
**Vom Oligomer zu supramolekularen
Strukturen:
Studien zur freien Diffusion,
Selbstassemblierung und Elektrophorese
von DNA und DNA-Chromophor-Hybriden**

Johannes Paul Andreas Bayer



München 2005

**Vom Oligomer zu supramolekularen
Strukturen:
Studien zur freien Diffusion,
Selbstassemblierung und Elektrophorese
von DNA und DNA-Chromophor-Hybriden**

Johannes Paul Andreas Bayer

Dissertation
an der Sektion Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Johannes Paul Andreas Bayer
aus Haßfurt

München, den 17. August 2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler

Zweitgutachter: Dr. Ralf Blossey (Directeur de Recherche au CNRS)

Tag der mündlichen Prüfung: 7. November 2005

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung und Motivation	3
1.1 Selbstassemblierung	3
1.1.1 Aufbau und strukturelle Eigenschaften der DNA	4
1.1.2 Experimentelle Grundideen zur DNA-Assemblierung	7
1.1.3 Eigene Assemblierungsexperimente	10
1.2 Elektrophorese	12
1.3 Struktur der Arbeit	13
2 Theoretische und methodische Konzepte	15
2.1 Gleichgewichtsprozesse	15
2.1.1 DNA-Modellierung als Polymer	15
2.1.2 Selbstassemblierung	19
2.2 Nichtgleichgewichtsphänomene	23
2.2.1 Die freie Diffusion	23
2.2.2 Theoretische Überlegungen zur Elektrophorese	27
2.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	37
2.3.1 Experimentelle Grundzüge	37
2.3.2 Die Autokorrelationsfunktion	38
2.3.3 Auswirkungen photophysikalischer Prozesse auf die Autokorrelation	41
2.3.4 Zwei-Orts-Kreuzkorrelation	46
2.3.5 Weitere FCS-Methoden	48
3 Experimentelle Methoden und Synthesewege	51
3.1 DNA-Präparation	51
3.1.1 Herstellung und Färbung der dsDNA-Fragmente	51
3.1.2 Transfer in unpolare Lösungsmittel	53
3.1.3 FCS-Messungen der freien Diffusion in wässrigen Lösungen und in Alkanen	54
3.2 Synthese und Analyse der PON-Strukturen	57
3.2.1 Reaktionsmechanismus	57

3.2.2	Unterschiede in den PON-Konstrukten	59
3.2.3	Nachweis der supramolekularen Strukturen mittels Gelelektrophorese	61
3.2.4	UV-VIS-Absorptionsspektroskopie zur Analyse der Thermodissoziation	63
3.2.5	Darstellung von Molekülen mit 3 ssDNA-Anknüpfungsstellen . . .	67
3.3	Experimenteller Aufbau der Mikroelektrophorese	70
3.3.1	Doppelfokus-FCS-Aufbau	70
3.3.2	Messkammeraufbau	73
3.3.3	Methoden zur Korrektur intrinsischer Parameter und von Artefakten	75
4	Diffusive Eigenschaften DNA-basierter Systeme	81
4.1	Doppelsträngige und einzelsträngige DNA	81
4.1.1	Wässrige DNA-Lösungen	81
4.1.2	DNA-Fragmente in Alkanen	90
4.2	Perylen-bis-Oligonukleotide	94
5	Selbstassemblierung DNA-basierter Systeme	97
5.1	Nachweis unterschiedlicher supramolekularer Strukturen	97
5.2	Hybridisierungsnachweis mittels FCS	104
5.3	Schmelzverhalten in Abhängigkeit von der supramolekularen Struktur . .	107
5.3.1	Das ODN als Modellsystem	107
5.3.2	Das Schmelzverhalten der PON-Ketten und der PON-Dimere . .	108
5.3.3	Einfluss der supramolekularen Struktur auf das Schmelzverhalten der symmetrischen PON	110
5.3.4	Das Schmelzverhalten der sandwichartigen Strukturen	111
5.4	Moleküle mit mehr als zwei Anknüpfungspunkten für die Hybridisierung .	114
6	Elektrophoretische Eigenschaften von dsDNA auf kleinen Längenskalen	117
6.1	Hydrodynamische Flussprofile	117
6.2	dsDNA-Elektrophorese in freier Lösung	121
6.2.1	Spannungsinduzierter Temperaturanstieg	122
6.2.2	Vergleich der Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsdaten . . .	124
6.2.3	Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität in freier Lösung . .	126
6.2.4	Zusammenhang zwischen Diffusion und elektrophoretischer Drift .	130
6.2.5	Diffusionslimitierte Auflösung	132
6.3	dsDNA-Elektrophorese in physikalischen Netzwerken	135
6.3.1	Temperatureffekte	137
6.3.2	Auftrennpotential	137
6.3.3	Nachweis der dsDNA-Auftrennung auf kleinen Längenskalen . . .	140

7 Ausblick	143
7.1 Anwendungen der PON-Strukturen	143
7.2 Potential der dfFCS-gestützten Mikroelektrophorese	144
Danksagung	171

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die diffusiven und elektrophoretischen Eigenschaften von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die Selbstassemblierung von DNA-Chromophor-Hybridmolekülen untersucht. Hierzu wurden, neben Gelelektrophorese und temperaturabhängigen Absorptionsmessungen, vor allem Fluoreszenz-Korrelationsmethoden angewandt.

Um quantitative Aussagen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) über die freie Diffusion von doppelsträngigen (ds) DNA-Fragmenten (75 bp - 1019 bp) in wässrigen Lösungen zu treffen, wurden laserleistungsabhängige Messungen durchgeführt. Diese Experimente ergaben, dass photophysikalische Effekte wie Triplettrelaxation, Isomerisations- oder Bleichprozesse die Autokorrelation entscheidend beeinflussen. Die Längenabhängigkeit der gemessenen Diffusionskonstanten kann mit einem Stabmodell beschrieben werden, das für alle verwendeten dsDNA-Fragmente, die Konturlängen von bis zu 7 Persistenzlängen aufweisen, Gültigkeit besitzt. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass kleinere Diffusionskonstanten lediglich bei der Zugabe von zweiwertigen Salzen und bei hohen Salzkonzentrationen ($> 0,1$ M) beobachtet werden. Durch eine Komplexierung der dsDNA-Fragmente mit kationischen und neutralen Lipiden war es möglich, dsDNA in ein unpolares Lösungsmittel (n-Alkan) zu überführen. Durch Messung der freien Diffusion konnte die Monodispersität von Lipid-dekorierten dsDNA-Fragmenten festgestellt werden. In der unpolaren Phase wurde eine kritische DNA-Konzentration (≈ 10 nM) festgestellt, die für die Stabilität der DNA-Lipid-Komplexe notwendig ist.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz wurde ein DNA-Chromophor-Hybrid synthetisiert, bei dem an ein zentrales Farbstoffmolekül (Perylen) beidseitig jeweils ein kurzes ca. 20 Basen langes Oligonukleotid (ODN) kovalent angebunden wurde. FCS-Messungen, die die intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften des Hybrids ausnutzten, konnten die Löslichkeit und Monodispersität der Hybride bzw. der Lipid-Hybrid-Komplexe sowohl in wässriger Phase als auch in Alkanen nachweisen. Durch eine geeignete Wahl der ODN-Sequenzen und der Anknüpfungsstelle der ODN an den Farbstoffkern entstanden durch Basenpaarung unterschiedliche, supramolekulare Strukturen, die in Gelelektrophorese-Experimenten nachgewiesen wurden. Symmetrische DNA-Chromophor-Hybride können neben beliebig langen, linearen Ketten bei entsprechender Modifikation der Bausteine sandwichartige Dimere ausbilden. Asymmetrische Hybride ermöglichen den Aufbau linearer Strukturen

definierter Länge (z. B. Dimere).

Die thermodynamischen Eigenschaften der unterschiedlichen, supramolekularen Konstrukte wurden durch temperaturabhängige Absorptionsexperimente untersucht. Die Denaturierung der linearen kettenartigen Strukturen kann durch ein Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden, dessen energetische Eigenschaften sehr gut mit denen der verwendeten ODN übereinstimmen. Im Fall der sandwichartigen Strukturen musste für den Schmelzübergang ein Drei-Zustands-Modell angenommen werden, wobei die eingebauten Farbstoffkerne eine energetische Wechselwirkung vermittelten.

Neben der freien Diffusion von dsDNA wurde deren elektrophoretische Drift untersucht. Dazu wurde ein Mikroelektrophorese-System entwickelt, bei dem die Drift im elektrischen Feld mittels zweier Laserfoki detektiert wird, die einen Abstand von ca. 5 μm aufweisen. Hierbei wirken die beiden Foki wie eine mikroskopische „Lichtschranke“; die Driftzeit wird dabei durch eine Orts-Orts-Kreuzkorrelation der beiden Fluoreszenzsignale zugänglich gemacht. Auf Grund der methodisch bedingten sehr hohen Ortsauflösung ist es möglich, detaillierte Aussagen über die elektrophoretischen und elektroosmotischen Anteile an der Drift zu treffen. Experimente mit unterschiedlichen Feldstärken zeigen, dass eine Temperaturänderung durch den Eintrag von Joulescher Wärme nicht vernachlässigbar ist. Die elektrophoretische Mobilität ist in freier Lösung bei der verwendeten dsDNA unabhängig von der Fragmentlänge und beträgt im Mittel $4,5 \cdot 10^{-4} \frac{\text{cm}^2}{\text{Vs}}$. Durch die gleichzeitige Messung von Drift und Diffusion konnte neben der elektrophoretischen Mobilität der dsDNA-Fragmente auch der Einfluss der hydrodynamischen Reibung ermittelt werden. Dadurch zeigt sich, dass neben der elektrostatischen Kraft und der Reibungskraft auch hydrodynamische Abschirmeffekte berücksichtigt werden müssen, um mit einem entsprechenden Kraftbild die Elektrophorese-Experimente zu erklären.

Im Gegensatz zu den Messungen in freier Lösung zeigt die elektrophoretische Drift der dsDNA-Fragmente in einem physikalischen Polyethylenoxid-Netzwerk eine Längenabhängigkeit, die einem Potenzgesetz folgt ($v_{ep} \propto L^{-0,3}$). Berechnet man das Auflösungspotential der Elektrophorese-Experimente und vergleicht dies mit theoretischen Vorhersagen, so ergibt sich, dass die Diffusion im Vergleich zur Detektorausdehnung den deutlich stärker limitierenden Faktor bezüglich des Auftrennpotentials unterschiedlich langer DNA darstellt. Die Auftrennung unterschiedlich langer dsDNA-Fragmente in der Lösung konnte experimentell nachgewiesen werden, wobei die Auflösungsgrenze ungefähr 400 bp betrug.

Die vorgestellten Ergebnisse belegen, dass FCS zur quantitativen Charakterisierung der Diffusion eingesetzt werden kann. Darüber hinaus erlaubt die simultane Messung von elektrophoretischer Drift und Diffusion mit Hilfe von Doppelfokus-FCS, die Bildung von supramolekularen Konstrukten im Bezug auf Ladung und Geometrie mit einer Zeitauflösung im Minutenbereich zu verfolgen.

1 Einleitung und Motivation

1.1 Selbstassemblierung

Im Jahr 1965 postulierte der Mitbegründer von Intel, *Gordon Moore*, dass sich die Transistorzahl pro Quadratinch in integrierten Schaltungen jeweils innerhalb eines Zeitraums von einem Jahr verdoppeln wird. Die damals getroffene Vorhersage beruhte auf den bis zu diesem Zeitpunkt realisierten technischen Entwicklungen seit der Erfindung des Transistors 1947. In der Tat hat sich dieser Trend bis in die heutige Zeit bewahrheitet, wobei die Zeitkonstante leicht auf 18 Monate angepasst werden musste. Diese Gesetzmäßigkeit gilt als eine der entscheidenden Triebfedern der Halbleiterindustrie, was in Abbildung 1.1 exemplarisch für die Transistorzahl in DRAM-Speichern gezeigt ist.¹ Mit der zuneh-

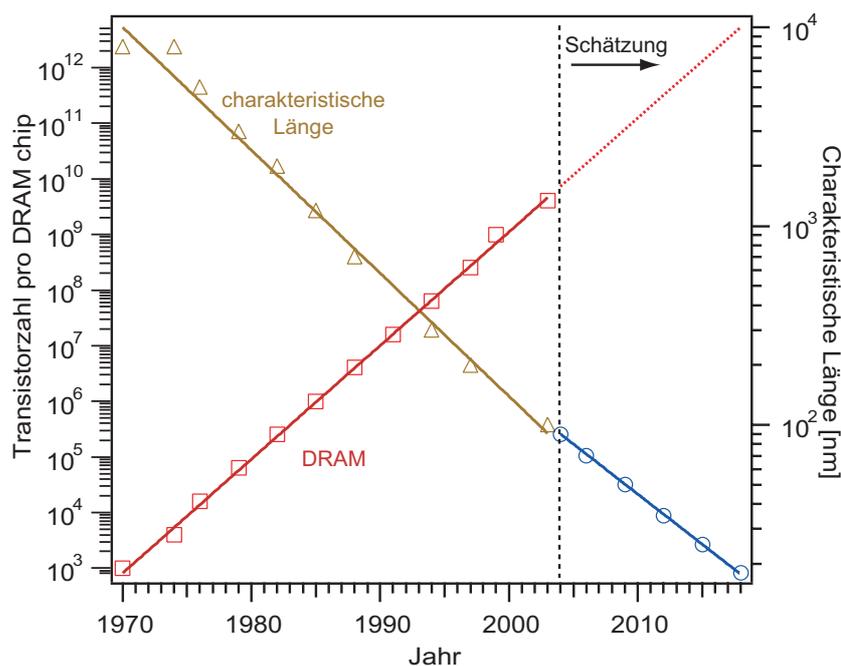


Abbildung 1.1: Trends in der Miniaturisierung von integrierten Schaltungen: Die Halbleiterindustrie hat über Dekaden hinweg eine schnelle, technologische Entwicklung gezeigt.

¹Die Daten entstammen Veröffentlichungen von *IC Knowledge* (www.icknowledge.com, Georgetown, MA, USA) und dem Jahresbericht 2004 der *International Technology Roadmap for Semiconductors* (<http://public.itrs.net/>)

menden Leistungsfähigkeit der Bausteine ist aber auch eine entsprechende Abnahme der charakteristischen Längen innerhalb der Bausteine verbunden. Betrug diese 1974 noch 80 μm , so wird heute mit einem typischen Abstand von 100 nm gearbeitet.

Obwohl angenommen wird, dass sich dieser Trend weiter fortsetzt, verbreitet sich größere Skepsis, inwieweit sich Moore's Gesetzmäßigkeit noch in Zukunft als tragfähig erweist. Diese Skepsis wird durch die Tatsache untermauert, dass sehr bald physikalische Limitierungsfaktoren wie die Atomgröße oder auch die verwendete Beleuchtungswellenlänge für lithographische Schritte eine entscheidende Rolle spielen werden, die mit den herkömmlichen „Top-Down“-²Methoden nicht überwunden werden können.

Aus diesem Grund hat sich ein reges Interesse innerhalb der Naturwissenschaften entwickelt, Moleküle als elementare Bausteine zu verwenden und mit deren Hilfe selbstassemblierte komplexe Strukturen aufzubauen. So konnte z. B. der selbstorganisierte Aufbau von Nanostrukturen durch epitaktisches Wachstum von Halbleitern gezeigt werden [1, 2, 3]. Hier entstanden Quantenpunkte auf Grund von Verspannungseffekten zwischen unterschiedlichen Halbleitermaterialien. Dieser „Bottom-Up“-Ansatz³ ist aber durchaus nicht neu, sondern wurde von der Natur bereits ausgenutzt. Betrachtet man zum Beispiel Zellen als den kleinsten vollständigen Baustein des Lebens, so werden diese von einer selbstorganisierten Doppelschicht aus Lipiden von der Außenwelt abgetrennt. Erst durch diese Separation und die Regulationsfunktion der Zellmembran wird es möglich, die Nichtgleichgewichtsprozesse, die für den Erhalt der Lebensfunktionen unerlässlich sind, aufrechtzuerhalten.

In diesem Zusammenhang entwickelte sich auch die Idee, Desoxyribonukleinsäure (DNA⁴), das zentrale Molekül des Lebens, als synthetischen Strukturbaustein zu verwenden, wobei diesbezüglich Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von *Seeman* als bahnbrechend gelten [4, 5, 6, 7]. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, auf welchen Eigenschaften der DNA das technologische Interesse beruht. Hierzu ist ein Verständnis der DNA-Struktur notwendig.

1.1.1 Aufbau und strukturelle Eigenschaften der DNA

Im Laufe der 1. Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde nach und nach die chemische Struktur der DNA aufgeklärt. Hierbei fand man heraus, dass insgesamt vier verschiedene Basen (Adenin: A, Guanin: G, Cytosin: C und Thymin: T) seitlich an ein Desoxyribosemolekül angebunden sind. Die Zuckermoleküle wiederum sind über Phosphatdiester-Bindungen miteinander zu einem Makromolekül verknüpft; die Anordnung der Basen entlang der Kette stellt das charakteristische Merkmal dar. Ausgehend vom chemischen Aufbau und von Röntgenstrukturdaten entwarfen *Watson* und *Crick* ein Strukturmodell, das den molekularen Aufbau der DNA beschreibt [8]. Zwei DNA-Moleküle sind in einer

²Hierunter versteht man die Herstellung von Mikro- oder Nanostrukturen (z. B. Transistoren) aus größeren Materialien (Silizium-Wafer)

³Es bezeichnet den gezielten Aufbau größerer Strukturen aus molekularen Bausteinen

⁴Abkürzung für die englische Bezeichnung *deoxyribonucleic acid*

antiparallelen Konformation zu einer rechtsdrehenden Doppelhelix aufgewunden. Diese weist eine Periodizität von 10 Basenpaaren (bp) oder 3,4 nm entlang der Helixachse auf, so dass die charakteristische Länge pro Basenpaar 0,34 nm und der Durchmesser der Helix 2 nm beträgt (Abbildung 1.2 (a)). Das Rückgrat der Doppelhelix bilden jeweils die Zucker- und Phosphateinheiten. In wässriger Lösung sind die Phosphatgruppen meist deprotoniert ($pK_a \approx 2$), wodurch DNA-Moleküle in der Regel pro Base eine negative Ladung tragen. Die Basen stehen senkrecht zur Helixachse und zeigen nach innen. Sie sorgen durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der beiden Stränge für den Zusammenhalt der Doppelhelix, wobei nur sogenannte Watson-Crick-Paare zwischen A und T (2 Wasserstoffbrückenbindungen) und zwischen G und C (3 Wasserstoffbrückenbindungen) möglich sind. Der Basenpaarungsmechanismus ist explizit in Abbildung 1.2 (b) dargestellt.

Diese strukturellen Eigenschaften der DNA qualifizieren das Molekül als einen potentiellen molekularen Baustein zum Aufbau supramolekularer Strukturen. Auf Grund

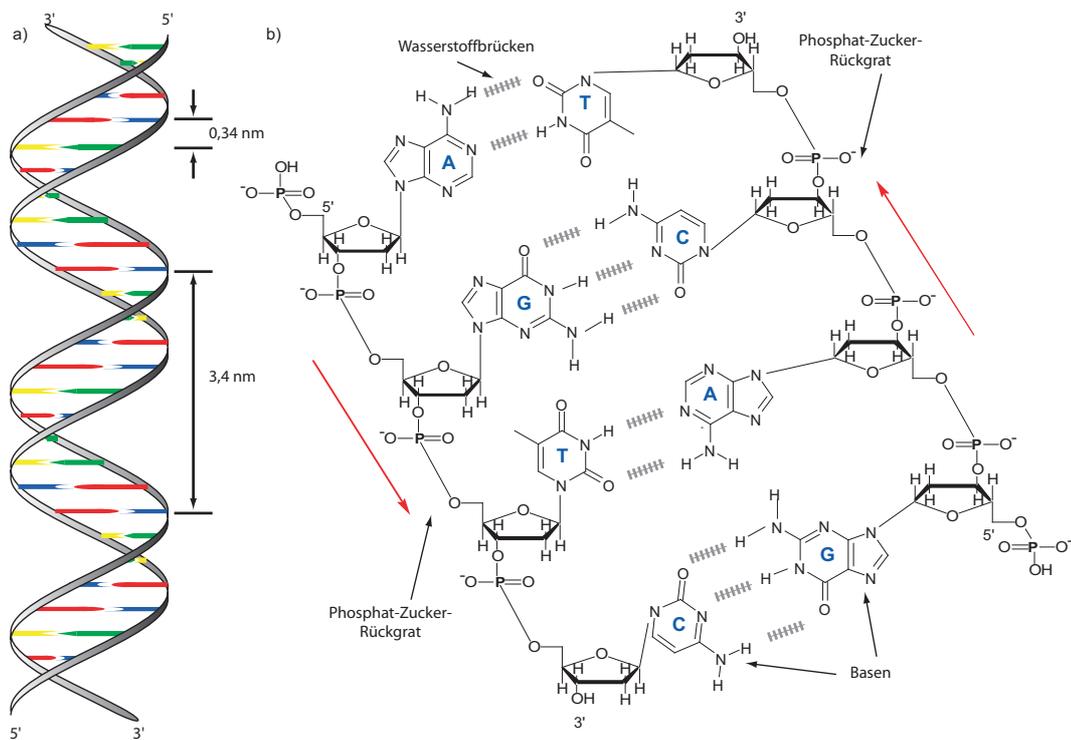


Abbildung 1.2: Molekulare und supramolekulare Struktur der DNA: (a) Zwei gegenläufige zueinander komplementäre DNA-Moleküle lagern sich zu einer rechtsdrehenden Helix zusammen, die eine Periodizität von 10 Basen (3,4 nm) in axialer Richtung aufweist. Die Zucker- und Phosphateinheiten bilden das Rückgrat der Helix, während die Basen in das Helixinnere zeigen. (b) Der Zusammenhalt der Doppelhelix wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen erzeugt, wobei nur AT- und GC-Paarungen möglich sind.

der hohen Selektivität der Basenpaarung kommt es nur dann zur Hybridisierung, d. h. zur Ausbildung einer doppelhelikalen Struktur aus zwei einzelsträngigen (ss⁵) DNA-Molekülen, wenn diese zueinander komplementär sind. Fehlstellen führen schließlich dazu, dass sich die Doppelhelix nicht oder nur unvollständig ausbildet. Diese hohe Selektivität erlaubt es, gezielt bestimmte Sequenzen über Hybridisierungsexperimente zu identifizieren.

Da die Basenpaarung nur durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den entsprechenden Basen verursacht wird und bei deren Öffnung die chemische Struktur der ssDNA erhalten bleibt, ist eine reversible Denaturierung möglich (Abbildung 1.3). Dieser Prozess kann zum einen thermisch (Thermodissoziation), aber auch chemisch durch Änderung der Salzstärke oder des pH-Werts initiiert werden. Neben diesen grundlegenden chemischen und strukturellen Eigenschaften der DNA ist aber auch zu erwähnen, dass sich die Synthese von spezifischen ssDNA-Molekülen in der Art etabliert hat, dass sie bereits kostengünstig käuflich erworben werden können. Dies ist für eine weitere Handhabung als Baustein von großem Nutzen, da man sich dadurch von *in vivo*-Methoden abkoppeln kann und eine einfache und kostengünstige Versorgung für spätere Anwendungen sichergestellt ist.

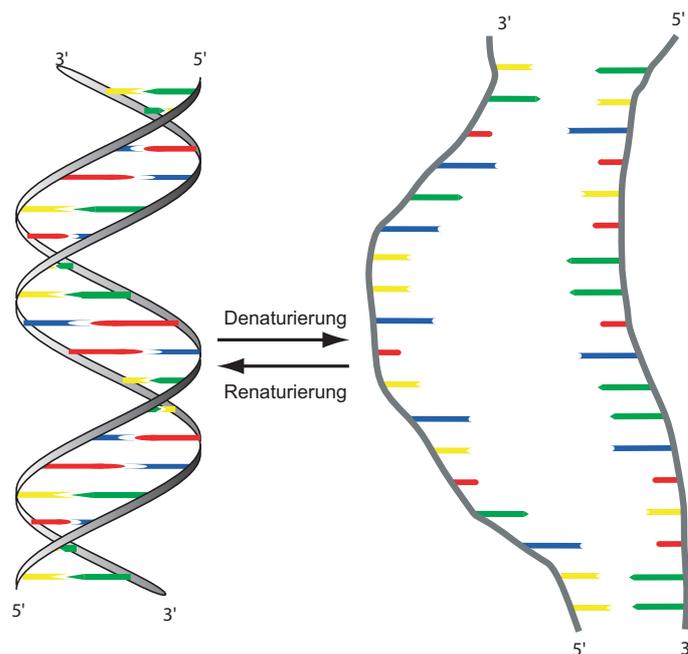


Abbildung 1.3: Reversible Denaturierung der DNA: Durch eine Änderung der Temperatur oder der chemischen Umgebung (z. B. pH-Wert) kann die doppelsträngige (ds) DNA aufgeschmolzen werden. Dieser Vorgang ist bei entsprechender Änderung der äußeren Bedingungen reversibel.

⁵Abkürzung für den englischen Ausdruck *single stranded*

1.1.2 Experimentelle Grundideen zur DNA-Assemblierung

Die vorgestellte Selektivität und Reversibilität der Basenpaarung wurde, wie bereits erwähnt, mehrfach ausgenutzt, um supramolekulare Strukturen zu erzeugen. Nachfolgend werden wichtige Experimente im Bezug auf die DNA-Assemblierung vorgestellt, die als Inspiration für die eigene Arbeit dienen. Sie sind ausführlicher in den Referenzen [9, 10, 11, 12, 13] diskutiert.

Direkte Anordnung der DNA

Im Hinblick auf die unmittelbare Anordnung von DNA wurden seit ungefähr 20 Jahren grundlegende Konzepte in der Arbeitsgruppe von *Seeman* geschaffen [4, 5, 14]. Sie beruhen darauf, dass durch die geeignete Wahl der Basenpaarsequenzen Kreuzungspunkte geschaffen werden, die geschickt zum Aufbau komplizierter Strukturen eingesetzt werden können. Abbildung 1.4 (a) zeigt hierzu ein Verknüpfungsschema. Dabei werden vier ssDNA-Stränge verwendet, die jeweils zu zwei weiteren teilweise komplementär sind. Hierdurch entsteht eine kreuzungsartige Struktur.⁶ Je nachdem wie die Abschlüsse der jeweiligen Oligonukleotide⁷ (ODN) gewählt werden, können unterschiedliche Strukturen, z. B. 2-D Kristalle (Abbildung 1.4 (b)), aufgebaut werden. *Seeman* konnte diesbezüglich Quadrate [6] oder auch abgeflachte Oktaeder [7] nachweisen.

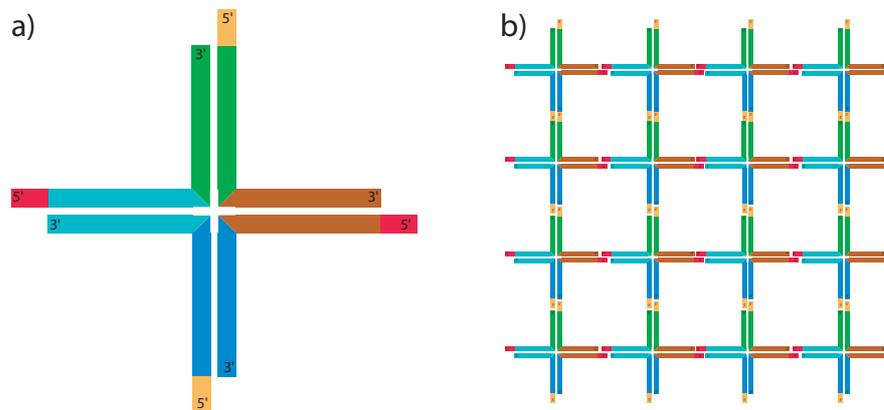


Abbildung 1.4: DNA als Gerüstbaustein: (a) Ein vierarmiger Kreuzungspunkt aus ssDNA-Strängen kann durch partielle Komplementarität zu jeweils zwei anderen Oligonukleotiden erreicht werden. Dies ist im Bild durch jeweils die gleiche Farbe angedeutet. (b) Bei geeigneter Wahl der Überlappsequenzen können unterschiedliche Strukturen (hier ein zweidimensionales Gitter) entstehen. (Schemazeichnungen nach [11])

In Hinblick auf die dreidimensionalen Strukturen ist zu erwähnen, dass sich hier der Nachweis als schwierig gestaltete und hauptsächlich über Gelelektrophorese erfolgte, da keine Kristalle zur Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden konnten. Weitere

⁶Dies bezeichnet man im Englischen als *Holliday junction*.

⁷Oligonukleotide sind kurze, weniger als 100 Basen umfassende ssDNA-Moleküle

großflächige, zweidimensionale kristalline Strukturen, die eine Ausdehnung von mehreren Quadratmikrometern haben, wurden mit Hilfe von sich doppelt kreuzenden DNA-Strängen hergestellt [15]. Insgesamt wurde immer die DNA selbst als einziger Baustein verwendet, der nur durch geschickte Wahl der Komplementarität unterschiedliche Strukturen entstehen ließ.

DNA vermittelter Aufbau von Nanostrukturen

Neben der Verwendung der DNA als Gerüstbaustein besteht auch die Möglichkeit, die reversiblen Hybridisierungseigenschaften zur Verknüpfung anderer Objekte auszunutzen. Dies haben *Mirkin et. al.* eindrucksvoll bestätigt [16]. In dieser Arbeit wurde die DNA-vermittelte Anordnung von Goldnanopartikeln demonstriert. Hierzu wurden die Nanopartikel mit unterschiedlichen ODN versehen, so dass sich in einer Lösung, die die beiden funktionalisierten Goldkluster und zusätzlich einen zu beiden ODN komplementären ssDNA-Strang enthielt, entsprechende supramolekulare Aggregate bildeten. Besonders bemerkenswert in dieser Hinsicht war, dass sich wegen der regelmäßigen Anordnung der Goldnanopartikel durch die Hybridisierung festkörperartige Eigenschaften einstellten, die durch einen reversiblen Farbumschlag zu erkennen waren. In diesem Zusammenhang wurde auch ausgenutzt, dass die Aggregation durch thermische Denaturierung und Rehybridisierung reversibel gesteuert werden konnte. Nachfolgend konnte auch gezeigt werden, dass dieses Prinzip ebenso auf Nanopartikel unterschiedlicher Größe anwendbar ist [17]. *Niemeyer et.al* haben wiederum dargestellt, dass diese Methode auch eine gezielte Anordnung von Nanopartikeln auf Oberflächen erlaubt [18]. In der Gruppe von *Alivisatos* konnte die Aneinanderreihung einer bestimmten Anzahl an Nanopartikeln entlang eines DNA-Moleküls gezeigt werden [19]. Hierbei wurden ODN am 3' oder 5'-Ende mit Goldnanopartikeln markiert. Somit war die Möglichkeit gegeben, diese entlang einer längeren, teilweise komplementären ssDNA zu hybridisieren. Sowohl Dimere als auch Trimere wurden nachgewiesen, bei denen der Abstand der Goldmarker durch die Position der Komplementärsequenz auf dem längeren Fragment und durch die Markeranknüpfung an das Trägeroligonukleotid (3' oder 5') eingestellt werden konnte.

Elektronische Anwendung von DNA

Die intrinsischen, elektronischen Eigenschaften von DNA wurden im Bezug auf die Verwendbarkeit in molekularen Schaltkreisen ausführlich mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Es konnten der DNA neben Isolatoreigenschaften [20, 21, 22] auch halbleiterartiges Verhalten [23] oder eine ohmsche Charakteristik [24] zugeordnet werden. Allerdings zeigt sich auch, dass die gemessenen Eigenschaften stark vom Messprinzip und darüber hinaus auch von der Zusammensetzung und der Länge der DNA abhängen. Auf kleinen Längenskalen <10 nm scheint sich DNA jedoch wie ein Halbleiter mit großer Bandlücke zu verhalten [23].

Neben der Ausnutzung der unmittelbaren Leitungseigenschaften der DNA wurde ver-

sucht, DNA lediglich als Templat zu benutzen. *Braun et. al.* konnten die Verwendung von DNA als Nukleationsort für die Generation eines nanoskaligen Silberdrahts demonstrieren [25, 26]. Dazu wurden zwei Elektroden mit unterschiedlichen ODN funktionalisiert. Die Lücke zwischen den Elektroden wurde mit einem zu beiden ODN komplementären DNA-Strang überbrückt und diese DNA-Verknüpfung schließlich metallisiert. Die Leitfähigkeit konnte eindeutig nachgewiesen werden.

DNA als hochspezifischer Bindungsbaustein (Aptamer)

Während dsDNA sehr steif ist und daher auf kleinen Längenskalen außer der Doppelhelix kaum Strukturen höherer Ordnung ausbildet, ändert sich dies für den Fall, dass man ssDNA oder Ribonukleinsäure (RNA⁸) betrachtet. Hier können sich selbst bei kurzen Oligonukleotiden sekundäre oder tertiäre Strukturen ausbilden. Diese Eigenschaft ähnelt sehr den Proteinen, die auf Grund ihrer spezifischen Struktur als hochspezifische Bindungsbausteine eingesetzt werden. In der Tat kann dieses Prinzip der spezifischen Bindung ebenfalls auf ssDNA und RNA angewandt werden. Die sog. Aptamere können mit hoher Selektivität an unterschiedliche Klassen von Molekülen binden [27, 28]. Eine Herstellung ist *in vitro* über einen Selektionsprozess möglich, bei dem aus einem großen Pool an möglichen Sequenzen durch spezifische Bindung an das Zielmolekül, diejenigen mit höchster Affinität ausgewählt und amplifiziert werden [29, 30, 31].⁹ Aptamere können mit herkömmlichen Antikörpern konkurrieren und besitzen einige Vorteile, die sie für einen weiteren Einsatz interessant machen. Sie müssen im Gegensatz zu Proteinen nicht aus Tieren gewonnen werden, sondern können *in vitro* synthetisiert werden. Dies erleichtert auch eine weitere Funktionalisierung [10]. Aus diesen Gründen wurden in den letzten Jahren auch gezielt Aptamere als Biosensoren [32] und Arzneimittel [33] entwickelt. Besonders im Hinblick auf die letztgenannte Gruppe ist die leichte Deaktivierung, die mit dem entsprechenden komplementären DNA-Strang erfolgen kann, von besonderem Vorteil. Dies haben *Dittmer et. al.* für ein Thrombin-bindendes Aptamer gezeigt [34].

DNA-Nanomaschinen

Alle bis jetzt vorgestellten Experimente beschreiben entweder statische Strukturen der DNA oder nützen lediglich die Hybridisierungseigenschaften aus. Dynamische Prozesse der DNA wurden noch nicht gezeigt. Hierzu entwickelte die Arbeitsgruppe um *Yurke* eine DNA-Maschine, die DNA als Treibstoff verbraucht, um zwischen unterschiedlichen Zuständen zu schalten [35]. Das Prinzip ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Im Grundzustand wird ein 40 Basen ODN mit zwei 42 Basen langen ODN hybridisiert, wobei

⁸Abkürzung für die englische Bezeichnung *ribonucleic acid*

⁹Diese Methode wird mit SELEX (*systematic evolution of ligands by experimental enrichment*) bezeichnet

diese Sequenzen jeweils nur an den Rändern über 18 Basen mit dem ersten Strang komplementär sind. So entsteht eine molekulare Pinzette, deren Konformation (offen oder geschlossen) geändert werden kann. Gibt man nun das erste Treibstoffmolekül (F) hinzu, das komplementär zu den beiden einzelsträngigen Enden der Pinzette ist, kommt es durch Hybridisierung zu einer geschlossenen Konformation. Diese kann wiederum durch Zugabe eines zweiten komplementären Treibstoffmoleküls (\bar{F}) geöffnet werden. Insgesamt wurde ein dsDNA-Molekül zum Schalten zwischen zwei Zuständen verbraucht. Die Triebfeder des Prozesses besteht darin, dass bei jedem Schritt die Anzahl der komplementären Basenpaare erhöht wird und dadurch das System jeweils einen energetisch günstigen Zustand erreicht. Dieses Prinzip wurde in der Folgezeit mehrmals angewandt, um zwischen zwei oder mehreren Zuständen schalten zu können [36, 37, 38, 39].

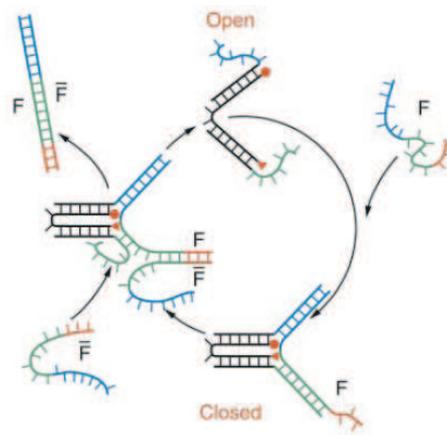


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung einer DNA-Maschine: Mit Hilfe von zwei DNA-Treibstoffmolekülen (F und \bar{F}) kann in einem vollständigen Zyklus zwischen einem offenen und geschlossenen Zustand der molekularen Pinzette geschaltet werden (Abbildung aus [35]).

1.1.3 Eigene Assemblierungsexperimente

In der hier vorliegenden Arbeit ist es vorrangiges Ziel, die Selbstanordnung von linearen DNA-funktionalisierten molekularen Bausteinen, z. B. Farbstoffen, zu untersuchen, die im Vergleich zur DNA eine vergleichbare oder kleinere Ausdehnung haben (vgl. Abbildung 1.6). Hauptaugenmerk liegt vor allem darauf, wie sich durch eine geeignete Wahl der DNA-Farbstoff-Hybride unterschiedliche supramolekulare Strukturen ausbilden können und wie sich diese des Weiteren auf die funktionellen und thermodynamischen Eigenschaften auswirken. Außerdem wird auch ein Konzept vorgestellt, bei dem durch den Einbau von Verzweigungspunkten das lineare Strukturmodell gezielt durchbrochen werden kann. Die selbstassemblierten Strukturen wurden mit Hilfe von Gelelektrophorese analysiert, während ein Zugang zu den thermodynamischen Eigenschaften

über Thermidissoziationsexperimente der entsprechenden Aggregate gewonnen wurde.

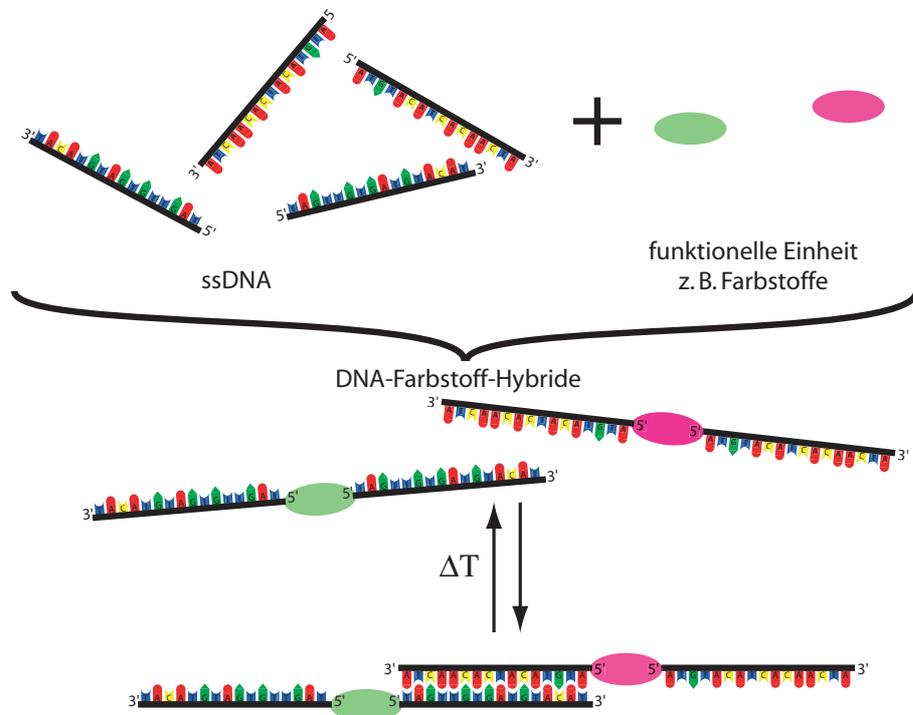


Abbildung 1.6: Experimentelles Prinzip der Untersuchung von DNA-Hybridmolekülen: Funktionelle Einheiten werden mit DNA-Molekülen versehen und können entsprechend ihrer Funktionalisierung unterschiedliche supramolekulare Strukturen ausbilden, deren Stabilität durch reversible Thermidissoziationsexperimente untersucht wird.

1.2 Elektrophorese

Wie im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der selbstassemblierten Strukturen stellen im Allgemeinen Gelelektrophorese-Experimente eine wichtige analytische Methode dar, um DNA-basierte Strukturen zu charakterisieren und diese entsprechend nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Hierbei wird ausgenutzt, dass DNA-Moleküle im elektrischen Feld unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten aufzeigen, die durch eine eingebrachte Gelmatrix induziert werden. Das führt schließlich zu einer effektiven Auftrennung der Moleküle. Die herkömmlichen Labormethoden eignen sich kaum für eine schnelle Analyse, da nur mit niedrigen Feldstärken ($< 20 \frac{\text{V}}{\text{cm}}$) gearbeitet werden kann, so dass eine Analyse mehrere Stunden in Anspruch nimmt.

Erst mit der Erfindung der Kapillarelektrophorese (CE¹⁰)[40], die eine dünne Glaskapillare als Elektrophoresekanal verwendet, wurde es möglich bei hohen Feldstärken (bis zu $1000 \frac{\text{V}}{\text{cm}}$) zu arbeiten [41, 42] und so die Analysezeiten deutlich zu reduzieren. Diese Entwicklung machte erst die rasche Sequenzierung des menschlichen Genoms möglich. Allerdings stellt diese Methode im Hinblick auf die Miniaturisierung keine Fortschritte dar, da für die verwendeten Detektoren weiterhin Abstände von 10 cm und größer notwendig sind.

Mit dem Hintergrund, Elektrophorese-Experimente in Strukturen von weniger als 100 μm Ausdehnung durchführen zu können, ist es notwendig, neue Detektionsmethoden zur effektiven Bestimmung der elektrophoretischen Drift auf kleinen Längenskalen zu entwickeln. Nachdem es hier generell problematisch erscheint, unterschiedliche Zonen im Gel, wie sie in makroskopischen Experimenten auftauchen, analysieren zu können, wurden Messprinzipien entwickelt, um in kontinuierlichen Lösungen unterschiedliche Driftgeschwindigkeiten zu detektieren. In diesem Zusammenhang wurden Einzelmolekül-Techniken eingesetzt, die zum einen auf der direkten Beobachtung [43] oder Detektion [44] der Moleküle beruhen oder auf der anderen Seite die statistischen Eigenschaften eines Molekülensembles mittels dynamischer Lichtstreuung [45, 46] oder Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS¹¹) [47, 48, 49, 50] ausnutzen. Bezüglich FCS wurden sowohl Einzelfokus-gestützte [47] als auch Doppelfokus-gestützte Techniken [48, 49, 50, 51] implementiert. Bei der Doppelfokus (df) -FCS-Methode werden die beiden Foki als eine Art „Lichtschanke“ verwendet, um die Driftzeit auf einer Längenskala von einigen Mikrometern zu ermitteln.

In diesem Zusammenhang wird hier eine detaillierte Untersuchung der elektrophoretischen Drift in freier Lösung sowie in Polymernetzwerken auf kleinen Längenskalen vorgenommen. Dabei ist von besonderer Bedeutung, die mit dem System zu erreichende Auflösung auszuloten und die zu Grunde liegenden physikalischen Prinzipien bezüglich ihrer limitierenden Wirkung herauszuarbeiten.

¹⁰Abkürzung für die englische Bezeichnung *capillary electrophoresis*

¹¹Abkürzung für die englische Bezeichnung *Fluorescence Correlation Spectroscopy*

1.3 Struktur der Arbeit

Insgesamt bewegt sich diese Arbeit im Spannungsfeld zwischen dem prinzipiellen Nachweis supramolekularer DNA-vermittelter Strukturen, deren Einfluss auf die thermodynamischen Gegebenheiten des Systems und der methodischen Entwicklung sowie der Analyse der dFFCS-gestützten Mikroelektrophorese. Im Kapitel 2 werden die im Rahmen dieser Arbeit notwendigen theoretischen und methodischen Konzepte vorgestellt. Dies umfasst neben grundsätzlichen Überlegungen zur Thermodynamik der Selbstassemblierung, der DNA-Dissoziation, der Diffusion und der Elektrophorese auch eine Einführung in die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Hier wird besonders auf das Potential der Methode zur Analyse photophysikalischer Effekte Wert gelegt. Kapitel 3 beschreibt die Probenpräparation und stellt die Methodik der Experimente vor. In diesem Zusammenhang wird auch die Synthese der DNA-Farbstoff-Hybride beschrieben.

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, sind in den Kapiteln 4, 5 und 6 dargestellt. Das erste der drei Kapitel beschäftigt sich mit der Analyse der freien Diffusion von dsDNA und der DNA-Farbstoff-Hybride in wässrigen Lösungen und in unpolaren Lösungsmitteln. Hierbei werden vor allem die photophysikalischen Eigenschaften charakterisiert, um eine mögliche Verfälschung der Diffusionsmessungen zu reduzieren. Im nachfolgenden Kapitel werden die Assemblierungseigenschaften der DNA-Farbstoff-Hybride erörtert. In diesem Zusammenhang werden unterschiedliche supramolekulare Strukturen nachgewiesen und ein Zusammenhang mit den aus den DNA-Dissoziationsexperimenten gewonnenen thermodynamischen Eigenschaften aufgezeigt. Das letzte Experimentalkapitel stellt die dFFCS-gestützten Mikroelektrophorese-Experimente erstens in freier Lösung und zweitens in einem Polymernetzwerk vor. Nach der Korrektur der experimentellen Artefakte wird ein Vergleich mit den theoretischen Vorhersagen für die elektrophoretische Mobilität gezogen. Darüber hinaus wird das Auftrennpotential der Mikroelektrophorese in Polymernetzwerken bestimmt und der zu Grunde liegende physikalische Mechanismus herausgearbeitet. Über diese Arbeit hinausgehende Visionen sind schließlich im 7. Kapitel dargestellt.

2 Theoretische und methodische Konzepte

In diesem Kapitel werden wichtige theoretische und methodische Erkenntnisse vorgestellt, die zum Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit notwendig sind. Der erste Abschnitt beleuchtet die relevanten Gleichgewichtsprozesse. In diesem Zusammenhang werden fundamentale Polymermodelle erklärt und weiterhin thermodynamische Gesetzmäßigkeiten zur Selbstassemblierung und zur DNA-Dissoziation beschrieben. Dies stellt somit hauptsächlich die Grundlage für die in Kapitel 5 beschriebenen Messungen dar. Im nachfolgenden Abschnitt 2.2 werden sowohl die Diffusion als auch die Elektrophorese als elementare Phänomene erörtert, die im Nichtgleichgewicht stattfinden. Die beiden Konzepte bilden die Basis für die in den Kapiteln 4 und 6 beschriebenen Ergebnisse zur freien Diffusion und zur Mikroelektrophorese in freier Lösung und in Polymernetzwerken. FCS als Hauptdetektionsmethode im Bezug auf diese Experimente wird im Abschnitt 2.3 aus theoretischer Sicht eingeführt.

2.1 Gleichgewichtsprozesse

2.1.1 DNA-Modellierung als Polymer

DNA wird in vielen Bereichen innerhalb der Lebenswissenschaften intensiv erforscht; der Blickwinkel, unter dem die jeweiligen Forschungen erfolgen, hängt sehr stark von den entsprechenden Fachdisziplinen ab. In der Biologie besteht das vorrangige Interesse an der DNA in der Verwendung als Informationsspeicher des Lebens. Hier stellt sich die Frage, nach der Kodierung der Information und wie sie manipuliert werden kann. Von chemischer Seite betrachtet man den strukturellen Aufbau der DNA und sucht nach Wegen, die DNA-Struktur geschickt zu manipulieren bzw. analoge Strukturen z. B. aus Polypeptiden aufzubauen [52, 53]. Vom physikalischen Standpunkt aus erscheint DNA gerade als Modellpolymer besonders interessant, an dem prinzipielle Polymereigenschaften studiert werden können, die sich im Wesentlichen aus der Länge und der Steifigkeit ableiten lassen. Die detaillierte Molekularstruktur kann in den meisten Fällen vernachlässigt werden. In diesem Abschnitt sollen die fundamentalen Polymermodelle insoweit dargestellt werden, wie sie für diese Arbeit relevant sind. Ausführliche Erläuterungen zur Polymerphysik und der entsprechenden statistischen Physik finden sich in den Referenzen [54, 55, 56, 57].

2.1.1.1 Flexible Polymere

Im einfachsten Fall kann man sich ein Polymer aus N Elementarsegmenten aufgebaut vorstellen, bei denen die einzelnen Untereinheiten zwar aneinander hängen, aber vollkommen beliebig im Raum verteilt sind (Ideale Kette)¹. Die Richtungsvektoren \vec{r}_i der Segmente sind vollkommen unabhängig voneinander. Jetzt stellt sich die Frage, was über den End-zu-End-Abstand des Polymers und über die mittlere Ausdehnung des Moleküls ausgesagt werden kann.

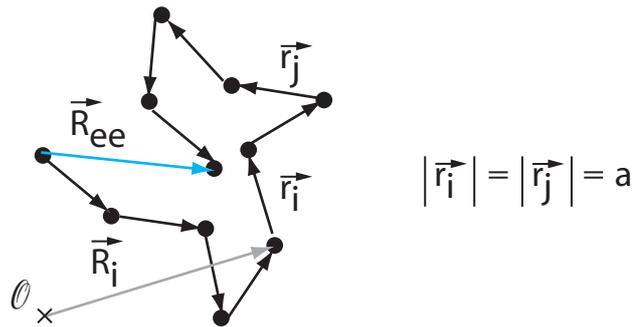


Abbildung 2.1: Prinzipskizze einer idealen Kette: Die einzelnen Segmente der Kette sind frei miteinander verbunden, ohne dass eine Richtungskorrelation vorliegt.

Der End-zu-End-Abstand \vec{R}_{ee} ist folgendermaßen definiert:

$$\vec{R}_{ee} = \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \quad (2.1)$$

Berücksichtigt man, dass bei jeder idealen Kette die Kontur als ein Zufallsweg aufgefasst werden kann, so wird klar, dass der mittlere End-zu-End-Abstand $\langle \vec{R}_{ee} \rangle$ verschwinden muss. Für den mittleren quadratischen End-zu-End-Abstand $\langle \vec{R}_{ee}^2 \rangle$ gilt:

$$\langle \vec{R}_{ee}^2 \rangle = \left\langle \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \cdot \sum_{j=1}^N \vec{r}_j \right\rangle = \left\langle \sum_{i,j} \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \right\rangle = \sum_{i=1}^N \langle \vec{r}_i^2 \rangle + \underbrace{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1; j \neq i}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle}_{=0} = Na^2 \quad (2.2)$$

Die Mittelung über die gemischten Richtungsvektoren verschwindet, da vorausgesetzt wird, dass sie zueinander unkorreliert sind. Die Wurzel des quadratischen End-zu-End-Abstands skaliert wie folgt:

$$\sqrt{\langle \vec{R}_{ee}^2 \rangle} = aN^{\frac{1}{2}} \quad (2.3)$$

¹Im Englischen wird es als *freely jointed chain* beschrieben

Der End-zu-End-Abstand stellt jedoch eine Größe dar, die experimentell oft nicht zugänglich ist, da schon die Definition, wenn man z. B. verzweigte Polymere berücksichtigt, recht schwierig sein kann. In den meisten Streuexperimenten ist aber der Gyrationradius R_g , d. h. die mittlere Ausdehnung des Moleküls zugänglich.

$$R_g := \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle (\vec{R}_i - \vec{R}_s)^2 \rangle} \quad \text{mit} \quad \vec{R}_s = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \vec{R}_i \quad (2.4)$$

Hierbei stellt \vec{R}_s den Schwerpunktsvektor der Kette und \vec{R}_i den Ortsvektor des i -ten Segments dar (vgl. Abbildung 2.1). Der Gyrationradius lässt sich explizit berechnen:

$$R_g = \frac{1}{6} a N^{\frac{1}{2}} = \frac{1}{6} \sqrt{\langle R_{ee}^2 \rangle} \quad (2.5)$$

In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass das Skalenverhalten des End-zu-End-Abstands und des Gyrationradius auch dann erhalten bleibt, wenn man die freie Bewegung der Segmente einschränkt und nur noch einen bestimmten Winkel θ zwischen den Segmenten zulässt; dabei ist eine Rotation um die Achse weiterhin erlaubt.² Der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand berechnet sich in diesem Fall zu:

$$\langle R_{ee}^2 \rangle = \frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta} a^2 N \quad \text{mit} \quad \cos \theta < 1 \quad (2.6)$$

Bezüglich dieser einfachen Polymermodelle für flexible Ketten ist anzumerken, dass sie die Experimente oft nur unvollständig beschreiben, da dort oft ein anderes Skalenverhalten beobachtet wird.

$$R_g \propto N^\nu \quad \text{mit} \quad 0,5 < \nu < 1 \quad (2.7)$$

Diese Tatsache liegt darin begründet, dass in den obigen Modellen die Ausdehnung der Moleküle und deren Wechselwirkung untereinander unberücksichtigt geblieben ist. Es ist notwendig, diese Effekte miteinzubeziehen. In drei Dimensionen errechnet sich ν zu $3/5$, was experimentell bestätigt werden konnte.

2.1.1.2 Semiflexible Ketten

Reale Polymere sind nicht unendlich flexibel, sondern weisen eine gewisse Steifigkeit auf, d. h. dass die Konformation eines Segments von der Orientierung des vorhergehenden abhängig ist. Dieses wurmartige Modell wurde von *Kratky* und *Porod* vorgeschlagen [58].³ Um über charakteristische Größen in diesem Modell Aussagen treffen zu können, ist es sinnvoll, die Tangenten-Tangenten-Korrelation entlang eines Polymers näher zu betrachten. Hierzu definieren wir die Tangenten an drei verschiedenen Orten entlang der

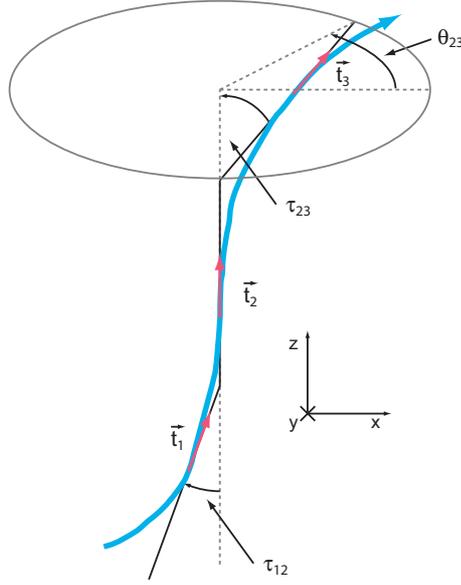


Abbildung 2.2: Schemazeichnung zur Berechnung der Tangenten-Tangenten-Korrelation

Kontur mit der Bedingung, dass ohne Beschränkung der Allgemeinheit \vec{t}_2 entlang der z-Achse orientiert ist und \vec{t}_1 sich in der x-z-Ebene befindet (Abbildung 2.2):

$$\vec{t}_1 = \begin{pmatrix} \sin \theta_{12} \\ 0 \\ \cos \theta_{12} \end{pmatrix}; \quad \vec{t}_2 = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix}; \quad \vec{t}_3 = \begin{pmatrix} \cos \theta_{23} \sin \tau_{23} \\ \sin \theta_{23} \sin \tau_{23} \\ \cos \tau_{23} \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

Bildet man nun die jeweils gemittelten Skalarprodukte zwischen den Tangenten und berücksichtigt, dass die Winkel entlang der Kette entkoppeln (Markov-Eigenschaft), so gilt:

$$\langle \vec{t}_1 \vec{t}_3 \rangle = \langle \vec{t}_1 \vec{t}_2 \rangle \cdot \langle \vec{t}_2 \vec{t}_3 \rangle \quad \text{oder} \quad \langle \cos \tau(s_1 + s_2) \rangle = \langle \cos \tau(s_1) \rangle \cdot \langle \cos \tau(s_2) \rangle, \quad (2.9)$$

s_1 und s_2 stellen jeweils die Konturlängen zwischen den Fragmenten dar. Eine Funktion, die die in Gleichung 2.9 definierte Bedingung erfüllt, stellt die Exponentialfunktion dar. Damit lässt sich für die Tangenten-Tangenten-Korrelation folgender Ansatz verwenden:

$$\langle \vec{t}(0) \vec{t}(s) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{l_p}\right) \quad (2.10)$$

Hier gibt die Persistenzlänge l_p an, wann das Polymer seine ursprüngliche Orientierung verloren hat. l_p ist also ein Maß für die Steifigkeit des Polymers. Für kurze oder sehr steife

²Diese Modell wird als *freely rotating chain* bezeichnet

³Diese Modell wird als *worm like chain model* bezeichnet

Moleküle kann ein direkter Zusammenhang zwischen dem Biegemodul κ des Moleküls und l_p hergestellt werden, wenn man von der thermischen Anregung der Biegung ausgeht.

$$l_p = \frac{\kappa}{k_b T} \quad (2.11)$$

Ebenso kann mit Hilfe der Persistenzlänge der End-zu-End-Abstand berechnet werden:

$$\langle \vec{R}_{ee}^2 \rangle = 2l_p \left\{ L - l_p + l_p \exp\left(-\frac{L}{l_p}\right) \right\} \quad (2.12)$$

Auch die Grenzfälle eines steifen Stabes oder eines flexiblen Polymers können durch den entsprechenden Grenzübergang beschrieben werden.

2.1.2 Selbstassemblierung

Die Selbstassemblierung kann prinzipiell durch unspezifische oder spezifische Wechselwirkung erfolgen. Nachfolgend sollen beide Prinzipien von theoretischer Seite beleuchtet werden. Dies sind sowohl für die Experimente mit den DNA-Lipid-Komplexen (vgl. Abschnitt 4.1.2) als auch für die in Kapitel 5 beschriebenen Assemblierungsstudien von entscheidender Bedeutung.

2.1.2.1 Thermodynamische Betrachtung der Selbstassemblierung

Findet eine Aggregation von Monomeren zu größeren Aggregaten statt, stellt sich im Allgemeinen ein Gleichgewicht ein, das in der Gleichgewichtsthermodynamik darauf beruht, dass das chemische Potential innerhalb des Gesamtsystems und somit innerhalb der Aggregate konstant ist [59].

$$\underbrace{\mu = \mu_1^0 + kT \ln(X_1)}_{\text{Monomer}} = \underbrace{\mu_2^0 + \frac{1}{2}kT \ln\left(\frac{1}{2}X_2\right)}_{\text{Dimer}} = \underbrace{\mu_3^0 + \frac{1}{3}kT \ln\left(\frac{1}{3}X_3\right)}_{\text{Trimer}} = \dots \quad (2.13)$$

μ_i^0 bezeichnet den temperaturunabhängigen Teil des chemischen Potentials pro Molekül und X_i die relative Konzentration der Monomere im Aggregationszustand, der aus i Monomeren besteht. Gleichung 2.13 kann ebenso über das Massenwirkungsgesetz abgeleitet werden. Im Bezug auf die Konzentration lässt sich Gleichung 2.13 folgendermaßen schreiben:

$$X_N = N \left\{ \frac{X_M}{M} \exp\left[M \frac{\mu_M^0 - \mu_N^0}{k_b T} \right] \right\}^{\frac{N}{M}} \quad (2.14)$$

N und M bezeichnen jeweils einen beliebigen Zustand, der aus N bzw. M Monomeren besteht. In Kombination mit der Massenerhaltung ist das System vollständig definiert.

$$C_{Ges} = X_1 + X_2 + \dots = \sum_i X_i = const \quad (2.15)$$

Aus Gleichung 2.14 erkennt man, dass nur dann eine deutliche Aggregatbildung einsetzt, wenn sich die Monomere im Aggregat bezüglich ihrer freien Energie deutlich von den Monomeren in der Lösung unterscheiden. Ist aber die freie Energie unabhängig vom Aggregationsgrad, d. h.

$$\mu_1^0 = \mu_2^0 = \mu_3^0 = \dots = \mu_N^0, \quad (2.16)$$

so berechnet sich die Konzentration an Monomeren im n -ten Aggregat zu:

$$X_n = nX_1^n \quad (2.17)$$

Hieraus wird ersichtlich, dass die Konzentration der Aggregate mit zunehmendem Aggregationsgrad deutlich abnimmt und immer unwahrscheinlicher wird. Dieser Trend wird noch verstärkt, wenn die freie Monomerenergie μ_N^0 mit dem Aggregationsgrad wächst. Im Gegensatz dazu werden Aggregate klar bevorzugt, wenn μ_N^0 sich mit N reduziert.

Nimmt man z. B. für lineare Ketten an, dass bei jeder Bindung zwischen den Monomeren, die freie Energie um $\alpha k_b T$ abnimmt, so ergibt sich:

$$\mu_N^0 = - \left(1 - \frac{1}{N}\right) \alpha k_b T = \mu_\infty^0 + \alpha \frac{k_b T}{N} \quad (2.18)$$

μ_∞^0 entspricht der mittleren freien Energie in einem unendlich langen Aggregat.

In diesem Zusammenhang stellt sich nun die Frage, wann sich Aggregate bevorzugt ausbilden. Dafür betrachten wir nochmals Gleichung 2.14 und setzen Gleichung 2.18 darin ein:

$$\begin{aligned} X_N &= N \left\{ X_1 \exp \left(\frac{\mu_1^0 - \mu_N^0}{k_b T} \right) \right\} \\ &= N \left\{ X_1 \exp \left(\alpha - \frac{\alpha}{N} \right) \right\}^N \approx N [X_1 \exp(\alpha)]^N \end{aligned} \quad (2.19)$$

Für $X_1 \exp(\alpha) \ll 1$ gilt $X_1 > X_2 > X_3 \dots$; das impliziert, dass die Moleküle weitestgehend als freie Monomere vorliegen. Nachdem X_N aber nicht größer als 1 sein kann, muss eine kritische Konzentration existieren, ab der eine Aggregatbildung merklich einsetzt. Diese kritische mizellare Konzentration (CMC⁴) ist folgendermaßen bestimmt:

$$[X_1]_{CMC} = \exp \left[- \frac{\mu_1^0 - \mu_N^0}{k_b T} \right] \approx \exp(-\alpha) \quad (2.20)$$

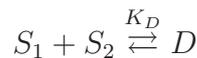
Wird die freie Monomerkonzentration über diesen kritischen Wert angehoben, so führt dies zur verstärkten Aggregatbildung, ohne dass sich die freie Monomerkonzentration im Gleichgewicht ändert.

⁴Abkürzung für die englische Bezeichnung *critical micelle concentration*

2.1.2.2 Theorie der DNA-Dissoziation

Die Charakterisierung der spezifischen Wechselwirkung zwischen komplementären DNA-Fragmenten und die damit verbundene Vorhersage der Duplexstabilität bzw. der Schmelztemperatur ist von fundamentaler und praktischer Bedeutung. Viele biochemische oder molekularbiologische Methoden, z. B. die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR⁵), beruhen darauf, Reaktionen nahe der Schmelztemperatur ablaufen zu lassen. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe von empirischen Daten Modelle erarbeitet, die die Vorhersage der Schmelztemperatur für eine beliebige Sequenz erlauben.⁶ Bezüglich dieser Arbeit soll die berechnete Duplexstabilität für bestimmte dsDNA-Fragmente dazu dienen, strukturbedingte Veränderungen der Stabilität zu erkennen. Im Nachfolgenden wird die Theorie der DNA-Dissoziation und die nötige Berechnung der energetischen Verhältnisse dargestellt, die sich unter anderem vor allem an die Arbeiten von *Owczarzy* anlehnen [60, 61, 62].

Die einfachste Möglichkeit, den Schmelzprozess zu beschreiben, stellt ein Zwei-Zustands-Modell dar, das in seiner Beschreibung analog zum *Ising-Modell* des Ferromagnetismus behandelt werden kann [63, 64]. Man geht in dem „Alles-oder-Nichts“-Modell davon aus, dass die jeweiligen komplementären Einzelstränge S_1 und S_2 mit dem Doppelstrang D im Gleichgewicht stehen.



Dabei stellt K_D die Gleichgewichtskonstante dar, die über die Gleichgewichtskonzentrationen definiert ist.

$$K_D = \frac{[D]}{[S_1][S_2]} \quad (2.21)$$

K_D kann aber auch über das Verhältnis der Gewichte der internen und externen Freiheitsgrade bestimmt werden [65]:

$$K_D = \frac{Z_{int}(D)Z_{ext}(D)}{Z_{int}(S_1)Z_{ext}(S_1)Z_{int}(S_2)Z_{ext}(S_2)} \quad (2.22)$$

Das Verhältnis der Gewichte der internen Freiheitsgrade (K_{duplex}) trägt für die konzentrationsunabhängigen, thermodynamischen Unterschiede zwischen Einzel- und Doppelstrang Rechnung und bestimmt weitgehend den kooperativen Schmelzprozess. Dies wird lediglich durch die sequenzabhängige Ausbildung von Wasserstoffbrücken sowie die Übereinanderlagerung der Basen bestimmt und legt die entsprechende Gleichgewichtskonstante fest:

$$K_{duplex} = \frac{Z_{int}(D)}{Z_{int}(S_1)Z_{int}(S_2)} \quad (2.23)$$

⁵Abkürzung für die englische Bezeichnung *polymerase chain reaction*

⁶In Referenz [60] ist eine Zusammenstellung der unterschiedlichen, empirischen Ergebnisse gegeben

Die freie Enthalpie bzw. die Enthalpie und die Entropie des Duplexübergangs und dadurch K_{duplex} können direkt aus der Sequenz abgeleitet werden, was in Abschnitt 3.2.4.3 vorgestellt wird.

$$\Delta G_{duplex} = -RT \ln K_{duplex} = \Delta H_{duplex} - T \Delta S_{duplex} \quad (2.24)$$

Das Verhältnis der externen Freiheitsgrade β akkumuliert konzentrationsabhängige Effekte und weitere Faktoren, die die externen Freiheitsgrade beeinflussen. Hierzu gehören vor allem die Anzahl der möglichen Nukleationspunkte innerhalb einer Sequenz, die für eine Aufweichung des kooperativen Zwei-Zustands-Modells sorgen.

$$\beta = \frac{Z_{ext}(D)}{Z_{ext}(S_1)Z_{ext}(S_2)} \quad (2.25)$$

Deshalb gilt für die Gleichgewichtskonstante folgende Beziehung:

$$K_D = K_{duplex} \cdot \beta \quad (2.26)$$

Über die später im Detail vorgestellten DNA-Dissoziationsexperimente ist der Anteil an intakten Basenpaaren χ zugänglich. Berücksichtigt man hierzu lediglich das Zwei-Zustands-Modell, so ergibt sich für χ :

$$\chi = \frac{2[D]}{2[D] + [S_1] + [S_2]} = \frac{2[D]}{c_T}, \quad (2.27)$$

mit der Bezeichnung c_T für die Gesamtkonzentration an ssDNA in der Probe, die während des Schmelzprozesses konstant bleibt. Unter Verwendung von Gleichung 2.21 kann ein Zusammenhang zwischen K_D und χ hergestellt werden.

$$K_D = \frac{2\chi}{(1-\chi)^2 c_T} \quad \text{bzw.} \quad \chi = \frac{1 + c_T K_D - \sqrt{1 + 2c_T K_D}}{c_T K_D} \quad (2.28)$$

Es wurde ein äquimolares Verhältnis zwischen den beiden komplementären ssDNA angenommen. Daraus wird ebenso ersichtlich, dass mit einer genauen Kenntnis der Gleichgewichtskonstante der Verlauf des Schmelzprozesses vorhergesagt werden kann. In diesem Zusammenhang ist die Schmelztemperatur dadurch bestimmt, dass die Hälfte der DNA-Basen sich im hybridisierten Zustand befinden ($\chi = 1/2$). Berücksichtigt man Gleichung 2.24 und 2.25, so kann die Schmelztemperatur in Abhängigkeit von der sequenzabhängigen Enthalpie (ΔH_{duplex}), der Entropie (ΔS_{duplex}) und des Nukleationsfaktors (β) bestimmt werden.

$$T_M = \frac{\Delta H_{duplex}}{R \ln \left(\frac{c_T}{4}\right) + \Delta S_{duplex} + R \ln \beta} \quad (2.29)$$

2.2 Nichtgleichgewichtsphänomene

Sowohl die Diffusion als auch die Elektrophorese stellen Prozesse dar, die auf Fluktuationen um den Gleichgewichtszustand beruhen oder nicht im Gleichgewicht stattfinden. Beide Phänomene sollen nachfolgend theoretisch beschrieben werden. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf einer schlüssigen Beschreibung der Aspekte, die im Rahmen dieser Arbeit relevant sind.

2.2.1 Die freie Diffusion

2.2.1.1 Einstein Relation

Obwohl die im Abschnitt 2.1.1 vorgestellten statischen Eigenschaften der Polymere durchaus experimentell zugänglich sind, werden doch viele weitere Polymereigenschaften durch dynamische Prozesse bestimmt. Auf mikroskopischer Längenskala spielt hier vor allem die *Brownsche* Molekularbewegung eine entscheidende Rolle, wie es besonders auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FCS-Messungen zutrifft. Dies soll nun mit Hilfe eines phänomenologischen Ansatzes, der auf Arbeiten von *Einstein* [66] beruht, näher erläutert werden.

Gemäß dem 1. Fickschen Gesetz besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsstrom $\vec{j}(\vec{x}, t)$ und dem Konzentrationsgradienten in der Lösung:

$$\vec{j}(\vec{x}, t) = -D\nabla c(\vec{x}, t) \quad (2.30)$$

D stellt die Diffusionskonstante dar. Berücksichtigt man noch die Kontinuitätsgleichung, so ergibt sich die allgemeine Diffusionsgleichung:

$$\frac{\partial c(\vec{x}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 c(\vec{x}, t) \quad (2.31)$$

Wirkt nun ein äußeres Potential auf das System, muss es entsprechend berücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass die entsprechende Geschwindigkeit proportional zur Kraft ist, die aus dem Potential U resultiert. Das 1. Ficksche Gesetz wird folgendermaßen angepasst:

$$\vec{j}(\vec{x}, t) = -D\nabla c(\vec{x}, t) - \frac{c(\vec{x}, t)}{\xi}\nabla U, \quad (2.32)$$

wobei ξ die Reibungskonstante darstellt. Im Gleichgewichtszustand, d. h. bei verschwindendem Konzentrationsstrom, und unter der Annahme, dass die Konzentration im Potential *Boltzmann*-verteilt ist, ergibt sich ein Zusammenhang zwischen D und ξ , die sog. *Einstein-Relation*:

$$D = \frac{k_b T}{\xi} \quad (2.33)$$

Nach *Stokes* hängt die Reibungskonstante für kugelförmige Objekte direkt vom hydrodynamischen Radius r_h ab, so dass die *Stokes-Einstein-Relation*

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_h} \quad (2.34)$$

gilt. Hierbei beschreibt η die Viskosität des Lösungsmittels. Nimmt man nun an, dass für sehr große Polymerknäule der hydrodynamische Radius mit dem Gyrationradius, d. h. mit der mittleren Ausdehnung des Moleküls skaliert, würde man für flexible Ketten ein Skalenverhalten von D mit $N^{-1/2}$ bzw. unter Berücksichtigung der Volumeneffekte mit $N^{-3/5}$ erwarten.

2.2.1.2 Flexible Polymere

Die im vorhergehenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse wie die *Einstein-Relation* beziehen sich lediglich auf einzelne Teilchen. Bei Polymeren kann aber die innere Dynamik und deswegen die Wechselwirkung der einzelnen Monomere nicht unberücksichtigt bleiben. Das erste Modell, das für die innere Dynamik Rechnung trägt, wurde von *Rouse* vorgeschlagen [67]. Es basiert auf einer Kugel-Feder-Vorstellung für das Polymer, was eine zu den in Abschnitt 2.1.1.1 vorgestellten Modellen komplementäre Beschreibung einer flexiblen Kette darstellt (Abbildung 2.3).

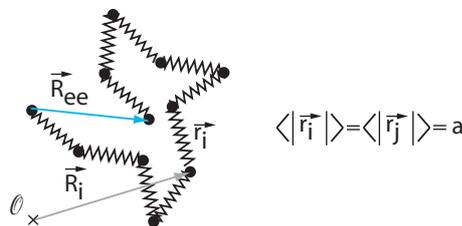


Abbildung 2.3: Schemazeichnung zum Kugel-Feder-Modell: Die einzelnen Monomere des Polymers sind über entropische Federn miteinander verbunden.

Hierbei wird angenommen, dass zwischen zwei Kugeln eine entropische Federwirkung vorhanden ist. Dies hat zur Folge, dass innerhalb dieses Modells nur Nächste-Nachbar-Wechselwirkung betrachtet wird. Die Bewegungsgleichung ergibt sich entsprechend zu:

$$\frac{d\vec{R}_i}{dt} = -k(2\vec{R}_i - \vec{R}_{i+1} - \vec{R}_{i-1}) + f_i \quad (2.35)$$

k entspricht der entropischen Federkonstante ($k = \frac{3k_b T}{a^2}$) und f_i der stochastischen Kraft. Dieses Gleichungssystem besteht aus gekoppelten, linearen Differentialgleichungen. Es kann mit Hilfe eines exponentiellen Lösungsansatzes in ein Eigenwertproblem überführt

und entsprechend gelöst werden. Betrachtet man die Bewegung des Polymerschwerpunktes $\vec{R}_s(t)$ (vgl. Gleichung 2.4), dann kann die entsprechende Diffusionskonstante D_R berechnet werden.

$$D_R = \frac{k_b T}{N \xi} \propto N^{-1} \quad (2.36)$$

Dieses konzeptionell wichtige Modell kann allerdings einen Großteil der Experimente nicht erklären, da in diesen ein anderes Skalenverhalten beobachtet wurde.

$$D \propto N^{-\nu} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{2} \leq \nu \leq \frac{3}{5} \quad (2.37)$$

Die Diskrepanz liegt hauptsächlich darin begründet, dass die hydrodynamischen Wechselwirkungen, die unter den einzelnen Segmenten des Polymers vorhanden sind, vernachlässigt werden. Die jeweiligen Segmente bewegen sich nicht wie im Modell in einer ruhenden Flüssigkeit, sondern in einer effektiven Strömung, die durch die Bewegung der anderen Monomere erzeugt und von der Flüssigkeit übertragen wird. Die hydrodynamische Wechselwirkung wird im Zimm-Modell berücksichtigt [68]. In diesem Fall erhält man folgendes Skalenverhalten der Diffusionskonstante:

$$D_Z \propto N^{-\frac{1}{2}} \quad (2.38)$$

Diese Skalengesetz wird in der Tat für ideale Polymere beobachtet.

2.2.1.3 Freie Diffusion von stabförmigen Molekülen

Obwohl die für flexible Polymere entwickelten Diffusionstheorien sehr viele experimentelle Ergebnisse gut erklären können, tritt gerade bei kurzen Polymeren der Fall auf, dass die Steifigkeit explizit berücksichtigt werden muss. Das ist der Fall, wenn die Konturlänge des betrachteten Polymers im Größenbereich der Persistenzlänge liegt. Hier ist das besonders relevant, da die in den Experimenten verwendeten dsDNA-Fragmente diese Bedingung erfüllen und somit durchaus angenommen werden kann, dass sie eher als ein steifer Stab als ein flexibles Polymer beschrieben werden können. Um die Translationsdiffusion berechnen zu können, wird der Stab in starr miteinander verbundene Kugelsegmente zerlegt, wobei der Durchmesser des Stabes b dem Durchmesser der Kugeln entspricht (Abbildung 2.4 (a)). Darüber hinaus ist zu beachten, dass der Stab einem anisotropen Körper entspricht, so dass eine mögliche Kraft bzw. eine dadurch induzierte Geschwindigkeit immer in die entsprechenden Komponenten senkrecht und entlang der Zylinderachse zerlegt werden muss (Abbildung 2.4 (b)):

$$\vec{F} = \xi_{\parallel} \vec{v}_{\parallel} + \xi_{\perp} \vec{v}_{\perp} \quad (2.39)$$

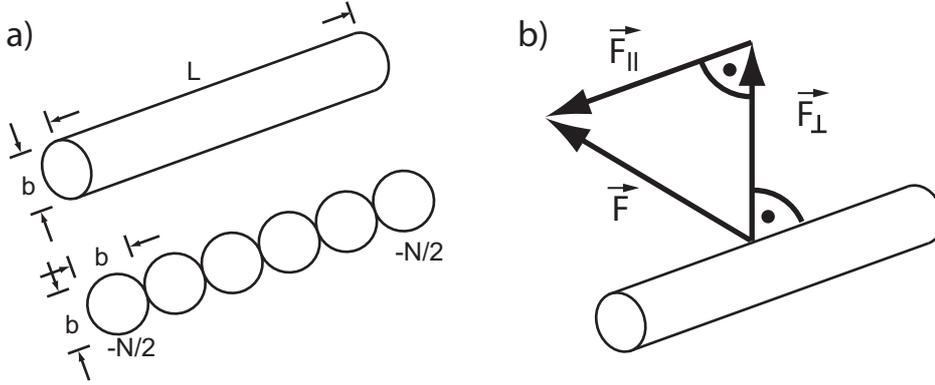


Abbildung 2.4: Modellvorstellung für einen steifen Stab: (a) Um die Diffusion eines steifen Stabes zu berechnen, wird dieser durch Kugelsegmente ersetzt, die starr miteinander verbunden sind. (b) Wirken Kräfte auf einen Zylinder, so müssen diese immer in eine Normalkomponente und in eine axiale Komponente zerlegt werden.

Mit Hilfe der *Kirkwood-Theorie* lassen sich die Reibungskoeffizienten berechnen [69]:

$$\xi_{\parallel} = \frac{2\pi\eta L}{\ln\left(\frac{L}{b}\right)} \quad \text{und} \quad \xi_{\perp} = 2\xi_{\parallel} \quad (2.40)$$

Unter Verwendung der *Einstein-Relation* lassen sich die entsprechenden Diffusionskonstanten berechnen.

$$D_{\parallel} = \frac{k_b T}{2\pi\eta L} \ln\left(\frac{L}{b}\right) \quad \text{und} \quad D_{\perp} = \frac{1}{2} D_{\parallel} \quad (2.41)$$

Die über alle Raumrichtungen gemittelte Diffusionskonstante beträgt schließlich:

$$D_{ges} = \frac{D_{\parallel} + 2D_{\perp}}{3} = \frac{1}{3} \frac{k_b T}{\pi\eta L} \ln\left(\frac{L}{b}\right) \quad \text{d.h.} \quad D_{ges} \propto \frac{1}{L} \ln\left(\frac{L}{b}\right) \quad (2.42)$$

Bezüglich dieses Modells ist anzumerken, dass keine hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Kugeln des Stabes berücksichtigt wurden. Diese Effekte wurden in numerischen Modellrechnungen von *Broersma et. al.* [70, 71] und *Tirado et. al.* [72, 73] explizit berechnet. Nach *Tirado* ergibt sich eine gemittelte Diffusionskonstante zu [74]:

$$D_{ges} = \frac{A k_b T}{3\pi\eta L} \quad \text{mit} \quad A = \ln\left(\frac{L}{b}\right) + 0,312 + 0,565 \left(\frac{L}{b}\right)^{-1} - 0,100 \left(\frac{L}{b}\right)^{-2} \quad (2.43)$$

Diese Gleichung für die Diffusionskonstante wird im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet.

2.2.2 Theoretische Überlegungen zur Elektrophorese

Für das Verständnis der Elektrophorese ist es erforderlich, zuerst die elektrostatischen Gegebenheiten in wässriger Lösung näher zu analysieren. Dazu sind ausführliche Betrachtungen in den Referenzen [75, 76, 77] gegeben. In diesem Zusammenhang ist es von entscheidender Bedeutung, dass DNA einen Polyelektrolyten darstellt, der in wässriger Lösung im Allgemeinen vollständig geladen ist und somit pro Basenpaar zwei negative Ladungen trägt ($pK_a(\text{H}_3\text{PO}_4) = 2,16$). Dies entspricht einer Linienladungsdichte von $\rho = 5,88 e/\text{nm}$. In wässriger Lösung sind neben dem Polyelektrolyten (PE) noch die Gegenionen und Coionen zu berücksichtigen, die auf Grund der endlichen Salzstärke vorhanden und frei beweglich sind.

2.2.2.1 Elektrostatik in Elektrolytlösungen

Um einen qualitativen Einblick in die Ladungsverteilung um einen PE zu bekommen, muss die *Poisson-Gleichung* näher betrachtet werden, die einen Zusammenhang zwischen Ladungsverteilung ρ und dem elektrostatischen Potential U am Ort \vec{r} herstellt:

$$\Delta U(\vec{r}) = -\frac{\rho(\vec{r})}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \quad (2.44)$$

Die relative Dielektrizitätskonstante ε_r beträgt in Wasser ca. 80. Für den Fall einer einzelnen Elementarladung im Ursprung ($\rho(\vec{r}) = \delta(\vec{0})e$), lässt sich das Potential analytisch mit Hilfe der entsprechenden Greenschen Funktion berechnen.

$$U(\vec{r}) = \frac{e}{4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0} \frac{1}{|\vec{r}|} \quad (2.45)$$

Die auf die thermische Energie normierte elektrostatische Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Ladungen ergibt sich zu:

$$u(\vec{r}) = \frac{qU(\vec{r})}{k_b T} = \frac{l_B}{|\vec{r}|} \quad \text{mit} \quad l_B = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r k_b T} \quad (2.46)$$

In diesem Zusammenhang bezeichnet die Bjerrum-Länge l_B den Abstand, bei dem die elektrostatische Wechselwirkungsenergie gleich der thermischen ist. Sie beträgt in Wasser ungefähr 0,8 nm.

Im Falle einer PE-Lösung müssen nicht nur die frei beweglichen Ladungen des Salzes ρ_G und ρ_{Co} , sondern auch die immobilisierten Ladungen des PE ρ_{PE} berücksichtigt werden:

$$\rho(\vec{r}) = \rho_{PE}(\vec{r}) + \rho_G(\vec{r}) + \rho_{Co}(\vec{r}) \quad (2.47)$$

Die Verteilung der Gegen- und Coionen folgt weitgehend der Boltzmannverteilung [78], so dass sich die *Poisson-Boltzmann-Gleichung* folgendermaßen formulieren lässt:

$$\Delta U(\vec{r}) = -\frac{1}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \left\{ \rho_{im}(\vec{r}) + c_S e z \exp\left(-\frac{e z U(\vec{r})}{k_b T}\right) - c_S e z \exp\left(+\frac{e z U(\vec{r})}{k_b T}\right) \right\} \quad (2.48)$$

c_S entspricht der Salzkonzentration und z der Valenz der freien Ionen. Die *Poisson-Boltzmann-Gleichung* stellt eine nichtlineare Differentialgleichung dar, die nur im Fall einer planaren geladenen Wand analytisch gelöst werden kann. Für niedrige Salzkonzentrationen, große Entfernungen von der immobilisierten Ladung und unter der Annahme, dass die thermischen Fluktuationen deutlich größer als die elektrostatische Wechselwirkung sind ($e z U \ll k_b T$), lässt sich Gleichung 2.48 linearisieren.

$$\Delta U(\vec{r}) = -\frac{1}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \rho_{im}(\vec{r}) + \frac{2 c_S e^2 z^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_b T} U(\vec{r}) \quad (2.49)$$

Für eine Punktladung im Ursprung kann das Potenzial zu

$$U(\vec{r}) = \frac{l_B k_b T}{|\vec{r}|} \frac{1}{e} \exp(-\kappa r) \quad \text{mit} \quad \kappa^2 = \frac{2 c_S e^2 z^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_b T} \quad (2.50)$$

berechnet werden; κ^{-1} bezeichnet die Debye-Länge. Bemerkenswert an dieser Lösung ist, dass das ursprüngliche Potential der Punktladung um einen Exponentialterm abgeschwächt wird. Die Debye-Länge als ein Maß für die Stärke dieser Abschirmung variiert mit der Salzstärke und der Valenz der Ionen. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Debye-Länge ungefähr 1 nm ($c_S = 100$ mM; $z = 1$). Die Lösung zeigt auch, dass für große Entfernungen die Ladung vollständig durch die entsprechende Gegenladungswolke abgeschirmt ist.

Lineare PE wie DNA können in erster Näherung mit einer linearen kontinuierlichen Ladungsdichte beschrieben werden, die unter Vernachlässigung der Randeﬀekte als unendlich ausgedehnt angenommen wird. Unter diesen Annahmen gilt für das Potential:

$$U(\vec{r}) = 2 l_B \frac{\rho_{PE}}{e^2} K_0 \left[\kappa \sqrt{x^2 + y^2} \right] k_b T + A \frac{k_b T}{e} \quad (2.51)$$

A stellt eine Normierungskonstante dar, die durch die Randbedingungen festgelegt werden muss. $K_0(\alpha)$ entspricht einer hyperbolischen Besselfunktion nullter Ordnung, die ein asymptotisches Verhalten mit $-\ln(\alpha)$ aufweist.

2.2.2.2 Manning-Kondensation

Mit Hilfe der linearisierten *Poisson-Boltzmann-Gleichung* konnte gezeigt werden, dass die elektrische Ladung eines Polyelektrolyten mit zunehmender Entfernung deutlich durch die beweglichen Ladungen abgeschirmt wird. Darüber hinaus können bei großen Salzstärken und Ladungsdichten des PE Kondensationseffekte von Gegenionen auf dem PE auftreten, die experimentell beobachtet [79] und von *Manning* erklärt [80, 81, 82] wurden. Dieser Effekt soll nun näher diskutiert werden.

Bei den bisherigen Berechnungen des Potentials wurde postuliert, dass die Verteilung innerhalb der Lösung einer Boltzmann-Statistik folgt und so im Fall einer unendlich langen Linienladung die Wahrscheinlichkeit, ein Ion im Abstand r^* vom PE zu finden, durch

$$W(r^*) = \exp\left(\frac{eU(r^*)}{k_b T}\right) = W_0 r^{*(-2l_B \frac{\rho}{e})} \quad \text{mit } W_0 = e^A \kappa^{-2l_B \frac{\rho}{e}} \quad (2.52)$$

definiert ist. Die Wahrscheinlichkeit P , ein Ion bis zum Abstand \tilde{r}^* zu finden, wird folgendermaßen berechnet:

$$P(\tilde{r}^*) = \int_0^{\tilde{r}^*} W(r^*) 2\pi r^* dr^* = 2\pi W_0 \int_0^{\tilde{r}^*} r^{*(1-2l_B \frac{\rho}{e})} dr^* \quad (2.53)$$

Diese Wahrscheinlichkeit ist nur dann positiv und physikalisch aussagekräftig, wenn

$$l_B \frac{\rho}{e} < 1. \quad (2.54)$$

Aus physikalischer Sicht kann dies so interpretiert werden, dass für den Fall, dass die Ladungsdichte des PE diesen kritischen Wert übersteigt, so lange Gegenionen an diesen angelagert werden, bis die kritische Ladungsdichte erreicht ist. Bei DNA handelt es sich um einen hochgeladenen PE, so dass ca. 76 % der DNA-Ladungen durch kondensierte Gegenionen abgesättigt sind. Die Ladungen sind nicht statisch miteinander verbunden, sondern es stellt sich in einem dynamischen Prozess der makroskopisch sichtbare Kondensationseffekt ein.

2.2.2.3 DNA im elektrischen Feld in freier Lösung

Bis jetzt wurde eine PE-Lösung lediglich für den Fall betrachtet, dass kein äußeres Feld angelegt wurde. Es wurde ersichtlich, dass sich innerhalb der Lösung eine charakteristische Verteilung der Ionen einstellt und dass nur PE als solche in wässriger Lösung nur bis zu einer kritischer Ladungsdichte stabil sind und dass anderenfalls Gegenionenkondensation zu beobachten ist. Wirkt nun eine äußere elektrische Kraft, dann sind mehrere Beiträge zu berücksichtigen, die zum einen die elektrostatischen Kräfte der DNA-Ladungen aber auch die der Gegenionen bzw. die induzierte, elektroosmotische Strömung berücksichtigen.

Lokales Bild der wirkenden Kräfte

Ein Überblick über die relevanten Kräfte ist in Abbildung 2.5 illustriert und wird ausführlich in Referenz [83] behandelt. Eine wesentliche, wirkende Kraft stellt die elektrische Kraft $\vec{F}_e = q_{eff}\vec{E}$ dar, wobei q_{eff} die tatsächlich zugängliche Ladung des PE und \vec{E} das von außen angelegte elektrische Feld beschreiben. Bei konstanter Ladungsdichte wirkt die Kraft gleichförmig entlang der Kontur des PE. Des Weiteren entsteht durch die induzierte Drift des PE auf Grund der Viskosität des Mediums eine hydrodynamische Reibungskraft \vec{F}_h , die der Driftgeschwindigkeit entgegengerichtet ist. Unter der Annahme eines ionenfreien Lösungsmittels kann die Reibungskonstante ξ unter Verwendung der *Einstein-Relation* (Gleichung 2.33) und dem Diffusionsmodell für stabförmige Moleküle (Gleichung 2.42) berechnet werden.

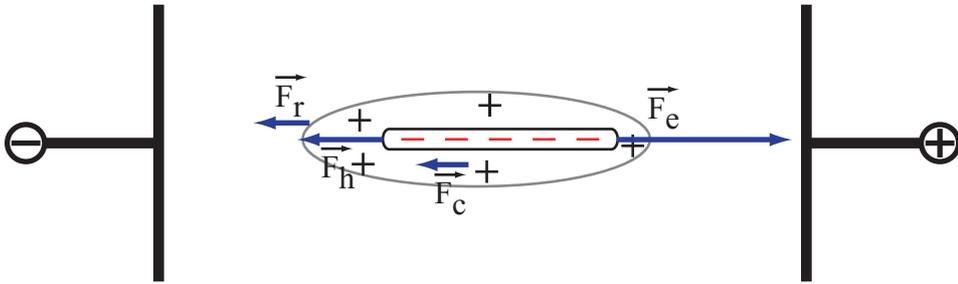


Abbildung 2.5: Kräfte, die auf einen geladenen Polyelektrolyten wirken.

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, bildet sich um einen PE eine Gegenionenwolke aus, die die Ladung des PE vollständig neutralisiert. Auf diese Gegenionen wirkt jeweils eine elektrische Kraft, die in ihrer Gesamtheit der des PE entspricht. Allerdings ist die Verzögerungskraft \vec{F}_r , die durch das Medium auf den PE übertragen wird, deutlich niedriger, da das viskose Medium den entsprechenden Übertrag dämpft. Diese Dämpfung ist indirekt proportional zur *Debye-Länge*, dadurch liefert \vec{F}_r einen deutlich stärkeren Beitrag für kleine *Debye-Längen* bzw. für große Salzstärken. Im Grenzfall verschwindender Salzstärke kann auch die Verzögerungskraft vernachlässigt werden. Schließlich muss noch die Relaxationskraft \vec{F}_c berücksichtigt werden, die darauf beruht, dass sich die Ladungsschwerpunkte der PE und der Gegenionen im elektrischen Feld verschieben und so ein Dipolmoment induziert wird, das dem ursprünglich angelegtem E-Feld entgegengerichtet. Im stationären Zustand muss die Summe aller Kräfte verschwinden:

$$\vec{F}_e + \vec{F}_h + \vec{F}_r + \vec{F}_c = \vec{0} \quad (2.55)$$

Vor allem bei hohen Salzstärken können alle Terme in Gleichung 2.55 relevant sein.

Im Gleichgewichtszustand lässt sich eine Mobilitätskonstante bestimmen, die die electrophoretische Drift mit dem E-Feld verbindet:

$$\vec{v} = \mu \vec{E} \quad (2.56)$$

Für den Fall, dass sowohl die Verzögerungskraft \vec{F}_r als auch die Relaxationskraft \vec{F}_c und Kondensationseffekte vernachlässigt werden können, kann direkt die elektrophoretische Geschwindigkeit bestimmt werden.

$$\left| \vec{F}_e \right| = \left| \vec{F}_h \right| \quad (2.57)$$

$$qE = \xi v = \xi \mu E \quad (2.58)$$

Verknüpft man diesen Zusammenhang mit der *Einstein-Relation* aus Gleichung 2.33, so ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen elektrophoretischer Drift und der Diffusionskonstante des PE:

$$\frac{\mu}{D} = \frac{q}{k_b T}. \quad (2.59)$$

Geht man von einem homogen geladenen PE mit n Elementarladungen aus, wie das z. B. bei DNA der Fall ist, dann kann Gleichung 2.59 weiter vereinfacht werden. Es folgt daraus unabhängig von der Länge des PE ein konstanter Quotient.

$$\frac{\mu(n)}{D(n)n} = \frac{e}{k_b T} \quad (2.60)$$

Dieser beträgt bei Raumtemperatur $39,6 \text{ V}^{-1}$

Längenabhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität

Will man DNA im elektrischen Feld auftrennen, so ist es notwendig, dass die elektrophoretische Mobilität eine ausgeprägte Längenabhängigkeit aufweist. Diesbezüglich sind in freier Lösung prinzipiell zwei Fälle zu unterscheiden. (i) Wenn der Gyrationradius kleiner als die Debye-Länge und diese nochmals kleiner als die Persistenzlänge ist, können Retardierungskräfte und Dipolkräfte vernachlässigt werden. Demnach kann aus Gleichung 2.60 unter Verwendung der Diffusionskonstante für steife Stäbe (vgl. Gleichung 2.43) die längenabhängige Mobilität $\mu(L)$ errechnet werden.

$$\mu(L) = \frac{q(L)D(L)}{k_b T} = \frac{\rho^* L 3\pi\eta L}{k_b T L} \ln\left(\frac{L}{b}\right) \propto \ln\left(\frac{L}{b}\right) \quad (2.61)$$

Für kurze DNA-Fragmente konnte diese Abhängigkeit bis zu einer Länge von 200 bp gezeigt werden [84, 85]. (ii) Im Allgemeinen wird aber der Gyrationradius deutlich größer als die Debye-Länge sein. In diesem Fall kommt es zu hydrodynamischen und elektrostatischen Abschirmungen, so dass nur noch ein Segment betrachtet werden muss, das die Ausdehnung der Debye-Länge aufweist. Damit skaliert die Mobilität des PE-Segments mit der Debye-Länge und nicht mehr mit der Länge des PE

$$\mu(L) = \frac{q(\kappa^{-1})D(\kappa^{-1})}{k_b T} = \frac{\rho^* L 3\pi\eta\kappa^{-1}}{k_b T \kappa^{-1}} \ln\left(\frac{\kappa^{-1}}{b}\right) \propto \ln\left(\frac{\kappa^{-1}}{b}\right). \quad (2.62)$$

Da die Debye-Länge eine ausgeprägte Salzabhängigkeit zeigt, sollte auch im Bezug zur elektrophoretischen Mobilität die Salzstärke einen entscheidenden Einfluss haben. Der Nachweis wurde ebenfalls bereits erbracht[83].

In den letzten Jahren wurde von experimenteller Seite her intensiv daran gearbeitet, eine Auftrennung von PE im elektrischen Feld zu erzeugen, ohne eine Matrix einzubringen. Hierbei wurden DNA-Moleküle endständig mit ladungsneutralem Strepavidin markiert, so dass ein Ladungs-Reibungs-Ungleichgewicht entstand, das eine Auftrennung ermöglichte.⁷ Auch von Seiten der Theorie kann diese Elektrophoresemethode weitgehend erklärt werden. Die Mobilität ist folgendermaßen mit der Gesamtlänge des Fragmentes verknüpft:

$$\mu(L) = \mu_0 \frac{1}{1 + \frac{\gamma}{L}} \quad (2.63)$$

γ entspricht der Länge eines DNA-Fragmentes, dessen Reibungskonstante dem des endständigen Labels entspricht. Eine Übersicht über die experimentellen und theoretischen Ergebnisse ist in Referenz [86] gegeben.

Elektroosmose

Wie in Abschnitt 2.2.2.1 näher gezeigt, stellt sich in der Umgebung von immobilisierten Ladungsträgern immer ein ortsabhängiges Potential ein, wodurch auch die Konzentrationen der Ionen der Elektrolytlösung nicht mehr gleich verteilt sind. Dieser Effekt ist auch an geladenen Oberflächen zu beobachten. Innerhalb einer Schichtdicke, die in Ihrer Ausdehnung ungefähr der Debye-Länge entspricht, kommt es zu einer erhöhten Konzentration an Gegenionen. Erst auf größeren Längenskalen ist wieder eine Gleichverteilung der Gegen- und Coionen zu erwarten.

Legt man nun an eine entsprechende Kammer ein elektrisches Feld an, so driften die Ionen. Da sich aber an der Kammerwand mehrheitlich positiv oder negativ geladene Ionen befinden, kommt es dort zur Ausbildung einer effektiven Ladungsströmung, die durch die innere Reibung der Flüssigkeit auf die ganze Flüssigkeit übertragen wird. Es stellt sich eine makroskopische Flüssigkeitsbewegung ein. Im Fall eines offenen Systems ist die elektroosmotische Geschwindigkeit außerhalb der durch die Debye-Länge bestimmten Doppelschicht konstant und linear abhängig vom angelegten, elektrischen Feld:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad (2.64)$$

Die elektroosmotische Mobilität ist lediglich durch die Höhe der Oberflächenladung und die Ausdehnung der Doppelschicht bestimmt.

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta} \quad (2.65)$$

⁷Die Methode wird mit *end-labeled free-solution electrophoresis* bezeichnet.

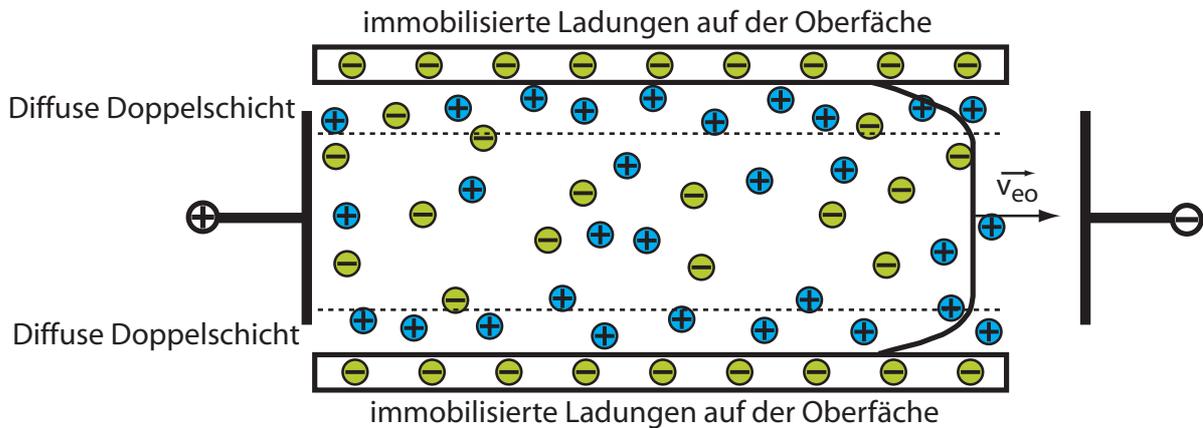


Abbildung 2.6: Schemazeichnung zur Ausbildung einer elektroosmotischen Strömung: Auf Grund der immobilisierten Oberflächenladungen stellt sich ein Gradient in der Verteilung der freien Ladungsträger ein; dadurch entstehen effektive Driftbewegungen im elektrischen Feld, so dass auf Grund der Viskosität der Flüssigkeit eine makroskopische Flüssigkeitsströmung beobachtet werden kann.

Das Zetapotential ζ beschreibt das Potential am Ort der diffusen Doppelschicht [87].

In geschlossenen Kanälen ist die gemessene elektroosmotische Geschwindigkeit auch außerhalb der Debye-Länge nicht unabhängig von der Position im Kanal, dies ist darin begründet, dass der Gesamtfluss der Flüssigkeit in diesem Fall verschwinden muss. Es stellt sich ein parabolisches Flussprofil ein, welches in Abschnitt 3.3.3.2 noch näher betrachtet wird.

2.2.2.4 DNA-Auftrennung in Polymernetzwerken

Während es in freier Lösung nur sehr schwierig ist, eine Auftrennung von PE zu erzeugen, ist dies in Gelen ohne Probleme möglich. Nicht ohne Grund stellt die Gelelektrophorese nach wie vor eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden dar, die vor allem bei der DNA-Analyse und -sequenzierung unverzichtbar ist. In diesem Abschnitt sollen nun die für die Auftrennung grundlegenden Modelle betrachtet und die Abhängigkeit der Mobilität von der dsDNA-Länge dargestellt werden. Ein ausführlicher Überblick wird in den Referenzen [88, 89, 90, 91, 92] gegeben.

Abbildung 2.7 stellt den prinzipiellen Verlauf der elektrophoretischen Mobilität in Abhängigkeit der DNA-Länge dar. Charakteristisch hierbei ist, dass es eine kritische Fragmentlänge gibt, der dieser es zu einer Mobilitätsinversion kommt und noch längere DNA-Fragmente mit konstanter Mobilität migrieren. Die unterschiedlichen Regime der elektrophoretischen Drift werden hauptsächlich durch das Verhältnis aus Maschenweite ψ und dem Gyrationradius der DNA bestimmt. Ist der Gyrationradius klein im Vergleich zur Porengröße, wirkt das Gel wie ein Sieb. Die Auftrennung in diesem Bereich kann wie eine durch das E-Feld getriebene Filtration betrachtet werden. Dieser Bereich wird

als *Ogston-Regime* bezeichnet, das mit dem *Ogston-Modell* beschrieben werden kann [93, 94]. Hierbei wird angenommen, dass das Verhältnis aus der im Gel gemessenen Mobilität und der in freier Lösung bestimmten Mobilität gleich dem fraktalen Volumen ist, das der DNA zur Verfügung steht. Unter dieser Annahme ergibt sich für die Mobilität μ

$$\frac{\mu(L)}{\mu_0} = \exp \left\{ -\frac{\pi}{4} \left(\frac{R_G}{\psi} \right)^2 \right\}. \quad (2.66)$$

Dies impliziert zum einen, dass die Mobilität von der DNA-Länge ($R_G \propto \sqrt{L}$) abhängt, aber auch mit der Porengröße bzw. der Konzentration des Gels variiert. Dieser Zusammenhang kann verwendet werden, um die Porengröße abzuschätzen [95].

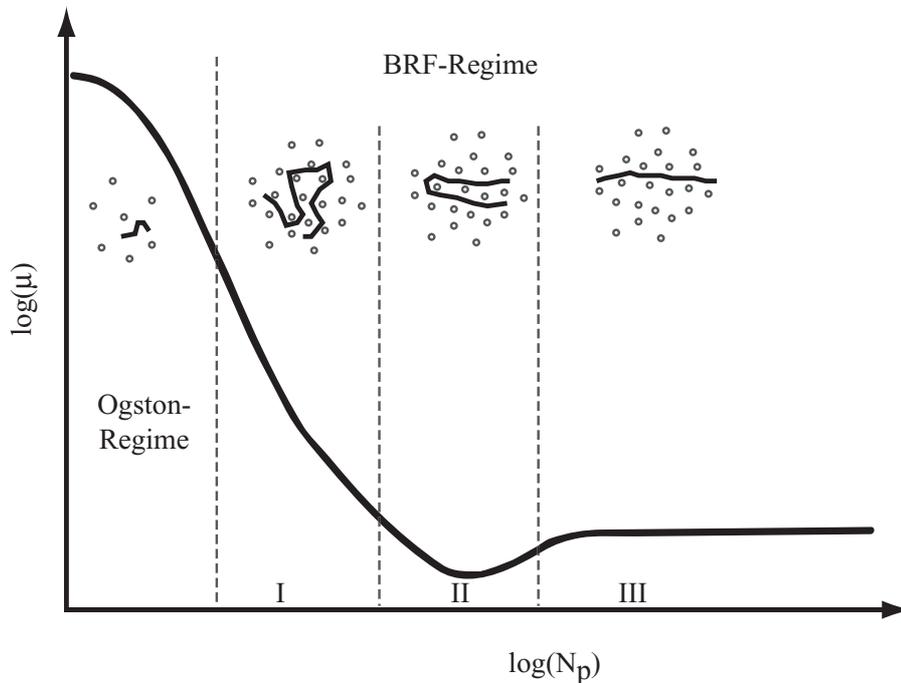


Abbildung 2.7: DNA-Auftrennung in einer Gelmatrix: In Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen der DNA-Länge und der Porengrößen beschreiben unterschiedliche Modelle die elektrophoretische Mobilität⁹. Im *Ogston-Regime* wirkt das Gel wie ein Sieb. Für größere DNA-Stränge findet das BRF-Modell Anwendung, das die unterschiedlichen Zustände beschreibt. Die DNA kriecht durch das Gel. Solange keine Orientierung auftritt (I) ist die Mobilität sehr stark von der DNA-Länge abhängig. Ein Minimum ist dann zu beobachten, wenn die Anzahl der u-förmigen Konformationen zunimmt und auf diese Weise die DNA-Bewegung effektiv verlangsamt wird (II). Bei noch längeren DNA-Molekülen ist eine vollständige Ausrichtung im elektrischen Feld zu beobachten, die einer Auftrennung entgegen steht (III).

⁹ N_p beschreibt die Anzahl an Poren, die durch einen DNA-Strang belegt sind

Die Bewegung längerer DNA in einer Gelmatrix kann mit einem getriebenen Kriechmodell, das Fluktuation mit einbezieht (BRF)¹⁰ gut beschrieben werden [96]. Dieses Modell stellt eine Verallgemeinerung älterer Kriechmodelle dar [97, 98]. Ist das DNA-Molekül zu groß, um in eine Pore zu passen, so wird es deformiert und über mehrere Poren verteilt. Bei einer weiteren Bewegung bewegt es sich immer mit einem Ende weiter, während das restliche Molekül nachgezogen wird. Dadurch ist die DNA-Migration mit einer Bewegung innerhalb einer Röhre zu vergleichen. Hierbei versucht die elektrische Kraft, die DNA zu orientieren und so die potentielle Energie zu minimieren.

Ist die DNA noch kurz genug, dass die Reibungskräfte nicht ausreichen, die DNA vollständig im E-Feld auszurichten und sie weitestgehend ihre Knäuel-Struktur behält, dann skaliert die Mobilität mit N_p^{-1} . N_p stellt die Anzahl der Poren dar, die durch die DNA belegt sind und skaliert linear mit der DNA-Länge. Im Zwischenbereich minimaler Mobilität kommt es zur verstärkten Ausbildung u-förmiger Konformationen, die die Bewegung im Gel verlangsamen und die Mobilität minimieren. Dieser Effekt wurde beobachtet [99], kann aber meist vernachlässigt werden. Im Fall noch längerer DNA kommt es schließlich durch die kriechende Fortbewegung und wegen der immer größer werdenden Reibungskräfte zu einer vollständigen Ausrichtung des Moleküls, was zu einer längenunabhängigen Mobilität führt. Von phänomenologischer Seite aus kann die Mobilität innerhalb der BRF-Regimes mit nachfolgender Gleichung beschrieben werden [90].

$$\frac{\mu(L)}{\mu_0} = \sqrt{\left(\frac{1}{3N_p}\right)^2 + \left(\frac{2\varepsilon}{5 + 2\beta\varepsilon}\right)^2} \quad \text{mit} \quad \varepsilon = \frac{\eta\psi^2\mu_0 E}{k_b T} \quad \text{und} \quad \frac{1}{\beta} = \frac{\mu_\infty}{\mu_0}, \quad (2.67)$$

wobei μ_∞ die elektrophoretische Mobilität im Gel bei hohen Feldern beschreibt. Darin werden auch nochmals die Skalengesetze für kurze DNA-Fragmente (N_p^{-1}) und lange Fragmente (N_p^0) sichtbar. Die Bandinversion ist in Gleichung 2.67 nicht berücksichtigt. Der Übergang von längen- zu feldabhängiger Mobilität erfolgt ungefähr bei

$$N_p^* \approx \varepsilon^{-1} = \frac{k_b T}{\eta\psi^2\mu_0 E}. \quad (2.68)$$

Der Übergang ist deshalb hauptsächlich von der Porengröße und der Feldstärke abhängig.

Insgesamt beschreibt das BRF-Modell sehr gut elektrophoretische Experimente, allerdings kann die kritische DNA-Länge nicht mit hoher Genauigkeit vorhergesagt werden [89]. Weiterführende Experimente haben auch gezeigt, dass sehr lange DNA-Fragmente ($N_p > 1000 - 10000$) keine elektrophoretische Drift in Gelen zeigen [88]. Eine mögliche Erklärung sind DNA-Knoten.

Die hier vorgestellten Mobilitätsmodelle wurden für den Fall chemischer Netzwerke entwickelt. Sollen diese nun auf physikalische Gele, d. h. auf Gele, die nur durch

¹⁰Das Modell wird im Englischem mit *biased reptation model with fluctuations* bezeichnet

Überlapp der Polymere zu Stande kommen, angewandt werden, muss deren Eigendynamik berücksichtigt werden. Dies kann in der Art und Weise geschehen, dass durch die Polymereigenbewegungen die Matrixbeschränkungen für den DNA-Kriechprozess aufgeweicht werden. *Viovy und Dukes* schlussfolgerten daraus, dass neben der Mobilität, die das Kriechen der DNA verursacht (μ_{rep}), noch ein Term berücksichtigt werden muss, der für die Fluktuationen des Gels und für die Aufweichung der Kriechröhre Rechnung trägt (μ_{cr}) [100].

$$\mu = \mu_{rep} + \mu_{cr} \tag{2.69}$$

μ_{cr} ist unabhängig von der spezifischen DNA-Länge. Folglich kann nur dann eine Auftrennung erzielt werden, wenn der Aufweicheffekt vernachlässigbar ist. Das ist für hohe Polymerkonzentrationen erfüllt.

2.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Mit FCS hat sich in den letzten Jahren eine mächtige Methode etabliert, sehr stark verdünnte fluoreszierende Moleküle mit sehr hoher Orts- und Zeitaufösung im Bezug auf ihre dynamischen Prozesse zu charakterisieren. Im Gegensatz zu den konventionellen Fluoreszenztechniken ist aber hier nicht die Intensität als solche von Bedeutung, sondern deren zeitliche Fluktuationen, die durch spontane Abweichungen vom thermischen Mittelwert entstehen. Prinzipiell können mit Hilfe von FCS all diejenigen physikalischen Parameter zugänglich gemacht werden, die sich im fluktuierenden Fluoreszenzsignal niederschlagen.

Die tatsächliche Anwendbarkeit der Methode, Intensitätsfluktuationen zu detektieren und hieraus Aussagen über die Molekülkinetik zu treffen, wurde von *Magde, Elson und Webb* 1972 nachgewiesen, indem sie die Bindungskonstante von Ethidiumbromid, einem interkalierenden Farbstoff, mit DNA mittels FCS detektieren konnten [101]. In der Folgezeit wurde die entsprechende Theorie ausgearbeitet [102, 103, 104]. Allerdings mangelte es bei den ersten Experimenten an einem ausreichenden Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Ebenso erschwerten die niedrige Detektionswahrscheinlichkeit, die hohe Teilchenzahl und das hohe Hintergrundsignal einfache und tiefe Einblicke in die entsprechenden Systeme. Besonders die große Ensemblezahl verursachte, dass die Fluoreszenzfluktuationen deutlich in den Hintergrund traten. Dies wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass die Fluktuationen der Teilchenzahl N im Fokus auf Grund der anzuwendenden Poissonstatistik mit N^{-1} skaliert und somit für große N klein ist. Wegen dieser experimentellen Unzulänglichkeiten trat FCS in den Hintergrund und erlebte erst im Jahr 1993 eine Renaissance, als es *Rigler et. al.* gelang, Einzelmolekülfluoreszenz nachzuweisen [105]. Dieser Fortschritt wurde erst durch die Verwendung einer Laserbeleuchtung auf der einen Seite und der Implementierung eines konfokalen Detektionsvolumens auf der anderen Seite ermöglicht. Durch diese entscheidenden Weiterentwicklungen wurde FCS zum Nachweis unterschiedlichster Prozesse interessant. In der Folgezeit wurden neben diffusiven Prozessen z. B. Bindungskinetiken [106] oder photophysikalische Eigenschaften von Farbstoffen [107] analysiert. FCS entwickelte sich zu einer standardmäßigen Methode, was sich auch darin manifestiert, dass mehrere kommerzielle Geräte verfügbar sind. Eine ausführliche Übersicht über die Anwendungsgebiete von FCS ist in folgenden Referenzen zu finden [108, 109, 110, 111].

2.3.1 Experimentelle Grundzüge

Der prinzipielle FCS-Aufbau ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Die Probe, die die zu detektierenden Moleküle enthält, wird durch das Objektiv mit einem fokussierten Laser beleuchtet. Die diffundierenden Teilchen absorbieren das eingestrahlte Licht und emittieren gegebenenfalls rotverschobenes Fluoreszenzlicht in alle Raumrichtungen. Das Objektiv fängt einen Teil davon auf und bildet dies über eine entsprechende Optik, die das Fluoreszenzlicht vom Anregungs- und Streulicht trennt, auf eine Lochblende ab. Diese

sorgt dafür, dass fluoreszentes Streulicht, das nicht aus der Anregungsebene stammt, ausgeblendet wird und somit nur das Licht aus einem auflösungslimitierten Volumen detektiert wird. Mit Hilfe einer Avalanche Photo Diode (APD) wird das zeitaufgelöste Fluoreszenzsignal gemessen, das die Rohdaten jeder FCS-Messung darstellt.

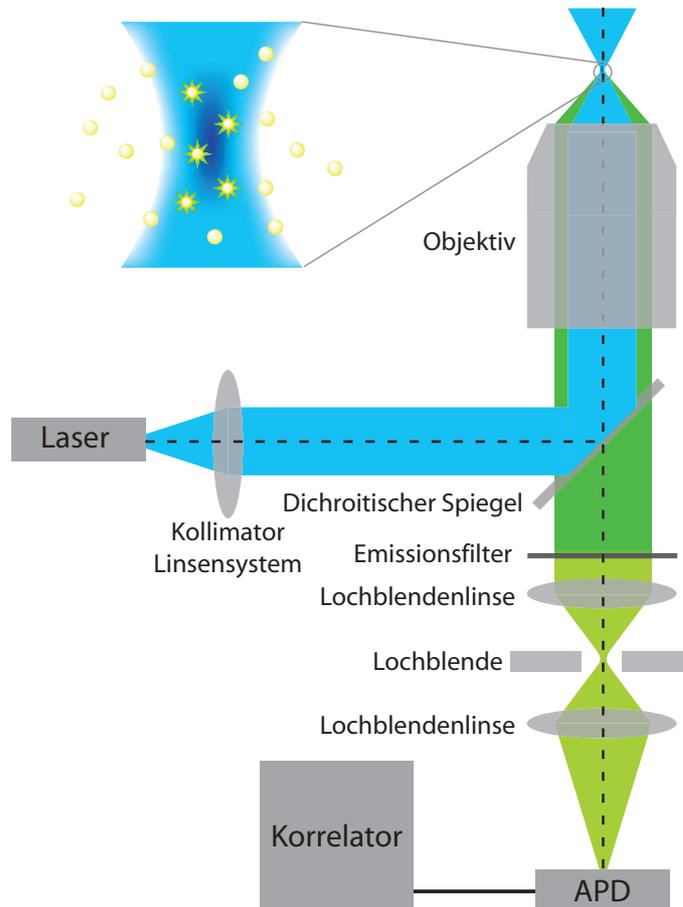


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der FCS-Methode: Mit einem fokussierten Laser wird die Probe beleuchtet. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv aufgefangen und durch entsprechende Filter vom Anregungslicht getrennt. Die Lochblende sorgt dafür, dass lediglich das Fluoreszenzlicht aus der Anregungsebene detektiert wird. Das zeitabhängige Fluoreszenzsignal wird mit einer Avalanche Photo Diode (APD) detektiert und mit Hilfe eines Computers verarbeitet.

2.3.2 Die Autokorrelationsfunktion

Wie bereits vorgestellt, liefert die FCS-Messung lediglich das zeitaufgelöste Fluoreszenzsignal als Rohdaten, in denen die Informationen des jeweiligen betrachteten Fluoreszenzprozesses verborgen und noch nicht direkt zugänglich sind. Um einen Zugang zu

gewinnen, muss die in Gleichung 2.70 definierte Autokorrelationsfunktion angewendet werden:

$$G(t) = \frac{\langle I(t')I(t'+t) \rangle_{t'}}{\langle I(t')^2 \rangle_{t'}} \quad \text{mit} \quad \langle I(t') \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T I(t') dt \quad (2.70)$$

$I(t')$ und $I(t'+t)$ entsprechen der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t' und $t'+t$. Dieser Autokorrelationsschritt ist für die in Abbildung 2.9 (a) gezeigten Rohdaten in Abbildung 2.9 (b) durchgeführt. Es zeigt sich ein charakteristischer Verlauf im Bezug auf die Verzögerungszeit, die in den zu Grunde liegenden physikalischen (Diffusion, Drift) und photophysikalischen Prozessen (Bleichen, Übergang in dunkle Tripletzustände) begründet sind. Die Form der Autokorrelation soll nun von theoretischer Seite hergeleitet werden.

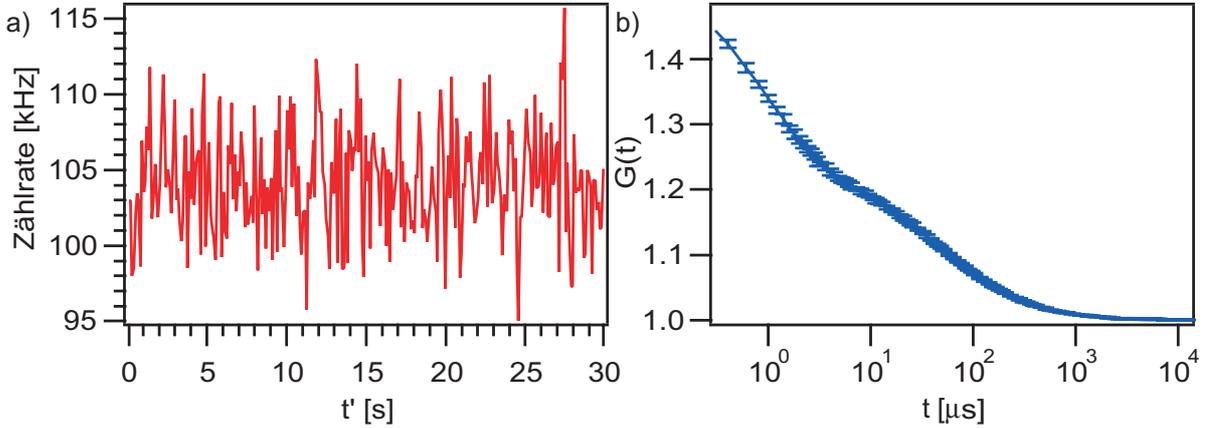


Abbildung 2.9: FCS-Rohdaten und Autokorrelationsfunktion für eine Cy5-Lösung: (a) Die Zählrate, d. h. die Anzahl der detektierten Photonen pro Zeiteinheit ist gegen die Messzeit aufgetragen. Der Mittelwert ist konstant. (b) Aus der zeitabhängigen Zählrate lässt sich die Autokorrelation bilden, die einen charakteristischen Verlauf aufweist.

Die gemessene Intensität $I(t')$ setzt sich folgendermaßen zusammen:

$$I(t') = \int_V I_{anr}(\vec{r}) S(\vec{r}) c(\vec{r}, t') dV \quad (2.71)$$

$I_{anr}(\vec{r})$ beschreibt die räumliche Verteilung der einfallenden Laserstrahlung (Anregungsvolumen) und $S(\vec{r})$ die Signalentstehungsfunktion (Detektionsvolumen), die durch das Objektiv, die Lochblende und durch die Geräteparameter festgelegt wird. $c(\vec{r}, t')$ stellt die zeitliche und räumliche Konzentrationsverteilung dar, die durch die Diffusionsgleichung definiert ist. Das Produkt aus Anregungsintensität und Signalentstehungsfunktion definiert die Moleküldetektionseffizienz (MDE) $W(\vec{r})$. Im Allgemeinen gilt diesbezüglich,

dass die Laserintensität im Fokus einem Gaußprofil in radialer und einem Lorentzprofil in axialer Richtung entspricht. Die Signalentstehungsfunktion ist zum einen durch die Auflösungsbegrenzung der Optik und durch die Abbildung der Lochblende in den Probenraum charakterisiert. *Rigler et. al.* zeigten, dass $W(\vec{r})$ bei entsprechenden Randbedingungen, z. B. richtig eingestellter Lochblendengröße, als eine Gaußfunktion in allen Raumrichtungen beschrieben werden kann [105]:

$$W(\vec{r}) = I_{anr}(\vec{r})S(\vec{r}) = W_0 \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{\omega_0^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right), \quad (2.72)$$

wobei ω_0 der tatsächlichen radialen und z_0 einer abgeschätzten, axialen Ausdehnung entspricht. W_0 trägt für die Quanteneffizienz des Farbstoffes und der Effizienz der Detektoren Rechnung. Unter der Annahme, dass das System sich im Gleichgewicht befindet, kann die mittlere Intensität $\langle I(t') \rangle$ berechnet werden:

$$\begin{aligned} \langle I(t') \rangle &= \int_V W(\vec{r}) \langle c(\vec{r}, t') \rangle dV \\ \langle I(t') \rangle &= \langle c(t') \rangle W_0 \int_V \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{\omega_0^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right) dV \end{aligned} \quad (2.73)$$

Das noch verbliebene Integral ist analytisch lösbar, so dass sich $\langle I(t') \rangle$ explizit ergibt zu:

$$\langle I(t') \rangle = W_0 \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \omega_0^2 z_0 \langle c(t') \rangle \quad (2.74)$$

Es wird ersichtlich, dass die Intensität nur durch die mittlere Konzentration des Farbstoffs, die Fokausdehnung und die Detektionseffizienz bestimmt ist. Für eine weitere Betrachtung ist es notwendig, die in Gleichung 2.70 definierte Autokorrelationsfunktion umzuformen.

$$\begin{aligned} G(t) &= \frac{\langle I(t')I(t'+t) \rangle}{\langle I(t')^2 \rangle} = \frac{\langle I(t') \rangle^2 + \langle \delta I(t') \delta I(t'+t) \rangle}{\langle I(t') \rangle^2} \\ &= 1 + \frac{\langle \delta I(t') \delta I(t'+t) \rangle}{\langle I(t') \rangle^2} \quad \text{mit} \quad \delta I(t') = I(t') - \langle I(t') \rangle \end{aligned} \quad (2.75)$$

Unter Verwendung der Gleichungen 2.71, 2.72 und 2.74 kann Gleichung 2.75 entsprechend umformuliert werden.

$$G_D(t) = \frac{\int_{V'} \int_V W(\vec{r}') W(\vec{r}) \langle \delta c(\vec{r}', t') \delta c(\vec{r}, t'+t) \rangle dV' dV}{W_0^2 \langle c \rangle^2 \left(\frac{\pi}{2}\right)^3 \omega_0^4 z_0^2} \quad (2.76)$$

Die zeitliche Mittelung über die Konzentrationsfluktuationen ergibt sich nach Referenz [102] zu:

$$\langle \delta c(\vec{r}, t) \delta c(\vec{r}', t' + t) \rangle = \langle c \rangle (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4Dt}\right), \quad (2.77)$$

womit die Autokorrelationsfunktion nach erfolgter Integration mittels quadratischer Ergänzung folgende Form annimmt:

$$G_D(t) = \frac{1}{\langle c \rangle V_{eff}} \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{s^2 \tau_D}}} \quad (2.78)$$

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_0^2 z_0; \quad \tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D}; \quad s = \frac{z_0}{\omega_0}; \quad (2.79)$$

Befinden sich in der Lösung mehrere fluoreszierende Komponenten, die sich unabhängig voneinander bewegen, so kann hierfür eine mehrkomponentige Autokorrelationsfunktion aufgestellt werden [108].

$$G(t) = 1 + \frac{1}{(\sum q_i N_i)^2} \sum \frac{q_i^2 N_i}{1 + \frac{t}{\tau_{Di}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{s^2 \tau_{Di}}}} \quad (2.80)$$

Hierbei trägt q_i für die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Komponenten Rechnung, die durch das Produkt aus Detektionseffizienz, Absorptionsquerschnitt und Fluoreszenzquantenausbeute definiert ist. N_i beschreibt die mittlere Teilchenzahl der entsprechenden Komponente.

2.3.3 Auswirkungen photophysikalischer Prozesse auf die Autokorrelation

Wie bereits beschrieben beruht FCS auf der Detektion von Fluoreszenzschwankungen in der Probe. Im vorhergehenden Abschnitt wurden diese Schwankungen auf Konzentrationsfluktuationen zurückgeführt. Dabei wurde angenommen, dass die Moleküle gleichmäßig fluoreszieren und prinzipiell nur ein Übergang aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand zu erwarten ist. Betrachtet man allerdings das durch viele Experimente bestätigte Energieschema eines Fluoreszenzmoleküls, so erkennt man, dass es noch weitere Kanäle gibt, über die ein angeregter Farbstoff relaxieren kann (Abbildung 2.10). Diese Übergänge sind nur teilweise mit einer Strahlungsabgabe in Form von elektromagnetischer Strahlung verbunden. Oft sind auch strahlungslose Prozesse von

Bedeutung, bei denen die Relaxation über Vibrationszustände erfolgt (SR). Ein angeregtes Elektron kann durch Abgabe von Fluoreszenzlicht abgeregt werden. Durch innere Umwandlung (IC¹¹) kann es direkt aus dem angeregten Zustand in einen vibronisch angeregten Grundzustand gelangen, aus dem es weiter strahlungslos relaxiert. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch der Übergang aus dem angeregten Singulett-Zustand in einen eigentlich verbotenen Triplett-Zustand.¹² Aus letzteren ist sowohl strahlungslose als auch strahlungsbehaftete Relaxation (Phosphoreszenz) möglich. Betrachtet man die Gleichgewichtskonstanten bzw. die Relaxationszeiten für die entsprechenden Relaxationskanäle, so unterscheiden sich diese sehr stark untereinander. Während der fluoreszente Übergang üblicherweise im Bereich von Nanosekunden liegt, beobachtet man für den Triplettübergang Zeitkonstanten im Bereich von Mikrosekunden. Dadurch sollten Triplettzerfälle und weitere photophysikalische Effekte wie Bleichen mit FCS zugänglich sein. Sie haben einen signifikanten Einfluss auf die Korrelationsfunktion.

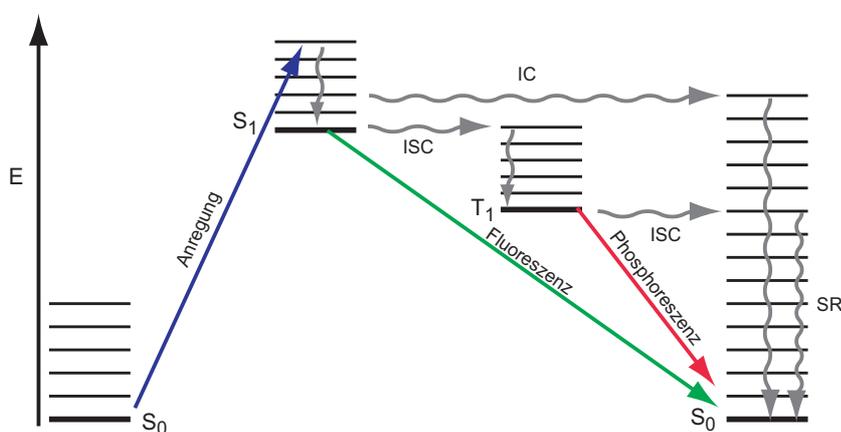


Abbildung 2.10: Jablonski-Diagramm für die Übergänge innerhalb eines Farbstoffmoleküls: Ein Farbstoff kann durch Licht aus einem Singulett-Grundzustand in den angeregten Singulett-Zustand übergehen. Neben der Relaxation durch die Aussendung von Fluoreszenzlicht sind auch mehrere strahlungslose Übergänge von Bedeutung (ISC: Inter system crossing; IC: Internal conversion; SR: Schwingungsrelaxation). Eine Beschreibung ist im Text zu finden.

2.3.3.1 Triplett-Zustände

Befindet sich der Farbstoff im Triplett-Zustand, so steht er nicht mehr für einen fluoreszenten Übergang zur Verfügung. Erst nach dem Übergang in den Singulett-Grundzustand kann eine erneute Anregung stattfinden. Um die Auswirkungen des Triplett-Übergangs auf die Autokorrelation zu charakterisieren, wird das Termschema, wie es in

¹¹Abkürzung für die englische Bezeichnung *internal conversion*

¹²Dieser Vorgang wird mit *inter system crossing* (ISC) bezeichnet

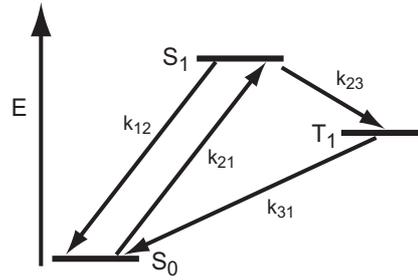


Abbildung 2.11: Vereinfachtes Termschema zur Beschreibung des Triplet-Übergangs

Abbildung 2.10 beschrieben ist, auf drei Zustände, den Grundzustand (S_0), den angeregten Singulett-Zustand (S_1) und den Triplet-Zustand (T) reduziert. Die Raten für die Übergänge zwischen den Zuständen sind in Abbildung 2.11 vorgestellt. Geht man davon aus, dass die zeitliche Änderung der Population zu der entsprechenden Besetzungszahl proportional ist, so lässt sich ein System von linearen Differentialgleichungen 1. Ordnung aufstellen.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} & k_{31} \\ k_{12} & -(k_{23} + k_{21}) & 0 \\ 0 & k_{23} & -k_{31} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \end{pmatrix} \quad (2.81)$$

Das Gleichungssystem kann mit Hilfe eines Exponentialansatzes in ein Eigenwertproblem überführt werden. Unter Verwendung der Anfangsbedingung, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ das Molekül sich im Grundzustand befindet ($S_0(0) = 1$; $S_1(0) = 0$; $T(0) = 0$) kann das System vollständig beschrieben werden.

$$\begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \end{pmatrix} = \sum_{i=1}^3 \begin{pmatrix} S_{0i} \\ S_{1i} \\ T_i \end{pmatrix} \exp(\lambda_i t) \quad (2.82)$$

mit

$$\lambda_0 = 0 \quad (2.83)$$

$$\lambda_1 = -(k_{21} + k_{12}) \quad (2.84)$$

$$\lambda_2 = -\left(k_{31} + \frac{k_{12}k_{23}}{k_{12} + k_{21}} \right) \quad (2.85)$$

Im Bezug auf die Eigenwerte ist festzuhalten, dass $\lambda_1 = 0$ explizit verdeutlicht, dass für große Zeiten ($t \rightarrow \infty$) ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. λ_2 trägt dafür Rechnung, dass die Anregung und die Relaxation im Fluoreszenzkanal nicht instantan

vonstatten gehen. Dieser Prozess ist bei FCS-Messungen auf Grund der sehr kurzen Zeitkonstante nicht zugänglich. Anders sieht dies im Fall von λ_3 aus. Dieser Eigenwert beschreibt die Abregung über den Triplett-Kanal, welche mit FCS analysiert werden kann.

Angenommen, dass die Prozesse, die die Autokorrelation beeinflussen, zeitlich voneinander getrennt sind, kann für die Gesamtfunktion ein Produktansatz gewählt werden.

$$G(t) = 1 + \prod_i G_i(t) \quad (2.86)$$

Hier beschreibt $G_i(t)$ die Autokorrelationsfunktion des entsprechenden Prozesses (Triplettabfall, Diffusion, etc.). Für den Fall, dass im System der Triplettabfall sowie die Diffusion zu berücksichtigen sind, ergibt sich die Autokorrelation zu

$$G(t) = 1 + \left[1 + \frac{T_{eq}}{1 - T_{eq}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \right] G_D(t) \quad (2.87)$$

$$\text{mit } T_{eq} = \frac{k_{23}k_{12}}{k_{12}(k_{23} + k_{31}) + k_{31}(k_{21}k_{23})}, \quad \tau_T = -\frac{1}{\lambda_3} \quad (2.88)$$

und G_D entsprechend Gleichung 2.78.

2.3.3.2 Bleichprozesse

Neben dem Übergang in einen nicht leuchtenden Triplett-Zustand muss das Bleichen als weiterer photophysikalischer Prozess berücksichtigt werden, der sich signifikant auf die Autokorrelation auswirkt. Generell versteht man unter Photobleichen, dass der Fluoreszenzfarbstoff in einen Zustand übergeht, in dem er nicht in der Lage ist, einen fluoreszierenden Übergang durchzuführen. Der Farbstoff kann wohl weiterhin angeregt werden, er relaxiert aber ausnahmslos strahlungslos. Insgesamt kann es sich hierbei um einen reversiblen oder irreversiblen Prozess handeln, der auf jeden Fall sehr langlebig ist. Allerdings ist der genaue Mechanismus, der das Bleichen verursacht, noch nicht vollständig geklärt, so dass eine genaue Beschreibung und deren Auswirkung auf die Autokorrelation schwierig erscheint und nur in Ansätzen vollständige theoretische Lösungen existieren [112].

Eine einfache Möglichkeit, einen Einblick in das zeitliche Bleichverhalten zu bekommen, besteht darin, die zeitliche Konzentrationsänderung der fluoreszierenden Moleküle zu betrachten. Geht man von einem monomolekularen, quasistatischen Prozess aus, so wird ein exponentieller Abfall bezüglich der Konzentration

$$c(t) = c_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Bl}}\right) \quad (2.89)$$

und der Autokorrelation

$$G(t) = 1 + \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Bl}}\right) \prod_i G_i(t) \quad (2.90)$$

erwartet, wobei τ_{Bl} die mittlere Bleichzeit bezeichnet [113, 114]. Prinzipiell wird davon ausgegangen, dass jeweils vom angeregten Singulett-Zustand und vom Triplett-Zustand ausgehend Bleichkanäle existieren. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass neben einfachexponentiellen Abfällen auch mehrfachexponentielle beobachtet wurden [113, 114, 115, 116]. Neben der Schwierigkeit, den Bleichprozess vollständig kinetisch zu erfassen, ergibt sich bei FCS-Messungen darüber hinaus noch das Problem, dass innerhalb des Anregungsvolumens die Laserintensität nicht homogen ist. Dies wurde von *Widengren et. al.* dadurch berücksichtigt, dass nur ein bestimmter Anteil B der Moleküle tatsächlich bleicht [114, 117]:

$$G(t) = 1 + \left[1 + B \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Bl}}\right) - B\right] \prod_i G_i(t) \quad (2.91)$$

2.3.3.3 Isomerisation

Ein weiterer photophysikalischer Prozess, der im Zusammenhang mit den später vorgestellten Messungen von Bedeutung ist, ist in der lichtinduzierten Isomerisation des Farbstoffs begründet. Der Fluoreszenzfarbstoff kann in zwei isomeren Zuständen vorliegen, die ineinander übergehen können; nur einer der beiden ist fluoreszenzaktiv, der andere kann als ein dunkler Zustand betrachtet werden. Jener Prozess wurde z. B. für Cy5 und GFP¹³ beobachtet und analysiert [117, 118]. Das kann prinzipiell mit Hilfe eines Zwei-Zustands-Modells (Abbildung 2.12), das nur die isomeren Zustände I_1 und I_2 und die entsprechenden Reaktionskonstanten k_{on} und k_{off} berücksichtigt, beschrieben werden [118, 119].

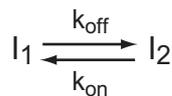


Abbildung 2.12: Reaktionsgleichung für den Isomerisationsprozess: I_1 kennzeichnet das fluoreszierende Isomer und I_2 das dunkle.

Analoge kinetische Überlegungen wie im Fall der Triplettzustände führen auf ein entsprechendes Modell für die Autokorrelationsfunktion [119].

$$G_I(t) = \left[1 + \frac{I_2^{eq}}{1 - I_2^{eq}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_I}\right)\right] \quad (2.92)$$

I_2^{eq} beschreibt den Anteil der Moleküle, die sich im dunklen Zustand befinden. τ_I stellt die charakteristische Isomerisationszeit dar.

¹³Abkürzung für *green fluorescent protein*

2.3.4 Zwei-Orts-Kreuzkorrelation

Die vorhergehenden Abschnitte haben gezeigt, dass mit Hilfe von FCS sowohl photophysikalische Prozesse als auch die Teilchendiffusion detektiert werden können. Hierbei stellt sich die Frage, inwieweit auch eine gerichtete Bewegung der Fluoreszenzpartikel Auswirkungen auf die Autokorrelation hat und wie diese detektiert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Drift die Autokorrelation signifikant beeinflusst, was sich in einem steilen Abfall der Autokorrelation manifestiert. Berücksichtigt man in der Diffusionsgleichung die Driftbewegung, so lässt sich hierfür die Autokorrelation bestimmen [104]:

$$G(t) = 1 + G_D(t) \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_{Drift}} \right)^2 \frac{1}{NG_D(t)} \right] \quad (2.93)$$

Mit Hilfe der Driftzeit τ_{Drift} lässt sich die Driftgeschwindigkeit berechnen:

$$v_{Drift} = \frac{\omega_0}{\tau_{Drift}} \quad (2.94)$$

Diese Methode wurde erfolgreich zur Messung von Flussprofilen [120, 121] und zur Detektion der elektrophoretischen Drift [47] eingesetzt. Allerdings besitzt diese Methode der Driftanalyse einige Limitierungen, die darin begründet sind, dass Diffusion und Drift stark miteinander verknüpft sind. Bei langsamer Drift ($\tau_{Drift} \gg \tau_D$) ist eine Detektion der gerichteten Bewegung kaum mehr möglich, da die Autokorrelation im messtechnisch relevanten Bereich lediglich durch die Diffusion bestimmt ist. Nur für den Fall, dass die Diffusion langsamer als die Drift erfolgt, sind aussagefähige Messungen im Bezug auf τ_{Drift} möglich. Eine weitere Einschränkung erwächst aus der Radialsymmetrie des Laserfokus. Jene Symmetrie verhindert, neben dem Betrag auch die Richtung der Bewegung zu bestimmen. Um die Symmetrie zu brechen und somit die Richtung auflösen zu können, wurde mit elliptischen Anregungsprofilen gearbeitet [122].

Eine elegante Methode, Diffusion und Drift zu entkoppeln und gleichzeitig eine Richtungsauflösung zu erreichen, stellt Doppelfokus-FCS (dfFCS) dar, die analog zu einer Lichtschranke funktioniert. Das Prinzip, das von *Brinkmeier et. al* entwickelt wurde [123, 124, 125], ist in Abbildung 2.13 (a) sichtbar.

In einem Fluss befinden sich zwei räumlich mit dem Abstand R gegeneinander versetzte Anregungsvolumina. Kommen die fluoreszierenden Teilchen von einem Fokus zum nächsten, dann werden die Chromophore in beiden Foki jeweils mit einem Zeitversatz angeregt (vgl. Abbildung 2.13 (b)). Die Kreuzkorrelation zwischen den Fluoreszenzsignalen wird wie folgt gebildet:

$$G_{kk}(t) = 1 + \frac{\langle \delta I_1(\vec{r}_1, t') \delta I_2(\vec{r}_2, t' + t) \rangle}{\langle I_1(\vec{r}_1, t') \rangle \langle I_2(\vec{r}_2, t') \rangle} \quad (2.95)$$

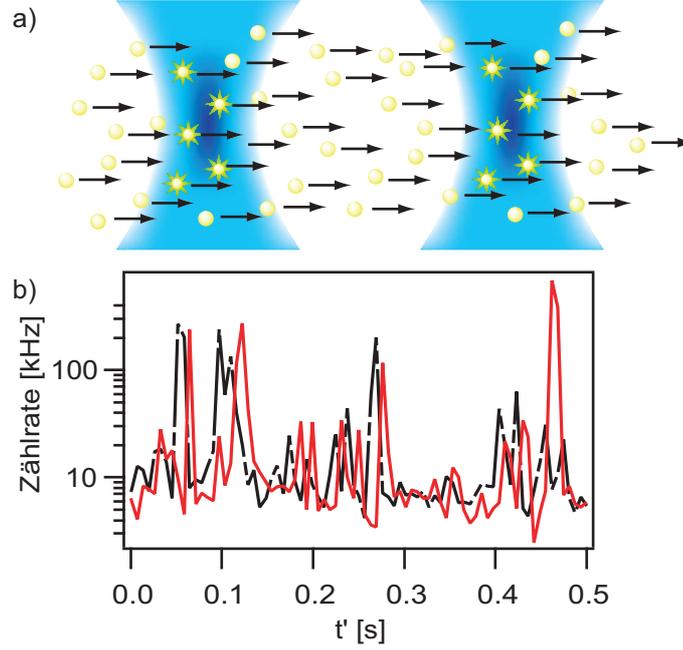


Abbildung 2.13: Prinzipskizze und Rohdaten der Doppelfokus-FCS-Methode: (a) Zwei räumlich getrennte Laserfoki detektieren das Fluoreszenzsignal von driftenden Farbstoffen. Ein charakteristisches Signal kann in der Kreuzkorrelation beobachtet werden. (b) Die in den beiden Detektionskanälen gemessenen Intensitätsfluktuationen sind zeitlich gegeneinander verschoben.

Diese räumliche Kreuzkorrelation lässt sich unter Berücksichtigung von Diffusion und Drift theoretisch berechnen [123, 124]:

$$G_{kk}(t) = 1 + G_D(t) \exp \left[-\frac{R^2}{\omega_0^2} \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} \left(\left(\frac{t}{\tau_{Drift}^{kk}} \right)^2 + 1 - 2 \frac{t}{\tau_{Drift}^{kk}} \cos \Theta \right) \right] \quad (2.96)$$

τ_{Drift}^{kk} bezeichnet die Driftzeit zwischen den beiden Foki und Θ den Winkel zwischen der Fluss- und Foki-Richtung. Nimmt man an, dass beide zueinander parallel sind ($\Theta = 0$), kann die Kreuzkorrelation vereinfacht werden:

$$G_{kk}(t) = 1 + G_D(t) \exp \left[-\frac{R^2}{\omega_0^2} \left(\frac{(t - \tau_{Drift}^{kk})^2}{\tau_{Drift}^{kk}{}^2 \left(1 + \frac{t}{\tau_D} \right)} \right) \right] \quad (2.97)$$

Die Driftgeschwindigkeit berechnet sich zu:

$$v_{Drift} = \frac{R}{\tau_{Drift}^{kk}} \quad (2.98)$$

Bei Betrachtung der Kreuzkorrelation erkennt man, dass der diffusive Prozess nach wie vor als Einhüllende die Amplitude der Kreuzkorrelation bestimmt und dadurch weiterhin limitierend wirkt (vgl. Abbildung 2.14). Durch den gaußschen Term ist die gerichtete Bewegung aber klar von den rein durch die Diffusion bestimmten Eigenschaften getrennt, was die Auswertung erleichtert. Obwohl vom theoretischen Standpunkt aus die Autokorrelation und auch die Ortskreuzkorrelation vergleichbare Detektionscharakteristiken haben [126], hat sich von experimenteller Seite her dFCS als sehr handhabbar erwiesen, so dass neben der elektrophoretischen Drift [49, 51] und dem gerichteten Transport in Mikrokanälen [127] auch das Strömungsprofil an Grenzflächen [128] untersucht wurde.

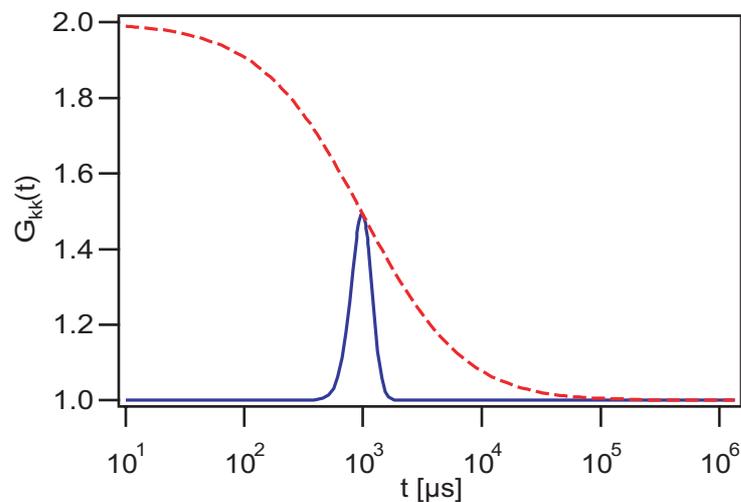


Abbildung 2.14: Darstellung der theoretischen FCS-Kreuzkorrelation: Die Autokorrelation der freien Diffusion (gestrichelte Linie) stellt die Einhüllende der Kreuzkorrelationsfunktion (durchgezogene Linie) dar.

2.3.5 Weitere FCS-Methoden

Neben den bereits vorgestellten FCS-Methoden, die innerhalb der Arbeit Anwendung finden, sollen noch kurz diejenigen erwähnt werden, die ebenso große Bedeutung besonders im Bezug auf die Bestimmung von Reaktionskinetiken besitzen. Um Reaktionsgeschwindigkeiten aufzuklären, kann im Prinzip die Diffusionsmessung mit Hilfe der Autokorrelation verwendet werden. Verändert sich mit der Reaktion das Volumen des markierten Produktes im Vergleich zum entsprechenden Edukt, so hat dies einen direkten Einfluss auf die Diffusion, die detektiert werden kann. Dies wurde zum Beispiel erfolgreich für den Fall einer Hybridisierung zweier unterschiedlich langer DNA-Fragmente verwendet [106].

Probleme treten dann auf, wenn die Edukte vergleichbare Größen aufweisen und sich deshalb die Diffusionscharakteristik während der Reaktion nicht entscheidend ändert.

Um auch hier einen Zugang zu den Reaktionskinetiken zu bekommen, wurde Zwei-Farben-FCS entwickelt [129]. Sind die beiden Edukte mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und werden diese im selben Anregungsvolumen mit unterschiedlich farbigen Lasern angeregt, so ist es möglich, durch eine Kreuzkorrelation der verschiedenfarbigen Intensitätssignale eine Aussage über den Bindungszustand zu gewinnen. In diesem Zusammenhang ist nur dann ein Kreuzkorrelationssignal zu erwarten, wenn die Edukte miteinander reagiert haben und sie sich folglich gleichförmig miteinander bewegen.

Erhebliche Probleme mit herkömmlichen FCS-Methoden treten auch auf, wenn man in der Nähe einer Grenzfläche messen möchte, da dort sowohl das Anregungs- und das Detektionsvolumen verändert als auch wegen der Reflexionen an der Grenzfläche das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis stark beeinträchtigt wird. Einen Ausweg hierfür bietet die Anwendung des evaneszenten, elektromagnetischen Feldes, das bei einer Schrägbeleuchtung oberhalb des kritischen Winkels durch totale interne Reflexion wohl definiert in den an die Grenzschicht sich anschließenden Raum hineinragt. Mit Hilfe dieser Methode wurden Vorgänge an Grenzflächen studiert [130, 131].

3 Experimentelle Methoden und Synthesewege

3.1 DNA-Präparation

3.1.1 Herstellung und Färbung der dsDNA-Fragmente

Ein Teil der verwendeten dsDNA-Fragmente (75 bp, 153 bp, 210 bp, 394 bp, 508 bp, 603 bp, 712 bp, 822 bp, 914 bp und 1019 bp) wurden unter Verwendung von PCR hergestellt. Als Reaktionspuffer wurden 50 µl 1x ThermoPol Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1 % Triton X-100) eingesetzt, in dem 10 ng pEGFP-N1-Vektor als Templat (BD Biosciences, #:6085-1, Heidelberg, Deutschland), ein Unit Taq DNA-Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland), 0,2 mM des unterschiedlichen dNTPs (Roche, Mannheim, Deutschland) und jeweils 50 pmol der jeweiligen Primer (Metabion, Martinsried, Deutschland) gelöst wurden (Tabelle 3.1). Die PCR selbst wurde mit einer thermischen Denaturierung der dsDNA bei 95 °C für 5 min begonnen. Nach dem Aufschmelzen der dsDNA wurden insgesamt 30 Amplifizierungszyklen (94 °C, 65 °C und 72 °C für je 30 s) durchgeführt und das System schließlich weitere 5 min bei 72 °C inkubiert, um sämtliche komplementären Stränge aufzufüllen.

Die Qualität der PCR-Produkte bezüglich Länge und Quantität wurde mit Hilfe der

dsDNA [bp]	Primer (Vorwärtsreaktion)	Primer (Rückwärtsreaktion)	T _m ^a [°C]
75	5' cag agc tgg ttt agt gaa ccg 3'	5' cag aat tcg aag ctt gag ctc g 3'	59,8 / 60,3
101	5' cgc cac cat ggt gag caa gg 3'	5' gga cac gct gaa ctt gtg gc 3'	63,4 / 61,4
153	5' cgc cac cat ggt gag caa gg 3'	5' cag atg aac ttc agg gtc agc 3'	63,4 / 59,8
210	5' cgc cac cat ggt gag caa gg 3'	5' ccg tag gtc agg gtg gtc acg 3'	63,4 / 65,7
394	5' cgc cac cat ggt gag caa gg 3'	5' gat gcc ctt cag ctc gat gc 3'	63,4 / 61,4
508	5' cgc cac cat ggt gag caa gg 3'	5' ctt gaa gtt cac ctt gat gcc g 3'	63,4 / 60,3
603	5' cgc cac cat ggt gag caa gg 3'	5' gtt gtc ggg cag cag cac g 3'	63,4 / 63,1
712	5' cgc cac cat ggt gag caa gg 3'	5' gtc cat gcc gag agt gat cc 3'	63,4 / 61,4
822	5' cag agc tgg ttt agt gaa ccg 3'	5' cag agc tgg ttt agt gaa ccg 3'	59,8 / 61,4
923	5' gac gtc aat gac ggt aaa tgg c 3'	5' ctt gaa gtt cac ctt gat gcc g 3'	60,3 / 60,3
1019	5' gac gtc aat gac ggt aaa tgg c 3'	5' gtt gtc ggg cag cag cac g 3'	60,3 / 63,1

^aDie Schmelztemperaturen entsprechen in der Reihenfolge den beiden Primern

Tabelle 3.1: Verwendete Primer in der PCR-Reaktion

Gelelektrophorese untersucht, wobei als Matrix ein 2 %-iges Agarosegel verwendet wurde. Die Färbung wurde mit Ethidiumbromid durchgeführt.

Weitere dsDNA-Fragmente (252 bp, 691 bp und 1246 bp) wurden aus dem Plasmid puc18 gewonnen. Dabei wurde die Plasmid-DNA in *E. coli* amplifiziert und anschließend mit Hilfe eines Qiagen Plasmid Maxi Kits (Qiagen, #: 12163, Hilden, Deutschland) isoliert.¹ Um die DNA-Fragmente zu erhalten, wurde die DNA mit folgenden Restriktionsenzymen für 3 Stunden bei 37 °C verdaut: BamHI und ApaLI (jeweils New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland). Die Verdauungsprodukte wurden mit einem standardisierten DNA-Längenmarker (100 bp Ladder, New England BioLabs, #: N3231S, Frankfurt, Deutschland) in einem 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt und die den gewünschten Fragment-Längen entsprechenden Banden ausgeschnitten. Ein Gelextraktionskit (Qiagen, #: 20021, Hilden, Deutschland) diente zum Abtrennen der Fragmente aus der Gelmatrix.

Alle gewonnenen dsDNA-Fragmente wurden entweder mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC²) oder unter Verwendung eines PCR-Aufreinigungskits (Qiagen, #: 28104, Hilden, Deutschland) von Verunreinigungen und noch überschüssigen Primern befreit. Im Fall der HPLC wurde eine speziell für kurze DNA-Fragmente ausgelegte Säule (TSK Gel DNA-NPR, Tosoh Bioscience, #: 18249, Stuttgart, Deutschland) in einem analytischen HPLC-Aufbau (HPLC Agilent 1100 Series LC, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min in einem Puffergradienten aus 20 mM Tris-HCl (pH 9,0) und 20mM Tris-HCl / 1 M NaCl (pH 9,0). Das Verhältnis der beiden Puffer wurde zur effektiven Auftrennung innerhalb von 15 min von einem Verhältnis von (25 : 75) auf (45 : 55) linear variiert. Die von der Säule eluierten Fragmente wurden mit Hilfe von UV-VIS-Absorptionsmessungen detektiert und in jeweils getrennten Probenbehältern aufgefangen. Die so erhaltenen dsDNA-Fragmente wurden unter Verwendung von Zentrifugensäulen (Micron YM10, #: 42408 und Micron YM30, #: 42411, Millipore, Schwalbach, Deutschland) entsalzt. Nach erfolgter Aufreinigung wurden alle Proben in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) gelöst und bei -20 °C gelagert.

Zur Färbung der DNA wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Zum einen wurde ein interkalierender Farbstoff (TOTO3, Absorption: 642 nm, Emission: 660 nm, #: T3604, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet. Hierbei handelt es sich um Chromophore, die im freien Zustand eine sehr niedrige Fluoreszenzquantenausbeute zeigen, die sich signifikant verändert, wenn das Molekül in die dsDNA eingelagert wird [132]. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist in diesem Fall bis zu 1000-mal höher als im ungebundenen Zustand. Die Färbung wurde im jeweilig verwendeten Analysepuffer in der Art vorgenommen, dass die Vorlagen aus DNA und Farbstoff in einem Volumenverhältnis von 1 : 1 miteinander gemischt wurden. Das Verhältnis zwischen Farbstoff und

¹Bei allen verwendeten molekularbiologischen Präparations-Kits wurde weitestgehend das vom Hersteller vorgegebene Protokoll verwendet

²Abkürzung für die englische Bezeichnung *high pressure liquid chromatography*

dsDNA-Basenpaar wurde auf 20:1 eingestellt. Die so erhaltene Analysenlösung wurde für 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dsDNA unter direkter kovalenter Anbindung eines Farbstoffes zu markieren. Hierzu wurde ein entsprechender Präparationskit (Label IT[®] Nucleic Acid Labeling Kit, #: MIR 3700, Mirus, Madison, USA) verwendet. Im Reaktionsprozess wird an das N-7 Atom des Guanin über einen Pt-vermittelten, stabilen Koordinationskomplex der entsprechende Farbstoff (in unserem Fall Cy5, Absorption: 649 nm, Emission: 670 nm) angeknüpft. Der Reaktionspuffer wurde mit 5 µg des entsprechenden dsDNA-Fragmentes angesetzt und für 1 Stunde bei 37°C vorsichtig geschüttelt. Der noch verbliebene freie Farbstoff wurde von der gefärbten dsDNA über eine mitgelieferte Säule abgetrennt und die dsDNA in den jeweils gewünschten Puffer aufgenommen. Die Labeldichte konnte nicht unmittelbar beeinflusst werden. UV-VIS-Experimente ergaben ein Verhältnis von 50-90:1 zwischen DNA-Basenpaaren und kovalent verknüpften Farbstoffen.

Ein Teil der Experimente wurde mit kurzen ODN durchgeführt. Diese wurden käuflich erworben (Metabion, Martinsried, Deutschland) und bereits im Herstellungsprozess, wenn notwendig, endständig mit Cy5 markiert. Bei den Sequenzen wurde darauf geachtet, dass keine Selbstkomplementarität vorhanden war. Für Hybridisierungsexperimente zwischen einem kurzen ODN und einem langen ssDNA-Fragment wurde ein ss Plasmid (M13mp18(+)-Strang, Amersham Bioscience, #: 27-1546-01, Freiburg, Deutschland) verwendet. In Tabelle 3.2 ist eine Zusammenstellung der verwendeten ODN gegeben.

ODN-Sequenz	Name	Anmerkung
5' Cy5 gcc gtc tct gac tgc tga tga cta cta tcg 3'	ODN C	Cy5 markiertes 30b ODN
5'cga tag tag tca tca gca gtc aga gac ggc 3'	ODN \bar{C}	zu ODN C komplementär
5' Cy5 tgt aaa acg acg gcc agt 3'	M13-Primer	zu M13mp18(+) komplementär

Tabelle 3.2: Weitere für FCS-Messungen verwendete ODN

3.1.2 Transfer in unpolare Lösungsmittel

Der Transfer von dsDNA und der PON in n-Dekan wurde mit Hilfe von Lipiden vollzogen. Dafür wurden Mischungen in Reinstwasser aus kationischem 1,2-Dioleoyl-3-Tri-methylammonium-Propan (DOTAP, #: 890890, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) und neutralem bzw. zwitterionischem 1,2-Dioleoyl-sn-Glyzero-3-Phosphoethanolamin (DOPE, #: 850725, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) hergestellt. Das Massenverhältnis ϕ zwischen DOPE und der Gesamtlipidmasse aus DOPE und DOTAP wird auf 76 % eingestellt. Die in Chloroform gelösten Lipide wurden über Nacht im Vakuumschrank getrocknet, danach in Wasser gelöst und für 3 Stunden auf 40 °C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Rüsselbeschaller (P = 240 W, Bandelin, Berlin, Deutschland) für 10 min vorsichtig bei maximal 50 % der Gesamtleistung beschallt. Die so entstandene Lösung aus unilamelaren Vesikeln wurde mit der entsprechenden

DNA- oder PON-Lösung gemischt, so dass sich ein äquimolares Verhältnis zwischen der Konzentration der DNA-Phosphatgruppen und der kationischen Lipide einstellte. Das Volumen der 1 μM wässrigen Lösung betrug 1 ml. Die DNA/Lipid-Mischung wurde für mindestens 1 Stunde geschüttelt, bevor das gleiche Volumen an n-Dekan dazu gegeben wurde. Das 2-Phasensystem wurde für mehrere Tage bei Raumtemperatur leicht durchmischt. Der Übergang der DNA oder PON-Lipid-Komplexe konnte mit bloßem Auge wahrgenommen werden, da sich die wässrige Phase nach dem Schüttel- und Mischprozess aufklärte. Die jeweiligen Proben wurden unmittelbar vor den Messungen dem Phasengleichgewicht entzogen und entsprechend verdünnt.

3.1.3 FCS-Messungen der freien Diffusion in wässrigen Lösungen und in Alkanen

Die FCS-Messungen wurden mit einem kommerziell erhältlichen Gerät der Firma Carl Zeiss (Jena, Deutschland) durchgeführt [133, 134]. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Er basiert auf einem invertierten Mikroskop (Zeiss Axiovert 200), an dessen seitlichem Eingang das FCS-Modul (ConfoCor 2) angebaut ist. Gleichzeitig ist das Mikroskop am unteren Ausgang mit einem konfokalen Mikroskop-Modul (Zeiss LSM³ 510) bestückt, das für die später vorgestellten Kreuzkorrelationsmessungen benötigt wird. Als Objektiv wurde ein C-Appochromat 40x/1,2 NA Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet, das eine einstellbare Deckglaskorrektur besitzt. Als Probenkammer wurden entweder unterschiedliche μ -Kammern (IBIDI, München, Deutschland) oder ein LabTek-Kammersystem (Nunc, #: 155411, Wiesbaden, Deutschland) mit dem entsprechend notwendigen Probenvolumen verwendet. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe von Avalanche Photodioden detektiert, wobei die Zeitdifferenzen zwischen Einzelphotonenereignissen als Rohdaten an den verarbeitenden Computer weitergeleitet wurden. Dort wurden daraus die Intensitätsfluktuationen und die Korrelation berechnet.

Die DNA-Proben wurden mit dem HeNe-Laser bei 633 nm ($I_{\text{max}} = 1,42 \text{ mW}$) angeregt, dessen Intensität, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe des akusto-optischen durchstimmbaren Filters (AOF) auf 5 % abgeschwächt wurde. Als Emissionsfilter wurde ein Langpass mit einer Grenzwellenlänge von 660 nm verwendet. An jedem Messtag und bei jedem Wechsel des Kammersystems wurde die Lochblende mit einer 100 nM Cy5-Lösung (Amersham Bioscience, #: PA 15101, Freiburg, Deutschland) so positioniert, dass maximale Fluoreszenzintensität detektiert wurde. Entsprechend wurde auch die Deckglaskorrektur des Objektivs eingestellt.

Um das effektive Probenvolumen zu charakterisieren, wurden darüber hinaus Kalibrierungsmessungen mit einer 5-10 nM Cy5-Lösung durchgeführt. Hierzu wurden in der Regel 10 individuelle Autokorrelationskurven mit einer jeweiligen Messzeit von 30 s aufgenommen. Die entstandenen Autokorrelationskurven wurden mit der theoretischen

³Abkürzung für die englische Bezeichnung *laser scanning microscope*

Autokorrelationsfunktion, die eine diffundierende Komponente und ein Triplet-Anteil berücksichtigt, angepasst (vgl. Gleichung 2.87):

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \left[1 + \frac{T_{eq}}{1 - T_{eq}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \right] \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{s^2 \tau_D}}} \quad (3.1)$$

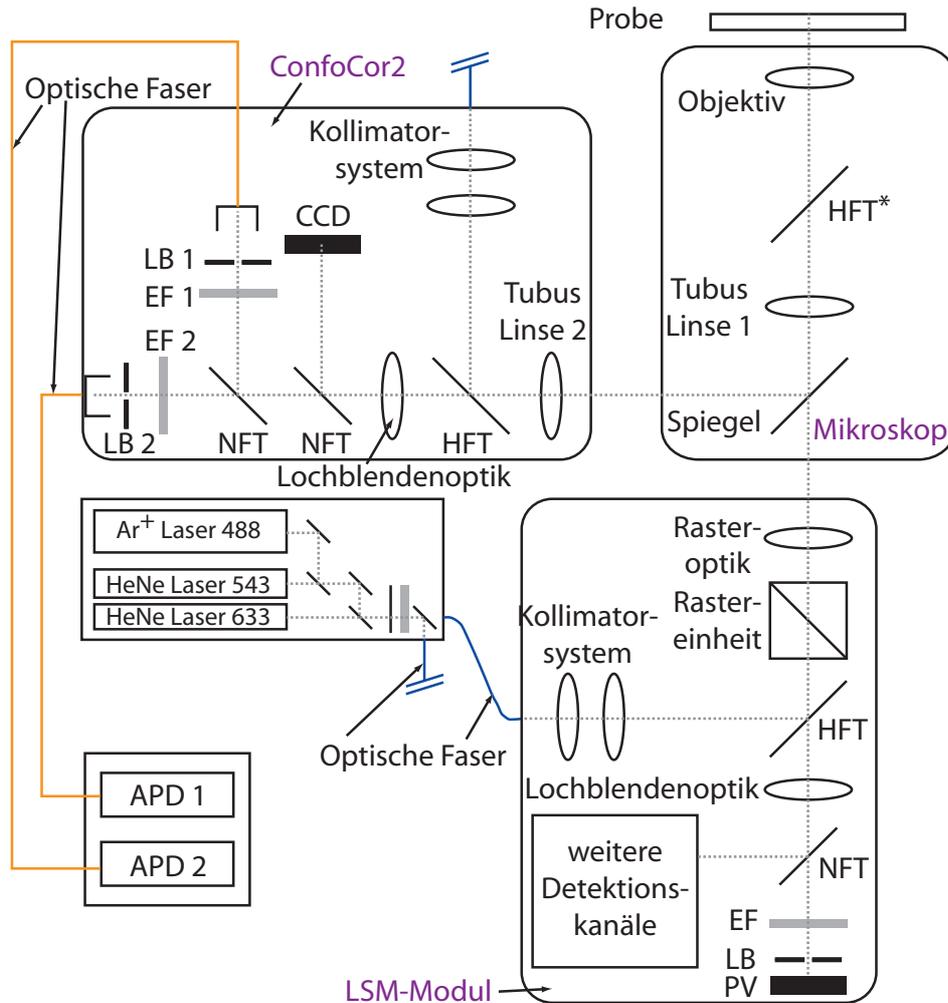


Abbildung 3.1: Schemazeichnung des verwendeten FCS/LSM-Kombiinstrumentes:

An ein inverses Mikroskop (Axiovert 200) ist seitlich das FCS-Modul (ConfoCor 2) und am unteren Ausgang des Mikroskops das LSM-Modul (LSM 510) angebracht. Während das ConfoCor2 vollständig gezeigt ist, wurde im Fall des LSM 510 nur einer der vier Detektionskanäle dargestellt, wobei die weiteren analog aufgebaut sind. Der besonders markierte Hauptfarbteiler wird nur für den später vorgestellten Doppelfokus-Aufbau benötigt. (Abkürzungen: LB: Lochblende; EF: Emissionsfilter; NFT: Nebenfarbteiler; HFT: Hauptfarbteiler; APD: Avalanche Photodiode; PV: Photoelektronenvervielfältiger; AOF: Akusto-optischer, durchstimmbarer Filter)

Mit Hilfe der ermittelten Diffusionszeit τ_D kann die radiale Ausdehnung ω_0 des Fokus berechnet werden. Hierbei wird die bekannte Diffusionskonstante für Cy5 ($D_{Cy5} = 250 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) verwendet [117]. ω_0 ist folgendermaßen festgelegt:

$$\omega_0 = \sqrt{4D\tau_D} \quad (3.2)$$

Für die nachfolgenden Messungen wird die so errechnete radiale Ausdehnung und der Strukturparameter s , d. h. das Verhältnis zwischen axialer und radialer Größe des Fokus, fixiert, der bei den Kalibrierungsmessungen ein variabler Fitparameter ist. Das Fluoreszenzsignal der Proben wurde je nach experimentellen Bedingungen 10-mal für 30-180 s gemessen.

Die Kalibrierung des effektiven Volumens in n-Dekan wurde über eine Messung in wässriger Lösung durchgeführt. Geht man davon aus, dass in beiden Lösungsmitteln das effektiv detektierte Volumen auflösungslimitiert ist und lediglich durch die Wellenlänge des entsprechenden Lichtes festgelegt ist, dann kann angenommen werden, dass das Produkt aus radialer Fokusaussdehnung und Brechungsindex eine Konstante darstellt:

$$\omega_0^{H_2O} n_{H_2O} = \omega_0^{n-Dekan} n_{n-Dekan} \quad (3.3)$$

Die ermittelten Ergebnisse in n-Dekan wurden noch für die entsprechende Viskosität korrigiert.

3.2 Synthese und Analyse der PON-Strukturen

Bereits in der Einleitung wurde die gezielte DNA-vermittelte Anordnung von funktionellen Einheiten postuliert bzw. im Fall von Goldnanopartikeln vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an ssDNA-funktionalisierten Farbstoffen durchgeführt. Als Farbstoff wurde Perylen (vgl. Abbildung 3.2) verwendet, dessen Derivate eine sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufzeigen und sowohl chemisch als auch thermodynamisch stabil sind [135, 136]. Perylenfarbstoffe kommen als Autolacke aber auch als Spezialdruckfarben zum Einsatz. Im Nachfolgenden soll die Synthese kurz vorgestellt werden, die von Moustafa Abdalla in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung durchgeführt wurde [137, 138, 139].

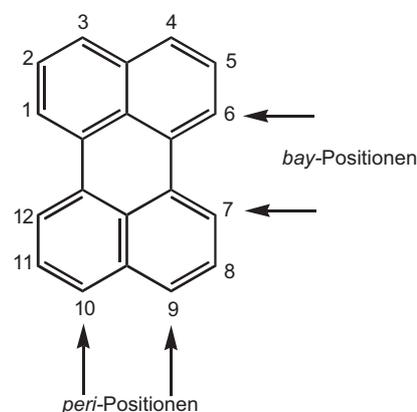


Abbildung 3.2: Strukturformel des Perylen-Farbstoffs

3.2.1 Reaktionsmechanismus

Während sowohl Oligonukleotide als auch Perylen käuflich erwerblich sind, musste im Fall der Perylen-bis-Oligonukleotid-Konjugate (PON) nach einem geeigneten Weg für die Synthese gesucht werden. Als Syntheseweg wurde eine Aktivester-Amin-Kopplung verwendet. Hierzu musste vor allem das Perylen-Edukt entsprechend chemisch modifiziert und für die eigentliche Kopplungsreaktion vorbereitet werden, indem ein Perylendiimid mit zwei Aktivestern in der Imidstruktur synthetisiert wurde. Die Reaktion wird nachfolgend beschrieben und in den Abbildungen 3.3 und 3.4 schematisch dargestellt.

Im ersten Reaktionsschritt wird 1,6,7,12-Tetrachlorperylen-3,4:9,10-tetracarbonsäuredianhydrid (1) mit 4-Brom-2,6-diisopropylphenylamin im Verhältnis 1:6 bei 155 °C in Propionsäure umgesetzt. Die Imidisierung erfolgt über 15 Stunden. Sie dient nicht nur zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und der Verhinderung der Verseifung des Endproduktes, sondern auch zur Einführung von Bromfunktionen, die für die spätere Funktionalisierung des Perylens mit zwei Carbonsäuregruppen notwendig sind. Nach der Abkühlung fällt das Reaktionsprodukt (2) aus der Lösung aus. Für die weiteren Reaktionen ist eine gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln erforderlich, so dass in der bay-Region eine Phenoxylierung erfolgt. Hierzu reagiert (2) mit tert-Octylphenol und Kaliumcarbonat (1:10:6) in N-Methylpyrrolidon (NMP) für 20 Stunden bei 90 °C unter Edelgasatmosphäre. Das Reaktionsprodukt (3) wird mit verdünnter Salzsäure (konz. Salzsäure, Methanol, destilliertes Wasser; 0,25:3:1) gefällt und getrocknet.

Zwei Methyl-geschützte Carbonsäure-Gruppen werden mit Hilfe einer Suzuki-Kopplung in die Imidstruktur von (3) eingeführt. Hierzu reagiert (3) mit 4-Methoxycarbonylphenylboronsäure in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Toluol, 2M Kaliumcarbonat und Methanol bei 75 °C für 15 Stunden. Die Reaktion wird mit Pd(PPh₃)₄ unter

Schutzgas katalysiert. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung erhält man ein dunkelrotes Produkt (4). Die freie Säure (5) entsteht nahezu quantitativ nach einer 24-stündigen Reaktion bei 80 °C in Tetrahydrofuran (THF) und Kaliumhydroxid-Lösung (20 Äquivalente KOH in 2 ml Wasser). Durch die Zugabe von Wasser nach 12 Stunden wurde das teilweise ausgefallene Produkt wieder in Lösung gebracht. Die Perylendiimid-dicarbonsäure (5) wurde mit 2 M Salzsäure gefällt und weiter verwendet.

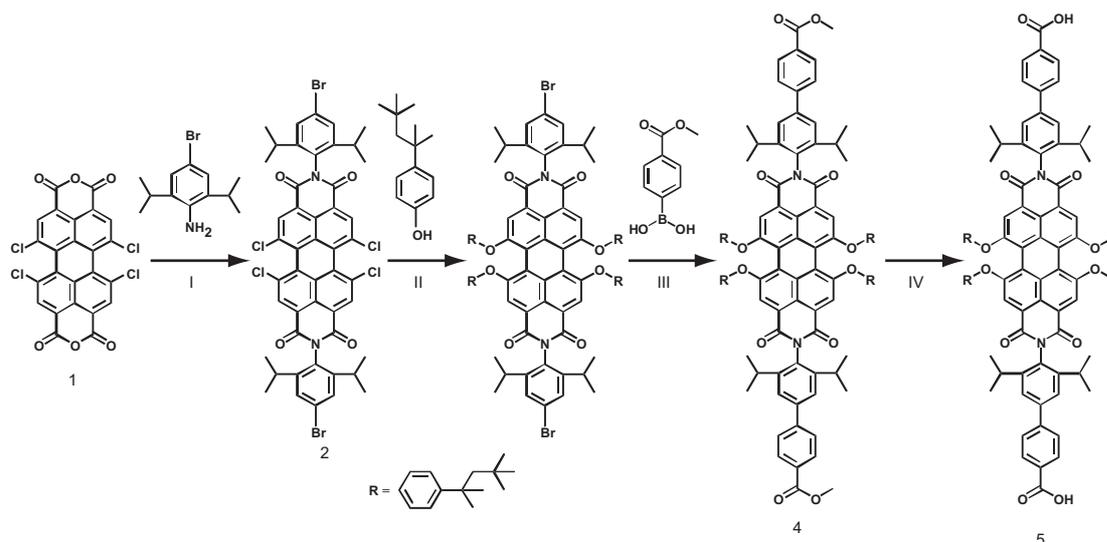


Abbildung 3.3: Syntheseschritte zur Herstellung der Perylendiimiddicarbonsäure: Nachfolgend sind die Reaktionsbedingungen und die Ausbeute beschrieben: I: Propinsäure, 155 °C, 15 h, 89 % Ausbeute; II: K₂CO₃, N-Methylpyrrolidon, 80 °C, 12 h, 66 % Ausbeute; III: Palladiumkatalysator, 2 M K₂CO₃, Toluol, Methanol, 75 °C, 15 h, 93 % Ausbeute; V: 20 Äquivalente KOH in 2 ml H₂O, THF, 80 °C, 24 h, 96 % Ausbeute.

Um (5) mit einem Oligonukleotid über eine freie Aminfunktion zu verknüpfen, müssen die Carbonsäuregruppen in Aktivester überführt werden. Hierzu wird (5) über Nacht getrocknet und in DMF mit N-Hydroxysuccinimid zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde unter Schutzgasbedingungen bei 35 °C für 48 Stunden durchgeführt und mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) katalysiert. Das so erhaltene Produkt (6) wird getrocknet und in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Da sich die mit einer Aminfunktionalität versehenen Oligonukleotide (H₂N-(CH₂)₆-p-5'(3')ODN 3'(5')) nicht in organischen Lösungsmitteln lösen, werden diese in 0,1 M Natrium-Tetraborat Pufferlösung (pH 8,5-9) aufgenommen. Das gelöste Produkt (6) wurde langsam zur Oligonukleotid-Lösung zutropft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach Reaktionsende und einem weiteren Trocknungsschritt erhält man einen wasserlöslichen Farbstoff.

Die weitere Auftrennung des Reaktionsgemisches mit den unterschiedlich möglichen Reaktionsprodukten wurde mit Hilfe von denaturierender Gelelektrophorese mit Polyacrylamid als Separationsmatrix durchgeführt. Es wurde ein 12 %-iges Polyacrylamidgel mit 1x TBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.3) als Elektropho-

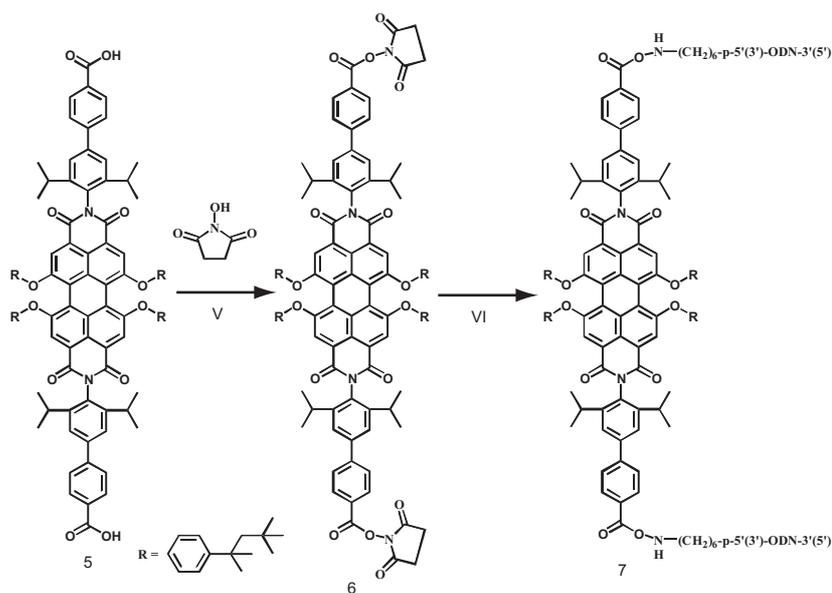


Abbildung 3.4: Syntheseschritte zur Herstellung der Perylen-bis-Oligonucleotide: Nachfolgend sind die Reaktionsbedingungen und die Ausbeute beschrieben: V: Dicyclohexylcarbodiimid als Katalysator, DMF, 35 °C, 48 h, 100 % Ausbeute; VI: Aminfunktionalisiertes ODN im Tetraborat-Puffer (pH 8,5-9), (6) in DMF, vorsichtiges Zutropfen von (6), über Nacht, 37 °C.

rese-Puffer verwendet [139]. Es treten Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht auf, die den freien ODN, aber auch den mono- oder di-funktionalisierten Perylendiimiden entsprechen (vgl. auch Abbildung 3.7). Für die weiteren Experimente wurden die Banden, die den PON-Konjugaten entsprechen, ausgeschnitten und dreimal in jeweils 1 ml Wasser bei 37 °C extrahiert und schließlich mittels Dialyse entsalzt.

Es stellt sich die Frage, ob durch die umfangreiche Funktionalisierung der Perylengrundstruktur die Farbstoffeigenschaften erhalten bleiben. Aus den Absorptions- und Emmissionsspektren des Produkts (6) und des PON erkennt man, dass diese Eigenschaften weiterhin vorhanden sind. Es ist darüber hinaus eine bathochromische Verschiebung, d. h. eine Rotverschiebung, des Emmissionsmaximums des PON gegenüber (6) zu erkennen.

3.2.2 Unterschiede in den PON-Konstrukten

Im vorhergehenden Abschnitt wurde der prinzipielle Syntheseweg für die PON-Konjugate dargestellt. Um die Möglichkeit zu besitzen, unterschiedliche supramolekulare Strukturen aufzubauen, ist es notwendig, unterschiedliche PON herzustellen. Dieses kann sehr einfach dadurch erreicht werden, dass beim Anknüpfungsschritt der Oligonucleotide an das Perylendiimid die Anknüpfungsseite des Amins an das ODN von 3' auf 5' geändert oder ein Gemisch aus verschiedenen aminfunktionalisierten ODN eingesetzt

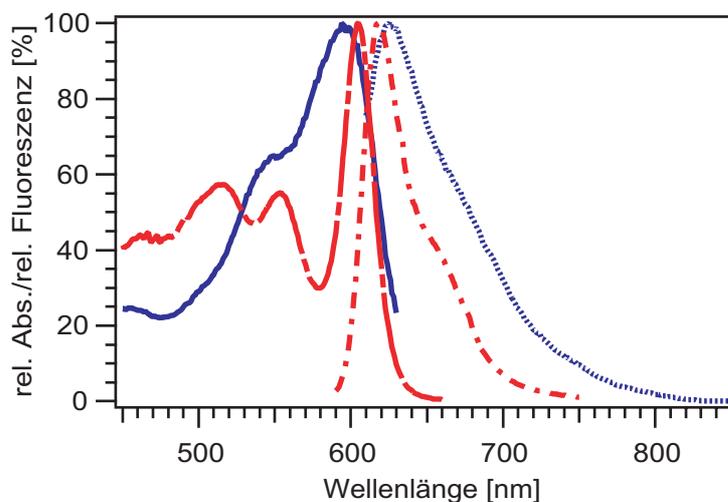


Abbildung 3.5: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Produkt (6) und PON: (6) in THF (durchbrochene Linie, gestrichelte Linie); PON-Konjugat (durchgezogene Linie, gepunktete Linie) im Phosphat-Puffer (pH 7,0).

wird. Es konnten so, neben symmetrischen und asymmetrischen PON, auch gezielt PON hergestellt werden, bei denen die ODN-Anknüpfung an den Perylenkern geändert wurde.

Um die entsprechenden PON genau bezeichnen zu können und direkt Aussagen über das Hybridisierungsverhalten treffen zu können, wurde folgende Nomenklatur eingeführt: Die beiden verwendeten ODN werden mit A (5'-TAG TTG TGA TGT ACA T-3') und B (5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3') bezeichnet. Die komplementären Sequenzen werden mit \bar{A} und \bar{B} abgekürzt. Eine Richtungsumkehr innerhalb der Sequenz von 5'-3' nach 3'-5' wird durch einen Apostroph sichtbar gemacht (z. B. A' und B'). Unter Verwendung dieser Nomenklatur wird ersichtlich, dass zwei Konstrukte der Form $R_1 - A$ und $\bar{A}' - R_2$ miteinander hybridisieren können. Der Perylenkern selbst wird durch P symbolisiert.

Insgesamt wurden für die späteren Experimente fünf verschiedene PON verwendet. Neben den symmetrischen PON mit einer 5'- (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) oder 3'-Anknüpfung des ODN (PON $\bar{A}P\bar{A}'$) an den Perylen-Kern wurden auch zwei asymmetrische PON (PON A'PB und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{B}$) betrachtet. Die Strukturformeln mit den entsprechenden Abkürzungen sind in Abbildung 3.6 gezeigt.

FCS-Untersuchungen

Die PON wurden analog zu den bereits in Abschnitt 3.1 vorgestellten Methoden für die FCS-Messungen in wässrigen und unpolaren Lösungsmitteln präpariert. Als Lichtquelle wurde in diesem Fall die 543 nm-Laserlinie eines HeNe-Lasers mit 100 % Intensität und ein Langpass mit einer Grenzwellenlänge von 585 nm als Emissionsfilter in den Detektionskanälen verwendet. Als Kalibrierungsstandard diente Rhodamin 6G (Fluka,

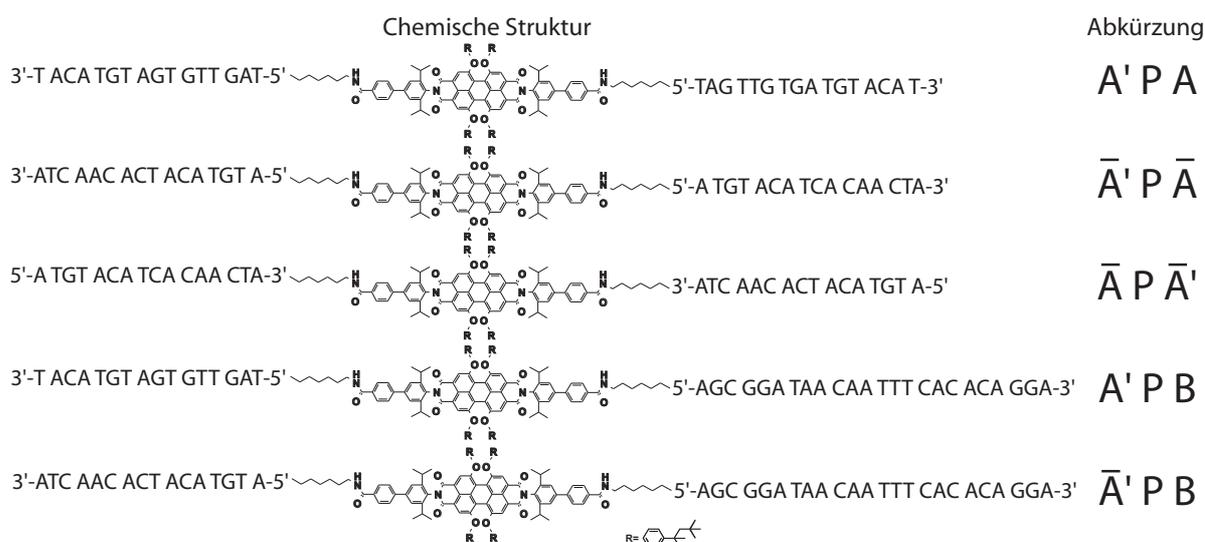


Abbildung 3.6: Darstellung der chemischen Struktur und der Abkürzung für die verwendeten PON-Konstrukte: Die Nomenklatur ist im Text erklärt.

#: 83697, München, Deutschland). Die Messungen zur freien Diffusion sind in Abschnitt 4.2 vorgestellt.

3.2.3 Nachweis der supramolekularen Strukturen mittels Gelelektrophorese

Der erste Nachweis von supramolekularen Strukturen wurde mit Hilfe der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die PON-Proben, deren Hybridisierung nachgewiesen werden sollte, in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) / 60 mM NaCl im entsprechenden Konzentrationsverhältnis gemischt und gut geschüttelt. Die Konzentration der PON im Hybridisierungspuffer wurde auf ca. 1 μ M eingestellt. Die Proben wurden auf 70 °C aufgeheizt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Für den Fall einer nicht sofortigen Verwendung des Ansatzes wurde dieser bei 4 °C gelagert.

Als Gelelektrophorese-Aufbau wurde ein Mini-PROTEAN 3 cell System (Bio Rad, #: 165-3301, München, Deutschland) verwendet, das mit einer Hochspannungsquelle (Powerpack 1000, Bio Rad, München, Deutschland) betrieben wurde. Als Elektrophoresepuffer wurden sowohl 1x TBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 7,8) als auch 1x TAE (40 mM Tris-Base, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) eingesetzt. Die Gele wurden in einen senkrecht stehenden Glasplattenaufbau (8,3 cm x 7,3 cm) mit einem Abstand von 0,75 mm gegossen. Die 15 %-ige quervernetzte Polyacrylamid-Gelmatrix wurde vor jedem Experiment neu hergestellt. Hierzu wurden in der Regel eine 10 ml Polymerisationslösung aus 5 ml 30 % Acrylamid / Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30, Verhältnis 37,5 : 1, #: 3029.2, Roth, Karlsruhe, Deutschland), 3 ml

3 Experimentelle Methoden und Synthesewege

Reinstwasser, 2 ml 5x TBE oder TAE, 100 μ l 10 % Ammoniumperoxidsulfatlösung (APS) und 5 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma, #: T9281, Taufkirchen, Deutschland) angesetzt und in die Elektrophoreseplatten gegossen. Zur Herstellung der Füllbereiche wurde ein Kamm mit 10 Kompartimenten verwendet. Die Polymerisation wird auf Grund der durch TEMED und APS induzierten Radikalbildung der Acrylamid- und Bisacrylamid-Monomere induziert, wobei die Quervernetzung durch das Bisacrylamid erreicht wird. Nach ca. 1 Stunde kann das auspolymerisierte Gel verwendet werden. Für die Analysenlösung wurde darauf geachtet, dass die Masse der eingesetzten DNA im Bereich von 50 ng lag und entsprechend der Erfahrungen bezüglich der späteren Anfärbung leicht angepasst wurde. Ebenso wurde die notwendige Menge an Farbstoffpuffer (6 x Loading Dye: 50 % Glycerin, 0,05 % Bromthymolblau, 0,05 % Xylencyanol in 1x TBE) zugesetzt und gegebenenfalls mit Reinstwasser auf das notwendige Volumen aufgefüllt. Anhand des Farbstoffes konnte die Lauffront erkannt und somit der Verlauf des Experimentes beobachtet werden. Ein ssDNA-Marker und ein dsDNA-Marker, die jeweils selbst hergestellt wurden, dienten als Referenzstandard. Der ssDNA-Marker bestand jeweils aus 50 ng von ssODN der Länge 20, 30, 41 und 50 Basen. Mit den gleichen Mengen wurde auch der dsDNA-Marker aus 30 bp, 49 bp, 75 bp, 101 bp, 153 bp, 300 bp, 508 bp und 812 bp zusammengesetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Gesamtspannung von 150 V für ca. 1 Stunde durchgeführt.

Nach dem Ende der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus den Gelplatten gelöst

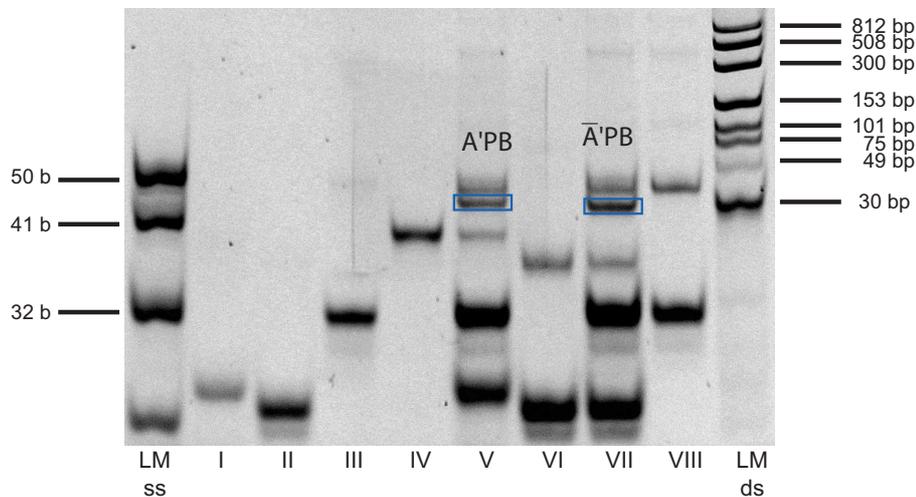


Abbildung 3.7: Exemplarische Darstellung eines Gelelektrophorese-Experimentes an Hand der Syntheseprodukte für asymmetrische Konjugate: Am Ende der Synthesereaktion der asymmetrischen PON (PON A'PB und PON A'PB) liegt ein Gemisch aus unterschiedlichen Substanzen vor. Linien wie folgt: I, ODN A; II, ODN A; III, ODN B; IV, PON A'PA; V, PON A'PB (Reaktionsgemisch); VI, PON A'PB/ODN A (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); VII, PON A'PB (Reaktionsgemisch); VIII, PON B'PB/ODN B (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1).

und in 50 ml 1x TAE oder 1x TBE gegeben. Zur Färbung wurden 5 μ l 10000x SYBR Gold (Molecular Probes, #: S11494, Eugene, OR, USA) hinzugegeben. Das so präparierte Gel wurde für 30 Minuten leicht geschüttelt. Nach dem Färbeschritt wurde das Gel mit einem Transilluminator (MacroVue UVIS-20, Hoefer, #: UV20-230V, San Francisco, CA, USA) beleuchtet und durch einen speziellen Farbfilter (Molecular Probes, #: S7569, Eugene, OR, USA) mit einer kommerziellen Digitalkamera fotografiert. Eine Nachbearbeitung der Bilder bezüglich Kontrast und Helligkeit fand mit Adobe Photoshop 6.0 (Adobe, San Jose, CA, USA) statt.

Exemplarisch ist eine Aufnahme in Abbildung 3.7 dargestellt. In den äußerst linken und rechten Linien sind die Banden des ssDNA-Markers (links) und des dsDNA-Markers (rechts) zu sehen. Außerdem wurden in den Linien V und VII die abschließenden Reaktionsgemische der PON-Synthese für asymmetrische PON aufgetragen. Hierbei erkennt man die Trennwirkung der Gelelektrophorese. Die unterschiedlichen Bestandteile des Reaktionsgemisches (ODN A bzw. ODN \bar{A} und ODN B, symmetrische PON B'PB, PON A'PA und PON \bar{A} 'P \bar{A} sowie asymmetrische PON A'PB und PON \bar{A} 'PB) treten deutlich zu Tage. Dadurch ist auch nachgewiesen, dass neben den symmetrischen auch gezielt asymmetrische PON hergestellt werden können.

3.2.4 UV-VIS-Absorptionsspektroskopie zur Analyse der Thermodissoziation

3.2.4.1 Experimentelle Durchführung

Die Hybridisierungsproben zur Ermittlung der Schmelztemperatur wurden analog zu den Proben für die Elektrophorese-Experimente gemischt. Nach der Erhitzung auf 70 °C wurden diese über Nacht auf 4 °C abgekühlt. Experimente wurden an einem Zweistrahl-UV-VIS Spectrometer (V 550, Jasco, #: 6703-J024A, Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt, das mit einer peltiertemperierten Zelle (ETC 505, Jasco, #: 6708-J025A, Groß-Umstadt, Deutschland) ausgerüstet ist. Eine Mikroabsorptionsküvette (Hellma, #: 115-QS, Müllheim, Deutschland) diente als Gefäß für die Proben. Nach erfolgter Kalibrierung mit dem reinen Analysepufer (1x TE / 60 mM NaCl) bei 260 nm wurde die zu analysierende Lösung in die Mikroküvette eingefüllt und jene mit einem Teflonstopfen und zusätzlichem Teflonband derartig verschlossen, dass die Kammer luftfrei war. Nach dem Einsetzen der Küvette in den Probenhalter wurde diese für 5 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Die Probe wurde bei dieser Temperatur 10 Minuten äquilibriert. Die temperaturabhängige Absorption der Probe bei 260 nm wurde im folgenden Verlauf aufgenommen, wobei die Temperatur mit einer konstanten Heizrate von 0,5 °C/min von 0 °C auf 90 °C erhöht wurde. Neben dem Heizzyklus wurde ein analoger Kühlzyklus gleich im Anschluss durchgeführt.

3.2.4.2 Zusammenhang zwischen dem Absorptionssignal und der DNA-Dissoziation

Mit Hilfe des Absorptionssignals der DNA-haltigen Lösung bei 260 nm kann eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die DNA als Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegt. Das liegt darin begründet, dass diese verschiedenen Zustände der DNA unterschiedliche Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge aufweisen, wobei für eine Analyse der Schmelzkurve die genauen Unterschiede unerheblich sind. Eine exemplarische Schmelzkurve einer ODN A/ODN \bar{A} -Lösung ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Sowohl für niedrige als auch für hohe Temperaturen kann ein nahezu linearer Verlauf der Absorption beobachtet werden. Hierbei wird angenommen, dass das Signal jeweils nur der temperaturabhängigen Absorption für dsDNA (niedrigere Temperaturen) bzw. für ssDNA (hohe Temperaturen) entspricht. Im sigmoidalen Zwischenbereich kommt es zur Öffnung der Basenpaare. Unter Berücksichtigung dieser Annahme kann der Anteil an geöffneten Basenpaaren θ folgendermaßen definiert werden:

$$\theta(T) = \frac{A(T) - A_{ds}(T)}{A_{ss}(T) - A_{ds}(T)} \quad (3.4)$$

A stellt das gemessene Absorptionssignal und A_{ds} bzw. A_{ss} die linearen Ausgleichsgeraden für niedrige bzw. hohe Temperaturen dar (vgl. Abbildung 3.8). Während bei hohen Temperaturen der lineare Bereich sich über ein sehr großes Temperaturintervall erstreckt

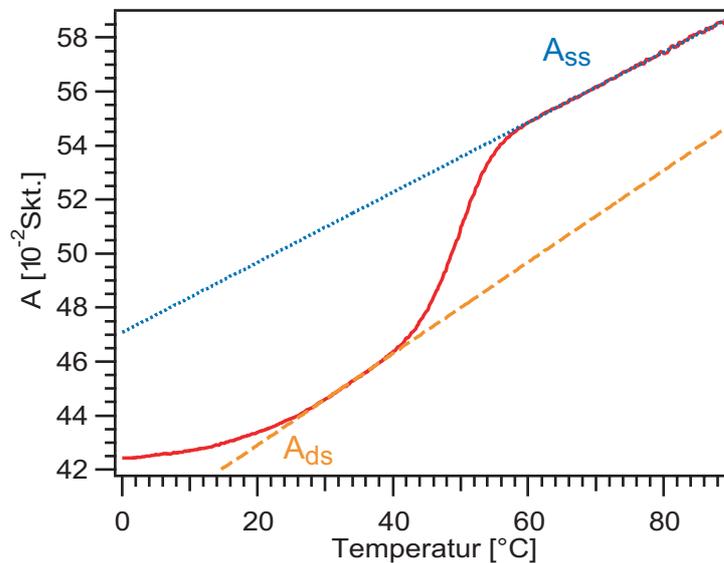


Abbildung 3.8: Temperaturabhängiges Absorptionssignal für eine äquimolare Mischung aus ODN A und ODN \bar{A} : Um eine weitere Analyse der Schmelzkurven zu erleichtern müssen diese nach Gleichung 3.4 normiert werden. Hierzu werden lineare Bereiche für niedrige (A_{ds}) und hohe Temperaturen (A_{ss}) festgelegt.

und somit das Anlegen der entsprechenden Gerade sich einfach gestaltet, ist dies für A_{ds} wegen der weniger stark ausgeprägten Linearität schwieriger. Aus diesem Grund wurde neben der Linearität zusätzlich noch beachtet, für den entsprechenden Bereich der Ausgleichsgeraden über alle Experimente hinweg ähnliche Temperaturintervalle anzunehmen. Als weiterer Hinweis für den richtig gewählten Bereich kann auch noch die Vergleichbarkeit der Steigung in beiden Regimen dienen [62]. Es zeigt sich, dass die genaue Steigung von A_{ds} keinen signifikanten Einfluss auf die normierte Schmelzkurve und deren Verlauf hat [61].

3.2.4.3 Theoretische Vorhersagen des Schmelzprozesses

In Abschnitt 2.1.2.2 wurde bereits vorgestellt, wie der Schmelzprozess bei der Kenntnis der freien gibbsschen Energie beschrieben werden kann. Allerdings stellt sich die Frage, inwiefern eine Berechnung der energetischen Verhältnisse direkt aus der Sequenz des entsprechenden DNA-Stranges möglich ist. Hierzu wurden umfangreiche empirische, aber auch theoretische Untersuchungen vorgenommen.⁴ Insgesamt ist festzuhalten, dass man neben der bloßen Zusammensetzung der DNA auch die Anordnung der einzelnen Basenpaare zueinander berücksichtigen muss. In unserem Fall wurde zur Bestimmung der Enthalpie und Entropie lediglich die Nächste-Nachbar-Wechselwirkung berücksichtigt.

Die Schmelzenthalpie lässt sich in zwei Teile zerlegen; dabei kommt der eine lediglich durch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen ($\Delta H_{H-Bindung}$), der andere durch die Aneinanderreihung der Basenpaare ($\Delta H_{Reihung}$) zustande:

$$\Delta H_{duplex} = \Delta H_{H-Bindung} + \Delta H_{Reihung} \quad (3.5)$$

$\Delta H_{H-Bindung}$ leitet sich direkt aus der Basenzusammensetzung der Sequenz ab:

$$\Delta H_{H-Bindung} = \Delta S_{bp}[N_{AT}T_{AT} + N_{CG}T_{CG}] \quad (3.6)$$

$\Delta S_{bp} = -103,97 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bezeichnet die Entropieänderung, die beim Schmelzen eines Basenpaares auftritt [140]. Insgesamt wird angenommen, dass ΔS_{bp} unabhängig von der Temperatur und der Sequenz ist und dass dies für die in den Experimenten verwendeten Salzkonzentrationen erfüllt ist. N_{AT} und N_{CG} stellen die Anzahl der AT- bzw. der CG-Basenpaare in der Sequenz dar. Die Schmelztemperatur der einzelnen Basenpaare (T_{AT} und T_{CG}) ist nur von der Konzentration an monovalenten Ionen in der Lösung abhängig [141]:

$$T_{AT}[K] = 355,55 + 7,95 \ln[Na^+] \quad (3.7)$$

$$T_{CG}[K] = 391,55 + 4,89 \ln[Na^+] \quad (3.8)$$

⁴In Referenz [60] sind die unterschiedlichen energetischen Parameter zusammengestellt

Berücksichtigt man bei der Aneinanderreihung bzw. bei der Berechnung der entsprechenden Enthalpie lediglich jeweils die nächsten Nachbarn und vernachlässigt die Endeffekte, so treten innerhalb der DNA insgesamt 10 eindeutig definierte Basenpaarungspaare auf (5'-3'): AA = TT, AG = CT, AC = GT, GA = TC, GG = CC, TG = CA, CG, GC, TA und AT. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es nur 8 linear unabhängige Energieparameter gibt, da durch die Sequenzlänge und durch das Verhältnis der Basen zueinander zwei Randbedingungen berücksichtigt werden müssen. Somit lässt sich $\Delta H_{Reihung}$ folgendermaßen schreiben:

$$\Delta H_{Reihung} = \sum_{i=1}^8 N_i(\delta G_i) \quad (3.9)$$

Die Berechnung der Anzahl der entsprechenden Linearkombination aus der DNA-Sequenz (N_i) und die entsprechende freie Energie (δG_i) für die nächste-Nachbar-Wechselwirkung ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Somit lassen sich die Enthalpie und Entropie wie folgt berechnen:

$$\Delta H_{duplex} = \Delta S_{bp}[N_{AT}T_{AT} + N_{CG}T_{CG}] + \sum_{i=1}^8 N_i(\delta G_i) \quad (3.10)$$

$$\Delta S_{duplex} = \Delta S_{bp}[N_{AT} + N_{CG}] \quad (3.11)$$

Für die weiteren Experimente sind die thermodynamischen Parameter für das ODN A (5'-TAG TTG TGA TGT ACA T-3') von Bedeutung. Alle Messungen wurden in TE/60 mM NaCl durchgeführt. N_{AT} beträgt hier 11 und N_{GC} 5. Die Schmelztemperaturen berechnen sich zu: $T_{AT} = 333,18$ K und $T_{GC} = 377,79$ K. Es ergibt sich für $\Delta H_{H-Bindung}$ ein Wert von -577443 J mol⁻¹. Für die entsprechenden N_i erhält man für diese Sequenz: $N_1 = 1$; $N_2 = 0$; $N_3 = 6$; $N_4 = 0$; $N_5 = 8$; $N_6 = 2$; $N_7 = 0$; $N_8 = 0$. Unter Verwendung der Werte aus Tabelle 3.3 und Gleichung 3.9 kann $\Delta H_{Reihung}$ berechnet werden:

Anzahl	freie Energie [J mol ⁻¹ K ⁻¹]
$N_1 = N_{AA/TT}$	$\delta G_1 = -146,5$
$N_2 = N_{CC/GG}$	$\delta G_2 = 648,7$
$N_3 = N_{AT/AT} + N_{TA/TA}$	$\delta G_3 = 25,1$
$N_4 = N_{CG/CG} + N_{GC/GC}$	$\delta G_4 = -640,3$
$N_5 = N_{AC/GT} + N_{CA/TG}$	$\delta G_5 = -205,1$
$N_6 = N_{AG/CT} + N_{GA/TC}$	$\delta G_6 = 184,1$
$N_7 = N_{AT/AT} - N_{TA/TA} + N_{CG/CG} - N_{GC/GC} + 2(N_{GA/TC} - N_{AG/CT})$	$\delta G_7 = 50,2$
$N_8 = N_{AT/AT} - N_{TA/TA} - N_{CG/CG} + N_{GC/GC} + 2(N_{CA/TG} - N_{AC/GT})$	$\delta G_8 = 100,4$

Tabelle 3.3: Mögliche Linearkombinationen und freie Energien pro Basenpaar zur Berechnung der nächste-Nachbar-Wechselwirkung: Die Linearkombinationen entsprechen den in Referenz [142] definierten. Die freien Energien wurden aus Referenz [140] entnommen und bei den weiteren Berechnungen verwendet.

$$\Delta H_{Reihung} = \sum_{i=1}^8 N_i(\delta G_i) \quad (3.12)$$

$$\begin{aligned} &= 1(\delta G_1) + 0(\delta G_2) + 6(\delta G_3) + 0(\delta G_4) \\ &\quad + 8(\delta G_5) + 2(\delta G_6) + 0(\delta G_7) + 0(\delta G_8) \\ &= 1(-146,5) + 6(25,1) + 8(-205,1) + 2(184,1) \\ &= -1318,7 \frac{J}{mol} \end{aligned} \quad (3.13)$$

Insgesamt ergeben sich für ODN A ΔH_{duplex} und ΔS_{duplex} zu:

$$\Delta H_{duplex} = \Delta S_{bp}[N_{AT}T_{AT} + N_{CG}T_{CG}] + \sum_{i=1}^8 N_i(\delta G_i) = -578761,7 \frac{J}{mol} \quad (3.14)$$

$$\Delta S_{duplex} = \Delta S_{bp}[N_{AT} + N_{CG}] = -1663,5 \frac{J}{mol K} \quad (3.15)$$

Die theoretischen Schmelzkurven ergeben unter Verwendung von Gleichung 2.28 nachfolgende Gleichung:

$$\theta = 1 - \chi = 1 - \frac{1 + c_T K_D - \sqrt{1 + 2c_T K_D}}{c_T K_D} \quad (3.16)$$

Hierbei wurde explizit der Zusammenhang zwischen dem Anteil an gebrochenen (θ) und an intakten Basenpaaren (χ) verwendet. Die Gesamtkonzentration an ODN wurde durch die Präparation festgelegt. In der Regel wurde der Einfluss des Nukleationsfaktors auf die Schmelzkurven vernachlässigt, d. h. $\beta = 1$, so dass K_D und K_{duplex} identisch sind.

Um eine Anpassung der Schmelzkurven vorzunehmen, wurde ein freier Parameter ν definiert, der die kooperative Kettenlänge im Bezug auf das ODN A-System angibt.

$$\theta(T, \nu) = 1 - \frac{1 + c_T K_{duplex}(T, \nu) - \sqrt{1 + 2c_T K_{duplex}(T, \nu)}}{c_T K_{duplex}(T, \nu)} \quad (3.17)$$

$$\text{mit} \quad K_{duplex}(T, \nu) = \exp \left[-\frac{\nu(\Delta H_{duplex} - T\Delta S_{duplex})}{RT} \right] \quad (3.18)$$

3.2.5 Darstellung von Molekülen mit 3 ssDNA-Anknüpfungsstellen

Um verzweigte supramolekulare Strukturen zu schaffen, ist es zwingend erforderlich, Moleküle mit mehr als zwei Anknüpfungsstellen zu verwenden. Hierzu wurde ebenso von Moustafa Abdalla in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz ein Molekül synthetisiert, das mit drei ODN versehen war. Die Reaktionsschritte sind nachfolgend und in Abbildung 3.9 (a) beschrieben.

Als Ausgangssubstanz wurde 1,3,5-Tribrombenzol (8) verwendet, das in einer Suzuki-Kopplungsreaktion mit 4-Methoxycarbonyl-phenylboronsäure (stöchiometrisches Verhältnis 1:7) reagiert. Die Reaktion wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus Toluol, Methanol und 2 M Kaliumcarbonatlösung für 15 Stunden bei 75 °C unter Schutzgas durchgeführt. Als Katalysator wurde Pd(PPh₃)₄ verwendet. Nach erfolgter Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde die Carboxylmethylschutzgruppe von (9) in THF und Kaliumhydroxid bei 80 °C (24 Stunden) abgespalten. (10) wurde mit 2 M HCl-Lösung gefällt und schließlich getrocknet. Die Herstellung des Aktivesters (11) wurde durch eine Reaktion mit N-Hydroxysuccinimid in DMF erreicht, wobei die Reakti-

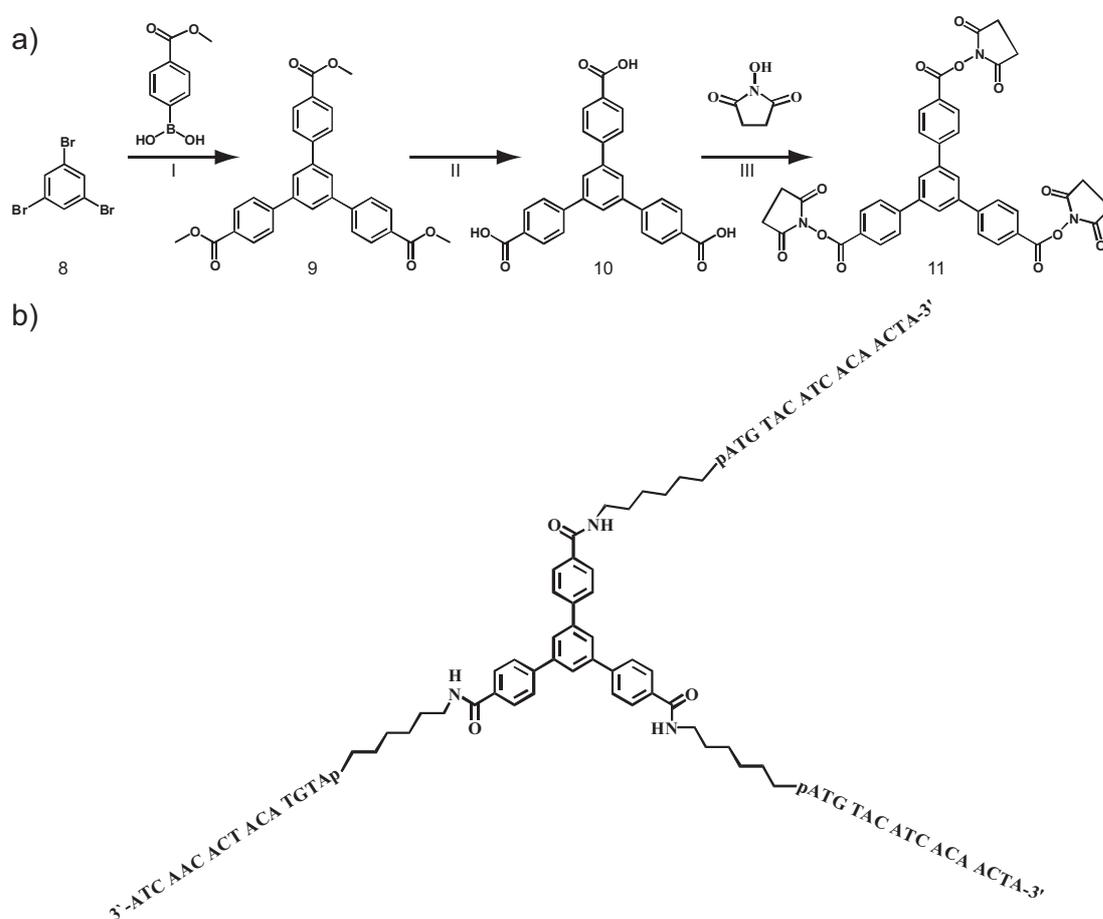


Abbildung 3.9: Synthese und Struktur des Trioligonukleotids: (a) Syntheseschritte zur Herstellung des Trioligonukleotidkerns. Nachfolgend sind die Reaktionsbedingungen und die Ausbeute beschrieben: I: Palladiumkatalysator, 2 M K₂CO₃, Toluol, Methanol, 75 °C, 15 h, 91 % Ausbeute; II: 30 Äquivalente KOH in 2 ml H₂O, THF, 80 °C, 24 h, 87 % Ausbeute; III: Dicyclohexylcarbodiimid als Katalysator, DMF, 35 °C, 48 h, 100 % Ausbeute. (b) Strukturformel des Trioligonukleotids. Das ODN \bar{A} wurde mit Hilfe einer Aktivester-Amin-Kopplung über das 5'-Ende an den Trioligonukleotid-Kern gebunden.

on mit DCC katalysiert wurde. Die Synthese des Trioligonukleotids wurde analog zu der beschriebenen Reaktion der PON durchgeführt. Es wurde ODN \bar{A} über das 5'-Ende angebunden. Die Struktur des Trioligonukleotids (Tri-ODN) ist in Abbildung 3.9 (b) dargestellt. Die Analyse der Hybridisierungseigenschaften erfolgte analog mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

3.3 Experimenteller Aufbau der Mikroelektrophorese

Die Detektion von elektrophoretischer Drift auf kleinen Längenskalen ist mit herkömmlichen Methoden kaum zu erreichen, da die verwendeten Absorptionssysteme nicht klein genug sind und keine Einzelmolekülaufösung möglich ist. Auch scheint es auf diesen Längenskalen sehr schwierig, genau definierte Banden zu erzeugen, die getrennt voneinander detektiert werden können. In diesem Zusammenhang stellt die Zwei-Orts-Kreuzkorrelation eine elegante Lösung des Problems dar. Zum einen kann hier der Abstand der beiden Detektionsvolumina auf einer μm -Skala variiert werden, zum anderen ist diese Methode nicht darauf angewiesen, dass eine tatsächliche Separation der Proben auftritt. Im Nachfolgenden wird der experimentelle Aufbau dargestellt sowie die Durchführung und Analyse der Experimente vorgestellt.

3.3.1 Doppelfokus-FCS-Aufbau

In Abbildung 3.10 ist der schematische Aufbau des Doppelfokus-FCS gezeigt, der im Detail auch in den Referenzen [119, 128] vorgestellt ist. Um zwei getrennte Laserfoki zu erzeugen, wird bezüglich der Beleuchtung der Strahlengang modifiziert. Aus der Lasereinheit wird über eine optische Faser das Laserlicht auf einen optischen Tisch ausgekoppelt. Ein Wollaston-Prisma teilt das Licht in zwei um $0,5^\circ$ gegeneinander divergierende polarisierte Strahlen auf. Die erste eingebaute Linse (Linse 1) wird im Abstand der eigenen Brennweite vom Wollaston-Prisma positioniert, um die beiden divergierenden Lichtstrahlen wieder parallel zueinander auszurichten. Mit einer zweiten Linse (Linse 2) werden die Strahlen refokussiert und über ein speziell entwickeltes Tubuslinsensystem (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) von hinten in das Mikroskop eingekoppelt. Die Brennweiten der beiden Linsen sind so gewählt, dass im Probenvolumen ein Fokusabstand von ca. $5 \mu\text{m}$ erreicht wird. Bei der Wahl der Linsen musste neben dem korrekten Einfallswinkel in das Tubuslinsensystem darauf geachtet werden, die innere Divergenz der Strahlen möglichst klein zu halten, um nach Möglichkeit weiterhin auflösungslimitierte Foki zu erhalten. Die Umlenkung des Anregungslichtes in das Objektiv erfolgt über einen auf die Wellenlänge angepassten dichroitischen Spiegel, der im Filterrevolver des Mikroskops eingebaut ist (vgl. Abbildung 3.1). Als Objektiv wird weiterhin ein C-Apochromat $40\times/1,2 \text{ NA}$ Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Die Detektion des Fluoreszenzlichtes erfolgt über das ConfoCor2 System, wobei das Signal zwischen beiden Detektionskanälen durch einen $50:50$ Strahlteiler aufgeteilt wird. Die Kreuzkorrelation zwischen den beiden Kanälen wird direkt durch das ConfoCor2 System ermittelt und über die Systemsoftware ausgegeben.

Das System ist so adaptiert, dass prinzipiell die drei Hauptlinien der Laser (488 nm , 543 nm und 633 nm) für die Doppelfokus-Messungen verwendet werden können. Hierzu muss lediglich der dichroitische Spiegel im Mikroskoprevolver gewechselt und die Emissionsfilter in den Detektionskanälen angepasst werden. Bezüglich der hier vorgestellten Experimente wurde allerdings ausschließlich die Laserlinie bei 633 nm und Cy5 als Ka-

librierungsfarbstoff verwendet.

Um den Abstand der beiden Foki zu detektieren, wird eine $1 \mu\text{M}$ Cy5-Lösung über den modifizierten Lichtweg angeregt. Die Detektion wird allerdings nicht über das FCS-Modul, sondern mit Hilfe des ebenfalls angeschlossenen LSM-Moduls vorgenommen (vgl. Abbildung 3.1). Ein so detektiertes Bild ist in Abbildung 3.11 (a) zu sehen. Unter Verwendung der eingebauten Rastereinrichtung wird die Probe abgerastert. Nur in den Bereichen, in denen die Cy5-Lösung durch die beiden Foki angeregt wird, kann ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Das Fluoreszenzprofil wird dazu verwendet, an jedem Messtag den Abstand der Foki festzulegen. Dieser wird über das Intensitätsprofil (vgl. Abbildung 3.11 (b)) bestimmt und beträgt über alle Experimente gemittelt $(5,4 \pm 0,1) \mu\text{m}$. Dies zeigt, dass der Aufbau insgesamt stabil ist.

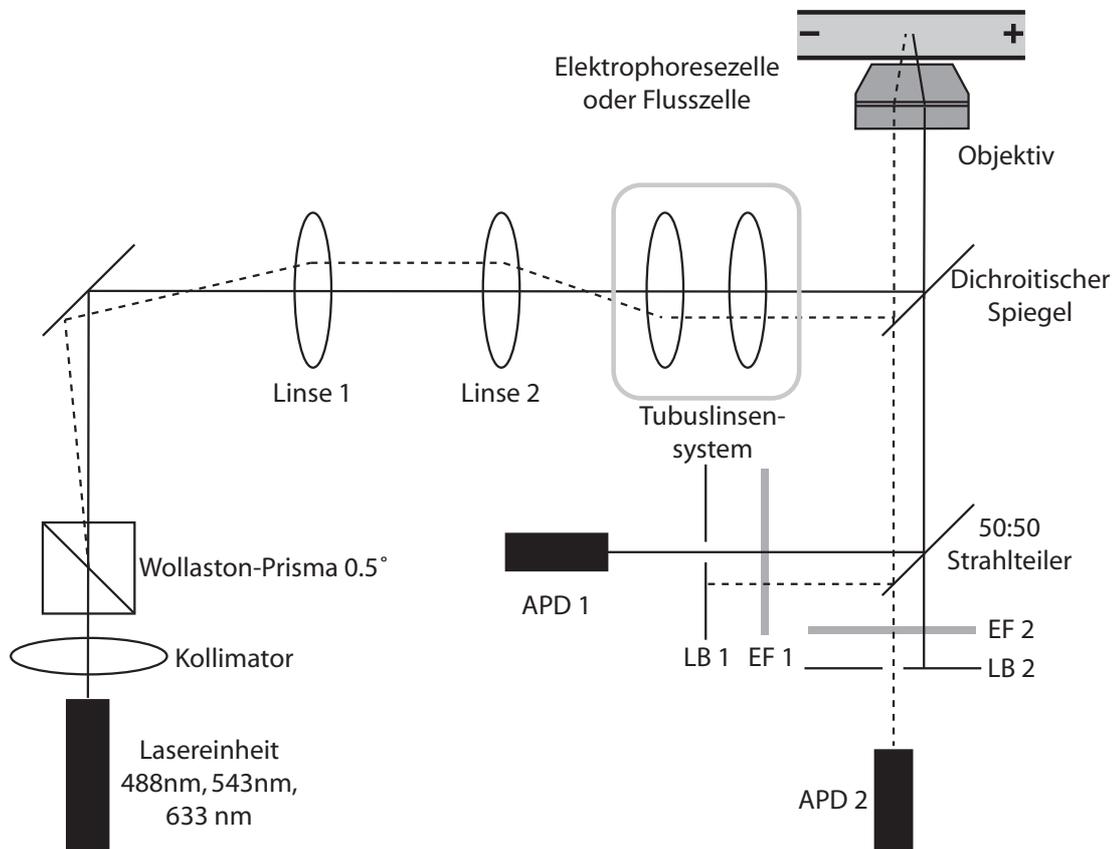


Abbildung 3.10: Prinzipskizze des Doppelfokus-FCS Aufbaus: Zur Erzeugung der beiden Foki wird ein modifizierter Lichtweg verwendet. Das Laserlicht wird mit einem Wollaston-Prisma in zwei zueinander divergierende Lichtstrahlen aufgespalten und über Linsen parallelisiert und erneut fokussiert. Das Licht wird schließlich über ein spezielles Tubuslinsensystem wieder ins Mikroskop eingekoppelt. Der Einfallswinkel in dieses System bestimmt den Abstand der beiden Foki. Zur Detektion des Fluoreszenzlichtes wird das ConfoCor2-System verwendet.

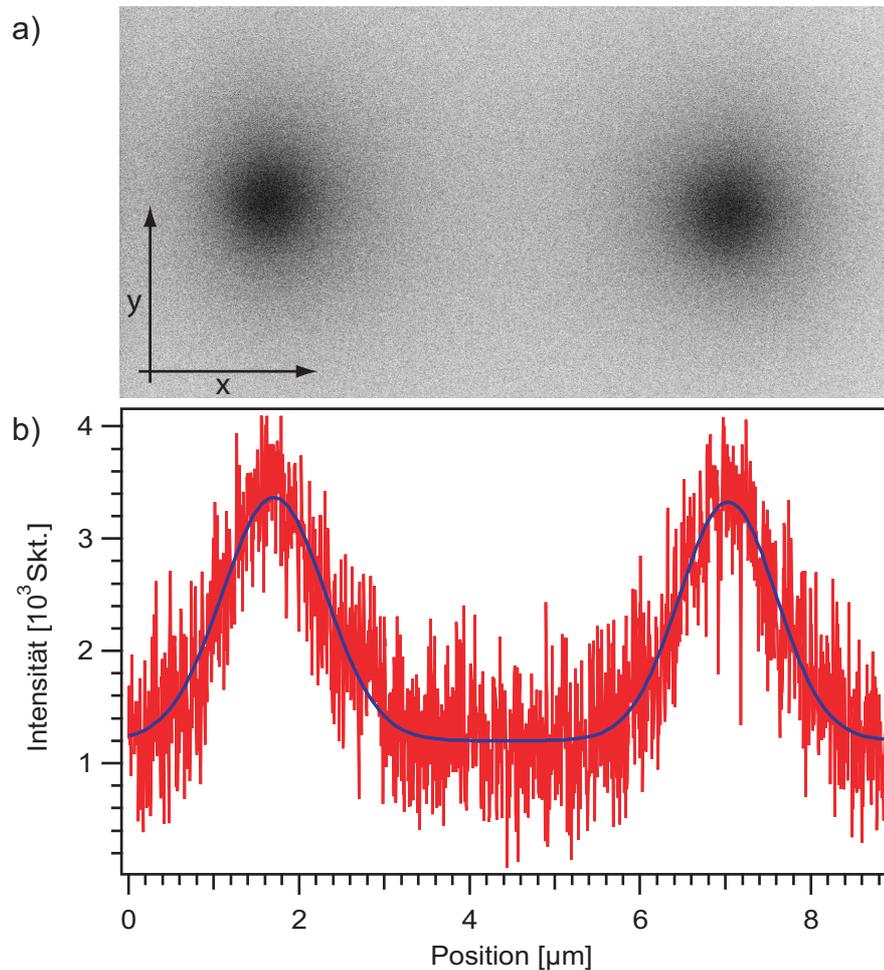


Abbildung 3.11: Fluoreszenzbild der beiden Foki im Probenraum: (a) Rohdaten des mit dem LSM-Modul aufgenommenen Fluoreszenzlichtes der beiden Foki im Probenraum. Die Skalierung entspricht der in Abbildung (b). (b) Intensitätsprofil durch die beiden Foki, der Abstand der beiden Foki entspricht dem Abstand der Maxima, das Profil kann mittels zweier Gaußfunktionen (durchgezogene Linie) angepasst werden. In diesem Fall wird der Abstand auf $(5,32 \pm 0,03)$ μm bestimmt. Das hohe Rauschen kommt durch die mobilen Farbstoffe in der Lösung zu Stande.

Nachdem der Abstand der beiden Foki kalibriert ist, müssen die Lochblenden bezüglich der beiden Maxima justiert werden. Hierzu wird eine 100 nM Cy5-Lösung verwendet. Die Lochblenden in beiden Kanälen werden so positioniert, dass jeweils die maximale Intensität eines Fokus detektiert wird, wobei die Lochblendenposition in z-Richtung weitgehend unberücksichtigt bleibt. Um die Größe der beiden Foki abzuschätzen wird in einer 10 nM Cy5-Lösung eine analoge Kalibrierungsmessung wie im Fall der bereits beschriebenen FCS-Experimente durchgeführt. Allerdings muss auf Grund der signifikanten Absorptionsverluste im modifizierten Lichtweg mit einer höheren Ausgangslaserleistung

(ca. 70 % der Maximalleistung) gemessen werden. Eine charakteristische Kalibrierungsmessung ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Die Messungen ergeben, dass die beiden Foki im Vergleich zu den Einzelfokus-Messungen leicht aufgeweitet aber im Bezug zueinander ungefähr gleich groß sind. Aus Abbildung 3.12 wird zusätzlich ersichtlich, dass die Lochblenden auf die unterschiedlichen Foki ausgerichtet sind, da die gleichzeitig mit den Autokorrelationen gemessene Kreuzkorrelation verschwindet.

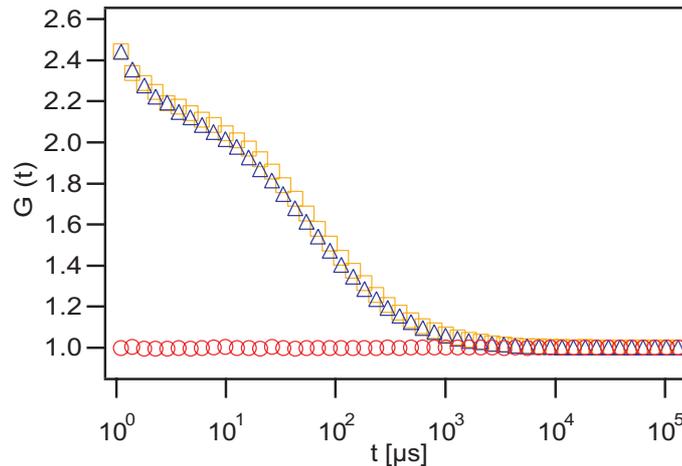


Abbildung 3.12: Auto- und Kreuzkorrelationsfunktion der Doppelfokus-Kalibrierung: Die Autokorrelationen der beiden Anregungsvolumina (Dreiecke und Quadrate) sind nahezu identisch. Die Kreuzkorrelation (Kreise) weist keinen Ausschlag auf; dies zeigt, dass die beiden Foki klar voneinander getrennt sind.

3.3.2 Messkammeraufbau

Sowohl für einfache Flussmessungen als auch für die Elektrophoresemessungen wurden Kunststoffkammern der Firma IBIDI (μI -Slide, #: 80111, München, Deutschland) eingesetzt, die im Fall der Elektrophorese angepasst wurden. Die Kammern waren mit Hilfe von Teflonschläuchen (Bolender, #: S 1810-26, Grünsfeld, Deutschland) auf beiden Seiten mit 3-Wege-Hähnen und weiteren Flüssigkeitsbehältern verbunden (vgl. Abbildung 3.13). Die beiden Behälter waren in der Höhe einstellbar gelagert. Die Höhendifferenz diente auf der einen Seite zum Anlegen eines definierten hydrostatischen Drucks bei Flussexperimenten und andererseits zum Spülen des Kanalsystems. Über eine an einem 3-Wege-Hahn angebrachten Spritze konnten die entsprechenden Proben in kleinen Mengen injiziert werden.

Die Elektrophoresekammer besitzt einen Messkanal (1,5 mm x 0,1 mm) und zwei Flüssigkeitsreservoirs, in die Elektrodenhalter eingebaut und mit Teflonband abgedichtet wurden. Zur Vermeidung von Polarisierungseffekten an den Elektroden wurden geschwärzte Platinelektroden verwendet. Der Schwärzungs-Prozess wurde nach dem Protokoll in Referenz [143] durchgeführt und der Abstand der Elektroden auf 2,5 cm eingestellt.

Diese waren über ein Relais mit einem Hochspannungsnetzteil (Heinzinger, Rosenheim, Deutschland) verbunden, das Spannungen von bis zu 700 V erzeugen kann. Das Relais wurde verwendet, um mit Hilfe eines computergenerierten Triggersignals die Polarität der Elektroden mit einer Frequenz von 0,1 Hz umzuschalten.

Die Elektrophoresemessungen wurden in 1x TBE-Puffer durchgeführt, der vor der Messung entgast wurde, damit eine Gasbildung während des Experimentes vermieden wurde. Die entsprechende Probe wurde mit einer Spritze injiziert. Die Kreuzkorrelation wurde mindestens 5-mal für 15 Sekunden in Abhängigkeit der angelegten Spannung und der Messposition im Kanal gemessen. Neben der Kreuzkorrelation wurde auch der Strom, der durch die Messkammer fließt, aufgenommen. Nach dem Ende der Messungen wurde die Kammer so lange gespült, bis das Fluoreszenzsignal wieder auf das Hintergrundniveau abgefallen war.

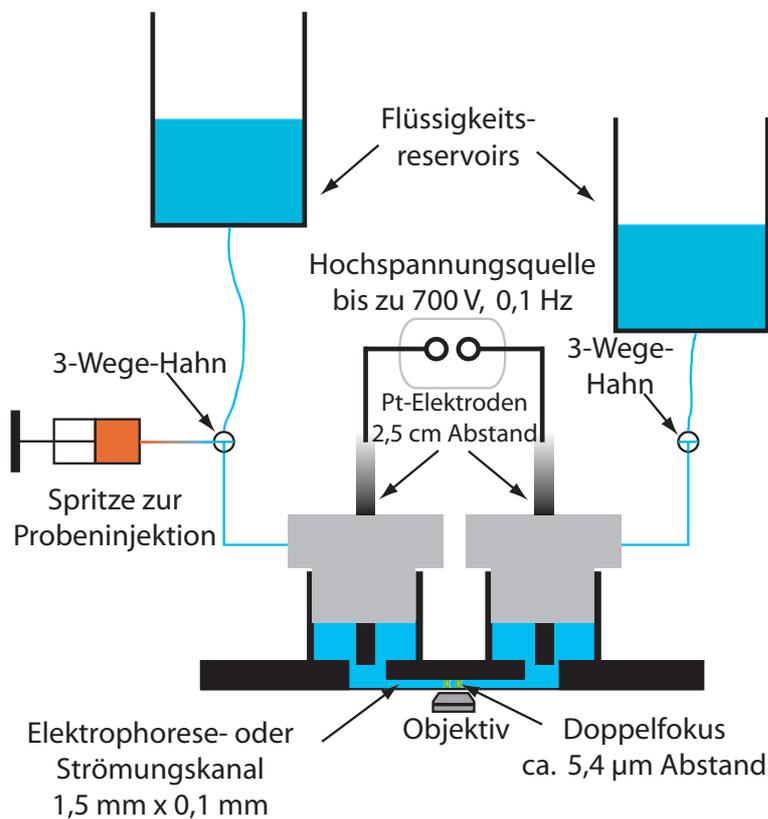


Abbildung 3.13: Messkammeraufbau für Fluss- und Elektrophorese-Experimente: Die Messkammer ist über ein Schlauchsystem mit 3-Wege-Hähnen und Flüssigkeitsreservoirs verbunden, deren Höhe eingestellt werden kann. Im Fall der Elektrophorese-Experimente ist die Kammer noch mit zwei Elektroden im Abstand von 2,5 cm bestückt, die mit einer Spannungsquelle verbunden sind. Die Polarität kann durch ein externes Signal umgeschaltet werden. Die Probe wird mit Hilfe einer Spritze in den Messkanal gebracht.

3.3.3 Methoden zur Korrektur intrinsischer Parameter und von Artefakten

Mit Hilfe der Zwei-Orts-Kreuzkorrelation kann sehr einfach die Driftgeschwindigkeit in der Kammer in Abhängigkeit von der angelegten Spannung und der Messposition im Kanal bestimmt werden (vgl. Gleichungen 2.97 und 2.98). Allerdings kann man aus der so gemessenen Geschwindigkeit noch nicht direkt die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} nach Gleichung 2.56 berechnen, sondern man erhält lediglich die effektive Mobilität μ_{eff} , in der noch alle Artefakte und intrinsische Parameter beinhaltet sind. Hierfür kommen zum einen elektroosmotische Effekte, wie sie in Abschnitt 2.2.2.3 bereits eingeführt wurden, in Frage. Es zeigt sich aber auch, dass Temperatureffekte, die durch den elektrischen Stromfluss induziert wurden, nicht zu vernachlässigen sind. Beide Effekte sollen in den nächsten Abschnitten näher beleuchtet werden. Im Fall der Temperatur-induzierten Artefakte wird analog zu *Knox und McCormack* vorgegangen [144].

3.3.3.1 Temperatureffekte

Unter der Annahme, dass durch die Einführung von *Joulescher Wärme* die Temperatur im Kanal steigt, ist nicht zu erwarten, dass der in Gleichung 2.56 postulierte Zusammenhang gilt, sondern dass μ_{eff} mit der Temperatur variiert.

$$v_{eff}(T) = \mu_{eff}(T)E \quad (3.19)$$

Geht man davon aus, dass μ_{eff} indirekt proportional zur Reibungskonstante ξ ist, was aus dem einfachen Kräfteansatz in Gleichung 2.57 folgt, und dass ξ wiederum direkt proportional zur Viskosität η der Flüssigkeit ist, so lässt sich folgender Zusammenhang für v_{eff} herstellen:

$$v_{eff}(T) = \frac{C_1}{\eta(T)}E \quad (3.20)$$

Die Viskosität von Wasser ist in der Tat stark temperaturabhängig [145] und ist näherungsweise über eine Exponentialfunktion mit der absoluten Temperatur verknüpft:

$$\eta(T) = 2,761 \exp\left(\frac{1713K}{T[K]}\right) \mu Pa s \quad (3.21)$$

Zur Berechnung der Temperatur wurde diese als Funktion der Viskosität ausgedrückt [144]:

$$T[^\circ C] = -251 \eta^3 + 624 \eta^2 - 570 \eta + 215 \quad (3.22)$$

wobei η in mPas eingesetzt werden muss. Beide Gleichungen beschreiben die Viskosität in einem Temperaturintervall von 20 °C bis 100 °C sehr gut.

Trägt man nun den Quotienten aus v_{eff} und E gegen E auf, so erwartet man einen konstanten Wert. Dies ist allerdings nicht der Fall, falls mit zunehmender Feldstärke sich die Temperatur und somit die Viskosität im Kanal ändert. Die Konstante C_1 wird dadurch ermittelt, dass man für niedrige elektrische Felder davon ausgeht, dass die Kammertemperatur der Raumtemperatur entspricht. Für alle weiteren Feldstärken kann darum die Viskosität und daraus die Temperatur im System berechnet werden.

Im weiteren Verlauf der Analysen wird die Geschwindigkeit bezüglich der temperaturabhängigen Viskosität korrigiert und eine auf Raumtemperatur normierte effektive Geschwindigkeit für weitere Analysen verwendet.

$$v_n(E) = v_{eff}(E) \frac{\eta(E)}{\eta(E=0)} \quad (3.23)$$

Neben der Diftgeschwindigkeit wurde ebenso der durch die Kammer fließende elektrische Strom aufgenommen. Die Daten wurden dazu genutzt, eine Kontrollberechnung für die Kammertemperatur durchzuführen. Der Strom im Elektrophoresekanal ist folgendermaßen nach dem Ohmschen Gesetz definiert:

$$I = A \sigma_{sp} E \quad (3.24)$$

hierbei bezeichnet A den Querschnitt des Kanals und σ_{sp} die spezifische Leitfähigkeit des Puffers. σ_{sp} ist auf mikroskopischer Skala mit der Mobilität der Pufferionen verknüpft und wiederum indirekt proportional zur Viskosität der Flüssigkeit. Daher wird für den Strom folgender Zusammenhang postuliert:

$$I(T) = \frac{C_2}{\eta(T)} E \quad (3.25)$$

Über eine analoge Auftragung wie im Fall der effektiven Geschwindigkeit kann hier ebenfalls die Viskosität und damit verbunden die Temperatur des Kammersystems ermittelt werden.

3.3.3.2 Elektroosmose in geschlossenen Systemen

Während in einem offenen Kanalsystem sich ein über den ganzen Kanal nahezu konstantes elektroosmotisches Strömungsprofil einstellt (vgl. Abschnitt 2.2.2.3), muss im Fall eines geschlossenen Systems berücksichtigt werden, dass im Allgemeinen das Höhenprofil ortsabhängig ist. Für den Fall sehr dünner Kanäle wird ein parabolisches Strömungsprofil beobachtet (Abbildung 3.14), dessen Scheitel mit der Kanalmitte zusammenfällt ($z = 0$).⁵

⁵In unserem Fall war die Kanalbreite mindestens um den Faktor 10 größer als die Kanalhöhe, so dass das System sehr gut durch zwei unendlich ausgedehnte planparallele Platten genähert werden kann. Das sich einstellende Profil ist nur von der Höhenposition im Kanal abhängig

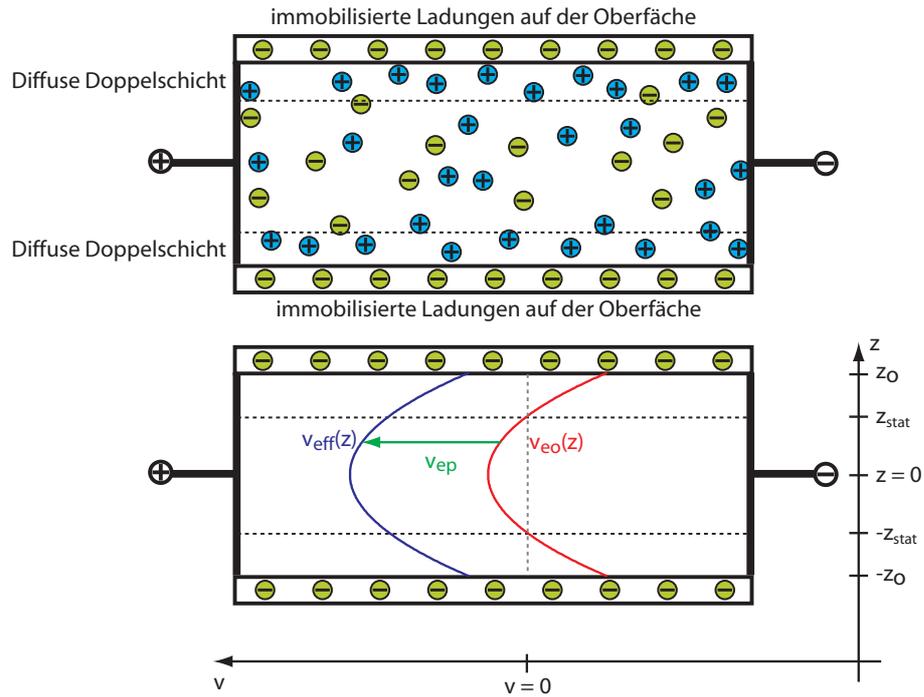


Abbildung 3.14: Elektrophoretische und elektroosmotische Drift in geschlossenen Systemen: Im oberen Teil der Abbildung sind die Ladungsverhältnisse in einer Elektrophoresekammer dargestellt. Der Konzentrationsgradient der Gegen- und Coionen induziert im elektrischen Feld eine Driftbewegung (vgl. Abschnitt 2.2.2.3). Im geschlossenen Kanalsystem kommt es zu einer Ausbildung eines parabolischen, elektroosmotischen Strömungsprofils $v_{eo}(z)$, dem die konstante elektrophoretische Drift v_{ep} überlagert ist.

$$v_{eo}(z) = az^2 + b \quad (3.26)$$

a und b stellen zunächst beliebige Konstanten dar, die durch die Randbedingung eingeschränkt werden, dass in einem geschlossenen System kein Nettofluss der Flüssigkeit existieren darf:

$$\int_{-z_0}^{z_0} v_{eo}(z) dz = \int_{-z_0}^{z_0} az^2 + b dz \stackrel{!}{=} 0 \quad (3.27)$$

Dies ergibt eine Bedingung für a und b , so dass diese nicht mehr unabhängig voneinander sind.

$$b = -a \frac{z_0^2}{3} \quad (3.28)$$

Unter Verwendung dieser Bedingung lässt sich die effektive Geschwindigkeit, die mit dem Doppelfokus-Aufbau gemessen wird, folgendermaßen bestimmen:

$$v_{eff}(z) = v_{ep} + v_{eo}(z) = v_{ep} + az^2 - a \frac{z_0^2}{3} \quad (3.29)$$

Dies zeigt, dass es bei Kenntnis der Krümmung der ortsabhängigen effektiven Geschwindigkeit möglich ist, die elektrophoretische Geschwindigkeit zu extrahieren. Diese kann prinzipiell über zwei verschiedene Analysewege ermittelt werden.

Betrachtet man die elektroosmotische Geschwindigkeit unter Berücksichtigung der Randbedingung (Gleichung 3.28), erkennt man, dass innerhalb des Kanals eine stationäre Phase existiert, an der der elektroosmotische Beitrag zur effektiven Geschwindigkeit verschwindet. Diese Höhe ergibt sich zu:

$$z_{stat} = \frac{1}{\sqrt{3}}z_0 \quad (3.30)$$

In dieser Höhe erhält man direkten Zugang zur elektrophoretischen Geschwindigkeit. Bemerkenswert ist, dass z_{stat} nur von der Kammerhöhe abhängt. Mit dieser Methode sind Messungen ohne Kenntnis der elektroosmotischen Eigenschaften möglich. Dabei taucht das Problem auf, die stationäre Höhe exakt einzustellen, da die Höhe der Kanäle nur grob gemessen werden kann.

Eine andere Möglichkeit, die effektive Geschwindigkeit für elektroosmotische Effekte zu korrigieren besteht darin, das höhenabhängige Geschwindigkeitsprofil zu messen und daraus über einen parabolischen Fit die Krümmung a des Profils zu ermitteln. Dadurch lässt sich der elektroosmotische Anteil an der effektiven Geschwindigkeit exakt berechnen. Es erscheint jedoch sinnvoll, in der Kanalmitte zu messen, da durch die ungenaue Positionierung die Fehler hier am niedrigsten sind. Die elektrophoretische Geschwindigkeit ergibt sich in der Kanalmitte zu:

$$v_{ep} = v_{eff}(0) - v_{eo}(0) = v_{eff}(0) + a\frac{z_0^2}{E} \quad (3.31)$$

Die entsprechenden Mobilitäten berechnen sich zu:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad \text{und} \quad \mu_{eo}(0) = -\frac{1}{3}\frac{az_0^2}{E} \quad (3.32)$$

3.3.3.3 Polyethylenoxid-Netzwerke

Für die Messungen in Polymernetzwerken wurde eine 3 %-ige ($\frac{w}{v}$) Polyethylenoxid (PEO)-TBE Pufferlösung verwendet ($M_r(\text{PEO})=3 \cdot 10^5$ Dalton). Die Polymerlösungen wurden nach den in den Referenzen [146, 147] vorgeschlagenen Methoden hergestellt. PEO (Aldrich, #: 182001, Taufkirchen, Germany) wurde in kleinen Mengen jeweils zu einem auf 85 °C - 90 °C temperierten TBE-Puffer hinzugegeben, wobei die Lösung mittels eines Rührfischs bei hoher Geschwindigkeit stetig gut durchmischt wurde. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und anschließend im Ultraschallbad und im Vakuum (≈ 15 mbar) entgast, bis keine weitere Gasentwicklung mehr zu beobachten war.

Auch im Bezug auf elektrophoretische Messungen in der PEO-Lösung spielt die Temperaturabhängigkeit der Viskosität eine entscheidende Rolle. Sie soll nun näher betrachtet werden.

Die temperaturabhängige spezifische Viskosität η_{sp} wurde über die Huggins Gleichung mit den von *Jeon et. al.* experimentell ermittelten Parametern berechnet [148]. Die spezifische Viskosität spiegelt den Anteil an der Gesamtviskosität der Polymerlösung wider, der durch das Polymer selbst verursacht wird, und ist über Gleichung 3.33 definiert.

$$\eta_{sp}(T) = \frac{\eta(T) - \eta_{LM}(T)}{\eta_{LM}(T)} \quad (3.33)$$

Unter Verwendung der berechneten Temperaturabhängigkeit der spezifischen Viskosität und der Viskosität von Wasser (vgl. Gleichung 3.21) lässt sich die tatsächliche Viskosität der Polymerlösung errechnen. Die entsprechende Temperatur wurde gegen die sich so ergebenden Werte für die Viskosität aufgetragen und mit einem Polynom 4. Grades angepasst (siehe Abbildung 3.15):

$$T[^\circ\text{C}] = -24,553 + 29,801 \eta - 4,4588 \eta^2 + 0,18573 \eta^3 \quad (3.34)$$

Bezüglich der Datenauswertung wurde im Fall der PEO-Lösungen analog zu den Experimenten in freier Lösung vorgegangen. Zur Errechnung der Temperatur wurden die Strommessungen verwendet.

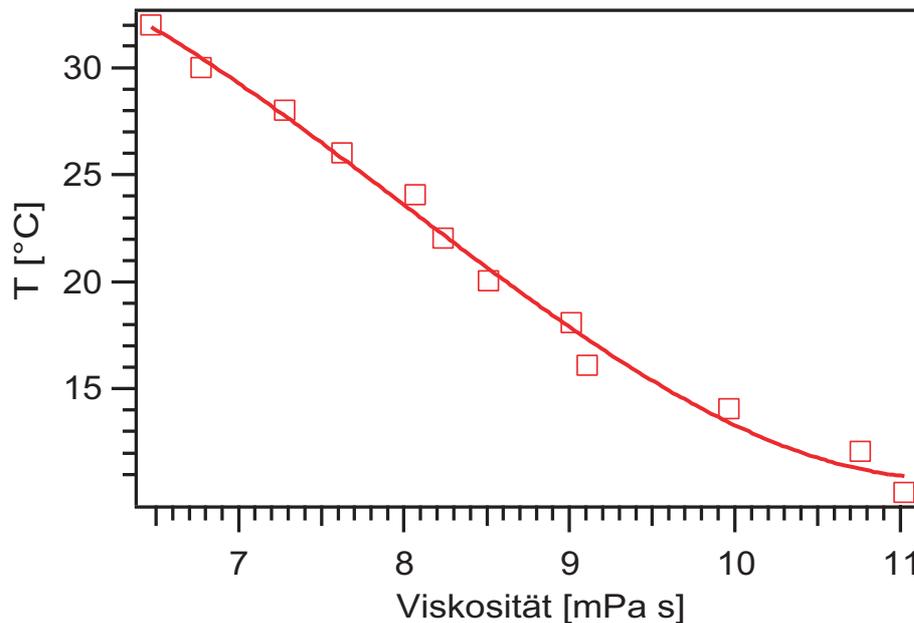


Abbildung 3.15: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Temperatur und Viskosität für die verwendete PEO-Lösung: Die Temperatur (Quadrate) ist gegen die Viskosität aufgetragen. Die Werte wurden mit einem Polynom 4. Grades angepasst (durchgezogene Linie). Die Berechnung der temperaturabhängigen Viskosität ist im Text beschrieben.

4 Diffusive Eigenschaften DNA-basierter Systeme

Wie bereits im Abschnitt 2.3 von der theoretischen Seite her beschrieben, stellt FCS eine mächtige Methode dar, um Prozesse zu charakterisieren, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals haben. Zu diesen so detektierten Prozessen gehören zum Beispiel die freie Diffusion, aber auch die fluoreszenzkinetischen Prozesse wie der Übergang in einen strahlungslosen Triplettzustand, Isomerisationsprozesse oder das Bleichen des Farbstoffes beim Durchgang durch das Anregungsvolumen. Unter Berücksichtigung dieser möglichen Einflüsse auf das Fluoreszenzsignal und somit auf die FCS-Messung stellt die Charakterisierung von farbstoffmarkierter dsDNA eine besondere Herausforderung dar. Die involvierten Prozesse sollen in den nachfolgenden Abschnitten genauer analysiert und die Auswirkungen auf die in unserem Fall eigentlich relevante Messung des diffusiven Prozesses herausgearbeitet werden. Darüber hinaus war die Beschreibung der diffusiven Eigenschaften in unterschiedlichen Lösungsmitteln (wässrige Lösung im Vergleich zu Alkanen) von großem Interesse. Zum einen sollen die von *Hohner et. al* erzielten Röntgenstreuungsergebnisse bezüglich der Löslichkeit von DNA in unpolaren Lösungsmitteln auf einzelmolekularer Ebene an den gleichen DNA-Systemen bestätigt werden [149]. Zum anderen wird die Frage beantwortet, inwieweit DNA-Farbstoff-Hybridmoleküle wie die in Abschnitt 3.2 vorgestellten PON sich in polaren und unpolaren Lösungsmitteln verhalten.

4.1 Doppelsträngige und einzelsträngige DNA

4.1.1 Wässrige DNA-Lösungen

Obwohl FCS-Messungen in wässrigen Lösungsmitteln (in unserem Fall TE/60 mM NaCl) prinzipiell routinemäßig durchgeführt werden können, stellt die Analyse dennoch eine große Herausforderung wegen der vielen gekoppelten Fluoreszenzprozesse dar. Darum ist es gerade hier sinnvoll, sich mit den zu Grunde liegenden physikalischen Prozessen zu beschäftigen, um mögliche Artefakte auszuschließen [150]. Deswegen sollen neben dem Kalibrierungsfarbstoff Cy5 auch die unterschiedlich gefärbten dsDNA-Proben (kovalent oder interkalierend gefärbt; vgl. Abschnitt 3.1) in Abhängigkeit von der verwendeten Laserleistung, aber auch von der Salzstärke untersucht werden. Schließlich werden für die unterschiedlichen Proben die Ergebnisse der freien Diffusion diskutiert.

4.1.1.1 Cy5 als Kalibrierungsfarbstoff

Zu Beginn jedes Experimentiertages wurden jeweils Kalibrierungsmessungen mit Cy5 durchgeführt, die mittels der gemessenen Diffusionszeit und dem Literaturwert für die Diffusionskonstante [117] zur Berechnung des konfokalen Volumens dienen (siehe auch Abschnitt 3.1.3). Hierbei taucht natürlich die Frage auf, inwieweit z. B. die verwendete Laserleistung diesen Kalibrierungsprozeß beeinflusst. Leistungsabhängige Messungen mit dem Kalibrierungsfarbstoff Cy5 sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Aus den Autokorrelationskurven erkennt man, dass innerhalb des von uns zugänglichen Leistungsgebietes, sich die Kurven für Zeiten $>10 \mu\text{s}$ kaum unterscheiden und sich auf Grund des sehr schnellen Durchgangs des Farbstoffes durch das Anregungsvolumen selbst bei hohen Laserleistungen weder signifikante Bleich- [114, 115] noch Saturierungseffekte [150] einstellen. Dies verdeutlicht die Analyse der mittleren Driftzeit für unterschiedliche Anregungsintensitäten. Es ist zwar eine tendenzielle Zunahme der mittleren Diffusionszeit für Leistungen $<70\%$ und eine leichte Abnahme für größere Laserleistungen erkennbar, allerdings bleibt diese Variation innerhalb des Fehlerbereiches beschränkt. Dennoch könnte diese Tendenz damit erklärt werden, dass der Farbstoff mit zunehmender Laserleistung gesättigt und somit das scheinbare Anregungsvolumen vergrößert wird, da das Anregungsprofil des Farbstoffes immer mehr vom idealen gaußschen Profil abweicht [150]. Im Gegensatz dazu würde das Bleichen des Farbstoffes eine Abnahme der Diffusionszeit bewirken, da dieser nicht während des kompletten Durchgangs durch den Fokus

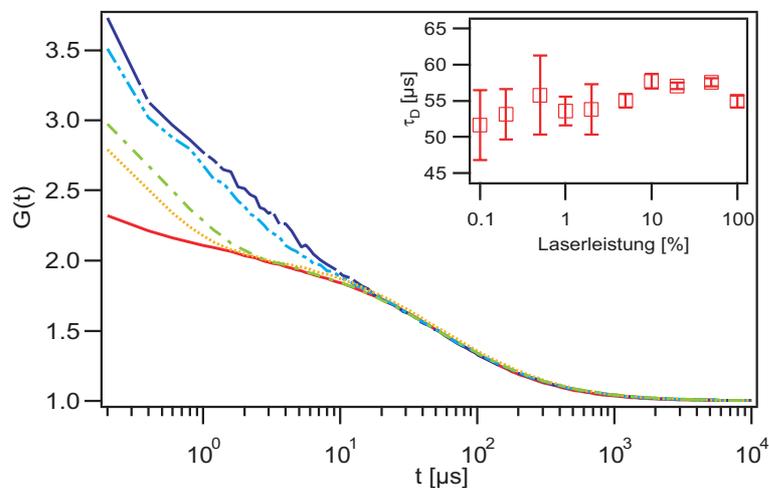


Abbildung 4.1: Leistungsabhängige Fluoreszenzautokorrelationsfunktionen von Cy5 in TE/60 mM NaCl: Die teilchenzahlnormierten Autokorrelationsfunktionen für unterschiedliche Laserleistungen (100 %: durchgezogene Linie; 10 %: gepunktete Linie; 5 %: gestrichelte Linie; 1%: doppeltgepunktete, gestrichelte Linie; 0,1 %: gebogene Linie) zeigen lediglich bei kurzen Zeiten unterschiedliches Verhalten, während sie im Bereich, der für die Bestimmung der Diffusion relevant ist, nahezu denselben Verlauf nehmen. Dies zeigen auch die ermittelten leistungsabhängigen Diffusionszeiten, die lediglich innerhalb der Fehlergrenzen variieren.

Fluoreszenzlicht emittiert [114]. Beide Effekte scheinen aber eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Bemerkenswerter, aber für die Analyse der freien Diffusion weniger entscheidend, sind die Prozesse, die zu den stark unterschiedlich ausgeprägten Autokorrelationskurven für kurze Zeiten ($<10 \mu\text{s}$) führen. Diese Unterschiede sind in Triplet- und Isomerisationsübergängen in strahlungslose Zustände begründet (siehe Abschnitt 2.3 und [117]), wobei der langsame Anteil mit zunehmender Laserleistung deutlich abnimmt und zu kürzeren Zeiten wandert. Dies steht im Einklang mit Messungen von *Widengren et. al.* [117], die hieraus eine Entvölkerung des dunklen Isomerisationszustandes für höhere Intensitäten ableiten, während sich die Charakteristik für den Übergang in den Tripletzustand kaum verändert. Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass in unserem Fall die Laserleistung keinen entscheidenden Einfluss auf die erzielten Messungen bezüglich der Fokuskalibrierung hat, da sich diese lediglich auf die Bestimmung der Diffusionszeit bezieht. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass sich mit zunehmender Laserleistung auch das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis verbessert, was zu weniger fehlerbehafteten Autokorrelationskurven führt, obwohl sich die Kurvencharakteristik dadurch nicht wesentlich ändert.

4.1.1.2 Kovalent gefärbte doppelsträngige DNA-Fragmente

Bezüglich der Analyse der Autokorrelation und der Extraktion der Eigendiffusion stellen vor allem die kovalent mit Cy5 markierten (kov.) dsDNA-Fragmente (für die Präparation siehe Abschnitt 3.1) eine Herausforderung dar, da sich hier die Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Cy5-Farbstoffe mit den diffusiven Eigenschaften der dsDNA-Fragmente überlagern. Auf diese Weise kommt der Analyse der leistungsabhängigen Daten eine besondere Bedeutung zu. Im Gegensatz zu reinen Cy5-Lösungen zeigt sich hier, dass der diffusive Anteil der Autokorrelationsfunktion deutlich von der Laserleistung abhängt. Dies ist in Abbildung 4.2 (a) für ein 394bp kov. dsDNA-Fragment dargestellt. Der charakteristische diffusive Abfall variiert hier um nahezu eine Größenordnung, so dass eine detaillierte Auswertung vonnöten ist.

Um den Leistungsbereich zu bestimmen, innerhalb dessen die Messungen vergleichbar und unabhängig von der Laserleistung sind, wurden die gemessenen Kurven an eine Modellfunktion angepasst, die neben der Eigendiffusion des kov. dsDNA-Fragments und der ungebundenen Cy5-Moleküle (Gleichung 2.80) in der Lösung auch die entsprechenden Triplet- (Gleichung 2.87) und Isomerisationsprozesse (Gleichung 2.92) berücksichtigt:

$$\begin{aligned}
 G(t) = & \left[1 + \frac{T_{eq}}{1 - T_{eq}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \right] \cdot \left[1 + \frac{I_2^{eq}}{1 - I_2^{eq}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_I}\right) \right] \cdot \dots \\
 & \dots \cdot \frac{1}{N} \cdot \left[\frac{f}{1 + \frac{t}{\tau_{D1}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{s^2 \tau_{D1}}}} \right] \cdot \left[\frac{1 - f}{1 + \frac{t}{\tau_{D2}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{s^2 \tau_{D2}}}} \right] + 1 \quad (4.1)
 \end{aligned}$$

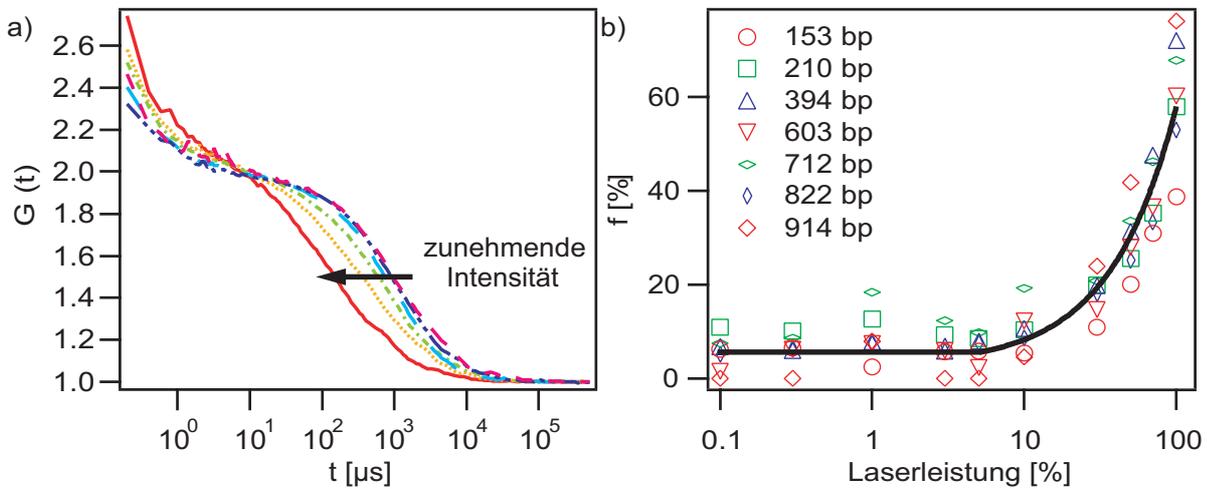


Abbildung 4.2: Intensitätsabhängige Auswertung der Autokorrelationsfunktion für kov. dsDNA-Fragmente: (a) Der diffusionsbestimmende Teil der teilchenzahlnormierten Autokorrelationsfunktion verschiebt sich signifikant mit zunehmender Laserleistung (0,1%; 10%; 30%; 50%; 70%; 100%) zu kleineren Zeiten. Der Unterschied zwischen den beiden Kurven mit geringster Laserleistung ist marginal. (b) Unter Verwendung eines Zweikomponentenfits für den diffusiven Anteil der Autokorrelationsfunktion und jeweils festgehaltenen Diffusionszeiten der schnellen (bestimmt in der Cy5-Kalibrierung) und der langsamen (ermittelt für niedrige Laserintensitäten) Fraktion kann der Anteil f an schnellen Fragmenten angepasst werden. f liegt bis zu Laserleistungen von 5% für nahezu alle dsDNA-Fragmente unterhalb von 10%. Oberhalb dieser Leistung ist ein linearer Anstieg zu beobachten (Linie in diesem Bereich).

Hier wurde vereinfachend angenommen, dass Cy5 sowohl im freien als auch im an die DNA gebundenen Zustand dieselbe Fluoreszenzcharakteristik aufweist. f bezeichnet den Anteil an schnellen Teilchen. Die diffusiven Prozesse werden durch die beiden Diffusionszeiten τ_{D_1} und τ_{D_2} charakterisiert. Hält man die Diffusionszeiten der beiden Spezies fest und lässt lediglich die Verteilung zwischen den beiden Fraktionen variieren, so erkennt man, dass f bis zu einer Laserleistung von ca. 5% konstant ist und unterhalb von 10% liegt (siehe Abbildung 4.2 (b)). Erst mit zunehmender Laserleistung nimmt f deutlich und fast linear zu. Allerdings wäre die Interpretation etwas irreführend, wenn man daraus schließen würde, dass die schnelle Fraktion tatsächlich zunimmt, da die eingestrahelte Energie nicht ausreicht, eine Photodissoziation zwischen den kovalent angehängten Cy5-Molekülen und den dsDNA-Fragmenten zu erzeugen. Sehr wahrscheinlich ist es, dass die gebundenen Cy5-Moleküle auf Grund der um wenigstens den Faktor 5 erhöhten Verweildauer im Fokus mit höherer Wahrscheinlichkeit bleichen, obwohl dieser Effekt im Leistungsspektrum für reine Cy5-Lösungen noch nicht zu beobachten ist (vgl. Abschnitt 4.1.1.1). Dies soll nun näher untersucht werden.

Eine qualitative Aussage hierzu zu treffen ist vergleichsweise schwierig, da bei den entsprechenden Proben bereits einige photophysikalische und diffusive Prozesse berück-

sichtigt werden müssen. An die experimentellen leistungsabhängigen Daten für die unterschiedlichen kov. dsDNA-Fragmente wurden Autokorrelationsfunktionen angepasst, die einen Triplettabfall, einen Bleichprozess (Gleichung 2.91) und zwei unterschiedlich schnell diffundierende Komponenten berücksichtigen (vgl. Gleichung 4.1 bezüglich der Diffusion). Hinsichtlich der Diffusionsprozesse wurden die Diffusionszeiten und die Verteilung auf die beiden Fraktionen durch die Kalibrierung mit einer reinen Cy5-Lösung (schnelle Diffusionszeit) und die Messung der jeweiligen kov. dsDNA-Fragmente bei niedriger Laserleistung (langsame Diffusionszeit und die Verteilung auf die beiden Fraktionen) bestimmt und im weiteren Fitprozess festgehalten. Die Analyse bezüglich des Anteils an gebleichten Teilchen B (Abbildung 4.3 (a)) und der mittleren Bleichzeit τ_{Bl} (Abbildung 4.3 (b)) ergeben folgendes Bild: Während B von 10% bis 50% Laserleistung abnimmt, ist eine Zunahme für höhere Laserleistungen sichtbar. τ_{Bl} folgt nahezu im gesamten Leistungsbereich einem Potenzgesetz, wobei der Exponent mit $-2,4$ bestimmt werden kann. Hierbei mag der Trend bezüglich B etwas verwirren. Berücksichtigt man aber, dass für niedrige Laserleistungen unterhalb von 30% τ_{Bl} größer als die Diffusionszeit der dsDNA-Fragmente in der Lösung ist und somit im relevanten Bereich der Modellierung der Bleichanteil lediglich einen beinahe konstanten Beitrag liefert, dann können in diesem Bereich die ermittelten Parameter bezüglich ihrer Aussagefähigkeit vernachlässigt werden. Insgesamt gilt aber festzuhalten, dass für Messungen mit einer geringeren Laserleistung als 5% Bleicheffekte eine untergeordnete Rolle spielen und deshalb unberücksichtigt bleiben können.

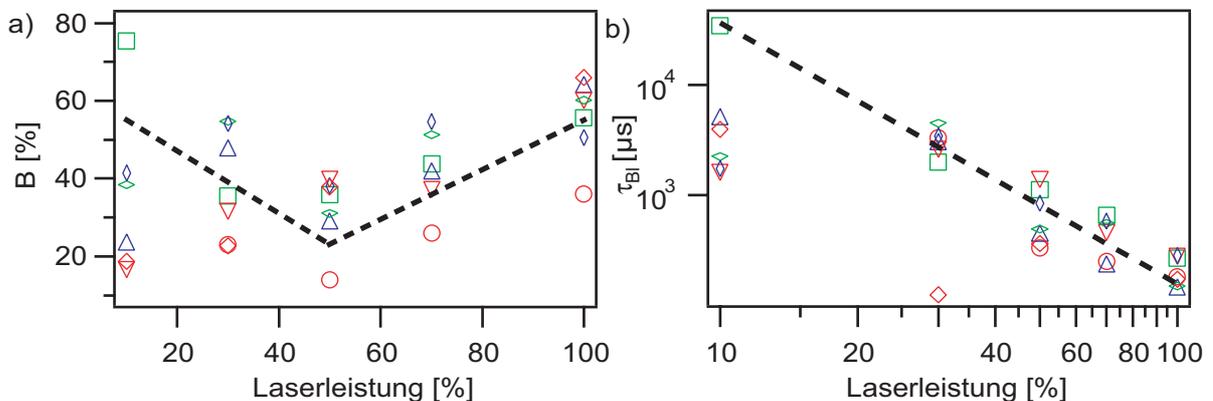


Abbildung 4.3: Charakterisierung des Bleichprozesses in Abhängigkeit von der Laserleistung: Während die Bleichzeit τ_{Bl} mit einem Potenzgesetz (Exponent $\approx -2,4$) mit zunehmender Laserleistung abnimmt (b), nimmt der Anteil der gebleichten Teilchen B zuerst tendenziell ab und schließlich für höhere Intensitäten wieder zu (a). Die Symbole entsprechen denen in Abbildung 4.2 (b). Die Trends sind jeweils durch die gestrichelten Linien illustriert.

4.1.1.3 Interkalierend gefärbte doppelsträngige DNA-Fragmente

Neben der kov. dsDNA wurde auch interkalierend markierte (int.) dsDNA verwendet. Hierbei lagert sich das Farbstoffmolekül zwischen zwei Basen der DNA-Doppelhelix ein, wobei die Quanteneffizienz für die Fluoreszenz um Größenordnungen höher für den interkalierten Zustand im Vergleich zum freien Zustand ist. Es ist daher ausreichend, lediglich eine Fraktion mit entsprechender Diffusionskonstante (int. dsDNA) zu berücksichtigen.

Analysiert man die Rohdaten für ein 394 bp dsDNA-Fragment, so wird deutlich, dass auch hier die Laserintensität einen entscheidenden Einfluss auf den Kurvenverlauf hat. Der diffusive Anteil verschiebt sich ebenfalls, wenn auch nicht so signifikant wie im Fall der kov. dsDNA, zu kleineren Zeiten für höhere Intensitäten (siehe Abbildung 4.4 (a)). Die leistungsabhängigen Daten wurden mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion angepasst, die neben einem Triplettabfall und der freien Diffusion eines Teilchens einen

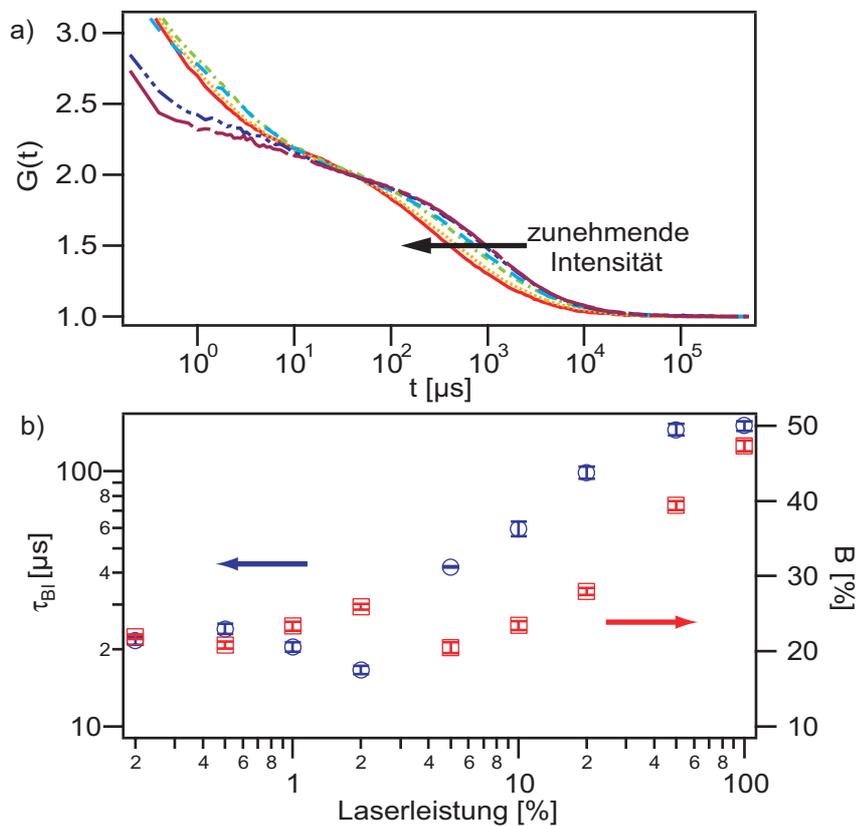


Abbildung 4.4: Intensitätsabhängige Auswertung der Fluoreszenzautokorrelationsfunktion interkalierend gefärbter 394 bp langer dsDNA: (a) Eine Verschiebung der teilchenzahlnormierten Autokorrelationsfunktion zu niedrigeren Zeiten ist mit zunehmender Laserleistung (0,1%; 1%; 10%; 20%; 50%; 100%) sichtbar. (b) Sowohl die Bleichzeit τ_{BI} (Kreise) als auch der gebleichte Anteil B (Quadrate) zeigen eine deutliche Zunahme für Laserleistungen oberhalb von 5%.

Bleichprozess berücksichtigt. Die entsprechende Diffusionszeit wurde bei niedrigen Laserleistungen bestimmt und für alle weiteren Fits festgehalten. Aus den Anpassungen erkennt man, dass τ_{Bl} für niedrige Laserleistungen ca. 20 μs beträgt und B bei ungefähr 25 % liegt (siehe Abbildung 4.4 (b)). Erst für höhere Intensitäten ist sowohl eine Zunahme von B als auch von τ_{Bl} zu beobachten; dies steht bezüglich τ_{Bl} im Gegensatz zu Messungen mit der Cy5-markierten dsDNA. Das weist darauf hin, dass es mit zunehmender Besetzung des gebleichten Zustandes scheinbar schwieriger wird, diesen weiter zu bevölkern. Auch hier zeigen die Messungen, dass es sinnvoll ist, zur Bestimmung der freien Diffusion lediglich Laserleistungen unterhalb von 5 % zu verwenden.

4.1.1.4 Freie Diffusion unterschiedlich langer doppelsträngiger DNA-Fragmente

Die bereits vorgestellten leistungsabhängigen Messungen haben gezeigt, dass bei der Analyse der Autokorrelationsdaten für dsDNA-Fragmente unter Umständen mehrere photophysikalische Prozesse berücksichtigt werden müssen und dass es dadurch vor allem für hohe Laserleistungen zu Verfälschungen bezüglich der freien Diffusion kommen kann. Auf der anderen Seite ist es aber auch notwendig durch die entsprechende Beleuchtung für ein ideales Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu sorgen. Dadurch ist insgesamt ein Kompromiss zwischen diesen beiden gegenläufigen Effekten zu finden. Aus diesem Grund wurden die längenabhängigen Messungen an dsDNA jeweils bei 5 % Laserleistung durchgeführt.

Abbildungen 4.5 (a) und 4.5 (b) zeigen die auf gleiche Teilchenzahl normierten Autokorrelationskurven für kov. dsDNA-Fragmente ((a)) und int. dsDNA-Fragmente ((b)) unterschiedlicher Länge. Aus den Rohdaten wird ersichtlich, dass die Diffusionszeit mit zunehmender Fragmentlänge ebenso zunimmt, wobei die entsprechenden Modellen, die einen Triplett- und einen Isomerisationsprozess sowie einen (int. dsDNA) oder zwei Diffusionsprozesse (kov. dsDNA) berücksichtigen, den gemessenen Kurven angepasst werden können.

Unter Verwendung der *Stokes-Einstein-Relation* (Gleichung 2.34) und der Kalibrierung der Fokusdimensionen mit Hilfe von Cy5-Messungen lässt sich die Diffusionskonstante für die Translationsdiffusion berechnen. Die entsprechenden Werte sind in Abbildung 4.6 gegen die Länge der dsDNA-Fragmente aufgetragen. Hieraus wird ersichtlich, dass die Diffusionskonstante mit zunehmender dsDNA-Länge monoton abnimmt. Allerdings liegen die Messpunkte für die kov. dsDNA systematisch unterhalb der für int. dsDNA. Insgesamt skalieren die Diffusionsdaten aber in der Art und Weise, wie es durch ein Modell für stabförmige Moleküle postuliert wird ($D \propto L^{-1} \ln L$; siehe auch Abschnitt 2.2.1.3 und [74]). Das ist insoweit überraschend, da die dsDNA-Fragmente bis zu 7 Persistenzlängen lang sind und man für diese Längen kein Verhalten gemäß eines Stabmodells erwarten würde. Dies deutet darauf hin, dass durch hydrodynamische Abschirmungseffekte nur Wechselwirkungen auf den Längen vermittelt werden, auf deren das Molekül noch als Stab aufgefasst werden kann.

Gleicht man das Modell an Messdaten an und variiert lediglich den Durchmesser b der

dsDNA und die Basenpaarlänge \bar{l} als Parameter, so erhält man bei int. dsDNA Werte von ca. 3,4 Å für \bar{l} und für b ungefähr 26,7 Å, was im Bereich der Literaturwerte liegt. Für kov. dsDNA wird \bar{l} mit 3,9 Å und b mit 34,8 Å bestimmt, was von den erwarteten Werten abweicht. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass durch die kovalente Färbung der effektive dsDNA-Durchmesser erhöht wird, wodurch die Abweichungen erklärt wären. Derartige längenabhängigen Messungen zeigen aber auch ganz deutlich das Potential von FCS auf, Unterschiede in der Diffusion von dsDNA detektieren zu können.

4.1.1.5 Freie Diffusion in Abhängigkeit von der Salzkonzentration in der Lösung

Die bereits beschriebenen Messungen haben gezeigt, dass systembedingte Artefakte die erzielten Ergebnisse bezüglich der diffusiven Eigenschaften unterschiedlicher DNA-Fragmente beeinflussen und verfälschen können. Bis jetzt beruhen diese Effekte lediglich auf intrinsischen, photophysikalischen Prozessen. Weiterhin soll noch betrachtet werden, ob und inwieweit externe Einflüsse wie zum Beispiel die Änderung der Pufferbedingungen, die physikalischen Parameter der DNA und die Diffusion beeinflussen können.

Um diese Einflussmöglichkeiten exemplarisch zu testen, wurden Messreihen in Reinstwasser mit unterschiedlichem Gehalt an einwertigen (NaCl) und zweiwertigen (CaCl₂) Salzen durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

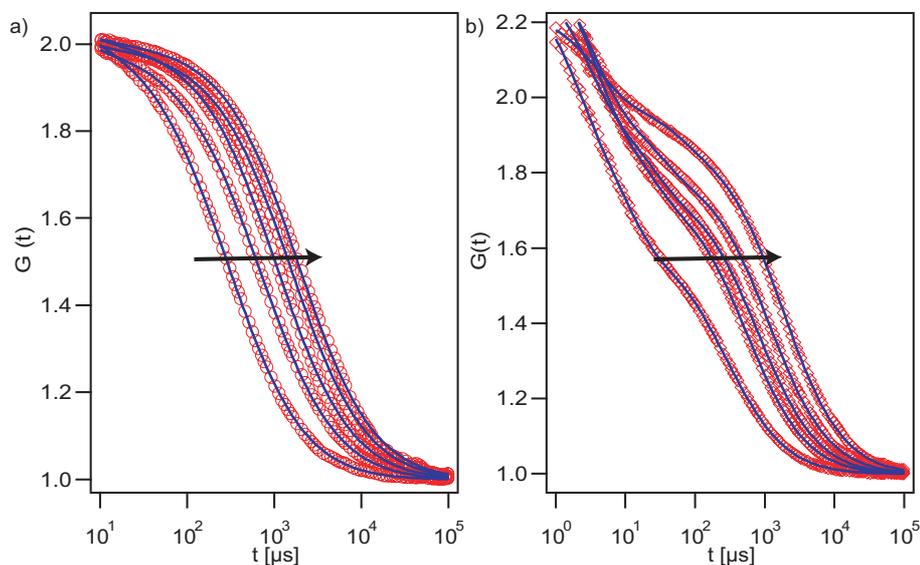


Abbildung 4.5: Autokorrelationsfunktionen von unterschiedlich gefärbter dsDNA in Abhängigkeit von der Länge: Sowohl die teilchennormierten Autokorrelationsfunktionen für kov. dsDNA ((a), Kreise) bzw. für int. dsDNA ((b), Quadrate) verschieben sich zu längeren Diffusionszeiten für längere dsDNA-Fragmente (entsprechend der Pfeilrichtung: 75 bp; 210 bp; 394 bp; 604 bp; 822 bp). Die durchgezogenen Linien entsprechen jeweils den besten Fits (zwei Diffusionskomponenten bei kov. dsDNA; eine Diffusionskomponente bei int. dsDNA).

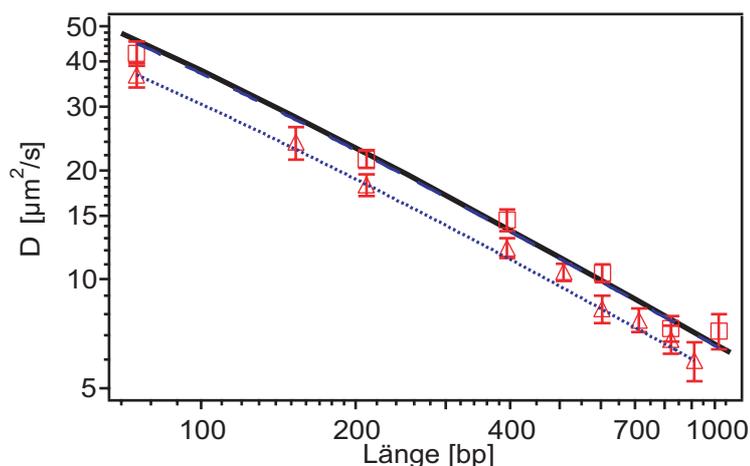


Abbildung 4.6: Darstellung der Diffusionskonstante von dsDNA unterschiedlicher Länge: Die ermittelten Diffusionskonstanten für kov. dsDNA (Dreiecke) und int. dsDNA (Quadrate) variieren mit der Länge der DNA und folgen einem Stabmodell (Linien, vgl. Gleichung 2.43, [74]); für kov. dsDNA (gepunktete Linie) werden im Vergleich zu den Literaturwerten ein deutlich größerer Durchmesser und eine geringfügig erhöhte Basenpaarlänge für die Anpassung ermittelt.

Während sich die Diffusionszeit bei einwertigen Salzen im ganzen gemessenen Konzentrationsbereich nicht ändert, kommt es im Fall von CaCl_2 bei Salzkonzentrationen oberhalb von 0,1 M zu deutlichen Aggregationseffekten, die auf Grund der entstandenen Polydispersität der Aggregate die FCS-Messungen erschweren. Deutlich größere Diffusionszeiten und dadurch kleinere Diffusionskonstanten sind die Folge.

In der Tat wurde von experimenteller Seite beobachtet, dass bei Zugabe von multivalenten Ionen eine Kondensation der DNA in kompakte Aggregate auftritt [151, 152, 153, 154]. Von theoretischer Seite her gibt es zwei Ansätze diese Kondensationseffekte zu erklären. Einerseits wird angenommen, dass dieser Effekt durch Fluktuationen der kondensierten Gegenionen auf der DNA entsteht [155, 156]. Andererseits wird postuliert, dass die Gegenionen zwischen den DNA-Molekülen die attraktive Wechselwirkung vermitteln [157, 158].

Die hier vorgestellten Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu der beobachteten und in der Literatur beschriebenen DNA-Kondensation zu stehen. Die Diffusionskonstante nimmt hier mit zunehmender Salzstärke ab. Dies deutet auf größere und nicht, wie erwartet, auf kleinere Aggregate hin (vgl. Gleichung 2.34). Berücksichtigt man allerdings, dass hier die Messungen an sehr kurzer DNA (394 bp) durchgeführt wurden, so kann dieser Effekt dadurch erklärt werden, dass es in diesem Fall nicht zu einer Kondensation eines einzelnen DNA-Moleküls zu einer kompakten Struktur kommt, sondern dass mehrere ds-DNA-Fragmente sich ohne Änderung der eigentlichen DNA-Konformation zusammenlagern. Diese supramolekularen Aggregate würden eine deutlich langsamere Diffusions-Charakteristik aufweisen, was mit den Experimenten im Einklang ist.

4.1.2 DNA-Fragmente in Alkanen

Wegen ihrer hohen Ladung lösen sich Polyelektrolyte wie DNA hervorragend in polaren Lösungsmitteln, zum Beispiel in Wasser, aber eine Überführung in unpolare Lösungsmittel wie Alkane ist nicht einfach zu bewerkstelligen. In Abschnitt 3.1.2 wurde bereits eine Methode beschrieben, die einen Transfer von DNA in die unpolare Phase mit Hilfe von kationischen und neutralen Lipiden erlaubt. Während die von *Hohner* durchgeführten Streuexperimente hauptsächlich die in der unpolaren Phase vorliegende Struktur (zylinderartige DNA-Lipid-Komplexe) aufklären konnten [149], ging es bei den FCS-Messungen vielmehr darum, die Monodispersität zu bestätigen und eine Aussage über die Transfereffizienz von der wässrigen Phase in die unpolare Phase zu treffen.

4.1.2.1 Verdünnungen in polaren und unpolaren Lösungsmitteln

Um die Transferrate zwischen den beiden Phasen zu bestimmen, wurden endständig mit Cy5 markierte 30mer ssDNA-Fragmente verwendet (siehe Abschnitt 3.1.1). Die in Abbildung 4.8 (a) dargestellten Autokorrelationen zeigen, dass es in beiden Lösungsmitteln möglich ist, die entsprechenden Kurven mit einem Einkomponentenfit anzupassen. Hieraus lässt sich schließen, dass die DNA jeweils monodispers vorliegt und nicht zu einer unkontrollierten Aggregation neigt. Es wird eine Verschiebung der Diffusionszeit zu höheren Werten in n-Dekan beobachtet. Die Diffusionskonstante der ssDNA ändert sich von $(83 \pm 5) \mu\text{m}^2/\text{s}$ in Wasser auf $(40 \pm 2) \mu\text{m}^2/\text{s}$ in n-Dekan. Die Begründung dafür liegt in einer zusätzlichen Lipidhülle, die mindestens eine Monolage mächtig ist und die die ssDNA-Fragmente umgibt. Des Weiteren belegen die unterschiedlichen Ampli-

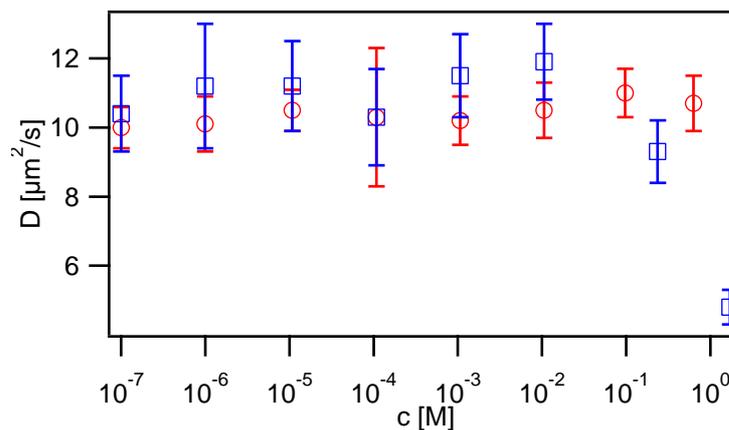


Abbildung 4.7: Abhängigkeit der freien Diffusion von der Salzkonzentration: Die freie Diffusion eines 394 bp kov. dsDNA-Fragmentes wurde in einwertigen (Kreise, NaCl) und zweiwertigen (Quadrate, CaCl₂) Salz-Lösungen in Abhängigkeit von der jeweiligen Salzkonzentration gemessen. Lediglich im Fall des zweiwertigen Salzes kommt es zu einer Abnahme der Diffusion für hohe Salzkonzentrationen ($> 0,1$ M).

tuden der Autokorrelationsfunktionen, dass die unpolare Phase deutlich mehr Teilchen enthält als in der Wasserphase vorhanden sind, obwohl beide Lösungen aus der gleichen Stammlösung mit dem selben Verdünnungsverhältnis präpariert wurden (vgl. Abschnitt 3.1.2).

Abbildung 4.8 (b) zeigt diesbezüglich konzentrationsabhängige Messungen der Teilchenzahl ausgehend von einer 1 μM Stammlösung, die beide Lösungsmittel (polares und unpolares) enthält. In beiden Lösungsmitteln ist für moderate Verdünnungen $c > 2 \cdot 10^{-7}$ M ein lineares Verdünnungsverhalten sichtbar, woraus eine Transfereffizienz von über 90 % berechnet werden kann. Während aber in der Wasserphase ein direkter Zusammenhang zwischen Teilchenzahl und eingesetzter DNA-Konzentration beobachtet wird, ist es nicht möglich ssDNA in n-Dekan unterhalb einer kritischen Konzentration zu detektieren. Fluoreszierende ssDNA in n-Dekan konnte nur bis zu einer Konzentration von 10^{-8} M festgestellt werden. Dies ist verständlich, wenn man berücksichtigt, dass Lipide generell unterhalb einer kritischen Konzentration keine Mizellen mehr ausbilden, deren Vorhandensein jedoch essentiell notwendig für die Überführung von DNA aus der polaren in die unpolare Phase ist (vgl. Abschnitt 2.1.2.1). In unserem Fall ist ein exponentieller Zusammenhang zwischen der gemessenen Teilchenzahl und dem Verdünnungsfaktor zu erkennen.

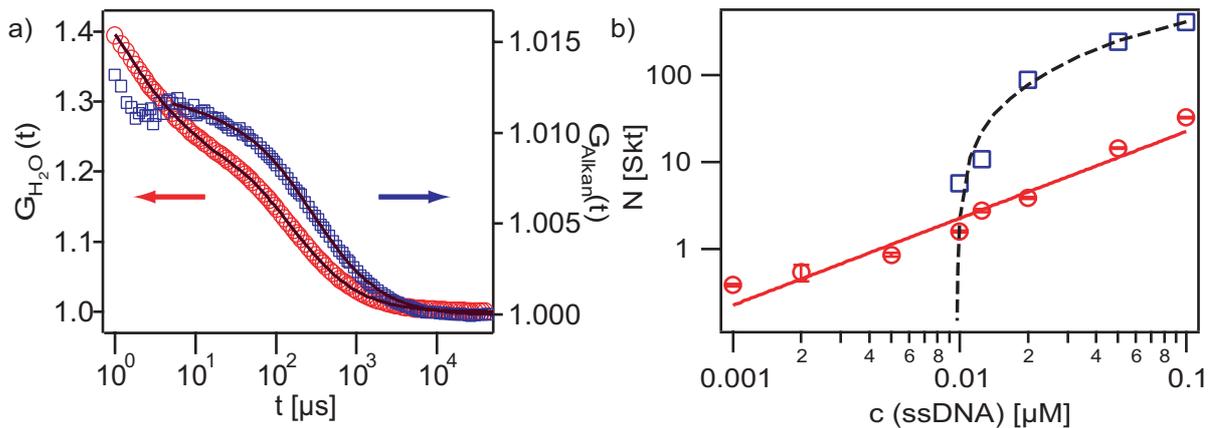


Abbildung 4.8: Freie Diffusion von ssDNA in polaren und unpolaren Lösungsmitteln: (a) Sowohl die Autokorrelationsfunktion in Wasser (Kreise) als auch in n-Dekan (Quadrate) kann mit einem Einkomponentenfit angepasst werden (schwarze Linien). Die Diffusionszeit ist in n-Dekan auf Grund der zusätzlich postulierten Lipidhülle zu größeren Zeiten verschoben. (b) Die Teilchenzahlen hängen sowohl in der wässrigen Phase (Kreise) als auch in der unpolaren Phase (Quadrate) von der Verdünnung ab, wobei diese in Wasser einem linearen Gesetz (durchgezogene Linie) und in n-Dekan einem Exponentialgesetz (gestrichelte Linie) folgt. Unterhalb einer DNA-Konzentration von 10^{-8} M kann in n-Dekan keine Fluoreszenzautokorrelation mehr detektiert werden.

Neben der Untersuchung des Verdünnungsverhaltens wurden auch unterschiedliche Methoden zum Transfer von DNA aus der wässrigen Lösung in n-Dekan angewandt. Im

Gegensatz zu der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Methode wurde in einem weiteren Fall das Detergenz zuerst in n-Dekan gelöst und dann zu der wässrigen DNA-Lösung gegeben. Die FCS-Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Transfereffizienz zwischen den unterschiedlich präparierten Methoden feststellen.

4.1.2.2 Monodispersität von doppelsträngigen DNA-Fragmenten

Neben der Analyse des Verdünnungsverhaltens lag auch besonderes Interesse darauf, das längenabhängige Diffusionsverhalten von dsDNA-Fragmenten in unpolaren Lösungsmitteln zu analysieren. Dazu wurden unterschiedlich lange int. dsDNA-Fragmente in n-Dekan überführt und die Fluoreszenz mit FCS gemessen. Die Rohdaten für die unterschiedlichen Fragmente sind in Abbildung 4.9 (a) dargestellt. Im Gegensatz zu den Messungen in Wasser (vgl. Abbildung 4.5) liegen die teilchenzahlnormierten Autokorrelationskurven nicht der Länge nach geordnet vor. Dies hängt damit zusammen, dass es in n-Dekan nicht möglich war, konvektive Effekte innerhalb der Messkammer mit ca. 1 ml Volumen während des Messprozesses zu unterdrücken. Aus diesem Grund fallen die Autokorrelationskurven teilweise deutlich stärker ab, als das ohne Konvektion der Fall wäre. Somit musste aber auch bei der Fitfunktion eine gerichtete Bewegung zusätzlich berücksichtigt werden, um die Daten anpassen zu können. Führt man die entsprechenden Korrekturen für die Drift und die unterschiedliche Viskosität in n-Dekan durch, so kann man Diffusionskoeffizienten ermitteln, die sehr gut dem in Abschnitt 2.2.1.3 vorgestellten Stabmodell entsprechen und den dsDNA-Fragmenten einen effektiven Durchmesser von ca. 8 nm zuweisen (siehe Abbildung 4.9 (b)), was dem von *Hohner et. al.* entwickelten

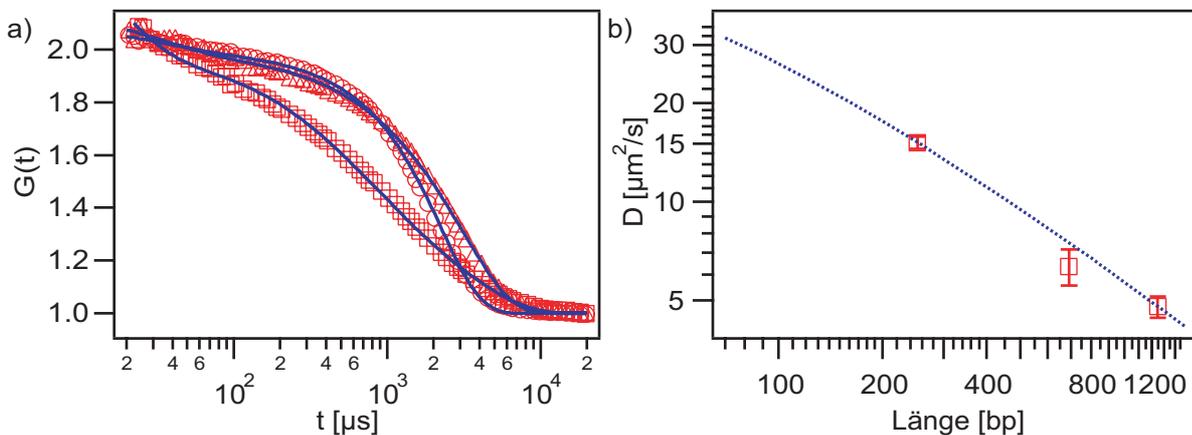


Abbildung 4.9: Freie Diffusion von dsDNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge in n-Dekan: (a) Die Autokorrelationsfunktionen für int. dsDNA-Fragmente (Quadrate: 252 bp; Dreiecke: 691 bp; Kreise: 1246 bp) können mit einem Modell, das gerichtete Drift beinhaltet, angepasst werden (Linien). (b) Die Diffusionskonstanten (Quadrate) der int. dsDNA-Fragmente folgen dem theoretischen Stabmodell unter Berücksichtigung eines Durchmessers von 8 nm (Linie).

Modell entspricht [149]. Hier wird davon ausgegangen, dass die DNA neben einer 1 nm mächtigen Wasserhülle auch von einer monolagigen Lipidschicht umgeben ist. Allerdings können wegen der doch sehr komplexen Modellfunktion keine weitergehenden Aussagen getroffen werden.

4.2 Perylen-bis-Oligonukleotide

Wie im Abschnitt 3.2 beschrieben sollen PON als Farbstoff-DNA-Hybride unter Ausnutzung der hochspezifischen, reversiblen Hybridisierungseigenschaften der DNA zum Aufbau supramolekularer Strukturen dienen, die sowohl in wässriger als auch in öliger Phase verwendet werden können. Außerdem galt es zu charakterisieren, inwieweit die an den unpolaren Perylenkern angehängten Oligonukleotide die Löslichkeit der nun amphiphilen Moleküle in konträren Lösungsmitteln ermöglichen.

Hierzu zeigen unsere Messungen, dass es durchweg möglich ist, PON bei geeigneter chemischer Präparation in Wasser monodispers zu lösen. Die in Abbildung 4.10 (a) dargestellten Rohdaten für ca. $1 \mu\text{M}$ Lösungen in Wasser können sehr gut mit einem Einkomponentenfit angepasst werden. Die mittlere Diffusionszeit τ_D wird mit $(41 \pm 5) \mu\text{s}$ ermittelt, die einer Diffusionskonstante von $(257 \pm 35) \mu\text{m}^2/\text{s}$ entspricht. Unter der Annahme, dass das PON als kugelförmiges Teilchen beschrieben werden kann, ist es möglich, den hydrodynamischen Radius mit $(0,85 \pm 0,12) \text{ nm}$ zu berechnen. Dies stimmt sehr gut mit der erwarteten Ausdehnung des Perylens überein. Insgesamt ist zu sagen, dass die Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs in wässriger Lösung sehr gering ist. Dies führt dazu, dass die Messungen im Vergleich zu den üblichen Farbstoffen (z.B. Cy5) höhere Konzentrationen erforderten. Darüber hinaus mindert beziehungsweise erschwert diese Tatsache die Aussagefähigkeit der Ergebnisse.

Im Gegensatz zu den Messungen in Reinstwasser, wo PON doch deutlich gequencht zu sein scheint, zeigt sich in der Alkanphase nach der Überführung mit Hilfe von kat-

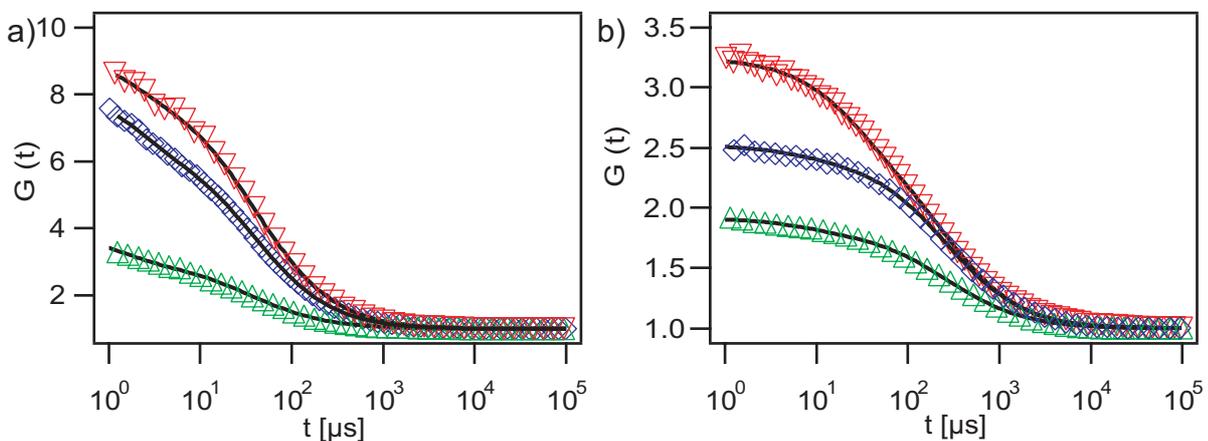


Abbildung 4.10: Fluoreszenzautokorrelationsfunktionen der PON in Reinstwasser und in n-Dekan: Sowohl die Autokorrelationsfunktionen von unterschiedlichen ca. $1 \mu\text{M}$ PON-Lösungen in Reinstwasser (a) und in n-Dekan (b) können mit einer Modellfunktion, die lediglich eine Diffusionskonstante berücksichtigt, angepasst werden. Die drei unterschiedlichen Probenchargen (Dreiecke, Quadrate, umgedrehte Dreiecke) wurden im Fall der Messungen in n-Dekan jeweils unmittelbar vor dem Experiment dem Gleichgewicht der beiden Lösungsmittel entzogen.

ionischen und neutralen Lipiden, dass die Proben deutlich bessere Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. Auch hier ist es möglich, die Autokorrelationsfunktion mit Hilfe eines entsprechenden Einkomponentenfits anzupassen (Abbildung 4.10 (b)). Im Vergleich zur wässrigen Lösung zeigt sich deutlich eine Verschiebung der Korrelationsfunktion zu längeren Diffusionszeiten und höheren Teilchenzahlen bzw. niedrigeren Amplituden. Unter Verwendung der unterschiedlichen Teilchenzahlen in polarer und unpolare Phase lässt sich eine Transfereffizienz von ca. 80 % berechnen, die geringfügig unterhalb des für ssDNA-Fragmente ermittelten Wertes liegt. Weiterhin ergibt sich eine mittlere Diffusionszeit von $(270 \pm 29) \mu\text{s}$. Die daraus berechnete mittlere Diffusionskonstante beträgt $(39,0 \pm 5,1) \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit den theoretischen Berechnungen (vgl. Gleichung 2.43), die für den PON-Lipid-Komplex einen Zylinder der Länge 18 nm mit einem Durchmesser von 6 nm annehmen und eine Diffusionskonstante von $41,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vorhersagen (Abbildung 4.11).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass PON sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösungsmitteln aufgenommen werden können und monodispers vorliegen. Die gemessenen diffusiven Eigenschaften stimmen mit den theoretischen Vorhersagen überein. Es zeigen sich aber deutliche Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.

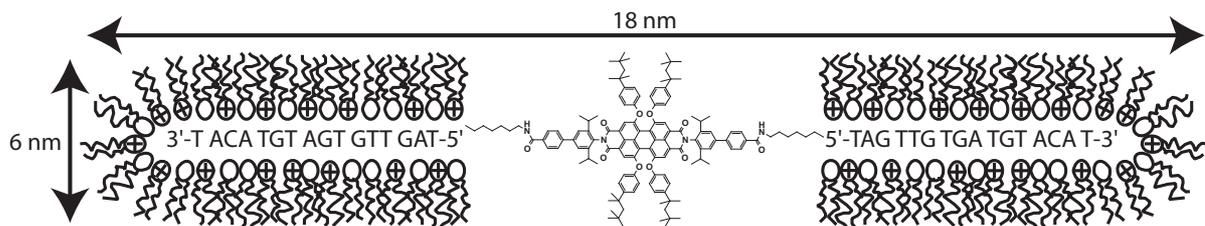


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung von PON in n-Dekan: Die Kopfgruppen der Lipide sind in Richtung der hydrophilen ssDNA-Fragmente ausgerichtet, während die unpolaren Schwanzgruppen in Kontakt mit dem n-Dekan stehen. Die Dimensionen wurden aus der molekularen Ausdehnung der PON und der Lipide abgeleitet.

5 Selbstassemblierung DNA-basierter Systeme

5.1 Nachweis unterschiedlicher supramolekularer Strukturen

In Abschnitt 3.2 wurde bereits die Synthese unterschiedlicher PON dargestellt und deren Löslichkeit in polaren und unpolaren Lösungsmitteln im vorhergehenden Kapitel betrachtet. Im Folgenden soll nun untersucht werden, inwieweit sich durch die molekularen Eigenschaften der PON sowohl die Kinetik der Assemblierung als auch die supramolekularen Strukturen an sich beeinflussen lassen. Zunächst soll aber der Nachweis dieser Komplexe dargestellt werden. In Abbildung 5.1 sind alle potentiellen Strukturen gezeigt, die die von uns verwendeten PON (vgl. Abbildung 3.6) bei entsprechender Mischung ausbilden können. Im Bezug auf die monomeren PON wurde hier neben der ODN-Sequenz auch die Anknüpfung der ODN an den Perylenkern variiert. Verwendet man zwei symmetrische PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'P\bar{A}$), bei denen jeweils zwei gleiche zueinander komplementäre ODN (ODN A und ODN \bar{A}) über das 5'-Ende an den Perylen-Kern angebunden sind, so sollten lineare polymerartige Kettenstrukturen entstehen. Allerdings ergibt sich aus der Symmetrie der zu Grunde liegenden Monomere, dass sich ABAB...-artige Strukturen ausbilden, deren Länge nur indirekt beeinflusst werden kann. Eine stöchiometrische Absättigung durch die zusätzliche Zugabe der ungebundenen ODN wäre auch möglich (abgesättigtes Dimer). Mischt man nun zwei symmetrische PON, die zwar bezüglich der ODN zueinander komplementär sind, die sich aber in der Verknüfungsposition der ODN an den Perylenkern unterscheiden (5' bei PON A'PA und 3' bei PON $\bar{A}'P\bar{A}$), dann bilden sich sandwichartige Dimere aus. Diese weisen nun keine weiteren Hybridisierungsstellen auf, mit denen eine definierte Erweiterung des Konstruktes möglich wäre. Obwohl unterschiedliche Strukturen ausgebildet werden können, ist es mit symmetrischen PON nicht möglich, eine gezielte Einstellung der Kettenlänge zu bewerkstelligen. Dazu wurden asymmetrische PON (PON A'PB und PON $\bar{A}'P\bar{B}$) synthetisiert, die ein wohldefiniertes Dimer ausbilden können. Bei geeigneter Wahl weiterer asymmetrischer PON wird eine gezielte Verlängerung ermöglicht.

Auf Grund dessen, dass die verwendeten ODN eine Selbstkomplementarität über 8 Basen aufweisen, sind neben den bereits beschriebenen Strukturen der PON auch potentiell andere möglich, die nur durch eine PON-Komponente aufgebaut werden. Exemplarisch ist das durch die Produkte der symmetrischen PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'P\bar{A}$) dar-

gestellt. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es möglich sein wird, diese postulierten Strukturen tatsächlich bei Raumtemperatur nachweisen zu können, da die Schmelztemperatur von acht Basenpaaren ungefähr in diesen Temperaturbereich fällt und deshalb die Strukturen nicht mehr vorhanden sind.

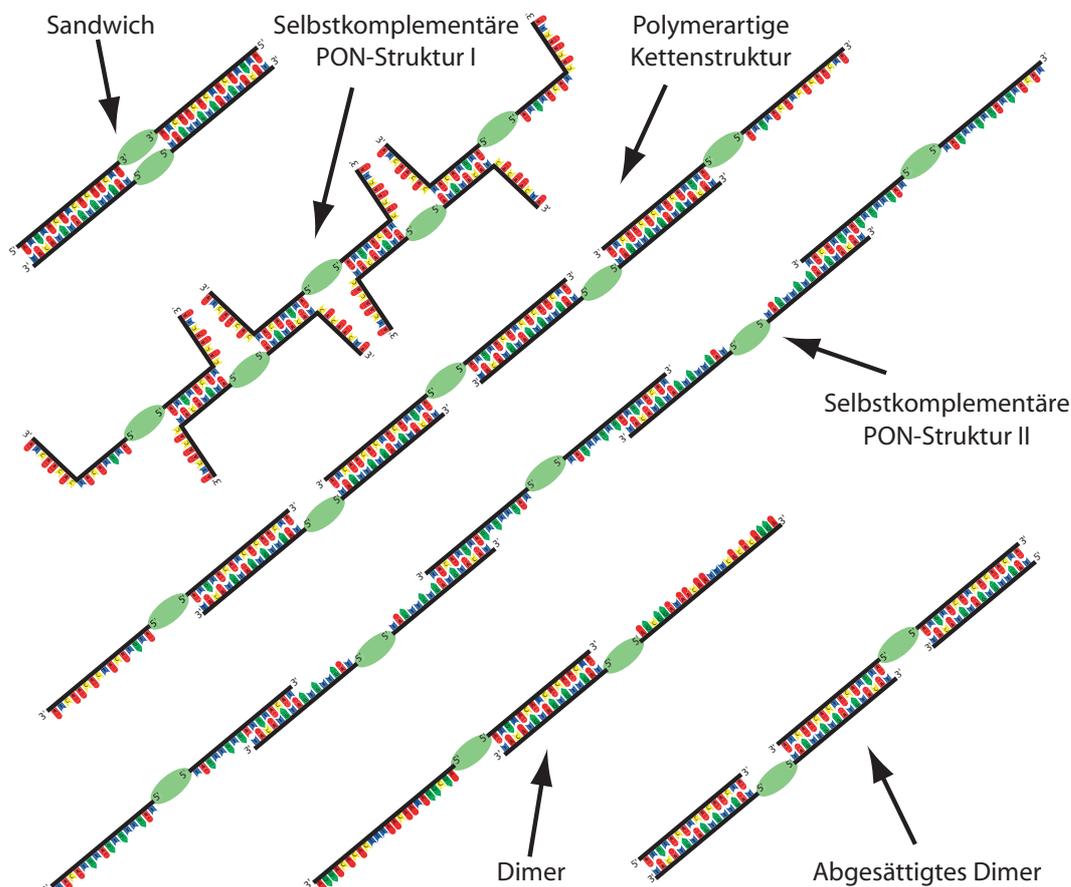


Abbildung 5.1: Potentielle supramolekulare Strukturen der unterschiedlichen PON: In Abhängigkeit von der Symmetrie des PON und der Anknüpfungsstelle der ODN an den Perylen-Kern können unterschiedliche Hybridisierungsprodukte entstehen. Zwei symmetrische PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) mit komplementären ODN und jeweils der selben Anknüpfungsseite des ODN an den Perylen-Kern bilden polymerartige Ketten undefinierter Länge aus. Eine stöchiometrische Absättigung durch Zugabe der entsprechenden ODN (ODN A und ODN \bar{A}) scheint auch möglich (abgesättigtes Dimer). Symmetrische komplementäre PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$), die sich lediglich in der Anknüpfung der ODN an den Perylen-Kern unterscheiden, hybridisieren zu sandwichartigen Strukturen. Asymmetrische PON (PON A'PB und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{B}$), die nur auf einer Seite zueinander komplementär sind, können verwendet werden, um lineare PON-Ketten definierter Länge zu bilden (hier Dimer). Da die eingesetzten ODN eine Selbstkomplementarität über 8 Basen aufweisen, können die entsprechenden symmetrischen PON jeweils alleine supramolekulare, lineare Strukturen ausbilden.

Symmetrische PON

Mit Hilfe der symmetrischen PON sollte hauptsächlich geklärt werden, ob zum einen die Hybridisierungseigenschaften der gebundenen ODN durch die Perylenkerne beeinflusst werden und ob sich zum anderen die postulierten supramolekularen Strukturen tatsächlich ausbilden. Die entsprechenden Hybridisierungsexperimente zwischen den PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) und den jeweiligen ODN (ODN A und ODN \bar{A}) sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Hierbei wird sichtbar, dass die Hybridisierung zwischen den PON und den entsprechenden komplementären ODN möglich ist. Im Vergleich zu Proben, die aus einem PON und jeweils demselben ODN bestehen (I, IV), weisen Mischungen aus PON und dem komplementären ODN (II, III, VI, VIII) zwei zusätzliche Banden mit höherem Molekulargewicht auf, wobei die ODN-Bande (II, III) und die PON-Bande (II) verschwinden. Die zusätzlichen Banden entsprechen mono- und dihybridisierten PON. Dabei ist es möglich, das Verhältnis zwischen den beiden Hybridisierungsprodukten durch Änderung der entsprechenden Konzentrationsverhältnisse zwischen den PON und den ODN (1:1 in Linien III und VIII auf 1:2 in Linien II und VI) gezielt zu variieren. Es zeigt sich aber auch, dass bei Raumtemperatur die Hybridisierungsenergie der potentiellen Strukturen der selbstkomplementären PON nicht ausreicht, so dass diese Strukturen nicht stabil sind und nachgewiesen werden könnten (Linien I und IV).

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Auftreten von zwei zusätzlichen Banden im Fall der Mischungen aus PON und komplementären ODN tritt bei den Proben, die

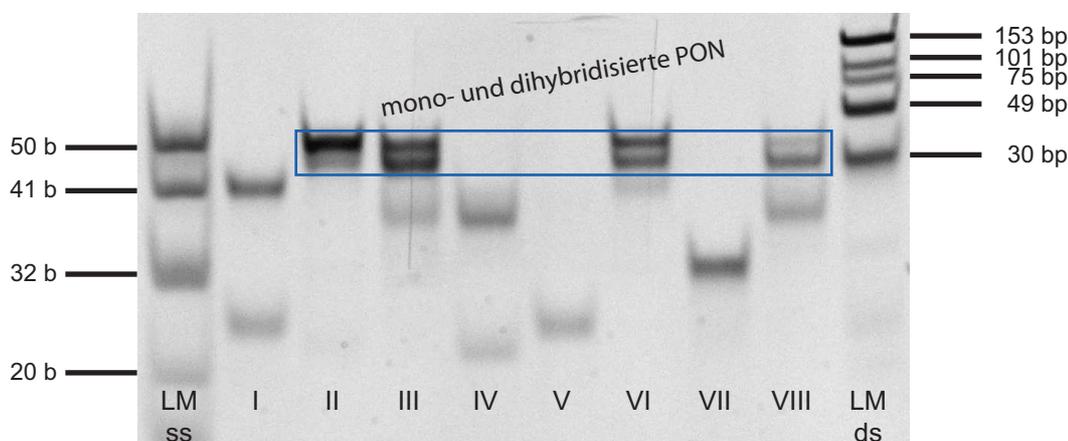


Abbildung 5.2: Hybridisierungsprodukte zwischen symmetrischen PON und entsprechenden ODN: Mono- und dihybridisierte PON können nachgewiesen werden. Linien wie folgt: I, PON A'PA/ODN A; II, PON A'PA/ODN \bar{A} (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); III, PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ /ODN A (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); IV, PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ /ODN \bar{A} ; V, ODN A; VI, PON A'PA/ODN \bar{A} (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); VII, ODN A/ODN \bar{A} (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); VIII, PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ /ODN A (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1).

aus PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ bestehen, eine leiterartige Bandstruktur bei höheren Molekulargewichten auf (vgl. Abbildung 5.3). Diese Banden können kettenartigen Polymerstrukturen unterschiedlicher Länge zugeordnet werden (III-VII). Mit Hilfe des Gels kann die Entstehung von PON-Dimeren, -Trimeren, -Tetrameren und -Pentameren nachgewiesen werden. Die Bande, die bei ca. 800 bp läuft, könnte einer ringförmigen Struktur entsprechen, wobei keine Aussage über die Anzahl der Monomere im Konstrukt aus der Laufweite im Gel abgelesen werden kann. Die Kettenbildung tritt bei Proben aus PON und dem komplementären ODN nicht auf. Des Weiteren weist eine Mischung aus beiden PON und beiden ODN Banden auf, die ODN A/ODN \bar{A} -Hybriden, PON, PON/ODN-Hybriden und PON-Ketten unterschiedlicher Länge entsprechen (VIII). Dies deutet darauf hin, dass der Perylenkern die Hybridisierung der angebondenen ODN nicht behindert. Weiterführende Experimente zeigen, dass die Kettenbildung durch die Variation der Salzstärke nicht beeinflusst werden kann.

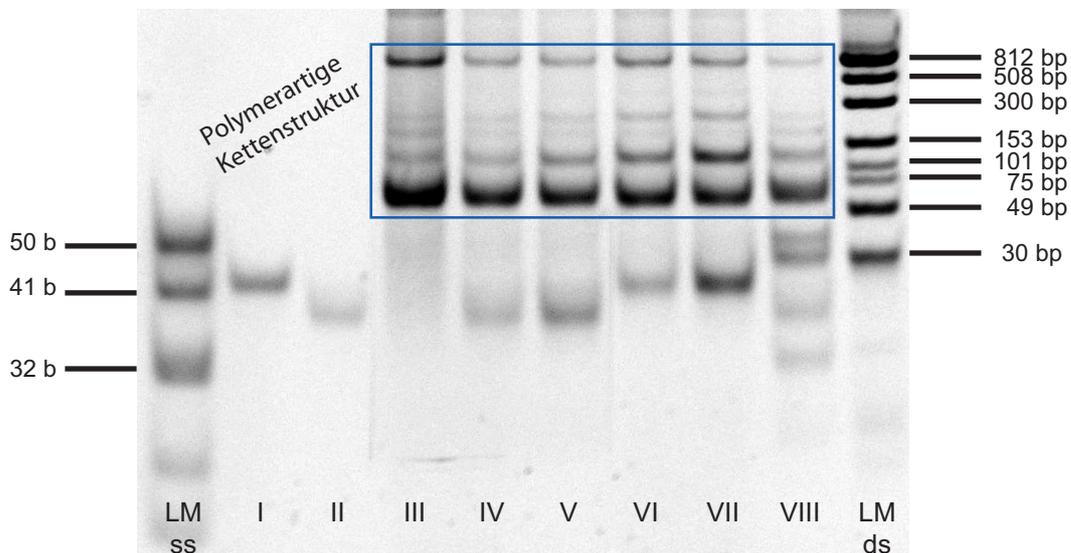


Abbildung 5.3: Nachweis kettenartiger Strukturen für symmetrische PON: Linien wie folgt: I, PON A'PA; II, PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$; III, PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); IV, PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); V, PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ (stöchiometrisches Verhältnis = 1:3); VI, PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ (stöchiometrisches Verhältnis = 2:1); VII, PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ (stöchiometrisches Verhältnis = 3:1); VIII, PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ /ODN A/ODN \bar{A} (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1:1:1).

Diese leiterartige Struktur soll in Abbildung 5.4 nochmals verdeutlicht werden: Dort ist das Fluoreszenzintensitätsprofil für zwei unterschiedliche Mischungsverhältnisse dargestellt. Die verschiedenen Maxima entsprechen PON-Ketten unterschiedlicher Länge. Nimmt man das aufintegrierte Intensitätssignal unter den einzelnen Maxima als ein Maß für die Konzentration, so kann man eine Abschätzung für die Konzentrationsverteilung

zwischen den unterschiedlich langen Ketten treffen. Diese Konzentrationsverteilung folgt einem aus den Betrachtungen in Abschnitt 2.1.2 ableitbaren Exponentialgesetz, wie man es im Fall einfacher Polymerisationsprozesse erwartet (Inset in Abbildung 5.4). Die Intensitätsprofile zeigen aber auch, dass durch die Verschiebung des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen den beiden PON (z.B. von 1:1 auf 1:3) die Genese von Polymeren bestimmter Länge bevorzugt wird. So ist in Abbildung 5.4 zum einen ein niedermolekularer Peak, der den monomeren überschüssigen PON entspricht, und zum anderen eine Zunahme der Konzentration der Polymere mit ungeradzahligem Monomeren zu erkennen. Diese neue entstandene Konzentrationsverteilung folgt keinem Exponentialgesetz mehr.

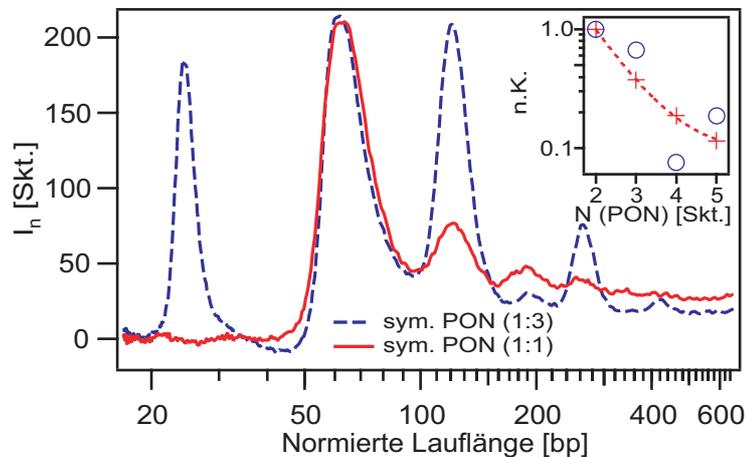


Abbildung 5.4: Nachweis der Beeinflussbarkeit der Genese von kettenartigen Strukturen für symmetrische PON: Die normierte Intensität I_n für zwei Gelbanden mit einem unterschiedlichen Verhältnis der Monomere PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ ist gegen die Lauflänge aufgetragen. Es können unterschiedliche Polymerlängen nachgewiesen werden, deren Konzentrationen mit der Anzahl der beinhalteten Monomere variiert. **Inset:** Die normierte Konzentration (n.K.) ist gegen die Anzahl der Monomere (N) des entsprechenden Polymers aufgetragen (Kreuze: stöchiometrisches Verhältnis = 1:1; Kreise: stöchiometrisches Verhältnis = 1:3). Im Fall der äquimolaren Mischung kann ein exponentieller Abfall mit zunehmender Polymerlänge beobachtet werden.

Die oben vorgestellten Hybridisierungsexperimente legten dar, dass unter Verwendung symmetrischer PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) kettenartige Polymere unterschiedlicher Länge entstehen, da nach jedem Hybridisierungsschritt erneut aktive Stellen für eine weitere Anlagerung eines PON vorhanden sind. Diese Assemblierungseigenschaft kann aber entscheidend beeinflusst werden, indem man bei einem PON die Anknüpfungsstelle der ODN von 5' auf 3' ändert (PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A} \rightarrow$ PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$). Dadurch ist die für die Hybridisierung notwendige gegenläufige DNA-Orientierung bereits bei einer direkten und nicht wie im Fall der Ketten bei einer verschobenen Übereinanderlagerung gegeben (vgl. Abbildung 5.1). Dies wird in Abbildung 5.5 sichtbar. Im Vergleich zu den Linien Ia und

IIa der Monomere zeigen diejenigen der Gemische aus beiden komplementären PON eine einzige zusätzliche Bande (IIIa - Va), die der sandwichartigen Struktur entsprechen. Ohne weiteren Anknüpfungspunkt des Sandwichs sind auch keine zusätzlichen Banden zu erwarten. Eine überschüssige Zugabe eines der beiden PON bewirkt lediglich das Auftreten einer zusätzlichen Monomerbande. Die unterschiedlichen supramolekularen Strukturen, die durch die hierfür synthetisierten, symmetrischen PON erzeugt werden können, sind in Abbildung 5.5 (b) nochmals verdeutlicht. Grundsätzlich zeigen die Ergebnisse, dass auch im Fall der sandwichartigen Strukturen die PON-Kerne die Hybridisierung nicht hindern.

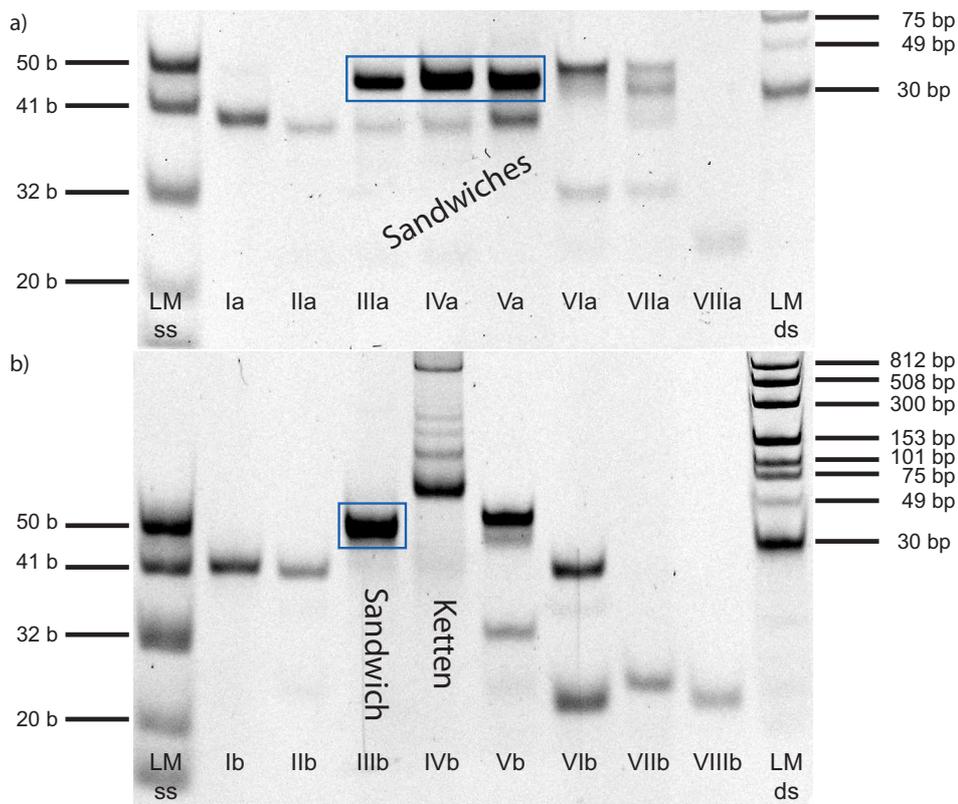


Abbildung 5.5: Nachweis von sandwichartigen Dimeren: (a) Die bezüglich der ODN gegenläufigen PON (PON A'PA und PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$) hybridisieren zu sandwichartigen Strukturen. Linien wie folgt: Ia, PON A'PA; IIa, PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$; IIIa, PON A'PA/PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$ (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); IVa, PON A'PA/PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$ (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); Va, PON A'PA/PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$ (stöchiometrisches Verhältnis = 2:1); VIa, PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$ /ODN A (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); VIIa, PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$ /ODN A (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); VIIIa, ODN A. (b) Durch die Verwendung entsprechender symmetrischer Monomere kann die supramolekulare Struktur beeinflusst werden. Linien wie folgt: Ib, PON A'PA; IIb, PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$; IIIb, PON A'PA/PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$; IVb, PON A'PA/PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$; Vb, PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$ /ODN A (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); VIb, PON $\bar{A}\bar{P}\bar{A}'$ /ODN \bar{A} ; VIIb, ODN A; VIIIb, ODN \bar{A} .

Asymmetrische PON

Obwohl wir zeigen konnten, dass mit symmetrischen PON sandwichartige Dimere erzeugt werden können, ist es mit diesen Monomeren nicht möglich, einen gezielten Aufbau von Polymeren definierter Länge zu erreichen. Anders sieht dies aus, wenn asymmetrische PON verwendet werden. Hierbei besitzen die PON zwei sich unterscheidende ODN-Sequenzen, an der ein PON mit einem entsprechenden komplementären ODN angelagert werden kann. Mit diesem Prinzip können nun definierte N-mere hergestellt werden. Für den experimentellen Nachweis von Dimeren wurden zwei asymmetrische PON (PON A'PB und PON \bar{A} 'PB) verwendet. Wie aus Abbildung 5.6 ersichtlich wird, bildet sich in Proben, die beide PON enthalten, neben der Bande der Monomere eine zweite aus, die dem Dimer entspricht (III - V). Auch hier bewirkt die Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse zwischen den beiden asymmetrischen PON lediglich eine Verstärkung der Monomerbande. Im Gegensatz zu den Hybridisierungsexperimenten der symmetrischen PON mit den entsprechenden komplementären ODN entstehen im Fall der asymmetrischen PON nur die zusätzlichen Banden des monohybridisierten PON, da das ODN nur zu einem PON-ODN komplementär ist und dort hybridisieren kann (VI). Gibt man beide komplementären ODN zu, so verschiebt sich die Bande zu höheren Molekulargewichten, was auf dihybridisierte PON hindeutet (VII).

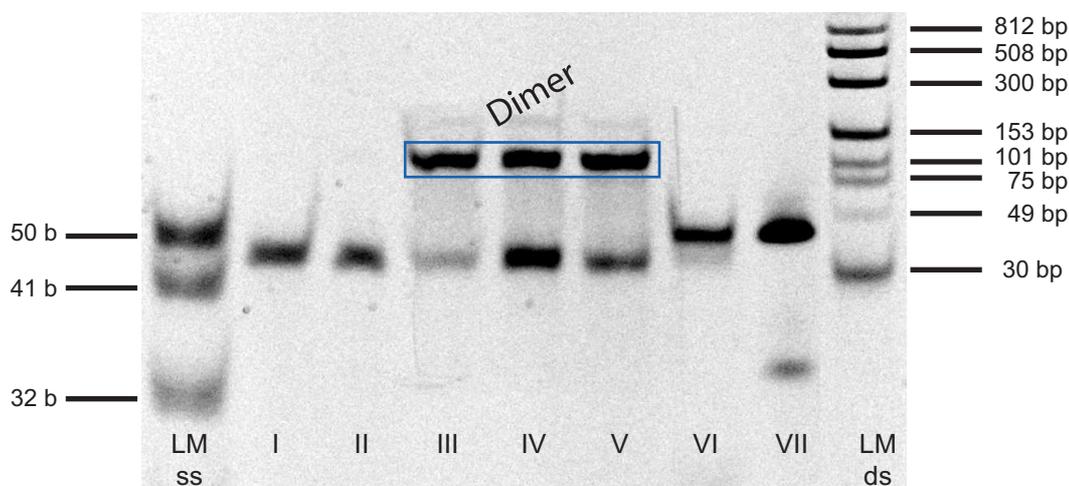


Abbildung 5.6: Nachweis von kettenartigen Dimeren: Zwei asymmetrische PON hybridisieren zu kettenartigen Dimeren, die weitere Anknüpfungsstellen besitzen. Linien wie folgt: I, PON A'PB; II, PON \bar{A} 'PB; III, PON A'PB/PON \bar{A} 'PB (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); IV, PON A'PB/PON \bar{A} 'PB (stöchiometrisches Verhältnis = 2:1); V, PON A'PB/PON \bar{A} 'PB (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); VI, PON A'PB/ODN \bar{A} (stöchiometrisches Verhältnis = 1:2); VII, PON A'PB/ODN \bar{A} /ODN B (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1:1).

5.2 Hybridisierungsnachweis mittels FCS

Im vorhergehenden Abschnitt wurde der Nachweis der unterschiedlichen supramolekularen Strukturen mit Hilfe von Gelelektrophorese durchgeführt. Die Methode eignet sich exzellent zur Analyse DNA-basierter supramolekularer Assemblierungen. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde darüberhinaus ausgelotet, inwieweit es möglich ist, DNA-vermittelte Aggregation unter Verwendung von FCS zu charakterisieren, wobei nur ein bestimmter Farbstoff angeregt und detektiert wird (sog. Ein-Farben-FCS). Prinzipiell beruht hierbei der Nachweis der Strukturen darauf, dass sich in Folge der Aggregation die Größe oder die Geometrie des entsprechenden Konstruktes ändert, was einen direkten Einfluss auf die diffusiven Eigenschaften hat. Deshalb besitzen unterschiedliche Konstrukte im Idealfall verschiedene Diffusionskonstanten bzw. Diffusionszeiten, die sich auf den Verlauf der Autokorrelationskurven unmittelbar auswirken. Diese Methode hat den Vorteil, dass neben der Verwendung von niedrigen Konzentrationen und kleinen Volumina auch auf Grund der guten Zeitauflösung Einblicke in die Assemblierungskinetik und in den Einfluss des Perylenkerns auf Hybridisierung gewonnen werden können.

Um das Potential von Ein-Farben-FCS zu ermitteln, wurden Hybridisierungsexperimente mit ssDNA durchgeführt. Hierbei wurden im Hybridisierungspuffer zum einen zwei 30 Basen lange komplementäre ssDNA-Fragmente verwendet, zum anderen wurde die Hybridisierung zwischen einem kurzen 18-Basen-langen, farbstoffmarkierten ssDNA-Fragment und einem weiteren deutlich längeren ssDNA-Plasmid (7250 Basen) nachgewiesen (vgl. Tabelle 3.2). Die Präparation erfolgte analog zu den Hybridisierungsexperimenten der PON (vgl. Abschnitt 3.2).

Die entsprechenden Messungen sind in Abbildung 5.7 (a) für die kurzen Fragmente und in Abbildung 5.7 (b) für die unterschiedlich langen Fragmente dargestellt, wobei hier jeweils die kinetischen Anfangs- und Endzustände für äquimolare Mischungen betrachtet wurden. In beiden Fällen ist ein Unterschied in den Autokorrelationsfunktionen im Bereich, der für die Diffusion relevant ist, zu sehen. Allerdings ist dies im Fall der unterschiedlich langen Hybridisierungsedukte deutlich stärker ausgeprägt. Analysiert man die Kurven quantitativ, dann stellt man für den Fall der beiden kurzen ODN fest, dass die Diffusionszeit sich vom unhybridisierten zum hybridisierten Zustand um ca. 40% erhöht ($106 \mu\text{s} \rightarrow 160 \mu\text{s}$). Also scheint es auf jeden Fall möglich, Anfangs- und Endzustand zu charakterisieren. Will man darüber hinaus einen Einblick in die zeitliche Entwicklung des Systems erhalten, so ist dies deutlich schwieriger, da sich die beiden relevanten Zustände bezüglich der Diffusion zu geringfügig unterscheiden. Es erschwert, aussagefähige Anpassungen mit einem Modell für zwei diffundierende Komponenten zu erhalten. Insgesamt ist dieses Verhalten zu erwarten, wenn man berücksichtigt, dass sich durch die Hybridisierung das relevante Molekülvolumen im Idealfall lediglich verdoppelt. Dadurch sollte die Diffusionszeit, die in erster Näherung mit dem Radius des Teilchens variiert, um den Faktor $\sqrt[3]{2} \approx 1,26$ zunehmen. Der beobachtete stärkere Effekt kann mit der Stäbchennatur der Konstrukte erklärt werden, wobei dies die prinzipielle Aussage nicht ändert.

Anders verhält es sich bei den ungleich langen ssDNA-Fragmenten (Abbildung 5.7 (b)). Während auch hier die Diffusionszeit der unhybridisierten 18mer ssDNA bei $(120 \pm 2) \mu\text{s}$ liegt, kann für das hybridisierte Konstrukt eine mittlere Diffusionszeit von $(1664 \pm 102) \mu\text{s}$ ermittelt werden. Folglich sind die beiden Zustände des Systems bezüglich der Diffusion über eine Größenordnung hinweg klar voneinander getrennt. Das erlaubt einen Zweikomponentenfit zur Anpassung, aus dem schließlich Aussagen über das Verhältnis der beiden Fraktionen (hybridisiert/unhybridisiert) gewonnen werden können, was *Kinjo und Rigler* gezeigt haben [106].

Bezüglich der unterschiedlichen PON-Konstrukte, die mit Gelelektrophorese nachgewiesen wurden, stellt sich ebenso die Frage nach einem sinnvollen Hybridisierungsnach-

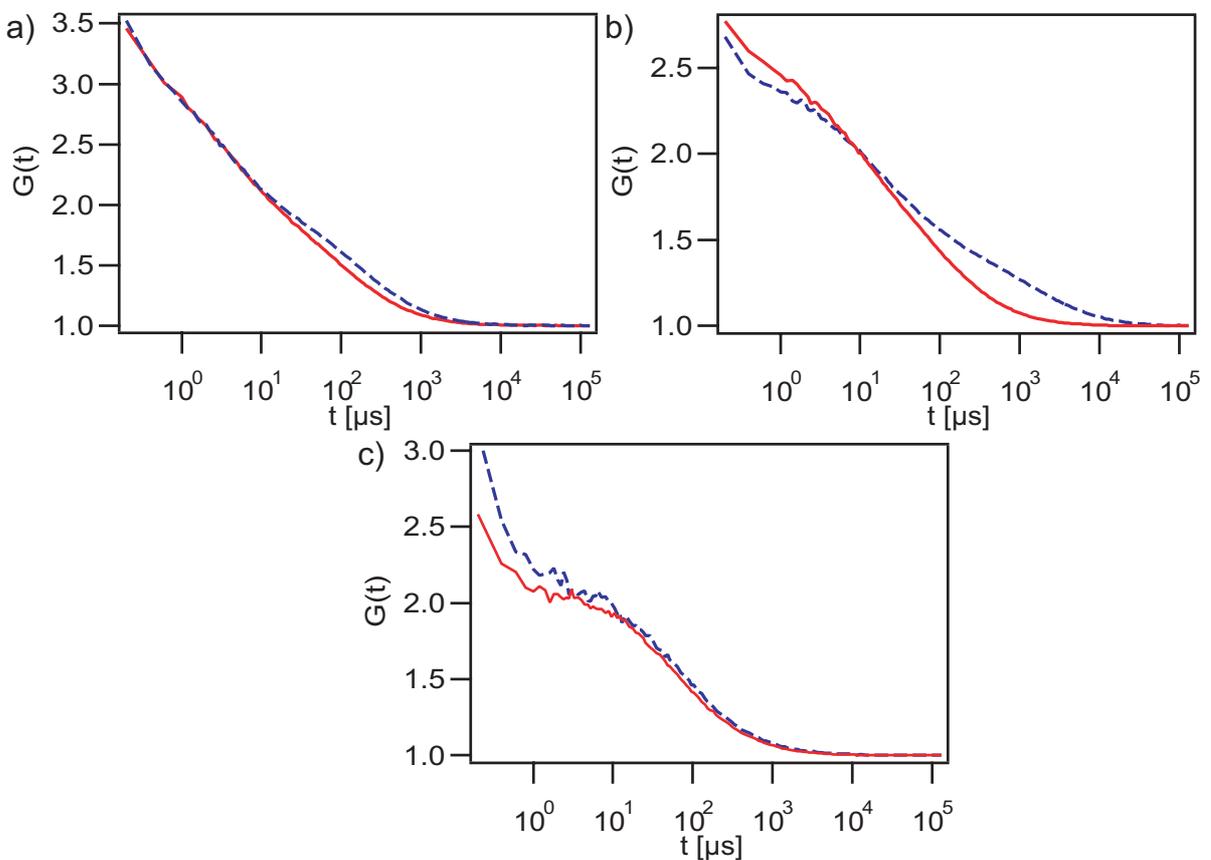


Abbildung 5.7: Nachweis der DNA-Assemblierung mittels Ein-Farben-FCS: Der Unterschied in den teilchenzahlnormierten Autokorrelationsfunktionen zwischen dem unhybridisierten (gestrichelte Linien) und dem hybridisierten (durchgezogene Linien) Zustand ist für zwei 30 Basen lange komplementäre ss-DNA-Fragmente (a), zwei unterschiedlich lange (18 Basen und 7250 Basen) komplementäre ssDNA-Fragmente (b) und für das PON A'PA/PON A'PÄ-System (c) dargestellt. Die Messungen zeigen, dass eine signifikante Änderung der Autokorrelation nur dann auftritt, wenn durch die Hybridisierung die diffusiven Eigenschaften der detektierten Teilchen erheblich modifiziert werden, was nur in (b) der Fall ist.

weis mittels Ein-Farben-FCS. Auch hier ergibt sich wiederum das Problem, dass die beiden Hybridisierungserdukte gleiche Struktur und gleiche Ausdehnung besitzen. Dies entspricht prinzipiell den Messungen mit den 30 Basen ssDNA-Fragmenten. Es zeigt sich, dass sich durch die Hybridisierung die diffusiven Eigenschaften nicht in dem Maß ändern, wie es für einen Nachweis der entsprechenden Strukturen nötig wäre (Abbildung 5.7 (c)). Die Autokorrelationskurven für die hybridisierten und unhybridisierten Zustände der PON A'PA und PON A'PÄ-Konstrukte liegen nur geringfügig auseinander, so dass eine gezielte Analyse bezüglich der längeren Polymere nicht möglich ist (vgl. Abbildung 5.3).

Eine FCS-Kreuzkorrelations-Methode, um Assoziationsprozesse zu studieren, die sich nur unmerklich auf die diffusiven Eigenschaften der Produkte auswirken, wurde von *Schwille et. al.* entwickelt (Zwei-Farben-Kreuzkorrelation) [129]. Dabei wird die Probe mit 2 Lasern unterschiedlicher Wellenlänge am selben Ort beleuchtet, die Fluoreszenz ebenso in Abhängigkeit der Farbe in unterschiedlichen Kanälen detektiert und die Kreuzkorrelation zwischen den beiden Fluoreszenzsignalen gebildet (vgl. Abschnitt 2.3.5). Bezüglich des Nachweises der Strukturen muss hier lediglich gelten, dass sich die unterschiedlich farblich markierten Edukte unabhängig voneinander bewegen, während sich diese im Laufe des Reaktionsprozesses zusammenlagern und schließlich gleichförmig bewegen müssen. Werden nun beispielsweise zwei komplementäre ssDNA-Fragmente mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, kann das Hybridisierungsprodukt im Kreuzkorrelationssignal der beiden Kanäle identifiziert werden. Diese Methode kann allerdings im Bezug auf die Perylen-DNA-Hybride nicht angewandt werden, da es von synthetischer Seite aus nicht möglich war, ähnliche Systeme mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionscharakteristika herzustellen.

5.3 Schmelzverhalten in Abhängigkeit von der supramolekularen Struktur

Aus den Gelelektrophorese-Experimenten wurde deutlich, dass sich in Abhängigkeit der zu Grunde liegenden Monomere unterschiedliche supramolekulare Strukturen ausbilden können. Um weitergehende Aussagen über die Kinetik des Assoziationsprozesses und den Einfluss des Perylenkerns zu treffen, wurden temperaturabhängige DNA-Absorptionsmessungen durchgeführt, analysiert und mit der Theorie der DNA-Dissoziation verglichen. Auch sollte der Nachweis für die postulierten supramolekularen, selbstkomplementären Ketten der symmetrischen PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) geführt werden, die bei Raumtemperatur nicht stabil sind. Im nachfolgenden Abschnitt sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt.

5.3.1 Das ODN als Modellsystem

Um eine mögliche Fehlinterpretation der ermittelten Schmelzkurven auszuschließen, sollen zunächst die der zu Grunde liegenden ODN (ODN A und ODN \bar{A}) genauer analysiert werden. Betrachtet man die experimentell ermittelte Schmelzkurve der äquimolaren ODN-Mischung in Abbildung 5.8 (a), so erkennt man drei unterschiedliche Abschnitte. Während für niedrige Temperaturen <315 K ein leichter Anstieg der Schmelzkurve zu beobachten ist, der in nahezu zwei lineare Bereiche zerfällt, tritt um 320 K ein sehr scharfer Anstieg in der Absorption auf. Für Temperaturen über 320 K zeigt die Absorption erneut einen langsamen linearen Anstieg. Schaut man sich die Unterschiede zwischen der Heizkurve und der Kühlkurve an, gilt zu sagen, dass sie denselben Verlauf nehmen, aber leicht gegeneinander bezüglich der Absorption verschoben sind. Das ist in diesem Fall weniger als Hysterese zu interpretieren, sondern dadurch, dass im Verlauf des Experimentes der Detektor im Hinblick auf das gemessene Absorptionssignal leicht driftet. Dies verdeutlichen die hysteresefreien, normierten Schmelzkurven (Abbildung 5.8 (b)). Die linearen Bereiche bei niedrigen und bei hohen Temperaturen sind im temperaturabhängigen Absorptionsverhalten der dsDNA auf der einen und der ssDNA auf der anderen Seite begründet; der zweite lineare Anstieg für Temperaturen <315 K kann damit erklärt werden, dass innerhalb der dsDNA internes Schmelzen auftritt und einzelne Bindungen bereits hier aufbrechen. Der darauf folgende scharfe Übergang bei 320 K beschreibt die kooperative Dissoziation der ODN-Stränge.

Betrachtet man nun die im Hinblick auf die temperaturabhängigen Absorptionseffekte und auf die internen Schmelzprozesse normierte Absorptionskurve (vgl. Abschnitt 3.2.4), so kann man einen scharfen, sigmoidalen Übergang, der bezüglich des Heiz- und Kühlzykluses keine Hysterese aufweist beobachten (Abbildung 5.8 (b)). Die Form des Übergangs weist darauf hin, dass es sich um einen Zwei-Zustands-Prozess handelt, der typisch für dsDNA bis zu einer Länge von 50 bp ist. Verwendet man das in Abschnitt 2.1.2.2 dargestellte Zwei-Zustands-Modell mit der entsprechenden Enthalpie und Entropie für die

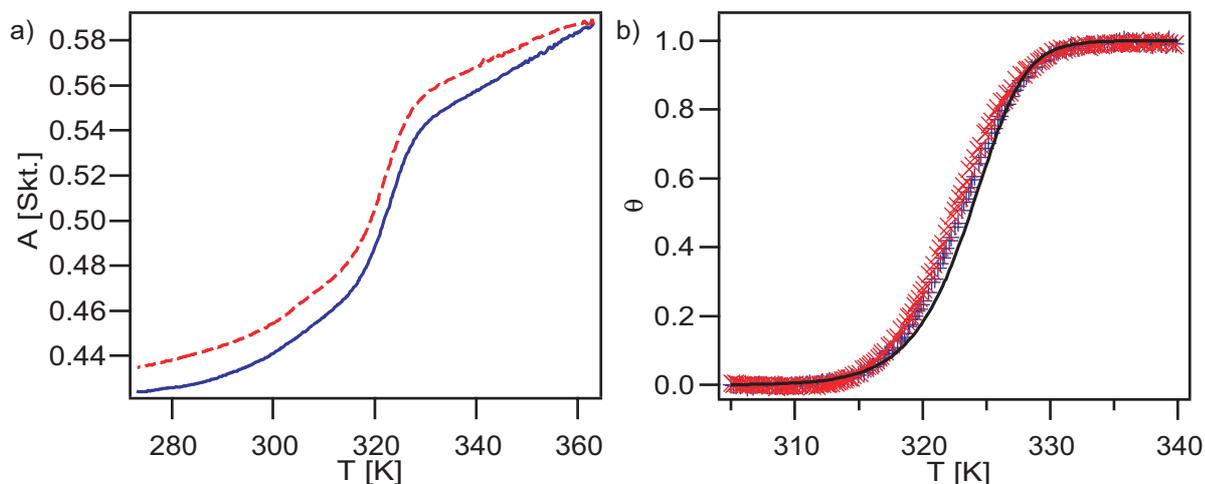


Abbildung 5.8: Experimentell gemessene und normierte Schmelzkurven der verwendeten ODN (ODN A und ODN \bar{A}): (a) Sowohl die Heizkurve (durchgezogene Linie) als auch die Kühlkurve (gestrichelte Linie) zeigen die gleiche Charakteristik, wobei der steile Anstieg bei ungefähr 320 K auf einen kooperativen Übergang zwischen dsDNA und ssDNA hinweist. (b) Die normierten Schmelzkurven des Heiz- und Kühlzyklus können mit Hilfe eines Zwei-Zustands-Modells, das keine freien Fitparameter beinhaltet, beschrieben werden.

verwendete DNA-Sequenz (siehe Abschnitt 3.2.4.3 für die Berechnung), so ergibt sich eine theoretische Schmelzkurve, die ohne freien Parameter sehr gut die gemessenen Daten beschreibt. Dies zeigt, dass das einfache Modell des kooperativen Schmelzens auf unsere Systeme angewendet werden kann.

5.3.2 Das Schmelzverhalten der PON-Ketten und der PON-Dimere

Analysiert man die Schmelzkurven der PON-Ketten (PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$), PON-Dimere (PON A'PB/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{B}$) und einer Mischung, die sowohl aus zwei symmetrischen PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) und den entsprechenden ODN (ODN A und ODN \bar{A}) besteht, erkennt man schließlich, dass die Schmelzkurven zueinander zwar bezüglich der Temperatur verschoben sind, aber insgesamt den gleichen Verlauf nehmen (Abbildung 5.9). Die leicht unterschiedlichen Schmelztemperaturen können hauptsächlich durch unterschiedliche Konzentrationen der entsprechenden Proben erklärt werden. Hieraus lässt sich insgesamt schließen, dass diese PON-Konstrukte auch weiterhin kooperativ schmelzen und ein Zwei-Zustands-Modell zur Beschreibung des Schmelzvorgangs Anwendung finden kann. Dies wird im Fall polymerartiger Ketten (PON A'PA/PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) durch die Ergebnisse der Gelelektrophorese-Experimente untermauert, da die Konzentration der unterschiedlich langen PON-Polymere nur dann exponentiell verteilt ist, wenn jeder Polymerisationsschritt unabhängig voneinander ist (Abbildung 5.4).

Die Ergebnisse bezüglich dieser Experimente und der theoretischen Berechnungen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Hierbei kann Folgendes festgestellt werden: (i) Wie be-

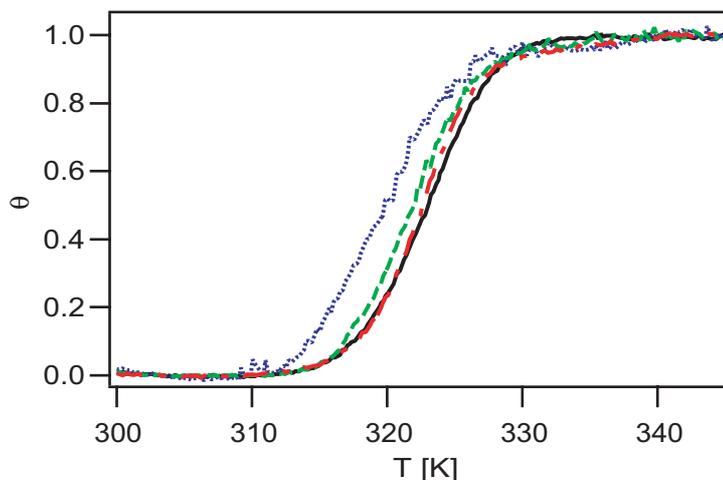


Abbildung 5.9: Schmelzkurven der unterschiedlichen supramolekularen PON-Konstrukte: Die normierten Schmelzkurven der ODN (durchgezogene Linie), der polymerartigen Ketten (gepunktet-gestrichelte Linie), der Dimere (gepunktete Linie) und einer Mischung (gestrichelte Linie) aus symmetrischen PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'P\bar{A}$) und den entsprechenden ODN (ODN A und ODN \bar{A}) zeigen tendenziell denselben Verlauf. Die Unterschiede können weitestgehend durch die unterschiedlichen Probenkonzentrationen und weniger durch unterschiedliche Konformationen erklärt werden.

reits vorher angemerkt zeigen die Schmelztemperaturen eine Abhängigkeit von der Konzentration, die zwar nur schwach (logarithmisch) ist, die aber zur Berechnung der exakten Schmelztemperatur berücksichtigt werden muss; das erklärt einen großen Teil der experimentell beobachteten Unterschiede. Dies ist an der sehr guten Übereinstimmung der experimentellen und der theoretischen Schmelztemperaturen unter Berücksichtigung

Konstrukt	ϵ	α	c_T [10^{-6} M]	$T_m(exp)$ [K]	$T_m(calc)$ [K]	$\ln \beta$
ODN	1	4	1,3	323,0	323,8	0,5
Dimer	1	4	0,89	320,0	323,2	2,1
Abgesättigtes Dimer ^a	1	4	0,68	322,0	322,8	0,5
PON A'PA	0,5	1	2,0	298,8	303,9	3,3
PON $\bar{A}'P\bar{A}$	0,5	1	2,0	311,1	303,9	-
Ketten	1	4	1,0	322,6	323,4	0,5
Sandwich	2	4	1,1	327,1	335,3	10,4

^aMischung aus PON A'PA, PON $\bar{A}'P\bar{A}$, ODN A und ODN \bar{A}

Tabelle 5.1: Schmelztemperaturen der unterschiedlichen supramolekularen Strukturen (ϵ : Kooperative Kettenlänge im Bezug auf das 16mer ODN; α : Komplementaritätsfaktor; c_T : Molkonzentration der DNA; T_m : Experimentelle und berechnete Schmelztemperaturen; $\ln \beta$: Nukleationsfaktor).

der Konzentration für die ODN, Dimere, Ketten und Mischungen zu erkennen. (ii) Bei der Berechnung der Schmelztemperaturen ($T_m(\text{calc})$) wurden diejenigen Beiträge nicht berücksichtigt, die in energetisch ungünstigen Wechselwirkungen zwischen den Strängen begründet sind, indem der Nukleationsfaktor β gleich 1 gesetzt wurde. Verwendet man $\ln\beta$ als freien Parameter, um die entsprechenden Schmelztemperaturen genau anzupassen, so kann dieser für die ODN, die Ketten und die abgesättigten Dimere nahezu vernachlässigt werden. Obwohl $\ln\beta$ für die Dimere etwas größer ist, kann dennoch insgesamt davon ausgegangen werden, dass das Zwei-Zustands-Modell den Schmelzprozess dennoch gut beschreibt.

5.3.3 Einfluss der supramolekularen Struktur auf das Schmelzverhalten der symmetrischen PON

Nachdem mit Hilfe der Gelelektrophorese die postulierten supramolekularen Strukturen der über 8 Basen selbstkomplementären PON (PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$) nicht nachgewiesen werden konnten, sollten die temperaturabhängigen Absorptionsmessungen einen Anhaltspunkt dafür geben, ob diese Strukturen existieren. Die Messungen zeigen tatsächlich für beide symmetrischen PON einen scharfen Anstieg in der Absorption, der als Schmelzen der postulierten Strukturen interpretiert werden kann. Die in Abbildung 5.10 dargestellten normierten Schmelzkurven demonstrieren deutlich einen sigmoidalen Übergang, der dem kooperativen Schmelzen der Strukturen entspricht. Allerdings

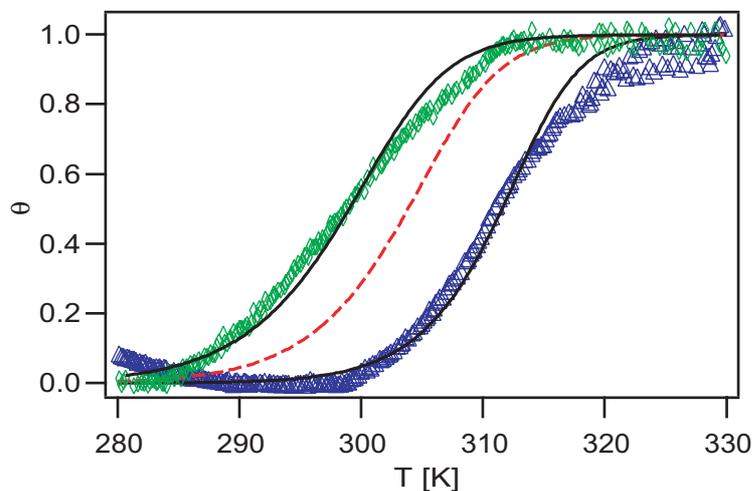


Abbildung 5.10: Schmelzkurve der selbstkomplementären PON-Konstrukte: Sowohl die Schmelzkurven der PON A'PA (Rauten) als auch die der PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ (Dreiecke) können durch ein Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden. Die Unterschiede in den Schmelztemperaturen beruhen aber nicht nur auf unterschiedlichen Konzentrationen, sondern sind vielmehr in der unterschiedlichen Anzahl an Basenpaaren, die den kooperativen Dissoziationsprozess verursachen, begründet. Bei PON A'PA sind das sieben, bei PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ zehn Basenpaare.

wirft eine detaillierte Analyse weitere Fragen auf. Während die experimentell gemessene Schmelztemperatur der selbstkomplementären PON A'PA recht genau unter Verwendung des 8-Basen-Überlapps und einem kleinen Nukleationsfaktor β ($\ln \beta = 3,3$) beschrieben werden kann, liegt die berechnete Schmelztemperatur der PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ -Ketten um 7 K unterhalb der experimentell gemessenen, so dass diese Diskrepanz nicht durch ein Aufweichen des Zwei-Zustands-Modells erklärt werden kann.

Versucht man nun, die Schmelzkurven der komplementären PON durch Variation der maximalen Anzahl an gepaarten Basen mit Gleichung 3.17 zu fitten, dann kann die experimentelle Kurve der PON A'PA unter Verwendung eines 7-Basen-Überlapps und die der PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ mit zehn Basenpaaren angepasst werden. Eine Erklärung dafür ist unter Berücksichtigung der postulierten Strukturen (siehe Abbildung 5.1) möglich. Während die supramolekularen PON A'PA-Konstrukte in einer gestreckten Form vorliegen, die jede weitere zusätzliche Wechselwirkung unterbindet, ist es bei der gedrungenen Struktur der PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ wahrscheinlich, dass es zur Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen den freien ODN-Basen untereinander oder mit dem Perylenkern kommt; dadurch kann die erhöhte Stabilität des Systems begründet werden.

5.3.4 Das Schmelzverhalten der sandwichartigen Strukturen

Die selbstkomplementären Strukturen der PON A'PA und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{A}$ verdeutlichen, dass die Konformation der Strukturen durchaus einen Einfluss auf das Schmelzverhalten haben kann und sich dort direkt niederschlägt. Bei den anderen bis jetzt diskutierten Strukturen (ODN, Dimere, Ketten) konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass die hybridisierten ODN jeweils unabhängig voneinander schmelzen, da die Verknüpfung zwischen zwei PON jeweils nur über genau ein ODN erfolgt. Anders sieht dies im Fall der sandwichartigen Strukturen aus. Hier sind die beiden PON (PON A'PB und PON $\bar{A}'\bar{P}\bar{B}$) direkt über beide ODN miteinander hybridisiert, so dass zu klären ist, welche Auswirkung die Kopplung über die Perylenkerne hinweg auf das kooperative Verhalten der ODN hat. Würde der Perylenkern keine oder eine sehr schwache Wechselwirkung zwischen den beiden angeknüpften ODN übertragen, sollten die ODN unabhängig voneinander schmelzen und das Sandwich daraus folgend das Schmelzverhalten eines 16mer ODNs aufweisen. Überträgt das Perylen allerdings eine starke Wechselwirkung zwischen den beiden ODN, so sollte dieses wie ein effektives 32mer ODN schmelzen.

Die in Abbildung 5.11 (a) dargestellten theoretischen und experimentell ermittelten Schmelzkurven legen offen, dass weder das Modell der starken (32 bp Schmelzen) noch das der schwachen Wechselwirkung (16 bp Schmelzen) die experimentellen Daten zufriedenstellend erklären kann. Die Diskrepanz liegt aber nicht nur in den unterschiedlichen Schmelztemperaturen begründet, sondern schlägt sich auch in der Kurvenform nieder. Diese weist zwei lineare Bereiche auf, die im Vergleich zu Kurven, die auf einem vollständigen, kooperativen Prozess beruhen, weniger steil ansteigen. Einen weiteren Hinweis, dass der Schmelzprozess über mehr als zwei Zustände vonstatten geht, stellt der große Wert des Nukleationsfaktors dar, der zum Angleichen der theoretischen Schmelz-

temperatur notwendig ist (siehe Tabelle 5.1). Mit Hilfe eines phänomenologischen Drei-Zustands-Modells ist es jedoch möglich, Theorie und Experiment zufriedenstellend in Einklang miteinander zu bringen. Während für Temperaturen deutlich oberhalb und unterhalb der Schmelztemperatur das Sandwich entweder vollständig dissoziiert oder hybridisiert ist, liegt es nahe der Schmelztemperatur in einem teilweise hybridisierten Zustand vor (vgl. Abbildung 5.11 (b)). Diese Überlegung spiegelt sich in der theoretischen Schmelzkurve in der Art wider, dass zwei kooperative Schmelzprozesse überlagert werden:

$$\theta(T) = \frac{1}{2} \{ \theta_1(T, \nu_1) + \theta_2(T, \nu_2) \} \quad (5.1)$$

$\theta_1(T, \nu_1)$ und $\theta_2(T, \nu_2)$ sind in Gleichung 3.17 definiert, wobei ν die kooperative Kettenlänge im Bezug auf das ODN A-System angibt.

Unter Verwendung dieses Modells ist es möglich, zwei kooperative Schmelzprozesse zu ermitteln, die zum einen dem Schmelzen von ca. einer ODN-Länge ($\nu_1 = 0,91$) und zum anderen von ca. 22 bp entsprechen ($\nu_2 = 1,37$). Es erklärt, wieso die experimentelle

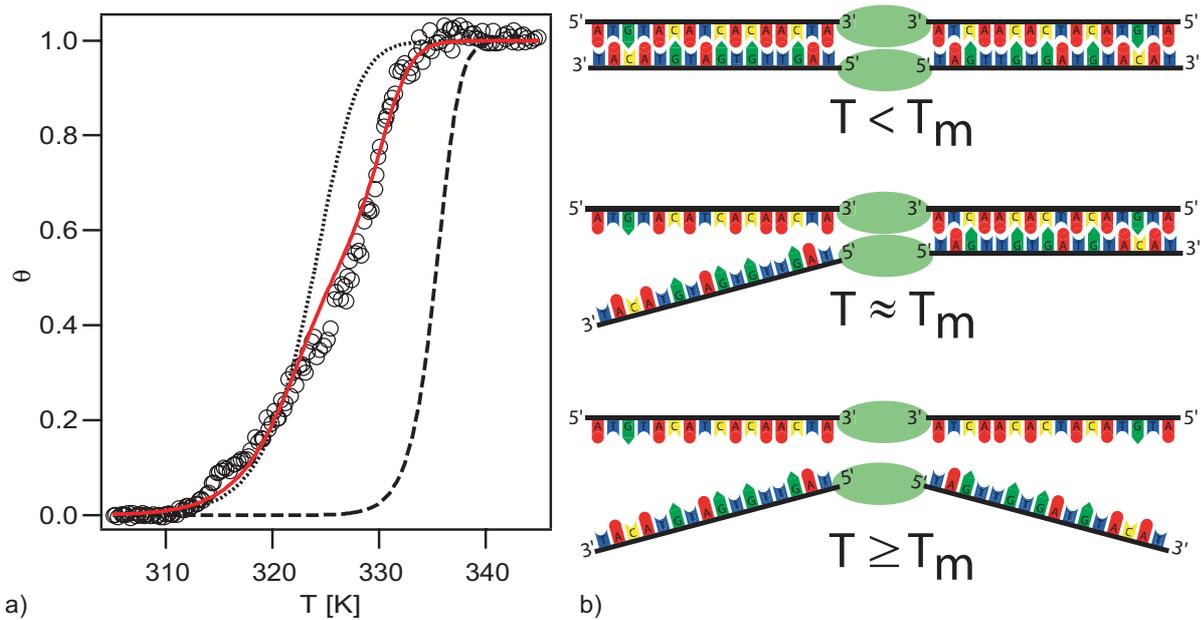


Abbildung 5.11: Schmelzverhalten des Sandwichs: (a) Die theoretischen Schmelzkurven für ein 16mer ODN (gepunktete Linie) und für ein 32mer ODN (gestrichelte Line) weichen deutlich von der experimentell gemessenen Schmelzkurve (Kreise) ab. Diese kann mit einem Drei-Zustands-Modell für das Schmelzen (durchgezogenen Linie) beschrieben werden; dabei entspricht der erste kooperative Schritt 16 Basenpaaren und der zweite 22 Basenpaaren. (b) Während des Sandwich-Schmelzprozesses muss ein weiterer Zwischenzustand mit einbezogen werden, bei dem nahe der Schmelztemperatur das Sandwich schon teilweise auf eine Länge von ca. einem ODN dissoziiert ist.

Schmelzkurve zwischen den 16mer oder 32mer Kurven liegt. Dabei stellt sich die Frage, wie der zweite kooperative Schritt zu Stande kommt. Es wird angenommen, dass die Wechselwirkung des zweiten noch nicht geschmolzenen ODN durch die übereinanderliegenden Perylenkerne entsprechend verstärkt wird.

Für eine detaillierte Analyse wäre es weiterführend nötig, die Wechselwirkungsmöglichkeiten der Perylenkerne genauer zu analysieren. Darüber hinaus müsste eine weiterreichende Theorie der Tatsache Rechnung tragen, dass die im ersten kooperativen Schritt geschmolzenen ODN während des weiteren Schmelzprozesses nahe aneinander bleiben und somit Assoziations- und Dissoziationsvorgänge deutlich häufiger auftreten können. Dies spiegelt sich auch in den Schmelzkurven wider, die im Fall des Sandwiches deutlich verrauschter sind, wobei das unabhängig von der Schmelzgeschwindigkeit ist.

Im Großen und Ganzen konnte gezeigt werden, dass PON zu unterschiedlichen supramolekularen Strukturen hybridisieren können. Bei den meisten Strukturen bleibt das generelle ODN-Schmelzverhalten mit zwei Zuständen erhalten, so dass der Perylenkern einen sehr schwachen Einfluss hat. Lediglich im Fall des Sandwichs und des selbstkomplementären PON entsteht eine gewisse Kopplung durch den Perylenkern, der in einem Fall zu einem weiteren Zwischenzustand und im anderen Fall zu einer erhöhten Stabilität führt. Daher konnte der Einfluss der zu Grunde liegenden supramolekularen Struktur auf das Schmelzverhalten demonstriert werden.

5.4 Moleküle mit mehr als zwei Anknüpfungspunkten für die Hybridisierung

Die vorgestellten Ergebnisse bezüglich der supramolekularen Strukturen der PON haben deutlich bestätigt, dass nur durch die Variation der mit dem Perylenkern verbundenen ODN und durch die Änderung der Anknüpfungsstelle der ODN an das Perylen (3' oder 5') unterschiedliche Konformationen erreicht werden können. Allerdings ist es mit zwei Anknüpfungsstellen nicht möglich, ein verzweigtes, nicht lineares Netzwerk aufzubauen. Dies ist aber im Bezug auf eine vollständige Sammlung von Assemblierungsbausteinen notwendig. Hierzu wird ein Tri-ODN verwendet, bei dem drei ODN über ein Zentralmolekül miteinander verknüpft sind und deren Synthese und Struktur in Abschnitt 3.2.5 beschrieben ist.

Bezüglich des Tri-ODN ist zu klären, ob und inwieweit es möglich ist, alle drei Anknüpfungsstellen anzusprechen und eine erfolgreiche Hybridisierung durchzuführen. Verwendet man hierzu 50-Basen-lange ODN, die am entsprechenden Ende die komple-

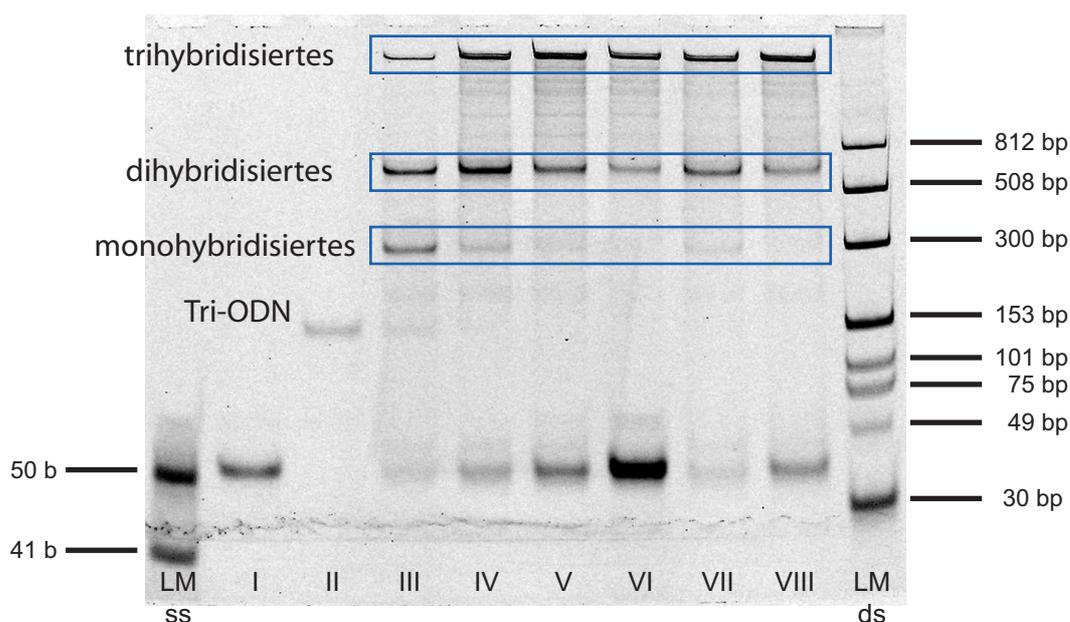


Abbildung 5.12: Hybridisierungsprodukte der Tri-ODN: Es ist möglich, komplementäre ODN an die Anknüpfungsstellen des Tri-ODN anzulagern, wobei mono-, di- und trihybridisierte Produkte entstehen, deren Genese durch eine Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse variiert werden kann. Linien wie folgt: I, 50mer ODN; II, Tri-ODN; III, 50mer ODN/Tri-ODN (stöchiometrisches Verhältnis = 1:1); IV, 50mer ODN/Tri-ODN (stöchiometrisches Verhältnis = 2:1); V, 50mer ODN/Tri-ODN (stöchiometrisches Verhältnis = 3:1); VI, 50mer ODN/Tri-ODN (stöchiometrisches Verhältnis = 4:0,5); VII, 50mer ODN/Tri-ODN (stöchiometrisches Verhältnis = 2:1); VIII, 50mer ODN/Tri-ODN (stöchiometrisches Verhältnis = 3:1).

mentären ODN-Sequenzen aufweisen, so zeigen die Hybridisierungsmessungen, dass eine Ankopplung an jedes einzelne ODN des Tri-ODN möglich ist (Abbildung 5.12). Vergleicht man die Linien, die sowohl das 50mer ODN als auch das Tri-ODN enthalten (III-VIII) mit denjenigen der 50mer ODN (I) und des Tri-ODN (II), dann entstehen drei zusätzliche Banden, die dem mono-, di- und trihybridisierten Tri-ODN entsprechen. Auch hier ist es gezielt möglich, durch Variation der Mischungsverhältnisse, die Genese der unterschiedlich hybridisierten Strukturen zu beeinflussen.

Anders sieht es hingegen aus, wenn man versucht dsDNA von 650 bp Länge mit Hilfe einer entsprechenden Brückensequenz an das Tri-ODN zu hybridisieren. Hier konnte maximal das dihybridisierte Tri-ODN nachgewiesen werden, ohne dass die Ergebnisse abhängig vom genauen Syntheseweg der Anknüpfung der komplementären Brückensequenz (zuerst Hybridisierung an das Tri-ODN und dann an das dsDNA-Fragment oder umgekehrt) waren. Dies weist darauf hin, dass die Kopplung von langer dsDNA an das Tri-ODN teilweise sterisch gehindert ist. Eine ähnliche sterische Hinderung haben *Shchepinov et. al.* für verzweigte ODN-Dendrimere beobachtet. In dem Zusammenhang konnte die Störung durch den Einbau eines längeren Spacers unterbunden werden [159].

6 Elektrophoretische Eigenschaften von dsDNA auf kleinen Längenskalen

Eine detaillierte Analyse von Strömungsprofilen bzw. der Partikeldrift kann mit unterschiedlichen FCS-Methoden realisiert werden, deren theoretischer Hintergrund in Abschnitt 2.3.4 behandelt wurde. Dort wurde auch demonstriert, dass eine Charakterisierung mit einem Anregungsfokus sowie mit zweien prinzipiell möglich ist. Außerdem erkennt man, dass mit der Doppelfokus-Methode im Gegensatz zu der Einzelfokus-Methode neben dem Betrag der Driftgeschwindigkeit auch die Flussrichtung aufgelöst werden kann. Des Weiteren trägt die Kreuzkorrelationsmessung zu einer stärkeren Entkopplung der Drift und der Diffusion bei, was eine Analyse der experimentellen Daten deutlich vereinfacht. Die Mächtigkeit der dFCS-Methode soll zuerst bei der Analyse von Strömungsprofilen demonstriert werden, bevor Experimente zur Bestimmung der elektrophoretischen Drift vorgestellt werden.

6.1 Hydrodynamische Flussprofile

Abbildung 6.1 zeigt die Kreuzkorrelationsdaten für die Drift von Cy5, die durch zwei unterschiedlich hohe Flüssigkeitsreservoirs induziert wurde, in einem Kanal mit rechteckigem Querschnitt (Höhe $a = 0,4$ mm; Breite $b = 5$ mm; der Aufbau ist in Abschnitt 3.3 beschrieben). Die Daten wurden mit einem Doppelfokus-Abstand von ca. $5,4 \mu\text{m}$ aufgenommen und die Fokusposition auf der z -Achse im Kanal variiert. Je nach Detektionsort verändert sich die Driftzeit zwischen den beiden Foki, die sich im Maximum der Kreuzkorrelation widerspiegelt, um nahezu zwei Größenordnungen. Es wird auch sichtbar, dass die maximale Amplitude mit zunehmender Driftzeit abnimmt, was darin begründet ist, dass sie durch die diffusiven Eigenschaften der detektierten Teilchen bestimmt wird. Je länger die Zeit ist, die das Teilchen zum Durchqueren der Distanz zwischen den beiden Foki braucht, umso niedriger ist die Wahrscheinlichkeit, dass das entsprechende Teilchen in beiden Foki tatsächlich angeregt wird, weil die überlagerte Diffusion das Teilchen immer mehr von der eigentlichen Flussbahn abbringt. Die Messung desselben Teilchens in beiden Foki essentiell für die Entstehung der Kreuzkorrelation. Nachdem Cy5 eine relativ hohe Diffusionskonstante aufweist ($250 \mu\text{m}^2/\text{s}$) [117], nimmt die Amplitude bei längeren Driftzeiten deutlich ab (vgl. Gleichung 2.97). Eine Erweiterung des Messbereiches zu längeren Driftzeiten bzw. niedrigeren Driftgeschwindigkeiten wäre durch die Verwendung von Partikeln mit niedriger Diffusionskonstante möglich,

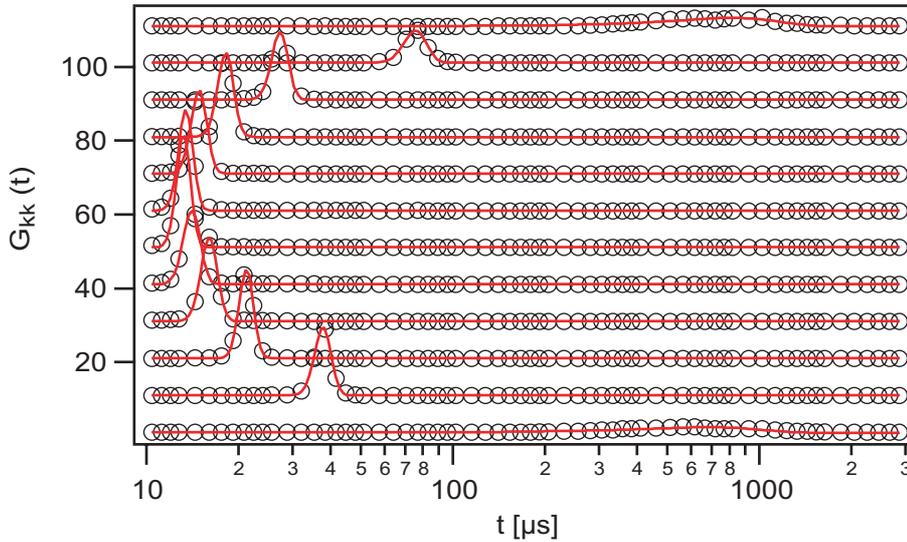


Abbildung 6.1: Fluoreszenzkreuzkorrelationsdaten für Cy5 in einer Flusskammer in Abhängigkeit von der Kanalposition: Das Maximum der gemessenen Kreuzkorrelation in einem Flusskanal mit einem Rechteckquerschnitt (Höhe $a = 0,4$ mm; Breite $b = 5$ mm), dessen Fluss durch zwei unterschiedlich hohe Flüssigkeitsreservoirs ($\Delta h = 80$ cm) erzeugt wird, wandert in Abhängigkeit von der Messposition im Kanal. Die kleinsten Driftzeiten werden in der Kanalmitte ermittelt. Die Amplitude der Kreuzkorrelation nimmt mit zunehmender Driftzeit ab. Die beiden Foki sind ca. $5,4 \mu\text{m}$ voneinander entfernt.

was sich zum Beispiel mit fluoreszenzmarkierten Kunststoffkugeln bewerkstelligen lässt [119, 128].

Die aus der Kreuzkorrelation abgeleiteten Driftgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Messposition im Kanal und von der hydrostatischen Druckdifferenz sind in Abbildung 6.2 (a) gezeigt. Im Kanal stellt sich ein parabolisches Flussprofil ein. Daraus lässt sich ablesen, dass das Profil innerhalb des Kanals sehr gut aufgelöst wird. Aus den Messungen wird auch ersichtlich, dass die Maximalgeschwindigkeit linear mit der angelegten Höhendifferenz der Reservoirs bzw. mit dem angelegten hydrostatischen Druck variiert. Trägt man die aus den Profilen gewonnene Maximalgeschwindigkeit doppellogarithmisch gegen die entsprechende Höhendifferenz auf (Abbildung 6.2(b)), lässt sich der Exponent mit $(1,077 \pm 0,020)$ ermitteln. Dies bestätigt, dass der Druckabfall im Kanal bzw. im Flüssigkeitssystem gleichmäßig vonstatten geht und die Verteilung auf die einzelnen Bereiche (Kanal, Zuleitungen) weitgehend unabhängig vom jeweils anliegenden Gesamtdruck ist.

Um einen detaillierten Einblick in den Druckabfall im eigentlichen Messkanal zu gewinnen, wurde in weiterführenden Experimenten der äußere Druck direkt durch eine Pumpe mit sehr großem dynamischen Bereich erzeugt und anstatt der Flüssigkeitsreservoirs verwendet. Auch hier wird deutlich, dass die Maximalgeschwindigkeit im Kanal über nahezu 3 Größenordnungen linear vom angelegten Druck abhängt (Abbildung 6.3

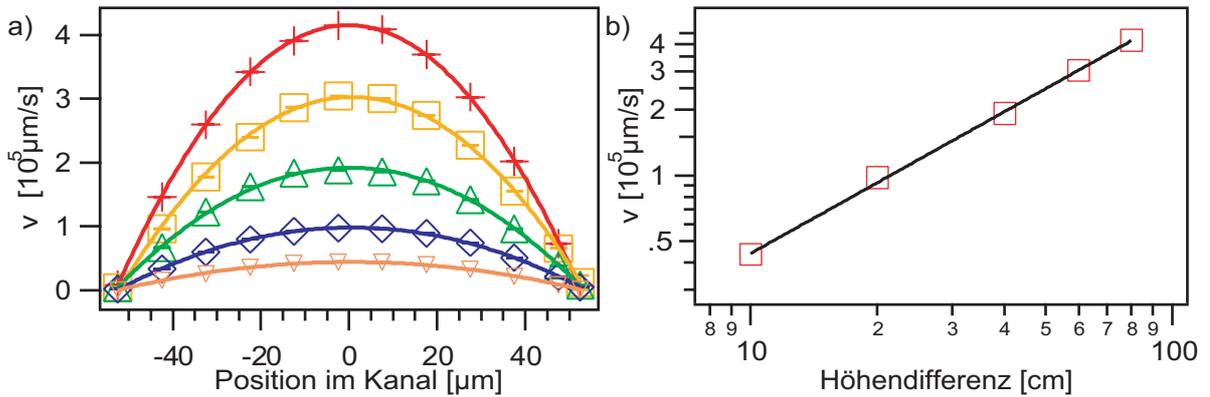


Abbildung 6.2: Flussprofil und Maximalgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Höhendifferenz zwischen den beiden Flüssigkeitsreservoirs: (a) Das z-Profil der Driftgeschwindigkeit im Kanal kann mit einem parabelförmigen Profil angepasst werden, wobei die Amplitude mit der Höhendifferenz der Flüssigkeitsreservoirs variiert (Kreuze: $\Delta h = 80 \text{ cm}$; Quadrate: $\Delta h = 60 \text{ cm}$; Dreiecke: $\Delta h = 40 \text{ cm}$; gedrehte Quadrate: $\Delta h = 20 \text{ cm}$; gedrehte Dreiecke: $\Delta h = 10 \text{ cm}$). (b) Die gemessene Maximalgeschwindigkeit variiert nahezu linear mit der angelegten Höhendifferenz (Exponent = $(1,077 \pm 0,020)$).

(a)). Der Exponent lässt sich zu $(1,037 \pm 0,001)$ bestimmen.

Aus der gemessenen Maximalgeschwindigkeit in der Kanalmitte lässt sich mit der nachfolgenden Gleichung der lineare Druckgradient $\frac{dp}{dx}$ berechnen, der innerhalb des Messkanals anliegt [160]:¹

$$\frac{dp}{dx} = -v_{max}\eta \left\{ \frac{b^2}{8} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n (b^2)}{2(2n+1)^3} \left(\frac{2}{\pi} \right)^3 \frac{1}{\cosh \left[(2n+1) \left(\frac{\pi a}{2b} \right) \right]} \right\}^{-1} \quad (6.1)$$

Trägt man den so ermittelten Druckgradienten gegen den angelegten Druck auf und vergleicht ihn mit dem theoretischen Gradienten, der möglich wäre, wenn der äußere Druck vollständig über die Kammerlänge von 5 cm abfallen würde, so erkennt man eine starke Diskrepanz zwischen den vorhergesagten und den theoretisch ermittelten Werten (Abbildung 6.3 (b)). In der Tat fallen lediglich 11% des insgesamt anliegenden Druckes im eigentlichen Messkanal ab. Das ist insoweit verständlich, wenn man berücksichtigt, dass das Zuflusssystem zwar größere Dimensionen aufweist, aber auch hier der Druckabfall nicht vernachlässigt werden kann. Geht man von einem gleichmäßigen Druckgradienten im ganzen System aus, dann müsste der Druck auf einer Länge von ca. 45 cm abfallen, was ungefähr den Dimensionen des Systems entspricht.

Im Prinzip konnte geklärt werden, dass es möglich ist, in einem sehr großen dynamischen Bereich, die Driftzeit bzw. die Driftgeschwindigkeit sehr genau zu ermitteln

¹Gleichung 6.1 wurde aus der Lösung der *Navier-Stokes-Gleichung* für einen rechteckigen Querschnitt gewonnen. Die Summation wurde nach 3 Termen abgebrochen, da der Fehler bereits unter einem Prozent lag

und das Flussprofil in einem rechteckigen Kanal aufzulösen. Der experimentell ermittelte Druckgradient hängt linear vom angelegten äußeren Druck ab. Allerdings zeigt sich, dass er nur dann mit den theoretischen Vorhersagen übereinstimmt, wenn man berücksichtigt, dass der Druck auch in der Zuleitung anteilmäßig abfällt.

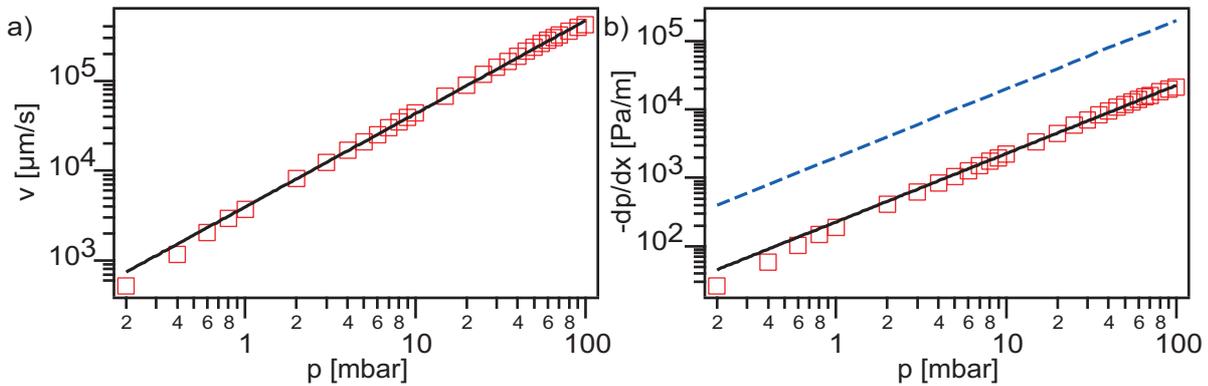


Abbildung 6.3: Durchflussmessungen bei unterschiedlichen äußeren Drücken: (a) Wird direkt an ein Kammer-system ein definierter Druck mit Hilfe eine Pumpe angelegt, so variiert auch die maximal gemessene Geschwindigkeit (Quadrate) im Kanal nahezu linear mit dem Druck (Linie; Exponent = $(1,037 \pm 0,001)$). Abweichungen sind nur für großen oder kleinen äußeren Druck erkennbar. (b) Der experimentell ermittelte (Quadrate) und der theoretisch berechnete Druckgradient (gestrichelte Linie), der auf einem Abfall des Druckes nur im eigentlichen Flusskanal beruht, unterscheiden sich ungefähr um eine Größenordnung. Es fallen lediglich 11% des Gesamtdruckes in der Messkammer ab (durchgezogene Linie).

6.2 dsDNA-Elektrophorese in freier Lösung

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt verdeutlicht wurde, dass eine Messung der Driftzeit mit Hilfe von dfFCS möglich ist, soll im weiteren Verlauf gezeigt werden, dass ebenso die Analyse der elektrophoretischen Drift realisiert werden kann. Dies stellt insofern eine Herausforderung dar, da die erwarteten Driftzeiten für dsDNA-Fragmente nochmals eine Größenordnung über denen liegen, die für Cy5 bereits ermittelt wurden (siehe Abbildung 6.1). Allerdings unterscheiden sich auch die Diffusionskonstanten ebenso um eine Größenordnung, so dass ein Nachweis möglich wird.

Die Fluoreszenzkreuzkorrelation für ein 210 bp langes dsDNA-Fragment in der Kanalmitte ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sich die Maxima der Kreuzkorrelation mit zunehmend angelegtem E-Feld zu kleineren Driftzeiten, d. h. zu

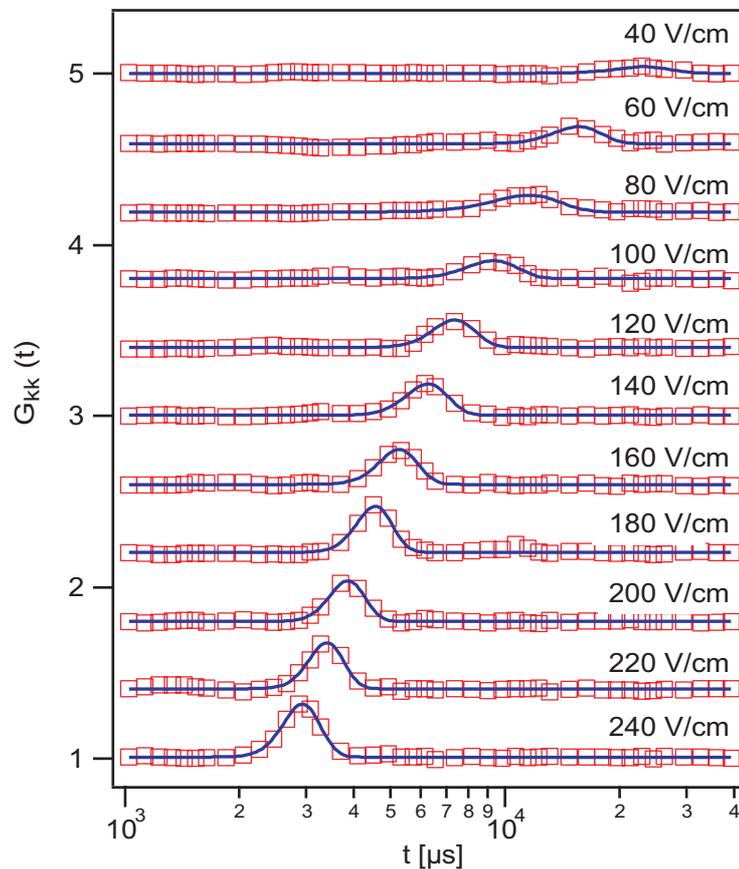


Abbildung 6.4: Fluoreszenzkreuzkorrelation für ein 210 bp dsDNA-Fragment in Abhängigkeit vom elektrischen Feld in wässriger Lösung: Die Driftzeit nimmt systematisch mit zunehmender Feldstärke ab, während sich die Höhe der Maxima in selber Richtung vergrößert. Die experimentellen Daten können mit einer Gaußfunktion gemäß Gleichung 2.97 angepasst werden.

höheren Geschwindigkeiten, verschoben. Ebenso nimmt in der selben Richtung auch die Amplitude der Peaks zu. In diesem Fall war es noch möglich, ein signifikantes Maximum in der Kreuzkorrelation bei ca. 20000 μs zu messen. Des Weiteren konnten die Daten mit einer gaußschen Fitfunktion gemäß Gleichung 2.97 beschrieben werden.

6.2.1 Spannungsinduzierter Temperaturanstieg

Um den Versuchsaufbau näher zu charakterisieren wurde neben der Driftzeit bzw. der Driftgeschwindigkeit auch der Strom gemessen, der über die Elektroden in Abhängigkeit vom angelegten elektrischen Feld im Elektrophoresekanal fließt. Es zeigt sich, dass beide physikalischen Messgrößen denselben Verlauf nehmen, was exemplarisch für die Messungen am 210 bp dsDNA-Fragment in Abbildung 6.5 dargestellt ist. Während man für niedrige Feldstärken ($< 120\text{V/cm}$) noch ein nahezu lineares Verhalten beobachtet, kommt es bei höheren Feldstärken zu einem deutlich nichtlinearen Anstieg sowohl bezüglich der Driftgeschwindigkeit als auch im Bezug auf den fließenden Strom. Dieses Verhalten kann damit erklärt werden, dass sich durch den Stromfluss die Flüssigkeit im Elektrophoresekanal erwärmt. Dies ändert zum einen die Viskosität der Flüssigkeit und die damit verknüpfte Mobilität der dsDNA-Fragmente wie zum anderen die spezifische Leitfähigkeit des Puffersystems.

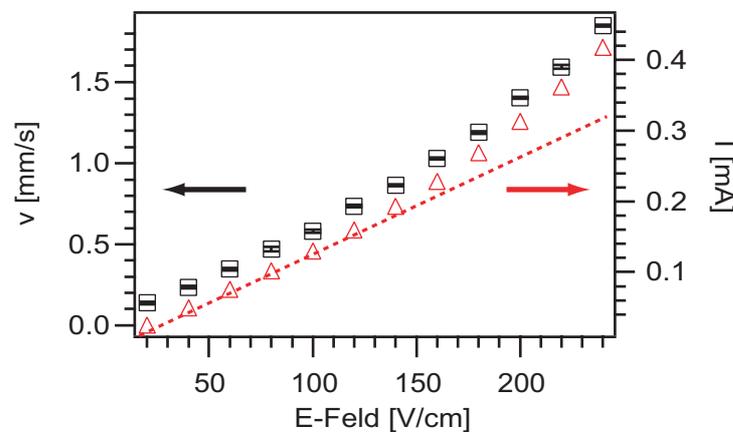


Abbildung 6.5: Driftgeschwindigkeit und gemessene Stromstärke für ein 210 bp dsDNA-Fragment in Abhängigkeit vom angelegten E-Feld: Die Driftgeschwindigkeit (Quadrate) und die Stromstärke (Dreiecke) zeigen den gleichen Verlauf mit zunehmender Feldstärke. Eine Linearität des Anstiegs ist nur für niedrige Feldstärken gegeben (gestrichelte Linie).

Noch deutlicher tritt die Nichtlinearität von Geschwindigkeit und Stromfluss zu Tage, wenn man die durch die Feldstärke dividierten und über alle Messungen mit dsDNA-Fragmenten gemittelten Größen gegen das E-Feld aufträgt (Abbildung 6.6). Hier sind deutliche Abweichungen von einem konstanten Wert sichtbar, der für niedrige elektrische

Felder (< 60 V im Falle des Stroms und < 120 V im Falle der Geschwindigkeit) ermittelt werden kann.

In Abschnitt 3.3.3 wurden die entsprechenden Analysemethoden zur Berechnung der intrinsischen Temperatur bereits vorgestellt. Unter der Annahme, dass neben der Driftgeschwindigkeit ebenso der gemessene Strom indirekt proportional zur stark temperaturabhängigen Viskosität ist, lässt sich hieraus die Temperatur der Elektrophoresekammer ableiten, wobei angenommen wird, dass für niedrige Feldstärken die Außentemperatur mit der Temperatur der Elektrophoreselösung übereinstimmt.

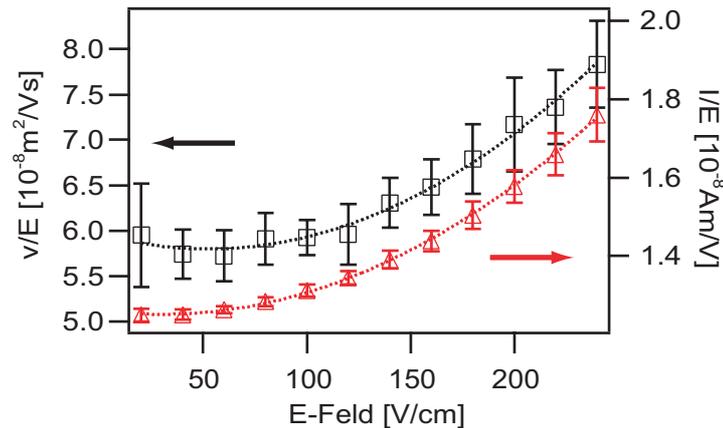


Abbildung 6.6: Reduzierte gemittelte Driftgeschwindigkeiten und reduzierte Stromstärken in Abhängigkeit vom E-Feld: Die über alle Messungen mit dsDNA in wässriger Lösung gemittelten reduzierten Geschwindigkeiten (v/E , Quadrate) und Stromstärken (I/E , Dreiecke) steigen bei großen Feldstärken stark an.

Die aus der Temperaturabhängigkeit der Viskosität ermittelten Kammertemperaturen sind für die Ableitung aus der Driftgeschwindigkeit und aus dem Elektrophoresestrom in Abbildung 6.7 dargestellt. Dies verdeutlicht, dass sich die Temperatur im Elektrophoresekanal merklich mit dem angelegten E-Feld ändert, aber beide Temperaturverläufe zueinander konsistent sind. Bei hohen Feldstärken (240 V/cm) beträgt die Temperaturdifferenz zur Raumtemperatur 15°C , was einen erheblichen, nicht vernachlässigbaren Effekt darstellt. Es stellt sich die Frage, inwieweit ein solch starker Effekt von theoretischer Seite vorhersagbar ist. Es gibt durchaus Ansätze, in denen sowohl für Kapillaren als auch für rechteckige Kanäle die Wärmedissipation berechnet wurde [161]. Die Berechnungen ergaben, dass ein Temperaturgradient innerhalb der Kammer meist vernachlässigbar ist und der Hauptabfall zwischen Kammerwand und Außenluft erfolgt [162]. Ein ähnlicher, analytischer Ansatz kann aber in diesem Fall nicht verwendet werden, da der Aufbau eine deutliche Asymmetrie aufweist. Während der Kanal an der Oberseite mit Luft in Kontakt ist, befindet sich zwischen Objektiv und Elektrophoresekammer Wasser, was für eine deutlich bessere Wärmeableitung in Richtung des Objektivs sorgt. Diese These wird auch dadurch gestützt, dass es in Kanälen, die nicht in Kontakt mit dem Objektiv stehen, bei größeren Feldstärken ($> 200 \text{ V/cm}$) zu einer deutlichen Gasentwicklung

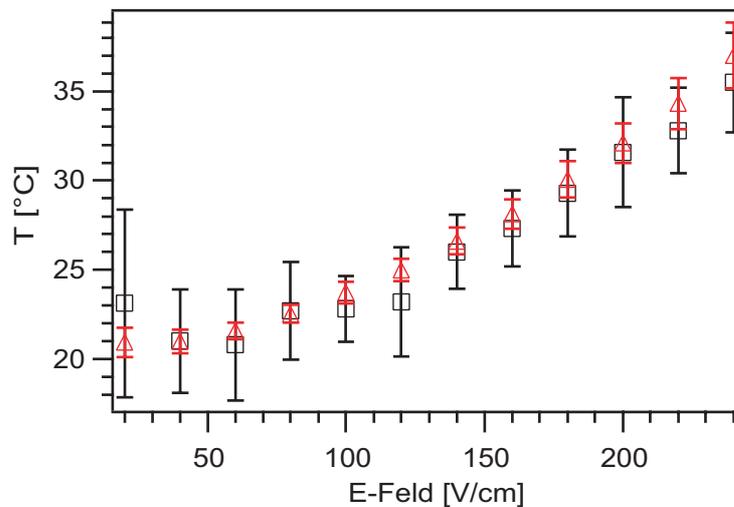


Abbildung 6.7: Kammertemperatur in Abhängigkeit des angelegten E-Feldes: Sowohl die mit Hilfe der Driftgeschwindigkeit (Quadrate) als auch die unter Verwendung der Stromstärke (Dreiecke) ermittelten Temperaturen stimmen innerhalb der Fehler miteinander überein. Es kann ein maximaler Temperaturunterschied zwischen niedrigen und hohen Feldstärken von 15 °C festgestellt werden.

kommt, was entweder auf ein Kochen der Probe oder ein Entgasen der Probe bei höheren Temperaturen hindeutet. Somit stellt gerade die Kühlung durch das Objektiv ein gutes Regulationselement dar, um den Erwärmungseffekt auf das beschriebene Maß zu reduzieren.

6.2.2 Vergleich der Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsdaten

Obwohl bei den Messungen mit dem Doppelfokus-Aufbau der Hauptaugenmerk darauf liegt, die Kreuzkorrelationsdaten aus dem Fluoreszenzsignal der beiden Foki zu analysieren, ist es natürlich parallel dazu auch möglich, die Fluoreszenzautokorrelation des Signals der einzelnen Foki jeweils zu berechnen. Nachdem die Autokorrelation und die Kreuzkorrelation auf demselben System beruhen, sollte eine detaillierte Auswertung auch korrespondierende Ergebnisse liefern.

Betrachtet man die theoretisch hergeleitete Kreuzkorrelation (Gleichung 2.97) genauer, so erkennt man, dass zum einen die maximal erreichbare Amplitude und zum anderen die Gaußfunktion essentiell von der Diffusion, der mittleren Teilchenzahl der gemessenen Partikel und den geometrischen Parametern abhängt. Jene sind die Fokusaussdehnung, das Ausdehnungsverhältnis von axialer und radialer Fokusaussdehnung sowie der Abstand der beiden Foki. Die Diffusionszeit kann ohne angelegtes Feld exzellent gemessen werden, was in Abschnitt 4.1 gezeigt wurde. Darüber hinaus ergaben Messungen von *Nkondo et. al.*, dass das elektrische Feld keinen Einfluss auf das Diffusionsverhalten hat [163]. Die jeweilige Teilchenzahl ergibt sich aus einem entsprechenden Fit der Auto-

korrelationsfunktion. Mit den so bestimmten Drift- und Teilchenzahlen sowie mit den aus den Kalibrierungsmessungen gewonnenen Parametern, können Vorhersagen über die Amplitude und die Breite σ der gaußschen Kreuzkorrelationsfunktion getroffen und mit den direkt aus der Autokorrelation zugänglichen Daten verglichen werden. Dies ist am Beispiel der Messungen mit 210 bp dsDNA in Abbildung 6.8 in Abhängigkeit von der angelegten Feldstärke dargestellt. Während im Fall der Amplitude die berechnete mit der gemessenen nur für kleine Feldstärken übereinstimmt und für höhere E-Felder die tatsächliche Amplitude deutlich unterhalb der vorhergesagten liegt (Abbildung 6.8 (a)), ist eine tendenzielle Übereinstimmung bezüglich der Breite zu beobachten (Abbildung 6.8 (b)). Im Fall der Breite der Gaußfunktion kann die Übereinstimmung nochmals deutlich gesteigert werden, wenn man den Einfluss der im Abschnitt 6.2.1 untersuchten deutlichen Temperaturerhöhung auf die Diffusion berücksichtigt. Hinsichtlich der Amplitude kann zwar ein vergleichbarer Temperatureffekt errechnet werden, es erklärt aber nicht vollständig die niedrigen Werte für hohe Feldstärken.

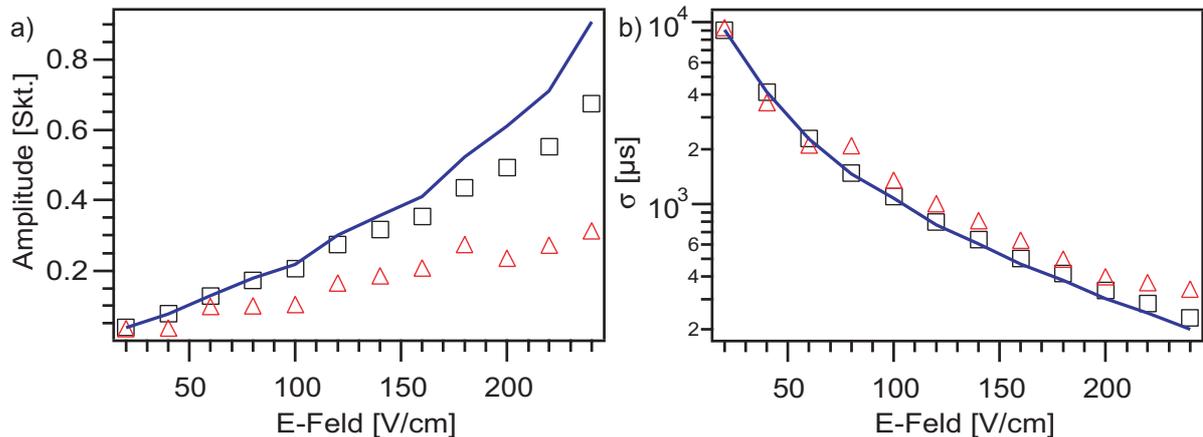


Abbildung 6.8: Vergleich zwischen den experimentell gemessenen und den zu erwartenden Parametern der Kreuzkorrelationen: (a) Mit Hilfe der durch die Autokorrelation bestimmten Größen (Teilchenzahl und Diffusionszeit) kann eine zu erwartende Amplitude (durchgezogene Linie) berechnet werden, die außer für kleine Feldstärken deutlich von der experimentell gemessenen abweicht (Dreiecke). Eine Korrektur für den Temperaturanstieg (Quadrate) kann die Diskrepanz verringern, aber nicht aufheben. (b) Die erwarteten und experimentell ermittelten Breiten der Kreuzkorrelationsfunktion zeigen denselben Verlauf. Die Übereinstimmung kann durch die Temperaturkorrektur weiter erhöht werden.

Die Diskrepanz ist zum Teil systematischer Natur, da in Flussexperimenten auch Abweichungen zwischen 10% und 20% beobachtet werden. Die Ursache können z. B. unterschiedlich große Foki sein. Außerdem könnten die Unterschiede in der nicht vollständigen Homogenität des elektrischen Feldes begründet sein, was die lineare Drift beeinflussen würde. Diese These wird dadurch gestützt, dass es z. B. in einem Kreuzkanal bei gleicher Elektrodengeometrie und vollständig unterdrücktem, hydrostatischem Fluss

nicht möglich war, ein elektrophoretisch induziertes Kreuzkorrelationssignal aufzunehmen. Konvektive Effekte scheiden weitestgehend aus, da bei dem im System vorhandenen Temperaturgradienten dieses Phänomen mindestens eine Größenordnung zu klein ist, um einen signifikanten Einfluss auf die Amplitude zu haben.

Während sowohl die Amplitude als auch die Breite der Kreuzkorrelation nur einen indirekten Vergleich zwischen den unterschiedlichen Analysemethoden, Einzelfokus oder Doppelfokus, zulassen, sind die Driftzeit und somit die Driftgeschwindigkeit in der Autokorrelation und in der Kreuzkorrelation explizit zugänglich. Wie bereits erwähnt, ist in der Autokorrelationsfunktion die Driftzeit an den ebenso stattfindenden diffusiven Prozess gekoppelt. Des Weiteren stellt die Driftzeit diejenige Zeit dar, die das Teilchen im Mittel zum Durchqueren des Fokus braucht. Dies macht eine genaue vorherige Kalibrierung der Fokusdimensionen notwendig. Im Gegensatz dazu ist die Driftzeit in der Kreuzkorrelation weitestgehend alleine durch die Position des gaußschen Maximums bestimmt, das unabhängig vom überlagerten, diffusiven Prozess ist. Der Abstand der beiden Foki lässt sich, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, unabhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen festlegen. Vergleicht man die unterschiedlich ermittelten Driftgeschwindigkeiten miteinander, so erkennt man, dass die über die Autokorrelation bestimmten systematisch niedriger sind als diejenigen, die über die Kreuzkorrelation ermittelt wurden; dabei tritt ebenfalls die temperaturbedingte Nichtlinearität mit zunehmenden elektrischem Feld zu Tage (Abbildung 6.9). Der Effekt, der zu niedrigen Driftzeiten führt, liegt darin begründet, dass die Ausdehnung der verwendeten dsDNA-Fragmente nicht mehr zu vernachlässigen ist, und deshalb die für die Messungen relevante effektive Detektorausdehnung vergrößert werden muss [119, 164].² Ein Kalibrierungsfehler ist nahezu vollständig auszuschließen, da sich das effektive Beobachtungsvolumen in der Tat mit zunehmender dsDNA-Länge zu größeren Werten verschiebt. Das wird auch ersichtlich, wenn man in Abbildung 6.9 die jeweils gemessenen Geschwindigkeiten für 210 bp und 822 bp miteinander vergleicht. Im Beispiel des längeren dsDNA-Fragmentes unterscheiden sich diese deutlicher voneinander (Kreuze und Dreiecke) als es bei den 210 bp dsDNA-Fragment (Quadrate und Kreise) der Fall ist.

6.2.3 Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität in freier Lösung

Die oben dargestellten Ergebnisse erläutern, dass es möglich ist, die durch ein elektrisches Feld induzierte Drift von geladenen Teilchen mit Hilfe von dFFCS nachzuweisen. Es wurde auch deutlich, dass die beiden FCS-Modi zueinander konsistente Ergebnisse liefern. Darüber hinaus ergaben die Auswertungen, dass die Kammererwärmung mit zunehmendem E-Feld ansteigt und bei einer weiteren Analyse berücksichtigt werden muss. Korrigiert man nun die spannungsabhängigen Driftgeschwindigkeiten im Hinblick auf die Temperatur, so ist ein linearer Zusammenhang zwischen Driftgeschwindigkeit und

²Dieser Effekt wird in der Literatur als *Particle-Size-Effekt* bezeichnet

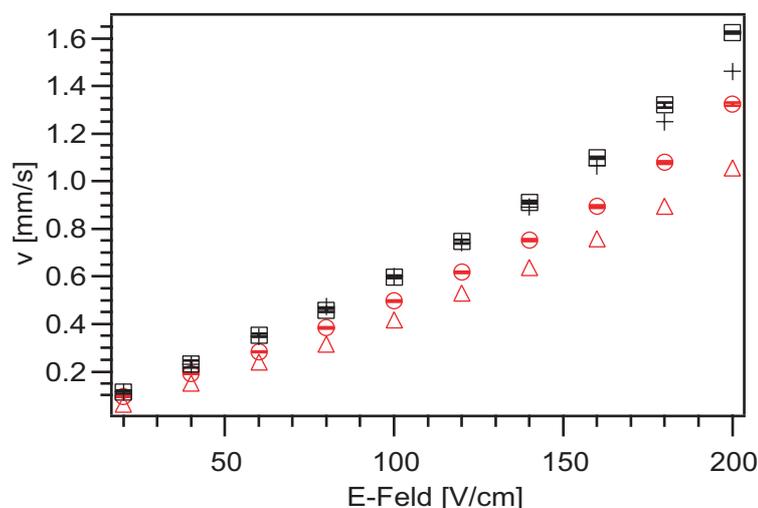


Abbildung 6.9: Vergleich der mit einem Fokus oder mit zwei Foki gemessenen Driftgeschwindigkeiten: Die ermittelten Driftgeschwindigkeiten unterscheiden sich je nach Detektionsmethode (Einzelfokus oder Doppelfokus) voneinander, wobei die mit dem Einzelfokus bestimmten Geschwindigkeiten (210 bp: Kreise; 822 bp: Dreiecke) systematisch niedriger sind als die entsprechenden mit dem Doppelfokus bestimmten (210 bp: Quadrate; 822 bp: Kreuze).

angelegtem E-Feld sichtbar (Abbildung 6.10 (a)). Hieraus lässt sich mit Hilfe von Gleichung 2.56 die effektive Mobilität berechnen, die abhängig von der genauen Position im Kanal ist. Vergleiche dazu Abbildung 6.10 (b)). Die Steigung der normierten Geschwindigkeiten der 210 bp dsDNA-Fragmente in der Kanalmitte und in der stationären Höhe unterscheiden sich deutlich, worauf im weiteren Verlauf noch näher eingegangen wird.³

Wie in Abschnitt 3.3.3.2 beschrieben, stellt sich in einem geschlossenen Kanalsystem unter dem Einfluss des elektrischen Feldes auf Grund der auftretenden Elektroosmose ein parabolisches Driftprofil ein, da der im gesamten Kanal konstanten elektrophoretischen Drift die höhenabhängige, elektroosmotische Drift überlagert ist. Die räumlich nicht konstante, elektroosmotische Bewegung ist im geschlossenen System und somit im verschwindenden Gesamtfluss begründet, da die Flüssigkeitsbewegung an der Wand durch eine Gegenbewegung in der Kanalmitte kompensiert werden muss. In diesem Zusammenhang bietet die Doppelfokus-gestützte Detektion der Driftgeschwindigkeit wiederum den Vorteil wegen der hohen Ortsauflösung, das detaillierte Geschwindigkeitsprofil im Kanal zu detektieren. Dieses Geschwindigkeitsprofil ist exemplarisch für das 210 bp dsDNA-Fragment in Abbildung 6.10 (b) gezeigt. Die temperaturkorrigierten Geschwindigkeiten lassen sich mit einem parabolischen Geschwindigkeitsprofil anpassen, aus dem sich die höhenabhängige, elektroosmotische Mobilität bestimmen lässt. Bei genauerer

³Unter der stationären Höhe versteht man die Position im Kanal, bei der die elektroosmotischen Effekte verschwinden

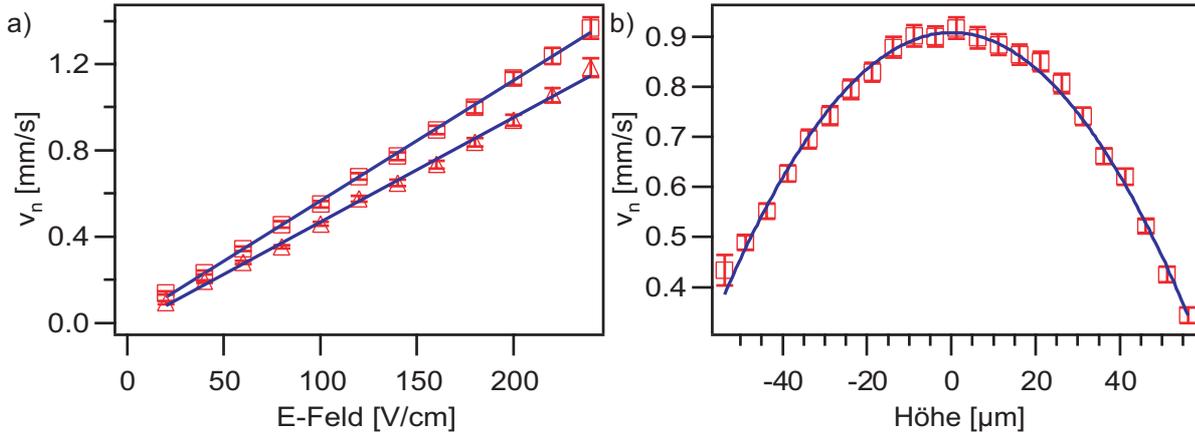


Abbildung 6.10: Temperaturkorrigierte Spannungs- und Höhenprofile der gemessenen effektiven Geschwindigkeit: (a) Es ist ein linearer Zusammenhang zwischen der temperaturkorrigierten Driftgeschwindigkeit und dem angelegten E-Feld vorhanden. Die Steigung variiert mit der Position im Kanal (Quadrate: Kanalmittelpunkte; Dreiecke: stationäre Höhenpunkte). (b) Die temperaturkorrigierte Geschwindigkeit bei einem elektrischen Feld von 160 V/cm (Quadrate) in Abhängigkeit von der Position im Kanal folgt einem parabolischen Verlauf.

Betrachtung des Profils erkennt man, dass zwar eine Höhenabhängigkeit gegeben ist, aber eine Geschwindigkeitsumkehr nicht beobachtet werden kann. Dies ist dadurch zu erklären, dass die immer gleichgerichtete, elektrophoretische Mobilität, die Elektroosmose betragsmäßig im ganzen Kanalsystem deutlich übersteigt und somit die effektive Mobilität stets die gleiche Richtung aufweist (vgl. Tabelle 6.1).

Die Ergebnisse für die unterschiedlichen dsDNA-Fragmente sind in Tabelle 6.1 und in Abbildung 6.11 zusammengefasst. Man erkennt, dass die um die Elektroosmose korrigierten, effektiven Mobilitätswerte in der Kanalmittelpunkte nahezu mit denen übereinstimmen, die in der Höhe des Kanals (stationäre Höhenpunkte) gemessen wurden, in der der elek-

dsDNA [bp]	μ_{eff} (Kanalmittelpunkte) [10^{-4} cm ² /Vs]	μ_{eff} (stat. Höhe) [10^{-4} cm ² /Vs]	μ_{eo} (Kanalmittelpunkte) [10^{-4} cm ² /Vs]	μ_{ep} [10^{-4} cm ² /Vs]
153	5,85 ± 0,14	4,60 ± 0,15	1,26 ± 0,04	4,59 ± 0,18
210	5,59 ± 0,05	4,66 ± 0,06	1,13 ± 0,04	4,46 ± 0,09
394	6,01 ± 0,16	5,01 ± 0,06	1,15 ± 0,03	4,85 ± 0,24
508	5,05 ± 0,04	4,70 ± 0,11	1,04 ± 0,03	4,01 ± 0,07
603	5,67 ± 0,05	4,54 ± 0,06	1,10 ± 0,04	4,57 ± 0,08
712	5,98 ± 0,06	4,94 ± 0,08	1,18 ± 0,03	4,80 ± 0,09
822	6,12 ± 0,11	5,06 ± 0,12	1,05 ± 0,03	5,06 ± 0,14
914	5,77 ± 0,06	4,80 ± 0,07	1,03 ± 0,02	4,74 ± 0,08

Tabelle 6.1: Mobilitäten der unterschiedlich langen dsDNA-Fragmente im elektrischen Feld

trosmotische Fluss verschwindet. Das aus der elektroosmotischen Strömung berechnete ζ -Potential der Wand (Gleichung 2.65) beträgt ungefähr -20 mV, was mit anderen Messungen am gleichen Kammer-System übereinstimmt [165]. Aus Abbildung 6.11 wird auch ersichtlich, dass die gemessene elektrophoretische Mobilität keine systematische Abhängigkeit von der dsDNA-Länge aufweist. Eine Übereinstimmung mit der in Abschnitt 2.2.2.3 vorgestellten Theorie, die eine Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der Ladungsdichte vorhersagt, die im Fall der dsDNA unabhängig von der Länge des Fragmentes ist, ist durchaus ersichtlich [166]. Allerdings haben *Stellwagen et al.* für dsDNA-Fragmente, die kleiner als 200 bp sind, eine Abnahme beobachtet bzw. postuliert [84, 85, 167, 168], die die gezeigten Messungen nicht bestätigen.

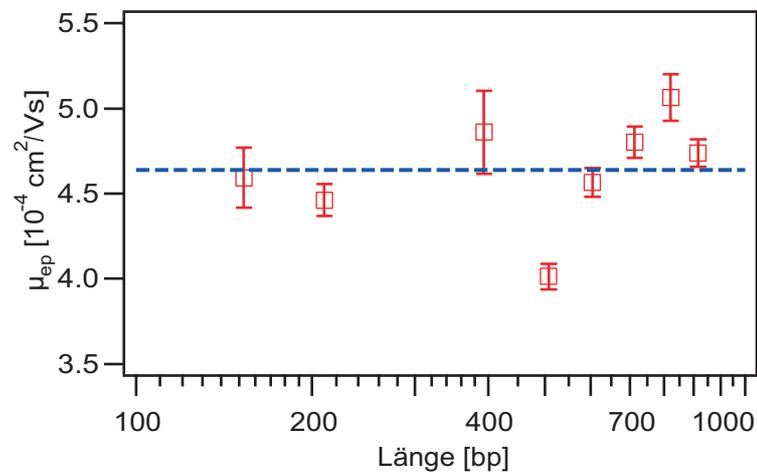


Abbildung 6.11: Elektrophoretische Mobilität in Abhängigkeit von der Länge der dsDNA-Fragmente: Es ist keine systematische Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der dsDNA-Fragmentlänge zu erkennen.

In weiterführenden Experimenten wurde versucht, die mit dem Messaufbau sehr gut zu charakterisierende Elektroosmose mit Hilfe von lipidbeschichteten Wänden auszulöschen; zur Beschichtung wurden unterschiedliche Mischungen aus neutralen bzw. zwitterionischen (DOPC⁴) und kationischen (DOTAP) Lipiden verwendet. Die Messungen an entsprechend präparierten Kammern machen deutlich, dass hierdurch die Elektroosmose reduziert werden kann, was sich in einer kleineren Krümmung der höhenabhängigen Flussprofile widerspiegelt. Dieser Effekt konnte durch einen höheren Anteil an kationischen Lipiden verstärkt werden. Eine vollständige Unterdrückung der Elektroosmose war nicht möglich.

⁴Abkürzung für das Lipid 1,2-Dioleoyl-sn-Glyzero-3-Phosphocholin

6.2.4 Zusammenhang zwischen Diffusion und elektrophoretischer Drift

In den vorausgegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die mit dFFCS gemessenen elektrophoretischen Mobilitäten auf kleinen Längenskalen sehr gut bestimmt werden können. Darüber hinaus ist fraglich, ob es mit dem Aufbau auch gleichzeitig möglich ist, die diffusiven Eigenschaften analog zu den Messungen mit einem Fokus (vgl. Abschnitt 4.1) charakterisieren zu können. Dies würde das Potential eröffnen, bei Kenntnis der elektrostatischen Kraft und der Reibungskraft detaillierte Aussagen über die Kraftrelationen in den Elektrophorese-Experimenten treffen zu können.

In Abbildung 6.12 ist der Vergleich der unter feldfreien Bedingungen erfolgten Messungen der freien Diffusion mit dem konventionellen FCS- und dem dFFCS-Aufbau zu sehen. Sie zeigen, dass mit beiden Arten der Beleuchtung trotz der leichten Unterschiede in der fokalen Ausdehnung vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können. Das unterstreicht das Potential der dFFCS-Methode, neben der elektrophoretischen Drift gleichzeitig auch die Diffusion bestimmen zu können.

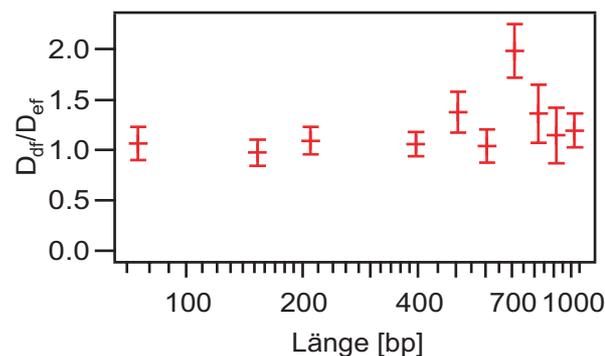


Abbildung 6.12: Verhältnis der mit konventionellen FCS und mit der Doppelfokus-Beleuchtung gemessenen freien Diffusion: Die Messung der freien Diffusion unter Verwendung der unterschiedlichen Beleuchtungen liefert vergleichbare Ergebnisse.

Es stellt sich nun bezüglich der Messdaten die Frage, welche Kräfte des im theoretischen Kapitel vorgestellten Kraftbildes berücksichtigt werden müssen, um die erzielten Ergebnisse erklären zu können (vgl. Abschnitt 2.2.2.3). Wären die elektrostatische Kraft und die Reibungskraft die ausschließlich dominierenden Kräfte im System, so sollten die experimentellen Ergebnisse im Bezug auf die Mobilität und die freie Diffusion die *Nernst-Einstein-Relation* erfüllen, die für den in Gleichung 2.60 definierten Quotienten einen konstanten Wert vorhersagt. Vergleicht man die Diffusionskonstanten der hier verwendeten dsDNA-Fragmente (Abbildung 4.6) mit der elektrophoretischen Mobilität (Abbildung 6.11), erkennt man, dass hier keine gleichgeartete Längenabhängigkeit vorliegt. Während die Diffusionskonstante in erster Näherung mit $\ln L/L$ skaliert, ist im Hinblick auf die Mobilität keine Abhängigkeit von der Länge festzustellen. In der Tat ist für die gemessenen dsDNA-Fragmente diese Relation nicht konstant, sondern nimmt mit

zunehmender Länge von ca. 6 V^{-1} ab (Abbildung 6.13 (a)) und liegt folglich deutlich unterhalb des erwarteten Wertes von $39,6 \text{ V}^{-1}$.

Für die Abweichungen von der *Nernst-Einstein-Relation* sind zwei Aspekte maßgeblich. Zum einen wurden bis jetzt die postulierte Gegenionen Kondensation auf der DNA vernachlässigt, die allerdings im Fall von DNA durchaus einen signifikanten Einfluss hat (vgl. Abschnitt 2.2.2.2 für die theoretische Betrachtung). Für DNA erwartet man, dass 76% der Ladungen durch Gegenionen abgeschirmt sind und keinen Beitrag zur elektrophoretischen Kraft liefern. Trägt man den mit Hilfe der experimentellen Ergebnisse ermittelten Quotienten aus tatsächlich gemessener Ladung q_{eff} , die aus der *Nernst-Einstein-Relation* bestimmt wurde, und der nominalen Ladung q_{nom} gegen die Fragmentlänge auf, liegt dieser jeweils wieder deutlich unterhalb des durch die *Manning-Theorie* vorhergesagten Wertes (Abbildung 6.13 (b)).

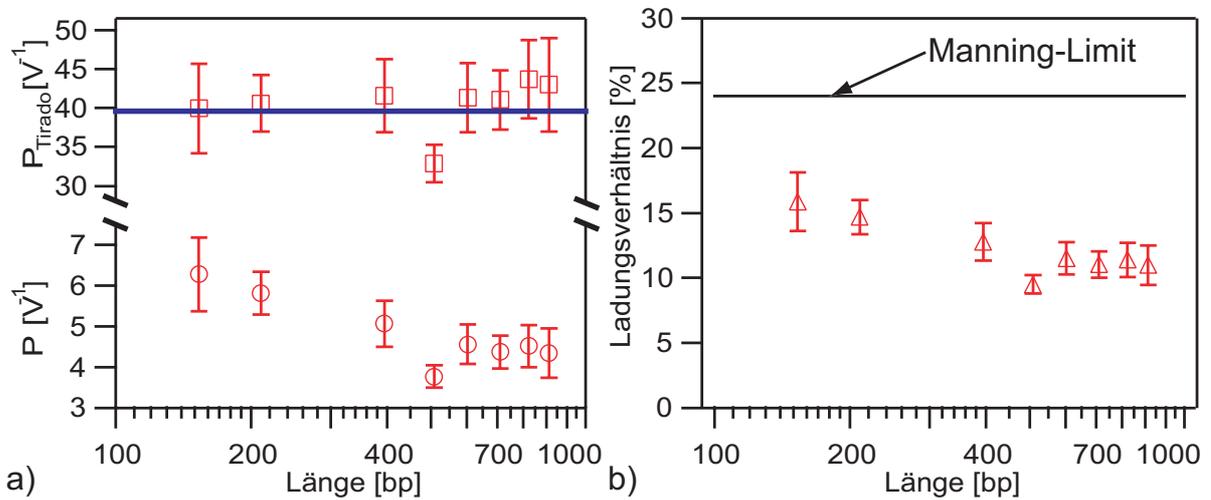


Abbildung 6.13: Darstellung des Zusammenhangs zwischen freier Diffusion und elektrophoretischer Mobilität: (a) Verknüpft man die freie Diffusion mit der elektrophoretischen Mobilität in der Form, wie es die *Nernst-Einstein-Relation* vorhersagt, so kann keine Konstante für die Relation ermittelt werden (Kreise). Das ist erst bei einer Reskalierung mit der Steigung der freien Diffusion der Fall (Quadrate). (b) Die aus der *Nernst-Einstein-Relation* ermittelte effektive Ladung der DNA liegt unterhalb des von *Manning* vorhergesagten Limits, was darauf hindeutet, dass neben der Reibungskraft und der elektrophoretischen Kraft noch weitere Kräfte einen merklichen Einfluss auf die Bewegung im elektrischen Feld haben.

Diese Tatsache weist darauf hin, dass weitere Kräfte, z. B. die Retardierungskräfte durch die Gegenionenwolke (vgl. Abschnitt 2.2.2.3), zur vollständigen Beschreibung der elektrophoretischen Messungen berücksichtigt werden müssen. Eine entsprechende von *Manning* entwickelte Theorie, die neben der elektrostatischen Kraft und der Reibungskraft auch die hydrodynamischen Wechselwirkungen berücksichtigt [169, 170], kann die experimentell ermittelten Werte für die Mobilität in freier Lösung gut beschreiben [83]. Nach dieser Theorie berechnet sich die elektrophoretische Mobilität zu

$4,35 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2/\text{Vs}$, was in guter Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit bestimmten Wert ist. Für einen vollständigen Vergleich zur Theorie müsste weiterführend die Salzabhängigkeit bestimmt werden.

Um zu veranschaulichen, welchen Einfluss die Retardierungseffekte der Gegenionenwolke haben, wird ein phänomenologisches Modell eingeführt, das durch Arbeiten von *Stellwagen et. al* inspiriert ist [171]. Bildet man folgenden Quotienten:

$$P_{Tirado} = \frac{\mu}{D} \frac{1}{z} A \quad (6.2)$$

wobei A dem Korrekturglied im *Tirado-Modell* in Gleichung 2.43 entspricht, so erfüllt dieser die Bedingung der *Nernst-Einstein-Relation* (Abbildung 6.13 (a)). Es ist zu klären, wie dies zu Stande kommt und welche physikalische Aussage daraus zu treffen ist. Schreibt man die Diffusionskonstante in Gleichung 6.2 ebenso in der Form für einen steifen Stab nach Gleichung 2.42, dann erhält man folgenden Ausdruck:

$$P_{Tirado} = \frac{\mu}{D} \frac{1}{z} A = \mu \frac{3\pi\eta z a}{Ak_b T} \frac{1}{z} A = \mu \frac{3\pi\eta a}{k_b T} = konst. \quad (6.3)$$

Jener Zusammenhang impliziert, dass durch die hydrodynamische Wechselwirkung die weitreichende Reibungskraft derart abgeschirmt wird, dass sich DNA gleich einem fiktiven Monomer im elektrischen Feld bewegt. Das ist in Übereinstimmung mit den theoretischen Vorhersagen in Gleichung 2.62, die eine Abschirmung auf der Länge der Debye-Länge annimmt, welche bei den hier vorliegenden experimentellen Bedingungen die gleiche Größenordnung wie die Monomerausdehnung aufweist.

6.2.5 Diffusionslimitierte Auflösung

Im Hinblick darauf, die dFFCS-gestützte Mikroelektrophorese zur Auftrennung unterschiedlicher Fragmente zu nutzen, ist es notwendig, aus den im Experiment detektierten Breiten σ der gaußschen Maxima die theoretisch erreichbare Auflösung näher zu analysieren. Die Berechnungen der Autokorrelationsbreiten in Abschnitt 6.2.2 bezogen neben der Diffusion der Partikel auch die endliche Ausdehnung des Detektors in Form der auflösungslimitierten FCS-Foki mit ein. Es taucht die Frage auf, welche der beiden Prozesse, die Diffusionsverbreiterung oder die endliche Ausdehnung des Detektors, die Auflösung der Maxima bzw. die Auftrennung verschiedener Maxima limitiert. Hierzu wurde die in Gleichung 6.4 definierte Bodenzahl berechnet, die eine Aussage über die Güte und das Auftrennpotential der Methode liefert.

$$N = \left(\frac{\tau_{Drift}^{kk}}{\sigma} \right)^2 \quad (6.4)$$

τ_{Drift}^{kk} bezeichnet die über die Kreuzkorrelation ermittelte Driftzeit zwischen den beiden Foki.

Eine exemplarische Zusammenstellung dieser Ergebnisse veranschaulicht Tabelle 6.2. Tendenziell ist zu erkennen, dass die aus der experimentell ermittelten Standardabweichung (σ_{exp}) berechnete Bodenzahl weitgehend mit der aus den theoretisch berechneten Standardabweichungen ($\sigma_{theorie}$), die sowohl Diffusion als auch Detektorausdehnung berücksichtigen, übereinstimmt und beide mit abnehmenden E-Feld sinken. Das heißt, dass das Experiment immer mehr durch die Verbreiterung der Bande bestimmt wird, womit ein mögliches Auflösungspotential mit abnehmenden elektrischen Feld sinkt. Interessant erscheint nun die getrennte Analyse der offensichtlich wichtigsten Verbreiterungsmechanismen. Wäre die Detektorausdehnung der begrenzende Faktor so würde man eine konstante Bodenzahl erwarten (N_{fokus}), die nur durch den Abstand der beiden Foki und der Fokusgröße selbst limitiert wird. Die hieraus berechnete Bodenzahl liegt aber konstant bei ca. 900, was deutlich über dem experimentell ermittelten Wert liegt. Im Gegensatz dazu zeigt die nur über die Diffusionsverbreiterung definierte Bodenzahl (N_{diff}) den aus dem Experiment erwarteten Verlauf, allerdings liegen die Werte oberhalb der theoretischen Bodenzahl ($N_{theorie}$), die beide Verbreiterungsmechanismen berücksichtigt.

E-Feld [V/cm]	τ_F [μ s]	σ_{exp} [μ s]	σ_{theo} [μ s]	N_{exp}	N_{theo}	N_{diff}	N_{fokus}
240	2931	341,4	237,2	73,7	152,7	183,7	903,5
220	3400	370,7	285,9	84,1	141,5	167,7	903,5
200	3858	400,2	335,4	92,9	132,4	155,1	903,5
180	4552	500,3	416,9	82,9	119,2	137,4	903,5
160	5265	633,5	504,3	69,1	109,0	123,9	903,5
140	6274	814,7	639,9	59,3	96,1	107,6	903,5
120	7382	1003,5	796,8	54,1	85,8	94,8	903,5
100	9322	1359,6	1104,7	47,0	71,2	77,3	903,5
80	11524	2096,6	1488,0	30,2	60,0	64,2	903,5
60	15588	2113,6	2296,4	54,4	46,1	48,6	903,5
40	23246	3595,1	4119,5	41,8	31,8	33,0	903,5
20	39325	9345,1	8993,0	17,7	19,1	19,5	903,5

Tabelle 6.2: Auflösungspotential der Doppelfokus-gestützten Mikroelektrophorese

Wegen dieser Kenntnisse ist es möglich, eine erfolversprechende Strategie abzuleiten, wie die Effizienz des vorgestellten Mikroelektrophoreseaufbaus gesteigert und lediglich durch das Detektorsystem limitiert werden kann. Es wäre nur über eine weitere Reduktion der Driftzeit und damit über eine deutliche Erhöhung des elektrischen Feldes vorstellbar. Unter der Annahme, dass beide Effekte gleichmäßig zur Auflösungsbegrenzung beitragen, müsste in der Kammer ein elektrisches Feld im Bereich von 1000 V/cm herrschen, was experimentell nur mit sehr hohem Aufwand und mit einer effektiven Kühlung des Systems möglich wäre. Hier wäre wissenswert, wieso auf den typischen Zeit- und Längenskalen (~ 40 cm Länge, ~ 10 min Laufzeit), die in der Kapillarelektrophorese

verwendet werden, deutlich höhere Bodenzahlen erreicht werden. Es wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass bei konstanter Geschwindigkeit, der zurückgelegte Driftweg linear mit der Zeit wächst, während die Diffusionsverbreiterung lediglich mit \sqrt{t} skaliert. Das impliziert, dass die Bodenzahl mit zunehmender Laufzeit anwächst. Dadurch wird deutlich, dass auf kleinen Längen- und Zeitskalen, die für das beschriebene Mikroelektrophoresesystem gelten, die Diffusion sehr effektiv ist und zum limitierenden Faktor bezüglich des Auflösungs potentials wird.

6.3 dsDNA-Elektrophorese in physikalischen Netzwerken

Die Elektrophorese-Experimente in wässriger Lösung, die im vorausgegangen Abschnitt analysiert wurden, zeigen, dass es möglich ist, mit Hilfe von dFFCS-gestützter Mikroelektrophorese, präzise Messungen der elektrophoretischen Mobilität vorzunehmen. Dabei wurde deutlich, dass das verwendete Detektionssystem eine genaue Charakterisierung der Elektrosmose erlaubt. Es bleibt festzuhalten, dass bei den verwendeten Analyselängen (5,4 μm) und Feldstärken (maximal 240 V/cm) die Diffusion das mögliche Auflösungspotential für unterschiedliche Mobilitäten limitiert. Da die elektrophoretische Mobilität in freier Lösung lediglich von der Ladungsdichte abhängt, die für dsDNA näherungsweise unabhängig von der Länge der dsDNA-Fragmente ist, konnte das mögliche Auftrennpotential noch nicht unter Beweis gestellt werden. Das Verhalten

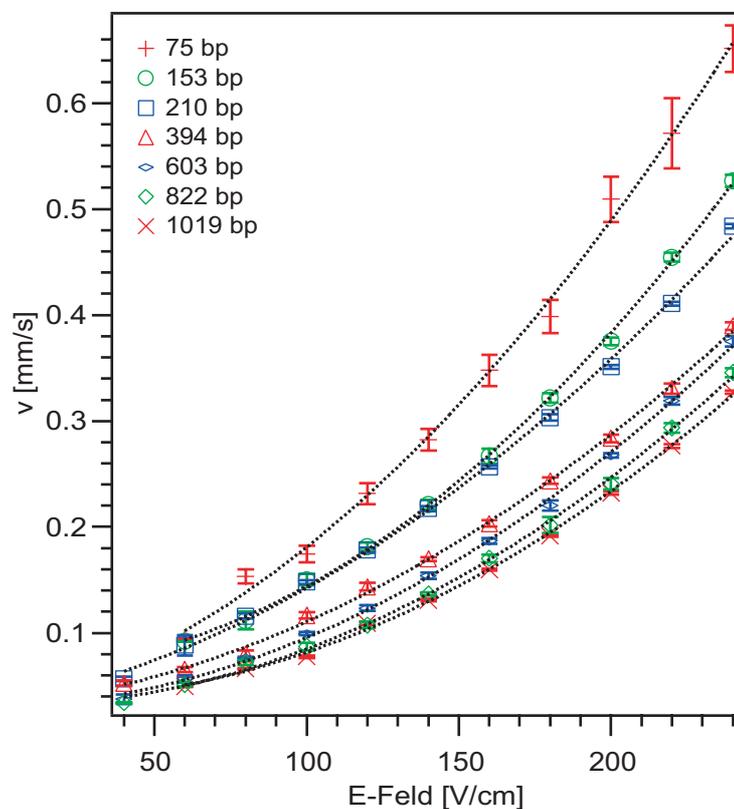


Abbildung 6.14: Driftgeschwindigkeiten in einem physikalischen Netzwerk in Abhängigkeit von der dsDNA-Länge und dem angelegten elektrischen Feld: Die Driftgeschwindigkeit im PEO-Netzwerk für verschiedene dsDNA-Fragmente (Längenangabe in der Legende) unterscheiden sich, wobei die Differenzen mit zunehmender dsDNA-Fragmentlänge deutlich abnehmen. Die Geschwindigkeit wurde aus dem Abstand der Foki und der aus der Kreuzkorrelation gewonnenen Driftzeit berechnet. Die gestrichelten Linien stellen einen parabolischen Fit der Daten dar, der der Nichtlinearität Rechnung trägt.

von dsDNA sollte sich nun allerdings ändern, wenn die Elektrophorese in einem Polymernetzwerk, hier in einem physikalischen PEO-Netzwerk, durchgeführt wird. Es sollte eine Längenabhängigkeit der Mobilität gegeben sein, die in Abschnitt 5.1 bereits zur Analyse der PON-Strukturen vorgestellt und in Kapilarelektrophorese-Experimenten mit gleichen Polymernetzwerken bereits demonstriert wurde [172, 173, 174, 175]. Der verwendete Aufbau wirft die Frage auf, ob auf einer Länge von 5 μm eine effektive Längenauftrennung möglich ist.

In der Tat unterscheiden sich die elektrophoretischen Geschwindigkeiten unterschiedlich langer dsDNA bei entsprechenden E-Feldern deutlich voneinander (Abbildung 6.14). Die unterschiedlichen dsDNA-Fragmente wurden getrennt voneinander charakterisiert. Es wird deutlich, dass erneut eine Nichtlinearität der Geschwindigkeit bezüglich des angelegten E-Feldes zu beobachten ist; das gibt auch in diesem Fall einen Hinweis auf eine verstärkte Erwärmung der Elektrophoresekammer mit zunehmenden elektrischen Feld. Ein Vergleich der Geschwindigkeitsunterschiede zwischen den unterschiedlichen dsDNA-Fragmenten lässt eine Abnahme mit zunehmender dsDNA-Länge erkennen.

Wenn man die in Abbildung 6.15 dargestellte Abhängigkeit der Driftgeschwindigkeit von der Messposition im Kanal betrachtet, wird deutlich, dass keine systematische Höhenabhängigkeit gegeben ist. Dies zeigt klar, dass elektroosmotische Effekte meist durch das PEO-Netzwerk unterdrückt werden. Das Polymernetzwerk unterbindet demnach erfolgreich die Flüssigkeitsströmungen, wobei die Messung nicht unterscheiden kann, ob die Oberflächenladungen abgesättigt oder lediglich die Strömung des Elektrolyten effektiv verhindert wird.

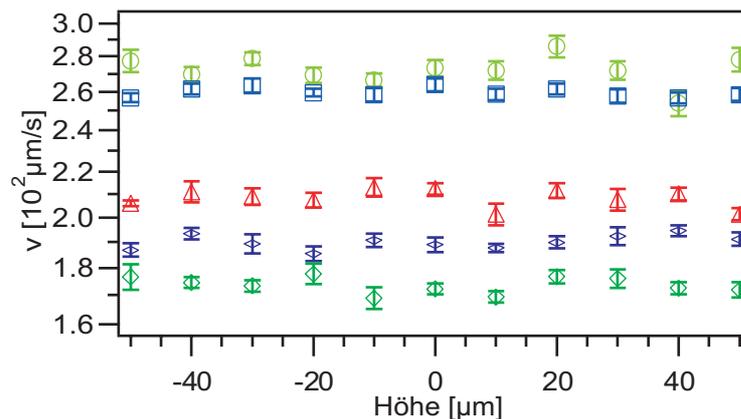


Abbildung 6.15: Driftgeschwindigkeiten in einem physikalischen Netzwerk in Abhängigkeit von der Position im Kanal: Die Driftgeschwindigkeiten zeigen keine systematische Abhängigkeit von der Messposition im Kanal. Die Symbole entsprechen denen aus Abbildung 6.14.

6.3.1 Temperatureffekte

Aus den in Abbildung 6.14 gezeigten Geschwindigkeitsprofilen in Abhängigkeit vom angelegten E-Feld wird deutlich, dass es auf Grund des dort beobachteten nichtlinearen Geschwindigkeitsverlaufs auch in den PEO-Lösungen zu einer Erwärmung der Elektrophoresekammer kommt, die nicht vernachlässigt werden kann. Das erklärt in diesem Fall ebenso die Auftragung der über alle Proben gemittelten reduzierten Stromstärke (I/E) als Funktion des elektrischen Feldes (Abbildung 6.16 (a)). Auch hier ist eine signifikante Erhöhung bei Feldstärken von über 80 V/cm zu beobachten. Die unmittelbare Übertragung der reduzierten Stromstärke auf die Viskosität des Systems und damit auf die Temperatur gestaltet sich schwieriger, weil neben der Viskosität von Wasser auch die des gelösten Polymers berücksichtigt werden muss. Die Viskosität der verwendeten PEO-Lösung und deren Temperaturabhängigkeit wurde in Abschnitt 3.3.3.3 ausgeführt. Unter Verwendung dieser Ergebnisse ist es möglich, die mittlere Temperatur in der Elektrophoresekammer zu berechnen (vgl. 6.16 (b)). Man erkennt hier ebenfalls, dass es bei zunehmendem E-Feld zu einer deutlichen Erhöhung der Temperatur kommt, die mit den entsprechenden Werten in wässriger Lösung vergleichbar ist. Im weiteren Verlauf der Bewertung der experimentellen Ergebnisse wird aber davon abgesehen, die Geschwindigkeit bezüglich der Temperatur zu korrigieren, da im Folgenden jeweils nur Daten bei gleicher Feldstärke miteinander verglichen werden.

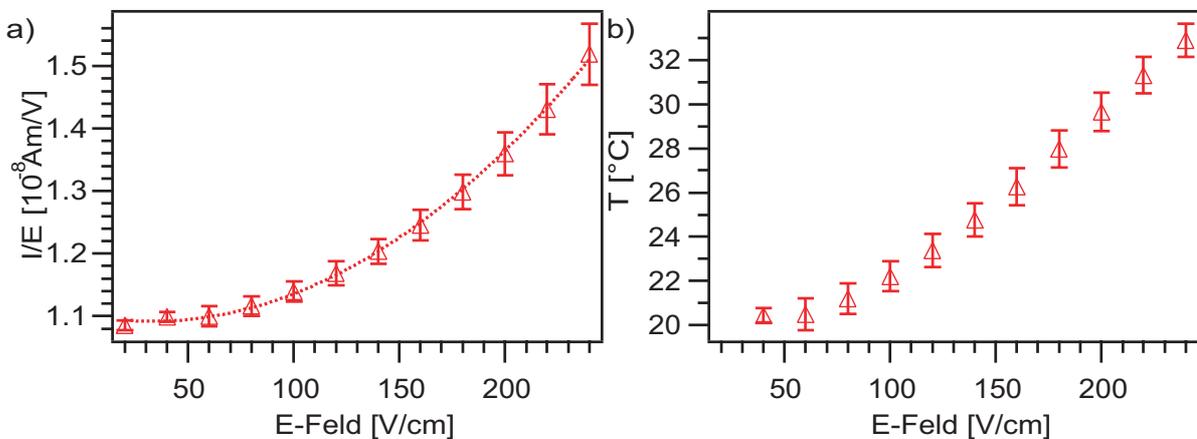


Abbildung 6.16: Reduzierter Strom und die daraus resultierende Temperatur in der Elektrophoresekammer: (a) Der reduzierte Strom (Dreiecke) kann mit einem parabelförmigen Profil (gestrichelte Linie) angepasst werden. (b) Die Elektrophoresekammertemperatur (Dreiecke) steigt mit zunehmender Feldstärke deutlich an.

6.3.2 Auftrennpotential

Bis jetzt konnte demonstriert werden, dass die Driftgeschwindigkeit der dsDNA-Fragmente in PEO-Netzwerken nicht nur vom angelegten E-Feld, sondern auch von der

dsDNA-Länge abhängt. Darüber hinaus soll analysiert werden, wie groß das Auftrennpotential zwischen unterschiedlichen dsDNA-Fragmenten ist und welche Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke besteht.

Trägt man die ermittelten Driftgeschwindigkeiten für unterschiedliche Feldstärken doppellogarithmisch gegen die Länge der dsDNA-Fragmente auf, so ist für alle Feldstärken ein Zusammenhang über ein Potenzgesetz zu erkennen ($v \propto L^{-\iota}$; Abbildung 6.17 (a)). Vergleicht man die Exponenten ι miteinander, variieren diese nur geringfügig um 0,3, wobei eine Abnahme für höhere Felder (>180 V/cm) zu beobachten ist (Abbildung 6.17 (b)). Neben der Größe des Exponenten ist weiterhin die Breite der gaußschen Kreuzkorrelation und folglich die Bodenzahl von entscheidender Bedeutung für

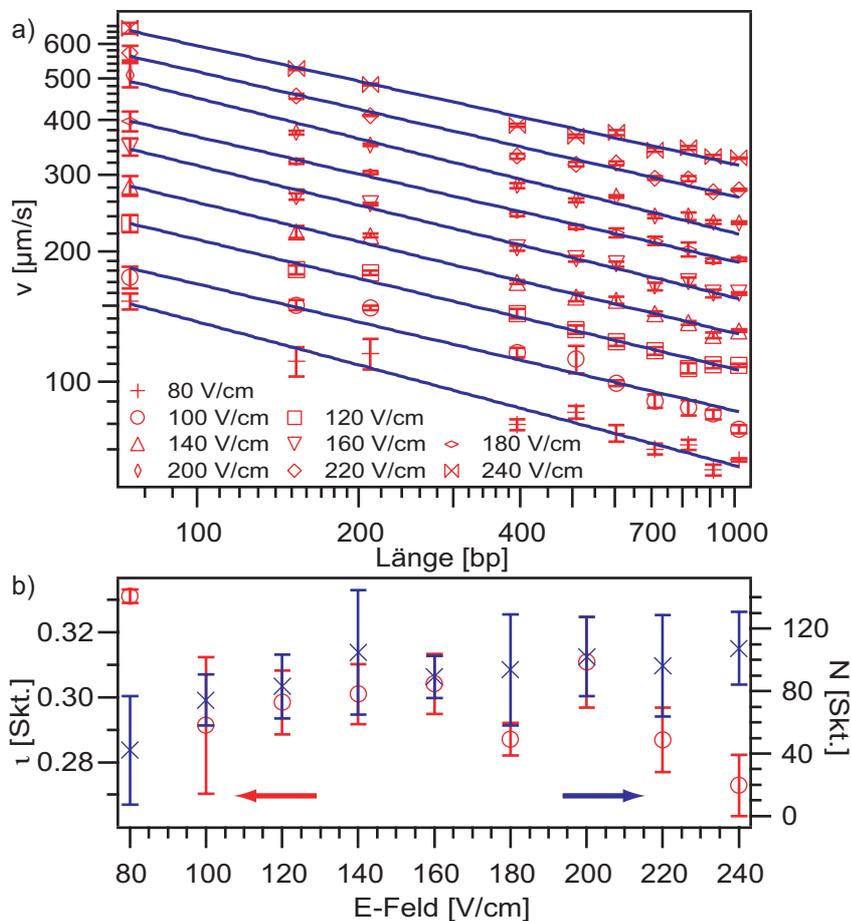


Abbildung 6.17: Doppellogarithmische Darstellung der elektrophoretischen Driftgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der dsDNA-Länge für unterschiedliche E-Felder: (a) Die Driftgeschwindigkeiten skalieren über ein Potenzgesetz mit dsDNA-Länge (durchgezogene Linien). Die Feldstärken sind in der Legende angegeben (b) Sowohl der Exponent des Potenzgesetzes (Kreise) als auch die Bodenzahl (Kreuze) zeigen eine tendenzielle Abhängigkeit von der Feldstärke, während sie sich jeweils gegensätzlich verändern .

die Auflösung, da eine hohe Schärfe des Maximums ein großes Trennpotenzial induzieren würde. Bezüglich der Bodenzahl ist zu erkennen, dass dies über alle verwendeten dsDNA-Fragmente hinweg tendenziell zunimmt und sein Maximum bei 240 V/cm mit ca. 107 erreicht, jedoch ist die Streuung hierbei sehr groß. In diesem Zusammenhang ist natürlich zu erwähnen, dass sich mit zunehmender Feldstärke auch das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis deutlich verbessert; das ermöglicht eine einfachere Detektion und unter Umständen kürzere Messzeiten.

Abbildung 6.17 (a) verdeutlicht, dass es prinzipiell möglich ist, unterschiedlich lange dsDNA zu unterscheiden und aufzutrennen. Außerdem soll eine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch die Auflösung ist und welche physikalischen Effekte hier limitierend wirken. Aus diesem Grund wurde die Auflösung Γ , d. h. die Basenpaardifferenz, die notwendig ist, damit zwei unterschiedlich lange dsDNA-Fragmente aufgetrennt werden können, in Abhängigkeit der dsDNA-Länge für die unterschiedlichen Feldstärken berechnet. Sie ist folgendermaßen definiert:

$$\Gamma = N_2 - N_1 = N_2(t_1 + 3\sigma(N_1(t_1))) - N_1(t_1) = N_1(t_1) \exp\left(\frac{1}{\iota} \ln\left[1 + 3\frac{\sigma}{t_1}\right]\right) \quad (6.5)$$

Dabei entspricht t_1 der elektrophoretischen Driftzeit des Fragments mit der Länge N_1 und σ der Standardbreite des gaußschen Maximums um t_1 , die unten genauer definiert wird. ι beschreibt die Längenabhängigkeit der elektrophoretischen Drift im Potenzgesetz für das entsprechend angelegte elektrische Feld (vgl. Abbildung 6.17).

Da die Driftgeschwindigkeiten mit der dsDNA-Länge bereits über ein Potenzgesetz miteinander verknüpft sind, ist der gleiche Zusammenhang auch für die Anzahl der noch auftrennbaren Basenpaare und der dsDNA-Länge zu erwarten, was Abbildung 6.18 verdeutlicht. Den größten Einfluss auf die Auflösung hat neben dem Exponenten die Bodenzahl und somit das Verhältnis aus Driftzeit und deren Standardabweichung. Dies erklärt, warum für 140V/cm die beste Auflösung berechnet wird. Tendenziell ergibt aber das Experiment, dass die Auflösung mit zunehmender Feldstärke verbessert wird. Es zeigt sich, dass der Mindestunterschied zwischen zwei zu trennenden dsDNA-Fragmenten selbst im Fall von 70 bp mindestens 100 bp bis 200 bp betragen muss, um eine Auftrennung in zwei separate Maxima zu beobachten. So gesehen besteht kaum die Möglichkeit, hochauflösende Elektrophorese in diesem Aufbau zu betreiben, bei der dsDNA mit einem Längenunterschied von wenigen Basenpaaren aufgetrennt werden kann.

Analog zu den Messungen in freier Lösung wäre es auch hier gut zu wissen, welcher Effekt die Auflösung innerhalb des Mikroelektrophoresesystems limitiert. Berechnet man jeweils die entsprechende Auflösung, die bezüglich σ entweder die Diffusion oder die Fokusgröße bzw. beide Effekte berücksichtigt, so erkennt man, dass auch in diesem Fall erneut die Diffusion den limitierenden Effekt darstellt. Aus Abbildung 6.18 wird ersichtlich, dass die experimentellen Daten weitestgehend durch die Berücksichtigung beider Effekte beschrieben werden können. Diese Ergebnisse zeigen wiederum, dass hochauflösende Elektrophorese auf kurzen Driftlängen nur schwierig zu realisieren ist, da

die Diffusion eine dominante Rolle spielt. Aber selbst wenn die Diffusion als limitierender Faktor vernachlässigt werden könnte und alleinig die Fokusausbildung die Auflösung definieren würde, wäre es lediglich möglich, 100 bp von 150 bp zu unterscheiden. Diese im Vergleich zu CE-Experimenten geringe Auflösung wird aber durch die methodischen Vorteile wie die schnellere Messung und die deutlich kürzere Driftlänge kompensiert. Jene Vorteile könnten vor allem im Bezug auf eine weitere Miniaturisierung der Elektrophorese wie z. B. bei Chip-Elektrophorese-Experimenten von großem Vorteil sein, bei denen es weniger auf eine hohe Auftrennungskapazität ankommt.

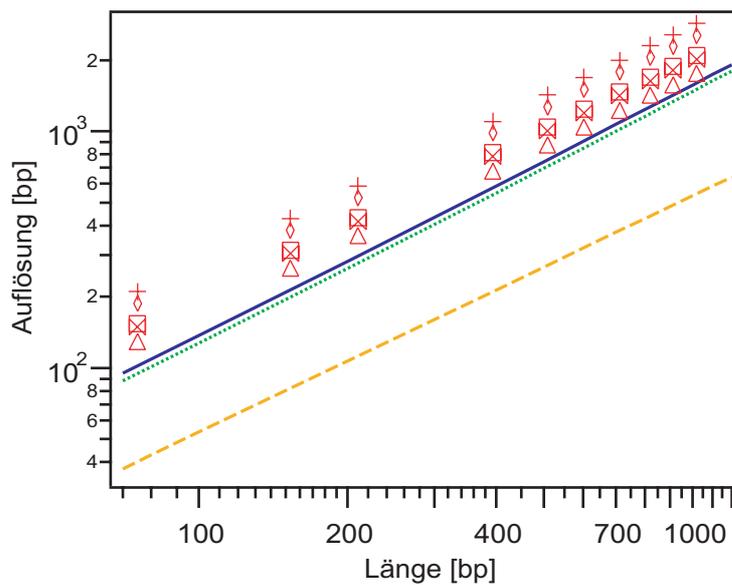


Abbildung 6.18: Auflösungsvermögen des Mikroelektrophoreseaufbaus: Das experimentelle Auflösungspotential hängt über ein Potenzgesetz mit der dsDNA-Länge zusammen. Vergleicht man sie mit dem theoretisch vorhergesagten Auflösungspotential, das die Diffusion (gepunktete Linie), die Fokusgröße (gestrichelte Linie) oder beide Effekte (durchgezogene Linie) berücksichtigt, dann erkennt man, dass auch in diesem Fall die Diffusion den limitierenden Faktor darstellt.

6.3.3 Nachweis der dsDNA-Auftrennung auf kleinen Längenskalen

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde, dass es prinzipiell möglich ist, dsDNA unterschiedlicher Länge auf einer Wegstrecke von ca. 5 μm aufzutrennen, zeigen Messungen an Probengemischen, die zwei unterschiedlich lange dsDNA-Fragmente enthalten, dass dies experimentell beobachtet werden kann. In Abbildung 6.19 (a) sind die Ergebnisse für eine Mischung aus 210 bp und 1019 bp dargestellt. Es sind deutlich zwei voneinander getrennte gaußsche Maxima sichtbar, die den beiden unterschiedlichen Fragmenten zugeordnet werden können. Die beiden Maxima sind selbst für niedrige Spannungen klar voneinander getrennt. Für höhere Spannungen überlappen die

Peaks immer mehr, was auf eine reduzierte Auflösung hindeutet. Die Experimente vermitteln, dass das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis mit zunehmender Feldstärke für das längere dsDNA-Fragment stärker zunimmt als beim kürzeren dsDNA-Fragment. Dieses nahezu konstante Signal-zu-Rauschen-Verhältnis konnte in der Art und Weise nicht in der Probe, die nur jenes kürzere dsDNA-Fragment enthält, nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass der Effekt durch Wechselwirkung der beiden dsDNA-Fragmente miteinander oder mit dem Polymernetzwerk entsteht. Trotzdem ist es für die Messungen notwendig, die Konzentrationen etwa gleich zu wählen, da sie sich dennoch unmittelbar auf die Amplitude der Maxima auswirken.

Über den prinzipiellen Nachweis hinaus, dass eine Auftrennung unterschiedlich langer dsDNA-Fragmente möglich ist, muss die Frage beleuchtet werden, inwieweit das vorhergesagte Auflösungspotential tatsächlich erreicht wird. Abbildung 6.19 (b) stellt die Kreuzkorrelationsrohdaten für unterschiedliche Mischungen aus zwei dsDNA-Fragmenten bei 160 V/cm dar. Während es für kleine Längenunterschiede lediglich zu einer deutlich sichtbaren Verbreiterung des Maximums in der Kreuzkorrelation kommt (Mischung aus 210 bp & 394 bp) ist für größere Längenunterschiede eine gemessene Auflösung von zwei getrennten Peaks zu beobachten. Das stimmt durchaus mit dem im vorhergehenden Abschnitt postulierten Auflösungspotential, von einigen hundert Basenpaaren in diesem Längenbereich, überein. Ein exakter Vergleich gestaltet sich aber auf Grund der unterschiedlichen Amplituden der Peaks als schwierig.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass der Nachweis von elektrophoretischer Drift auf kleinen Längenskalen möglich ist, wobei ebenso elektroosmotische Einflüsse sehr genau charakterisiert werden können. Die Messungen haben auch verdeutlicht, dass sowohl in freier Lösung als auch in physikalischen Polymernetzwerken auf den verwendeten kleinen Längenskalen die Diffusion den limitierenden physikalischen Effekt bezüglich des Auflösungspotentials darstellt. Während die elektrophoretische Mobilität in wässriger Lösung unabhängig von der dsDNA-Länge ist, lassen sich deutliche Unterschiede in der Driftgeschwindigkeit für unterschiedlich lange dsDNA-Fragmente in PEO-Lösungen beobachten. Die Auftrennung von dsDNA-Fragmenten ist auf kleinen Längenskalen von ca. 5 μm möglich.

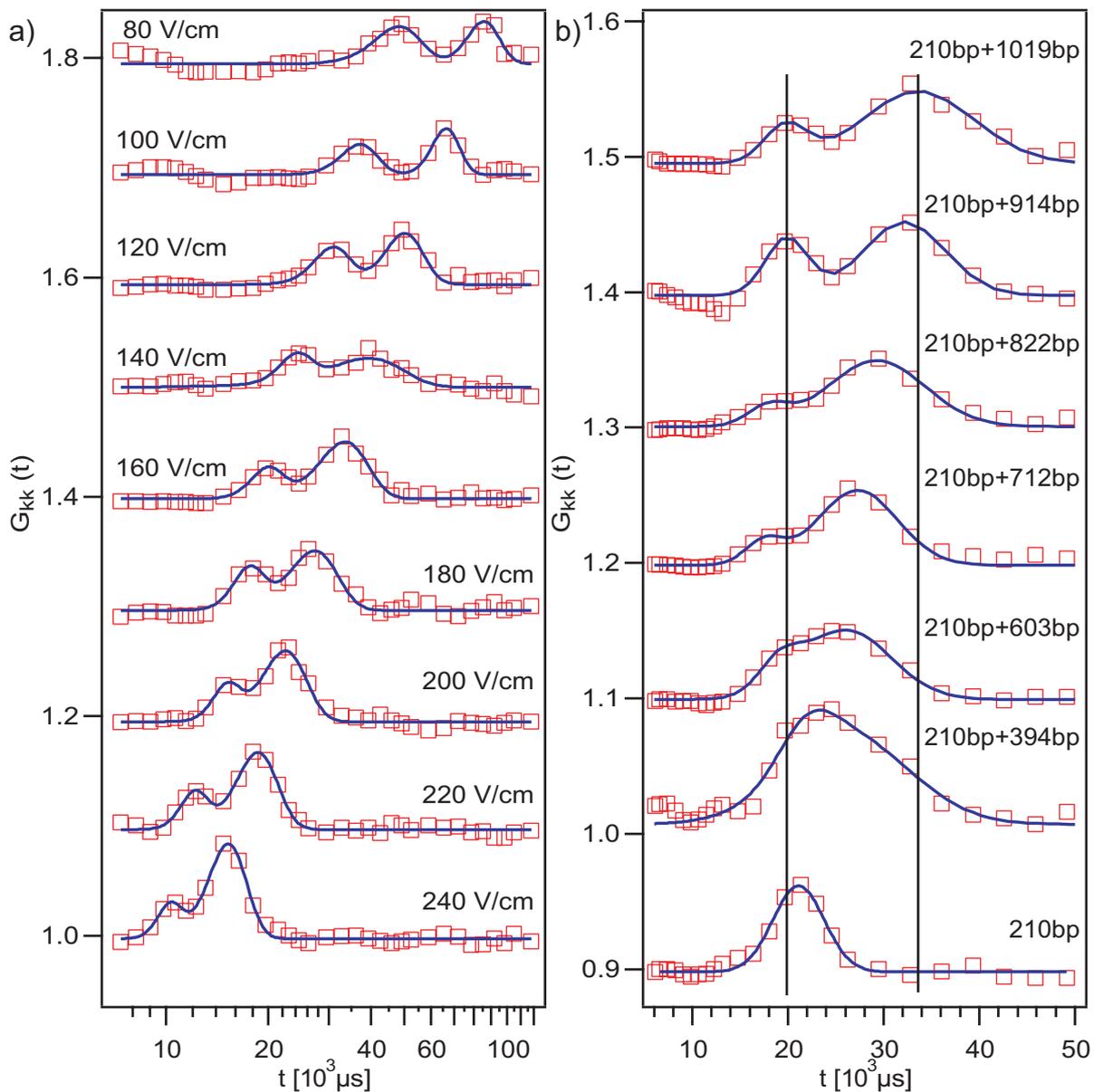


Abbildung 6.19: Auftrennung unterschiedlich langer dsDNA-Fragmente im elektrischen Feld: (a) E-Feld-abhängige Messungen der elektrophoretischen Drift zeigen in einer Probe, die zwei unterschiedlich lange dsDNA-Fragmente (210 bp & 1019 bp) enthält, zwei klar voneinander getrennt auflösbare Maxima in der Kreuzkorrelation. Auf Grund der sich unterschiedlich verändernden Amplitude der Maxima scheint sich die Auflösung mit zunehmender Feldstärke zu verschlechtern. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Fit mit zwei überlagerten Gaußfunktionen. (b) Das tatsächliche Auflösungspotential zeigt sich anhand unterschiedlicher dsDNA-Mischungen. Während für kleine Längenunterschiede lediglich eine Verbreiterung des Maximums zu beobachten ist, treten für größere zwei separat getrennte Peaks auf. Die Auflösung beträgt in diesem Fall ca. 400 bp.

7 Ausblick

7.1 Anwendungen der PON-Strukturen

In dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass durch eine Variation der ODN-Sequenzen oder deren Anknüpfungsstelle (3' oder 5') an den Perylenkern die supramolekularen Strukturen beeinflusst werden können und dass dies einen Einfluss auf die energetischen Eigenschaften des Systems hat (vgl. Kapitel 5). In den Experimenten wurde auch verdeutlicht, dass der Perylenkern die Stabilität der Strukturen mitbestimmt. Allerdings ließen die Messungen keine detaillierteren Aussagen zu. Dazu ist es notwendig, neben salz- und konzentrationsabhängigen Thermodissoziationsexperimenten auch die angeknüpften ODN bezüglich ihrer Sequenz zu variieren, um ein explizites Modell der Perylenwechselwirkung erstellen zu können.

In Kapitel 4 wurden die intrinsischen chromophoren Eigenschaften der PON dazu ausgenutzt, die Diffusion und die Monodispersität in unterschiedlichen Lösungsmitteln zu charakterisieren. Weiterführende Experimente blieben wegen der starken Quenching-Effekte in wässriger Lösung verwehrt. Diesbezüglich wurden in der letzten Zeit in der Gruppe von Prof. Dr. Müllen neue PON-Hybride synthetisiert, die eine deutlich bessere Quantenausbeute aufweisen. Ebenso konnte das Syntheseprinzip auch auf rotverschobene Farbstoffe angewandt werden. Gerade im Hinblick auf die neuerlichen Synthesefortschritte scheint es durchaus in greifbarer Nähe zu sein, dieses Assemblierungskonzept zu einer genauen Positionierung von Farbstoffen zu verwenden und deren gegenseitige Beeinflussung zum Beispiel mittels Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) zu messen (vgl. Abbildung 7.1 (a)). Die geeignete Wahl der komplementären ODN würde hier eine exakte Positionierung im Subnanometer-Bereich erlauben.

Erste Testmessungen ergaben, dass es unter Verwendung geeigneter Methoden möglich ist, die PON mit einer entsprechenden komplementären Sequenz auf Oberflächen zu immobilisieren, ohne dass die Fluoreszenzeigenschaften verloren gehen. Im Abschnitt 2.1.2 wurde außerdem vorgestellt, dass mit Hilfe des DNA-Hybridisierungs-Mechanismus der Abstand zwischen zwei Elektroden überbrückt werden kann, um anschließend die DNA zu metallisieren [25]. Wendet man dieses Prinzip auf das PON-System an, so kann ein einzelner Farbstoff zwischen zwei Elektroden eingespannt und über die Metallisierung der DNA, die den elektronischen Kontakt direkt an das Chromophor heranzuführt, kontaktiert werden. Hierdurch wäre es möglich, einen Potentialabfall nur über dem Kern auf sehr kleinen Längenskalen zu erzeugen, was schematisch in Abbildung 7.1 (b) dargestellt ist. Das könnte interessante, spektroskopische Einzelmolekülmessungen bei gegebenenfalls

extrem hohen lokalen Feldern ergeben. Neben diesen fundamentalen Aspekten könnte es durchaus auch von Interesse sein, in dieser Anordnung das Chromophor als lichtinduzierten Schalter für den Ladungstransport entlang des Nanodrahtes auszunutzen. Hierzu müssten bezüglich des notwendigen Chromophorkerns noch theoretische und experimentelle Überlegungen vorgenommen werden.

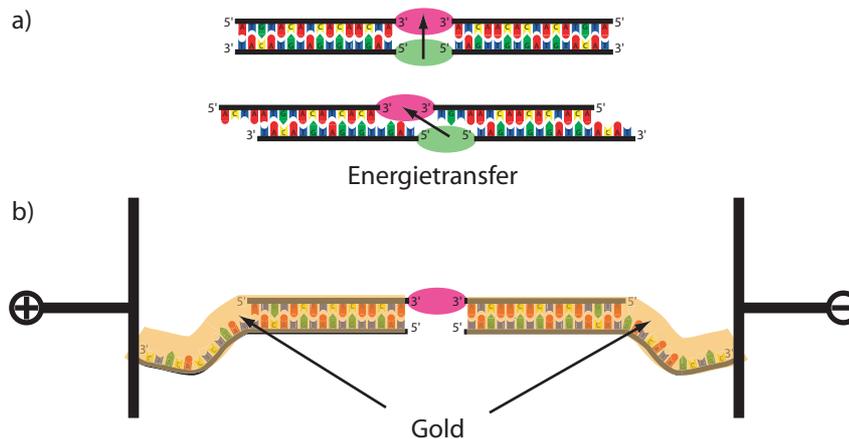


Abbildung 7.1: Mögliche Anwendungen für DNA-Hybridmoleküle: (a) Die hohe Spezifität der Basenpaarbindung kann zu einer exakten Positionierung der funktionellen Einheiten im Bezug zueinander genutzt werden. (b) Mit Hilfe von goldbedampften ODN kann ein einzelnes Chromophor in lokalen Feldern spektroskopisch beobachtet werden oder als lichtinduzierter Schalter dienen.

7.2 Potential der dfFCS-gestützten Mikroelektrophorese

Die Mikroelektrophorese-Experimente machen deutlich, dass die Auflösung nicht durch die Größe der Foki als die Detektoren der Drift im elektrischen Feld, sondern durch die Diffusion der DNA limitiert ist. Um diese Einschränkung zu umgehen, wäre es notwendig, entweder den Detektorabstand zu erhöhen oder bei höheren Feldstärken zu arbeiten. Im ersten Fall würde man den Nutzen daraus ziehen, dass eine gerichtete Bewegung wie die Drift auf größeren Längenskalen immer effektiver ist als die Diffusion. Während die Driftlänge bei konstanter Geschwindigkeit proportional zur Driftzeit ansteigt, nimmt die diffusionslimitierte Verbreiterung lediglich mit der Wurzel der Driftzeit zu. Dennoch scheidet dieser Ansatz aus, da es dem Ziel, auf möglichst kurzen Distanzen und Zeiten die elektrophoretische Drift zu detektieren, entgegensteht. Der zweite Ansatz scheint diesbezüglich der sinnvollere zu sein. Dazu ist es notwendig, den Aufbau weiterzuentwickeln, da bereits bei den jetzt verwendeten Feldstärken Temperaturänderungen auf Grund des Eintrags von Joulescher Wärme nicht vernachlässigbar sind. Hierzu wäre eine effektive Kammerkühlung und eine weitere Miniaturisierung des Elektrophoresekanals vorteilhaft, da z. B. im letzteren Fall der Wärmetransport wegen des vergrößerten Ober-

flächen-Volumenverhältnisses begünstigt wäre. Im Bezug auf das Kammerdesign besteht weiterhin das Potential, das Totvolumen bei den Messungen zu reduzieren.

Der experimentelle Mikroelektrophorese-Aufbau wurde mit Hilfe von dsDNA getestet und charakterisiert, wobei hinsichtlich der Ladungsdichte und der geometrischen Struktur keine Modifikationen an der DNA vorgenommen wurden. Im Prinzip kann in diesem Aufbau ein beliebiges geladenes Konstrukt untersucht werden, allerdings besteht bei der dFFCS-gestützten Mikroelektrophorese der entscheidende Vorteil darin, dass neben der elektrophoretischen Drift gleichzeitig auch die Diffusion und damit verbunden die Geometrie der Probe charakterisiert werden kann. Das könnte zu einer Analyse des Zetapotentials und somit zur Berechnung der Oberflächenladung ausgenutzt werden.

Um den Einfluss von Geometrie und Oberflächenladung zu testen, wurden erste Messungen an DNA-Molekülen durchgeführt, an die sich Blockcopolymere, die aus einem neutralen und einem kationischen Teil bestehen, angelagert hatten (vgl. Abbildung 7.2 (a)). Das System wurde in der Arbeitsgruppe bereits umfangreich untersucht; dabei lag das Hauptinteresse auf der Analyse der geometrischen Eigenschaften [176]. Bezüglich der elektrophoretischen Drift zeigen die in Abbildung 7.2 (b) dargestellten Ergebnisse,

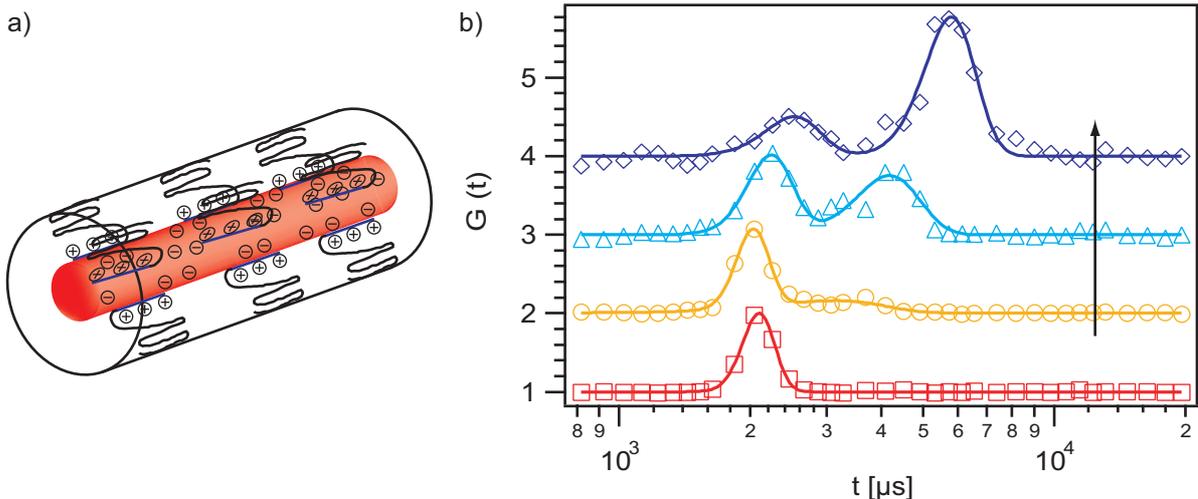


Abbildung 7.2: Potential der Mikroelektrophorese zur Messung unterschiedlich stark geladener DNA-Fragmente: (a) Schemazeichnung eines dekorierten DNA-Fragments. Die negative DNA ist von einem Blockcopolymer umgeben, dessen einer Bestandteil positiv geladen ist. (b) Kreuzkorrelationen für vier verschiedene DNA-Lösungen mit unterschiedlicher Blockcopolymerkonzentration bei einer elektrischen Feldstärke von 200 V/cm. Je nach dem Verhältnis zwischen dem positiven Blockcopolymer und der DNA entstehen unterschiedlich stark geladene DNA-Blockcopolymer-Komplexe. Dies drückt sich in höheren Driftzeiten bei gleichem elektrischem Feld aus. Der Pfeil zeigt in Richtung des zunehmenden Verhältnisses zwischen den Ammonium-Gruppen der Blockcopolymere und den Phosphatgruppen der dsDNA (Quadrate: DNA ohne Blockcopolymer; Kreise: 1,5 : 1; Dreiecke: 3 : 1; gedrehte Quadrate: 6 : 1).

dass die Dekorierung der DNA mit den Blockcopolymeren eine effektive Möglichkeit sein kann, die elektrophoretische Mobilität zu beeinflussen. Mit zunehmendem Anteil des Blockcopolymeren an der Lösung nimmt die Diffusionszeit der dekorierten DNA-Moleküle ab, während die Fraktion der nackten DNA verschwindet. Jene Testexperimente zeigen das Potential der dFFCS-gestützten Mikroelektrophorese, Aussagen über die spezifische Ladung der Moleküle zu treffen.

In diesem Zusammenhang bieten sich auch Systeme an, bei denen weniger die Ladung, sondern eher die Struktur der Objekte beeinflusst wird. So existiert zum Beispiel eine Gruppe von Proteinen, die durch ihre Bindung an DNA diese entsprechend verbiegen können. Dies wurde z. B. für das CAP¹-Protein gefunden, wobei der Biegewinkel nahezu 100° beträgt [177, 178]. Das Prinzip der Konformationsänderung ist in Abbildung 7.3 (a) dargestellt. Solche Konformationsänderungen sollten sich deutlich in der Diffusion und damit auch in der elektrophoretischen Drift niederschlagen.

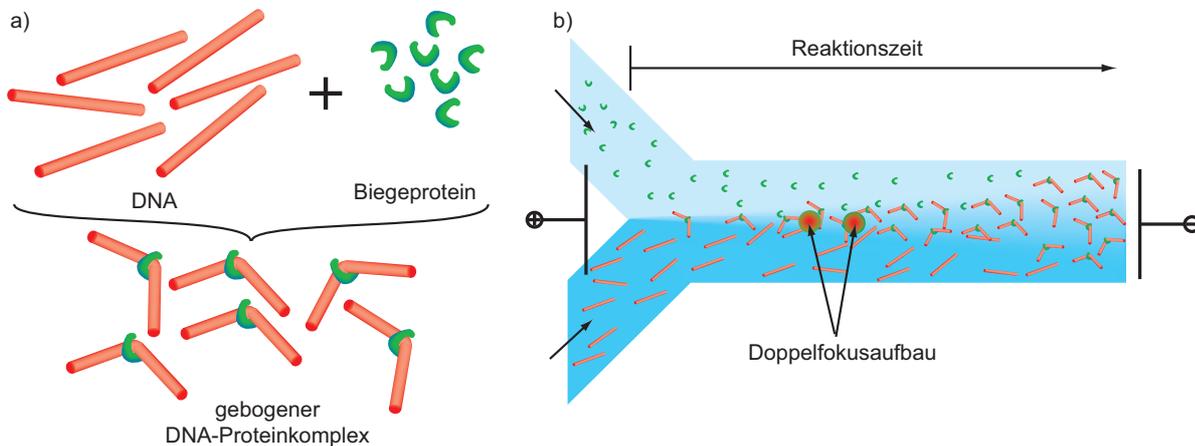


Abbildung 7.3: Prinzipskizze einer Flusssynthese: (a) Neben der unterschiedlichen Ladungsdichte können mit Hilfe der Elektrophorese auch Konformationsänderungen detektiert werden, die einen entscheidenden Einfluss auf die Geometrie und daher auf Reibungskonstanten der Moleküle haben. Bei DNA kann eine solche Konformationsänderung durch entsprechende Proteine erreicht werden. (b) Die sehr kleine Analysenstrecke von 5 μm erlaubt es, mit sehr hoher Ortsauflösung die elektrophoretische Mobilität zu messen. Dies könnte in Flusssynthesystemen zur Bestimmung der Reaktionskinetik ausgenutzt werden.

Neben der Analyse von stationären Zuständen oder von Endzuständen des Systems ist eine Detektion dynamischer Prozesse oder von Reaktionsprozessen von großem Interesse. Das wurde mittels FCS bereits vielfach demonstriert [108, 111]. Bei Reaktionen, die einen entscheidenden Einfluss auf die elektrophoretischen Eigenschaften haben, sollte ähnliches auch mit der dFFCS-gestützten Mikroelektrophorese möglich sein, jedoch dürfte die Zeitauflösung bei ca. einer Minute liegen. Um schnellere Reaktionsprozesse

¹Abkürzung für die englische Bezeichnung *catabolite activator protein*

untersuchen zu können, wird es allerdings notwendig, die Kinetik mittels eines Fluss-syntheseexperimentes aufzunehmen. Die Edukte werden dabei in zwei unterschiedlichen Kanälen mit einer bestimmten Geschwindigkeit zusammengeführt. Innerhalb des parallelen Stroms der Reaktanden kommt es zur Reaktion (vgl. Abbildung 7.3 (b)). Durch die angelegte Strömung wird die Reaktionszeit in eine Länge transformiert, was auf Grund der sehr hohen Ortsauflösung der beiden Foki leichter analysiert werden kann. So könnten neue Einblicke in bestimmte Reaktionsmechanismen gewonnen werden.

Literaturverzeichnis

- [1] FAFARD, S. ; LEON, R. ; LEONARD, D. ; MERZ, J. L. ; PETROFF, P. M.: Visible Photoluminescence from N-Dot Ensembles and the Linewidth of Ultrasmall Al_yIn_{1-y}As Al_xGa_{1-x}As Quantum Dots. In: *Physical Review B* 50 (1994), Sep 15, Nr. 11, S. 8086–8089
- [2] MADHUKAR, A. ; XIE, Q. ; CHEN, P. ; KONKAR, A.: Nature of Strained InAs 3-Dimensional Island Formation and Distribution on GaAs(100). In: *Applied Physics Letters* 64 (1994), May 16, Nr. 20, S. 2727–2729
- [3] MOISON, J. M. ; HOUZAY, F. ; BARTHE, F. ; LEPRINCE, L. ; ANDRE, E. ; VATEL, O.: Self-Organized Growth of Regular Nanometer-Scale InAs Dots on GaAs. In: *Applied Physics Letters* 64 (1994), Jan 10, Nr. 2, S. 196–198
- [4] MA, R. I. ; KALLENBACH, N. R. ; SHEARDY, R. D. ; PETRILLO, M. L. ; SEEMAN, N. C.: 3-Arm Nucleic-Acid Junctions Are Flexible. In: *Nucleic Acids Research* 14 (1986), Dec 22, Nr. 24, S. 9745–9753
- [5] PETRILLO, M. L. ; NEWTON, C. J. ; CUNNINGHAM, R. P. ; MA, R. I. ; KALLENBACH, N. R. ; SEEMAN, N. C.: The Ligation and Flexibility of 4-Arm DNA Junctions. In: *Biopolymers* 27 (1988), Sep, Nr. 9, S. 1337–1352
- [6] CHEN, J. H. ; SEEMAN, N. C.: Synthesis from DNA of a Molecule with the Connectivity of a Cube. In: *Nature* 350 (1991), Apr 18, Nr. 6319, S. 631–633
- [7] ZHANG, Y. W. ; SEEMAN, N. C.: Construction of a DNA-Truncated Octahedron. In: *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994), Mar 9, Nr. 5, S. 1661–1669
- [8] WATSON, J.D. ; CRICK, F.H.C.: Molecular structure of nucleic Acids. In: *Nature* 171 (1953), S. 737–738
- [9] BASHIR, R.: DNA-mediated artificial nanobiostructures: state of the art and future directions. In: *Superlattices and Microstructures* 29 (2001), Jan, Nr. 1, S. 1–16
- [10] ITO, Y. ; FUKUSAKI, E.: DNA as a 'nanomaterial'. In: *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 28 (2004), Jun 1, Nr. 4-6, S. 155–166

- [11] SEEMAN, N. C.: DNA in a material world. In: *Nature* 421 (2003), Jan 23, Nr. 6921, S. 427–431
- [12] NIEMEYER, C. M.: Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 40 (2001), Nr. 22, S. 4128–4158
- [13] NIEMEYER, C. M. ; ADLER, M.: Nanomechanical devices based on DNA. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 41 (2002), Nr. 20, S. 3779–3783
- [14] CHEN, J. H. ; KALLENBACH, N. R. ; SEEMAN, N. C.: A Specific Quadrilateral Synthesized from DNA Branched Junctions. In: *Journal of the American Chemical Society* 111 (1989), Aug 2, Nr. 16, S. 6402–6407
- [15] WINFREE, E. ; LIU, F. R. ; WENZLER, L. A. ; SEEMAN, N. C.: Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. In: *Nature* 394 (1998), Aug 6, Nr. 6693, S. 539–544
- [16] MIRKIN, C. A. ; LETSINGER, R. L. ; MUCIC, R. C. ; STORHOFF, J. J.: A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. In: *Nature* 382 (1996), Aug 15, Nr. 6592, S. 607–609
- [17] MUCIC, R. C. ; STORHOFF, J. J. ; MIRKIN, C. A. ; LETSINGER, R. L.: DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials. In: *Journal of the American Chemical Society* 120 (1998), Dec 9, Nr. 48, S. 12674–12675
- [18] NIEMEYER, C. M. ; CEYHAN, B. ; HAZARIKA, P.: Oligofunctional DNA-gold nanoparticle conjugates. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 42 (2003), Nr. 46, S. 5766–5770
- [19] ALIVISATOS, A. P. ; JOHNSON, K. P. ; PENG, X. G. ; WILSON, T. E. ; LOWETH, C. J. ; BRUCHEZ, M. P. ; SCHULTZ, P. G.: Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. In: *Nature* 382 (1996), Aug 15, Nr. 6592, S. 609–611
- [20] DE PABLO, P. J. ; MORENO-HERRERO, F. ; COLCHERO, J. ; HERRERO, J. G. ; HERRERO, P. ; BARO, A. M. ; ORDEJON, P. ; SOLER, J. M. ; ARTACHO, E.: Absence of dc-conductivity in lambda-DNA. In: *Physical Review Letters* 85 (2000), Dec 4, Nr. 23, S. 4992–4995
- [21] STORM, A. J. ; VAN NOORT, J. ; DE VRIES, S. ; DEKKER, C.: Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale. In: *Applied Physics Letters* 79 (2001), Dec 3, Nr. 23, S. 3881–3883
- [22] GOMEZ-NAVARRO, C. ; MORENO-HERRERO, F. ; DE PABLO, P. J. ; COLCHERO, J. ; GOMEZ-HERRERO, J. ; BARO, A. M.: Contactless experiments on individual

- DNA molecules show no evidence for molecular wire behavior. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), Jun 25, Nr. 13, S. 8484–8487
- [23] PORATH, D. ; BEZRYADIN, A. ; DE VRIES, S. ; DEKKER, C.: Direct measurement of electrical transport through DNA molecules. In: *Nature* 403 (2000), Feb 10, Nr. 6770, S. 635–638
- [24] FINK, H. W. ; SCHONENBERGER, C.: Electrical conduction through DNA molecules. In: *Nature* 398 (1999), Apr 1, Nr. 6726, S. 407–410
- [25] BRAUN, E. ; EICHEN, Y. ; SIVAN, U. ; BEN-YOSEPH, G.: DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. In: *Nature* 391 (1998), Feb 19, Nr. 6669, S. 775–778
- [26] EICHEN, Y. ; BRAUN, E. ; SIVAN, U. ; BEN-YOSEPH, G.: Self-assembly of nano-electronic components and circuits using biological templates. In: *Acta Polymerica* 49 (1998), Nov, Nr. 10-11, S. 663–670
- [27] CLARK, S. L. ; REMCHO, V. T.: Aptamers as analytical reagents. In: *Electrophoresis* 23 (2002), May, Nr. 9, S. 1335–1340
- [28] LUZI, E. ; MINUNNI, M. ; TOMBELLI, S. ; MASCINI, M.: New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003), 2003/12, Nr. 11, S. 810–818
- [29] ELLINGTON, A. D. ; SZOSTAK, J. W.: Invitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. In: *Nature* 346 (1990), Aug 30, Nr. 6287, S. 818–822
- [30] ELLINGTON, A. D. ; SZOSTAK, J. W.: Selection Invitro of Single-Stranded-DNA Molecules that Fold into Specific Ligand-Binding Structures. In: *Nature* 355 (1992), Feb 27, Nr. 6363, S. 850–852
- [31] TUERK, C. ; GOLD, L.: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment - RNA Ligands to Bacteriophage-T4 DNA-Polymerase. In: *Science* 249 (1990), Aug 3, Nr. 4968, S. 505–510
- [32] ITO, Y. ; KAWAZOE, N. ; IMANISHI, Y.: In vitro selected oligonucleotides as receptors in binding assays. In: *Methods-a Companion to Methods in Enzymology* 22 (2000), Sep, Nr. 1, S. 107–114
- [33] RUSCONI, C. P. ; SCARDINO, E. ; LAYZER, J. ; PITOC, G. A. ; ORTEL, T. L. ; MONROE, D. ; SULLENGER, B. A.: RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. In: *Nature* 419 (2002), Sep 5, Nr. 6902, S. 90–94

- [34] DITTMER, W. U. ; REUTER, A. ; SIMMEL, F. C.: A DNA-based machine that can cyclically bind and release thrombin. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 43 (2004), Nr. 27, S. 3550–3553
- [35] YURKE, B. ; TURBERFIELD, A. J. ; MILLS, A. P. ; SIMMEL, F. C. ; NEUMANN, J. L.: A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. In: *Nature* 406 (2000), Aug 10, Nr. 6796, S. 605–608
- [36] FENG, L. P. ; PARK, S. H. ; REIF, J. H. ; YAN, H.: A two-state DNA lattice switched by DNA nanoactuator. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 42 (2003), Nr. 36, S. 4342–4346
- [37] YAN, H. ; ZHANG, X. P. ; SHEN, Z. Y. ; SEEMAN, N. C.: A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. In: *Nature* 415 (2002), Jan 3, Nr. 6867, S. 62–65
- [38] LI, J. W. J. ; TAN, W. H.: A single DNA molecule nanomotor. In: *Nano Letters* 2 (2002), Apr, Nr. 4, S. 315–318
- [39] SIMMEL, F. C. ; YURKE, B.: A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states. In: *Applied Physics Letters* 80 (2002), Feb 4, Nr. 5, S. 883–885
- [40] JORGENSON, J. W. ; LUKACS, K. D.: Capillary Zone Electrophoresis. In: *Science* 222 (1983), Nr. 4621, S. 266–272
- [41] MÜLLER, O. ; MINARIK, M. ; FORET, F.: Ultrafast DNA analysis by capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection. In: *Electrophoresis* 19 (1998), Jun, Nr. 8-9, S. 1436–1444
- [42] SWERDLOW, H. ; ZHANG, J. Z. ; CHEN, D. Y. ; HARKE, H. R. ; GREY, R. ; WU, S. L. ; DOVICH, N. J. ; FULLER, C.: 3 DNA Sequencing Methods Using Capillary Gel-Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence. In: *Analytical Chemistry* 63 (1991), Dec 15, Nr. 24, S. 2835–2841
- [43] SHORTREED, M. R. ; LI, H. L. ; HUANG, W. H. ; YEUNG, E. S.: High throughput single-molecule DNA screening based by electrophoresis. In: *Analytical Chemistry* 72 (2000), Jul 1, Nr. 13, S. 2879–2885
- [44] CASTRO, A. ; SHERA, E. B.: Single-Molecule Electrophoresis. In: *Analytical Chemistry* 67 (1995), Sep 15, Nr. 18, S. 3181–3186
- [45] WARE, B. R. ; FLYGARE, W. H.: Light-Scattering in Mixtures of Bsa, Bsa Dimers, and Fibrinogen under Influence of Electric-Fields. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 39 (1972), Nr. 3, S. 670 ff

-
- [46] WARE, B. R. ; FLYGARE, W. H.: Simultaneous Measurement of Electrophoretic Mobility and Diffusion Coefficient in Bovine Serum Albumin Solutions by Light Scattering. In: *Chemical Physics Letters* 12 (1971), Nr. 1, S. 81–85
- [47] VAN ORDEN, A. ; KELLER, R. A.: Fluorescence correlation spectroscopy for rapid multicomponent analysis in a capillary electrophoresis system. In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Nov 1, Nr. 21, S. 4463–4471
- [48] LECAPTAIN, D. J. ; MICHEL, M. A. ; VAN ORDEN, A.: Characterization of DNA-protein complexes by capillary electrophoresis-single molecule fluorescence correlation spectroscopy. In: *Analyst* 126 (2001), Aug, Nr. 8, S. 1279–1284
- [49] LECAPTAIN, D. J. ; VAN ORDEN, A.: Two-beam fluorescence cross-correlation spectroscopy in an electrophoretic mobility shift assay. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Mar 1, Nr. 5, S. 1171–1176
- [50] SONEHARA, T. ; KOJIMA, K. ; IRIE, T.: Fluorescence correlation spectroscopy excited with a stationary interference pattern for capillary electrophoresis. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Oct 1, Nr. 19, S. 5121–5131
- [51] FOGARTY, K. ; VAN ORDEN, A.: Two-beam fluorescence cross-correlation spectroscopy for simultaneous analysis of positive and negative ions in continuous-flow capillary electrophoresis. In: *Analytical Chemistry* 75 (2003), Dec 1, Nr. 23, S. 6634–41
- [52] BRÜCKNER, A. M. ; CHAKRABORTY, P. ; GELLMAN, S. H. ; DIEDERICHSEN, U.: Molecular architecture with functionalized beta-peptide helices. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 42 (2003), Nr. 36, S. 4395–4399
- [53] BRÜCKNER, A. M. ; GARCIA, M. ; MARSH, A. ; GELLMAN, S. H. ; DIEDERICHSEN, U.: Synthesis of novel nucleobeta-amino acids and nucleobase-functionalized beta-peptides. In: *European Journal of Organic Chemistry* (2003), Sep 15, Nr. 18, S. 3555–3561
- [54] GROSBURG, A.Y. ; KHOKHLOV, A.R. ; LARSON, R. (Hrsg.) ; PINCUS, P.A. (Hrsg.): *Statistical Physics of Macromolecules*. New York : AIP Press, 1994 (AIP Series in Polymers and Complex Materials)
- [55] DOI, M.: *Introduction to polymer physics*. Oxford (UK) : Oxford University Press, 2001
- [56] DOI, M. ; EDWARDS, S.F. ; ADAIR, R.K. (Hrsg.) ; ELLIOTT, R.J. (Hrsg.) ; KRUMHANSL, J.A. (Hrsg.) ; MARSHALL, W. (Hrsg.) ; WILKINSON, D. H. (Hrsg.): *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford : Clarendon Press, 1986 (The international series of monographs on physics)

- [57] STROBL, G.: *The Physics of Polymers*. 2. Berlin : Springer, 1997
- [58] KRATKY, O. ; POROD, G.: Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. In: *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* 68 (1949), Nr. 12, S. 1106–1122
- [59] ISRAELACHVILI, J.: *Intermolecular & Surface Forces*. 2. San Diego, CA, USA : Academic Press, 2000
- [60] OW CZARZY, R. ; VALLONE, P. M. ; GALLO, F. J. ; PANER, T. M. ; LANE, M. J. ; BENIGHT, A. S.: Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers. In: *Biopolymers* 44 (1997), Nr. 3, S. 217–239
- [61] WARTELL, Roger M. ; BENIGHT, Albert S.: Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment. In: *Physics Reports* 126 (1985), 1985/9, Nr. 2, S. 67–107
- [62] OW CZARZY, R.: *Prediction of short DNA duplex thermodynamics and evaluation of next nearest neighbor interactions*. Chicago, IL, University of Illinois at Chicago, PhD Thesis, 1999
- [63] NEWELL, G. F. ; MONTROLL, E. W.: On the Theory of the Ising Model of Ferromagnetism. In: *Reviews of Modern Physics* 25 (1953), Nr. 2, S. 353–389
- [64] ZIMM, B. H.: Theory of Melting of the Helical Form in Double Chains of the DNA Type. In: *Journal of Chemical Physics* 33 (1960), Nr. 5, S. 1349–1356
- [65] BENIGHT, A. S. ; WARTELL, R. M. ; HOWELL, D. K.: Theory Agrees with Experimental Thermal-Denaturation of Short DNA Restriction Fragments. In: *Nature* 289 (1981), Nr. 5794, S. 203–205
- [66] EINSTEIN, A.: Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. In: *Annalen der Physik* 17 (1905), S. 549–560
- [67] 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
- [68] ZIMM, B. H.: Dynamics of Polymer Molecules in Dilute Solution: Viscoelasticity, Flow Birefringence and Dielectric Loss. In: *The Journal of Chemical Physics* 24 (1956), Feb, Nr. 2, S. 269–278
- [69] KIRKWOOD, J. G.: The Statistical Mechanical Theory of Irreversible Processes in Solutions of Flexible Macromolecules - Visco-Elastic Behavior. In: *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* 68 (1949), Nr. 9-10, S. 649–660

-
- [70] BROERSMA, S.: Viscous Force Constant for a Closed Cylinder. In: *Journal of Chemical Physics* 32 (1960), Nr. 6, S. 1632–1635
- [71] BROERSMA, S.: Rotational Diffusion Constant of a Cylindrical Particle. In: *Journal of Chemical Physics* 32 (1960), Nr. 6, S. 1626–1631
- [72] TIRADO, M. M. ; DE LA TORRE, J. G.: Translational Friction Coefficients of Rigid, Symmetric Top Macromolecules - Application to Circular-Cylinders. In: *Journal of Chemical Physics* 71 (1979), Nr. 6, S. 2581–2587
- [73] TIRADO, M. M. ; DE LA TORRE, J. G.: Rotational-Dynamics of Rigid, Symmetric Top Macromolecules - Application to Circular-Cylinders. In: *Journal of Chemical Physics* 73 (1980), Nr. 4, S. 1986–1993
- [74] 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
- [75] DAUNE, M.: *Molekulare Biophysik*. Braunschweig/Wiesbaden : Vieweg Verlag, 1997
- [76] NETZ, R.: Elektrostatischer Beitrag zur Erbsubstanz. In: *Physik Journal* 1 (2002), Nr. 9, S. 51–56
- [77] NETZ, R. R. ; ANDELMAN, D.: Neutral and charged polymers at interfaces. In: *Physics Reports-Review Section of Physics Letters* 380 (2003), Jun, Nr. 1-2, S. 1–95
- [78] NETZ, R. R. ; ORLAND, H.: Beyond Poisson-Boltzmann: Fluctuation effects and correlation functions. In: *European Physical Journal E* 1 (2000), Feb-Mar, Nr. 2-3, S. 203–214
- [79] GREGOR, H. P. ; FREDERICK, M.: Potentiometric Titration of Polyacrylic and Polymethacrylic Acids with Alkali Metal and Quaternary Ammonium Bases. In: *Journal of Polymer Science* 23 (1957), Nr. 103, S. 451–465
- [80] MANNING, G. S.: Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions. II. Self-Diffusion of Small Ions. In: *Journal of Chemical Physics* 51 (1969), Nr. 3, S. 934 ff
- [81] MANNING, G. S.: Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions. I. Colligative Properties. In: *Journal of Chemical Physics* 51 (1969), Nr. 3, S. 924 ff

- [82] MANNING, G. S. ; RAY, J.: Counterion condensation revisited. In: *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 16 (1998), Oct, Nr. 2, S. 461–476
- [83] HOAGLAND, D. A. ; ARVANITIDOU, E. ; WELCH, C.: Capillary electrophoresis measurements of the free solution mobility for several model polyelectrolyte systems. In: *Macromolecules* 32 (1999), Sep 21, Nr. 19, S. 6180–6190
- [84] STELLWAGEN, N. C. ; GELFI, C. ; RIGHETTI, P. G.: The free solution mobility of DNA. In: *Biopolymers* 42 (1997), Nov, Nr. 6, S. 687–703
- [85] STELLWAGEN, E. ; STELLWAGEN, N. C.: Determining the electrophoretic mobility and translational diffusion coefficients of DNA molecules in free solution. In: *Electrophoresis* 23 (2002), Aug, Nr. 16, S. 2794–2803
- [86] MEAGHER, R. J. ; WON, J. I. ; MCCORMICK, L. C. ; NEDELCO, S. ; BERTRAND, M. M. ; BERTRAM, J. L. ; DROUIN, G. ; BARRON, A. E. ; SLATER, G. W.: End-labeled free-solution electrophoresis of DNA. In: *Electrophoresis* 26 (2005), Jan, Nr. 2, S. 331–350. – Review
- [87] HIEMENZ, P.C. ; RAJAGOPALAN, R.: *Principles of colloid and surface chemistry*. 3rd edition. New York : Dekker, 1997
- [88] QUESADA, Mark A.: Replaceable polymers in DNA sequencing by capillary electrophoresis. In: *Current Opinion in Biotechnology* 8 (1997), Nr. 1, S. 82–93
- [89] HELLER, C.: Separation of double-stranded and single-stranded DNA in polymer solutions: I. Mobility and separation mechanism. In: *Electrophoresis* 20 (1999), Jul, Nr. 10, S. 1962–1977
- [90] VIOVY, J. L.: Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. In: *Reviews of Modern Physics* 72 (2000), Jul, Nr. 3, S. 813–872
- [91] HELLER, C.: Principles of DNA separation with capillary electrophoresis. In: *Electrophoresis* 22 (2001), Feb, Nr. 4, S. 629–643
- [92] SLATER, G. W. ; KENWARD, M. ; MCCORMICK, L. C. ; GAUTHIER, M. G.: The theory of DNA separation by capillary electrophoresis. In: *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2003), Feb, Nr. 1, S. 58–64
- [93] OGSTON, A. G.: The Spaces in a Uniform Random Suspension of Fibres. In: *Transactions of the Faraday Society* 54 (1958), Nr. 11, S. 1754–1757
- [94] RODBARD, D. ; CHRAMBAC, A.: Unified Theory for Gel Electrophoresis and Gel Filtration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 65 (1970), Nr. 4, S. 970 ff

-
- [95] FERGUSON, K. A.: Starch-Gel Electrophoresis-Application to Classification of Pituitary Proteins + Polypeptides. In: *Metabolism-Clinical and Experimental* 13 (1964), Nr. 10P, S. 985 ff
- [96] SEMENOV, A. N. ; DUKE, T. A. J. ; VIOVY, J. L.: Gel-Electrophoresis of DNA in Moderate Fields - the Effect of Fluctuations. In: *Physical Review E* 51 (1995), Feb, Nr. 2, S. 1520–1537
- [97] LUMPKIN, O. J. ; DEJARDIN, P. ; ZIMM, B. H.: Theory of Gel-Electrophoresis of DNA. In: *Biopolymers* 24 (1985), Nr. 8, S. 1573–1593
- [98] SLATER, G. W. ; NOOLANDI, J.: On the Reptation Theory of Gel-Electrophoresis. In: *Biopolymers* 25 (1986), Mar, Nr. 3, S. 431–454
- [99] NOOLANDI, J. ; ROUSSEAU, J. ; SLATER, G. W. ; TURMEL, C. ; LALANDE, M.: Self-Trapping and Anomalous Dispersion of DNA in Electrophoresis. In: *Physical Review Letters* 58 (1987), Jun 8, Nr. 23, S. 2428–2431
- [100] VIOVY, J. L. ; DUKE, T.: DNA Electrophoresis in Polymer-Solutions - Ogston Sieving, Reptation and Constraint Release. In: *Electrophoresis* 14 (1993), Apr, Nr. 4, S. 322–329
- [101] 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
- [102] ELSON, E. L. ; MAGDE, D.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. 1. Conceptual Basis and Theory. In: *Biopolymers* 13 (1974), Nr. 1, S. 1–27
- [103] MAGDE, D. ; ELSON, E. L. ; WEBB, W. W.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. 2. Experimental Realization. In: *Biopolymers* 13 (1974), Nr. 1, S. 29–61
- [104] MAGDE, D. ; WEBB, W.W. ; ELSON, E.L.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. 3. Uniform Translation and Laminar Flow. In: *Biopolymers* 17 (1978), S. 361–376
- [105] RIGLER, R. ; METS, U. ; WIDENGREN, J. ; KASK, P.: Fluorescence Correlation Spectroscopy with High Count Rate and Low-Background - Analysis of Translational Diffusion. In: *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 22 (1993), Aug, Nr. 3, S. 169–175
- [106] KINJO, M. ; RIGLER, R.: Ultrasensitive Hybridization Analysis Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Nucleic Acids Research* 23 (1995), May 25, Nr. 10, S. 1795–1799

- [107] 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), Sep 7, Nr. 36, S. 13368–13379
- [108] KRICHEVSKY, O. ; BONNET, G.: Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. In: *Reports on Progress in Physics* 65 (2002), Feb, Nr. 2, S. 251–297
- [109] THOMPSON, N. L. ; LIETO, A. M. ; ALLEN, N. W.: Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. In: *Current Opinion in Structural Biology* 12 (2002), Oct, Nr. 5, S. 634–641
- [110] SCHWILLE, P.: Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. In: *Cell Biochemistry and Biophysics* 34 (2001), Nr. 3, S. 383–408
- [111] ELSON, E. L.: Quick tour of fluorescence correlation spectroscopy from its inception. In: *Journal of Biomedical Optics* 9 (2004), Sep-Oct, Nr. 5, S. 857–64
- [112] ENDERLEIN, J.: Path integral approach to fluorescence correlation experiments. In: *Physics Letters A* 221 (1996), Oct 14, Nr. 6, S. 427–433
- [113] EGGELING, C. ; FRIES, J. R. ; BRAND, L. ; GUNTHER, R. ; SEIDEL, C. A. M.: Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998), Feb 17, Nr. 4, S. 1556–1561
- [114] WIDENGREN, J.: Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Bioimaging* 4 (1996), S. 149–157
- [115] DITTRICH, P. S. ; SCHWILLE, P.: Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. In: *Applied Physics B-Lasers and Optics* 73 (2001), Dec, Nr. 8, S. 829–837
- [116] PATTERSON, G. H. ; PISTON, D. W.: Photobleaching in two-photon excitation microscopy. In: *Biophysical Journal* 78 (2000), Apr, Nr. 4, S. 2159–62
- [117] 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), Jul 13, Nr. 27, S. 6416–6428
- [118] WIDENGREN, J. ; METS, U. ; RIGLER, R.: Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Chemical Physics* 250 (1999), Dec 1, Nr. 2, S. 171–186

-
- [119] KELLER, S.: *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Polymerlösungen*. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation, 2004
- [120] 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), Jul 15, Nr. 14, S. 3260–3265
- [121] KUNST, B. H. ; SCHOTS, A. ; VISSER, A. J. W. G.: Detection of flowing fluorescent particles in a microcapillary using fluorescence correlation spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Oct 15, Nr. 20, S. 5350–5357
- [122] 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
- [123] BRINKMEIER, M.: *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Mikrostrukturen*. Braunschweig, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Dissertation, 1996
- [124] 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), Feb 1, Nr. 3, S. 609–616
- [125] BRINKMEIER, M.: Cross-correlated Flow Analysis in Microstructures. In: RIGLER, R. (Hrsg.) ; ELSON, E.S. (Hrsg.): *Fluorescence Correlation Spectroscopy - Theory and Application* Bd. 62. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2001, S. 379–395
- [126] ENDERLEIN, J. ; KELLER, R. A.: Comparison of one-focus and two-foci setup in single-molecule detection experiments. In: *Applied Spectroscopy* 51 (1997), Mar, Nr. 3, S. 443–446
- [127] DITTRICH, P. S. ; SCHWILLE, P.: Spatial two-photon fluorescence cross-correlation Spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Sep 1, Nr. 17, S. 4472–4479
- [128] LUMMA, D. ; BEST, A. ; GANSEN, A. ; FEUILLEBOIS, F. ; RÄDLER, J. O. ; VINOGRADOVA, O. I.: Flow profile near a wall measured by double-focus fluorescence cross-correlation. In: *Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics)* 67 (2003), May, Nr. 5, S. 056313–10
- [129] SCHWILLE, P. ; BIESCHKE, J. ; ÖHLENSCHLAGER, F.: Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies. In: *Biophysical Chemistry* 66 (1997), Jun 30, Nr. 2-3, S. 211–228

- [130] 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
- [131] SCHWILLE, P.: TIR-FCS: Staying on the Surface Can Sometimes Be Better. In: *Biophysical Journal* 85 (2003), Nov, S. 2783–2784
- [132] HAUGLAND, R. P.: *The handbook - A guide to fluorescent probes and labeling Technologies*. 10th edition. Eugene, OR, USA, 2005
- [133] JANKOWSKI, T. ; JANKA, R.: 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
- [134] WEISSHART, K. ; JUNGEL, V. ; BRIDDON, S. J.: The LSM 510 META ConfoCor 2 system: An integrated imaging and spectroscopic platform for single-molecule detection. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* 5 (2004), Apr, Nr. 2, S. 135–154
- [135] WÜRTHNER, F. ; THALACKER, C. ; SAUTTER, A. ; SCHARTL, W. ; IBACH, W. ; HOLLRICHER, O.: Hierarchical self-organization of perylene bisimide-melamine assemblies to fluorescent mesoscopic superstructures. In: *Chemistry-a European Journal* 6 (2000), Nov 3, Nr. 21, S. 3871–3886
- [136] WÜRTHNER, F.: Perylene bisimide dyes as versatile building blocks for functional supramolecular architectures. In: *Chemical Communications* (2004), Nr. 14, S. 1564–1579
- [137] ABDALLA, M. A. ; BAYER, J. ; RÄDLER, J. ; MÜLLEN, K.: Nanoparticles and DNA probes based on DNA-fluorophore conjugates. In: *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids* 22 (2003), Nr. 5-8, S. 1399–1401
- [138] ABDALLA, M. A. ; BAYER, J. ; RÄDLER, J. O. ; MÜLLEN, K.: Synthesis and self-assembly of perylenediimide-oligonucleotide conjugates. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 43 (2004), Nr. 30, S. 3967–3970
- [139] ABDALLA, M. A.: *Synthese und Selbstorganisation von Perylendiimid - Oligonucleotid - Konjugaten*. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Dissertation, 2005
- [140] DELCOURT, S. G. ; BLAKE, R. D.: Stacking Energies in DNA. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991), Aug 15, Nr. 23, S. 15160–15169

-
- [141] FRANK-KAMENETSKII, M.D.: Simplification of Empirical Relationship between Melting Temperature of DNA, Its GC Content and Concentration of Sodium Ions in Solution. In: *Biopolymers* 10 (1971), Nr. 12, S. 2623–2624
- [142] GOLDSTEIN, R. F. ; BENIGHT, A. S.: How Many Numbers Are Required to Specify Sequence-Dependent Properties of Polynucleotides. In: *Biopolymers* 32 (1992), Dec, Nr. 12, S. 1679–1693
- [143] KAHL, V. J.: *Membrangestützte Mikroelektrophorese*. München, Technische Universität München, Dissertation, 2001
- [144] KNOX, J. H. ; MCCORMACK, K. A.: Temperature Effects in Capillary Electrophoresis .1. Internal Capillary Temperature and Effect Upon Performance. In: *Chromatographia* 38 (1994), Feb, Nr. 3-4, S. 207–214
- [145] LIDE, D.R.: *CRC handbook of chemistry and physics*. 82. ed. Boca Raton : CRC Press, 2001. – ISBN 0–8493–0482–2
- [146] CHEN, H. S. ; CHANG, H. T.: Capillary electrophoretic separation of 1 to 10 kbp sized dsDNA using poly(ethylene oxide) solutions in the presence of electroosmotic counterflow. In: *Electrophoresis* 19 (1998), Dec, Nr. 18, S. 3149–3153
- [147] CHEN, H. S. ; CHANG, H. T.: Electrophoretic separation of small DNA fragments in the presence of electroosmotic flow using poly(ethylene oxide) solutions. In: *Analytical Chemistry* 71 (1999), May 15, Nr. 10, S. 2033–2036
- [148] JEON, S.I. ; CHANG, G.D.: Temperature Dependence of the intrinsic viscosities for poly(ethylene oxide)-water and -aqueous urea systems. In: *Journal of the Korean Chemical Society* 40 (1996), 9. Sep, Nr. 12, S. 748–755
- [149] HOHNER, A. ; BAYER, J. ; RÄDLER, J.O.: Wormlike reverse DNA/Lipid micelles. (2005). – eingereicht
- [150] ENDERLEIN, J. ; GREGOR, I. ; PATRA, D. ; FITTER, J.: Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* 5 (2004), Apr, Nr. 2, S. 155–161
- [151] BLOOMFIELD, V. A. ; HE, S. Q. ; LI, A. Z. ; ARSCOTT, P. B.: Light-Scattering-Studies on DNA Condensation. In: *Biochemical Society Transactions* 19 (1991), Apr, Nr. 2, S. 496–496
- [152] BUTLER, J. C. ; ANGELINI, T. ; TANG, J. X. ; WONG, G. C. L.: Ion multivalence and like-charge polyelectrolyte attraction. In: *Physical Review Letters* 91 (2003), Jul 11, Nr. 2, S. 028301

- [153] DE LA CRUZ, M. O. ; BELLONI, L. ; DELSANTI, M. ; DALBIEZ, J. P. ; SPALLA, O. ; DRIFFORD, M.: Precipitation of Highly-Charged Polyelectrolyte Solutions in the Presence of Multivalent Salts. In: *Journal of Chemical Physics* 103 (1995), Oct 1, Nr. 13, S. 5781–5791
- [154] STREY, H. H. ; PODGORNIK, R. ; RAU, D. C. ; PARSEGAN, V. A.: DNA-DNA interactions. In: *Current Opinion in Structural Biology* 8 (1998), Jun, Nr. 3, S. 309–313
- [155] HA, B. Y. ; LIU, A. J.: Counterion-mediated attraction between two like-charged rods. In: *Physical Review Letters* 79 (1997), Aug 18, Nr. 7, S. 1289–1292
- [156] PODGORNIK, R. ; PARSEGAN, V. A.: Charge-fluctuation forces between rodlike polyelectrolytes: Pairwise summability reexamined. In: *Physical Review Letters* 80 (1998), Feb 16, Nr. 7, S. 1560–1563
- [157] RAY, J. ; MANNING, G. S.: Effect of counterion valence and polymer charge density on the pair potential of two polyions. In: *Macromolecules* 30 (1997), Sep 22, Nr. 19, S. 5739–5744
- [158] ISE, N.: Long-range electrostatic attraction between macroions mediated by oppositely charged counterions: Experimental supports, past and present. In: *Berichte der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* 100 (1996), Jun, Nr. 6, S. 841–848
- [159] SHCHEPINOV, M. S. ; UDALOVA, I. A. ; BRIDGMAN, A. J. ; SOUTHERN, E. M.: Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes. In: *Nucleic Acids Research* 25 (1997), Nov 15, Nr. 22, S. 4447–4454
- [160] PRASUHN, A. L.: *Fundamentals of fluid mechanics*. Eglewood Cliffs : Prentice-Hall, 1980
- [161] WANG, Y. ; LIN, Q. ; MUKHERJEE, T.: A model for Joule heating-induced dispersion in microchip electrophoresis. In: *Lab on a Chip* 4 (2004), Nr. 6, S. 625–631
- [162] KNOX, J. H.: Thermal Effects and Band Spreading in Capillary Electro-Separation. In: *Chromatographia* 26 (1988), S. 329–337
- [163] NKODO, A. E. ; GARNIER, J. M. ; TINLAND, B. ; REN, H. J. ; DESRUISSEAU, C. ; MCCORMICK, L. C. ; DROUIN, G. ; SLATER, G. W.: Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis. In: *Electrophoresis* 22 (2001), Aug, Nr. 12, S. 2424–2432
- [164] STARCHEV, K. ; ZHANG, J. W. ; BUFFLE, J.: Applications of fluorescence correlation spectroscopy - Particle size effect. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 203 (1998), Jul 1, Nr. 1, S. 189–196

-
- [165] KAHL, V. J.: 2005. – unveröffentlichte Ergebnisse
- [166] DESRUISSEAU, C. ; DROUIN, G. ; SLATER, G. W.: Electrophoresis of composite molecular objects. 2. Competition between sieving and frictional effects in polymer solutions. In: *Macromolecules* 34 (2001), Jul 17, Nr. 15, S. 5280–5286
- [167] MOHANTY, U. ; STELLWAGEN, N. C.: Free solution mobility of oligomeric DNA. In: *Biopolymers* 49 (1999), Mar, Nr. 3, S. 209–214
- [168] MOHANTY, U. ; MCLAUGHLIN, L.: On the characteristics of migration of oligomeric DNA in polyacrylamide gels and in free solution. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 52 (2001), S. 93–106
- [169] MANNING, G. S.: Limiting Laws and Counterion Condensation in Poly-Electrolyte Solutions. 7. Electrophoretic Mobility and Conductance. In: *Journal of Physical Chemistry* 85 (1981), Nr. 11, S. 1506–1515
- [170] CLELAND, R. L.: Electrophoretic Mobility of Wormlike Chains. 2. Theory. In: *Macromolecules* 24 (1991), Jul 22, Nr. 15, S. 4391–4402
- [171] STELLWAGEN, E. ; LU, Y. J. ; STELLWAGEN, N. C.: Unified description of electrophoresis and diffusion for DNA and other polyions. In: *Biochemistry* 42 (2003), Oct 14, Nr. 40, S. 11745–11750
- [172] WEI, W. ; YEUNG, E. S.: Improvements in DNA sequencing by capillary electrophoresis at elevated temperature using poly(ethylene oxide) as a sieving matrix. In: *Journal of Chromatography B* 745 (2000), Aug 4, Nr. 1, S. 221–230
- [173] FUNG, E. N. ; YEUNG, E. S.: High-Speed DNA-Sequencing by Using Mixed Poly(Ethylene Oxide) Solutions in Uncoated Capillary Columns. In: *Analytical Chemistry* 67 (1995), Jul 1, Nr. 13, S. 1913–1919
- [174] FUNG, E. N. ; PANG, H. M. ; YEUNG, E. S.: Fast DNA separations using poly(ethylene oxide) in non-denaturing medium with temperature programming. In: *Journal of Chromatography A* 806 (1998), May 8, Nr. 1, S. 157–164
- [175] CHIOU, S. H. ; HUANG, M. F. ; CHANG, H. T.: Separation of double-stranded DNA fragments by capillary electrophoresis: Impacts of poly(ethylene oxide), gold nanoparticles, ethidium bromide, and pH. In: *Electrophoresis* 25 (2004), Jul, Nr. 14, S. 2186–2192
- [176] DEROCHEY, J. ; WALKER, G. F. ; E., Wagner ; O., Rädler J.: Decorated Rods: A Bottom-Up Self-Assembly of Monomolecular DNA Complexes. (2005). – eingereicht

- [177] ZINKEL, S. S. ; CROTHERS, D. M.: DNA Bend Direction by Phase Sensitive Detection. In: *Nature* 328 (1987), Jul 9, Nr. 6126, S. 178–181
- [178] ZINKEL, S. S. ; CROTHERS, D. M.: Comparative Gel-Electrophoresis Measurement of the DNA Bend Angle Induced by the Catabolite Activator Protein. In: *Biopolymers* 29 (1990), Jan, Nr. 1, S. 29–38

Abbildungsverzeichnis

1.1	Trends in der Miniaturisierung von integrierten Schaltungen	3
1.2	Molekulare und supramolekulare Struktur der DNA	5
1.3	Reversible Denaturierung der DNA	6
1.4	DNA als Gerüstbaustein	7
1.5	Schematische Darstellung einer DNA-Maschine	10
1.6	Experimentelles Prinzip der Untersuchung von DNA-DNA-Hybridmolekülen	11
2.1	Prinzipskizze einer idealen Kette	16
2.2	Schemazeichnung zur Berechnung der Tangenten-Tangenten-Korrelation	18
2.3	Schemazeichnung zum Kugel-Feder-Modell	24
2.4	Modellvorstellung für einen steifen Stab	26
2.5	Kräfte, die auf einen geladenen Polyelektrolyten wirken	30
2.6	Schemazeichnung zur Ausbildung einer elektroosmotischen Strömung	33
2.7	DNA-Auftrennung in einer Gelmatrix	34
2.8	Schematische Darstellung der FCS-Methode	38
2.9	FCS-Rohdaten und Autokorrelationsfunktion für eine Cy5-Lösung	39
2.10	Jablonski-Diagramm für die Übergänge innerhalb eines Farbstoffmoleküls	42
2.11	Vereinfachtes Termschema zur Beschreibung des Triplett-Übergangs	43
2.12	Reaktionsgleichung für den Isomerisationsprozess	45
2.13	Prinzipskizze der Doppelfokus-FCS-Methode	47
2.14	Darstellung der theoretischen FCS-Kreuzkorrelation	48
3.1	Schemazeichnung des verwendeten FCS/LSM-Kombiinstrumentes	55
3.2	Strukturformel des Perylen-Farbstoffs	57
3.3	Syntheseschritte zur Herstellung der Perylendiimiddicarbonsäure	58
3.4	Syntheseschritte zur Herstellung der Perylen-bis-Oligonukleotide	59
3.5	Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Produkt (6) und PON	60
3.6	Darstellung der chemischen Struktur und der Abkürzung für die verwendeten PON-Konstrukte	61
3.7	Exemplarische Darstellung eines Gelelektrophorese-Experimentes an Hand der Syntheseprodukte für asymmetrische Konjugate	62

3.8	Temperaturabhängiges Absorptionssignal für eine äquimolare Mischung aus ODN A und ODN \bar{A}	64
3.9	Synthese und Struktur des Trioligonukleotids	68
3.10	Prinzipskizze des Doppelfokus-FCS Aufbaus	71
3.11	Fluoreszenzbild der beiden Foki im Probenraum	72
3.12	Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen der Doppelfokus-Kalibrierung	73
3.13	Messkammeraufbau für Fluss- und Elektrophoreseexperimente	74
3.14	Elektrophoretische und elektroosmotische Drift in geschlossenen Systemen	77
3.15	Darstellung des Zusammenhangs zwischen Temperatur und Viskosität für die verwendete PEO-Lösung	79
4.1	Leistungsabhängige Fluoreszenzautokorrelationsfunktionen von Cy5 in TE/60 mM NaCl	82
4.2	Intensitätsabhängige Auswertung der Autokorrelationsfunktion für kov. dsDNA-Fragmente	84
4.3	Charakterisierung des Bleichprozesses in Abhängigkeit von der Laserleistung	85
4.4	Intensitätsabhängige Auswertung der Fluoreszenzautokorrelationsfunktion interkalierend gefärbter 394 bp langer dsDNA	86
4.5	Autokorrelationsfunktionen von unterschiedlich gefärbter dsDNA in Abhängigkeit von der Länge	88
4.6	Darstellung der Diffusionskonstante von dsDNA unterschiedlicher Länge	89
4.7	Abhängigkeit der freien Diffusion von der Salzkonzentration	90
4.8	Freie Diffusion von ssDNA in polaren und unpolaren Lösungsmitteln	91
4.9	Freie Diffusion von dsDNA unterschiedlicher Länge in n-Dekan	92
4.10	Fluoreszenzautokorrelationsfunktionen der PON in Reinstwasser und in n-Dekan	94
4.11	Schematische Darstellung von PON in n-Dekan	95
5.1	Potentielle supramolekulare Strukturen der unterschiedlichen PON	98
5.2	Hybridisierungsprodukte zwischen symmetrischen PON und entsprechenden ODN	99
5.3	Nachweis kettenartiger Strukturen für symmetrische PON	100
5.4	Nachweis der Beeinflussbarkeit der Genese von kettenartigen Strukturen für symmetrische PON	101
5.5	Nachweis von sandwichartigen Dimeren	102
5.6	Nachweis von kettenartigen Dimeren	103
5.7	Nachweis der DNA-Assemblierung mittels Ein-Farben-FCS	105
5.8	Experimentell gemessene und normierte Schmelzkurven der verwendeten ODN	108
5.9	Schmelzkurven der unterschiedlichen supramolekularen PON-Konstrukte	109
5.10	Schmelzkurve der selbstkomplementären PON-Konstrukte	110

5.11	Schmelzverhalten des Sandwichs	112
5.12	Hybridisierungsprodukte der Tri-ODN	114
6.1	Fluoreszenzkreuzkorrelationsdaten für Cy5 in einer Flusskammer in Abhängigkeit von der Kanalposition	118
6.2	Flussprofil und Maximalgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Höhendifferenz zwischen den beiden Flüssigkeitsreservoirs	119
6.3	Durchflussmessungen bei unterschiedlichen Drücken	120
6.4	Fluoreszenzkreuzkorrelation für ein 210 bp dsDNA-Fragment in Abhängigkeit vom elektrischen Feld in wässriger Lösung	121
6.5	Driftgeschwindigkeit und gemessene Stromstärke für ein 210 bp dsDNA-Fragment in Abhängigkeit vom angelegtem E-Feld	122
6.6	Reduzierte gemittelte Driftgeschwindigkeiten und reduzierten Stromstärken in Abhängigkeit vom E-Feld	123
6.7	Kammertemperatur in Abhängigkeit des angelegten E-Feldes	124
6.8	Vergleich zwischen den experimentell gemessenen und den zu erwartenden Kreuzkorrelationen	125
6.9	Vergleich der mit einem Fokus oder mit zwei Foki gemessenen Driftgeschwindigkeiten	127
6.10	Temperaturkorregierte Spannungs- und Höhenprofile der gemessenen effektiven Geschwindigkeit	128
6.11	Elektrophoretische Mobilität in Abhängigkeit von der Länge der dsDNA-Fragmente	129
6.12	Verhältnis der mit konventioneller FCS und der mit Doppelfokus-Beleuchtung gemessenen freien Diffusion	130
6.13	Darstellung des Zusammenhangs zwischen freier Diffusion und elektrophoretischer Mobilität	131
6.14	Driftgeschwindigkeiten in einem physikalischen Netzwerk in Abhängigkeit von der dsDNA-Länge und dem angelegten elektrischen Feld	135
6.15	Driftgeschwindigkeiten in einem physikalischen Netzwerk in Abhängigkeit von der Position im Kanal	136
6.16	Reduzierter Strom und die daraus resultierende Temperatur in der Elektrophoresekammer	137
6.17	Doppellogarithmische Darstellung der Driftgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der dsDNA-Länge für unterschiedliche E-Felder	138
6.18	Auflösungsvermögen des Mikroelektrophoreseaufbaus	140
6.19	Auftrennung unterschiedlich langer dsDNA im elektrischen Feld	142
7.1	Mögliche Anwendungen für DNA-Hybridmoleküle	144
7.2	Potential der Mikroelektrophorese zur Messung unterschiedlich stark geladener DNA-Fragmente	145
7.3	Prinzipskizze einer Flusssynthese	146

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Primer in der PCR-Reaktion	51
3.2	Weitere verwendete ODN	53
3.3	Mögliche Linearkombinationen und freie Energien pro Basenpaar zur Berechnung der nächste-Nachbar-Wechselwirkung	66
5.1	Schmelztemperaturen der unterschiedlichen supramolekularen Strukturen	109
6.1	Mobilitäten der unterschiedlich langen dsDNA-Fragmente im elektrischen Feld	128
6.2	Auflösungspotential der Doppelfokus-gestützten Mikroelektrophorese . .	133

Danksagung

Zum Schluss bleibt mir nur noch, mich bei allen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zuallererst sei hier mein Doktorvater **Prof. Dr. Joachim Rädler** genannt. Neben den äußerst spannenden Fragestellungen im Rahmen meiner Dissertation hat er mir die Möglichkeit gegeben, meinen Forscherdrang weitgehend selbständig ausleben zu können. Auch hat es mir viel Spaß bereitet, von Anfang an den Aufbau des neuen Lehrstuhls aktiv mitzugestalten. **Dr. Ralf Blossey** danke ich nicht nur für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit, sondern auch für die vielen angenehmen Gespräche und die wissenschaftliche Zusammenarbeit im Bezug auf die Thermosoziationsexperimente. Er hat mir gezeigt, dass Wissenschaftler selbst nach Jahren in der Forschung weiterhin mit beiden Beinen auf dem Boden stehen können und Interesse an experimentellen Details finden. Die Zusammenarbeit mit **Dr. Moustafa Abdalla** werde ich immer in guter Erinnerung behalten. Sie hat mir deutlich gemacht, dass gerade eine Kooperation über die ursprünglichen Fächergrenzen hinweg sehr fruchtbar sein kann. **Xaver Schlagberger** und **Prof. Dr. Roland Netz** haben durch die zahlreichen Diskussionen über die Elektrophorese-Experimente entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Was wäre ein Lehrstuhl ohne die, die alles am Laufen halten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ausdrücklich bei **Gerlinde Schwake** und **Susanne Kempter** als die guten Seelen im Lehrstuhl-Labor bedanken. Ohne sie wären mir als Physiker einige der molekularbiologischen Methoden niemals in den Sinn gekommen, die von präparativer Seite letztendlich maßgeblich für die Durchführung der Experimente waren. Viele Experimente hätten nicht realisiert werden können, wenn sie nicht die Proben hergestellt und aufgereinigt hätten. In diesem Zusammenhang möchte ich auch **Stefan Manus** erwähnen, nur durch seine einfache, aber trotzdem geniale Idee konnte schließlich das Elektrophorese-Experiment in die Tat umgesetzt werden. Ohne ihn würde ich noch heute an einer Spannungsquelle basteln. Mister FCS **Simon Keller** danke ich für die intensive Einführung in die Methode und seine stetig verfügbare Expertise. Die Veröffentlichung zum Thema FCS, die er nicht kannte, gab es nicht! Seine Korrekturen haben der Arbeit den letzten Schliff gegeben. Meine Bürokollegin **Sonja Thunnessen** hat in mir die Lauffreude geweckt, die leider in der letzten Zeit etwas gelitten hat. Sie hat mir darüberhinaus gezeigt, dass kreatives Chaos nicht alles im Leben ist. Auch mit **Marion Hochrein** war es eine schöne Zeit in einem Büro, die vor allem durch die öfter stattfindenden *Kaffeekränzchen* versüßt wurde. Bei **Madeleine Leisner** bedanke ich

mich für die schönen Tanzabende und die wertvollen Kommentare zu meiner Arbeit. Nicht vergessen möchte ich alle weiteren Kollegen des Lehrstuhls Rädler. Sie schufen eine derart angenehme Atmosphäre, die so manchen Frust viel leichter ertragen ließ. Das Kuchenessen und das Grillen werden mir besonders fehlen.

Gott sei Dank ist die Arbeit nicht alles im Leben. Darum möchte ich an dieser Stelle auch die erwähnen, die zwar nicht die Dissertation, aber dafür um so mehr mein Leben beeinflusst haben. Mit **Bernward Mann** verbindet mich seit unserem gemeinsamen Amerikaaufenthalt und über die letzten Jahre hinweg sehr viel. Hoffentlich werden wir auch in der Zukunft die Gelegenheit haben, uns häufig auszutauschen. Gerade in der Großstadt München ist es schwierig Anschluss zu finden und Fuß zu fassen. In diesem Zusammenhang wurde mir meine Münchner Verbindung Aenania zu einem festen Ankerpunkt. Besonders meine Bundesbrüder **Rudolf Hautmann**, **Karl Janker**, **Peter Schwertsik** und **Patrick Windpassinger** haben mit mir zusammen einige schöne Stunden verbracht. Meinem Bundesbruder aus Würzburger Zeiten **Dr. Arndt Brückner** möchte ich an dieser Stelle besonders danken. Er hat mich während meines Studiums immer unterstützt und mir durch seine Ratschläge stets einen Weg gewiesen. Ich hoffe, dass wir auch weiterhin einen guten Kontakt pflegen können.

Diese Doktorarbeit wäre wahrscheinlich nie entstanden, wenn mich nicht mein Physiklehrer **Hubert Zenk** im Juni 1998 überzeugt hätte, das Physikstudium trotz der Schwierigkeiten im ersten Semester fortzuführen. Ich wünsche ihm, dass er auch weiterhin viele Schüler für die Physik begeistern kann.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern ein herzliches Vergelt's Gott sagen. Sie haben mir während meines ganzen Lebens immer die nötigen Freiheiten, aber auch den entsprechenden Rückhalt gegeben. Dies erst machte es mir möglich, mich so nach meinen Interessen zu entfalten und meinen Weg zu gehen. Auch meine Geschwister und deren Familien halfen mir, immer wieder einen Blick fürs Wesentliche zu entwickeln und nicht abzuheben.

Was wäre ich aber ohne meine **Wiltrud**, mit der ich gemeinsam unseren Lebensweg bestreite. Danke, dass Du den Vulkan immer wieder zu besänftigen weißt und Dich notfalls auch mal mitten in die heiße Lava stellst. Danke auch für Dein *Anders sein*.

Lebenslauf

Johannes Paul Andreas Bayer

geboren am 30. November 1978 in Haßfurt (Landkreis Haßberge)

Studium

Seit 01/2002	Promotion in Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. Dr. Joachim O. Rädler
20.08.2001	Master of Arts in Physics
08/2000 - 08/2001	Studium der Physik als Graduate Student an der University of Texas at Austin (USA) bei Prof. Dr. Josef Käs zum Thema: „Local mechano-sensing of neuronal growth cones“
08.11.1999	Vordiplom
05/1998 - 07/2000	Studium der Physik an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Praktikum

10/2001 - 12/2001	Unternehmensberater bei McKinsey & Company im Bereich „Entwicklung und Implementierung eines internationalen Produktportfolios für ein namhaftes europäisches Logistikunternehmen“
-------------------	--

Wehrdienst und Schulausbildung

07/1997 - 04/1998	Wehrdienst in Ellwangen/Jagst und Ebern
27.06.1997	Abitur
1989 - 1997	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges des Regiomontanus-Gymnasiums Haßfurt; Überspringen der 9. Jahrgangsstufe
1984 - 1989	Besuch der Grundschule in Aidhausen und der Hauptschule in Hofheim in Unterfranken