
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Polymerlösungen

Simon Keller



München 2004

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Polymerlösungen

Simon Keller

Dissertation
im Department für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Simon Keller
aus Haslach i.K.

München, den 18.08.2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Joachim O. Rädler
Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland R. Netz
Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2004

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
2. Polymerlösungen	5
2.1. Struktur einzelner Polymere	6
2.1.1. Die ideale Kette	7
2.1.2. Semiflexible Ketten	10
2.1.3. Geladene Polymere	12
2.2. Dynamik	13
2.2.1. Das Rouse-Modell	15
2.2.2. Das Zimm-Modell	17
2.2.3. Dynamik semiflexibler Ketten	18
3. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	23
3.1. Die Autokorrelationsfunktion	25
3.2. Diffusive Dynamik	27
3.3. Triplettabfall	30
3.4. Zweifarbenkorrelation für wechselwirkende Komponenten	32
3.5. Gerichteter Transport	35
4. Aufbau und Charakterisierung der Anlage	37
4.1. Konfokale Mikroskopie	37
4.2. ConfoCor 2	42
4.3. Messungen mit Farbstoffen	44
4.4. Statistische und systematische Fehler	45
5. Messungen in Polymerlösungen	51
5.1. Photokinetische Prozesse	54
5.2. Der Particle-Size-Effekt	65
5.3. Ketten mit interner Dynamik	69
5.4. DNA-Lösungen	71

5.5. Aktinlösungen	75
5.6. Vergleich der experimentellen Daten mit dem Modell semiflexibler Ketten	78
5.7. Halbverdünnte Lösungen	83
6. Anomale Diffusion in Polymernetzwerken	89
7. Flussexperimente mit dem Doppelfokus	91
7.1. Prinzip und Theorie	91
7.2. Aufbau	93
7.3. Fluiddynamik	96
7.3.1. Newton'sche Fluide	96
7.3.2. Nicht-Newton'sche Fluide	98
7.4. Experimente und Ergebnisse	99
7.4.1. Scherverdünnung in Polymerlösungen	103
8. FCS an Grenzflächen mit totaler interner Reflexion (TIR-FCS)	109
8.1. Theorie	109
8.2. Aufbau	113
9. Ausblick	115
A. Zur Nomenklatur in Streuexperimenten	117
B. Explizite Berechnung der FCS-Korrelationsfunktion	119
C. Verwendete Materialien	122
C.1. DNA	122
C.2. Aktin	124
C.3. Hyaluronsäure	126
Danke	145

Zusammenfassung

Die Dynamik von Makromolekülen spielt bei Transportprozessen in weicher Materie eine wichtige Rolle. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) kann die Dynamik spezifisch fluoreszenzmarkierter Moleküle in Lösung verfolgen. Das Prinzip der Methode basiert auf der Analyse von Intensitätsfluktuationen innerhalb eines Volumens in der Größenordnung eines Femtoliters ($1 \text{ fl} = 1 \mu\text{m}^3$). In dieser Arbeit wurde mit FCS die Dynamik von DNA, Aktin und Hyaluronsäure untersucht. Die Schwerpunktsdiffusion in Lösung, die intramolekulare Kettendynamik und das Verhalten von Polymerlösungen im Scherfluss wurden studiert. Die Möglichkeit für Messungen der Dynamik an Grenzflächen wurde geschaffen.

Die Autokorrelation fluoreszenzmarkierter DNA in Lösung zeigt auf verschiedenen Zeitskalen charakteristische Abfälle, die ihre Ursache in unterschiedlichen dynamischen Prozessen haben. Mit den in dieser Arbeit entwickelten Modellfunktionen für die Autokorrelation lassen sich die charakteristischen Größen der verschiedenen Prozesse durch Anpassung an die experimentellen Daten gewinnen. Bei kurzen Zeiten im Mikrosekundenbereich fällt die Korrelationsfunktion auf Grund photochemischer Prozesse der Fluoreszenzfarbstoffe exponentiell ab. Im Bereich von $10 - 100 \mu\text{s}$ zeigen die Daten einen weiteren Abfall, der stark von der Anzahl der Farbstoffe auf der Polymerkette abhängt. Die On-Off-Kinetik eines Ensembles von Fluorophoren wurde in ein Modell für die Korrelationsfunktion umgesetzt. Intensitätsfluktuationen im Bereich von $1 - 100 \text{ ms}$ stammen von der Diffusion und den internen Relaxationsmoden der Polymerketten. Ein Modell für die Korrelationsfunktion der Schwerpunktsdiffusion für Polymerketten mit kontinuierlicher Farbstoffverteilung entlang der Kontur wurde entwickelt und mit experimentellen Daten von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge (1019 bp bis 7250 bp) bestätigt. Ausgehend von den dynamischen Strukturparametern der Modelle von Rouse, Zimm und semiflexibler Ketten in Lösung wurden Korrelationsfunktionen für interne Relaxationen berechnet und an Messdaten mit λ -DNA (48502 bp) angepasst. Über den Abstand der Farbstoffe entlang der Polymerkontur werden Moden selektiert, deren Relaxationsdynamik sich in die Autokorrelationsfunktion überträgt. Bei Abständen, die viel größer als die Persistenzlänge der DNA sind, liefert das angepasste Modell die erwarteten Werte für die Zimm-Dynamik [1].

Aktinfilamente mit Längen im Bereich von 100 nm bis $50 \mu\text{m}$ wurden als Modellsysteme

semiflexibler Polymere untersucht. Für Filamentlängen, die kleiner als das Beobachtungsvolumen sind, ist die Korrelationsfunktion bestimmt durch die Schwerpunktsdiffusion. Für längere Filamente dominieren die Biegemoden. Charakteristisch für diese Form der internen Relaxation ist das zeitliche Skalenverhalten mit dem Exponenten $\beta = 3/4$. Theoretische Korrelationsfunktionen, die in Zusammenarbeit mit Roland Winkler vom Forschungszentrum Jülich entstanden sind, zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Erstmals wurden Korrelationsfunktionen einzelner Aktinfilamente im halbverdünnten Bereich gemessen. Die charakteristische Abfallzeit der Korrelationsfunktion als Maß für die Dynamik der Biegemoden sinkt mit steigender Aktinkonzentration. Für Aktinkonzentrationen von 0,01 mg/ml bis 1 mg/ml folgt die Abfallzeit einem Skalengesetz $\tau \sim c_{\text{Aktin}}^{-0.48 \pm 0.03}$.

Neben der Diffusion wurde in dieser Arbeit die Dynamik in Strömungen untersucht. Zur Verfolgung von gerichteten Transportprozessen wurden zwei Foki mit einem lateralen Abstand von $5 \mu\text{m}$ erzeugt. Durch eine Kreuzkorrelation der beiden getrennten Intensitätssignale lässt sich die Zeit bestimmen, die die Teilchen zum Durchlaufen des Abstandes der beiden Foki benötigen. Mit dieser mikroskopischen "Lichtschränke" wurden Flussgeschwindigkeiten in einem $100 \mu\text{m}$ hohen Kanal mit mikrometergenauer Ortsauflösung gemessen. Die Scherverdünnung einer Hyaluronsäurelösung konnte anhand des Geschwindigkeitsprofils nachgewiesen und eine kritische Scherrate von $285 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ bei einer Polymerkonzentration von 2,5 mg/ml bestimmt werden.

1. Einleitung

Die Physik der weichen Materie beschäftigt sich mit Stoffen, deren typische Wechselwirkungsenergien in der Größenordnung der thermischen Energie liegen. Die Kombination von klassischer Mechanik, Elektrostatik und statistischer Physik ist notwendig, um Modelle für die Struktur und Dynamik dieser komplexen Systeme zu finden. Innerhalb der Strukturen, die von wenigen Nanometern bis zu mehreren Mikrometern reichen können, spielt die Diffusion bei Transportprozessen eine entscheidende Rolle.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine Methode, um Transportprozesse spezifisch fluoreszenzmarkierter Teilchen in komplexen Umgebungen zu verfolgen. Die Methode beruht auf der statistischen Analyse von Intensitätsfluktuationen, die innerhalb eines durch einen fokussierten Laserstrahl erzeugten Beobachtungsvolumens von der Größenordnung eines Femtoliters ($1 \text{ fl} = 1 \mu\text{m}^3$) entstehen. Im einfachsten Fall ist die Ursache für Intensitätsfluktuationen ein fluoreszenzmarkiertes Teilchen, das sich durch das Beobachtungsvolumen bewegt. Daneben gibt es auch photochemische Prozesse des Farbstoffes, die dessen Helligkeit schwanken lassen. Beide Prozesse hinterlassen in der gemessenen Intensität charakteristische Spuren, die mit einer Autokorrelation herausgefiltert und analysiert werden können. Für Objekte, die viel kleiner sind als das Beobachtungsvolumen, sind das Verständnis und die theoretischen Modelle zur Beschreibung der Daten ausgereift. Dies trifft für große Objekte mit mehreren Farbstoffen nicht zu.

Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit FCS an Biopolymeren. Von Polymeren in Lösung ist bekannt, dass sie neben der Schwerpunktdiffusion noch interne Relaxationsmoden zeigen. Gegenüber der in der Polymerphysik etablierten Methode der dynamischen Lichtstreuung hat FCS den Vorteil, dass die Dynamik einer einzelnen spezifisch markierten Polymerkette verfolgt werden kann. In Umgebungen mit einer Vielzahl verschiedener Komponenten, wie dies in biologischen Proben der Fall ist, können Streumethoden die Dynamik einzelner Moleküle nicht auflösen. FCS erlaubt außerdem, lokal auftretende Prozesse an verschiedenen Stellen zum Beispiel innerhalb einer Zelle zu studieren. Im Hinblick auf die Frage nach dem dynamischen Verhalten von Biopolymeren wie DNA oder Aktin in Zellen liefert diese Arbeit die ersten Ergebnisse.

In Kapitel 2 werden die gängigen Modelle für die Struktur und die Dynamik von Polymeren zusammengefasst und verglichen. Die Kapitel 3 und 4 geben eine Einführung in die Theorie und den experimentellen Aufbau der FCS-Methode.

Kapitel 5 bildet das zentrale Kapitel dieser Arbeit. Theoretische Korrelationsfunktionen

werden aus physikalischen Modellen der On-Off-Kinetik von Farbstoffen und den dynamischen Strukturfaktoren von Polymeren entwickelt. Ergebnisse aus Messungen an DNA und Aktin werden präsentiert und mit theoretischen Vorhersagen eines Modells semiflexibler Ketten verglichen. Die anomale Diffusion von Kolloiden in Polymernetzwerken wird in Kapitel 6 behandelt.

In Kapitel 7 wird die Betrachtung auf eine Variation der FCS-Methode ausgedehnt. Das Prinzip, der Aufbau und Messungen mit zwei lateral versetzten Beobachtungsvolumina wird vorgestellt. Dieser Doppelfokus bildet eine *"Lichtschranke"* für fluoreszenzmarkierte Teilchen. Um die gemessenen Geschwindigkeitsprofile von Wasser und Hyaluronsäurelösungen diskutieren zu können, wird kurz auf die Eigenschaften von Polymerlösungen unter Scherung im Vergleich zu Newton'schen Fluiden eingegangen. In Kapitel 8 ist eine weitere Variation der Methode beschrieben. Ein evaneszentes Feld wird durch totale interne Reflexion eines Laserstrahls erzeugt, um die Dynamik an Grenzflächen zu untersuchen.

2. Polymerlösungen

Im Jahre 1922 stellte Hermann Staudinger die These auf, dass Polymere große Moleküle sind, die durch kovalente Bindungen einzelner Untereinheiten lange Ketten bilden können. In den folgenden Jahren konnte er zeigen, dass die kettenartige Struktur tatsächlich durch chemische Bindungen und nicht durch physikalische Aggregationen zustande kommen. Mit dieser Erkenntnis gilt er als Begründer nicht nur der modernen makromolekularen Chemie sondern auch der Polymerphysik. Seine Arbeiten bildeten die Grundlage für die Erforschung der physikalischen Eigenschaften der Ketten. Die Polymerphysik hat zum Ziel, die Struktur und die Dynamik dieser Systeme aufzuklären und makroskopische Eigenschaften der Materialien mit mikroskopischen Vorgängen zu verknüpfen. Trotz der unendlichen Vielfalt an möglichen chemischen Strukturen und Eigenschaften der Polymere gibt es erstaunlich viele universelle physikalische Eigenschaften, die sowohl für die einfachsten synthetischen Polymere wie Polyethylen als auch für die DNA, das Trägermolekül für genetische Informationen aller Lebewesen, gelten.

Synthetische Polymere sind oft aus nur einer Sorte von Monomereinheiten aufgebaut. Durch kovalente Bindung dieser Bausteine – im einfachsten Fall bilden viele Ethylengruppen eine Polyethylenkette – entstehen zumeist lineare Ketten; aber auch verzweigte Polymere (z.B. Dendrimere) können heutzutage künstlich hergestellt werden. Biopolymere unterscheiden sich in einigen Merkmalen von den bekannten synthetischen Polymeren. Sie bestehen oft aus verschiedenen Monomereinheiten, seien es die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, die die DNA bilden, oder die 20 verschiedenen Aminosäuren, aus denen Proteine aufgebaut sind. Insbesondere die Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass hierarchische Strukturen vorhanden sind, die durch die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) bestimmt wird. Erst die daraus folgenden 3-dimensionalen Strukturen (Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur) ermöglichen die volle Funktionalität des Proteins. Über Protein-Protein-Wechselwirkungen können diese wieder zu übergeordneten Strukturen assemblieren. Aktin zum Beispiel bildet lineare Ketten (Filamente), die Zellen nicht nur stabilisieren sondern entlang denen sich mit Hilfe von molekularen Motoren ein Teil des intrazellulären Transports abspielt.

Ein weiteres besonderes Merkmal von Biomolekülen ist deren Polymerisationsverhalten. Bei synthetisch hergestellten Polymeren ist die Polymerisation üblicherweise abgeschlossen, die lebende Zelle allerdings kann die Bildung und den Abbau von Ketten als kontinuierlichen Prozess steuern. Desweiteren sind die meisten Biomoleküle geladen, was die Löslichkeit in Wasser deutlich erleichtert.

Trotz dieser offensichtlichen Unterschiede können Biopolymere und synthetische Polymere mit denselben physikalischen Modellen beschrieben werden. In diesem Kapitel sollen einige wichtige Modelle für die Struktur und die Dynamik der Ketten vorgestellt werden. Ausführliche Darstellungen der Polymerphysik sind zum Beispiel [2] [3] [4].

2.1. Struktur einzelner Polymere

Die Struktur einer Polymerkette ist hierarchisch aufgebaut. Das einfachste Modell für Polymere betrachtet nur große Längenskalen, wo die Primärstruktur längst keine Rolle mehr spielt. Die Kettenkontur kann dann als 3-dimensionaler Zufallsweg beschrieben werden. Die Ergebnisse dieses Modells sind in Abschnitt 2.1.1 zusammengefasst. Dagegen wird im Modell der semiflexiblen Ketten in Abschnitt 2.1.2 berücksichtigt, dass eine reale Kette nicht unendlich flexibel ist. Die wichtigsten Parameter eines linearen Polymers sind in allen Modellen die Gesamtlänge L und die Persistenzlänge l_p , ein Maß für die Steifigkeit des Polymers.

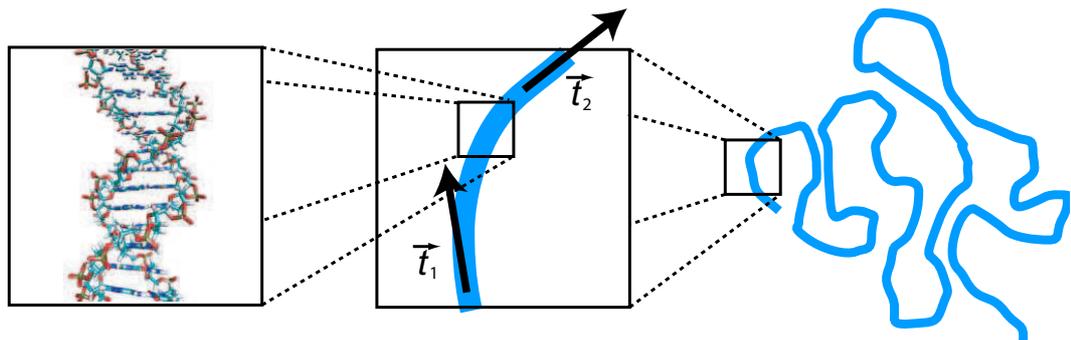


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung eines DNA-Moleküls auf verschiedenen Längenskalen. Der Durchmesser der Kette ist ca. 2 nm. Die Persistenzlänge, die von der mechanischen Steifigkeit der Doppelhelix herrührt, ist etwa 50 nm.

Abbildung 2.1 zeigt schematisch am Beispiel von DNA die Struktur auf verschiedenen Längenskalen. Die Primärstruktur, im Falle der DNA eine Doppelhelix mit zwei Phosphatrückgraten, beeinflusst die Steifigkeit der Kette. Betrachtet man zwei beliebige Tangentenvektoren \mathbf{t}_1 und \mathbf{t}_2 entlang der Kontur, so ist die Persistenzlänge definiert als die Länge, nach der die Richtungskorrelation der beiden Vektoren verloren gegangen ist.

$$\langle \mathbf{t}(s) \cdot \mathbf{t}(s + s') \rangle_{s'} = \exp\left(-\frac{s}{l_p}\right) \quad (2.1)$$

Der Buchstabe s , der im Intervall $[0, L]$ liegt, stellt die Parametrisierung der Kurve dar. Bei ausreichender Länge des Moleküls führt die Abnahme der Orientierung der Kette

dazu, dass sogenannte Knäuel (*englisch: coils*) entstehen. Die Struktur dieser Knäuel mit den beiden Größen L und l_p zu beschreiben, soll hier für verschiedene Polymermodelle geschehen.

2.1.1. Die ideale Kette

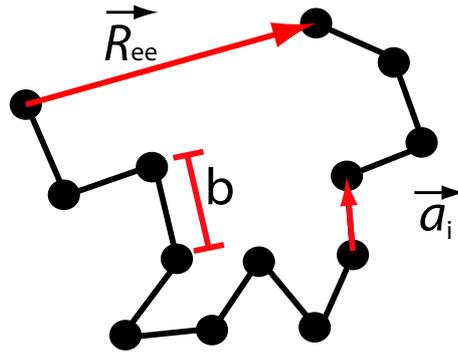


Abbildung 2.2.: Das *Freely Jointed Chain Model (FJC)*

Unterteilt man eine Polymerkette in genügend große Segmente der Länge b , so ist die Richtungskorrelation zwischen den einzelnen Segmenten mit den Ortskoordinaten \mathbf{r}_i völlig verloren. Das ist genau der Ansatz, der im *Freely Jointed Chain Model (FJC)* gemacht wird. Abbildung 2.2 zeigt, dass die Kette dann mit einem Zufallsweg beschrieben werden kann. Die Anzahl der Segmente N ist natürlich mit der Gesamtlänge der Kette verknüpft.

$$L = Nb \quad (2.2)$$

Ein Zufallsweg mit N Schritten der Länge b lässt sich mathematisch handhaben. Von großem Interesse ist der Vektor \mathbf{R}_{ee} , der die beiden Polymerenden verbindet. Er ist die Summe der einzelnen Segmentvektoren.

$$\mathbf{R}_{ee} = \sum_{i=1}^N \mathbf{a}_i \quad (2.3)$$

Die Verteilung dieses End-zu-End-Abstands ist eine isotrope Gaußfunktion, weshalb auch oft von der Gauß'schen Kette gesprochen wird:

$$p(\mathbf{R}_{ee}) = \left(\frac{3}{2\pi \langle R_{ee}^2 \rangle} \right)^{3/2} \exp \left(-\frac{3R_{ee}^2}{2 \langle R_{ee}^2 \rangle} \right), \quad (2.4)$$

2. Polymerlösungen

wobei der Mittelwert als erstes Moment dieser Verteilung Null wird, das zweite Moment aber oft als Abschätzung für die Größe des Polymerknäuels verwendet wird.

$$\langle R_{ee}^2 \rangle = Nb^2 \quad (2.5)$$

Die Unterteilung der Kette in Segmente, die der doppelten Persistenzlänge entsprechen ($b = 2 \cdot l_p$), erfüllt die Voraussetzung eines Zufallsweges, sodass der End-zu-End-Abstand auch mit der Konturlänge und der Persistenzlänge ausgedrückt werden kann.

$$\langle R_{ee}^2 \rangle = 2Ll_p \quad (2.6)$$

Der Gyrationradius, ein Maß für die Rotationsträgheit der Kette auf Grund ihrer Ausdehnung ist eine weitere, oft verwendete Größe. Sie lässt sich in Streuexperimenten direkt messen. Die Definition lautet:

$$R_g^2 := \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_c|^2 \rangle \quad (2.7)$$

mit dem Schwerpunkt der Kette am Ort \mathbf{r}_c . Für die ideale Gauß'sche Kette erhält man

$$R_g^2 = \frac{R_{ee}^2}{6} = \frac{Ll_p}{3} \quad (2.8)$$

In der Polymerphysik spielen Streuexperimente eine zentrale Rolle (siehe Anhang A). Mit ihrer Hilfe konnten Kratky und Porod die ersten Strukturbestimmungen durchführen [5] [6] [7]. Da die Streuintensität mit der Fouriertransformierten der Struktur verknüpft ist, wird die Struktur üblicherweise im reziproken Raum dargestellt. Die Teilchendichte einer Polymerkette im Fourierraum lautet:

$$C(\mathbf{q}) = \sum_{j=1}^N \exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}_j) \quad (2.9)$$

Durch die Mittelung über ein Ensemble an Polymeren ergibt sich der Formfaktor ¹ $F(\mathbf{q})$, der direkt proportional zur gemessenen Streuintensität ist.

$$F(\mathbf{q}) = \frac{1}{N} \langle |C(\mathbf{q})|^2 \rangle \quad (2.10)$$

¹Oft wird in der Literatur auch der Begriff *Strukturfaktor* verwendet. Formfaktor wird hier verwendet, da er sich üblicherweise auf die Form eines einzelnen Objekts, also auf das Polymer bezieht. Strukturfaktor bezeichnet eher die Struktur, die viele dieser einzelnen Objekte bilden (z.B. einen Kristall)

Für eine Gauß'sche Kette lässt sich der nach Debye benannte Formfaktor angeben:

$$F_{\text{Debye}}(\psi := q^2 R_g^2) = N \cdot \frac{2}{\psi^2} [\exp(-\psi) + \psi - 1] \quad (2.11)$$

Für große q -Werte fällt der Formfaktor quadratisch mit q ab.

$$F(\mathbf{q}) = \frac{2N}{R_g^2} \frac{1}{q^2} \quad \text{für} \quad qR_g \gg 1 \quad (2.12)$$

Eine ideale Gauß-Kette stellt die Basis für alle übrigen Modelle dar. Im idealen Modell wächst der Gyrationradius der Kette mit der Wurzel der Länge. Man spricht auch von fraktalem Verhalten mit der Dimension 2.

$$R_g \propto L^\nu \quad \nu = \frac{1}{2} \quad (2.13)$$

Ein Schwachpunkt dieses Modells ist die Annahme unendlich dünner Polymere. Ein Zufallsweg darf im Raum sich selbst kreuzen, während in der Realität zwei unterschiedliche Monomere nicht dieselben Koordinaten haben dürfen. Wechselwirkungen der Monomere untereinander sorgen für eine Ausdehnung der Ketten, da sich der Weg der Kette selbst vermeiden muss. Insbesondere ändert sich das Skalenverhalten. Tatsächlich findet man in guten Lösungsmitteln das Prinzip des *self-avoiding random walks* verwirklicht. Flory führte zur Beschreibung dieses Phänomens eine Wechselwirkung zwischen den Monomeren (*excluded volume interactions*) ein [8]. Die Struktur der Kette selbst ist ein Gleichgewichtszustand zwischen zwei konkurrierenden Kräften. Die repulsiven Ausschlusskräfte versuchen, die Kette zu strecken, während entropische Kräfte dem entgegenwirken. Es gibt im geknäulten Zustand für eine Kette weitaus mehr mögliche Konformationszustände als im gestreckten. Unter der Bedingung der Gleichwahrscheinlichkeit aller Konformationen ist ein möglichst kompaktes Polymer entropisch bevorzugt. Mit diesen einfachen Argumenten erhält man für den Gyrationradius folgendes Skalenverhalten:

$$R_g \propto L^\nu \quad \nu = \frac{3}{5} \quad (2.14)$$

Die Kette dehnt sich also mit zunehmender Länge stärker aus als im Idealfall. Tatsächlich zeigen Polymere in einem guten Lösungsmittel dieses Verhalten. Experimentell findet man die Ergebnisse des Modells der idealen Gauß'schen Kette nur in zwei Fällen. In Polymerschmelzen und in Lösung am sogenannten Θ -Punkt. In Schmelzen gibt es keine Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, was zur idealen Situation führt. In Lösungen

gibt es eine Temperatur Θ , bei der die entropische Kraft, die die Ketten zusammenzieht und linear von der Temperatur abhängt, gerade so groß ist, dass keine Ausschlusskräfte wirken.

Auf Längenskalen, die nicht sehr viel größer sind als die Persistenzlänge, versagen diese Modelle. Die Steifigkeit der Ketten muss dann explizit berücksichtigt werden.

2.1.2. Semiflexible Ketten

Auf Längenskalen kleiner als der Persistenzlänge erscheint die Polymerkette als steifer Stab. Die Struktur von Ketten mit Längen im Bereich der Persistenzlänge muss daher ein erweitertes Modell eingeführt werden. Schon 1949 führten Kratky und Porod das *Worm-Like Chain Model (WLC)* ein [5], mit dem die Struktur der Polymere auch auf verschiedenen Längenskalen korrekt zu beschreiben ist. Ein weiteres Beispiel für ein solches Modell ist in den Arbeiten von Winkler und Harnau vorgestellt, deren Ergebnisse hier kurz vorgestellt werden [9] [10].

Ausgangspunkt ist ein kontinuierliches Molekülmodell. Anstatt die einzelnen Monomere an den Orten \mathbf{r}_i zu betrachten, führt man die parametrisierte Kurve $\mathbf{r}(s)$ mit $0 \leq s \leq L$ ein. Der mittlere quadratische Abstand zwischen zwei Segmenten kann dann bestimmt werden zu

$$a(s - s') = \langle (\mathbf{r}(s) - \mathbf{r}(s'))^2 \rangle = 2l_p^2 \left[\frac{|s - s'|}{l_p} - 1 + \exp\left(-\frac{|s - s'|}{l_p}\right) \right]. \quad (2.15)$$

Daraus lässt sich der Gyrationradius bestimmen.

$$\begin{aligned} R_g^2 &= \frac{1}{2L^2} \int_{-L/2}^{L/2} \int_{-L/2}^{L/2} a(s - s') ds ds' \\ &= \frac{Ll_p}{3} - l_p^2 + \frac{2l_p^3}{L} - \frac{2l_p^4}{L^2} \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{l_p}\right) \right] \end{aligned} \quad (2.16)$$

Im Grenzfall kleiner Persistenzlängen erhält man erwartungsgemäß das Ergebnis der Gauß'schen Kette.

$$R_g^2 = \frac{Ll_p}{3} \quad l_p \ll L \quad (2.17)$$

Im Vergleich dazu schreibt sich der Gyrationradius eines steifen Stabes der Länge L :

$$R_g^2 = \frac{L^2}{12} \quad (2.18)$$

Mit der Funktion des mittleren quadratischen Abstands aus Gleichung 2.15 kann auch der Formfaktor für eine semiflexible Kette berechnet werden.

$$F(q) = \frac{2}{L^2} \int_0^L (L-s) \exp\left(-\frac{q^2 a(s)}{6}\right) ds \quad (2.19)$$

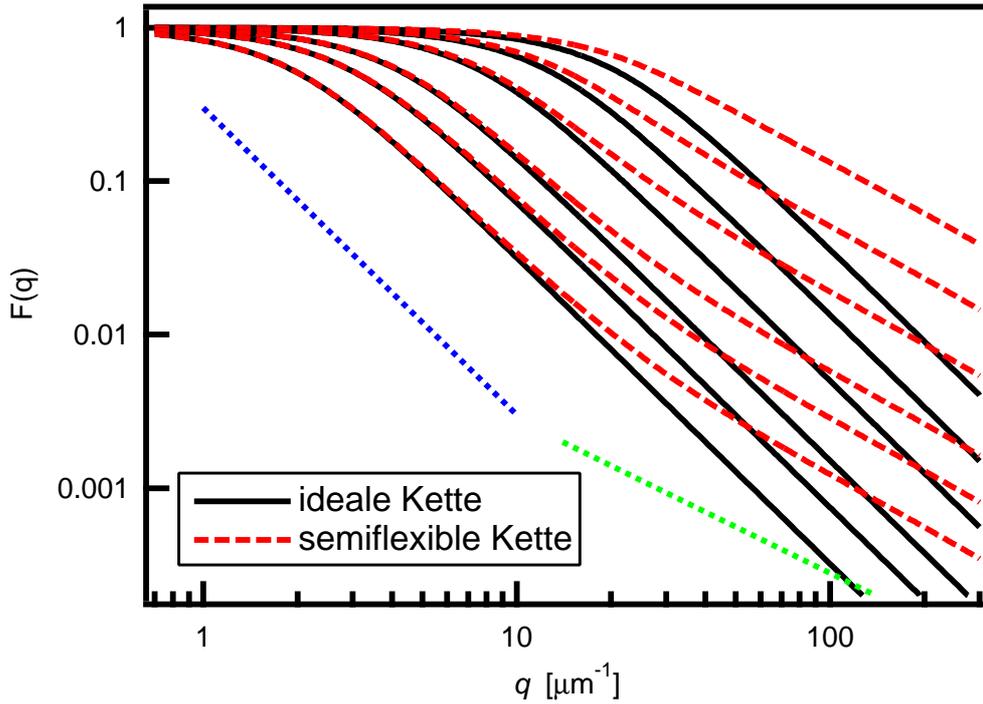


Abbildung 2.3.: Formfaktoren $F(q)$ für DNA bei verschiedenen Längen und für zwei verschiedene Modelle. Die durchgezogene Linie gilt für eine ideale Kette, die gestrichelte für das semiflexible Modell von Winkler und Harnau. Die Längen sind von rechts nach links: 330 nm (= 1000 bp), 950 nm, 2,4 μm , 7,9 μm , 16 μm , 37 μm (= 113000 bp). Die Persistenzlänge wurde mit $l_p = 50$ nm modelliert. Die beiden gepunkteten Linien fallen mit q^{-2} und q^{-1} ab.

In Abbildung 2.3 ist dieses Integral für den Fall von DNA bei verschiedenen Längen numerisch berechnet und mit den Formfaktoren für eine ideale Gaußkette verglichen. Insbesondere bei großen q -Werten, also bei kleinen Längenskalen weichen die Kurven deutlich voneinander ab. Während bei idealen Ketten der Debye-Formfaktor gemäß Gleichung 2.11 quadratisch abfällt, zeigen semiflexible Ketten bei großen q -Werten den für steife Stäbe typischen linearen Abfall. Für lange Polymere ist der Übergang zwischen den beiden Regimen bei $q \approx 1/l_p$ zu erkennen.

2.1.3. Geladene Polymere

Die meisten Biopolymere sind keine neutralen Polymere, sondern elektrisch geladen, also Polyelektrolyte. Die Auswirkungen der elektrischen Ladung auf die Form einer einzelnen Kette soll in diesem Abschnitt basierend auf den ausführlicheren Artikeln von Netz [11] [12] und Winkler [13] diskutiert werden. Neben der Ladungsdichte entlang der Polymerkette ist die Ionenkonzentration der umgebenden Lösung von entscheidender Bedeutung. Diese Gegenionen schirmen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den festen Ladungen auf der Polymerkette ab. Mit der Salzkonzentration der Lösung lassen sich dadurch zum Beispiel die Persistenzlänge der Polyelektrolyte beeinflussen. Bei hoher Salzkonzentration sind die repulsiven elektrostatischen Kräfte zwischen zwei Segmenten entlang der Kette geringer, und das Polymer wird daher flexibler.

Ausgangspunkt einer quantitativen Beschreibung ist die Poisson-Gleichung, die das Potential $U(\mathbf{r})$ mit der lokalen Ladungsdichte $\rho(\mathbf{r})$ verknüpft.

$$\nabla^2 U(\mathbf{r}) = -\frac{\rho(\mathbf{r})}{\varepsilon} \quad (2.20)$$

In Wasser ist die dielektrische Konstante $\varepsilon \approx 80$. Für eine Punktladung am Ursprung $\rho(\mathbf{r}) = e\delta(\mathbf{r})$ hat das Potential die Form

$$U(\mathbf{r}) = \frac{e}{4\pi\varepsilon} \frac{1}{|\mathbf{r}|} \quad (2.21)$$

Die elektrostatische Wechselwirkung zweier Punktladungen normiert auf die thermische Energie $k_B T$ lautet dann

$$u(\mathbf{r}) = \frac{eU(\mathbf{r})}{k_B T} = \frac{l_B}{|\mathbf{r}|} \quad \text{mit } l_B = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon k_B T} \quad (2.22)$$

Hierbei gibt die Bjerrum-Länge l_B den Abstand an, in der die elektrostatische Wechselwirkung gerade der thermischen Energie entspricht. In Wasser beträgt sie bei Raumtemperatur $l_B \approx 0,8$ nm. Berücksichtigt man nun zusätzlich mobile Gegenionen in der Lösung, so wird das Potential in der Debye-Hückel-Näherung durch einen zusätzlichen exponentiellen Term abgeschwächt.

$$u(\mathbf{r}) = \frac{l_B}{|\mathbf{r}|} \exp\left(-\frac{\kappa}{|\mathbf{r}|}\right) \quad (2.23)$$

Die Abschirmlänge κ^{-1} ist von der Salzkonzentration c_S und der Valenz z abhängig und ist gegeben durch $\kappa^2 = 8\pi z^2 l_B c_S$. Für Entfernungen größer als diese Abschirmlänge spielen elektrostatische Wechselwirkungen keine Rolle. Unter physiologischen Bedingungen ($c_S \approx 100$ mM, $z = 1$) beträgt sie etwa 1 nm.

Bei geringeren Salzkonzentrationen aber werden sich die Monomere entlang der Kette auf Grund der linearen Ladungsdichte σ abstoßen. Näherungsweise lässt sich dieser Effekt mit einem Beitrag zur Persistenzlänge beschreiben.

$$l_p = l_0 + l_{\text{OSF}} \quad \text{mit } l_{\text{OSF}} = \frac{l_B \sigma^2}{4\kappa^2} = \frac{\sigma^2}{32\pi z^2 c_S} \quad (2.24)$$

Die Persistenzlänge ist damit die Summe aus der immer vorhandenen mechanischen Persistenzlänge l_0 und einer elektrostatischen Persistenzlänge l_{OSF} , die nach Odijk, Skolnick und Fixman benannt ist [14] [15]. Mit wachsender Salzkonzentration nimmt die Persistenzlänge damit ab. Tabelle 2.1 zeigt den Effekt am Beispiel von DNA. Unter physiologischen Bedingungen ($c_S = 100 \text{ mM}$) ist der Beitrag der elektrostatischen Wechselwirkungen im Vergleich zur mechanischen Persistenzlänge von DNA ($l_0 = 50 \text{ nm}$) fast schon vernachlässigbar.

c_S [mM]	10	20	30	50	100
l_{OSF} [nm]	55,2	27,6	18,4	11,0	5,5

Tabelle 2.1.: Der Beitrag durch elektrostatische Wechselwirkungen zur Persistenzlänge l_{OSF} bei DNA für verschiedene Salzkonzentrationen. Die Ladungsdichte bei DNA beträgt $\sigma = 2e/\text{bp} \approx 6e \text{ nm}^{-1}$. Als Salz wurde NaCl mit der Valenz $z = 1$ benutzt.

Bei sehr hohen Ladungsdichten der Ketten wie zum Beispiel bei DNA tritt zusätzlich die sogenannte Manning-Kondensation auf [16]. Die Gegenionen lagern sich fest an die Kette an und reduzieren so die effektive Ladungsdichte.

Entscheidend für die Struktur und das Skalenverhalten geladener, semiflexibler Polymere sind also viele verschiedene Parameter. Die Wahl des geeigneten Modells hängt von der Konturlänge, der Persistenzlänge, der Ladungsdichte, der Salzkonzentration und dem Lösungsmittel ab. Einen Überblick geben die Arbeiten von Schiessel und Pincus [17] [18].

Experimentell bestätigt sich für DNA unter physiologischen Bedingungen und mit einer Länge größer als $5 \mu\text{m}$ das *excluded volume interactions*-Modell [19]. Für dessen Gyrationradius gilt dann $R_g \propto L^{3/5}$.

2.2. Dynamik

Polymere in Lösung sind keine starren Objekte mit zeitlich festgelegten Raumkoordinaten \mathbf{r}_i . Auf Grund thermischer Fluktuationen bei Raumtemperatur zeigen Polymerketten sowohl interne Relaxationen der Segmente als auch Diffusion des Schwerpunkts. Der Formfaktor $F(\mathbf{q})$ einer Polymerkette ist also nicht zeitlich konstant, sondern muss um

einen dynamischen Term erweitert werden. Das Aussehen dieses dynamischen Terms ist Gegenstand dieses Abschnitts. Einführend soll die phänomenologische Diffusionstheorie von Teilchen in Lösung betrachtet werden.

Das erste Fick'sche Gesetz lautet:

$$\mathbf{j} = -D \nabla c \quad (2.25)$$

wobei \mathbf{j} den Fluss, c die Konzentration und D die Diffusionskonstante darstellt. Die Kombination dieser Gleichung mit der Kontinuitätsgleichung

$$\frac{\delta c}{\delta t} = -\operatorname{div} \mathbf{j} \quad (2.26)$$

liefert das zweite Fick'sche Gesetz, das die Diffusionsgleichung darstellt.

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \operatorname{div} \nabla c \quad (2.27)$$

Diese Beziehung gilt, solange keine äußeren Kräfte auf die Teilchen wirken. In Gegenwart eines externen Potentials $U(\mathbf{r})$ wirkt eine Kraft $\mathbf{F} = -\nabla U$ und wird unter laminaren Bedingungen eine gleichmäßige Geschwindigkeit $\mathbf{v} = \mathbf{F}/\gamma$ hervorrufen. Die Größe γ hängt von der Größe und Form der Teilchen ab und lautet für Kugeln

$$\gamma = 6\pi\eta R. \quad (2.28)$$

R ist der Radius der Kugeln und η die Viskosität des Lösungsmittels. Die gerichtete Geschwindigkeit verursacht einen zusätzlichen Fluss $\mathbf{j} = c\mathbf{v}$. Gleichung 2.25 wird damit zu

$$\mathbf{j} = -D \nabla c - \frac{c}{\gamma} \nabla U. \quad (2.29)$$

Im Gleichgewicht muss der Fluss verschwinden und die Konzentration einer Boltzmannverteilung gehorchen.

$$D \nabla \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})}{kT}\right) = -\frac{1}{\gamma} \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})}{kT}\right) \nabla U \quad (2.30)$$

Dies wird zu

$$-\frac{D}{kT} \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})}{kT}\right) \nabla U = -\frac{1}{\gamma} \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})}{kT}\right) \nabla U, \quad (2.31)$$

woraus folgt:

$$D = \frac{kT}{\gamma} \quad (2.32)$$

Für den Spezialfall diffundierender Kugeln wurde diese Gleichung von Einstein 1905 über die Betrachtung des osmotischen Drucks hergeleitet, weshalb sie auch als Einsteinrelation bezeichnet wird [20]. Die mikroskopische Betrachtung der Diffusion über das Fluktuations-Dissipations-Theorem liefert als Ergebnis ebenfalls diese Einsteinrelation.

Mit der Fouriertransformierten der Teilchendichte

$$c(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int \exp(-i\mathbf{q}\mathbf{r}) c(\mathbf{q}, t) d\mathbf{q} \quad (2.33)$$

wird die Diffusionsgleichung 2.27 zu

$$\frac{\partial c(\mathbf{q}, t)}{\partial t} = -q^2 D c(\mathbf{q}, t). \quad (2.34)$$

Der Ansatz $c(\mathbf{q}, t) = \exp(-q^2 D t)$ löst die Differentialgleichung und beschreibt die Dynamik einer Lösung von frei diffundierenden Teilchen mit der Diffusionskonstanten D .

Für alle Teilchen, die mit einer festen internen Struktur frei in einer Lösung diffundieren, setzt sich der Strukturfaktor zusammen aus dem zeitunabhängigen Formfaktor der Teilchen $F(\mathbf{q})$ und einem dynamischen Strukturfaktor $S'(\mathbf{q}, t)$, der die Dynamik der Teilchen beschreibt. Insgesamt schreibt sich der Strukturfaktor der Lösung also:

$$S(\mathbf{q}, t) = F(\mathbf{q}) \cdot S'(\mathbf{q}, t) \quad (2.35)$$

Für die freie Brown'sche Diffusion eines starren Objektes wird dies zu

$$S(\mathbf{q}, t) = F(\mathbf{q}) \cdot \exp(-q^2 D t). \quad (2.36)$$

Interne Fluktuationen sind hier nicht berücksichtigt. Betrachtet man jedoch ein Segment in der Polymerkette, so ist dieses durch die Bindung an die benachbarten Sequenzen in seiner Bewegung eingeschränkt, wird also keine Brown'sche Diffusion zeigen. Das erste Modell, das diese internen Fluktuationen innerhalb einer langen Polymerkette erfolgreich beschreiben konnte, wurde 1953 von Rouse vorgestellt [21]. Nur wenig später wurde das Modell von Zimm verfeinert, indem er auch hydrodynamische Wechselwirkungen der Ketten mit dem Lösungsmittel in Betracht zog [22]. Für semiflexible Ketten gestaltet sich die Berechnung der internen Dynamik deutlich komplizierter. Der Übergang von kurzen steifen Stäbchen [23] [24] zu langen Ketten ist in mehreren theoretischen Arbeiten behandelt [25] [26] [27]. Die wichtigsten Ergebnisse der Modelle von Rouse, Zimm und semiflexibler Ketten sollen hier vorgestellt werden.

2.2.1. Das Rouse-Modell

Die ideale Gauß'sche Kette ist die Grundlage des Rouse-Modells. Es handelt sich im Prinzip um ein Kugel-Feder-Modell (*englisch: bead-spring-model*), dessen Bewegungsgleichungen gelöst werden. Die N Kugeln befinden sich in diesem Modell in gleichmäßigen

Abständen a entlang der Kette, sodass die Zwischenräume selbst als ideale Ketten betrachtet werden können. Diese Verbindungsstücke wirken als entropische Federn mit der Federkonstanten $k = 3k_B T/a^2$. Die Langevin-Gleichung beschreibt nun die Bewegungen der einzelnen Kugeln.

$$\zeta \frac{d\mathbf{r}_n}{dt} = k (\mathbf{r}_{n+1} - 2\mathbf{r}_n + \mathbf{r}_{n-1}) + \mathbf{f}_s \quad (2.37)$$

Die Position der n -ten Kugel ist durch \mathbf{r}_n gegeben. Die Größe ζ ist der Reibungskoeffizient der Kugel und \mathbf{f}_s stellt die stochastische Kraft im Wärmebad dar. Die Differentialgleichung beschreibt gekoppelte lineare Oszillatoren im überdämpften Fall. Eine cos-Fouriertransformation auf Normalkoordinaten entkoppelt diese Gleichung und liefert die Relaxationszeiten der verschiedenen Moden.

$$\tau_p = \frac{\zeta N^2 a^2}{3\pi^2 k_B T} \frac{1}{p^2} = \frac{\tau_R}{p^2} \quad (2.38)$$

Die Modenzahl p ist Element der natürlichen Zahlen. Die Rousezeit τ_R gibt die Relaxationszeit der ersten Mode an. Das entspricht der Relaxationszeit des End-zu-End-Vektors vom gestreckten in den geknäuelten Zustand. Aus der Lösung der Differentialgleichung lässt sich auch die Schwerpunktsdiffusion berechnen; sie stellt die nullte Mode dar.

$$D_R = \frac{k_B T}{N\zeta} \quad (2.39)$$

Der dynamische Strukturfaktor einer Gauß'schen Kette im Rouse-Modell ist gegeben durch

$$S(\mathbf{q}, t) = \exp(-q^2 D_R t) \exp\left(-\frac{2}{\sqrt{\pi}} \left[\frac{k_B T a^2}{12\zeta} q^4 t\right]^{\beta_R}\right) \quad (2.40)$$

mit $\beta_R = 1/2$. Der erste Exponentialterm beschreibt die Diffusion des Schwerpunkts. Typisch für die Brown'sche Diffusion ist die lineare Zeitabhängigkeit im Exponenten. Im Gegensatz dazu steht der zweite Term für interne Relaxationen. Der Exponent skaliert mit der Wurzel der Zeit. Vereinfacht gesagt, vollführt ein Segment eine Diffusion auf dem Zufallsweg, der durch die Kontur der Kette vorgegeben wird. Der dynamische Strukturfaktor geht auf die Arbeit von de Gennes zurück [28].

Problematisch am Rouse-Modell ist vor allem die Größe ζ , die Reibung eines Segmentes, da sie eine eher virtuelle Größe für die Theorie darstellt. Neutronen-Spin-Echo-Messungen erlauben den Nachweis des zeitlichen Skalenverhaltens eines markierten Monomers in einer Kette. Damit konnte gezeigt werden, dass das Rouse-Modell für Polymerschmelzen ein stimmiges Modell liefert [29].

2.2.2. Das Zimm-Modell

Im Zimm-Modell betrachtet man neben den entropischen Kräften auch noch die hydrodynamischen Wechselwirkungen der Segmente untereinander. Ein im Lösungsmittel bewegtes Segment erzeugt ein Strömungsfeld, das wiederum die anderen Segmente beeinflusst. Die Segmente erfahren dadurch eine Reibungskraft die vom Geschwindigkeitsprofil der umgebenden Lösung abhängt.

Wirkt in einer Lösung die Kraft \mathbf{F} , so erzeugt sie ein Strömungsfeld $\mathbf{v}(\mathbf{r})$ gemäß

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}) = \mathbf{T} \cdot \mathbf{F}. \quad (2.41)$$

\mathbf{T} ist der sogenannte Oseen-Tensor, der aus der inkompressiblen Navier-Stokes-Gleichung hergeleitet werden kann.

$$\mathbf{T}_{nm} = \frac{1}{8\pi\eta|\mathbf{r}_{nm}|} \left(\mathbf{E} - \frac{\mathbf{r}_{nm} \oplus \mathbf{r}_{nm}}{r_{nm}^2} \right) \quad n \neq m \quad (2.42)$$

\mathbf{E} ist die Einheitsmatrix, \oplus das äußere Produkt und $\mathbf{r}_{nm} = \mathbf{r}_n - \mathbf{r}_m$. Auf ein Segment am Ort \mathbf{r}_n wirkt die Reibungskraft

$$\mathbf{F}_n = \zeta \mathbf{v}(\mathbf{r}_n). \quad (2.43)$$

Das Strömungsfeld selbst ist das Ergebnis aller Kräfte, die von den anderen Segmenten auf das Lösungsmittel ausgeübt werden.

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}_n) = \sum_{m \neq n} \mathbf{T}_{nm} \left(k \frac{\partial^2 \mathbf{r}_m}{\partial t^2} + \mathbf{f}_m(t) \right) \quad (2.44)$$

Diese gekoppelte, nicht-lineare Differentialgleichung kann nur mit einigen Näherungen gelöst werden. Hierbei ergibt sich, dass das Strömungsfeld nur mit $1/r$ abfällt, was für ein qualitativ abweichendes Verhalten vom Rouse-Modell sorgt.

Die Diffusionskonstante des Schwerpunkts im Zimm-Modell lautet

$$D_Z = \frac{8k_B T}{3(6\pi^3)^{1/2} \eta a \sqrt{N}} = 0,196 \frac{k_B T}{\eta R_{ee}}. \quad (2.45)$$

Diese Gleichung ähnelt der bekannten Form des Diffusionskoeffizienten sehr stark.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.46)$$

Das Diffusionsverhalten der Ketten ist das von harten Kugeln mit einem hydrodynamischen Radius von

$$R_h = \frac{R_{ee}}{6\pi \cdot 0,196} = \frac{R_{ee}}{3,695} \approx \frac{2}{3} R_g. \quad (2.47)$$

Das Lösungsmittel innerhalb des Polymerknäuels wird also mittransportiert. Die Relaxationsmoden gehorchen dem Zusammenhang

$$\tau_p = \frac{\tau_Z}{p^{3/2}} \quad (2.48)$$

mit der Modenzahl p und

$$\tau_Z = \frac{\eta (a\sqrt{N})^3}{\sqrt{3}\pi k_B T} = 0,325 \frac{\eta R_{ee}}{k_B T}. \quad (2.49)$$

Sowohl die Diffusionskonstante als auch die Relaxationszeiten sind nicht mehr von der Segmentreibung ζ abhängig.

Der dynamische Strukturfaktor für das Zimm-Modell wurde 1967 von Dubois-Violette und de Gennes hergeleitet [30] [31]. Bei kleinen Streuvektoren zerfällt der Strukturfaktor einfach mit der Diffusionskonstanten D_Z .

$$S(\mathbf{q}, t) = F(\mathbf{q}) \exp(-D_Z q^2 t) \quad (2.50)$$

Bei großen Streuvektoren liefern die Zimm-Moden einen Beitrag zur Dynamik, der näherungsweise folgende Form hat:

$$S(\mathbf{q}, t) = F(\mathbf{q}) \exp(-1,35 (\Gamma_Z t)^{\beta_Z}) \quad (2.51)$$

mit $\beta_Z = 2/3$ und

$$\Gamma_Z = \frac{k_B T q^3}{6\pi\eta} \quad (2.52)$$

Die langreichweitigen Wechselwirkungen über das Lösungsmittel bewirken, dass er Exponent anstatt wie im Rouse-Modell ($\beta_R = 1/2$) mit $\beta_Z = 2/3$ skaliert. Vor allem bei synthetischen Polymeren in Lösung konnte die Theorie sehr gut bestätigt werden und ist bis heute die Standardmethode, Polymerdynamik in Lösungen zu betreiben. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind Näherungslösungen. Ausführlicher sind die dynamischen Strukturfaktoren im Rouse- und Zimm-Modell in der Arbeit von Akcasu et al. diskutiert [32].

2.2.3. Dynamik semiflexibler Ketten

Die Dynamik von Biomolekülen wie DNA oder Aktin lässt sich mit den Modellen von Rouse und Zimm nicht befriedigend beschreiben [33] [34] [35] [36] [37]. Hier spielt die relativ große Persistenzlänge eine entscheidende Rolle. Neben den Zimm-Moden müssen Biegemoden auf Grund der Steifigkeit des Polymers bei einer Betrachtung der Dynamik

berücksichtigt werden. Berg [38] und Soda [39] haben zum Beispiel einen dynamischen Strukturfaktor für das *Worm-Like-Chain*-Modell ermittelt, allerdings für geschlossene Polymerringe. Die Betrachtung sehr kurzer Polymere, die sich wie Stäbchen verhalten, wurde zum Beispiel in [23] [40] [41] [24] durchgeführt. Interne Dynamik der Stäbchen wird hier nicht betrachtet. Für die Diffusionskonstante eines Zylinders der Dicke d und der Länge L gilt im Falle $2 < L/d < 30$ [23]:

$$D = \frac{Ak_{\text{B}}T}{3\pi\eta L} \quad (2.53)$$

mit

$$A = \ln \frac{L}{d} + 0,312 + 0,565 \frac{d}{L} - 0,100 \frac{d^2}{L^2} \quad (2.54)$$

Aufgrund der hohen Ladungsdichte von DNA spielt die Salzkonzentration in Lösungen mit kurzen Fragmenten eine große Rolle. Mit der Salzkonzentration kann die Debye-Screeninglänge und damit die effektive Dicke der Zylinder beeinflusst werden. Mit dynamischer Lichtstreuung wurden Untersuchungen an kurzen DNA-Fragmenten ($L \approx l_p = 150$ bp) durchgeführt, bei denen verschiedene Parameter wie Länge, Konzentration und auch Salzkonzentration variiert wurden [42] [43] [44] [45] [46].

Bei Längen, die größer als die Persistenzlänge sind, muss die intramolekulare Dynamik berücksichtigt werden. In Arbeiten von Kroy und Frey [26] [27] wird der dynamische Strukturfaktor für semiflexible Ketten im Grenzfall großer Streuvektoren angegeben. Diese für sehr steife Ketten ($ql_p \gg 1$) gültige Funktion konnte mit dynamischer Lichtstreuung an Aktinfilamenten bestätigt werden [47] [48]. Hier sollen kurz die Ergebnisse der Arbeiten von Harnau, Winkler und Reineker [25] [10] wiedergegeben werden. Mit deren Modell lassen sich Polymere beliebiger Steifigkeit beschreiben. Im Grenzfall großer Streuvektoren stimmen die Ergebnisse mit der Theorie von Kroy und Frey überein.

Der Diffusionskoeffizient des Schwerpunktes lässt sich mit dem Molekülmodell von Abschnitt 2.1.2 zu

$$D = \frac{k_{\text{B}}T}{3\pi\eta L} \left[1 + \frac{\sqrt{6}}{\sqrt{\pi}L} \int_d^L \frac{L-s}{\sqrt{a(s)}} \exp\left(-\frac{3d^2}{2a(s)}\right) ds \right] \quad (2.55)$$

berechnen. Abbildung 2.4 zeigt die Diffusionskonstante von DNA bei verschiedenen Modellen. Gleichung 2.55 wurde numerisch berechnet und mit den anderen Modellen verglichen. Es zeigt sich, dass für kleine Längen das semiflexible Modell in das der steifen Stäbchen übergeht, für große Längen aber sich dem der idealen Kette nähert. Der Übergangsbereich liegt erwartungsgemäß bei einigen wenigen Persistenzlängen.

Die Biegemoden ergeben sich in diesem Modell zu

$$\tau_p = \frac{32\eta L^4}{\pi^3 k_{\text{B}} T l_p (2p-1)^4} \left[0,423 - \sqrt{\frac{6}{\pi}} \ln \left(\frac{(2p-1)\pi d}{2L} \right) \right]^{-1}, \quad (2.56)$$

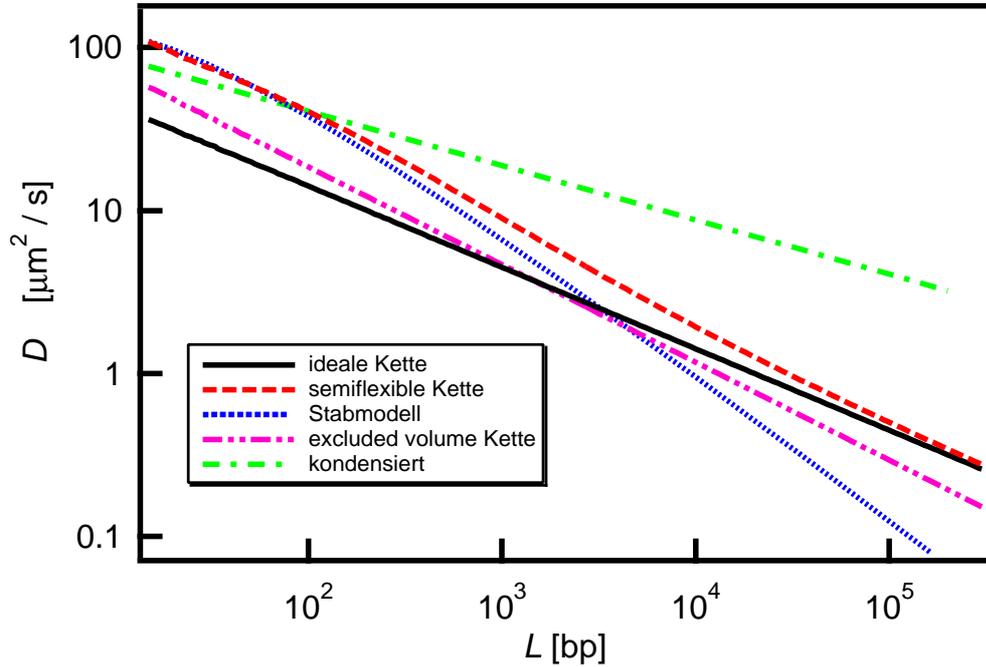


Abbildung 2.4.: Theoretische Diffusionskonstante von DNA bei verschiedenen Modellen ($l_p = 150 \text{ bp} = 50 \text{ nm}$, $d = 3 \text{ nm}$). Die ideale Kette wurde gemäß Gleichung 2.45 bestimmt. Die semiflexible Kette ist das Ergebnis einer numerischen Berechnung gemäß Gleichung 2.55. Das Stabmodell ist in Gleichung 2.53 gegeben. Die *excluded-volume*-Kette skaliert mit $-3/5$, wie in Gleichung 2.14 zu sehen ist. Im kondensierten Fall wurde einfach von einer Kugel ausgegangen, deren Radius mit $L^{1/3}$ wächst.

was mit einer Mittelung des Terms in der Klammer über alle Biegemoden p zu

$$\tau_p = \frac{32\eta L^4}{\sqrt{6}\pi^{5/2}k_B T l_p (2p-1)^4 \ln\left(\frac{\Lambda L}{d}\right)} \quad (2.57)$$

wird. Der Ausdruck $\ln\left(\frac{\Lambda L}{d}\right)$ ist ein Maß für den Einfluss der hydrodynamischen Wechselwirkung.

Eine geschlossene Form für den intramolekularen dynamischen Strukturfaktor gibt es nur unter der Näherung großer Streuvektoren und großer Zeiten. Er lautet dann

$$S(\mathbf{q}, t) = \exp\left(-0,41(\Gamma_s t)^{3/4}\right) \quad (2.58)$$

mit

$$\Gamma_s = \frac{2^{1/6}k_B T \ln\left(\frac{\Lambda L}{d}\right)}{\sqrt{3}\pi^{3/2}l_p^{1/3}\eta} q^{8/3}. \quad (2.59)$$

Im Gegensatz zum Zimm-Modell sind hier die Modellparameter wie Länge und Persistenzlänge im Strukturfaktor enthalten. Auch in der Skalierung mit $q^{8/3}t$ kommt zum Ausdruck, dass die Biegemoden großen Einfluss auf die Dynamik haben.

In Tabelle 2.2 sind noch einmal die wichtigsten dynamischen Größen der vorgestellten Modelle direkt verglichen. Man beachte, dass es sich bei den angegebenen Strukturfaktoren um Näherungen für große q und große Zeiten t handelt. Im Allgemeinen wird der dynamische Strukturfaktor also eine Überlagerung aus der bei kleinen q gültigen Schwerpunktdiffusion und den bei großen q genäherten intramolekularen Segmentbewegungen sein.

Eigenschaften	Rouse	Zimm	semiflexibel
D	$\frac{k_B T}{N\zeta}$	$0,196 \frac{k_B T}{\eta R_{ee}}$	Gl. 2.55
$S(\mathbf{q}, t)$	$\exp\left(-\frac{2}{\sqrt{\pi}}(\Gamma_R t)^\beta\right)$	$\exp\left(-1,35(\Gamma_Z t)^\beta\right)$	$\exp\left(-0,41(\Gamma_s t)^\beta\right)$
Γ	$\Gamma_R = \frac{k_B T a^2}{12\zeta} q^4$	$\Gamma_Z = \frac{k_B T}{6\pi\eta} q^3$	$\Gamma_s = \frac{2^{1/6} k_B T \ln \frac{\Delta L}{d}}{\sqrt{3}\pi^{3/2} l_p^{1/3} \eta} q^{8/3}$
β	$\frac{1}{2}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{3}{4}$

Tabelle 2.2.: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Polymermodelle

3. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ermöglicht es, kinetische Prozesse mittels einer statistischen Analyse von Gleichgewichtsfluktuationen zu detektieren. Betrachtet man fluoreszierende Moleküle in einem kleinen Beobachtungsvolumen, so können verschiedene Ereignisse eine Änderung der Intensität verursachen. Diffusion der Teilchen im Beobachtungsvolumen oder auch photochemische Prozesse des Farbstoffes führen zu Fluktuationen in der Intensität. Eine Autokorrelation des zeitabhängigen Intensitätssignals liefert Informationen über die Zeitkonstanten und Gewichtung der beteiligten dynamischen Prozesse im System. Mit einem geeigneten Modell lassen sich damit aus der Autokorrelationsfunktion Größen wie die Diffusionskonstante, Fließgeschwindigkeiten, Triplettzerfallsraten oder chemische Bindungsraten bestimmen.

Die chemische Bindungsrate von Ethidiumbromid, einem interkalierenden Farbstoff, und DNA war im Jahre 1972 die erste Größe, die Magde, Elson und Webb mit der neu entwickelten Methode gemessen hatten [49]. In den folgenden Jahren waren es auch diese drei Wissenschaftler, die die Theorie und die möglichen Anwendungen der Methode detailliert ausarbeiteten [50] [51] [52]. Bis Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts blieb FCS aufgrund der fehlenden Sensitivität auf Studien bei sehr hohen Teilchenkonzentrationen beschränkt. Mit der Einführung eines konfokalen Detektionsvolumens durch Rigler et al. im Jahre 1993 wurde es möglich, einzelne Moleküle nachzuweisen [53]. Besonders in biologischen Studien erfuhr FCS einen enormen Auftrieb, da die Biotechnologie es inzwischen erlaubt, bestimmte Moleküle spezifisch fluoreszent zu markieren. FCS erwies sich in diesem Bereich als ideale Methode, dynamische Prozesse nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* zu verfolgen.

Inzwischen ist FCS zu einer Standardmethode herangereift, was nicht zuletzt dadurch bewiesen ist, dass FCS-Geräte kommerziell erwerblich sind (wie das hier verwendete ConfoCor2 der Firma Carl Zeiss, Jena). In der Literatur sind einige neuere Übersichtsartikel zu finden, die den heutigen Stand der Forschung mit FCS wiedergeben [54] [55] [56] [57].

Das Prinzip der Methode beruht auf der Detektion von Fluktuationen im Fluoreszenzlicht, das aus einem kleinen konfokalen Volumen in der Probe stammt. Dazu wird ein

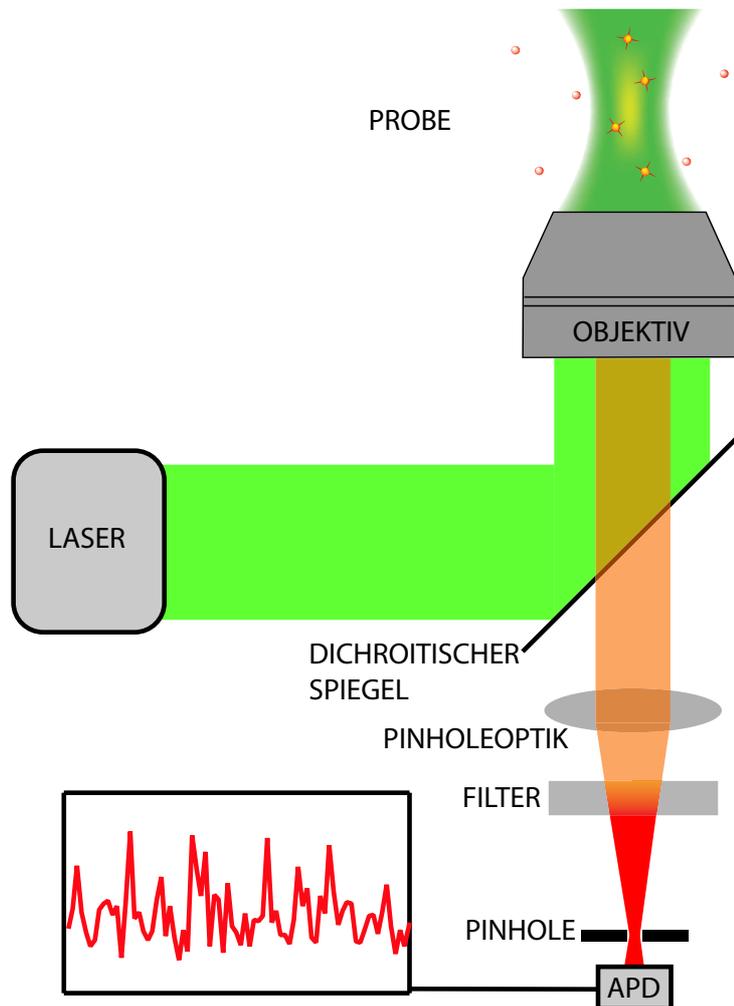


Abbildung 3.1.: Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Am Ende steht die zeitabhängige Intensität als Messsignal.

Laserstrahl mithilfe eines Objektivs im Probenraum fokussiert (siehe Abbildung 3.1). Fluoreszenzmarkierte Teilchen, die durch den Fokus diffundieren, werden angeregt und senden Fluoreszenzlicht in alle Raumrichtungen aus. Ein Teil dieses Lichtes wird zurück in das Objektiv gelangen und kann aufgrund seiner leichten Rotverschiebung mittels eines dichroitischen Spiegels vom Anregungslicht getrennt werden. Die erneute Fokussierung auf ein Pinhole erlaubt es, das Beobachtungsvolumen in Strahlrichtung zu begrenzen. Streulicht wird durch die Verwendung eines weiteren Filters unterdrückt, bevor mit einer Avalanchephotodiode (APD) die Intensität in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen wird.

Die statistische Analyse der Intensität erfolgt durch eine Autokorrelation. Selbstähnlichkeiten der Fluktuationen treten dadurch als charakteristische Zeitabfälle in der Korrela-

tionsfunktion zutage. Diese können von verschiedenen Ursachen herrühren. Im einfachsten Falle entstehen Fluktuationen durch diffundierende Teilchen, die in das Volumen ein- und austreten. Daneben existieren aber auch photokinetische Prozesse, die zu Fluoreszenzfluktuationen bei kürzeren Zeitskalen im Bereich von $0,2 - 20 \mu\text{s}$ führen.

3.1. Die Autokorrelationsfunktion

Die zeitabhängige Intensität $I(t)$ ist in einem FCS-Experiment die einzige gemessene Größe. In ihr steckt die gesamte Information über die involvierten dynamischen Prozesse. Aus diesem Grund muss eine theoretische Betrachtung bei dieser Größe starten.

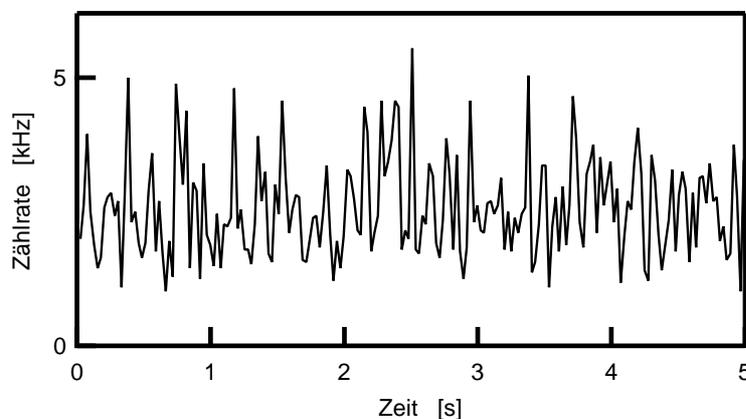


Abbildung 3.2.: Intensitätssignal eines FCS-Experiments. Die Fluktuationen in der Zählrate sind Ausdruck der ständigen Änderung der Konzentration im Beobachtungsvolumen

Die gemessene Intensität hängt von der Geometrie des betrachteten Volumens und den Fluktuationen der Fluorophorkonzentration $C(\mathbf{r}, t)$ im betrachteten System ab.

$$I(t) = \int_R W(\mathbf{r})C(\mathbf{r}, t)d^3\mathbf{r} \quad (3.1)$$

Die zeitunabhängige Funktion $W(\mathbf{r})$ ist die sogenannte Detektionsfunktion. Diese Funktion charakterisiert die Form des Beobachtungsvolumens und setzt sich zusammen aus dem Profil des anregenden Lasers und der Detektionsgeometrie. Bei konfokaler Detektion ist ein Gauß'scher Ellipsoid mit Radius r_0 in der x-y-Ebene und einer Ausdehnung z_0 in z-Richtung eine sehr gute Näherung. In Abschnitt 4.1 wird näher darauf eingegangen werden.

$$W(\mathbf{r}) = W_0 e^{-2\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} \quad (3.2)$$

3. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Im Vorfaktor W_0 stecken die Anregungsintensität, Verluste durch Filter und die Effizienz des Photodetektors.

Betrachtet man ein Ensemble punktförmiger Fluorophore, so kann deren Konzentration als Summe von Deltafunktionen dargestellt werden.

$$C(\mathbf{r}, t) = \sum_k b_k \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k(t)) \quad (3.3)$$

Der Parameter b_k gibt die Helligkeit des k -ten Fluorophors wieder und enthält dessen Quanteneffizienz und Anregungsquerschnitt. Prinzipiell kann diese Größe zeitabhängig sein. Hier soll diese Möglichkeit vernachlässigt werden. Die Intensität aus Gleichung 3.1 schreibt sich damit:

$$I(t) = \int_R W(\mathbf{r}) \sum_k b_k \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k(t)) d\mathbf{r} \quad (3.4)$$

Aus der Intensität wird nun die Autokorrelationsfunktion berechnet.

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t') \cdot I(t' + t) \rangle_{t'}}{\langle I(t')^2 \rangle_{t'}} \quad (3.5)$$

Die eckigen Klammern sind dabei die Abkürzung für die mathematische Vorschrift

$$\langle I(t') \cdot I(t' + t) \rangle_{t'} = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T f(t') \cdot f(t' + t) dt' . \quad (3.6)$$

Einsetzen der in Gleichung 3.4 ermittelten Intensität in die Definition der Autokorrelation und die Darstellung der Deltafunktion als Fourierintegral ergibt

$$g_2(t) = \frac{\int_q \int_{q'} W(\mathbf{q}) W(\mathbf{q}') \langle \sum_k \sum_l b_k b_l \exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}_k(t') + i\mathbf{q}'\mathbf{r}_l(t' + t)) \rangle_{t'} d\mathbf{q} d\mathbf{q}'}{\left(\int_q W(\mathbf{q}) \langle \sum_k b_k \exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}_k(t')) \rangle_{t'} d\mathbf{q} \right)^2} \quad (3.7)$$

Ergebnis dieser Rechnung ist die Darstellung der Autokorrelation als Funktion der reziproken Teilchendichte [58].

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{\langle C \rangle V_{\text{eff}}} \frac{\int \Phi(\mathbf{q}) C(\mathbf{q}, t) d^3 \mathbf{q}}{\int \Phi(\mathbf{q}) d^3 \mathbf{q}} \quad (3.8)$$

$V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$ ist das effektive Beobachtungsvolumen, $\langle C \rangle$ die mittlere Teilchendichte und $C(\mathbf{q}, t)$ die Konzentration der Teilchen im reziproken Raum. $\Phi(\mathbf{q})$ sei Transferfunktion genannt. Sie charakterisiert das Beobachtungsvolumen im reziproken Raum und stellt aus mathematischer Sicht eine Gauß'sche Filterfunktion mit Gewicht auf kleinen \mathbf{q} dar:

$$\Phi(\mathbf{q}) = W(\mathbf{q}) W(-\mathbf{q}) = \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \cdot \exp\left(-\frac{1}{4} r_0^2 (q_x^2 + q_y^2)\right) \cdot \exp\left(-\frac{1}{4} z_0^2 q_z^2\right) \quad (3.9)$$

wobei $W(\mathbf{q})$ die Fouriertransformierte der Detektionsfunktion ist. In Anhang B wird die Funktion explizit berechnet.

Korrelationsfunktionen, die mit $g_2(t)$ bezeichnet werden, fallen gemäß der Definition 3.5 auf den Wert 1 ab. In der Literatur sind auch oft Korrelationsfunktionen zu finden, die auf den Wert Null fallen. Es handelt sich dabei nur um einen additiven Term, der nicht von der Zeit abhängt. Es gilt folgender einfacher Zusammenhang.

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t') \cdot I(t' + t) \rangle_{t'}}{\langle I(t')^2 \rangle_{t'}} = 1 + \frac{\langle \delta I(t') \cdot \delta I(t' + t) \rangle_{t'}}{\langle I(t')^2 \rangle_{t'}} \quad (3.10)$$

3.2. Diffusive Dynamik

Diffundierende Teilchen hinterlassen aufgrund ihrer Dynamik einen charakteristischen Abfall in der Autokorrelationsfunktion. Wie dieser Abfall genau aussieht, wird nun beginnend mit dem einfachsten Fall einer monodispersen, verdünnten Lösung punktförmiger Teilchen vorgestellt.

Diffusion einer einzelnen Komponente

Für eine einzelne, nicht-wechselwirkende Komponente schreibt sich die Diffusionsgleichung folgendermaßen:

$$\frac{\partial C(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(\mathbf{r}, t) \quad (3.11)$$

Benutzt man die Fouriertransformierte $C(\mathbf{q}, t) = (2\pi)^{-3/2} \int C(\mathbf{r}, t) \exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}) d^3\mathbf{r}$, so lautet die Lösung der Differentialgleichung:

$$C(\mathbf{q}, t) = \exp(-Dq^2t) \quad (3.12)$$

In dem hier behandelten Idealfall geht man von punktförmigen Farbstoffteilchen aus, die alle die gleiche, zeitlich konstante Helligkeit besitzen. Die Autokorrelationsfunktion in Gleichung (3.8) wird damit zu:

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{\langle C \rangle V_{\text{eff}}} \frac{\int \Phi(\mathbf{q}) \exp(-Dtq^2) d^3\mathbf{q}}{\int \Phi(\mathbf{q}) d^3\mathbf{q}} \quad (3.13)$$

Das Produkt aus der Teilchendichte $\langle C \rangle$ und dem effektiven Volumen V_{eff} ist nichts anderes als die Teilchenzahl N , die im Mittel beobachtet wird. Die Amplitude der Korrelationsfunktion ist also direkt mit der Konzentration der Lösung verknüpft. Die Integrale

in Gleichung 3.13 sind analytisch lösbar (siehe Anhang B) und ergeben mit der Relation $\tau = \frac{r_0^2}{4D}$ für den idealen diffusiven Fall

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} G_{\text{Diff}}(t) \quad (3.14)$$

mit

$$G_{\text{Diff}}(t) = \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau}}} . \quad (3.15)$$

Die charakteristische Abfallszeit dieser hyperbelähnlichen Funktion wird umso größer, je kleiner die Diffusionskonstante der Teilchen ist. Ist das effektive Beobachtungsvolumen bekannt, so können aus der gemessenen Korrelationsfunktion sowohl die Konzentration als auch die Diffusionskonstante der Teilchen mittels einer Anpassung von Gleichung 3.14 an die Daten bestimmt werden. Typischerweise beträgt die Größe des Beobachtungsvolumens ungefähr einen halben Femtoliter ($1 \text{ fl} = 1 \mu\text{m}^3$) und weniger. Der Radius liegt je nach Wellenlänge des benutzten Lasers bei $r_0 \approx 200 \text{ nm}$. Die gemessenen Diffusionszeiten bewegen sich üblicherweise zwischen $10 \mu\text{s}$ und 100 ms . Konzentrationen von 10^{-6} M bis zu 10^{-10} M können mit FCS detektiert werden.

Alternativ lässt sich die Korrelationsfunktion 3.14 auch mit der mittleren quadratischen Abweichung $\langle r^2(t) \rangle$ ausdrücken.

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{2\langle r^2(t) \rangle}{3r_0^2}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{2\langle r^2(t) \rangle}{3z_0^2}}} \quad (3.16)$$

In Abbildung 3.3 ist das mittlere Verschiebungsquadrat gegen die Zeit aufgetragen. Durch Lösen einer kubischen Gleichung kann aus der experimentellen Autokorrelationsfunktion das mittlere Verschiebungsquadrat berechnet werden. Wie zu erwarten, steigt die Funktion linear mit der Zeit. Mit $\langle r^2(t) \rangle = 6Dt$ kann auch aus diesem Graphen die Diffusionskonstante bestimmt werden.

Mehrere Komponenten

Betrachtet man eine Lösung mit m Komponenten, so kann jeder einzelnen Komponente die Konzentration $C_j(\mathbf{r}, t)$ zugeordnet werden. Die mittlere Konzentration sei $\bar{C}_j = \langle C_j(\mathbf{r}, t) \rangle$. Reaktionen untereinander seien ebenso möglich wie die Diffusion der einzelnen Komponenten. Nahe des thermodynamischen Gleichgewichts können die nichtlinearen chemischen Gleichungen linearisiert werden und die Relaxationen der $C_j(\mathbf{r}, t)$ in einer linearen, m -dimensionalen Differentialgleichung ausgedrückt werden.

$$\frac{\partial C_j(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D_j \nabla^2 C_j(\mathbf{r}, t) + \sum_{k=1}^m K_{jk} C_j(\mathbf{r}, t) \quad (3.17)$$

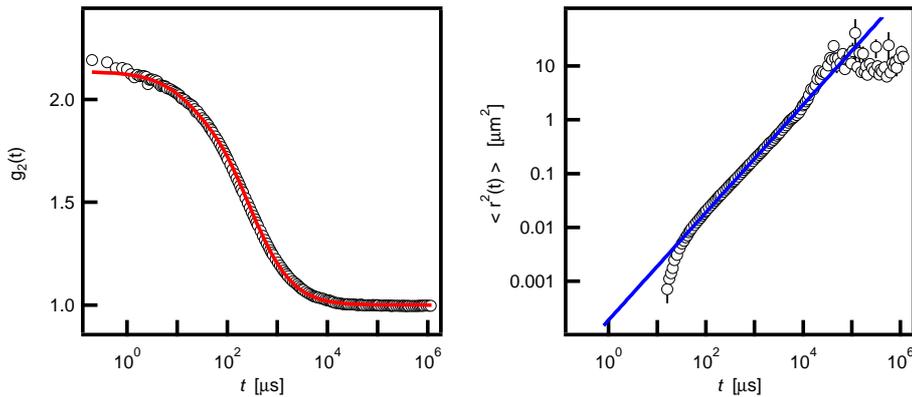


Abbildung 3.3.: Links: Autokorrelationsfunktion für Nanopartikel in Wasser. Dabei handelt es sich um ursprünglich hydrophobe Nanokristalle, die mit einer amphiphilen Polymerschicht wasserlöslich gemacht wurden [59]. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung an die Daten gemäß Gleichung 3.14. **Rechts** ist das mittlere Verschiebungsquadrat dargestellt. Die durchgezogene Linie entspricht dem Zusammenhang $\langle r^2(t) \rangle = 6Dt$ mit der Diffusionskonstanten $D = 32 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Das entspricht einem hydrodynamischen Radius von 7,0 nm.

D_j ist die Diffusionskonstante der j -ten Komponente, die Koeffizienten K_{jk} enthalten die Reaktionskonstanten und die Gleichgewichtskonzentrationen der beteiligten Spezies. Eine geschlossene analytische Lösung dieser Gleichung ist nur in wenigen Spezialfällen möglich, bei denen Näherungen möglich sind. Eine entscheidende Rolle spielt die Zeitskala, auf der sich die Reaktionen untereinander abspielen können. Liegen Reaktionskonstanten im selben Zeitfenster wie die Diffusionszeit der Teilchen durch das Beobachtungsvolumen, so muss die Differentialgleichung für das spezielle Problem gelöst werden. Für Reaktionen, die weitaus schneller ablaufen als die Teilchen zum Durchlaufen des Volumens benötigen, kann die Differentialgleichung separiert werden. Dies wird in Abschnitt 3.3 behandelt. Laufen die Reaktionen auf sehr viel langsameren Zeitskalen ab, so kann der zweite Term in Gleichung 3.17 ganz vernachlässigt werden. Man befindet sich dann nicht mehr nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht. Information über die Reaktionskinetik kann in diesem Fall durch Beobachten der Einzelkomponenten in mehreren aufeinanderfolgenden Messungen gewonnen werden. Dabei muss aber gewährleistet sein, dass die Reaktion so langsam abläuft, dass während einer Einzelmessung von einem quasistationären Zustand ausgegangen werden kann.

Voraussetzung zur Betrachtung mehrerer Komponenten ist ein Unterschied der Diffusionskonstanten. Nur mit unterschiedlichen Zeitkonstanten können die verschiedenen Fraktionen bei einer FCS-Messung als solche erkannt werden. Die jeweilige Gewichtung der Fraktion in der Korrelationsfunktion hängt einerseits natürlich von der Konzentra-

tion, zusätzlich aber auch von der Helligkeit ab. Die Autokorrelationsfunktion lautet

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} \sum_{j=1}^m \frac{k_j}{1 + \frac{t}{\tau_j}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau_j}}} \quad (3.18)$$

wobei N die Gesamtteilchenzahl, $\tau_j = \frac{r_0^2}{4D_j}$ die Diffusionszeit der j -ten Komponente und k_j das Gewicht der j -ten Komponente angibt, das von der Helligkeit und von der relativen Konzentration abhängt. Mit jeder zusätzlichen Fraktion steigt die Anzahl der Parameter dieser Funktion. Bei zu vielen freien Parametern ist eine Anpassung des Modells an die Daten nicht mehr aussagekräftig. Daher ist es umso besser, je mehr Informationen über das System bekannt sind. Diffusionszeiten einzelner Komponenten sollten, wenn möglich, in einem separaten Experiment, bei dem sie isoliert vorliegen, bestimmt werden. Außerdem müssen sich die Diffusionszeiten der verschiedenen Fraktionen mindestens um einen Faktor zwei unterscheiden. Dies entspricht aber grob einem Faktor acht im Molekulargewicht. Nur wenn kleine Objekte an große, langsam diffundierende Objekte binden, ist es möglich, die Gewichte der einzelnen Komponenten zu bestimmen, da sich dann die beiden Fraktionen in der Diffusionszeit unterscheiden.

Eine wesentlich elegantere und genauere Methode zum Nachweis von chemischen Reaktionen bietet die Zweifarbenkorrelation. Sind die Reaktionspartner mit Farbstoffen unterschiedlicher Wellenlänge markiert, so können diese getrennt angeregt und detektiert werden. Eine Kreuzkorrelation der beiden Intensitäten erlaubt direkte Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen der beiden Komponenten. In Abschnitt 3.4 wird das Prinzip etwas näher beleuchtet. Ein Beispiel für eine kritische Reaktion wäre eine Hybridisierung zweier komplementärer Oligomere zu einer doppelhelikalen DNA. Die Diffusionszeit des Produkts ist im Vergleich zur Diffusionszeit der Edukte kaum größer. Der Nachweis einer Bindung oder gar die Bestimmung der Reaktionskonstante ist mit einer Auswertung der Daten gemäß Gleichung 3.18 kaum möglich.

3.3. Triplettabfall

Neben den Intensitätsfluktuationen, die auf Grund der Diffusion der Teilchen durch das Beobachtungsvolumen vorkommen, können auch photokinetische Fluktuationen des Farbstoffes einen Einfluss auf die Korrelationsfunktion haben. Das bekannteste Beispiel ist der Triplettabfall, der bei allen handelsüblichen Farbstoffen auftritt.

Abbildung 3.4 zeigt ein vereinfachtes Jablonskidiagramm, das den Triplettabfall erklärt. Nachdem der Farbstoff durch ein Photon angeregt wurde, regt er sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit innerhalb weniger Nanosekunden unter Aussendung eines Photons mit etwas größerer Wellenlänge wieder ab. Diese Zeitspanne ist mit Hilfe von FCS nicht

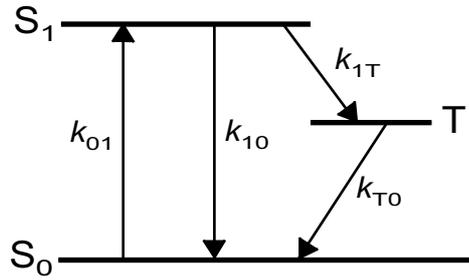


Abbildung 3.4.: Vereinfachtes Jablonskidiagramm zur Beschreibung des Triplettzustandes bei Fluoreszenzfarbstoffen.

aufzulösen. Einige der angeregten Zustände werden dagegen über einen metastabilen Zustand zurück in den Grundzustand gehen. Dieser sogenannte Triplettzustand hat eine Lebensdauer im Mikrosekundenbereich und liegt daher im Zeitfenster von FCS-Messungen. Die Fluktationen im Intensitätssignal auf dieser Zeitskala hinterlassen einen charakteristischen Abfall in der Korrelationsfunktion. Näherungsweise lässt sich der Triplettabfall schreiben als:

$$G_{\text{Triplett}}(t) = 1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \quad (3.19)$$

Die Größe T ist der prozentuale Anteil der Farbstoffe, die über den Triplettzustand zerfallen. Die mittlere Zeit, die der Farbstoff in dem dunklen Zustand verbringt, ist gegeben durch τ_T . Der Triplettabfall ist in den meisten Fällen sehr viel schneller als der diffusive Prozess. Dies erlaubt eine einfache Modellierung der Daten, in der die beiden Funktionen der unterschiedlichen Prozesse multiplikativ verknüpft werden können.

$$\begin{aligned} g_2(t) &= 1 + \frac{1}{N} \cdot G_{\text{Triplett}}(t) \cdot G_{\text{Diff}}(t) \\ &= 1 + \frac{1}{N} \cdot \left[1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right)\right] \cdot \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau}}} \end{aligned} \quad (3.20)$$

Abbildung 3.5 zeigt eine theoretische Korrelationskurve, die sowohl einen Triplettabfall bei kleinen Zeiten und einen diffusiven Abfall bei großen Zeiten besitzt. Ebenfalls gezeigt sind die beiden Teilfunktionen $G_{\text{Triplett}}(t)$ und $G_{\text{Diff}}(t)$, die den zeitlichen Verlauf der Korrelationsfunktion bestimmen. Die Amplitude und die charakteristische Zerfallszeit des Triplettabfalls hängen zum Beispiel von der Laserintensität ab. Auch die Salzkonzentration in der Lösung spielt bei vielen Farbstoffen eine Rolle. Eine detaillierte theoretische und experimentelle Studie des Triplettabfalls wurde von Widengren durchgeführt [60]. In Abschnitt 5.1 wird ausführlicher auf photokinetische Prozesse auf kurzen Zeitskalen eingegangen. Dort wird auch noch einmal die Modellierung des Triplettabfalls ausführlicher behandelt.

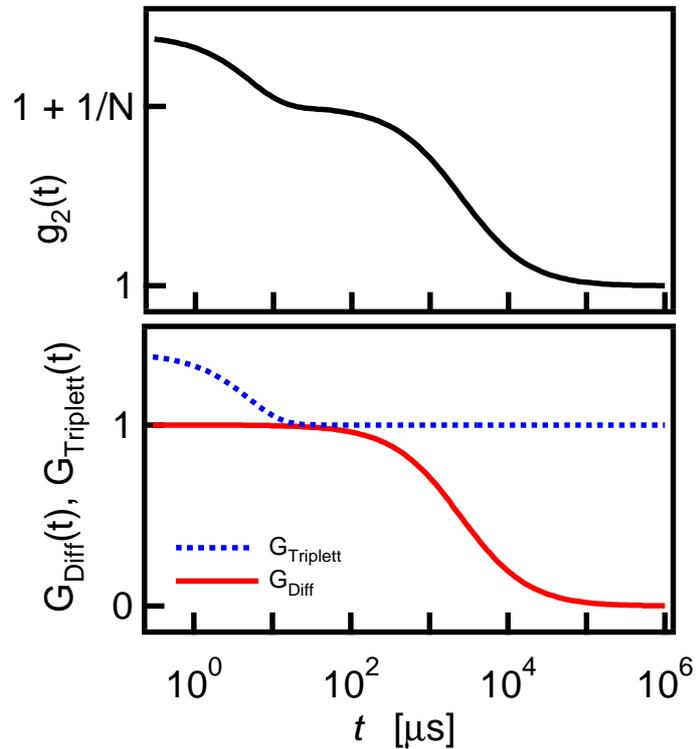


Abbildung 3.5.: Oben: Theoretische Autokorrelationskurve mit einem diffusiven Abfall und mit Berücksichtigung eines möglichen Triplettabfalls bei kurzen Zeiten. Unten: Teilfunktionen der oben gezeigten Korrelationsfunktion. Die Parameter für die Triplettfunktion sind: $\tau_T = 5 \mu\text{s}$ und $T = 0,4$.

3.4. Zweifarbenkorrelation für wechselwirkende Komponenten

Die Zweifarbenkorrelation bietet eine sehr elegante Methode zum Nachweis von Wechselwirkungen zweier Reaktionspartner. Voraussetzung dafür ist, dass einerseits die beiden Komponenten mit unterschiedlicher Farbe markiert sind und andererseits genau diese Farben von der FCS-Anlage angeregt und getrennt detektiert werden können. Vereinfacht gesagt, betrachtet man in ein und demselben Volumen die beiden Reaktionspartner in unterschiedlichen Kanälen (siehe Abbildung 3.6). Wechselwirkungen zwischen den beiden lassen sich mittels der Kreuzkorrelation der beiden Intensitätssignale verfolgen. Binden die beiden Komponenten aneinander, so führt dies zu Koinzidenzen in den beiden Kanälen. Ausschließlich diese miteinander verbundenen Teilchen tragen zur Kreuzkorrelation bei. Die Amplitude der Kreuzkorrelationskurve ist somit ein Maß für das Wechselwirkungspotential der beiden Komponenten, und über die Diffusionszeit erhält man direkt die Diffusionskonstante des Produkts [61].

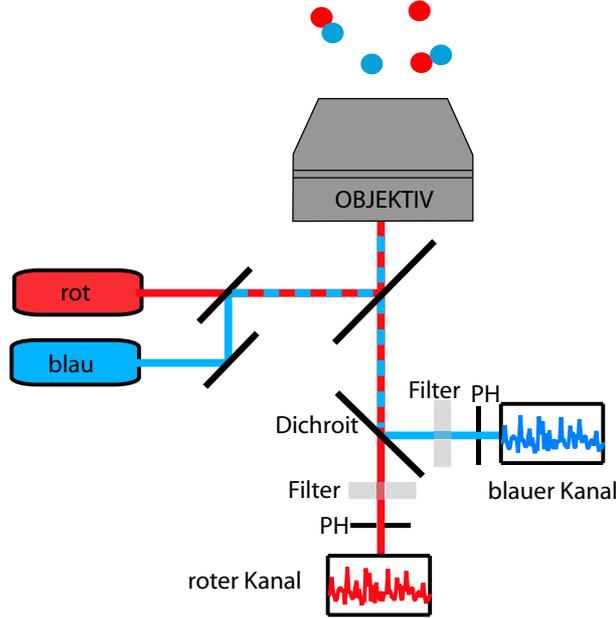


Abbildung 3.6.: Prinzip der Zweifarbenkorrelation. Es werden mit zwei Lasern zwei Foki am selben Ort mit unterschiedlicher Farbe erzeugt. Das emittierte Licht, wird später von einem dichroitischen Spiegel wieder nach Farbe getrennt und in zwei separaten konfokalen Kanälen detektiert. Blau markierte Teilchen werden im Idealfall nur in einem Kanal detektiert, rot markierte nur im anderen. Teilchen mit beiden Farbstoffen führen so zu Koinkidenzen in den beiden Kanälen, die mit einer Kreuzkorrelation quantitativ ausgewertet werden können.

Aus den beiden Intensitätssignalen $I_{\text{blau}}(t)$ und $I_{\text{rot}}(t)$ lassen sich drei Korrelationsfunktionen gewinnen; zum einen die beiden Autokorrelationsfunktionen gemäß Gleichung 3.5

$$G_{\text{blau}}(t) = \frac{\langle \delta I_{\text{blau}}(t' + t) \cdot \delta I_{\text{blau}}(t') \rangle_{t'}}{\langle I_{\text{blau}}(t') \rangle_{t'}^2} \quad (3.21)$$

und

$$G_{\text{rot}}(t) = \frac{\langle \delta I_{\text{rot}}(t' + t) \cdot \delta I_{\text{rot}}(t') \rangle_{t'}}{\langle I_{\text{rot}}(t') \rangle_{t'}^2}, \quad (3.22)$$

zum anderen die Kreuzkorrelation

$$G_{\text{Kreuz}}(t) = \frac{\langle \delta I_{\text{blau}}(t' + t) \cdot \delta I_{\text{rot}}(t') \rangle_{t'}}{\langle I_{\text{blau}}(t') \cdot I_{\text{rot}}(t') \rangle_{t'}}. \quad (3.23)$$

In dem hier betrachteten idealisierten Fall sollen die beiden Beobachtungsvolumina exakt gleich groß sein und perfekt überlappen: $V_{\text{eff,blau}} = V_{\text{eff,rot}} = V_{\text{eff}}$. Außerdem sollen

Intensitätsfluktuationen nur aufgrund von Diffusion entstehen. Dann lauten die Korrelationsfunktionen folgendermaßen [62]:

$$G_{\text{blau}}(t) = \frac{\langle C_{\text{blau}} \rangle G_{\text{blau}}^{\text{Diff}}(t) + \langle C_{\text{br}} \rangle G_{\text{br}}^{\text{Diff}}(t)}{V_{\text{eff}}(\langle C_{\text{blau}} \rangle + \langle C_{\text{br}} \rangle)^2} \quad (3.24)$$

$$G_{\text{rot}}(t) = \frac{\langle C_{\text{rot}} \rangle G_{\text{rot}}^{\text{Diff}}(t) + \langle C_{\text{br}} \rangle G_{\text{br}}^{\text{Diff}}(t)}{V_{\text{eff}}(\langle C_{\text{rot}} \rangle + \langle C_{\text{br}} \rangle)^2} \quad (3.25)$$

$$G_{\text{Kreuz}}(t) = \frac{\langle C_{\text{br}} \rangle G_{\text{br}}^{\text{Diff}}(t)}{V_{\text{eff}}(\langle C_{\text{blau}} \rangle + \langle C_{\text{br}} \rangle)(\langle C_{\text{rot}} \rangle + \langle C_{\text{br}} \rangle)} \quad (3.26)$$

Die Größen $\langle C_{\text{blau}} \rangle$, $\langle C_{\text{rot}} \rangle$ und $\langle C_{\text{br}} \rangle$ sind die mittleren Konzentrationen der blau bzw. rot markierten Edukte und des mit beiden Farbstoffen markierten Produkts (br). Die Funktionen $G_{\{\text{blau,rot,br}\}}^{\text{Diff}}(t)$ charakterisieren den jeweiligen diffusiven Zerfall der Korrelationsfunktion und hängen nur von der Diffusionszeit der jeweiligen Komponente und damit von deren Diffusionskonstante ab.

$$G_k^{\text{Diff}}(t) = \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_k}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau_k}}}, k \in \{\text{blau,rot,br}\} \quad (3.27)$$

Wie in Gleichung 3.26 zu sehen, wird die Zeitabhängigkeit der Kreuzkorrelation im Gegensatz zu den Autokorrelationen (Gleichungen 3.24 und 3.25) nur von der Diffusion des Produktes bestimmt. Die Amplitude der Kreuzkorrelation $G_{\text{Kreuz}}(0)$ ist direkt proportional zur Konzentration des Produkts $\langle C_{\text{br}} \rangle$, da der Nenner in Gleichung 3.26 zeitlich konstant ist. $\langle C_{\text{br}} \rangle$ lässt sich mit Hilfe der gemessenen Amplituden darstellen.

$$\langle C_{\text{br}} \rangle = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \frac{G_{\text{Kreuz}}(0)}{G_{\text{blau}}(0) \cdot G_{\text{rot}}(0)} \quad (3.28)$$

Die übliche Konvention, die inverse Amplitude als mittlere Teilchenzahl im Volumen zu benennen, liefert:

$$N_{\text{br}} = \frac{N_{\text{blau}} N_{\text{rot}}}{N_{\text{Kreuz}}} \quad (3.29)$$

Die Beobachtung der Amplituden in Abhängigkeit der Reaktionszeit erlaubt damit Rückschlüsse auf die Reaktionskonstanten.

Mit der Hybrisdisierung eines Cy5-gelabelten 40-mer DNA-Oligomer mit der rhodamin-gelabelten Komplementärsequenz wurde bewiesen, dass die Zweifarbenkorrelation eine schnelle und eindeutige Methode zum Nachweis von Bindungsexperimenten darstellt [62]. Diesem Experiment folgten weitere, bei denen zum Beispiel die Arbeit eines Restriktionsenzym beobachtet wurde [63], die chemische Reaktion eines Proteins im Zellinnern verfolgt wurde [64] oder auch die Komplexbildung von Polyelektrolyten [65] [66] studiert wurde.

Prinzipiell funktioniert die Methode auch für repulsive Wechselwirkungen, wie Rička und Binkert schon 1989 gezeigt haben [58]. Zwar war der technische Aufbau damals noch nicht so ausgereift wie es heutzutage möglich ist, eine negative Amplitude in der gemessenen Kreuzkorrelation folgt aber eindeutig den theoretischen Erwartungen für repulsive elektrostatische Wechselwirkungen.

3.5. Gerichteter Transport

Gerichteter Transport mit einer zeitlich konstanten Geschwindigkeit unterscheidet sich natürlich von diffusiven Prozessen, auch in der charakteristischen Spur, die er im Intensitätssignal eines FCS-Experiments hinterlässt. Schon 1978 erkannten Magde, Elson und Webb die Möglichkeit, Geschwindigkeiten zu messen [52]. Auch die dazugehörige Theorie wurde schon damals ausgearbeitet und hat sich bis heute im Wesentlichen nicht verändert. Im Blickpunkt steht dabei ganz klar die Anwendung zur Aufnahme von Geschwindigkeitsprofilen, wie es zum Beispiel in den Arbeiten von Gösch et al. [67] oder Kunst et al. [68] geschieht.

Bei gerichtetem Transport muss die ideale Korrelationskurve 3.14 um einen Exponentialterm erweitert werden.

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} G_{\text{Diff}}(t) \exp\left(-\left[\frac{t}{\tau_F}\right]^2 G_{\text{Diff}}(t)\right) \quad (3.30)$$

mit

$$G_{\text{Diff}}(t) = \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau_D}}} \quad (3.31)$$

Aus der Flusszeit τ_F lässt sich die Fließgeschwindigkeit mittels

$$v = \frac{r_0}{\tau_F} \quad (3.32)$$

bestimmen. Dieser einfache Zusammenhang gilt allerdings nur, wenn die z-Komponente der Geschwindigkeit gleich Null ist. Die axiale Symmetrie eines einzelnen Fokus verhindert zudem, dass über die Flussrichtung in der Ebene eine Aussage gemacht werden kann. Ist die Diffusion der Teilchen deutlich langsamer als der gerichtete Transport, kann der diffusive Term $G_{\text{Diff}}(t)$ in Gleichung 3.30 mit 1 genähert werden und die Korrelationsfunktion wird einfach zu

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} G_{\text{Fluss}}(t) = 1 + \frac{1}{N} \exp\left(-\left[\frac{t}{\tau_F}\right]^2\right) \quad (3.33)$$

3. *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie*

4. Aufbau und Charakterisierung der Anlage

Dieses Kapitel beschreibt den Aufbau der Anlage und die Charakterisierung des konfokalen Beobachtungsvolumen. Nach einer kurzen Einführung in das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wird auf die hier verwendete kommerzielle Anlage der Firma Zeiss eingegangen. Messungen mit Standard-Farbstoffen erlauben die Charakterisierung des Beobachtungsvolumens und geben Einblick in mögliche Fehlerquellen bei FCS-Messungen.

4.1. Konfokale Mikroskopie

Eine zentrale Rolle bei der Herleitung der Korrelationsfunktion spielt die Detektionsfunktion der Apparatur. Die Näherung eines Gauß'schen Ellipsoiden aus Gleichung 3.2 soll hier nun etwas motiviert werden. Die Überlegungen gehen dabei vorwiegend auf die Arbeit von Rigler et al. aus dem Jahre 1993 zurück [53]. Die folgenden Ausführungen sind eine Zusammenfassung der ausführlicheren Betrachtungen von Kottig [69].

Wie in der inversen Mikroskopie üblich, stellt das Objektiv das elementare Bauteil dar. Es sorgt sowohl für die Fokussierung des anregenden Laserstrahls als auch für die Detektion des emittierten Lichts. Wichtige Objektivparameter sind dabei die Vergrößerung M und die Numerische Apertur $N.A.$. Die Vergrößerung M ist erst in Kombination mit einer Tubuslinse (bei Zeiss $f_{\text{Tubus}} = 164,5 \text{ mm}$) eine wohldefinierte Größe. Der hochkomplexe Aufbau des Objektivs soll hier vernachlässigt werden und nur durch eine mikroskopseitige Eintrittspupille mit Aperturradius a , probenseitiger Kugelsegment-Phasenfront mit Öffnungswinkel α , entsprechend numerischer Apertur $N.A. = n \cdot \sin \alpha$ und dem Probenbrechungsindex n charakterisiert sein. Der Radius der Kugelsegment-Phasenfront entspricht der nominalen Brennweite $f = f_{\text{Tubus}}/M$ des Objektivs und setzt sich zusammen aus der Brennweite der Tubuslinse f_{Tubus} und der Vergrößerung M . In Abbildung 4.1 sind einige dieser Größen schematisch dargestellt.

Beleuchtet man die Eintrittspupille des Objektivs mit einem Laserstrahl der Vakuumwellenlänge λ_0 und Leistung P sowie gaußförmiger radialer Intensitätsverteilung mit einem $1/e^2$ -Radius ω_1 , so ergibt sich für die Lichtintensität in der Nähe des Fokuspunkts



Abbildung 4.1.: Das verwendete Objektiv (Zeiss C-Apochromat 40x/1,2 W korr). Der Aperturradius beträgt laut Herstellerangaben $a = 4,5$ mm. Bei der Vergrößerung $M = 40$ wird die nominale Brennweite $f = 4,11$ mm. Mit der Numerischen Apertur $N.A. = 1,2$ in wässriger Umgebung ($n = 1,33$) ist der Winkel $\alpha = 64,5^\circ$. Mit der im Bild horizontalen Skala lässt sich die Dicke eines Deckglases zwischen 0,13 mm und 0,18 mm korrigieren.

$z = 0$ eine in radialer Richtung gauß- und in z -Richtung lorentzförmige Verteilung

$$I(x, y, z) = \frac{2P}{\pi\omega^2(z)} \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega^2(z)}\right) \quad (4.1)$$

Abbildung 4.2 zeigt die normierte Anregungsintensität in Abhängigkeit der x - und z -Koordinate. Die y -Richtung ist aufgrund der Radialsymmetrie zur x -Richtung äquivalent.

Die Taillenbreite ω_0 des Strahles in der Fokusebene bestimmt sich durch die Beziehung $\omega_0 = \frac{\lambda f}{\pi\omega_1} = \frac{\lambda_0 f}{n\pi\omega_1}$ und für eine in z -Richtung verschobene Schnittfläche im Defokusbereich ergibt sich $\omega^2(z) = \omega_0^2 + z^2 \left(\frac{\omega_1}{f}\right)^2$. Der Radius ω_1 des Laserstrahls sollte bei dieser Anordnung wesentlich kleiner als die Eintrittspupille a des Objektivs sein, damit diese nicht die radiale Begrenzung des Profils darstellt.

Die Anregung eines fluoreszierenden Moleküls ist proportional der lokalen Lichtintensität und kann deshalb mit obiger Gleichung 4.1 beschrieben werden. Die Detektierbarkeit eines Punktes in der Probe ist die zweite Größe, die die Form des effektiven Volumens bestimmt. Ziel der folgenden Überlegung ist es, die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, mit der ein Lichtquant von einem bestimmten Punkt der Probe aus in den Detektor gelangt. Dazu muss zunächst die *Point Spread Function* (PSF) definiert werden. Ein leuchtender Punkt an der Stelle (x', y', z) wird in der Fokusebene ($z = 0$) als kleines Scheibchen mit einer Größe entsprechend dem Auflösungsvermögen R_0 der optischen Komponenten

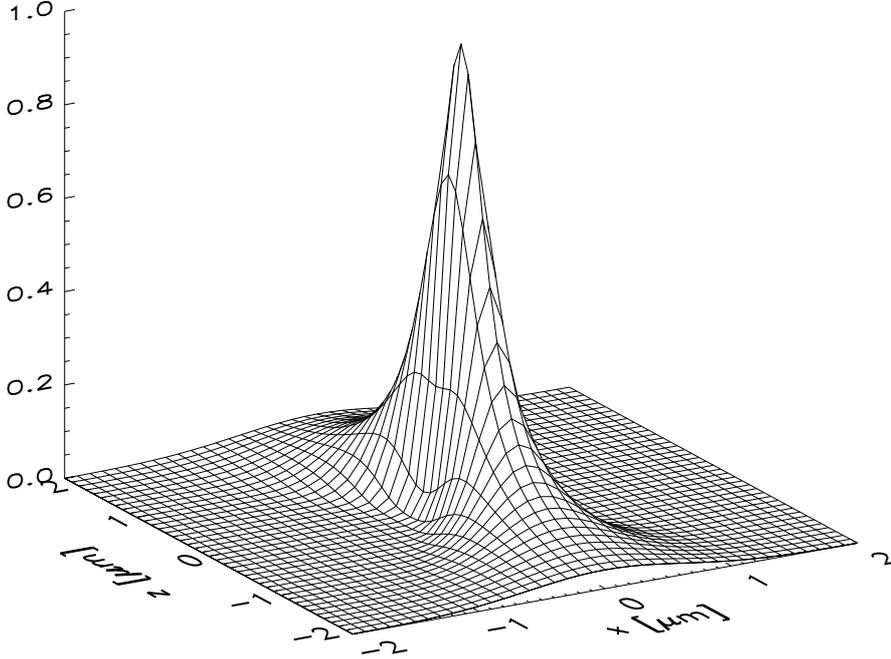


Abbildung 4.2.: Anregungsprofil des Lasers im Probenraum. Die zugrundeliegenden Berechnungsdaten sind den realen Werten nachempfunden: $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$; $\omega_1 = 2,5 \text{ mm}$; $M = 40$; $f_{\text{Tubus}} = 164,5 \text{ mm}$; $n = 1,33$. Die Intensität ist auf das Maximum normiert.

festgelegt. Für Punkte außerhalb der Fokusebene wird diese Scheibe entsprechend einer Lorentzfunktion $R^2(z) = R_0^2 + z^2 \tan^2(\alpha)$ vergrößert.

$$\text{PSF}(\mathbf{r}', \mathbf{r}, z) = \frac{\text{circ}\left(\frac{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|}{R(z)}\right)}{\pi R^2(z)} = \begin{cases} \frac{1}{\pi R^2(z)} & \text{für } \frac{\sqrt{(x'-x)^2 + (y-y')^2}}{R(z)} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (4.2)$$

Die Scheibenflächenfunktion $\text{circ}(r)$ ist eine radiale Stufenfunktion, die für Radien $|r| \leq 1$ den Wert 1 besitzt und für $|r| > 1$ den Wert 0.

Der Einschränkung der Detektion aufgrund des Pinholes wird mit einer weiteren Funktion Rechnung getragen, der *Transmissionsfunktion*. Ein Pinhole mit Radius S_0 wird über die konfokale Geometrie mit der Vergrößerung M auf eine verkleinerte Scheibe mit Radius $s_0 = S_0/M$ in die Fokusebene projiziert.

$$T(r) = \text{circ}\left(\frac{r}{s_0}\right) = \begin{cases} 1 & \text{für } \frac{r}{s_0} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (4.3)$$

Mit der *Point Spread Function* und der *Transmissionsfunktion* kann die Wahrscheinlichkeit für die Detektion eines aus dem Probenvolumen emittierten Lichtquants berechnet

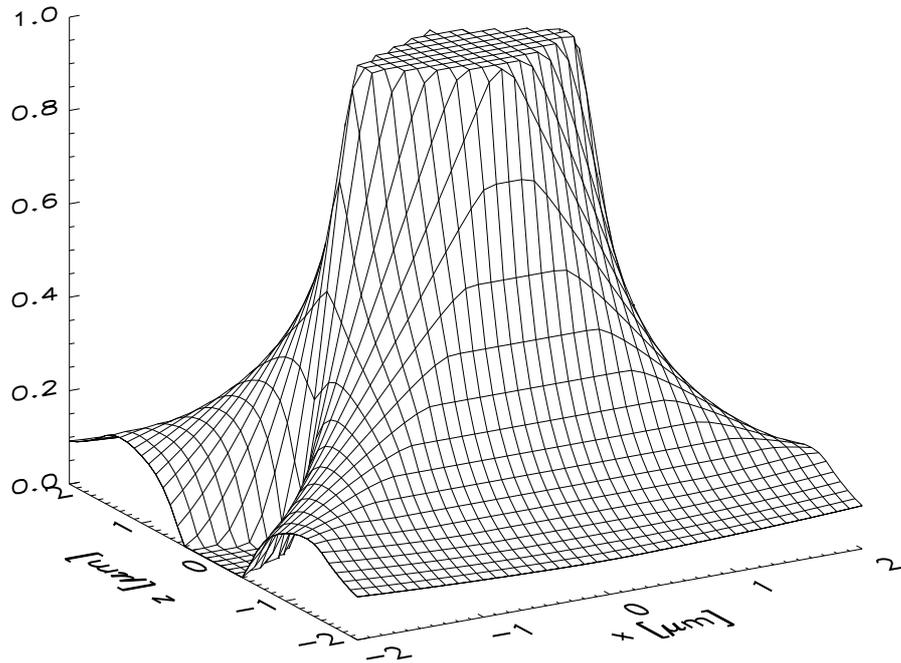


Abbildung 4.3.: Die *Collection Efficiency Function* (CEF) für ein C-Apochromat 40x/1,2 W korr und einem Pinholedurchmesser von $2s_0 = 90 \mu\text{m}$. Diese Funktion ist proportional zur Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon aus dem Probenraum detektiert wird.

werden. Da es sich um eine Detektionseffizienz handelt, bezeichnet man die Funktion oft als *Collection Efficiency Function* (CEF).

$$\text{CEF}(\mathbf{r}, z) = \frac{\int \int T(r) \text{PSF}(\mathbf{r}', \mathbf{r}, z) d^2 r'}{\int \int \text{PSF}(\mathbf{r}', \mathbf{r}, z) d^2 r'} \quad (4.4)$$

Das Produkt aus dieser Funktion und der Anregungsfunktion 4.1 wird als *Molecule Detection Efficiency* (MDE) bezeichnet und charakterisiert das effektive Volumen eines FCS-Experiments.

$$\text{MDE}(x, y, z) = \text{CEF}(x, y, z) \cdot I(x, y, z) \quad (4.5)$$

Eine geeignete Wahl der im System verwendeten Komponenten erlaubt eine Näherung dieses Volumens als dreidimensionalen Gauß'schen Ellipsoiden.

$$\text{MDE}(x, y, z) \approx W(\mathbf{r}) = W_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{r_0^2}} e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \quad (4.6)$$

Bei der Anregung ist wie schon erwähnt wichtig, dass die Ausdehnung ω_1 des anregenden Laserstrahls in der x-y-Ebene signifikant kleiner als der Aperturradius a des Objektivs ist. Quantitativ wird als Grenze $\omega_1 \leq \frac{a}{2}$ verwendet. Ein zweites wichtiges Kriterium ist

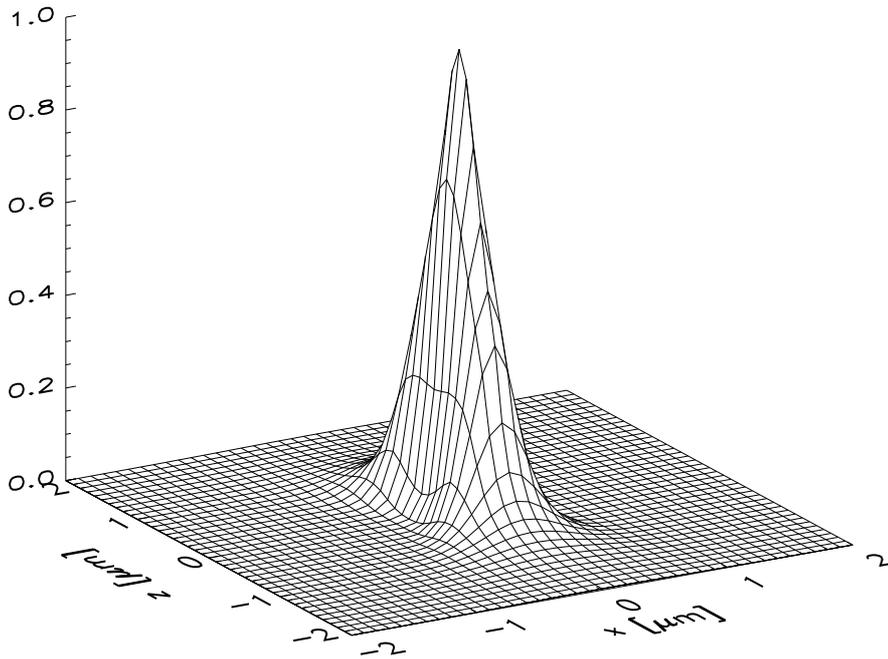


Abbildung 4.4.: Die *Molecule Detection Efficiency* (MDE) ist das Produkt aus der Anregungsintensität (siehe Abb. 4.2) und der *Collection Efficiency Function* (CEF) (siehe Abb. 4.3). Diese Funktion ist proportional zur Wahrscheinlichkeit, dass ein Teilchen, das sich im Probenvolumen befindet, angeregt und detektiert wird. Diese Funktion ist alleine vom Aufbau des Systems und von den Kenngrößen der verwendeten Komponenten abhängig. Sie stellt also eine fix vorgegebene apparative Filterfunktion für das untersuchte dynamische System dar.

die Größe des Pinholes. Einerseits kann ein zu klein gewähltes Pinhole ebenfalls den Effekt haben, die Gaußverteilung der Anregung in der $x-y$ -Ebene zu stören. Der Radius s_0 des in die Fokusebene projizierten Pinholes sollte also größer sein als die Ausdehnung des Laserstrahls ($\omega_0 \leq s_0 = \frac{S_0}{M}$). Andererseits bewirkt ein zu großes Pinhole, dass das in z -Richtung wirkende Lorentzprofil nicht als Gaußfunktion genähert werden kann. Idealerweise erfährt das Lorentzprofil durch die Pinhole-begrenzte Abbildung des Fokusbereichs eine zusätzliche Einschränkung in der Detektierbarkeit. Die Überlagerung von Anregung und Detektion kann dann sehr gut durch eine Gaußfunktion genähert werden, wie Abbildung 4.5 zeigt. In x -Richtung (und natürlich auch in y -Richtung) ist die Detektionsfunktion im Prinzip durch die Anregung gegeben. In z -Richtung allerdings wird die Anregung durch die konfokale Detektionsgeometrie an den Ausläufern des Lorentzprofils beschnitten und kann dann durch eine Gaußfunktion angenähert werden. Falls die optischen Komponenten nicht aufeinander abgestimmt sind, kann es zu Abweichungen dieser Näherung kommen. Dies führt zu systematischen Artefakten bei der Anpassung der theoretischen Funktionen an die experimentellen Daten, wie zum Bei-

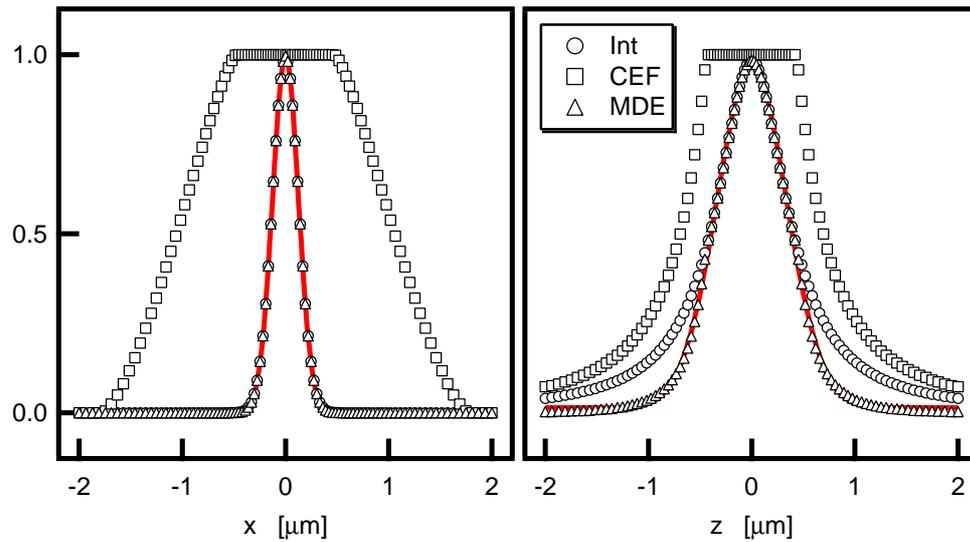


Abbildung 4.5.: Hauptachsenschnitte durch die Profile der Laseranregung (Int), der *Collection Efficiency Function* (CEF) und der *Molecule Detection Efficiency* (MDE). Die durchgezogenen Linien stellen angepasste Gaußfunktionen an Letztere dar.

spiel dem scheinbaren Auftreten einer zusätzlichen Kinetik, verfälschten Diffusionszeiten oder abweichenden Achsenverhältnissen z_0/r_0 [70].

4.2. ConfoCor 2

Beim hier verwendeten Aufbau handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Gerät der Firma Carl Zeiss (Jena). Eine ausführliche Beschreibung der Anlage findet sich in [71].

Abbildung 4.6 gibt einen schematischen Überblick des Gerätes. Die drei Untereinheiten, bestehend aus dem Lasermodul, dem Mikroskop Axiovert 200 und dem ConfoCor2 sind alle mittels einer zentralen Software von einem angeschlossenen Rechner steuerbar. Das Lasermodul enthält drei verschiedene Laser. Zwei HeNe-Laser, die längerwelliges Licht bei 633 nm und 543 nm liefern und einen Argon-Ionen-Laser, bei dem drei verschiedene Linien bei kürzeren Wellenlängen um die 500 nm zur Verfügung stehen. Die maximalen Intensitäten der verschiedenen Linien stehen in Tabelle 4.1. Sie lassen sich bis auf 0,1% des Maximalwerts herunterregeln. Da der Laser durch verschiedene optische Bauteile läuft, ist die Intensität im Probenraum I_P , sprich hinter dem Objektiv, kleiner als die nominale Ausgangsleistung I_0 . Aus der Intensität I_P und der Wellenlänge λ lässt sich eine mittlere Photonenzahl pro Zeit n_p berechnen, deren Kenntnis für Bleich- und

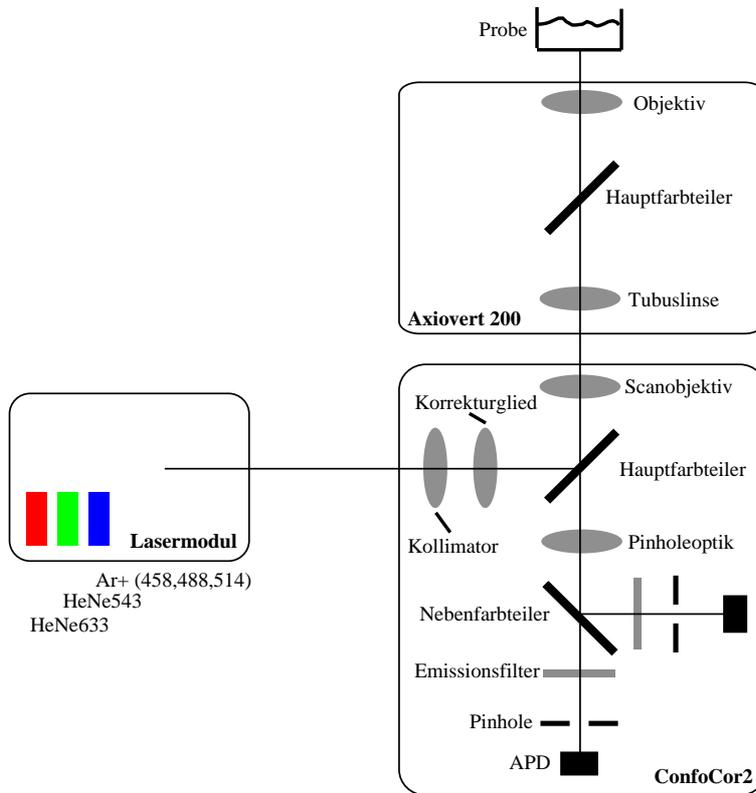


Abbildung 4.6.: Schematischer Aufbau des Gerätes für Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie der Firma Zeiss. (APD: Avalanche-photodiode)

Sättigungsprozesse oft von Vorteil ist.

$$n_p = \frac{I_p \lambda}{hc} \quad (4.7)$$

Das Planck'sche Wirkungsquantum ist $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J s und die Lichtgeschwindigkeit $c = 3 \cdot 10^8$ m s⁻¹

Über ein Glasfaserkabel gelangt der Laserstrahl ins ConfoCor2, wo er nach Durchlaufen einer kollimierenden Linsengruppe vom Hauptfarbteiler reflektiert und in das direkt verbundene Mikroskop gelenkt wird. Beim Mikroskop handelt es sich um das Modell *Axiovert 200*, ein inverses Mikroskop, das mit mehreren verschiedenen Objektiven ausgerüstet ist, darunter auch das fast ausschließlich benutzte C-Apochromat 40x/1,2 W korr. Dieses Objektiv erzeugt den Laserfokus und fängt das Fluoreszenzlicht teilweise wieder auf. Das gesammelte Licht wird wieder in das ConfoCor2-Modul eingekoppelt.

Hier kann mit dem Hauptfarbteiler eingestellt werden, welche Wellenlängen überhaupt weiter in den Detektionskanal vordringen dürfen und welche draußen bleiben müssen. Die selektierten Banden durchlaufen die Pinholeoptik, können von einem Nebenfarbteiler

Laser	λ [nm]	I_P [mW]	n_p [$\frac{10^{17}}{s}$]
Ar ⁺	458	0,43	0,99
Ar ⁺	488	2,91	7,14
Ar ⁺	514	1,18	3,05
HeNe	543	0,32	0,87
HeNe	633	1,42	4,52

Tabelle 4.1.: Kenngrößen der vorhandenen Laserlinien. I_P ist die im Probenraum gemessene Intensität und n_p die Anzahl Photonen pro Zeiteinheit. Die Intensitäten gelten für 100 % Leistung. Der Argon-Ionen-Laser wurde mit dem empfohlenen Tube-Current von 6,1 A betrieben.

je nach Wunsch nochmals in zwei unabhängige Kanäle aufgeteilt werden und passieren nochmals einen wählbaren Emissionsfilter. Das in alle Raumrichtungen verschiebbare Pinhole mit variablem Durchmesser gewährleistet die Begrenzung des Beobachtungsvolumens, indem Photonen vom *falschen* Ort ausgeblendet werden. Die Position des Pinholes wird vor der Messung so gewählt, dass die mittlere gemessene Intensität maximal wird. Dann ist das Pinhole konfokal zum Fokus. Die Avalanche-Photodiode registriert die Ankunftszeit jedes einzelnen Photons und gibt diese über ein SCSI-Kabel an eine Korrelatorkarte im Rechner. Während die Messung läuft, werden mit einem Multiple-Tau-Algorithmus instantan die Korrelationsfunktionen berechnet.

4.3. Messungen mit Farbstoffen

Sehr wichtig für alle FCS-Messungen ist eine gute Charakterisierung des effektiven Probenvolumens. Die gemessene Diffusionszeit einer unbekannt Probe kann nur dann in einen Diffusionskoeffizienten umgerechnet werden, wenn der Fokusradius r_0 bekannt ist. Der ersten Schritte bei einer FCS-Messung bestehen also in der Bestimmung des effektiven Volumens. Zuerst muss die ideale Position des Pinholes gefunden werden, sodass das Detektionsprofil mit dem Anregungsprofil überlappt. Nur dann sind die theoretischen Modelle für die Autokorrelationsfunktion gültig. Anschließend wird mit einer Kalibrierungslösung mit bekanntem Diffusionskoeffizienten der Fokusradius r_0 und das Verhältnis z_0/r_0 bestimmt.

Die ideale Pinholeposition lässt sich mit dem ConfoCor2 sehr komfortabel bestimmen. Dazu wird eine für FCS-Messungen hochkonzentrierte Farbstofflösung ($10^{-6} - 10^{-7}$ M) benötigt. Bei der Prozedur muss genau derselbe Aufbau verwendet werden wie später für die Messung. Bei eingeschaltetem Laser lässt sich die Position des Pinholes mit

einem Makro in der Softwaresteuerung nacheinander in allen drei Richtungen verschieben. Während des Verschiebens wird die Intensität gemessen. Bei idealem Überlapp von Anregung und Detektion erhält man maximale Intensität (siehe Abbildung 4.7). Die Maximalpositionen werden für die folgenden Messungen ausgewählt und festgehalten.

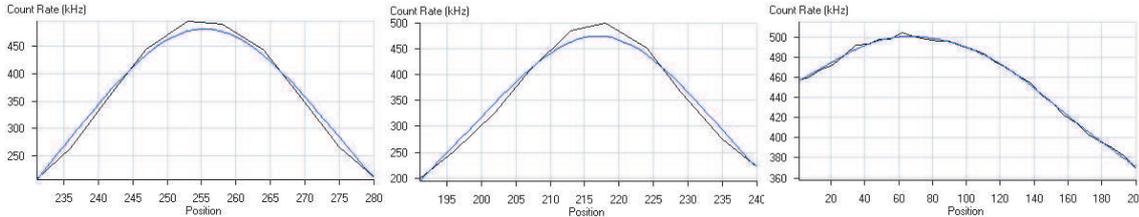


Abbildung 4.7.: Gemessene Intensitäten während des Verschiebens des Pinholes in x -Richtung (**Links**), y -Richtung (**Mitte**) und z -Richtung (**Rechts**). Ein Motorschritt in x - bzw. y -Richtung entspricht einer Verschiebung des Pinholes um $2\ \mu\text{m}$. In z -Richtung entspricht ein Motorschritt $4,8\ \mu\text{m}$. In den Probenraum projiziert, erhält man Schrittweiten von $15\ \text{nm}$ in x - bzw. y -Richtung und $3\ \text{nm}$ in z -Richtung. Die glatten Kurven sind Anpassungen einer Gaußkurve zur exakten Bestimmung des Maximums.

Die Charakterisierung des Probenvolumens erfolgt durch eine Messung mit einem Farbstoff mit bekanntem Diffusionskoeffizienten D . Die bekanntesten Beispiele sind Rhodamin 6G ($D_{\text{Rhodamin}} = 280\ \mu\text{m}^2\ \text{s}^{-1}$) für den Wellenlängenbereich von $480 - 550\ \text{nm}$ und Cy5 ($D_{\text{Cy5}} = 250\ \mu\text{m}^2\ \text{s}^{-1}$) für den roten Laser bei $633\ \text{nm}$. Abbildung 4.8 zeigt links eine typische Kalibrierungsmessung.

Bei der Anpassung des Modells an die Daten muss auf jeden Fall der Triplettabfall des Farbstoffes berücksichtigt werden. Laut Gleichung 3.20 ist die theoretische Korrelationsfunktion dann:

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} \left[1 + \frac{T}{1-T} \exp(-t/\tau_T) \right] \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau}}} \quad (4.8)$$

Aus der angepassten Diffusionszeit τ und dem bekannten Diffusionskoeffizienten D kann der Radius des effektiven Volumens bestimmt werden.

$$r_0 = \sqrt{4D\tau} \quad (4.9)$$

Die Werte r_0 und z_0 werden bei den Messungen der unbekannt Probe festgehalten.

4.4. Statistische und systematische Fehler

Bei FCS-Experimenten wird ausschließlich die Intensität gemessen. Diese unterliegt statistischen Schwankungen. Dieser Abschnitt spricht einige Kriterien an, die bei Messun-

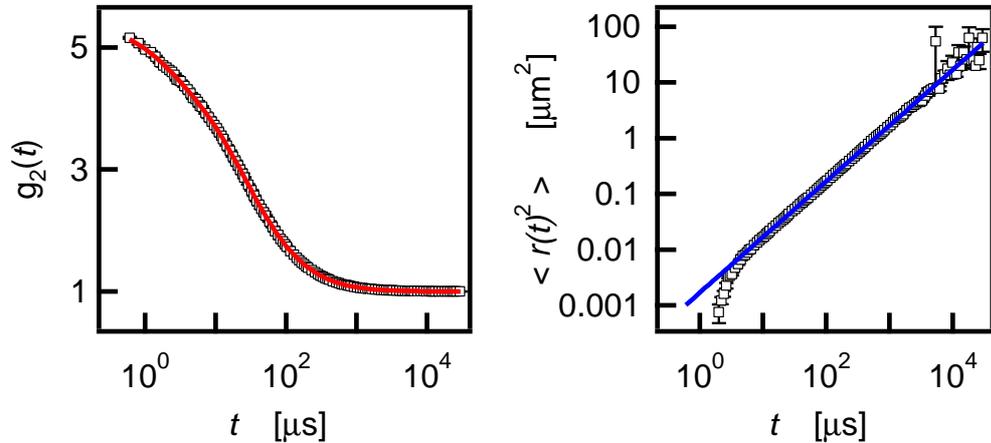


Abbildung 4.8.: Links: Autokorrelationskurve einer Rhodaminlösung (Rhodamin 6G) zur Kalibrierung des Probenvolumens. Die Anregungswellenlänge des Lasers betrug $\lambda = 488 \text{ nm}$. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung an die Daten gemäß Gleichung 4.8. Die resultierenden Fitparameter sind: $N = 0,27 \pm 0,02$; $T = 0,158 \pm 0,008$; $\tau_T = 1,87 \pm 0,15 \mu\text{s}$; $\tau = 26,3 \pm 0,2 \mu\text{s}$; $z_0/r_0 = 6,8 \pm 0,3$. Mit dem Literaturwert $D_{\text{Rhodamin}} = 280 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ergibt sich für den Radius des Detektionsvolumens: $r_0 = 172 \pm 1 \text{ nm}$. **Rechts:** Mittleres Verschiebungsquadrat, berechnet aus der Korrelationsfunktion gemäß Gleichung 3.16. Die durchgezogene Linie ist die theoretische Vorhersage gemäß $\langle r(t)^2 \rangle = 6 D t$.

gen erfüllt werden müssen, um Daten mit möglichst kleinen statistischen und systematischen Fehlern zu gewinnen. Die statistische Genauigkeit wurde zum ersten Mal 1974 von Koppel behandelt [72]. Inzwischen gibt es einige Arbeiten, die sich mit dem Problem beschäftigen [73] [74] [75]. Auch einen Vergleich zwischen Einzel- und Doppelfokus gibt es in der Literatur [76].

Signal-Rausch-Verhältnis

Hintergrundrauschen ist zwar nicht korreliert, dennoch hat es einen Einfluss auf die Korrelationsfunktion [77]. Vor allem die Amplitude $G(0)$ der Korrelationsfunktion hängt stark davon ab. Die Anzahl der Teilchen im effektiven Volumen kann durch einen sehr einfachen Schritt korrigiert werden [72].

$$N = \frac{1}{G(0)} \frac{\langle F \rangle^2}{\langle F + B \rangle^2} \quad (4.10)$$

F ist die Intensität aus der Messung mit den fluoreszenzmarkierten Teilchen. Die Hintergrundintensität B erhält man durch eine Messung ohne den Farbstoff. Bei sehr kleinen Konzentrationen wird üblicherweise die Intensität sehr gering und der Hintergrund

relativ zur Fluoreszenz größer. Ohne die Korrektur erhält man deshalb größere Teilchenzahlen als tatsächlich vorhanden, und die Konzentration wird überschätzt.

Sättigung des Farbstoffs

Jeder reelle Farbstoff erreicht bei irgendeiner Laserintensität die Sättigung. Dann ist die emittierte Lichtintensität nicht mehr proportional zur einfallenden Intensität. Der Prozess der Anregung des Farbstoffs und dem Aussenden eines Photons benötigt eine endliche Zeit. Während dieser Zeit können zusätzlich einfallende Photonen nicht *verarbeitet* werden.

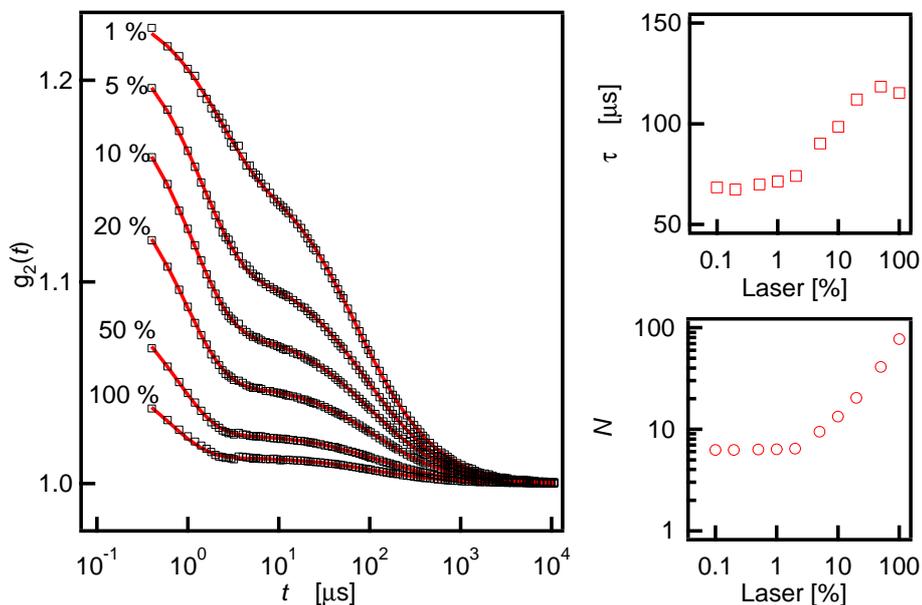


Abbildung 4.9.: **Links:** Autokorrelationsfunktionen einer Farbstofflösung (Alexa633) mit einer Konzentration von 20 nM für verschiedene Laserintensitäten ($\lambda = 633$ nm). Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen mit dem Standard-Diffusionsmodell laut Gleichung 3.20. **Rechts oben:** Diffusionszeit τ in Abhängigkeit der Laserintensität. **Rechts unten:** Anzahl der gemessenen Teilchen aus der Amplitude der Korrelationsfunktion.

Abbildung 4.9 zeigt links eine Reihe von Autokorrelationsfunktionen, die mit verschiedenen Laserintensitäten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 633$ nm aufgenommen wurden. Beim Farbstoff handelt es sich um Alexa633 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande, Bestellnummer: A-20500, Absorption: 624 nm, Emission: 643 nm). Deutlich zu erkennen ist die Abnahme der Amplitude mit steigender Laserintensität. An die Daten wurde Gleichung 4.8 angepasst. Die Ergebnisse für die Diffusionszeit τ und die Teilchenzahl N sind in den Abbildungen rechts gezeigt. Die Diffusionszeit und die scheinbare Anzahl der

4. Aufbau und Charakterisierung der Anlage

Teilchen steigen mit der Laserleistung, sobald eine kritische Sättigungsleistung erreicht ist. Die Sättigung des Farbstoffes setzt hier bei einer Laserleistung von zwei Prozent ein. Das entspricht laut Tabelle 4.1 einer Leistung des Lasers von $28 \mu\text{W}$ oder $9 \cdot 10^{15}$ Photonen pro Sekunde. Bei Messungen mit diesem Farbstoff sollte diese Laserleistung nicht überschritten werden, da die Ergebnisse sonst verfälscht sind.

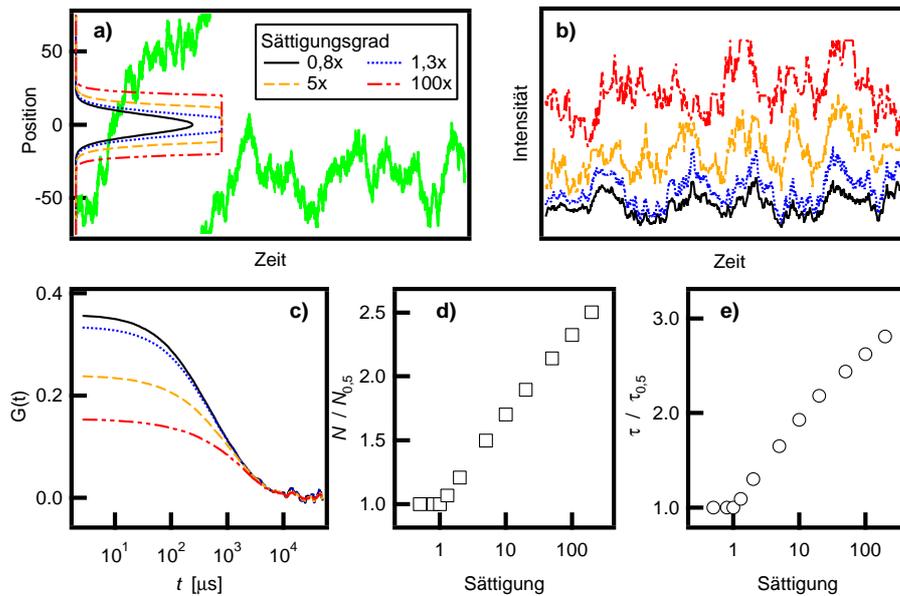


Abbildung 4.10.: Simulation der Auswirkung eines gesättigten Farbstoffes in einem FCS-Experiment. **(a)** Ein eindimensionaler Zufallsweg eines Teilchens in einem abgegrenzten Intervall. Zusätzlich sind eingezeichnet verschiedene Profile des Beobachtungsvolumens. Je nach Grad der Sättigung (normiert auf das Maximum der Anregbarkeit) durchlaufen die Teilchen unterschiedliche Detektionsprofile. **(b)** Die Intensität ist proportional zum Wert des Detektionsprofils an der jeweiligen Position. Hier gezeigt ist die Summe aus zwanzig unabhängig diffundierenden Teilchen. Die jeweiligen Positionen wurden für verschiedene Sättigungsprofile ausgewertet. **(c)** Resultierende Autokorrelationsfunktionen. **(d)** Teilchenzahl N aus der inversen Amplitude der Korrelationsfunktionen normiert auf die Teilchenzahl bei halber Sättigung $N_{0,5}$ und aufgetragen gegen den Grad der Sättigung. **(e)** Charakteristische Zerfallszeit τ der Korrelationskurve normiert auf die Zerfallszeit bei halber Sättigung $\tau_{0,5}$.

Abbildung 4.10 zeigt eine Simulation zur Veranschaulichung der angesprochenen Effekte. Sie wurde mit dem Programm IDL¹ durchgeführt. Ein Teilchen, das einen Zufallsweg in einem Intervall beschreibt, wird bei vorhandener Sättigung kein Gauß'sches Detektionsvolumen durchlaufen, sondern einen bei der Sättigung abgeschnittenen Gauß (Abb. 4.10 a). Im Extremfall sehr hoher Laserintensitäten kann das Profil als Stufenfunktion betrachtet werden. Teilchen, die auf einem identischen Zufallsweg verschiedene Anre-

¹Interactive Data Language, www.creaso.com

gungsprofile durchlaufen, liefern unterschiedliche Intensitäten als Ergebnisse (Abb. 4.10 b). Bei hohen Laserintensitäten sind die mittleren gemessenen Intensitäten erwartungsgemäß ebenfalls höher. Die Fluktuationen sind im Verhältnis dazu aber kleiner. Die Autokorrelation der Teilchen bei gesättigter Intensität wird systematische Fehler sowohl in der Amplitude als auch in der Diffusionszeit aufweisen (Abb. 4.10 c).

- Die Amplitude $G(0)$ entspricht der Varianz der Fluktuationen. Im gesättigten Fall ist diese Varianz kleiner, also $G(0)$ kleiner und damit wird die Teilchenzahl $N = \frac{1}{G(0)}$ überschätzt (Abb. 4.10 d).
- Die Korrelationszeit als mittlere Breite der Fluktuationen wächst. Dies führt zu unterschätzten Geschwindigkeiten oder Diffusionskonstanten (Abb. 4.10 e).

Bei der Diffusionszeit der experimentellen Daten in Abbildung 4.9 sieht man die Kurve für die höchste Laserintensität wieder nach unten einknicken. Dies kann auf das Bleichen des Farbstoffes zurückgeführt werden. Die Alexa-Reihe von Molecular Probes zeigt dies nur bei sehr hohen Laserintensitäten. Die Farbstoffe eignen sich für FCS-Messungen hervorragend. Andere Farbstoffe bleichen früher, wie das nächste Beispiel zeigen soll.

Bleichen

Bei sehr hoher Lasereinstrahlung kann es zum Bleichen des Farbstoffs kommen. Durch freie Radikale wird der Farbstoff irreversibel zerstört. Dieser Prozess macht sich dadurch bemerkbar, dass die normierte Korrelationsfunktion bei langen Zeiten nicht auf dem konstanten Wert 1 liegt. Das kommt daher, dass die gemittelte Intensität nicht zeitlich konstant bleibt, sondern sich durch das Bleichen verringert.

Da Bleichen einen Einfluss auf die Korrelationsfunktion hat, können die Mechanismen auch damit untersucht werden, wie Widengren gezeigt hat [78]. Beim Bleichen wird der Farbstoff während des Durchgangs durch das effektive Volumen zerstört und damit dunkel. Aus diesem Grund liefert die Korrelation der Intensität eine zu kleine Diffusionszeit. Diesem sehr komplexen Problem lässt sich von theoretischer Seite bisher nur mit einem Pfadintegralansatz begegnen [79]. Experimentell können Antioxidantien wie zum Beispiel Vitamin C das Bleichen abschwächen.

Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse einer Messung mit dem Farbstoff YOYO-1 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande, Bestellnummer: Y-3601, Absorption: 491 nm, Emission: 509 nm). YOYO-1 gehört zur Gruppe der interkalierenden Farbstoffe. Bei Messungen von DNA mit diesem Farbstoff darf die Laserleistung ein Prozent nicht überschreiten. An diesem Punkt setzt die Sättigung ein. Das entspricht gemäß Tabelle 4.1 ungefähr $29 \mu\text{W}$ oder $7 \cdot 10^{15}$ Photonen pro Sekunde. Das Bleichen allerdings setzt bei diesem Farbstoff bei etwa 10 Prozent Laserleistung ein, was am Abknicken der Diffusionszeit nach unten deutlich wird.

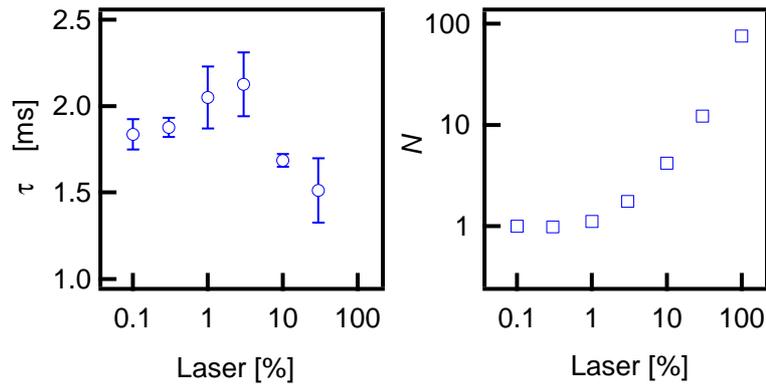


Abbildung 4.11.: Links: Diffusionszeit τ von DNA (1019 bp) markiert mit dem Farbstoff YOYO-1 bei verschiedenen Laserintensitäten ($\lambda = 488$ nm). Rechts: Anzahl der gemessenen Teilchen aus der Amplitude der Korrelationsfunktion.

Aggregation und Polydispersität

Bei Experimenten mit Teilchen, die in Relation zu den Ausmaßen des Beobachtungsvolumens vergleichbar groß oder gar größer sind, muss der Particle-Size-Effekt berücksichtigt werden [80] (siehe auch Abschnitt 5.2).

Oft sind sehr große Objekte wie zum Beispiel Aggregate auch besonders hell, da sie viele Farbstoffe tragen. Diese Objekte führen zu riesigen Intensitätsänderungen beim Eintritt in das Beobachtungsvolumen. Die Autokorrelationsfunktion wird dadurch derart gestört, dass sie keine Aussagekraft mehr besitzt. In diesem Fall kann, anstatt die Intensität zu korrelieren, das *Photon Counting Histogram* verwendet werden [81]. Damit ist es möglich, Informationen über die Größe von Aggregaten zu gewinnen oder auch noch die Bindung von sehr viel kleineren Reaktionspartnern an große Objekte nachzuweisen [82].

Ein eng verwandtes Problem ist die Polydispersität von Teilchen. Sind die fluoreszenzmarkierten Objekte nicht alle gleich groß, so wird ein ganzes Spektrum an Diffusionszeiten in der Korrelationsfunktion enthalten sein. Mit neu entwickelten statistischen Methoden kann unter bestimmten Voraussetzungen eine komplette Verteilung an Diffusionszeiten bestimmt werden [83]. Ohne irgendwelche Zusatzinformationen über das System aber kann die Größenverteilung einer polydispersen Lösung nicht aus einer FCS-Messung bestimmt werden, da es sich um ein inverses Problem handelt [84].

5. Messungen in Polymerlösungen

In diesem zentralen Kapitel geht es um FCS-Messungen in Polymerlösungen. Sowohl DNA (siehe Anhang C.1) als auch Aktin (Anhang C.2) wurden als Modellsysteme für semiflexible Ketten untersucht. Wie sich durch die Analyse der Daten in Abschnitt 5.4 zeigte, können die resultierenden Korrelationsfunktionen nicht mit dem Standardmodell eines einzelnen, diffundierenden Chromophors aus Gleichung 3.20 angepasst werden. Die Korrelationsfunktion wird durch eine Reihe polymerspezifischer Effekte beeinflusst. Die notwendigen Modifikationen des Modells sollen an dieser Stelle zusammengefasst und in den folgenden Abschnitten motiviert werden:

1. Die Polymere tragen entlang der Kette mehrere Farbstoffe. Dies hat Auswirkungen sowohl auf die Dynamik bei kurzen Zeiten als auch auf den diffusiven Abfall.
 - a) Auf kleinen Zeitskalen treten photokinetische Prozesse auf, die nicht mehr mit dem simplen Triplettzustand eines einzelnen Farbstoffes erklärt werden können. Die Anzahl der möglichen Zustände wächst mit der Anzahl der Farbstoffe auf der Kette. In Abschnitt 5.1 wird dazu ein theoretisches Modell der mehrfachen Isomerisation entwickelt und mit experimentellen Ergebnissen verglichen.
 - b) Der diffusive Abfall ändert sich, da Polymere mit mehreren Farbstoffen entlang der Kette keine punktförmigen Objekte sind. Dieser für Kugeln schon betrachtete *Particle-Size-Effekt* [80] wird in Abschnitt 5.2 durch Transformation in reziproke Raumkoordinaten auf den Fall erweitert, bei dem die Struktur der Polymere, also der Formfaktor, explizit berücksichtigt wird. Die theoretischen Vorhersagen werden für verschiedene Polymergrößen mit Experimenten an DNA-Fragmenten verglichen.
2. Polymere sind keine starren Objekte. Interne Kettendynamik trägt erheblich zum diffusiven Abfall bei, wie Abschnitt 5.3 theoretisch zeigen soll. Die Messungen an DNA in Abschnitt 5.4 bestätigen dies und zeigen auch, dass der Abstand der Farbstoffe entlang der Kette großen Einfluss auf die betrachtete Diffusionsdynamik hat. Messungen an Aktin in Abschnitt 5.5 zeigen, dass die internen Biegemoden der semiflexiblen Polymere den diffusiven Abfall gänzlich dominieren können.

FCS-Messungen an Polymeren sind bisher in der Literatur eine Rarität. Eine frühe Arbeit stammt von Scalettar et al. [85], die die Selbstdiffusion und die gegenseitige Diffusion in halbverdünnten DNA-Lösungen untersucht. In einer Arbeit von Borejdo und Burlacu wurde die Geschwindigkeit von Aktinfilamenten auf einer Oberfläche mit fixierten Myosinmotoren (*motility assay*) gemessen [86]. Eine aktuelle Arbeit von Shusterman et al. hat die Monomerdynamik von Einzel- und Doppelstrang-DNA mit FCS untersucht, indem ein einzelner Farbstoff kovalent an die Kette gebunden wurde [87]. Polymere mit einem einzelnen Farbstoff in organischen Lösungsmitteln waren Gegenstand einer Arbeit von Zettl et al. [88]. Die laterale Diffusion von Polymeren auf Oberflächen wurde von Sukhishvili et al. [89] und von Zhao und Grannick [90] mit FCS beobachtet.

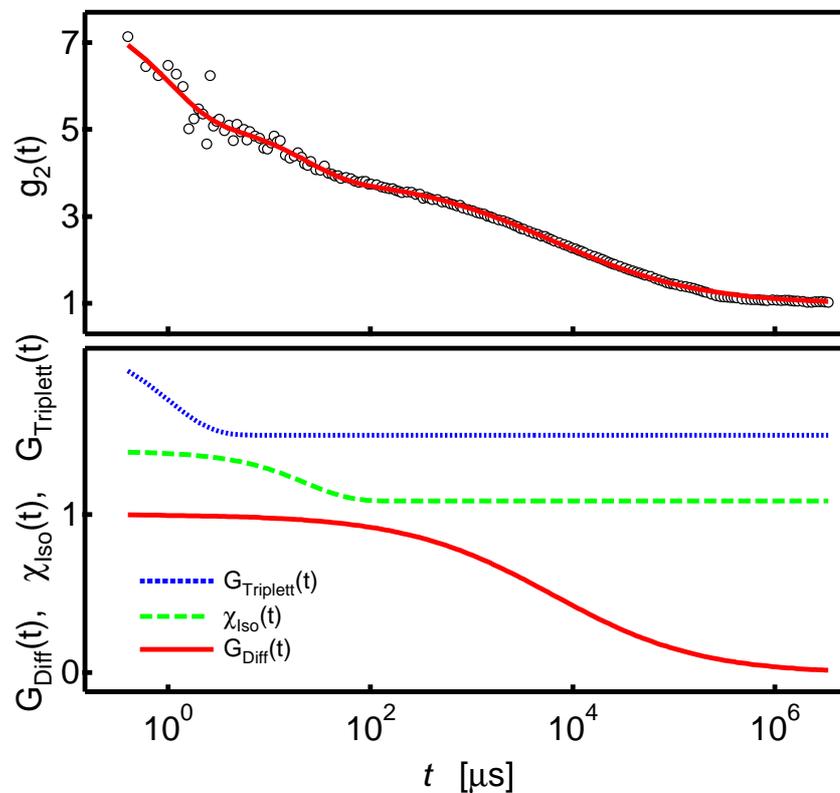


Abbildung 5.1.: **Oben:** Korrelationsfunktion von λ -DNA markiert mit dem interkalierenden Farbstoff TOTO-1. Der mittlere Abstand der Farbstoffe beträgt 1000 bp. Die durchgezogene Linie ist die Anpassung (siehe Text). **Unten:** Die Funktionen $G_{\text{Triplett}}(t)$, $\chi_{\text{Iso}}(t)$ und $G_{\text{Diff}}(t)$, die die dynamisch involvierten Prozesse auf verschiedenen Zeitskalen beschreiben. Zur besseren Darstellung sind $G_{\text{Triplett}}(t)$ und $\chi_{\text{Iso}}(t)$ auf der Ordinate versetzt. Tatsächlich sind die Funktionen so normiert, dass sie für große Zeiten gegen 1 konvergieren.

In dieser Arbeit wurden Polymere untersucht, die mehrere Farbstoffe entlang der Kette tragen. Abbildung 5.1 zeigt die Messung an einer verdünnten Lösung von λ -DNA. Ent-

lang der Kette sitzen interkalierende Farbstoffe TOTO-1, die im Mittel einen Abstand von 1000 bp = 330 nm haben. An die Daten wurde folgendes Modell angepasst:

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} G(t) \quad (5.1)$$

Die Funktion $G(t)$ ist die auf die Teilchenzahl normierte Korrelationsfunktion. Sie unterscheidet sich nur durch die Konstante 1 und die Amplitude $1/N$ von der gemessenen Funktion. Die Normierung der Daten dient zum besseren Vergleich der Kurven untereinander. $G(t)$ ist alleine durch die dynamischen Prozesse bestimmt und ist hier gegeben durch

$$G(t) = G_{\text{Triplett}}[T, \tau_T](t) \cdot \chi_{\text{Iso}}[M, k_{\text{on}}, k_{\text{off}}](t) \cdot G_{\text{Diff}}[\tau, \beta](t). \quad (5.2)$$

Prozesse auf drei verschiedenen Zeitskalen spielen eine Rolle. Bei den kürzesten Zeiten wurde der Triplettabfall berücksichtigt (siehe Abschnitt 3.3). Die Funktion ist gemäß Gleichung 3.19 gegeben durch

$$G_{\text{Triplett}}(t) = 1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right). \quad (5.3)$$

T ist der Triplettanteil. Die Triplettzeit τ_T war für die hier vorgestellten Experimente immer im Mikrosekundenbereich und für die Kettendynamik unerheblich. Dieser Abfall wurde bei allen Messungen berücksichtigt.

Der Zeitbereich von 10–100 μs wird mit der Funktion $\chi_{\text{Iso}}(t)$ beschrieben. Es handelt sich um eine Funktion, die die Dynamik einer mehrfachen Isomerisation beschreibt und in Abschnitt 5.1 detailliert vorgestellt wird. Dieser Prozess ist entscheidend von der Anzahl der Farbstoffe pro Kette abhängig. Diese experimentell sehr gut einstellbare Größe wird bei der Anpassung festgehalten. Die beiden freien Parameter sind die On- und die Off-Rate k_{on} bzw. k_{off} , die angeben, wie die Dynamik zwischen den verschiedenen Zuständen unterschiedlicher Helligkeit aussieht.

Sowohl der Triplettabfall $G_{\text{Triplett}}(t)$ als auch die Isomerisationsfunktion $\chi_{\text{Iso}}(t)$ sind so normiert, dass sie für große Zeiten $t \rightarrow \infty$ auf den Wert 1 fallen. Die Funktion $G(t)$ stimmt also für große Zeiten mit dem langsamsten, diffusiven Abfall $G_{\text{Diff}}(t)$ überein, der von 1 auf 0 abfällt. Diese Funktion ist gegeben durch:

$$G_{\text{Diff}}(t) = \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta}} \quad (5.4)$$

Gegenüber dem Standard-Diffusionsmodell aus Gleichung 3.20 ist diese Funktion um den Parameter β erweitert, der die internen Relaxationen der Kette berücksichtigen soll.

Die Funktion wird in Abschnitt 5.3 näher erläutert. Die Anpassungen der Modellfunktionen an die Daten wurde in dieser Arbeit mit einer Levenberg-Marquardt-Fitroutine des Programms IDL¹ vorgenommen.

Im unteren Teil der Abbildung 5.1 sind die drei Teilfunktionen getrennt dargestellt. Das Produkt dieser drei Funktionen und der Amplitude ist die Anpassung der Daten im oberen Teil der Abbildung. Die hier vorgenommene Faktorisierung der Autokorrelation in drei Teilfunktionen ist nur dann erlaubt, wenn sich die Zeitskalen der zugrunde liegenden Prozesse um jeweils mindestens eine Größenordnung unterscheiden. Ohne diese Annahme allerdings ist keine mathematisch geschlossene Form der Kurve möglich.

Im folgenden Abschnitt 5.1 wird auf photokinetische Prozesse von Farbstoffen eingegangen. Aus der On-Off-Kinetik eines Ensembles von Farbstoffen wird über das Modell einer mehrfachen Isomerisation eine Korrelationsfunktion berechnet und mit experimentellen Daten verglichen. In Abschnitt 5.2 wird eine Korrelationsfunktion entwickelt, die die Farbstoffverteilung auf einem diffundierenden Objekt berücksichtigt. Die theoretischen Funktionen für die gleichmäßige Verteilung entlang der Kontur eines idealen Polymerknäuels werden mit Messungen an DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge verglichen. In Abschnitt 5.3 wird aus den dynamischen Strukturfaktoren der in Abschnitt 2.2 vorgestellten Polymermodelle die Korrelationsfunktion berechnet. Die Abschnitte 5.4 und 5.5 beinhalten die Ergebnisse von Messungen in verdünnten DNA- bzw. Aktinlösungen. In Abschnitt 5.6 sind die Daten mit den theoretischen Funktionen aus einem Modell semiflexibler Ketten verglichen. Die dort präsentierten Ergebnisse stammen aus der Zusammenarbeit mit Roland Winkler vom Forschungszentrum Jülich. Abschnitt 5.7 zeigt Messungen an einzelnen fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten in einer halbverdünnten Lösung aus nicht-markierten Filamenten.

5.1. Photokinetische Prozesse

Bei kurzen Zeiten gibt es Prozesse, die sich in charakteristischer Art und Weise auf die Form des Intensitätssignals und damit auch auf die Form der Korrelationskurve auswirken. Im einfachsten Fall handelt es sich um eine Isomerisation, bei dem zwischen einem dunklen und einem hellen Zustand hin- und hergewechselt wird. Daran soll die Herangehensweise an ein derartiges Problem dargestellt werden, um danach die etwas komplexere Situation des Triplettabfalls zu behandeln. Schließlich wird in diesem Abschnitt noch die mehrfache Isomerisation betrachtet.

Unter der Bedingung, dass der Prozess bei kurzen Zeiten auf einer deutlich kleineren Zeitskala abläuft als der Diffusionsprozess, lässt sich die Korrelationsfunktion faktorisieren.

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} \chi(t) \cdot G_{\text{Diff}}(t) \quad (5.5)$$

¹Interactive Data Language, www.creaso.com

$G_{\text{Diff}}(t)$ ist der Term, der die Diffusion beschreibt, $\chi(t)$ hängt von den Zeitkonstanten des Kurzzeitprozesses ab und schreibt sich laut [91]:

$$\chi(t) = \frac{\sum_{i,j=1}^M Q_i Q_j S_{ij}(t)}{\sum_{i=1}^M Q_i^2} \quad (5.6)$$

Q_i ist die Helligkeit der i -ten Spezies oder des i -ten Zustandes und ist das Produkt aus Quantenausbeute und Anregungsquerschnitt des Farbstoffs. $S_{ij}(t)$ sind die Lösungen des folgenden Anfangswertproblems (AWP):

$$\frac{dS_{ij}(t)}{dt} = \sum_{k=0}^M \mathbf{T}_{ik} S_{kj}(t) \quad (5.7)$$

$$S_{ij}(0) = \delta_{ij} \quad (5.8)$$

wobei \mathbf{T} die Reaktionsmatrix der $M + 1$ beteiligten Zustände darstellt. Die Einträge dieser Matrix sind die Übergangswahrscheinlichkeitselemente zwischen den Zuständen. $S_{ij}(t)$ ist die Wahrscheinlichkeit, dass das System zur Zeit t im Zustand j ist, wenn es zur Zeit $t = 0$ im Zustand i war. Die Funktion $\chi(t)$ ist eine normalisierte Summe dieser Wahrscheinlichkeiten und verknüpft die Übergangsraten der Zustandsänderungen mit dem Abfall in der Korrelationsfunktion.

Isomerisation

Bei der Isomerisation handelt es sich im einfachsten Fall um ein Zweizustandssystem. Es gibt einen Zustand Z_0 , bei dem der Farbstoff nicht leuchtet. Mit der Übergangsrates k_{on} geht der Farbstoff in den Zustand Z_1 über, in dem er anregbar ist und fluoreszentes Licht aussendet. Die Rate k_{off} gibt an, mit welcher Zeitkonstanten das Teilchen aus geht. $K = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$ wird als Reaktionsrate bezeichnet.

Ziel ist es nun, die Wahrscheinlichkeiten für die beiden Zustände anzugeben. Die für Wahrscheinlichkeiten notwendige Nebenbedingung

$$\sum_{i=0}^1 Z_i = Z_0 + Z_1 = 1 \quad (5.9)$$

muss erfüllt sein. Die Gleichgewichtslösung (siehe dazu [92]) kann einfach angegeben werden:

$$Z_0 = \frac{1}{1 + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}} = \frac{1}{1 + K} \quad (5.10)$$

$$Z_1 = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{K}{1 + K} \quad (5.11)$$

Die zeitliche Entwicklung der Zustände ist durch die Übergangsraten gegeben. Die Population des Zustandes Z_0 kann sich dadurch verändern, dass er mit der Rate k_{on} nach Z_1 übergeht oder der Zustand Z_1 mit der Rate k_{off} nach Z_0 übergeht. Im ersten Fall wird etwas abgezogen, im zweiten Fall kommt etwas hinzu. Mathematisch lässt sich dies als Differentialgleichung in Form bringen.

$$\frac{dZ_0}{dt} = -k_{\text{on}}Z_0 + k_{\text{off}}Z_1 \quad (5.12)$$

Die Betrachtung des Zustandes Z_1 ergibt ein analoges Ergebnis.

$$\frac{dZ_1}{dt} = k_{\text{on}}Z_0 - k_{\text{off}}Z_1 \quad (5.13)$$

In Matrixschreibweise erhält man:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} Z_0(t) \\ Z_1(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{on}} & k_{\text{off}} \\ k_{\text{on}} & -k_{\text{off}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} Z_0(t) \\ Z_1(t) \end{pmatrix} \quad (5.14)$$

Die Matrix stellt hier die Reaktionsmatrix \mathbf{T} dar. Die Entkopplung geschieht auf dem Standardweg über die Diagonalisierung der Matrix und den dadurch möglichen Wechsel in das Eigensystem der linearen Abbildung. Die Eigenwerte der Matrix sind:

$$\lambda_0 = 0 \quad (5.15)$$

$$\lambda_1 = -k_{\text{on}} - k_{\text{off}} \quad (5.16)$$

Das Vorhandensein einer stationären Lösung kommt dadurch zum Ausdruck, dass mindestens ein Eigenwert Null ist. Mögliche Eigenvektoren sind:

$$\mathbf{v}_0 = \begin{pmatrix} 1 \\ K \end{pmatrix} \text{ und } \mathbf{v}_1 = \begin{pmatrix} -1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (5.17)$$

Die Eigenvektormatrix und deren Inverse sind also

$$\mathbf{V} = \begin{pmatrix} 1 & -1 \\ K & 1 \end{pmatrix} \quad (5.18)$$

$$\mathbf{V}^{-1} = \frac{1}{1+K} \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ -K & 1 \end{pmatrix} \quad (5.19)$$

Mit diesen beiden Matrizen lässt sich die Reaktionsmatrix diagonalisieren.

$$\begin{aligned} \mathbf{D} &= \mathbf{V}^{-1}\mathbf{T}\mathbf{V} \\ &= \frac{1}{1+K} \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ -K & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} -k_{\text{on}} & k_{\text{off}} \\ k_{\text{on}} & -k_{\text{off}} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 1 & -1 \\ K & 1 \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & -k_{\text{on}} - k_{\text{off}} \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} \lambda_0 & 0 \\ 0 & \lambda_1 \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (5.20)$$

Man transformiere nun $\mathbf{Z}(t)$ in dieses Eigensystem:

$$\mathbf{Z}'(t) = \mathbf{V}^{-1} \cdot \mathbf{Z}(t) \quad (5.21)$$

Für diese neue Größe gilt:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \mathbf{Z}'(t) &= \mathbf{V}^{-1} \cdot \frac{d}{dt} \mathbf{Z}(t) \\ &= \mathbf{V}^{-1} \cdot \mathbf{T} \cdot \mathbf{Z}(t) \\ &= \mathbf{V}^{-1} \cdot \mathbf{T} \cdot \mathbf{V} \cdot \mathbf{Z}'(t) \\ &= \mathbf{D} \cdot \mathbf{Z}'(t) \\ &= \begin{pmatrix} \lambda_0 & 0 \\ 0 & \lambda_1 \end{pmatrix} \cdot \mathbf{Z}'(t) \\ &= \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & -k_{\text{on}} - k_{\text{off}} \end{pmatrix} \cdot \mathbf{Z}'(t) \end{aligned} \quad (5.22)$$

Die entkoppelte Gleichung 5.22 lässt sich leicht lösen. Der Lösungsvektor $\mathbf{Z}'(t)$ lautet offensichtlich

$$\mathbf{Z}'(t) = \begin{pmatrix} a_0 \exp(\lambda_0 t) \\ a_1 \exp(\lambda_1 t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_0 \\ a_1 \exp((-k_{\text{on}} - k_{\text{off}})t) \end{pmatrix}, \quad (5.23)$$

wobei a_0 und a_1 Konstanten sind, die durch die Anfangsbedingungen festgelegt werden. Aus der Lösung $\mathbf{Z}'(t)$ lässt sich durch Umkehrung der Gleichung (5.21) die Lösung $\mathbf{Z}(t)$ ableiten.

$$\begin{aligned} \mathbf{Z}(t) &= \mathbf{V} \cdot \mathbf{Z}'(t) \\ &= \begin{pmatrix} 1 & -1 \\ K & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} a_0 \\ a_1 \exp(\lambda_1 t) \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} a_0 - a_1 \exp(\lambda_1 t) \\ K a_0 + a_1 \exp(\lambda_1 t) \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} a_0 - a_1 \exp((-k_{\text{on}} - k_{\text{off}})t) \\ K a_0 + a_1 \exp((-k_{\text{on}} - k_{\text{off}})t) \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (5.24)$$

Damit ist jetzt die Differentialgleichung 5.14 gelöst, das Anfangswertproblem aber noch nicht. Dazu bedarf es noch einer weiteren kleinen Überlegung. Bisher haben wir die Lösung $\mathbf{Z}(t)$ als Vektor betrachtet. Entscheidend für ein FCS-Experiment ist die Entwicklung eines Zustandes mit der Zeit. Die Lösungsvektoren werden deshalb als Spaltenvektoren einer quadratischen Matrix geschrieben. Die erste Spalte gibt dabei die Entwicklung des Systems an, wenn es sich zur Zeit $t = 0$ im ersten Zustand befand. Entsprechend gibt die i -te Spalte die Entwicklung des Systems an, wenn es sich zur Zeit $t = 0$ im Zustand i befand. $Z_{01}(t)$ ist nun die Wahrscheinlichkeit, dass zur Zeit t Zustand

1 herrscht, wenn zur Zeit $t = 0$ Zustand 0 eingenommen wurde. Für jeden möglichen Startzustand wird also eine Spalte der Lösungsmatrix benötigt. Innerhalb der Spalte stehen dann die Wahrscheinlichkeiten für die anderen Zustände, die sich mit der Zeit t entwickeln.

$$\begin{aligned} \mathbf{S}(t) &= (\mathbf{Z}(t); \mathbf{Z}(t)) \\ &= \begin{pmatrix} a_{00} - a_{01}\exp(\lambda_1 t) & a_{10} - a_{11}\exp(\lambda_1 t) \\ K a_{00} + a_{01}\exp(\lambda_1 t) & K a_{10} + a_{11}\exp(\lambda_1 t) \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (5.25)$$

Die Anfangsbedingungen werden so gewählt, dass zur Zeit $t = 0$ der jeweils betrachtete Zustand die Wahrscheinlichkeit 1 hat. In Matrixform geschrieben erhält man für die Anfangsbedingungen die Einheitsmatrix.

$$\mathbf{S}(0) = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{00} - a_{01} & a_{10} - a_{11} \\ K a_{00} + a_{01} & K a_{10} + a_{11} \end{pmatrix} \quad (5.26)$$

Damit sind die Koeffizienten a_{ij} eindeutig bestimmt.

$$a_{00} = a_{10} = a_{11} = \frac{1}{1 + K} \qquad a_{01} = -\frac{K}{1 + K} \quad (5.27)$$

Die Lösungsmatrix schreibt sich damit:

$$\mathbf{S}(t) = \frac{1}{1 + K} \begin{pmatrix} 1 + K\exp(\lambda_1 t) & 1 - \exp(\lambda_1 t) \\ K - K\exp(\lambda_1 t) & K + \exp(\lambda_1 t) \end{pmatrix} \quad (5.28)$$

Damit ist das Anfangswertproblem aus Gleichung 5.7 gelöst. Jetzt kann der Beitrag zur Korrelationsfunktion gemäß Gleichung 5.6 berechnet werden. Die Helligkeiten Q_i sind in diesem Fall einfach $Q_0 = 0$ im dunklen Zustand und $Q_1 = Q = \text{const.}$ im hellen Zustand. Der Term vereinfacht sich dadurch sehr stark, da alle Terme außer dem Z_{11} -Term durch Multiplikation mit $Q_0 = 0$ verschwinden.

$$\begin{aligned} \chi(t) &= \frac{Q^2 \frac{1}{1+K} (K + \exp(\lambda_1 t))}{Q^2 \frac{K}{1+K}} \\ &= 1 + \frac{1}{K} \exp(-(k_{\text{on}} + k_{\text{off}})t) \\ &= 1 + \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \exp(-(k_{\text{on}} + k_{\text{off}})t) \end{aligned} \quad (5.29)$$

Die Amplitude der Korrelationsfunktion hängt also vom Verhältnis der beiden Übergangsraten ab, die Zeitkonstante von der Summe. Bei einer alternativen Schreibweise definiert man eine Größe $F = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}} + k_{\text{off}}}$. Diese Größe ist der relative Anteil der Farbstoffe, die im zeitlichen Mittel aus sind. Die Größe $\tau_F = \frac{1}{k_{\text{on}} + k_{\text{off}}}$ soll die Isomerisationszeit sein. Die Kurzzeitfunktion lautet dann:

$$\chi(t) = 1 + \frac{F}{1 - F} \exp(-t/\tau_F) \quad (5.30)$$

Durch die Anfangsbedingungen ist die Funktion $\chi(t)$ so normiert, dass sie für sehr kleine Zeiten von Werten größer als 1 auf den Wert 1 für $t \rightarrow \infty$ fallen.

Widengren hat durch eine genaue Analyse des Kurzzeitabfalls in FCS-Funktionen die Zeitkonstante gemessen, mit denen das GFP-Protein blinkt [93], oder die Rate, mit der das Molekülrückgrat beim Farbstoff Cy5 einknicken kann [94].

Triplettabfall

Der Triplettabfall (siehe auch Abbildung 3.4) kommt dadurch zu Stande, dass der angeregte Farbstoff zum Teil nicht unter Aussendung eines Lichtquants innerhalb einiger Nanosekunden in den Grundzustand übergeht, sondern einen strahlungslosen Umweg über einen metastabilen Zustand nimmt, der eine Lebensdauer im Bereich von einer Mikrosekunde hat. Dadurch ist dieser dunkle Zustand in der Korrelationskurve bei sehr kurzen Zeiten bemerkbar.

Insgesamt sind drei Zustände beteiligt. Das zu lösende Differentialgleichungssystem hat folgende Form:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{01} & k_{10} & k_{T0} \\ k_{01} & -(k_{1T} + k_{10}) & 0 \\ 0 & k_{1T} & -k_{T0} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \end{pmatrix} \quad (5.31)$$

Die Lösung erfolgt durch Transformation ins Eigensystem. Dort entkoppeln die Gleichungen. Die Matrix muss also diagonalisiert werden. Die drei Eigenwerte sind:

$$\lambda_0 = 0 \quad (5.32)$$

$$\lambda_1 = -(k_{10} + k_{01}) \quad (5.33)$$

$$\lambda_2 = - \left[k_{T0} + \frac{k_{01}k_{1T}}{k_{01} + k_{10}} \right] \quad (5.34)$$

Da es sich um ein geschlossenes System dreier Zustände handelt und es einen Gleichgewichtszustand für $t \rightarrow \infty$ gibt, muss mindestens ein Eigenwert Null sein. Die Raten k_{01} und k_{10} sind im Vergleich zu den anderen beteiligten Raten sehr groß. Deshalb wird der zweite Eigenwert λ_1 sehr groß sein. Er stellt den sogenannten Antibunching-Term dar. Darin kommt zum Ausdruck, dass ein Farbstoff, der gerade eben ein Photon emittiert hat, nicht unmittelbar danach wieder ein Photon emittieren kann, sondern erst wieder angeregt werden muss. Die charakteristische Zeit (Kehrwert des Eigenwerts) liegt bei wenigen Nanosekunden. Im Vergleich dazu ist der dritte Eigenwert λ_2 sehr klein und ist in erster Näherung mit der Rate verknüpft, die das Erreichen bzw. das Verlassen des Tripletzustands charakterisieren. Der negative Kehrwert wird im weiteren als Tripletzeit $\tau_T = -\frac{1}{\lambda_2}$ bezeichnet. Für viele Farbstoffe in wässriger Lösung liegt diese Zeit im Mikrosekundenbereich und damit im Zeitfenster für FCS-Messungen.

Die Anfangsbedingungen für das Gleichungssystem lauten:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5.35)$$

Berechnet man die Eigenvektoren und daraus mit den Anfangsbedingungen die Funktion $\chi_{\text{Triplet}}(t)$, wird wieder eine Exponentialfunktion zu Tage treten:

$$\chi_{\text{Triplet}}(t) = 1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \quad (5.36)$$

Die Größe T ist dabei gegeben durch:

$$T = \frac{k_{01}k_{1T}}{k_{01}(k_{1T} + k_{T0}) + k_{10}k_{T0}} \quad (5.37)$$

Die Autokorrelationsfunktion aus Gleichung 5.5 schreibt sich also bei Berücksichtigung des Triplettabfalls:

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} G_{\text{Diff}}(t) \left[1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \right] \quad (5.38)$$

Eine ausführliche theoretische und experimentelle Arbeit über den Triplettabfall bei FCS-Messungen stammt von Widengren. Die Triplettparameter von Rhodamin 6G und Fluorescein wurden darin bestimmt [60]. Sowohl die Triplettzeit als auch die Triplettfraktion sind von der Anregungsintensität abhängig.

Isomerisation für mehr als zwei Zustände

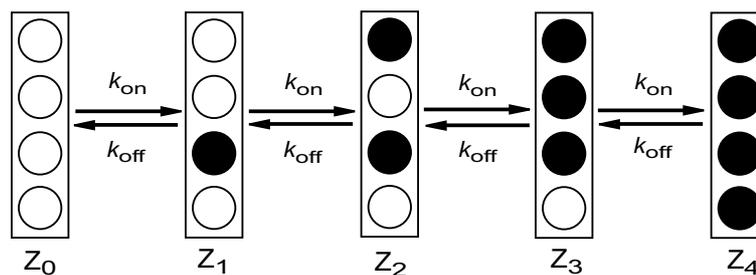


Abbildung 5.2.: Modell für eine Lichterkette mit 4 Lampen. Mathematisch wird dieses Problem als *Finite Birth and Death Process* [95] bezeichnet.

Abbildung 5.2 veranschaulicht das Modell der mehrfachen Isomerisation beispielhaft. Die Kette mit M Fluorophoren kann mit der Rate k_{on} in einen höheren Zustand und mit der Rate k_{off} in den nächstniedrigeren Zustand übergehen. Der Quotient $\frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$ wird mit K

bezeichnet. Damit hat das Gesamtsystem Lichterkette $M + 1$ Zustände. Z_0 ist der Zustand, in dem alle Lichter aus sind, bei Z_M sind alle M Lichter an. Die Reaktionsmatrix des Systems hat folgende Form:

$$\mathbf{T} = \begin{pmatrix} -k_{\text{on}} & k_{\text{off}} & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ k_{\text{on}} & -k_{\text{on}} - k_{\text{off}} & k_{\text{off}} & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & k_{\text{on}} & -k_{\text{on}} - k_{\text{off}} & k_{\text{off}} & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_{\text{on}} & -k_{\text{on}} - k_{\text{off}} & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & -k_{\text{on}} - k_{\text{off}} & k_{\text{off}} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & k_{\text{on}} & -k_{\text{off}} \end{pmatrix} \quad (5.39)$$

Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Zustände $Z_0, Z_1, Z_2, \dots, Z_M$ sind durch folgende Differentialgleichung bestimmt.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} Z_0 \\ Z_1 \\ Z_2 \\ \vdots \\ Z_M \end{pmatrix} = \mathbf{T} \cdot \begin{pmatrix} Z_0 \\ Z_1 \\ Z_2 \\ \vdots \\ Z_M \end{pmatrix} \quad \text{oder} \quad \frac{d}{dt} \mathbf{Z}(t) = \mathbf{T} \cdot \mathbf{Z}(t) \quad (5.40)$$

In einzeiliger Darstellung lautet die Differentialgleichung:

$$\begin{aligned} \dot{Z}_0(t) &= -k_{\text{on}} Z_0(t) + k_{\text{off}} Z_1(t) \\ \dot{Z}_i(t) &= k_{\text{on}} Z_{i-1}(t) - (k_{\text{on}} + k_{\text{off}}) Z_i(t) + k_{\text{off}} Z_{i+1}(t), \quad 1 \leq i \leq M-1 \\ \dot{Z}_M(t) &= k_{\text{on}} Z_{M-1}(t) - k_{\text{off}} Z_M(t) \end{aligned} \quad (5.41)$$

Da es sich um ein geschlossenes System handelt, muss es einen stationären Zustand geben. Dieser ist durch folgende Vorschrift gegeben [92]:

$$Z_i = \left(\frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \right)^i \cdot Z_0 = K^i \cdot Z_0 \quad \text{mit} \quad Z_0 = \left[\sum_{i=0}^M K^i \right]^{-1} \quad (5.42)$$

Um Aussagen über die Dynamik machen zu können, muss die Differentialgleichung gelöst werden. Dazu muss die Matrix \mathbf{T} diagonalisiert werden. Für die Eigenwerte gibt es eine in M parametrisierte Lösung. Ein Eigenwert ist aufgrund des Vorhandenseins einer stationären Lösung immer Null ($\lambda_0 = 0$). Für die übrigen gilt [95]:

$$\lambda_i = k_{\text{on}} + k_{\text{off}} - 2 \sqrt{k_{\text{on}} k_{\text{off}}} \cos \left(\frac{i-1}{M+1} \pi \right), \quad i \in [1, M+1] \quad (5.43)$$

Damit lassen sich dann die Eigenvektoren \mathbf{v}_i berechnen und als Spalten in die Eigenvektormatrix \mathbf{U} schreiben. Damit gilt dann

$$\mathbf{U}^{-1} \cdot \mathbf{T} \cdot \mathbf{U} = \begin{pmatrix} \lambda_0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \lambda_1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \lambda_M \end{pmatrix} \quad (5.44)$$

Die Differentialgleichung 5.40 löst man durch Transformation in das Eigensystem

$$\mathbf{Z}'(t) = \mathbf{U}^{-1} \cdot \mathbf{Z}(t) \quad (5.45)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung im Eigensystem ist wieder:

$$\begin{aligned} Z'_0(t) &= a_0 e^{\lambda_0 t} \\ Z'_1(t) &= a_1 e^{\lambda_1 t} \\ &\vdots \\ Z'_M(t) &= a_M e^{\lambda_M t} \end{aligned} \quad (5.46)$$

Die Koeffizienten a_i werden später aus den Anfangsbedingungen bestimmt. $\mathbf{Z}(t)$ erhält man dann wieder durch Multiplikation mit \mathbf{U}

$$\mathbf{Z}(t) = \mathbf{U} \cdot \mathbf{Z}'(t) \quad (5.47)$$

Damit ist die Differentialgleichung gelöst, das Anfangswertproblem aber noch nicht. Dazu wird wieder die quadratische Matrix \mathbf{S} eingeführt, die als Spalten die Vektoren $\mathbf{Z}(t)$ besitzt. Zu diesem System passend gibt es die $(M + 1)^2$ Anfangsbedingungen, die sich ebenfalls in Matrixform schreiben lassen.

$$S_{ij}(0) = \delta_{ij} \quad (5.48)$$

Damit kann das Anfangswertproblem für ein gegebenes M vollständig gelöst werden und dann $\chi_{\text{Iso}}(t)$ berechnet werden. Die Helligkeit eines Zustandes ist proportional zur Anzahl der Farbstoffe, die gleichzeitig angeregt werden können, also $Q_i = Q \cdot i$. In der Praxis will man üblicherweise die Modellparameter k_{on} und k_{off} an die gemessenen Daten anpassen. In dem Fall bietet sich eine numerische Lösung des Anfangswertproblems an. Die Fitprozedur kann bei größeren M sehr rechenintensiv werden, da innerhalb der Routine für jeden Iterationsschritt das Anfangswertproblem gelöst werden muss. Die Lösung ist aber auf jeden Fall eine lineare Superposition von Exponentialfunktionen mit den Eigenwerten als Zerfallsraten.

$$\chi_{\text{Iso}}(t) = \sum_{i=0}^M b_i \exp(\lambda_i t) \quad (5.49)$$

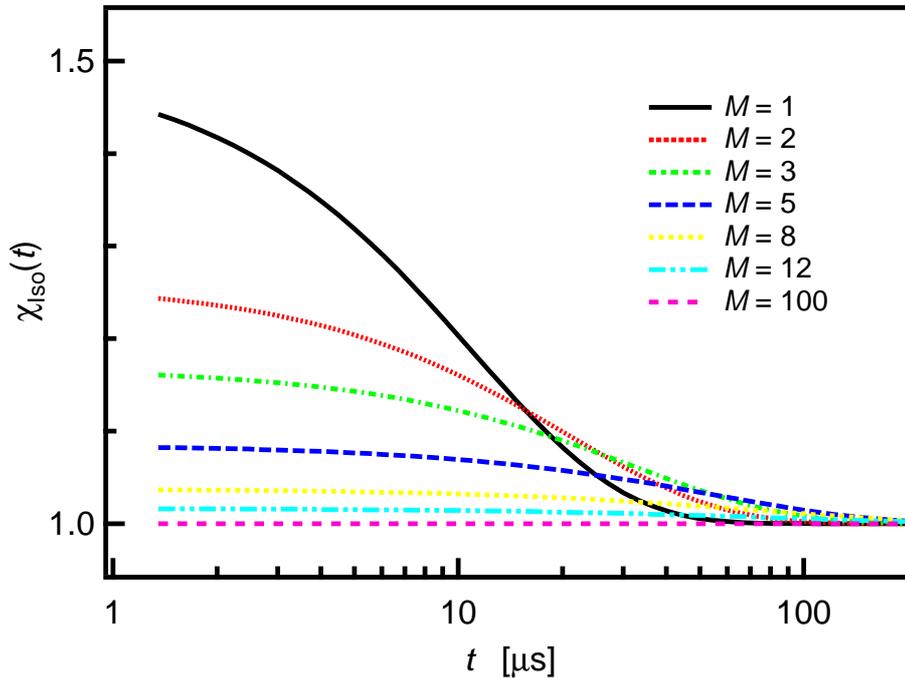


Abbildung 5.3.: Auswirkung der Anzahl der Zustände M auf die normierte Kurzzeitfunktion $\chi_{\text{Iso}}(t)$ bei der mehrfachen Isomerisation. Die übrigen Parameter sind: $k_{\text{on}} = 0,06 \mu\text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 0,03 \mu\text{s}^{-1}$

Sowohl die Koeffizienten b_i als auch die Eigenwerte λ_i hängen bei diesem Modell nur von den Übergangsraten k_{on} und k_{off} ab.

In Abbildung 5.3 sind theoretische Funktionen für $\chi_{\text{Iso}}(t)$ zu sehen. Die Funktionen sind numerische Berechnungen mit dem Programm IDL. Die Raten $k_{\text{on}} = 0,06 \mu\text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 0,03 \mu\text{s}^{-1}$ sind für alle Kurven konstant gehalten. Nur die Anzahl der Farbstoffe wurde variiert. Dass die Funktionen mit der Anzahl der möglichen Zustände immer flacher werden, hat seine Ursache in den Amplituden der Fluktuationen. Bei wenigen Zuständen sind einzelne Fluktuationen relativ zur Gesamtzahl der möglichen Zustände größer. Bei einer Lichterkette mit wenigen Lampen bewirkt der Ausfall einer Lampe mehr, als bei einer Kette mit vielen Lampen. Im Extremfall $M = 1$ erhält man wieder die einfache Isomerisation.

Abbildung 5.4 zeigt auf die Teilchenzahl normierte Korrelationsfunktionen einer verdünnten DNA-Lösung. Als erstes wurde hier mit Gleichung 5.1 die Funktion an die experimentellen Daten angepasst. Die Anpassung lieferte die Amplitude und die Funktion $G(t)$ konnte bestimmt werden. Die DNA-Fragmente haben eine Konturlänge von $L = 812 \text{ bp} = 280 \text{ nm}$ und tragen verschieden viele Farbstoffe entlang der Kette. Der Gyrationradius beträgt etwa $R_g \approx 70 \text{ nm}$, d.h. die Ausdehnung der Kette ist deutlich kleiner als das Beobachtungsvolumen. Kein Beitrag von internen Relaxationsmoden zur

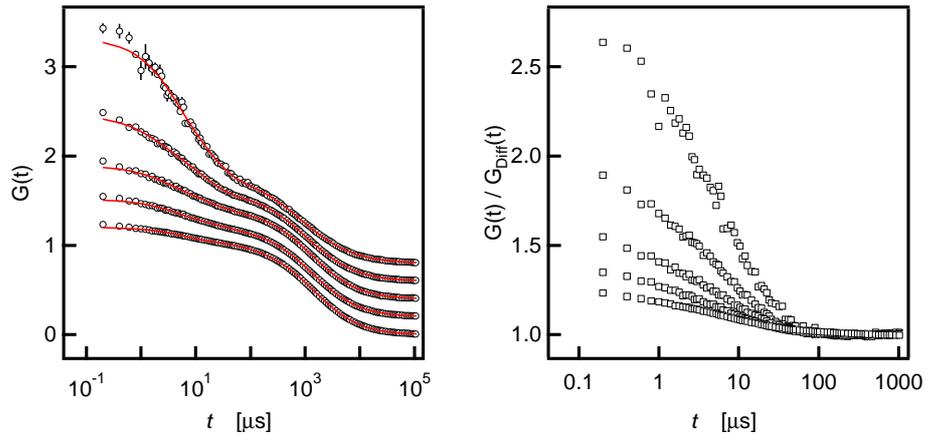


Abbildung 5.4.: Links: Normierte Korrelationsfunktionen eines DNA-Fragments ($L = 812 \text{ bp} = 280 \text{ nm}$) bei verschiedenen Labeldichten. Die Anzahl der Farbstoffe pro Kette beträgt von oben nach unten: $M = 1; 2; 4; 8; 20$. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen. **Rechts:** Kurzzeitdynamik bei verschiedenen Labeldichten. Der diffusive Anteil der Korrelationsfunktion wurde herausdividiert.

diffusiven Dynamik ist zu erwarten. Tatsächlich lässt sich der diffusive Teil mit dem Standardmodell ($\beta = 1$) gut anpassen. Die Diffusionszeit liegt mit $\tau \approx 1500 \mu\text{s}$ im erwarteten Bereich.

Bei kleinen Zeiten im Bereich von $10 - 100 \mu\text{s}$ treten allerdings deutliche Unterschiede in den Funktionen zu Tage. Je mehr Farbstoffe auf der Kette sitzen, desto flacher wird

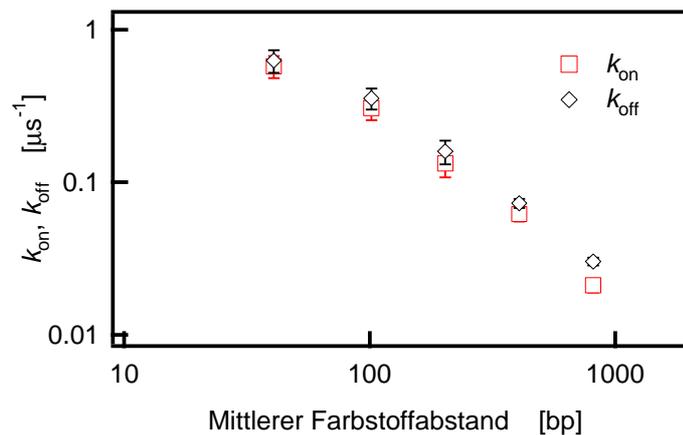


Abbildung 5.5.: On- und Off-Rate der mehrfachen Isomerisation gegen den Labelabstand entlang der Kette. Der Farbstoffabstand ist statistisch verteilt, da die Farbstoffe keine festen Bindungsplätze entlang der Kette haben. Der mittlere Farbstoffabstand ergibt sich aus der Länge des DNA-Fragments geteilt durch die Anzahl M der Farbstoffe pro Kette.

die Korrelationsfunktion. Im rechten Teil der Abbildung wurde die Korrelationsfunktion durch den angepassten diffusiven Anteil dividiert. Übrig bleibt die Kurzzeitdynamik.

Die experimentellen Daten lassen sich mit diesem Modell gut beschreiben, und wie in Abbildung 5.3 vorhergesagt, sinkt die Amplitude dieser Funktion mit der wachsenden Anzahl von Farbstoffen. Je mehr Farbstoffe auf der Kette sind, desto kleiner werden Helligkeitsfluktuationen beim Aus- oder Angehen eines einzelnen Farbstoffes. Abbildung 5.5 zeigt die inverse On-Rate k_{on}^{-1} und Off-Rate k_{off}^{-1} in Abhängigkeit des Farbstoffabstandes entlang der Kette. Die inverse Off-Rate gibt an, nach welcher Zeit ein Farbstoff im Mittel in einen dunklen Zustand übergeht. Erstaunlicherweise skalieren diese Raten mit dem Abstand zwischen den Farbstoffen. In Abschnitt 5.4 wird nochmals darauf eingegangen.

5.2. Der Particle-Size-Effekt

Die bisherigen Betrachtungen beruhen ausgehend von Gleichung 3.3 auf der Annahme, dass die diffundierenden Objekte eine punktförmige Farbstoffverteilung besitzen. Bei Kugeln oder Polymerknäueln mit mehreren Farbstoffen ist diese Annahme nicht mehr gerechtfertigt, sobald die Ausdehnung der Farbstoffe in die Größenordnung des Beobachtungsvolumens reicht. Anstatt eine konstante Helligkeit b anzunehmen, bezieht man einen Formfaktor $F(\mathbf{r})$ mit ein, der die Verteilung des Farbstoffes beschreibt. Gleichung 3.8 wird dementsprechend um den Formfaktor im reziproken Raum $F(\mathbf{q})$ erweitert.

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{\rho V_{\text{eff}}} \frac{\int \Phi(\mathbf{q}) F(\mathbf{q}) C(\mathbf{q}, t) d^3 \mathbf{q}}{\int \Phi(\mathbf{q}) F(\mathbf{q}) d^3 \mathbf{q}} \quad (5.50)$$

Dies kann sich sowohl auf die Form der Kurve, als auch auf die charakteristische Diffusionszeit auswirken.

Abbildung 5.6 zeigt als Beispiel zwei verschiedene Formfaktoren. Zum einen den einer Kugel, bei dem die Einhüllende für große \mathbf{q} mit der vierten Potenz abfällt.

$$F_{\text{Kugel}}(q) = 9 \frac{(\sin v - v \cos v)^2}{v^6} \quad (5.51)$$

mit

$$v = Rq \quad (5.52)$$

R ist der Radius der Kugel. Zum zweiten den eines idealen Polymerknäuels. Dieser Formfaktor ist nach Debye benannt und hat folgende Form:

$$F_{\text{Debye}}(q) = 2 \frac{e^{-\nu} + \nu - 1}{\nu^2} \quad (5.53)$$

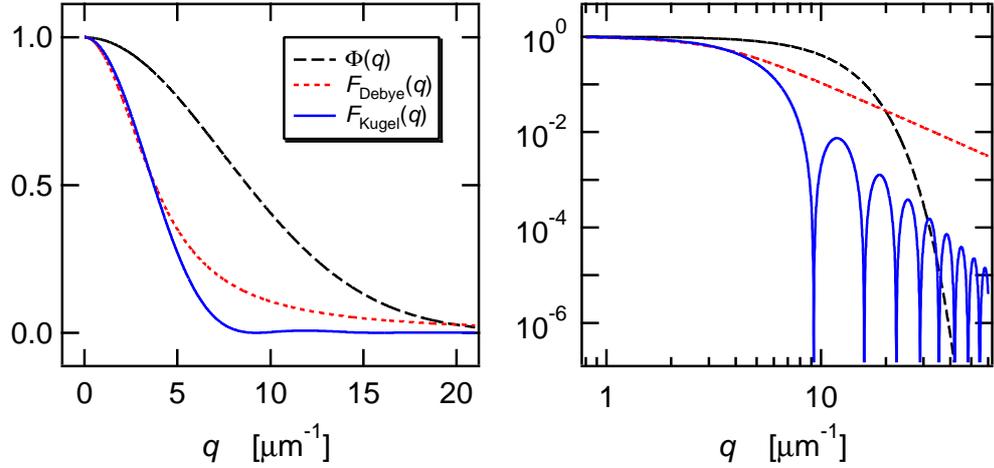


Abbildung 5.6.: Formfaktoren für eine Kugel (Linie) und für ein ideales Polymerknäuel laut Debye (gepunktet) in linearer und doppeltlogarithmischer Darstellung. Der hydrodynamische Radius beträgt jeweils 500 nm. Die gestrichelte Linie ist die Filterfunktion $\Phi(q)$ mit der die Formfaktoren gefaltet werden, in diesem Fall für den Fokusradius $r_0 = 190$ nm.

mit

$$\nu = R_g^2 q^2 \quad (5.54)$$

R_g ist dabei der Gyrationradius. Charakteristisch für den Debye-Formfaktor ist der sehr langsame Abfall bei großen q -Werten. In der Abbildung ist ebenfalls die normierte Filterfunktion aus Gleichung 3.9 aufgetragen. Bei ausgedehnten Fluorophorverteilungen auf den beobachteten Teilchen fällt der Formfaktor wie in der Abbildung gezeigt früher als die Filterfunktion ab und wird daher die Korrelationsfunktion als Integral über das Produkt der beiden Größen entscheidend verändern. Sowohl für Kugeln als auch für Polymerknäuel lässt sich Gleichung 5.50 nur noch numerisch lösen. In beiden Fällen bewirken die Verteilungen eine Vergrößerung der Diffusionszeit (siehe Abbildung 5.7 links).

Wie Abbildung 5.7 rechts zeigt, wächst dieser Effekt mit der Größe der Teilchen. Im Grenzfall kleiner Objekte ist er vernachlässigbar. Sobald aber die Größe der Teilchen in den Bereich des Beobachtungsvolumens kommt, so spielt die Verteilung der Farbstoffe eine wichtige Rolle. Die in der Abbildung gezeigten Näherungswerte von Starchev et al. [80] können folgendermaßen berechnet werden:

$$\tau = \frac{r_0^2 + R^2}{4D} \quad (5.55)$$

R ist wieder der Radius des markierten Objektes, r_0 ist der Radius des Laserfokus und D die Diffusionskonstante der Teilchen. Die Diffusionskonstante ist im Falle von Kugeln

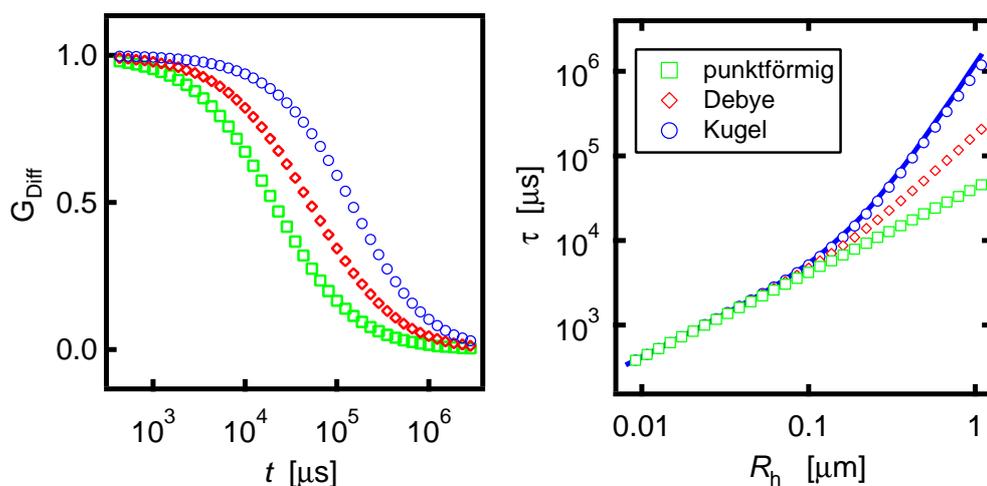


Abbildung 5.7.: **Links:** Normalisierte Autokorrelationsfunktionen für Teilchen mit verschiedenen Formfaktoren. Alle drei Kurven sind numerisch berechnete Kurven für ein Teilchen mit hydrodynamischem Radius von $R_h = 500$ nm, also einem Diffusionskoeffizienten von $D = 0,43 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, und einem Fokusradius von $r_0 = 190$ nm. Der Unterschied besteht in der Verteilung der Farbstoffe auf dem Teilchen. Die Quadrate sind für den punktförmigen Fall, die Rauten für den Debye-fall und die Kreise für die gleichmäßige Verteilung auf einer Kugeloberfläche. **Rechts:** Charakteristische Diffusionszeit aus numerisch berechneten Korrelationsfunktionen für die verschiedenen Farbstoffverteilungen bei verschiedenen Größen. Die durchgezogene Linie repräsentiert Gleichung 5.55. Es handelt sich um eine Näherungsformel für Kugeln, die von Starchev et al. stammt [80].

über die Stokes-Formel mit dem Radius verknüpft

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (5.56)$$

wobei η die Viskosität der Umgebung ist und $k_B T$ für die thermische Energie steht. Ein einfaches Argument für Gleichung 5.55 ist, dass sich durch die endliche Größe des Teilchens das effektive Beobachtungsvolumen vergrößert. Die Zeit τ als Maß für die Durchquerungszeit des Teilchens wird um so größer, je größer die Farbstoffverteilung auf dem Partikel ist. Die Diffusionszeiten, die hier über die Betrachtung des reziproken Formfaktors von Kugeln numerisch berechnet wurden, stimmen sehr gut mit den aus Simulationen gewonnenen Ergebnissen von Starchev überein. Vergleichsdaten für die Berechnungen mit dem Polymer-Formfaktor konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Sie sollen hier experimentell bestätigt werden.

Abbildung 5.8 zeigt experimentelle Kurven im Vergleich zu numerischen Kurven. Drei verschieden lange DNA-Fragmente wurden mit dem Farbstoff YOYO-1 markiert. Die Farbstoffkonzentration war bei allen Fragmenten so groß, dass jede Kette mindestens

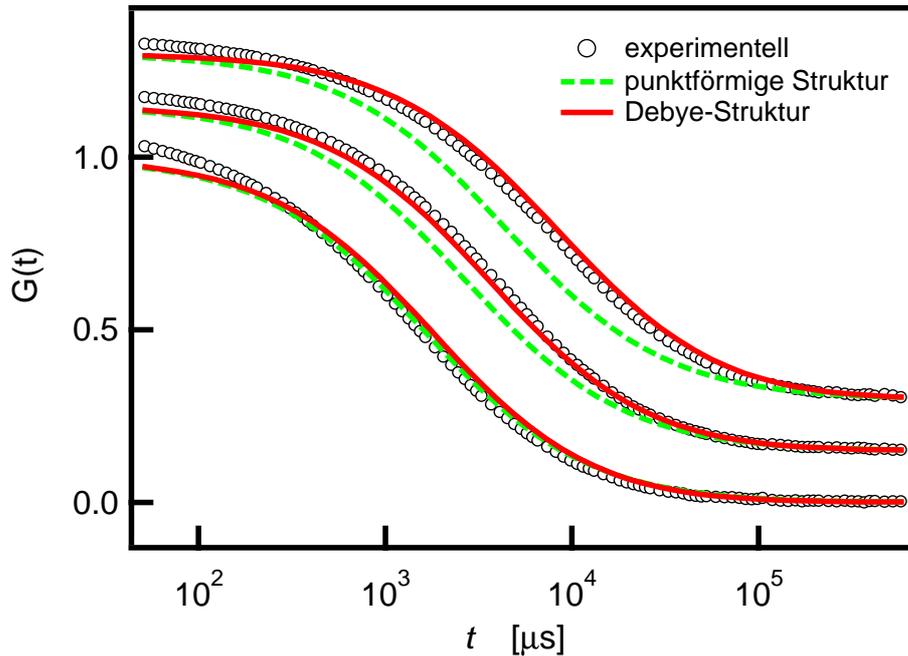


Abbildung 5.8.: Normierte Korrelationskurven für DNA verschiedener Länge. Von links nach rechts: $L = 1019$ bp; $L = 2686$ bp; $L = 7250$ bp. Die DNA war markiert mit dem Farbstoff YOYO-1. Die Abstände der Farbstoffe entlang der Kontur waren 20 bp; 50 bp bzw. 100 bp. Die mittlere Anzahl der Farbstoffe pro Kette war damit $M = 51$; $M = 54$ bzw. $M = 73$. Die gestrichelten Linien sind die erwarteten Kurven für Polymere der jeweiligen Länge mit punktförmiger Farbstoffverteilung. Die durchgezogenen Linien sind erwartete Korrelationskurven für eine kontinuierliche Verteilung des Farbstoffs entlang der Kette.

50 Farbstoffe trug. Näherungsweise kann dies als kontinuierliche Farbstoffverteilung betrachtet werden. Aus der Länge der DNA-Fragmente kann der Formfaktor der Ketten, der Gyrationradius und damit die Diffusionskonstante der Polymere bestimmt werden. Die Gyrationradien betragen:

$$R_g(L = 1019 \text{ bp}) = \sqrt{\frac{L \cdot l_p}{3}} \approx 75 \text{ nm}$$

$$R_g(L = 2686 \text{ bp}) \approx 122 \text{ nm}$$

$$R_g(L = 7250 \text{ bp}) \approx 200 \text{ nm}$$

Die jeweils zwei theoretischen Kurven beschreiben die Diffusion des jeweiligen DNA-Fragmentes. Die Kurven für dieselbe DNA-Länge unterscheiden sich lediglich in der Farbstoffverteilung entlang der Ketten. Die Standard-Korrelationsfunktion geht von einer punktförmigen Farbstoffverteilung im Schwerpunkt des Polymers aus. Berücksichtigt man, wie in Gleichung 5.50 geschehen, den Debye-Formfaktor des Polymers, so erhält

man theoretische Kurven, die sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Diese Untersuchung zeigt, wie wichtig die Kenntnis der Farbstoffverteilung auf dem diffundierenden Objekt ist. Würden die experimentellen Kurven in Abbildung 5.8 mit dem Standardmodell angepasst werden, so wären zumindest bei den großen Fragmenten die erhaltenen Diffusionskonstanten viel zu klein.

5.3. Ketten mit interner Dynamik

Der im letzten Abschnitt vorgestellte *Particle-Size-Effekt* berücksichtigt nur die statische Farbstoffverteilung. Interne Relaxationen sind in dieser Theorie nicht berücksichtigt. Diese sind Thema dieses Abschnitts.

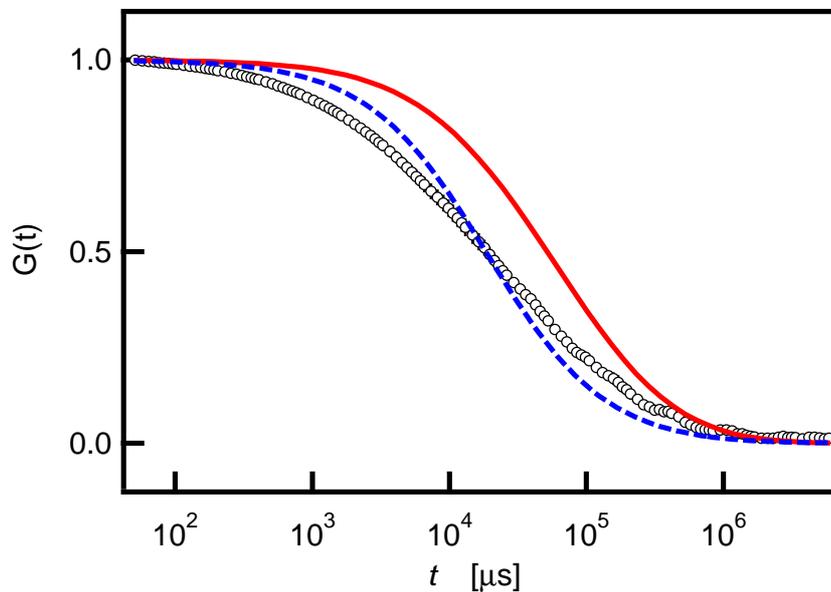


Abbildung 5.9.: Normierte Autokorrelationsfunktion von verdünnter λ -DNA markiert mit YOYO-1. Im Mittel ist hier jedes 500ste Basenpaar markiert. Die durchgezogene Linie gibt die erwartete Kurve für ein starres Polymerknäuel entsprechender Länge mit kontinuierlicher Farbstoffverteilung wieder, die gestrichelte Linie ist eine Anpassung mit dem Standard-Diffusionsmodell.

Abbildung 5.9 zeigt die Autokorrelationskurve von λ -DNA ($L = 48502 \text{ bp} \approx 16 \mu\text{m}$) markiert mit dem Farbstoff YOYO-1. Im Vergleich dazu ist gezeigt die Anpassung mit dem Standard-Diffusionsmodell für Brown'sche Bewegung. Die Anpassung zeigt eine deutliche Abweichung, vor allem kann sie die Steigung der experimentellen Daten nicht erklären. Die resultierende Diffusionskonstante liegt bei $D = 1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Dies ist deutlich größer als experimentell bestimmte Werte aus Lichtstreuungsmessungen ($D_{\text{DLS}} = 0,41 \pm 0,05 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) oder Fluoreszenzmikroskopie ($D_{\text{FM}} = 0,47 \pm 0,03 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) [19].

Ebenfalls gezeigt ist die theoretisch erwartete Kurve für eine starre Gauß'sche Kette mit einem Gyrationradius von $R_g \approx 500$ nm. Die experimentellen Daten weichen deutlich von beiden Modellen ab. Diese Abbildung zeigt, dass FCS-Messungen an Biomolekülen, deren Größe die Ausdehnung des Beobachtungsvolumens ($r_0 \approx 200$ nm) überschreitet, eine explizite Berücksichtigung interner dynamischer Prozesse erfordern.

Der dynamische Strukturfaktor $S(\mathbf{q}, t)$ wird nicht wie der eines freien Teilchens aussehen, da ein Monomer in einer Polymerkette auf Grund der Bindungen nicht frei diffundieren kann. Die internen Relaxationen werden Auswirkungen auf die Korrelationsfunktionen haben. In Abschnitt 2.2 wurden die gängigen Polymermodelle vorgestellt. Die gewonnenen Näherungen für die dynamischen Strukturfaktoren (siehe Tabelle 2.2) sollen hier in die theoretischen Modelle für FCS-Funktionen eingearbeitet werden. Der Exponent der Strukturfaktoren setzt sich in allen drei Modellen aus einem \mathbf{q} -abhängigen und einem zeitabhängigen Teil zusammen. Mit Hilfe eines neu definierten variablen Exponenten β und einer Größe γ lassen sich alle drei Modelle in einer Formel darstellen.

$$S_{\text{FCS}}(q, t) = \exp\left(-q^2(\gamma t)^\beta\right) \quad (5.57)$$

Während es in der \mathbf{q} -Abhängigkeit keinen Unterschied gibt, treten in der Zeitabhängigkeit erhebliche Unterschiede auf. Wie die beiden Größen β und γ je nach Modell aussehen, zeigt Tabelle 5.1. Die Tatsache, dass wie im Falle der Diffusion eines punktförmigen Teilchens im Exponenten ein q^2 steht, ermöglicht die analytische Integration wie in Abschnitt 3.2. In erster Näherung wird der dynamische Strukturfaktor um den Faktor, der die interne Dynamik enthält, erweitert. Die Schwerpunktdiffusion bleibt weiterhin erhalten.

$$S(q, t) = \exp\left(-q^2 Dt\right) \cdot \exp\left(-q^2(\gamma t)^\beta\right) \quad (5.58)$$

Damit wird die diffusive Korrelationsfunktion zu

$$G_{\text{Diff}}(t) = \frac{1}{1+X} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} X}} \quad (5.59)$$

mit

$$X = \frac{t}{\tau_D} + \left(\frac{t}{\tau_C}\right)^\beta \quad (5.60)$$

Dabei ist wie im einfachsten Fall $\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$ und zusätzlich $\tau_C = \left(\frac{r_0^2}{4}\right)^{1/\beta} \frac{1}{\gamma}$. Für große Moleküle ist die Schwerpunktdiffusion gegenüber den internen Relaxationen viel zu langsam und deshalb in erster Ordnung vernachlässigbar. Dann sieht die Korrelationsfunktion folgendermaßen aus:

$$G_{\text{Diff}}(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta}} \quad (5.61)$$

mit $\tau \approx \tau_C = \left(\frac{r_0^2}{4}\right)^{1/\beta} \frac{1}{\gamma}$.

	Rouse	Zimm	semiflexibel
β	$\frac{1}{2}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{3}{4}$
γ	$\frac{k_B T a^2}{3\pi\zeta}$	$\frac{1,35^{3/2} k_B T}{6\pi\eta}$	$\frac{0,342 k_B T \ln \frac{\Delta L}{d}}{\sqrt{3}\pi^{3/2} l_p^{1/3} \eta}$
τ_C	$\left(\frac{r_0^2}{4}\right)^2 \frac{3\pi\zeta}{kTb^2}$	$\left(\frac{r_0^2}{4 \cdot 1,35}\right)^{3/2} \frac{6\pi\eta}{kT}$	$\left(\frac{r_0^2}{4 \cdot 0,448}\right)^{4/3} \frac{\sqrt{3}\pi^{3/2} l_p^{1/3} \eta}{k_B T \ln \frac{\Delta L}{d}}$

Tabelle 5.1.: FCS-Parameter für die verschiedenen Näherungsmodelle von Polymeren in Lösung

Die Größe τ_C ist in Tabelle 5.1 ebenfalls für die verschiedenen Modelle aufgeführt. Die Separation von Schwerpunktdiffusion und interner Relaxation ist eine grobe Näherung für große Streuvektoren und große Zeiten. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie aber ist eine Methode, die gerade bei kleinen q sehr empfindlich ist. Die hier vorgestellten Werte können daher nur als Orientierung dienen. Eine exakte Beschreibung der Autokorrelationsfunktion ist in geschlossener Form nicht möglich. Das Näherungsmodell, das schon in Gleichung 5.2 vorgestellt wurde und für die Anpassung der Daten in den beiden folgenden Abschnitten und Abschnitt 5.7 benutzt wurde, schreibt sich:

$$G(t) = G_{\text{Triplet}}[T, \tau_T](t) \cdot \chi_{\text{Iso}}[M, k_{\text{on}}, k_{\text{off}}](t) \cdot G_{\text{Diff}}[\tau, \beta](t) \quad (5.62)$$

5.4. DNA-Lösungen

In diesem Abschnitt werden Messungen an λ -DNA ($L = 48502 \text{ bp} \approx 16 \mu\text{m}$) präsentiert. Die Ergebnisse dieses Abschnitts wurden veröffentlicht in [1].

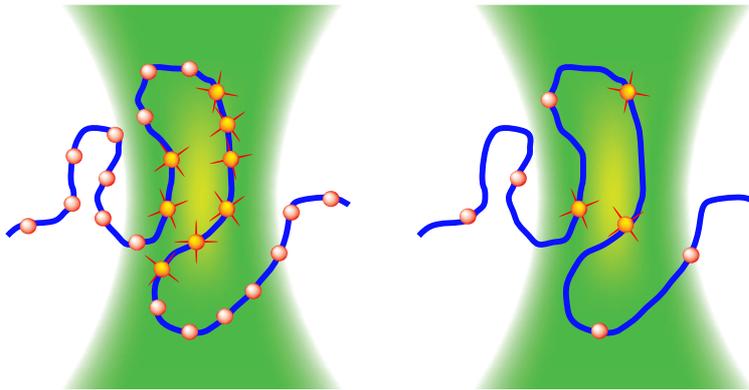


Abbildung 5.10.: Anschauliche Darstellung von DNA mit hoher (links) und niedriger (rechts) Labeldichte im FCS-Fokus.

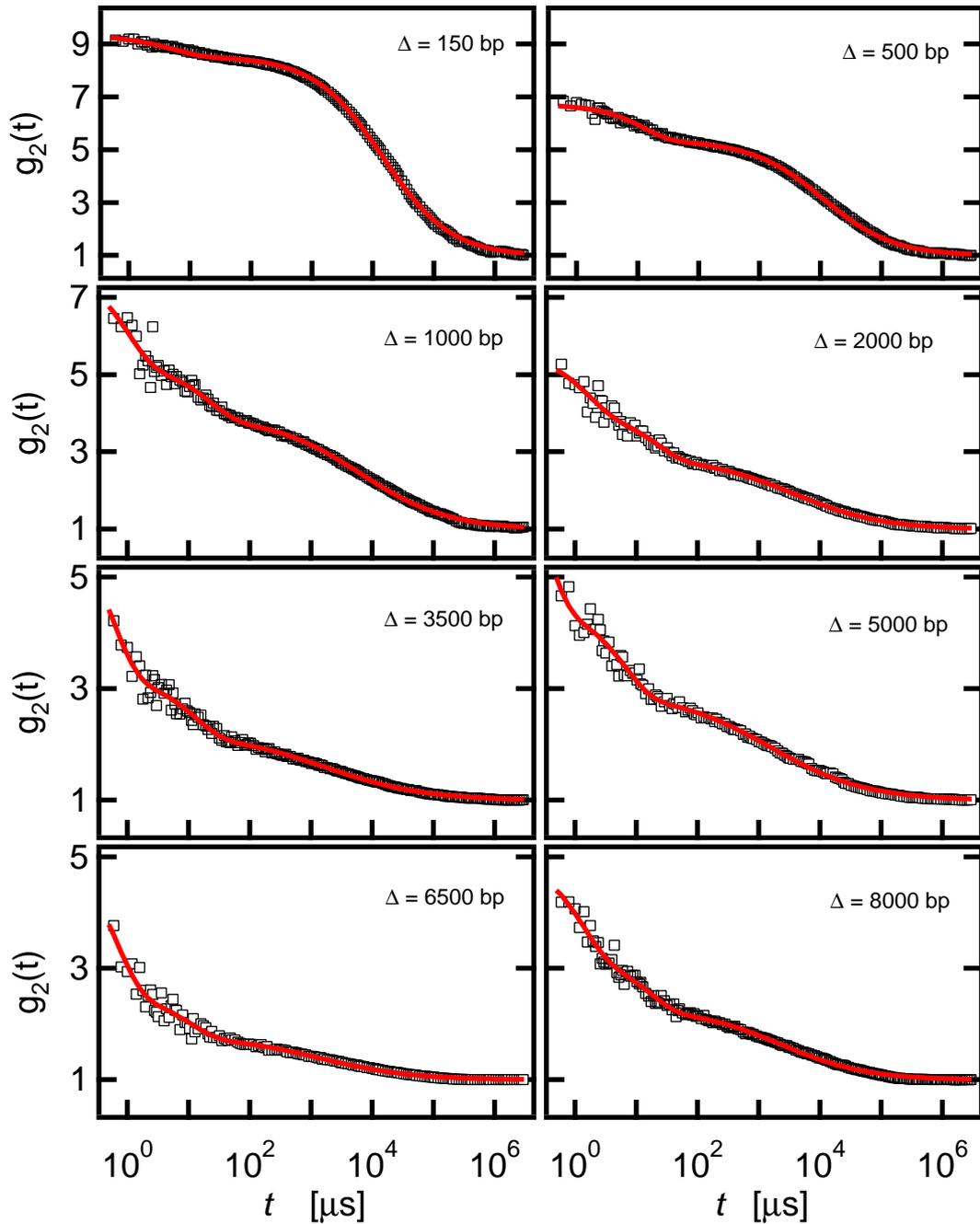


Abbildung 5.11.: Autokorrelationsfunktionen von λ -DNA ($L = 48502 \text{ bp} \approx 16 \mu\text{m}$) für verschiedene Labeldichten. Der mittlere Abstand Δ der Farbstoffe (TOTO-1) entlang der Kontur ist jeweils rechts oben angegeben. Die DNA-Konzentration betrug in allen Messungen $c_{\text{DNA}} = 0,3 \text{ nM}$. Die Lösung war ein TE-Puffer mit 100 mM NaCl . Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen gemäß Gleichung 5.2.

Der Abstand der Farbstoffe entlang der Kette spielt auch für die diffusive Dynamik eine Rolle, wenn die Ausdehnung des Polymers größer als das Beobachtungsvolumen ist. Abbildung 5.10 soll dies anschaulich vermitteln. Bei kleinen Abständen der Farbstoffe sind nicht nur gleichzeitig mehr Farbstoffe im Beobachtungsvolumen, sondern die Diffusion der einzelnen markierten Segmente wird von der Steifigkeit der Ketten beeinflusst werden. Diese sollte bei großen Farbstoffabständen dagegen keine Rolle mehr spielen.

In Abbildung 5.11 sind Korrelationsfunktionen aus Messungen an λ -DNA bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen gezeigt. Angepasst an die Daten wurde die Funktion aus Gleichung 5.2. Mögliche Abweichungen vom normalen Diffusionsverhalten werden mit dem Parameter β in der Funktion $G_{\text{Diff}}(t)$ berücksichtigt. Mit dieser Funktion kann den internen Relaxationsmoden näherungsweise Rechnung getragen werden. Noch einmal soll betont werden, dass in dem angepassten Modell zwar sieben freie Parameter stecken, dass diese aber den Abfall der Kurve über sechs Größenordnungen beschreiben können und auch ihre physikalische Bedeutung haben. Deutlich zu sehen ist eine systematische Veränderung der Funktionen mit der Abnahme der Labeldichte. Der Tripletabfall bei sehr kleinen Zeiten wurde bei der Anpassung berücksichtigt, soll aber hier nicht weiter diskutiert werden. Der Abfall, der die On-Off-Kinetik der Farbstoffe im Bereich von $10 - 100 \mu\text{s}$ beschreibt, wird wie theoretisch erwartet bei wenigen Farbstoffen ausgeprägter. Der Parameter M , der angibt, wieviele Farbstoffe auf der Kette sitzen, wurde bei der Anpassung festgehalten. Da λ -DNA etwa dreimal so groß ist wie das Beobachtungsvolumen, wurde angenommen, dass nur etwa ein Drittel der auf der ganzen Kette sitzenden Farbstoffe sich gleichzeitig im Fokus befinden. Für die Kurve mit einem Labelabstand von 150 bp bedeutet dies zum Beispiel, dass die Anzahl der Farbstoffe pro Kette etwa 300 betrug. Der Parameter M wurde bei der Anpassung auf $M = 300/3 = 100$ fixiert. Bei der Kurve mit einem Labelabstand von 8000 bp ergibt sich $M = 2$. Bei den anderen Kurven wurde der Parameter entsprechend berechnet und festgehalten.

Auch beim diffusiven Abfall zeigt sich erstens, dass die stark markierten Ketten eine größere Diffusionszeit besitzen als die Ketten mit nur wenigen Farbstoffen. Ebenso nimmt die Steigung der Kurven ab. Insbesondere bei sehr niedrigen Labeldichten bewegt man sich mit Messungen dieser Art sehr nahe am Intensitätshintergrund. Jede gezeigte Kurve ist das Ergebnis von zehn Messungen mit einer Gesamtmessdauer von 40 Minuten.

Abbildung 5.12 zeigt die Ergebnisse der Anpassung des diffusiven Anteils. Beide Parameter hängen stark vom Abstand der Farbstoffe entlang der Kette ab. Die Diffusionszeit sinkt mit der Zunahme des Farbstoffabstandes von 17 ms auf etwa 2 ms. Dieser Grenzwert liegt nahe beim erwarteten Wert für die Zimm-Dynamik. Ebenso sinkt der Exponent β vom Wert 0,75 auf etwa 0,55. Die Erklärung dafür liegt in der Längenskala der betrachteten internen Relaxationen. Bei großen Farbstoffabständen spielt die Persistenz der Kette kaum mehr eine Rolle. Der diffusive Abfall der FCS-Kurven spiegelt dann nahezu die Monomerdynamik innerhalb der Kette wieder. Sobald der Abstand der

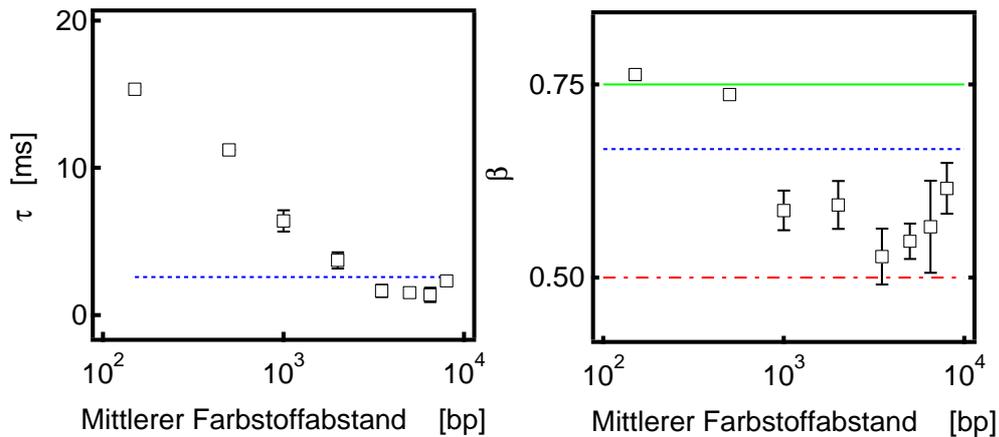


Abbildung 5.12.: Diffusionszeit und Exponent bei Messungen an λ -DNA in Abhängigkeit der Labeldichte entlang der Kette. Die durchgezogene Linie gibt die Vorhersage für das genäherte semiflexible Modell an, die gepunkteten Linien geben die erwarteten Werte für die Zimm-Dynamik wieder und die gepunktet-gestrichelte Linie liegt beim Wert für Rouse-Dynamik.

Farbstoffe mehrere Persistenzlängen beträgt, ist dies der Fall. Beim Exponenten ist eine klare Zuordnung zu Zimm oder Rouse-Dynamik nicht zu machen. Bei sehr kurzen Farbstoffabständen im Bereich der Persistenzlänge ($l_p = 150$ bp) dagegen erhält man erstens eine weitaus größere Diffusionszeit und einen Exponenten, der sehr nahe am theoretischen Wert von $3/4$ liegt. Der Schluss, dass hier mit FCS die Biegemoden der Polymere aufgelöst werden können, liegt nahe, ist aber nicht ganz vollständig. Es handelt sich um eine Überlagerung von internen Relaxationen und Schwerpunktsdiffusion. In Abschnitt 5.6 werden die Daten mit dem exakten Modell für semiflexible Ketten verglichen.

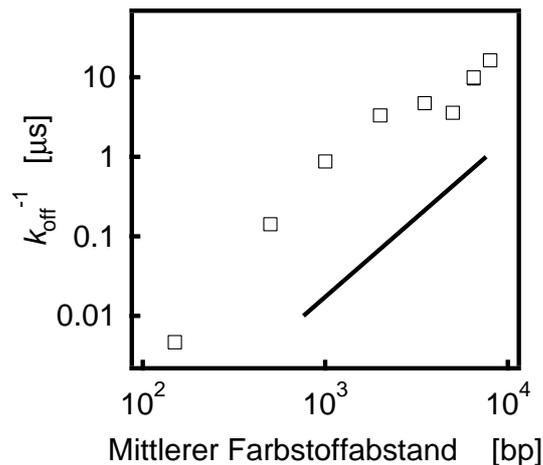


Abbildung 5.13.: Inverse Off-Rate gegen den Labelabstand entlang der Kette. Die durchgezogene Linie hat eine Steigung von 2.

Abbildung 5.13 zeigt den Kehrwert des Parameters k_{off} gegen den Abstand der Farbstoffe. Der Graph zeigt wie schon die Ergebnisse in Abbildung 5.5 eine deutliche Abhängigkeit der Off-Rate vom Abstand Δ der Farbstoffe entlang der Kette. Die nicht gezeigte On-Rate zeigt dasselbe Verhalten. Eine mögliche Ursache sind Torsionsmoden, die entlang der Kettenkontur laufen. Die Torsion könnte den interkalierenden Farbstoff für kurze Zeit in einen dunklen Zustand versetzen, was zu den Fluktuationen führen würde. Das Skalenverhalten, das die Off-Rate zeigt, könnte dann als Effekt einer linearen Torsionsdiffusion entlang der Kontur gedeutet werden. Mit dem Zusammenhang

$$\Delta^2 = \frac{1}{2} D_{\text{lin}} k_{\text{off}}^{-1} \quad (5.63)$$

ergibt sich $D_{\text{lin}} \simeq (4, 2 \pm 0, 3) \mu\text{m}^2 \mu\text{s}^{-1}$. Dennoch bleibt diese Interpretation vage, da zwar die Dynamik aber nicht der mikroskopische Ursprung dieser On-Off-Kinetik mit der Methode aufgeklärt werden kann. Möglicherweise können auch andere Modelle die gefundene Abhängigkeit erklären.

5.5. Aktinlösungen

Aktinfilamente sind im Gegensatz zu DNA-Molekülen viel steifer. Die Persistenzlänge beträgt $l_p \approx 16 \mu\text{m}$ und ist um einen Faktor 320 größer als die von DNA. Die interne Dynamik sollte daher bei diesen Molekülen stärker durch die Biegemoden bestimmt sein.

Bei den ersten Versuchen mit Aktinfilamenten (F-Aktin) wurde versucht, die Filamente mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zu markieren. Phalloidin ist ein Protein, das sich an die Filamente anlagert und diese stabilisiert. Es wird aus dem Gift des gelben Knollenblätterpilzes gewonnen. (Zur Präparation von Aktin siehe auch Anhang C.2.) Diese Methode ist in der Fluoreszenzmikroskopie üblich. Bei FCS-Messungen können aber schon wenige ungebundene, frei diffundierende Teilchen das Messsignal derart beeinflussen, dass nur noch die Diffusion des fluoreszenzmarkierten, ungebundenen Phalloidins gemessen wird. Die Verwendung von Aktin, an das kovalent ein Farbstoff gebunden ist, war daher notwendig.

Abbildung 5.14 zeigt eine Messung an G-Aktin, das mit dem Farbstoff Rhodamin 6G markiert ist. Die Proben stammen aus der Gruppe um Michael Bärmann (Physik-Department E22, Technische Universität München). Die Korrelationsfunktionen zeigen das erwartete normale Diffusionsverhalten von G-Aktin. Der aus den Daten bestimmte hydrodynamische Radius beträgt $R_h = 3, 4 \pm 0, 1 \text{ nm}$. Berücksichtigt man, dass das Protein auf Grund seiner Ladung eine Gegenionenwolke besitzt und zusätzlich einen Farbstoff mit sich trägt, so liegt dieser Wert durchaus im erwarteten Bereich für G-Aktin ($3, 3 \text{ nm} * 5, 6 \text{ nm} * 5, 0 \text{ nm}$).

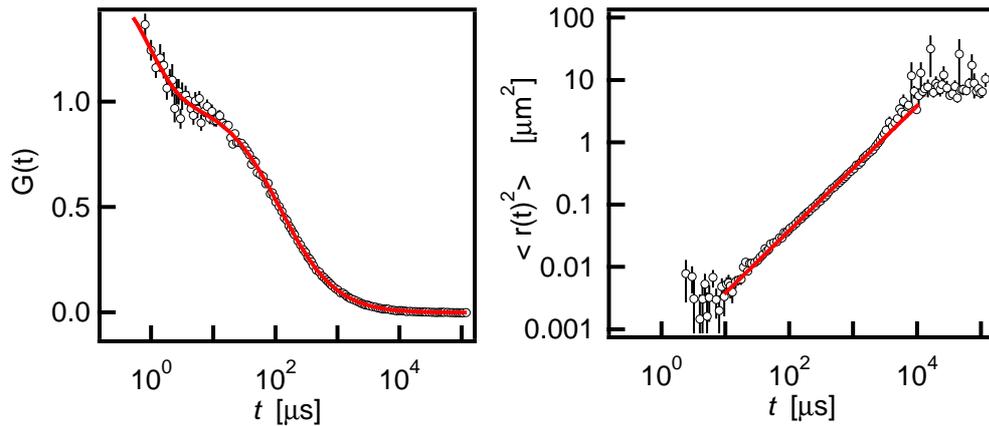


Abbildung 5.14.: Links: Normierte Korrelationsfunktion von Rhodamingelabeltem G-Aktin. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen an die Daten mit dem Diffusionsmodell gemäß Gleichung 5.4. Die resultierenden Parameter sind: $\tau = 119 \pm 4 \mu\text{s}$; $\beta = 0,98 \pm 0,02$. Rechts: Mittleres Verschiebungsquadrat berechnet aus der normierten Korrelationsfunktion. Die durchgezogene Linie ist ein Anpassung gemäß $\langle r(t)^2 \rangle = 6Dt$. Die resultierende Diffusionskonstante ist: $D = 63,7 \pm 0,3 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Mit diesen Aktinproben wurden die anschließenden Messungen durchgeführt. Dabei wurde unmarkiertes und markiertes Aktin im Verhältnis 9 : 1 gemischt. Das Aktin wurde polymerisiert wie in Anhang C.1 beschrieben. Durch Variation der Gelsolinkonzentration wurden verschiedene mittlere Filamentlängen $\langle L \rangle$ eingestellt. Der mittlere Abstand der Farbstoffe entlang des Filaments betrug 28 nm, da jedes zehnte Monomer markiert war.

Abbildung 5.15 zeigt die normierten Korrelationsfunktionen für Aktinfilamente unterschiedlicher Länge. An die Daten angepasst wurde das Modell aus Gleichung 5.2, das auch schon bei der Anpassung der DNA-Daten verwendet wurde. Der Parameter M , der die Anzahl der Farbstoffe angibt, die pro Kette gleichzeitig im Beobachtungsvolumen sein können, wurde bei der Anpassung festgehalten. Für das 100 nm-Filament wurde $M = 4$, für das 200 nm-Filament $M = 7$ und für die übrigen Längen $M = 15$ gesetzt. Diese Werte ergeben sich dadurch, dass die beiden kürzesten Filamente mit ihrer vollen Länge in das Beobachtungsvolumen ($r_0 \approx 200 \text{ nm}$) passen und im Mittel $M = 4$ bzw. $M = 7$ Farbstoffe tragen. In den Durchmesser des Beobachtungsvolumens passt der Farbstoffabstand von 28 nm etwa 15 Mal, was den Wert für die längeren Filamente erklärt. Die Triplett- und Isomerisationsparameter der On-Off-Kinetik aus den Anpassungen stellten sich als unabhängig von der Länge heraus.

Die Parameter des diffusiven Anteils sind in Abbildung 5.16 dargestellt. Die Diffusionszeit der kürzesten Filamente mit 100 nm und 200 nm Länge spiegeln die Schwerpunktsdiffusion der näherungsweise stabförmigen Moleküle wieder. Bei Filamenten, deren Länge den Durchmesser des Beobachtungsvolumens ($2r_0 \approx 400 \text{ nm}$) überschreiten, ändert sich

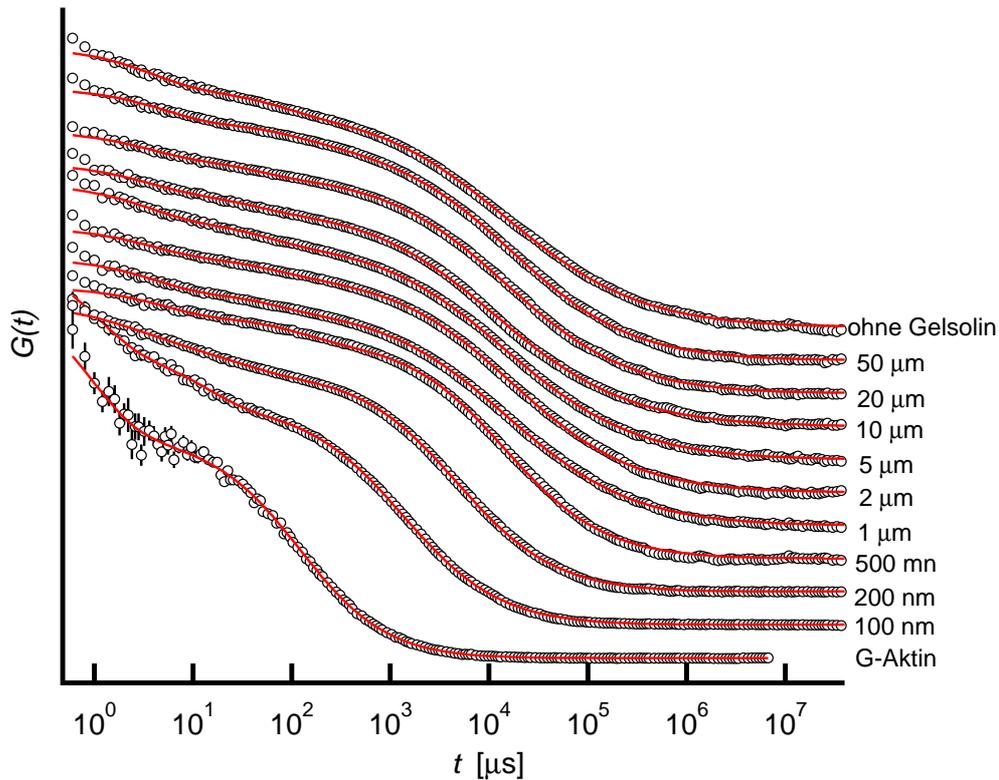


Abbildung 5.15.: Normierte Korrelationsfunktionen von Rhodamingelabeltem Aktin für verschiedene mittlere Filamentlängen. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen an die Daten gemäß Gleichung 5.2. Die Kurven sind zur besseren Darstellung auf der Ordinaten verschoben.

die gemessene Diffusionszeit nicht mehr. Die Erklärung dafür sind die internen Biegemoden der Polymere. Die Schwerpunktdiffusion, die mit wachsender Länge immer langsamer wird, spielt offensichtlich keine Rolle mehr. Ebenso zeigt der Parameter β einen systematischen Abfall von Werten nahe 1 auf die genäherten Vorhersagen für semiflexible Polymere ($3/4$) bzw. für Zimm-Relaxationen ($2/3$). Das Abfallen des Exponenten auf $2/3$ ist erstaunlich, da Aktin mit einer Persistenzlänge von etwa $16 \mu\text{m}$ auf der Längenskala des Beobachtungsvolumens eigentlich die reinen Biegemoden mit einem Exponenten von $3/4$ liefern sollte. Wie bei DNA zeigt sich, dass die Näherungsmodelle der Polymerdynamik für FCS-Messungen nicht ganz ausreichend sind. Diese Tatsache ist bei Betrachten der Näherungsvoraussetzungen nicht weiter verwunderlich. Alle drei vorgestellten dynamischen Strukturmodelle (Rouse, Zimm, semiflexibel) gelten für die Näherung großer Streuvektoren \mathbf{q} . Das Beobachtungsvolumen in einem FCS-Experiment ist im reziproken Raum aber gerade ein Filter, der das größte Gewicht bei kleinen \mathbf{q} -Werten hat. Die große Stärke von FCS-Messungen, nämlich Schwerpunktdiffusion genau bestimmen zu können, verkehrt sich bei der Analyse von intramolekularer Dynamik in einen Nachteil. Die einfachen Näherungsmodelle reichen für eine quantitative Auswertung nicht mehr

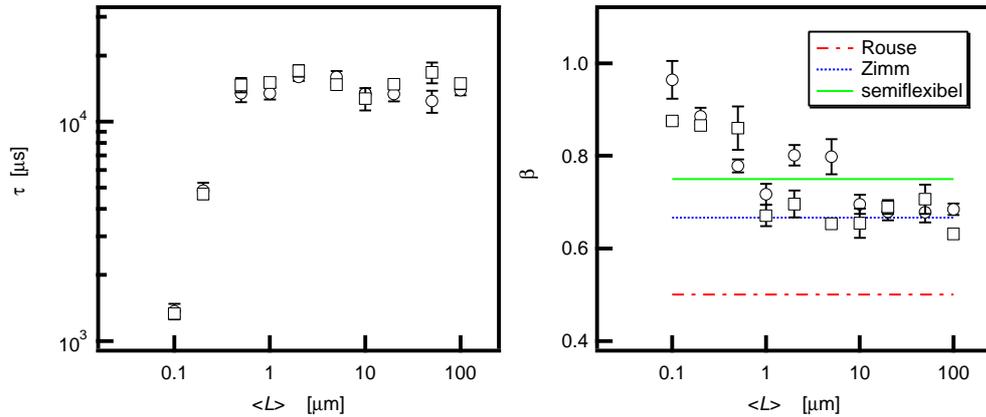


Abbildung 5.16.: Links: Diffusionszeit τ von Rhodamingelabeltem Aktin bei verschiedenen mittleren Längen. Rechts: Exponent β . Bei den Werten handelt es sich um zwei Messreihen, die mit verschiedenen Aktinchargen an verschiedenen Tagen gemacht wurden.

aus. Zur Beschreibung der Daten benötigt man ein exakteres Modell. Der Vergleich der Daten mit einem solchen Modell ist Gegenstand des nächsten Abschnitts.

5.6. Vergleich der experimentellen Daten mit dem Modell semiflexibler Ketten

In diesem Abschnitt werden die experimentellen Ergebnisse der Messungen an DNA und Aktin mit einem Modell semiflexibler Polymere verglichen. Die Ergebnisse hier sind entstanden in Zusammenarbeit mit Roland Winkler vom Institut für Festkörperforschung des Forschungszentrums Jülich. Die Theorie soll nicht in Einzelheiten diskutiert werden. Viel mehr soll dieser Abschnitt auf die verschiedenen Einflüsse auf die Korrelationsfunktion eingehen. Der Abschnitt gibt eine Zusammenfassung der ausführlichen Darstellung in [96].

Die Abbildungen 5.17 und 5.18 zeigen den Vergleich der theoretischen Funktionen mit den experimentellen Daten für DNA unterschiedlicher Länge. Es handelt sich um die experimentellen Daten, die denen aus den Abbildungen 5.8 und 5.9 entsprechen. Die Ketten tragen allesamt mehr als 50 Farbstoffe. Die theoretischen Modelle wurden berechnet für eine kontinuierliche Farbstoffverteilung. Die Dicke der DNA wurde mit $d = 2,5$ nm und die Persistenzlänge mit $l_p = 50$ nm modelliert. Die Temperatur betrug $T = 300$ K. Die Viskosität wurde bei $\eta = 1$ mPa·s, der Fokusradius bei $r_0 = 180$ nm und das Achsenverhältnis $z_0/r_0 = 7$ festgehalten. Die intramolekularen Beiträge können mit dem theoretischen Modell getrennt berechnet werden, wobei zur Gesamtkorrelation auch die

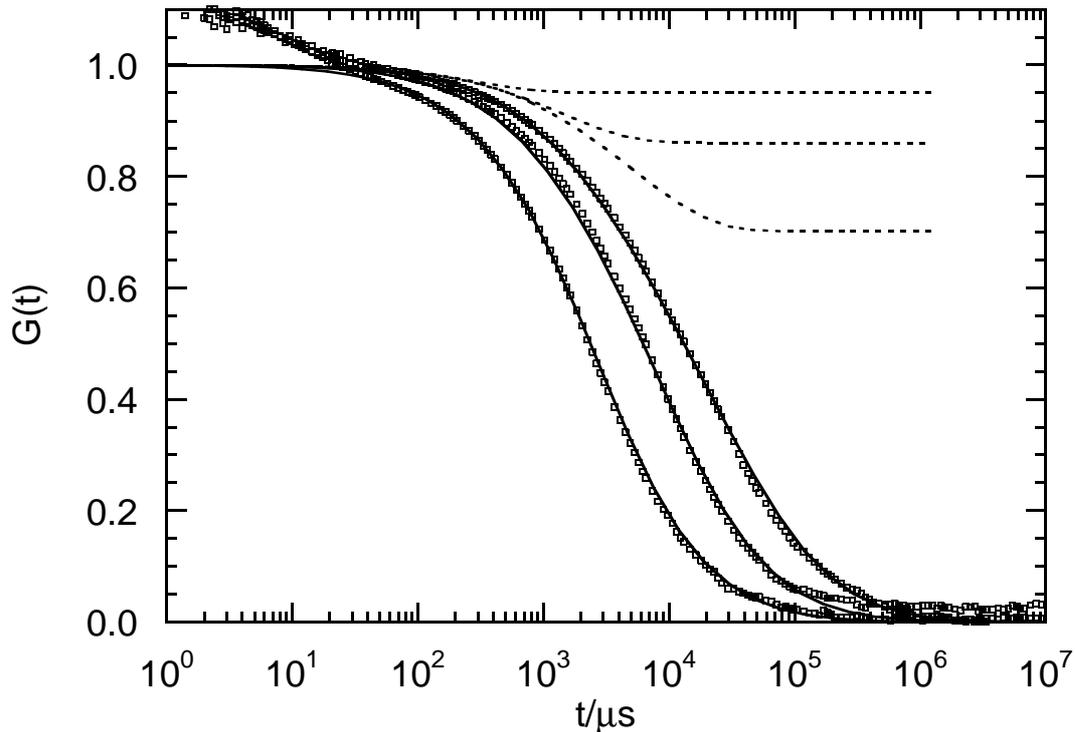


Abbildung 5.17.: Vergleich der theoretischen FCS-Korrelationskurve (durchgezogene Linie) mit experimentellen Daten von Messungen an DNA (Quadrate) für $L = 2686$ bp, $L = 7250$ bp, und $L = 48502$ bp (von links nach rechts). Die gepunkteten Linien stellen die intramolekularen Beiträge dar.

Schwerpunktdiffusion beiträgt. Der intramolekulare Beitrag ist ebenfalls in den Abbildungen eingefügt. Für das kürzeste Fragment ist dieser Anteil sehr gering, er wächst aber mit der Länge der untersuchten DNA. Mit der doppeltlogarithmischen Darstellung in Abbildung 5.18 kann die Steigung der Kurven besser gezeigt werden.

Die Abbildung zeigt, dass über drei Größenordnungen in der Zeit hinweg die theoretischen Modelle sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Die Abweichungen bei sehr kleinen Zeiten rühren von den photokinetischen Prozessen, die hier nicht berücksichtigt werden. Bei sehr großen Zeiten ist die statistische Ungenauigkeit zu groß. Hier geht die Korrelationskurve $G(t)$ gegen Null. Bei der gewählten doppeltlogarithmischen Darstellungsform erscheint diese gegen Null gehende Funktion im Nenner. Schon kleine Abweichungen haben deshalb große Effekte. Auch in dieser Abbildung lässt sich der Beitrag der intramolekularen Dynamik zur Korrelationsfunktion gut erkennen. Je länger die Kette wird, umso größer wird der Anteil. Bei den kurzen Fragmenten spielt er eher eine untergeordnete Rolle. Im Inset der Abbildung 5.18 ist die Steigung der theoretische Funktion aufgetragen. Das Zusammenspiel des theoretischen Modells für die Dynamik der Ketten und der Form des Beobachtungsvolumens ergibt eine von der

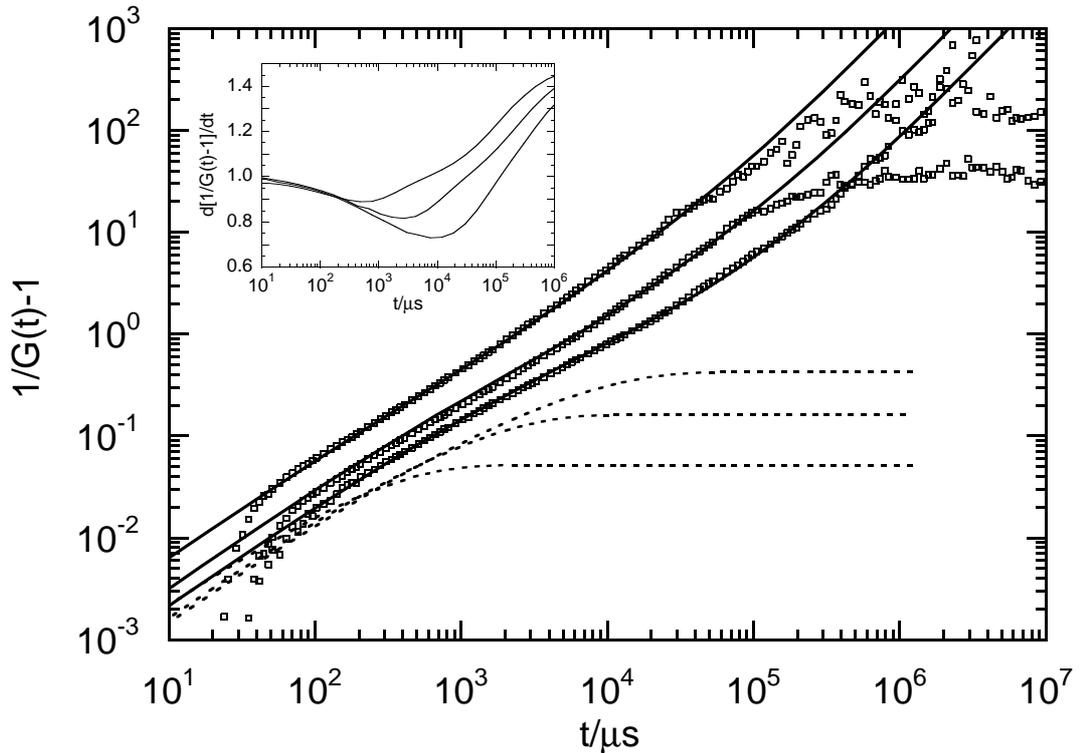


Abbildung 5.18.: Vergleich der theoretischen FCS-Korrelationskurve (durchgezogene Linie) mit experimentellen Daten von Messungen an DNA (Quadrate) für $L = 2686$ bp, $L = 7250$ bp, und $L = 48502$ bp (von links nach rechts). Die gepunkteten Linien stellen die intramolekularen Beiträge dar. Inset: Steigungen der theoretischen Korrelationsfunktionen.

Zeitskala und der Länge der Polymere abhängige Steigung. Die längste Kette erreicht dabei die kleinsten Steigungswerte. Für lange Zeiten wächst die Steigung auf Grund der Schwerpunktdiffusion wieder an. Bei den Anpassungen in den vorherigen Abschnitten wurde eine Näherungsfunktion mit einem konstanten β an die Daten angepasst. Dies wird der tatsächlichen Situation nicht voll gerecht. Das resultierende β ist eine Mittelung der tatsächlich variierenden Steigung. Die Gewichtung dieses Mittelwerts ist an der Stelle am größten, wo die Korrelationsfunktion die höchste Genauigkeit aufweist. Dies ist bei der charakteristischen Diffusionszeit der Fall.

Abbildung 5.19 zeigt den Vergleich der theoretischen Funktionen mit den Daten für unterschiedliche Labeldichten. Bei einem Abstand der Farbstoffe von $\Delta = 500$ bp trägt λ -DNA insgesamt etwa 100 Farbstoffe entlang der Kette. Die Näherung einer kontinuierlichen Verteilung ist hier gerechtfertigt. Der dynamische Strukturfaktor, der die Korrelationsfunktion bestimmt, ist für diesen Fall ein anderer als im Falle sehr großer Farbstoffabstände. Mit $\Delta = 8000$ bp trägt die Kette nur insgesamt acht Farbstoffe. Der dynamische Strukturfaktor, der mit FCS gemessen wird, ist der Strukturfaktor der Farb-

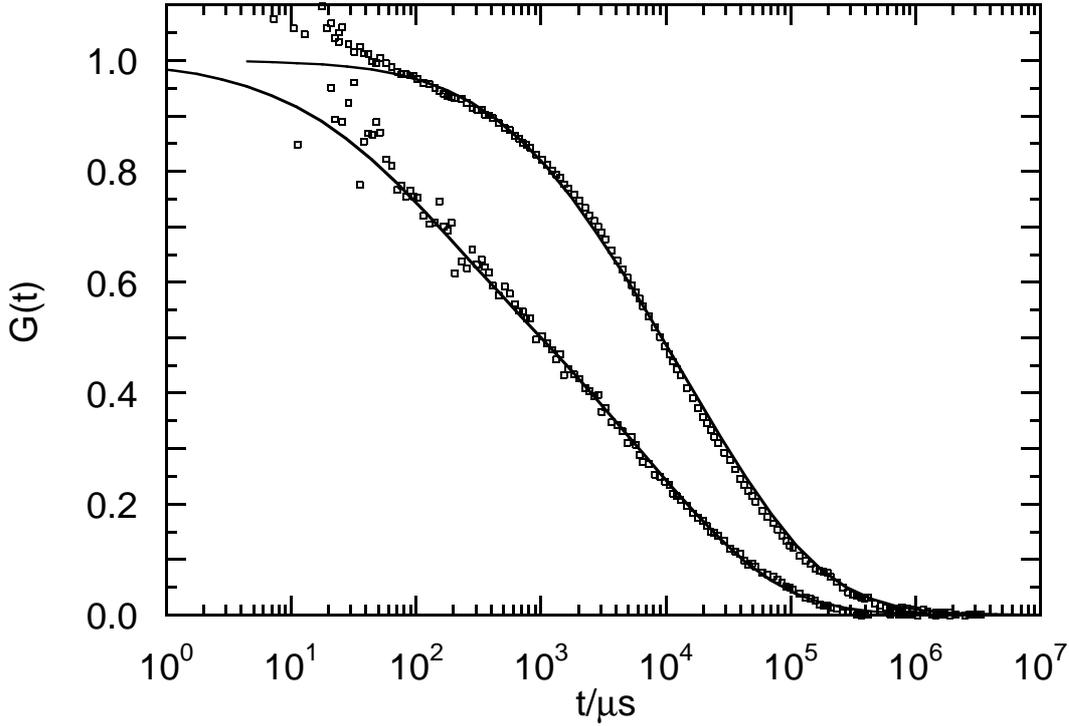


Abbildung 5.19.: Vergleich der theoretischen FCS-Korrelationskurve (durchgezogene Linie) mit experimentellen Daten von Messungen an λ -DNA (Quadrate) für die Farbstoffabstände $\Delta = 8000$ bp (links) und $\Delta = 500$ bp (rechts).

stoffverteilung. Der für die kontinuierliche Kette gültige Strukturfaktor

$$S(\mathbf{q}, t) = \frac{1}{L^2} \int_{-L/2}^{L/2} \int_{-L/2}^{L/2} \langle \exp(-i\mathbf{q} [\mathbf{r}(s, t) - \mathbf{r}(s', 0)]) \rangle ds ds' \quad (5.64)$$

ist bei nur acht Farbstoffen pro Kette nicht mehr gültig. Durch die Anwendung eines diskreten Modells erhält man die theoretische Kurve, die in Abbildung 5.19 die flachere Kurve ist. Die Steigung der Kurve ist geringer, da die Biegemoden in diesem Fall eine untergeordnete Rolle spielen. Die Kette ist auf der Längenskala des Farbstoffabstandes ($\Delta \approx 50 \cdot l_p$) flexibel.

Abbildung 5.20 schließlich zeigt den Vergleich der theoretischen Funktionen mit Messungen an Aktin. Auch hier zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung des Modells mit den Daten. In Abbildung 5.21 sind die selben Daten wieder in doppeltlogarithmischer Darstellung gezeigt. Aktin hat im Vergleich zu DNA eine viel größere Steifigkeit. Diese wurde natürlich bei der Modellierung mit $l_p = 16 \mu\text{m}$ berücksichtigt, ebenso wurde die Dicke auf $d = 8 \text{ nm}$ fixiert.

Im Gegensatz zur Situation bei den DNA-Messungen ist das Verhältnis von Länge zu

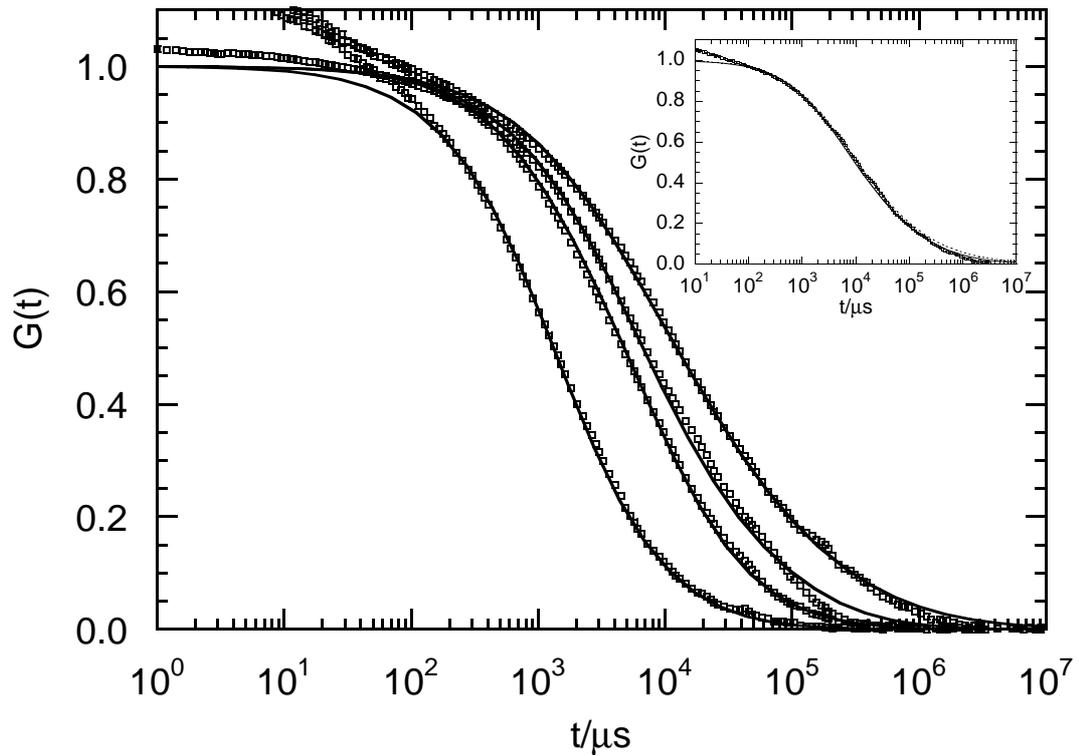


Abbildung 5.20.: Vergleich der theoretischen FCS-Korrelationskurve (durchgezogene Linie) mit experimentellen Daten von Messungen an Aktin (Quadrate) für $\langle L \rangle = 100 \text{ nm}$, $\langle L \rangle = 200 \text{ nm}$, $\langle L \rangle = 3 \mu\text{m}$, und $\langle L \rangle = 10 \mu\text{m}$ (von links nach rechts). Inset: FCS-Korrelationsfunktion für $\langle L \rangle = 50 \mu\text{m}$. Die gepunktete Linie stellt den intramolekularen Beitrag dar.

Persistenzlänge L/l_p hier in der Größenordnung von 1. Die theoretischen Funktionen sind sehr empfindlich auf Veränderungen in der Konturlänge L . Bei der Anpassung der theoretischen Funktionen an die Aktindaten wurde deshalb die Konturlänge als freier Parameter zugelassen. Das Ergebnis waren theoretische Längen, die im Folgenden mit den experimentell eingestellten Werten verglichen sind: $L = 110 \text{ nm}$ ($\langle L_{\text{exp}} \rangle = 100 \text{ nm}$), $L = 270 \text{ nm}$ ($\langle L_{\text{exp}} \rangle = 200 \text{ nm}$), $L = 1,1 \mu\text{m}$ ($\langle L_{\text{exp}} \rangle = 3 \mu\text{m}$), $L = 5,4 \mu\text{m}$ ($\langle L_{\text{exp}} \rangle = 10 \mu\text{m}$). Die Übereinstimmung der Werte ist durchaus zufriedenstellend, wenn man die große Sensitivität des Modells und die experimentellen Ungenauigkeiten bedenkt. Zum einen besitzt die Konzentration des Gelsolins einen großen Einfluss auf die Polymerlänge, zum anderen ist das System nicht monodispers. Die Längen sind statistisch um den Mittelwert verteilt, entsprechend empfindlich ist die gemessene Korrelationskurve.

Bei den theoretischen Funktionen für sehr lange Filamente ($\langle L_{\text{exp}} \rangle \approx 50 \mu\text{m}$, siehe Inset der Abbildungen) dominieren die Biegemoden die diffusive Dynamik. Die Steigung der theoretischen Kurve ist ungefähr 0,67. Dieser Wert wurde auch durch die Anpassung des einfachen Näherungsmodells für den Parameter β gefunden (siehe Abbildung 5.16).

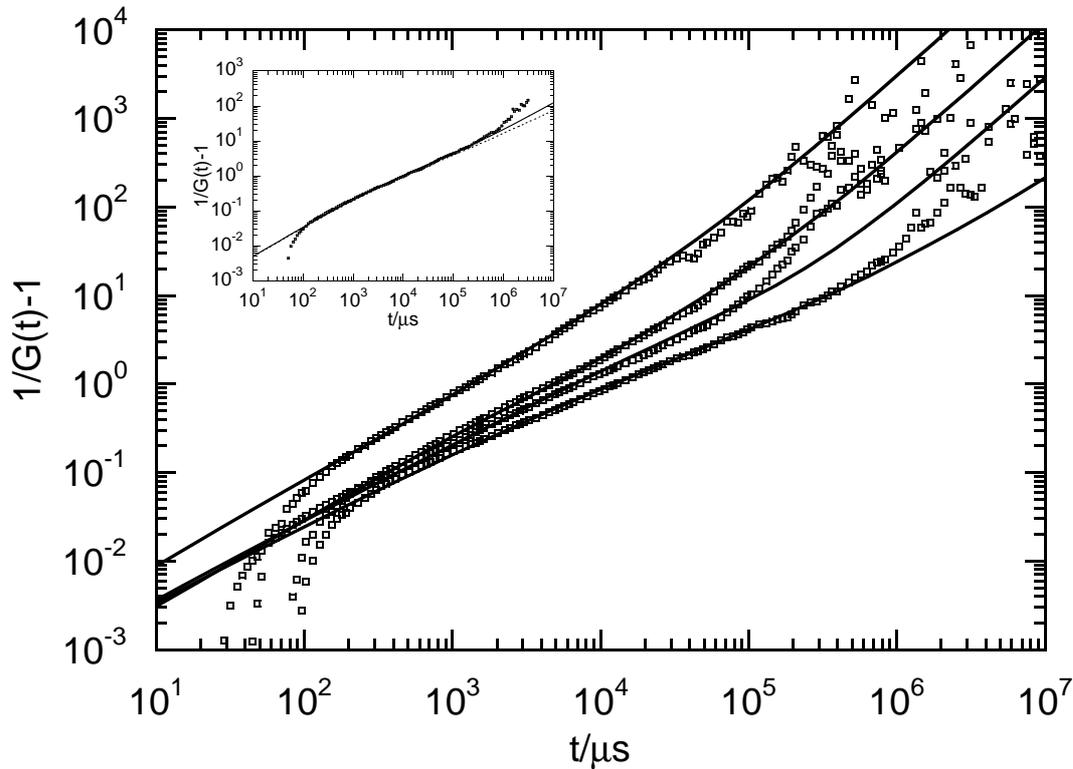


Abbildung 5.21.: Vergleich der theoretischen FCS-Korrelationskurve (durchgezogene Linie) mit experimentellen Daten von Messungen an Aktin (Quadrate) für $\langle L \rangle = 100 \text{ nm}$, $\langle L \rangle = 200 \text{ nm}$, $\langle L \rangle = 3 \mu\text{m}$, und $\langle L \rangle = 10 \mu\text{m}$ (von links nach rechts). Inset: FCS-Korrelationsfunktion für $\langle L \rangle = 50 \mu\text{m}$. Die gepunktete Linie stellt den intramolekularen Beitrag dar.

Die Anpassung mit einem konstanten Parameter β ist gerechtfertigt, wenn entweder die Schwerpunktdiffusion ($\beta = 1$) oder die intramolekulare Dynamik vollständig dominiert.

5.7. Halbverdünnte Lösungen

In diesem Abschnitt werden FCS-Messungen in halbverdünnten Aktinlösungen vorgestellt. Die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Filamente war dabei genau so groß wie im Falle der Messungen an verdünnten Lösungen. Die Gesamtkonzentration an Aktin wurde durch Zugabe von unmarkierten Filamenten erreicht. Diese bilden ein loses Netzwerk, das die Diffusionseigenschaften der Ketten verändert. In der Arbeit von Scalettar et al. [85] wurden die Diffusionseigenschaften von λ -DNA in halbverdünnten Lösungen mit FCS studiert. Allerdings waren in dieser Arbeit alle Ketten markiert. Das Ergebnis ist ein Diffusionskoeffizient, der die Eigenschaften des gesamten Netzwerks beschreibt, ähnlich den Ergebnissen, die mit Lichtstreuung gewonnen werden. Dies wurde für Aktin

zum Beispiel von Schmidt et al. beschrieben [97]. Die hier beschriebenen Messungen hingegen verfolgen die Dynamik eines einzelnen Aktinfilaments im Aktinnetzwerk.

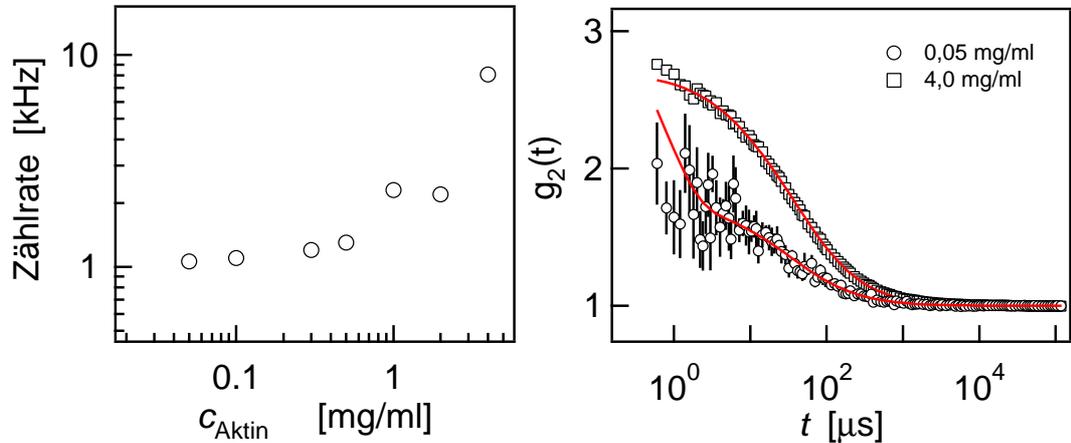


Abbildung 5.22.: Links: Gemessene Intensität bei Messungen im Aktinnetzwerk ohne Fluoreszenzfarbstoffe. Rechts: Autokorrelationskurve zweier Hintergrundmessungen bei Aktinkonzentrationen von $c_{\text{Aktin}} = 4 \text{ mg ml}^{-1}$ bzw. $c_{\text{Aktin}} = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen mit dem Standard-Diffusionsmodell.

Das unmarkierte Aktin wurde bei einer Konzentration von 4 mg/ml polymerisiert und nach Zugabe von Phalloidin in F-Puffer auf die unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt. Bei den FCS-Messungen stellte sich heraus, dass der Intensitätshintergrund stark von der Aktinkonzentration abhängt. Abbildung 5.22 zeigt links die mittlere Intensität pro Zeiteinheit in Abhängigkeit der Aktinkonzentration c_{Aktin} . In verdünnten, wässrigen Lösungen liegt der Hintergrund bei FCS-Messungen üblicherweise unterhalb von 1 kHz und zeigt keine Korrelation. Im rechten Graphen der Abbildung ist die Autokorrelationsfunktion zweier Hintergrundmessungen dargestellt. Beide Messungen zeigen einen Abfall, der mit dem Standard-Diffusionsmodell aus Gleichung 3.20 sehr gut angepasst werden kann. Bei allen Aktinkonzentrationen im Bereich von $0,01 - 4 \text{ mg ml}^{-1}$ ergaben sich sehr ähnliche Diffusionszeiten τ_{H} . Der Mittelwert betrug $\tau_{\text{H}} = (35 \pm 5) \mu\text{s}$. Diese Zeit entspricht einem Objekt mit einer Größe von etwa einem Nanometer. G-Aktin mit einem hydrodynamischen Radius von etwa fünf Nanometern ist zu groß, um diesen Abfall zu erklären. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte dieses Ergebnis auch mit Messungen in anderen halbverdünnten Lösungen reproduziert werden. Eine Erklärung dafür könnte die Rückstreuung des Laserlichts durch die höhere optische Dichte der Lösungen im Gegensatz zu reinem Wasser sein. Zwar hat dieser Hintergrund einen Einfluss auf die Messungen mit fluoreszenzmarkiertem Aktin, doch liegen die Diffusionszeiten des Hintergrunds und die der Aktinfilamente weit auseinander. So kann der Hintergrund mit konstanter Diffusionszeit bei der Anpassung der Daten berücksichtigt werden.

Gemäß Gleichung 3.2, die den diffusiven Abfall der Korrelationskurve für mehrere Kom-

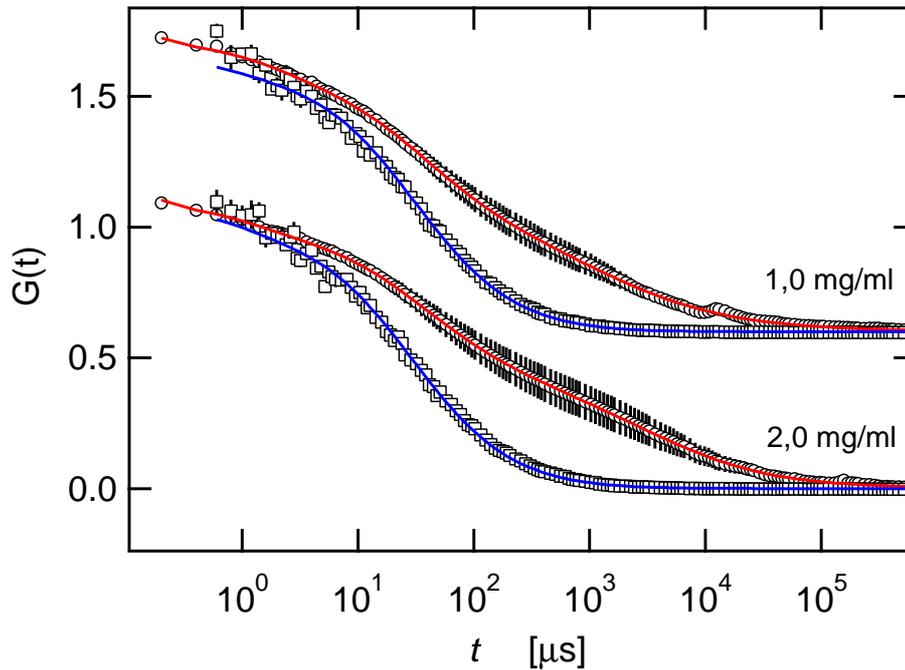


Abbildung 5.23.: Korrelationsfunktionen von Messungen im Aktinnetzwerk für zwei unterschiedliche Netzwerkkonzentrationen (oben: $c_{\text{Aktin}} = 1,0 \text{ mg ml}^{-1}$; unten: $c_{\text{Aktin}} = 2,0 \text{ mg ml}^{-1}$). Die Quadrate sind Hintergrundmessungen, das heißt Messungen ohne Rhodaminmarkiertes Aktin. Die Anpassungen (durchgezogene Linien) dazu sind mit dem Standard-Diffusionsmodell (Gleichung 3.20) durchgeführt. Die Kreise repräsentieren Messungen mit einzelnen markierten Aktinfilamenten im unmarkierten Netzwerk. Die Anpassungen sind für zwei Fraktionen durchgeführt (Gleichung 5.65). Die Diffusionszeit der schnellen Fraktion wurde auf den Wert der Hintergrundmessung fixiert.

ponenten beschreibt, ergibt sich für das neue Modell folgende Funktion:

$$G_{\text{Diff}}(t) = \frac{k_{\text{H}}}{1 + \frac{t}{\tau_{\text{H}}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau_{\text{H}}}}} + \frac{k_{\text{A}}}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^{\beta}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \left(\frac{t}{\tau}\right)^{\beta}}} \quad (5.65)$$

Der erste Summand beschreibt die Diffusion des Hintergrundes mit der Diffusionszeit τ_{H} . Der zweite Term ist die bekannte Funktion, die die Diffusion der markierten Aktinfilamente mit der Diffusionszeit τ und dem Parameter β beschreibt. Die Summe des Hintergrundanteils k_{H} und des Anteils vom Aktin k_{A} muss den Wert 1 ergeben. In Abbildung 5.23 sind Messungen bei zwei verschiedenen Netzwerkkonzentrationen dargestellt. Dabei sind immer die Hintergrundmessung, die nur mit einer diffusiven Fraktion angepasst wurden, im Vergleich zu den Messungen, die auch markierte Filamente enthalten gezeigt. Der Abfall bei den längeren Diffusionszeiten rührt von den markierten Filamenten her.

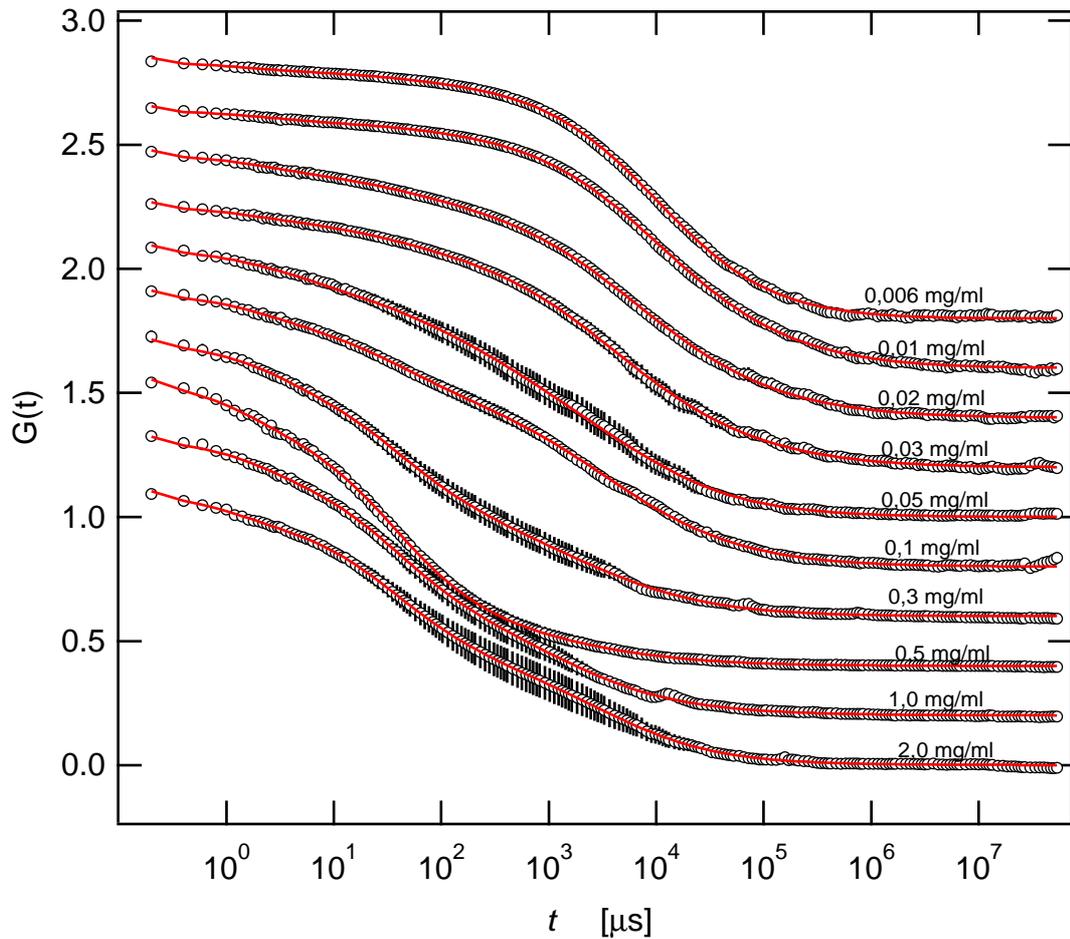


Abbildung 5.24.: Korrelationsfunktionen von Aktin in einem Aktinnetzwerk unterschiedlicher Konzentrationen. Die Konzentrationen sind im Graphen den Kurven zugeordnet. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen gemäß Gleichung 5.65. Die Diffusionszeit der schnellen Fraktion wurde auf den Wert der Hintergrundmessung fixiert.

Die Daten in Abbildung 5.24 zeigen die Korrelationsfunktionen bei verschiedenen Netzwerkkonzentrationen im Bereich von $c_{\text{Aktin}} = 0,006 \text{ mg ml}^{-1}$, was dem verdünnten Fall entspricht, bis hin zu $c_{\text{Aktin}} = 2,0 \text{ mg ml}^{-1}$. Der Aktinkonzentration kann mit der experimentell gefundenen Relation [97]

$$\xi = 0.34 \cdot \left(\frac{c_{\text{Aktin}}}{1 \text{ mg ml}^{-1}} \right)^{-1/2} [\mu\text{m}] \quad (5.66)$$

die Maschenweite (*mesh size*) ξ zugeordnet werden. Für die höchste hier gemessene Konzentration von $c_{\text{Aktin}} = 2,0 \text{ mg ml}^{-1}$ ergibt sich $\xi \approx 240 \text{ nm}$.

In Abbildung 5.25 sind die Diffusionszeit τ und der Exponent β aus den Anpassungen

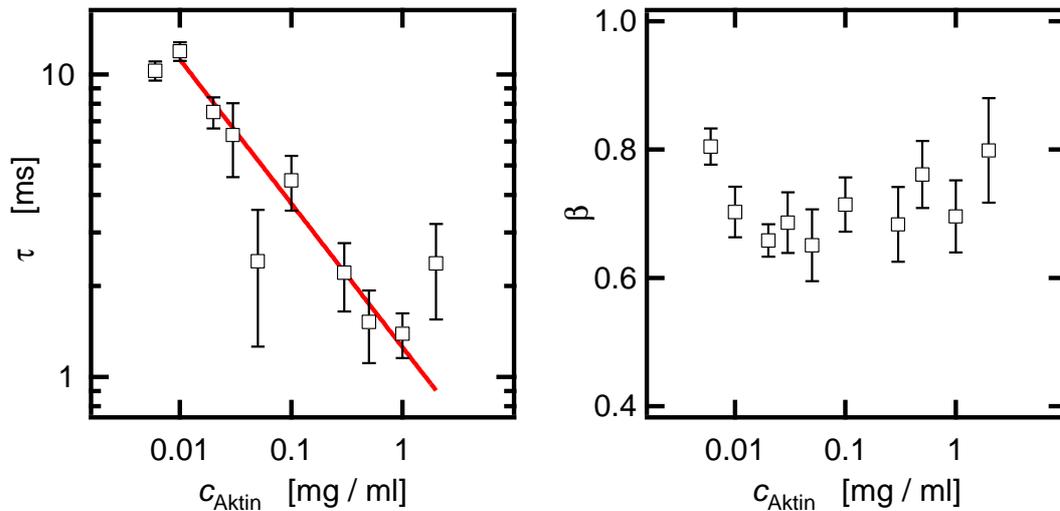


Abbildung 5.25.: Die diffusiven Parameter aus den Anpassungen an die Korrelationsfunktionen in Abbildung 5.24. **Links** die Diffusionszeit und **rechts** der Parameter β . Die durchgezogene Linie ist die Anpassung eines Skalengesetzes mit $\tau \sim c_{\text{Aktin}}^{-0.48 \pm 0.03}$.

der Daten in Abbildung 5.24 aufgetragen. Die Diffusionszeit sinkt mit steigender Konzentration von etwa 10 ms um fast eine Größenordnung und folgt dabei dem Skalengesetz

$$\tau \sim c_{\text{Aktin}}^{-0.48 \pm 0.03}. \quad (5.67)$$

Mit Gleichung 5.66 folgt die Abhängigkeit der Diffusionszeit von der Maschenweite

$$\tau \sim \xi^{0.96 \pm 0.06}. \quad (5.68)$$

Wie bei den verdünnten Lösungen deutlich wurde, dominieren die schnellen internen Biegemoden den diffusiven Abfall. Die Daten legen nahe, dass diese Dominanz im halbverdünnten Bereich noch verstärkt ist. Die Schwerpunktsdiffusion wird mit steigender Konzentration langsamer ($D \sim c_{\text{Aktin}}^{-1}$, siehe [97]). Im Gegensatz dazu zeigen die FCS-Messungen, dass die interne Dynamik schneller wird. Der nahezu konstante Exponent β legt den Schluss nahe, dass wie im verdünnten Bereich die Biegemoden für die Relaxationen verantwortlich sind. Ein Vergleich mit Vorhersagen ist leider nicht möglich, da eine Theorie für die internen Relaxationen semiflexibler Polymere in halbverdünnten Lösungen noch nicht ausgearbeitet ist. Trotz des störenden Hintergrunds und der daraus folgenden Ungenauigkeiten können diese Daten helfen, ein zukünftiges theoretisches Modell zu bestätigen.

Wichtig bei Messungen im halbverdünnten Bereich ist die Form der Fluoreszenzmarkierung. Im Falle von Aktin war es durch die kovalente Bindung des Farbstoffs an das Protein möglich, die Dynamik einzelner Filamente im unmarkierten Netzwerk zu studieren. Bei langen DNA-Molekülen, die mit interkalierenden Farbstoffen markiert sind,

können die Farbstoffe schon nach kurzer Zeit auch an die umgebenden DNA-Moleküle des Netzwerks binden. Interkalierende Farbstoffe haben eine endliche Bindungskonstante, die das Springen des Farbstoffes auf benachbarte Moleküle erlaubt. Die Verfolgung der Dynamik einzelner Ketten ist dann nicht mehr möglich.

6. Anomale Diffusion in Polymernetzwerken

Dieses Kapitel ist eine kurze Zusammenfassung von Experimenten, mit denen Transportprozesse in Polymernetzwerken untersucht wurden. Die Studie ist in [98] veröffentlicht. Wechselwirkungen zwischen diffundierenden Objekten und einer komplexen Umgebung führen zu anomaler Diffusion. Als anomal bezeichnet man Diffusionsprozesse, bei denen das mittlere Verschiebungsquadrat nicht linear mit der Zeit wächst.

$$\langle r^2(t) \rangle = 6 \Gamma t^\beta \quad (6.1)$$

Der Exponent β nimmt dabei Werte größer oder kleiner als 1 an. Für Werte, bei denen $\beta \neq 1$ ist, bekommt der Vorfaktor Γ eine andere physikalische Bedeutung, da sich die Einheiten von Γ und der klassischen Diffusionskonstanten unterscheiden. Wie Saxton mit seinen Monte-Carlo-Simulationen gezeigt hat, kann anomale Diffusion dann auftreten, wenn die diffundierenden Teilchen Hindernissen ausgesetzt sind [99] oder auch wenn den Teilchen die Möglichkeit gegeben ist, zeitweilig an Objekte zu binden [100]. Der Exponent β hängt dabei stark von der Hindernisdichte oder den Bindungskonstanten ab. Experimentell wurde anomale Diffusion in Polymernetzwerken [101] und in Zellen festgestellt. In Zellen treten nicht nur Exponenten kleiner als 1 auf, sondern auf Grund des aktiven Transports durch Motorproteine auch Werte um $\beta \approx 1,5$ [102] [103] [104].

Die Form der Autokorrelation bei einem FCS-Experiment wird sich dementsprechend ebenfalls ändern. Der Exponent geht direkt in die Korrelationsfunktion ein.

$$G_{\text{Diff}}(t) = \frac{1}{1 + (\frac{t}{\tau^*})^\beta} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} (\frac{t}{\tau^*})^\beta}} \quad (6.2)$$

mit

$$\tau^* = \left(\frac{r_0^2}{4\Gamma} \right)^{1/\beta} \quad (6.3)$$

Dies hat zur Folge, dass die FCS-Kurven flacher werden und nicht mehr mit dem Standard-Diffusionsmodell aus Gleichung 3.20 beschrieben werden können. Abbildung 6.1 zeigt den Unterschied in eindeutiger Weise am Beispiel fluoreszenzmarkierter Nukleosome in zwei verschiedenen Umgebungen. Nukleosome bestehen aus einem Histon (ein

positiv geladenes Protein), auf das ein 146 bp-Fragment DNA aufgewickelt ist. Dieser Komplex bildet die Grundeinheit des Genoms eukariotischer Zellen. Der Durchmesser der Teilchen im isolierten Zustand beträgt ungefähr 11 nm. In Wasser bzw. TE-Puffer zeigen diese Moleküle ein normales Diffusionsverhalten. In einem DNA-Netzwerk allerdings beobachtet man erstens eine langsamere Bewegung der Teilchen und zweitens anomale Diffusion.

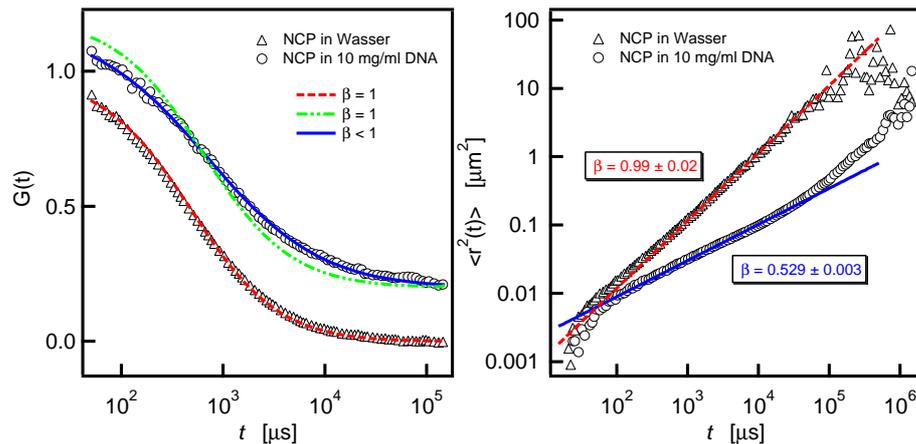


Abbildung 6.1.: Links: Normierte Autokorrelationsfunktionen für fluoreszenzmarkierte Nucleosome (NCP) in Wasser bzw. in einem DNA-Netzwerk. Gezeigt sind ebenfalls die theoretischen Anpassungen an die Daten mit dem Standard-Diffusionsmodell (gestrichelt) und mit dem Modell für anomale Diffusion (durchgezogen). Die Daten sind veröffentlicht in [98]. **Rechts:** Das mittlere Verschiebungsquadrat, das aus den normierten Autokorrelationsfunktionen berechnet wurde.

Schon in früheren Arbeiten wurde anomale Diffusion mittels FCS untersucht. Vorwiegend geschah dies bei der Untersuchung von Diffusion innerhalb von Membranen [105] [106] oder im Innern von Zellen [107] [108] [109].

7. Flussexperimente mit dem Doppelfokus

Makromoleküle können außer durch Diffusion auch in Strömungen transportiert werden. Die Viskosität der Lösung und die äußeren Randbedingungen des Flusssystems entscheiden über das Geschwindigkeitsprofil innerhalb der Strömung. Mit Hilfe zweier lateral versetzter Beobachtungsvolumina lässt sich die Anlage als "Lichtschranke" für einzelne Moleküle benutzen. Dieses Messprinzip zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

- Die Flussgeschwindigkeiten fluoreszenzmarkierter Teilchen lassen sich im Bereich von $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ bis 20 m s^{-1} mit einer Genauigkeit von bis zu zwei Prozent ermitteln.
- Die Richtung des Transports kann mit diesem Messprinzip eindeutig bestimmt werden.
- Mit dem Doppelfokus können Geschwindigkeiten polydisperser Systeme präzise gemessen werden. Die gemessene Korrelationszeit hängt nicht von der Größe der Teilchen ab.

Abschnitt 7.1 stellt das Prinzip und die Theorie vor, in Abschnitt 7.2 wird auf die experimentelle Realisierung eingegangen. In Abschnitt 7.3 wird die Fluidodynamik nicht-Newton'scher Flüssigkeiten im Hinblick auf die in Abschnitt 7.4 gezeigten Messungen an Hyaluronsäurelösungen beleuchtet.

7.1. Prinzip und Theorie

Abbildung 7.1 zeigt das Prinzip der Methode. Zwei Foki, deren Zentren in x-Richtung um eine Strecke Δs verschoben sind, können fluoreszenzmarkierte Teilchen, die mit der Geschwindigkeit v_x unterwegs sind, nacheinander anregen. In zwei Detektionskanälen, die auf die beiden Foki blicken, werden die Intensitätssignale um die Zeit Δt versetzt sein. Der Versatz entspricht genau der Zeit, die das Teilchen braucht, um die Strecke Δs zurückzulegen. Die Kreuzkorrelation der beiden Signale hat bei der Zeit Δt ein lokales Maximum.

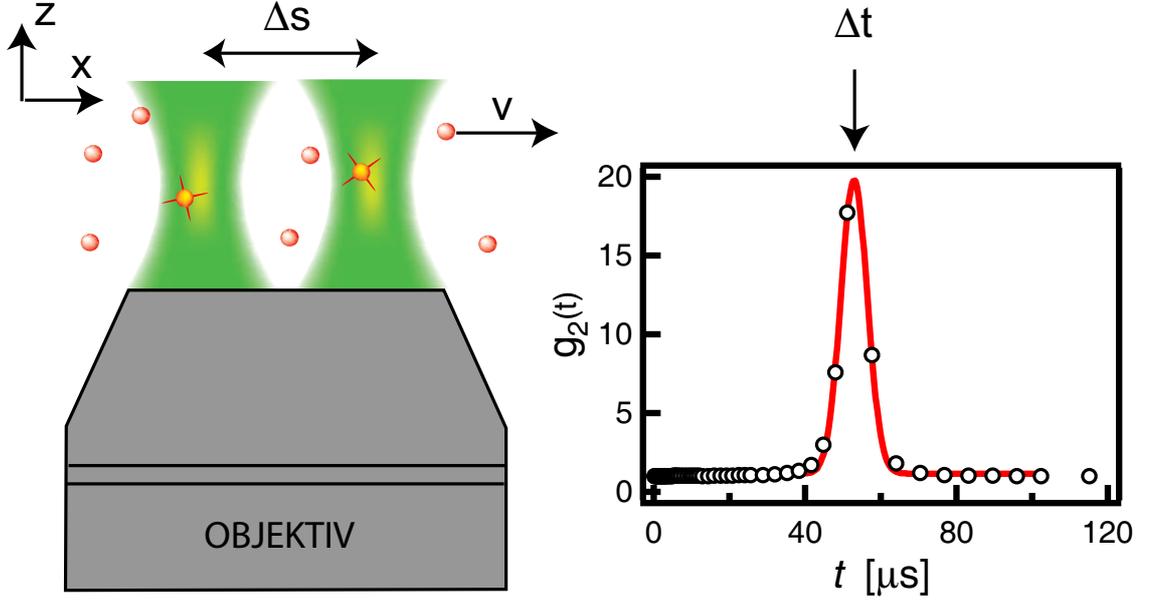


Abbildung 7.1.: Prinzip der Zwei-Foki-Messung. Teilchen, die sich mit der Geschwindigkeit v_x durch die beiden Foki bewegen, werden im rechten Volumen später detektiert als im linken. Diese Zeit Δt lässt sich in der Kreuzkorrelation durch die Anpassung einer Gaußfunktion an die experimentellen Daten bestimmen.

Einzelmolekülelektrophorese war 1995 das erste Gebiet, auf dem dieses Prinzip der Geschwindigkeitsmessung angewandt wurde [110]. Allerdings war der Abstand der beiden Laserfoki mit ca. $200 \mu\text{m}$ relativ groß. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde in diesem Experiment auch nicht konfokal detektiert. Eine der ersten Zwei-Foki-Messungen mit FCS stammt von Brinkmeier et al. aus dem Jahr 1999 [111]. Inzwischen wurden verschiedene Problemstellungen mit der Methode bearbeitet, sei es Elektrophorese [112], Fluidik in Mikrokanälen [113] oder gerichteter Transport in der Nähe von Grenzflächen [114]. Durch Kreuzung zweier Laserstrahlen war es auch möglich, nicht nur mit zwei Anregungsvolumina zu arbeiten sondern gleich mit einem kompletten Interferenzmuster [115]. Auch mit einem anisotropen einzelnen Fokus lassen sich Flussgeschwindigkeit und Richtung bestimmen [116].

Im Rahmen dieser Arbeit soll auf die Methode mit zwei Anregungsvolumina eingegangen werden. Der Einfachheit halber betrachten wir nur Fälle, bei denen der Transport entlang der x -Achse vonstatten geht, sprich entlang der Achse, auf der auch die beiden Detektionsvolumina liegen. Die Kreuzkorrelation hat dann folgende Form.

$$\begin{aligned}
 g_2(t) &= 1 + \frac{1}{N} G_{\text{Diff}}(t) \cdot \exp\left(-\frac{v_x^2 (t - \Delta t)^2}{r_0^2 (1 + t/\tau_D)}\right) \\
 &= 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1/2} \exp\left(-\frac{v_x^2 (t - \Delta t)^2}{r_0^2 (1 + t/\tau_D)}\right) \quad (7.1)
 \end{aligned}$$

Die Größe τ_D ist dabei die schon bekannte Eigendiffusionszeit der Teilchen und Δt die Fließzeit der Teilchen zwischen den beiden Foki. Unter der Bedingung, dass die Diffusion der Teilchen gegenüber dem Transport vernachlässigt werden kann, also $\tau_D \gg \Delta t$, vereinfacht sich Gleichung 7.1 nochmals erheblich.

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} \exp\left(-\frac{v_x^2 (t - \Delta t)^2}{r_0^2}\right) \quad (7.2)$$

Diese Gaußfunktion hat ihr Maximum genau bei der Fließzeit Δt . Die Breite der Funktion hängt ab von der Geschwindigkeit der Teilchen v_x und der Größe der Detektionsvolumina r_0 .

7.2. Aufbau

Für die Realisierung zweier lateral versetzter Beobachtungsvolumina ist in erster Linie die Hürde zweier versetzter Laserfoki zu überwinden. Die Detektion ist mit den beiden vorhandenen unabhängig voneinander justierbaren Pinholes kein Problem, solange der laterale Abstand der beiden Punkte im Probenvolumen nicht zu groß wird. Die beiden Pinholes mit ihren Schrittmotoren lassen sich im Pinholeraum nur endlich weit auseinander bewegen. Für ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung (C-Apochromat 40x/1,2 W korr) beträgt der maximal mögliche Abstand im Probenraum etwa $7,6 \mu\text{m}$.

Um zwei lateral versetzte Laserfoki mit einem Abstand in diesem Bereich zu erhalten, wird der Laserstrahl auf einen optischen Tisch ausgekoppelt und mit einem Wollaston-Prisma in zwei Strahlen aufgeteilt. Abbildung 7.2 zeigt den schematischen Aufbau. Die zwangsläufige Polarisation der beiden Strahlen ist nicht weiter von Bedeutung. Der Winkel zwischen den beiden auslaufenden Strahlen beträgt $0,5^\circ$. Mit den Positionen und Brennweiten der Linsen L1 und L2 lassen sich die beiden Strahlen unter einem gewünschten Winkel über eine spezielle Erweiterung des Mikroskops einkoppeln. Diese Erweiterung und das Objektiv sorgen je nach Einkoppelwinkel γ für einen bestimmten Versatz Δs der beiden Foki im Probenraum. Für den Zusammenhang gilt:

$$\Delta s = \frac{\gamma}{2,86'} \mu\text{m} \quad (7.3)$$

Für einen gewünschten Abstand Δs der beiden Foki, kann also ein Winkel γ angegeben werden, unter dem die beiden Strahlen am Eingang des Mikroskops eintreten müssen. Die frei wählbaren Brennweiten und Positionen der beiden Linsen L1 und L2 müssen einzig die Nebenbedingung erfüllen, dass die innere Divergenz der einzelnen Strahlen nicht zu groß oder zu klein wird, da sonst die Foki selbst in ihren Ausmaßen zu stark von den Standardwerten abweichen.

Abbildung 7.3 zeigt den optischen Nachweis für den vorhandenen Doppelfokus. Dazu wurde ein Deckglas mit einem fluoreszenten Farbstoff beschichtet und in die Fokusebene

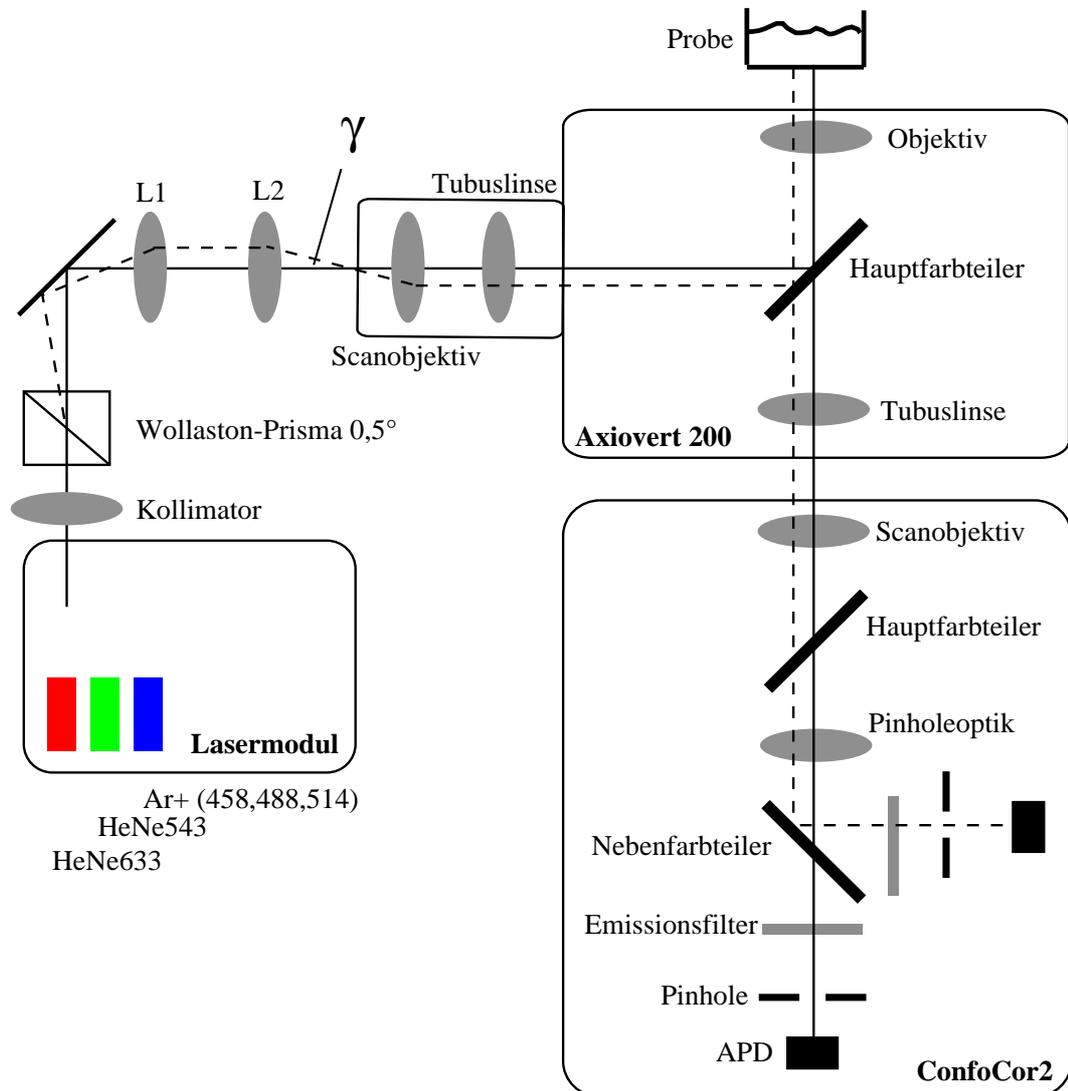


Abbildung 7.2.: Schematischer Aufbau der Anlage im Doppelfokusmodus. L1 und L2 stellen optische Linsen dar. Beim seitlich an das Axiovert200 angebrachten Gerät handelt es sich um eine individuelle Modifikation der Firma Zeiss.

des Mikroskops gebracht. Anstatt nun das Fluoreszenzlicht im ConfoCor2-Modul zu detektieren, kann es auch in ein ebenfalls an der Anlage angeschlossenes Laser-Scanning-Modul geleitet werden. Mittels einer Scanoptik wird in der konfokalen Ebene Punkt für Punkt die Intensität gemessen. Die dreidimensionale Darstellung in Abbildung 7.3 beweist, dass die beiden Foki deutlich getrennt sind. Diese Methode erlaubt es auch, den Abstand der beiden Foki genau zu bestimmen. Die Lage der Verbindungsachse wurde durch die Orientierung des Wollaston-Prismas auf die x-Achse des Mikroskops gelegt.

Im nächsten Schritt werden die beiden Pinholes auf die beiden Foki justiert. Ein Detek-

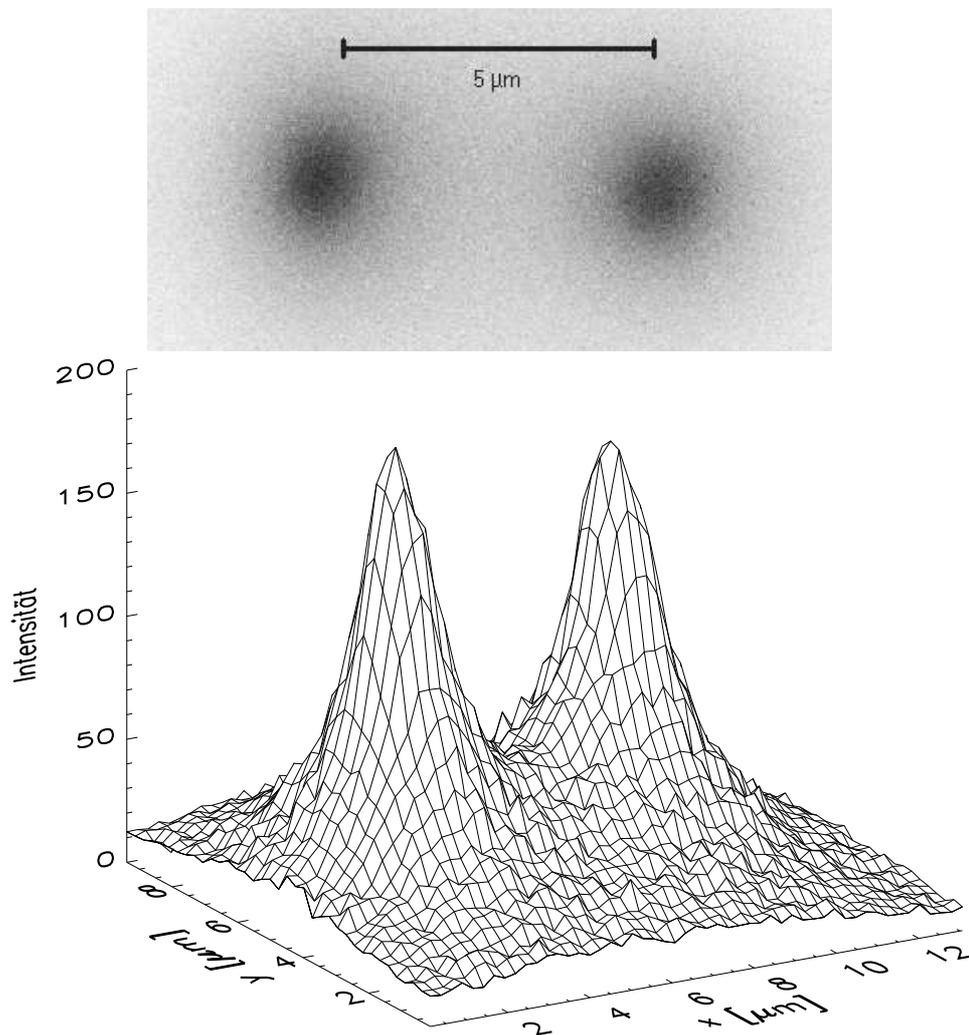


Abbildung 7.3.: Nachweis der beiden Foki mittels Laser Scanning Mikroskopie. Originalbild (oben) und 3-dimensionale Darstellung (unten). Die Anpassung von Gaußfunktionen an die beiden Peaks liefert einen Abstand der beiden Maxima von $d = (5,09 \pm 0,03) \mu\text{m}$.

tionskanal soll Photonen vom linken Fokus, der andere vom rechten Fokus nachweisen. Abbildung 7.4 zeigt eine Kontrollmessung nach der erfolgreichen Justage der Pinholes. Links handelt es sich um eine einfache Lösung eines Farbstoffes, bei dem nur Diffusion als Transportprozess in Frage kommt. Die beiden Autokorrelationsfunktionen sind sich sehr ähnlich, was für die erwartete hohe Ähnlichkeit der beiden Detektionsvolumina spricht. Eine Kreuzkorrelation ist nicht vorhanden. Dies beweist, dass die beiden Pinholes auf die beiden unterschiedlichen Foki justiert sind. Da die beiden Volumina deutlich getrennt sind, gibt es keinen detektierbaren *Crosstalk* zwischen den Kanälen, das heißt Licht vom

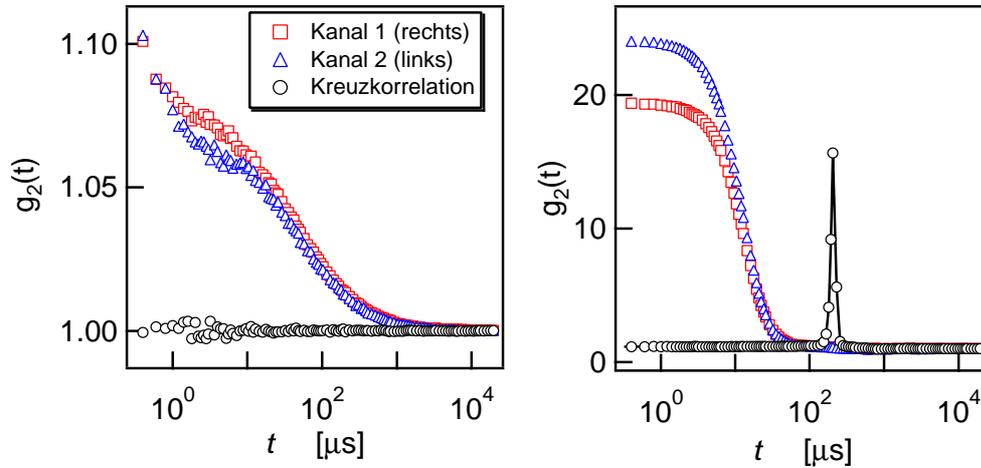


Abbildung 7.4.: Kontrollmessungen mit dem Doppelfokusaufbau. **Links:** Lösung mit Alexa568 [20 nM]. Kanal1 ist auf den rechten Fokus justiert, Kanal2 blickt auf den linken. Es ist kein Fluss angelegt. **Rechts:** Doppelfokus-FCS-Messung an fluoreszenzmarkierten Teilchen in einem stationären Strömungsfeld.

linken Fokus kann nicht in den rechten Detektionskanal gelangen und umgekehrt. Der rechte Graph zeigt eine Messung mit angelegtem Fluss. Die Kreuzkorrelation zeigt die Zeit an, die die Teilchen vom linken in den rechten Fokus benötigen. Die Geschwindigkeit der Teilchen beträgt in diesem Fall $v \approx \frac{5 \mu\text{m}}{100 \mu\text{s}} = 50 \text{ mm/s}$.

7.3. Fluidynamik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Geschwindigkeitsprofile in laminaren Strömungen von Wasser und Polymerlösungen aufgenommen. Dieser Abschnitt gibt die Theorie für den Spezialfall eines Flusses zwischen zwei parallelen Platten wieder. Die Ergebnisse sind entnommen aus den Arbeiten von Tritton [117] und Bird [118].

7.3.1. Newton'sche Fluide

Eine Newton'sche Flüssigkeit ist per Definition eine Flüssigkeit, bei der die Scherkraft τ proportional zur angelegten Scherrate $\dot{\gamma} = \frac{\partial u}{\partial z}$ ist. Die Proportionalitätskonstante ist die Viskosität η .

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} = \eta \frac{\partial u}{\partial z} \quad (7.4)$$

Wasser ist ein sehr gutes Beispiel für eine Newton'sche Flüssigkeit. Betrachtet man eine Newton'sche Flüssigkeit im Zwischenraum zweier paralleler Platten, so wird die Flüssig-

keit in Richtung des Druckgradienten fließen. Um das stationäre Geschwindigkeitsprofil des Flusses zu erhalten, muss man die Navier-Stokes-Gleichung lösen. Für den Fluss zwischen zwei parallelen Platten lautet sie vereinfacht:

$$\eta \frac{d^2 u}{dz^2} = \frac{\partial p}{\partial x} \quad (7.5)$$

Der linke Teil dieser Gleichung beschreibt die Kraft, die auf Grund der Viskosität auf ein Volumenelement wirkt, rechts steht die Kraft, die vom angelegten Druck herrührt. Wählt man den Nullpunkt in der Mitte der beiden Platten, so lauten die Randbedingungen

$$u(z) = 0 \text{ für } z = \pm \frac{h}{2}. \quad (7.6)$$

Die Lösung dieser Gleichung ist ein in z -Richtung parabolisches Geschwindigkeitsprofil (siehe Abbildung 7.5).

$$u(z) = \frac{1}{2\eta} \frac{\partial p}{\partial x} \left[z^2 - \left(\frac{h}{2} \right)^2 \right] \quad (7.7)$$

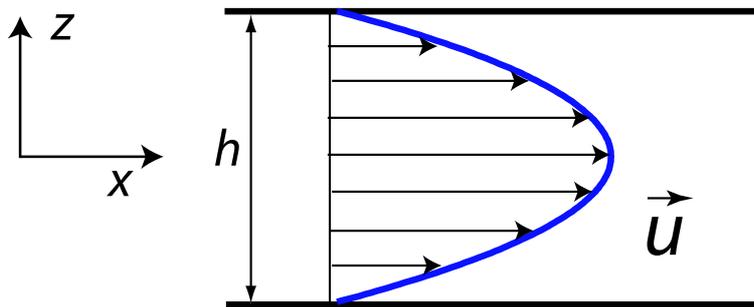


Abbildung 7.5.: Laminares Flussprofil einer Newton'schen Flüssigkeit zwischen zwei ruhenden Platten. Der angelegte Druckgradient wirkt in x -Richtung. Die y -Richtung zeigt in die Zeichenebene.

Bei konstantem Druckgradienten ist die Geschwindigkeit in x -Richtung konstant. Die Ausdehnung w der Platten in y -Richtung (in der Abbildung senkrecht zur Zeichenebene) sei viel größer als die Höhe h . Dann kann die Geschwindigkeit auch als unabhängig von der y -Richtung genähert werden und Gleichung 7.7 gilt in drei Dimensionen. Der Fluss Φ , also das Volumen, das pro Zeit durch den Querschnitt der Platten fließt, ist

$$\Phi = \int_{-h/2}^{h/2} \int_0^w u \, dz \, dy = -\frac{wh^3}{12\eta} \frac{\partial p}{\partial x} \quad (7.8)$$

Man beachte, dass der Druckgradient in Flussrichtung negativ ist; daher das negative Vorzeichen für den Fluss.

7.3.2. Nicht-Newton'sche Fluide

Polymerlösungen haben im Gegensatz zu Newton'schen Flüssigkeiten die Eigenschaft, dass die Viskosität nicht konstant ist, sondern von der Scherrate abhängt. Die Rheologie beschäftigt sich ausführlich mit diesem Phänomen.

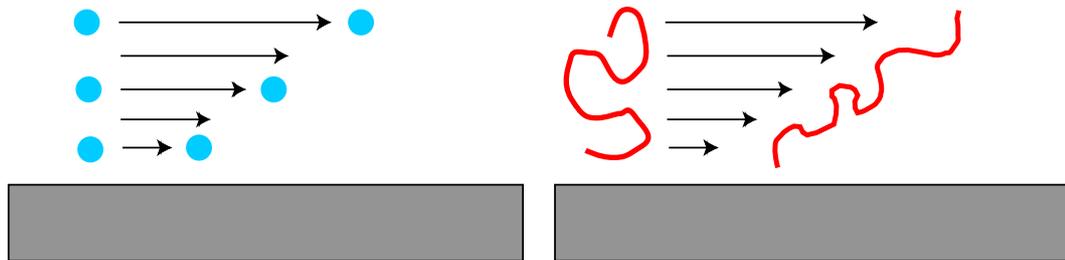


Abbildung 7.6.: Vereinfachte Darstellung des Flusses nahe einer festen Grenzfläche. Die Scherrate ist hier konstant. **Links:** Drei Fluidelemente einer Newton'schen Flüssigkeit in verschiedenen Abständen von der Grenzfläche. Der Abstand der Elemente in Flussrichtung wächst mit der Zeit linear an. **Rechts:** Die Scherung eines Polymers hat eine Streckung zur Folge. Die Konformationsänderung ist energetisch ungünstig und das Polymerrückgrat wird sich bei zu hohen Scherraten in Richtung des Flusses ausrichten. Dies führt zu einer niedrigeren Viskosität.

Für sehr kleine und sehr große Scherraten findet man für Polymerlösungen Newton'sches Verhalten mit den Viskositäten η_0 und η_∞ . Der Bereich zwischen den beiden Extremen lässt sich mit Hilfe eines Exponentialgesetzes beschreiben, das auf Carreau und Yasuda zurückgeht [118].

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = [1 + (\lambda\dot{\gamma})^a]^{(n-1)/a} \quad (7.9)$$

Die Größe λ ist eine Zeitkonstante und a ist ein dimensionsloser Parameter, der den Übergang von sehr kleinen Scherraten in den exponentiellen Bereich beschreibt. Für $n < 1$ spricht man von pseudoplastischem Scherverhalten oder Scherverdünnung, für $n > 1$ von dilatantem Verhalten oder Scherverdickung. Viel häufiger ist die Scherverdünnung, bei dem die Viskosität mit steigender Scherrate abnimmt. Ein mikroskopisches Bild zur Erklärung dieses Phänomens ist in Abbildung 7.6 gezeigt. Durch Anlegen einer Scherrate wird das Polymer gestreckt. Diese entropisch ungünstige Konformation führt zu einer Kraft, die das Polymer zusammenzieht. Ab einer gewissen Scherrate ist die energetisch günstigste Situation eine Ausrichtung des Polymerrückgrates in Flussrichtung. Das hat eine Erniedrigung der Viskosität zur Folge. Als kritische Scherrate wird der Punkt bezeichnet, an dem die Viskosität abzufallen beginnt. Typischerweise liegt n im Falle der Scherverdünnung zwischen $1/3$ und $1/2$. Ein weiteres häufig gebrauchtes Modell ist das von Ostwald [118]:

$$\eta = m \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (7.10)$$

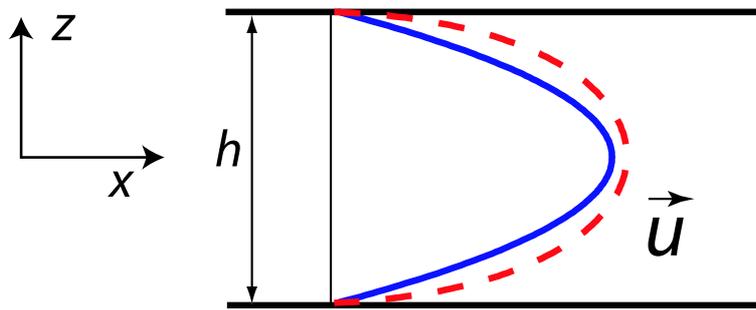


Abbildung 7.7.: Laminares Flussprofil einer Newton'schen Flüssigkeit (durchgezogene Linie) und einer nicht-Newton'schen pseudoplastischen Flüssigkeit unter Scherverdünnung (gestrichelte Linie).

Die Größe m wird sehr oft Konsistenzindex genannt. Für $n = 1$ erhält man den Newton'schen Fall mit $m = \eta$. Für beide Modelle der Viskosität ist die Bewegungsgleichung 7.5 nicht mehr analytisch integrierbar. Das Geschwindigkeitsprofil $u(z)$ kann nicht als geschlossene Funktion dargestellt werden. Dennoch lassen sich qualitative Vorhersagen über das Aussehen treffen. Beim Durchfließen eines Kanals sind an den Grenzflächen die Scherraten größer als in der Mitte des Kanals. Wenn nun wie bei einer pseudoplastischen Flüssigkeit die Viskosität mit der Scherrate abnimmt, wird das Geschwindigkeitsprofil am Rand steiler und in der Mitte des Kanals flacher. Abbildung 7.7 zeigt das qualitative Flussprofil im Vergleich zum parabolischen Profil einer Newton'schen Flüssigkeit.

Aus einem gemessenen Flussprofil lässt sich nun sowohl die Scherrate als auch die Viskosität bestimmen. Die Scherrate ist die Ableitung des Flussprofils in z -Richtung. Gemäß der Navier-Stokes-Gleichung 7.5 lässt sich aus der zweiten Ableitung die Viskosität bestimmen. Sie ist proportional zum Kehrwert der Krümmung des Flussprofils.

$$\eta = \frac{\partial p / \partial x}{\partial^2 u / \partial z^2} = \frac{\partial p / \partial x}{\partial \dot{\gamma} / \partial z} \quad (7.11)$$

Für ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil ist die Viskosität konstant. In der Rheologie üblich ist eine Auftragung der Viskosität gegenüber der Scherrate wie sie Abbildung 7.8 zeigt.

Parameter wie die kritische Scherrate, die Plateauwerte der Viskosität und die Steigung im Übergangsbereich hängen von Größen wie Temperatur, Molekulargewicht und Konzentration der Polymere ab.

7.4. Experimente und Ergebnisse

Dieser Abschnitt hier zeigt das Potential zur Aufnahme präziser Geschwindigkeitsprofile in eingeschränkten Geometrien. Bei allen hier vorgestellten Messungen wurden als

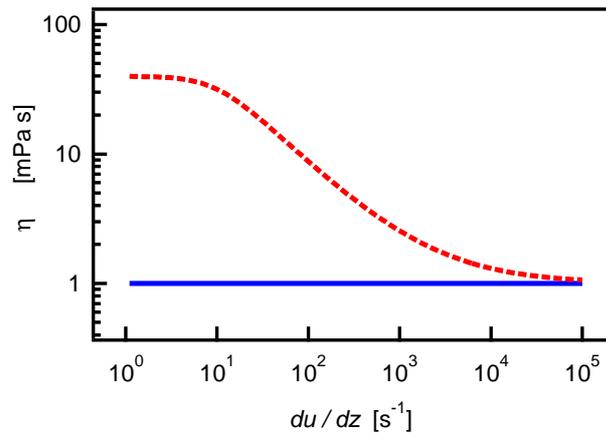


Abbildung 7.8.: Viskosität als Funktion der Scherrate für Wasser (durchgezogene Linie) und einer Polymerlösung laut dem Carreau-Yasuda-Modell (gestrichelte Linie). Folgende Parameter wurden dabei benutzt: $\lambda = 0,1 \text{ s}$, $a = 2$, $n = 0,3$, $\eta_0 = 40 \text{ mPa s}$, $\eta_\infty = 1 \text{ mPa s}$

Sonden zur Detektion fluoreszenzmarkierte Kugeln mit einem Durchmesser von 100 nm benutzt. Diese Kugeln tragen mehrere hundert Farbstoffe kovalent gebunden auf der Oberfläche, sind also sehr hell und leicht zu detektieren. Zu kleine Kugeln haben den Nachteil, dass sie einen zu großen Diffusionskoeffizienten besitzen. Auf dem Weg vom ersten zum zweiten Beobachtungsvolumen können sie so aus ihrer Bahn diffundieren. Zu große Kugeln könnten das System stören und würden dem örtlichen Auflösungsvermögen von ca. $1 \mu\text{m}$ nicht gerecht werden. Der gewählte Durchmesser von 100 nm für die Kugeln ist ein guter Kompromiss.

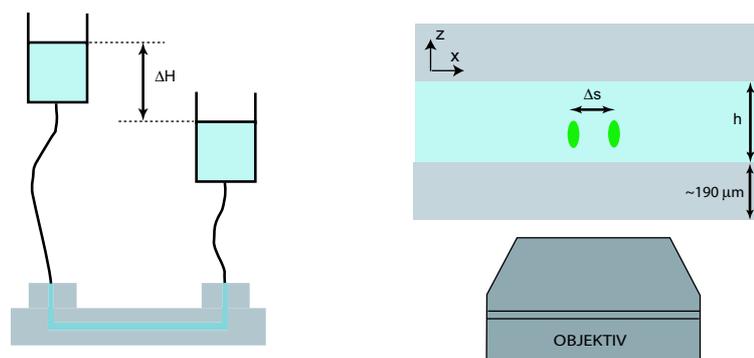


Abbildung 7.9.: Schematische Darstellung des verwendeten Flusssystems. **Links:** Der Höhenunterschied ΔH der beiden Reservoirs bestimmt den Druck und sorgt für einen gleichmäßigen Fluss. **Rechts:** Durch Verschieben des Objektivs in z -Richtung lässt sich die Position der Beobachtungsvolumina bei verschiedenen Höhen im Kanal einstellen.

Das verwendete Flusssystem, das in Abbildung 7.9 schematisch dargestellt ist, basiert

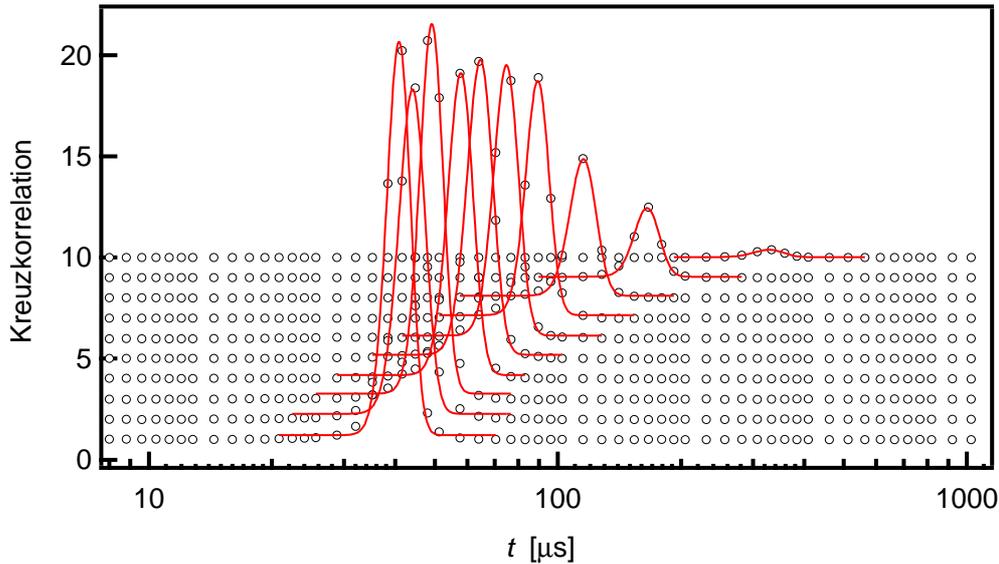


Abbildung 7.10.: Kreuzkorrelationsfunktionen in einem Flusskanal mit rechteckigem Querschnitt (ibidi μ -slide V). Als Probe diente eine 60 pM-Lösung von Fluoreszenzkugeln mit 100 nm Durchmesser (Fluospheres Orange (540/560), 0,1 μm , Molecular Probes, F-8800). Die Daten wurden an unterschiedlichen z -Positionen im Kanal gemessen. Die Höhen von oben nach unten sind: $z = 0 \mu\text{m}$, 10 μm , 20 μm , 30 μm , 40 μm , 50 μm , 60 μm , 80 μm , 100 μm , 130 μm . Die durchgezogenen Linien sind Gauß'sche Anpassungen. Der Abstand der beiden Foki beträgt $\Delta s = 5,1 \mu\text{m}$ (siehe Abschnitt 7.2).

auf dem Prinzip des hydrostatischen Drucks. Zwei mit einem Ausfluss im Boden versehene Bechergläser dienen als Reservoir für die Flüssigkeit. Die Verbindungsschläuche mit einem Innendurchmesser von 2 mm haben eine Gesamtlänge von ca. 2 m. Das ganze System ist aber mit vielen Anschlussmöglichkeiten sehr variabel gestaltet. Die Höhendifferenz ΔH der beiden Reservoirs bestimmt den Druck gemäß

$$p = \rho g \Delta H \quad (7.12)$$

wobei ρ die Dichte der untersuchten Flüssigkeit und $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$ die Erdbeschleunigung. An die Verbindungsschläuche angeschlossen ist die Kammer, deren Geometrie das Flussprofil bestimmt, solange deren Querschnitt deutlich kleiner als die der Verbindungsschläuche und Adapter ist. Für die Untersuchungen hier stellten sich Kammern der Firma ibidi GmbH (Integrated BioDiagnostics, München) als ideal heraus. Modelle mit verschiedenen Geometrien wurden verwendet. Die Höhe h des Kanals war immer kleiner als die Breite w in y -Richtung.

Abbildung 7.10 zeigt die Kreuzkorrelationsfunktionen von Messungen an verschiedenen z -Positionen in einem ibidi μ -slide V. Der Kanal ist laut Hersteller durch folgende Größen

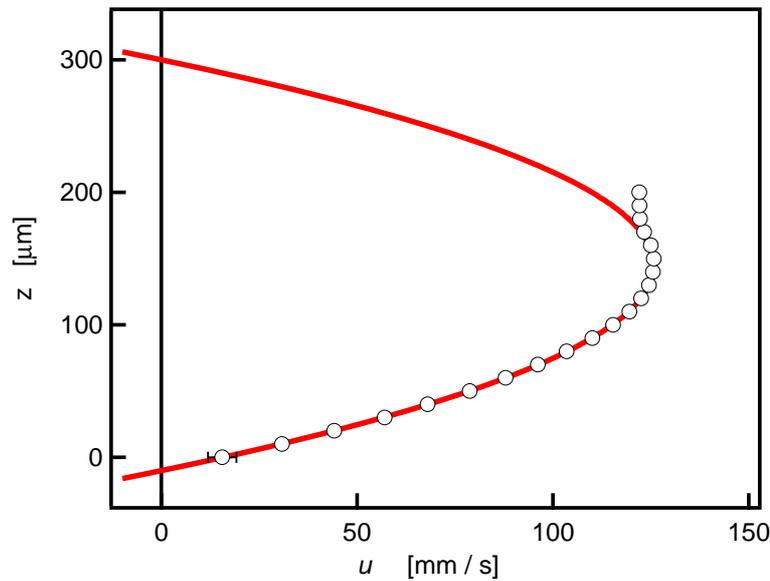


Abbildung 7.11.: Flussgeschwindigkeit u aus den Korrelationsfunktionen in Abbildung 7.10. Die Höhe der Flusskammer beträgt $h = 300 \mu\text{m}$. Das verwendete Objektiv (C-Apochromat 40x, 1,2W) lässt nur Messungen bis zu einer Höhe von etwa $150 \mu\text{m}$ zu.

charakterisiert: Höhe $h = 300 \mu\text{m}$, Breite $w = 500 \mu\text{m}$ und Länge $L = 5 \text{ mm}$. Der Abstand der beiden Beobachtungsvolumina war $\Delta s = 5,1 \mu\text{m}$ und die Höhendifferenz der Reservoirs betrug in diesem Fall $\Delta H = 100 \text{ mm}$. Je größer der Abstand zur unteren Grenzfläche wird, desto weiter wandert das Maximum zu kleineren Zeiten. Jede Kurve ist das Ergebnis einer Mittelung von fünf Einzelmessungen mit jeweils fünf Sekunden Messdauer. Die z -Position der Beobachtungsvolumina im Kanal kann nur relativ zur vorhergehenden exakt bestimmt werden. Sie wird durch Verschieben des Objektivs relativ zur Kammer erreicht. Der Nullpunkt kann frei gewählt werden. Die absolute Lage der Grenzfläche kann anhand der Reflexionen der Foki nur mit einer Genauigkeit von etwa $2 \mu\text{m}$ bestimmt werden. An die experimentellen Daten wurden gemäß Gleichung 7.2 Gaußfunktionen angepasst und so die mittlere Zeit Δt bestimmt, die die Sonden für die Wegstrecke Δs benötigen. Die Zeit Δt ist ein Mittelwert aus fünf Zeiten, die aus der Anpassung von fünf Gaußfunktionen an die jeweiligen Datensätze resultieren.

Abbildung 7.11 zeigt die Geschwindigkeit $u = \frac{\Delta s}{\Delta t}$ in Abhängigkeit der z -Position. Bis zu einer Höhe von ca. $180 \mu\text{m}$ erhält man präzise Flussgeschwindigkeiten. Größere Höhen sind auf Grund des beschränkten Arbeitsabstandes des Objektivs nicht realisierbar. Das Objektiv stößt an die Kammer an und der Abstand bleibt konstant. Die Punkte bei diesen großen Höhen wurden bei der Anpassung des parabolischen Profils vernachlässigt. Obwohl nur eine Hälfte des Geschwindigkeitsprofils gemessen werden konnte, ergibt die Extrapolation auf die gesamte Höhe eine Kanalhöhe von etwas mehr als $300 \mu\text{m}$, was sehr gut mit den Herstellerangaben übereinstimmt.

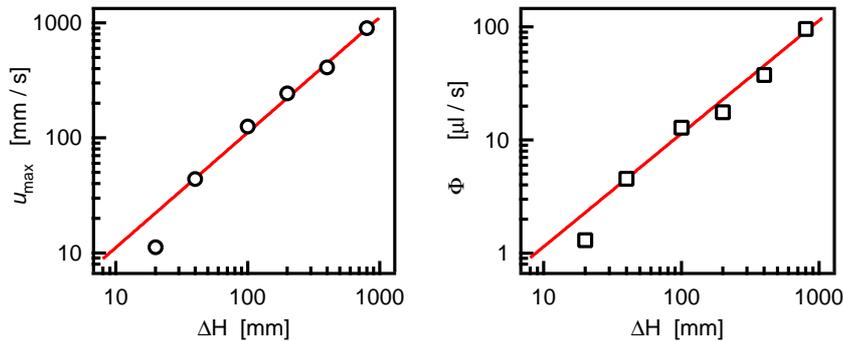


Abbildung 7.12.: Maximalgeschwindigkeit u_{\max} (links) und Gesamtfluss Φ (rechts) aus gemessenen Flussprofilen bei verschiedenen Reservoirhöhen ΔH . Die Maximalgeschwindigkeit ist das Maximum der angepassten Parabel, der Fluss das Integral der Parabel, multipliziert mit der Breite $w = 500 \mu\text{m}$ des Kanals. Die durchgezogenen Linien sind lineare Anpassungen.

Für verschiedene Reservoirhöhen wurde diese Messung wiederholt und aus den Parametern der angepassten parabolischen Geschwindigkeitsprofile die Maximalgeschwindigkeit u_{\max} in der Mitte des Kanals und der Gesamtfluss $\Phi = w \cdot \int u(z) dz$ bestimmt. Wie erwartet sind beide Größen linear mit der Reservoirhöhe ΔH und damit auch linear mit dem hydrostatischen Druck p verknüpft (siehe Abbildung 7.12). Der Fluss Φ ist dabei grob genähert, da das Profil in y -Richtung nicht berücksichtigt wurde. Der Linearität tut dies allerdings keinen Abbruch. Das Flusssystem ist somit für solche Messungen geeignet. Lediglich bei sehr kleinen Höhendifferenzen bricht der Fluss zusammen. Bei diesen kleinen Drücken reicht schon eine kleine Luftblase, um den Fluss zum Erliegen zu bringen. Hier kann man nur durch eine sehr gute Entlüftung des Flusssystems Abhilfe schaffen.

7.4.1. Scherverdünnung in Polymerlösungen

Für den Vergleich des Geschwindigkeitsprofils von Wasser (Newton'sches Fluid) mit einer Nicht-Newton'schen Flüssigkeit wurde eine etwas modifizierte Geometrie gewählt. Die Höhe des Kanals wurde auf $h = 100 \mu\text{m}$ verkleinert. Die Länge des Kanals war $L = 16 \text{ mm}$ und die Breite war unverändert $w = 500 \mu\text{m}$. Die Kammer ist eine Spezialanfertigung der Firma ibidi.

Abbildung 7.13 zeigt das Geschwindigkeitsprofil von Wasser bei einer Reservoirhöhe von $\Delta H = 870 \text{ mm}$. Die geringe Höhe des Kanals hat den Vorteil, dass auch mit diesem Objektiv die gesamte Höhe erfasst werden kann, was eine parabolische Anpassung an die experimentellen Daten rechtfertigt.

Abbildung 7.14 zeigt das Geschwindigkeitsprofil einer Hyaluronsäurelösung (siehe auch C.3) mit einer Konzentration von $c = 2,5 \text{ mg/ml}$. Die kritische Überlappkonzentration

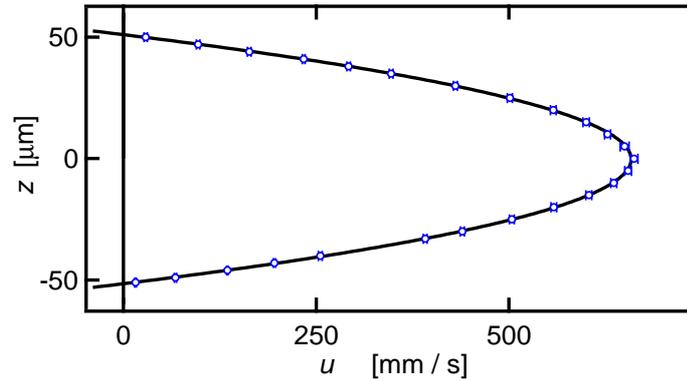


Abbildung 7.13.: Geschwindigkeitsprofil von Wasser in einem Kanal mit $h = 100 \mu\text{m}$ Höhe bei einer Reservoirhöhe von $\Delta H = 870 \text{ mm}$. Die durchgezogene Linie ist eine parabolische Anpassung.

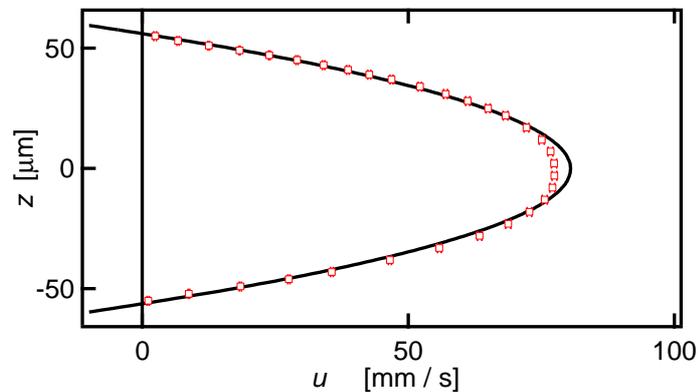


Abbildung 7.14.: Geschwindigkeitsprofil von Hyaluronsäure unter den selben Bedingungen wie in der Messung mit Wasser (siehe Abbildung 7.13). Die durchgezogene Linie ist eine parabolische Anpassung.

dieser linearen Polymere liegt bei $c^* = 1 \text{ mg/ml}$. Die Lösung hier ist also halbverdünnt. Die Viskosität der Lösung wurde mit einem Ostwald-Rheometer auf $\eta_{0,\text{HA}} = 23 \text{ mPa s}$ bestimmt. Die Dichte beträgt $\rho_{\text{HA}} = 1,0 \text{ g/ml}$, ist also die des Lösungsmittels. Die im Gegensatz zu Wasser ($\eta_0 = 1 \text{ mPa s}$) viel größere Viskosität erniedrigt erwartungsgemäß die Flussgeschwindigkeit. Deutlich ist ebenfalls die Abweichung vom parabolischen Flussprofil zu erkennen. Die Probe zeigt Scherverdünnung. Das Geschwindigkeitsprofil bei der Hyaluronsäure zeigt eine etwas größere Höhe des Kanals. Beim Austausch der beiden Flüssigkeiten musste die Kammer aus der Messposition genommen werden. Die genauen lateralen Messkoordinaten in der x - y -Ebene waren daher bei den Messungen von Wasser und Hyaluronsäure nicht exakt dieselben. Da die Höhe des Kanals über einen makroskopischen Bereich nicht auf exakt $100 \mu\text{m}$ herzustellen ist, kann diese Abweichung damit erklärt werden.

Die Präzision der Daten erlaubt eine weitere Quantifizierung. Mit der bekannten Geometrie des Kanals und den bekannten Daten von Wasser kann aus dem Profil der Wassermessung gemäß Gleichung 7.8 der Druckgradient bestimmt werden.

$$\frac{\partial p}{\partial x} = -\frac{12\eta\Phi}{wh^3} = -\frac{12 \cdot 1 \text{ mPa s} \cdot 22,5 \mu\text{l s}^{-1}}{500 \mu\text{m} \cdot 102^3 \mu\text{m}^3} = 510 \text{ Pa mm}^{-1} \quad (7.13)$$

Über die Länge des Kanals von $L = 16 \text{ mm}$ ergibt sich damit ein Druck von

$$p = \frac{\partial p}{\partial x} \cdot L = 510 \text{ Pa mm}^{-1} \cdot 16 \text{ mm} = 8160 \text{ Pa}. \quad (7.14)$$

Dies ist etwas kleiner als der hydrostatische Druck aus der Höhendifferenz der Reservoirs.

$$p_{\text{Reservoir}} = \rho \cdot g \cdot \Delta H = 1 \text{ g/ml} \cdot 9,81 \text{ m s}^{-2} \cdot 870 \text{ mm} = 8535 \text{ Pa} \quad (7.15)$$

Ein kleiner Teil des Drucks geht also im übrigen Flusssystem verloren. Bei der Messung mit Hyaluronsäure wurde am Flusssystem nichts verändert. Die Dichte ist dieselbe wie bei Wasser. Daher kann vom gleichen Druckgradienten ausgegangen werden. Gleichung 7.5 erlaubt damit die Bestimmung der Viskosität aus der zweiten Ableitung des Geschwindigkeitsprofils.

$$\eta = \frac{\partial p / \partial x}{\partial^2 u / \partial z^2} \quad (7.16)$$

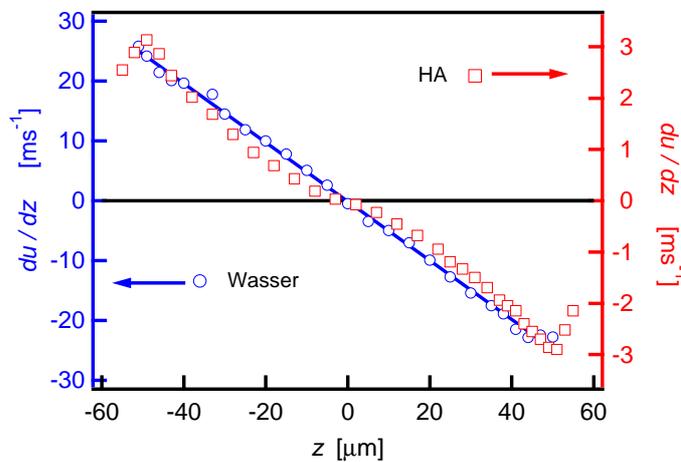


Abbildung 7.15.: Die erste Ableitung der Flussprofile von Wasser (Abbildung 7.13) und Hyaluronsäure (Abbildung 7.14).

Abbildung 7.15 zeigt die erste Ableitung des Geschwindigkeitsprofils von Wasser und Hyaluronsäure im Vergleich. Während die Kurve bei Wasser linear verläuft, zeigt Hyaluronsäure charakteristische Abweichungen. Die Kurve stellt nichts anderes als die Scher-rate dar.

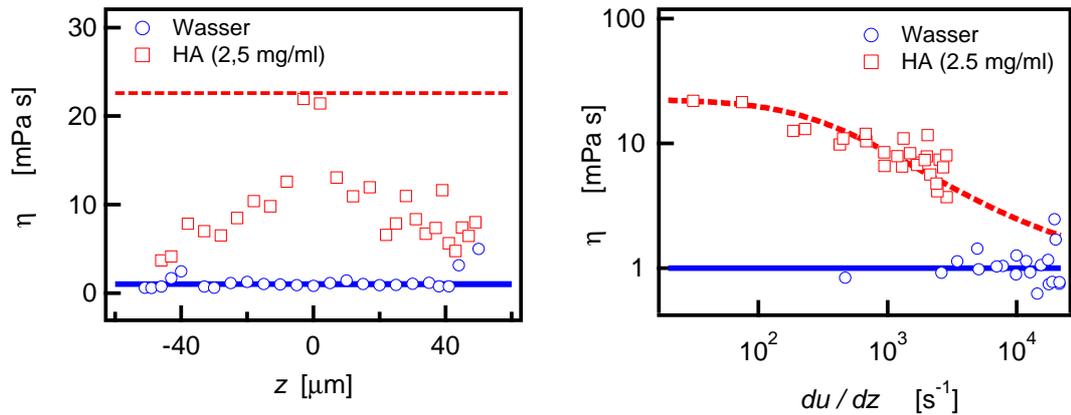


Abbildung 7.16.: Links: Viskositätsprofil berechnet aus den Krümmungen der Geschwindigkeitsprofile in den Abbildungen 7.13 und 7.14. Die durchgezogene Linie ist die Viskosität des Lösungsmittels ($\eta_\infty = 1$ mPa s), die gestrichelte Linie die Viskosität der Polymerlösung im Grenfall kleiner Scherkräfte ($\eta_0 = 23$ mPa s). **Rechts:** Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate. Die durchgezogene Linie ist die Viskosität des Lösungsmittels, die gestrichelte Linie ist eine Anpassung des Carreau-Yasuda-Modells.

In Abbildung 7.16 ist links die Viskosität aufgetragen für verschiedene Höhen im Kanal. Sie wurde bestimmt, indem die Scherraten in Abbildung 7.15 nochmals abgeleitet wurden, und der Kehrwert dieser zweiten Ableitung mit dem Druckgradienten multipliziert wurde. Während Wasser im gesamten Bereich konstant ist, hat die Viskosität von Hyaluronsäure in der Mitte des Kanals ein Maximum nahe am statischen Wert von $\eta_{0,\text{HA}} = 23$ mPa s. In der Mitte sind die Scherraten am kleinsten und der Effekt der Scherverdünnung wächst erst nach außen hin zu großen Scherraten an. Abbildung 7.16 rechts zeigt die typische Auftragung der Viskosität gegen die Scherrate, wie sie in der Rheologie üblich ist. Angepasst an die Daten wurde das Carreau-Yasuda-Modell (siehe Gleichung 7.9), bei dem aber nur die kritische Übergangszeit λ als freier Parameter zugelassen wurde. Die übrigen Parameter waren $a = 1,25$ und $n = 0,25$, was für Polymerlösungen typisch ist, $\eta_\infty = 1$ mPa s als Viskosität des Lösungsmittels und $\eta_{0,\text{HA}} = 23$ mPa s aus der Messung mit dem Ostwald-Rheometer. Aus dem Geschwindigkeitsprofil konnte dadurch die kritische Scherrate dieser Hyaluronsäurelösung zu $\dot{\gamma} = 285 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Diese Ergebnisse stimmen gut mit experimentellen Daten aus der Literatur überein [119].

Abschließend lässt sich sagen, dass der Doppelfokus erfolgreich installiert und getestet werden konnte. Neben der hier vorgestellten Untersuchung der Scherverdünnung können weitere Transportprozesse untersucht werden. Nahe liegende Problemstellungen sind Elektrophorese oder auch Geschwindigkeitsprofile nahe Grenzflächen. Durch Oberflächenbeschichtungen kann erreicht werden, dass die Flussgeschwindigkeit an der Wand nicht auf Null absinkt. Erste Experimente mit dem Doppelfokus konnten schon einen

Beitrag zum besseren Verständnis dieses komplexen Problems der *boundary slip conditions* liefern [114].

8. FCS an Grenzflächen mit totaler interner Reflexion (TIR-FCS)

In der Nähe von Grenzflächen sind Messungen mit der herkömmlichen FCS-Methode schwierig. Durch Reflexionen des fokussierten Laserstrahls wird das Anregungsvolumen und damit auch das effektive Beobachtungsvolumen stark verändert. Das reflektierte Licht gelangt zudem neben dem fluoreszenten Licht vermehrt in den Detektionskanal und verschlechtert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis enorm. Ein Ausweg aus dieser Situation bietet die Methode der Anregung durch totale interne Reflexion (TIR) [120].

Anstatt mit einem fokussierten Laserstrahl die Fluoreszenz anzuregen, wird ein evaneszentes Feld benutzt, wie es bei der totalen internen Reflexion von Licht an einer Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium entstehen kann. Die Kombination dieser Anregungsmöglichkeit mit FCS wurde zum ersten Mal im Jahr 1981 von Thompson et al. realisiert [121]. Damit lassen sich kinetische Prozesse wie Diffusion nahe Grenzflächen oder die Bindung an eine Oberfläche studieren. Einen Überblick über die Möglichkeiten von TIR-FCS geben Artikel von Thompson et al. [122] [123] oder auch Schwille [124].

8.1. Theorie

Licht der Vakuumwellenlänge λ , das auf eine Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium fällt, wird gemäß des Snellius'schen Gesetzes vom Lot weggebrochen.

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta \quad (8.1)$$

Überschreitet der Einfallswinkel den kritischen Grenzwinkel $\beta_G = \arcsin \frac{n_1}{n_2}$, so tritt der Laserstrahl nicht mehr ins optisch dünnere Medium aus, sondern wird total an der Grenzfläche reflektiert (siehe Abbildung 8.1). Im optisch dünneren Medium liegt ein evaneszentes Feld vor. Die Intensität fällt exponentiell mit dem Abstand von der Grenzfläche ab:

$$I(z) \sim \exp \left[-\frac{z}{d} \right] \quad (8.2)$$

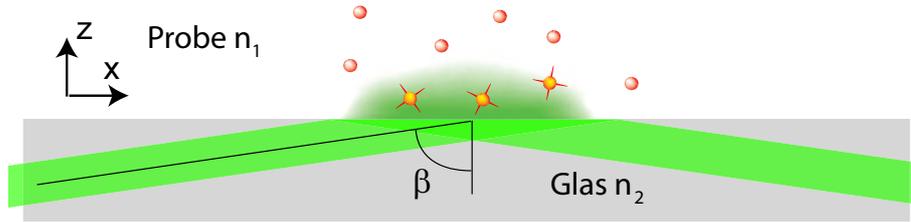


Abbildung 8.1.: Prinzip der totalen internen Reflexion. Für eine Grenzfläche Glas ($n_2 = 1,5$) zu Wasser ($n_1 = 1,33$) beträgt der Grenzwinkel $\beta_G = 62,5^\circ$. Für größere Einfallswinkel erhält man ein evaneszentes Feld im Probenraum mit einer charakteristischen Abklinglänge von wenigen hundert Nanometern. Dadurch werden nur Farbstoffe angeregt, die sich in unmittelbarer Nähe der Grenzfläche befinden. Die laterale Ausdehnung des Anregungsvolumens hängt vom Querschnitt des einfallenden Laserstrahls ab.

wobei

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_2^2 \sin^2 \beta - n_1^2}} \quad (8.3)$$

Das Intensitätsprofil in der x-y-Ebene hängt vom Profil des einfallenden Laserstrahls ab, wird also im Normalfall eine Gauß'sche Form haben. Aufgrund der Strahlgeometrie wird auf der Grenzfläche ein in x-Richtung gestreckter Gauß'scher Ellipsoid entstehen.

$$I(x, y) \sim \exp\left[-\frac{x^2}{x_0^2}\right] \exp\left[-\frac{y^2}{y_0^2}\right] \quad (8.4)$$

Die Größen x_0 und y_0 liegen abhängig von der Fokussierung im Bereich mehrerer μm . Im Vergleich zu der sehr kleinen Abklinglänge in z-Richtung spielt die Ausdehnung in der Ebene eine marginale Rolle. Die Moleküle werden auf einer relativ großen Fläche angeregt, aber nur dann, wenn sie der Grenzfläche sehr nahe kommen. Die Detektionsfunktion in Gleichung 3.2 muss dahingehend modifiziert werden, dass in z-Richtung nun kein Gauß'scher sondern ein exponentieller Abfall vorliegt. Da die Abfälle in x- und y-Richtung im Vergleich dazu sehr groß sind, soll die Detektionsfunktion als konstant in der Ebene genähert werden.

$$W(z) = W_0 \cdot \exp\left[-\frac{z}{d}\right] \quad (8.5)$$

Die Tatsache, dass sowohl diffusive Prozesse als auch Adsorption an die Oberfläche zu Veränderungen in der Intensität führen können, hat eine sehr komplexe Autokorrelationsfunktion zur Folge [125]. Hier soll nur kurz auf die beiden Spezialfälle eingegangen werden, bei denen entweder keine Bindung an die Oberfläche vorliegt oder nur die Bindung selbst betrachtet wird. Beide Fälle sind auch experimentell von Bedeutung. Mit dem Buchstaben A sollen Teilchen in Lösung, mit dem Buchstaben C gebundene Teilchen bezeichnet werden.

Grenzfall verschwindender Oberflächenbindung

Findet keine Bindung an die Oberfläche statt, so rühren Fluktuationen von der Diffusion der Teilchen in z -Richtung her. Diffusion in der Ebene kann auf Grund der großen Fläche vernachlässigt werden. Die Autokorrelationsfunktion hat dann folgende Form:

$$\frac{G(t)}{G_A(0)} = (1 - 2R_e t) \cdot w\left(i\sqrt{R_e t}\right) + 2\sqrt{\frac{R_e t}{\pi}} \quad (8.6)$$

mit der von der Anzahl der Teilchen N_A im effektiven Volumen abhängigen Amplitude

$$G_A(0) = \frac{1}{2N_A} \quad (8.7)$$

und der monoton fallenden Funktion

$$w(\xi) = \exp(-\xi^2) \operatorname{erfc}(-i\xi) \quad (8.8)$$

wobei $\operatorname{erfc}(z) = 1 - \operatorname{erf}(z)$ die komplementäre Fehlerfunktion ist. R_e ist die Transportrate durch das evaneszente Feld und von der Diffusionskonstanten D und der Abklinglänge d abhängig

$$R_e = \frac{D}{d^2} \quad (8.9)$$

Grenzfall dominierender Oberflächenbindung

Spielt der Diffusionsprozess für die Fluktuationen dagegen eine untergeordnete Rolle, so kann die Autokorrelationsfunktion beschrieben werden durch

$$\frac{G(t)}{G_C(0)} = \frac{\sqrt{R_1} w(-i\sqrt{R_2 t}) - \sqrt{R_2} w(-i\sqrt{R_1 t})}{\sqrt{R_1} - \sqrt{R_2}} \quad (8.10)$$

Dabei ist die Amplitude der Quotient aus der relativen Anzahl unbesetzter Bindungsstellen β und der Anzahl der gebundenen Teilchen N_C

$$G_C(0) = \frac{\beta}{N_C} \quad (8.11)$$

Die Raten sind

$$\begin{aligned} \sqrt{R_1} &= -\frac{R_r}{2\sqrt{R_t}} + \sqrt{\frac{R_r^2}{4R_t} - R_r} \\ \sqrt{R_2} &= -\frac{R_r}{2\sqrt{R_t}} - \sqrt{\frac{R_r^2}{4R_t} - R_r} \end{aligned} \quad (8.12)$$

wobei

$$R_r = k_a \langle A \rangle + k_d \quad (8.13)$$

die Reaktionsrate ist, die von der Absorptionsrate k_a , der Desorptionsrate k_d und der Konzentration $\langle A \rangle$ der Teilchen in Lösung zusammengesetzt ist. In der Transportrate

$$R_t = D \left(\frac{\langle A \rangle}{\beta \langle C \rangle} \right)^2 \quad (8.14)$$

ist noch die Konzentration $\langle C \rangle$ der Teilchen an der Oberfläche enthalten. Die Transportrate bestimmt, wie schnell durch Diffusion in der Lösung ein eventuell freigewordener Platz an der Oberfläche wieder besetzt werden kann. Die Besetzung an sich wird von der Reaktionsrate gesteuert. Hier kann wieder zwischen zwei Grenzfällen unterschieden werden.

Ist die Reaktionsrate viel kleiner als die Transportrate ($R_r \ll R_t$), was bedeutet, dass zu jeder Zeit genügend Teilchen für eine Bindung an einen freien Oberflächenplatz bereitstehen, dann nimmt die Autokorrelationsfunktion die einfachste Form an:

$$G(t) = \frac{\beta}{N_C} \cdot \exp(-R_r t) \quad (8.15)$$

Der exponentielle Abfall der Korrelationsfunktion ist dann alleine von der Reaktionsrate bestimmt. Im entgegengesetzten Fall ($R_r \gg R_t$) ist die Reaktion ganz davon abhängig, wie schnell die Teilchen an eine freie Stelle geschafft werden können. Die Autokorrelation wird

$$G(t) = \frac{\beta}{N_C} \cdot w \left(i\sqrt{R_t t} \right). \quad (8.16)$$

Es gibt in der Literatur inzwischen einige Arbeiten, die sich mit der Bindungskinetik an Oberflächen beschäftigen. Angefangen bei den ersten Arbeiten gleich nach der Entwicklung der Methode Anfang der 1980er Jahre [126] [127] bis zu aktuellen Arbeiten [128] [129], bei denen auch zum ersten Mal die Kinetik einer spezifischen Ligand-Rezeptor-Bindung untersucht wurde [130]. Auch die reine Diffusion nahe von Grenzflächen wurde vor kurzem untersucht [131]. Die Methode erlaubt es außerdem Konzentrationsbestimmungen an der Oberfläche durchzuführen [132].

Auf einem ähnlichen Prinzip basiert auch eine weitere Modifikation des FCS, bei der mit sogenannten *Zero-Mode Waveguides* gearbeitet wird [133]. In einer Metallschicht werden dabei vertikale zylindrische Hohlräume geschaffen, deren Durchmesser kleiner als die Wellenlänge des Lichts sind. Lichtwellen können nicht durch diese Hohlräume gelangen. Die Intensität eines von unten auf die Hohlräume treffenden Laserstrahls klingt exponentiell ab. Das effektive Beobachtungsvolumen liegt im Bereich von einigen Attolitern (10^{-21} m^3), was Messungen bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von bis zu 1 mM ermöglicht.

8.2. Aufbau

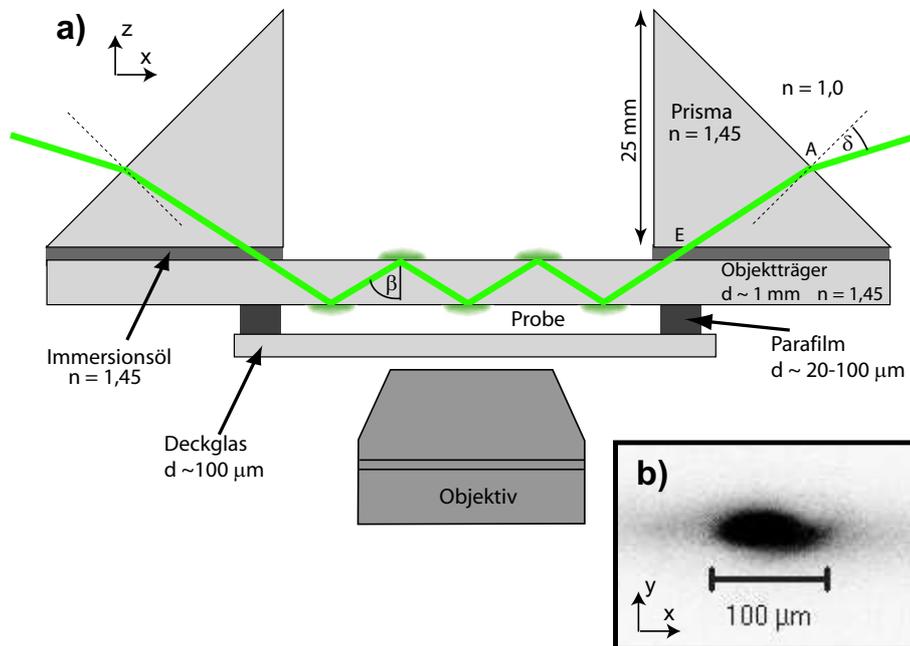


Abbildung 8.2.: a) Skizze des Versuchsaufbaus zur Erzeugung totaler interner Reflexion. An der Unterseite des Objektträgers entsteht ein evaneszentes Feld, in dem Farbstoffe angeregt werden können. b) LSM-Aufnahme eines TIRF-Flecks.

Die gewünschte Laserlinie wird vom Lasermodul auf den optischen Tisch ausgekoppelt. Mit optischen Linsen wird möglichst paralleles Licht erzeugt. Dieses wird dann von einer letzten Linse mit der Brennweite $f = 100\text{ mm}$ fokussiert. Ungefähr 80 mm hinter dieser letzten Linse trifft der Lichtstrahl wie in Abbildung 8.2 a) skizziert auf die lange Seite eines Prismas. Um den Strahl wie angedeutet in totaler interner Reflexion durch den Objektträger zu führen, müssen sowohl der Auftreffpunkt A als auch der Einfallswinkel δ auf das Prisma sorgfältig gewählt sein. Dem Strahl muss die Möglichkeit gegeben sein, am Punkt E über eine dünne Schicht Immersionsöl in den Objektträger einzutreten. Der Winkel β hängt direkt vom Winkel δ ab und muss größer als der Grenzwinkel sein. Dann durchläuft der Strahl mit mehreren Reflexionen an Unter- und Oberseite den Objektträger und wird von einem zweiten Prisma auf der linken Seite wieder ausgekoppelt. Mit Parafilm und Deckgläschen lässt sich auf einfache Art und Weise an der Unterseite des Objektträgers ein Zwischenraum für Proben in wässriger Umgebung erzeugen.

Abbildung 8.2 b) enthält ein Laser-Scanning-Mikroskopie-Bild eines TIRF-Flecks an der Unterseite des Objektträgers. Um möglichst hohe evaneszente Intensitäten zu erzeugen, sind kleine konzentrierte Flecke von Vorteil. Entscheidende Faktoren sind dabei die Fokussierung des Lasers, die Qualität des Prismas und des Objektträgers und eine

möglichst dünne, blasenfreie Immersionsschicht.

Die Detektion bei FCS-Messungen erfolgt wie üblich im konfokalen Modus. Das Pinhole sollte dabei möglichst zentral im TIR-Fleck liegen.

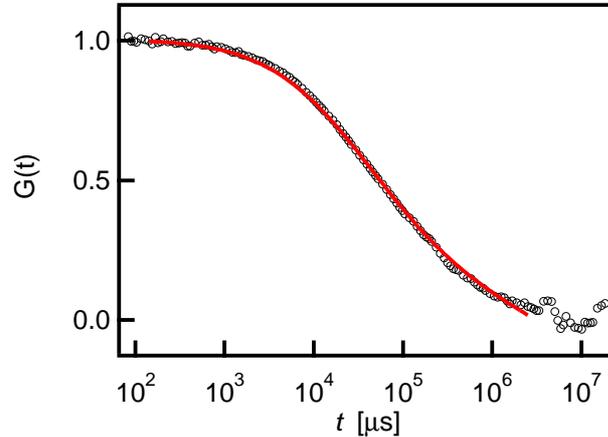


Abbildung 8.3.: Korrelationsfunktion einer Lösung von fluoreszenzmarkierten Kugeln mit 200 nm Durchmesser. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung gemäß Gleichung 8.6.

Abbildung 8.3 zeigt eine erste Testmessung mit dem beschriebenen Aufbau. Bei der Probe handelt es sich um fluoreszenzmarkierte Kugeln mit 200 nm Durchmesser (Fluospheres Yellow-green 505/515, 0,2 µm, Molecular Probes, F-8811). Diese Kugeln tragen mehrere Farbstoffe. Ihre Helligkeit entspricht mehreren Tausend Fluoresceinmolekülen. Die Glasoberfläche war in keiner Weise modifiziert, sodass der Grenzfall verschwindender Oberflächenbindung in Gleichung 8.6 gilt. Die angepasste Transportrate ist $R_e = 57 \pm 1 \text{ s}^{-1}$. Die Diffusionskonstante der Kugeln lässt sich durch den Radius abschätzen. Es ergibt sich:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \approx \frac{4,05 \text{ pN nm}}{6\pi \cdot 1 \text{ mPa s} \cdot 100 \text{ nm}} = 2,2 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1} \quad (8.17)$$

Weiter lässt sich daraus die Abklinglänge des evaneszenten Feldes abschätzen:

$$d = \sqrt{\frac{D}{R_e}} \approx \sqrt{\frac{2,2 \mu\text{m}^2}{57}} \approx 200 \text{ nm} \quad (8.18)$$

Um Reaktionskinetik an Oberflächen zu studieren, ist es notwendig, einzelne Farbstoffe detektieren zu können. Moleküle, die an die Oberfläche binden, sollten durch Farbstoffe so wenig wie möglich gestört sein. Das Messprinzip wurde hier erfolgreich getestet. Das weitere Ziel muss das Erreichen der Einzelmolekülsensitivität sein.

9. Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit FCS quantitative Messungen an DNA und Aktin möglich sind. Die Untersuchung der Dynamik in der lebenden Zelle ist die logische Fortführung dieser Arbeit. Abbildung 9.1 zeigt das Fluoreszenzbild einer Zelle, deren Aktin mit GFP markiert ist. FCS bietet den Vorteil, das kleine Beobachtungsvolumen innerhalb der Zelle an verschiedenen Positionen zu platzieren und so die Transportprozesse lokal zu analysieren. In der intakten Zelle liefert die Anpassung der Modellfunktion Parameter, die mit denen der Aktinfilamente in halbverdünnter Lösung bei einer Konzentration von 1 mg/ml übereinstimmen (siehe Abschnitt 5.7). Allerdings können die Parameter auch mit anomaler Diffusion von Aktinmonomeren im Cytoplasma der Zelle erklärt werden. Nach Zerstörung der Zellmembran kann das Aktin in das umgebende Zellmedium diffundieren. Die resultierende Korrelationsfunktion kann als Diffusion des G-Aktins in einer Flüssigkeit mit der Viskosität von $\eta \approx 2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ interpretiert werden. Sowohl die Analyse der Monomerdynamik als auch des Diffusionsverhaltens der Ketten könnte dazu beitragen, intrazelluläre Transportprozesse und deren Auswirkungen auf die Zellbewegung besser zu verstehen.

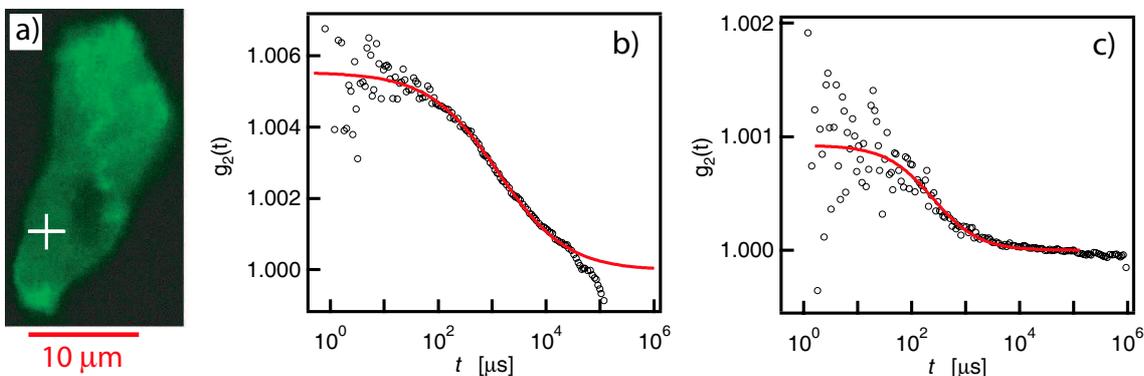


Abbildung 9.1.: a) Laser-Scanning-Mikroskopie-Bild einer Dictyosteliumzelle, in der das Aktin mit GFP (*Green Fluorescent Protein*) markiert ist. Das weiße Kreuz markiert die Stelle, an der FCS gemessen wurde. b) Autokorrelationsfunktion innerhalb der lebenden Zelle. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung mit dem Modell für Diffusion mit interner Dynamik. Die resultierenden Parameter sind $\tau = (1300 \pm 100) \mu\text{s}$ und $\beta = 0,68 \pm 0,03$. c) FCS-Messung nach der Zerstörung der Zellmembran. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung mit dem Modell für normale Diffusion und liefert $\tau = (240 \pm 20) \mu\text{s}$.

Für Messungen innerhalb lebender Zellen ist die Zwei-Photonen-Anregung von Vorteil [134]. Bei dieser Methode geschieht die Anregung des Farbstoffes durch zwei Photonen der jeweils halben Energie. Streulicht spielt auf Grund der großen Differenz der Anregungs- und Detektionswellenlänge kaum eine Rolle. Das effektive Volumen, in dem die Photonendichte groß genug für die Anregung des Farbstoffes ist, ist kleiner als bei der klassischen Methode mit der konfokalen Detektion. Um noch kleinere Beobachtungsvolumina zu erzeugen, kann FCS in Zukunft auch mit der STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion*) kombiniert werden. Bei dieser Art der Mikroskopie findet in einem Teil des Beobachtungsvolumens die stimulierte Emission des Farbstoffs in den Grundzustand statt [135]. Dadurch lässt sich das detektierte Volumen unter die Abbesche Beugungsgrenze verkleinern.

Die Doppelfokusbildungsmethode ist technisch ausgereift. Der flexible Aufbau erlaubt eine einfache Veränderung des Abstandes der beiden Beobachtungsvolumina über die Wahl des Objektivs. Zu kleinen Abständen hin ist die Methode allerdings beschränkt, da bei zu großem Überlapp der beiden Foki sich die Kreuzkorrelation immer mehr der Autokorrelation annähert. Für Geschwindigkeiten kleiner als $100 \mu\text{m s}^{-1}$ gilt es, einen idealen Kompromiss zwischen Fokusüberdeckung und minimalem Abstand auszuloten.

A. Zur Nomenklatur in Streuexperimenten

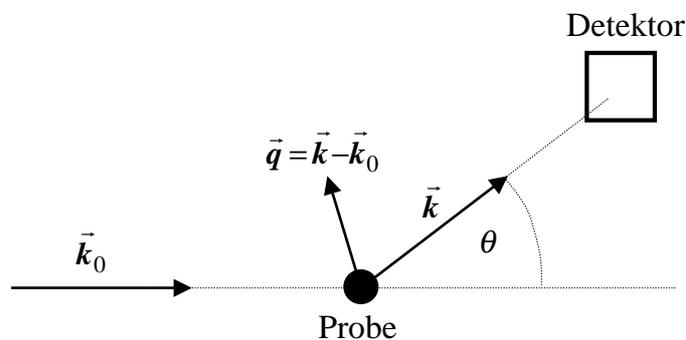


Abbildung A.1.: Schema der Streugeometrie. \mathbf{k}_0 ist der einfallende Wellenvektor, \mathbf{k} der gestreute und \mathbf{q} ist die Differenz der beiden. θ ist der Streuwinkel.

Abbildung A.1 zeigt das Schema eines Streuexperimentes. Der Wellenvektor des einfallenden Strahles wird mit \mathbf{k}_0 bezeichnet, der des gestreuten Strahles mit \mathbf{k} . Die Differenz der beiden ist der Streuvektor \mathbf{q} .

$$\mathbf{q} = \mathbf{k} - \mathbf{k}_0 \quad (\text{A.1})$$

Mit dem Winkel θ zwischen einfallendem und gestreutem Strahl ergibt sich mit $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ für den Betrag des Streuvektors:

$$q = |\mathbf{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{A.2})$$

Typische Röntgenstrahlung hat eine Wellenlänge von $\lambda \approx 0,15 \text{ nm}$. Um also Strukturen im Nanometerbereich aufzulösen, muss man bei kleinen Winkeln streuen; bekannt unter der Abkürzung SAXS (*englisch: Small Angle X-ray Scattering*). Die winkelabhängige Intensität $I(q)$ ist verknüpft mit der Fouriertransformierten der Elektronendichte in der Probe. SAXS gehört zu den Standardmethoden, um Strukturen in Polymerlösungen, -schmelzen und -kristallen aufzulösen.

Dynamische Lichtstreuung erlaubt es, zeitliche Prozesse in Lösungen zu messen. Das Licht wird an Polarisierbarkeitsgradienten gestreut. Die zeitabhängige Intensität, die unter verschiedenen Streuvektoren gemessen wird, wird autokorreliert. Dynamische Prozesse treten in der resultierenden Funktion als charakteristische Abfälle auf entsprechenden Zeitskalen zu Tage. Die Diffusionskonstante erhält man durch eine Extrapolation der nullten Mode auf den Streuvektor $q = 0$.

Mit Neutronen-Spin-Echo-Messungen können auch interne Relaxationsmoden in Polymeren quantitativ erfasst werden. Die Markierung der Ketten durch den Austausch zum Beispiel des Wasserstoffs mit Deuterium ist einerseits der Schritt, der die Messungen präparativ sehr kompliziert werden lässt, auf der anderen Seite aber die gezielte Beobachtung der Monomerdynamik erlaubt. Dies ist möglich, da für Neutronen Isotope einen veränderten Streuquerschnitt besitzen. Die Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Streumethoden zur Untersuchung weicher kondensierter Materie sind zum Beispiel in [136] beschrieben.

B. Explizite Berechnung der FCS-Korrelationsfunktion

Berechnung der Transferfunktion

Die Detektionsfunktion der Apparatur lautet:

$$W(\mathbf{r}) = W_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{r_0^2}} e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \quad (\text{B.1})$$

Um die Transferfunktion zu erhalten, benötigt man die Fouriertransformierte dieser Funktion:

$$\begin{aligned} W(\mathbf{q}) &= \text{FT} \{W(\mathbf{r})\} \\ &= \text{FT} \left\{ W_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{r_0^2}} e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \right\} \\ &= \frac{W_0}{(2\pi)^{3/2}} \int e^{-\frac{2x^2}{r_0^2}} e^{-\frac{2y^2}{r_0^2}} e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} e^{i\mathbf{q}\mathbf{r}} d^3\mathbf{r} \\ &= \frac{W_0}{(2\pi)^{3/2}} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{2x^2}{r_0^2} + iq_x x} e^{-\frac{2y^2}{r_0^2} + iq_y y} e^{-\frac{2z^2}{z_0^2} + iq_z z} dx dy dz \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

Um das Integral explizit zu lösen, veranstalten wir eine kleine Nebenrechnung:

$$h_x = e^{-\frac{2}{r_0^2}x^2 + iq_x x} = e^{-\frac{2}{r_0^2}(x^2 - \frac{1}{2}r_0^2 q_x x)} \quad (\text{B.3})$$

Der Exponent wird quadratisch ergänzt.

$$\begin{aligned} h_x &= e^{-\frac{2}{r_0^2}[x^2 - \frac{1}{2}r_0^2 q_x x + (\frac{1}{4}r_0^2 q_x)^2 - (\frac{1}{4}r_0^2 q_x)^2]} \\ &= e^{-\frac{2}{r_0^2}[x - \frac{1}{4}r_0^2 q_x]^2} \cdot e^{\frac{2}{r_0^2}(\frac{1}{4}r_0^2 q_x)^2} \\ &= e^{-\frac{2}{r_0^2}[x - \frac{1}{4}r_0^2 q_x]^2} \cdot e^{-\frac{1}{8}r_0^2 q_x^2} \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

Die Hilfsfunktion h_x lässt sich analytisch über x integrieren:

$$\int_{-\infty}^{\infty} h_x dx = e^{-\frac{1}{8}r_0^2 q_x^2} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{2}{r_0^2}[x - \frac{1}{4}r_0^2 q_x]^2} dx = e^{-\frac{1}{8}r_0^2 q_x^2} \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}} r_0 \quad (\text{B.5})$$

B. Explizite Berechnung der FCS-Korrelationsfunktion

Dabei wurde folgende Relation benutzt:

$$\int_0^{\infty} e^{-a^2 x^2} dx = \frac{\sqrt{\pi}}{2a} \quad (\text{B.6})$$

Die Integrale über y und z lassen sich analog lösen. Damit haben wir das Geheimnis um die Fouriertransformierte gelöst.

$$\begin{aligned} W(\mathbf{q}) &= \frac{W_0}{(2\pi)^{3/2}} \cdot \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} r_0^2 z_0 \cdot e^{-\frac{1}{8}r_0^2 q_x^2} e^{-\frac{1}{8}r_0^2 q_y^2} e^{-\frac{1}{8}z_0^2 q_z^2} \\ &= \frac{W_0}{8} r_0^2 z_0 \cdot e^{-\frac{1}{8}r_0^2 (q_x^2 + q_y^2)} e^{-\frac{1}{8}z_0^2 q_z^2} \end{aligned} \quad (\text{B.7})$$

Die Transferfunktion $\Phi(\mathbf{q})$ lautet damit:

$$\Phi(\mathbf{q}) = W(\mathbf{q})W(-\mathbf{q}) = \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \cdot e^{-\frac{1}{4}r_0^2 (q_x^2 + q_y^2)} e^{-\frac{1}{4}z_0^2 q_z^2} \quad (\text{B.8})$$

Über den q -Raum integriert ergibt sich die für den Idealfall punktförmiger Teilchen benötigte Normierungskonstante in Gleichung 3.13

$$\begin{aligned} \int \Phi(\mathbf{q}) d^3 \mathbf{q} &= \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{1}{4}r_0^2 q_x^2} e^{-\frac{1}{4}r_0^2 q_y^2} e^{-\frac{1}{4}z_0^2 q_z^2} dq_x dq_y dq_z \\ &= \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \cdot \frac{\pi^{3/2} 8}{r_0^2 z_0} \\ &= \frac{W_0^2}{8} \pi^{3/2} r_0^2 z_0 \end{aligned} \quad (\text{B.9})$$

Integration der Korrelationsfunktion

Die Korrelationsfunktion für den idealen Fall einer einkomponentigen Lösung lautet:

$$\begin{aligned} g_2(t) &= 1 + \frac{1}{\rho V_{\text{eff}}} \frac{\int \Phi(\mathbf{q}) e^{-Dtq^2} d^3 \mathbf{q}}{\int \Phi(\mathbf{q}) d^3 \mathbf{q}} \\ &= 1 + \frac{1}{N} \frac{\int \Phi(\mathbf{q}) e^{-Dtq^2} d^3 \mathbf{q}}{\frac{W_0^2}{8} \pi^{3/2} r_0^2 z_0} \end{aligned} \quad (\text{B.10})$$

Das Integral im Zähler wird zu

$$\begin{aligned} I_1 &= \int \Phi(\mathbf{q}) e^{-Dtq^2} d^3 \mathbf{q} \\ &= \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-(\frac{1}{4}r_0^2 + Dt)q_x^2} e^{-(\frac{1}{4}r_0^2 + Dt)q_y^2} e^{-(\frac{1}{4}z_0^2 + Dt)q_z^2} dq_x dq_y dq_z \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \pi^{\frac{3}{2}} \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{4}r_0^2 + Dt}} \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{4}r_0^2 + Dt}} \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{4}z_0^2 + Dt}} \\
&= \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \pi^{\frac{3}{2}} \frac{1}{\frac{1}{4}r_0^2 + Dt} \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{4}z_0^2 + Dt}}
\end{aligned} \tag{B.11}$$

Dabei wurde folgende Relation benutzt:

$$\int_0^\infty e^{-a^2 x^2} dx = \frac{\sqrt{\pi}}{2a} \tag{B.12}$$

Mit $\tau = \frac{r_0^2}{4D}$ und $f = \frac{z_0}{r_0}$ folgt

$$\begin{aligned}
I_1 &= \frac{W_0^2}{64} r_0^4 z_0^2 \pi^{\frac{3}{2}} \frac{1}{\frac{r_0^2}{4} \left(1 + \frac{t}{\tau}\right)} \frac{1}{\frac{z_0}{2} \left(\sqrt{1 + \frac{t}{f^2 \tau}}\right)} \\
&= \frac{W_0^2}{8} r_0^2 z_0^2 \pi^{\frac{3}{2}} \frac{1}{\left(1 + \frac{t}{\tau}\right)} \frac{1}{\left(\sqrt{1 + \frac{t}{f^2 \tau}}\right)}
\end{aligned}$$

und damit als Ergebnis Gleichung 3.14

$$g_2(t) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{f^2 \tau}}} \tag{B.13}$$

C. Verwendete Materialien

Polymer	DNA	Aktin	Hyaluronsäure
Molekulargewicht M_W [$\frac{g}{mol}$]	≈ 650	≈ 42000	≈ 400
Bindungslänge b [nm]	0,34	$\approx 2,7$	≈ 1
Persistenzlänge l_p [nm]	50	≈ 16000	≈ 8
Ladungsdichte σ [e/nm]	-5,9	-4	-0,7

Tabelle C.1.: Charakteristische Daten der verwendeten Polymere. Das Molekulargewicht bezieht sich auf eine Monomereinheit. Die Bindungslänge ist ein Mittelwert, der das Verhältnis von Gesamtlänge L zur Anzahl der Monomereinheiten N wiedergibt. Die Ladungsdichte ist eine lineare Ladungsdichte.

C.1. DNA

DNA ist die englische Abkürzung für *Desoxyribonukleinsäure*. Eine Monomereinheit einer DNA-Kette besteht aus einer speziellen Form eines Zuckers, der sogenannten Desoxyribose, an die auf einer Seite eine Phosphatgruppe gebunden ist. An der gegenüberliegenden Seite sitzt eine sogenannte Base. Die vier Basen, die man in DNA findet, sind Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Die Monomereinheiten lassen sich über Phosphodiesterbindungen zu Ketten polymersieren. Die Phosphatgruppe und die Desoxyribose bilden dabei das Rückgrat. Die Reihenfolge der vier verschiedenen Basen entlang der Kette bildet die Sequenz der DNA. Die vier Basen haben die Eigenschaft, dass sie paarweise komplementär sind, d.h. A kann über Wasserstoffbrückenbindungen an T und G an C binden. So gibt es zu jeder Basensequenz eine eindeutige Komplementärsequenz. Zwei lange Einzelstränge, die zueinander komplementär sind, haben eine hohe Bindungsenergie. Pro Basenpaarbindung wenige $k_B T$. Die beiden Einzelstränge binden aneinander, wobei die beiden Rückgrate aus Phosphat und Desoxyribose eine Doppelhelix bilden. Die Ganghöhe der Helix beträgt elf Basenpaare. Die Doppelhelix sorgt für eine relativ große mechanische Steifigkeit im Gegensatz zum Einzelstrang. Pro Basenpaar sorgen die zwei Phosphatgruppen für zwei negative Ladungen entlang der Kettenkontur. Auf die biologische Funktion von DNA als Träger des genetischen Codes soll hier nicht eingegangen werden. Eine Einführung bietet zum Beispiel ein Buch von Watson [137].

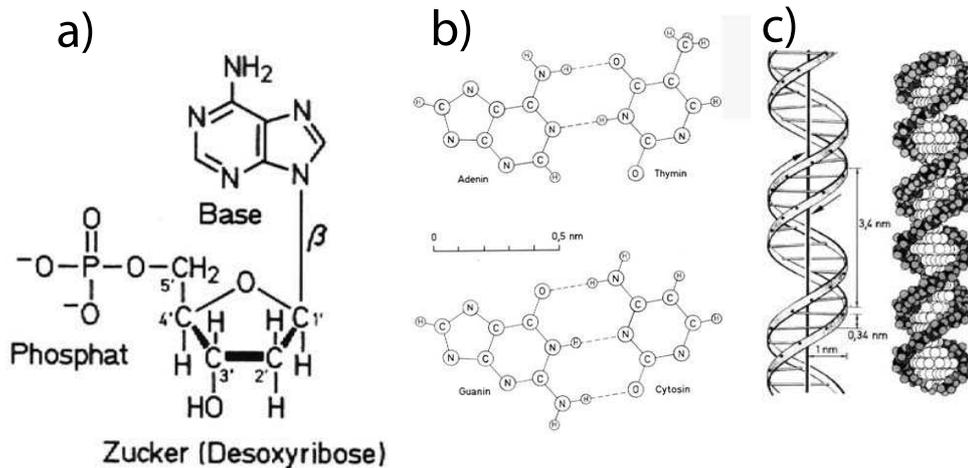


Abbildung C.1.: Chemische Struktur von DNA. **a)** Die Monomereinheit, das sogenannte Nucleotid, besteht aus einem Phosphat, einem Zucker und einer der vier Basen. **b)** Die vier Basen können wie angedeutet paarweise über Wasserstoffbrücken binden. **c)** Über die Bindung zweier komplementärer Einzelstränge entsteht die Doppelhelix. Hier gezeigt ist die sogenannte B-Form. Daneben existieren noch andere Möglichkeiten der Sekundärstruktur (A-Form, Z-Form), auf die aber hier nicht eingegangen wird.

DNA eignet sich als Modellsystem für semiflexible Polymere auch deshalb so gut, weil das Spektrum an verfügbaren Längen sehr groß ist und inzwischen einfach herzustellen sind. Bei der in dieser Arbeit verwendeten DNA handelt es sich ausschließlich um lineare, doppelsträngige DNA. Tabelle C.1 fasst die wichtigsten physikalischen Parameter zusammen.

In dieser Arbeit wurde DNA mit unterschiedlichen Längen verwendet.

- Die Fragmente mit einer Länge von $L = 812 \text{ bp} \approx 270 \text{ nm}$ und $L = 1019 \text{ bp} \approx 340 \text{ nm}$ wurden mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) hergestellt.
- Die Fragmente mit einer Länge von $L = 2686 \text{ bp} \approx 900 \text{ nm}$ und $L = 7250 \text{ bp} \approx 3,2 \mu\text{m}$ wurden aus kommerziell erwerblicher Plasmid-DNA gewonnen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Plasmide pUC19 (2686 bp) und M13mp18 (7250 bp) sind geschlossene DNA-Ringe. Beide Plasmide besitzen eine einzelne Schnittstelle für das Restriktionsenzym *ECO R1* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Damit lassen sich die Ringe zu linearen Polymeren aufschneiden.
- λ -DNA ($48502 \text{ bp} \approx 16 \mu\text{m}$) wurde bei MBI Fermentas gekauft. Diese DNA wird aus dem Erbgut der λ -Phage gewonnen.

Die Markierung der DNA geschah in dieser Arbeit ausschließlich mit interkalierenden Farbstoffen der Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande). Zum einen wur-

de TOTO-1 benutzt (Bestellnummer: T-3600, Absorption: 514 nm, Emission: 533 nm), zum anderen YOYO-1 (Bestellnummer: Y-3601, Absorption: 491 nm, Emission: 509 nm). Diese Farbstoffe haben den großen Vorteil, dass sie im ungebundenen Zustand eine um Größenordnungen kleinere Quantenausbeute besitzen und deshalb im Vergleich zu den an DNA gebundenen Farbstoffen fast unsichtbar sind. Die Bindung selbst ist keine kovalente Bindung, sondern funktioniert über hydrophobe Wechselwirkungen. Der dimere Farbstoff klammert sich in die Doppelhelix der DNA.

Der verwendete Puffer TE setzt sich zusammen aus 10 mM Tris, mit dem der pH-Wert der Lösung stabil auf dem Wert 7,8 gehalten wurde, und 1 mM EDTA, das zweiwertige Ionen in der Lösung einfängt, um deren Kondensation an der DNA zu verhindern. Bei einigen Messungen wurde zusätzlich noch NaCl zugegeben.

Bei allen Proben wurden DNA-Lösung und Farbstofflösung im Lösungsmengenverhältnis 1:1 gemischt. Die DNA- und Farbstoffkonzentrationen entscheiden dann über die Labeldichte entlang den DNA-Ketten. Die Proben wurden anschließend etwa eine Stunde bei 37°C leicht geschüttelt. Bei sehr hohen Farbstoffkonzentrationen wird die Länge und die Persistenzlänge der DNA vom Farbstoff beeinflusst [19]. Bei den hier verwendeten relativ niedrigen Labeldichten kann dieser Effekt aber vernachlässigt werden.

C.2. Aktin

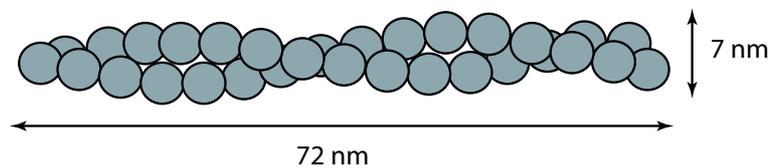


Abbildung C.2.: Ausschnitt aus einem Aktinfilament. Die Ganghöhe der Helix beträgt 72 nm, die Dicke liegt bei 7 nm.

Aktin gehört zur Familie der Proteine. Ein Aktinmonomer, sogenanntes G-Aktin, ist selbst ein Polymer aus einer definierten Sequenz aus 375 Aminosäuren, aufgeteilt in zwei Domänen. Die Struktur dieses Proteins ist nahezu globular. Die Ausmaße sind 3,3 nm * 5,6 nm * 5,0 nm. In ausreichender Konzentration (≈ 1 mg/ml) und in Anwesenheit von Magnesiumionen polymerisieren die Aktinmonomere zu linearen Filamenten, sogenanntem F-Aktin. Phalloidin, das Gift des gelben Knollenblätterpilzes, lagert sich bei Zugabe an die Filamente an und stabilisiert diese. Mit Phalloidin lässt sich die Aktinfilamentkonzentration bis in den verdünnten Bereich senken, ohne dass die Filamente depolymerisieren. Die typische Länge der Filamente liegt im Mikrometerbereich, abhängig von der Qualität der einzelnen Monomere. Die Länge der Filamente ist statistisch verteilt, es handelt sich also im Gegensatz zu vielen DNA-Proben um ein polydisperses

System. Der Mittelwert der Länge lässt sich jedoch mit einem sogenannten Capping-Protein, dem Gelsolin, beeinflussen. Die Konzentration von Gelsolin im Verhältnis zum G-Aktin entscheidet über die Länge.

Aktinfilamente stabilisieren neben Mikrotubuli die Form von lebenden Zellen. Entlang den Filamenten sorgen auch molekulare Motoren wie Myosin für intrazellulären gerichteten Transport. Ideal für die Zelle sind die hohe Steifigkeit und die Steuerungsmöglichkeit der Polymerisation der Filamente, was der Zelle erlaubt, sich in bestimmte Richtungen zu bewegen.

Das in dieser Arbeit verwendete Aktin wurde freundlicherweise von der Gruppe um Michael Bärmann (Physik Department, E22, TU München) zur Verfügung gestellt. Es stammt vom Rückenmuskel von Kaninchen. Die Aufreinigung des Proteins ist in der Literatur beschrieben [138] [139] [140]. Die Markierung des G-Aktin wurde durch die kovalente Bindung von Rhodamin an das Protein erreicht.

Besonders kritisch bei Messungen mit Aktin ist die Qualität der Proben. Schon FCS-Messungen an monomerem G-Aktin lassen auf die Beschaffenheit des verwendeten Materials schließen. Aktin hat die Eigenschaft, dass es sehr schnell degradiert und somit unbrauchbar wird, da es aggregiert und nicht mehr zu Filamenten polymerisieren kann. Bei einer Lagerung auf Eis (0°C) hält sich Aktin ungefähr eine Woche lang. Besonders empfindlich ist fluoreszenzgelabeltes Aktin. Die kommerziell erworbenen Proben, bei denen das Aktin mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 markiert ist (Molecular Probes, A-12373), war bereits zu Beginn der Messungen so degradiert, dass mit FCS deutliche Aggregate nachzuweisen waren, deren Größe die bekannten Ausmaßen von G-Aktin (3,3 nm * 5,6 nm * 5,0 nm) weit überstiegen.

Unmarkiertes und markiertes G-Aktin wurden im Verhältnis 9 : 1 in G-Puffer (siehe unten) gemischt. Die Absolutkonzentration betrug zwischen 1 und 4 mg/ml. Der Übergang in F-Puffer startet die Polymerisation der Filamente. Die mittlere Länge der Filamente kann durch die Konzentration von Gelsolin (ebenfalls von M. Bärmann zur Verfügung gestellt) beeinflusst werden. Es gilt:

$$\langle L \rangle = \frac{[\text{G-Aktin}]/[\text{Gelsolin}]}{370} \mu\text{m} \quad (\text{C.1})$$

Das molare Verhältnis der Aktin- und der Gelsolinkonzentration bestimmt also die Länge.

Nach 20 Minuten Polymerisation wurde Phalloidin (Molecular Probes, P-3457) im molaren Verhältnis Phalloidin : G-Aktin = 1 : 4 zugegeben, um die Filamente zu stabilisieren. Erst dann wurde die Lösung verdünnt auf die gewünschte Messkonzentration. Der mittlere Abstand der Farbstoffe entlang der Kette betrug ungefähr 28 nm, da jedes zehnte Monomer markiert war.

Als Puffer wurden verwendet:

G-Puffer

- 2 mM Tris/HCl pH 7.4
- 0.5 mM ATP
- 0.2 mM CaCl₂
- 0.2 mM Dithiothreitol
- 0.2 % NaN₃

F-Puffer

- G-Puffer +
- 2 mM MgCl₂
- 100 mM KCl

C.3. Hyaluronsäure

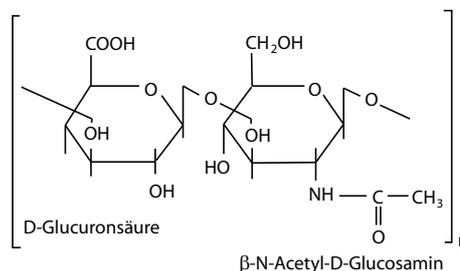


Abbildung C.3.: Monomereinheit der Hyaluronsäure (HA).

Hyaluronsäure (Abkürzung: HA vom englischen *Hyaluronic Acid*) ist wie DNA und Aktin auch ein lineares Polymer. Das Polysaccharid besteht aus alternierenden Einheiten von Glucuronsäure und N-Acetyl-Glucosamin. Einige der physikalischen Parameter sind in Tabelle C.1 zusammengefasst. Hyaluronsäure stellt für die extrazelluläre Matrix beim Menschen ein wichtiges Element dar. Sie kommt zum Beispiel vor in der Haut, in Knorpeln, im Glaskörper des Auges und in der Nabelschnur. Die hier verwendeten Proben wurden aus Nabelschnüren gewonnen (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Bestellnummer: 53730). Das Molekulargewicht lag bei 200000 – 800000, was einer Kontrurlänge im Bereich von 1 μm entspricht. Mehr Informationen zu Hyaluronsäure gibt es zum Beispiel im Internet ¹.

¹<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>

Abbildungsverzeichnis

2.1.	DNA-Molekül auf verschiedenen Längenskalen	6
2.2.	Das <i>Freely Jointed Chain Model (FJC)</i>	7
2.3.	Formfaktoren von DNA unterschiedlicher Länge	11
2.4.	Theoretische Diffusionskonstante von DNA bei verschiedenen Modellen	20
3.1.	Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	24
3.2.	Intensitätssignal eines FCS-Experiments	25
3.3.	Autokorrelationsfunktion für Nanopartikel in Wasser	29
3.4.	Vereinfachtes Jablonskidiagramm zur Beschreibung des Triplettzustandes bei Fluoreszenzfarbstoffen.	31
3.5.	Triplettabfall in der Korrelationsfunktion	32
3.6.	Prinzip der Zweifarbenkorrelation	33
4.1.	Das verwendete Objektiv (Zeiss C-Apochromat 40x/1,2 W korr)	38
4.2.	Anregungsprofil des Lasers im Probenraum	39
4.3.	Die <i>Collection Efficiency Function (CEF)</i>	40
4.4.	Die <i>Molecule Detection Efficiency (MDE)</i>	41
4.5.	Hauptachsenschnitte durch die Profile der Laseranregung (Int), der <i>Collection Efficiency Function (CEF)</i> und der <i>Molecule Detection Efficiency (MDE)</i>	42
4.6.	Schematischer Aufbau des Gerätes für Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie der Firma Zeiss	43
4.7.	Gemessene Intensitäten während des Verschiebens des Pinholes	45
4.8.	Autokorrelationskurve einer Farbstofflösung	46
4.9.	Autokorrelationsfunktionen einer Alexa633-Lösung für verschiedene Laserintensitäten	47
4.10.	Simulation der Auswirkung eines gesättigten Farbstoffes in einem FCS-Experiment	48
4.11.	Der Farbstoff YOYO-1 bei verschiedenen Laserintensitäten	50
5.1.	Korrelationsfunktion von λ -DNA	52
5.2.	Modell für den <i>Finite Birth and Death Process</i>	60

5.3.	Auswirkungen der Kurzzeitdynamik auf die Korrelationsfunktion	63
5.4.	Korrelationsfunktionen eines DNA-Fragments (812 bp) bei verschiedenen Labeldichten	64
5.5.	On- und Off-Rate gegen den Labelabstand entlang der Kette	64
5.6.	Formfaktoren für eine Kugel und für ein ideales Polymerknäuel	66
5.7.	Autokorrelationsfunktionen für Teilchen mit verschiedenen Formfaktoren	67
5.8.	Autokorrelationsfunktionen für DNA verschiedener Länge	68
5.9.	Autokorrelationsfunktion von verdünnter λ -DNA	69
5.10.	DNA unterschiedlicher Labeldichten im FCS-Experiment	71
5.11.	Autokorrelationsfunktionen von λ -DNA für verschiedene Labeldichten . .	72
5.12.	Diffusionszeit und Exponent bei Messungen an λ -DNA in Abhängigkeit der Labeldichte	74
5.13.	Inverse Off-Rate gegen den Labelabstand entlang der Kette	74
5.14.	Normierte Korrelationsfunktion von Rhodamingelabeltem G-Aktin	76
5.15.	Korrelationsfunktionen von Aktin für verschiedene mittlere Filamentlängen	77
5.16.	Diffusionszeit und Exponent von Aktin bei verschiedenen mittleren Längen	78
5.17.	Vergleich der Theorie mit experimentellen Daten für DNA verschiedener Länge	79
5.18.	Vergleich der Theorie mit experimentellen Daten für DNA verschiedener Länge	80
5.19.	Vergleich der Theorie mit experimentellen Daten für DNA verschiedener Labeldichte	81
5.20.	Vergleich der Theorie mit experimentellen Daten für Aktin verschiedener Länge	82
5.21.	Vergleich der Theorie mit experimentellen Daten für Aktin verschiedener Länge	83
5.22.	Hintergrund bei Messungen im Aktinnetzwerk	84
5.23.	Korrelationsfunktionen von Messungen im Aktinnetzwerk	85
5.24.	Korrelationsfunktionen von Aktin in einem Aktinnetzwerk unterschiedli- cher Konzentrationen	86
5.25.	Diffusionszeit von Aktin in einem Aktinnetzwerk unterschiedlicher Kon- zentrationen	87
6.1.	Autokorrelationsfunktionen für fluoreszenzmarkierte Nukleosome (NCP) in zwei verschiedenen Umgebungen	90
7.1.	Prinzip der Zwei-Foki-Messung	92
7.2.	Schematischer Aufbau der Anlage im Doppelfokusmodus	94
7.3.	Der Doppelfokus im LSM	95
7.4.	Kontrollmessungen mit dem Doppelfokusaufbau	96
7.5.	Flussprofil einer Newton'schen Flüssigkeit zwischen zwei ruhenden Platten	97
7.6.	Vereinfachte Darstellung des Flusses nahe einer festen Grenzfläche	98

7.7. Laminares Flussprofil einer Newton'schen Flüssigkeit und einer nicht-Newton'schen pseudoplastischen Flüssigkeit unter Scherverdünnung . . .	99
7.8. Viskosität als Funktion der Scherrate	100
7.9. Schematische Darstellung des verwendeten Flusssystems	100
7.10. Kreuzkorrelationsfunktionen in einem Flusskanal mit rechtwinkligem Querschnitt	101
7.11. Geschwindigkeitsprofil in einer Kammer mit $300\ \mu\text{m}$ Höhe	102
7.12. Maximalgeschwindigkeit und Gesamtfluss für verschiedene Reservoirhöhen	103
7.13. Geschwindigkeitsprofil von Wasser in einem Kanal mit $100\ \mu\text{m}$ Höhe . . .	104
7.14. Geschwindigkeitsprofil von Hyaluronsäure in einem Kanal mit $100\ \mu\text{m}$ Höhe	104
7.15. Die Scherrate von Wasser und Hyaluronsäure in einem Kanal mit $100\ \mu\text{m}$ Höhe	105
7.16. Viskositätsprofil und Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate	106
8.1. Prinzip der totalen internen Reflexion	110
8.2. Versuchsaufbau zur Erzeugung totaler interner Reflexion	113
8.3. Korrelationsfunktion im Modus totaler interner Reflexion	114
9.1. Korrelationsfunktion von Aktin in einer lebenden Zelle	115
A.1. Schema der Streugeometrie	117
C.1. Chemische Struktur von DNA	123
C.2. Ausschnitt aus einem Aktinfilament	124
C.3. Monomereinheit der Hyaluronsäure	126

Tabellenverzeichnis

2.1. Der Beitrag durch elektrostatische Wechselwirkungen zur Persistenzlänge	13
2.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Polymermodelle . . .	21
4.1. Kenngrößen der vorhandenen Laserlinien	44
5.1. FCS-Parameter für die verschiedenen Näherungsmodelle von Polymeren in Lösung	71
C.1. Charakteristische Daten der verwendeten Polymere	122

Literaturverzeichnis

- [1] LUMMA, D. ; KELLER, S. ; VILGIS, T. ; RÄDLER, J. O.: Dynamics of large semiflexible chains probed by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Physical Review Letters* 90 (2003), Nr. 21, S. 218301
- [2] DE GENNES, Pierre-Gilles: *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca, New York : Cornell University Press, 1979
- [3] DOI, M. ; EDWARDS, S.F.: *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford : Clarendon Press, 1986
- [4] STROBL, G.: *The Physics of Polymers*. Springer, 1997
- [5] KRATKY, O. ; POROD, G.: Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. In: *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 68 (1949), S. 1106–1122
- [6] POROD, G.: X-Ray and Light Scattering by Chain Molecules in Solution. In: *Journal of Polymer Science* 10 (1953), Nr. 2, S. 157–166
- [7] HEINE, S ; KRATKY, O. ; POROD, G. ; SCHMITZ, P.J.: Eine verfeinerte Theorie der Röntgenkleinwinkelstreuung des verknäulten Fadenmoleküls und ihre Anwendung auf Cellulosenitrat in Lösung. In: *Die makromolekulare Chemie* 44-46 (1961), S. 682–726
- [8] FLORY, Paul J.: *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. New York : Interscience Publishers, 1969
- [9] WINKLER, R. G. ; REINEKER, P. ; HARNAU, L.: Models and Equilibrium Properties of Stiff Molecular Chains. In: *Journal of Chemical Physics* 101 (1994), Nr. 9, S. 8119–8129
- [10] HARNAU, Ludger: *Zur Theorie dynamischer und statischer Strukturfaktoren von Makromolekülen unterschiedlicher Molekülsteifigkeit*, Universität Ulm, Doktorarbeit, 1998
- [11] NETZ, R.: Elektrostatischer Beitrag zur Erbsubstanz. In: *Physik Journal* 1 (2002), Nr. 9, S. 51–56

- [12] NETZ, R. ; ANDELMAN, D.: Neutral and charged polymers at interfaces. In: *Physics Reports* 380 (2003), S. 1–95
- [13] WINKLER, R. G.: Polyelectrolytes and Semiflexible Polymers. In: GOMPPER, Gerhard (Hrsg.) ; KAUPP, U. B. (Hrsg.) ; DHONT, Jan K. G. (Hrsg.) ; RICHTER, Dieter (Hrsg.) ; WINKLER, Roland G. (Hrsg.): *35th Spring School of the Institut für Festkörperforschung: Physics meets Biology* Bd. 19. Jülich : Forschungszentrum Jülich GmbH, 2004
- [14] ODIJK, T.: Electrostatic persistence length and its relation to a unified theory of polyelectrolytes. In: *Polymer* 19 (1978), S. 989
- [15] SKOLNICK, J. ; FIXMAN, M.: Electrostatic Persistence Length of a Wormlike Polyelectrolyte. In: *Macromolecules* 10 (1977), Nr. 5, S. 944–948
- [16] MANNING, G. S. ; RAY, J.: Counterion condensation revisited. In: *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 16 (1998), Nr. 2, S. 461–476
- [17] SCHIESSEL, H. ; PINCUS, P.: Counterion-condensation-induced collapse of highly charged polyelectrolytes. In: *Macromolecules* 31 (1998), Nr. 22, S. 7953–7959
- [18] SCHIESSEL, H.: Counterion condensation on flexible polyelectrolytes: Dependence on ionic strength and chain concentration. In: *Macromolecules* 32 (1999), Nr. 17, S. 5673–5680
- [19] SMITH, D. E. ; PERKINS, T. T. ; CHU, S.: Dynamical scaling of DNA diffusion coefficients. In: *Macromolecules* 29 (1996), Nr. 4, S. 1372–1373
- [20] EINSTEIN, A.: Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. In: *Annalen der Physik* 17 (1905), S. 549–560
- [21] ROUSE, P. E.: A Theory of the Linear Viscoelastic Properties of Dilute Solutions of Coiling Polymers. In: *Journal of Chemical Physics* 21 (1953), Nr. 7, S. 1272–1280
- [22] ZIMM, B. H.: Dynamics of Polymer Molecules in Dilute Solution: Viscoelasticity, Flow Birefringence and Dielectric Loss. In: *The Journal of Chemical Physics* 24 (1956), Nr. 2, S. 269–278
- [23] TIRADO, M. M. ; MARTINEZ, C. L. ; DE LA TORRE, J. G.: Comparison of Theories for the Translational and Rotational Diffusion-Coefficients of Rod-Like Macromolecules - Application to Short DNA Fragments. In: *Journal of Chemical Physics* 81 (1984), Nr. 4, S. 2047–2052

- [24] ORTEGA, A. ; DE LA TORRE, J. G.: Hydrodynamic properties of rodlike and disklike particles in dilute solution. In: *Journal of Chemical Physics* 119 (2003), Nr. 18, S. 9914–9919
- [25] HARNAU, L. ; WINKLER, R. G. ; REINEKER, P.: Dynamic structure factor of semiflexible macromolecules in dilute solution. In: *Journal of Chemical Physics* 104 (1996), Nr. 16, S. 6355–6368
- [26] KROY, K. ; FREY, E.: Dynamic scattering from solutions of semiflexible polymers. In: *Physical Review E* 55 (1997), Nr. 3, S. 3092–3101
- [27] KROY, K. ; FREY, E.: Dynamic Scattering from semiflexible polymers. In: BROWN, Wyn (Hrsg.) ; MORTENSEN, Kell (Hrsg.): *Scattering in Polymeric and Colloidal Systems*. Taylor and Francis, 2000
- [28] DE GENNES, P.-G.: Quasi-Elastic Scattering of Neutrons by Dilute Polymer Solutions: I. Free-Draining Limit. In: *Physics* 3 (1967), Nr. 1, S. 37–45
- [29] RICHTER, D.: Polymer Dynamics. In: GOMPPER, Gerhard (Hrsg.) ; KAUPP, U. B. (Hrsg.) ; DHONT, Jan K. G. (Hrsg.) ; RICHTER, Dieter (Hrsg.) ; WINKLER, Roland G. (Hrsg.): *35th Spring School of the Institut für Festkörperforschung: Physics meets Biology* Bd. 19. Jülich : Forschungszentrum Jülich GmbH, 2004
- [30] DUBOIS-VIOLETTE, E. ; DE GENNES, P.-G.: Quasi-Elastic Scattering by Dilute, Ideal, Polymer Solutions: II. Effects of Hydrodynamic Interactions. In: *Physics* 3 (1967), Nr. 4, S. 181–198
- [31] DE GENNES, P.-G.: Brownian motions of flexible polymer chains. In: *Nature* 282 (1979), S. 367–370
- [32] AKCASU, A. Z. ; BENMOUNA, M. ; HAN, C. C.: Interpretation of Dynamic Scattering from Polymer-Solutions. In: *Polymer* 21 (1980), Nr. 8, S. 866–890
- [33] SCHURR, J. M.: Boundaries of the Universal K-3 Region and Plateau Region of the Dynamic Structure Factor for DNA. In: *Biopolymers* 22 (1983), Nr. 10, S. 2207–2217
- [34] SCHURR, J. M. ; SCHMITZ, K. S.: Dynamic Light-Scattering-Studies of Bio-Polymers - Effects of Charge, Shape, and Flexibility. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 37 (1986), S. 271–305
- [35] SORLIE, S. S. ; PECORA, R.: A Dynamic Light-Scattering Study of a 2311 Base Pair DNA Restriction Fragment. In: *Macromolecules* 21 (1988), Nr. 5, S. 1437–1449

- [36] SORLIE, S. S. ; PECORA, R.: A Dynamic Light-Scattering Study of 4 DNA Restriction Fragments. In: *Macromolecules* 23 (1990), Nr. 2, S. 487–497
- [37] PECORA, R.: DNA - a Model-Compound for Solution Studies of Macromolecules. In: *Science* 251 (1991), Nr. 4996, S. 893–898
- [38] BERG, O.G.: Brownian Motion of the Wormlike Chain and Segmental Diffusion of DNA. In: *Biopolymers* 18 (1979), S. 2861–2874
- [39] SODA, K.: Theory of the Dynamic Light-Scattering Properties for Circular Semiflexible Chains in Solution. In: *Macromolecules* 17 (1984), Nr. 11, S. 2365–2375
- [40] AVALOS, J. B. ; RUBI, J. M. ; BEDEAUX, D.: Dynamics of Rodlike Polymers in Dilute-Solution. In: *Macromolecules* 26 (1993), Nr. 10, S. 2550–2561
- [41] DE LA TORRE, J. G.: Hydrodynamics of Segmentally Flexible Macromolecules. In: *European Biophysics Journal* 23 (1994), Nr. 5, S. 307–322
- [42] NICOLAI, T. ; MANDEL, M.: Dynamic Light-Scattering by Aqueous-Solutions of Low Molar Mass DNA Fragments in the Presence of NaCl. In: *Macromolecules* 22 (1989), Nr. 5, S. 2348–2356
- [43] WANG, L. X. ; GARNER, M. M. ; YU, H.: Self-Diffusion and Cooperative Diffusion of a Rodlike DNA Fragment. In: *Macromolecules* 24 (1991), Nr. 9, S. 2368–2376
- [44] GOINGA, H. T. ; PECORA, R.: Dynamics of Low-Molecular-Weight DNA Fragments in Dilute and Semidilute Solutions. In: *Macromolecules* 24 (1991), Nr. 23, S. 6128–6138
- [45] EIMER, W. ; PECORA, R.: Rotational and Translational Diffusion of Short Rodlike Molecules in Solution - Oligonucleotides. In: *Journal of Chemical Physics* 94 (1991), Nr. 3, S. 2324–2329
- [46] LEHNER, D. ; LINDNER, H. ; GLATTER, O.: Determination of the translational and rotational diffusion coefficients of rodlike particles using depolarized dynamic light scattering. In: *Langmuir* 16 (2000), Nr. 4, S. 1689–1695
- [47] GÖTTER, R. ; KROY, K. ; FREY, E. ; BÄRMANN, M. ; SACKMANN, E.: Dynamic light scattering from semidilute actin solutions: A study of hydrodynamic screening, filament bending stiffness, and the effect of tropomyosin/troponin-binding. In: *Macromolecules* 29 (1996), Nr. 1, S. 30–36
- [48] HOHENADL, M. ; STORZ, T. ; KIRPAL, H. ; KROY, K. ; MERKEL, R.: Desmin filaments studied by quasi-elastic light scattering. In: *Biophysical Journal* 77 (1999), Nr. 4, S. 2199–2209

-
- [49] MAGDE, D. ; ELSON, E.L. ; WEBB, W.W.: Thermodynamic fluctuations in a reacting system: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Physical Review Letters* 29 (1972), Nr. 11, S. 705–8
- [50] ELSON, E.L. ; MAGDE, D.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory. In: *Biopolymers* 13 (1974), S. 1–27
- [51] MAGDE, D. ; ELSON, E.L. ; WEBB, W.W.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization. In: *Biopolymers* 13 (1974), S. 29–61
- [52] MAGDE, D. ; WEBB, W.W. ; ELSON, E.L.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. III. Uniform Translation and Laminar Flow. In: *Biopolymers* 17 (1978), S. 361–376
- [53] RIGLER, R. ; METS, U. ; WIDENGREN, J. ; KASK, P.: Fluorescence correlation spectroscopy with high countrate and low background: analysis of translational diffusion. In: *European Biophysics Journal* 22 (1993), S. 169–175
- [54] SCHWILLE, P. ; BIESCHKE, J. ; OEHLENSCHLAGER, F.: Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies. In: *Biophysical Chemistry* 66 (1997), Nr. 2-3, S. 211–228
- [55] WIDENGREN, J. ; RIGLER, R.: Review - Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. In: *Cellular and Molecular Biology* 44 (1998), Nr. 5, S. 857–879
- [56] KRICHEVSKY, O. ; BONNET, G.: Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. In: *Reports on Progress in Physics* 65 (2002), Nr. 2, S. 251–297
- [57] THOMPSON, N. L. ; LIETO, A. M. ; ALLEN, N. W.: Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. In: *Current Opinion in Structural Biology* 12 (2002), Nr. 5, S. 634–641
- [58] RICKA, J. ; BINKERT, T.: Direct Measurement of a Distinct Correlation-Function by Fluorescence Cross-Correlation. In: *Physical Review A* 39 (1989), Nr. 5, S. 2646–2652
- [59] PELLEGRINO, T. ; MANNA, L. ; KUDERA, S. ; LIEDL, T. ; KOKTYSH, D. ; ROGACH, A. L. ; KELLER, S. ; RÄDLER, J. O. ; NATILE, G. ; PARAK, W. J.: Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. In: *Nano Letters* 4 (2004), Nr. 4, S. 703–707
- [60] WIDENGREN, J. ; METS, U. ; RIGLER, R.: Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet-States in Solution - a Theoretical and Experimental-Study. In: *Journal of Physical Chemistry* 99 (1995), Nr. 36, S. 13368–13379

- [61] SCHWILLE, P. ; HEINZE, K. G.: Two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy. In: *Chemphyschem* 2 (2001), Nr. 5, S. 269–272
- [62] SCHWILLE, P. ; MEYERALMES, F. J. ; RIGLER, R.: Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. In: *Biophysical Journal* 72 (1997), Nr. 4, S. 1878–1886
- [63] KETTLING, U. ; KOLTERMANN, A. ; SCHWILLE, P. ; EIGEN, M.: Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998), Nr. 4, S. 1416–1420
- [64] BACIA, K. ; MAJOU, I. V. ; SCHWILLE, P.: Probing the endocytic pathway in live cells using dual-color fluorescence cross-correlation analysis. In: *Biophysical Journal* 83 (2002), Nr. 2, S. 1184–1193
- [65] LUCAS, B. ; VAN ROMPAEY, S. ; DE SMEDT, S. C. ; DEMEESTER, J. ; VAN OOSTVELDT, P.: Dual-Color Fluorescence Fluctuation Spectroscopy To Study the Complexation between Poly-l-lysine and Oligonucleotides. In: *Macromolecules* 35 (2002), Nr. 21, S. 8152–8160
- [66] CLAMME, J. P. ; AZOULAY, J. ; MELY, Y.: Monitoring of the Formation and Dissociation of Polyethylenimine/DNA complexes by Two Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 84 (2003), S. 1960–1968
- [67] GÖSCH, M. ; BLOM, H. ; HOLM, J. ; HEINO, T. ; RIGLER, R.: Hydrodynamic flow profiling in microchannel structures by single molecule fluorescence correlation spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 72 (2000), Nr. 14, S. 3260–3265
- [68] KUNST, B. H. ; SCHOTS, A. ; VISSER, A.: Detection of flowing fluorescent particles in a microcapillary using fluorescence correlation spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 20, S. 5350–5357
- [69] KOTTIG, K.: *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an Lipidvesikeln auf oxidiertem Silizium*, Technische Universität München, Dissertation, 2000
- [70] HESS, S.T. ; WEBB, W.W.: Focal Volume Optics and Experimental Artifacts in confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 83 (2002), S. 2300–2317
- [71] JANKOWSKI, Tilo ; JANKA, Reinhard: ConfoCor 2 The Second Generation of Fluorescence Correlation Microscopes. In: RIGLER, R. (Hrsg.) ; ELSON, E.S. (Hrsg.): *Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Berlin : Springer, 2001, S. 331–345
- [72] KOPPEL, D. E.: Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. In: *Physical Review A* 10 (1974), Nr. 6, S. 1938–1945

- [73] GELL, C.: Accurate Use of Single Molecule Fluorescence Correlation Spectroscopy to Determine Molecular Diffusion Times. In: *Single Mol.* 3 (2001), S. 177–181
- [74] WOHLAND, T. ; RIGLER, R. ; VOGEL, H.: The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 80 (2001), Nr. 6, S. 2987–2999
- [75] SAFFARIAN, S. ; ELSON, E.L.: Statistical Analysis of Fluorescence Correlation Spectroscopy: The Standard Deviation and Bias. In: *Biophysical Journal* 84 (2003), S. 2030–2042
- [76] ENDERLEIN, J. ; KELLER, R. A.: Comparison of one-focus and two-foci setup in single-molecule detection experiments. In: *Applied Spectroscopy* 51 (1997), Nr. 3, S. 443–446
- [77] STARCHEV, K. ; RICKA, J. ; BUFFLE, J.: Noise on fluorescence correlation spectroscopy. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 233 (2001), Nr. 1, S. 50–55
- [78] WIDENGREN, J.: Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Bioimaging* 4 (1996), S. 149–157
- [79] ENDERLEIN, J.: Path integral approach to fluorescence correlation experiments. In: *Physics Letters A* 221 (1996), Nr. 6, S. 427–433
- [80] STARCHEV, K. ; ZHANG, J. W. ; BUFFLE, J.: Applications of fluorescence correlation spectroscopy - Particle size effect. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 203 (1998), Nr. 1, S. 189–196
- [81] MÜLLER, Joachim D. ; CHEN, Yan ; GRATTON, Enrico: Photon Counting Histogram Statistics. In: RIGLER, R. (Hrsg.) ; ELSON, E.S. (Hrsg.): *Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Berlin : Springer, 2001, S. 410–437
- [82] VAN CRAENENBROECK, E. ; MATTHYS, G. ; BEIRLANT, J. ; ENGELBORGH, Y.: A statistical analysis of fluorescence correlation data. In: *Journal of Fluorescence* 9 (1999), Nr. 4, S. 325–331
- [83] SENGUPTA, P. ; GARAI, K ; BALAJI, J. ; PERIASAMY, N. ; MAITI, S.: Measuring Size Distribution in Highly Heterogeneous Systems with Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 84 (2003), S. 1977–1984
- [84] STARCHEV, K. ; BUFFLE, J. ; PEREZ, E.: Applications of fluorescence correlation spectroscopy: Polydispersity measurements. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 213 (1999), Nr. 2, S. 479–487
- [85] SCALETTAR, B. A. ; HEARST, J. E. ; KLEIN, M. P.: Frap and Fcs Studies of Self-Diffusion and Mutual Diffusion in Entangled DNA Solutions. In: *Macromolecules* 22 (1989), Nr. 12, S. 4550–4559

- [86] BOREJDO, J. ; BURLACU, S.: Velocity of Movement of Actin-Filaments in In-vitro Motility Assay - Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 61 (1992), Nr. 5, S. 1267–1280
- [87] SHUSTERMAN, R. ; ALON, S. ; GAVRINYOV, T. ; KRICHEVSKY, O.: Monomer Dynamics in Double- and Single-Stranded DNA Polymers. In: *Physical Review Letters* 92 (2004), Nr. 4, S. 048303
- [88] ZETTL, H. ; HAFNER, W. ; BOKER, A. ; SCHMALZ, H. ; LANZENDORFER, M. ; MÜLLER, A. H. E. ; KRAUSCH, G.: Fluorescence correlation spectroscopy of single dye-labeled polymers in organic solvents. In: *Macromolecules* 37 (2004), Nr. 5, S. 1917–1920
- [89] SUKHISHVILI, S. A. ; CHEN, Y. ; MULLER, J. D. ; GRATTON, E. ; SCHWEIZER, K. S. ; GRANICK, S.: Materials science - Diffusion of a polymer 'pancake'. In: *Nature* 406 (2000), Nr. 6792, S. 146–146
- [90] ZHAO, J. ; GRANICK, S.: Polymer Lateral Diffusion at the Solid-Liquid Interface. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 20, S. 6242–6243
- [91] WIDENGREN, J.: Photophysical Aspects of FCS. In: RIGLER, R. (Hrsg.) ; ELSON, E.S. (Hrsg.): *Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Berlin : Springer, 2001, S. 276–301
- [92] KAMPEN, N.G. v.: *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*. Amsterdam : North-Holland, 1992
- [93] WIDENGREN, J. ; METS, U. ; RIGLER, R.: Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Chemical Physics* 250 (1999), Nr. 2, S. 171–186
- [94] WIDENGREN, J. ; SCHWILLE, P.: Characterization of photoinduced isomerization and back- isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Journal of Physical Chemistry A* 104 (2000), Nr. 27, S. 6416–6428
- [95] STADJE, W. ; PARTHASARATHY, P.R.: On the Convergence to Stationarity of Some Finite Birth and Death Processes. In: *submitted* (2003)
- [96] WINKLER, R. G. ; KELLER, S. ; RÄDLER, J. O.: Intramolecular Dynamics of Linear Macromolecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Physical Review E* to be submitted (2004)
- [97] SCHMIDT, C. F. ; BÄRMANN, M. ; ISENBERG, G. ; SACKMANN, E.: Chain Dynamics, Mesh Size, and Diffusive Transport in Networks of Polymerized Actin - a Quasielastic Light-Scattering and Microfluorescence Study. In: *Macromolecules* 22 (1989), Nr. 9, S. 3638–3649

-
- [98] MANGENOT, S. ; KELLER, S. ; RÄDLER, J. O.: Transport of Nucleosome Core Particles in Semidilute DNA Solutions. In: *Biophysical Journal* 85 (2003), Nr. 3, S. 1817–1825
- [99] SAXTON, M. J.: Anomalous Diffusion Due to Obstacles - a Monte-Carlo Study. In: *Biophysical Journal* 66 (1994), Nr. 2, S. 394–401
- [100] SAXTON, M. J.: Anomalous diffusion due to binding: A Monte Carlo study. In: *Biophysical Journal* 70 (1996), Nr. 3, S. 1250–1262
- [101] CASPI, A. ; ELBAUM, M. ; GRANEK, R. ; LACHISH, A. ; ZBAIDA, D.: Semiflexible polymer network: A view from inside. In: *Physical Review Letters* 80 (1998), Nr. 5, S. 1106–1109
- [102] CASPI, A. ; GRANEK, R. ; ELBAUM, M.: Enhanced diffusion in active intracellular transport. In: *Physical Review Letters* 85 (2000), Nr. 26, S. 5655–5658
- [103] CASPI, A. ; GRANEK, R. ; ELBAUM, M.: Diffusion and directed motion in cellular transport. In: *Physical Review E* 66 (2002), Nr. 1
- [104] SALMAN, H. ; GIL, Y. ; GRANEK, R. ; ELBAUM, M.: Microtubules, motor proteins, and anomalous mean squared displacements. In: *Chemical Physics* 284 (2002), Nr. 1-2, S. 389–397
- [105] FEDER, T. J. ; BRUST-MASCHER, I. ; SLATTERY, J. P. ; BAIRD, B. ; WEBB, W. W.: Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: A new interpretation. In: *Biophysical Journal* 70 (1996), Nr. 6, S. 2767–2773
- [106] SCHWILLE, P. ; KORLACH, J. ; WEBB, W. W.: Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. In: *Cytometry* 36 (1999), Nr. 3, S. 176–182
- [107] MARSHALL, W. F. ; STRAIGHT, A. ; MARKO, J. F. ; SWEDLOW, J. ; DERNBURG, A. ; BELMONT, A. ; MURRAY, A. W. ; AGARD, D. A. ; SEDAT, J. W.: Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. In: *Current Biology* 7 (1997), Nr. 12, S. 930–939
- [108] GENNERICH, A. ; SCHILD, D.: Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used. In: *Biophysical Journal* 79 (2000), Nr. 6, S. 3294–3306
- [109] WACHSMUTH, M. ; WALDECK, W. ; LANGOWSKI, J.: Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. In: *Journal of Molecular Biology* 298 (2000), Nr. 4, S. 677–689

- [110] CASTRO, A. ; SHERA, E. B.: Single-Molecule Electrophoresis. In: *Analytical Chemistry* 67 (1995), Nr. 18, S. 3181–3186
- [111] BRINKMEIER, M. ; DORRE, K. ; STEPHAN, J. ; EIGEN, M.: Two beam cross correlation: A method to characterize transport phenomena in micrometer-sized structures. In: *Analytical Chemistry* 71 (1999), Nr. 3, S. 609–616
- [112] LECAPTAIN, D. J. ; VAN ORDEN, A.: Two-beam fluorescence cross-correlation spectroscopy in an electrophoretic mobility shift assay. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 5, S. 1171–+
- [113] DITTRICH, P. S. ; SCHWILLE, P.: Spatial two-photon fluorescence cross-correlation Spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 17, S. 4472–4479
- [114] LUMMA, D. ; BEST, A. ; GANSEN, A. ; FEUILLEBOIS, F. ; RÄDLER, J.O. ; VINOGRADOVA, O.I.: Flow Profile near a Wall Measured by Double-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Physical Review E* 67 (2003), S. 056313
- [115] SONEHARA, T. ; KOJIMA, K. ; IRIE, T.: Fluorescence correlation spectroscopy excited with a stationary interference pattern for capillary electrophoresis. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 19, S. 5121–5131
- [116] LENNE, P. F. ; COLOMBO, D. ; GIOVANNINI, H. ; RIGNEAULT, H.: Flow profiles and directionality in microcapillaries measured by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Single Molecules* 3 (2002), Nr. 4, S. 194–200
- [117] TRITTON, D. J.: *Physical Fluid Dynamics*. New York : Van Nostrand, 1977
- [118] BIRD, R. B.: *Dynamics of Polymeric Liquids*. Bd. 1 Fluid Mechanics. 2nd. New York : John Wiley, 1987
- [119] FOUISSAC, E. ; MILAS, M. ; RINAUDO, M.: Shear-Rate, Concentration, Molecular-Weight, and Temperature Viscosity Dependences of Hyaluronate, a Wormlike Polyelectrolyte. In: *Macromolecules* 26 (1993), Nr. 25, S. 6945–6951
- [120] AXELROD, D.: Total Internal-Reflection Fluorescence Microscopy. In: *Methods in Cell Biology* 30 (1989), S. 245–270
- [121] THOMPSON, N.L. ; BURGHARDT, T.P. ; AXELROD, D.: Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 33 (1981), Nr. 3, S. 435–54

-
- [122] THOMPSON, N.L. ; PEARCE, K.H. ; HSIEH, H.V.: Total internal reflection fluorescence microscopy: application to substrate-supported planar membranes. In: *European Biophysics Journal* 22 (1993), Nr. 5, S. 367–78
- [123] THOMPSON, N. L. ; LAGERHOLM, B. C.: Total internal reflection fluorescence: Applications in cellular biophysics. In: *Current Opinion in Biotechnology* 8 (1997), Nr. 1, S. 58–64
- [124] SCHWILLE, P.: TIR-FCS: Staying on the Surface Can Sometimes Be Better. In: *Biophysical Journal* 85 (2003), S. 2783–2784
- [125] STARR, T.E. ; THOMPSON, N.L.: Total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy: combined surface reaction and solution diffusion. In: *Biophysical Journal* 80 (2001), Nr. 3, S. 1575–84
- [126] BURGHARDT, T.P. ; AXELROD, D.: Total internal reflection/fluorescence photobleaching recovery study of serum albumin adsorption dynamics. In: *Biophysical Journal* 33 (1981), Nr. 3, S. 455–67
- [127] THOMPSON, N.L. ; AXELROD, D.: Immunoglobulin surface-binding kinetics studied by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 43 (1983), Nr. 1, S. 103–14
- [128] HANSEN, R. L. ; HARRIS, J. M.: Total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy for counting molecules at solid/liquid interfaces. In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Nr. 13, S. 2565–2575
- [129] MCCAIN, K. S. ; SCHLUESCHE, P. ; HARRIS, J. M.: Modifying the Adsorption Behavior of Polyamidoamine Dendrimers at Silica Surfaces Investigated by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 76 (2004), S. 930–938
- [130] LIETO, A. M. ; CUSH, R. C. ; THOMPSON, N. L.: Ligand-receptor Kinetics Measured by Total Internal Reflection with Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 85 (2003), S. 3294–3302
- [131] STARR, T.E. ; THOMPSON, N.L.: Local diffusion and concentration of IgG near planar membranes: measurement by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy. In: *Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), Nr. 9, S. 2365–71
- [132] HANSEN, R. L. ; HARRIS, J. M.: Measuring reversible adsorption kinetics of small molecules at solid/liquid interfaces by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Nr. 20, S. 4247–4256

- [133] LEVENE, M. J. ; KORLACH, J. ; TURNER, S. W. ; FOQUET, M. ; CRAIGHEAD, H. G. ; WEBB, W. W.: Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. In: *Science* 299 (2003), Nr. 5607, S. 682–686
- [134] SCHWILLE, P. ; HAUPTS, U. ; MAITI, S. ; WEBB, W. W.: Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. In: *Biophysical Journal* 77 (1999), Nr. 4, S. 2251–2265
- [135] KLAR, T. A. ; JAKOBS, S. ; DYBA, M. ; EGNER, A. ; HELL, S. W.: Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000), Nr. 15, S. 8206–8210
- [136] LINDNER, P. ; ZEMB, Th.: *Neutrons, X-Rays and Light: Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Amsterdam : Elsevier, 2002
- [137] WATSON, J. D.: *Recombinant DNA*. 2nd. New York : Scientific American Books, 1992
- [138] SPUDICH, J. A. ; WATT, S.: The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction. I. BIOCHEMICAL STUDIES OF THE INTERACTION OF THE TROPOMYOSIN-TROPONIN COMPLEX WITH ACTIN AND THE PROTEOLYTIC FRAGMENTS OF MYOSIN. In: *J. Biol. Chem.* 246 (1971), Nr. 15, S. 4866–4871
- [139] MACLEAN-FLETCHER, S. ; POLLARD, T. D.: Identification of a Factor in Conventional Muscle Actin Preparations Which Inhibits Actin Filament Self-Association. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 96 (1980), Nr. 1, S. 18–27
- [140] PARDEE, J. D. ; SPUDICH, J. A.: Purification of Muscle Actin. In: *Methods in Enzymology* 85 (1982), S. 164–181

Danke

Zum Schluss möchte ich mich bei denen bedanken, die mich in der Zeit meiner Promotion begleitet haben.

Prof. Dr. Joachim O. Rädler danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seinen Fittichen durchzuführen. Mit vielen Freiheiten ausgestattet konnte ich auch mal vor mich *hinwurschteln*, wobei er mich immer wieder zurück in den Korridor des physikalisch Wesentlichen zu geleiten verstand. **Dr. Dirk Lumma** war während der Zeit in Mainz und darüber hinaus ein hervorragender Betreuer und hat in meinen Augen bewiesen, dass gute Ideen nicht unbedingt aus dem Chaos heraus entstehen müssen. **Prof. Dr. Roland R. Netz** hat nicht nur das Zweitgutachten meiner Arbeit übernommen. Er hat mir gezeigt, dass auch theoretische Physiker mit der real existierenden Welt in Einklang leben können. **Prof. Dr. Roland Winkler** vom Forschungszentrum Jülich sei für die sehr angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit gedankt.

Außerdem will ich natürlich meinen Kollegen vom Lehrstuhl Rädler danken.

Andreas Hohner musste mich fast täglich in unserem Büro ertragen. Ihn konnte ich jederzeit fragen, weil er immer alles weiß. Ihm und seinem Sekundanten **Christian Reich** verdanke ich die phantastische Vorbereitung auf die mündliche Prüfung. Die Zusammenarbeit mit **Johannes Bayer** am FCS'le hat sehr viel Spaß gemacht. Sein sorgfältiges Korrekturlesen hat meine Arbeit deutlich aufgewertet. **Gerlinde Schwake** und **Susanne Kempter** verdanke ich den Großteil meiner DNA-Proben und Puffer. Ihre Hilfsbereitschaft – etwa beim Zentrifugieren von Proben – wird einen bedeutenden Teil meiner angenehmen Erinnerungen an die Zeit in München bilden. **Marion Hochrein** verdanke ich mein grundlegendes Verständnis des Fluktuations-Dissipations-Theorems. **Judith Leierseder** hatte entscheidenden Anteil am Aufbau des TIR-FCS. **Dr. Jason DeRouchey** hat meinen englischen Wortschatz um Ausdrücke bereichert, die kaum in Wörterbüchern zu finden sind. Zusammen mit den weiteren Kollegen vom Lehrstuhl Rädler – **Laura Rusu**, **Özcan Kaya**, **Dr. Stephanie Mangenot**, **Stefan Schiefer**, **Sonja Thunnessen**, **Dr. Bert Nickel**, **Dr. Berenike Maier**, **Dr. Eduardo Mendoza** und **Lana Polero** – schufen sie eine angenehme Atmosphäre, in der ich mich sehr wohl fühlte. Ihnen allen möchte ich hiermit meinen tief empfundenen Dank aussprechen.

Dr. Michael Bärmann und **Monika Rusp** vom Lehrstuhl E22 der TU München haben mich mit großen Mengen an qualitativ hochwertigem Aktin versorgt. Der Firma

ibidi GmbH, insbesondere **Dr. Roman Zantl** danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die vielen spezialangefertigten Probenkammern.

Vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz sei **Prof. Dr. Thomas Vilgis** für die gute Zusammenarbeit gedankt. **Andreas Best** war in allen technischen Fragen ein kompetenter Ansprechpartner und half mir mit seinem Besuch hier in München beim Aufbau des Doppelfokus. **Dr. Markus Wolkenhauer** hat die gute Atmosphäre in Mainz durch die stringente Organisation von Kaffeekränzchen entscheidend mitgetragen und mir die absoluten Grundlagen des hessischen Dialekts vermittelt. **Sandra Ritz** hat mir viel über den Umgang mit biologischen Materialien und den rheinhessischen Dialekt beigebracht. **Alex Gansen** danke ich für den täglichen Ansporn, seine Snood-Rekorde zu brechen.

Schließlich geht ein herzliches Vergelt's Gott an meine Familie. Meine Eltern, Geschwister und Schwiegereltern haben mich jederzeit unterstützt, auch wenn ihnen nicht immer klar war, was genau ich mache und wozu das gut sein soll. Und ich kann mich glücklich schätzen, dass meine Frau **Katharina** an meiner Seite war. Danke.

Lebenslauf

Simon Keller

geboren am 23.07.1974 in Haslach i.K.

Schule

1981 - 1985 Grundschule Mühlenbach

1985 - 1994 Gymnasium Hausach

Juni 1994 Abitur

Zivildienst

1994 - 1995 Zivildienst bei der Lebenshilfe für behinderte Menschen,
Kreisverein Wolfach e.V.

Studium

1995 - 2001 Physikstudium an der Albert-Ludwigs-Universität
in Freiburg i.Br.

1997 - 1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Fraunhofer
Institut Solare Energiesysteme (ISE) in Freiburg

Januar 2001 Diplom Physik, Thema der Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. Strobl:
Reversible Oberflächenschmelzprozesse in teilkristallinen Polymeren

April 2001 Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für
Polymerforschung in Mainz bei Prof. Dr. Joachim O. Rädler

Februar 2002 Umzug mit der Arbeitsgruppe an die
Ludwig-Maximilians-Universität München