

Molekulare Motoren

Gruppe 26
Anh Tong
Tobias Theil
Kholodkov Jakov

1. Dezember 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
2. Verwendete Methoden	2
3. Experimentelles Vorgehen	2
4. Funktionsweise des fluoreszierenden Aktinmarkers	2
5. Zusammenhang zwischen numerischer Apertur und Auflösungsgrenze	2
6. Experimentelles Vorgehen und Ergebnisse	4
6.1. Abhängigkeit der Aktingeschwindigkeit von der Konzentration des ATP	4
7. Berechnung der Messunsicherheiten	4
8. Diskussion	4
9. Zusammenfassung	4
A. Anhang	4
A.1. Fragen	4

Literatur

- [1] Pelzl Carina, Loiseau Etienne, and Bleicher Philip. <https://www.ph.tum.de/academics/org/labs/fopra/docs/userguide-07.en.pdf>. [Online: accessed 30.11.2016].

1. Einleitung

2. Verwendete Methoden

3. Experimentelles Vorgehen

4. Funktionsweise des fluoreszierenden Aktinmarkers

Für die Messung der Aktineschwindigkeit wurde ein fluoreszierender Marker verwendet. Fluoreszenz beschreibt eine spezielle Art der Abstrahlung von Photonen durch einen quantenmechanischen Positionswechsel eines Elektron in einen energetisch niedrigeren Zustand. Für Fluoreszenz braucht es ein Dreinevensystem bei dem das höchste Energieniveau kurzlebig, und das mittlere Energieniveau sehr langlebig ist. Indem man die passende Lichtfrequenz verwendet, regt Elektronen in das höchste Energieniveau an, von dem sie sich schnell, ohne Photoemission, in das mittlere Niveau abregen. In diesem Energieniveau verweilen sie, bis es spontan zu einer Abregung und der damit verbundenen Lichtemission kommt. Da die Energiedifferenz zwischen mittlerem und niedrigstem Energieniveau kleiner ist als die Energiedifferenz zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Niveau, ist die Wellenlänge des Abgestrahlten Lichtes kleiner. Das wird schematisch in Abbildung 1 verdeutlicht.

5. Zusammenhang zwischen numerischer Apertur und Auflösungsgrenze

Die Auflösungsgrenze eines Mikroskopes ist durch die numerische Apertur N_A gegeben, einer dimensionslosen Zahl, die abhängig von der Wellenlänge den minimalen noch zu messenden Abstand zwischen zwei Lichtpunkten angibt. Wenn das Licht senkrecht auf die Linse einfällt lautet der minimale Abstand d_{min} :

$$d_{min} = \frac{1.22\lambda}{N_A} \quad (1)$$

Als Fausregel merkt man sich $d_{min} \approx \frac{\lambda}{N_A}$, da der Vorfaktor vom Einfallswinkel des Lichts auf die Linse abhängt. Hätten wir in unserem Versuch ein Auflicht-, oder ein Durchlichtmikroskop für die Analyse der Aktineschwindigkeit verwendet, hätten wie bei blauem Licht mit $\lambda = 488nm$ und der im Versuch gegebenen Linse eine Auflösungsgrenze von 180 nm.

Die Auflösung des Fluoreszenzmikroskops beträgt $1.57\mu m/Pixel$. Bei einer Aktinlänge im Bereich von einigen μm [1] scheint die Auflösung eines gewöhnlichen Mikroskopes besser zu sein. Jedoch würde man die Aktinstrukturen nicht erkennen, da es zu viel Streulicht gäbe. So ist der Grund für die Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes der deutlich bessere Kontrast des Fluoreszenzmikroskopes im Vergleich zum Auflicht-, oder Durchlichtmikroskop.

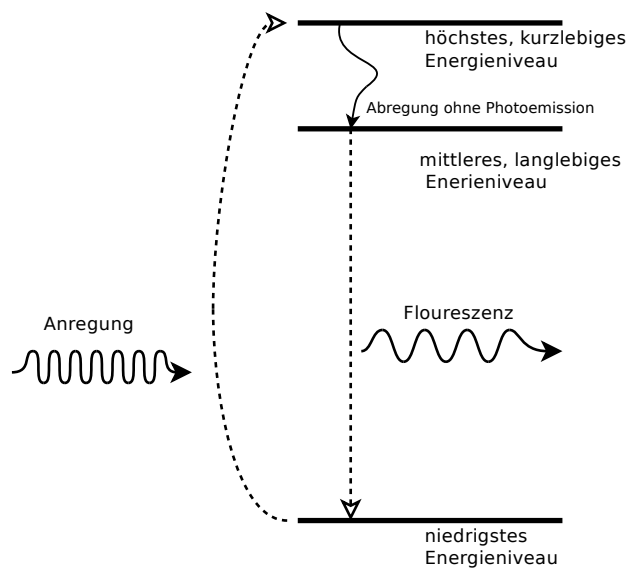


Abbildung 1: Ein Dreiniveausystem für Floureszenz

6. Experimentelles Vorgehen und Ergebnisse

6.1. Abhängigkeit der Aktingeschwindigkeit von der Konzentration des ATP

Bei der Versuchsvorbereitung wurden mit Myosin beschichtete Glasplättchen hergestellt. Danach wurden Aktinfilamente auf das Myosin gegeben und das im Motility Buffer gelöste ATP hinzugefügt. Mit dem Mikroskop und einer CCD Kamera wurden für verschiedene ATP-Konzentrationen alle 100 ms insgesamt 100 Bilder aufgenommen. Mithilfe des Programms ImageJ konnte man die Geschwindigkeit der Aktinfilamente bestimmen. Dabei wurden die Geschwindigkeit jener Aktinfilamente gemessen, die sich über die Zeit von 100ms kontinuierlich bewegt haben. Bei höheren Konzentrationen von ATP war die Geschwindigkeit der Aktinfilamente deutlich höher als bei niedrigen Konzentrationen, wie durch die Michaelis-Menten Gleichung 2 vorhergesagt.

$$\nu = \frac{\nu_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Jedoch zeigt der letzte Messpunkt bei der ATP Stoffmenge von $2000\mu\text{Mol}$ eine starke Abweichung vom geplottetem Graphen 2. Bereits bei der Versuchsdurchführung war die geringe Geschwindigkeit der Filamente aufgefallen. Diese Abweichung könnte auf einem nicht linearen Zusammenhang zwischen Aktingeschwindigkeit und Produktionsrate des ADP deuten. Eine weitere Ursache für die niedrigen Geschwindigkeiten könnte ein Pipetierfehler sein, der dafür gesorgt hat, dass es eine andere ATP Konzentration in der Lösung gab. Um die Nichtlinearität genauer zu untersuchen müsste man den Versuch erneut durchführen, mit mehr Abstufungen verschiedener Konzentrationen. Bei der Wiederholung des Versuchs müsste man ebenso darauf achten genau zu pipetieren. Wegen der ungenauen Datenlage kann man keinen einzelnen genauen Wert für die maximale Aktingeschwindigkeit oder die Gleichgewichtskonstante angeben. Es wurden zwei Fits durchgeführt, dabei wurde einmal der letzte Wert in den Fit mit einbezogen und einmal weggelassen.

7. Berechnung der Messunsicherheiten

8. Diskussion

9. Zusammenfassung

A. Anhang

A.1. Fragen

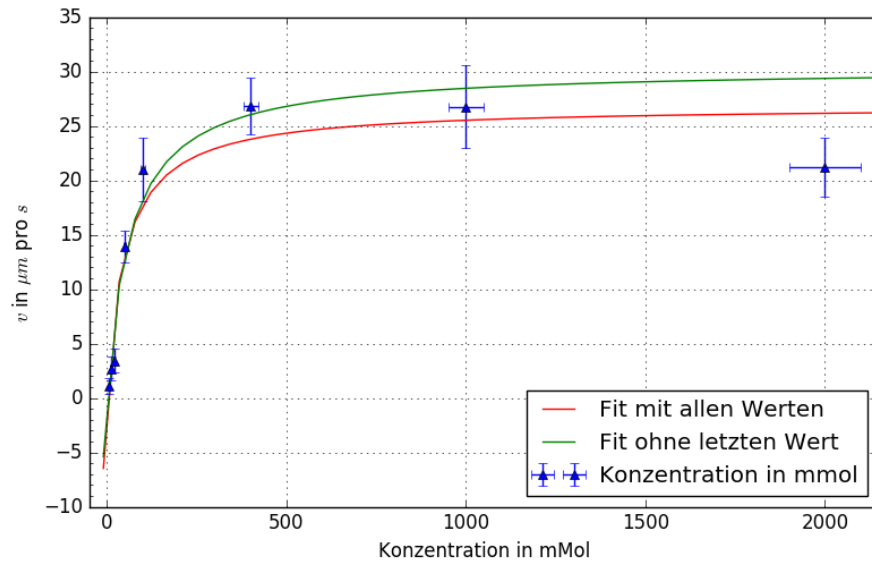


Abbildung 2: gemessene Aktungsgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ in A

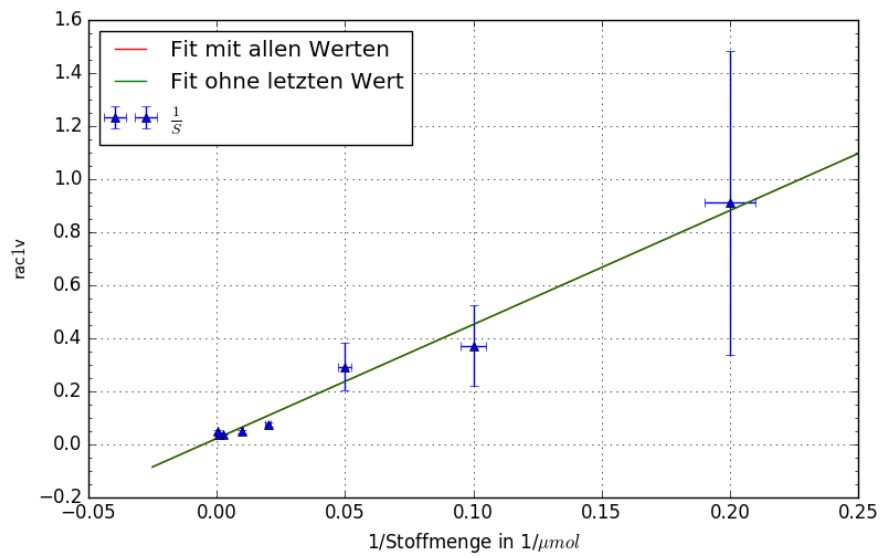


Abbildung 3: Fit über $1/v$ in $\text{s}/\mu\text{m}$ in A