daran liegen kann, dass die Kontraktion bei diesem Versuch viel schneller stattgefunden hat als bei den ersten beiden. Das Verhältnis zwischen beiden Abständen ist fast gleich. Bei einem Versuch ist es gelungen, eine Aufnahme vom kompletten Kanal zu erstellen. Das Problem an dieser Aufnahme ist die wechselnde Helligkeit der einzelnen Bilder, was durch die Kamera am Mikroskop verursacht wurde. Die Strukturen wurden deshalb mit Linien nachgezogen, um eine Analyse zu ermöglichen. Dies ist in Abbildung 4.25 zu sehen. Die einzelnen Abstände wurden mit Programm 7.0.2 an der Stelle des schwarzen Strichs ermittelt und sind in Tabelle

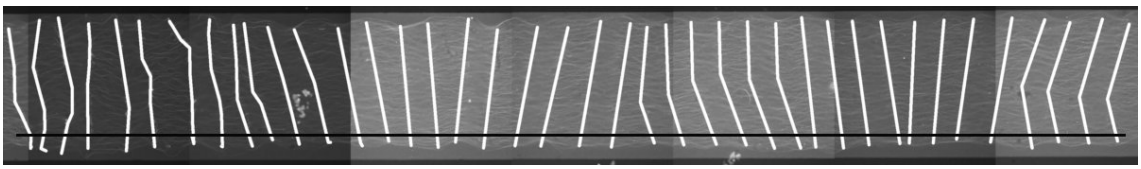


Abb. 4.25: Panelaufnahme einer Musterbildung. Die Striche waren für die Auswertung nötig, da die Helligkeit der Bilder schwankt. Da diese Aufnahme in der untersten z-Ebene gemacht wurde, sind die unscharfen Strukturen die Konvexen und die Scharfen die Konkaven.

4.4 dargestellt. Mit diesen Messwerten erhält man dann folgende Werte: $\langle d_{konv} \rangle = 281.3 \pm 9.2\ \mu$m, $\langle d_{konk} \rangle = 292.6 \pm 18.3\ \mu$m, $\frac{\langle d_{konv} \rangle}{\langle d_{konk} \rangle} = 0.96 \pm 0.09$. Da das Verhältnis nahe an eins liegt bedeutet dies, dass die konvexen und konkaven Strukturen fast den gleichen Abstand haben. Die Panelaufnahme stammt von dem Versuch in Abbildung 4.24B.

$d_{konv}[\mu\text{m}]$	$d_{konk}[\mu\text{m}]$
195.0	234.1
204.8	419.4
253.6	409.6
302.3	243.8
234.1	273.1
302.3	341.3
292.6	243.8
282.8	214.6
302.3	331.6
273.1	390.1
321.8	351.1
312.1	321.8
302.3	282.8
282.8	204.8
282.8	263.3
312.1	136.5
253.6	243.8
360.8	360.8
273.1	-

Tab. 4.4: Messwerte der Kanalaufnahme für die konvexen und konkaven Abstände.

4.3.4 Fourieranalyse der Musterbildung

Da eine Regelmäßigkeit der Muster zu sehen war, wurde eine Fourieranalyse durchgeführt. Dabei erhält man eine Ortsfrequenz mit der man die Wellenlänge λ der Muster in folgendem Zusammenhang berechnen kann: $\xi = 1/\lambda$[8, S.4]. Diese repräsentiert dann $\lambda = d_{konv} + d_{konk}$. Die Wellenlänge kann man dadurch auch mit den Werten von d_{konv} und d_{konk} aus Tabelle 4.3 berechnen und mit denen aus der Fouriertransformation vergleichen.
Die Fourieranalyse wurde mit dem Programm 7.0.2 durchgeführt. Dabei hat man die Rechteckfunktion aus Abbildung 4.21 mit Hilfe einer 'fast fourier transformation' transformiert. Durch die erhaltene Ortsfrequenz lies sich ein periodisches Signal erzeugen, welches dem originalen Signal ähnelte. Die Fehler der Wellenlänge wurden wie in Abbildung 4.26 ermittelt, indem man an verschiedenen y-Koordinaten die Wellenlängen berechnet hat. Nach Bildung des Mittelwerts konnte der mittlere

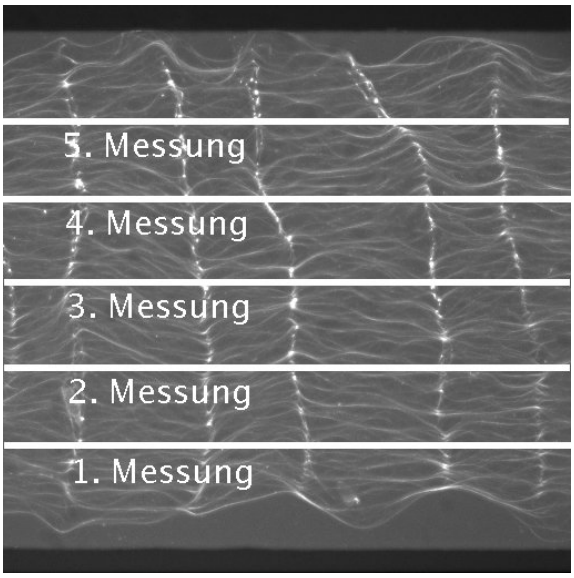


Abb. 4.26: Schema zur Ermittlung der Mittelwerte mit den dazugehörigen Fehlern der Messungen.

quadratische Fehler des Mittelwerts mit Gleichung 4.2 bestimmt werden.
Durch die hohe Anzahl an Messwerten lies sich die Intensitätsverteilung aus der Kanalaufnahme aus Abbildung 4.25 am genausten auswerten. Diese erzeugte einen Peak bei einer Frequenz, was in Abbildung 4.27 zu sehen ist. Die Nullfrequenz konnte dabei vernachlässigt werden. Die Wellenlänge der Aufnahme hat einen Mittelwert von 585.7 μm mit einem Fehler von 2.5 μm. In Tabelle 4.5 sind die Messwerte der

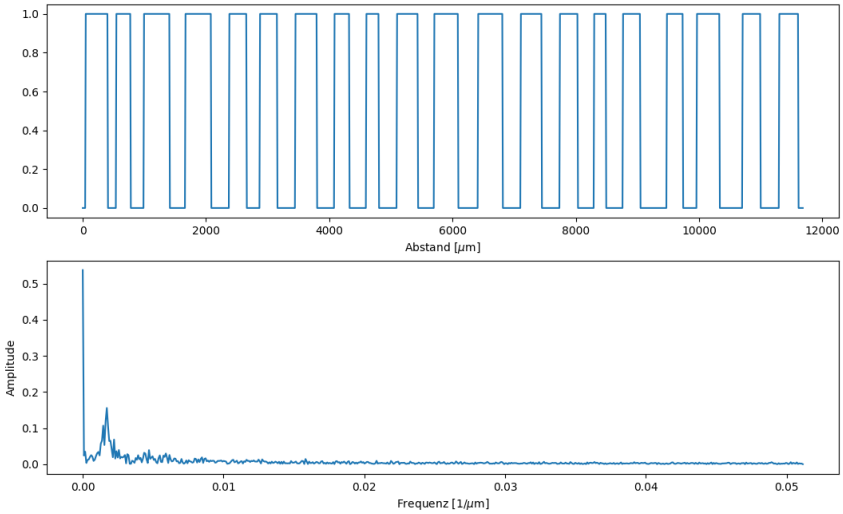


Abb. 4.27: In der oberen Abbildung ist die Rechteckfunktion zu sehen, die fouriertransformiert wurde. Auf der unteren Abbildung ist die Fouriertransformierte zu sehen.

anderen Muster und die Wellenlängen der Messungen aus Kapitel 4.3.3 zu sehen, welche in Abbildung 4.28 miteinander vergleichen wurden. Wenn die Fehler sich überlappen liegen sie im Fehlerintervall des anderen Wertes.
Dabei fällt auf, dass vier von sechs Werten in diesem Intervall liegen. Dass der Wert von Abbildung 4.24 A nicht im Bereich liegt, lässt sich durch die schwach ausgeprägte Musterbildung erklären. Dieses Muster konnte nur mit Hilfe von eingezeichneten Linien erahnt werden und ist somit anfällig für Fehler. Bei den Werten von Abbildung 4.24 B ist dies durch das Verschwinden der ersten Linie zu erklären. Wie man sehen kann, ist diese nur in einem bestimmten Bereich zu sehen und muss für den restlichen Kanal an einer Stelle angenommen werden. Bei Abbildung 4.24 E wurde ebenfalls das Muster nachgezeichnet und man kann erkennen, dass der Messwert gerade noch so im Toleranzbereich liegt. Man kann also ebenfalls die Fouriertransformation benutzen, um die Wellenlängen zu berechnen, da eine ausreichende Genauigkeit vorhanden ist, falls die Strukturen gut dargestellt sind. Es konnte bei der Fouriertransformation der hier verwendeten Rechteckfunktion allerdings nur die Wellenlänge ermittelt werden. Um die einzelnen Abstände zu erhalten würde man eine andere Funktion benötigen.

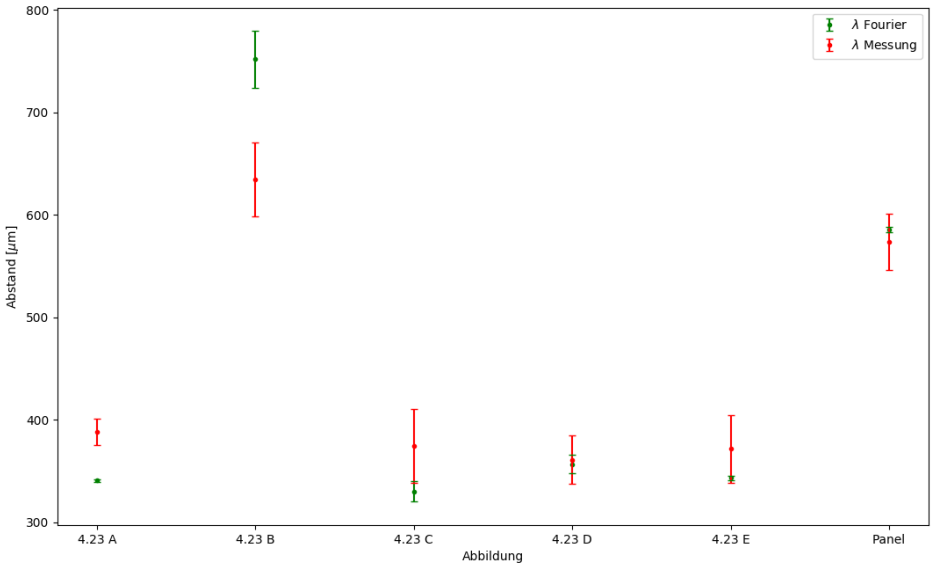


Abb. 4.28: Hier sind die Wellenlängen der Fouriertransformation und die Wellenlänge der Messung aus Kapitel 4.3.3 mit ihren Fehlern geplottet.

Abbildung	$\langle\lambda\rangle$ Fourier [μm]	$\langle\lambda\rangle$ Abstandsmessung [μm]
4.24A	340.8 ± 1.0	388.4 ± 13.1
4.24B	751.9 ± 27.5	634.8 ± 36.3
4.24C	330.2 ±9.8	374.6 ± 35.8
4.24D	357.0 ± 8.8	361.3 ± 23.4
4.24E	343.4 ± 1.8	371.7 ± 33.2

Tab. 4.5: Messwerte der Musterbildung aus der Fouriertransformation und aus Kapitel 4.3.3. Die Werte, aus denen die Mittelwerte und Fehler berechnet wurden, sind in Tabelle 4.6 zu finden.

Abbildung	λ [μm]				
4.24A	346.7	345.6	338.0	336.9	336.9
4.24B	830.4	820.6	823.9	775.7	509.2
4.24C	269.7	310.7	381.1	308.7	381.1
4.24D	435.5	338.8	336.4	337.2	337.2
4.24E	334.7	333.9	345.3	354.2	348.6
Panel	584.7	583.7	592.9	566.6	600.7

Tab. 4.6: Einzelne Messwerte zur Bestimmung des Mittelwerts und des mittleren quadratischen Fehlers.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Bachelorarbeit wurde die Kontraktion von Netzwerken aus Mikrotubuli untersucht. Dabei stellte man fest, dass diese in unterschiedlichen Arten stattfinden kann. Es war eine Asternbildung, eine Kontraktion der Schichtdicke und eine Musterbildung zu beobachten. Man benutzte Kanäle aus doppelseitigem Klebeband und PDMS-Mikrofluid Kanäle. Durch die Bildung der Muster folgte auf die Kontraktion eine Expansion im gleichem Versuch.
Die Analyse der Astern bestand darin zu sehen, wie diese sich mit der Zeit verhalten. Es wurde dabei eine Kontraktion festgestellt. Die Schichtdicke kontrahierte sich ebenfalls wobei die finale Dicke unterschiedlich war. Beim wiederholen der Versuche fiel eine Musterbildung auf, von der die Abstände untersucht wurden. Durch eine Fouriertransformation war es möglich, eine Periodizität zu zeigen und die Wellenlänge dieser Muster zu ermitteln.
Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kontraktion und Expansion nacheinander und im gleichem Versuch stattfinden können. Eine derartige Musterbildung wurde bisher nicht beobachtet und bildet die Grundlage für weiterführende Theorien und Versuche.

6 Verwendete Protokolle

6.1 Mikrotubuli

4 μl Tubulin 1:5 labeled/unlabeled [Porcine Tubulin, Cytoskeleton, T240] [Tubulin HiLyte Fluor 488 labeled (porcine), Cytoskeleton, TL488M]
+ 6,78 μl M2B (PIEPES [Piperazine-1,4bis(2ethanesulfonic acid) 1,4Pieperazine-dieethansulfonic acid ($C_8H_{18}N_2O_6S_2$), Sigma, P6757], $MgCl_2$ [Magnesiumchlorid, Merck, 8.147330500], EGTA [Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid ($C_{14}H_{24}N_2O_{10}$), Biomol, 54648.100])
+ 1,22 μl $MgCl_2$(50 mM)
+ 1,5 μl DMSO(50%) [Dimethyl Sulfoxid, Merck, 317275]
+ 1,5 μl GTP [Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate, Sigma, G8877]
= 15 μl MT

990 μl M2B
+ 10 μl Taxol [Palitaxel, Sigma, T7402]
=1000 μl M2B/Taxol

185 μl M2B/Taxol
+ 15 μl MT
= 200 μl Mikrotubuli

6.2 Bewegende Bündel

K-S:
14 μl Kinesin I [Kinesin 401-BIO-6xHIS, plasmid pWC2 was a gift from Jeff Gelles (Addgene plasmid # 15960) and was purified at the Dortmund protein facility (DPF)]
+ 0.5 μl 50mM DTT [DL-Dithiothreitol, Sigma, 43815]

+ 8 μl Streptavidin [Streptavidin (S.avidinii), Invitrogen, 434301]
+ 5.5 μl M2B = 22.5 μl

AM:
4 μl K-S
+ 6 μl Trolox [(+-)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane 2-carboxylic acid, Sigma, 238813-G]
+ 8 μl PEP [Phosphorenolpyruvic acid monopodassium salt, Alfa Aesar, Lot:10199963]
+ 1.7 μl PK [Pyruvate Kinase/Lactic Dehydrogenase, Sigma, P0294]
+ 16.6 μl PEG [Poly(ethylene glycol), Sigma, 95172]
+ 2 μl ATP [Adenosin 5'-triphosphat disodium salt hydrate, Sigma, A3377]
+ 1.3 μl Go [Glucose-Oxidase from Aspergillus nieger, Sigma, 49180]
+ 0.65 μl Katalase [Catalase frome bovine Liver, Sigma, C9322]
+ 3.25 μl 10mM DTT
+ 1 μl Glucose [D-(+)-Glucose, Sigma, G7528]
+ 5.5 μl M2B = 50 μl

MT:
4 μl Tubulin
+ 1.78 μl M2B
+ 1.22 μl 50mM $MgCl_2$
+ 1.5 μl 50% DMSO
+ 5 μl PEG
+ 1.5 μl GTP = 15 μl

PLL-g-PEG:
10 μl PLL-g-PEG [PLL(20)-g[3.5]- PEG(2) (PLL(20 kDa) grafted with PEG(2 kDa)), SuSoS]
+ 90 μl HEPES [4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), Sigma, H4034]

PDMS:
60g PDMS[Silicone Elastomer Base (Sylgard), Dow Corning]
+ 6g Härter [Silicone Elastomer curing agent (Sylgard), Dow Corning]

Chemikalie	Stock conentration	Final concentration
PEP	200 mM	18.63 mM
PK	-	1.7 μL in 50 μL
ATP	100 mM	2 mM
PEG	3 %	1 %
Taxol	1 mM	7 μM

Tab. 6.1: Stock- und finale Konzentration verschiedener benutzter Chemikalien.

7 Programme

Die Programme, die aus der log-File die Zeiten auslesen, werden hier nicht genannt, da diese nur für Dateien von dem verwendeten Mikroskop funktionieren.

7.0.1 Kontraktion auswerten

Astern

```
import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import os

#definieren des Videos
capture = cv2.VideoCapture('.../Video.avi')
i = 0

#falls die txt Dateien vorhanden sind dann loeschen
if "hell.txt" in os.listdir('.'):
        os.remove("hell.txt")
if "kontr.txt" in os.listdir('.'):
        os.remove("kontr.txt")

while True:
    var, bild = capture.read()
    if var == True:

        #jedes Bild in Graustufen umwandeln
        grau = cv2.cvtColor(bild,cv2.COLOR_BGR2GRAY)

        #Threshold (Schwellenwert) benutzen und Pixel zaehlen, die weiss sind
        #Schwellenwert (xx) muss an das Video angepasst werden
        C = np.array(grau)
        C[C > xx] = 255
        hell =  np.count_nonzero(C == 255)

        #w0 ist die anfaengliche Anzahl an weissen Pixeln
        if i == 0:
                w0 = hell
        hell_spots = str(hell)

        #Anzahl der hellen Pixel in Datei hell.txt schreiben
```

```
        f1 = open("hell.txt","a")
        f1.write(hell_spots)
        f1.write(' ')

        #definieren der Kontraktion und diese in kontr.txt schreiben
        kontr  = (float(w0) - float(hell))/float(w0)
        kontraktion = str(kontr)
        f3 = open("kontr.txt","a")
        f3.write(kontraktion)
        f3.write(' ')

        #Video zur Kontrolle anzeigen
        cv2.imshow('bild1',C)

        #Programm beenden wenn q gedrueckt wird
        if cv2.waitKey(30) & 0xFF == ord('q'):
            break
    else:
        break

capture.release()
f1.close()
f3.close()
cv2.destroyAllWindows()

#plotten der hellen Pixel gegen die Zeit
x = np.loadtxt("time.txt")
y = np.loadtxt("hell.txt")

plt.xlabel('Zeit $t$ [min]')
plt.ylabel('Anzahl heller Pixel')
plt.plot(x,y)
plt.grid(True)
plt.show()
```

Schichtdicke

```
import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import os
from scipy.optimize import curve_fit

#Videoquelle definieren
capture = cv2.VideoCapture('.../Video.avi')

#falls die txt Dateien vorhanden sind dann loeschen
if "y.txt" in os.listdir('.'):
        os.remove("y.txt")

if "epsilon.txt" in os.listdir('.'):
        os.remove("epsilon.txt")

w0 = 0
```

```
18 while True:
19
20     var, bild = capture.read()
21
22     if var == True:
23
24         #jedes Bild bilateral filtern
25         filter = cv2.bilateralFilter(bild,9,90,90)
26
27         #jedes Bild in Graustufen umwandeln
28         grau = cv2.cvtColor(filter,cv2.COLOR_BGR2GRAY)
29
30     #Schwellwert anwenden wobei der Wert fuer xx auf das Video angepasst
           werden muss und einen Wert zwischen 0 - 255 hat
31         var, schwellwert = cv2.threshold(grau,xx ,255,0)
32
33         #benutze morphologische Operation, das Closing
34         #als structure Element wurde ein Rechteck benutzt
35         kernel = cv2.getStructuringElement(cv2.MORPH_RECT,(2,2))
36         closing = cv2.morphologyEx(schwellwert, cv2.MORPH_CLOSE, kernel)
37
38         #Konturen suchen und die mit der groessten Flaeche auswaehlen
39         image, konturen, hierarchy = cv2.findContours(closing,cv2.RETR_TREE,
               cv2.CHAIN_APPROX_SIMPLE)
40         cnt = max(konturen, key = cv2.contourArea)
41
42         #Rechteck um die groesste Flaeche legen
43         x,y,w,h = cv2.boundingRect(cnt)
44
45         #Hoehe von Pixel in micron umrechnen und anschliessend in Datei y.txt
               schreiben
46         high = float(h)* 3.25
47         hoehe = str(high)
48         f1 = open("y.txt","a")
49         f1.write(hoehe)
50         f1.write(' ')
51
52         #erste Hoehe als w0 definieren, Kontraktion bestimmen und in epsilon.
               txt schreiben
53         if h > w0:
54                 w0 = h
55         float(h)
56         float(w0)
57         epsilon = (float(w0) - float(h)) / float(w0)
58         epsilon = str(epsilon)
59         f3 = open("epsilon.txt","a")
60         f3.write(epsilon)
61         f3.write(' ')
62
63         #Rechteck genauer definieren, Linie in der Hoehe einzeichnen und
               Hoehe der Kontraktion im Kontrollvideo anzeigen
64         cv2.rectangle(bild,(x,y),(x+w,y+h),(0,255,0),2)
65         bild = cv2.line(bild,(300,y+h),(300,y),(0,0,255),5)
```

```
        font = cv2.FONT_HERSHEY_SIMPLEX
        cv2.putText(bild,str(h),(310,y + 45), font, 1,(0,0,255),2,cv2.LINE_AA
            )

        cv2.imshow('bild1',bild)

        #Programm beenden wenn q gedrueckt wird
        if cv2.waitKey(30) & 0xFF == ord('q'):
            break

    else:
        break

capture.release()
f1.close()
f3.close()
cv2.destroyAllWindows()

#Funktion zum fitten definieren
def fitFunc(time, tau, einf):
    return einf * (1 - np.exp(-(time/tau )))


#Werte einlesen
x = np.loadtxt("time.txt")
y = np.loadtxt("y.txt")
e = np.loadtxt("epsilon.txt")
q = np.loadtxt("time.txt")
z = fitFunc(x,100,0.25)
popt, pcov = curve_fit(fitFunc, x, e)

#zwei Plots erstellen
plt.figure(1)
plt.subplot(211)
plt.xlabel('Zeit $t$ [min]')
plt.ylabel('Schichtdicke $W(t)$ [$\mu$m]')
plt.plot(x,y, label='Messwerte')
plt.legend(loc="upper right")
plt.grid(True)

plt.subplot(212)
plt.xlabel('Zeit $t$ [min]')
plt.ylabel('Kontraktion $\epsilon (t)$ [$\mu$m]')
#gefittete Funktion plotten und wahlweise Werte fuer tau und epsilon_inf  auf
     dem Plot anzeigen lassen
plt.plot(x, fitFunc(x, *popt), 'r-', label='fit')
plt.text(400, 0.07, r"$\tau$ = "+str(popt[0].round(2)))
plt.text(400, 0.05, r"$e_\infty$ = "+str(popt[1].round(3)))
plt.plot(x,e, label='Messwerte')
plt.legend(loc="upper right")
plt.grid(True)
plt.show()
```

7.0.2 Analyse der Musterbildung

Intensitaetsverteilung

```
import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import os
from scipy.fftpack import fft, ifft

#falls die txt Dateien vorhanden sind dann loeschen
if "intensity.txt" in os.listdir('.'):
        os.remove("intensity.txt")

if "x.txt" in os.listdir('.'):
        os.remove("x.txt")


i = 0
j = 0
k = 0
#Bildquelle definieren
bild = cv2.imread('.../Bild.jpg')

#Bild bilateral filtern
filter = cv2.bilateralFilter(bild,9,75,75)

#in Graustufen umwandeln
grau = cv2.cvtColor(filter,  cv2.COLOR_BGR2GRAY)

#Schwellwert benutzen wobei der Wert von xx dem Bild angepasst werden muss
var , schwellwert = cv2.threshold(grau, xx, 255, 0)

#Opening benutzen wobei als structure Element eine Ellipse benutzt wird
kernel = cv2.getStructuringElement(cv2.MORPH_ELLIPSE,(3,2))
opening = cv2.morphologyEx(schwellwert, cv2.MORPH_OPEN, kernel)

#Bildausschnitt auswaehlen, Bild zuschneiden und anzeigen
ausschnitt = cv2.selectROI(opening)
zuschnitt = schwellwert[int(ausschnitt[1]):int(ausschnitt[1]+ausschnitt[3]),
    int(ausschnitt[0]):int(ausschnitt[0]+ausschnitt[2])]
cv2.imshow('bild',zuschnitt)

#Hoehe und Breite des ausgeschnittenen Bildes definieren
hoch = np.size(zuschnitt, 0)
breit = np.size(zuschnitt, 1)

#Mittelwert ueber alle Pixel in einer Spalte nehmen und in intensity.txt
    speichern
while i < breit:
        inten = 0
        k = 0
        while k < hoch:
```

```
                inten = zuschnitt[k][i] + inten
                k = k + 1
        inten = inten / hoch
        inten_str = str(inten)
        f1 = open("intensity.txt","a")
        f1.write(inten_str)
        f1.write(' ')
        i = i + 1

#x-Werte in x.txt speichern
while j < breit:
        x = j
        x_str = str(j)
        f2 = open("x.txt","a")
        f2.write(x_str)
        f2.write(' ')
        j = j + 1

f1.close()
f2.close()
cv2.waitKey(0)
cv2.destroyAllWindows()

x = np.loadtxt("x.txt")
y = np.loadtxt("intensity.txt")

#plotten des ausgeschnittenen Bildes und der Intensitaet mit geteilter x-
    Achse
plt.figure(1)
x1 = plt.subplot(211)
plt.imshow(zuschnitt, cmap = 'gray', interpolation = 'bicubic', aspect="auto"
    )

plt.subplot(212, sharex=x1)
plt.xlabel('Koordinate')
plt.ylabel('Intensitaet')
plt.plot(x,y)
plt.grid(True)
plt.subplots_adjust(wspace = 0.33 )
plt.show()
```

Messwerte als Funktion darstellen,Abstand der Maxima bestimmen und Fouriertransformation

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy import signal
import os
import peakutils

#einlesen der Werte aus der Intensitaetsverteilung
t = np. loadtxt('.../xwerte.txt') #*skalierung
s = np. loadtxt('.../intensitaet.txt')
```

```
i = 0
o = 0
def frange(start, stop, step):
        i = start
        while i < stop:
            yield i
            i += step

#Maxima finden, der Wert fuer  min_dist muss individuell an die Messwerte angepasst werden
#thres ist die maximale Hoehe der betrachteten Peaks und muss den Messwerten angepasst werden
werte = peakutils.indexes(s, thres=xx/max(s), min_dist= xx) #*skalierung
i = 0
ort_t = np.zeros(len(werte))
while i < len(werte):
        ort_t[i] = int(np.where(t == werte[i])[0])
        i += 1
ort_t = np.asarray(ort_t, dtype=int)

#Abstand zwischen den Peaks berechnen und in der Konsole anzeigen
u = 0
o = len(werte - 1)
print 'Abstand:', ' '
abstand = np.zeros(len(s))
mittelwert = 0
p = 0
while u+1 < o:
        abstand[p] = werte[u+1] - werte[u]
        mittelwert += abstand[p]
        p = p + 1
        u = u + 1
mittelwert = mittelwert / p
print mittelwert
peak_connect = np.zeros(len(s))
#Peaks miteinander verbinden und in die Funktion peak_connect speichern
k = 1
j = np.where(t == werte[0])
while k <= p:
        h = 0
        #ungerade
        if k % 2:
                anfang = np.where(t == werte[k - 1])
                ort = np.where(t == werte[k])
                while anfang[0]+h <= ort:
                        peak_connect[anfang[0]+h] = 1
                        h = h + 1
                k = k + 1
        #gerade
        else:
                k = k + 1

```

```
y = peak_connect

#fft definieren
#0.3077 micron/pixel, festgestellt mit Fiji, fuer Panelaufnahme 0.102539063
Fs = 0.3077
Ts = 1.0/Fs
n = len(y)
dFs = Fs / n
k = 0
for i in frange(0, Fs/2-dFs, dFs):
        k +=1
freq = np.zeros(k)
k = 0
for i in frange(0, Fs/2-dFs, dFs):
        freq[k] = i
        k += 1
freq = freq[range(n/2)]

Y = np.fft.fft(y) / n
Y = Y[range(n/2)]

#Wellenlaenge ermitteln und ausgeben
max_Y = max(abs(Y[1:len(Y)]))
max_Y_koor = np.where(abs(Y) == max_Y)[0][0]
freq_max = freq[max_Y_koor]
wellenlange = 1/freq_max
print wellenlange

#Plots erzeugen
f, ( ax2, ax3 ) = plt.subplots(2)
ax2.set_xlabel('Abstand [$\mu$m]')
ax2.plot(t, y)
ax3.set_xlabel('Frequenz [1/$\mu$m]')
ax3.set_ylabel('Amplitude')
ax3.plot(freq, abs(Y))
plt.show()
```

Literaturverzeichnis

[1] Gerald Karp (2005): Molekulare Zellbiologie, Springer Verlag, 1. deutsche Auflage.

[2] Rob Phillips, Jane Kondev, Julie Theriot, Hernan G. Garcia (2012): Physical biology of the cell, Garland Science, 2. Auflage.

[3] David Boal (2012): Mechanics of the cell, Cambridge University Press, 2. Auflage.

[4] Peter J Foster, Sebastian Fürthauer, Michael J Shelley, Daniel J Needleman (2015): Active contraction of microtubule networks, eLife. Volume 4.

[5] Sanchez, Tim and Chen, Daniel T. N. and DeCamp, Stephen J. and Heymann, Michael and Dogic, Zvonimir (2012): Spontaneous motion in hierarchically assembled active matter, Nature volume 491, 431–434.

[6] Marcus Braun, Zdenek Lansky, Feodor Hilitski, Zvonimir Dogic, Stefan Diez: Entropic forces drive contraction of cytoskeletal networks, Bioessays, Volume 38, 474-481.

[7] Jörn Große-Knetter, Peter Schaaf (2014): Das Physikalische Praktikum Band I, Universitätsdrucke Göttingen.

[8] Glenn D. Boreman (2001): Modulation Transfer Function in Optical and Electro-Optical Systems, SPIE.

[9] Kasimira T. Stanhope, Vikrant Yadav, Christian D. Santangelo, Jennifer L.Ross (2017): Contractility in an Extensile System.

[10] Ai Saito, Tamanna Ishrat Farhana, Arif Md. Rashedul Kabir, Daisuke Inoue, Akihiko Konagaya, Kazuki Sadaab, Akira Kakugo (2017): Understanding the emergence of collective motion of microtubules driven by kinesins: role of concentration of microtubules and depletion force, RSC Adv., 7, 13191.

Danksagung

Ich danke Dr. Isabella Guido dafür, dass Sie immer Zeit für mich hatte und meine Fragen beantworten konnte. Sie hat es geschafft, mein Interesse für das Thema zu entfachen. Des Weiteren danke ich Smrithika Subramani, die mir ihre bisherige Arbeit zeigte und mir die Durchführung der Experimente erklärte. Weiterhin danke ich auch Maren Müller und Sarah Romanowski, die mir im Labor geholfen haben und mir zur Seite standen. Sarah danke ich besonders für die Herstellung der PLL-g-PEG Coverslips und der Wafer, die für den Mikrofluidkanal benötigt wurden. Des Weiteren danke ich Dr. Christian Westendorf für die Einführung am Mikroskop und der Beantwortung der daraus resultierenden Fragen. Vielen Dank auch an Herr Prof. Dr. Eberhard Bodenschatz, der mir diese Bachelorarbeit ermöglicht hat.

Erklärung Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entnommene Stellen habe ich unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Richtlinien zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis an der Universität Göttingen wurden von mir beachtet. Eine gegebenenfalls eingereichte digitale Version stimmt mit der schriftlichen Fassung überein. Mir ist bewusst, dass bei Verstoß gegen diese Grundsätze die Prüfung mit nicht bestanden bewertet wird.

Göttingen, den 6. September 2018

(Tobias Strübing)