

Physik-Department
Institut für experimentelle Biophysik E22
der Technischen Universität München

**Statische und dynamische Lichtstreuung an
Lösungen von Aktinfilamenten**

Tobias-Alexander Storz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
2. Priv.-Doz. W. Doster

Die Dissertation wurde am 01.10.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 25.10.2001 angenommen.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Statische und dynamische Lichtstreuung an Lösungen von Aktinfilamenten“

am Lehrstuhl für experimentelle Biophysik E 22 unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Sackmann ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 4 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Erich Sackmann für die freundliche Aufnahme in seinen Lehrstuhl und die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen.

Außerordentlich danken möchte ich Herrn Dr. habil. Rudolf Merkel für das Anvertrauen dieses sehr interessanten Themas. Lichtstreuung bereitete mir stets große Freude. Keinen Tag möchte ich missen.

Frau Dr. Elke Thedinga danke ich für den acht Monate dauernden Crashkurs in Biochemie.

Frau Monika Rusp danke ich für die Präparation von Aktin.

Frau Kirpal für die sehr kniffligen MyosinS1 – Proteinpräparationen.

Herrn Dipl. Phys. Felix Linke danke ich für die souveräne Einführung in Mathematica.

Herrn Wilhelm Peters von der Firma ALV möchte ich für seine Hilfsbereitschaft und guten Tipps zum justieren und aufbauen danken.

Dem gesamten Lehrstuhl für das gute Arbeitsklima gilt ebenfalls mein Dank.

Besonders dankbar bin ich meiner Großmutter, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützte.

Meiner Freundin und Lebensgefährtin Petra Becker möchte ich für ihren Rückhalt, ihr Verständnis und ihre Geduld ganz besonders danken.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	3
Aktin und aktinbindende Proteine	4
F-Aktin vernetzende Proteine, deren Funktion und Relevanz	6
Aktinnetzwerke als Modelle für die Polymerphysik	7
THEORIE DER LICHTSTREUUNG	10
1.0 Einleitung	10
1.1 Lichtstreuung im Einteilchen- und im Kontinuums-Bild	12
1.2 Winkelabhängigkeit der Streustrahlung	15
1.3 Statische Lichtstreuung	16
1.4 Dynamische Lichtstreuung	19
1.4.0 Einleitung	19
1.4.1 Die Intensitätsautokorrelationsfunktion	20
1.4.2 Diffusion kleiner Partikel in Lösung	23
1.5 Untersuchung der Diffusion semiflexibler Polymere mit Lichtstreuung	24
1.5.0 Einleitung	24
1.5.1 Theorie der semiflexiblen Polymere	25
1.5.1.1 Der flexible Grenzfall - Gauß'sche Kette	25
1.5.1.2 Das Modell von Kratky und Porod	26
1.5.1.3 Der Strukturfaktor für semiflexible Polymere	30
GERÄTE ZUM EXPERIMENT	33
2.0 Einleitung	33
2.1 Die Lichtstreuanlage	34
2.1.1 Justageprotokolle, Streuwinkelkorrektur und Kontrolle der Intensitätsstabilität des Lasers über lange Zeiträume	37
2.1.1.1 Die Korrektur des Streuvektors für kleine Streuwinkel in rechteckigen Küvetten	42
2.1.1.2 Überprüfung der Langzeitstabilität des Instruments	44
2.2 Der Thermostat	46
2.3 Das Viskosimeter	49
2.3.0 Einleitung	49
2.3.1 Beschreibung eines Mikro-Ubbelohde Viskosimeters	49

2.3.1 Durchführung der Viskositätsmessung an G-Puffer und F-Puffer	51
2.3.2 Ergebnisse	52
HERSTELLUNG DER F-AKTINPROBEN FÜR DIE LICHTSTREUUNG	54
3.0 Einleitung	54
3.1 Nachreinigung des Aktins	55
3.2 Herstellung der Aktinproben für die Lichtstreuung	57
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	60
4.0 Einleitung	60
4.1 Die absoluten Streuintensitäten der verschiedenen Aktinkonzentrationen	61
4.1.1: Die Einstellung der Laserleistung - Kontrollmessungen	61
4.1.2: Die absoluten Streuintensitäten für 0.3 mg/ml F-Aktin	64
4.1.3 Die absoluten Streuintensitäten für 0.5 mg/ml F-Aktin	67
4.1.4 Die absoluten Streuintensitäten für 0.7 mg/ml F-Aktin	70
4.1.5 Die absoluten Streuintensitäten für 1.0 mg/ml F-Aktin	73
4.2 Die Intensitätskorrelationsfunktionen von verschiedenen Aktinkonzentrationen	76
4.2.1 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 0.3 mg/ml F-Aktin	76
4.2.2 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 0.5 mg/ml F-Aktin	77
4.2.3 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 0.7 mg/ml F-Aktin	78
4.2.4 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 1.0 mg/ml F-Aktin	79
4.2.5 Vergleich der normierten Intensitätskorrelationsfunktionen unterschiedlicher F-Aktinkonzentrationen bei festem Streuwinkel	80
4.2.6 Direkter Vergleich von absoluter Streuintensität und dazugehöriger Intensitätskorrelationsfunktion	81
4.3 Diskussion der gemessenen Korrelationsfunktionen	83
4.3.1 Anpassung von Modellen an die experimentellen Daten	83
4.3.2 Überprüfung des $t^{(3/4)}$ - Gesetzes für F-Aktin	86
4.3.3 Schnittpunkt der Anpassungsfunktionen mit der Ordinate	87
4.3.4 Die Berechnung der Persistenzlängen für F-Aktin	88
4.3.4 Bestimmung der Übergangspunkte vom exponentiellen Zerfall zum logarithmischen Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktionen von F-Aktin	91
4.3.5 Interpretation des statischen Strukturfaktors	97
4.4 Abschließende Betrachtungen	101
A 1: GOLDLABELING VON F-AKTIN	103
A 1.0 Einleitung	103
A 1.1 Material und Methoden	104

A 1.1.1 Geräte:	104
A 1.1.2 Reagenzien und Standards:	105
A 1.1.3 Puffer und andere Lösungen:	106
A 1.1.4 Verbrauchsmaterial:	107
A 1.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese („SDS-PAGE“):	107
A 1.1.6 Trenngele konstanter Polyacrylamid-Konzentration:	108
A 1.1.8 Anfärbung des Proteins:	108
A 1.1.7.1 Anfärbung mit Coomassie-Blau:	108
A 1.1.7.2 Silberfärbung:	109
A 1.1.8 Trocknen von Proteingelen:	110
A 1.2 Markierung von Kaninchen F-Aktin mit Mono-Sulfo-NHS-Nanogold	111
A 1.3 Bestimmung des Anteils an markiertem G-Aktin in den Fraktionen der Superdex 75 Gelfiltration	117
A 1.4 Ergebnisse	119
A 2: ANPASSUNGSERGEBNISSE	123
Literaturverzeichnis	131

ABKÜRZUNGS- UND FORMELVERZEICHNIS

Abkürzung

AKF	Autokorrelationsfunktion
A_2	2. Virialkoeffizient
n	Brechungsindex
N	Teilchenzahl
N_L	Loschmidt'sche Zahl
M	Molekulargewicht
IMB	Indexmatchingbadgefäß
E	elektrisches Feld
I	Intensität
I_s	Streuintensität
λ	Wellenlänge
l_p	Persistenzlänge
τ	Korrelationszeit
η	Viskosität
R_G	Gyrationsradius
R_H	hydrodynamischer Radius
R_Θ	Rayleighverhältnis beim Streuwinkel Θ
Θ	Streuwinkel
c	Konzentration
R	Allgemeine Gaskonstante
t	Zeit
T	Temperatur
ρ	Depolarisationsgrad, Dichte
K	Korrekturfaktor/Konstante
kDa	Masseneinheit
P	Streufunktion
P	Dipolmoment
α	Polarisierbarkeit; Volumenexpansionskoeffizient
β	isotherme Kompressibilität
ω	Kreisfrequenz
k_B	Boltzmann-Konstante
y	Hagenbach-Korrektur

ABSTRACT

It is possible with, Actin in its biopolymer form to polymerise very long filaments (of up to 100 μm in length). The polymer system models in Actin solution form allows for very easy and precise measurement. The effect of a finite torsion stiffness could be studied because the persistence length is in the range of about 20 μm .

In this thesis solutions of actin networks were studied with the aid of static, and dynamic light scattering techniques. These techniques allow measurements on homogenous and isotropic networks without markers. The actin concentration (varied between 7 and 24 μM) corresponds to mean distances of the filaments between 0.27 μm and 0.5 μm . The scattered vector varied between 12 μm^{-1} and 30 μm^{-1} . At these length scales the important and for theoretical predictions fundamental crossover between single filament dynamics and motion of the network could be measured.

It is the first time that a correlation between neighbour filaments was found to be analogous to the density correlation function of a solution. The structure of the network was studied with static light scattering technique.

Dynamic light scattering was used to measure the density fluctuations of networks within a time-scale between 100 msec and 30 minutes. In these experiments a twofold decay of the intensity correlation function was found. With short timescales a stretched exponential decay was measured, with longer timescales a logarithmic decay of the intensity correlation function was found. The higher the concentration of the actin, and the smaller the scattering angle: the higher the relative part of the logarithmic decay, in the intensity correlation function.

This extremely slow logarithmic decay is described in this work for the first time. It is related to collective modes, of the motion, of the network. The resulting exponent of 0.72 is typical an exponential value of single filament theory. The theoretical value is predicted to 0.75.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter geeigneten Bedingungen polymerisiert das Zytoskelettprotein Aktin zu Filamenten. Aufgrund der außerordentlichen Konturlängen dieser Polymere (bis in den 100 μm Bereich) sind Lösungen dieser Polymere äußerst fruchtbare Modellsysteme für die Polymerphysik. Insbesondere die Effekte einer endlichen Kettensteifheit können an diesen Lösungen studiert werden, da Aktinfilamente eine Persistenzlänge von ca. 20 μm aufweisen.

In dieser Arbeit wurden Aktinlösungen mit Hilfe der Lichtstreuung untersucht. Diese Technik erlaubt eine störungsfreie Messung an homogenen, isotropen Aktinnetzwerken. Aktinkonzentrationen variierten von 7 bis 24 μM , was mittleren Abständen zwischen den Filamenten von 0,27 μm bis 0,50 μm entspricht. Es wurden Streuvektoren im Bereich von 12 μm^{-1} bis 30 μm^{-1} verwendet, d.h. die Polymerlösung wurde auf der Längenskala der Abstände zwischen benachbarten Filamenten untersucht. Auf dieser Längenskala findet der bisher unverstandene und für die theoretische Beschreibung des Systems fundamental wichtige Übergang vom Einzelfilamentverhalten zum Kontinuumsverhalten statt.

Die Struktur der Lösungen wurde mittels statischer Streuung erforscht. Es wurde hier erstmals eine Positionskorrelation zwischen nächsten Nachbarn gefunden, analog zur Dichtekorrelationsfunktion in einer Flüssigkeit. Diese Korrelation wird ausgeprägter mit steigender Dichte des Netzwerks.

Dynamische Lichtstreuung erlaubte die Messung der Dichtefluktuationen des Netzwerks auf einer Zeitskala von 100 nsec bis zu einer halben Stunde. In diesen Experimenten wurde ein zweistufiger Zerfall der Autokorrelationsfunktionen der Streulichtintensität gefunden. Auf kurzen Zeiten (bis zu ca. 0.1 sec) liegt ein gestreckt exponentieller Zerfall der Autokorrelationsfunktion vor, bei längeren Zeiten wurde ein wesentlich langsamerer Prozess gefunden, der durch einen näherungsweise logarithmischen Zerfall der Autokorrelationsfunktionen gekennzeichnet ist. Der relative Anteil des gestreckt exponentiellen Zerfalls nimmt mit sinkender Dichte und wachsenden Streuvektoren zu. Der gestreckt exponentielle Zerfall konnte erfolgreich mit einer Theorie für die Dynamik isolierter, semiflexibler Polymere beschrieben werden. Der im Experiment gefundene Exponent von $0,72 \pm 0,02$ stimmt hervorragend mit dem Theoriewert von $3/4$ überein. Eine Auswertung der charakteristischen Zeiten lieferte Werte für die Persistenzlänge, die im Rahmen der mit alternativen Techniken bestimmten Ergebnisse liegen.

Der äußerst langsame, logarithmische Zerfallsprozess wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Er konnte kollektiven Netzwerkmoden auf der Längenskala der Abstände zwischen benachbarten Polymeren zugeordnet werden. Aus den Amplituden dieser kollektiven Moden konnten die dynamischen Lokalisierungslängen des Netzwerks berechnet werden. Diese sind überraschenderweise wesentlich kleiner als die mittleren Abstände zwischen den Filamenten.

Die hier gefundenen kollektiven Moden können nur im Rahmen einer Theorie beschrieben werden, die den Übergang von Einzelfilamenteigenschaften zu kollektiven Netzwerkeigenschaften korrekt beschreibt. Da genau dieser Übergang ein zentrales Problem der Polymerphysik ist, wird intensiv an solchen Theorien geforscht. Die in dieser Arbeit vorgestellten Messdaten erlauben es diese Theorien kritisch zu überprüfen und sind daher eine wichtige Leitschnur für die weitere Entwicklung.

EINLEITUNG

Eukaryotische Zellen werden von filamentösen Strukturen durchzogen, die an der Formgebung und den verschiedensten Zellfunktionen wie Zellfortbewegung, Zellteilung oder, wie in Muskelfasern, an der Muskelkontraktion beteiligt sind. Die Gesamtheit dieser Strukturen bildet das Zytoskelett. Die Bausteine dieser Strukturen, die Filamente, werden nach ihrem Durchmesser unterschieden in Mikrofilamente, intermediäre Filamente und Mikrotubuli. Obwohl die verschiedenen Filamente aus unterschiedlichen Proteinen aufgebaut sind, liegt allen ein ähnliches Bauprinzip zugrunde. Die Filamente des Zytoskeletts werden durch Polymerisation monomerer Proteine gebildet. Sie selbst aber sind keine statischen Gebilde, sondern können durch Polymerisation wachsen oder durch Depolymerisation schrumpfen. Zumindest in Mikrotubuli und Mikrofilamenten besitzt das Filament eine Polarität, d. h. ein Ende an dem die Polymerisation bevorzugt ist und ein Ende an dem Monomere bevorzugt depolymerisieren. Allen Filamentklassen ist gemein, dass sie mit einer Reihe akzessorischer Proteine assoziiert sind, die an spezialisierten Funktionen der Filamente beteiligt sind.

Das Zytoskelett erstreckt sich durch die ganze Zelle und ist sowohl für die charakteristischen passiven mechanischen Eigenschaften von Zellen, als auch für aktive Bewegungs- und Transportprozesse verantwortlich und daher für das Überleben der Zellen von fundamentaler Bedeutung. Die Funktionen des Zytoskeletts – z.B. bei der Stabilisierung und den funktionellen Änderungen der äußeren Form (Zellteilung und Zellmigration), oder bei der Fixierung und dem zielgerichteten Transport von Organellen und Vesikeln innerhalb von Zellen – sind sehr vielfältig und der Gegenstand lebhafter Forschung.

Der Grundbaustein der Mikrofilamente ist Aktin, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, ohne das die Zelle wohl nicht leben könnte. Mikrofilamente haben einen Durchmesser von 9-10 nm [Holmes et al.]. In Muskelzellen bilden geordnete Aktin und Myosinfilamente die hochspezialisierte Einheit der Krafterzeugung [Alberts et al.]. In Nichtmuskelzellen bilden Aktinfilamente (F-Aktin) keine statische Struktur, sondern unterliegen einem dynamischen Auf- und Abbau. Generell können zwei verschiedene Anordnungen unterschieden werden. Der Zellkörper wird von langen Aktinfilamenten durchzogen, die sich zu dicken Bündeln aneinanderlagern können und dann als

Aktinkabel oder "Stress-Fibers" bezeichnet werden. Unter der Plasmamembran und in Verbindung mit ihr, befindet sich ein Netzwerk aus kurzen Aktinfilamenten einiger 100 nm Länge, das auch als "corticales Aktinnetzwerk", oder kurz Cortex, bezeichnet wird. Die kurzen Filamente liegen relativ dicht und sind überdies hochgradig vernetzt. Daher ist das corticale Netzwerk relativ steif und bildet sozusagen die „Karosserie“ der Zelle.

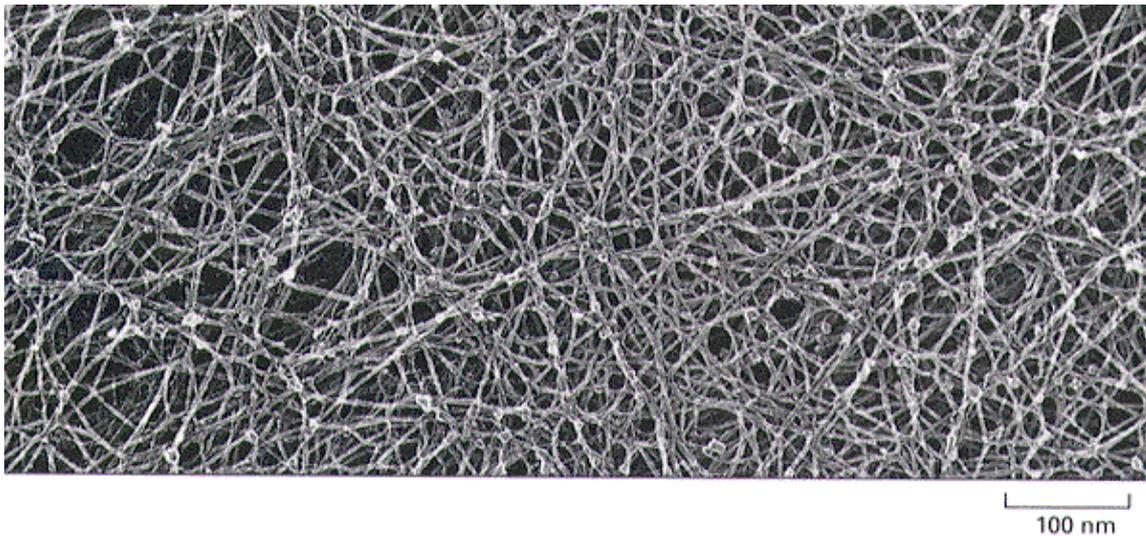


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahme des „corticalen Aktinnetzwerkes“ aus Alberts et al.

Aufgrund seiner großen Bedeutung und vielfältigen Aufgaben unterliegt das Aktinnetzwerk einer genauen biologischen Kontrolle. Eine große Anzahl von aktinbindenden Proteinen reguliert den Auf- und Abbau des Aktinfilamentsystems, seine Organisation, seine mechanischen Eigenschaften und seine Interaktion mit zellulären Strukturen. Aktin ist demnach für die mechanische Stabilität der Zelle und sogar für die Fortbewegung von Zellen unerlässlich.

Aktin und aktinbindende Proteine

Die Konzentration von Aktin in tierischen Zellen beträgt 0.1 mM [Alberts: „Die Zelle“]. Nur etwa 50 % des gesamten Aktins liegt als F-Aktin vor, obwohl die ionischen Bedingungen der Zelle die Polymerisation von Aktin begünstigen. Im Reagenzglas (in vitro) polymerisiert globuläres Aktin (G-Aktin), wenn die Konzentration die „kritische Konzentration“ von 0.1 μM übersteigt und mono- oder divalente Salze wie KCl, MgCl_2 oder CaCl_2 in millimolarer Konzentration zugegeben werden

[Gordon et al. 1976]. Die kritische Konzentration und damit die Geschwindigkeit des Filamentwachstums ist an beiden Enden des Filaments unterschiedlich, das schnellwachsende Ende wird als Plus-Ende, das langsamwachsende Ende als Minus-Ende bezeichnet. Die „kritische Konzentration“ ist zudem Ionenkonzentrations- und Temperaturabhängig.

Eine Reihe von aktinbindenden Proteinen greift in diese Anfangsphase der Polymerisation regulierend ein, wie in Abbildung 2 unten zu sehen ist:

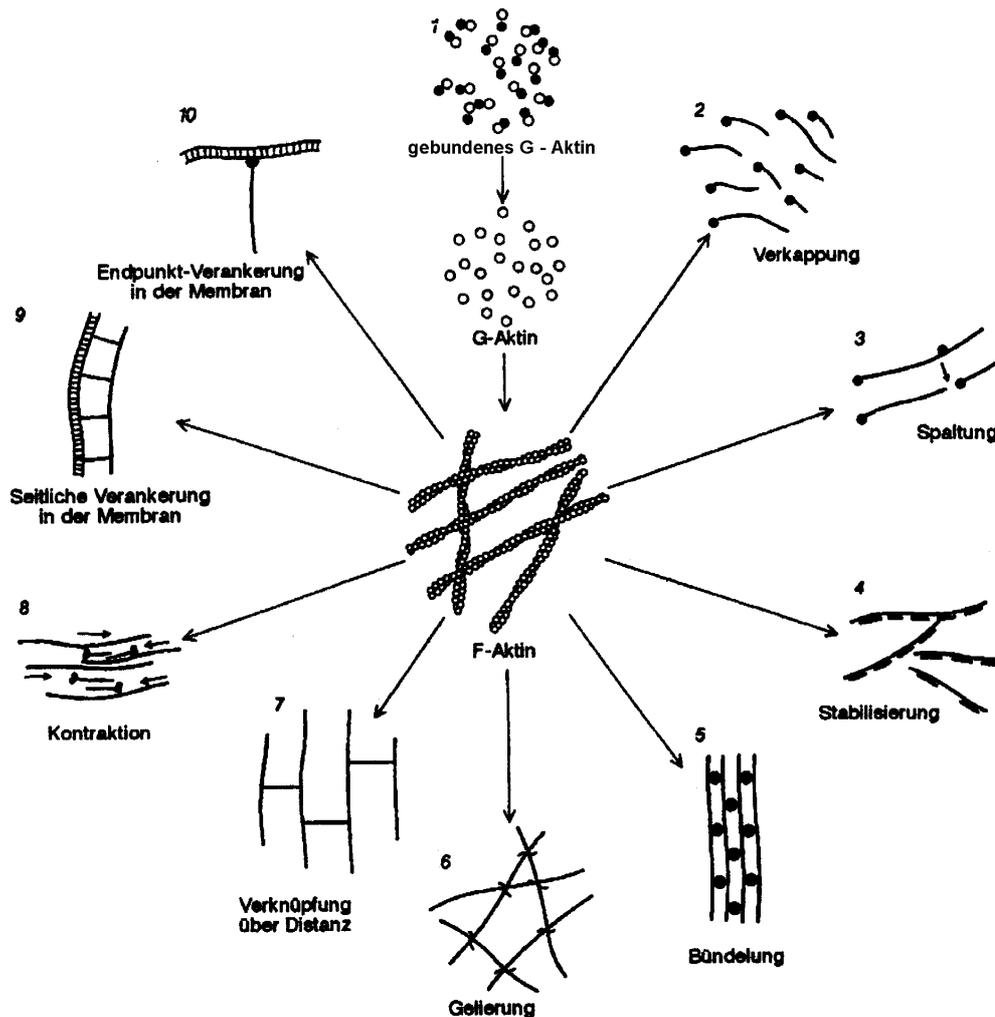


Abbildung 2: Übersicht über die unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen aktinbindender Proteine [Osborn, 1985]

Proteine wie Profilin kommen in großen Mengen in der Zelle vor und binden G-Aktin in einem 1:1 Komplex [Weeds & Way 1991]. Dem Gleichgewicht werden dadurch Aktin-Monomere entzogen und die Polymerisation gehemmt. Andere Proteine binden an das Plus-Ende des Filaments und

verlangsamen die Polymerisation (=Verkappung). Das Cap32/34 aus *D. discoideum* [Haus et al., 1991] oder das CapZ aus Muskelzellen [Casella et al., 1986; Caldwell et al., 1989] sind typische Vertreter dieser Klasse. Proteine wie Severin aus *D. discoideum* [Brown et al., 1982; Eichinger et al., 1991] oder Gelsolin aus Säugern [Yin & Stossel, 1979; Way & Weeds, 1988] haben vielfältige Aktivitäten, die die Polymerisation beeinflussen. Sie fragmentieren Aktinfilamente, binden an das Plus-Ende der Filamente und sind in der Lage den ersten Schritt der Polymerisation, die Nukleation, zu fördern.

Eine weitere Gruppe von funktionell ähnlichen Proteinen bilden die F-Aktin Vernetzungsproteine oder "Crosslinker", welche die dreidimensionale Organisation der Aktinfilamente kontrollieren und zu denen beispielsweise auch das α -Aktinin gehört [Meyer & Aebi, 1990]. Eine weitere sehr wichtige Gruppe sind einige aktinbindende Motorproteine, wie zum Beispiel das Myosin. Erst das Zusammenspiel von Myosin und Aktinfilamenten macht Zellbewegung und Muskelkontraktion überhaupt erst möglich [Stossel. The machinery of cell crawling. SCI AM 271, 1994] oder [Geeves, Holmes. Annual review of biochemistry. 68 1999].

Durch das Zusammenspiel von Aktin-Netzwerk und akzessorischen Proteinen passt die Zelle ihre mechanischen Eigenschaften an die momentanen Notwendigkeiten an. Nur so ist es möglich, dass ein und dieselbe Zelle so grundverschiedene Funktionen wie z.B. Fortbewegung, Phagozytose und Zellteilung bewerkstelligen kann.

F-Aktin vernetzende Proteine, deren Funktion und Relevanz

Ein dreidimensionales Aktinnetzwerk, wie es unter der Plasmamembran besteht, wird von Vernetzungsproteinen stabilisiert. Das corticale Aktinnetzwerk wird durch ein Netz von Aktinfilamenten gebildet, die untereinander durch Aktinbindeproteine verbunden sind (Aktingle). Alle Vernetzungsproteine besitzen deshalb zwei F-Aktin Bindestellen, die entweder auf einem Protein liegen, oder durch Dimerisierung von Untereinheiten mit jeweils mindestens einer Aktinbindestelle gebildet werden. Diese Gruppe beinhaltet beispielsweise α -Aktinin [Brier et al., 1983; Noegel et al., 1987; Condeelis et al., 1984], den 120 kDa-Gelationsfaktor [Noegel et al., 1989] und Filamin [Gorlin et al., 1990]. Vernetzungsproteine erhöhen die Viskosität einer F-Aktinlösung und können auch

zur Gelierung führen (Gelierung). Quervernetzer wie α -Aktinin ändern die makroskopisch gemessene Viskosität drastisch, während die lokale Dynamik, die mit quasielastischer Lichtstreuung gemessen werden kann, nahezu unverändert bleibt. Auf die Zelle übertragen heißt das, dass diese als ganze elastisch bzw. zäh verformbar sein kann, während aber die zum Transport von kleinen Vesikeln oder Organellen bestimmende Mikro-Viskosität sehr viel niedriger ist [Simson et al. 2000]. Die Zelle erzeugt genau die Netzwerkarchitektur, die im Moment am effektivsten ist.

Ganz besonders wichtig für Biologie und Medizin ist die Untersuchung von Aktinfilamenten und Aktinnetzwerken. Hieraus ergeben sich wichtige Zusammenhänge, welche zum grundlegenden Verständnis des Aufbaues einer Zelle unabdingbar sind. Die Funktion von Muskeln, nicht nur der Arme und Beine, sondern auch des Herzmuskels kann studiert werden. Die Ursache von Krankheiten kann somit erforscht werden.

Aktinnetzwerke als Modelle für die Polymerphysik

Für die Physik, Biologie und Chemie sehr interessant ist die Untersuchung und Herstellung von Polymeren. Diese haben weitreichende technische Bedeutung. Autoreifen, Dichtungen, Klebstoffe, Matten, sind nur wenige, einfache Beispiele. Neue Werkstoffe erschließen neue Technologien.

Polymere sind eine sehr vielfältige Substanzklasse. Hier sind Theorien und Modelle extrem wichtig, um zielgerichtet neue Materialien zu „designen“. Flexible Polymere sind schon relativ gut verstanden [Flory, Doi & Edwards, De Gennes „Scaling Concepts in Polymer Physics“]. Viele Ketten besitzen jedoch eine Steifheit, d. h. sie sind nicht beliebig biegsam sondern gleichen eher dünnen, elastischen Stäbchen für deren Biegung ein Biegemoment nötig ist [Kratky und Porod 1949 Rec. Trav. Chim. 68,1106]. Allerdings reichen thermische Fluktuationen zur ständigen Biegebewegung der Filamente. Somit kommt eine neue Längenskala ins Spiel, die sog. Persistenzlänge. Diese ist die charakteristische Abklinglänge der Richtungskorrelation entlang der Polymerkette. Kettensteifheit und die damit verbundene Persistenzlänge führen zu völlig neuen physikalischen Phänomenen, welche mit bestehenden Theorien nur teilweise beschrieben werden können. Insbesondere der Übergang von Einzelketteneigenschaften (z.B. Persistenzlänge) zu kollektiven Eigenschaften (Viskoelastizität, Kompressionsmoden) ist völlig unverstanden.

Polymerisiertes Aktin stellt ein hervorragendes Modellsystem, sowohl in Experimenten als auch für Theorien, zur Untersuchung der dynamischen und statischen Eigenschaften von semiflexiblen Polymeren im Netzwerk, dar. Durch ihre ausserordentlichen Konturlängen (bis zu 100 μm und mehr) können Aktinfilamente direkt mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden sichtbar gemacht werden. Es ist daher für viel mehr Messtechniken zugänglich als synthetische Polymere. Außerdem kann durch Zugabe von Hilfsproteinen die Eigenschaft des Netzwerkes gezielt verändert werden. Eine Reihe von Arbeiten befasste sich daher mit Aktin und seinen Filamenten. So ist zum Beispiel die Rheologie eine hervorragende Technik um Schermodule von Aktinnetzwerken zu bestimmen [Hinner et al.]. Das Fließverhalten von Aktinnetzwerken wird von molekularen Bewegungen bestimmt. Somit kann man von makroskopischen Materialeigenschaften (Schermoduli) auf mikroskopische Bewegungen rückgeschlossen werden.

Durch Fluoreszenzmikroskopie und spezielle biochemische Sonden ist es gelungen, ein F-Aktinfilament im Netzwerk direkt zu beobachten und das dynamisch zugängliche Volumen sichtbar zu machen [Sackmann, Käs und Strey, Nature]. Diese Größe ist von fundamentaler Bedeutung für die theoretische Beschreibung der Dynamik von Polymernetzwerken [Doi&Edwards].

Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie kann die Bewegung von Aktinfilamenten auf einem Untergrund aus Myosinfragmenten direkt beobachtet werden. Transportprozesse können somit sichtbar gemacht werden [Leibler et al.]. Aktuelle Arbeiten befassen sich, mit Hilfe von Nanopartikeln als Sonde, mit der Mikrorheologie von Aktinnetzwerken [Crocker et al., 2000] oder [Mahaffy et al., 2000].

Die Mikrorheologie eröffnet neue Möglichkeiten. Hier werden kleine, superparamagnetische Kugeln in das Netzwerk eingegossen, im Magnetfeld ausgelenkt und die Antwort gemessen [Ziemann, Schmidt; Rheologie, Shear field mapping]. In diesen Arbeiten wurden Unterschiede zwischen der Mikro und Makrorheologie der Aktinnetzwerke gefunden: sind die Filamente kürzer als der Kugeldurchmesser, existieren keine Unterschiede. Sind die Filamente aber länger, so wird die terminale Relaxationszeit bei der Mikrorheologie viel kleiner als bei der Makrorheologie. Bei der Zwei-Kugel-Rheologie [Crocker et al.] misst man die Korrelation zwischen den Bewegungen zweier Kugeln, d.h. die Bewegung des gesamten Hintergrundes (Kontinuumsbewegungen). Lokale Inhomogenitäten fallen weg.

Eine ideale störungsfreie Sonde zur Aufklärung mechanischer Eigenschaften von Aktinnetzwerken ist die statische und dynamische Lichtstreuung. Gerade die Lichtwellenlängen im sichtbaren Bereich zwischen 350 nm und 700 nm, sind bestens geeignet, um den Bereich des Einzelfilamen-

tabstandes zu Untersuchen. Für theoretische Betrachtungen zum Verständnis der Netzwerkeigenschaften ist dies eine zentrale Größe. Es wird präzise die Längen- und Zeitskala untersucht, in denen die gut verstandenen Einzelfilamenteigenschaften in kollektive Netzwerkeigenschaften übergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Lichtstreuung sowohl die Zeit- als auch die Längenskala des Überganges vom Einzelfilament zum Kontinuum in ungestörten Volumenlösungen von F-Aktin untersucht. Dabei wurde eine Korrelation der Abstände analog zur Struktur von Flüssigkeiten gefunden, sowie außerordentlich langsam zerfallende kollektive Moden. Beide Phänomene waren völlig unerwartet. Eine Arbeitsgruppe aus der theoretischen Physik hat begonnen, anhand dieser Ergebnisse eine entsprechende Theorie zu entwickeln. Der Übergang von Einzelfilamentbewegung zu kollektiven Netzwerkeigenschaften ist sehr wichtig, um die mechanischen Eigenschaften von Netzwerken und deren Struktur zu beschreiben.

Die Aufklärung der Dynamik und der Struktur des Netzwerkes trägt zur Lösung eines zentralen Problems in der Polymerphysik bei – der Vorhersage von Materialeigenschaften aus den Eigenschaften der Moleküle aus denen sie bestehen.

THEORIE DER LICHTSTREUUNG

1.0 Einleitung

Fällt Licht auf ein Medium, so wird die Energie des Strahles z.B. durch Absorption oder durch Streuung erniedrigt. Trifft ein Laserstrahl auf eine kolloidale Lösung, so wird das Licht durch die Teilchen im Strahlengang gestreut und man kann dieses Streulicht seitlich beobachten. Die Ursache für die Streuung von Licht sind Dichtefluktuationen. In Abbildung 3 sind die Verhältnisse schematisch dargestellt.

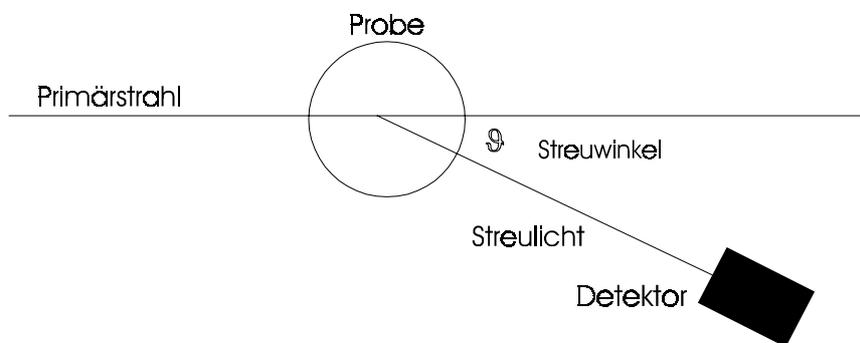


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Lichtstreuexperimentes

Streut man das Licht einer monochromatischen Lichtquelle (Laser) an einer solchen Lösung, so stimmt der größte Teil des Streulichts sowohl in der Phase als auch in der Frequenz mit der Ausgangsstrahlung überein. In diesem Fall sprechen wir von elastischer oder kohärenter Streuung, vgl. Abschnitt 1.1. Es unterscheidet sich lediglich die Intensität, die Fortpflanzungsrichtung und der Polarisationszustand der Streustrahlung von der Ausgangsstrahlung.

Für Teilchen, die in der Lösung auf Grund der Brownschen Molekularbewegung unterschiedlich diffundieren, kann sich jedoch das Streulicht zusätzlich in der Phase und Frequenzverteilung von der Primärstrahlung unterscheiden. In diesem Fall sprechen wir von inelastischer oder dynamischer Streuung. Dieser Aspekt wird im Abschnitt über dynamische Lichtstreuung genauer untersucht.

Die Analyse der Intensität und Richtungsabhängigkeit der Streustrahlung erlaubt Rückschlüsse auf die Eigenschaften sowohl der einzelnen streuenden Teilchen, als auch eines Ensembles von Teilchen in einer Lösung. Insbesondere können so Molekulargewichte und Gyrationsradien werden so bestimmt. Der Abschnitt über statische Lichtstreuung behandelt dies näher.

Ein Teil der Strahlung erfährt durch den Dopplereffekt kleine Frequenzverschiebungen (quasi-elastisch gestreutes Licht). Eine Analyse der Frequenzverteilung dieses Anteils erlaubt Aussagen über die Dynamik der Probe auf einer Zeitskala von wenigen Nanosekunden bis zu mehreren Stunden mit Photonenkorrelationsspektrometern und im Picosekundenbereich mit Fabry-Perot Interferometern. Auf diesem Weg werden in unserem Fall die zeitlichen Dichtefluktuationen der Lösungen von Aktinfilamenten bestimmt. Diese Methode der Streulichtanalyse bezeichnet man als dynamische Lichtstreuung (DLS) oder auch äquivalent als quasielastische Lichtstreuung (QLS). Eine genauere Beschreibung dieses Prozesses soll im Abschnitt über dynamische Lichtstreuung erfolgen.

Wird die Streuintensität jedoch gemittelt, so geht Information über die Dynamik der Probe verloren und man bezeichnet diese Methode der Streulichtanalyse als statische Lichtstreuung (SLS). Dieser Prozess wird im Abschnitt über statische Lichtstreuung kurz beschrieben.

Wir nehmen an, dass die Teilchendimension wesentlich kleiner ist als die Wellenlänge der Lichtquelle, man sich also im Bereich der Rayleigh-Streuung befindet, in dem gilt:

Teilchendurchmesser $< \lambda/20$.

Hochinelastische Prozesse (z.B. Anregung von Phononen = Brillouin-Streuung) und Streuung durch große Partikel (Mie-Streuung) [1] werden im folgenden außer acht gelassen, da diese Effekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

1.1 Lichtstreuung im Einteilchen- und im Kontinuums-Bild

Im Feld der anregenden elektromagnetischen Welle schwingen die Außenelektronen der Teilchen im Streuvolumen hin und her. Die so oszillierenden Elektronen senden dann ihrerseits elektromagnetische Dipolstrahlung aus. Durch diesen Prozess wird die anregende elektromagnetische Welle gestreut.

Die elektrische Feldstärke \mathbf{E} des einfallenden Lichtes übt eine Kraft auf die Außenelektronen eines Moleküls aus. Dadurch wird ein elektrisches Dipolmoment \mathbf{p} induziert. Die Größe des elektrischen Dipolmoments \mathbf{p} ergibt sich aus dem Vektorprodukt der Polarisierbarkeit α des Moleküls und der Feldstärke \mathbf{E} [2]:

$$\mathbf{p} = \alpha \times \mathbf{E} \quad (1)$$

Der Realteil der Feldstärke \mathbf{E} eines Laserstrahls hat ideal die folgende Zeit- und Ortsabhängigkeit:

$$\mathbf{E} = \text{Re} [\mathbf{E}_0 \exp\{i(\mathbf{k} \mathbf{r} - \omega_0 t)\}] \quad (2)$$

Bei kleinen Teilchen (Teilchendimension $d \ll \lambda/20$) ist \mathbf{E} an jedem Ort innerhalb des Teilchens gleich groß und es treten daher keine Phasenunterschiede bei der Anregung auf. Das gleiche gilt, wenn ein Ensemble von Teilchen sehr dicht beieinander liegt, der Abstand R zwischen den Teilchen im Ensemble relativ klein ist ($R \ll \lambda/20$). Der einfallende Strahl induziert in allen diesen Teilchen ein in Phase und Frequenz gleich oszillierendes Dipolmoment:

$$\mathbf{p} = \text{Re} [\alpha \times \mathbf{E}_0 \exp\{i(\mathbf{k} \mathbf{r} - \omega_0 t)\}] \quad (3)$$

Diese oszillierenden Dipole emittieren nun ihrerseits elektromagnetische Strahlung, die sich sphärisch nach allen Richtungen und senkrecht zum \mathbf{E} -Vektor ausbreitet, die sogenannte Streustrahlung. Die elektrische Feldstärke der Streustrahlung ist proportional zu $d^2\mathbf{p}/d^2t$, wobei \mathbf{p} in Gleichung

chung 1 gegeben ist. Für große Entfernungen r vom Streuzentrum steht die gestreute Feldstärke \mathbf{E}_s senkrecht auf der Verbindungsgeraden zwischen Dipol und Beobachter und fällt im Betrag mit $1/r$ ab. Die Größe der Feldstärke variiert auch mit $\sin\Theta$, dem Beobachtungswinkel in der Streuebene. Für die Feldstärke des gestreuten Lichts \mathbf{E}_s ergibt sich so mit $\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} = 2\pi x/\lambda$ und $\omega_0 t = 2\pi\nu_0 t$ folgender Ausdruck [2]:

$$\vec{E}_s^{Einzel} = \frac{4\pi^2 \alpha \vec{E}_0 \sin \Theta}{r \lambda^2} \cos 2\pi \left(\nu t - \frac{x}{\lambda} \right) \quad (4)$$

Die Frequenz und die Phase von \mathbf{E}_s ist gleich der des einfallenden Lichts \mathbf{E} , daher der Name kohärent bzw. elastisch gestreutes Licht. Abbildung 4 soll die Situation, zur besseren Übersicht nur für ein Teilchen dargestellt, veranschaulichen:

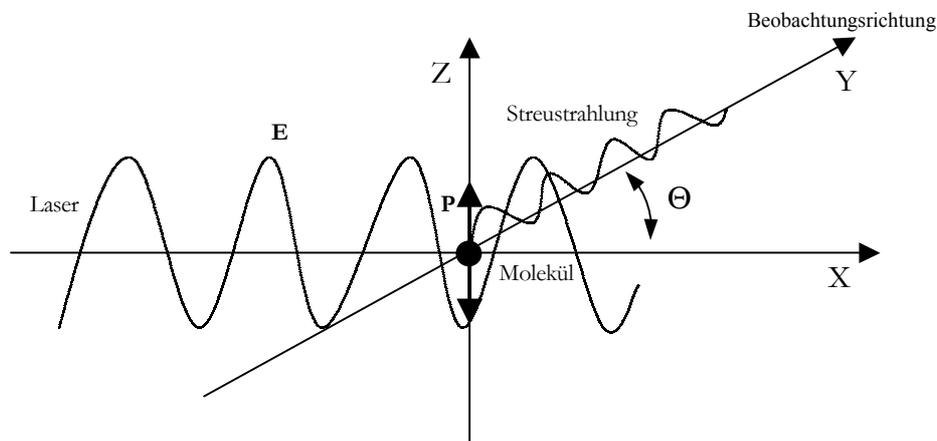


Abbildung 4: Streuvorgang an einem Teilchen

Sind die Teilchendimensionen d oder aber die Abstände R der Teilchen im Ensemble größer als $\lambda/20$, so werden die Teilchen mit unterschiedlichen Phasen des einfallenden \mathbf{E} -Feldes angeregt. Somit sind auch die Phasen der Wellen in der gestreuten Strahlung unterschiedlich. Die gesamte Streustrahlung ist demnach eine Überlagerung aus einzelnen Wellen unterschiedlicher Phase. Diese

Situation tritt zum Beispiel auf, wenn in einer Lösung mit filamentösem Aktin Licht gestreut wird. Das Licht wird an den Dichtefluktuationen des Netzwerkes gestreut. Abbildung 5 veranschaulicht dies am Beispiel des F-Aktins:

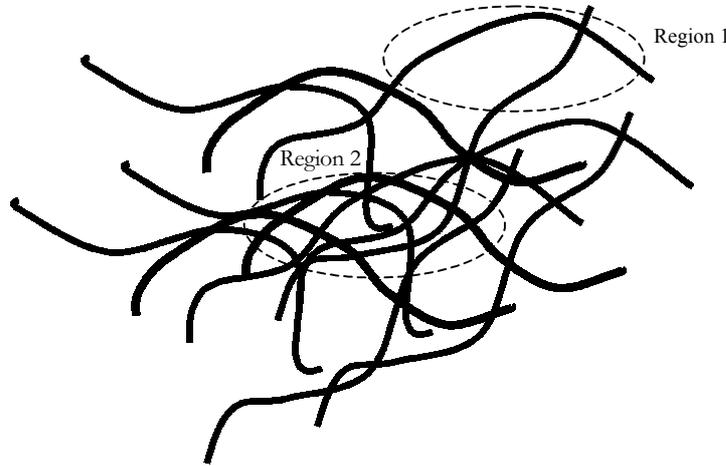


Abbildung 5: Verteilung von Aktinfilamenten im Streuvolumen

Die Region 1 zeigt einen Bereich, in dem die Filamente relativ weit voneinander entfernt sind, Region 2 zeigt Bereiche, in denen die Filamente einander sehr nahe sind, im folgenden als Knoten bezeichnet. Durch Diffusion der Filamente ändert sich die Größe und Lage dieser Regionen.

Durch die translatorische Diffusion der Moleküle kommt es darüber hinaus zu einer Dopplerverbreiterung der Frequenz in der Streustrahlung gegenüber der Einfallsstrahlung. Man kann also von quasimonochromatischem Streulicht sprechen.

Ebenfalls Beachtung finden muss die Tatsache, dass F-Aktin lange Filamente bildet (μm -Bereich) und als semiflexibles Polymer betrachtet wird. Die Polarisierbarkeit α ist nicht isotrop, sondern ein Tensor 2. Ordnung. Die Arbeiten von Kroy und Frey [3] und von Eimer et. al. [4] geben hierzu gute Einblicke, wie weiter unten gezeigt wird. Für das Elektrische Feld \mathbf{E} des gestreuten Lichtes ergibt sich folgender Zusammenhang [5]:

$$\vec{E}_s = k_0^2 \frac{\vec{E}_0 \sin \Theta}{4\pi R_0} \int_V \delta\epsilon(\vec{r}) \exp[-i\vec{q}\vec{r}] d^3 r \quad (5)$$

Es bedeuten k_0 der Wellenvektor des einfallenden Lichtes, ϵ die Dielektrizitätskonstante und \mathbf{q} der Streuvektor, R_0 ist der Abstand vom Streuzentrum.

1.2 Winkelabhängigkeit der Streustrahlung

Wie in Abschnitt 1.1 erwähnt, sollen die Abmessungen der Teilchen gegenüber der Wellenlänge klein sein. Das \mathbf{E} -Feld ist dann am Ort der Teilchen homogen und die Teilchen strahlen wie punktförmige Dipole. Bei Makromolekülen deren Durchmesser größer als $\lambda/20$ ist, werden die Elektronen mit unterschiedlichen Phasen angeregt. Die von diesen verschiedenen Bereichen ausgehende Streustrahlung führt abhängig vom Beobachtungswinkel zu einer mehr oder weniger starken Auslöschung und damit zu einer Winkelabhängigkeit in der Streustrahlung, wie Abbildung 6 veranschaulicht. Die Strahlen geben die Streurichtung wieder, das Polardiagramm soll qualitativ die Intensitätsverteilung zeigen. In der Mitte befindet sich das Streuzentrum.

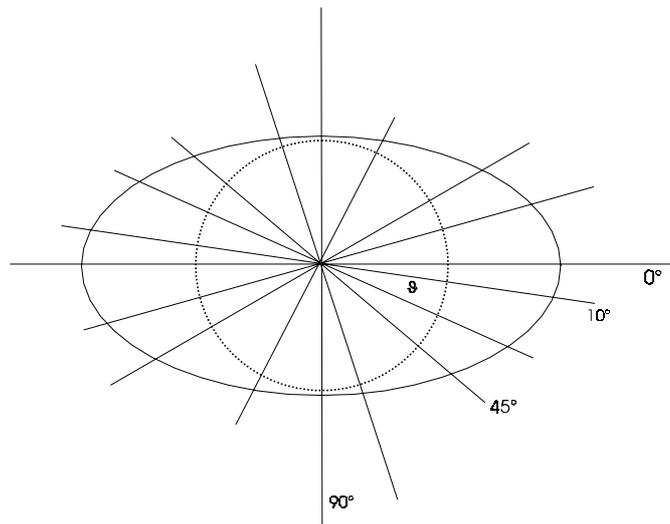


Abbildung 6: Streudiagramm von Teilchen größer als $\lambda/20$ und kleiner als $\lambda/2$ und eines punktförmigen Streuers (gestrichelte Linie)

Ein solch glatter Verlauf der Streukurve ergibt sich jedoch nur, wenn die Abmessungen der Moleküle die Größenordnung einer halben Wellenlänge nicht übersteigen. Aktinfilamente sind wenige nm dick, so dass diese Forderung erfüllt ist.

Beim Beobachtungswinkel 0° kommt zum Streulicht noch das im Allgemeinen kaum abgeschwächte Primärlicht hinzu und man muss deshalb bei großen Molekülen die Streuintensität bei verschiedenen Winkeln messen und auf den Streuwinkel Null extrapolieren. Dies ist bei Auswertungen in der statischen Lichtstreuung von großer Bedeutung, da die Gesetzmäßigkeiten der Rayleigh-Streuung hier gültig sind. Bei dynamischen Lichtstreuexperimenten ergeben sich aus der Winkelabhängigkeit der Streustrahlung sehr interessante Einblicke in die Dynamik der Dichtefluktuationen von Netzwerken, wie in den folgenden Abschnitten gezeigt wird.

1.3 Statische Lichtstreuung

Wie bereits in Abschnitt 1.0 erwähnt, gibt es zwei voneinander unabhängige Methoden, die Streuintensität eines Lichtstreuexperimentes winkelabhängig auszuwerten. In diesem Abschnitt soll nach B. Zimm [6] auf jene Methode der Auswertung eingegangen werden, mit welcher Molekulargewichte, Gyrationsradien und 2. Virialkoeffizienten von Molekülen gemessen und berechnet werden können. Da in dieser Arbeit eine statische Analyse der Streustrahlung nach B. Zimm nicht stattfand, das Augenmerk in Lichtstreuexperimenten aber immer auf der statischen Streuintensität liegen soll, wird hier nur kurz das Vorgehen beschrieben. Die statische Betrachtung der Streuintensität ist zur Justage und Kalibration einer Lichtstreuanlage unabdingbar. Herleitungen findet man in der Literatur [7].

Ausgangspunkt für eine statische Analyse der Streustrahlung eines Lichtstreuexperimentes nach B. Zimm ist das Rayleigh-Verhältnis [8]:

$$R = r^2 \frac{I_{\Theta}^{\text{Streu}}}{I_0} \quad (5)$$

Es bedeuten hier: r der Abstand Streuzentrum - Detektor, I^{Streu} die Streuintensität beim Streuwinkel Θ und I_0 die Laserintensität.

Die Streuintensität ist proportional zu E^2 . Für vertikal polarisiertes Einfallslight (Laserlicht) in kolloidalen Lösungen hat das Rayleigh-Verhältnis folgende Gestalt [9]:

$$R_{\Theta} = \frac{4\pi^2 n^2}{N_L \lambda^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 cM = KcM \quad (6a)$$

Hier bedeutet neben den üblichen Abkürzungen, dn/dc das spezifische Brechungsindexinkrement.

Für einige Flüssigkeiten die als Standard verwendet werden, wie zum Beispiel Toluol, wurde das Rayleigh-Verhältnis in Absolutmessungen ermittelt [10]. Das Rayleigh-Verhältnis für Flüssigkeiten hat bei 90° Streuwinkel folgende Gestalt [11]:

$$R(90^\circ) = \left[\frac{4\pi^2 kT\beta}{\lambda^4} \right] \left[\frac{n}{\alpha} \right]^2 \left[\frac{dn}{dT} \right]^2 \left(\frac{6+6\rho_u}{6-7\rho_u} \right) \left(\frac{1}{1+\rho_u} \right) \quad (6b)$$

Neben den üblichen Abkürzungen bedeuten: β die isotherme Kompressibilität, α bezeichnet den isobaren Expansionskoeffizienten und ρ_u ist das Verhältnis von horizontal und vertikal polarisierter Streulichtintensität für unpolarisiertes Primärlicht.

Durch Vergleich von selbst gemessenem und aus Absolutmessungen bestimmtem Rayleigh-Verhältnis, wird die Justage einer Lichtstreuanlage überprüft, wie später noch gezeigt wird [7].

Nach B. Zimm benötigt man den Quotienten Kc/R einer Lösung, um Molekulargewichte, Gyrationradien und 2. Virialkoeffizienten zu berechnen. Dazu muss die Streuintensität des Lösungsmittels von der Streuintensität der Lösung subtrahiert werden, da man nur an der Streuintensität der gelösten Substanz selbst interessiert ist. Aus den Mittelwerten errechnet sich dann der Kc/R -Wert wie folgt [12]:

$$\frac{Kc}{R_\Theta} = \frac{4\pi^2 \left(\frac{dn}{dc} n_{\text{Lösungsmittel}} \right)^2 c}{N_A \lambda^4} \cdot \frac{\frac{I_{\text{Standard}}}{I_{\text{Laser}}}}{\frac{I_{\text{Lösung}}}{I_{\text{Laser}}} - \frac{I_{\text{Lösungsmittel}}}{I_{\text{Laser}}}} \cdot \frac{1}{R_{\text{Absolut}}} \quad (7)$$

Neben den üblichen Abkürzungen bedeuten:

I_{Laser} : Primärintensität

I_{Standard} : Streuintensität des Standards, hier Toluol

$I_{\text{Lösungsmittel}}$: Streuintensität des Lösungsmittels

$I_{\text{Lösung}}$: Streuintensität der Lösung

R_{Absolut} : Aus Absolutmessungen berechnetes theoretisches Rayleigh-Verhältnis des Standards

Toluol wird als Standard verwendet und sein Rayleigh-Verhältnis für 488 nm Primärlicht beträgt bei 25°C $39.6 \cdot 10^{-6} \text{ 1/cm}$, vgl. [10]. Der Brechungsindex für Toluol beträgt 1.443 bei 488 nm.

Um Molekulargewichte, Gyrationradien und 2. Virialkoeffizienten berechnen zu können, wird Gleichung 7 nach B. Zimm [9] mit Näherungen modifiziert zu:

$$\frac{Kc}{R_{\Theta}} = \frac{1}{P(\Theta)M} + 2A_2c \quad (8)$$

$P(\Theta)$ bezeichnet die Streufunktion, für die gilt:

$$\frac{1}{P(\Theta)} = 1 + \frac{16}{3} \pi^2 \frac{R_G^2}{\lambda^2} \sin^2 \frac{\Theta}{2} \quad (9)$$

Durch Kombination der Gleichungen 8 und 9 erhält man:

$$\frac{Kc}{R_{\Theta}} = \frac{1}{M} \left[1 + \frac{16}{3} \pi^2 \frac{R_G^2}{\lambda^2} \sin^2 \frac{\Theta}{2} \right] + 2A_2c. \quad (10)$$

Wird die Streuintensität über einen größeren Winkel- und Konzentrationsbereich gemessen, so liefert dieses Verfahren unabhängig von der Form des Teilchens oben erwähnte Größen [2;9].

1.4 Dynamische Lichtstreuung

1.4.0 Einleitung

Wie eingangs erwähnt, untersucht man in der dynamischen Lichtstreuung (DLS) die Frequenzverteilung des gestreuten Lichtes [13]. Die streuenden Partikel in der Lösung unterliegen ständiger thermischer Bewegung, so dass es in der Streustrahlung aufgrund des Dopplereffektes zum Teil zu Frequenzverschiebungen kommt. Die spektrale Verbreiterung in der Streustrahlung $I_s(\omega)$ enthält folglich Informationen über die dynamischen Prozesse in der Lösung. Aufgrund der statistischen Bewegung der Streuteilchen in der Lösung, ändern sich auch die Interferenzbedingungen der von den Streuern emittierten Wellen. Dies hat eine statistische Fluktuation der Streuintensität I_s zur Folge. Die Streuintensität I_s enthält demnach Frequenzkomponenten, welche die Primärstrahlung nicht hatte, deshalb bezeichnet man die dynamische Lichtstreuung auch oft als quasielastische Lichtstreuung. Allerdings ist die Aufweitung des Frequenzspektrums im allgemeinen sehr klein:

$$\frac{\Delta f}{f} \approx \text{charakteristische Zerfallsrate von } g_1 \sim \frac{10^7 - 10^3 \text{ 1/sec}}{3 \cdot 10^8 \text{ m/sec}} \cdot 488 \cdot 10^{-9} \text{ m} \approx 10^{-12} - 10^{-8}$$

Diese Frequenzauflösung kann mit Interferometern nur sehr schwer erreicht werden, deshalb wird Photonenkorrelation verwendet.

In der dynamischen Lichtstreuung unterscheidet man grundsätzlich zwischen zwei voneinander unabhängigen experimentellen Methoden. Zum einen handelt es sich hierbei um die Heterodynspektroskopie, bei der die Primärstrahlung mit der Streustrahlung zur Analyse überlagert wird, zum anderen um die Homodynspektroskopie, bei welcher ausschließlich die Streustrahlung detektiert und untersucht wird.

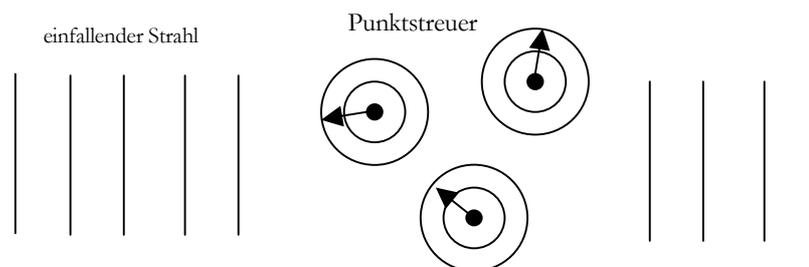


Abbildung 7: Bei der Homodynemethode wird ausschließlich die von den Partikeln gestreute Strahlung beobachtet.

Jedes Teilchen wirkt als Punktstreuer. Da sehr viele Teilchen beitragen, entsteht ein sehr komplexes Interferenzmuster das aufgrund der Teilchenbewegung ständig fluktuiert.

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Streustrahlung das Prinzip der Homodynspektroskopie angewendet, vgl. Abbildung 7, welche im folgenden näher beschrieben werden soll.

1.4.1 Die Intensitätsautokorrelationsfunktion

In der dynamischen Lichtstreuung ist die zentrale Ausgangsgröße für weitere Berechnungen die Intensitätsautokorrelationsfunktion. Dazu werden die Streuintensitäten zwischen sehr kleinen Zeitabständen im Nanosekundenbereich, aber auch zwischen sehr großen Zeitabständen im Stundenbereich miteinander verglichen (korreliert).

Nach dem Wiener-Khintchine-Theorem ist die Autokorrelationsfunktion der Streuintensität (AKF $I_s(t)$) die inverse Fouriertransformierte der spektralen Dichte $I_s(\omega)$ [13] :

$$\langle I(t + \tau)I(t) \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\omega) \exp(-i\omega\tau) d\omega \quad (11)$$

Die Intensitätsautokorrelationsfunktion ist definiert, vgl Chu [45], als

$$g_2(t) = \langle I(t + \tau)I(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t + \tau)I(t) dt \quad (12)$$

Diese Beziehung bringt folgendes zum Ausdruck:

Zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten t und $t+\tau$ variiert die Intensität, je kleiner τ im Vergleich zu den für die Fluktuationen charakteristischen Zeiten ist, desto geringer ist der Unterschied der bei-

den Intensitätswerte. Die Fluktuationen sind somit eng miteinander korreliert. Ist τ sehr groß, zerfällt die Korrelation zwischen den beiden Intensitätswerten. Die Korrelationsfunktion fällt von ihrem Anfangswert $\langle I(0)^2 \rangle$ für kleine τ , auf $\langle I \rangle^2$ für große Zeiten τ ab.

Experimentell wird Gleichung 12 angenähert durch

$$g_2(t) = \lim_{M \rightarrow \infty} \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M I_j I_{j+m} . \quad (13)$$

Hier bezeichnen I_j die Mittelwerte der Streuintensität im Intervall $[j \cdot dt, (j+1) \cdot dt]$ zur Zeit $t=j \cdot dt$, und I_{j+m} den Mittelwert der Intensität zur Zeit $t+\tau = (j+m) \cdot dt$. Die Streuintensität wird über ein Zeitintervall dt gemessen. Je größer die Anzahl M der Messpunkte und je kleiner die Einzelmesszeit dt ist, umso besser nähert sich die Summe aus Gleichung 13 dem Intergral aus Gleichung 12, vgl. [9].

Zum besseren Verständnis wurde hier vorausgesetzt, dass die Zeitabstände τ linear sind. Mit fortgeschrittenen Korrelationsverfahren und entsprechender Computerarchitektur ist dies jedoch nicht zwingend erforderlich. In dieser Arbeit war es experimentell möglich, Korrelationen im hundert Nanosekundenbereich ebenso zu messen, wie im Bereich von Stunden oder Tagen. Die Zeitachse ist hier logarithmisch, was mit sog. multi-tau-Korrelatoren realisiert werden kann. Dies stellt an die Detektionselektronik und an den Korrelator sehr hohe technische Anforderungen [14].

Zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten und für weiterführende theoretische Betrachtungen benötigt man die experimentell nicht zugängliche AKF des elektrischen Feldes, vgl. Cummins [46]:

$$g_1(t) = \frac{\langle E_s^*(t) E_s(t+\tau) \rangle}{\langle E_s^*(t) E_s(t) \rangle} \quad (14)$$

Für die normierte Intensitätsautokorrelationsfunktion, welche gemessen wird, gilt nach 12:

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t+\tau)I(t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (15)$$

Über die Siegert-Relation lässt sich die gesuchte AKF des elektrischen Feldes E aus der experimentell bestimmbaren AKF der Streuintensität berechnen [44]:

$$g_1(t) = \sqrt{g_2(t) - 1} \quad (16)$$

Diese Beziehung gilt für den Fall, dass die elektrische Feldstärke des Streulichtes \mathbf{E}_s eine Gauß'sche Zufallsvariable ist. Bei der Streuung an Mattscheiben und bei kritischen Dichtefluktuationen, wenn die Korrelationslänge die Größe des Streuvolumens überschreitet, gilt diese Beziehung nicht.

Weiterhin gilt für $g_1(t)$ [9]:

$$g_1(t) = \frac{S(q,t)}{S(q)} \quad (17)$$

Dies ist der Quotient des dynamischen und statischen Strukturfaktors $S(q,t)$ bzw. $S(q)$.

Für den dynamischen Strukturfaktor gilt [44]:

$$S(q,t) = \sum_i^N \sum_j^N \left\langle \exp(i \vec{q}(\vec{r}_i(0) - \vec{r}_j(t))) \right\rangle \quad (18)$$

Für den statischen Strukturfaktor gilt:

$$S(q) = \sum_i^N \sum_j^N \left\langle \exp(i \vec{q}(\vec{r}_i - \vec{r}_j)) \right\rangle \quad (19)$$

Die \mathbf{r}_i und \mathbf{r}_j bezeichnen die Abstände der Teilchen i und j vom gemeinsamen Schwerpunkt.

Der Streuvektor \mathbf{q} ist für isotrope Proben über den Wellenvektor des einfallenden Lichtes \mathbf{k}_i und den Wellenvektor des Streulichtes \mathbf{k}_s wie folgt definiert:

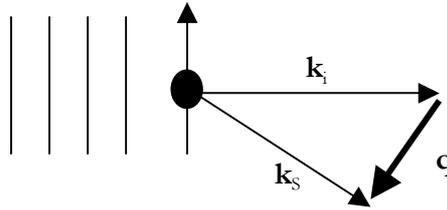


Abbildung 8: Veranschaulichung der Definition des Streuvektors:

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi \cdot n}{\lambda} \sin \frac{\Theta}{2} \quad (20)$$

Hier bedeuten:

Θ : Streuwinkel

λ : Wellenlänge des Laserlichtes

n : Brechungsindex der Lösung

1.4.2 Diffusion kleiner Partikel in Lösung

Hier wird angenommen, dass die Dimension der Teilchen kleiner als das Inverse des Streuvektors $|\mathbf{q}|$ ist, d.h. $|\mathbf{q}R_H| \ll 1$.

Für kleine, monodisperse Teilchen, welche sich rein diffusiv bewegen, gehorcht $g_1(t)$ einem einfachen Exponentialgesetz [9,13]:

$$g_1(\vec{q}, t) = g_1(\vec{q}, 0) \exp(-q^2 Dt) \quad (21)$$

mit D : Diffusionskoeffizient der Translation

1.5 Untersuchung der Diffusion semiflexibler Polymere mit Lichtstreuung

1.5.0 Einleitung

In dieser Arbeit werden Aktinfilamente untersucht, deren charakteristische Dimension (z.B. R_G) aufgrund ihrer Länge größer als die Lichtwellenlänge ist, also $|\mathbf{q}R_G| \gg 1$. In diesem Fall ist die spektrale Zusammensetzung des Streulichtes, welche in der dynamischen Lichtstreuung analysiert wird, hauptsächlich von internen Relaxationen der Moleküle bestimmt. Um aus den experimentell gewonnenen Daten auf die physikalischen Parameter des Polymers schließen zu können, bedarf es geeigneter Modelle für Polymerketten.

Licht wird an den Fluktuationen des Brechungsindex gestreut. Bei dynamischer Lichtstreuung an makromolekularen Lösungen kann man wegen der weitaus geringeren Polarisierbarkeiten, der kleineren Amplituden und der kleineren charakteristischen Zeiten der Fluktuationen des Lösungsmittels, dessen Beiträge im Streusignal in der Regel vernachlässigen. Die Fluktuationen des Brechungsindex werden deswegen in der dynamischen Lichtstreuung als proportional zu Konzentrationsfluktuationen der Makromoleküle angenommen [13]. Die spektrale Zusammensetzung des Streulichtes, die Verbreiterung der Rayleighlinie, ist bestimmt durch die Dynamik dieser Fluktuationen, wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben. Diese Konzentrationsfluktuationen werden durch die Brown'sche Bewegung [15] verursacht.

Aktinfilamente werden, wie erwähnt, bei theoretischen Betrachtungen als semiflexible Polymere beschrieben. Semiflexible Polymere sind Makromoleküle mit einer Steifigkeit zwischen den zwei Grenzfällen eines Knäuels und eines starren Stabes.

1.5.1 Theorie der semiflexiblen Polymere

Die hier beschriebenen theoretischen Beziehungen für die dynamische Lichtstreuung an semiflexiblen Polymeren für Zeitskalen bis einige ms wurden in eindrucksvollen Arbeiten von Klaus Kroy und Erwin Frey [20; 21; 22] gezeigt. Auf Herleitungen wird hier im wesentlichen verzichtet. Diese können aus [3] entnommen werden. Diese Theorie unterstützte die Lichtstreuexperimente von Frau Melanie Nguyen-Duong (geb. Hohenadel) an Desminfilamenten [23] ganz wesentlich und beschreibt auch den in dieser Arbeit an Aktinfilamenten beobachteten Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion in Zeitbereichen zwischen einigen μs und einigen ms.

1.5.1.1 Der flexible Grenzfall - Gauß'sche Kette

Zum Vergleich soll erst das mathematisch sehr gut zu behandelnde Modell für ein lineares, flexibles Polymer, die Gauß'sche Kette [3], beschrieben werden. Sie besteht aus N Untereinheiten (Perlen) der Ausdehnung b , deren Orientierung voneinander unabhängig ist und deren gegenseitige Abstände r einer Gaußverteilung gehorchen:

$$\Psi(r) = \left(\frac{3}{2\pi b^2} \right)^{3/2} \exp \left[- \left(\frac{3r^2}{2b^2} \right) \right] \quad (22)$$

mit dem quadratischen Mittel

$$\langle r \rangle^2 = b^2. \quad (23)$$

Die Verteilung der möglichen Konformationen der gesamten Kette lässt sich wie folgt beschreiben:

$$\Psi(\{r_n\}) = \prod_{n=1}^N \Psi(r_n) \quad (24)$$

wobei r_n die Position der n-ten Perle beschreibt.

Der einzige charakteristische Parameter ist demnach R , der mittlere End-zu-End Abstand des Polymers.

$$\langle R^2 \rangle = Nb^2 \quad (25)$$

Unabhängig von der Längenskala auf der das Polymer betrachtet wird, bildet die Gauß'sche Kette demnach ein Knäuel. Dieses Modell beschreibt die Wirklichkeit jedoch nur ungenügend. Reale Polymere sind auf großen Skalen geknäuel, aber auf kleinen Skalen unterhalb ihrer charakteristischen Flexibilitätsparameter, d.h. ihrer Persistenzlänge l_p (Definition siehe unten), steif.

1.5.1.2 Das Modell von Kratky und Porod

Ein besseres Modell für fadenförmige Polymere, wie Aktin oder Desmin, ist deren Betrachtung als wurmartige Kette. Dieses Polymermodell wurde von Kratky und Porod [16] erstmals 1949 vorgestellt. Es beschreibt das Polymer als dünnen Stab mit einer endlichen Biegesteifigkeit κ . Auf einer Längenskala, die kleiner als l_p aber groß gegenüber dem Durchmesser a der Kette ist, wird dieser Stab als Raumkurve $\mathbf{r}(s,t)$ der Bogenlänge s mit einer elastischen Biegeenergie U betrachtet.

Die Persistenzlänge ist wie folgt definiert:

Betrachtet man für jedes Monomer eine Tangente an die Polymerkonformation, so ist die Persistenzlänge l_p die Länge der Kontur L , über die die Orientierungskorrelationen zwischen den Tangenteneinheitsvektoren auf den Wert $1/e$ abfallen.

Formal wird sie wie folgt beschrieben [3]:

$$\langle \vec{n}_1 \cdot \vec{n}_2 \rangle \approx \exp\left[-\left(\frac{Lk_B T}{\kappa}\right)\right] = \exp\left[-\left(\frac{L}{l_P}\right)\right] \quad (26)$$

mit

$$l_P = \frac{\kappa}{k_B T}. \quad (27)$$

Hier beschreiben \mathbf{n}_i die Tangenteneinheitsvektoren der Kette an der Stelle i , L die Länge des Molekülabschnittes (Kontur) zwischen n_1 und n_2 und κ das Elastizitätsmodul (oder auch Biegesteifigkeit) der Kette. Die eckigen Klammern beschreiben das Zeitmittel.

Für U gilt:

$$U\{\vec{r}(s,t)\} = \frac{\kappa}{2} \int_0^L ds \left(\frac{\partial^2 \vec{r}(s,t)}{\partial s^2} \right)^2. \quad (28)$$

Die Konturlänge L des Filaments wird als konstant angenommen, da es wesentlich mehr Energie erfordert das Polymer zu dehnen, als es zu biegen. Auch lokal gibt es keine Dehnung:

$$\left| \frac{\partial \vec{r}(s,t)}{\partial s} \right| = 1 \quad (29)$$

Für lange Polymere kann die Schwerpunktsbewegung vernachlässigt werden:

$$\left| \frac{\partial \vec{r}(s,t)}{\partial t} \right| = 0. \quad (30)$$

Die eckigen Klammern bezeichnen das Mittel über die Konturlänge.

Das Modell von Kratky und Porod [16] ist allgemein und erfasst die Realität sehr gut. Um jedoch Strukturfaktoren für ein realistisches dynamisches Polymermodell berechnen zu können, wird dieses Modell in seiner allgemeinen Gültigkeit mathematisch sehr aufwendig. In theoretischen Betrachtungen konzentriert man sich deshalb auf die wichtigsten Einflussfaktoren.

Das Lösungsmittel beeinflusst die Polymerdynamik als viskoses Medium der Viskosität η_s . Es bremst einerseits die Einzelfilamentbewegung, andererseits wird diese durch das Lösungsmittel hydrodynamisch weitergeleitet, d.h. die Bewegungen verschiedener Filamente werden gekoppelt (hydrodynamische Wechselwirkung).

Die weiteren, wesentlichen Annahmen sind folgende:

- Die Hydrodynamische Wechselwirkung kann lokal angenommen werden (d.h. alle Filamente spüren die gleiche gemittelte Umgebung)
- In der Lichtstreuung detektierbar sind nur senkrechte Auslenkungen, Parallelverschiebungen spielen keine Rolle. Der Brechungsindex ändert sich an den Enden des Polymers in den Längen um die es verschoben wurde. Die Polymere sind aber sehr lange, daher spielt das keine Rolle.

Hiermit kann man dann die mittlere quadratische Verschiebung als Funktion des Ortes berechnen.

Weiterhin wird angenommen, dass die Filamente sehr weit voneinander Entfernt sind, dass gilt:

$$q \cdot (\text{mittlerer Abstand}) \gg 1 \quad (31)$$

Kreuzterme [3] können vernachlässigt werden.

Unter diesen Annahmen wäre der statische Strukturfaktor der einer isolierten semiflexiblen Kette. Der dynamische Strukturfaktor ergibt sich zu:

$$S(q, t) = \exp[-\Delta x^2 q^2]. \quad (32)$$

Es soll nun die für die hydrodynamische Abschirmung massgebliche mittlere Maschenweite berechnet werden.

Für das Netzwerk nimmt man ein kubisches Gitter mit der Gitterkonstanten k an. Für das Volumen eines solchen Kubus folgt dann:

$$V = k^3 \quad (33)$$

Um aus der Polymerkonzentration die Maschenweite des Netzwerkes zu berechnen, führt man einen weiteren Koeffizienten γ ein. Dieser bezeichnet die Masse pro Länge eines Filaments:

$$\gamma = m/L \quad (34)$$

daraus folgt:

$$m = \gamma L = \gamma \cdot 3k \quad (35)$$

Mit der Massenkonzentration $c = m/V$ folgt:

$$c = m/V = 3 \cdot k \cdot \gamma / k^3 \quad (36)$$

Es folgt:

$$k = \sqrt[3]{3\gamma/c} \quad (37)$$

Mit der Annahme [3]:

$$\xi_m = k \quad (38)$$

G-Aktin hat ein Molekulargewicht von $42 \cdot 10^3$ g/mol und eine Länge von 2.76 ± 0.05 nm [Holmes]. Für F-Aktin ergibt sich für die Maschenweite und die Massenkonzentration somit folgender Zusammenhang:

$$\xi_m = 0,276 \mu\text{m} \cdot \frac{1}{\sqrt{c}} \quad (39)$$

1.5.1.3 Der Strukturfaktor für semiflexible Polymere

Zur Berechnung des Strukturfaktors wird die Mobilitätsmatrix [3] durch einen effektiven Reibungskoeffizienten ξ_{\perp} angenähert.

Es gilt:

$$\xi_{\perp} = \frac{4\pi\eta_s}{\ln\left(\frac{\xi_h}{a}\right)} \quad (40)$$

Hier beschreibt a den hydrodynamischen Durchmesser des Polymers. Für F-Aktin wurde der Durchmesser zu $9 - 9.5$ nm bestimmt [24]. In dieser Arbeit wird $a = 9$ nm verwendet. Es lässt sich

zeigen, dass in verdünnten Lösungen für die hydrodynamische Abschirmlänge ξ_h folgende Abschätzung gilt [3]:

$$\xi_h = \frac{e^{5/6}}{q}. \quad (41)$$

Somit ergibt sich für ξ_{\perp} :

$$\xi_{\perp} = \frac{4\pi\eta_s}{5/6 - \ln(qa)}. \quad (42)$$

Der Strukturfaktor zerfällt im Experiment für verschiedene Korrelationsbereiche unterschiedlich. Auf kleinen Zeitskalen, im Bereich einiger μs , werden die hydrodynamisch getriebenen Fluktuationen der Polymerkontur um ihre Gleichgewichtslage beschrieben. Der anfängliche Zerfall der Intensitätsautokorrelationsfunktion („initial decay“) konnte hier für Aktin nicht gemessen werden, da Zerfall in diesem Zeitbereich nicht signifikant war. Für den Filamentdurchmesser a musste deshalb ein Theoriewert [24] genommen werden. Auf Zeitskalen einiger ms können die Relaxationen der Biegemoden beschrieben werden. Auf noch größeren Zeitskalen, welche in dieser Arbeit untersucht werden, versagt die Theorie allerdings.

Im Bereich der Biegemoden, in Zeitbereichen zwischen einigen μs und einigen ms , wurde in oben erwähnten Arbeiten für den Strukturfaktor ein gestreckt-exponentieller Zerfall hergeleitet. Es wurde angenommen, d. h. Interferenzterme zwischen verschiedenen Polymeren wurden vernachlässigt:

$$g_1(\vec{q}, t) = g_1(\vec{q}, 0) \exp \left[\frac{-\Gamma\left(\frac{1}{4}\right)}{3\pi} (\gamma_s t)^{3/4} \right] \quad (43)$$

mit der Zerfallsrate γ_s :

$$\gamma_s = \frac{k_B T q^{8/3}}{\xi_{\perp} l_P^{-1/3}}. \quad (44)$$

Neben den üblichen Abkürzungen bedeutet Γ die Gammafunktion und es gilt [25]:

$$\Gamma(1/4) = \frac{\Gamma(0,25 + 1)}{0,25} \approx 3,6256. \quad (45)$$

Diese Beziehungen helfen uns, die experimentellen Daten zu interpretieren. Im Kapitel Ergebnisse werden die charakteristischen Größen von F-Aktin berechnet und gezeigt, dass der Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion bei langen Korrelationszeiten anderen Gesetzen gehorcht, welche bis heute nicht theoretisch beschrieben werden konnten.

GERÄTE ZUM EXPERIMENT

2.0 Einleitung

Um Lichtstremessungen durchführen zu können, werden an den Aufbau und die Komponenten der Lichtstreuanlage sehr hohe Anforderungen hinsichtlich Qualität und Justage gestellt. So muss zum Beispiel die Laserintensität über einen langen Zeitraum hinweg, hier über 23 Stunden, stabil bleiben, da Schwankungen zu einem großen Meßfehler führen können. Es müssen absolute Streuintensitäten bei Messungen unter verschiedenen Winkeln und verschieden konzentrierten Proben verglichen werden. Aufbau und Justage des Gerätes müssen sicherstellen, dass die Empfindlichkeit weder zeitliche noch Winkelschwankungen zeigt. Außerdem muss das Strahlprofil des Lasers gaußförmig und genau vertikal polarisiert sein. Eine gute Intensitätsstabilität wird nur erreicht, wenn die Laserspiegel optimal eingestellt sind und Raumtemperaturschwankungen, auf die diese sehr empfindlich reagieren, bestmöglich unterdrückt werden. Die Anlage selbst muss optimal justiert sein, um Reflexe an den Küvetten zu vermeiden. Durch die Verwendung von zylindrischen Quarzglasküvetten, kommt es beim Übergang Küvette-Lösung aufgrund des Brechungsindexunterschiedes und der Krümmung der Küvettenwand zu einer Brechung des Laserstrahles (Linsenwirkung der Küvette). Ziel einer guten Justage ist nun, mit dem Laserstrahl die Küvette zentrisch zu treffen, um den Einfluss dieser Linsenwirkung auf die Winkelabhängigkeit der Messung zu minimieren. Voraussetzung hierfür ist ein gaußförmiges Strahlprofil des Lasers. Die Position der Streulichtküvetten darf sich auch bei mehrmaligem wechseln nicht ändern. Für Messungen bei sehr kleinen Winkeln werden rechteckige Küvetten verwendet, diese müssen ebenfalls reproduzierbar positioniert werden können. Eine gute Justage ist außerdem nötig, damit keine ungewollten Reflexionen von anderen sich im Strahlengang befindlichen optischen Bauteilen entstehen.

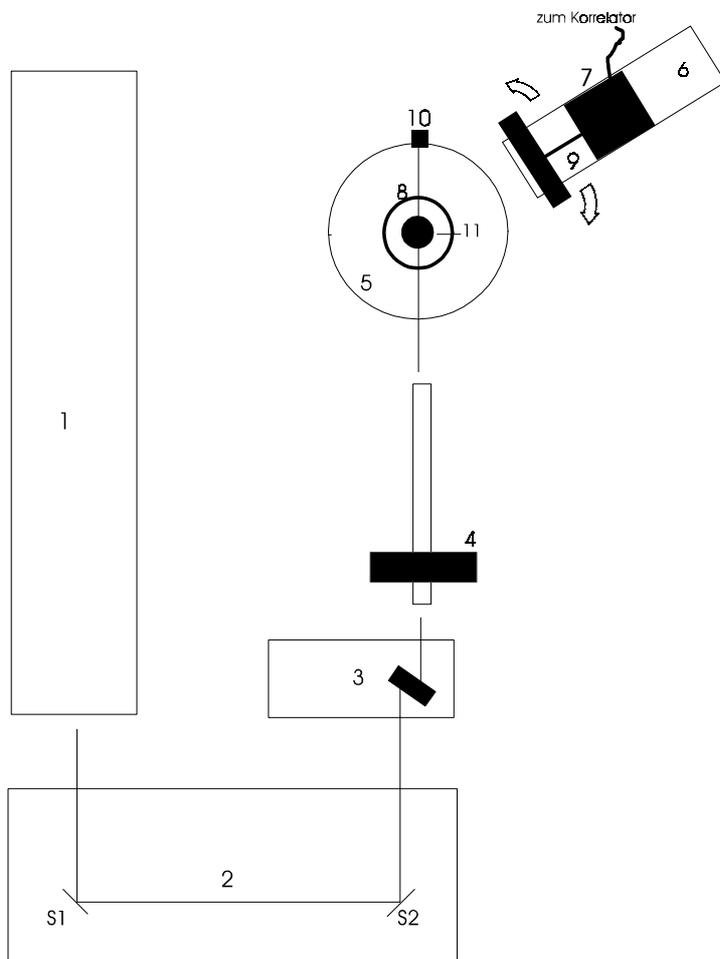
Natürlich müssen auch die Proben unter Reinraumbedingungen präpariert worden sein, da bereits wenige Staubpartikel in der Probe die Messung zerstören.

Um Streulichtschwankungen aufgrund von Konvektionsströmungen auszuschließen, muss auf eine konstante Probentemperatur geachtet werden.

Ebenso sorgfältig muss auch die kinematische Viskosität η des Lösungsmittels bestimmt werden, da diese Größe in die Beziehungen zur Auswertung der dynamischen Lichtstreudaten eingeht.

2.1 Die Lichtstreuanlage

In Abbildung 9 ist der Aufbau unseres Lichtstreuexperimentes dargestellt. Alle Komponenten der Anlage müssen exakt aufgebaut und justiert sein. Auch der Laser muss diesen Anforderungen genügen. Um exakte Messungen auszuführen, kann die Intensität des Streulichtes einer Probe in einem Winkelbereich von 20° bis 150° mit Hilfe einer drehbar gelagerten Detektionseinheit gemessen werden.



Legende:

- 1: Laser
- 2: Umlenkspiegeleinheit, justierbar mit Umlenkspiegeln S1 und S2
- 3: Strahlabschwächer-Monitordiodeeinheit, justierbar mit Strahlteilerplättchen
- 4: Fokussierlinseneinheit, justierbar
- 5: Zellgehäuse, justierbar mit Zellgehäusesedeckel und Küvettenhalterung
- 6: Goniometerarm
- 7: Photomultiplier
- 8: Indexmatchingbadgefäß
- 9: Monomodefaser mit Einkopplungslinse
- 10: Strahlfalle
- 11: Küvettenhalterung

Abbildung 9: Die Lichtstreuanlage

Nicht in Abb.9 gezeigt: Ein Korrelator mit Schrittmotorsteuertechnik, Temperaturmessung und Monitordiodesteuerung, und ein Thermostat

Die in dieser Arbeit verwendete Lichtstreuanlage (Typ: DLS/SLS – 5000 F System) der ALV-GmbH (Langen, Deutschland) besteht aus den in der Abbildung 5 dargestellten Komponenten und ist auf einer Aluminium Grundplatte montiert, welche ihrerseits auf einer massiven Natursteinplatte befestigt ist. In der Aluminiumplatte befinden sich sämtliche Bohrungen zum Verschrauben der optischen Komponenten.

Als Lichtquelle dient ein Argon-Ionen-Laser der Firma Coherent (USA) mit 488 nm Wellenlänge und einer damit verbundenen Ausgangsleistung von 1,5 W. Diese hohe Leistung stellt sicher, dass auch schwach streuende Proben mit genügend hoher Streuintensität untersucht werden können. Als Faustregel dient hier, dass die Streuintensität bei einem Streuwinkel von 90° mindestens 10mal so groß sein sollte wie die Dunkelzählrate des Photomultipliers. Der Laser muss in der TEM_{00} Mode emittieren und exakt vertikal polarisiertes Primärlicht erzeugen, um richtig interpretierbare Messungen zu ermöglichen. Um eine unabhängige und exakte Justage zu gewährleisten, wird der Laserstrahl mit Hilfe einer Umlenkspiegeleinheit (2) um 180° gelenkt. Diese erlaubt eine vom Laser unabhängige Korrektur der Strahlage durch die Spiegel S1 und S2.

In der Laser-Monitordioden-Abschwächereinheit (3) befindet sich sowohl ein auf einem Schlitten montierter Doppelgraukeil mit Skala zur reproduzierbaren Laserstrahlabschwächung, als auch ein Strahlteilerplättchen, welches einen Teil der einfallenden Lichtintensität in eine Vier-Quadranten-Diode reflektiert, damit sowohl die Strahlage als auch die Ausgangsintensität kontrolliert werden können. Die reflektierte Intensität beträgt etwa 1% der realen Ausgangsintensität. Wichtig ist hier die Proportionalität zwischen realem I_0 und reflektiertem Anteil, nicht der Absolutwert, da, wie aus Gleichung 7 hervorgeht, sich ein multiplikativer Term kürzt. Das Strahlteilerplättchen versetzt aufgrund seiner Dicke den Ausgangsstrahl um einen definierten Wert. Der Umlenkspiegel S2 ist dafür auf einem Schlitten mit Mikrometerschraube befestigt, um diesen Strahlversatz auszugleichen [7]. Der Doppelkeil hat aufgrund seiner Konstruktion kaum Einfluss auf die Strahlage, wie an den Monitordioden abgelesen werden kann. Es muss darauf hingewiesen werden, dass eine Korrektur der Strahlage über die Laserspiegel erfolgen muss, da durch die Verwendung nur einer Monitordiode im Strahlengang ein falscher Eindruck entsteht. Diese beiden Spiegel versetzen den Strahl nur dann parallel, wenn sie als Einheit betrachtet werden.

Nach der Monitordioden-Abschwächereinheit passiert der Strahl eine Fokussierlinse (Präzisionsachromat) mit 400 mm Brennweite, welcher über Mikrometerschrauben sowohl parallel und senkrecht zur Einfallsebene als auch deren Verkipfung zu ihr, exakt einjustiert werden kann. Diese Linse bündelt den Laserstrahl damit er einen noch kleineren Durchmesser erlangt und somit durch die

Krümmung der Quarzglasküvetteninnenwand nicht zu sehr abgelenkt wird, und es dadurch zu Reflexen, besonders beim Übergang Glas-Wasser, bei kleinen Streuwinkeln kommt.

Jetzt fällt der Strahl auf das Indexmatchingbadgefäß (8). Dies ist mit Toluol gefüllt und in einem temperierbaren und justierbaren Zellgehäuse (5) eingebaut. In dessen Mitte wird die Küvette mit einem konischen Teflonhalter reproduzierbar genau befestigt. Als Thermostat findet ein in der Abbildung nicht dargestellter F32HD der Firma Julabo mit einer extern rückgekoppelten Temperaturregelung und einer Genauigkeit von 0,01K Verwendung (vgl. unten). Sowohl das Indexmatchingbadgefäß als auch die Küvette mit Probe werden somit, über ein Wasserbad, auf gleicher Temperatur gehalten. Sinn des Indexmatching ist es, den Brechungsindexunterschied beim Übergang Toluol-Quarzglas so gering wie möglich zu halten, da es auch hier aufgrund der Küvettenkrümmung sonst zu Reflexen kommt.

Aus Sicherheitsgründen befindet sich am Zellgehäuse eine Strahlfalle (10) dessen Spiegel den Laserstrahl in einen absorbierenden Hohlraum lenkt.

Am Goniometerarm (6) ist die Detektionseinheit (7) mit Monomodelichtleitfaser (9) und justierbarer Einkopplungslinse befestigt. Der Schrittmotor fährt das Goniometer auf eine Winkelsekunde genau zum gewünschten Winkel. Zu erwähnen ist, dass die Dunkelzählrate des Photomultipliers abhängig von der ihn umgebenden Raumtemperatur ist. Durch Isolationsmaßnahmen im Labor konnten Temperaturdriften von bis zu 10°C auf 2-3°C gesenkt werden, so dass der Dunkelstrom von ehemals 160 Hz auf ca. 100 Hz reduziert werden konnte. Die Monomodefaser ist ebenfalls temperaturempfindlich wie auch erschütterungsempfindlich. Bei ihr ist darauf zu achten, dass sie auf einen Durchmesser von max. 10 cm aufgerollt und dann ohne mechanische Spannungen am Goniometerarm befestigt wird. Die Monomodefaser muss aufgerollt werden, da somit Streulicht anderer Phase und Wellenlänge unterdrückt wird.

Auf eine detaillierte Justagebeschreibung soll hier verzichtet werden, da die Originalanleitung der Firma ALV [7] alle Punkte enthält. Ausdrücklich wird jedoch darauf hingewiesen, dass die beschriebene Reihenfolge der Justage unbedingt eingehalten werden muss, da nur das Zusammenspiel aller mechanischen und optischen Komponenten zum Ziel führt. Bei Verwendung rechteckiger Küvetten muss darauf geachtet werden, diese um einen kleinen Winkel gedreht in den Strahlengang zu setzen, damit der entstehende Rückreflex beim Übergang Lösung-Quarzglas nicht das Streuvolumen passiert. Die Justage der Linse ist in Quelle [26] beschrieben.

2.1.1 Justageprotokolle, Streuwinkelkorrektur und Kontrolle der Intensitätsstabilität des Lasers über lange Zeiträume

Als wesentliche Voraussetzung bei allen Lichtstremessungen muss sichergestellt sein, dass der Aufbau optimal justiert und die Laserintensität auch über sehr lange Zeiträume hinweg stabil bleibt. Um dies zu gewährleisten, muss der Laser vor Justage- und Messbeginn etwa 48 Stunden in Betrieb sein, damit alle Komponenten, insbesondere die Laserspiegel, aufeinander abgestimmt werden können. Laserleistungs- und Richtungsschwankungen werden kleiner mit wachsender Betriebsdauer. Vor Messbeginn werden Justageprotokolle mit Toluol und Wasser angefertigt.

Es soll dazu das Streuvolumen, das als sehr klein angenommen wird, genauer betrachtet werden, da dies als Grundlage zur Eichung, Justage und Kalibration einer Lichtstreuanlage unabdingbar ist. Wie in Abbildung 10 verdeutlicht, verändert sich das wirksame Streuvolumen mit dem Beobachtungswinkel.

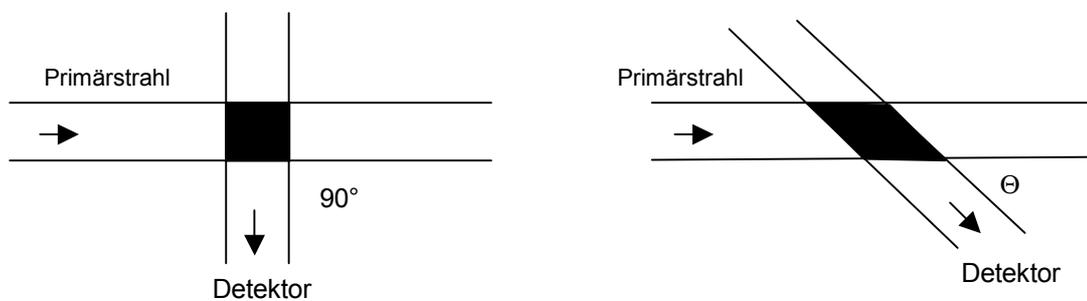


Abbildung 10: Änderung des detektierten Streuvolumens

Es gilt:

$$V_{90^\circ} = V_\theta \sin \Theta \quad (46)$$

Dabei spielt der Absolutbetrag des Volumens V und seine Gestalt keine Rolle. Direkt proportional zum Streuvolumen ist auch die Anzahl der darin enthaltenen Teilchen und damit die Streuintensität I_s .

Unter der Voraussetzung, dass sich im Streuvolumen nur sehr kleine Teilchen (Punkstreuer) befinden, gilt für die Streuintensität in zylindrischen Küvetten demnach folgende Beziehung:

$$I_s(90^\circ) = I_s(\theta) \sin\theta. \quad (47)$$

Ziel einer guten Justage ist nun, diese Beziehung zu erfüllen, damit keine Winkelabhängigkeiten vorgetäuscht werden.

Zur Überprüfung misst man bei konstanter Laserleistung die Streuintensität von Toluol in einem Winkelbereich zwischen 20° und 150° . Nach obiger Beziehung gilt im Idealfall für jeden Streuwinkel in zylindrischen Küvetten:

$$\frac{I_s(90^\circ)}{I_s(\theta)\sin(\theta)} = 1 \quad (48)$$

Die relative Abweichung dieser Beziehung vom Wert eins trägt man in einem Diagramm über die Streuwinkel auf. Ist die Anlage optimal justiert, so soll die relative Abweichung für Toluol im oben genannten Winkelbereich innerhalb der Grenzen von $\pm 1\%$ liegen, wie in Abbildung 11 unten zu sehen.

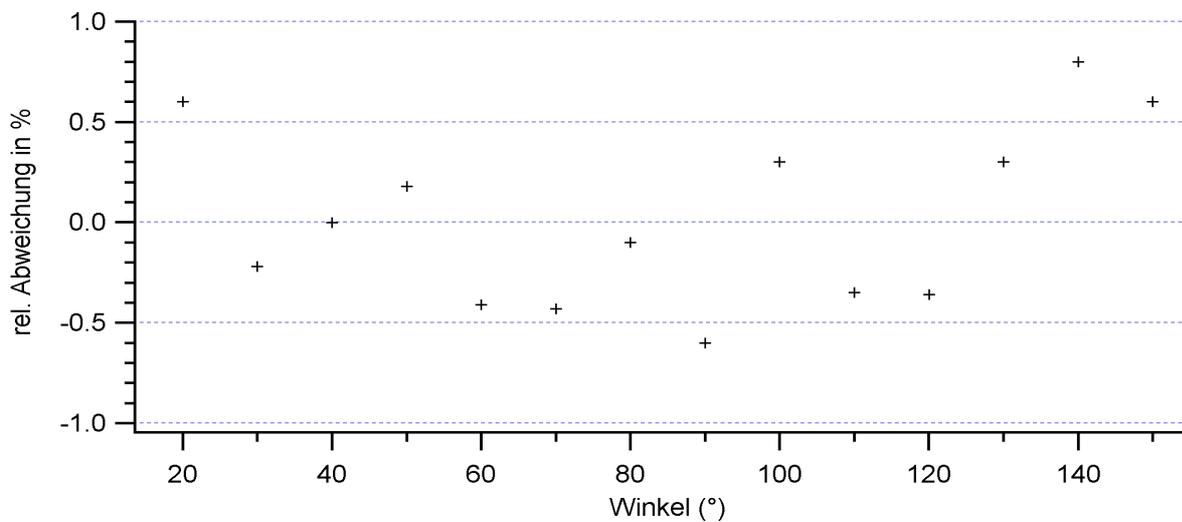


Abbildung 11: Justageprotokoll gemessen an Toluol

Die gleiche Messreihe wird mit Wasser wiederholt. Wegen des oben beschriebenen Brechungsindexunterschiedes zwischen Küvetteninnenwand und wäßriger Lösung kommt es aufgrund der dadurch entstehenden Linsenwirkung in zylindrischen Küvetten an dieser Stelle zu einer Ablenkung des Strahles. Deshalb ist der Winkelbereich zwischen 40° und 140° einzugrenzen. In Abbildung 12 ist das Justageprotokoll mit Wasser zu sehen.

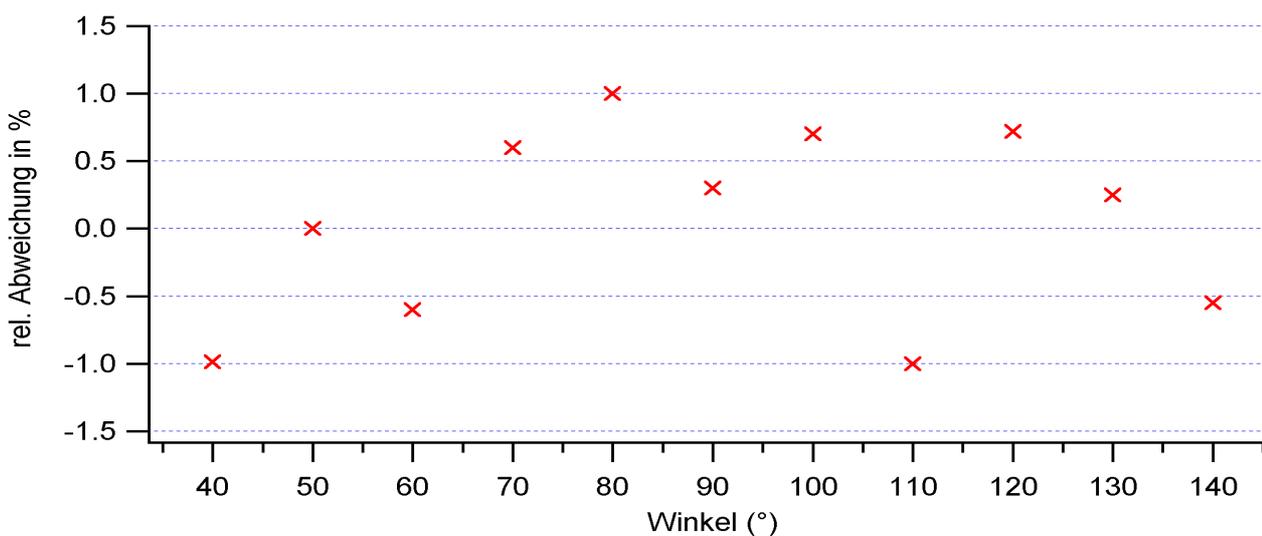


Abbildung 12: Justageprotokoll gemessen an Wasser

Ist die Anlage optimal justiert und kalibriert, so müssen beide Bedingungen gleichzeitig gelten.

Wenn man, wie in unserem Fall, in wässriger Lösung bei noch kleineren Winkeln messen möchte, so müssen in diesen Winkelbereichen rechteckige Küvetten verwendet werden. Der Linseneffekt ist dadurch eliminiert, allerdings erfordert diese Küvettengeometrie eine komplexere Korrektur des Streuvolumens, da die Streustrahlung nun nicht mehr in der Streuebene senkrecht zur Küvettenwand steht [27]. Die $\sin(\Theta)$ Beziehung ist nicht mehr gültig. Für die Berechnung des Streuvektors muss der Verkippungswinkel α ebenfalls berücksichtigt werden. Abbildung 13 unten zeigt das Schema:

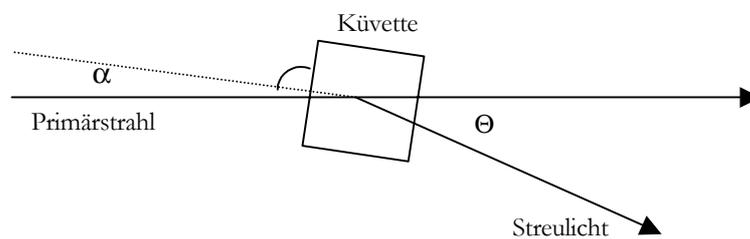


Abbildung 13a: Der Weg des Streulichtes durch eine rechteckige Küvette

Der Winkel α wurde im Experiment nach folgendem Kriterium eingestellt:

In Vorwärtsrichtung ist ein Intensitätsmaximum beim Einsetzen der Küvette deutlich zu erkennen (heller Fleck). Dieser sollte von der Detektionsoptik möglichst weit entfernt sein.

Am einfachsten ist eine experimentelle Korrektur des Streuvolumens durch Vermessen der rechteckigen Küvette. Dazu misst man winkelabhängig die Streuintensität einer wässrigen Lösung und bildet auf diese Weise einen Korrekturfaktor.

Nach Justage und Kalibration der Anlage werden die Streuintensitäten von Wasser beim Streuwinkel 90° von zylindrischer und rechteckiger Küvette gemessen und verglichen. Diese müssen gleich sein:

$$I_{\text{zylindrisch}}(90^\circ) = I_{\text{rechteckig}}(90^\circ) \quad (49)$$

Ist diese Bedingung erfüllt, so werden die Streuintensitäten I_s von Wasser in rechteckigen Küvetten bei den Streuwinkeln 15° , 20° , 25° , 30° und 40° gemessen. Daraus errechnet sich der Korrekturfaktor K_1 wie folgt:

$$K_1(\Theta) = \frac{I_{SWasser}(90^\circ)}{I_{SWasser}(\Theta)} \quad (50)$$

Es ergaben sich folgende Mittelwerte aus 5 Einzelmessungen für den Korrekturfaktor $K_1(\Theta)$:

Streuwinkel Θ	Korrekturfaktor K_1
15°	$0,23 \pm 20\%$
20°	$0,26 \pm 5\%$
25°	$0,35 \pm 5\%$
30°	$0,45 \pm 5\%$
40°	$0,52 \pm 5\%$

Tabelle 1: Korrekturfaktor $K_1(\Theta)$ für rechteckige Küvetten

Der Verkippungswinkel α , vgl. Abbildung 13, beträgt weniger als 10° . Dies ist der Winkel, um den die Küvette versetzt in den Strahlengang positioniert wird.

Multipliziert man die gemessene Streuintensität beim Streuwinkel Θ mit $K_1(\Theta)$, so soll dieser Wert gleich dem Wert der Streuintensität von Wasser bei $\Theta = 90^\circ$ sein.

Damit die oben angegebenen Werte von $K_1(\Theta)$ möglichst genau sind, sollte die Küvette mehrmals aus dem Strahlengang genommen und wieder eingesetzt werden, damit die Reproduzierbarkeit der

Korrektur gewährleistet ist. In diesen Experimenten erwies sich die Korrektur für den Streuwinkel 15° als besonders kritisch, wie aus dem Fehler entnommen werden kann. Bei den Auswertungen der Experimente wurde dieser Streuwinkel daher nicht berücksichtigt.

Mit K_1 werden die Streuintensitäten von F-Aktin in rechteckigen Küvetten im Experiment multipliziert und miteinander verglichen, wie in Kapitel 4 beschrieben.

2.1.1.1 Die Korrektur des Streuvektors für kleine Streuwinkel in rechteckigen Küvetten

Zur besseren Übersicht sind die Winkelbeziehungen aus Abbildung 13a nochmals detailliert dargestellt:

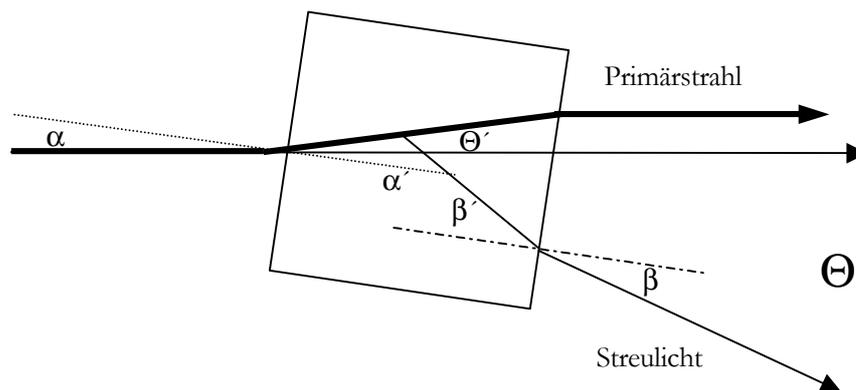


Abbildung 13b: Der Weg des Lichtes bei Verwendung rechteckiger Küvetten

Die Korrektur errechnet sich wie folgt:

$$n_W \sin(\alpha') = n_T \sin(\alpha)$$

Es gilt:

$$\Theta = \alpha + \beta$$

Weiter gelten die Brechungsgesetze:

$$n_W \sin(\alpha') = n_T \sin(\alpha)$$

$$n_T \sin(\beta) = n_W \sin(\beta')$$

daraus folgt:

$$\Theta' = \arcsin\left[\frac{n_T}{n_W} \cdot \sin(\alpha)\right] + \arcsin\left[\frac{n_T}{n_W} \cdot \sin(\Theta - \alpha)\right] \quad (51)$$

Es bezeichnen n_W den Brechungsindex von Wasser (1.333) und n_T den Brechungsindex von Toluol (1.443)

Für die Streuwinkel Θ 20°, 25° und 30° ergeben sich somit Korrekturen, welche bei der Berechnung des Streuvektors berücksichtigt werden müssen. Für $\alpha \leq 5^\circ$ ergeben sich folgende korrigierte Winkel:

Streuwinkel Θ	korrigierte Streuwinkel (Θ')
20°	21.68°
25°	27.14°
30°	32.64°

Tabelle2: korrigierte Streuwinkel

2.1.1.2 Überprüfung der Langzeitstabilität des Instruments

Die Überprüfung der Langzeitstabilität des Lasers erfolgt über die Messung der Intensitäts-Autokorrelationsfunktion von Toluol. In Abbildung 14 unten ist diese Messung über 80.000 s dargestellt.

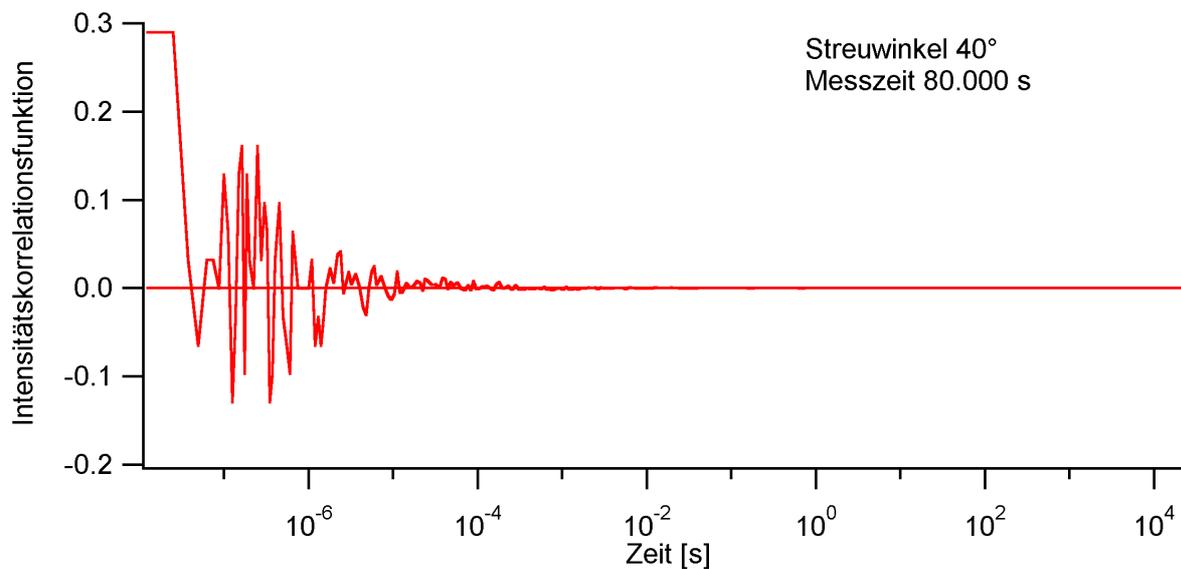


Abbildung 14a: Intensitätsautokorrelationsfunktion von Toluol

Hierbei ist darauf zu achten, dass in den Zeitbereichen, welche in dieser Arbeit relevant sind, nur möglichst kleine Korrelationen auftreten, die von Laserintensitätsschwankungen herrühren, welche sonst Einfluss auf die Messdaten haben können. Die starken Schwankungen der Intensitätskorrelation bei sehr kleinen Korrelationszeiten sind auf zu geringe Streuintensität und somit auf mangelnde Statistik zurückzuführen und im Hinblick auf die sehr lange Messzeit von 80.000 Sekunden im Experiment zu vernachlässigen. Abbildung 14b unten zeigt die gleichen Daten der Intensitätskorrelation (g^2-1) von Toluol in einer anderen Darstellung:

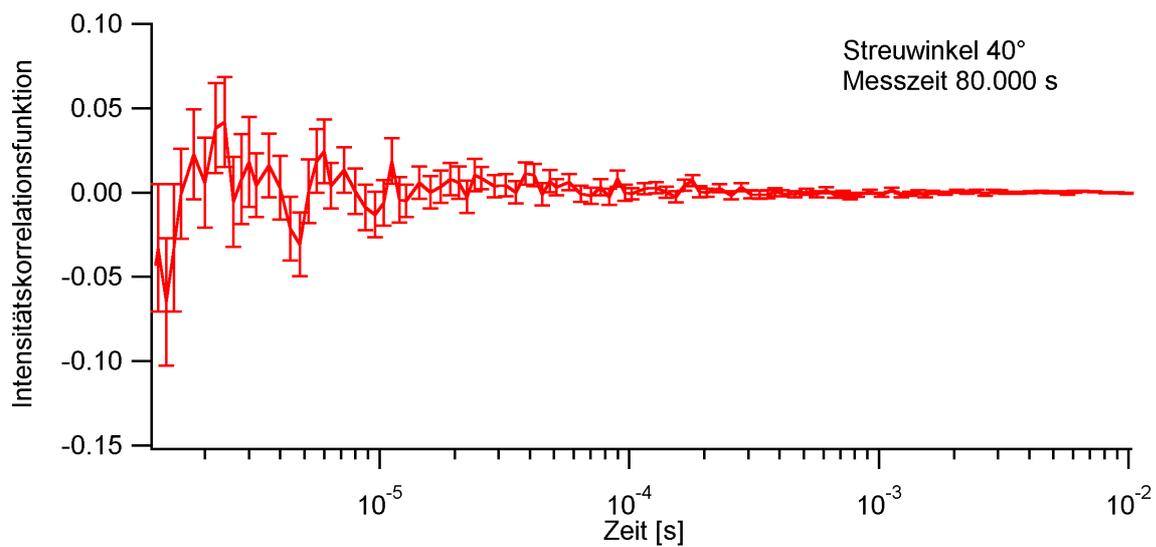


Abbildung 14b: Ein Ausschnitt der Intensitätskorrelation von Toluol

In Abbildung 14b oben ist deutlich zu erkennen, dass die Laserintensitätsschwankungen in den Zeitbereichen, die für diese Arbeit wichtig sind, sehr gering sind.

Pusey und Bertolotti [13] zeigen, dass unter der Annahme, dass Laserleistungsschwankungen und Streuprozesse statistisch unabhängig sind, für die Leistungs-Korrelationsfunktion gilt:

$$G_{\text{sig}}^2(t) = G_{\text{ideal}}^2(t) * G_{\text{Gerät}}^2(t)$$

Diese Beziehung beschreibt die Faltung der jeweiligen nicht normierten Intensitätsautokorrelationsfunktionen.

Diese Faltungsbeziehung gilt für alle Artefakte des Gerätes, z. B. Afterpulsing, Drift der Empfindlichkeit und Drift der Detektionsoptik, was gerade bei Langzeitmessungen auftreten könnte.

Die Messung an Toluol über 80.000 s zeigt Korrelationen von höchstens 0.3%. Das heißt Artefakte durch das Gerät sind zu vernachlässigen.

2.2 Der Thermostat

Dem Thermostat kommt aus folgenden Gründen eine besondere Bedeutung zu:

1. Bei kleinen Streuwinkeln kann es aufgrund von Konvektionsströmung und damit verbundener Schlierenbildung zu wellenförmigen Schwankungen der detektierten Streuintensität kommen, und so der Mittelwert am Ende der Messung einen großen Fehler aufweisen.
2. Gerade bei Langzeitmessungen, in denen Dichtefluktuationen detektiert werden, soll der Einfluss der Temperaturschwankungen eliminiert werden.
3. Die Temperatur geht in Absolutmessungen [10] ein, Gradienten werden also im Gerätekorrekturfaktor sichtbar und könnten im K_c/R -Wert ebenfalls auftauchen.
4. Natürlich möchte man temperaturempfindliche Proben bei einer definierten Temperatur messen.
5. Die Lösungsmittelviskosität zeigt Temperaturabhängigkeit

Wie erwähnt, findet ein F32-HD der Firma Julabo mit einer Genauigkeit von 0,01K Verwendung. Dieses Gerät ist für einen externen Temperaturregelbetrieb ausgelegt, welcher unten kurz beschrieben werden soll.

Selbstverständlich muss auch dieses Gerät kalibriert werden, da bei externer Temperierung ein Temperaturgradient auftreten kann. Um diesen Effekt zu minimieren, wurden sämtliche Schläuche mit Schaumstoff ummantelt und darauf geachtet, dass Messtemperatur und Raumtemperatur im Rahmen der Möglichkeiten gleich gehalten werden. Über einen Pt100 Widerstand als Messfühler, welcher direkt neben der Küvette im Zellgehäuse steckt und in die Indexmatchingflüssigkeit ragt, wird die Probentemperatur gemessen und kann am Bildschirm jederzeit mitverfolgt werden. Ein zweiter Pt100 Widerstandsmessfühler verbunden mit dem Thermostat, ragt ebenfalls in die Indexmatchingflüssigkeit und misst die Temperatur am Ort der Probe. Der interne Messfühler des Thermostaten wie auch der zweite Pt100 sind über eine Vierpunktschaltung verschaltet. Abbildung 15 unten zeigt den Schaltplan:

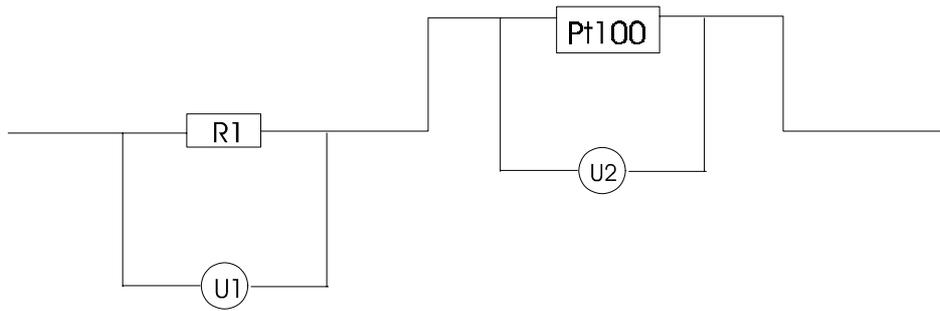


Abbildung 15: Schaltplan für externen Temperaturregelbetrieb

Hier bezeichnet R1 den internen Temperaturwiderstand, entsprechend U1 und U2 die an den Widerständen abfallenden Spannungen. Durch Vergleich beider Spannungen wird die hohe Temperaturgenauigkeit erreicht.

Des weiteren hängt die Temperaturgenauigkeit über lange Zeiträume von der richtigen Einstellung der Regelparameter des Gerätes [28] ab. Diese wiederum sind für das jeweilig zu temperierende Volumen speziell zu ermitteln. Das Vorgehen ist aus der Bedienungsanleitung ersichtlich.

Einen kleinen Einblick in die Leistungsfähigkeit dieses Gerätes soll Abbildung 16 geben:

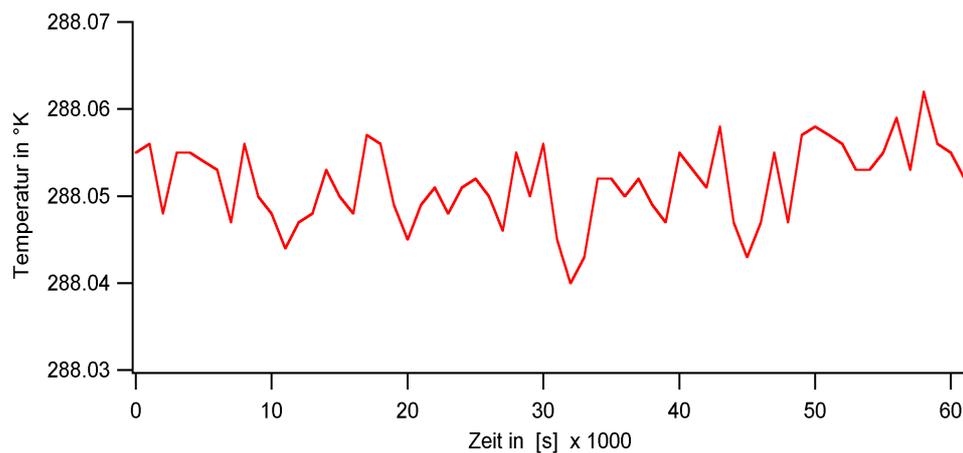


Abbildung 16: Temperaturkurve einer Messung

Bei optimaler Einstellung der Parameter ergibt sich folgende Heizkurve:

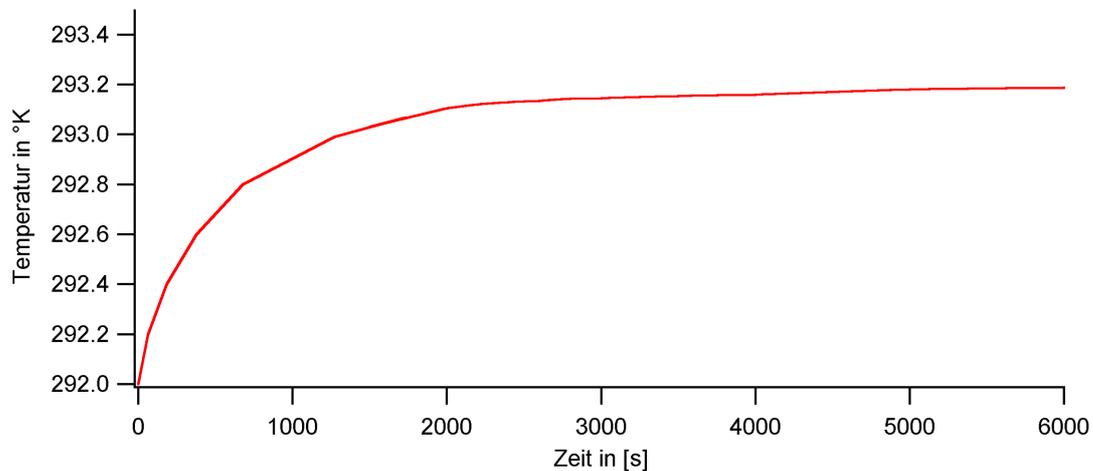


Abbildung 17: Heizkurve bei optimaler Einstellung der Parameter

Wird das Gerät neu eingeschaltet, so dauert es mindestens 1-2 Stunden, bis die gewünschte Temperatur erreicht ist. Beim Wechseln der Küvetten ist ebenfalls darauf zu achten, dass vor Messbeginn ca. 2 Stunden gewartet wird, bis im Indexmatchingbadgefäß und in der Probe wieder Temperaturgleichgewicht herrscht. Wie erwähnt, kann es sonst durch Konvektionsströmung, gerade bei kleinen Streuwinkeln, zu Verfälschungen des Streusignals kommen. Die Wartezeit beim Probenwechsel hängt auch vom Probenvolumen ab, so dass es sinnvoll erscheint, möglichst wenig Probenflüssigkeit zu verwenden.

2.3 Das Viskosimeter

2.3.0 Einleitung

Die Auswertung der Daten eines dynamischen Lichtstreuexperimentes macht die Kenntnis der kinematischen Viskosität η_s des Lösungsmittels erforderlich. Diese Größe ist jene Eigenschaft des Lösungsmittels, welche die Diffusion der Aktinfilamente hydrodynamisch beeinflusst. Sie stellt die innere Reibung der Lösungsmittelmoleküle untereinander dar. Je viskoser das Medium ist, in welchem sich die Filamente bewegen, umso langsamer erfolgt diese Bewegung. Gerade in der dynamischen Lichtstreuung hat die kinematische Viskosität, oder auch Fluidität, daher sehr großen Einfluss auf das Experiment. Diese Größe geht in die entsprechenden Beziehungen linear ein. Gerade in F-Puffer ist die Salzkonzentration sehr hoch, so dass die Viskosität von der reinen Wassers unterscheiden wird, im folgenden soll deshalb die Lösungsmittelviskosität bei verschiedenen Temperaturen untersucht werden.

2.3.1 Beschreibung eines Mikro-Ubbelohde Viskosimeters

Zur Messung der kinematischen Viskosität η_s fand ein Ubbelohde-Viskosimeter der Firma Schott-Geräte GmbH vom Typ 501 10/ 1, mit der Apparate-Nr. 907974, Verwendung. Dieses Viskosimeter ist zur Bestimmung der kinematischen Viskosität newtonscher Flüssigkeiten nach DIN 51 562, Teil 1 geeignet. Dazu wird die zu messende Flüssigkeit durch eine Kapillare geleitet und die Durchflusszeit eines konstanten Flüssigkeitsvolumens bestimmt. Die Gerätekonstante K gilt für die Ringmessmarken unter visueller Erfassung des Meniskusdurchganges. K hat bei dem hier verwendeten Gerät folgenden Wert:

$$K = 0,01011 \text{ mm}^2/\text{s}^2 \quad (52)$$

Die Gerätekonstante K gilt für Flüssigkeiten mit einer Oberflächenspannung bis etwa 80 mN/m und bei einer Fallbeschleunigung von $9,8125 \text{ m/s}^2$. Die Oberflächenspannung von Wasser beträgt

74 mN/m, die Fallbeschleunigung in München beträgt 9.824 m/s^2 , dies wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Bei dem hier gemessenen Temperaturbereich von 5°C bis 30°C ist eine Berücksichtigung der Wärmeausdehnung des Viskosimeters nicht erforderlich. Die kinematische Viskosität η_s in mm^2/s von Flüssigkeiten kann mit dem Wert von K nach folgender Beziehung berechnet werden:

$$\eta_s = K \times (t - y) \quad (53)$$

wobei t die Durchflusszeit der Probe in Sekunden und y die entsprechende Hagenbach Korrektur bedeuten [29].

Die relative Unsicherheit des angegebenen Zahlenwertes von K beträgt $0,65\%$ bei einem Vertrauensniveau von 95% [vgl. 29].

Das Gerät befindet sich in einem Temperierbad, um Temperaturschwankungen von nur $\pm 0.01^\circ\text{C}$ gewährleisten zu können. In Abbildung 18 ist das Mikro-Ubbelohde-Viskosimeter dargestellt.

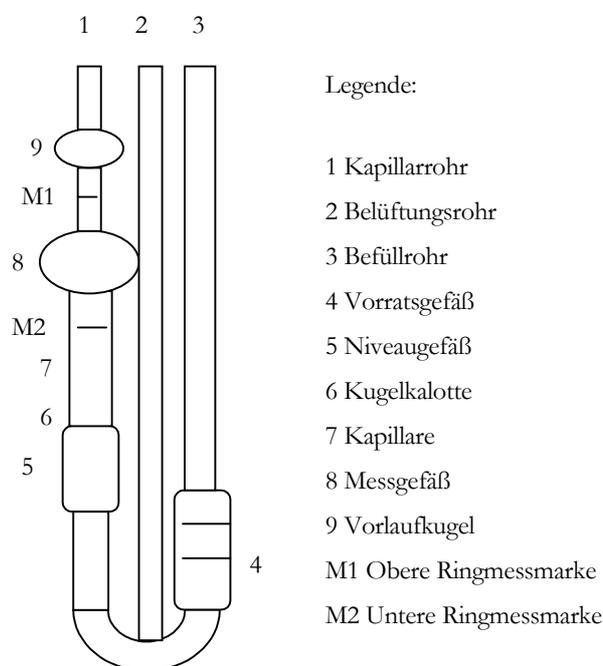


Abbildung 18: Mikro-Ubbelohde Viskosimeter

2.3.1 Durchführung der Viskositätsmessung an G-Puffer und F-Puffer

Vor Beginn dieses Experimentes sollte die zu untersuchende Flüssigkeit filtriert werden. Das Viskosimeter muss sauber, die Kapillare frei von Staub und trocken sein.

Bei der Änderung der Messtemperatur muss darauf geachtet werden, dass sich die Heizkurve im Sättigungsbereich befindet (vgl. Abbildung 13 in Abschnitt 2.2), was erst etwa 2 Stunden nach Änderung der Temperatur der Fall ist. Auch bei dieser Messung sind die Gerätespezifikationen des Thermostaten zu berücksichtigen.

Die Öffnung des Belüftungsrohres (2) wird mit dem Finger verschlossen. Mit Hilfe eines aufgesetzten Schlauches saugt man am Kapillarrohr (1), wodurch sich nacheinander das Niveaugefäß (5), die Kapillare (7), das Messgefäß (8) und die darüber befindliche kleinere Vorlaufkugel (9), etwa 10 mm des Rohres über der Ringmessmarke M1, füllen.

Jetzt wird das Saugen beendet, der Schlauch abgenommen und die Öffnung des Belüftungsrohres (2) wieder freigegeben; dabei reißt die Flüssigkeitssäule am unteren Ende der Kapillare (7) ab und es bildet sich an der dort befindlichen Kugelkalotte (6) das hängende Niveau aus. Gemessen wird die Zeitspanne (Durchflusszeit t), in der der untere Rand des Meniskus der Probe von der oberen Kante der Ringmessmarke M1 zur oberen Kante der Ringmessmarke M2 absinkt.

Beim Versuchsaufbau ist darauf zu achten, dass das Viskosimeter senkrecht steht. Dies muss mit einer Wasserwaage überprüft werden.

Zur besseren Übersicht ist der gesamte Versuchsaufbau in Abbildung 19 unten schematisch dargestellt:

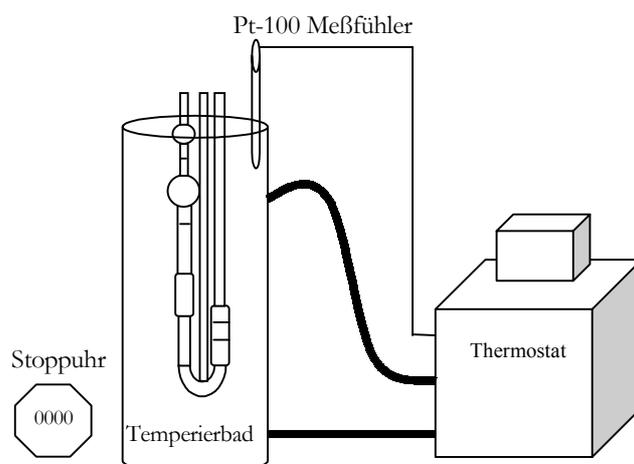


Abbildung 19 : Schematischer Versuchsaufbau zur Messung der Viskosität

Um bei den Ergebnissen eine gute Statistik zu erreichen, sollte jede Messung etwa 6 mal wiederholt werden. Wird die Probe gewechselt, so ist das Viskosimeter vor der Neubefüllung gründlich zu reinigen, wie oben erwähnt.

2.3.2 Ergebnisse

Zur Kalibration des experimentellen Aufbaues wird die kinematische Viskosität von Reinstwasser mit einem Volumenanteil von 30% Glycerin sowie Reinstwasser ohne Glycerin temperaturabhängig gemessen. Die Literaturwerte entnimmt man aus [30].

Für eine gute Statistik wird die Durchflusszeit pro Probe mindestens 6 mal gemessen und der Mittelwert gebildet. Die zu den Durchflusszeiten entsprechende Hagenbach-Korrektur entnimmt man aus [29]. Durch einsetzen der Mittelwerte und der Hagenbach-Korrektur in Gleichung 53 ergeben sich die Werte in Tabelle 3 unten. Die aus der Literatur [30] entnommenen Werte sind ebenfalls enthalten. Die Unsicherheit der Messungen beträgt etwa 3%, diese ist hauptsächlich auf den Ablesefehler zurückzuführen.

Die Einheit der kinematischen Viskosität η_s ist in mm^2/s gegeben.

Temperatur in °C	Reinstwasser Literatur	Reinstwasser + 30% Glycerin Literatur	Reinstwasser	Reinstwasser + 30% Glycerin	G-Puffer	F-Puffer
5	1.52	kein Wert	1.51	nicht messbar	1.51	1.5
10	1.31	3.49	1.31	3.68	1.3	1.3
20	1.00	2.5	1.01	2.55	1.01	1.0
30	0.80	1.87	nicht messbar	1.84	0.81	0.804

Tabelle 3: Messergebnisse für die kinematische Viskosität η_s von G-Puffer, F-Puffer und Reinstwasser

Für die Probe Reinstwasser + 30% Glycerin bei 5°C war bei diesem Gerätetyp die Kapillare zu klein um eine verlässliche Messung durchzuführen. Für die Probe Reinstwasser bei 30°C war die verwendete Kapillare zu groß.

Die kinematische Viskosität η_s wird oft in cSt angegeben. Es gilt folgender Zusammenhang:

$$1 \text{ cSt} = 1 \text{ mm}^2/\text{s} \quad (54)$$

In Abbildung 20 unten sind die Messergebnisse Tabelle 2 graphisch veranschaulicht:

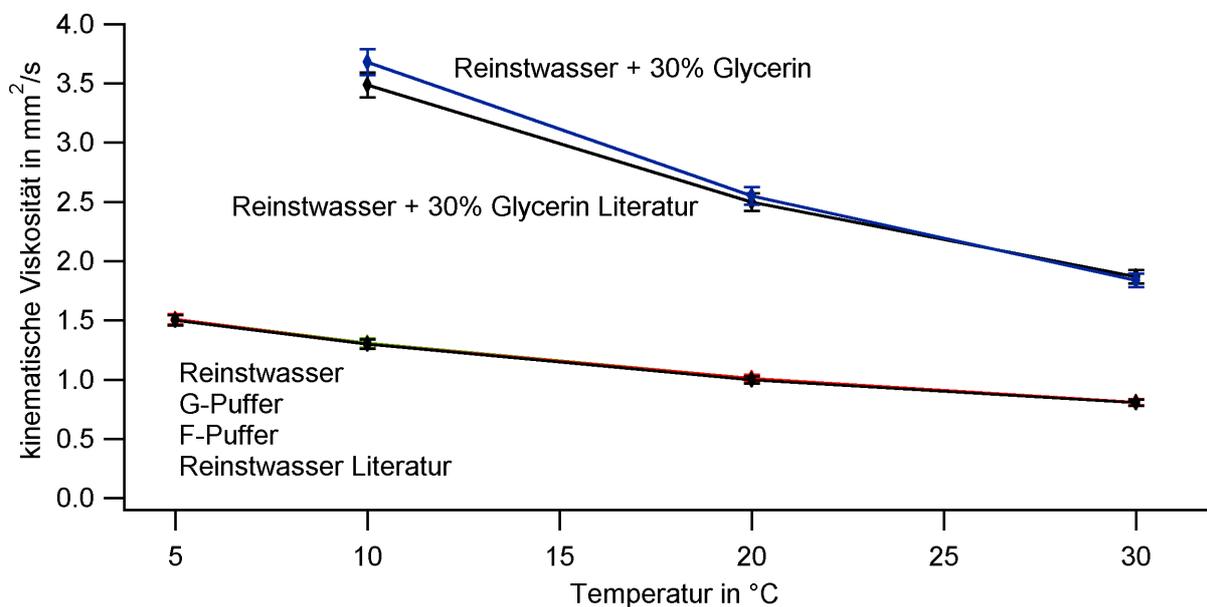


Abbildung 20: Die kinematische Viskosität für G-Puffer, F-Puffer und Reinstwasser bei verschiedenen Temperaturen

Diese Messreihe ergibt, dass die Pufferbestandteile im untersuchten Temperaturbereich im Rahmen der Messgenauigkeit keinen Einfluss auf die kinematische Viskosität des Lösungsmittels besitzen. Bei 15°C ergibt sich für die kinematische Viskosität von F-Puffer ein Wert von 1.15 mm²/s.

HERSTELLUNG DER F-AKTINPROBEN FÜR DIE LICHTSTREUUNG

3.0 Einleitung

Aktin (MW 42.000) wird an unserem Lehrstuhl routinemäßig von Frau Rusp nach der Methode von Spudich und Watt [31], modifiziert nach McLean-Fletcher et al. [32] aus Kaninchenmuskel hergestellt.

Zur Zwischenlagerung wird es als G-Aktin bei -70 °C tiefgefroren in G-Puffer aufbewahrt. Das für die Messungen verwendete Aktin war nach dem Auftauen maximal 3 Tage alt. Für Lichtstreuemessungen werden an die Proben sehr hohe Anforderungen hinsichtlich Reinheit der Substanz und Staubfreiheit gestellt. Da keine biochemische Proteinisolation absolut reine Produkte liefert, soll im Folgenden die Herstellung der F-Aktinproben gerade für Lichtstreuemessungen beschrieben werden. Es muss sichergestellt sein, dass sich in den Küvetten nur Aktinfilamente befinden und keine zusätzlichen Proteine, welche entweder eine Polymerisation des Aktins verhindern (Cappingproteine), oder aber das Aktin und seine Filamente binden (Aktinbindeproteine). All diese Proteine würden die Ergebnisse aus Lichtstreuemessungen empfindlich beeinflussen. Durch eine konsistente Nachbehandlung des Proteins wird ferner sichergestellt, dass verschiedene Aktinpräparationen untereinander besser vergleichbar sind.

Die Konzentration des Aktins wird durch Messung der Absorption bei 290 nm in einem Absorptionsspektrometer (Typ Lambda 15) der Firma Perkin-Elmer bestimmt. Die spezifische Absorption von Aktin bei 290 nm beträgt: $A^{290} = 0.65\text{ cm}^2/\text{mg}$ [33].

3.1 Nachreinigung des Aktins

Um möglichst lange Aktinfilamente für Lichtstreuexperimente zu erhalten, muss sichergestellt sein, dass sich im aufgetauten Aktin keine Verunreinigungen befinden. Diese werden durch den nachfolgend beschriebenen Reinigungsschritt bestmöglich entfernt.

Um während der Arbeitsschritte sicher zu gehen, das Aktin nicht mit Proteasen zu kontaminieren, muss immer mit Handschuhen gearbeitet werden. Die Dialyseschläuche (VISKING Typ 8132) der Firma Roth werden, um Fremdbestandteile aus der Herstellung und zur Haltbarkeit zu entfernen, vor Verwendung gekocht und gründlich mit Reinstwasser gespült. Um das Protein nicht unnötig höheren Temperaturen auszusetzen wird immer, wenn nicht anders erwähnt, auf Eis gearbeitet.

Es werden folgende Puffer benötigt:

G-Puffer:

20 mM Imidazol pH 7.4
0,2 mM DTT
0,1 mM ATP
0,1 mM CaCl₂
0,005 Vol.% NaN₃

10x F-Puffer:

20 mM Imidazol pH 7.4
0,2 mM DTT
0,1 mM ATP
1 M KCl
20 mM MgCl₂
0,1 mM CaCl₂
0,005% Vol. NaN₃

Das tiefgefrorene G-Aktin in G-Puffer wird in benötigter Menge zügig in der Hand aufgetaut und in Röhrchen, welche für die Ultrazentrifugation geeignet sind, gefüllt.

Dann wird die Polymerisation des G-Aktins durch Zugabe von 1/10 Vol. 10xF-Puffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur (25°C) initiiert.

Es schließt sich nun eine Ultrazentrifugation des F-Aktins bei 180.000 g und 4°C für 2 Stunden an.

Der Überstand Ü1 dieser Zentrifugation wird verworfen, während das Pellet P1 vorsichtig in G-Puffer resuspendiert wird. Es schließt sich ein Depolymerisationsschritt des resuspendierten F-Aktins durch eine 48 Stunden-Dialyse in G-Puffer bei 4°C an. Der Puffer sollte mindestens viermal gewechselt werden.

Sollten sich im aufgetauten G-Aktin polymerisationshemmende Proteine befinden (sog. Capping-Proteine) so werden diese zusammen mit dem Überstand Ü1 entfernt.

Das nach der Dialyse in globulärer Form vorliegende G-Aktin wird ebenfalls für 2 Stunden bei 4°C und 180.000 g zentrifugiert. Der Überstand Ü2 dieser Ultrazentrifugation wird weiterverwendet, während das eventuell entstandene Pellet P2 verworfen wird.

Sollten sich im aufgetauten G-Aktin Aktinbindeproteine befunden haben, so werden diese zusammen mit dem Pellet P2 verworfen.

Zur besseren Übersicht veranschaulicht Abbildung 21 unten die Schritte dieser Nachreinigung:

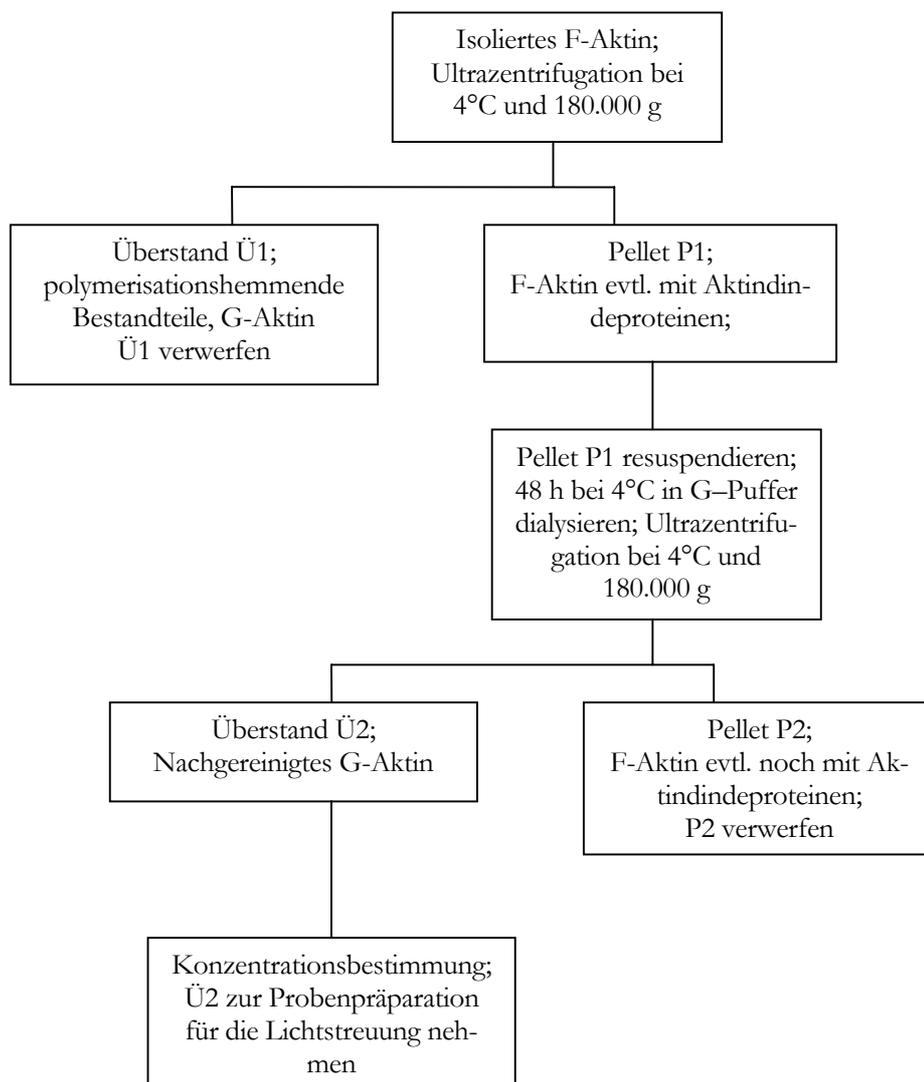


Abbildung 21: Schema zur Nachreinigung von Aktin

Von dem auf diese Weise nachgereinigten Aktin werden nun die Proben für Lichtstreuungen angefertigt.

3.2 Herstellung der Aktinproben für die Lichtstreuung

Auf Sauberkeit muss sehr großer Wert gelegt werden. Zum einen erzeugen verunreinigte optische Bauteile trotz guter Justage ungewollte Reflexe, wie zum Beispiel die Laserumlenkspiegel, das Brewster-Fenster am Laser, die Fokussierlinse, die Ein- und Austrittsfenster des Indexmatchingbadgefäßes, die Küvetten und Staub in der Indexmatchingflüssigkeit, zum anderen können Winkelabhängigkeiten der Streuung vorgetäuscht werden. Ebenso führt Staub in der Indexmatchingflüssigkeit zu Reflexen und zu großen Schwankungen der Streuintensität, wodurch nicht nur Absolutsondern auch Korrelationsmessungen der Streuintensität beeinträchtigt werden. In dynamischen Lichtstreuemessungen führt Staub zu einem heterodynem Anteil in der Streustrahlung, da große Partikel wie Spiegel wirken. Wird dennoch eine Probe mit Staub kontaminiert, ist diese zu vernichten.

Vor der Befüllung der Küvetten müssen folgende Vorarbeiten abgeschlossen sein:

- Die Küvetten werden nach jedem Gebrauch etwa eine Stunde in 10%-Hellmanex II-Lösung (Hellma, Müllheim, Deutschland) gestellt. Danach werden sie gründlich (ca. 5 mal) mit Reinstwasser gespült. Nach Trocknung können sie so für die nächste Meßreihe vorbereitet werden.
- Beim Reinigen der Küvetten ist darauf zu achten, diese nicht zu verkratzen, da Kratzer zu Reflexionen führen.
- Das Indexmatchingbadgefäß ist, wenn oft gemessen wird, routinemäßig alle 2 Wochen zu reinigen und mit filtriertem Toluol in HPLC Qualität der Firma Sigma-Aldrich neu zu füllen. Die Filter dazu liefert Millipore Deutschland.
- Vor jeder Messung ist die Lichtstreuanlage neu zu kalibrieren.

Abfüllprozedur:

- Die sterile Werkbank RETEC C4301-1 (Reinraumspezifikation: DIN12950 Teil 10 Klasse 2) in der Zellkultur ca. 20 min vorlaufen lassen, bevor gearbeitet wird.

- Die Küvetten und die Deckel mindestens 15 Minuten in den Küvetten-spülanlagen Mainz 70 der Firma Fischer (Frankfurt a.M., Deutschland) spülen lassen. Das Lösungsmittel ist Aceton in HPLC Qualität.

- Um die gespülten Küvetten unter die sterile Werkbank zu bringen, sind diese verschlossen mit Deckel nach unten vorsichtig zu transportieren.

- Sämtliche Filter müssen vor Gebrauch mit Reinstwasser gründlich gespült (ca. 10 mal) und konditioniert werden (ca. 20 Minuten).

- Zum Abfüllen der Proben unter der sterilen Werkbank wird, um Staubkontamination durch statische Aufladung zu vermeiden, eine ebenfalls vorher gründlich gespülte Glasspritze verwendet.

- Es werden 3 Filter in Serie aneinander gesteckt, und dann die Proben langsam (ca. 2 Tropfen pro Sekunde) in die Küvetten filtriert. Dabei dürfen sich keine Luftblasen in den Filtern befinden. Der erste Tropfen wird verworfen.

- zuerst wird G-Aktin in die Küvetten filtriert, dann in einer separaten Spritze 1/10 Vol. 10xPuffer

- Die zylindrischen Küvetten werden mit insgesamt 2.0 ml Probenvolumen gefüllt, die rechteckigen mit insgesamt 1.0 ml. Später kann an dem sich bildenden Meniskus der Probenflüssigkeit in der Küvette der Laserstrahl auf den Boden abgelenkt werden, und so die Probe nochmals auf Staubkontamination geprüft werden.

Bei der Konzentrationsbestimmung mittels Absorption ist darauf zu achten, in der Ausgangslösung eine um 10% höhere Aktinkonzentration als die am Ende gewünschte anzusetzen. Nachdem die Küvetten mit Aktin gefüllt wurden, wird die Polymerisation des Aktins durch Zugabe von 1/10 Volumen 10xPuffer über Nacht bei 4°C initiiert. Dadurch wird die Ausgangslösung verdünnt.

Für Messungen in einem Streuwinkelbereich von 15° bis 30° werden nur die rechteckigen Küvetten verwendet, im Bereich von 40° bis 120° nur die zylindrischen Küvetten. Alle Proben werden doppelt angesetzt.

Die Polymerisation des Aktins kann mit Lichtstreuung verfolgt werden.

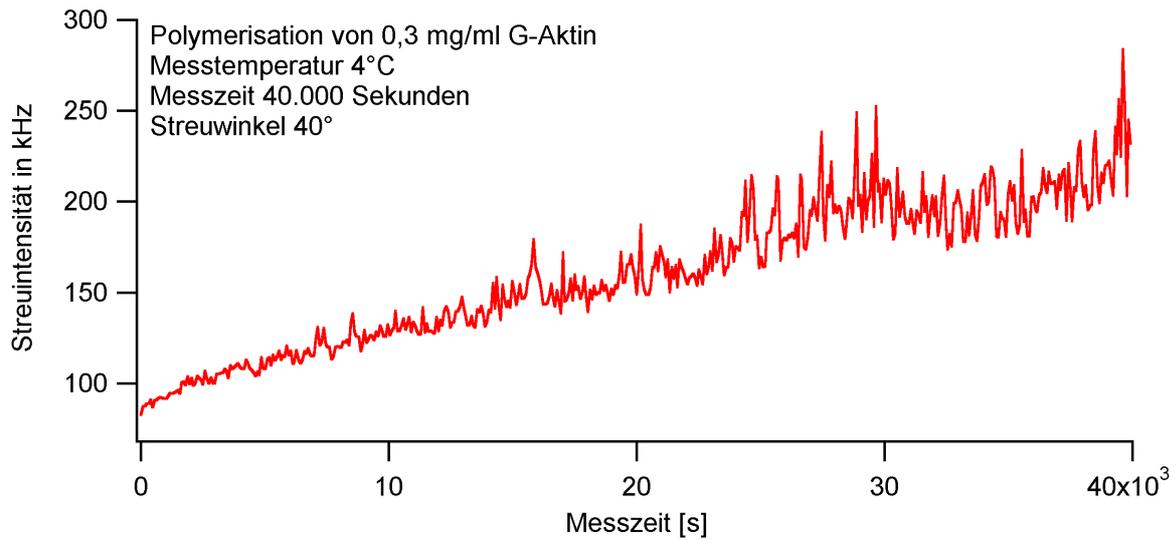


Abbildung 22: Polymerisation von Aktin

In Abbildung 22 ist Anhand der Streuintensität sehr schön zu erkennen, wie die Fluktuation in der Probe zunimmt. Nicht nur der Absolutbetrag sondern auch der Unterschied der Streuintensität steigt. Führt man bei vollständig polymerisiertem F-Aktin Lichtstremessungen über mehrere Stunden hinweg durch, so können aus diesen dynamischen Prozessen sehr interessante Informationen über die Kinetik in den Proben gewonnen werden, wie im nächsten Kapitel gezeigt wird.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.0 Einleitung

In diesem Kapitel werden die Daten aus statischen und dynamischen Lichtstreuexperimenten an verschiedenen F-Aktinlösungen vorgestellt. Die Messtemperatur betrug bei allen Experimenten 15 °C. Die gemessenen Streuwinkel sind in untenstehender Tabelle 4 aufgelistet. Mit Hilfe von Gleichung 20 lassen sich die zugehörigen Streuvektoren \mathbf{q} bei einer Laserwellenlänge von 488 nm berechnen. Für die Streuwinkel 20°, 25° und 30° muss aufgrund der Küvettenform der Streuvektor gemäß Gleichung 51 in Abschnitt 2.1.1.1 Tabelle 2 korrigiert werden:

Streuwinkel Θ	20°	25°	30°	40°	45°	50°	60°	70°	80°	90°	100°	120°
Streuvektor $1/\mu\text{m}$	6.44	8.04	9.62	11.71	13.10	14.47	17.13	19.64	22.01	24.22	26.24	29.66

Tabelle 4: Die zu den Streuwinkeln gehörenden Streuvektoren

Die untersuchten Massenkonzentrationen des F-Aktins betragen 0.3 mg/ml (7.2 μM), 0.5 mg/ml (12 μM), 0.7 mg/ml (16.8 μM) und 1.0 mg/ml (24 μM). Die Proben wurden, wie in Abschnitt 3 beschrieben, hergestellt.

Vor jeder Messung wurde die Justage der Lichtstreuanlage nach den Kriterien wie in Abschnitt 2 beschrieben, überprüft. Um eine über die gesamte Messzeit konstante Laserleistung zu gewährleisten, wurde das Labor temperiert und der Laser über mehrere Tage vor Messbeginn überwacht und justiert. Bei den kleinen Streuwinkeln betrug die Messzeit bis zu 80.000 Sekunden, etwa 22 Stunden. Um das F-Aktin nicht zu schädigen, muss in Vorexperimenten jene Laserleistung ermittelt werden, bei welcher die Probe am Ende des Experiments noch die gleichen Eigenschaften aufweist wie zu Beginn. Dies wurde durch Kontrollmessungen bestätigt.

4.1 Die absoluten Streuintensitäten der verschiedenen Aktinkonzentrationen

4.1.1: Die Einstellung der Laserleistung - Kontrollmessungen

Wie erwähnt, muss vor Beginn des Experiments sichergestellt sein, dass das F-Aktin nicht durch zu hohe Laserleistung zerstört wird. Bei zu hoher Laserleistung können Filamente fragmentiert werden, was sich in einer geringeren Streuintensität und in einem schnelleren Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion äußert. Gerade Langzeitmessungen können so signifikant beeinträchtigt werden.

Die geeignete Laserleistung wird durch mehrere Versuche ermittelt. Dazu wird eine F-Aktinlösung bei 90° Streuwinkel für etwa 15 Minuten vermessen und danach die Langzeitmessung gestartet. Anschließend wird die gleiche Probe nochmals bei 90° und einer Messzeit von ebenfalls 15 Minuten vermessen. Nun werden die erste und letzte Messung miteinander verglichen. Sind beide Streuintensitäten und Intensitätskorrelationen deckungsgleich, wird diese Ausgangsleistung des Lasers für das weitere Vorgehen beibehalten. Abbildung 23 unten zeigt eine Kontrollmessung für die 1 mg/ml F-Aktinlösung bei zu hoher Laserleistung.

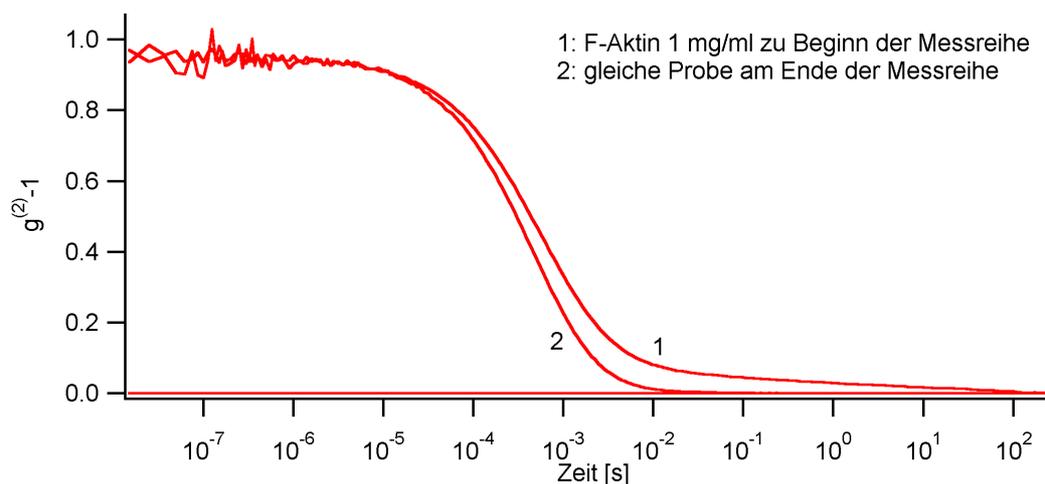


Abbildung 23a: Die Intensitätskorrelationsfunktion für 1 mg/ml F-Aktin bei zu hoher Laserleistung.
Die Messdauer betrug 15 Min

Aus den Abbildungen 23a und 23b geht eindeutig hervor, dass die Laserleistung zu hoch war, da weder die Korrelationsfunktionen noch die Streuintensitäten vor Beginn der Messreihe und nachher, gleich waren.

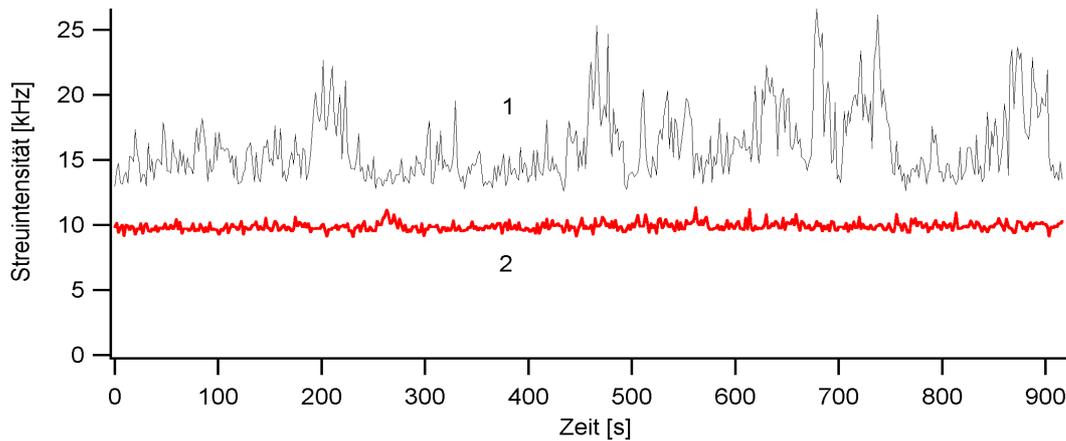


Abbildung 23b: Streuintensität für 1 mg/ml F-Aktin bei zu hoher Laserleistung. Der Index 1 bezeichnet die Kontrollmessung vor Beginn der Messreihe, der Index 2 nach Ende der Messreihe.

Die passende Laserleistung muss für jede Konzentration ermittelt werden.

Für die F-Aktinkonzentrationen 0.7 mg/ml, 0.5 mg/ml und 0.3 mg/ml wurde die Laserintensität nochmals erniedrigt. Bei passender Laserleistung ergibt sich folgendes Bild, wie die Abbildungen 24a und 24b unten zeigen.

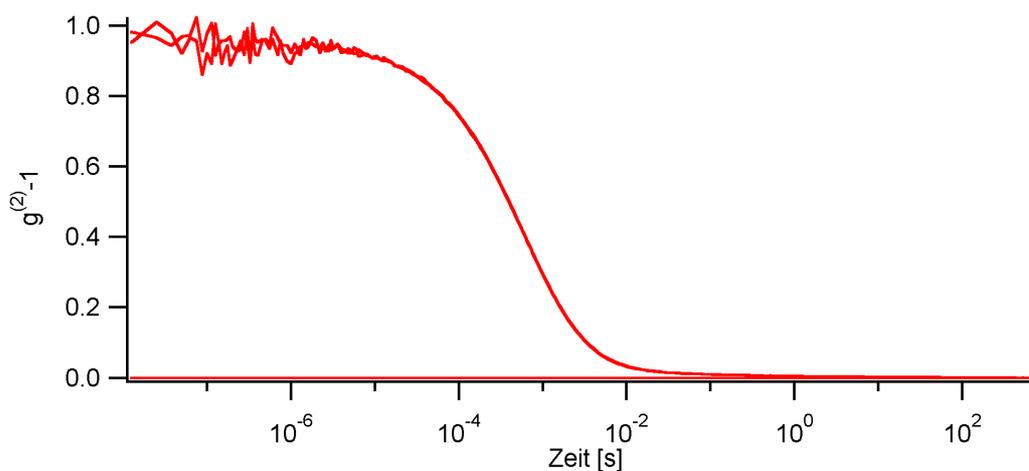


Abbildung 24a: Die Intensitätskorrelationsfunktionen sind vor Beginn der Messreihe und nachher gleich.

Aus Abbildung 24a, der Intensitätskorrelationsfunktion für 0.7 mg/ml F-Aktin, geht hervor, dass beide Funktionen vor Beginn der Messreihe und nachher deckungsgleich sind. Das gleiche gilt für die Streuintensitäten in Abbildung 24b unten:

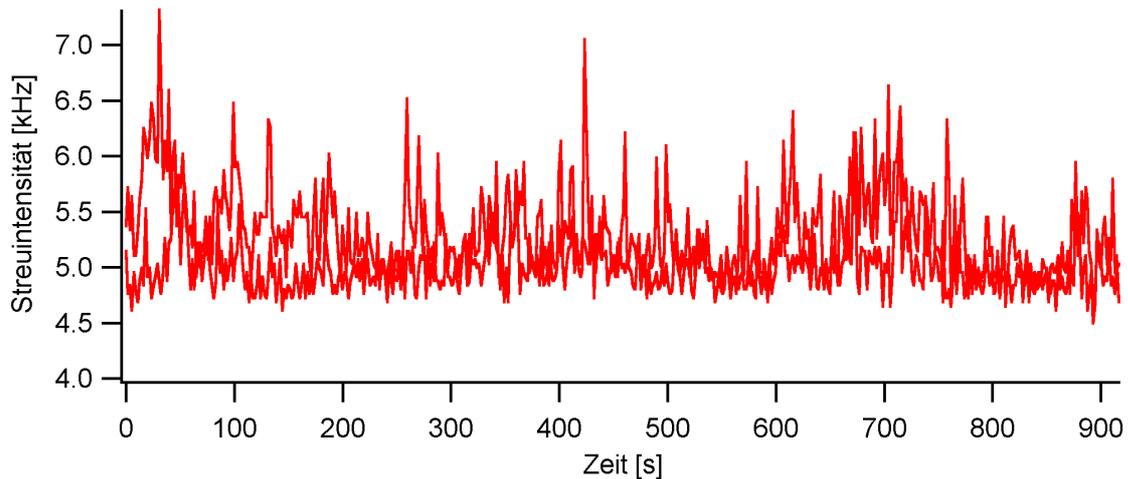


Abbildung 24b: Die absolute Streuintensität für 0.7 mg/ml F-Aktin bei passender Laserintensität

Nach diesen Kriterien wurden alle Konzentrationen untersucht.

Um die Messungen unterschiedlicher Konzentrationen vergleichbar zu machen, wird bei diesen jeweiligen Laserleistungen und identischen Systemparametern wie bei der eigentlichen Messung, die Streuintensität des Standards Toluol bei 40° Streuwinkel gemessen.

Daraus ergaben sich folgende gemittelte Werte:

Für die F-Aktinkonzentrationen 0,7 mg/ml, 0.5 mg/ml und 0.3 mg/ml: 0.38 kHz ($\pm 5\%$),

Für die F-Aktinkonzentration 1 mg/ml 0.61 kHz ($\pm 5\%$).

4.1.2: Die absoluten Streuintensitäten für 0.3 mg/ml F-Aktin

Für die absoluten Streuintensitäten der 0.3 mg/ml F-Aktinprobe ergeben sich nachstehende Werte. Sehr gut in den Abbildungen 25a und 25b zu erkennen sind die Variationen der Beträge der detektierten Intensität in Abhängigkeit vom Streuwinkel Θ . Je kleiner der Detektionswinkel Θ , desto deutlicher sind die zeitlichen Fluktuationen der gestreuten Intensität sichtbar. Dies impliziert, dass die Dichtefluktuationen auf den entsprechenden Zeitskalen ($1/q$) sehr viel langlebiger sind.

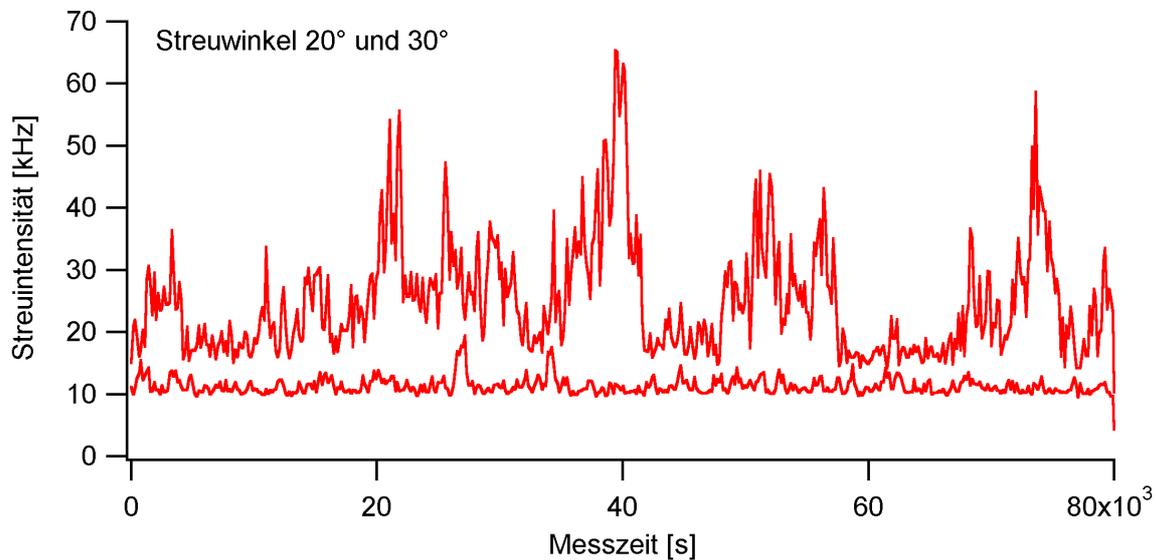


Abbildung 25a: Die absoluten Streuintensitäten für 0.3 mg/ml F-Aktin bei 20° (obere Kurve) und 30° (untere Kurve) Streuwinkel

Der Betrag der mittleren Streuintensität nimmt mit zunehmendem Streuwinkel stark ab. Abbildung 25a oben zeigt die beiden Streuwinkel 20° und 30° und zum direkten Vergleich sind die beiden Streuwinkel 90° und 120° in Abbildung 25b unten gezeigt.

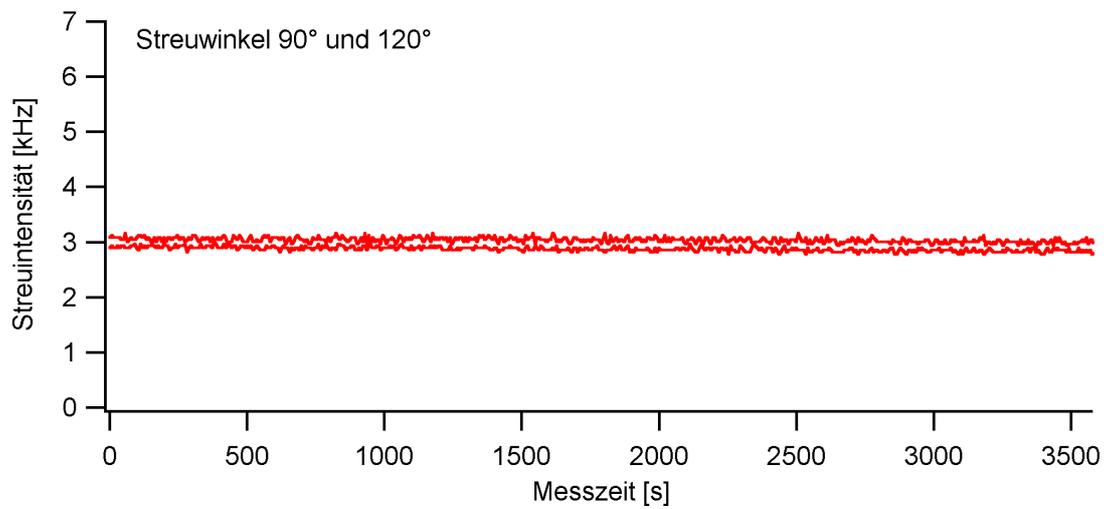


Abbildung 25b: Die absoluten Streuintensitäten für 0.3 mg/ml F-Aktin bei 90° (obere Kurve) und 120° (untere Kurve) Streuwinkel

Zur besseren Übersicht werden in den folgenden Abbildungen die Intensitäten für die Streuwinkel 20°, 25° und 30° nochmals getrennt dargestellt. Für den Streuwinkel 20° ergibt sich folgender Verlauf:

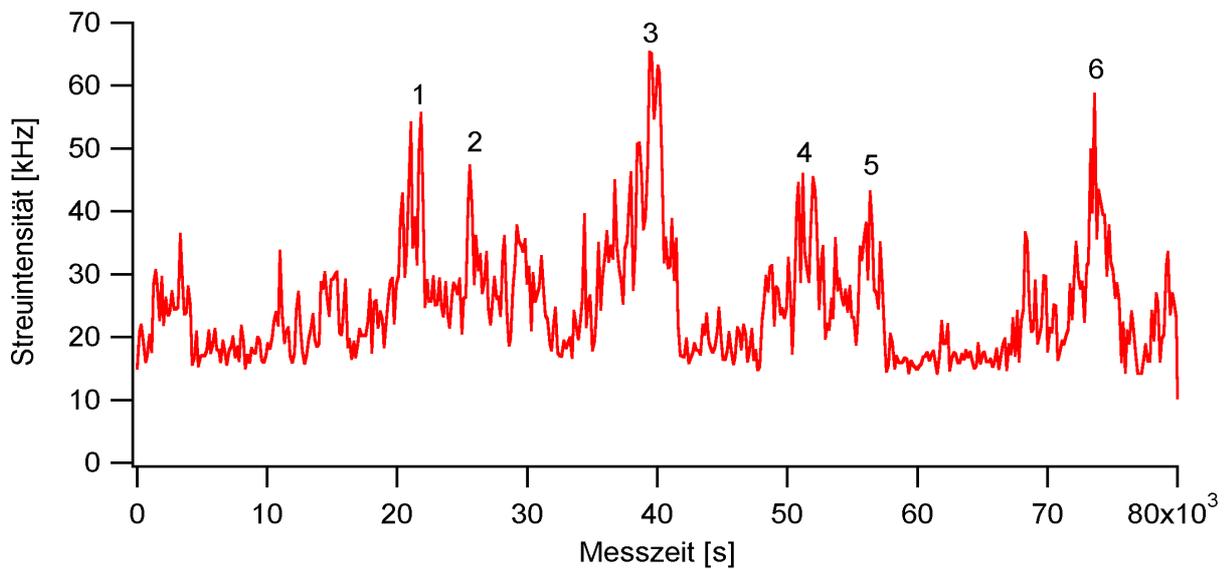


Abbildung 26: Die Streuintensität für 0.3 mg/ml F-Aktin und 20° Streuwinkel (die Zahlen bezeichnen besonders langlebige Fluktuationen).

Die Messzeit bei den Winkeln 20° , 25° und 30° betrug 80000 Sekunden. In der Darstellung ist diese Messzeit in 509 Messkanäle unterteilt, das heißt ein Kanal stellt den Mittelwert der Streuintensität über 157 Sekunden dar. Die in Abbildung 26 deutlich zu erkennenden Regionen 1 – 6 mit erhöhter Streuintensität sind demnach zum Teil über mehrere Stunden messbar. Diese Regionen waren auch in Vorwärtsrichtung (nicht bei 90° Streuwinkel) mit bloßem Auge sichtbar. Dass sie nicht bei größeren Winkeln sichtbar waren, schließt Staub aus.

In Abbildung 27 unten sind die Streuintensitäten für die gleiche F-Aktinprobe und die Streuwinkel

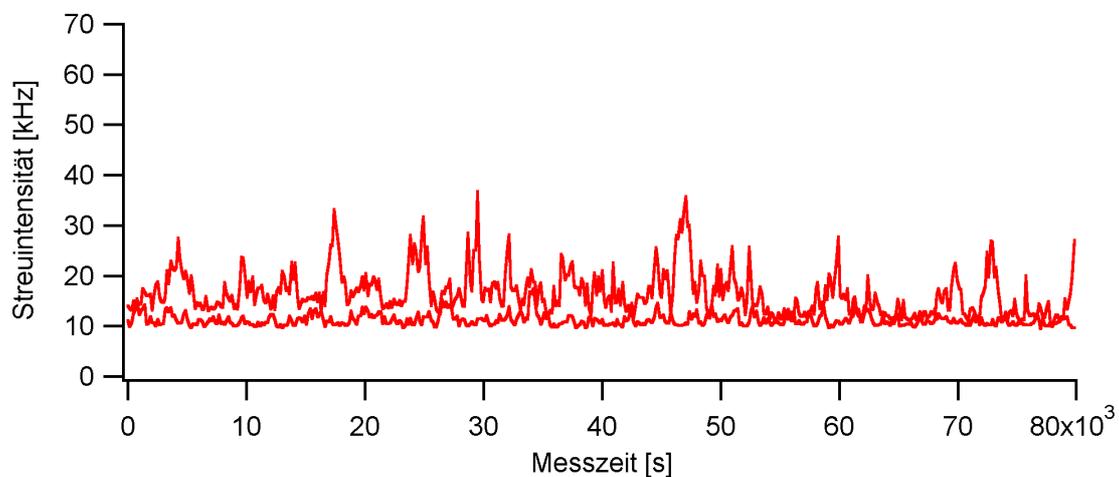


Abbildung 27: Die Streuintensität für 0.3 mg/ml F-Aktin und die Streuwinkel 25° und 30°

25° und 30° gezeigt. Deutlich zu erkennen ist, dass der Betrag der Intensitätsmaxima stark abnimmt. In Abbildung 28 ist der Mittelwert der Streuintensitäten unter Berücksichtigung der Korrektur des Streuvolumens aus Gleichung 47 und Gleichung 51 für rechteckige Küvetten über den Streuvektor \mathbf{q} , relativ zu Toluol, aufgetragen. Durch den Vergleich mit Toluol wird die Streustärke eine absolute Größe.

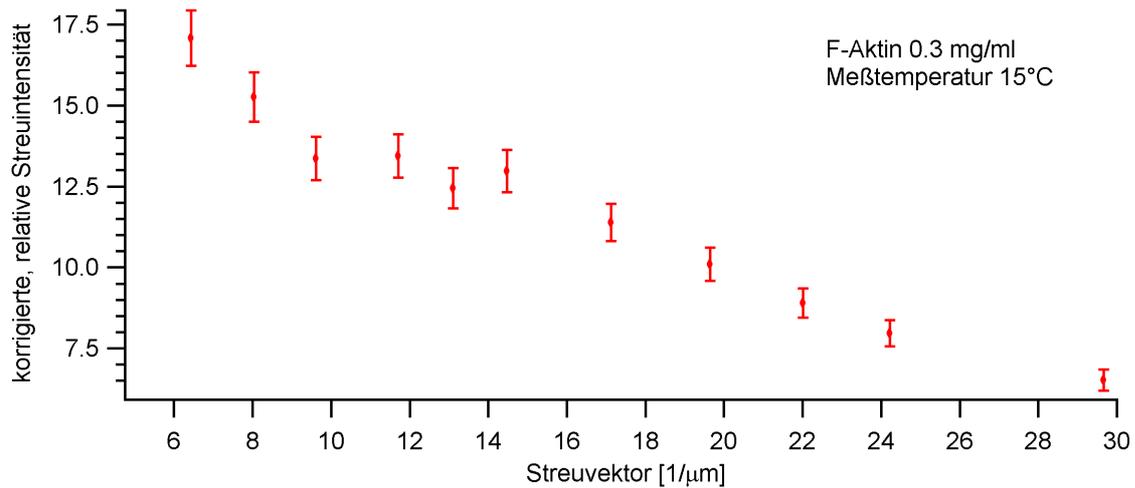


Abbildung 28: Korrigierte Streuintensität für 0.3 mg/ml F-Aktin aufgetragen über den Streuvektor

Die Fehler ergeben sich aus den Laserintensitätsschwankungen, die bei allen Experimenten etwa 5% betragen. In Abbildung 28 ist gut zu erkennen, dass zu den kleineren Streuwinkelbereichen hin die mittlere Intensität steigt, und sich zwischen 40° und 50° ein Plateau andeutet.

4.1.3 Die absoluten Streuintensitäten für 0.5 mg/ml F-Aktin

Abbildung 29 unten zeigt die Streuintensitäten der 0.5 mg/ml F-Aktinprobe bei 20° und 30° Streuwinkel.

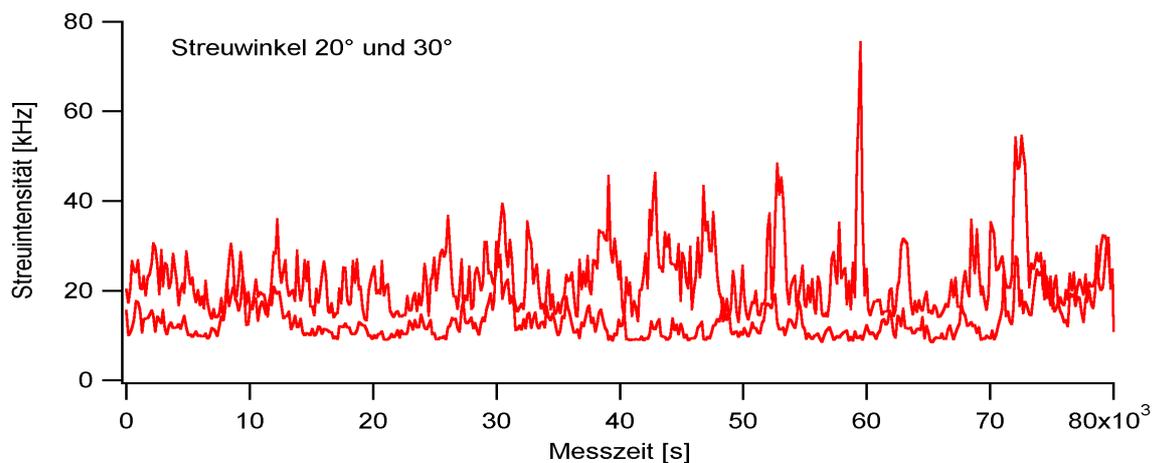


Abbildung 29a: Die absoluten Streuintensitäten für 0.5 mg/ml F-Aktin bei 20° und 30° Streuwinkel

Der Betrag der mittleren Streuintensität nimmt mit zunehmendem Streuwinkel stark ab. Zum direkten Vergleich sind die beiden Streuwinkel 90° und 120° in Abbildung 29b unten gezeigt.

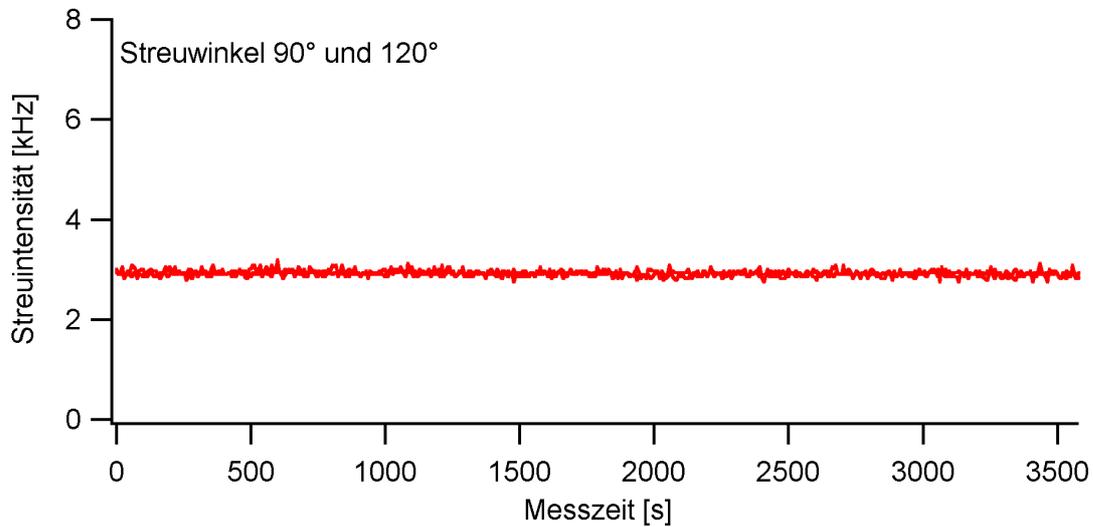


Abbildung 29b: Die absoluten Streuintensitäten für 0.5 mg/ml F-Aktin bei 90° und 120° Streuwinkel (Die Kurven sind nicht unterscheidbar)

Auch hier ist die Winkelabhängigkeit der Streuintensität deutlich zu sehen. Die Zeitskala der Dynamik der Probe ändert sich auch hier mit dem Streuwinkel drastisch. Zur besseren Übersicht ist der 20° Streuwinkel in Abbildung 30 dargestellt.

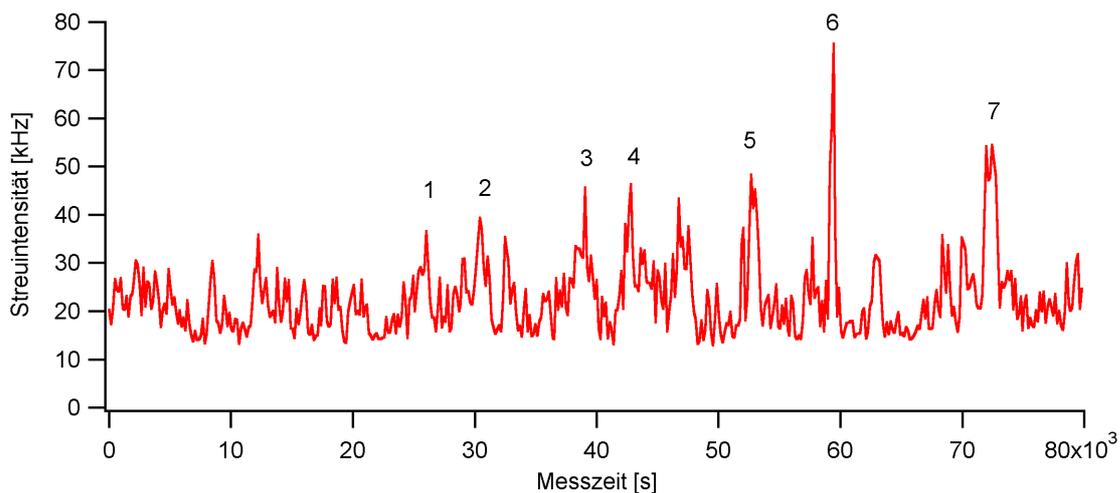


Abbildung 30: Die Streuintensität für 0.5 mg/ml F-Aktin und 20° Streuwinkel

In Abbildung 30 sind die Regionen 1-7 gut zu erkennen, in denen die langlebigen Intensitätsmaxima entsprechend lang anhaltende Dichteschwankungen anzeigen. Die Messzeit betrug 80.000 Sekunden. In Abbildung 31 unten sind diese Regionen bei den Streuwinkeln 25° und 30° ebenfalls noch sehr ausgeprägt:

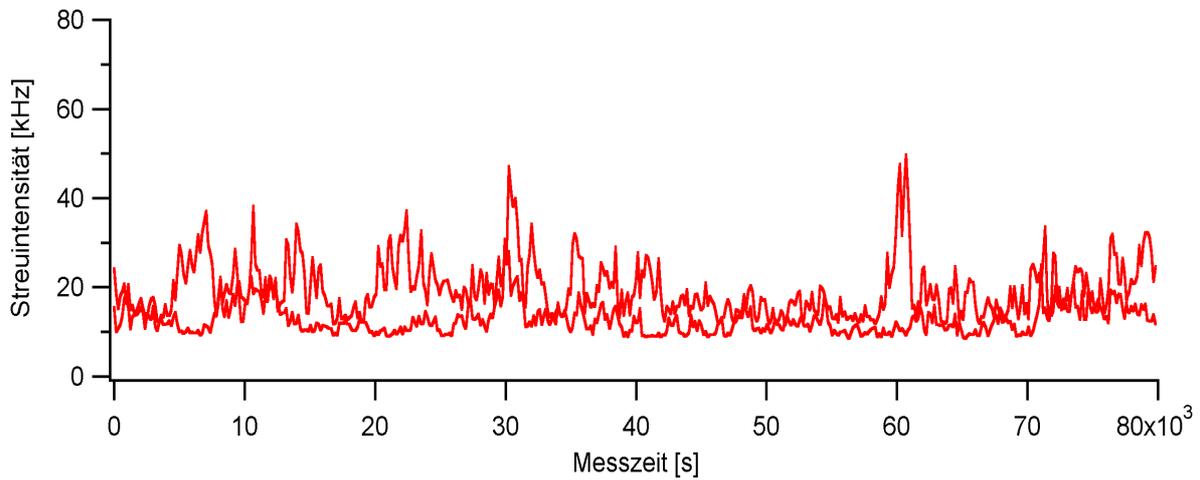


Abbildung 31: Die Streuintensität für 0.5 mg/ml F-Aktin und die Streuwinkel 25° und 30°

Die Messzeiten für den 25° und 30° Streuwinkel betragen ebenfalls 80.000 Sekunden.

Abbildung 32 unten zeigt den Mittelwert der Streuintensitäten der gesamten Messreihe, relativ zu Toluol, unter Berücksichtigung der Streuvolumenkorrektur aus Gleichung 47 und Gleichung 51 für den gesamten zugänglichen \mathbf{q} -Vektorbereich:

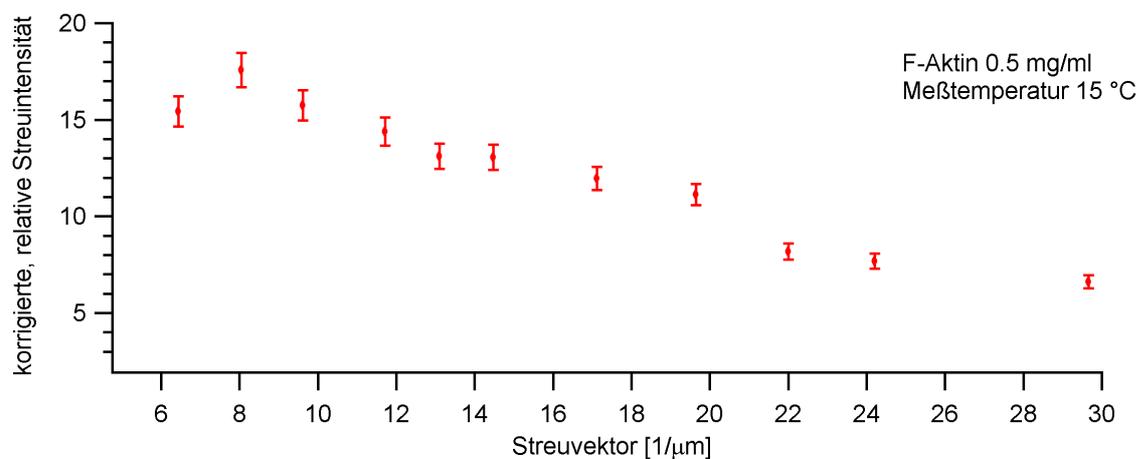


Abbildung 32: Korrigierte Streuintensität für 0.5 mg/ml F-Aktin aufgetragen über den Streuvektor \mathbf{q}

4.1.4 Die absoluten Streuintensitäten für 0.7 mg/ml F-Aktin

Die in den Abbildungen 33a und 33b gezeigten Werte ergeben sich für die 0.7 mg/ml F-Aktinlösung.

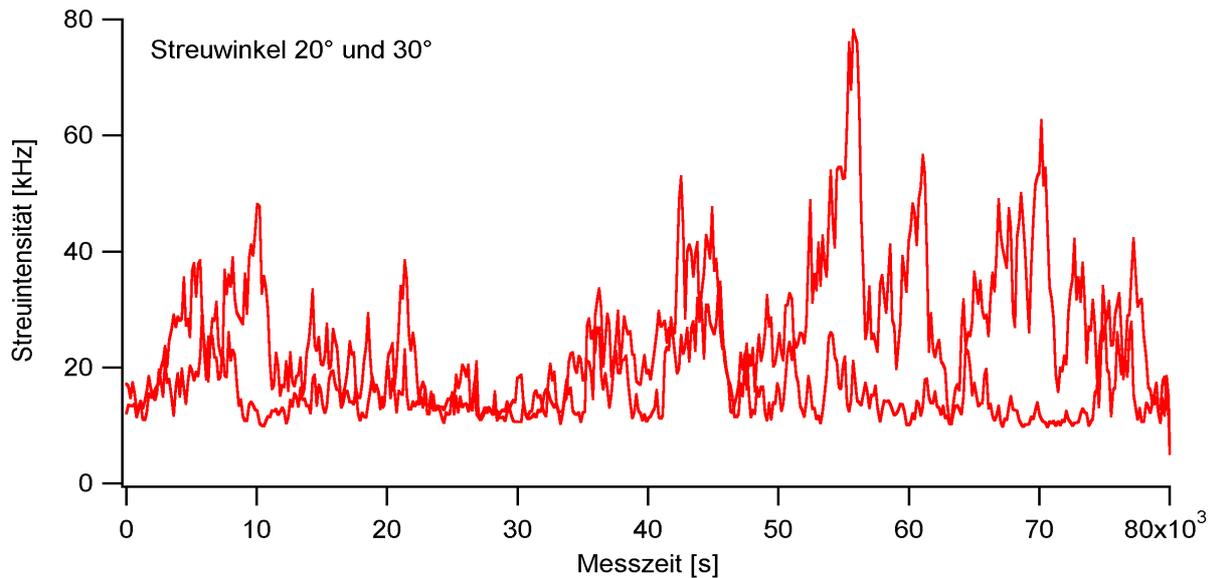


Abbildung 33a: Die absoluten Streuintensitäten für 0.7 mg/ml F-Aktin bei 20° und 30° Streuwinkel

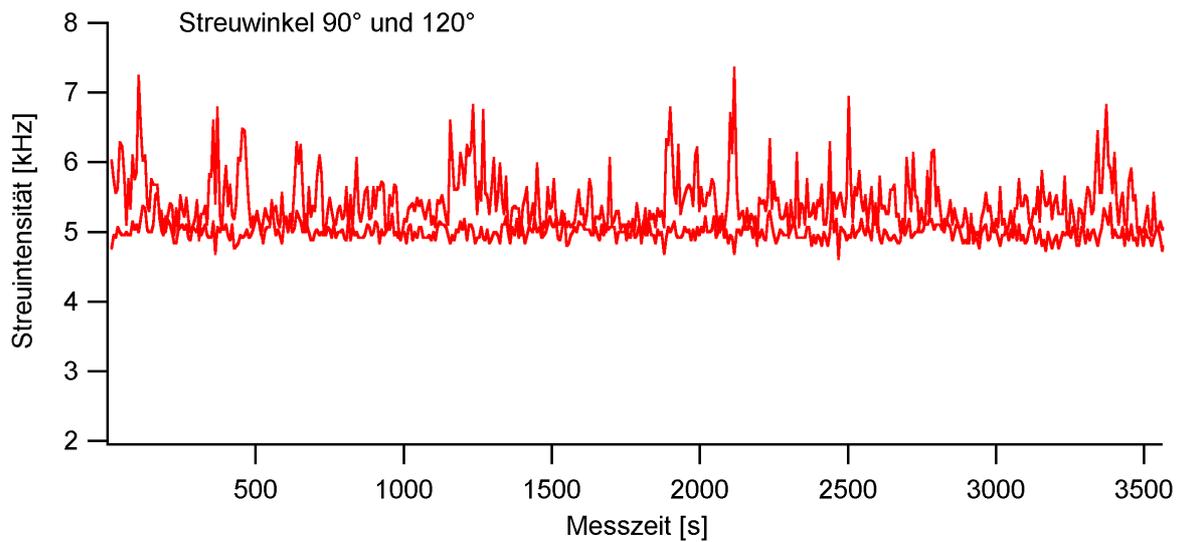


Abbildung 33b: Die absoluten Streuintensitäten für 0.7 mg/ml F-Aktin bei 90° und 120° Streuwinkel

In der Darstellung ist deutlich zu sehen, dass hier auch bei größeren Streuwinkeln Bereiche in der Streuintensität auftreten, in denen der Betrag der Intensität sehr groß ist. Abbildung 34 unten zeigt den Intensitätsverlauf für den 20° Streuwinkel. Die Messzeit betrug 80.000 Sekunden. Die Bereiche 1 bis 7 zeigen Lebensdauern von mehreren tausend Sekunden.

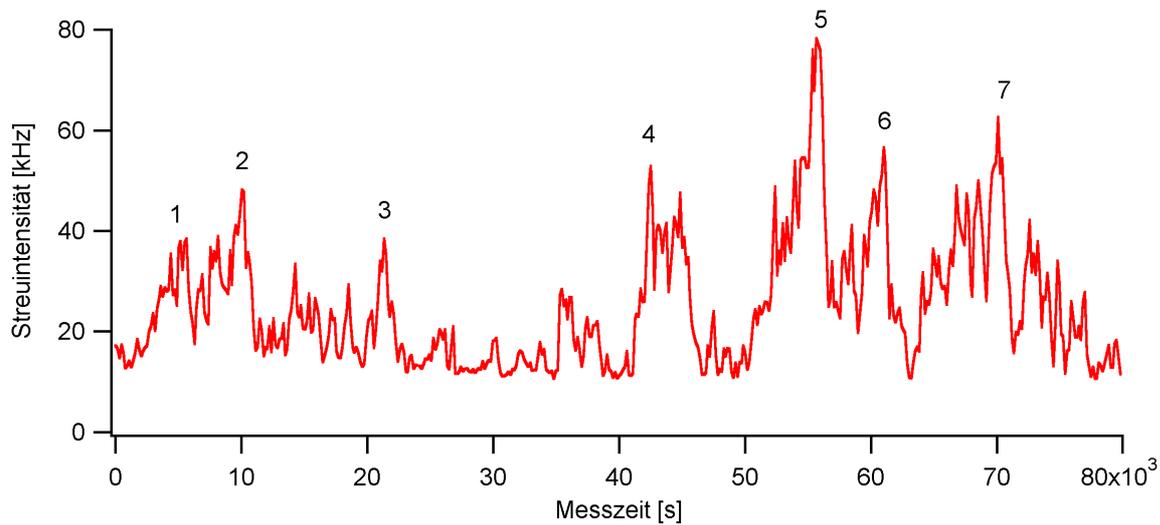


Abbildung 34: Die Streuintensität für 0.7 mg/ml F-Aktin und 20° Streuwinkel

In Abbildung 35 unten ist der Streuintensitätsverlauf für den Detektionswinkel 25° gezeigt. Auch hier zeigen sich für Bereiche 1 bis 6 extrem lange Lebensdauern

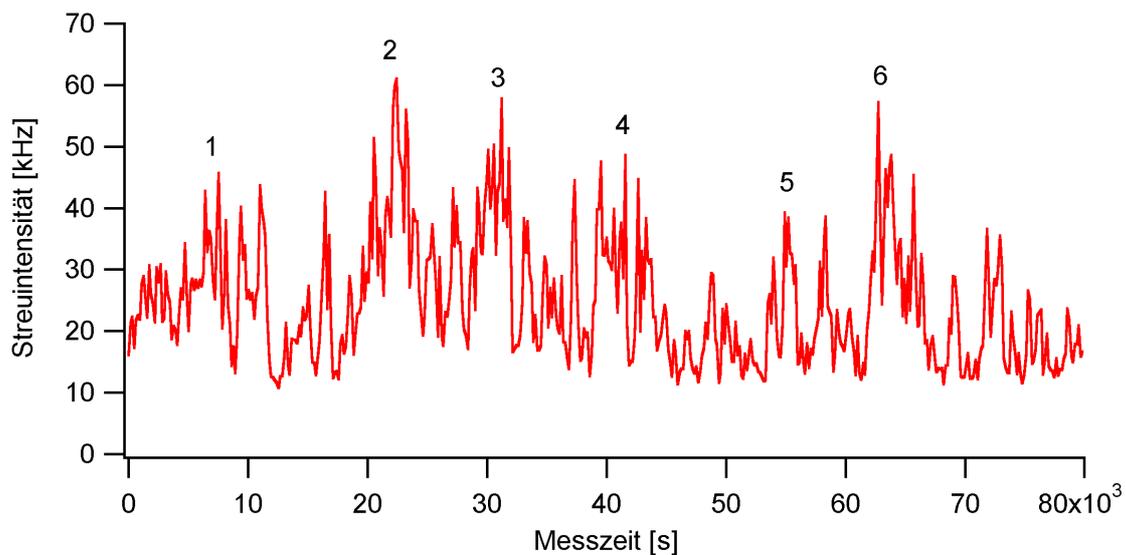


Abbildung 35: Die Streuintensität für 0.7 mg/ml F-Aktin und den Streuwinkel 25°

Selbst bei dem Detektionswinkel 40° ist die Zeitskala der Dynamik noch sehr langsam. Die Messzeit betrug 80.000 Sekunden. Abbildung 36 unten zeigt die Ergebnisse:

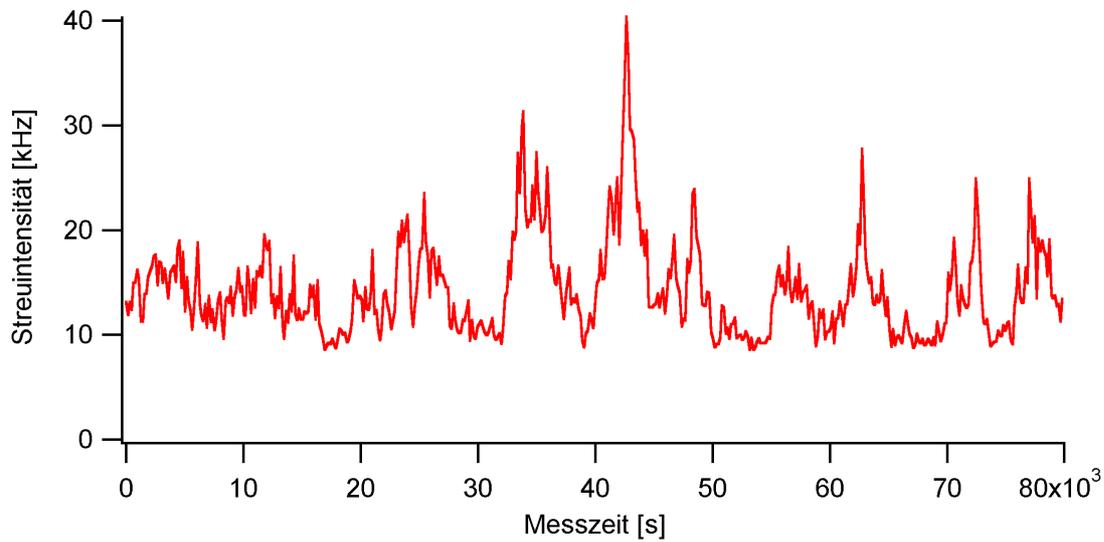


Abbildung 36: Die Streuintensität für 0.7 mg/ml F-Aktin und 40° Streuwinkel

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass mit zunehmender Konzentration des F-Aktins die Dichtefluktuationen immer langlebiger werden.

Abbildung 37 unten zeigt die korrigierte Streuintensität der gesamten Messreihe nach Gleichung 47 und Gleichung 51 über den Streuvektor q , relativ zu Toluol, aufgetragen.

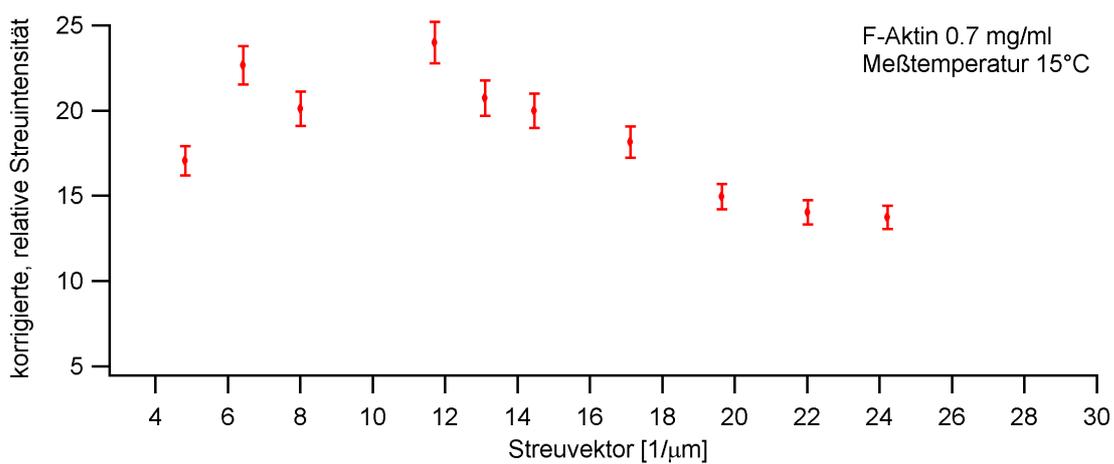


Abbildung 37: Korrigierte Streuintensität für 0.7 mg/ml F-Aktin über den Streuvektor q aufgetragen

In Abbildung 37 ist sehr gut zu sehen, dass der bei den vorherigen Proben als Plateau erkennbare Bereich zwischen dem 40° und 50° Streuwinkel immer steiler wird. Zu noch kleineren Streuwinkeln hin sinkt dagegen die korrigierte, relative Streuintensität. Diese Beobachtung wurde in bisher allen voneinander unabhängigen Experimenten und für unterschiedliche Aktinpräparationen ausgehend von unterschiedlichen Kaninchen gemacht. An dieser Stelle sei ausdrücklich erwähnt, dass es bei Experimenten mit rechteckigen Küvetten unerlässlich ist, diese beim Einsetzen korrekt in den Strahlengang zu positionieren. Ansonsten könnten Reflexe entstehen, die eine erhöhte oder geringere Streuintensität vortäuschen.

4.1.5 Die absoluten Streuintensitäten für 1.0 mg/ml F-Aktin

In Abbildung 38 unten ist die Streuintensität für F-Aktin mit einer Konzentration von 1.0 mg/ml gezeigt. In diesem Experiment ist gut zu erkennen, dass die Extrema in der Probe sehr ausgeprägt sind. Die Streuintensitäten erreichen maximale Werte von bis zu 350 kHz. Die Messzeit betrug 80.000 Sekunden für die Streuwinkel 20° , 25° , 30° , 40° und 45° .

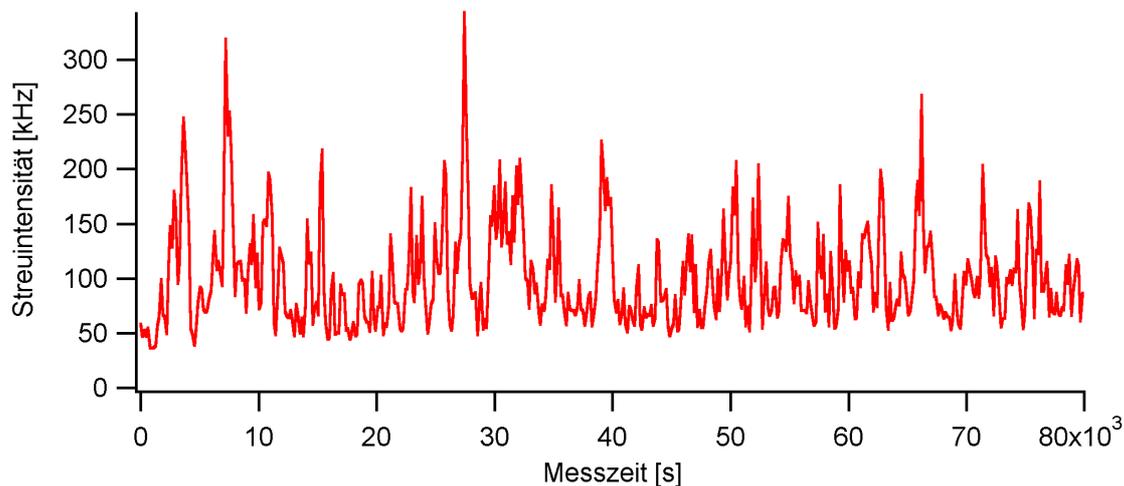


Abbildung 38a: Die Streuintensität für 1.0 mg/ml F-Aktin und 20° Streuwinkel

Zum Vergleich ist der Streuwinkel 90° in Abbildung 38b unten gezeigt:

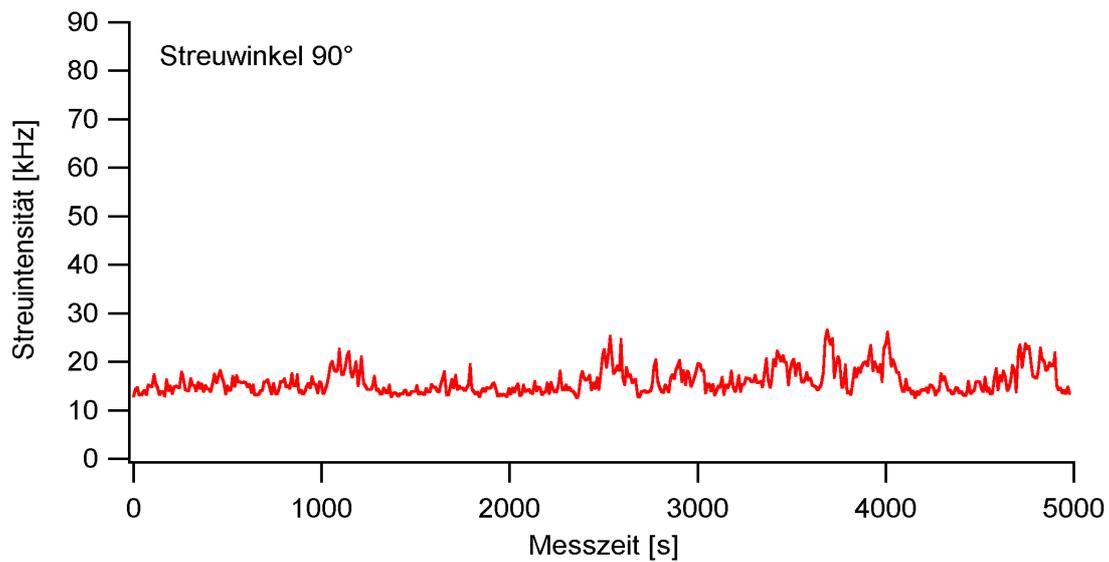


Abbildung 38b: Die Streuintensität für 1.0 mg/ml F-Aktin und 90° Streuwinkel

Bei dieser hohen Konzentration sind die Langzeitfluktuationen der Probe gerade bei kleinen Streuwinkeln gut zu sehen. Zum Vergleich ist in Abbildung 39 unten die Streuintensität für den Streuwinkel 45° gezeigt. Man beachte die Skala der Ordinate.

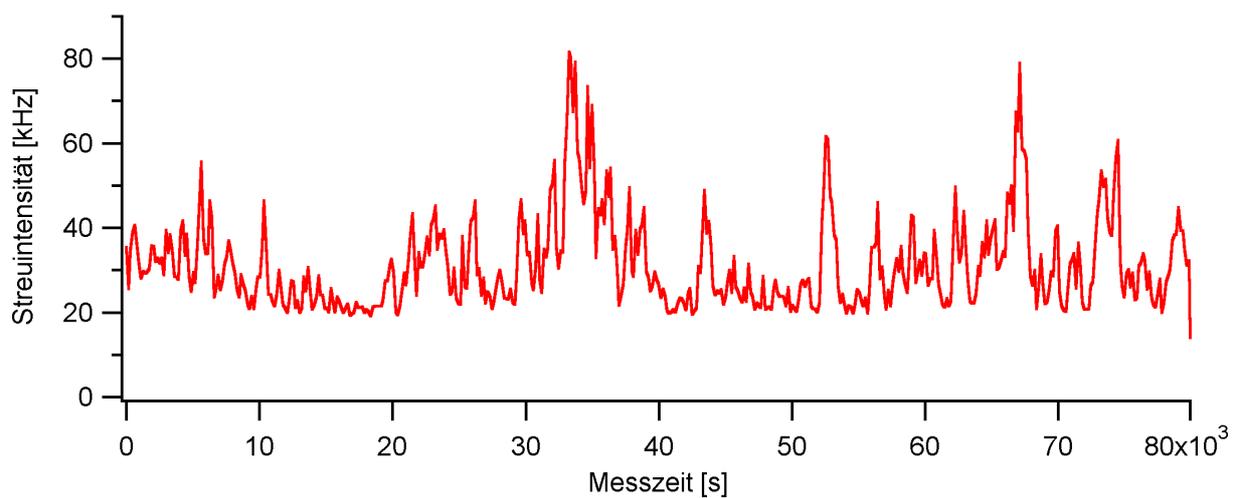


Abbildung 39: Die Streuintensität für 1.0 mg/ml F-Aktin und 45° Streuwinkel

Abbildung 40 zeigt die korrigierten Streuintensitäten gemäß den Gleichungen 47 und 51 für 1.0 mg/ml F-Aktin relativ zu Toluol:

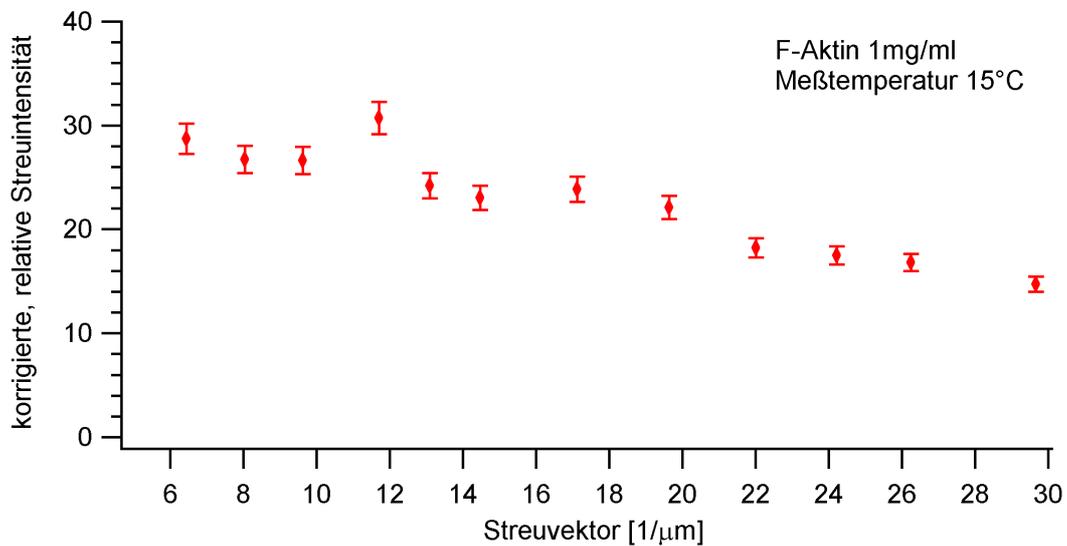


Abbildung 40: Korrigierte Streuintensität für 1.0 mg/ml F-Aktin aufgetragen über den Streuvektor q

Zur besseren Übersicht zeigt Abbildung 41 unten die korrigierten Streuintensitäten relativ zu Toluol für alle Konzentrationen über den Streuvektor.

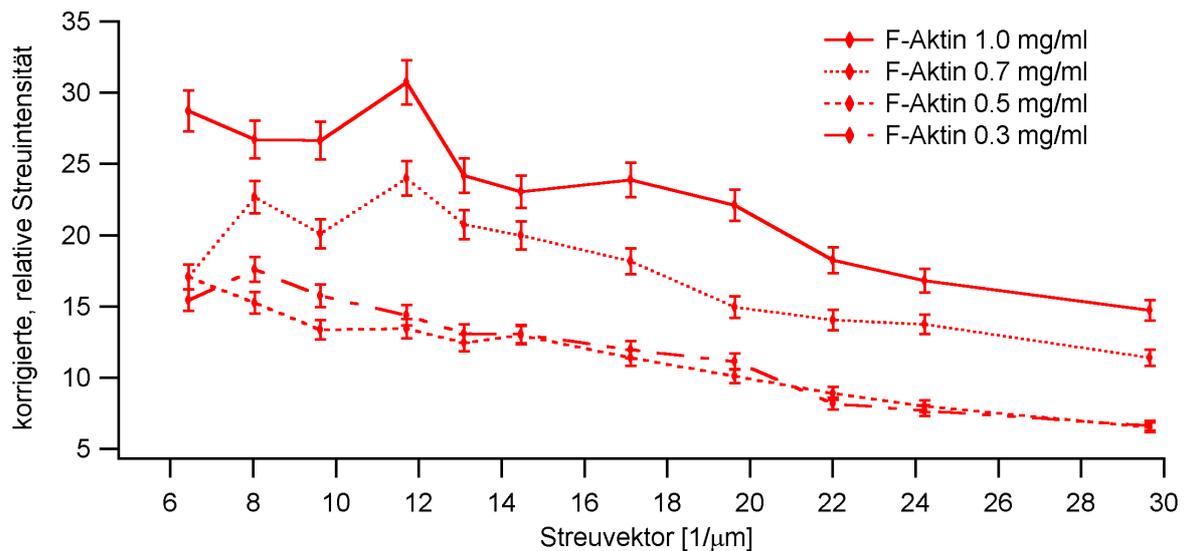


Abbildung 41: Übersicht der korrigierten Streuintensitäten aller F-Aktinproben

4.2 Die Intensitätskorrelationsfunktionen von verschiedenen Aktinkonzentrationen

In diesem Abschnitt werden die Intensitätskorrelationsfunktionen der F-Aktinkonzentrationen von 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.7 mg/ml und 1.0 mg/ml gezeigt. Diese wurden aus den absoluten Streuintensitäten, wie sie zum Teil im vorigen Abschnitt gezeigt wurden, errechnet. Dazu fand ein ALV-5000 Multi-Tau-Korrelator der ALV-GmbH (Langen, Deutschland) Verwendung. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass sämtliche Ergebnisse aus etwa 3 – 4 voneinander unabhängigen Experimenten reproduzierbar gemessen wurden.

4.2.1 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 0.3 mg/ml F-Aktin

Abbildung 42 unten zeigt die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie von 20° bis 120° für 0.3 mg/ml F-Aktin.

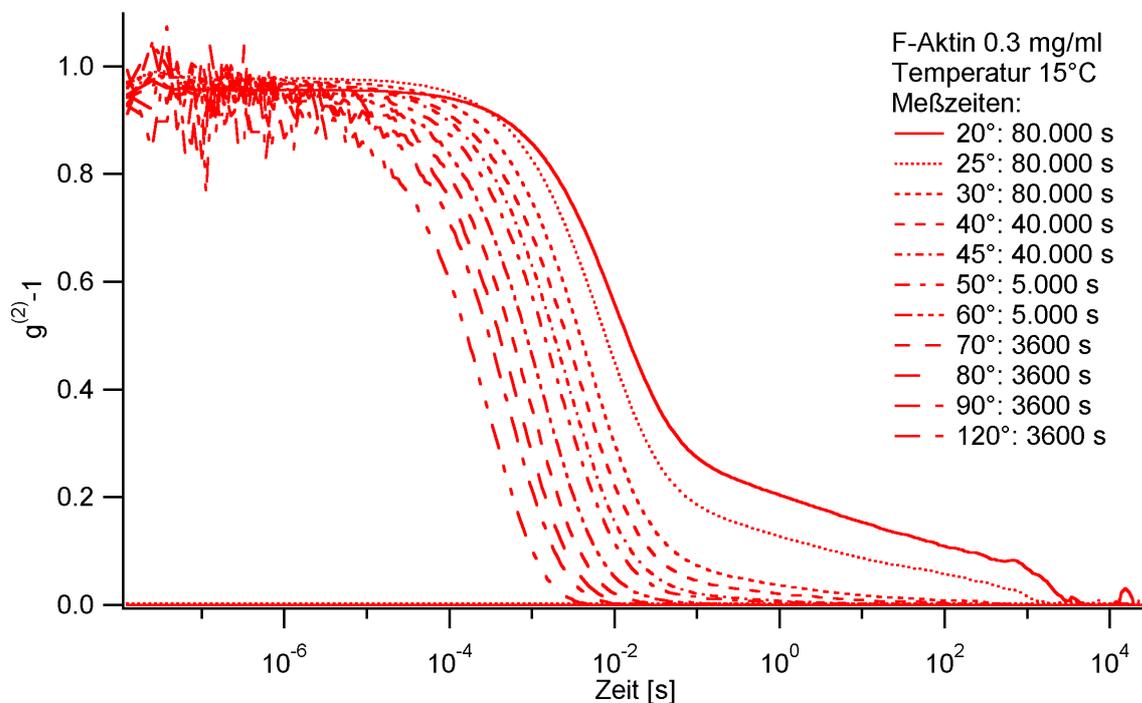


Abbildung 42: Die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie für 0.3 mg/ml F-Aktin

Bei den Intensitätskorrelationsfunktionen für 20° und 25 ° ist für lange Korrelationszeiten, ab etwa 0.1 Sekunden, eindeutig ein extrem langsamer Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion erkennbar. Bei kürzeren Korrelationszeiten handelt es sich um einen gestreckt exponentiellen Zerfall, wie in der Diskussion gezeigt wird.

4.2.2 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 0.5 mg/ml F-Aktin

Abbildung 43 unten zeigt die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie von 20° bis 120° für 0.5 mg/ml F-Aktin.

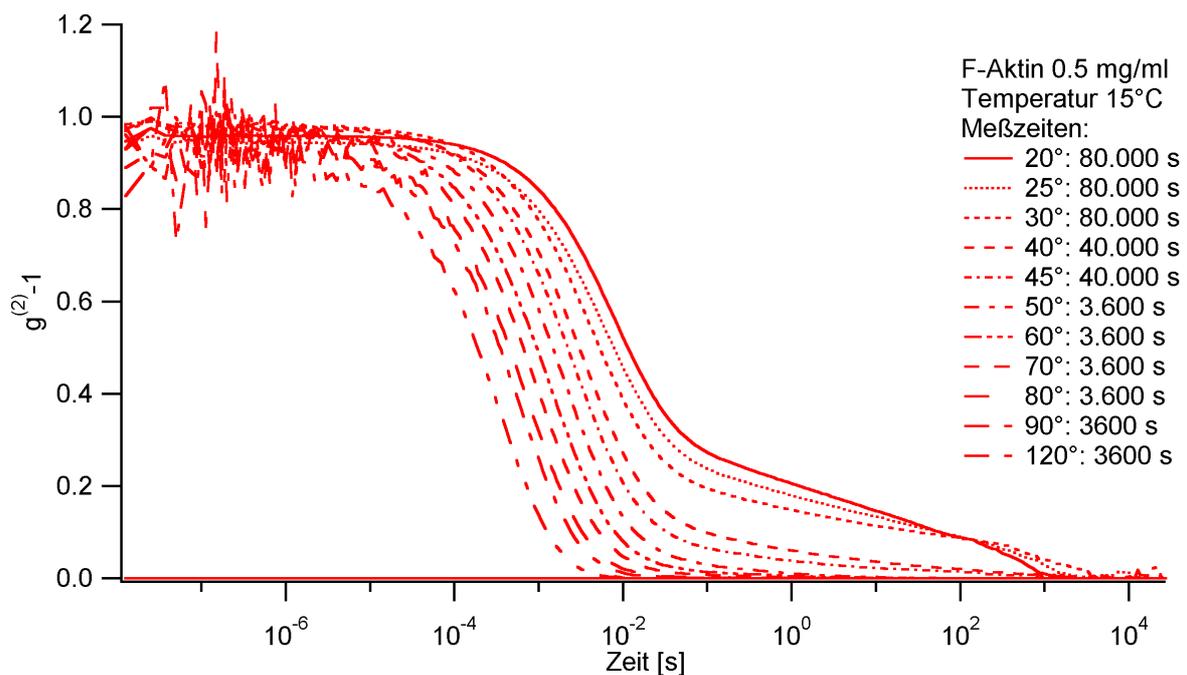


Abbildung 43: Die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie für 0.5 mg/ml F-Aktin

Auch hier ist der extrem langsamer Zerfall der normierten Intensitätskorrelationsfunktion zwischen 0.1 s bis zu 1000 s bis zum Streuwinkel 45° erkennbar.

4.2.3 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 0.7 mg/ml F-Aktin

Abbildung 44 unten zeigt die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie von 20° bis 120° für 0.7 mg/ml F-Aktin.

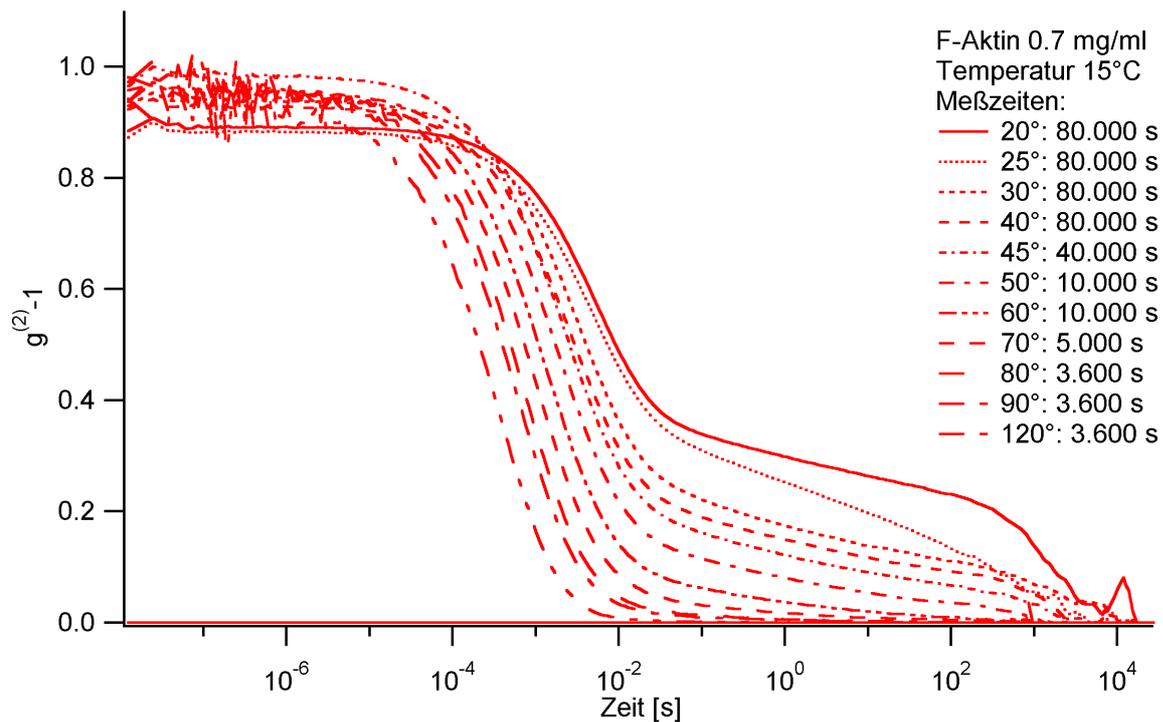


Abbildung 44: Die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie für 0.7 mg/ml F-Aktin

Für den Streuwinkel 20° scheint die Messzeit von 80.000 s nicht ausreichend. Die Regionen 1 bis 7 der statischen Streuintensität aus Abbildung 34 zeigen über mehrere Stunden andauernde Fluktuationen. Daraus ergibt sich bei einer festen Messzeit von etwa 22 Stunden eine entsprechend schlechte Statistik. 1000 Ereignisse sind mindestens notwendig für eine gute Statistik. Bei einer Dauer der Ereignisse von ca. 5 Stunden, vgl. z. B. Abbildungen 30 und 34, entspricht dies einer hypothetischen Messzeit von 208 Tagen. Dies ist experimentell nicht durchführbar. Der Aufbau der Korrelationsfunktion verlief wie folgt: am Ende der Korrelationszeit fällt die Intensitätskorrelationsfunktion steil ab. Dieser steile Abfall verschiebt sich zu längeren Korrelationszeiten innerhalb der Messzeit. Der langsame Zerfall wird somit immer ausgeprägter.

Die schlechte Statistik und zu kurze Messzeit äußert sich im steilen Abfall der Intensitätskorrelationsfunktion aus Abbildung 44 oben für die beiden Streuwinkel 20° und 25° ab etwa 1000 Sekunden. Trotzdem ist der extrem langsame Zerfall eindeutig und für alle Streuwinkel kleiner als 60° erkennbar.

4.2.4 Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 1.0 mg/ml F-Aktin

Abbildung 45 unten zeigt die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie von 20° bis 120° für 1.0 mg/ml F-Aktin.

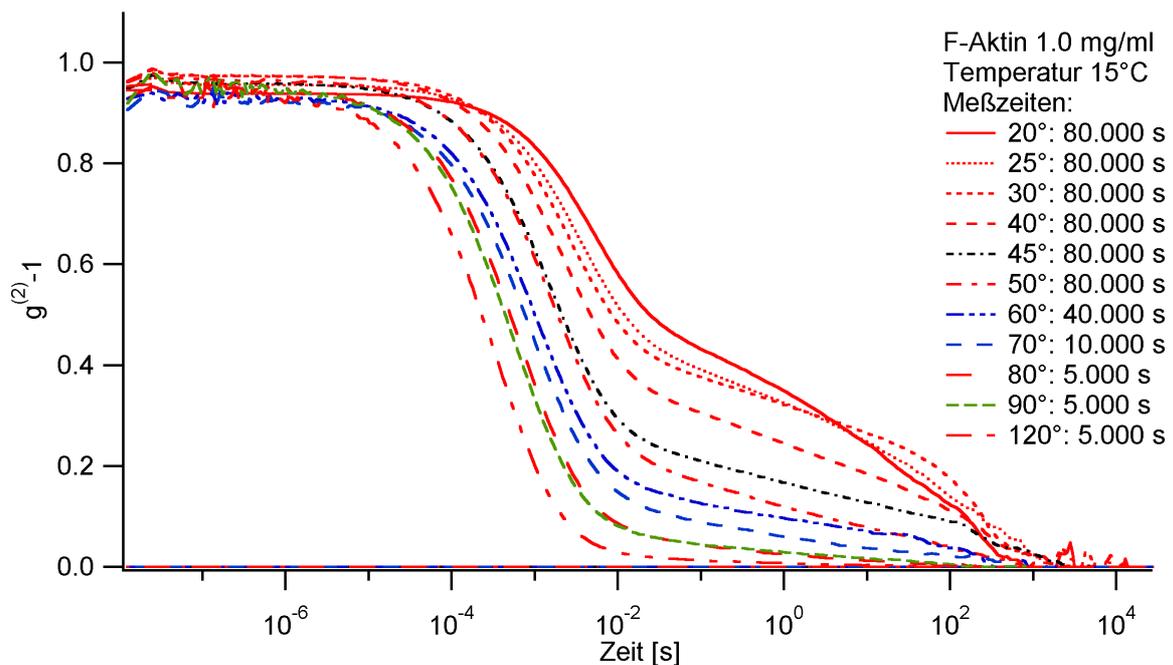


Abbildung 45: Die Intensitätskorrelationsfunktionen einer Winkelserie für 1.0 mg/ml F-Aktin

Wie schon aus der statischen Streuintensität für den 20° Streuwinkel aus Abbildung 38a hervorgeht, sind die Langzeitfluktuationen derart ausgeprägt, dass die Messzeit von 80.000 s auch hier nicht ausreicht, vgl. oben erwähnter Aufbau der Korrelationsfunktion. Daher der steile Abfall des langsamen Zerfalles der Intensitätskorrelationsfunktion und das ausgeprägte Rauschen ab etwa 1000 s Korrelationszeit. Ab einem Streuwinkel von 40° besitzen die Daten eine gute Statistik.

4.2.5 Vergleich der normierten Intensitätskorrelationsfunktionen unterschiedlicher F-Aktinkonzentrationen bei festem Streuwinkel

In Abbildung 46 unten sind die normierten Intensitätskorrelationsfunktionen für einen Streuwinkel von 40° der unterschiedlichen F-Aktinkonzentrationen dargestellt.

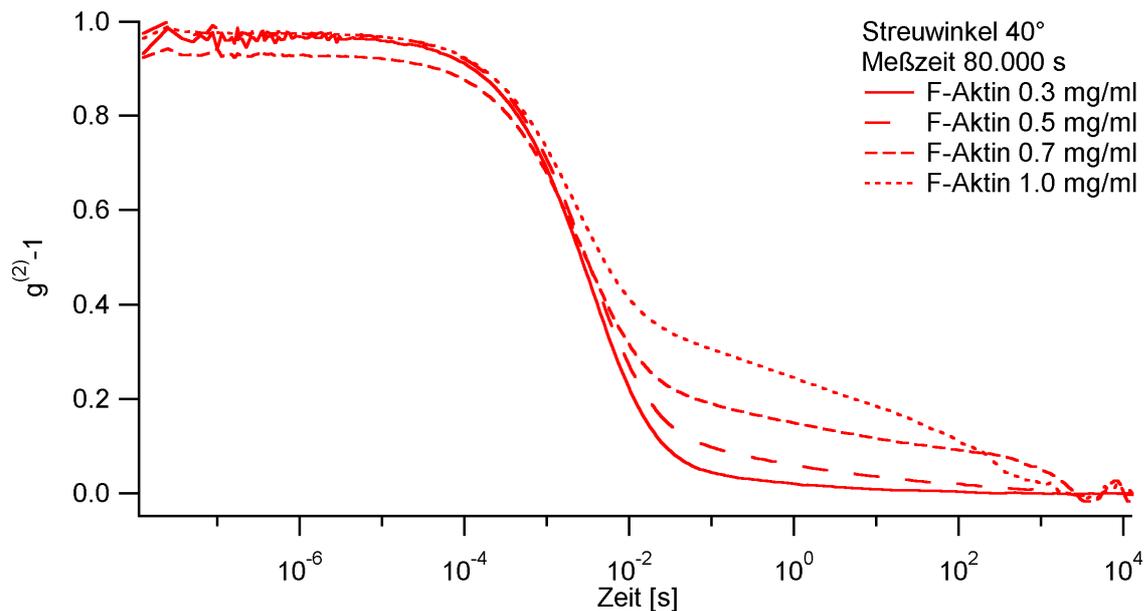


Abbildung 46: Normierte Intensitätskorrelationsfunktionen der verschiedenen F-Aktinkonzentrationen bei 40° Streuwinkel

In Abbildung 46 ist sehr gut zu erkennen, dass der langsame Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion umso ausgeprägter wird, je höher die F-Aktinkonzentration ist. Die Messzeit betrug bei allen Proben 80.000 s. Bei den F-Aktinkonzentrationen von 0.7 mg/ml und 1.0 mg/ml sind ab etwa 500 s Korrelationszeit steilere Zerfälle der Korrelationsfunktion erkennbar. Dies deutet auf unzureichende Messzeit hin.

4.2.6 Direkter Vergleich von absoluter Streuintensität und dazugehöriger Intensitätskorrelationsfunktion

Hier soll zur besseren Veranschaulichung die absolute Streuintensität und dazugehörige Intensitätskorrelationsfunktion mit Fehler für das Beispiel 0.5 mg/ml F-Aktin gezeigt werden.

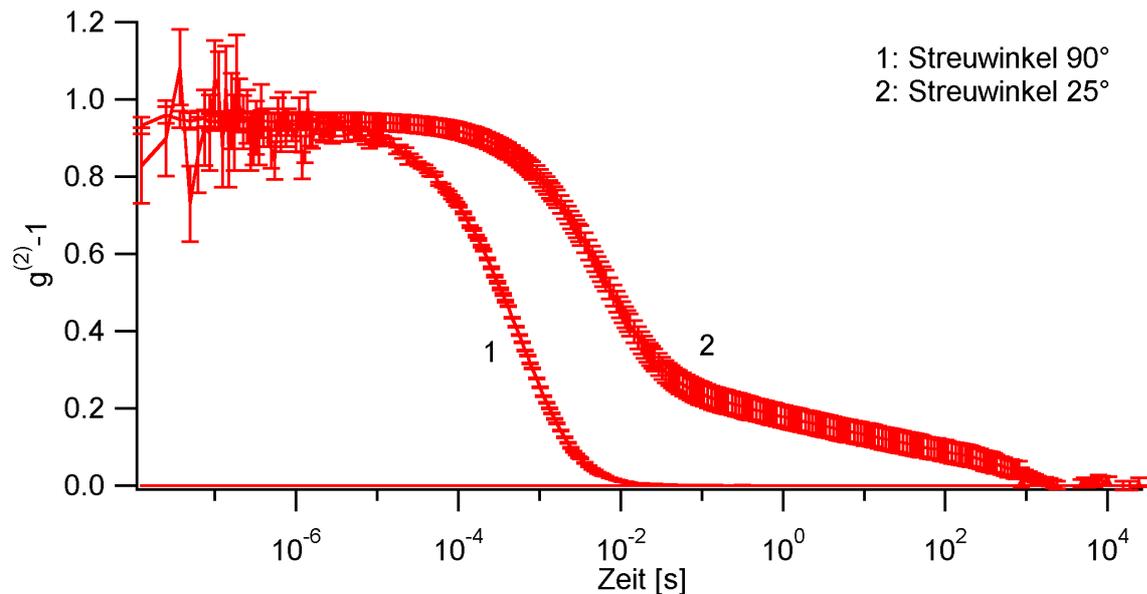


Abbildung 47: Die Intensitätskorrelationsfunktionen für 0.5 mg/ml und 25° bzw. 90° Streuwinkel

Der Langzeiterfall der Korrelationsfunktion ist in der Intensität als hohe, langanhaltende Fluktuation sichtbar. Die Messzeit ist aus den oben erwähnten Gründen für den kleinen Streuwinkel unzureichend. Die Fehlerbalken sind bei 90° viel kleiner als bei 25° Streuwinkel, obwohl bei 90° 10^7 Photonen korreliert wurden und bei 25° 10^9 Photonen. Dies liegt daran, dass bei 25° die mittlere Intensität, durch sie wird $g^{(2)}$ normiert, viel schlechter bekannt ist, da die längsten Korrelationszeiten nicht wesentlich kürzer sind als die Messzeit.

Zur Statistik tragen zwei unabhängige statistische Prozesse bei: Photonenstatistik und die Statistik der Dichtefluktuationen. Beide bringen statistische Fehler, hier dominiert bei weitem die Dichtefluktuation.

Zum Vergleich, die dazugehörigen absoluten Streuintensitäten:

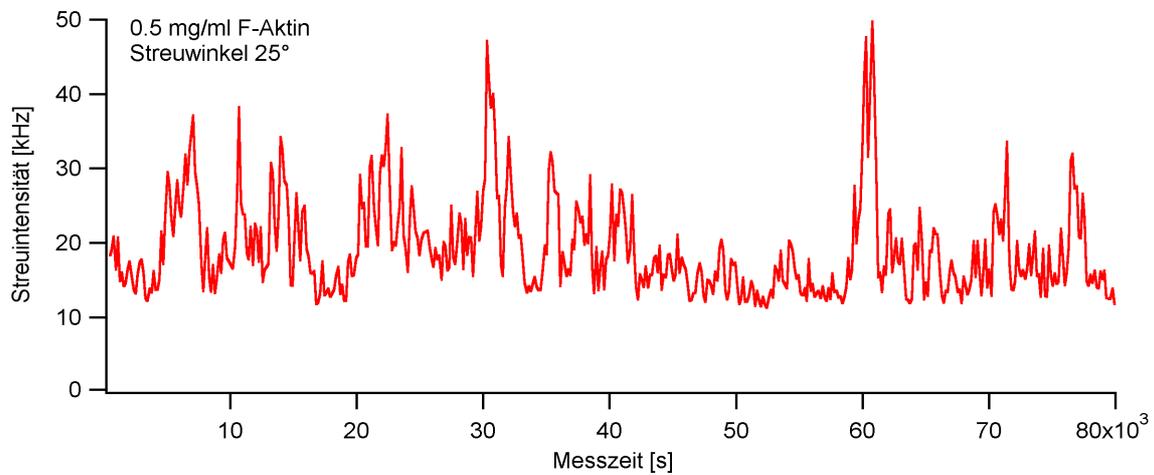


Abbildung 48: Die absolute Streuintensität zur obigen Intensitätskorrelationsfunktion für 25° Streuwinkel

Die Abbildung 49 unten zeigt die absolute Streuintensität zur Korrelationsfunktion 1 aus Abbildung 47 oben:

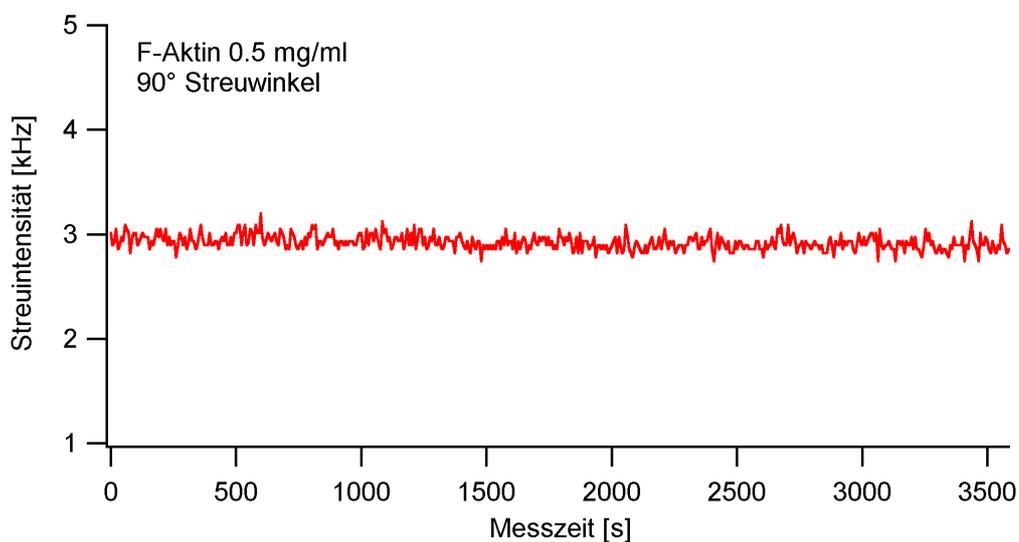


Abbildung 49: Die absolute Streuintensität zur obigen Intensitätskorrelationsfunktion für 25° Streuwinkel

Die Abbildungen 47 bis 49 oben sollen beispielhaft die Streuintensitäten mit den entsprechenden Intensitätskorrelationen auf einen Blick zeigen.

4.3 Diskussion der gemessenen Korrelationsfunktionen

4.3.1 Anpassung von Modellen an die experimentellen Daten

Wie aus den Daten entnommen werden kann, fallen diese offensichtlich in zwei Regime. Die Zeitachse ist immer logarithmisch, d.h. der Unterschied der zwei Regime ist noch viel drastischer als er hier erscheint. Ein generelles Modell das hier passen würde, fehlt. Für die Einzelfilamentdynamik gibt es Vorhersagen, welche natürlich getestet werden. Im Kurzzeitbereich wird Einzelfilamentdynamik erwartet, da dort noch die kleinsten Amplituden, d.h. die lokalisierteste Bewegung gemessen wird. Wie gezeigt wird, gehorcht diese Bewegung dem Gesetz

$$g^{(2)} - 1 = \exp\left[-\left(\frac{t}{t_0}\right)^{3/4}\right].$$

Für das Langzeitverhalten gibt es keine Vorhersagen, daher musste anhand der vorliegenden Daten eine möglichst angemessene Modellfunktion gefunden werden.

Zur besseren Veranschaulichung ist in Abbildung 50 unten die Vorgehensweise dargestellt, mit welcher die experimentellen Daten der normierten Intensitätskorrelationsfunktionen an theoretische Modelle angepasst wurden. Als Beispiel sind die Daten des 45° Streuwinkels der 1 mg/ml F-Aktinlösung mit Fehlergrenzen gezeigt. Das Vorgehen war bei allen Intensitätskorrelationen identisch.

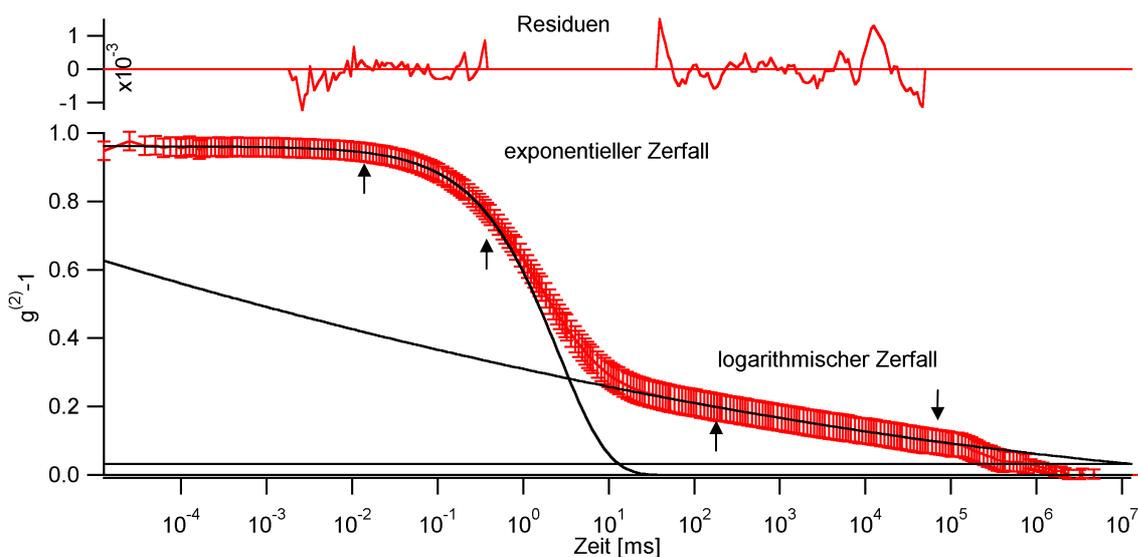


Abbildung 50: Anpassung der theoretischen Modelle an die experimentellen Daten. 1mg/ml F-Aktin, 45 Streuwinkel. Die Pfeile markieren die beiden unterschiedlichen Regime.

Die Residuen berechnen sich wie folgt:

$$\sigma = \frac{a-b}{\sigma_a} \quad (55)$$

Hier bedeutet:

a: Messwert

b: Anpassungswert

σ_a : Standardabweichung des Messwertes a

Gemessen wurde eine normierte Intensitätskorrelationsfunktion. Der Skalenfaktor zur Normierung ist $\langle I \rangle^2$. Dieser dominiert den Fehlerbalken bei weitem, d.h. die Fehlerbalken geben an, um welchen Faktor die ganze Kurve fehl-skaliert sein könnte. Die Fehlerbalken geben nicht das unabhängige Rauschen der Punkte gegeneinander an. Daher sind die Residuen in der Größenordnung 10^{-3} . Sie müssten von der Größenordnung 1 sein, sofern die Standardabweichungen wirklich die Standardabweichungen der Kurve gegeneinander angeben würden. Die Fehler der Intensitätskorrelationsfunktion werden zu längeren Korrelationszeiten größer. Dies liegt an der Tatsache, dass die Statistik der Korrelationswerte mit extrem langlebigen Dichtefluktuationen, aufgrund der festen Messzeit von einigen Stunden, schlecht ist. Desweiteren ist aus dem gleichen Grund die mittlere Streuintensität nicht genau bekannt. Ausführungen dazu findet man von W. Peters in Wyn Brown [3].

Als Anpassungsfunktionen wurden in den entsprechenden Bereichen, welche durch die Pfeile markiert sind, folgende Modelle verwendet:

Für den anfänglichen Teil der Korrelationsfunktion erwartet man nach den Theorien von Kroy und Maggs [21] einen gestreckt exponentiellen Verlauf. Daher wurde die folgende Modellfunktion verwendet:

$$g^{(2)} - 1 = \left\{ a \cdot \exp \left[- \left(\frac{t}{t_0} \right)^b \right] \right\}^2 + c \quad (56a)$$

Für den sehr langsam zerfallenden Teil wurde heuristisch folgendes Modell verwendet:

$$g^{(2)} - 1 = [d \cdot (\ln(t) - e)]^2 + f \quad (56b)$$

Ein quadrierter Logarithmus erwies sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Daten als wesentlich bessere Modellfunktion als eine Logarithmusfunktion selbst.

Bei der Modellierung muss darauf geachtet werden, dass in den Bereichen, in denen die Anpassung für Auswertungen verwendet wird, die Residuen symmetrisch um die Ursprungslinie variieren, wie in Abbildung 50 oben gezeigt ist. Die absolute Größe χ^2 kann als Kriterium nicht verwendet werden, da ja die Standardabweichungen bei weitem eine Überschätzung sind. Da die Beurteilung in einzelnen Fällen subjektiv ausfallen kann, wurden die Anpassungsgrenzen, durch die Pfeile in Abbildung 50 angedeutet, etwa drei bis vier mal variiert und zur Berechnung der Parameter die entsprechenden Mittelwerte gebildet. Die Ergebnisse der Anpassungen aus den Rohdaten sind ohne Kommentar in Anhang 2 dargestellt.

4.3.2 Überprüfung des $t^{(3/4)}$ - Gesetzes für F-Aktin

Werden die Parameter aus Gleichung 56a für den exponentiellen Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion an die experimentellen Daten angepasst, so ergibt sich für den Exponenten b aus Gleichung 56a ein Mittelwert von 0.73 mit einem Fehler von 3%. Dies passt sehr gut mit dem von Maggs [42] vorhergesagten $t^{3/4}$ - Zerfallsgesetz überein. Abbildung 51 unten zeigt die Ergebnisse der Anpassung:

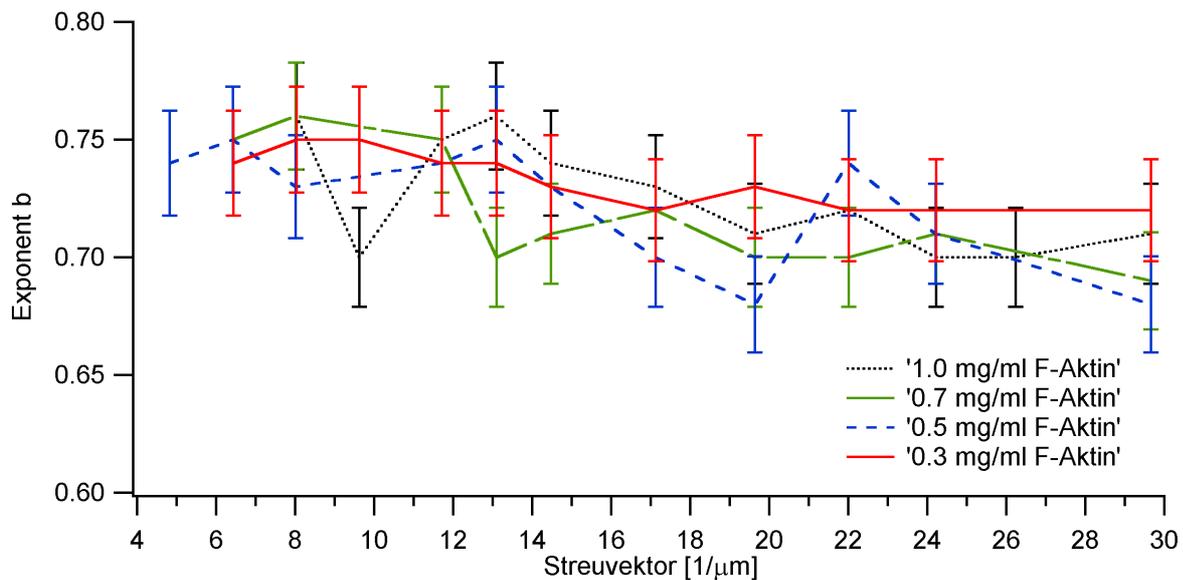


Abbildung 51: Die Werte für den Exponenten b des gestreckt-exponentiellen Zerfalls der Intensitätskorrelationsfunktionen

Das in Abbildung 51 erkennbare Gefälle zu größeren Streuvektoren ist nicht signifikant, da dieses Gefälle innerhalb der Fehler liegt. Die Standardabweichung beträgt 0.02.

Die theoretischen Vorhersagen von Kroy und Frey behandeln die Dynamik eines isolierten semi-flexiblen Polymers. Die hydrodynamische Wechselwirkung und die Effekte des Netzwerkes wurden hier völlig vernachlässigt. Es ist daher verblüffend, dass trotz dieser stark vereinfachenden Annahmen doch eine sehr gute Beschreibung der Messdaten möglich ist.

4.3.3 Schnittpunkt der Anpassungsfunktionen mit der Ordinate

Für den Anpassungsparameter a , den Schnittpunkt der gestreckt exponentiellen Anpassungsfunktion aus Gleichung 56a mit der Ordinate, hier als „Intercept“ bezeichnet, ergeben sich die in Abbildung 52 unten dargestellten Werte:

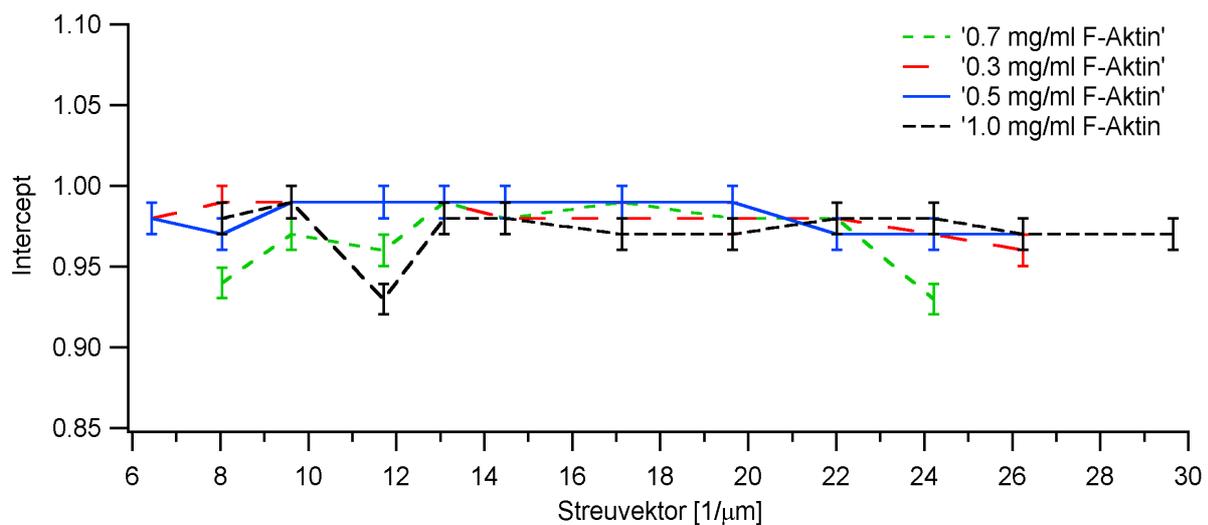


Abbildung 52: Ergebnisse für den Schnittpunkt des Anpassungsparameters a mit der Ordinate

Der theoretische Wert für diesen Anpassungsparameter hat bei homodynen Lichtstreuexperimenten den Wert 1, vgl. Cummins et al. [13]. Der Anpassungsparameter ist ein Maß für die Justage der Lichtstreuanlage und sollte über 0.95 liegen [39].

Bei Systemen mit Gelationstendenz tritt oft heterodyne Lichtstreuung auf. Damit einher gehen im Normalfall drastisch reduzierte Werte des Intercepts. Die statischen Strukturen in solchen Systemen streuen einen Teil des Primärlichtes. Dies führt zu Schwebungen zwischen frequenzverbreitertem (=gestreutem) Licht und Primärlicht, vgl. Geissler et al. [40]. Aus Abbildung 52 geht somit eindeutig hervor, dass die untersuchten Aktinproben keine statischen Strukturen enthalten, d. h. noch fließen. Das Fließen der Probe beobachtet man auch, indem man die 1 mg/ml F-Aktinlösung in der Küvette kippt.

4.3.4 Die Berechnung der Persistenzlängen für F-Aktin

Zur Berechnung der Persistenzlängen wurde folgende Modellfunktion an die Daten angepasst:

$$(g^{(2)} - 1) = a^2 \cdot \exp\left[-2\left(\frac{t}{t_0}\right)^{3/4}\right] \quad (57)$$

Setzt man Gleichung 43 in die oben genannte Anpassungsfunktion ein, so ergibt sich folgender Zusammenhang:

Mit

$$(g^{(2)} - 1) = \exp\left[-\frac{2 \cdot \Gamma(1/4)}{3\pi} (\gamma_s t)^{3/4}\right] \quad (58)$$

ergibt sich:

$$1/t_0 = \left\{ \frac{\Gamma(1/4)}{3\pi} \right\}^{-3/4} (\gamma_s)^{3/4} \quad (59a)$$

Setzt man in Gleichung 59a die Beziehungen aus den Gleichungen 42, 44 und 45 aus Abschnitt 1.5 ein, so ergibt sich:

$$\frac{1}{t_0} = \left\{ \frac{3.63}{3\pi} \right\}^{-3/4} \left(\frac{k_B T}{\xi_{\perp} l_P^{-1/3}} \right)^{3/4} (q^2) \quad (59b)$$

Die q^2 -Abhängigkeit des Anpassungsparameters b wird aus Gleichung 59b ersichtlich.

Nach längerer, aber trivialer Rechnung ergibt sich für die Persistenzlänge l_p folgender Ausdruck:

$$l_p = \frac{q^8 (k_B T)^3 \left[\frac{5}{6} - \ln(q \cdot a) \right]^b}{\gamma_s^3 (4\pi\eta)^3} \quad (60)$$

Trägt man die logarithmierten Anpassungswerte für den Parameter b , welcher der charakteristischen Zeit t_0 in Gleichung 57 entspricht, gegen den logarithmierten Streuvektor auf, ergibt sich folgendes Bild:

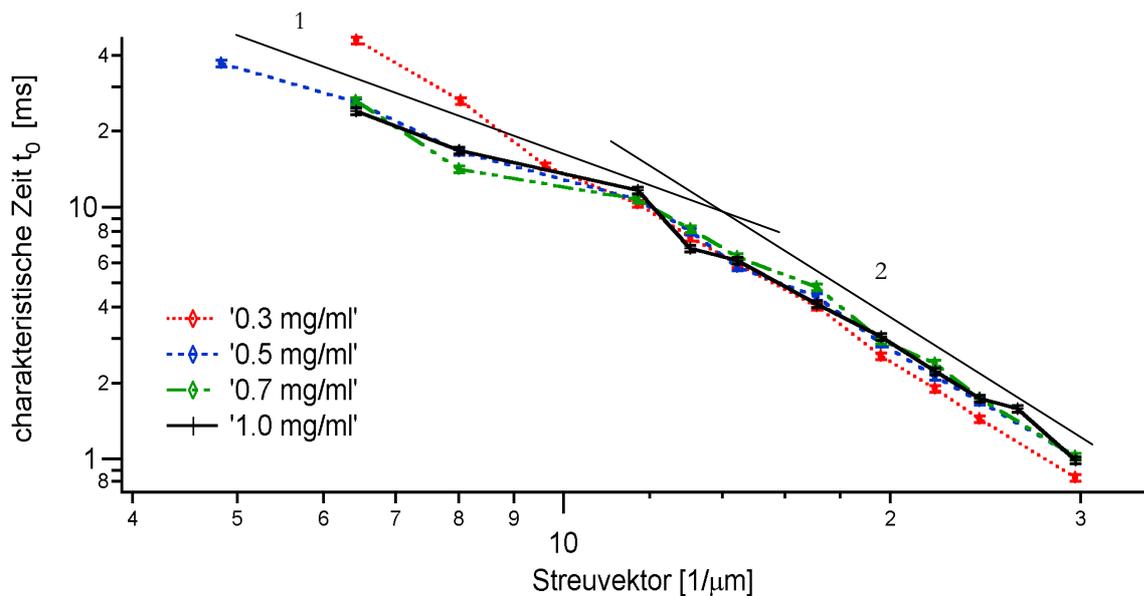


Abbildung 53: Die charakteristische Zeit der gestreckten Exponentialfunktion (Parameter b in der Modellfunktion aus Gleichung 57) über den Streuvektor aufgetragen. 1 und 2 geben die beiden unterschiedlichen Anpassungsgeraden.

Man erkennt, dass ab einem Streuvektor von $13.10 \text{ 1}/\mu\text{m}$ (45° Streuwinkel) die Anpassungswerte für höhere Konzentrationen ein steileres Gefälle aufweisen. Die Steigungen betragen für Gerade 1 (-1.48) und für Gerade 2 (-2.38). Mit der gegenwärtigen Theorie würde man die Steigung ($-8/3$) erwarten.

Der Grund hierfür ist, dass ab hier der detektierte langsame Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion sehr viel schwächer ausgeprägt ist. Für die Streuwinkel ab 70° wird die Persistenzlänge berechnet und in Abbildung 54 unten gezeigt. Bei allen Messungen sind erst ab diesem Streuwinkel die Zahl der Messpunkte ausreichend, an welche die Modellfunktion aus Gleichung 57 angepasst wird.

Dabei wurde für die Filamentdicke a ein Wert von 9 nm verwendet [24]. Die kinematische Viskosität wurde zu $1.15 \text{ mm}^2/\text{s}$ gemessen, vgl. dazu Abschnitt 2.3. Unter Berücksichtigung des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes und der Vertrauensbereiche der Mittelwerte für den Parameter t_0 [35] aus den Anpassungen, ergeben sich für die Persistenzlänge von F-Aktin folgende Werte:

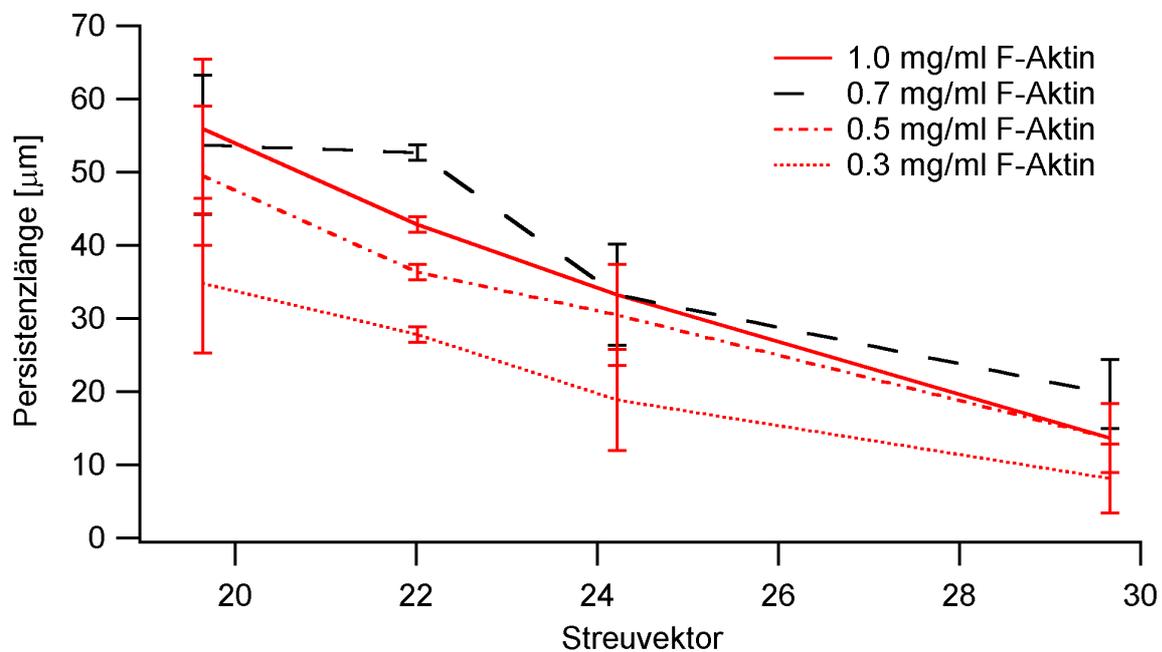


Abbildung 54: Die Persistenzlänge für F-Aktin

Es ist deutlich zu erkennen, dass zu größeren Streuvektoren hin, die nach diesem Modell berechnete Persistenzlänge geringere Werte annimmt. Bei diesen Konzentrationen und den verwendeten Streuwinkeln und Zeitbereichen für die Anpassung, dominiert die Einzelfilamentdynamik den Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion so stark, dass mit einer Theorie für ein einzelnes Filament die Daten doch äußerst gut beschrieben werden können. Die Persistenzlänge wird aus der vierten Potenz des Anpassungsparameters b bestimmt. Kleine Fehler bei der Auswertung machen sich daher sehr stark bemerkbar. Für den dargestellten Bereich stimmen die Werte mit den an fluoreszieren-

dem F-Aktin gemessenen Werten für die Persistenzlänge von 17 μm gut überein. Die Theorie von Kroy et al. [3] passt für große Streuwinkel und kleine Konzentrationen offensichtlich sehr gut.

Für die weitere Diskussion der Messergebnisse sind die Punkte von Wichtigkeit, bei welchen die beiden unterschiedlichen Zerfallsmodelle ineinander übergehen. Da bisher für solche Übergänge keine formalen Modelle existieren, war das Vorgehen heuristisch. Es wurde versucht die experimentellen Daten mit beiden Modellen zu beschreiben.

4.3.4 Bestimmung der Übergangspunkte vom exponentiellen Zerfall zum logarithmischen Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktionen von F-Aktin

Für den Übergang vom gestreckt-exponentiellen Zerfall zum logarithmischen Zerfall, im folgenden als Übergangspunkt („crossover-point“) bezeichnet, wurden die Wendepunkte der experimentellen Intensitätskorrelationsfunktionen $\{g^{(2)}(\ln[t]) - 1\}$ auf einer logarithmischen Zeitachse über

$$\frac{\partial^2 g}{\partial(\ln(t))^2} = 0$$

definiert. Der Zeitpunkt dieses Überganges soll als Übergangszeit („crossover-time“) und der Wert der Korrelationsfunktion an dieser Stelle als Übergangsamplitude („crossover-amplitude“) bezeichnet werden. Eine Bestimmung der Übergangspunkte über die Schnittpunkte der Anpassungsfunktionen aus Abbildung 50 oben war aufgrund der großen Variationen im logarithmischen Teil der Anpassung nicht möglich.

Ermittelt wurden diese Punkte wie folgt:

Mit Hilfe der Software IGOR (Firma Wavemetrics, USA) wurde der Wendepunkt der experimentell ermittelten, normierten Intensitätskorrelationsfunktion als Funktion der logarithmierten Zeit über die 1. Ableitung nach dem Logarithmus der Zeit des gestreckt exponentiellen Zerfalls errechnet. Aus dem Minimum der 1. Ableitung des gestreckt exponentiellen Zerfalls wurde dann der Übergangspunkt abgelesen und in folgende Beziehungen eingesetzt.

Für die 2. Ableitung der Funktion

$$(g^{(2)} - 1) = a^2 \cdot \exp\left[-2\left(\frac{t}{t_0}\right)^{3/4}\right]$$

nach der Zeit t ergibt sich nach längerer, trivialer Rechnung für die Übergangzeiten der Wendepunkte t_{WP} :

$$t_{WP} = \left(\frac{1}{2}\right)^{4/3} \cdot t_0 \quad (61)$$

Für die Übergangzeiten ergaben sich die in Abbildung 55 gezeigten Werte:

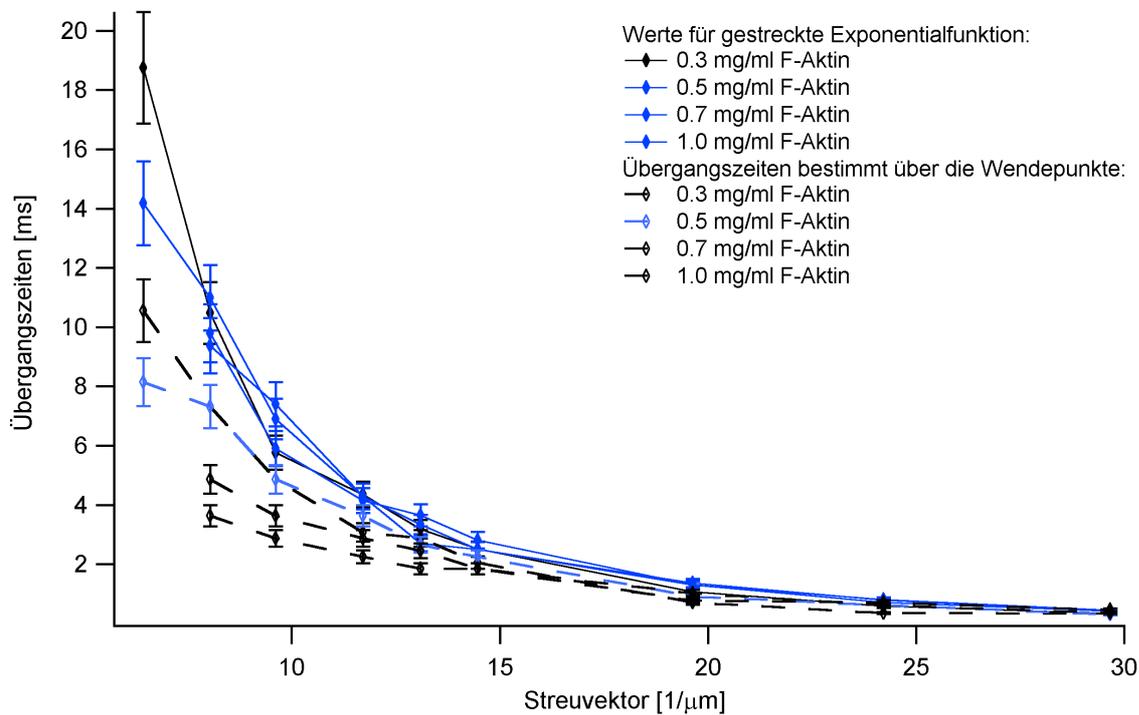


Abbildung 55: Vergleich der Übergangzeiten der gemessenen Kurven mit denen des gestreckt exponentiellen Anteils des Zerfalles

Man kann klar erkennen, dass bei kleinen Winkeln die beiden Zeiten auseinanderlaufen, wobei die Wendepunkte der experimentellen Daten immer bei größeren Werten liegen als die des gestreckt exponentiellen Anteils.

Für die Übergangsamplitude der gestreckten Exponentialfunktion gilt mit Gleichung 61:

$$g^{(2)}(t_{WP}) - 1 = \frac{a^2}{e}. \quad (62)$$

Der Parameter a bezeichnet hier den Schnittpunkt der gestreckten Exponentialfunktion mit der Ordinate. Da der theoretische Wert für diesen Schnittpunkt 1 ist [13], ergibt sich für den theoretischen Schnittpunkt ein Wert von $1/e$.

Für Übergangsamplituden ergaben sich die in Abbildung 56 gezeigten Werte:

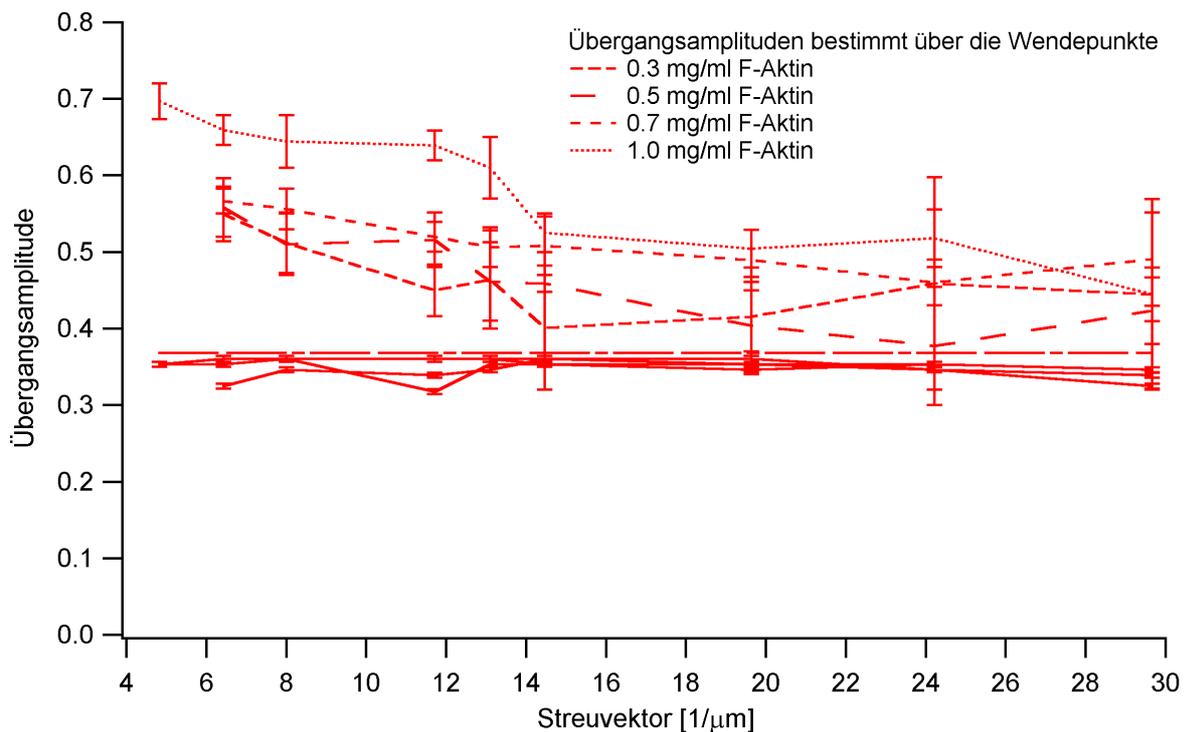


Abbildung 56: Experimentell ermittelte Übergangsamplituden und theoretischer Wert

Die oberen Kurven in Abbildung 56 zeigen die Übergangsamplituden aus den Anpassungen. Die unteren Kurven, welche sehr dicht zusammen liegen, ergeben sich aus Gleichung 62, zeigen also die Amplituden eines rein gestreckt exponentiellen Zerfalles. Ebenso eingezeichnet ist der theoretische Wert der Übergangsamplitude $1/e$. Wie deutlich zu erkennen ist, kann dieser Zerfallsbereich mit einer gestreckten Exponentialfunktion nicht beschrieben werden.

In Abbildung 50 b unten wird gezeigt, wie es zu diesen Unterschieden kommt:

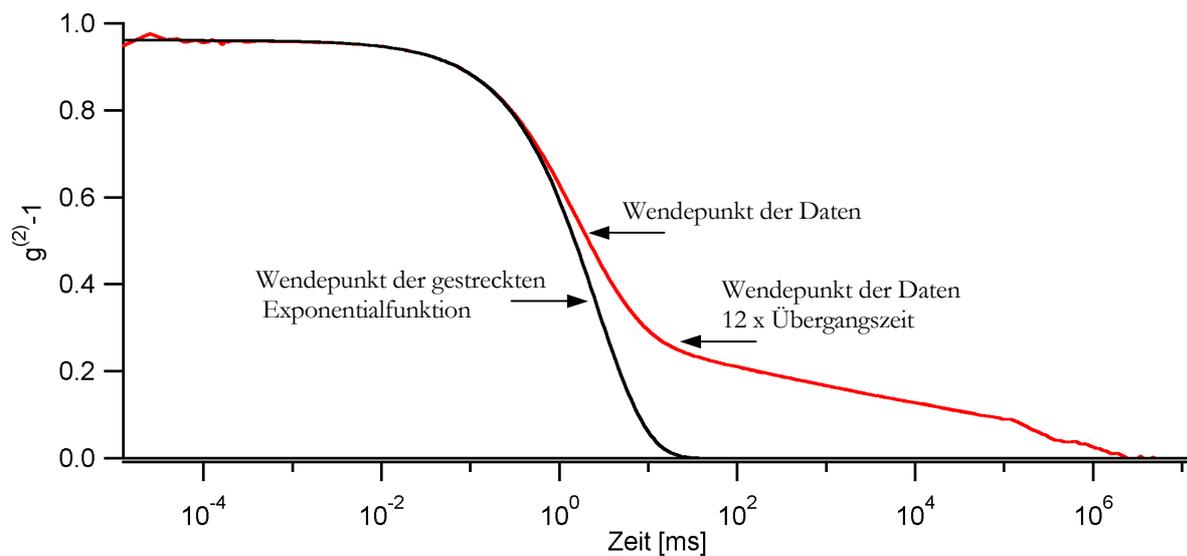


Abbildung 50b: Darstellung einer gestreckten Exponentialfunktion im Vergleich mit Messdaten

In Abbildung 50b oben wird eine reine gestreckte Exponentialfunktion mit den Daten verglichen. Man erkennt deutlich, dass in den Messdaten aufgrund des Ausläufers die Amplituden beim Wendepunkt höher ist und der Zeitpunkt früher. Daraus folgt, dass sich der Langzeiterfall mit kleinerem Streuvektor \mathbf{q} und höheren Konzentrationen immer deutlicher auswirkt..

Aufgrund des Verlaufes der Intensitätskorrelationsfunktionen in Abhängigkeit des Streuvektors \mathbf{q} und der Konzentration c , und der guten Übereinstimmung mit theoretischen Vorhersagen von Kroy et al., wird bis zum Übergangspunkt Einzelfilamentdynamik angenommen, nach der Beziehung:

$$A = \exp[-2q^2 z^2].$$

Es muss nun getestet werden, ob diese Gleichung die Daten beschreibt, d.h. die Frage, ob sich bei verschiedenen Streuvektoren q ein konsistentes z ergibt muss geklärt werden. Diese Auswertung macht nur dort Sinn, wo man den Daten klar kollektive Dynamik zuordnen kann, etwa bei der 12-fachen Übergangszeit.

Die Übergangsamplituden bei der 12-fachen Übergangszeit zeigt Abbildung 57 unten:

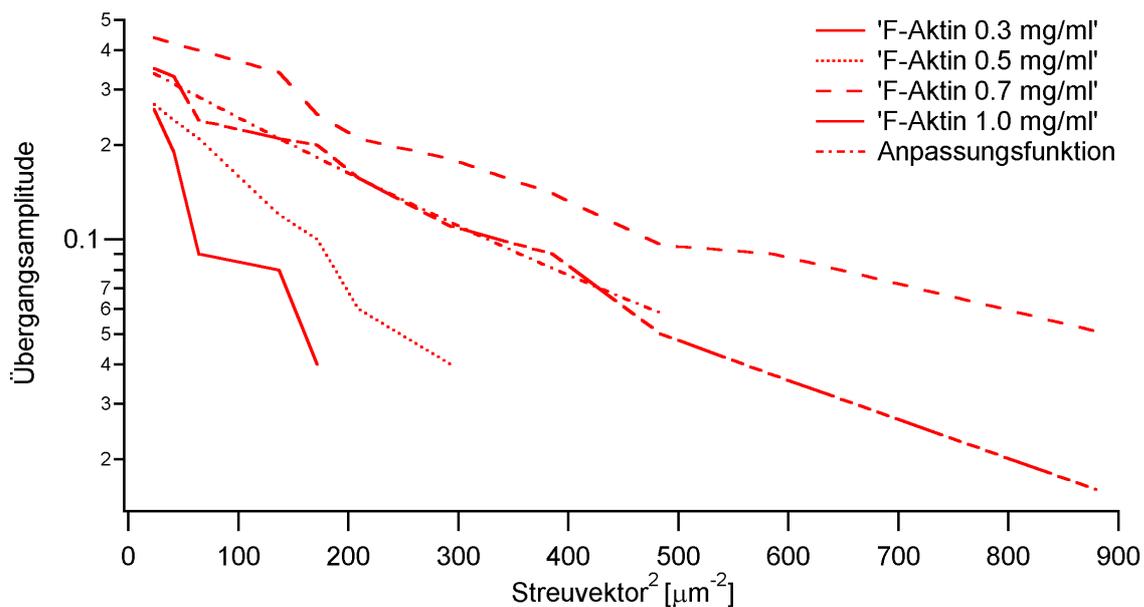


Abbildung 57: Die Übergangsamplituden bei der 12-fachen Übergangszeit

Die Lokalisierungslänge ergibt sich aus dem Anpassungsparameter z . sie beträgt für 1 mg/ml F-Aktin 44 nm. Bei 0.7 mg/ml F-Aktin beträgt der Anpassungsparameter z 48 nm, für 0.5 mg/ml 54 nm und für 0.3 mg/ml etwa 56 nm. Dies ist viel kleiner als der theoretisch vorhergesagte Wert von 270 nm. Die Anpassungsfunktion ist beispielhaft in Abbildung 57 eingezeichnet. Für die Konzentrationen 0.3 mg/ml und 0.5 mg/ml F-Aktin waren nur die Werte bei kleinen Streuwinkeln signifikant, wie aus obiger Diskussion und den Korrelationsfunktionen ersichtlich ist.

Dieser Befund wird wie folgt interpretiert:

Ab einer Auslenkungsamplitude z geht die Einzelfilamentdynamik in die viel langsamere Kontinuumsdynamik über. Auf der Zeitskala der Einzelfilamentdynamik beschreibt z in wieweit die Filamente lokalisiert sind, d.h. wann stoßen sie aneinander. Im einfachsten Modell würde man natürlich annehmen, dass alle Filamente in der gleichen mittleren Umgebung vorliegen. Die Lokalisierungs-

länge wäre dann natürlich durch die durch die halbe mittlere Maschenweite des Netzwerkes gegeben (die Maschenweite wäre der Durchmesser der Röhre, das Filament liegt in der Mitte, daher der Faktor 2). Dies ist offensichtlich im Widerspruch zu unseren Daten. Es folgt, dass die Inhomogenitäten des Netzwerkes (d.h. die Variation des Durchmessers der Röhre) sehr wichtig für die Dynamik der Filamente ist. Dies ist klar, denn wenn ein Punkt des Filaments eingeklemmt ist, können erst Punkte, welche eine Persistenzlänge weit weg liegen, sich wieder völlig frei bewegen. Alle Punkte die näher liegen spüren die Engstelle durch die mechanische Kopplung entlang des semiflexiblen Filaments und können nur geringere Schwingungsamplituden ausführen. Anders Ausgedrückt: relativ wenige Engstellen haben einen drastischen Effekt auf die Dynamik des Filaments.

Da wir die Größe z aus der Dynamik bestimmt haben, nennen wir sie die dynamische Lokalisierungslänge.

4.3.5 Interpretation des statischen Strukturfaktors

Wie aus den vorhergehenden Abschnitten eindeutig hervorgeht, lösen die Intensitätskorrelationsfunktionen zwei unterschiedliche Fluktuationen im Netzwerk auf: die Einzelfilamentdynamik und die kollektive Netzwerkdynamik.

Wie aus der Form des statischen Strukturfaktors aus Abbildung 41 hervorgeht, weist dieser Maxima auf, welche mit höherer F-Aktinkonzentration und kleinerem Streuwinkel ausgeprägter werden. Abbildung 41 soll hier zur besseren Übersicht noch mal gezeigt werden:

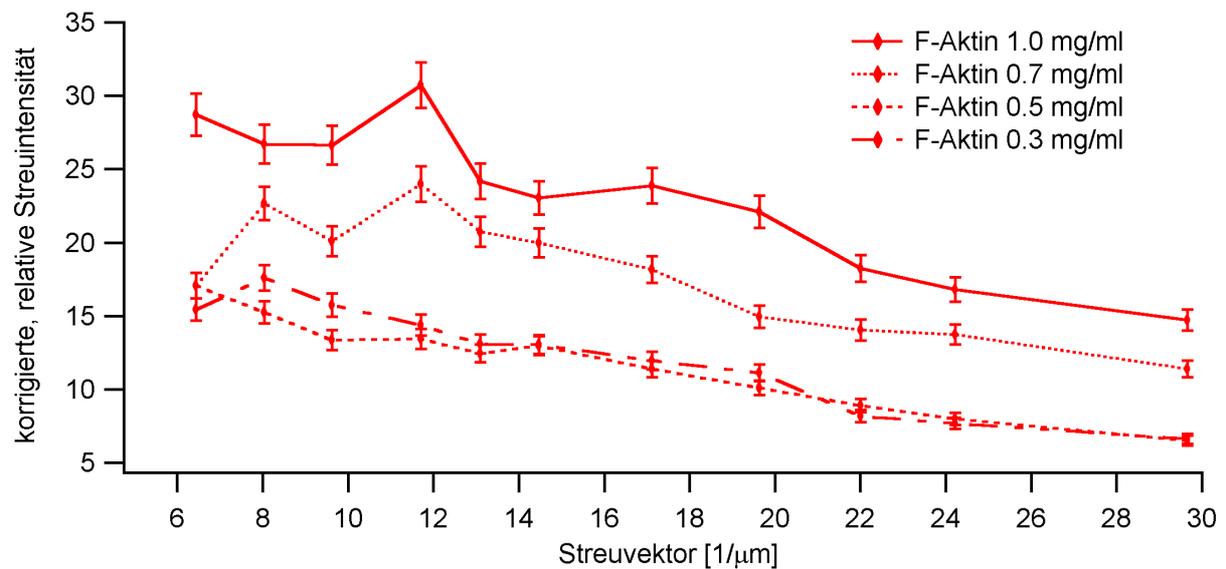


Abbildung 41b: Übersicht der korrigierten Streuintensitäten Aller F-Aktinkonzentrationen (Die Werte sind relativ zum Standard Toluol)

Abbildung 58 unten soll die charakteristischen Längen von F-Aktinfilamenten im Netzwerk darstellen:

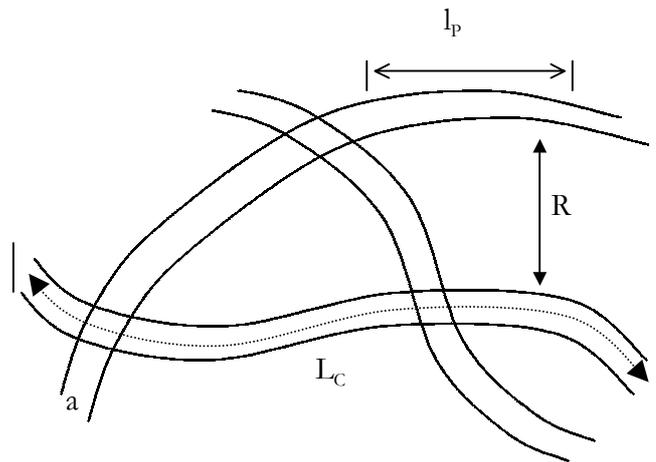


Abbildung 58: Die charakteristischen Längen von F-Aktin im Netzwerk

In Abbildung 58 bedeuten:

R: der mittlere Filamentabstand (Maschenweite des Netzwerkes)

l_p: Persistenzlänge

a: Filamentdicke

L_c: Konturlänge

Der mittlere Filamentabstand R ist in der Größenordnung der mittleren Maschenweite, wie aus Tabelle 5 hervorgeht. Die Persistenzlänge beträgt etwa 17 μm , wie oben erwähnt. Die Filamentdicke a beträgt etwa 9 nm, wie ebenfalls oben erwähnt. Die Konturlänge eines Filamentes beträgt mehrere 10 μm .

Die mittlere Maschenweite des Netzwerkes kann mit Hilfe von Gleichung 39 aus Abschnitt 1.5 abgeschätzt werden. In untenstehender Tabelle ist die so bestimmte mittlere Maschenweite für die verschiedenen untersuchten F-Aktinkonzentrationen tabelliert.

Konzentration F-Aktin	Mittlere Maschenweite [μm]
1.0 mg/ml	0.27
0.7 mg/ml	0.33
0.5 mg/ml	0.39
0.3 mg/ml	0.50

Tabelle 5: Die mittlere Maschenweite im Netzwerk

Aus Tabelle 5 und den Ergebnissen aus Abbildung 41 und 58 kann geschlossen werden, dass es sich bei den Maxima um die Detektion von konstruktiven Interferenzen zwischen verschiedenen Filamenten im Netzwerk handelt. Das Netzwerk hat somit eine Struktur, die Filamente beeinflussen sich gegenseitig. Die Nächstnachbar-Korrelationen werden für höhere F-Aktinkonzentrationen ausgeprägter.

Für ein isoliertes semiflexibles Polymer gilt nach [43] folgender statischer Strukturfaktor:

$$S(q) = \frac{\pi}{qa} - \frac{2}{q^2 a L_C} + \frac{2}{3q^2 a l_p}. \quad (63)$$

Nach dieser Beziehung kann es kein Maximum geben und weil darüber hinaus $S(q)$ linear mit der Konzentration verläuft, im Widerspruch zu den experimentellen Ergebnissen, wie die Abbildungen 41 und 58 oben zeigen. Aus der Annahme unabhängiger Streuer folgt die lineare Abhängigkeit von $S(q)$ von der Konzentration. Dies ist nicht gegeben, daraus folgt, dass es sich nicht um unabhängige Streuer handeln kann.

Da die F-Aktinlösungen eine ungeordnete Materie darstellen, gibt es keine höheren Bragg-Maxima. Für ein Maximum im statischen Strukturfaktor bleibt als einzige charakteristische Größe des Netzwerks, die zu diesen Maxima führen kann, die Maschenweite R . Es gibt eine flüssigkeitsartige Nächstnachbar-Korrelation. Dies wurde nicht erwartet.

Setzt man in diese Beziehung die Werte für a und den Streuvektor \mathbf{q} ein, so ergeben sich für das Produkt $\mathbf{q} \cdot \mathbf{a}$ Werte zwischen 0.045 – 0.27. Für das Produkt $3 \cdot \mathbf{q}^2 \cdot a \cdot l_p$ ergeben sich Werte zwischen 0.255 – 1.53. Der erste Term in Gleichung 63 dominiert somit.

4.4 Abschließende Betrachtungen

Die wichtigsten Ergebnisse sind:

- beim Zerfall der Intensitätskorrelationsfunktion müssen flüssigkeitsartige Nächste-Nachbarkorrelationen berücksichtigt werden
- bei kurzen Korrelationszeiten kann der Zerfall mit der Einzelfilamentdynamik gut beschrieben werden. Nachfolgend tritt jedoch eine extrem langsame Dynamik im Zerfall der Intensitätskorrelation auf
- die Einzelfilamentdynamik reicht nur bis zu Amplituden, die viel kleiner sind als die mittleren Abstände zwischen den benachbarten Filamenten.

Mit den bisherigen Modellen für semiflexible Polymere können die kollektiven Netzwerkfluktuationen und die Ausbildung einer Struktur im Netzwerk nicht beschrieben werden.

Erste Lösungsansätze liefert das Reptationsmodell von De Gennes und Edwards [41]. Hier stellt man sich das Polymer als flexible Kette, eingebettet in eine Röhre ohne endlicher Persistenzlänge vor. Dieses Modell passt aber für semiflexible Polymere nicht, da ein Polymer mit einer Persistenzlänge von $17\ \mu\text{m}$, welches sich in einem Netzwerk mit einer mittleren Maschenweite von $276 - 500\ \text{nm}$, also viel kleiner als die Persistenzlänge, nicht unendlich flexibel an eine Röhre anpassen kann. Andere Techniken, wie z. B. die Mikrorheologie, vgl. Dichtl et al. [44] zeigen die gleichen Resultate.

Für semiflexible Polymere fehlt ein Modell das den Übergang von Einzelfilament- zum Kontinuumsverhalten beschreibt.

Ein solches Modell müsste einerseits die Ausbildung von Positionskorrelationen im Netzwerk behandeln, andererseits die Dynamik des Filaments in dieser Struktur beschreiben. Im Reptationsmodell sind folgende Annahmen über die Struktur des Netzwerks fundamental.

-
- das einzelne Polymer ist eine ideale Kette
 - die Reptationsröhre stellt wieder eine ideale Kette dar

Bei der Betrachtung der Dynamik der Kette darf die Annahme nicht gemacht werden, dass die dynamische Lokalisierungslänge dem mittleren Abstand der Filamente entspricht. Vielmehr muss die thermische Fluktuation eines semiflexiblen Filaments in einer inhomogenen Umgebung behandelt werden (d. h. der Durchmesser der Reptationsröhre ist variabel).

A 1: GOLDLABELING VON F-AKTIN

A 1.0 Einleitung

Mit Nanogoldpartikeln steht eine sehr gute Möglichkeit zur Verfügung, filamentöses Kaninchen-Aktin für Lichtstreuexperimente zu markieren. Die Vorteile einer solchen Markierung bestehen darin, durch einzelne markierte Aktinfilamente in einem dichten Netzwerk unmarkierter Filamente echte inkoärente Streuung zu messen. Somit könnte man die Eigenschaften des Einzelpolymers von den Netzwerkeigenschaften trennen. Die Einzelfilamentbewegung kann so mit einem wesentlich besseren Signal-Rausch-Verhältnis aufgelöst werden. Zu beachten ist jedoch, dass Gold einen Teil der Leistung des einfallenden Laserlichtes absorbiert. Daraus ergibt sich eine lokale Erwärmung der Goldpartikel, die sich auf die Aktinfilamente überträgt und diese während der Messung zerstört. Man muss deshalb in allen Experimenten darauf achten, Wellenlängen in Bereichen zu verwenden, in denen die Absorption von Gold vernachlässigt werden kann. Zu empfehlen ist die 632 nm Linie eines HeNe-Lasers. Die in diesen Lichtstreuexperimenten verwendete Wellenlänge von 488 nm eines Argon-Ionen-Lasers reichte trotz Strahlabschwächung aus, die Aktinfilamente durch lokale Erwärmung zu denaturieren. Die hier entwickelte Präparation könnte für entsprechend veränderte Lichtstreuapparate (Lichtwellenlänge im roten Bereich) wertvolle Möglichkeiten bieten. Detaillierte Angaben zur Herstellung und zu Bindungseigenschaften des Nanogoldes findet man in [36]. In unten stehender Tabelle A1 [37] ist die Absorption von Mono-Sulfo-NHS-Nanogold® der Firma Nanoprobes bei verschiedenen Wellenlängen gegeben.

Wellenlänge	Absorbtion in %
280 nm	0.4200
350 nm	0.2437
420 nm	0.1589
500 nm	0.1058
800 nm	0.0145

Tabelle A1: Absorption einer Isopropanol/Wasser Lösung (20%) mit 1 μ M NHS-Nanogold

A 1.1 Material und Methoden

A 1.1.1 Geräte:

Zur Markierung von Kaninchen F-Aktin mit Mono-Sulfo-NHS-Nanogold werden folgende Geräte benötigt:

Säulen:

SUPERDEX 75	Pharmacia
Sephadex G25 M	Pharmacia

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge L7-55	Beckman
-----------------------	---------

Rotoren:

Ti 50	Beckmann
-------	----------

Sonstige Geräte:

FPLC LCL-500	Pharmacia
Spektralphotometer Ultraspec III	Pharmacia
UV-Detektor UV-1	Pharmacia
Schreiber REC-1	Pharmacia
Fraktionssammler RediFrac	Pharmacia
Peristaltische Pumpe P-1	Pharmacia
pH-Meter	WTW
Elektrophorese- und Protein-Transfer-Kammern	Eigenanfertigung
Rührer/Heizplatte Ikamag RCT	Ika
Vortex	Cenco
Pipetten 10, 20, 200 und 1000 µl	Eppendorf
Quarzküvetten QS	Hellma
Gradientenmischer	Eigenanfertigung
Superloop	Pharmacia
Absorptionsspektrometer	Perkin Elmer
Reinstwasseranlage	Millipore
Zentrifugenröhrchen	Beckmann

A 1.1.2 Reagenzien und Standards:

Soweit nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Laborchemikalien von Sigma und hatten den Reinheitsgrad *p.a.* .

Reagenzien

Ascorbinsäure	Sigma
ATP (Adenintriphosphat)	Sigma
Acrylamid	National Diagnostics
Agarose (Seakem ME)	Biozym
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
DEAE-Cellulose	Whatman
Essigsäure	Riedel-de-Haën
Ethanol	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
HEPES	Sigma
SDS (sodiumdodecylsulfate)	Roth
TEMED	Serva
Tricine	Sigma

Protein-Größen-Marker

“Low” Protein-Standard, bestehend aus Phosphorylase b (97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (31 kDa), Trypsininhibitor (21,5 kDa) und Lysozym (14,4 kDa)

Goldmarker:

2025 A Mono-NHS-Nanogold[®] (NHSNA) 30 nmol in 5 Ampullen Nanoprobes, Inc.

A 1.1.3 Puffer und andere Lösungen:

Alle verwendeten Puffer werden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert wurde.

Puffer:

G-Puffer2:

20 mM HEPES pH 7.5
0,2 mM Ascorbinsäure
0,1 mM ATP
0,1 mM CaCl₂
0,005% NaN₃

10x F-Puffer2:

20 mM HEPES pH 7.5
0,2 mM Ascorbinsäure
0,1 mM ATP
1 M KCl
20 mM MgCl₂
0,1 mM CaCl₂
0,005% NaN₃

G-Puffer:

20 mM HEPES pH 7.5
0,2 mM DTT
0,1 mM ATP
0,1 mM CaCl₂
0,005% NaN₃

10x F-Puffer:

20 mM HEPES pH 7.5
0,2 mM DTT
0,1 mM ATP
1 M KCl
20 mM MgCl₂
0,1 mM CaCl₂
0,005% NaN₃

F-Puffer2:

20 mM HEPES pH 7.5
0,2 mM Ascorbinsäure
0,1 mM ATP
0,1 M KCl
2 mM MgCl₂
0,1 mM CaCl₂
0,005% NaN₃

10 x Laufpuffer:

250 mM Tris
1,9 M Tricine
1 % SDS

3 x SDS-Probenpuffer:

200 mM Tris-HCl, pH 6,8
6,7 % SDS
12 % (v/v) Glycerin

Nach Einstellung des pH-Wertes erfolgt die Zugabe von ca. 10 mg Coomassie-Brilliant-Blue R-250.

Silberlösung:

2013 LI-Silberlösung (2 Komponenten)

Nanoprobes, Inc.

A 1.1.4 Verbrauchsmaterial:

Dialyseschlauch VISKING
Reaktionsgefäße 1.0, 1.5 ml
Skalpellschlingen Typ 11
Sterilfilter

Roth
Eppendorf
Bayha
Millipore

A 1.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese („SDS-PAGE“):

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) werden Trenngele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 10% und 3%ige Sammelgele gegossen.

Diese Minigele (10 x 8 x 0,05 cm) werden in einer Gießkammer mit konstanter Polyacrylamid-Konzentration gegossen.

A 1.1.6 Trenngele konstanter Polyacrylamid-Konzentration:

Hier fanden ausschließlich 10% SDS-PAGE Gele Verwendung.

10 % Acrylamidlösung:

375 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,1 % SDS
10 % Acrylamid, (10/37,5) % Methylenbisacrylamid
10 mM EDTA
0,05 % APS
0,04 % (v/v) TEMED

Sammelgel:

125 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1 % SDS
3 % Acrylamid
10 mM EDTA
0,3 % APS
0,05 % (v/v) TEMED

A 1.1.7 Protein:

Es wurde Aktin aus Kaninchenmuskel nach der Methode von Spudich und Watt [31] von Frau Rusp präpariert.

A 1.1.8 Anfärbung des Proteins:

A 1.1.7.1 Anfärbung mit Coomassie-Blau:

In der Regel erfolgt der Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen durch Färbung mit Coomassie-Blau-Lösung für 10-30 min. Anschließend wird das Gel für 30 min bis mehrere Stunden in Entfärbelösung oder Reinstwasser geschüttelt.

Coomassie-Blau-Lösung:

45 % Ethanol
10 % Essigsäure
0,25 % Coomassie-Brillant-Blau

Die Lösung wird durch einen Faltenfilter, z.B. Kaffeefilter, filtriert.

Entfärberlösung:

10 % Ethanol 250 ml
10 % Essigsäure 100 ml
ad. 1000 ml Reinstwasser

A 1.1.7.2 Silberfärbung:

Eine hochempfindliche Methode zur Anfärbung von Nanogoldmarkierten Proteinen in SDS-Gelen ist das Färben mit LI-Silber®. Dazu wird das Gel für die angegebenen Zeiten in folgenden Lösungen (je 50 ml) geschüttelt [38]:

Anmerkung: Die Standardmethode nach Heukeshoven und Dernicke, darf nicht angewendet werden.

Färbeschritte	Zeitdauer	Lösung
1. Waschen	3x20 min	Reinstwasser
2. Anfärben & Entwickeln	5-10 min	LI-Silber (Lösung A+B)
3. Stoppen	10-20 min	Reinstwasser

Die gefärbten Gele (auch Coomassie-gefärbte) können zur Aufbewahrung getrocknet werden, indem sie 2 x 20 min in Geltrockenpuffer (25 % Ethanol/5 % Glycerin) äquilibriert und unter Luftabschluss erwärmt werden.

A 1.1.8 Trocknen von Proteingelen:

Das Gel wird für 20 min in Geltrockenpuffer geschwenkt und dann luftblasenfrei zwischen eine Cellophanfolie und ein Nitrozelluloseblättchen gelegt. Die Cellophanfolie wird zuvor in Geltrockenpuffer eingeweicht.

Geltrockenpuffer:

5% Glycerin

20% Ethanol

in Reinstwasser

A 1.2 Markierung von Kaninchen F-Aktin mit Mono-Sulfo-NHS-Nanogold

Die nachstehend beschriebene Vorgehensweise der Goldmarkierung erwies sich als streng reproduzierbar. Die Ergebnisse und Ausbeuten waren stets zufriedenstellend. Das verwendete Aktin war nicht länger als eine Woche bei -70°C gelagert und das Nanogold nicht älter als einen Monat.

Nach zügigem Auftauen wird das Aktin vor der weiteren Verwendung einem Reinigungsschritt unterzogen. Dazu wird es zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur polymerisiert, dann für 2 Stunden bei 4°C und 180.000 g zentrifugiert, das Pellet anschließend in G-Puffer resuspendiert und für 48 Stunden in G-Puffer bei 4°C zur Depolymerisation umdialysiert. Es schließt sich dann ein Zentrifugationsschritt des Dialysats für 2 Stunden bei 180.000 g und 4°C an. Der Überstand dieser Ultrazentrifugation wird weiterverwendet.

Zur Markierung sollte das F-Aktin möglichst konzentriert vorliegen, da durch die beiden enthaltenen Gelfiltrationsschritte die Probe stark verdünnt wird. Das wie oben beschrieben gereinigte Aktin wird als G-Aktin mit Hilfe einer Sephadex G25 M Säule entsalzt. Dieser Schritt ist notwendig, um das im G-Puffer enthaltene DTT zu entfernen. Das DTT zerstört die Aktivestergruppe an den Nanogoldpartikeln, so dass eine Markierung des Aktins nicht mehr möglich ist. Zuvor wird die Säule mit G-Puffer gründlich, d.h. mit dem 5 -10-fachen Säulenvolumen, äquilibriert und gespült. Der schematische Aufbau dieses Schrittes ist in Abbildung A1 dargestellt. Das G-Aktin wird vorsichtig, ohne das Säulenmaterial aufzuwirbeln, auf die Säule Sephadex G25 M pipettiert.

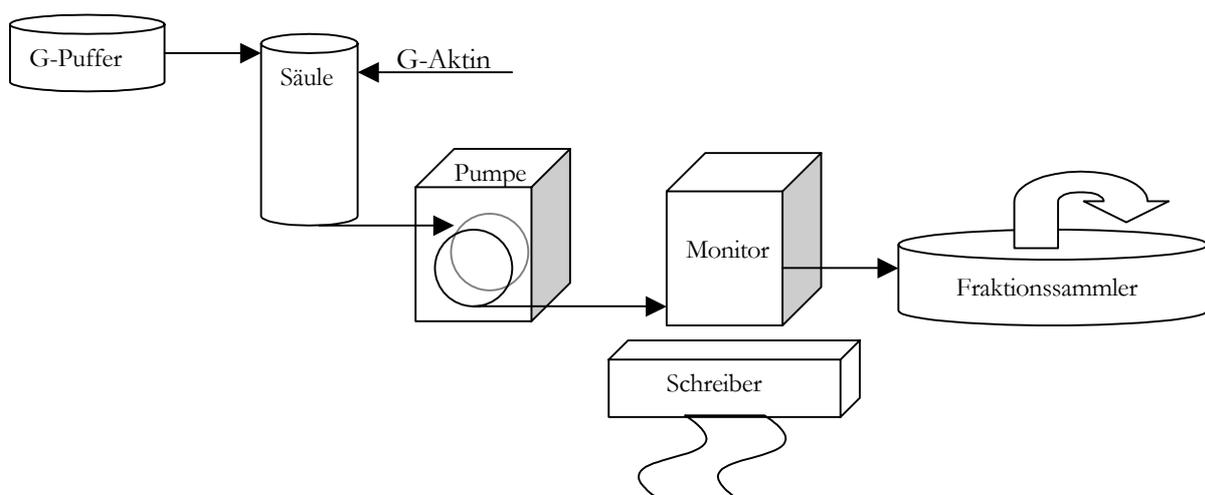


Abbildung A1: Der schematische Aufbau der Aktinentsalzung;

Abbildung A2 zeigt das Elutionsprofil (UV-Absorption bei 280 nm) der Sephadex G25 M Säule im Entsalzungsschritt. Ganz oben sind die Fraktionsnummern gezeigt.

Einstellungen der Anlage:

Aufgetragenes Volumen: 1 ml
Aktinkonzentration am Anfang: 1 mg/ml
Fraktionsgröße: 1.5 ml
Elutionsgeschwindigkeit: 0.5 ml/min

Schreibereinstellung:

Empfindlichkeit: 10 mV
Geschwindigkeit: 5 mm/min

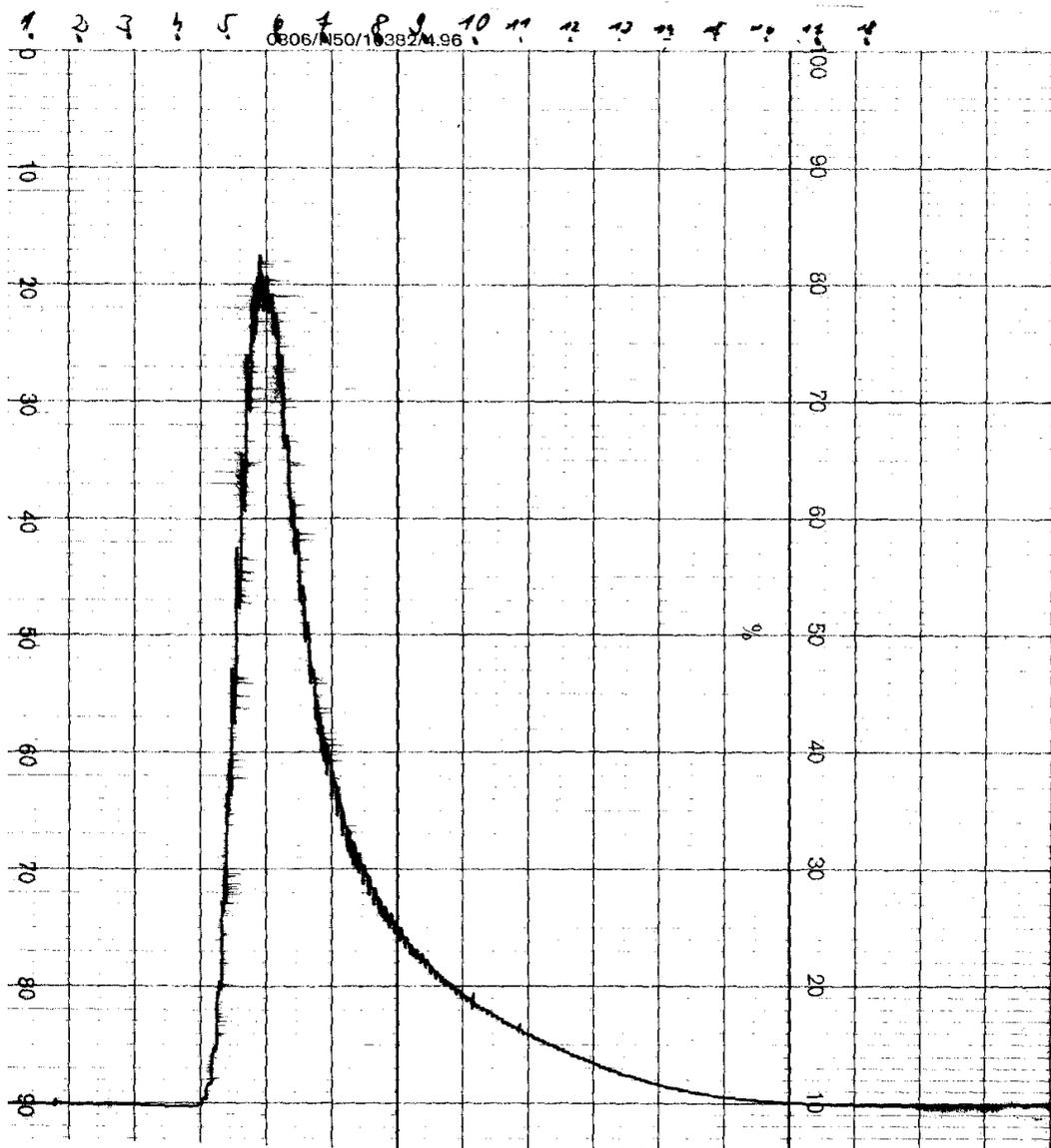


Abbildung A2: Elutionsprofil der Sephadex G25 M Säule im Entsalzungsschritt

Von allen Fraktionen des Entsalzungsschrittes wird ein Coomassie-SDS-Page-Gel angefertigt, wie in Abbildung A3 gezeigt; A ist der Säulenauftrag, das Protein im Salzpuffer:

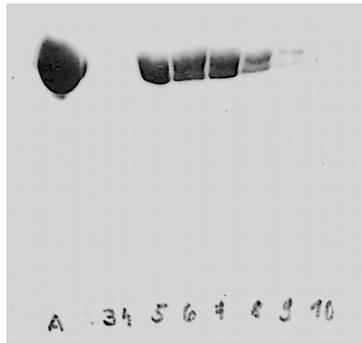


Abbildung A3: Coomassie-SDS-Page-Gel der Fraktionen 3-14

Die Fraktionen 5 mit 8 werden gesammelt. Da die Säule nur eine begrenzte Kapazität besitzt, müssen größere Volumina als 1 ml und höhere Aktinkonzentrationen als 1mg/ml nacheinander entsalzt werden. Die nacheinander entsalzten und zur weiteren Verwendung vorgesehenen Fraktionen werden am Ende gesammelt. Mit dem entsprechenden Volumen 10xF-Puffer2 wird die Polymerisation des entsalzten G-Aktins für 2 Stunden bei Raumtemperatur (25°C) initiiert.

Um das F-Aktin anzukonzentrieren schließt sich eine Ultrazentrifugation bei ca. 180.000 g für 2 Stunden an. Dieser Schritt ist unbedingt notwendig, um eine möglichst effiziente Markierung zu erreichen. Auch das Ergebnis des unten beschriebenen Trennschrittes wird dadurch wesentlich beeinflusst. Das Pellet dieser Zentrifugation wird in entsprechend kleinerem Volumen (400µl) F-Puffer2 gründlich resuspendiert und damit gleichzeitig ankonzentriert. Das Resuspensionsvolumen errechnet sich aus dem gewünschten Endvolumen, abzüglich des Volumens, das zur Aktivierung des Nanogoldes gebraucht wird. Das Endvolumen sollte etwa 1 ml betragen und die Aktinkonzentration mindestens 36 µM betragen.

Zur Markierung von 36 µM F-Aktin werden 3 Ampullen zu je 6 nmol Nanogold in jeweils 200µl Reinstwasser aktiviert und sofort zum F-Aktin gegeben. Das Gesamtvolumen der Lösung beträgt jetzt 1 ml. Die Lösung wird kurz gevortext. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Am nächsten

Tag wird die Depolymerisation des markierten F-Aktins mit einer 48 Stunden-Dialyse in G-Puffer2 eingeleitet.

Gleichzeitig wird eine FPLC und eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule vorbereitet. Der folgende Gelfiltrationsschritt ist notwendig, um freies Gold aus der Lösung zu entfernen. Die Säule muss vorher gründlich mit G-Puffer2 gespült werden. Danach wird eine 1 ml Superloop mit der Probe gefüllt, die Säule geladen und der Trennvorgang gestartet. Abbildung A4 zeigt den schematischen Aufbau:

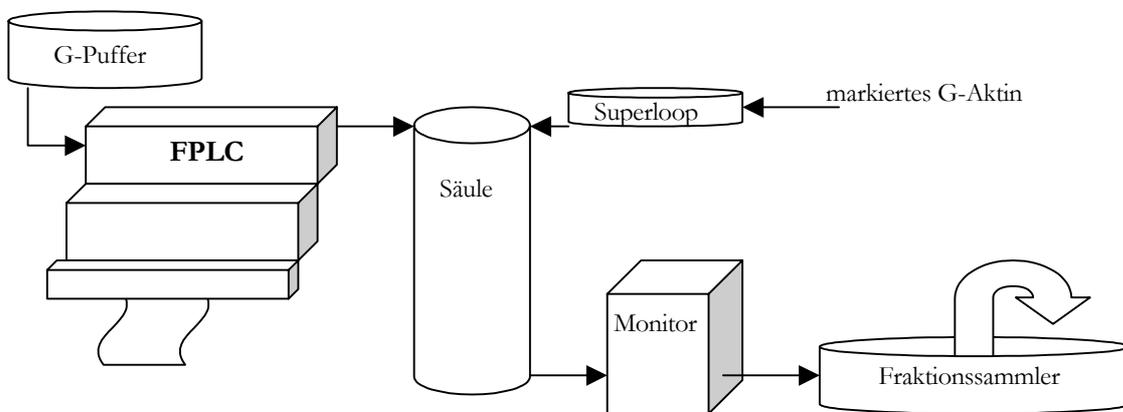


Abbildung A4: Schematischer Aufbau des FPLC-Trennschrittes:

Abbildung A5 zeigt das Elutionsprofil der Superdex 75 Gelfiltration. Sehr gut zu erkennen sind die beiden Peaks, welche dem markierten G-Aktin (1.Maximum) und dem freien Nanogold (2.Maximum) zugeordnet werden. Der negative Ausläufer und die kleineren Extrema am Ende des Elutionsprofiles werden auf die Entsalzung, insbesondere den Verlust von ATP, zurückgeführt.

FPLC-Einstellungen:

Fraktionsvolumen: 1 ml; Schreiberempfindlichkeit: 100 mV

Elutionsgeschwindigkeit: 0,4 ml/min; Schreibergeschwindigkeit: 0,2 cm/s

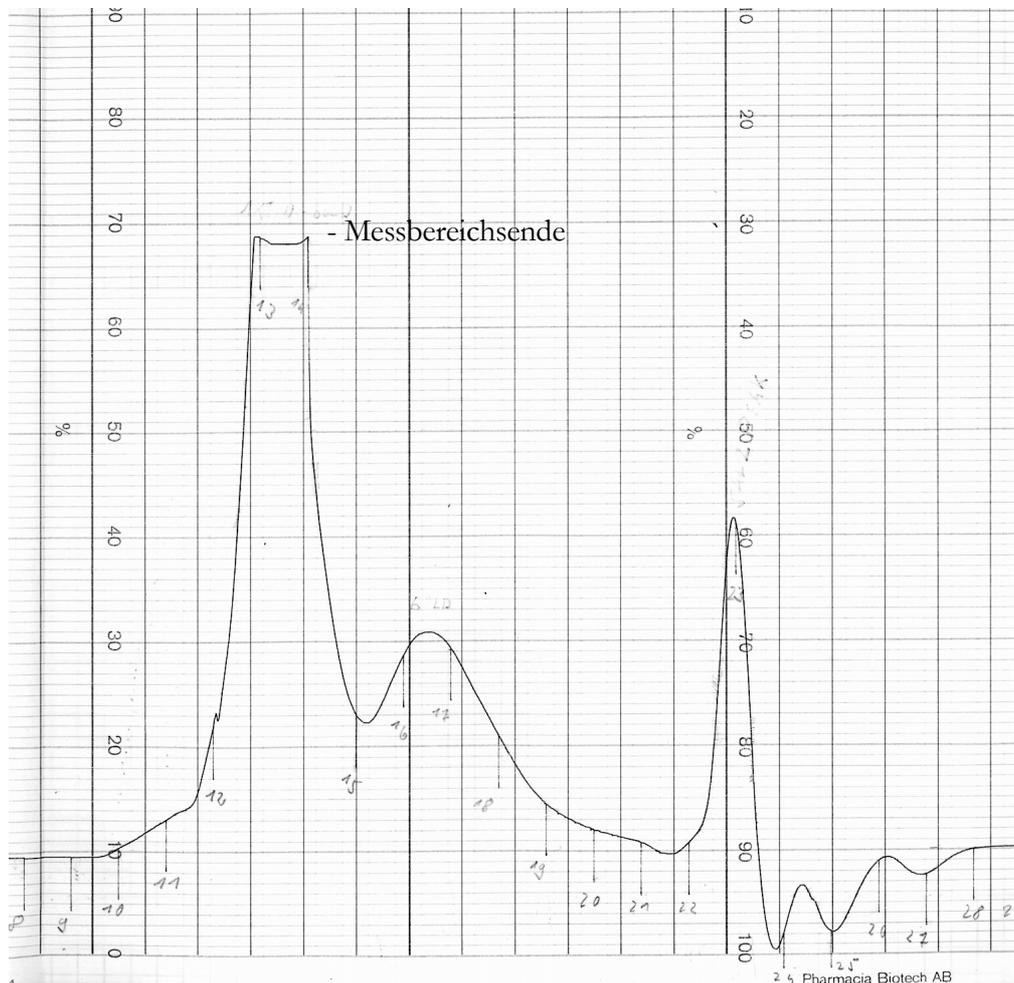


Abbildung A5: Elutionsprofil der Superdex 75 Gelfiltration

Von den Fraktionen 10 mit 19 wird ein 10% SDS-Coomassie-Gel und ein 10 % SDS LI-Silver-Gel unter nichtreduzierenden Bedingungen, mit Tricin als Laufpuffer angefertigt. Hier ist speziell zu beachten, dass der angefärbte Nanogold-Aktin-Komplex vor dem Befüllen der Geltaschen nicht erhitzt werden darf, da sonst die Bindung Nanogold-Aktin zerstört wird und insbesondere im Silbergel nicht mehr sichtbar gemacht werden kann. Das Coomassie-Gel gibt Klarheit darüber, in welchen Fraktionen Aktin enthalten ist, wie in Abbildung A6 zu sehen.

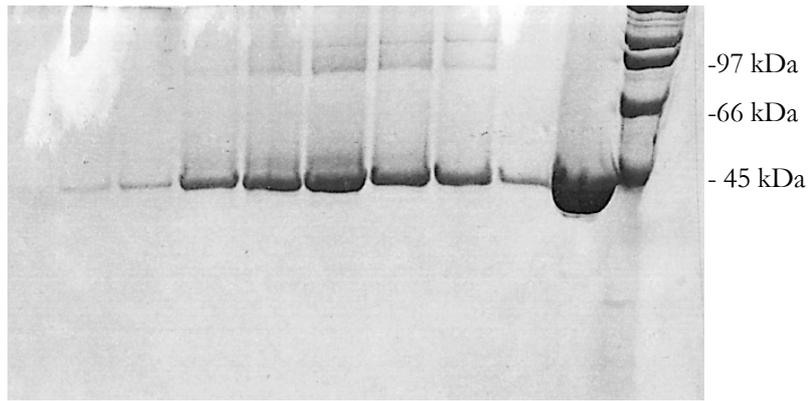


Abbildung A6: 10% SDS-Coomassie-Gel der Fraktionen 11 mit 18 von links nach rechts (ganz rechts: Proteinmarker gefolgt vom Säulenauftrag)

Schön zu erkennen sind in Abbildung A7 die Doppelbanden von markiertem (obere Bande) und unmarkiertem (untere Bande) Aktin. Der Unterschied der Banden beruht auf unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen markiertem und unmarkiertem Aktin. Die Differenz beträgt etwa 15 kD, dies entspricht dem Molekulargewicht des Nanogoldes. Abbildung A6 zeigt das 10% SDS-LI-Silbergel. Der obere Pfeil zeigt das unmarkierte Protein, der untere das markierte Protein.

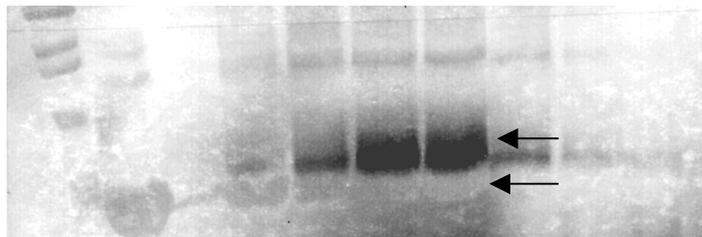


Abbildung A7: 10% SDS-LI-Silbergel der Fraktionen der Superdex 75 Gelfiltration von rechts nach links: Marker, Säulenauftrag, Fraktionen 11 mit 18

A 1.3 Bestimmung des Anteils an markiertem G-Aktin in den Fraktionen der Superdex 75 Gelfiltration

In diesem Abschnitt wird kurz die Vorgehensweise erläutert, mit welcher man die Konzentration an markiertem Protein in einer Lösung mit unmarkiertem Protein bestimmen kann. Ausführlichere Informationen findet man in [38]. Folgende Beziehungen werden benötigt:

$$PK = \frac{\epsilon_{Gold(420nm)} \times Abs_{(280nm)} - \epsilon_{Gold(280nm)} \times Abs_{(420nm)}}{\epsilon_{Protein(280nm)} \times \epsilon_{Gold(420nm)}} \quad (\text{Gl. A 1.1})$$

$$GMK = \frac{Abs_{(420nm)}}{\epsilon_{Gold(420nm)}} \quad (\text{Gl. A1.2})$$

$$R = \frac{\epsilon_{Protein(280nm)} \times Abs_{(420nm)}}{\epsilon_{Gold(420nm)} \times Abs_{(280nm)} - \epsilon_{Gold(280nm)} \times Abs_{(420nm)}} \quad (\text{Gl. A1.3})$$

Hier bedeutet:

- PK: Proteinkonzentration
GMK: markierende Nanogoldkonzentration
R: Markierungsrate
Abs_(280nm): Absorption der Probe bei 280 nm
 $\epsilon_{Gold(280nm)}$: Extinktionskoeffizient von Gold bei 280 nm

Aus [36] können die Werte des Extinktionskoeffizienten entnommen werden. Zur besseren Übersicht sind die Konstanten tabellarisch aufgeführt:

Extinktionskoeffizient:	Aktin bei 280 nm	Gold bei 280 nm	Gold bei 420 nm
ϵ in 1/Mcm	$2.64 \cdot 10^4$	$2.3 \cdot 10^5$	$1.1 \cdot 10^5$

Tabelle TA1: Die Extinktionskoeffizienten von Aktin und Gold

A 1.4 Ergebnisse

In diesem Experiment wurden die Fraktionen 11 mit 19 der FPLC-Gelfiltration aus Abbildung A7 einer Absorptionmessung bei 290 nm und 420 nm in Quarzglasküvetten unterzogen. Die Messung erfolgte bei 290 nm, weil sich im Puffer ATP befand, der bei einer Wellenlänge von 280 nm ebenso absorbiert, was eine Unterscheidung zum Protein unmöglich macht. Bei 420 nm tritt dieser Effekt nicht auf. Der so entstehende Fehler in der Konzentrationsbestimmung ist vernachlässigbar. Die Ergebnisse zeigt untenstehende Tabelle TA2:

Fraktion Nr.:	Absorption bei 290 nm in 1/Mcm	Absorption bei 420 nm in 1/Mcm
11	0.23	0.05
12	0.55	0.16
13	0.89	0.26
14	0.66	0.2
15	0.32	0.13
16	0.4	0.22
17	0.45	0.25
18	0.29	0.17
19	0.13	0.08

Tabelle TA2: Ergebnisse der Absorptionmessung der Fraktionen 11 mit 19

Die zu markierende Aktinkonzentration betrug etwa 1,5 mg/ml das entspricht einer Teilchenkonzentration von etwa 36 μM Aktin. Die Stoffmenge an Nanogold in 3 Ampullen beträgt 18 nmol, das entspricht einer Teilchenkonzentration von 18 μM .

Wie aus dem 10% SDS-Coomassie-Gel in Abbildung A6 zu erkennen ist, enthalten die Fraktionen 17 mit 19 kaum Aktin. Daraus lässt sich ableiten, dass die Werte für die Absorption in diesen Fraktionen von freiem Nanogold in der Lösung resultieren. Dies stimmt auch mit dem Elutionsprofil der Superdex 75 Gelfiltration aus Abbildung A4 überein. Aus den Fraktionen 11 mit 15 hingegen ist im 10% LI-Silbergel deutlich die Doppelbande von markiertem und unmarkiertem Aktin erkennbar, wie aus Abbildung A7 folgt. Zur Berechnung der Markierungsrate werden nur diese Fraktionen verwendet. Durch Anwendung der Gleichungen A 1.1 mit A 1.3 auf die Ergebnisse aus Tabelle TA2 ergeben sich für die Markierungsrate, die markierende Nanogoldkonzentration und die Proteinkonzentration folgende Werte:

Fraktion Nr.:	Markierende Nanogoldkonzentration GMK in μM	Proteinkonzentration (Aktin) in μM	Markierungsrate R in %
11	0.45	4.75	9.4
12	1.45	2.93	49.5
13	2.3	13.1	17.6
14	1.82	9.17	19.8
15	1.18	0.65	(60)

Tabelle TA3: Ergebnisse für die Markierungsrate in den Fraktionen 11 mit 15

In den Fraktionen 12 mit 14 ist die Markierungsrate R am größten, wie man auch aus Abbildung A7 gut erkennen kann. Die Summe der markierenden Nanogoldkonzentrationen aus Fraktion 11 mit 14 ergibt einen Wert von $6 \mu\text{M}$. Die eingesetzte Nanogoldkonzentration betrug $18 \mu\text{M}$, daraus ergibt sich eine Effizienz von 30%. Bei Berechnung der Werte für die Proteinkonzentration und der markierenden Nanogoldkonzentration ergibt sich für Fraktion 15 ein höherer Wert an Nanogold als an Aktin. Dies bedeutet, dass bereits in dieser Fraktion freies Nanogold enthalten ist. An ein Aktinmolekül kann nur ein Nanogoldpartikel binden, da das Aktin für den Aktivester als Verbindungsglied nur eine Bindungsstelle besitzt. Für die weiteren Experimente werden deshalb nur die Fraktionen 11 mit 14 verwendet. Zur besseren Veranschaulichung ist Tabelle TA3 graphisch dargestellt.

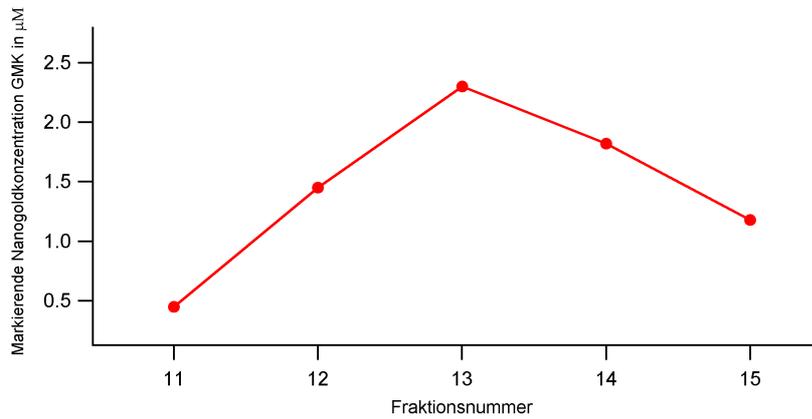


Abbildung A8: Markierende Nanogoldkonzentration GMK in den Fraktionen 11 mit 15

Die markierende Nanogoldkonzentration hat in Fraktion 13 ihr Maximum mit $2.3 \mu\text{M}$, wie in Abbildung A 8 zu sehen ist. Die Aktinkonzentration hat hier ebenfalls mit $13.1 \mu\text{M}$ ein Maximum. Der Anteil an markiertem Protein in dieser Fraktion beträgt also 17.6% . Den Betrag der Aktinkonzentration in den Fraktionen 11 mit 15 zeigt Abbildung A9 unten:

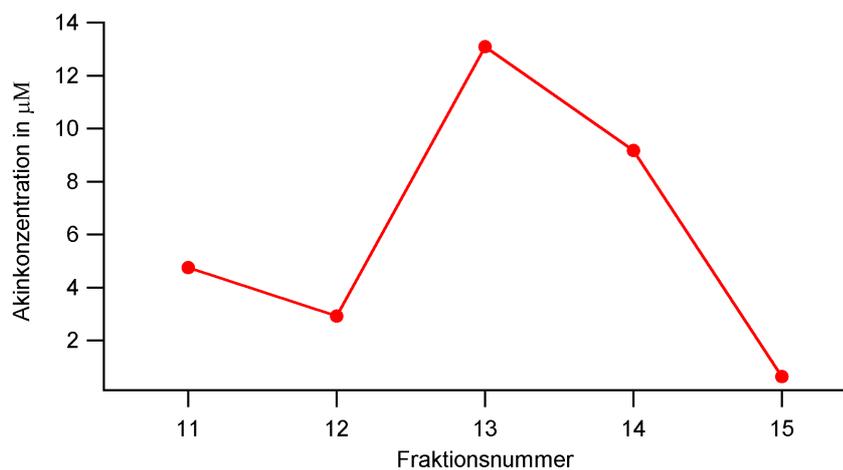


Abbildung A9: Die Aktinkonzentration in den Fraktionen 11 mit 15

Abbildung A10 zeigt die Markierungsrate in den Fraktionen 11 mit 14. Hier ist deutlich zu erkennen, dass das Maximum der Markierungsrate in Fraktion 12 mit 49.5% zu finden ist.

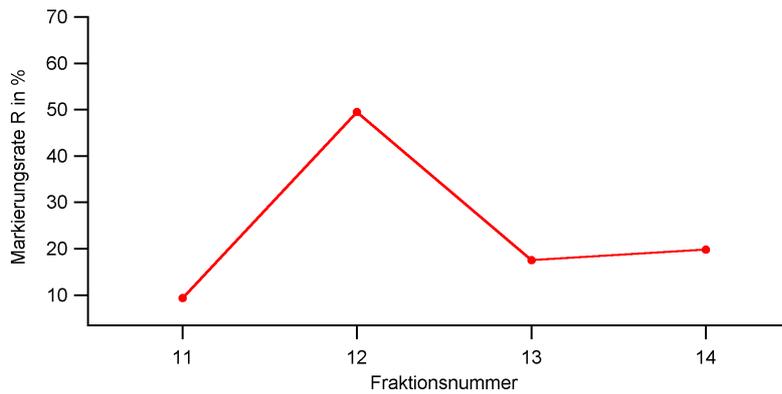


Abbildung A10: Markierungsrate R in % der Fraktionen 11 mit 14

Die Abbildungen A8 mit A10 geben das Elutionsprofil der Superdex 75 Gelfiltration aus Abbildung A5 quantitativ wieder.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde hier für Lichtstreuexperimente ein Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet. Die Ausgangsleistung betrug etwa 100 mW. Die Detektion der absoluten Streuintensität nach wenigen Minuten Messzeit ergab den in Abbildung A11 dargestellten Verlauf.

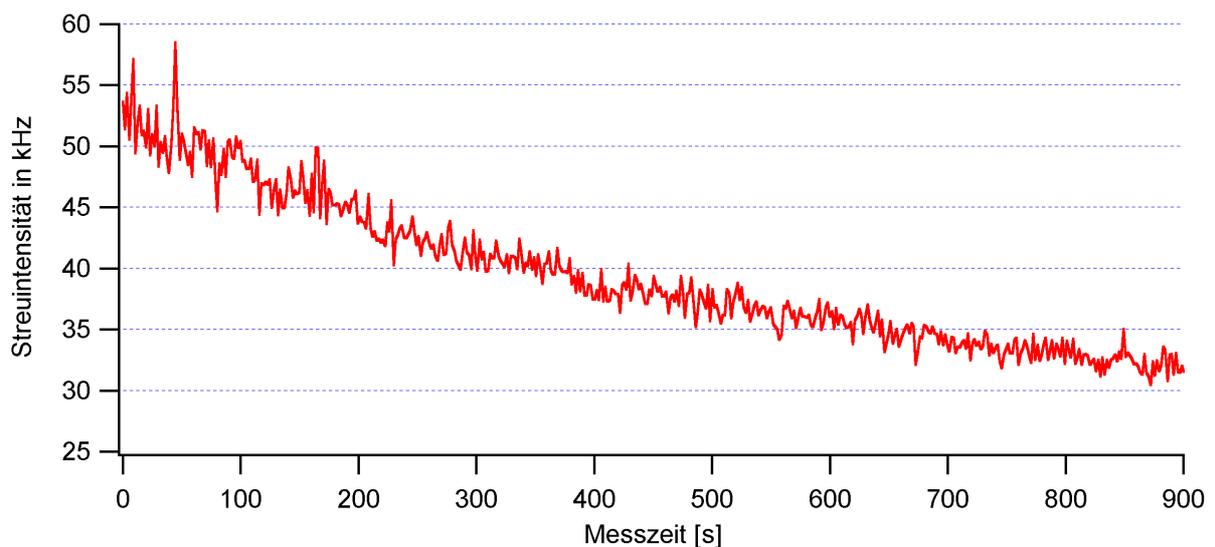


Abbildung A11: Streulicht einer mit Nanogold markierten Aktinlösung bei einer Wellenlänge von 488 nm

A 2: ANPASSUNGSERGEBNISSE

Zur Dokumentation enthalten folgende Tabellen die Anpassungsergebnisse mit Fehlerangaben:

Die Parameter a, b, c sind die Anpassungsparameter der gestreckten Exponentialfunktion, die Parameter d, e, f sind die Anpassungsparameter des Logarithmus.

Das „-“, bedeutet, dass keine Anpassung möglich war.

F-Aktin	Streuwinkel	a	b	c	d	e	f
0.3 mg/ml	20°	0.98 (1%)	47.27 (15%)	0.75 (3%)	0.025 (1%)	25.41 (4%)	-0.017 (15%)
„	25°	0.99 (1%)	26.42 (10%)	0.75 (3%)	0.032(14%)	16.78 (7%)	0.03467 (25%)
„	30°	0.99 (1%)	14.52 (8%)	0.75 (3%)	0.032 (4%)	11.96 (3%)	0.01 (30%)
„	40°	0.99 (1%)	10.95 (10%)	0.73 (3%)	0.06 (16%)	7.18 (6%)	0.023 (13%)
„	45°	0.99 (1%)	8.01 (10%)	0.74 (3%)	0.05 (1%)	6.49 (4%)	0.0103 (30%)
„	50°	0.98 (1%)	6.34 (10%)	0.73 (3%)	0.06 (40%)	5.78 (8%)	0.0045 (50%)
„	70°	0.98 (1%)	2.7 (3%)	0.73 (3%)	-	-	-
„	90°	0.97 (1%)	1.49 (3%)	0.72 (3%)	-	-	-
„	120°	0.96 (1%)	0.85 (3%)	0.72 (3%)	-	-	-

Tabelle 1 A2: Anpassungsergebnisse für 0.3 mg/ml F-Aktin

F-Aktin	Streuwinkel	a	b	c	d	e	f
0.5 mg/ml	20°	0.98 (1%)	35.75 (15%)	0.75 (3%)	0.023(30%)	30.62(40%)	0.1 (30%)
„	25°	0.98 (1%)	27.7 (8%)	0.74 (3%)	0.02 (30%)	32.43 (15%)	-0.93(20%)
„	30°	0.99(1%)	17.04 (7%)	0.75 (3%)	0.028 (20%)	17.4 (9%)	0.06 (20%)
„	40°	0.99 (1%)	10.80 (9%)	0.75 (3%)	0.03 (10%)	12.75 (8%)	0.02 (20%)
„	45°	0.99 (1%)	8.4 (5%)	0.74(3%)	0.03 (10%)	11.6 (3%)	0.016 (9%)
„	50°	0.99 (1%)	6.3 (5%)	0.73 (3%)	0.05 (15%)	7.63 13%)	0.01 (20%)
„	70°	0.99 (1%)	3.3 (5%)	0.70 (3%)	-	-	-
„	90°	0.97 (1%)	1.8 (5%)	0.71 (3%)	-	-	-
„	120°	0.94 (1%)	1.04 (1%)	0.70 (3%)	-	-	-

Tabelle 2 A2: Anpassungsergebnisse für 0.5 mg/ml F-Aktin

F-Aktin	Streuwinkel	a	b	c	d	e	f
0.7 mg/ml	25°	0.94 (1%)	24.7 (12%)	0.76 (3%)	0.018(11%)	42.5 (24%)	-0.24 (30%)
„	30°	0.97 (1%)	14.9 (10%)	0.74 (3%)	0.03 (3%)	18.29 (11%)	0.075 (20%)
„	40°	0.96 (1%)	10.47 (9.5%)	0.74 (3%)	0.026 (10%)	18.6 (6.5%)	0.059 (12%)
„	45°	0.97 (1%)	9.22 (3%)	0.75 (3%)	0.029 (5%)	16.08 (7%)	0.05 (20%)
„	50°	0.99 (1%)	7.1 (10%)	0.73 (3%)	0.026 (4%)	16.66 (6%)	0.016 (18%)
„	70°	0.98 (1%)	3.3 (9%)	0.72 (3%)	0.027 (11%)	10.22 (10%)	0.0096 (10%)
„	90°	0.98 (1%)	2.01 (5%)	0.70 (3%)	-	-	-
„	120°	0.97 (1%)	1.13 (2%)	0.70 (3%)	-	-	-

Tabelle 3 A2: Anpassungsergebnisse für 0.7 mg/ml F-Aktin

F-Aktin	Streuwinkel	a	b	c	d	e	f
1.0 mg/ml	25°	0.98 (1%)	23.62 (13%)	0.75 (3%)	0.021 (23%)	37.08 (11%)	-0.15 (20%)
„	30°	0.99 (1%)	18.65 (16%)	0.73 (3%)	-0.0141(2%)	65.68 (2%)	-0.37 (2%)
„	40°	0.93 (1%)	10.81 (10%)	0.76 (3%)	-0.0121(2%)	68.12 (2%)	-0.299 (2%)
„	45°	0.98 (1%)	6.8 (5%)	0.75 (3%)	0.018(1%)	31.85 (10%)	-0.05(30%)
„	50°	0.98 (1%)	6.3 6%)	0.74 (3%)	0.027 (1%)	20.5 (10%)	-0.02(20%)
„	70°	0.97 (1%)	3.45 (9%)	0.72 (3%)	0.018(1%)	25.19(12%)	0.03 30%)
„	90°	0.98 (1%)	2 (10%)	0.70 (3%)	0.022(13%)	13.15(13%)	0.011(15%)
„	120°	0.97 (1%)	1.05 (8%)	0.73 (3%)	0.023(21%)	8.05(16%)	0.007(30%)

Tabelle 4 A2: Anpassungsergebnisse für 1.0 mg/ml F-Aktin

Konzentration F-Aktin	Streuwinkel	Übergangszeit 12X [ms]	Übergangsamplitude 12X
0.3 mg/ml	20°	131.02	0.2611
„	25°	85.146	0.19798
„	30°	58.931	0.09366
„	40°	35.994	0.0818
„	45°	35.994	0.0467
„	50°	24.525	0.0443
„	60°	12.237	0.0405
„	70°	8.96	0.02566
„	80°	8.96	0.0105
„	90°	4.45	0.02
„	120°	4.045	0.00458

Tabelle 5: Übergangszeiten 12X 0.3 mg/ml

Konzentration F-Aktin	Streuwinkel	Übergangszeit 12X [ms]	Übergangsamplitude 12X
0.5 mg/ml	20°	98.25	0.274
„	25°	85.146	0.24392
„	30°	58.931	0.215
„	40°	42.547	0.1285
„	45°	32.717	0.1006
„	50°	27.03	0.062
„	60°	19.61	0.04
„	70°	11.418	0.0416
„	80°	6.5	0.0395
„	90°	7.32	0.02
„	120°	7.045	0.0154

Tabelle 6: Übergangszeiten 12X 0.5 mg/ml

Konzentration F-Aktin	Streuwinkel	Übergangszeit 12X [ms]	Übergangsamplitude 12X
0.7 mg/ml	20°	65.48	0.35
„	25°	52.378	0.33
„	30°	42.54	0.248
„	40°	35.994	0.2194
„	45°	29.44	0.2
„	50°	22.88	0.157
„	60°	14.694	0.11
„	70°	8.96	0.093
„	80°	8.96	0.05
„	90°	8.96	0.0376
„	120°	5.68	0.01599

Tabelle 7: Übergangszeiten 12X 0.7 mg/ml

Konzentration F-Aktin	Streuwinkel	Übergangszeit 12X [ms]	Übergangsamplitude 12X
1.0 mg/ml	20°	65.485	0.44
„	25°	42.54	0.42
„	30°	35.99	0.4
„	40°	26.16	0.34
„	45°	22.88	0.2474
„	50°	22.88	0.21
„	60°	11.42	0.18
„	70°	12.24	0.139
„	80°	8.96	0.096
„	90°	7.32	0.09
„	120°	4.45	0.051

Tabelle 8: Übergangszeiten 12X 1.0 mg/ml

Literaturverzeichnis

- [1] M. B. Huglin. „Determination of Molecular Weights by Light Scattering“ in *Inorganic and Physical Chemistry*. Springer Verlag, Volume 77, Seite 156
- [2] H. Brunner und K. Dransfeld. „Lichtstreuung an Makromolekülen“ in W. Hoppe, *Biophysik*. Springer Verlag, Berlin 2. Auflage 1982.
- [3] K. Kroy, E. Frey, 1998, „Dynamic scattering from semiflexible Polymers“, in W. Brown, K. Mortensen, “Scattering in polymeric and colloidal systems” 1999.
- [4] Eimer, „Polarized and depolarized dynamic light scattering study on F-Actin in solution: Comparison with model calculations“, *Macromolecules*, 1994, 27:87-95
- [5] Sackmann, „Biophysikskript“, Kapitel 1; TU-München
- [6] B. H. Zimm; *J. Chem. Phys.* **16**, 1093 (1948)
- [7] ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m.b.H., „Compact Goniometer System Adjustment Manual“ V.1.3. 05/97
- [8] P. Kratochvil in “Classical light scattering from polymer solutions”, ed. A. P. Junkins, *Polymer Science Library* 5, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [9] M. Schmidt „Simultaneous static and dynamic light scattering: application to a polymer structure analysis“ in Wyn Brown. *Dynamic Light Scattering*. Oxford Science Publications Clarendon Press 1993
- [10] B. Pecora, *Macromolecules* 1986, 19:244-245
- [11] M. B. Huglin. Ed. „Light Scattering from Polymer Solutions“. Academic Press London New York 1972

-
- [12] ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m.b.H., „Reference Manual“ V. 5 05/1993
- [13] H. Z. Cummins; E. R. Pike; “Photon correlation and light beating spectroscopy”; 1973. Plenum Press, New York and London; Published in cooperation with NATO scientific affairs division.
- [14] ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m.b.H., „Multiple Tau Digital Correlator Reference Manual“ V. 5 05/1993
- [15] Einstein; “Untersuchung über die Theorie der Brownschen Bewegung”, 1905, Harri Deutsch, Band 199.
- [16] Kratky, O, Porod, G. 1949. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 68:1106.
- [17] Doi, M. (1996) „ Introduction to polymer physics“, Clarendon Press, Oxford.
- [18] Doi, M. and Edwards, S.F. (1986) „ The theory of polymer dynamics“, Clarendon Press, Oxford.
- [19] L. D. Landau, E. M. Lifschitz. Statistische Physik, Teil 2. Verlag Harri Deutsch. 9. Auflage 1986
- [20] Frey, E., Kroy, K., und Wilhelm, J. (1998) “Viscoelasticity of Biopolymer networks and statistical mechanics of semiflexible polymers”. In molecular Biophysics of the Cytoskeleton, ed. Malhotra, S. und Tuszynski, J. A. Jai Press.
- [21] Frey, E., Kroy, K., and Wilhelm, J., und Sackmann, E. (1998) “statistical mechanics of semiflexible polymers: Theory and Experiment. In Dynamical Networks in Physics and Biology, ed. Forgacs, G. und Beysens, D. Springer Verlag, Berlin.
- [22] Frey, E. und Nelson, D. R. (1991) J. Phys. France 1:1715
- [23] Melanie Hohenadl, „Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Desminfilamenten mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung“ ; Diplomarbeit 1998 TU-München
- [24] Holmes et al. Nature : 1990 347 :44-49

-
- [25] Bronstein, Semendjajew. „Taschenbuch der Mathematik“. Verlag Harri Deutsch. 24. Auflage 1989
- [26] Tobias-Alexander Storz, „Untersuchung der Strukturbildung und Mizellierung in Blockcopolymeren mit statischer und dynamischer Lichtstreuung“, Diplomarbeit 1998, TU-München
- [27] Pike et al. „Measurement of Rayleigh Ratio for several pure liquids using a laser and monitored photon counting“; Royal Radar Establishment, Great Malvern, Worcestershire, United Kingdom 1974
- [28] Julabo Labortechnik GmbH, „Betriebsanleitung Kälte-Umwälzthermostate F32-HD“ 05/97
- [29] Schott Glas GmbH, „Gebrauchsanleitung Ubbelohde Viskosimeter“
- [30] Physikalische Konstanten
- [31] Spudich, J.A., Watt, S.1971. J. Biol. Chem. 246:4866-4871
- [32] MacLean –Fletcher, S. D.,Pollard, T. D.1980. Biochem. Biophys.Res.Commun. 96:18-27
- [33] Kirpal; persönliche Mitteilung
- [34] B. Pecora. Macromolecules 1986, **19**, 244-245
- [35] Bevington. „Data Reduction and error analysis for the physical sciences“. McGraw-Hill Book Company New York 1969
- [36] Nanogold. Produkt Information, „Sulfo-N-Hydroxy-Succinimido Nanogold Labeling Reagent“, Nanoprobes Inc. New York
- [37] LI-Silver. Produkt Information, „LI-Silver Enhancement Kit“, Nanoprobes Inc. New York

-
- [38] Nanoprobes Inc. „Detection of Nanogold-labeled molecules on Gels“ 1998 Nanoprobes Inc. New York
- [39] Wilhelm Peters, ALV-GmbH, persönliche Mitteilung
- [40] Wyn Brown. Dynamic Light Scattering. Oxford Science Publications Clarendon Press 1993
- [41] de Gennes, P.G. (1979) „Scaling Concepts in Polymer Physics“. Cornell University Press
- [42] Maggs, A. C. (1997) Actin, a model semiflexible polymer. Condmat/9704054
- [43] Norisuje, T., Murakama, H., and Fujita, H. (1978) Macromol. 11, 966
- [44] Dichtl, M. 2001. Doktorarbeit, Technische-Universität-München
- [45] Chu B., 1991 „Laser light scattering“, 2. Ausgabe, Academic Press
- [46] Cummins H.Z. “Application of light beating spectroscopy to biology”; Department of Physics, New York University

LEBENS LAUF

Name Tobias-Alexander Storz

Anschrift General-von-Stein Straße 5 A
85356 Freising

Geburtsdatum & -ort 19.11.1968 in München

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Schul Ausbildung

1975 - 1982 Grundschule, München

1982 - 1986 Rudolf-Diesel-Realschule; 1986 mittlere Reife

1986 - 1987 10. Übergangsklasse am Willi-Graf-Gymnasium

1987 - 1990 11. bis 13. Klasse Gisela-Gymnasium, 1990 Abitur

Wehrdienst 1990 - 1991 Grundwehrdienst bei der Luftwaffe

Studium 01.11.1991 - 05.02.1998

Studium der allgemeinen Physik an der Technischen-Universität München, Diplom am 05.02.1998, Institut für experimentelle Biophysik (E22)

Promotion 01.04.1998 - 31.10.2001

Promotion am Lehrstuhl für experimentelle Biophysik (E22) bei Herrn Prof. Dr. Sackmann, Technische-Universität-München

Freising, den 26. September 2001

NOTIZEN