

**Anwendung der Gradientenmethode nach Boltzmann
zur Bestimmung konzentrationsabhängiger Diffusions-
koeffizienten von Polyelektrolyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
- Chemie und Pharmazie -
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Alexander Wagner
aus Schweinfurt

2006

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde von Prof. Dr. H.-H. Kohler angeleitet.

Das Kolloquium fand am 07.11.2006 statt.

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. O. S. Wolfbeis (Vorsitzender)

Prof. Dr. H.-H. Kohler (Erstgutachter)

Prof. Dr. G. Schmeer (Zweitgutachter)

Prof. Dr. J. Daub (Drittprüfer)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kohler gebührt mein besonderer Dank für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Bereitschaft physikalisch-chemische Probleme in Zusammenhang mit der Arbeit oder allgemeiner Art unverzüglich und gewinnbringend zu diskutieren. Unvergesslich bleiben seine bereichernden, weil vielfach ungewöhnlichen Beiträge zu eher philosophischen Fragestellungen. Die von ihm gewährte akademische Freiheit hinsichtlich der Bearbeitung des gestellten Themas ist wohl nur selten anzutreffen. Ich habe sie mit den Jahren immer mehr geschätzt und halte sie mittlerweile für unabdingbar.

Dr. Stefan Woelki und Dr. Jürgen Keller danke ich insbesondere für jederzeit geleistete Hilfestellungen bei Problemen im Computerbereich. Erwähnenswert sind das außergewöhnliche Interesse von Dr. Jürgen Keller am Verlauf der Arbeit und seine Bereitschaft, sich fachliche und andere Probleme geduldig anzuhören.

Herrn Stefan Nagl möchte ich für die Einweisung in die Funktionsweise der instituts-eigenen Fluoreszenz-Messapparatur danken. Auftretende Probleme oder Fragen in Zusammenhang mit den eigenen Messungen wurden von ihm unverzüglich geklärt.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung und Zielsetzung	1-13
A.1	Diffusionsgleichung	1
A.2	Wichtigste experimentelle Verfahren	5
A.2.1	Gleichgewichtsmethode	6
A.2.2	Gradientenmethode	6
A.3	Gegenüberstellung von Gleichgewichts- und Gradientenmethode	8
A.4	Zielsetzung der Arbeit	11
B	Optische Abbildung des Konzentrationsprofils	14-27
B.1	Einführung	14
B.2	Entwicklung einer neuen Messmethode	20
B.3	Zusätzliche Fehlerquellen	23
C	Diffusionszelle und Grenzbildungstechnik	28-43
C.1	Problemstellung	28
C.2	Diffusionszelle	29
C.3	Auswahl des Silikonmaterials	32
C.4	Zur Durchführung des Experiments	33
C.5	Anmerkungen zur Grenzbildungstechnik	35
C.6	Anfangsintensitätsprofil	40
D	Fluoreszenzmarkierung und Polyelektrolyteigenschaften	44-56
D.1	Modellpolyelektrolyt	44
D.2	Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs	47
D.3	Untersuchungen der Eigenschaften von nativem BSA	48
D.4	Einfluss der Markierung auf die Proteinladungszahl z_p	50

E	Messergebnisse und ihre Interpretation	57 - 78
E.1	Intensitätsprofile und Kurvenanpassung	57
E.2	Anmerkungen zu den Intensitätsprofilen	62
E.3	Berechnung des Diffusionskoeffizienten	63
E.4	Anmerkungen zu den berechneten Diffusionskoeffizienten	69
E.5	Vergleich mit Literaturergebnissen	70
E.5.1	Diffusionskoeffizient D_0	70
E.5.2	Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten	72
E.6	Interpretation der Messergebnisse	73
F	Zusammenfassung und Ausblick	79 - 83
G	Anhang	84 - 92
Anhang 1:	Osmotischer Druck und osmotische Kompressibilität nach Donnan	84
Anhang 2:	Unschärfe von Bildpunkten	85
Anhang 3:	Parameterwerte	87
Anhang 4:	Einfluss der Intensitätsfluktuationen auf die Flächenterme A bzw. A_{al}	88
Anhang 5:	Osmotische Kompressibilität und Diffusionskoeffizient für $z_{p,eff}(c_p)$	90
Anhang 6:	Einstellung der Lösungsbedingungen	91
H	Literaturverzeichnis	93 - 95

A Einleitung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung und Interpretation des konzentrationsabhängigen Diffusionskoeffizienten eines geladenen Makromoleküls in wässriger Lösung. Im Folgenden wird zuerst die Diffusionsgleichung näher beleuchtet. Im Anschluss an eine kurze Vor- und Gegenüberstellung der wichtigsten experimentellen Methoden soll die Zielsetzung der Arbeit konkretisiert werden.

A.1 Diffusionsgleichung

Nimmt man unter Temperatur- und Druckkonstanz ein eindimensionales Diffusionsproblem an, so gilt nach Fick [1] in Analogie zur Wärmeleitungsgleichung:

$$(A-1) \quad j = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1. \text{ Ficksches Gesetz})$$

x, t : Orts- und Zeitkoordinate

$j(x, t)$: Flussdichte des Gelösten

$c(x, t)$: Konzentration des Gelösten

D : Diffusionskoeffizient des Gelösten

Bilanziert man in einem gegebenen differentiell kleinen Volumenelement die Ein- bzw. Ausstromdichte der gelösten Substanz, so erhält man die Konzentrationsänderung pro Zeit t :

$$(A-2) \quad \frac{\partial c}{\partial t} = - \frac{\partial j}{\partial x}$$

Dies führt mit Gleichung (A-1) direkt zum 2. Fickschen Gesetz:

$$(A-3) \quad \frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right)$$

Setzt man eine Konzentrationsunabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D voraus („Diffusionskonstante“), so kann man Gleichung (A-3) z. B. mittels Fourier- bzw. Laplace-Transformation integrieren. Frühzeitig aber ergaben Experimente [2,3,4] eine Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten $D(c)$, die auf Wechselwirkungen zwischen den gelösten Teilchen beruht.

Der Einfluss der Teilchenladung auf den Diffusionsprozess soll am Beispiel eines Salzes $K_k A_a$ erläutert werden, das in wässriger Lösung in k Kationen K der Wertigkeit z^+ und a Anionen A der Wertigkeit z^- zerfällt. Die Elektroneutralität der Lösung verlangt $k z^+ + a z^- = 0$. Die Lösung wird als ideal angenommen. Es gelte für die Stoffmengenflussdichte j die Nullstrombedingung $z^+ F j^+ + z^- F j^- = 0$. F ist die Faraday-Konstante ($F = 96485$ As/mol). Durch die meist unterschiedliche Größe des Diffusionskoeffizienten von Kation und Anion bildet sich bei Vorliegen eines Salzkonzentrationsgradienten durch das „Vorauslaufen“ der „schnelleren“ Ionen praktisch sofort ein elektrisches Feld in Diffusionsrichtung aus, das die Coionen so verlangsamt bzw. die Gegenionen so beschleunigt, dass es zu einer reinen Salzdifusion kommt. Die jeweiligen Flussdichten kann man durch die entsprechenden Nernst-Planck-Gleichungen beschreiben:

$$(A-4) \quad j^+ = -D^+ \left(\frac{\partial c^+}{\partial x} + c^+ z^+ \frac{\partial \Psi}{\partial x} \right)$$

$$(A-5) \quad j^- = -D^- \left(\frac{\partial c^-}{\partial x} + c^- z^- \frac{\partial \Psi}{\partial x} \right) \quad \text{mit} \quad \Psi = \frac{F}{RT} \varphi$$

$\varphi(x, t)$: elektrisches Potenzial

R : Allgemeine Gaskonstante, $R = 8.314$ J/(mol·K)

T : Temperatur

Die Salzdifusion kann man quantitativ beschreiben, indem man die Gleichungen (A-4) bzw. (A-5) durch $D^+ \cdot z^+ \cdot k$ bzw. $D^- \cdot z^- \cdot a$ teilt. Durch eine nachfolgende Subtraktion beider Gleichungen fällt der Potenzialterm heraus und man gelangt nach einfacher Rechnung formal zu Gleichung (A-1), wobei:

$$(A-6) \quad j = \frac{j^+}{k} = \frac{j^-}{a}$$

$$(A-7) \quad D = \frac{D^+ D^- \cdot (z^+ - z^-)}{z^+ D^+ - z^- D^-} \quad (\text{Nernst-Hartley-Gleichung})$$

$$(A-8) \quad c = \frac{c^+}{k} = \frac{c^-}{a}$$

Der Gültigkeitsbereich der Gleichung (A-1) kann auch auf die Diffusion von geladenen Makromolekülen in Salzlösungen ausgedehnt werden. Hier und in der gesamten Arbeit setzen wir ein ein-einwertiges Salz voraus und nehmen an, dass das Polyelektrolytion und das Salz ein gemeinsames Gegenion besitzen. Zugleich wird neben der Elektroneutralität die Idealität der Lösung vorausgesetzt. Alle Abweichungen in Form von hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den gelösten Teilchen und thermodynamischen Aktivitätskoeffizienten der Ionen sollen sich in einer effektiven Ladung des Polyelektrolytions als anpassbarem Parameter widerspiegeln.

Die Nernst-Planck-Gleichungen der drei beteiligten Ionen kann man durch die Nullstrombedingung koppeln und auf diese Weise den Potenzialterm in der Gleichung für das Polyelektrolytion eliminieren. Um Zugang zum 1. Fickschen Gesetz zu bekommen, muss man die Beziehung zwischen den Konzentrationsgradienten von Anion und Kation und dem des Polyions kennen. Dieses Problem kann man durch das Postulat eines Quasi-Gleichgewichts der Salzionen (Donnan-Gleichgewicht) [5,6,7,8] lösen. Ein Donnan-Gleichgewicht (siehe Anhang 1) stellt sich zwischen zwei benachbarten Volumenelementen ein, wenn die Polyelektrolytkonzentration unterschiedlich ist. Die Salzkonzentration in einem polyelektrolytfreien Volumenelement bezeichnet man als Referenzsalzkonzentration c_s ($[c_s] = \text{mol/l}$). Für den Diffusionsprozess kann man ein Quasi-Gleichgewicht der Salzionen mit der deutlich größeren Beweglichkeit der „kleinen“ Ionen im Vergleich zum Polyelektrolytion begründen. Die Referenzsalzkonzentration c_s wird als zeitlich konstant angenommen. Damit ergibt sich:

$$(A-9) \quad j = -D(c_p) \frac{\partial c_p}{\partial x}$$

$$(A-10) \quad \frac{\partial c_p}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D(c_p) \frac{\partial c_p}{\partial x} \right)$$

Außer von der Polyelektrolytkonzentration c_p ($[c_p] = \text{g/l}$) hängt der Diffusionskoeffizient des Polyelektrolytions von der Referenzsalzkonzentration, den Diffusionskoeffizienten der Salzionen und der effektiven Ladung des Polyelektrolytions ab. Setzt man eine konstante effektive Ladung des Makromoleküls voraus [6,7,8,9,10], so kann man eine zu Gleichung (A-7) analoge mathematische Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten des Polyelektrolytions und den oben genannten Parametern gewinnen. In dieser Arbeit wird allerdings eine alternative Gleichung für $D(c_p)$ verwendet (siehe Kapitel D.1).

Unter der Annahme idealisierter experimenteller Bedingungen soll ein Diffusionsexperiment einschließlich seiner Auswertung vorgestellt werden. Es soll in vertikaler Richtung (x -Richtung) ein stufenförmiges Anfangskonzentrationsprofil vorliegen:

$$(A-11) \quad c_p(x, t=0) = c_{p0} \quad \text{für } -\infty < x < 0; \quad c_p(x, t=0) = 0 \quad \text{für } 0 < x < \infty$$

Die Randbedingungen seien:

$$(A-12) \quad c_p(x = -\infty, t) = c_{p0} \quad c_p(x = \infty, t) = 0$$

Der mit Beginn des Experiments einsetzende Diffusionsprozess wird vollständig durch Gleichung (A-10) dirigiert. Eine Momentaufnahme des räumlichen Konzentrationsprofils spiegelt deshalb den konzentrationsabhängigen Diffusionskoeffizienten wider. In dieser Arbeit wird das Ziel verfolgt diese Informationsquelle maximal zu nutzen, d. h. aus dem Konzentrationsprofil zu einer (im Prinzip beliebigen) Zeit $t > 0$ den Diffusionskoeffizienten für den gesamten überstrichenen Konzentrationsbereich zu bestimmen.

Boltzmann [11] hat gezeigt, dass unter den oben festgelegten Anfangs- und Randbedingungen die Konzentration nur eine Funktion von $\lambda = x/\sqrt{t}$ ist. Dadurch nimmt Gleichung (A-10) folgende Form an:

$$(A-13) \quad \frac{\lambda}{2} \frac{dc_p}{d\lambda} = - \frac{d}{d\lambda} \left(D(c_p) \frac{dc_p}{d\lambda} \right)$$

Eine einmalige Integration unter Verwendung der Gleichung (A-12) ergibt:

$$(A-14) \quad D(c_p) = -\frac{1}{2} \left(\frac{d\lambda}{dc_p} \right)_{c_p} \int_0^{c_p} \lambda dc_p$$

Bei gegebener Diffusionszeit t wird daraus:

$$(A-15) \quad D(c_p) = -\frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dc_p} \right)_{c_p} \int_0^{c_p} x dc_p = \frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dc_p} \right)_{c_p} \int_{x(c_p)}^{\infty} x \frac{dc_p}{dx} dx$$

Die rechte Seite der Gleichung liefert das Verfahren zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten. Die Auswertung kann den Konzentrationsbereich $0 < c_p < c_{p0}$ umfassen.

Alternativ könnte man $D(c_p)$ nach Gleichung (A-9) bestimmen. Das beschriebene Experiment ist hierfür jedoch ungeeignet, da die räumlich und zeitlich variable Flussdichte experimentell bestimmt werden müsste. Dieses Problem lässt sich beheben, indem man die stationäre Diffusion in einer Schicht endlicher Dicke bei festen Randkonzentrationen betrachtet. Die Flussdichte entlang des Konzentrationsgradienten ist dann nach Gleichung (A-2) konstant. Man kann sie analytisch bestimmen. Kennt man zusätzlich $\partial c_p / \partial x$ in Abhängigkeit von x , so lässt sich der Diffusionskoeffizient $D(c_p)$ bestimmen.

A.2 Wichtigste experimentelle Verfahren

Man kann im Wesentlichen zwei experimentelle Methoden zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten unterscheiden: Die Gradientenmethode und die Gleichgewichtsmethode. Die Gradientenmethode ist das ältere, „klassische“ Verfahren. Heute wird nahezu ausschließlich die Gleichgewichtsmethode in Form von dynamischen Lichtstremessungen genutzt.

A.2.1 Gleichgewichtsmethode

Die Lösung befindet sich bei dieser Methode [9,12] im thermodynamischen Gleichgewicht. Man wählt den Betrag des Streuvektors q so, dass gilt: $R_G \cdot q \ll 1$ (R_G : Trägheitsradius des Makromoleküls):

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

n : Brechungsindex der Lösung

λ_0 : Wellenlänge des eingestrahlten monochromatischen Lichts im Vakuum

θ : Streuwinkel

Zusätzlich ist darauf zu achten, dass im Falle von Polyelektrolyten die Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkungen sehr viel kleiner ist als der Betrag des inversen Streuvektors. Unter der Annahme idealer Bedingungen ist bei konstantem, offenem Beobachtungsvolumen innerhalb einer deutlich größeren Lösungsgesamtmenge die zeitlich gemittelte Streuintensität (statische Lichtstreuung) dem Streuungsquadrat der Teilchenzahl proportional [13,14,15]. Das gemittelte Abklingen der spontanen mikroskopischen Konzentrationsfluktuationen folgt Gleichung (A-9) und kann im dynamischen Lichtstreuexperiment mit Hilfe einer charakteristischen Zeit τ beschrieben werden, die den Zugang zum Diffusionskoeffizienten eröffnet:

$$(A-16) \quad \tau^{-1} = D(c_p) q^2$$

Man muss jeweils ein Experiment pro Konzentrationswert ansetzen.

A.2.2 Gradientenmethode

Man kann zwischen der Bestimmung von Diffusionskoeffizienten aus einem dynamischen und einem stationären Experiment unterscheiden. Man hat innerhalb beider Methoden zwei Optionen. Neben der Möglichkeit den Diffusionskoeffizienten für das gesamte im Experiment überstrichene Konzentrationsintervall zu bestimmen kann man durch die Vorlage zweier Reservoirs geringfügig unterschiedlicher Konzentration einen

gemittelten Diffusionskoeffizienten bestimmen. Dabei kann man auf analytische Lösungen der Gleichungen (A-1) bzw. (A-3) für einen konzentrationsunabhängigen Diffusionskoeffizienten zurückgreifen. Diese Methode ist allerdings vergleichsweise aufwändig und deshalb wenig attraktiv, wenn man sich für die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten interessiert. Sie wird deshalb in dieser Arbeit nicht verfolgt.

Das auf S.5 beschriebene Verfahren zur Bestimmung konzentrationsabhängiger Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-9) (stationäres Experiment) ist nur einmal für einwertige Salze in der Literatur angewendet worden [16]. Zwei große Reservoirs unterschiedlicher Salzkonzentration sorgen für zeitlich konstante Randkonzentrationen. Diese Reservoirs werden vertikal über eine Diffusionssäule miteinander verbunden. Zur Vermeidung von Konvektion beinhaltet die obere Vorlage die weniger dichte Lösung. Nach Erreichen des stationären Zustands wird der Konzentrationsverlauf in der Säule optisch detektiert. Die Übereinstimmung des Diffusionskoeffizienten in dem einzigen bisher durchgeführten Experiment mit den durch andere Messmethoden erzielten Resultaten ist allerdings wenig befriedigend [17].

Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-15) (dynamisches Experiment) erfordert die Realisierung des auf S.4 beschriebenen idealisierten Experiments. Die Länge der Diffusionszelle ist so groß bzw. die Diffusionszeit so klein zu wählen, dass die Randbedingungen (Gleichung (A-12)) praktisch nicht verletzt werden. Es muss gelingen eine Polyelektrolytlösung so mit einer Salzlösung zu überschichten, dass die Anfangsbedingung der Gleichung (A-11) zumindest in Näherung erfüllt wird.

Eine Literaturrecherche ergibt nur in zwei Fällen eine Bestimmung des Diffusionskoeffizienten geladener Makromoleküle nach Gleichung (A-15). Es handelt sich in beiden Fällen um synthetische Polyelektrolyte [6,18]. Die erzielten Resultate stimmen in wesentlichen Punkten mit denen der Gleichgewichtsmethode überein. Sie werden im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben.

A.3 Gegenüberstellung von Gleichgewichts- und Gradientenmethode

Von den Gradientenmethoden erscheint die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-15) am interessantesten. Hier verbinden sich eine durch zwei Experimente [6,18] nahegelegte Gültigkeit der Methode mit der Eleganz einer Bestimmung des Diffusionskoeffizienten für ein definiertes Konzentrationsintervall aus nur einem Experiment. Den beiden in der Literatur beschriebenen Experimenten soll deshalb besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Die jeweiligen Resultate werden mit entsprechenden Lichtstremessungen verglichen.

Alexandrowicz [6] ermittelt aus einem dynamischen Gradientenexperiment den Diffusionskoeffizienten von Poly-L-Lysin in unterschiedlich konzentrierten Kochsalzlösungen (Abbildung (A-1)). Die optische Abbildung des Diffusionsprozesses erfolgt durch das Schlierenverfahren unter Verwendung einer Wolter-Phasenplatte.

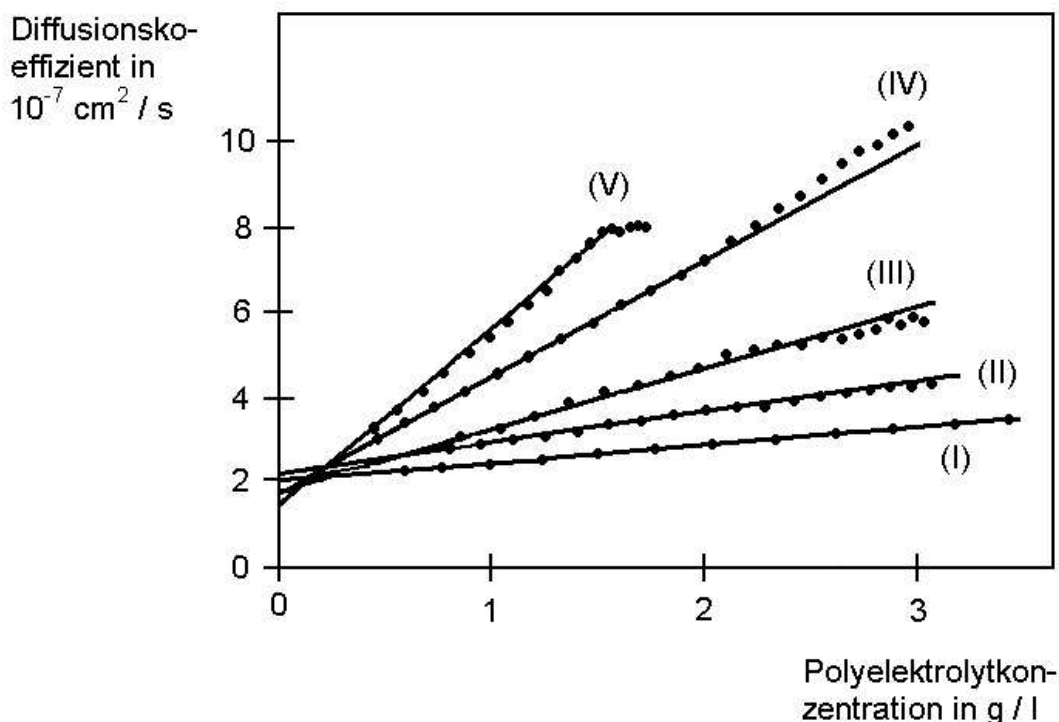


Abbildung (A-1): Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von Poly-L-Lysin (nach [6]). Salzkonzentrationen: (I) $c_s = 1$ mol/l, (II) $c_s = 0.1$ mol/l, (III) $c_s = 33$ mmol/l, (IV) $c_s = 15$ mmol/l, (V) $c_s = 10$ mmol/l.

Nach eigener Aussage nutzt Alexandrowicz Gleichung (A-15) beginnend mit der salzärmsten Lösung nur bis zu einer Salzkonzentration von 33 mmol/l (Messpunkte (III) bis (V)). Seine Angaben erlauben keinen eindeutigen Rückschluss auf die Frage, wie die Messpunkte (II) gewonnen wurden. Bei der einmolaren Salzlösung stellen die einzelnen Messpunkte (I) einen gemittelten Diffusionskoeffizienten dar, d. h. sie gehen aus jeweils einem Experiment gemäß S.6,7 hervor.

Über die Konzentration c_{p0} im Polyelektrolytreservoir macht Alexandrowicz bei den Experimenten (III) bis (V) keine definitive Aussage. In dem Experiment, dessen Resultate seine Figur 1 zeigt und in dem Experiment in salzfreier Lösung ist $c_{p0} = 5$ g/l. Wenn c_{p0} auch in den Experimenten (III) bis (V) diesen Wert besitzt, bleiben in Abbildung (A-1) beträchtliche Teile des überstrichenen Konzentrationsbereichs ausgespart. Die in Richtung wachsender Konzentration letzten Messpunkte zeigen jeweils eine Abweichung von einem linearen Verhalten. Der uneinheitliche Trend in den drei Experimenten erscheint verdächtig. In der Gegenrichtung enden die Werte unvermittelt bei einer Konzentration von ca. 0.4 g/l, obwohl dies nach Gleichung (A-15) nicht erforderlich ist.

Alexandrowicz extrapoliert unter Annahme einer linearen Abhängigkeit und Einbeziehung geeigneter Messpunkte auf ein D_0 :

$$(A-17) \quad D(c_p) = D_0(1 + k c_p)$$

D_0 : Diffusionskoeffizient in unendlich verdünnter Lösung

k : 1. Virialkoeffizient des Diffusionskoeffizienten

Die Frage, warum Alexandrowicz bei einer Referenzsalzkonzentration von 1 mol/l die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten mit einem wesentlich aufwändigeren Verfahren bestimmt, bleibt ungeklärt.

Ein Vergleich mit der Lichtstremethode erfordert eine Berücksichtigung des im entsprechenden Experiment [10] deutlich größeren Polymerisationsgrades. Die Resultate bezüglich des Diffusionskoeffizienten D_0 bzw. des Virialkoeffizienten k werden in befriedigender Weise bestätigt. Die Umrechnung der D_0 -Werte geschieht mit Hilfe einer üblichen Skalierungsbeziehung [6]. Die lineare Abhängigkeit erstreckt sich bei den Lichtstreuexperimenten in 10^{-2} -molarer Salzlösung im Gegensatz zu den Ergebnissen der

Abbildung (A-1) bis zu einer Konzentration von 3 g/l. Dieser Umstand kann mit dem deutlich unterschiedlichen Polymerisationsgrad begründet werden.

Gemäß Literatur [7,8,19,20,21] zeigen synthetische Polyelektrolyte im Widerspruch zu den Messpunkten (V) der Abbildung (A-1) bei allen verwendeten Salzkonzentrationen nach einem (genähert) linearen Bereich ein Einmünden der Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten in eine positive Krümmung. Eine nähere Beleuchtung der Resultate von Alexandrowicz einschließlich eines Vergleichs mit den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung lassen im Gesamtbild zumindest Zweifel an der Qualität seiner Messmethode aufkommen.

Nagasawa [18] verwendet ebenfalls Gleichung (A-15) zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Polystyrolsulfonat in salzfreier Lösung. Die Konzentration des Polyelektrolyten detektiert er mittels der Rayleigh-Interferenzmethode unter Ausnutzung der Proportionalität von Polyelektrolytkonzentration und Fransenzahl. In Abbildung (A-2) entsprechen 10 Fransen einer Polyelektrolytkonzentration von 0.56 g/l:

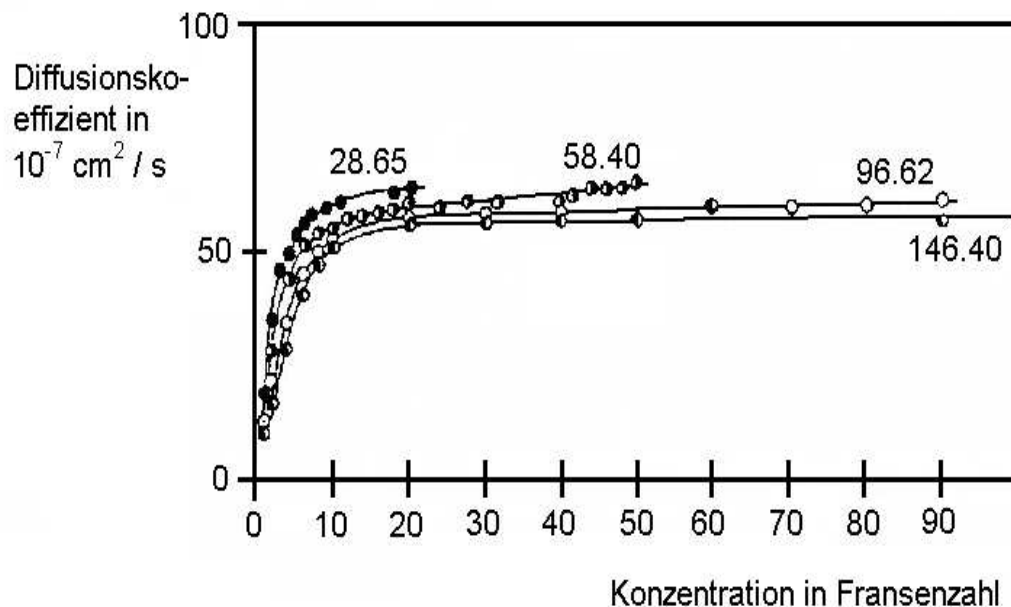


Abbildung (A-2): Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von Polystyrolsulfonat in salzfreier Lösung. Die über bzw. unter den Kurven stehende Fransenzahl gibt die Konzentration c_{p0} im Polyelektrolytreservoir an (nach [18]).

Lichtstreuexperimente [21,22] zeigen vergleichbare Tendenzen für die Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten synthetischer Polyelektrolyte in salzfreier Lösung. Analysiert man Abbildung (A-2), so fällt eine mit der Theorie der Diffusion nicht vereinbare zusätzliche Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Konzentration c_{p0} im Polyelektrolytreservoir auf. Der qualitative Verlauf der Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten ist zwar für jedes Diffusionsexperiment gleich, der relative Fehler für den Diffusionskoeffizienten ist aber insbesondere im Bereich kleiner Polyelektrolytkonzentration (bis Fransenzahl 10) beträchtlich.

Interessanterweise benutzt Nagasawa später [7,8] zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten desselben Polyelektrolyten in unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen nicht mehr Gleichung (A-15). Er bestimmt aus einem dynamischen Gradientenexperiment mittels einer eigens für die Rayleigh-Interferenzmethode entwickelten Auswertung [23] nur einen gemittelten Diffusionskoeffizienten gemäß S.6,7. Die dank mehrerer Messungen erhaltene Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten stimmt im Kurvenverlauf mit den neueren Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung überein [19,20,21].

Nach einem ähnlichen Muster erfolgt die Bestimmung konzentrationsabhängiger Diffusionskoeffizienten aus dynamischen Gradientenexperimenten bei Proteinen [24,25] und Polymeren in unpolaren Lösungsmitteln [26,27].

A.4 Zielsetzung der Arbeit

Fasst man die letzten Kapitel zusammen, so lässt sich festhalten:

- 1) Die Gradientenmethode nach Gleichung (A-15) stellt eine einfache Möglichkeit zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten geladener Makromoleküle dar.
- 2) Obwohl dieses Verfahren zweimal bei synthetischen Polyelektrolyten durchgeführt wurde, hat es sich selbst vor der Verdrängung durch die dynamische Lichtstreuung nicht durchgesetzt. Über die bereits im letzten Kapitel aufgedeckten Auffälligkeiten

hinaus erweckt die Literatur z. T. den Eindruck als würde diese Methode gar nicht zum Ziel führen. Dies unterstreicht Nagasawa für das Rayleigh-Interferenzverfahren [7]:

„The diffusion coefficient of a polyelectrolyte in the presence of added salt depends on the concentration of the polyelectrolyte so highly that the diffusion pattern is skewed. Therefore, the diffusion experiments carried out between a polymer solution and solvent is **not suitable** to clarify the concentration dependence of diffusion coefficient of polyelectrolytes.”

Diese Aussage ist allerdings nicht korrekt. Ein „verzerrter“, unsymmetrischer räumlicher Konzentrationsverlauf ist für konzentrationsabhängige Diffusionskoeffizienten zu erwarten. Grundsätzlich spricht nichts gegen eine Bestimmung des Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-15).

In Kombination mit der von Nagasawa in salzfreier Polystyrolsulfonatlösung [18] fälschlicherweise erhaltenen Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von c_{p0} (siehe Abbildung (A-2)) scheinen eher grundsätzliche Zweifel an seiner Messmethode angebracht. Dieser Verdacht wird durch die Resultate von Alexandrowicz [6] gestützt. Sie wurden mit einem anderen Abbildungsverfahren erzielt und sind zumindest in bestimmten Konzentrationsbereichen innerhalb seiner Experimente (III) bis (V) (Abbildung (A-1)) reproduzierbar. Aber auch bei ihm weist die Qualität der Messungen zumindest im Gesamtbild Mängel auf.

Fragt man sich, warum das Gradientenverfahren in Verbindung mit Gleichung (A-15) trotz seiner Vorzüge heute kaum eine Rolle spielt, rückt der Abbildungsvorgang der Diffusion in den Vordergrund. Erforderlich ist eine exakte Kopie des Konzentrationsprofils. Ein wichtiges Ziel der Arbeit besteht deshalb darin, bisherige Abbildungsverfahren zu analysieren und nach Möglichkeit zu verbessern.

Dazu wird in Abgrenzung zu den bisher beschriebenen Experimenten eine möglichst geringe Abtasttiefe zur Erfassung des Konzentrationsverlaufs in Kombination mit einer auflösungserhöhenden Signalverstärkung durch eine Fluoreszenzmarkierung des Polyelektrolyten angestrebt. Es soll geprüft werden, ob dann mit der Gradientenmethode aus einem einzelnen Konzentrationsprofil der Diffusionskoeffizient für das gesamte im Diffu-

sionsprozess überstrichene Konzentrationsintervall ermittelt werden kann. Dies setzt die Entwicklung einer entsprechenden Messapparatur einschließlich einer geeigneten Diffusionszelle voraus. Im Erfolgsfall ergäbe sich eine leistungsfähige Alternative zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten mittels dynamischer Lichtstreuung.

Im Niedersalzbereich ist die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von geladenen Makromolekülen am stärksten ausgeprägt. Deshalb wird in dieser Arbeit mit einer 10^{-3} -molaren Salzlösung gearbeitet. Es wird exemplarisch ein Derivat des Proteins Rinder-Serumalbumin (im Folgenden BSA genannt) mit einer Konzentration c_{p0} im Polyelektrolytreservoir von 4 g/l untersucht. Dies entspricht einer Stoffmengenkonzentration von ca. $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Einen zweiten Schwerpunkt der Arbeit bildet die Interpretation des Diffusionskoeffizienten von Polyelektrolyten in salzarmer Lösung. Insbesondere soll überprüft werden, ob im Grenzbereich starker Verdünnung die häufig anzutreffende a priori Annahme einer linearen Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten gerechtfertigt ist (vgl. Abbildung (A-1)).

Die weiteren Kapitel dieser Arbeit sollen kurz angesprochen werden. In Abschnitt B „Optische Abbildung des Konzentrationsprofils“ werden Möglichkeiten aufgezeigt, wie man Abbildungsfehler reduzieren kann, und die eigene Messmethode vorgestellt. Der Abschnitt C befasst sich mit der Entwicklung einer Diffusionszelle einschließlich Grenzbildungstechnik. Abschnitt D beschäftigt sich mit den Eigenschaften des markierten Makromoleküls unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses einer Fluoreszenzmarkierung auf die Nettoladung des Proteins. Anschließend werden in Abschnitt E die eigenen Messergebnisse vorgestellt und diskutiert. Den Abschluss der Arbeit bildet der Abschnitt F „Zusammenfassung und Ausblick“.

B Optische Abbildung des Konzentrationsprofils

B.1 Einführung

Einleitend soll das erste in der Literatur beschriebene, „klassische“ Experiment zur optischen Erfassung eines Diffusionsprozesses geschildert werden [4]. Es dient als Grundlage, um die bisherigen Strategien zur Weiterentwicklung und mögliche Abbildungsfehler zu diskutieren sowie einen neuen Ansatz herauszuarbeiten. Abbildung (B-1) zeigt eine Prinzipskizze (nach [28]):

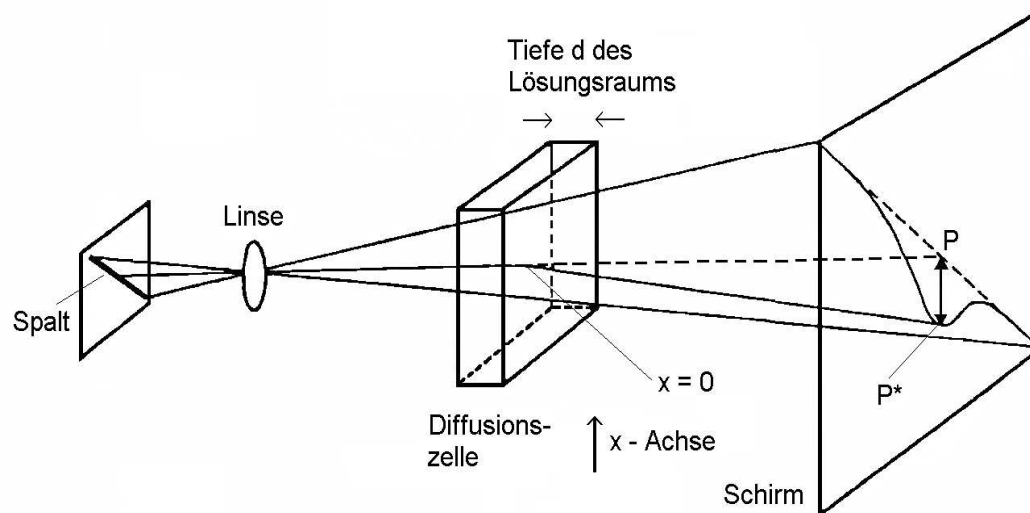


Abbildung (B-1): Diffusionsexperiment von Wiener (nach [4,28])

Eine konvexe Linse bildet einen beleuchteten, diagonalen Spalt auf einen Schirm ab. Findet in dem zwischengeschalteten Gefäß in vertikaler Richtung (x -Richtung) Diffusion statt, so verzerrt sich das Spaltbild deutlich. In der Umgebung der Anfangsgrenze zwischen beiden Lösungen ($x = 0$) ist die Abweichung des Bildpunkts (P^*) von dem Bildpunkt (P) des Spaltes, den man ohne Diffusionszelle erhalten würde, am größten.

Durch die Inhomogenität der Konzentration im Diffusionsprozess wird in x -Richtung ein Gradient im Brechungsindex n verursacht. Hierdurch wird horizontal auf das Diffusions-

gefäß einfallendes Licht auf seinem Weg durch die Lösung gekrümmt. Der Krümmungsradius r spiegelt diesen Gradienten direkt wider [4]:

$$(B-1) \quad r \sim \frac{dx}{dn}$$

Auf dem Schirm entsteht deshalb ein Bild, das die Information über Konzentrationsgradienten als Funktion von x beinhaltet. Unter vereinfachenden Annahmen und der Voraussetzung einer Proportionalität von Brechungsindex n und Konzentration der diffundierenden Substanz leitet Wiener für die Bildpunktverschiebung $\Delta P = \left| \overline{P^*P} \right|$ folgende Beziehung ab (d : Tiefe des Lösungsraums):

$$(B-2) \quad \Delta P \sim d \frac{dc}{dx}$$

Eine Verbesserung des Experiments stellen die Schlierenmethoden dar. Hier geht man von einem beleuchteten horizontalen Spalt aus. Optische Einrichtungen hinter dem Gefäß vermögen unter Zwischenschaltung von mechanischen Schneiden unterschiedlicher Form den Diffusionsprozess auf ein rechtwinkliges Koordinatensystem abzubilden [29,30]. Die in Kapitel A.3 (S.8) erwähnte Phasenplatte ist eine optische Schneide. Sie stellt einen weiteren Fortschritt dar, indem sich die Abbildung durch eine deutlich feinere Linie auszeichnet und deshalb die Messgenauigkeit erhöht wird [31,32].

Gleichung (A-15) (S.5) zeigt die entscheidende Rolle, die dem Konzentrationsgradienten an einer interessierenden Stelle x für die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten zukommt. Alle erwähnten Arbeiten nach Wiener konzentrieren sich auf das Verhalten der Lichtstrahlen nach Verlassen der Diffusionszelle und suchen dort eine Optimierung des Abbildungsverfahrens. Sie legen zugrunde, dass sich die Lage eines jeden Bildpunkts in den Konzentrationsgradienten an einer Stelle x des Lösungsraums umrechnen lässt.

Die Zelltiefe beträgt in einem typischen Experiment mindestens 1 cm. Tatsächlich durchläuft ein horizontal auf das Gefäß auftreffender Lichtstrahl im Diffusionsbereich auf seinem Weg durch die Lösung deshalb Regionen unterschiedlicher Konzentrationsgradienten, die nach Gleichung (B-1) direkt auf den Krümmungsradius und damit die Lage des

resultierenden Bildpunktes zurückwirken. Das Bild repräsentiert somit nicht die Konzentrationsgradienten an den einzelnen Punkten x des Lösungsraums. Jeder Bildpunkt gibt vielmehr Auskunft über die Konzentrationsgradienten, die auf dem Weg durch die Lösung überstrichen wurden und liefert deshalb nur einen gemittelten Konzentrationsgradienten. In einem Diffusionsbereich, der sich durch eine große Veränderlichkeit des Konzentrationsgradienten, d. h. durch eine starke Krümmung des Konzentrationsverlaufs auszeichnet, sollte diese Ungenauigkeit am stärksten auffallen.

Nimmt man der Einfachheit halber einen konstanten Diffusionskoeffizienten an, so erhält man nach einer analytischen Lösung der Gleichung (A-3) (S.1) für den Konzentrationsgradienten unter den Anfangs- und Randbedingungen der Gleichungen (A-11) und (A-12) (S.4):

$$(B-3) \quad c_p = \frac{c_{p0}}{2} \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \right) = \frac{c_{p0}}{2} \left(\operatorname{erfc} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \right)$$

$$(B-4) \quad \frac{\partial c_p}{\partial x} = \frac{-c_{p0}}{2\sqrt{\pi Dt}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4Dt}}$$

Wir interessieren uns für die Steigung des Konzentrationsgradienten :

$$(B-5) \quad \frac{\partial^2 c_p}{\partial x^2} = \frac{c_{p0}}{\sqrt{\pi Dt}} \cdot \frac{x}{4Dt} \cdot e^{-\frac{x^2}{4Dt}}$$

Im Grenzbereich starker Verdünnung ist die Steigung des Konzentrationsgradienten durch die Wirkung des Exponentialterms klein, um in Richtung größerer Konzentration des Polyelektrolyten zuerst einem Maximalwert zuzustreben und dann bei $x = 0$ den Wert Null anzunehmen. Mit anderen Worten, die auf der Krümmung des Konzentrationsverlaufs beruhenden Abbildungsfehler sollten im Bereich kleiner Polyelektrolytkonzentration nur schwach ausgeprägt sein und erst ab einer bestimmten Konzentration auffallen. Nimmt man eine lineare Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten an, so wird zwar der Konzentrationsgradientenverlauf „verzerrt“ und zusätzlich die Lage seines Maximums verändert [33], die obigen Aussagen bleiben aber grundsätzlich richtig.

Die Lichtstrahlen werden in der Lösung nur eine kleine Strecke in Diffusionsrichtung passieren, wenn große Krümmungsradien, d. h. nach Gleichung (B-1) kleine Brechungsindexgradienten und damit Konzentrationsgradienten vorliegen. Nach Gleichung (B-4) ist dies für große Abstände zur Anfangsgrenze der Fall und damit u. a. für kleine Polyelektrolytkonzentrationen. Beide Beiträge zu Abbildungsungenauigkeiten (Größe des Krümmungsradius und Steigungsverhalten des Konzentrationsgradienten) sind im Bereich kleiner Polyelektrolytkonzentration gering. Diese Argumentation würde die in diesem Konzentrationsbereich durch Lichtstreuungsmessungen bestätigten Resultate von Alexandrowicz [6] (Abbildung (A-1), S.8), der das Schlierenverfahren einschließlich Phasenplatte einsetzt, erklären¹.

Zur Reduzierung der Abbildungsfehler kann man die Strecke des Lichts durch die Lösung im Prinzip beliebig klein wählen, indem man Diffusionszellen mit geringer Tiefe d des Lösungsraums konstruiert. Gleichung (B-2) zufolge zieht dies das Problem der Sichtbarmachung von kleinen Konzentrationsgradienten nach sich, die im Diffusionsprozess wie oben erläutert u. a. im Bereich sehr kleiner Polyelektrolytkonzentration auftreten. Dies mag für Alexandrowicz [6] der Grund für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten erst ab einer bestimmten Mindestkonzentration an Polyelektrolyt gewesen sein, obwohl seine Zelle mit einer Tiefe von 1.2 cm übliche Maße besitzt.

Diese Strategie führt demnach nicht zum Ziel, wenn man sich auch für den Diffusionskoeffizienten bei sehr kleinen Polyelektrolytkonzentrationen interessiert.

Eine alternative Methode Informationen über den Diffusionsprozess zu gewinnen stellt die Messung des Konzentrationsprofils mit Hilfe der Lichtabsorption durch Polyelektrolyte dar [34,35]. Die Einstrahlungswellenlänge richtet sich nach dem Maximum des molekülspezifischen Extinktionskoeffizienten ε . Das Auflösungsvermögen der Methode hängt u. a. von dessen Wert ab. Man bestrahlt die Lösung mit räumlich einheitlicher Intensität und setzt die Gültigkeit des Lambert-Beer-Gesetzes voraus.

Dieses bietet über die messbare Beziehung zwischen Einstrahlintensität I_0 und Lichtintensität I nach Verlassen der Zelle einen Zugriff auf die Polyelektrolytkonzentration:

¹ Diese Begründung setzt allerdings voraus, dass tatsächlich $c_{p0} = 5 \text{ g/l}$ (vgl. Kapitel A.3, S.9).

$$(B-6) \quad I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon c_p d}$$

Das Argument der Exponentialfunktion nimmt für übliche experimentelle Bedingungen genügend kleine Werte an, um eine Linearisierung zu rechtfertigen. Hierdurch ist ein durch eine Linse abgebildetes Intensitätsprofil in guter Näherung proportional zum Konzentrationsverlauf:

$$(B-7) \quad \Delta I = I - I_0 = -I_0 \varepsilon c_p d$$

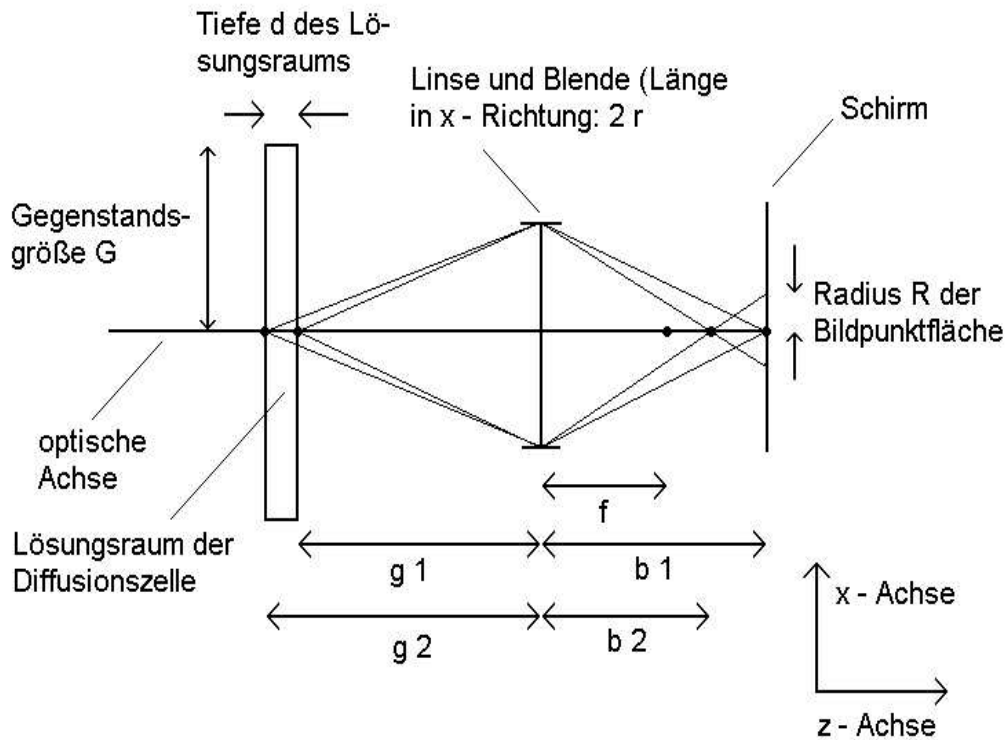
Die Literatur [34,35] beschreibt nur die Bestimmung gemittelter Diffusionskoeffizienten gemäß S.6,7. Die Abbildungsfehler der Methode scheinen dafür verantwortlich zu sein, dass die Möglichkeiten der Gleichung (A-15) (S.5) ungenutzt bleiben.

Die Entfernung eines Schirms von einer Linse (Bildweite b) kann man in Abhängigkeit von dem Abstand der Diffusionszelle von der Linse (Gegenstandsweite g) und der Brennweite f nach der Linsenformel einstellen:

$$(B-8) \quad \frac{1}{f} = \frac{1}{b} + \frac{1}{g}$$

Es lässt sich hierdurch aber nur eine x - y -Ebene (vgl. Abbildung (B-2), nächste Seite) scharf abbilden. Mit wachsender Tiefe $d = \Delta g = g_2 - g_1 > 0$ des Lösungsraums ergibt sich daher eine zunehmende Verschiebung $\Delta b = b_2 - b_1 < 0$ der Bildweite und damit eine wachsende Unschärfe des Bildes. Es soll anhand einfacher Überlegungen abgeleitet werden, unter welchen experimentellen Bedingungen man diesen Abbildungsfehler zumindest stark reduzieren kann.

Dazu wird in einer Prinzipskizze das Bild zweier sich auf der optischen Achse befindlicher Punkte im Lösungsraum der Diffusionszelle betrachtet (Abbildung (B-2)). Beide Punkte liegen an den Begrenzungen des Lösungsraums, sind demnach maximal weit voneinander entfernt. Wenn der linsennahe Punkt scharf auf den Schirm abgebildet wird, entsteht bei der Abbildung des linsenernen Punktes, dessen Bildweite b_2 nach Gleichung (B-8) kleiner ist als b_1 , anstelle eines Bildpunktes eine Bildpunktfläche mit Radius R .

Abbildung (B-2): Unschärfe von Bildpunkten durch die endliche Tiefe d des Lösungsraums

Nach einfacher Rechnung (siehe Anhang 2) ergibt sich für R :

$$(\text{Ah2-7}) \quad R = \frac{r \Delta g f}{g_1 (g_1 - f)}$$

Der Einfluss von R auf die Bildqualität hängt von der Bildgröße B_1 ab. Man kann deshalb als Maß für die Unschärfe einen relativen Fehler R/B_1 einführen. Für die Bildgröße gilt:

$$(\text{B-9}) \quad B_1 = \frac{G \cdot b_1}{g_1}$$

Die Gegenstandsgröße G ist konstant ($G = x_{\text{ob}} = |x_{\text{un}}|$, x_{ob} bzw. x_{un} : obere bzw. untere Begrenzung des Lösungsraums). Unter Verwendung von Gleichung (B-8) substituiert man b_1 und erhält anstelle von Gleichung (B-9):

$$(B-10) \quad B_1 = \frac{G \cdot f}{(g_1 - f)}$$

Mit Gleichung (Ah2-7) erhält man für den relativen Fehler R/B_1 :

$$(B-11) \quad \frac{R}{B_1} = \frac{r \Delta g}{g_1 G}$$

Der relative Abbildungsfehler nimmt in Übereinstimmung mit der Argumentation auf S.18 mit $\Delta g = d$ ab. Man kann aus Gleichung (B-11) ableiten, welche experimentellen Bedingungen neben einer möglichst geringen Tiefe d des Lösungsraums anzustreben sind: Der Blendenradius r ist möglichst klein zu wählen, wohingegen die Entfernung g_1 der Diffusionszelle von der Kameralinse möglichst groß sein sollte.

Stellt man die drei genannten Parameter (d, r, g_1) in geeigneter Weise ein, so sorgt jeder einzelne für eine Abschwächung des Signals für die Polyelektrolytkonzentration. Dies ist insbesondere durch das Interesse am Grenzbereich starker Verdünnung, das eine der Motivationen dieser Arbeit darstellt, nicht hinnehmbar. Diesen Zusammenhang zwischen einer Reduzierung der Abbildungsfehler und damit einhergehender Signalschwächung gilt es zu durchbrechen.

B.2 Entwicklung einer neuen Messmethode

Man kann das im letzten Kapitel genannte Problem auf einfache Weise lösen, indem man ausnutzt, dass leistungsstarke Fluoreszenzfarbstoffe bereits in sehr geringer Anzahl messbare Signale senden können. Eine kovalente Bindung dieser Farbstoffe an Polyelektrolyte ist in vielen Fällen problemlos möglich. Dadurch kann man in den Bereich nahezu „unendlich“ kleiner Tiefen d des Lösungsraums vorstoßen und den Diffusionskoeffizienten im Grenzbereich starker Verdünnung bestimmen. Durch die Markierung schaltet man zugleich einen möglichen Beitrag der räumlich variablen Konzentration an Salzionen (stetiges Donnan-Gleichgewicht, siehe Anhang 1) zu dem Bild des Diffusionsprozesses aus. Dieser Effekt tritt in Messverfahren auf, in denen Brechungsindices eine Rolle spielen. Er ist dort allerdings nur von untergeordneter Bedeutung.

Es wird nach einer Messapparatur gesucht, die es gestattet, unter Erfassung einer möglichst geringen Tiefe d des Lösungsraums den Diffusionsprozess in Form eines räumlichen Fluoreszenzintensitätsprofils sichtbar zu machen. Wenn keine Proportionalität zwischen Intensität und Polyelektrolytkonzentration vorliegt, muss man in einen Konzentrationsverlauf übersetzen. Dies erfordert die Erstellung einer Eichkurve.

Die konfokale Mikroskopie einschließlich möglicher Laserabtastung in alle Richtungen innerhalb der erfassten Ebene (Laser Scanning Confocal Microscopy: LSCM) [36,37] stellt für den Zweck der Arbeit die Ideallösung dar. Nach der Wahl einer zur Diffusionsrichtung parallelen Ebene, die zur Vermeidung von Randeffekten am besten zentral gelegen ist, fährt man mittels eines anregenden Lasers die Diffusionsstrecke langsam ab und misst die resultierende Fluoreszenzintensität. Der kontinuierliche Abtastungsvorgang mit einer punktförmigen Lichtquelle sollte eine gleichmäßige Einstrahlintensität und durch entsprechende Blendenvorrichtungen eine hohe laterale Auflösung sichern. Die Tiefe der detektierten „Ebene“ beträgt in modernen Geräten ca. $7\ \mu\text{m}$. Abbildungsfehler sollten (nahezu) eliminiert werden. Mit dieser Methode sollte man deshalb einer Kopie des Konzentrationsprofils sehr nahe kommen.

Der Aufbau der Apparatur für die konfokale Mikroskopie lässt allerdings nur eine Anregung durch Laserlicht in vertikaler Richtung zu, d. h. die Diffusionsrichtung müsste horizontal sein. Eigene Versuche ergeben bereits bei relativen Dichteunterschieden zwischen zwei Lösungen im Promillebereich Konvektion nach der Kontaktbildung. Dieses Verfahren scheidet demnach aus.

Alternativ kann man durch die Konstruktion einer Diffusionszelle mit einem Lösungsraum von möglichst geringer Tiefe d Abbildungsfehler reduzieren und sich so dem Idealverfahren der LSCM zumindest nähern. Zur Vermeidung von Konvektion zu Beginn des Experiments muss die Diffusion in vertikaler Richtung erfolgen. Die Bestrahlung der Zelle muss deshalb horizontal mit räumlich konstanter Intensität erfolgen. Mit Hilfe einer Kameralinse soll das vertikale Fluoreszenzintensitätsprofil abgebildet werden. In dieser Arbeit wird eine Diffusionszelle gebaut, deren Lösungsraum eine Tiefe d von $0.4\ \text{mm}$ besitzt. Es soll getestet werden, ob man damit unter Verwendung geeigneter Einzelbausteine und unter Berücksichtigung der Vorgaben von Gleichung (B-11) ein Messverfahren entwickeln kann, das Abbildungsfehler vernachlässigbar werden lässt. Als Qualitäts-

nachweis soll der konzentrationsabhängige Diffusionskoeffizient eines fluoreszenzmarkierten Polyelektrolytions nach Gleichung (A-15) (S.5) bestimmt werden.

Als Lichtquelle wird eine Leuchtdiode (LED)² gewählt. Der in dieser Arbeit gewählte Fluoreszenzmarker ist ein Alexafarbstoff (Abbildung (D-1), S.47). Der Hersteller garantiert eine vorzügliche Quantenausbeute bei gleichzeitig außergewöhnlicher Photostabilität. Photochemische Reaktionen des Fluoreszenzfarbstoffs können die Eigenschaften des markierten Makromoleküls verändern und sollten deshalb in Hinblick auf mehrere Messungen innerhalb eines Diffusionsexperiments ausgeschlossen sein³. Lösungen fluoreszenzmarkierter Polyelektrolyte sollten nach einminütiger Belichtung verglichen mit einer unbestrahlten Lösung keine Einbußen an Fluoreszenzvermögen aufweisen. Eigenen Experimenten zufolge besteht der markierte Polyelektrolyt dieser Arbeit den Test.

Der gewählte Fluoreszenzfarbstoff ähnelt auch in kovalent an das Polyelektrolytion gebundener Form bezüglich des Wellenlängenbereichs der maximalen Absorption bzw. Emission dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Zur selektiven Anregung des Farbstoffs wird deshalb vor die LED ein FITC-Filter gestellt. Der Stokes-Shift des Fluoreszenzfarbstoffs beträgt laut Hersteller ca. 30 nm. Hierdurch sollte die Gefahr einer wechselseitigen Anregung der Moleküle untereinander vernachlässigbar sein. Die Kamera darf nur emittiertes Licht detektieren. Deshalb ist ein zweiter Filter der Kameralinse vorgeschaltet. Eigene Vorversuche zeigen seine Effektivität.

Das emittierte Licht wird in dieser Arbeit mit einer CCD-Kamera⁴ detektiert. Nach Gleichung (B-10) darf g_1 nicht zu groß gewählt werden, da gleichzeitig B_1 abnimmt. Dies ist in Hinblick auf das Auflösungsvermögen durch endliche Flächen von Einzelrezeptoren zu beachten. Der eingebaute Chip enthält Pixel mit einer Größe von $11.6 \mu\text{m} \cdot 11.2 \mu\text{m}$. Man berechnet nach Gleichung (B-10) ($G = x_{\text{ob}} = |x_{\text{un}}| \approx 1.0 \text{ cm}$ (vgl. Kapitel C.2, S.31), $f = 1.6 \text{ cm}$, $g_1 \approx 14 \text{ cm}$) für $B_1 \approx 0.13 \text{ cm}$. Der Einfluss dieser Fehlerquelle wird deshalb als völlig vernachlässigbar eingestuft.

² LXHL-LB5C Blue V Star – Lambertian (Philips Lumileds)

³ In dieser einführenden Arbeit werden im Abstand von Stunden mehrere Messungen innerhalb eines Diffusionsexperiments durchgeführt. Nach einer Etablierung der Methode kann die Forderung nach Photostabilität stark gelockert werden, da man nur eine Messung zur Bestimmung konzentrationsabhängiger Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-15) (S.5) benötigt. Streng genommen reicht es dann aus, wenn nur ein Teil der Moleküle die Fähigkeit besitzt, ein Mal Licht zu emittieren. Die gemessene Fluoreszenzintensität darf allerdings nicht zu klein sein, da sonst das Auflösungsvermögen sinkt.

⁴ Image TGi CCD-Kamera (Photonic Research, Salford, UK)

Grundsätzlich sind die Abstände der einzelnen Messbausteine so zu wählen, dass man mit einer Belichtungszeit von ca. 10 Sekunden im mittleren Bereich der von der Kamera detektierbaren Fluoreszenzintensität liegt. Die Entfernung der LED von der Zelle ist im Prinzip beliebig und beträgt in dieser Arbeit ca. 11 cm. Die gewählte Gegenstandsweite g_1 beträgt ca. 14 cm. Es wird grundsätzlich mit der kleinsten zugänglichen Blendenöffnung der Kamera (Blendenzahl: $f/(2r) = 16$) gearbeitet. In Anhang 2 wurden für die genannten Bedingungen sowohl der Radius R der Bildpunktfläche als auch der relative Abbildungsfehler R/B_1 berechnet. Beide sind absolut vernachlässigbar.

Die am Institut bereits vorhandene Ausstattung ermöglicht eine computergestützte Vorgabe beliebiger Belichtungszeiten und die Speicherung der in dieser Zeit von den einzelnen Rezeptoren der Kamera gemessenen Fluoreszenzintensität. Mit einem speziellen Auswertungsprogramm kann man beliebige Schnitte durch die von der Kamera erfasste Bildebene abrufen und ein Fluoreszenzintensitätsprofil in Abhängigkeit von der Pixelnummer erhalten. Für die Zwecke der vorliegenden Arbeit ist ausschließlich der Intensitätsverlauf parallel zur Diffusionsstrecke (in x -Richtung) von Interesse. Die Umrechnung der räumlichen Koordinate (Pixel) in die übliche Einheit (cm) erfolgt durch einen Faktor, der sich aus der bekannten Länge des Lösungsraums in cm und dessen Bildgröße in Pixel ergibt (siehe Fußnote 42 und Gleichung (E-8), S.63).

B.3 Zusätzliche Fehlerquellen

In älteren Lichtabsorptionsexperimenten zur Bestimmung gemittelter Diffusionskoeffizienten (z. B. Abbildung (B-3), nächste Seite, [35]) wurden sowohl das Lampengehäuse als auch die Diffusionszelle thermostatisiert. Die Temperaturkonstanz des Lösungsraums soll die Ausschaltung von Thermokonvektion gewährleisten. Da das Eintreten von Konvektion u. a. von den Abmessungen des Lösungsraums abhängt, sollte diese Störung in der vorliegenden Arbeit ausbleiben (Tiefe d des Lösungsraums: 0.4 mm). Es wird deshalb zusätzlich geprüft, ob man den Diffusionskoeffizienten mit einer Diffusionszelle bestimmen kann, die den natürlichen Temperaturfluktuationen im Messraum ausgesetzt ist. Diese liegen für die eigenen Experimente im Bereich von ± 1 °C um den Mittelwert. Die Größenordnung des ermittelten Diffusionskoeffizienten gibt Aufschluss darüber, ob diese Vereinfachung des experimentellen Aufbaus zulässig ist.

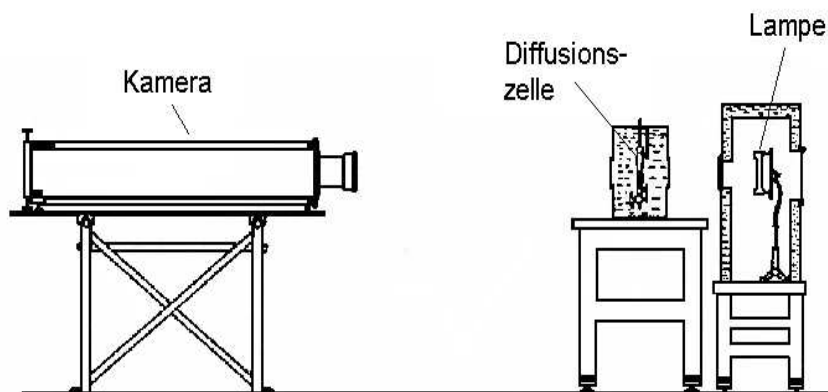


Abbildung (B-3): Älteres Diffusionsexperiment (nach [35])

Die für die eigene Arbeit gewählte Messanordnung ist eine Modifikation der Abbildung (B-3) (siehe Abbildung (B-5), S.26). Bisher nicht erwähnte, grundsätzliche Unterschiede werden im Folgenden beschrieben. Alle Utensilien befinden sich auf einem Messtisch. Die Diffusionszelle (Abbildung (C-1), S.29) wird durch eine Schraubzwinge in vertikaler Ausrichtung gehalten. Anstelle einer Lampe wird mit einer LED gearbeitet. Durch die kurze Belichtungszeit von ca. 10 s ist keine Thermostatisierung der Lichtquelle vonnöten.

Ein Problem stellt die erforderliche Einstrahlung mit gleicher räumlicher Intensität dar. Die Lichtquelle (LED) kann als genähert punktförmig aufgefasst werden. Die abgestrahlte Lichtintensität nimmt deshalb mit dem Abstand a von der Punktquelle mit a^{-2} ab, es soll aber mit der Diffusionszelle eine Fläche mit einer Ausdehnung in x -Richtung von ca. 2.1 cm einheitlich beleuchtet werden. Abbildung (B-4) (nächste Seite) zeigt, inwieweit dies umgesetzt werden konnte. Dabei wurde die LED in mittlerer Höhe des Lösungsraums ($x = 0$) platziert. Die Kamera ist grundsätzlich so ausgerichtet, dass das Bild des Lösungsraums möglichst zentral innerhalb der Gesamtaufnahme liegt (vgl. Abbildung (B-2)). In Abbildung (B-4) ist das Fluoreszenzintensitätsprofil (Einheit: „arbitrary units“, im Folgenden mit a. u. abgekürzt) in x -Richtung (Einheit von w : Pixel) für eine homogene Lösung markierter Proteine (BSA) dargestellt. 100 Pixel entsprechen 1.2 cm im Lösungsraum. Die Höhe in der Lösung nimmt von links nach rechts zu.

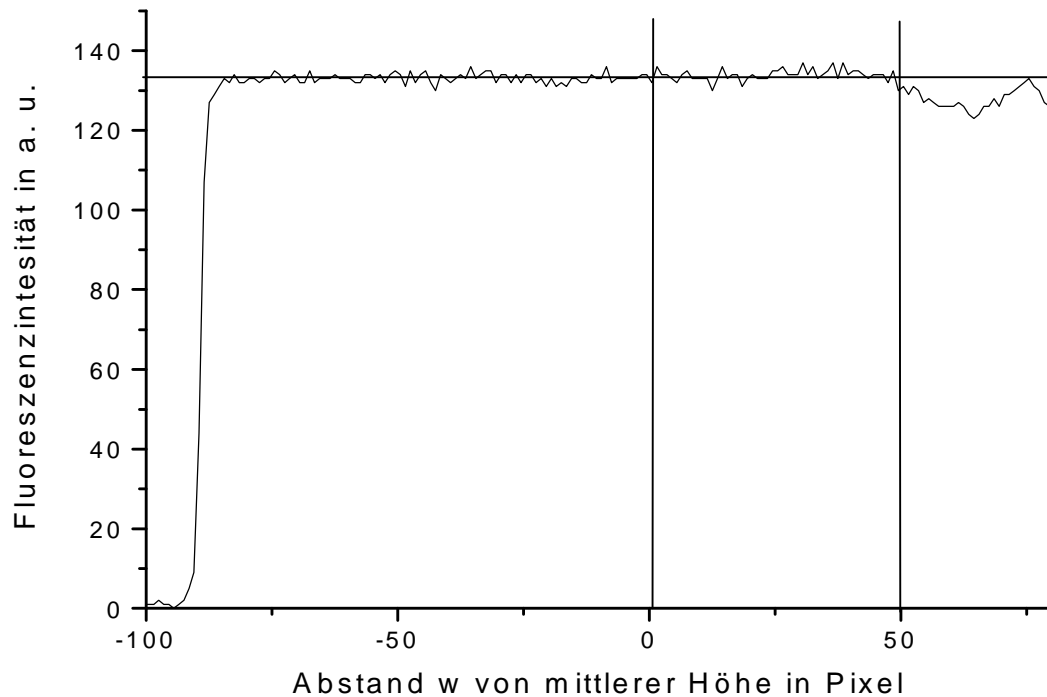


Abbildung (B-4): Intensitätsprofil einer homogenen Lösung markierter Proteine

Die starken Schwankungen in der Fluoreszenzintensität für $w \geq 50$ Pixel liegen in Trübungen innerhalb des Anregungsfilters begründet. Der Diffusionsprozess ist in keinem der nachfolgend dokumentierten Fälle in diesem Bereich angelangt (siehe Abbildungen (E-1) bis (E-4), S.57 ff.). Abgesehen davon wird die Einheitlichkeit der Einstrahlintensität als befriedigend erachtet.

Wegen der Lichtkrümmung bei Vorhandensein von Konzentrationsgradienten (siehe Kapitel B.1, S.14 ff.) ist es auch bei gleichmäßigem Lichteinfall auf die Diffusionszelle nicht möglich eine einheitlich intensive Belichtung in x -Richtung innerhalb der Lösung zu gewährleisten. Die geringe Tiefe d des Lösungsraums von 0.4 mm sollte aber Konsequenzen für die eigene Messmethode verhindern (siehe Kapitel C.6, S.41 ff.).

Beim Experiment ist streng auf eine Minimierung von Reflexionen des emittierten Lichts an Glas- bzw. Metalloberflächen zu achten. Diese dürfen nicht in einen von der Kamera erfassten Strahlengang gelangen. Deshalb umgibt schwarzer Pappkarton die Messanordnung von allen Seiten (Abbildung (B-5), nächste Seite). Innerhalb dieser Begren-

zung wird der Messtisch mit schwarzem Pappkarton abgedeckt, um Reflexionen an dieser Fläche zu vermeiden. Alle Metalloberflächen (LED-Gehäuse, Kamera-Objektiv, Schraubzwinde) werden mit schwarzem Isolierband überklebt. Eine weitere erkannte Fehlerquelle sind Reflexionen an dem Anregungsfilter. Deshalb wird die Diffusionszelle von der Seite bestrahlt und der Anregungsfilter so ausgerichtet, dass emittiertes und an diesem Filter reflektiertes Licht nicht von der Kamera erfasst werden kann. Dies wurde in Vorexperimenten überprüft. Da eine möglichst einheitliche horizontale Belichtung gewahrt bleiben sollte, wurde in dieser Arbeit ein Winkel von ca. 16° zwischen den Geraden Zelle/Kamera und Zelle/LED-Gehäuse gewählt.

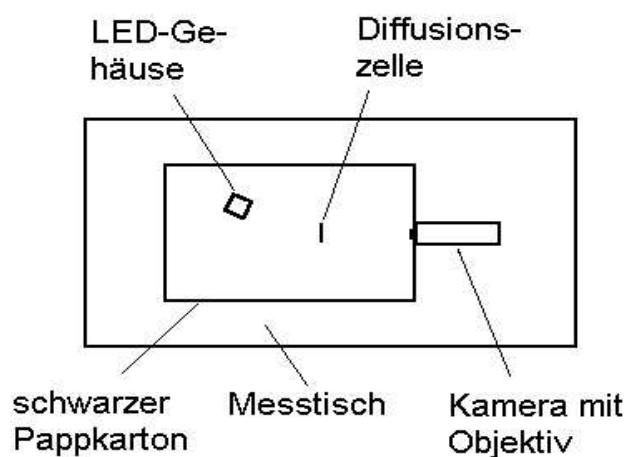


Abbildung (B-5): Blick von oben auf den Messtisch (Prinzipskizze)

Zur Vermeidung von Reflexionen an den äußeren Glasflächen der Diffusionszelle, die nicht im anvisierten Messbereich liegen (vgl. Abbildung (C-1), S.29), wurde zumindest die der Kamera zugewandte Seite der Zelle mit schwarzem Isolierband überklebt. Diese Maskierung verdeckt seitlich und unten kleine Streifen des Lösungsraums. Durch diese Maßnahme werden Randeffekte vermieden, die durch die farblose Kunststoffbegrenzung des Lösungsraums auftreten und einen unerwünschten Beitrag zum Bild liefern können. Totalreflexionen des emittierten Lichts an der Innenseite der den Diffusionsraum begrenzenden Glaswände können nicht vermieden werden. Sie gelangen allerdings nicht in die Kamera.

Reflexionen des Fluoreszenzlichts am Emissionsfilter lassen sich nicht vermeiden. Um überhaupt in den Detektionsbereich der Kamera zu gelangen, muss dieses Licht allerdings nochmals an der Glasoberfläche der Diffusionszelle reflektiert werden. Grundsätzlich dasselbe gilt für die Linse der Kamera. Durch ihre Krümmung ist die von dieser Stelle ausgehende Gefahr einer Beeinflussung der Messdaten durch Doppelreflexion noch geringer. Beide Faktoren scheinen aber nach Abbildung (B-4) bedeutungslos.

C Diffusionszelle und Grenzbildungstechnik

C.1 Problemstellung

Die angestrebte Reduzierung der Abbildungsfehler gibt eine möglichst geringe Tiefe d des Lösungsraums der Diffusionszelle vor. Um dies zu realisieren, wird ein neues Modell entworfen.

Gradientenexperimente liefern häufig zeitabhängige, gemäß Kapitel A.2.2 (S.6,7) gemittelte Diffusionskoeffizienten $D(t)$ [7,24]. Theoretischen Betrachtungen [38,39] zufolge liegt die Ursache in einer Abweichung von der Anfangsbedingung Gleichung (A-11) (S.4). In der genannten Literatur wird für konstante Diffusionskoeffizienten ein zunehmendes „Vergessen“ dieser Ungenauigkeit im Laufe des Diffusionsprozesses nachgewiesen. Tatsächlich sinkt der Diffusionskoeffizient $D(t)$ in den erwähnten Experimenten [7,24] mit der Diffusionszeit t . Diesen kann man gegen die inverse Diffusionszeit t^{-1} auftragen und zusätzlich als Maß für die Abweichung von der Anfangsbedingung eine Nullzeitkorrektur Δt einführen. Unter Verwendung einer empirischen Beziehung lassen sich der „wahre“ Diffusionskoeffizient D und Δt bestimmen [40]:

$$(C-1) \quad D(t) = D \cdot \left(1 + \frac{\Delta t}{t} \right)$$

Die ermittelte Zeitdifferenz Δt ist z. T. erheblich. Dies spricht gegen die Qualität der Anfangsgrenze. In der vorliegenden Arbeit wird auf Korrekturen in einer der Gleichung (C-1) ähnlichen Form verzichtet.

Für die Konstruktion eines neuen Zellmodells steht deshalb neben der Einheitlichkeit innerhalb der Maße des Lösungsraums die Forderung nach einer weitestgehenden Verwirklichung eines stufenförmigen Anfangskonzentrationsprofils zwischen Polyelektrolytlösung und Salzlösung im Focus der Aufmerksamkeit. Unter der Literatur über die bisher eingesetzten Methoden zur Grenzbildung ist besonders eine Vergleichsstudie [41] hervorzuheben.

C.2 Diffusionszelle

Es soll der gesamte Konzentrationsverlauf in x -Richtung erfasst werden (siehe Abbildung (C-1)). Vorder- und Rückseite des Lösungsraums müssen gemäß experimentellem Aufbau (Abbildung (B-5), S.26) eine lichtdurchlässige Front bilden. Die Wahl fällt in dieser Arbeit auf Objektträger (Maße: x -Richtung: 26 mm, y -Richtung: 76 mm, z -Richtung: 1 mm, Abbildung (C-1)). Bezüglich des Materials der anderen Begrenzungen der Diffusionsstrecke hat man im Prinzip Freiheit. Für die laterale Begrenzung des Lösungsraums wurde eine Substanz gesucht, die zwei Objektträger stabil und wasserdicht miteinander verbindet und von außen einen einfachen Zugang für die Grenzbildung zwischen den Lösungen bietet. In idealer Weise können dies Kunststoffe aus der Gruppe der Silikone leisten. Man kann eine Kanüle (Grenzbildungskanüle) problemlos in den Lösungsraum einführen. Die Elastizität dieses Kunststoffs verhindert das Nachfließen der Lösung nach dem Herausziehen der Grenzbildungskanüle aus dem Lösungsraum.

Abbildung (C-1) zeigt eine Prinzipskizze der entwickelten Diffusionszelle. Die Ausrichtung der Zelle entspricht der im Diffusionsexperiment (Messtisch: y - z -Ebene). Die Perspektive B geht aus der Ansicht A durch einen Schnitt oberhalb der Kanüle in der y - z -Ebene der Zelle hervor.

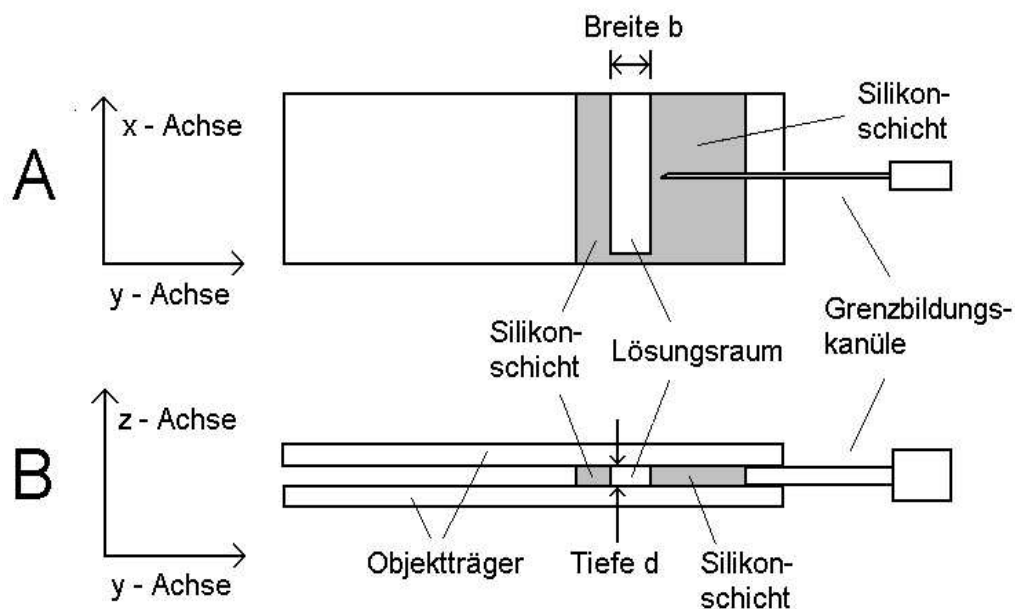


Abbildung (C-1): Prinzipskizze der Diffusionszelle

Optimal zur Bildung der seitlichen Begrenzung des Lösungsraums ist das Gießen eines zähflüssigen, mit der Zeit aushärtenden Silikons als Abdruck präzise vorgegebener Zellmaße. Als Matrix dienen zwei Kanülen⁵, deren Außendurchmesser 0.4 mm und deren Länge 40 mm beträgt. Der konstante Durchmesser der Kanülen sorgt für die einheitliche Tiefe d des Lösungsraums (vgl. Abbildung (C-1)). Die Herstellung der Diffusionszelle verläuft nach folgendem Muster. Zwei kleine aufeinanderliegende Stücke Kopierfolie werden durch zwei Kanülen im Abstand von ca. 5 mm durchstoßen. Die Folienstücke werden anschließend jeweils in Richtung unterschiedlicher Enden der Kanülen gezogen bis sie möglichst weit voneinander entfernt sind. Durch diese Maßnahmen erzielt man die erforderliche konstante Breite b der Diffusionsstrecke ($b \approx 5$ mm). Die Anschlussstücke dieser Kanülen, die zum Aufsetzen auf die Spritze dienen, stören und werden deshalb mit einer Zange entfernt.

Die beiden durch die Folienstücke miteinander verbundenen Kanülen werden so auf einem Objektträger platziert, dass sie bezogen auf Abbildung (C-1) möglichst exakt in x -Richtung weisen und die sich verjüngenden Enden und die Folienstücke nicht auf ihm zu liegen kommen. Dies ist möglich, da die Länge der Kanülen (40 mm) die Maße des Objektträgers in x -Richtung (26 mm) übertrifft. Bezüglich der Lage der beiden Kanülen auf der y -Achse des Objektträgers ist zu beachten, dass durch die Grenzbildungskanüle, die ebenfalls eine Länge von 40 mm besitzt, der gesamte Lösungsraum überbrückt werden muss (siehe Ansicht A in Abbildung (C-1)). Um dies zu ermöglichen dürfen die beiden miteinander verbundenen Kanülen nicht in der Mitte des Objektträgers liegen. Rechts und links der durch die beiden Kanülen vorgegebenen Diffusionsstrecke wird in einem gewissen Abstand der zähflüssige Kunststoff aufgetragen. Anschließend legt man einen anderen Objektträger so auf die beiden Kanülen, dass die beiden Objektträger möglichst vollständig überlappen und fixiert sie durch zwei Klammern. Die lateralen Begrenzungen des Diffusionsraums sind definiert.

Mit Hilfe anderer Kanülen wird von beiden Seiten das aufgebrachte zähflüssige Silikon in Richtung der beiden fixierten Kanülen bewegt. Dies führt man fort bis der Kunststoff blasenfrei beide Kanülen vollständig umschließt. Durch den Druck der Klammern wird ein

⁵ Im medizinischen Handel sind keine Kanülen mit kleinerem Durchmesser zu erhalten. Nach Gleichung (B-11) (S.20) würden sich zwar Abbildungsfehler bei Kanülen mit kleinerem Durchmesser ($\equiv \Delta g$) weiter verringern. Gleichzeitig nimmt aber bezüglich der erforderlichen Einheitlichkeit in der Tiefe d des Lösungsraums die Gefahr eines relativen Fehlers zu.

„Überlaufen“ des Kunststoffes in den Lösungsraum verhindert. Es werden nach der Aushärtungszeit des Silikons, die im Bereich von Tagen liegt, die beiden Stücke Plastikfolie entfernt und die Kanülen soweit herausgezogen, dass man in die durch die Objektträger und den festen Kunststoff begrenzte Öffnung etwas zähflüssiges Silikon einführen kann und die Öffnung dadurch verschließt. Durch diese Maßnahme wird der Boden des Lösungsraums gebildet (vgl. Ansicht A in Abbildung (C-1)).

Je nach Viskosität des verwendeten Ausgangsmaterials ist darauf zu achten, dass der den Boden bildende Kunststoff nicht zu weit in den Lösungsraum „läuft“ und damit die Abmessung der Diffusionsstrecke (x -Richtung) reduziert. Der nach der Aushärtung entstandene Boden entspricht zwar nicht der Idealform (siehe Ansicht A in Abbildung (C-1)), sondern ist schwach gekrümmt. Dies spielt aber keine Rolle, da die Diffusion diesen Bereich nicht erfassen darf (siehe unten). Die für das Diffusionsexperiment zur Verfügung stehende Länge des Lösungsraums in x -Richtung misst ca. 2.3 cm. Um die seitlichen Flanken freizugeben, werden beide Kanülen vollständig herausgezogen. Anschließend wird die Grenzbildungskanüle möglichst genau auf der mittleren Höhe $x \approx 0$ des Lösungsraums horizontal in die Silikonschicht eingeführt und Richtung Lösungsraum bewegt (siehe Ansicht A in Abbildung (C-1)).

Die Diffusionszeit muss so gewählt werden, dass die Randbedingungen der Gleichung (A-12) (S.4) nicht verletzt werden. Übersetzt auf die endlichen Maße der Diffusionszelle lauten sie (x_{ob} , x_{un} : obere bzw. untere Begrenzung des Lösungsraums):

$$(C-2) \quad c_p(x_{un}, t) = c_{p0} \qquad c_p(x_{ob}, t) = 0$$

Wenn man willkürlich einen bewusst groß veranschlagten konstanten Diffusionskoeffizienten D des Polyelektrolytions von $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ zugrundelegt, kann man mit Hilfe der Gleichung (B-3) (S.16) abschätzen, bei welcher Diffusionszeit t Gleichung (C-2) verletzt wird. Ausgehend von der Anfangsgrenze bei $x \approx 0$ stehen in der Zelle in beiden Richtungen mindestens 1.0 cm Diffusionsstrecke zur Verfügung. Erlaubt man an den vertikalen Begrenzungen des Lösungsraums, wobei $x_{ob} = |x_{un}| = 1.0 \text{ cm}$ gesetzt wird, eine Konzentrationsänderung von 0.1 Promille der Anfangskonzentration, so ist nach Gleichung (B-3) (S.16) eine Zeit von etwa 10 Stunden zu veranschlagen. Die maximale Dauer eines Diffusionsexperiments beträgt deshalb in dieser Arbeit 9 Stunden.

C.3 Auswahl des Silikonmaterials

Zur Aushärtung von Silikon mittels einer Quervernetzung von Einzelsträngen sind diese entsprechend funktionalisiert. Häufig wird bei dieser Verknüpfungsreaktion ein Kondensationsprodukt abgespalten. Bei dem im Handel erhältlichen Silikon ist dies meist die Essigsäure. Eigene Versuche zeigen deren starken Einfluss auf die Lösungseigenschaften selbst nach vorangegangener Spülung der Zelle mit destilliertem Wasser. Durch die Dauer des Experiments von mehreren Stunden wird Essigsäure aus der Silikonschicht in die wässrige Lösung diffundieren. Die nach einigen Stunden feststellbaren Konsequenzen sind eine drastische Änderung eines anfangs fast neutralen pH-Wertes der Lösung auf pH 3 und als unmittelbare Folge davon, ein Ausfallen des in dieser Arbeit verwendeten Proteins BSA. Selbst ein mehrtägiger Versuch, die Essigsäure komplett aus einer ca. 1 cm breiten Silikonschicht auszulaugen, schlägt fehl.

Verunreinigungen, die aus der Silikonschicht in die Lösung eingebracht werden, können allerdings nicht nur die Lösungseigenschaften beeinflussen, sondern bei dem physiologisch als Trägermolekül aktiven Protein BSA zu einer Adsorption führen. Diese Neigung umfasst neben Anionen [42] und oberflächenaktiven Substanzen [43,44] auch Alkane [45]. Hierdurch können neben der Nettoladung auch die hydrodynamischen Eigenschaften des Proteins verändert werden. Insbesondere die Nettoladung eines Proteins beeinflusst allen bisherigen Experimenten zufolge das Diffusionsverhalten stark.

Man muss an das Silikon deshalb folgende zusätzliche Ansprüche stellen. Es sollte im Aushärtungsprozess keine Spaltprodukte bilden und im Silikongerüst keine Moleküle enthalten, die an die wässrige Lösung abgegeben werden können. Ideal sind deshalb additionsvernetzende Silikone. Hier arbeitet man mit zwei Komponenten. Die eine enthält Silikonstränge mit Silanseitengruppen, die andere solche mit Vinylseitengruppen⁶. Für eine möglichst quantitative Umsetzung beider Edukte werden die Komponenten nach Anweisung des Herstellers in einem bestimmten Verhältnis gemischt. Zur Sichtbarmachung der vollständigen Durchmischung werden vielfach einer der ursprünglich farblosen Komponenten Eisenoxide zugegeben. Für schlecht zu verarbeitende anfänglich dünnflüssige Mischungen empfiehlt der Hersteller die Zugabe von Füllstoff. Angesichts der oben dargelegten Ansprüche wird auf beides verzichtet.

⁶ In dieser Arbeit wurde Elastosil RT 625 (Komponenten A und B, Wacker Silicones) verwendet.

Es wird nach intensivem Verrühren der beiden farblosen Komponenten so lange gewartet, bis eine streichfähige Konsistenz der Mischung vorliegt.

C.4 Zur Durchführung des Experiments

Die Diffusionszelle wird nach der in Kapitel B.3 auf S.26 beschriebenen Maskierung mit schwarzem Isolierband durch eine unter möglichst geringem Druck greifende Schraubzwinde vertikal gestellt. In Abbildung (C-1) würde die Schraubzwinde am linken Rand der Objektträger zum Einsatz kommen. Eine die Polyelektrolytlösung enthaltende Spritze wird über die aufgesteckte Kanüle durch die obere Öffnung der Diffusionszelle bis kurz vor den Kunststoffboden geführt. Zur Vermeidung ausgeprägter Temperaturdifferenzen innerhalb der Lösung und aus Gründen der Sterilität wird ein Körperkontakt mit der Kanüle vermieden. Auch die vorher mit Aceton gereinigten Glasoberflächen des Lösungsraums werden nicht berührt.

Die Polyelektrolytlösung wird blasenfrei zugespritzt bis sie einen Bereich knapp über der mittleren Höhe $x \approx 0$ des Lösungsraums erreicht hat. Durch die Oberflächenspannung ist die Grenzfläche zwischen Lösung und Luft schwach gekrümmt. Die Grenzbildungschanüle (siehe Ansicht A in Abbildung (C-1)) wird in den Lösungsraum eingeführt und teilt die Lösung in einen kleinvolumigen Überstand und das Polyelektrolytreservoir der unteren Raumhälfte. Sie dringt mit dem sich verjüngenden Ende vollständig in die gegenüberliegende Silikonschicht ein.

Eine zweite Spritze enthält die Salzlösung und wird über eine aufgesteckte Kanüle in die Öffnung des Lösungsraums eingeführt. Sie soll dort nur soweit hineinreichen, dass man durch vorsichtiges Zuspritzen die überstehende Polyelektrolytlösung überschichten kann. Dies erfolgt, bis das gesamte Volumen des Lösungsraums mit Lösung gefüllt ist. Anschließend muss man den in der oberen Raumhälfte unerwünschten Polyelektrolyten entfernen. Dies geschieht durch langsames weiteres Zuspritzen von ca. 1 ml der Salzlösung. Dadurch läuft zwar die Diffusionszelle über, aber der Polyelektrolyt wird vollständig aus der oberen Raumhälfte ausgeschwemmt. Dies und das Erfordernis einer durch den Spülvorgang unverletzten Homogenität der Polyelektrolytlösung werden durch die Aufnahme eines Fluoreszenzintensitätsprofils überprüft. Nach positivem Befund werden auf

den äußeren Glasoberflächen verbliebene Wassertropfen mit einem saugfähigen Tuch vorsichtig entfernt.

Die Dauer des Experiments von mehreren Stunden macht eine Versiegelung der Lösung an der Öffnung des Lösungsraums notwendig. Eine Verdampfung des Lösungsmittels führt zu einer Aufkonzentrierung der Salzlösung. Eine einfache Methode zur Abdichtung stellt das Überschichten der wässrigen Lösung mit einem wenig flüchtigen organischen Lösungsmittel dar. Dieses sollte in Reinform vorliegen und in Wasser in sehr guter Näherung unlöslich sein.

Versuche mit Silikonöl weisen allerdings mehrere gewichtige Nachteile auf. Erstens bietet diese Methode keinen dichten Abschluss. Zwischen dem organischen Lösungsmittel und dem Silikon der lateralen Begrenzung der Zelle befindet sich stets ein Wasserfilm [46], der eine Brücke zwischen der wässrigen Lösung und Luft bildet. Dadurch kann Wasser aus der Lösung verdampfen. Diesen Vorgang kann man durch einen im Laufe von Stunden sinkenden Pegel der Wasser-Öl-Grenzfläche nachweisen. Zweitens sollte eine Diffusionszelle nach ausreichender Spülung mehrfach Verwendung finden können. Das Silikonöl ist aus dem durch die geringe Tiefe d schwer zugänglichen Lösungsraum nicht mehr restlos zu entfernen. Gleiches gilt, wenn man Silikonfett verwendet.

Alternativ kann man für eine mechanische Abdichtung sorgen. Dies ist der in dieser Arbeit beschrittene Weg. Vor der Befüllung der Diffusionszelle wird ein Streifen handelsüblicher Aluminiumfolie so geschnitten, dass er den Zugang zum Lösungsraum gerade vollständig abdeckt. Dieser Streifen wird auf der klebbaren Seite eines größeren schwarzen Isolierbandes fixiert. Die oberen Kanten der Objektträger werden mit einem Tuch von Fettresten gesäubert und nur ein Teil des Isolierbandstreifens dort unter Freilassung der Öffnung des Lösungsraums stabil so befestigt, dass nach dem Befüllungsvorgang und vor dem Start des Diffusionsexperiments durch ein „Umklappen“ des anderen Teils diese Öffnung durch die Aluminiumfolie passgenau geschlossen wird. Mit Hilfe der freien klebenden Flächen des Bandes wird die Folie dort fixiert. Diese Maßnahme senkt die Wasserverdampfung drastisch und ist für die maximale Versuchsdauer von 9 Stunden vollkommen ausreichend. Durch den nicht absoluten Verschluss kann Salzlösung nachfließen, um das freiwerdende Volumen beim Herausziehen der Grenzbildungskanüle aus dem Lösungsraum aufzufüllen.

Der gesamte Prozess von der Einführung der Grenzbildungskanüle in den Lösungsraum bis zum Start des Diffusionsexperiments sollte keinen zu großen Zeitrahmen beanspruchen, da Dimerisierungsreaktionen des Proteins BSA in Gegenwart von Metallen möglich sind [47]. BSA besitzt eine freie Thiolgruppe, die durch Metalle unter Bildung einer Disulfidbrücke oxidiert werden kann. Deshalb wird bei der Durchführung des Experiments auf möglichst geringe Kontaktzeiten des Proteins mit Metalloberflächen geachtet.

Nach dem Verschluss des Lösungsraums wird die Diffusionszelle auf dem Messtisch vorsichtig horizontal in Richtung einer vorher bestimmten und in allen Experimenten gleichen Position bewegt und dort abgestellt (siehe Abbildung (B-5), S.26). Diese zeichnet sich dadurch aus, dass die in Abschnitt B genannten Anforderungen bestmöglich erfüllt werden. Liegt durch die Spülung entlang der Silikonoberfläche ein Wasserfilm vor, der bis zu dem die Zelle unten begrenzenden, schwarzen Pappkarton reicht (vgl. Ansicht A in Abbildung (C-1)), so saugt der Karton die Lösung aus der Zelle. Vorsorglich wird dieses Material deshalb am Standort der Diffusionszelle mit schwarzem Isolierband versiegelt und gegebenenfalls für dessen Trockenheit gesorgt.

Zum Start des Diffusionsexperiments zieht man die Grenzbildungskanüle langsam in einem Zug horizontal so weit heraus, bis die Kanülenspitze vollständig in die laterale Kunststoffbegrenzung zurückgezogen ist. Anschließend nimmt man das Anfangsintensitätsprofil auf, das für die Experimente mit einer 10^{-3} -molaren Salzlösung gut reproduzierbar in die Nähe der Anfangsbedingung Gleichung (A-11) (S.4) kommt (siehe Kapitel C.6). Die Diffusionszelle bleibt wie die gesamte Messanordnung im Laufe eines Experiments unberührt.

C.5 Anmerkungen zur Grenzbildungstechnik

Die Tiefe d des Lösungsraums wird durch Kanülen definiert. Dies lässt erwarten, dass die Grenzbildungskanüle, die den gleichen Durchmesser besitzt, beide Lösungshälften vollständig gegeneinander abdichtet. Tatsächlich dringt aber Salzlösung in die Polyelektrolytlösung ein, wenn man mit gewohnter Geschwindigkeit eine einmolare Salzlösung zuspritzt.

Es ist demnach auf beiden Seiten zwischen Glaswand und Kanüle⁷ ein Leck vorhanden (Abbildung (C-2)):

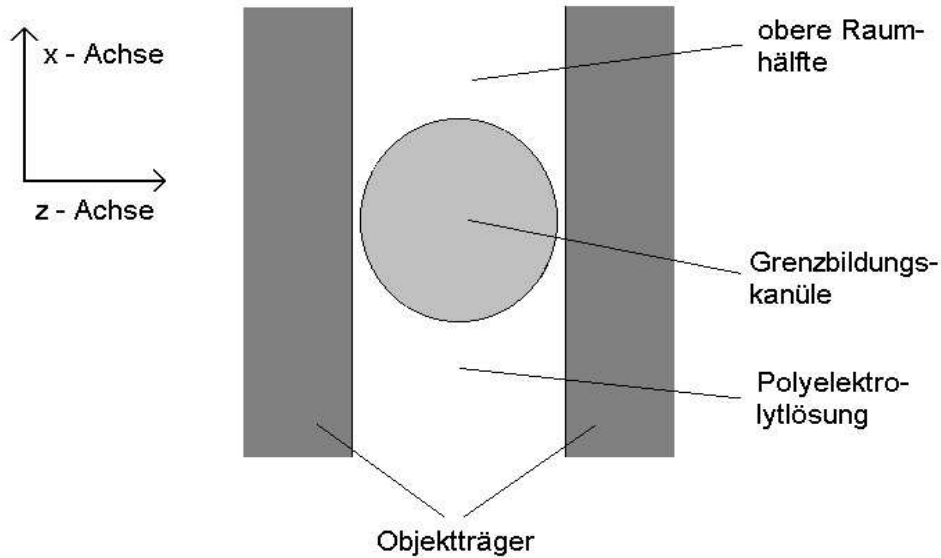


Abbildung (C-2): Prinzipskizze des Lösungsraums

Nach Abbildung (C-2) sollte beim Zuspritzen der Salzlösung diese stets z. B. links in die Polyelektrolytlösung ein- und rechts wieder ausströmen können. Dies wird in salzärmerer Lösung entweder durch Dichteunterschiede zwischen beiden Lösungen oder Salzefekte bzw. beide gemeinsam verhindert. Zur Herstellung der Polyelektrolytlösung wird der Polyelektrolyt der Salzlösung als Feststoff zugegeben (siehe Anhang 6). Da mit einer Polyelektrolytkonzentration von 4 g/l gearbeitet wird, bewegt sich der relative Dichteunterschied zwischen beiden Lösungen lediglich im Promillebereich.

Der Einfluss des Salzgehalts wurde bei einem pH-Wert von 6.5 durch eine Versuchsreihe beginnend mit einer 10^{-3} -molaren Salzlösung untersucht. Die Salzkonzentration wurde bis zur einmolaren Lösung jeweils um den Faktor 10 erhöht. Die absoluten Dichteunterschiede und alle übrigen Lösungsparameter waren in allen Experimenten gleich. Es wurde stets mit derselben Zelle gearbeitet. Auch die Position der Grenzbildungs-kanüle im Lösungsraum sollte für alle Versuche gleich sein, da sie beginnend mit der am

⁷ Die Kanüle wird als geschlossene Fläche dargestellt. Eigene Versuche ergeben, dass ihr Lumen wegen des geringen Durchmessers keine Rolle spielt.

schwächsten konzentrierten Salzlösung für die nachfolgenden Experimente jeweils nur soweit herausgezogen wurde, bis die Spitze gerade vollständig in der Silikonschicht verschwindet. Das Dichtungsleck sollte demnach zumindest in Näherung stets die gleichen Ausmaße besitzen. Die Strömungsgeschwindigkeit beim Zuspritzen der Salzlösung war in den einzelnen Experimenten näherungsweise gleich. Beim Spülvorgang zur Entfernung des Polyelektrolyten aus der oberen Raumhälfte erwies sich die Schrankenfunktion der Grenzbildungschanüle bis zu einer 0.1-molaren Salzlösung als sehr zuverlässig. Das beschriebene Eindringen einer einmolaren Salzlösung in die Polyelektrolytlösung lässt sich durch sehr langsames Zuspritzen verhindern und führt deshalb für sich genommen nicht zu einem Versagen der Grenzbildungstechnik. Der Einfluss des Salzgehalts soll im Folgenden erläutert werden.

Die Glaswand besitzt durch den Aufbau aus einem Silicatgerüst ein Oberflächenpotential, das bei dem pH -Wert der Lösung in der Größenordnung von -90 mV liegt [48,49]. Die Kanülenoberfläche ist durch eine bei Metallen stets vorhandene Oxidschicht ebenfalls negativ geladen [48,50]. Im Falle einer KCl-Lösung kann man eine Adsorption dieser Ionen an beiden Wänden wohl ausschließen. Die Reichweite der Ionenwolke (geschwärzter Bereich in Abbildung (C-3)) in den Lösungsraum hinein ist eine Funktion der Salzkonzentration [51,52,53]:

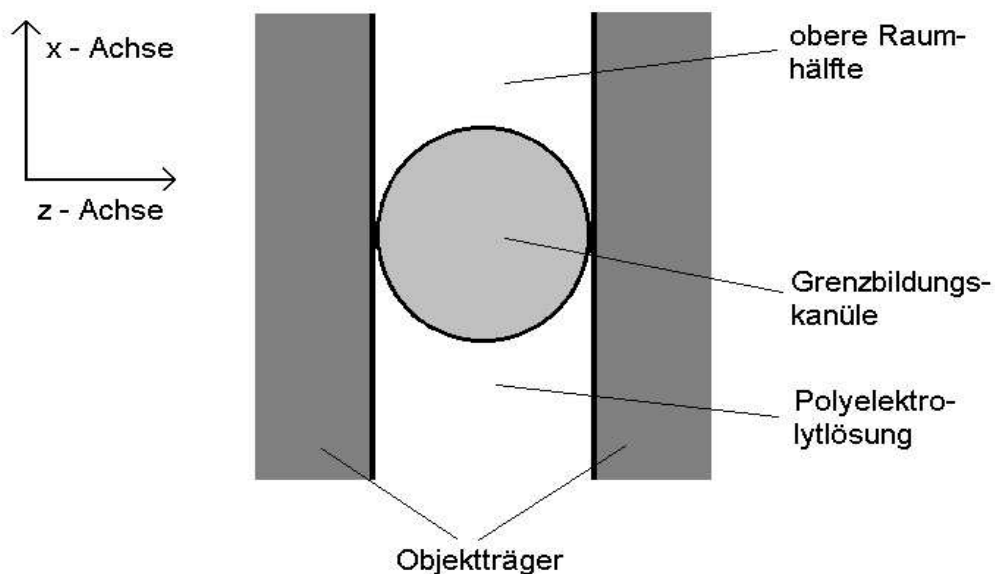


Abbildung (C-3): Erklärung für die Dichtungsfunktion der Grenzbildungschanüle

Sie soll durch die Debye-Länge κ^{-1} (siehe Gleichung (D-13), S.52) charakterisiert werden. Im Unterschied zu Abbildung (C-2) erkennt man in Abbildung (C-3) die mögliche Brückenfunktion der Ionenwolken.

Durch das nicht exakt vertikale Zuspritzen der Salzlösung greifen einseitig, z. B. an der linken Glaswand der Abbildung (C-3) Scherkräfte an, die zu einer kleinen Verschiebung der Raumladungsschicht nach unten führen. Diese pflanzt sich praktisch unmittelbar entlang der Ionenwolke über die Kanüle bis zur Raumladungsschicht der rechten Glaswand fort. Das resultierende Strömungspotenzial führt zu einer elektrischen Stromdichte, die dem Strömungsstrom entgegengerichtet ist und dadurch die Lösungsschicht der Ionenwolke weitgehend immobilisiert. Man kann anschaulich von einem Einziehen der Glas- bzw. Kanülenwand um die Länge κ^{-1} in den Lösungsraum hinein sprechen. Je geringer die Salzkonzentration der Lösung ist, desto größer ist κ^{-1} und damit die Reichweite der Immobilisierung. Offensichtlich wird dadurch das Leck bis zur 10^{-1} -molaren Salzlösung ausreichend versiegelt (vgl. Abbildung (C-3)), wenn man diese mit gewohnter Geschwindigkeit zuspritzt.

Zusätzlich wurde das Anfangsintensitätsprofil in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersucht. Das Herausziehen der Grenzbildungschanüle erfolgte stets mit näherungsweise gleicher Geschwindigkeit. Beginnend mit der 10^{-3} -molaren Salzlösung zeigen die Anfangsintensitätsprofile bis einschließlich der Konzentration von 10^{-1} mol/l vergleichbare Qualität. Bei der einmolaren Salzlösung kann auch ein Herausziehen der Grenzbildungschanüle mit deutlich reduzierter Geschwindigkeit einen wellenförmigen Anfangsgrenzverlauf in y -Richtung nicht verhindern (vgl. Abbildung (C-1)). Die Anfangsbedingung wird in einem nicht zu akzeptierenden Maß verletzt. Die in der vorliegenden Arbeit eingeführte Grenzbildungstechnik versagt demnach für diese Salzkonzentration.

Beim Zurückziehen der Grenzbildungschanüle werden die angereicherten Gegenionen und damit die gesamte umgebende Raumladungsschicht mitgezogen, die in Abbildung (C-4) der folgenden Seite geschwärzt eingezeichnet ist⁸. Wird die Grenzbildungschanüle in die Silikonschicht zurückgezogen, staut sich Lösung an der Silikonoberfläche und führt dort zu einer Druckerhöhung, die eine Verschiebung der Lösung bewirkt. Sie erfolgt an den Ort, der durch den Rückzug der Kanüle frei wird (siehe gekrümmte Pfade auf

⁸ Die Ionenwolke der Glaswand ist nicht eingezeichnet, da sie in der Erklärung keine Rolle spielt.

beiden Seiten der Kanüle in Abbildung (C-4)). Zur Auffüllung des entstehenden Raumes steht oberhalb der Kanüle zusätzlich die der Schwerkraft folgende nachfließende Salzlösung zur Verfügung (senkrechter Pfeil in Abbildung (C-4)). Durch das kontinuierliche Herausziehen der Grenzbildungschanüle fließen die beiden Lösungen aneinander entlang und sorgen für einen glatten, zur y -Achse parallelen Grenzverlauf.

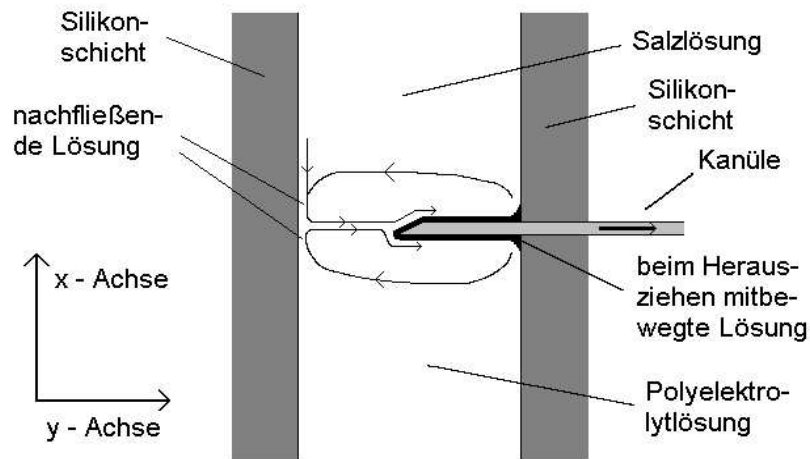


Abbildung (C-4): Prinzipskizze zur Bildung der Grenzfläche

In makroskopischer Form ist ein ähnliches Prinzip in einer vollständig anders konzipierten Diffusionszelle verwirklicht worden [54]. Dort lässt man zwei Flüssigkeiten gegeneinander strömen und die Zelle durch eine gemeinsame seitliche Öffnung verlassen. Die Strömungsgrenzlinie zwischen beiden Lösungen stellt die Anfangsgrenze im Diffusionsexperiment dar, das mit dem abrupten Schließen dieser Öffnung beginnt. Es ergeben sich aber Probleme bei der Abdichtung. Weiterhin wird durch das seitliche Anbringen der Öffnung das Gebot einer einheitlichen Breite b der Diffusionsstrecke verletzt.

Je dicker die Ionenwolke um die Kanüle ist, desto stärker ausgeprägt ist die in Abbildung (C-4) eingezeichnete Konvektion. Mit zunehmender Salzkonzentration werden beim Herausziehen der Kanüle immer kleinere Lösungsvolumina bewegt. Bei einer Konzentration von 1 mol/l bricht daher die von oben nachfließende Salzlösung in die ruhende Polyelektrolytlösung ein und führt zu einem wellenförmigen Verlauf der Grenzlinie.

Als Fazit dieser Messreihe kann man festhalten, dass der Salzgehalt der Lösung ein entscheidender Faktor für den Erfolg der eingeführten Grenzbildungstechnik ist. Die in den Experimenten der Arbeit vorliegenden geringen absoluten Dichteunterschiede zwischen beiden Lösungen vermögen alleine nicht beim Herausziehen der Grenzbildungs-kanüle den Einstrom von Salzlösung in die Polyelektrolytlösung zu verhindern. Zur Bestimmung konzentrationsabhängiger Diffusionskoeffizienten in salzreichen Lösungen könnte man auf eine größere Konzentration c_{p0} im Polyelektrolytreservoir ausweichen und prüfen, ob die Stabilisierung der Grenzfläche ausschließlich durch Dichteunterschiede zwischen beiden Lösungen erreicht werden kann⁹.

C.6 Anfangsintensitätsprofil

Das Diffusionsexperiment findet zwischen einer 10^{-3} -molaren KCl-Lösung und einer fluoreszierenden Proteinlösung gleichen Salzgehalts statt. Abbildung (C-5) zeigt eine Aufnahme des Lösungsraums unmittelbar nach dem Herausziehen der Grenzbildungs-kanüle. Sie geht aus dem Originalbild durch Farbumkehr hervor. Dies geschieht, weil dann die Qualität der Anfangsgrenze besser beurteilt werden kann.

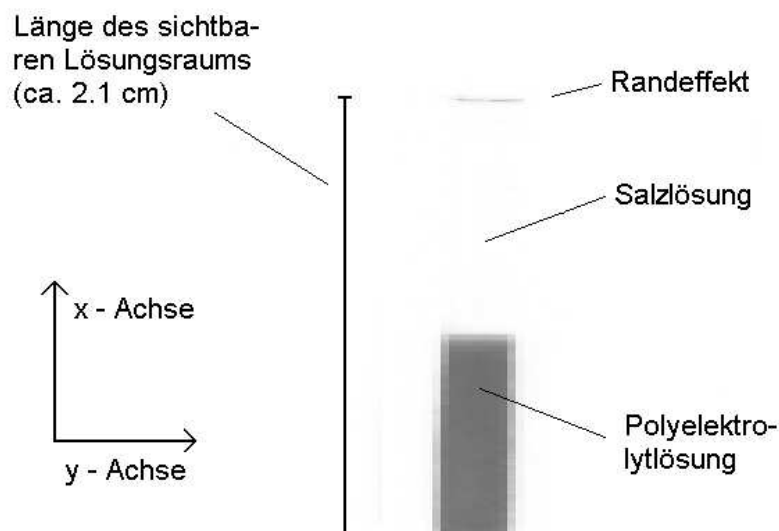


Abbildung (C-5): Aufnahme des Lösungsraums zu Beginn eines Diffusionsexperiments

⁹ Der Hochsalzbereich erscheint allerdings für die Messmethode ohnehin wenig attraktiv, da Diffusionskoeffizienten von Polyelektrolyten dort durch die Abschirmung elektrostatischer Wechselwirkungen nur in geringem Maße konzentrationsabhängig sind.

Um einen eindimensionalen Diffusionsprozess untersuchen zu können, muss die Anfangsgrenze parallel zur y -Achse verlaufen. Die Abbildung zeigt abgesehen von einem kaum wahrnehmbaren Schleier, dass diese Forderung erfüllt werden konnte.

Das den Lösungsraum oben abschließende Isolierband enthält einen Streifen Aluminiumfolie, die von dem emittierten Licht der Polyelektrolytlösung erreicht werden kann. In dem in Abbildung (C-5) dargestellten Experiment ist die x - y -Ebene an der oberen Kante des kameranahen Objektträgers nicht mit diesem Isolierband überklebt. Deshalb kann entweder vom Rand der Aluminiumfolie oder von der Kante des Objektträgers Fluoreszenzlicht in einen von der Kamera erfassten Strahlengang gelangen (Randeffekt in Abbildung (C-5)). Es wird deshalb eine zusätzliche schwache Emissionsquelle vorgeschaltet. Hierdurch kann man die obere Begrenzung des Lösungsraums erkennen.

Der Salzlösungsraum erscheint in der Abbildung größer als der Polyelektrolytlösungsraum. Tatsächlich sind beide näherungsweise gleich groß, aber schwarzes Isolierband auf der Glasoberfläche verdeckt einen Teil der Polyelektrolytlösung in x -Richtung. Die Länge des sichtbaren Lösungsraums beträgt ca. 2.1 cm. Emittiertes Licht wird beim Austritt aus der Lösung an den Kanten des Isolierbandes gebeugt. Dadurch erscheint zwar in Abbildung (C-5) das Bild dieser Grenzen scharf, aber insbesondere lateral durch eine Bande schwacher Fluoreszenzintensität eingerahmt.

Aus einem Schnitt in x -Richtung durch den Lösungsraum der Abbildung (C-5) geht Abbildung (C-6) (nächste Seite) hervor (100 Pixel entsprechen 1.2 cm Lösungsraum). Sie zeigt das quantitative Fluoreszenzintensitätsprofil zu Beginn eines Diffusionsexperiments. Zum Vergleich ist ein stufenförmiges Anfangsprofil überlagert. Die Beugung des Fluoreszenzlichts an der Kante des Isolierbandes, das den sichtbaren Lösungsraum unten begrenzt, zeigt sich an der Abweichung des Intensitätsverlaufs von der Stufenform.

Ausgehend von einem Plateau der Fluoreszenzintensität erkennt man in Abbildung (C-6) einen leichten Anstieg in Richtung Anfangsgrenze. Eine uneinheitliche Beleuchtung durch die LED ist wohl auszuschließen, da die Fluoreszenzintensität einer homogenen Lösung markierter Proteine in der Umgebung der Stelle $w = 0$ keine Auffälligkeiten zeigt (siehe Abbildung (B-4), S.25). Nach Kapitel B.1 (S.14 ff.) ist bei Vorliegen eines Konzentrationsgradienten in x -Richtung eine vollständig homogene Bestrahlung des Lö-

sungsraums selbst bei der in dieser Arbeit vorliegenden Tiefe d von nur 0.4 mm nicht möglich. Insbesondere in Bereichen einer starken Krümmung des Konzentrationsverlaufs sollte eine uneinheitliche Belichtung in x -Richtung auffallen.

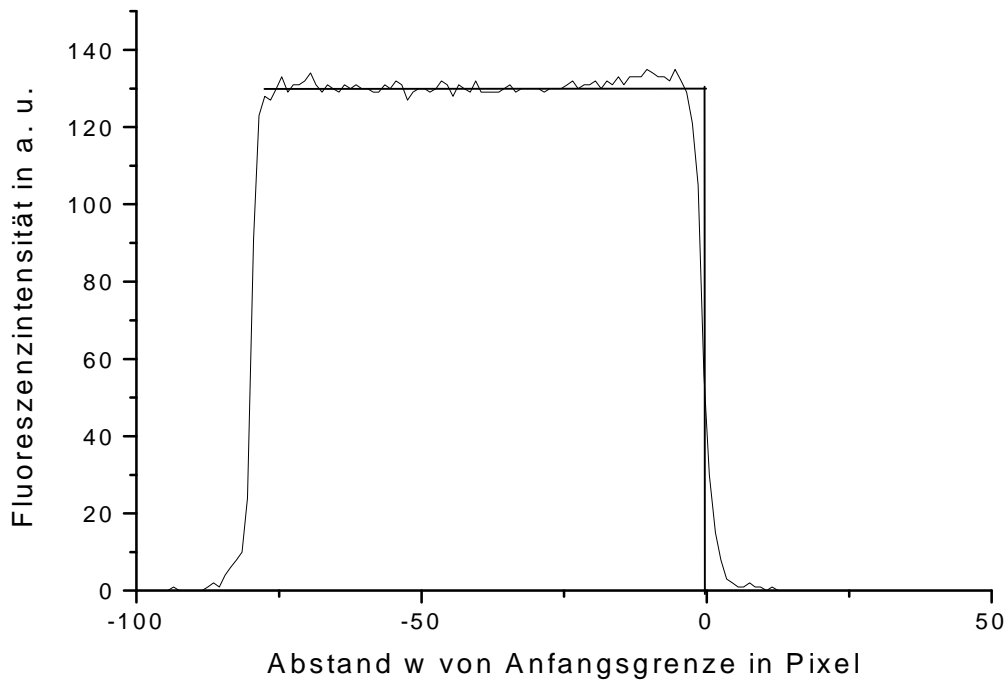


Abbildung (C-6): Anfangsintensitätsprofil einer fluoreszierenden Proteinlösung

Geht man in Abbildung (C-6) ausgehend von $w = 0$ in den Bereich $w < 0$, so nimmt der Betrag der Intensitätssteigerung, die in dieser Arbeit (siehe Gleichung (E-5), S.61) proportional zum Konzentrationsgradienten des Proteins ist, innerhalb weniger Pixel ab. Horizontal einfallende Lichtstrahlen werden deshalb immer schwächer in Richtung Polyelektrolytlösung gekrümmt und sorgen durch die resultierende Überlagerung für eine örtliche Überbelichtung, die sich mit dem Abstand von der Quelle der Lichtkrümmung, dem Konzentrationsgradienten, verringert. Die Exzessbestrahlung spiegelt sich in der beobachteten verstärkten Emission wider.

Legt man einen konstanten Diffusionskoeffizienten des Polyelektrolyten zugrunde, so gibt Gleichung (B-5) (S.16) Auskunft über die Krümmung im Konzentrationsverlauf. Die Diffusionszeit t steht jeweils im Nenner der Argumente. Im Laufe des Diffusionsprozesses nimmt deshalb die Krümmung des Konzentrationsprofils ab. Gleichzeitig nehmen

nach Gleichung (B-4) (S.16) auch die Konzentrationsgradienten, die nach Gleichung (B-1) (S.15) ursächlich an der Lichtkrümmung im Lösungsraum beteiligt sind, mit der Diffusionszeit ab. Um Fehler durch den Effekt der Lichtkrümmung gering zu halten, sollte man diesen Aspekt beachten. Als minimale Diffusionszeit werden in dieser Arbeit deshalb 5 Stunden angesetzt.

Die Ausprägung der Lichtkrümmung hängt von der individuellen Struktur des Anfangskonzentrationsprofils ab, die in jedem Experiment zwar ähnlich aber nicht identisch ist. Die Auswirkungen auf das Anfangsintensitätsprofil können deshalb sogar völlig verschwinden, weil im Plateaubereich ohnehin Intensitätsschwankungen vorliegen. Dies soll mit Abbildung (C-7), die aus einem anderen Experiment in einer salzarmen Lösung bei ansonsten gleichen Bedingungen stammt, gezeigt werden:

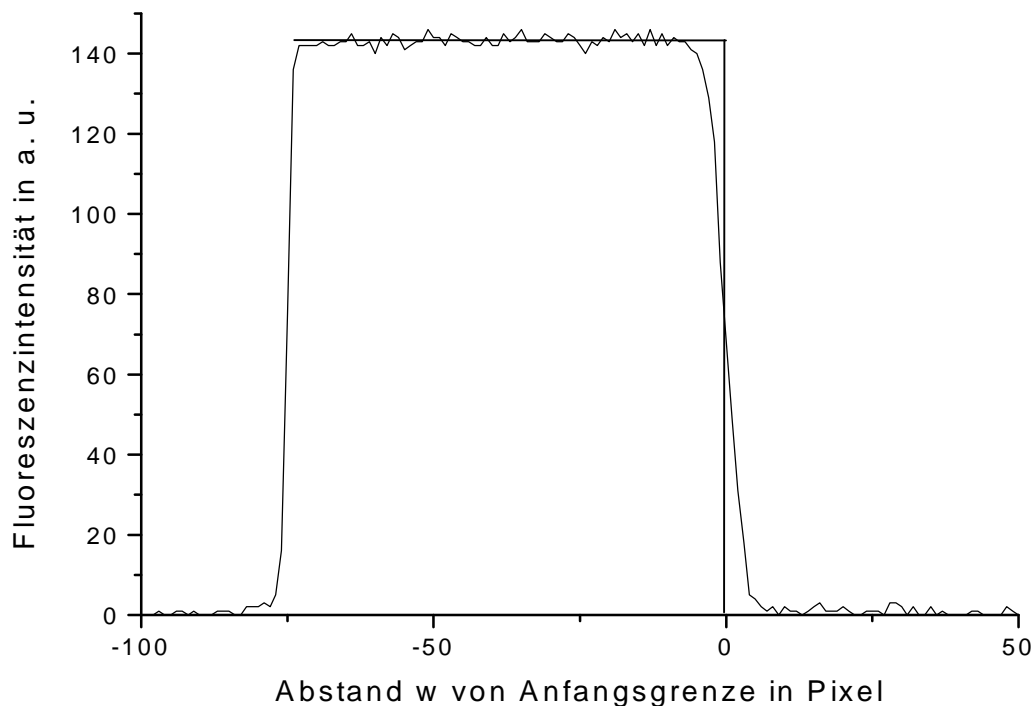


Abbildung (C-7): Anfangsintensitätsprofil einer fluoreszierenden Proteinlösung

Im Bereich der Salzlösung findet man Abweichungen von der Nulllinie. Diese stellen lediglich ein Grundrauschen dar und sind keine Signale für Verunreinigungen.

D Fluoreszenzmarkierung und Polyelektrolyteigenschaften

D.1 Modellpolyelektrolyt

In dieser Arbeit soll exemplarisch an einem Polyelektrolyten getestet werden, ob es gelingt, Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-15) (S.5) zu bestimmen. Dieses Vorgehen ist allerdings nur sinnvoll, wenn die einzelnen Polyelektrolytionen bezüglich der Eigenschaften, die den Diffusionskoeffizienten bestimmen, gleich sind. Um diese kennen zu lernen, gehen wir von der verallgemeinerten Stokes-Einstein Gleichung aus. Dabei sollen in Einklang mit Kapitel A.1 (S.3) alle Abweichungen von der Idealität der Lösung in eine effektive Nettoladungszahl $z_{p,eff}$ des Polyelektrolytions als anpassbarem Parameter eingehen:

$$(D-1) \quad D = \frac{m \cdot \partial \pi / \partial c_p}{\xi_0}$$

c_p : Massenkonzentration des Polyelektrolytions

m : Masse des Polyelektrolytions

π : osmotischer Druck

ξ_0 : Reibungskoeffizient des Polyelektrolytions in idealer Lösung

Es wird nur der aus dem postulierten Donnan-Gleichgewicht resultierende Beitrag zu $\partial \pi / \partial c_p$ berücksichtigt¹⁰ (siehe Anhang 1). Man erhält dann für $|z_{p,eff}| c_p / 2M \ll c_s$ und $z_{p,eff} = \text{konstant}$ (Gleichung (Ah1-8), S.85):

$$(D-2) \quad \frac{\partial \pi}{\partial c_p} = \frac{k_B T}{m} (1 + k c_p)$$

$$(D-3) \quad k = \frac{|z_{p,eff}|^2}{2 M c_s}$$

k_B : Boltzmann-Konstante, $k_B = 1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K

$z_{p,eff}$: effektive Ladungszahl des Polyelektrolytions

¹⁰ Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom Donnan-osmotischen Druck π

c_s : Referenzsalzkonzentration in mol/l

M : Molare Masse des Polyelektrolytions

Setzt man die Gleichungen (D-3) und (D-2) in Gleichung (D-1) ein, so erhält man:

$$(D-4) \quad D = \frac{k_B T}{\xi_0} \left(1 + \frac{|z_{p,\text{eff}}|^2}{2 M c_s} c_p \right)$$

Durch Gleichung (D-4) lässt sich die häufig postulierte lineare Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten bis in den Grenzbereich starker Verdünnung erklären. Bei verschwindender Polyelektrolytkonzentration ergibt sich:

$$(D-5) \quad D_0 = \frac{k_B T}{\xi_0}$$

Gleichung (D-4) macht deutlich, dass die einzelnen Polyelektrolytionen (möglichst) exakt gleiche Eigenschaften hinsichtlich des Reibungskoeffizienten ξ_0 und der effektiven Nettoladungszahl $z_{p,\text{eff}}$ besitzen sollten. Deshalb sollte die Nettoladungszahl z_p für alle Polyelektrolytionen gleich sein. Die natürliche Synthese kann beide Bedingungen (gleiche ξ_0 und z_p) erfüllen. Bei synthetischen Polyelektrolyten erhält man Streuungen um einen Mittelwert der Kettenlänge. Mit dem Polymerisationsgrad Z nehmen zwar sowohl der Reibungskoeffizient ξ_0 als auch die Nettoladungszahl z_p des Polyelektrolytions zu. Beide Effekte gleichen sich aber in aller Regel nicht aus. Nach Gleichung (D-4) resultiert daraus eine Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von Z . Streuungen im Polymerisationsgrad müssen deshalb bei synthetischen Polyelektrolyten durch Fraktionierungsmaßnahmen zumindest auf ein Minimum reduziert werden, um die Auswertung eines Gradientenexperiments nach Gleichung (A-15) (S.5) zu rechtfertigen. Es ist allerdings zweifelhaft, ob dies mit einem vertretbaren Aufwand in ausreichender Weise gelingt. Deshalb wird in dieser Arbeit ein natürlicher Polyelektrolyt verwendet, der einen einheitlichen Polymerisationsgrad besitzt.

Nach Kapitel B.2 (S.20) ist ein stark fluoreszierender Polyelektrolyt vonnöten. Da es diese in der Natur nicht gibt, muss man den Polyelektrolyten mit einem leistungsstarken Fluoreszenzfarbstoff markieren. Wenn dadurch die Nettoladung des Polyelektrolytions verändert wird, sollte dies Konsequenzen für $z_{p,\text{eff}}$ und damit nach Gleichung (D-3) für

den 1. Virialkoeffizienten k haben. Nimmt man einen durch die Markierung unveränderten Reibungskoeffizienten ξ_0 an, was bei sparsamer Markierung vernünftig erscheint und experimentell bestätigt werden konnte [55], so sollte nach Gleichung (D-5) der Diffusionskoeffizient D_0 unberührt bleiben.

Wenn man im Falle einer ladungsverändernden Markierung die „neue“ Nettoladungszahl z_p des Polyelektrolytions bestimmen will, sollten Anzahl und Art der Einzelbausteine des nativen Polyelektrolyten bekannt sein und bereits Titrationskurven für unterschiedliche Salzkonzentrationen vorliegen. Um einen Vergleich der eigenen Ergebnisse mit anderen Messmethoden zu ermöglichen, sollte der Diffusionskoeffizient in Abhängigkeit von der Konzentration des betreffenden Polyelektrolyten bestimmt worden sein.

Bei den natürlich vorkommenden Polyelektrolyten hat man sich bisher insbesondere für die Eigenschaften der Proteine interessiert. Hinsichtlich der genannten Kriterien zählt BSA zu den am besten untersuchten Proteinen. Es wird deshalb in dieser Arbeit als Modellpolyelektrolyt gewählt. Attraktiv ist zusätzlich, dass BSA im Handel in bereits markierter Form verfügbar ist. Der Hersteller gibt für den in dieser Arbeit verwendeten photostabilen und leistungsstarken anionischen Fluoreszenzfarbstoff (siehe Abbildung (D-1), nächste Seite) einen Markierungsgrad von 6 Molekülen pro Protein vor¹¹. Wie die Berechnungen in Kapitel D.4 zeigen, wird die Nettoladungszahl z_p des Proteins dadurch deutlich verändert. Die in Kapitel A.4 definierten Ziele der Arbeit werden dadurch nicht berührt. Es spielt im Prinzip keine Rolle, ob man den konzentrationsabhängigen Diffusionskoeffizienten des nativen BSA oder eines in den Ladungseigenschaften veränderten Proteins bestimmt. Sollten die Resultate der eigenen Arbeit vielversprechend sein, kann man immer noch Fluoreszenzfarbstoffe synthetisieren, die den Ladungszustand des Polyelektrolytions nur geringfügig beeinflussen (siehe Kapitel D.4, S.55 ff.).

Die Glasoberfläche trägt eine negative Ladung (vgl. Kapitel C.5, S.37). Wegen der geringen Tiefe d des Lösungsraums könnte die Adsorption positiv geladener Polyelektrolytionen insbesondere im Grenzbereich starker Verdünnung ins Gewicht fallen. Bei der Einstellung der Lösungsbedingungen sollte daher der isoelektrische Punkt des Proteins in Richtung basischer Lösung überschritten werden. Das Protein trägt dort eine negative Ladung und wird deshalb von der Wand abgestoßen.

¹¹ Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

D.2 Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs

Der für diese Arbeit gewählte Fluoreszenzfarbstoff sollte außer photostabilen Eigenschaften auch in proteingebundener Form eine große Quantenausbeute besitzen. Dieses Erfordernis ist dem Interesse am Grenzbereich starker Verdünnung und der geringen Tiefe d des Lösungsraums geschuldet. Es wird deshalb ein Alexafarbstoff verwendet. Die Absorptions- und Emissionseigenschaften des markierten Proteins wurden mit den am Institut vorhandenen Filtern (vgl. Kapitel B.2, S.22) abgestimmt. Die Wahl fiel auf den Alexafarbstoff 488^{12,13}. Abbildung (D-1) zeigt den gebundenen Farbstoff im schwach sauren Milieu:

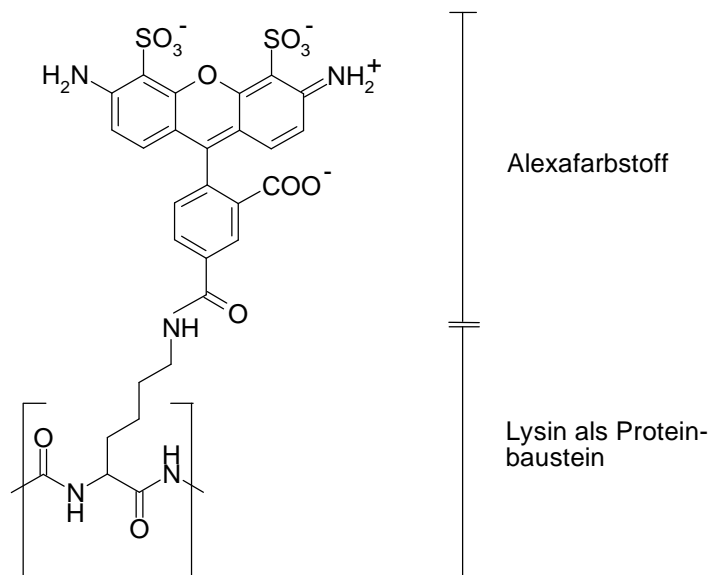


Abbildung (D-1): Markierung eines Proteins mit dem Alexafarbstoff 488

Außer vom pH -Wert der Lösung hängt die Ladung des anionischen Farbstoffs von der Anwesenheit anderer geladener Gruppen im Protein und dem Salzgehalt der Lösung ab. Diese Einflüsse könnten in Abwandlung des Ladungszustands nach Abbildung (D-1) insbesondere zu einer Protonierung der Carboxylgruppe führen. Legt man den pK_S -Wert der Benzoesäure zugrunde ($pK_S = 3$), so scheint diese Möglichkeit bei dem pH -Wert der eigenen Messungen ($pH = 6.5$) nicht gegeben. Es wird deshalb dem Farbstoff im Folgenden die maximale Ladungszahl von -2 zugeordnet.

¹² Die Zahl gibt die Wellenlänge des Absorptionsmaximums in nm an.

¹³ Produktnummer: A13100, albumin from bovine serum (BSA), Alexa Fluor 488 conjugate, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

Der Fluoreszenzfarbstoff wurde an die Aminogruppe von Lysin gebunden. Die Säure-/Basefunktion dieser Gruppe geht hierdurch verloren. Wenn man von ursprünglich protoniertem Lysin ausgeht, resultiert aus der Markierung eine Veränderung um -3 Elementarladungen pro gebundenem Farbstoffmolekül und damit bei einem Markierungsgrad von 6 um -18 Elementarladungen (maximaler Markierungseffekt).

D.3 Untersuchungen der Eigenschaften von nativem BSA

In Abbildung (D-2) werden die Titrationsexperimente von Tanford [56] (Temperatur jeweils $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, Polyelektrolytkonzentration c_p : 6 g/l bis 44 g/l) vorgestellt:

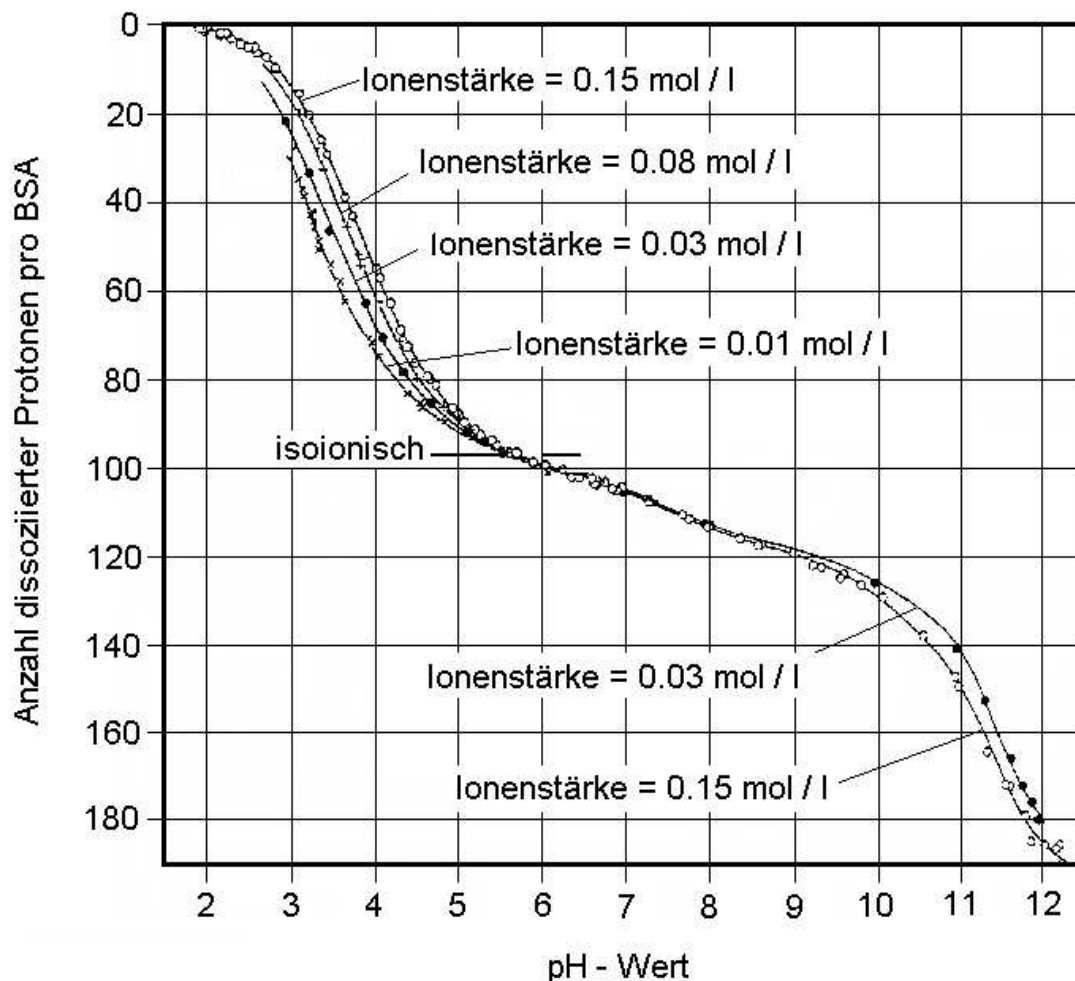


Abbildung (D-2): Titrationskurven von nativem BSA nach [56]

Auf der Ordinate ist ausgehend von der Maximalladung des Proteins von + 96 im stark Sauren die Anzahl dissoziierter Protonen pro BSA verzeichnet. Die Ionenstärke ist jeweils über dem abgebildeten pH -Bereich konstant. Im isoionischen Zustand heben sich die protonenbedingten Ladungen des Proteins gerade auf¹⁴. In Tabelle (D-1) sind die wesentlichen Resultate der Titrationsexperimente zusammengefasst¹⁵:

Aminosäure	Anzahl/BSA ¹⁶	pK_{S0} -Wert ¹⁷
Asparagin- und Glutaminsäure ¹⁸ (C)	99	3.9
Histidin (His)	16	6.9
Lysin (Lys)	57	9.8
Tyrosin (Tyr)	19	10.4
Arginin (Arg)	22	> 12
α -Aminogruppe (α -Am)	1	7.8

Tabelle (D-1): Anzahl und pK_{S0} -Werte titrierbarer Aminosäuren in BSA

Unter Verwendung der Daten aus Tabelle (D-1) und einer modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung (D-6) erhält Tanford die durchgezogenen Kurven in Abbildung (D-2)¹⁹. Der anpassbare Parameter c in Gleichung (D-6) ist im pH -Bereich von 4.3 bis 10 konstant.

$$(D-6) \quad pH + \lg \left(\frac{\tilde{n}_e - n_e}{n_e} \right) = pK_{Se0} - cz_p$$

e : Aminosäuregruppe

\tilde{n}_e : Anzahl der Aminosäuren pro BSA innerhalb der Gruppe e

n_e : Anzahl Protonen, die an den \tilde{n}_e Bindungsplätzen adsorbiert sind

¹⁴ Zusätzlich kann durch die Adsorption von Anionen die Ladung von BSA beeinflusst werden.

¹⁵ Bei der Bestimmung der Anzahl an Aminosäuren einer Gruppe e stützt Tanford sich z. T. auf zusätzliche Titrationsexperimente, die er bei einer Temperatur von 5 °C durchgeführt hat. Ausgehend vom stark Sauren werden dadurch die Dissoziationsenthalpien in Abhängigkeit von der Anzahl dissoziierter Protonen zugänglich. Diese sind für die einzelnen Aminosäuregruppen unterschiedlich.

¹⁶ Die angegebenen Werte wurden durch analytische Untersuchungen im Wesentlichen bestätigt [57].

¹⁷ Die molekülspezifischen pK_{S0} -Werte beziehen sich auf das ungeladene Protein.

¹⁸ Diese Aminosäuren müssen nicht unterschieden werden, da ihre pK_{S0} -Werte sehr ähnlich sind.

¹⁹ Dabei berücksichtigt er den Beitrag adsorbierter Anionen zur Proteinladungszahl z_p in Gleichung (D-6).

Anderson [58] bestimmt mit der Taylor-Methode²⁰, einer selten praktizierten Technik, den Diffusionskoeffizienten D_0 von BSA und den 1. Virialkoeffizienten k bei 4 °C und einem pH-Wert von 6.5. Nach Abbildung (D-2) besitzt das Protein dort eine schwach negative Ladung. Dieses Ladungsvorzeichen ist für die eigenen Diffusionsexperimente von Vorteil (vgl. Kapitel D.1, S.46).

In einem Experiment stellt Anderson eine 10^{-3} -molare KCl-Konzentration ein. In diesem Niedersalzbereich unterbleibt bei pH 6.5 eine Adsorption von Anionen [42,58]. Diese Lösungsbedingungen bieten sich zur Nachahmung an, da natives BSA dort eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten aufweist. Das in dieser Arbeit verwendete markierte BSA ist deutlich stärker geladen (siehe Kapitel D.4). Nimmt man an, dass auch $|z_{p,\text{eff}}|$ (markiertes BSA) $>$ $|z_{p,\text{eff}}|$ (natives BSA), so sollte nach Gleichung (D-3) der 1. Virialkoeffizient des Diffusionskoeffizienten von markiertem BSA noch größer sein als der von nativem BSA.

Bowen [59] kopiert abgesehen von dem Arbeiten bei 25 °C die Lösungseigenschaften von Anderson, verwendet aber Lichtstreuexperimente für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten. Die Resultate von beiden werden in den Kapiteln E.5 und E.6 zum Vergleich herangezogen.

D.4 Einfluss der Markierung auf die Proteinladungszahl z_p

Um den Einfluss der Markierung auf die Nettoladungszahl z_p des Proteins untersuchen zu können, führen wir die Abhängigkeit der einzelnen Protonen-Dissoziationskonstanten K_e vom Oberflächenpotenzial φ_0 ein²¹:

$$(D-7) \quad K_e = K_{e0} \cdot e^{F\varphi_0 / (RT)}$$

²⁰ Es handelt sich nicht um das geläufigere sogenannte Dispersionsverfahren, das ebenfalls von G. I. Taylor stammt, sondern um die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten aus dem Grenzwert der stabilisierten Dichteunterschiede in einer vertikalen Kapillare (Prinzip der hydrodynamischen Stabilität).

²¹ Gleichung (D-7) gilt auch für die Assoziationskonstanten K^{-1} und damit für die Adsorptionstendenzen der Anionen, die allerdings in dieser Arbeit keine Rolle spielen.

Den Besetzungsgrad x_e der \tilde{n}_e Protonenbindungsplätze kann man mit Hilfe einer Langmuir-Adsorptionsisothermen beschreiben²²:

$$(D-8) \quad x_e = \frac{n_e}{\tilde{n}_e} = \frac{c_{H^+}}{c_{H^+} + K_{e0} \cdot e^{F\varphi_0/(RT)}}$$

Kennt man \tilde{n}_e , K_{e0} ²³, φ_0 und den pH-Wert der Lösung, so kann man die Anzahl n_e adsorbierter Protonen und damit die Nettoladungszahl z_p des Proteins bestimmen. Hierzu teilt man die Aminosäuregruppen e in basische i (His, Lys, Arg, α -Am) und saure j (C, Tyr) ein:

$$(D-9) \quad z_p = \sum_i \tilde{n}_i \cdot \frac{c_{H^+}}{c_{H^+} + K_{i0} \cdot e^{F\varphi_0/(RT)}} - \sum_j \tilde{n}_j \left(1 - \frac{c_{H^+}}{c_{H^+} + K_{j0} \cdot e^{F\varphi_0/(RT)}}\right)$$

Die einzige Unbekannte für die Bestimmung von z_p ist das Oberflächenpotenzial φ_0 . Ausgangspunkt für dessen Berechnung ist die Poisson-Boltzmann-Gleichung für einwertige Salze (Δ : Laplace-Operator), wobei wir annehmen: $c_s \gg c_{H^+}, c_{OH^-}$:

$$(D-10) \quad \Delta\varphi = -\frac{Fc_s}{\varepsilon} \left(e^{-\frac{F\varphi}{RT}} - e^{\frac{F\varphi}{RT}} \right)$$

Die Dielektrizitätskonstante ε wird als räumlich konstant angenommen. Das Protein wird im interessierenden pH-Bereich als (genähert) kugelförmig beschrieben [56]. Durch die Kugelsymmetrie des Potenzials²⁴ wird der Laplace-Operator in Gleichung (D-10) ausschließlich eine Funktion des Abstandes vom Kugelmittelpunkt r :

$$(D-11) \quad \frac{1}{r} \frac{d^2(r\varphi)}{dr^2} = -\frac{Fc_s}{\varepsilon} \left(e^{-\frac{F\varphi}{RT}} - e^{\frac{F\varphi}{RT}} \right)$$

²² Da der salzarme Bereich im Vordergrund steht, wird der Aktivitätskoeffizient der Protonen durchgehend gleich 1 gesetzt.

²³ Es werden die Werte aus Tabelle (D-1) verwendet. Die Temperatur der eigenen Messungen unterscheidet sich zwar z. T. deutlich von 25 °C, aber speziell die Gruppen C und His zeigen nur eine schwache Temperaturabhängigkeit [56] von K . Nur sie kommen bis pH 6.5 für eine Deprotonierung in Frage. Die im Folgenden berechneten Werte sollen deshalb für alle Temperaturen der eigenen Experimente gelten.

²⁴ Eine Verwendung der Gouy-Chapman-Theorie ist sinnlos, da in unserem Fall $\kappa^{-1} > \text{Radius (BSA)}$.

Diese Differentialgleichung kann man analytisch nicht lösen. Erst nach einer Linearisierung der Exponentialterme wird dies möglich [53]:

$$(D-12) \quad \frac{1}{r} \frac{d^2(r\varphi)}{dr^2} = \kappa^2 \varphi$$

Der Debye-Parameter κ besitzt folgende Bedeutung:

$$(D-13) \quad \kappa = \sqrt{\frac{2F^2 c_s}{\varepsilon RT}}$$

Gleichung (D-12) kann man geschlossen lösen:

$$(D-14) \quad \varphi(r) = \frac{z_p q_0}{4\pi \varepsilon r} \cdot \frac{1}{(1+\kappa \hat{r})} \cdot e^{-\kappa(r-\hat{r})}$$

Man erhält deshalb für das Oberflächenpotenzial $\varphi_0 = \varphi(\hat{r})$:

$$(D-15) \quad \varphi_0 = \frac{z_p q_0}{4\pi \varepsilon \hat{r}} \cdot \frac{1}{(1+\kappa \hat{r})}$$

q_0 ist die Elementarladung ($q_0 = 1.6 \cdot 10^{-19}$ C). Der „Kontaktabstand“ \hat{r} ist theoretisch die minimale Entfernung der Mittelpunkte von Protein und Ion, wird aber häufig als anpassbarer Parameter betrachtet.

Die Linearisierung der Gleichung (D-11) ist nur gerechtfertigt, wenn durchweg gilt:

$$(D-16) \quad |\varphi| \ll 25.7 \text{ mV}$$

Um zumindest eine vernünftige Abschätzung für die Nettoladungszahl z_p des Proteins zu erhalten, kann man die Linearisierungsbedingung der Gleichung (D-16) abschwächen und stattdessen fordern [60]:

$$(D-17) \quad |\varphi(\kappa^{-1})| \ll 25.7 \text{ mV}$$

Setzt man für z_p Gleichung (D-9) ein, so wird aus Gleichung (D-15):

$$(D-18) \quad \varphi_0 = \frac{q_0}{4\pi \varepsilon \hat{r}(1+\kappa \hat{r})} \left(\sum_i \tilde{n}_i \cdot \frac{c_{H^+}}{c_{H^+} + K_{i0} \cdot e^{F\varphi_0/(RT)}} - \sum_j \tilde{n}_j \left(1 - \frac{c_{H^+}}{c_{H^+} + K_{j0} \cdot e^{F\varphi_0/(RT)}} \right) \right)$$

Diese Gleichung kann man numerisch lösen. Es werden die Werte der Tabelle (D-1), sowie für den „Kontaktabstand“ 3.6 nm [58] und für die Temperatur 298 K verwendet. Setzt man den berechneten Wert von φ_0 in Gleichung (D-9) ein, so erhält man die Nettoladungszahl z_p des Proteins. Für einen pH-Wert von 6.5 ergeben eigene Berechnungen²⁵ für eine 10^{-3} -molare Salzlösung ein Oberflächenpotenzial φ_0 von -19.4 mV und eine Nettoladungszahl z_p des Proteins von ca. -5 . Die Bedingung (D-17) ist erfüllt, da man für das Potenzial $\varphi(\kappa^{-1})$ den Wert -1.89 mV berechnet. Anderson [58] bestimmt mit Hilfe eines anderen Verfahrens in guter Übereinstimmung mit den eigenen Berechnungen ein Oberflächenpotenzial φ_0 von -23.1 mV und eine Nettoladungszahl z_p des Proteins von ca. -6 . Die Ladungszahl z_p des Proteins von ca. -5 erscheint bei einem Vergleich mit Abbildung (D-2) vernünftig.

Arbeitet man den Markierungseffekt ein²⁶, so ergibt sich für φ_0 ein Wert von -68.9 mV und für die Nettoladungszahl z_p des markierten Proteins ein Wert von -18 . Das Potenzial $\varphi(\kappa^{-1})$ ergibt sich zu -6.7 mV, wodurch Bedingung (D-17) erfüllt ist.

Die ursprüngliche Ladung wird demnach durch die Markierung um 13 Einheiten vermindert. Den eigenen Berechnungen zufolge liegen die Lysingruppen des Proteins vollständig protoniert vor. Vergleicht man deshalb den Wert -13 mit dem maximalen Markierungseffekt von -18 Ladungen (vgl. Kapitel D.2, S.48), so erkennt man, dass 5 Ladungen durch die Säure-/Baseeigenschaften des Proteins kompensiert werden. Diese verteilen sich auf die Carboxylgruppen der Asparagin- bzw. Glutaminsäure (3) und die Aminogruppen von Histidin (2). Die jeweils in Klammern angegebene Zahl ist die berechnete Differenz zwischen den adsorbierten Protonen im markierten und nativen Protein.

Eine vollständig andere Möglichkeit zur Beurteilung der Ladungsbeeinflussung durch die Markierung bietet die Interpretation der Titrationskurve des Proteins (Abbildung (D-2)). Ausgehend von der Maximalladung von $+96$ im stark Sauren (vollständig protonierte Säure-/Basegruppen (vgl. Tabelle (D-1))) wird dieser Betrag im Laufe der Titration um die Anzahl dissoziierter Protonen reduziert²⁷:

²⁵ Alle Berechnungen in diesem Kapitel wurden mit maple 9 durchgeführt.

²⁶ Hierzu reduziert man die Anzahl an Lysingruppen um 6 und fügt in Gleichung (D-9) als 3. Term -12 ein.

²⁷ Da sich unsere Überlegungen auf salzarme Lösungen beschränken, bleibt eine Adsorption von Anionen, die in den Titrationsexperimenten von Tanford bei einer Ionenstärke von 0.15 mol/l eine Rolle spielen mag, unberücksichtigt.

$$(D-19) \quad z_p(\text{natives BSA}) = 96 - \sum_e (\tilde{n}_e - n_e)$$

Die Reihenfolge der Deprotonierung wird durch die pK_{SeO} -Werte der einzelnen Aminosäuregruppen diktiert. Bei dem interessierenden pH -Wert von 6.5 sind nur die Carboxylgruppen C und das Histidin His von der Deprotonierung erfasst (vgl. Tabelle (D-1)). Die Lysingruppen liegen dagegen noch vollständig protoniert vor. Man kann deshalb die 6-fache Markierung mit einem doppelt negativ geladenen Fluoreszenzfarbstoff durch die gedankliche Entfernung von 18 Lysingruppen kompensieren.

Dies reduziert die Maximalladung des Proteins. Anstelle von Gleichung (D-19) erhält man bei einem pH -Wert von 6.5 für z_p des markierten Proteins²⁸:

$$(D-20) \quad z_p(\text{markiertes BSA}) = 96 - 18 - (\tilde{n}_C - n_C) - (\tilde{n}_{\text{His}} - n_{\text{His}})$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung (D-6) ein, so erhält man für markiertes BSA:

$$(D-21) \quad pH + \lg\left(\frac{\tilde{n}_A - n_A}{n_A}\right) = pK_{\text{SA0}} - c(96 - 18 - (\tilde{n}_C - n_C) - (\tilde{n}_{\text{His}} - n_{\text{His}}))$$

Index A: Carboxylgruppen C bzw. Histidin His

Der Unterschied zwischen den Gleichungen (D-6) und (D-21) besteht im interessierenden pH -Bereich nur darin, dass auf der rechten Seite der Gleichung (D-21) der Exzessterm $18 \cdot c$ auftritt. Man kann den Einfluss der Markierung daher direkt aus der Titrationskurve für natives BSA ableiten. Dies soll am Beispiel der 10^{-2} -molaren Salzlösung der Abbildung (D-2) demonstriert werden. Man liest anstelle von $pH = 6.5$ die Anzahl dissoziierter Protonen bei dem um $18 \cdot c$ verminderten pH -Wert ab ($pH \approx 5.7$) [56]²⁹. Abbildung (D-2) zufolge trägt natives BSA dort ca. 5 Protonen mehr (isoionischer Bereich) als bei $pH = 6.5$. Diese protonenbedingte Ladung von Null kann man dem markierten Protein bei $pH = 6.5$ und $c_s = 10^{-2}$ mol/l zuweisen³⁰.

²⁸ Die Anregung zu diesem Vorgehen findet sich in Literatur [61].

²⁹ Dieses einfache Vorgehen ist an die in diesem Fall gegebene Konstanz von c gebunden.

³⁰ Man kann anhand Abbildung (D-2) den Zusammenhang zwischen dem ladungsverändernden Markierungseffekt und dem Puffervermögen des Proteins erkennen. Dieses ist in dem pH -Bereich zwischen 5.7

Nach Gleichung (D-20) beträgt die Nettoladungszahl z_p des markierten Proteins deshalb $- 18$.

Der empirische Parameter c nimmt mit sinkender Salzkonzentration zu [56]. Überträgt man das beschriebene Vorgehen auf die interessierende 10^{-3} -molare Salzlösung, so erhält man deshalb einen pH -Wert, der kleiner sein wird als 5.7. Nimmt man an, dass für diese Salzkonzentration die Messpunkte ausgehend vom stärker sauren Bereich flacher in den allen Experimenten gemeinsamen „Schnittpunkt“ im isoelektrischen Bereich einmünden (vgl. Abbildung (D-2)), so scheint der ladungsverändernde Markierungseffekt mit dem der 10^{-2} -molaren Salzlösung vergleichbar. Daher sollte das markierte Protein unter den Lösungsbedingungen der Arbeit eine Nettoladungszahl z_p von ca. $- 18$ besitzen. Man erkennt eine gute Übereinstimmung mit dem Resultat der Debye-Hückel-Theorie, wodurch die Linearisierung der Gleichung (D-11) zusätzlich gerechtfertigt wird.

Mit dem Ziel, den ladungsverändernden Effekt der Markierung zu reduzieren oder aufzuheben, könnten andere geeignete Fluoreszenzfarbstoffe synthetisiert werden. Ein Ansatz, der eine Alternative zur Carbonsäureamidbindung bietet, ist vor kurzem gefunden worden [62,63] (Abbildung (D-3)):

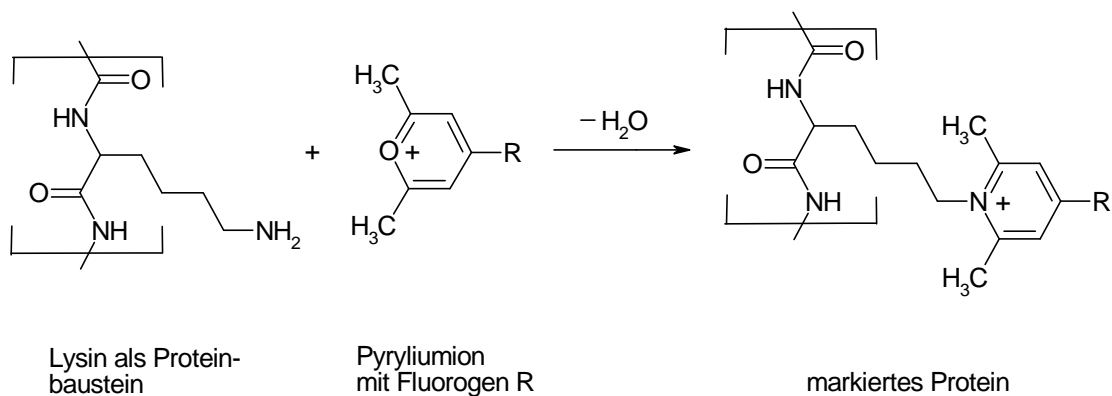


Abbildung (D-3): Markierung mit einem Pyryliumion (nach [63])

und 6.5 nur sehr schwach ausgeprägt. Hätte man in einer 10^{-2} -molaren Salzlösung anstelle von pH 6.5 einen pH -Wert von z. B. 5.2 eingestellt, so zeigt der steilere Kurvenverlauf bis $pH = 4.4$, dass der ladungsverändernde Markierungseffekt dort durch den beginnenden Pufferbereich der Carboxylgruppen besser kompensiert werden kann. Im Bereich großer Pufferkapazität kann es sogar zu einer Überkompensierung kommen. Die Markierung mit einem anionischen Farbstoff führt dann zu einer Vergrößerung der vorliegenden positiven Nettoladung des Proteins !

Im basischen pH -Bereich wird ein Pyryliumion, an das ein Fluorogen R gekoppelt ist, unter Einbringung einer positiven Ladung an eine Lysin-Gruppe des Proteins gebunden. Durch die Markierung wird die Säure-/Basefunktion von Lysin zwar ebenfalls zerstört, aber zugunsten einer fixen positiven Ladung. Durch den großen pK_{S0} -Wert von Lysin ($pK_{S0} \approx 10$) liegt diese Aminosäure über einen weiten pH -Bereich protoniert vor. Dort bleibt die Ladung nach einer Markierung erhalten³¹.

Im Idealfall sollten die Säure-/Baseeigenschaften von Lysin durch die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffs an ein Protein nicht verändert werden. Dies könnte man z. B. bewerkstelligen, indem man einen Farbstoff synthetisiert, der neben dem Chromophor eine Alkylaminseitenkette besitzt. Diese soll den einzigen potenziellen Ladungsträger darstellen. Nach der Bindung soll die „neue“ Aminogruppe des Polyelektrolytions die Säure-/Baseeigenschaften von Lysin übernehmen (Abbildung (D-4)):

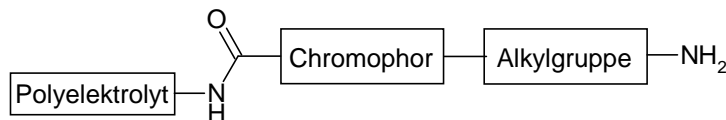


Abbildung (D-4): Vorschlag zur Erhaltung der Aminogruppe

Dazu sollte sich deren pK_{S0} -Wert nach Möglichkeit mit dem von Lysin decken. Als Korrekturglied für die Einstellung dieses Parameters könnte entweder die Länge oder eine geeignete Derivatisierung der Alkylkette dienen.

³¹ Dies trifft nur zu, wenn das Fluorogen R ladungsneutrale Eigenschaften besitzt.

E Messergebnisse und ihre Interpretation

E.1 Intensitätsprofile und Kurvenanpassung

Es wurden zwei Diffusionsexperimente durchgeführt. Abgesehen von der Temperatur (Experiment 1: 4°C – 6°C, Experiment 2: 16°C – 18°C) sind die Lösungsbedingungen (Salzkonzentration (KCl): 10^{-3} mol/l, Konzentration c_{p0} an markiertem BSA im Polyelektrolytreservoir: 4 g/l, pH-Wert: 6.5) gleich. In Experiment 1 wurde die Belichtungsdauer für die einzelnen Messungen (Diffusionszeiten: 5 h, 7 h, 9 h) nicht verändert.

Die Abbildungen (E-1) bis (E-4) zeigen alle in der Arbeit ausgewerteten Profile, wobei die Kurvenanpassungen überlagert sind. Um besser beurteilen zu können, wie weit der Diffusionsprozess fortgeschritten ist, sind die idealisierten Anfangsintensitätsprofile eingezeichnet. Die Lage der Anfangsgrenze ($w = 0$) ist eine Abschätzung aus dem jeweiligen Anfangsintensitätsprofil (vgl. Abbildungen (C-6) bzw. (C-7), S.42 bzw. 43).

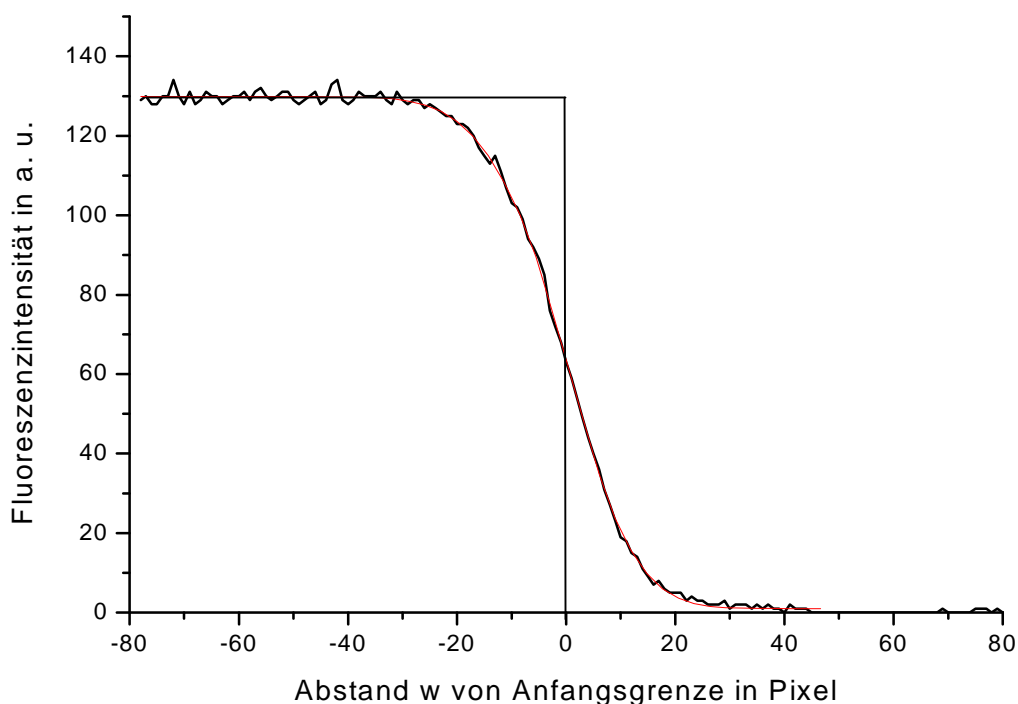


Abbildung (E-1): Intensitätsprofil nach einer Diffusionszeit von 5 Stunden (Experiment 1)

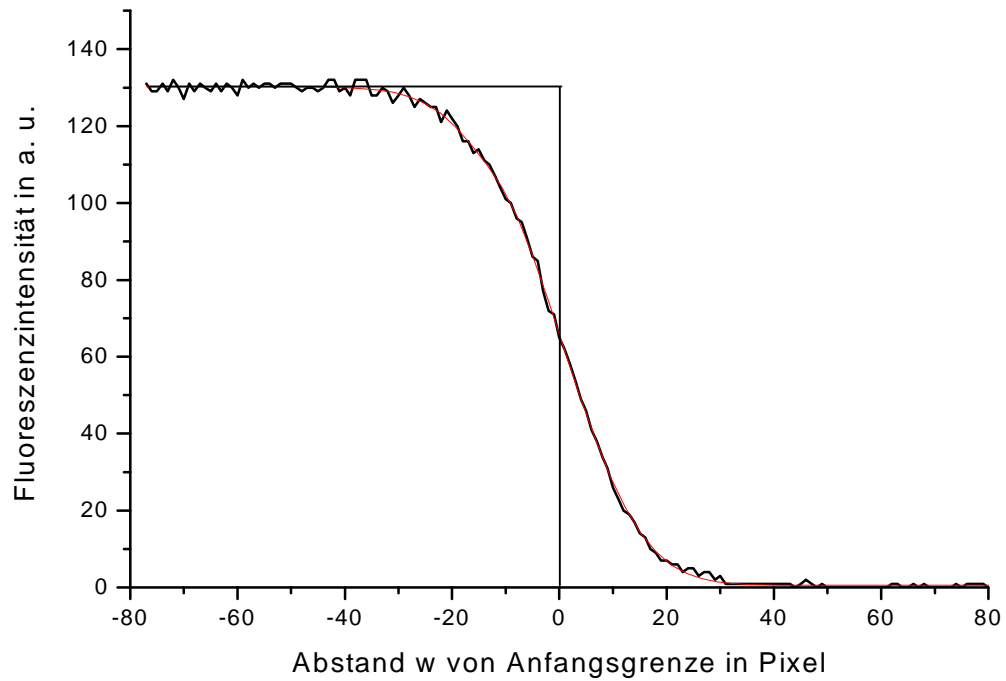


Abbildung (E-2): Intensitätsprofil nach einer Diffusionszeit von 7 Stunden (Experiment 1)

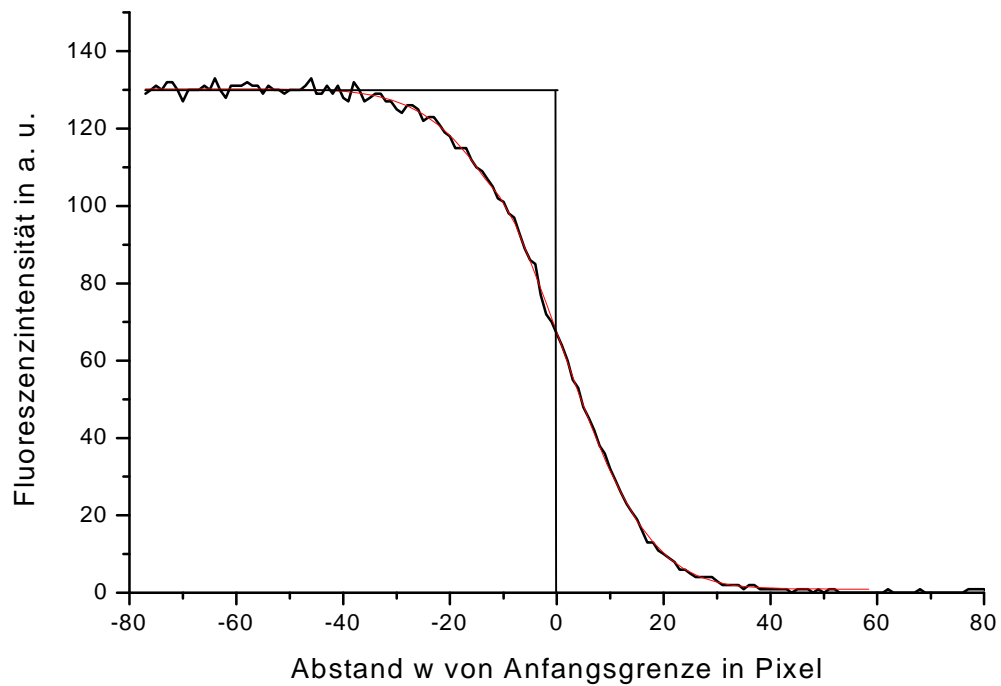


Abbildung (E-3): Intensitätsprofil nach einer Diffusionszeit von 9 Stunden (Experiment 1)

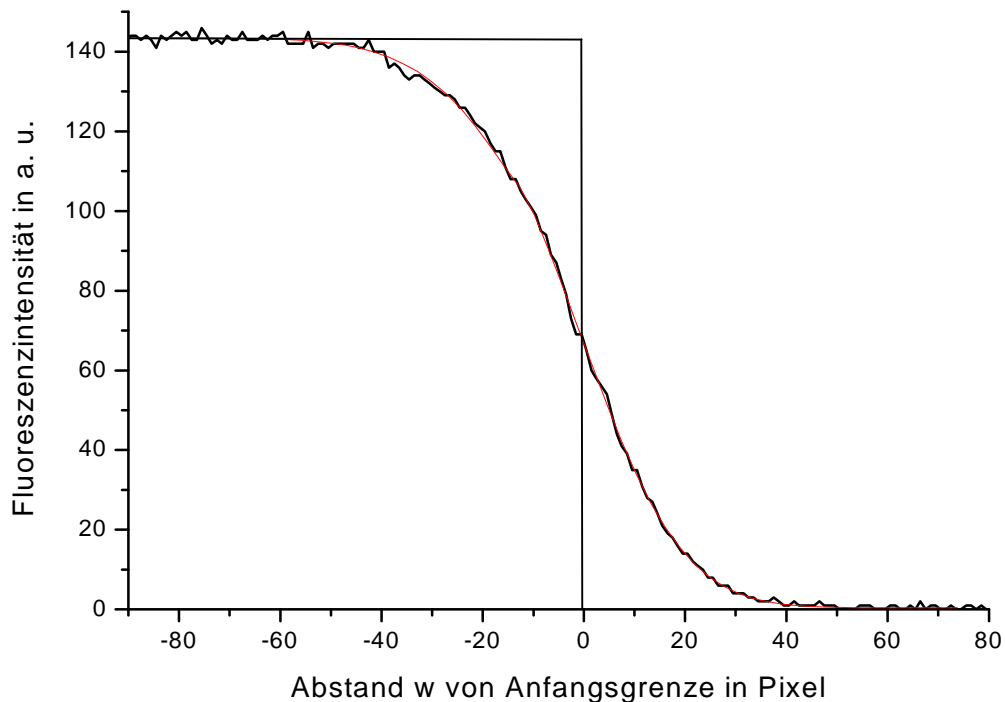


Abbildung (E-4): Intensitätsprofil nach einer Diffusionszeit von 9 Stunden (Experiment 2)³²

Der einfachste Weg aus den Abbildungen (E-1) bis (E-4) den Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-15) (S.5) zu bestimmen ist die Übersetzung des Intensitätsprofils I in eine mathematische Funktion³³. Bei der Suche nach einem geeigneten Funktionstyp kann man als Ausgangspunkt die in Kapitel B.1 (S.16) angegebene Lösung der 2. Fickschen Gleichung für konstante Diffusionskoeffizienten wählen:

$$(B-3) \quad c_p = \frac{c_{p0}}{2} \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \right) = \frac{c_{p0}}{2} \left(\operatorname{erfc} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \right)$$

³² In diesem Fall ist die gegenüber dem idealisierten Anfangsintensitätsprofil „abgeschmolzene“ Fläche augenscheinlich größer als die für $w > 0$ hinzugewonnene Fläche. Da in dieser Arbeit Fluoreszenzintensität und Polyelektrolytkonzentration zueinander proportional sind (siehe Gleichung (E-5), S.61), sollten beide Flächen nach Gleichung (E-14) (S.65) gleich groß sein. Demzufolge kann die eingezeichnete Anfangsgrenze nicht richtig sein.

³³ Diese Vorgehensweise ist grundsätzlich zu empfehlen, wenn sich, wie in dieser Arbeit, wegen Intensitätsfluktuationen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Steigung des Intensitätsprofils ergeben.

Zur Anpassung an ein Konzentrationsprofil, das auf einem variablen Diffusionskoeffizienten beruht, kann man anstelle von Gleichung (B-3) eine Summe aus zwei gewichteten erfc-Funktionen einführen (b_1, b_2, g_1, g_2 : anpassbare Parameter):

$$(E-1) \quad c_p = \frac{c_{p0}}{2} \frac{\operatorname{erfc}(b_1 x) \cdot g_1 + \operatorname{erfc}(b_2 x) \cdot g_2}{g_1 + g_2}$$

Gleichung (E-1) liefert für $c_p(x=0)$ stets $c_{p0}/2$. Um die Beschränkung auf einen für variable Diffusionskoeffizienten falschen Wert aufzuheben, muss man eine der beiden erfc-Funktionen entlang der Abszisse verschieben. Zur Vergrößerung der Anpassungsmöglichkeiten an ein Konzentrationsprofil wird in anderem Ausmaß³⁴ auch für die andere erfc-Funktion eine Verschiebung zugelassen (c_1, c_2 : anpassbare Parameter):

$$(E-2) \quad c_p = \frac{c_{p0}}{2} \frac{\operatorname{erfc}(b_1(x+c_1)) \cdot g_1 + \operatorname{erfc}(b_2(x+c_2)) \cdot g_2}{g_1 + g_2}$$

Zu demselben Zweck kann man Variationsmöglichkeiten für das Gewichtungsverhältnis g_1/g_2 einführen, indem man einen der beiden Parameter ortsabhängig macht ($g_1 = g_1(x)$, $g_2 = g = \text{konstant}$). Bei der Wahl des Funktionstyps für $g_1(x)$ gibt es im Prinzip Freiheiten. Man sollte allerdings darauf achten, dass man keine zur Anfangsgrenze achsensymmetrische Funktion wählt (z. B. $g_1(x) \sim e^{-x^2}$), da diese mit zunehmendem Abstand von der Anfangsgrenze zu einer starken Dominanz einer der beiden erfc-Funktionen führt. Dadurch werden die Anpassungen für große $|x|$ aneinander gekoppelt, was zu einer Qualitätseinbuße führen kann. Diesem Problem kann man begegnen, indem man für $g_1(x)$ eine Funktion wählt, die in beiden Randbereichen unterschiedliche erfc-Funktionen dominieren lässt. Als Gewichtsfunktion wird deshalb gewählt³⁵ (f : anpassbarer Parameter):

$$(E-3) \quad g_1(x) = e^{f x^3}$$

Damit wird aus Gleichung (E-2)):

$$(E-4) \quad c_p = \frac{c_{p0}}{2} \frac{\operatorname{erfc}(b_1(x+c_1)) \exp(f x^3) + \operatorname{erfc}(b_2(x+c_2)) g}{\exp(f x^3) + g}$$

³⁴ Dies ist wichtig, da $c_1 = c_2$ nach Gleichung (E-2) die Beschränkung $c_p(x = -c_1) = c_{p0}/2$ nach sich zieht.

³⁵ Die Potenz der Exponentialfunktion muss größer sein als 2 (vgl. die entsprechende Approximation für die erfc-Funktion).

Nach Gleichung (E-4) wird das Konzentrationsprofil für $f > 0$ bei Annäherung an das Polyelektrolytreservoir zunehmend durch erfc-Funktion (2)³⁶ bestimmt, während in Richtung unendlicher Verdünnung zunehmend erfc-Funktion (1) dominiert.

Die eigenen Experimente liefern allerdings nicht die Polyelektrolytkonzentration in Abhängigkeit von x ($[x] = m$), sondern die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von w , dem Abstand von der Anfangsgrenze in Pixel. Deshalb wird in Gleichung (E-4) die Variable x durch w ersetzt.

Vorversuche ergaben, dass die Fluoreszenzintensität I im Konzentrationsbereich dieser Arbeit proportional zur Polyelektrolytkonzentration c_p ist:

$$(E-5) \quad I = m \cdot c_p$$

Den Term $I_{\max}/2$, der nach Gleichung (E-5) aus $c_{p0}/2$ in Gleichung (E-4) hervorgeht, könnte man aus den Abbildungen (E-1) bis (E-4) bestimmen. Wegen Intensitätsfluktuationen wäre dieser Term allerdings mit Ungenauigkeiten behaftet. Er wird deshalb durch den anpassbaren Parameter a ersetzt.

Aus Gleichung (E-4) wird deshalb:

$$(E-6) \quad I(w) = a \frac{\operatorname{erfc}(b_1(w + c_1)) \exp(f w^3) + \operatorname{erfc}(b_2(w + c_2)) g}{\exp(f w^3) + g}$$

Den Abbildungen zufolge liegt die Intensitätsgrundlinie nicht exakt bei Null. Deshalb wird die Möglichkeit eingebaut, das Intensitätsprofil entlang der Ordinate zu verschieben:

$$(E-7) \quad I(w) = a \frac{\operatorname{erfc}(b_1(w + c_1)) \exp(f w^3) + \operatorname{erfc}(b_2(w + c_2)) g}{\exp(f w^3) + g} + h$$

Computergestützt³⁷ wird eine Anpassung der Gleichung (E-7) an die einzelnen Intensitätsprofile durchgeführt. Die jeweiligen Parameterwerte finden sich in Anhang 3. Nach

³⁶ Die erfc-Funktionen sind nach den Indices der anpassbaren Parameter benannt.

³⁷ Origin 6.1 G, nichtlineare Kurvenanpassung

Augenmaß wird die Qualität der Kurvenanpassungen in den Abbildungen (E-1) bis (E-4) als befriedigend erachtet.

E.2 Anmerkungen zu den Intensitätsprofilen

Man kann anhand der Abbildungen gut verfolgen, wie tief der Polyelektrolyt in die Salzlösung eingedrungen ist. Nach Abbildung (B-4) (S.25) wird die Einstrahlintensität durch Trübungen innerhalb des Anregungsfilters ab $w \geq 50$ Pixel inhomogen. Man erkennt an den Intensitätsprofilen, dass der Polyelektrolyt in keinem Fall diesen kritischen Punkt passiert hat. Die mit Hilfe der Randbedingungen der Gleichung (C-2) (S.31) abgeschätzte zulässige Diffusionszeit musste aus diesem Grund nicht verkürzt werden.

Schwieriger fällt eine Beurteilung, ob die andere Randbedingung ($c_p(x_{un}, t) = c_{p0}$) eingehalten wurde, da ein horizontaler Intensitätsverlauf an der Begrenzung des Lösungsraums keine Rückschlüsse erlaubt. Nur bei einer Erfüllung beider Bedingungen von Gleichung (C-2) ist die Polyelektrolytkonzentration lediglich eine Funktion von $\lambda = x/\sqrt{t}$. Man kann deshalb zur Überprüfung $c_p(x=0)$ bzw. in dieser Arbeit $c_p(x=v)$ (siehe Kapitel E.3, S.65) bestimmen³⁸. Für Experiment 1 ergibt sich^{39,40}:

Diffusionszeit/Stunden	c_p -I/g für $x = v$
5	2.10
7	2.08
9	2.09

Tabelle (E-1): Polyelektrolytkonzentration an der Anfangsgrenze

Die Werte weichen zwar geringfügig von der erwarteten Konstanz ab, dies wird aber wegen Fußnote 39 als unbedenklich eingestuft.

³⁸ Dies dient lediglich zur Kontrolle. Den Berechnungen auf S.31 zufolge sollte die zulässige Diffusionszeit nicht überschritten worden sein.

³⁹ Die Intensität an der Stelle $x = v$ (siehe Anhang 3) wurde aus den Rohdaten interpoliert. Die nicht exakte Erfüllung von Gleichung (E-14) (siehe S.65) wurde hingenommen.

⁴⁰ c_p wird aus den Gleichungen (E-5) und (E-16) (S.65), a aus Anhang 3 gewonnen.

Die Polyelektrolytkonzentration an der Anfangsgrenze liefert zusätzlich Hinweise auf die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten. Nach Gleichung (B-3) (S.59) ist für einen konstanten Diffusionskoeffizienten die Polyelektrolytkonzentration bei $x = 0$ gerade $c_{p0}/2$. Ein linear mit der Konzentration wachsender Diffusionskoeffizient führt an dieser Stelle zu einer mit dem 1. Virialkoeffizienten k steigenden Polyelektrolytkonzentration [33]. Die eigenen Messungen ergeben:

$$\text{Experiment 1}^{41}: c_p(x = v) = 0.52 \cdot c_{p0}$$

$$\text{Experiment 2}: c_p(x = v) = 0.52 \cdot c_{p0}$$

Sie widersprechen einer ausgeprägten linearen Konzentrationsabhängigkeit und deuten eher in Richtung eines konstanten Diffusionskoeffizienten. Dieser Punkt wird auf S.68 nochmals aufgegriffen.

E.3 Berechnung des Diffusionskoeffizienten

Die Grundlage für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten stellt der rechte Ausdruck in Gleichung (A-15) (S.5) dar:

$$(A-15) \quad D(c_p) = \frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dc_p} \right)_{c_p} \int_{x(c_p)}^{\infty} x \frac{dc_p}{dx} dx$$

Um den Bezug zu den Kurvenanpassungen der eigenen Arbeit herzustellen, wird zum einen Gleichung (E-5) genutzt. Um zum anderen ausgehend von der Variablen w auf die übliche Einheit für den Diffusionskoeffizienten ($[D] = \text{cm}^2/\text{s}$) zu kommen, muss man an einer beliebigen Stelle einen Umrechnungsfaktor⁴² n einarbeiten, der in beiden Experimenten 0.012 cm/Pixel beträgt:

$$(E-8) \quad x = n \cdot w$$

⁴¹ Für die Polyelektrolytkonzentration wurde das arithmetische Mittel der Tabelle (E-1) eingesetzt.

⁴² Dazu benötigt man die Bildgröße des sichtbaren Lösungsraums in Pixel. Da man dessen Gegenstandsgröße in cm kennt, kann n anschließend bestimmt werden. Einen einfachen Zugang zur Bildgröße bietet der „Randeffekt“ (vgl. Abbildung (C-5), S.40). Alternativ kann man nach Abbruch des Diffusionsexperiments bei unveränderter Position der Diffusionszelle die gesamte Lösung zuerst mittels Kanüle aus der Zelle entfernen, um sie anschließend vollständig zurückzuführen. Die erzeugte Mischlösung führt zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal über die gesamte Länge des sichtbaren Lösungsraums und damit zur gewünschten Bildgröße in Pixel.

In der vorliegenden Arbeit wird dieser Schritt in Gleichung (E-6)⁴³ vollzogen. Dadurch erhält man (P ≡ Pixel):

(E-9)

$$I(x) = a \frac{\operatorname{erfc}\left(b_1\left(\frac{x \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}} + c_1\right)\right) \exp\left(f\left(\frac{x \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}}\right)^3\right) + \operatorname{erfc}\left(b_2\left(\frac{x \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}} + c_2\right)\right) g}{\exp\left(f\left(\frac{x \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}}\right)^3\right) + g}$$

Mit Gleichung (E-5) wird aus Gleichung (A-15):

$$(E-10) \quad D(x) = \frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dl} \right)_x \int_x^\infty x \frac{dl}{dx} dx$$

Führt man eine partielle Integration⁴⁴ durch, so erhält man:

$$(E-11) \quad D(x) = -\frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dl} \right)_x \left(xI + \int_x^\infty I dx \right) = -\frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dl} \right)_x A(x)$$

Indem man ausgehend von Gleichung (A-13) (S.4) als Integrationsgrenze nicht die Salzlösung ($c_p = 0$) sondern das Polyelektrolytreservoir ($c_p = c_{p0}$) wählt, erhält man eine alternative Möglichkeit zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten. Mit Gleichung (E-5) erhält man anstelle von Gleichung (E-11):

$$(E-12) \quad D(x) = \frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dl} \right)_x \left(x(I_{\max} - I) - \int_{-\infty}^x (I_{\max} - I) dx \right) = -\frac{1}{2t} \left(\frac{dx}{dl} \right)_x A_{\text{al}}(x)$$

Der konkrete Wert für $D(x)$ ergibt sich unter Verwendung von Gleichung (E-9) in Verbindung mit den einzelnen Parameterwerten (Anhang 3). Die Festlegung der Anfangsgrenze durch eine Abschätzung aus den jeweiligen Anfangsintensitätsprofilen ist aller-

⁴³ Es wird auf Gleichung (E-6) zurückgegriffen. Gleichung (E-7) war lediglich zur Korrektur der fehlerhaften Grundlinie in den Intensitätsprofilen vonnöten.

⁴⁴ Intensitätsfluktuationen können Fehler insbesondere in der Steigung dI/dx verursachen, die sich merklich auf den berechneten Wert für den Diffusionskoeffizienten auswirken können (siehe Kapitel E.4). Soweit dies möglich ist, wird dieser Term eliminiert.

dings wenig befriedigend (siehe Abbildung (E-4) und Fußnote 32). Besser ist es, die Äquivalenz der Gleichungen (E-11) und (E-12) zu nutzen und zu fordern:

$$(E-13) \quad xI + \int_x^{\infty} I dx = -x(I_{\max} - I) + \int_{-\infty}^x (I_{\max} - I) dx \quad \text{bzw.} \quad A(x) = A_{\text{al}}(x)$$

Für $x = 0$ verlangt dies⁴⁵:

$$(E-14) \quad \int_0^{\infty} I dx = \int_{-\infty}^0 (I_{\max} - I) dx \quad \text{bzw.} \quad A(0) = A_{\text{al}}(0)$$

Wenn man an der Lage der Anfangsgrenze ($w = 0$ bzw. $x = 0$) festhalten will und gleichzeitig Gleichung (E-14) erfüllt sein soll, muss man gegebenenfalls das Intensitätsprofil entlang der Abszisse verschieben. Deshalb wird in Gleichung (E-9) der anpassbare Parameter v eingeführt:

$$(E-15)$$

$$I(x) = a \frac{\operatorname{erfc}\left(b_1 \left(\frac{(x+v) \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}} + c_1\right)\right) \exp\left(f \left(\frac{(x+v) \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}}\right)^3\right) + \operatorname{erfc}\left(b_2 \left(\frac{(x+v) \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}} + c_2\right)\right) g}{\exp\left(f \left(\frac{(x+v) \cdot P}{0.012 \cdot \text{cm}}\right)^3\right) + g}$$

Der Parameter v wird so bestimmt, dass Gleichung (E-14) in sehr guter Näherung erfüllt ist (siehe Anhang 3)^{46,47}. $D(x)$ wurde unter Verwendung der Gleichung (E-15) nach den Gleichungen (E-11) und (E-12) berechnet. Die Variable x wurde ausgehend von einem Startwert von -0.6 cm (-50 Pixel) in Schritten von 0.1 cm erhöht⁴⁸. Um $D(c_p)$ zu bestimmen, berechnet man nach Gleichung (E-15) zusätzlich $I(x)$ und nach Gleichung (E-5) $c_p(x)$. Die Konstante m lässt sich auf einfache Weise gewinnen:

$$(E-16) \quad m = \frac{I_{\max}}{c_{p0}} = \frac{a}{2 g/l}$$

⁴⁵ Alternativ kann man Gleichung (E-14) unter Verwendung der Gleichung (E-5) aus der Konstanz der Polyelektrolytteilchenzahl im gesamten Lösungsraum herleiten.

⁴⁶ Diese und die folgenden Berechnungen wurden mit maple 9 durchgeführt.

⁴⁷ Die im Unendlichen liegenden Integrationsgrenzen werden stets durch Werte ersetzt, die deutlich von dem Diffusionsbereich entfernt sind (z. B. $x = \pm 20 \text{ cm}$).

⁴⁸ Z. T. wurden zusätzliche Werte von x eingearbeitet.

Die nach den Gleichungen (E-11) bzw. (E-12) berechneten Werte für den Diffusionskoeffizienten von markiertem BSA stimmen für den mittleren Konzentrationsbereich gut überein, für große $|x|$ unterscheiden sie sich teilweise. Bei Diskrepanzen wird für den Diffusionskoeffizienten jeweils der Wert gewählt, dessen (kleine) Fläche (A bzw. A_{ai}) nach den Gleichungen (E-11) bzw. (E-12) nicht aus der Differenz zweier großer Beträge, sondern aus der Summe zweier kleiner Beträge gewonnen wird. In der Umgebung des Polyelektrolytreservoirs wird deshalb der Wert nach Gleichung (E-12) und im Grenzbereich starker Verdünnung der nach Gleichung (E-11) verwendet. Nach diesem Muster erhält man die Tabellen (E-2) und (E-3), deren Resultate in Abbildung (E-5) grafisch aufgetragen sind.

Experiment 1:

Diffusionszeit: 5 h		Diffusionszeit: 7 h		Diffusionszeit: 9 h	
$c_p \cdot l/g$	$D \cdot 10^7 \cdot s/cm^2$	$c_p \cdot l/g$	$D \cdot 10^7 \cdot s/cm^2$	$c_p \cdot l/g$	$D \cdot 10^7 \cdot s/cm^2$
0.03	4.3	0.01	4.1	0.03	4.0
0.09	4.3	0.08	4.1	0.14	4.0
0.23	4.3	0.18	4.1	0.26	4.1
0.33	4.3	0.35	4.1	0.46	4.1
0.47	4.3	0.48	4.1	0.59	4.1
0.88	4.2	0.64	4.1	0.75	4.1
2.07	4.6	1.04	4.3	1.13	4.1
3.15	5.8	2.07	4.4	2.07	4.2
3.71	5.8	3.04	5.2	2.98	4.8
3.93	5.9	3.57	5.3	3.48	5.4
3.99	6.0	3.88	5.1	3.80	5.5
		3.98	5.1	3.94	5.5
				4.00	5.5

Tabelle (E-2): $D(c_p)$ von markiertem BSA (Experiment 1).

Experiment 2: Diffusionszeit 9 h

c_p -l/g	$D \cdot 10^7 \cdot s/cm^2$	c_p -l/g	$D \cdot 10^7 \cdot s/cm^2$
0.03	6.1	1.33	6.3
0.10	6.1	2.11	6.6
0.29	6.2	2.85	8.1
0.46	6.2	3.28	9.0
0.69	6.2	3.62	9.1
0.82	6.2	3.83	9.3
0.98	6.2	3.97	9.4

Tabelle (E-3): $D(c_p)$ von markiertem BSA (Experiment 2).

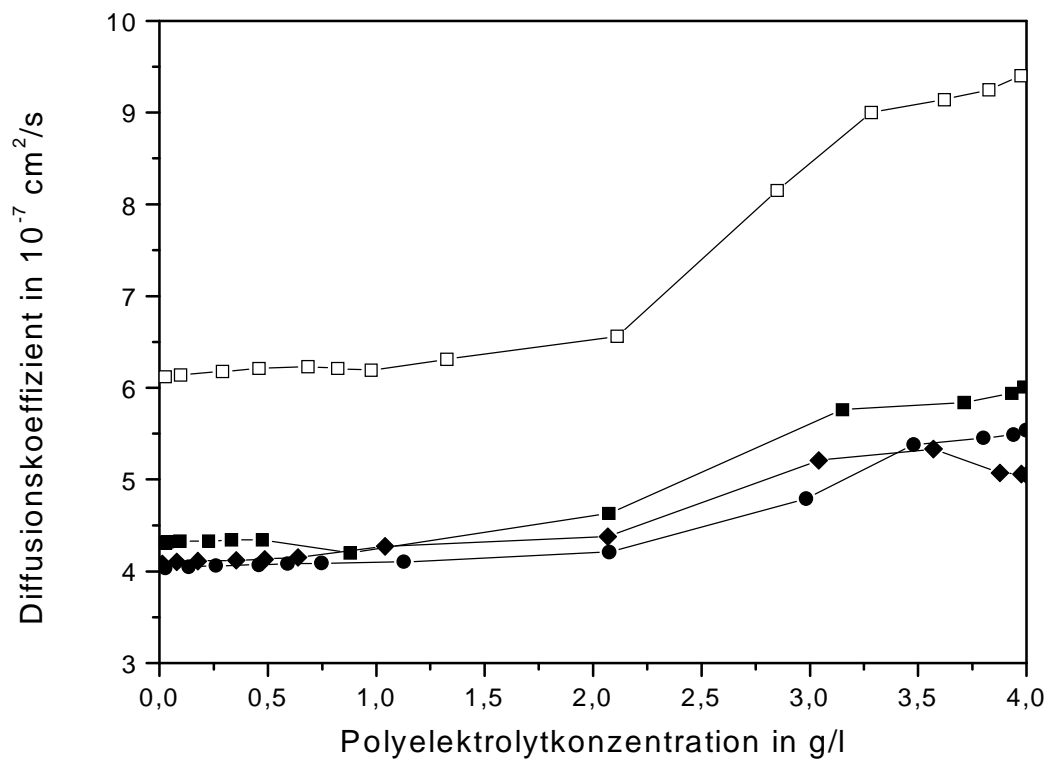


Abbildung (E-5): Diffusionskoeffizient in Abhängigkeit von der Konzentration an markiertem BSA. Die einzelnen Symbole bedeuten:

- : Diffusionszeit 5 h (Experiment 1)
- ◆ : Diffusionszeit 7 h (Experiment 1)
- : Diffusionszeit 9 h (Experiment 1)
- : Diffusionszeit 9 h (Experiment 2)

Für Experiment 1 wurde unter Annahme einer Linearität zwischen zwei Bestimmungspunkten (Abbildung (E-5)) ein gemittelter Diffusionskoeffizient im Abstand von 0.5 g/l berechnet. Er ist unter Berücksichtigung der Standardabweichung⁴⁹ zusammen mit dem Diffusionskoeffizienten aus Experiment 2 in Abbildung (E-6) dargestellt:

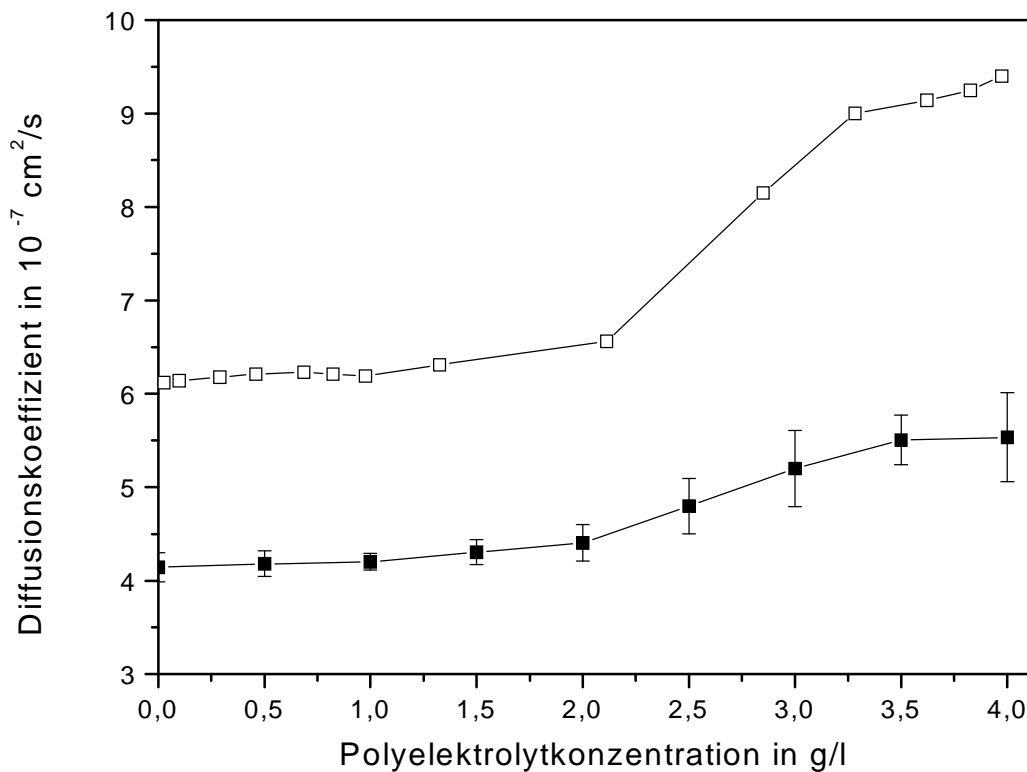


Abbildung (E-6): Diffusionskoeffizient in Abhängigkeit von der Konzentration an markiertem BSA. Gezeigt sind der gemittelte Diffusionskoeffizient einschließlich Standardabweichung aus Experiment 1 (■) und der Diffusionskoeffizient aus Experiment 2 nach einer Diffusionszeit von 9 h (□).

Der Verlauf des Diffusionskoeffizienten mit dem bis $c_p \approx 2 \text{ g/l}$ annähernd konstanten Wert erklärt die Beobachtung $c_p(x=v)/c_{p0} \approx 0.5$ (S.63). Da der Diffusionskoeffizient dennoch für $x < v$ größer ist als für $x > v$, ist die Eindringtiefe der Diffusion in das Polyelektrolytreservoir etwas größer als in die Salzlösung. Anhand der Flächenregel (Gleichung (E-14)) kann man sich mit Hilfe von Gleichung (E-5) leicht klarmachen, dass der Quotient tatsächlich etwas größer sein muss als 0.5 (vgl. Werte S.63).

⁴⁹ Origin 6.1 G, Statistik

E.4 Anmerkungen zu den berechneten Diffusionskoeffizienten

Die Werte für den Diffusionskoeffizienten streuen nach Abbildung (E-6) signifikant für $c_p \geq 2.5$ g/l in Experiment 1. Ab $c_p \approx 3.4$ g/l hängt nach Abbildung (E-5) auch das Vorzeichen der Steigung $\Delta D/\Delta c_p$ von der Diffusionszeit ab.

Wenn man von schwachen Fluktuationen im Bereich sehr kleiner Polyelektrolytkonzentration absieht, sind zwar in den Abbildungen (E-1) bis (E-4) Kurvenanpassung und Intensitätsprofil für $l < 100$ a. u. nahezu deckungsgleich, ab $l \approx 110$ a. u. ($c_p \approx 3.4$ g/l in Experiment 1) treten allerdings ausgeprägte Intensitätsfluktuationen auf. Da die Einzelrezeptoren des Kamerachips nicht absolut identisch sind, ist dieses Phänomen für größere Intensitätswerte zu erwarten. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Kurvenanpassungen der Abbildungen (E-1) bis (E-4) ab $l \approx 110$ a. u. weniger gute Näherungen darstellen⁵⁰.

Deshalb wird die exakte Lage der Anfangsgrenze nach der Flächenregel (Gleichung (E-14)) unbestimmbar. Die Konsequenzen für den Wert des Diffusionskoeffizienten erstrecken sich zwar über den gesamten Konzentrationsbereich, sind aber von vernachlässigbarer Größenordnung (siehe Anhang 4).

Da sich die Steigung der Fluoreszenzintensität mit Annäherung an das Polyelektrolytreservoir seinem Grenzwert Null nähert, können sich nach den Gleichungen (E-11) bzw. (E-12) bereits kleine absolute Fehler, die aus einem nicht eindeutigen Intensitätsverlauf resultieren, auf den erhaltenen Wert für den Diffusionskoeffizienten auswirken. Dadurch lässt sich das widersprüchliche Verhalten des berechneten Diffusionskoeffizienten für $c_p > 3.4$ g/l erklären. Dennoch ist ein einheitlicher Trend, eine deutlich schwächere Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten im oberen Konzentrationsbereich, zu erkennen (siehe Diskussion auf S.78).

⁵⁰ Insbesondere bei der Messung nach einer Diffusionszeit von 7 h (Abbildung (E-2)) treten zwar im Grenzbereich starker Verdünnung ebenfalls Intensitätsfluktuationen auf, aber in schwächerer Ausprägung hinsichtlich Amplitude und Reichweite. Mögliche Fehler sind aber offensichtlich so klein, dass sie sich nicht im erhaltenen Wert für den Diffusionskoeffizienten niederschlagen. Jedenfalls deckt sich nach Abbildung (E-5) in diesem Konzentrationsbereich der Verlauf des Diffusionskoeffizienten mit dem der anderen Auswertungen. Auch die Werte für den Diffusionskoeffizienten stimmen gut mit den nach einer Diffusionszeit von 9 h erhaltenen Werten überein.

Fazit

Nach Abbildung (E-6) ist der Diffusionskoeffizient für $c_p < c_p^x \approx 1.5 \text{ g/l}$ ($c_p^x \equiv$ Grenzkonzentration) konstant, um anschließend zuzunehmen. Ab einer zweiten Grenzkonzentration c_p^{xx} ($c_p^x < c_p^{xx} \approx 2 \text{ g/l}$) nimmt der Diffusionskoeffizient genähert linear mit der Polyelektrolytkonzentration zu. Für $c_p > 3.4 \text{ g/l}$ bestehen Zweifel an den berechneten Werten für den Diffusionskoeffizienten.

Das Verhalten des Diffusionskoeffizienten für $c_p < 2 \text{ g/l}$ widerspricht der Annahme einer linearen Konzentrationsabhängigkeit von Diffusionskoeffizienten bis in den Grenzbereich starker Verdünnung, von der sowohl Anderson [58] als auch Bowen [59] ausgehen. Die eigenen Ergebnisse sollen deshalb im Folgenden überprüft werden.

E.5 Vergleich mit Literaturergebnissen

E.5.1 Diffusionskoeffizient D_0

Nach den Tabellen (E-2)⁵¹ und (E-3) ergeben die eigenen Experimente⁵²:

$$D_0 = 4.1 \cdot 10^{-7} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \quad (5^\circ\text{C})$$

$$D_0 = 6.1 \cdot 10^{-7} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \quad (17^\circ\text{C})$$

Nach Gleichung (D-5) (S.45) hat die Fluoreszenzmarkierung von BSA für ξ_0 (markiertes BSA) = ξ_0 (natives BSA) (vgl. [55]) trotz starker Ladungsveränderung keinen Einfluss auf D_0 . Deshalb können die eigenen Werte mit den Literaturdaten für natives BSA verglichen werden. Einige sind in Tabelle (E-4) aufgelistet, wobei jeweils Lösungsbedingungen vorlagen, die mit denen der eigenen Messungen vergleichbar waren:

⁵¹ Es wurde der Mittelwert des Diffusionskoeffizienten D_0 herangezogen.

⁵² Es wurde der Mittelwert der Raumtemperatur gebildet.

Messtemperatur in °C	$D_0 \cdot 10^7 \cdot \text{s/cm}^2$	Messmethode	Literatur
4	3.6	Taylor-Methode	[58] ⁵³
10	4.4	Lichtstremethode	[64] ⁵⁴
23	6.3	Lichtstremethode	[64]
25	6.2	Lichtstremethode	[59] ⁵³

Tabelle (E-4): Literaturwerte von D_0 für natives BSA

Die eigenen Ergebnisse fügen sich in zufriedenstellender Weise in die Werte der Tabelle (E-4) ein. Man kann sie einer zusätzlichen Überprüfung unterziehen. Wenn man den Reibungskoeffizienten ξ_0 von BSA durch den Ausdruck ersetzt, den Stokes für ein kugelförmiges Makromolekül mit Radius r bestimmt hat, wird aus Gleichung (D-5) (S.45):

$$(E-17) \quad D_0(T) = \frac{k_B T}{6\pi \eta_0(T) r}$$

$\eta_0(T)$: Zähigkeit der unendlich verdünnten Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur (entspricht bei salzarmen Lösungen $\eta(T)$ von Wasser)

Daraus ergibt sich die Walden-Regel (c : molekulspezifische Konstante):

$$(E-18) \quad \frac{D_0(T) \cdot \eta_0(T)}{T} = c$$

⁵³ D_0 wird durch Extrapolation von Messpunkten bestimmt, die in 0.1-molaren Salzlösungen gewonnen wurden. Da die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten bei dieser Salzkonzentration nur schwach ausgeprägt ist, spielen Abweichungen des Verlaufs von der Linearität, wie sie in Abbildung (E-6) beobachtet wurden, eine vernachlässigbare Rolle. Die Viskosität der 0.1-molaren Salzlösung unterscheidet sich nicht merklich von der des reinen Wassers. Deshalb kann man nach Gleichung (E-17) annehmen: $D_0(c_s = 0.1 \text{ mol/l}) = D_0(c_s = 10^{-3} \text{ mol/l})$.

⁵⁴ Der Diffusionskoeffizient wurde für $c_p = 0.5 \text{ g/l}$ bei $\text{pH} = 6.66$ und einer Ionenstärke von 25 mmol/l ermittelt. Die Viskosität der Lösung entspricht deshalb in Näherung der bei den eigenen Messungen. Nach Abbildung (E-6) und Kapitel E.6 (S.73) ist der von Gaigalas bestimmte Diffusionskoeffizient identisch mit D_0 .

Kennt man η_0 für beide Messtemperaturen, so kann man berechnen, in welchem Verhältnis die Diffusionskoeffizienten zueinander stehen müssen:

$$(E-19) \quad \frac{D_0(17^\circ\text{C})}{D_0(5^\circ\text{C})} = \frac{290\text{K} \cdot \eta_0(5^\circ\text{C})}{278\text{K} \cdot \eta_0(17^\circ\text{C})}$$

Nach Anderson [58] ist:

$$\frac{\eta_0(4^\circ\text{C})}{\eta_0(20^\circ\text{C})} = 1.57$$

Nimmt man in diesem Intervall eine lineare Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur an, so ergibt sich mit $\eta_0(20^\circ\text{C}) = 1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$:

$$\frac{\eta_0(5^\circ\text{C})}{\eta_0(17^\circ\text{C})} = 1.39$$

Setzt man dies in Gleichung (E-19) ein, ergibt sich:

$$\frac{D_0(17^\circ\text{C})}{D_0(5^\circ\text{C})} = 1.45$$

Die eigenen Messungen (S.70) ergeben das Verhältnis 1.49, wodurch die Walden-Regel in befriedigender Weise erfüllt ist.

E.5.2 Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten

Es liegen nur wenige Daten zu dem Verhalten des Diffusionskoeffizienten von Polyelektrolyten in salzarmer stark verdünnter Lösung vor. In der überwiegenden Mehrheit wird ausgehend von dem Diffusionskoeffizienten für $c_p > 1 \text{ g/l}$ durch eine Ausgleichsgerade auf ein anderweitig bestimmtes D_0 extrapoliert (vgl. Fußnote 53). Als typische Beispiele können die ersten beiden Konzentrationswerte von Anderson [58] ($c_p \approx 10 \text{ g/l}$ bzw. 15 g/l) und Bowen [59] ($c_p = 2 \text{ g/l}$ bzw. ca. 4 g/l) herangezogen werden, die den Diffusionskoeffizienten von nativem BSA untersuchen. Nur Bowens Messungen erfassen den Konzentrationsbereich der eigenen Arbeit, allerdings nur mit zwei Messwerten. Natur-

gemäß muss deshalb das „tatsächliche“ Verhalten des Diffusionskoeffizienten im Grenzbereich starker Verdünnung im Verborgenen bleiben.

Grüner [65] bestimmt durch Lichtstreuexperimente den Diffusionskoeffizienten von Polystyrolsulfonat in salzfreier Lösung⁵⁵. Die Minimalkonzentration, bei der er den Diffusionskoeffizienten ermittelt, beträgt 5 mg/l. Er erhält für die nachfolgenden beiden Konzentrationswerte (10 mg/l bzw. 15 mg/l) exakt denselben Wert für den Diffusionskoeffizienten. Erst ab einer Konzentration von 100 mg/l kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Diffusionskoeffizienten mit der Konzentration.

Vor kurzem hat Gapinski [66] mit Hilfe von Lichtstreuexperimenten den Diffusionskoeffizienten des (genähert) kugelförmigen Proteins Apoferritin in einer 10^{-3} -molaren Salzlösung ermittelt. Die den Messungen zugrundeliegende Polyelektrolytkonzentration beginnt mit den Werten: $c_p = 0.3$ g/l, $c_p = 0.6$ g/l, $c_p \approx 1.0$ g/l und $c_p \approx 3.0$ g/l. Der Diffusionskoeffizient besitzt jeweils denselben Wert. Erst ab einer Polyelektrolytkonzentration von ca. 10 g/l kommt es zu einem sichtbaren Anstieg des Diffusionskoeffizienten.

Beide Experimente bestätigen die in Abbildung (E-6) auftretende Konstanz des Diffusionskoeffizienten vom Grenzbereich starker Verdünnung bis zur Grenzkonzentration c_p^x .

E.6 Interpretation der Messergebnisse

Hinsichtlich einer Interpretation der Messergebnisse sind die Lichtstreuexperimente von Gaigalas [64] interessant. Er bestimmt den Diffusionskoeffizienten von nativem BSA in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Sowohl die Polyelektrolytkonzentration ($c_p = 0.5$ g/l) als auch die Ionenstärke der Lösung (25 mmol/l) wurden dabei konstant gehalten. Der Diffusionskoeffizient bleibt für die pH-Werte 5, 6 und 7 näherungsweise konstant. Abbildung (D-2) (S.48) zufolge nimmt $|z_p|$ von pH 6 (nahezu ungeladen) bis

⁵⁵ Nagasawa [18] ermittelt den Diffusionskoeffizienten dieses Polyelektrolyten in salzfreier Lösung mit Hilfe eines Gradientenexperiments (siehe Kapitel A.3, S.10 und Abbildung (A-2)). Seine ersten Bestimmungspunkte liegen bei $c_p \approx 0.1$ g/l. Der Diffusionskoeffizient nimmt von dort mit der Polyelektrolytkonzentration zu. Für einen Vergleich mit Grüners Resultaten benötigt man allerdings die molare Masse des eingesetzten Polystyrolsulfonats (siehe S.75 ff.). Nagasawa gibt dafür einen unrealistischen Polymerisationsgrad von 10^6 an (Erratum, da die molare Masse eines Monomers bei ca. 200 g/mol liegt ?!).

pH 7 um ca. 5 zu. Deshalb sollte sich auch $z_{p,\text{eff}}$ und damit nach den Gleichungen (D-1) (S.44) und (Ah1-6) (S.85) der Diffusionskoeffizient für beide pH-Werte unterscheiden.

Zusätzlich ermittelt Gaigalas den Diffusionskoeffizienten von BSA für $c_p = 0.5 \text{ g/l}$ bei $\text{pH} = 6.2$ in salzfreier Lösung und bei $\text{pH} = 5.2$ für eine Ionenstärke von 0.1 mol/l . Auch hier ergibt sich dasselbe Bild, beide Werte für den Diffusionskoeffizienten sind gleich groß. Nach Abbildung (D-2) (S.48) sollte $|z_p|$ bei beiden pH-Werten ähnlich groß sein. Wenn man für beide Experimente den gleichen Wert für $|z_{p,\text{eff}}|$ annimmt, unterscheiden sie sich hinsichtlich Gleichung (Ah1-6) (S.85) nur in der Salzkonzentration. Nach den Gleichungen (D-1) (S.44) und (Ah1-9) (S.85) erreicht der Diffusionskoeffizient in salzfreier Lösung seinen Maximalwert. Er sollte deutlich größer sein als der Diffusionskoeffizient bei einer Ionenstärke von 0.1 mol/l .

Beide Beobachtungen lassen sich allerdings erklären, wenn man $|z_{p,\text{eff}}| = 0$ für $c_p = 0.5 \text{ g/l}$ annimmt, da in diesem Fall die Kombination aus den Gleichungen (D-1) (S.44) und (Ah1-6) (S.85) in D_0 (Gleichung (D-5), S.45) einmündet.

Overbeek [48,67] interpretiert vergleichbare Beobachtungen durch ein Alternativmodell zum Donnan-Gleichgewicht. Ausgehend von der Oberfläche eines Polyelektrolytions nimmt der Betrag des elektrischen Potentials mit zunehmender Entfernung ab. In stark verdünnten Lösungen ist der Abstand zwischen zwei benachbarten Polyelektrolytionen so groß, dass die beiden Potenzialverläufe voneinander unbeeinflusst sind, d. h. der Betrag des Potentials sinkt auf Null, wenn man der bulk-Lösung diesen Wert zuweist. Das Polyelektrolytion bildet in diesem Konzentrationsbereich einschließlich der umgebenden Ionenwolke eine neutrale Einheit ($z_{p,\text{eff}} = 0$). Ab einer Polyelektrolytkonzentration c_p^x beginnen die Potenzialverläufe und damit die Ionenwolken benachbarter Polyelektrolytionen zu überlappen. Exakt in der Mitte zwischen den beiden Polyelektrolytionen besitzt der Betrag des Potenzialverlaufs ein Minimum, es wirkt keine elektrische Kraft auf Gegenionen und Coionen. Man kann beide deshalb als „frei“ betrachten, nur an dieser Stelle sind sie im Sinne einer idealen Lösung osmotisch aktiv. Nach der Boltzmann-Verteilung ist die Konzentration der Gegenionen dort größer als die der Coionen. Diese Differenz bestimmt die effektive Polyelektrolytladungszahl ($z_{p,\text{eff}} \neq 0$) (Elektroneutralität der Lösung). Mit wachsender Polyelektrolytkonzentration nimmt der Minimalwert im Betrag des Potenzialverlaufs zu. Deshalb vergrößert sich an dieser Stelle die Differenz zwi-

schen Gegenionen- und Coionenkonzentration und damit der Betrag der effektiven Nettoladungszahl des Polyelektrolytions ($\partial |z_{p,eff}| / \partial c_p > 0$).

Nach den Gleichungen (D-1) (S.44) und (Ah1-6) (S.85) ist der Diffusionskoeffizient eine Funktion von $z_{p,eff}$. Deshalb sollte die Erklärung von Overbeek auch hier greifen. Sie wird allerdings abgewandelt, indem das Donnan-Gleichgewicht nach Anhang 1 ($z_{p,eff} = \text{konstant}$) mit der Theorie von Overbeek ($z_{p,eff}(c_p)$) kombiniert wird (siehe Anhang 5). Die eigenen Messergebnisse und alle beschriebenen Literaturergebnisse lassen sich damit in qualitativer Hinsicht erklären: Der Diffusionskoeffizient ist für $0 < c_p < c_p^x$ konstant, da man den Polyelektrolyten als neutral auffassen kann ($z_{p,eff} = 0$). Erst für $c_p > c_p^x$ macht sich die Polyelektrolytladung bemerkbar ($|z_{p,eff}| > 0$). Nach Gleichung (Ah5-3) (S.90) beginnt der Diffusionskoeffizient mit zunehmender Polyelektrolytkonzentration nichtlinear zu steigen ($\partial |z_{p,eff}| / \partial c_p > 0$).

Nach Grüner [65] (vgl. S.73) liegt c_p^x für Polystyrolsulfonat ($M \approx 10^5$ g/mol) bei ca. 0.1 g/l, d. h. bei $c^x \approx 10^{-6}$ mol/l. Abbildung (E-6) zufolge gilt für die eigenen Experimente mit markiertem BSA: $c_p^x \approx 1.5$ g/l ($\equiv c^x \approx 2.2 \cdot 10^{-5}$ mol/l)⁵⁶. Die deutliche Differenz bezüglich c^x liegt zum einen daran, dass Grüner in salzfreier Lösung arbeitet. Dadurch steigt nach Gleichung (D-13) (S.52) der Radius κ^{-1} der Ionenwolke, die Ionenwolken überlappen deshalb ab einer kleineren Stoffmengenkonzentration des Polyelektrolyten. Zum anderen ist zu berücksichtigen, dass synthetische Polyelektrolyte in salzfreier Lösung genähert in Stabform vorliegen. Durch die sperrige Gestalt sollte c^x auch in 10^{-3} -molarer Salzlösung deutlich niedriger liegen als bei dem (genähert) kugelförmigen BSA.

Die Ergebnisse von Gaigalas [64] (S.73,74) legen nahe, dass bei $c_p = 0.5$ g/l der Grenzwert c_p^x für natives BSA selbst in salzfreier Lösung noch nicht erreicht wird. Dies lässt $c_p^x \approx 1.5$ g/l für markiertes BSA in einer 10^{-3} -molaren Salzlösung vernünftig erscheinen.

Nach Gapinski [66] liegt c_p^x für das Protein Apoferritin ($M \approx 450\,000$ g/mol [69]) in einer 10^{-3} -molaren Salzlösung bei ca. 10 g/l ($c^x \approx 2.2 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Die Stoffmengengrenzkonzentration c^x stimmt folglich für Apoferritin und markiertes BSA überein (siehe oben).

⁵⁶ M (BSA) $\approx 66\,500$ g/mol [68]. Durch die sechsfache Markierung mit dem Alexafarbstoff der Abbildung (D-1) (S.47) erhöht sich die molare Masse auf ca. 69 500 g/mol.

Gapinskis Experimente in 10^{-4} - bzw. 10^{-5} -molarer Salzlösung zeigen eine zunehmende Verschiebung von c_p^x in Richtung stärkerer Verdünnung. Dies ist zu erwarten, da nach Gleichung (D-13) (S.52) der Radius κ^{-1} der Ionenwolke mit abnehmender Salzkonzentration zunimmt und die Ionenwolken deshalb bereits für kleinere c_p^x überlappen. Gapinski zufolge lässt sich die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten nur dann mit den Berechnungen eines theoretischen Modells⁵⁷ zur Deckung bringen, wenn man in Analogie zur eigenen Argumentation eine Konzentrationsabhängigkeit der effektiven Polyelektrolytladungszahl $z_{p,eff}$ zugrundelegt.

Es bleibt noch zu klären, wie man die lineare Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten z. B. in Abbildung (A-1) (S.8) [6] begründen kann. Nach Gleichung (Ah5-3) (S.90) müssen für ein lineares Verhalten zwei Voraussetzungen gegeben sein. Zum einen muss gelten: $\partial |z_{p,eff}| / \partial c_p = 0$. Andere Experimente⁵⁸ legen nahe, dass tatsächlich $\partial |z_{p,eff}| / \partial c_p \neq 0$ nur bis zu einer zweiten Grenzkonzentration c_p^{xx} ($c_p^{xx} > c_p^x$) gilt, während für $c_p > c_p^{xx}$ die effektive Nettoladungszahl einen konstanten Wert annimmt: $z_{p,eff} = z_{p,eff}^{xx}$, wodurch die erste Bedingung erfüllt ist. Zum anderen muss gelten: $|z_{p,eff}^{xx}| c_p / (2M) \ll c_s$. Unter diesen Bedingungen gilt Gleichung (Ah5-5) (S.91).

Abbildung (E-6) zufolge kann man für markiertes BSA abschätzen: $c_p^{xx} \approx 2 \text{ g/l}$ ($c^{xx} = 2.9 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). $|z_{p,eff}^{xx}| c_p / (2M) \ll c_s$ ist erfüllt⁵⁶, da $z_{p,eff}^{xx} \approx -6$ (siehe nächste Seite). Damit lässt sich die in Abbildung (E-6) für $c_p > c_p^{xx} \approx 2 \text{ g/l}$ gezeigte genähert lineare Abhängigkeit erklären.

Abbildung (A-1) (S.8) [6] zeigt den Diffusionskoeffizienten von Poly-L-Lysin, einem synthetischen Polyelektrolyten. Für $c_s = 10^{-2} \text{ mol/l}$ (Experiment (V) in Abbildung (A-1)) ist $c_p^{xx} < 0.5 \text{ g/l}$. Mit der molaren Masse des Polyelektrolytions von ca. 54 000 g/mol ergibt sich $c^{xx} < 9 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$, d. h. offensichtlich ist nicht nur c^x sondern selbst c^{xx} bei synthetischen Polyelektrolyten kleiner als c^x bei markiertem BSA bzw. Apoferritin⁵⁹.

⁵⁷ Dieses Modell unterscheidet sich von dem der vorliegenden Arbeit durch deutlich größere Subtilität.

⁵⁸ Auf diese Weise lässt sich z. B. das Verhalten des Diffusionskoeffizienten von Polystyrolsulfonat in salzfreier Lösung erklären, das Abbildung (A-2) (S.10) [18] zeigt und das durch alternative Experimente [21,22,65] bestätigt wird. Der Diffusionskoeffizient wächst mit der Polyelektrolytkonzentration, da für $c_p > c_p^x$ die Polyelektrolytladung konzentrationsabhängig ist. Erst ab $c_p = c_p^{xx}$ bleibt $z_{p,eff}$ konstant. Der Diffusionskoeffizient verliert deshalb für $c_p \geq c_p^{xx}$ seine Konzentrationsabhängigkeit. Dies bringen sowohl die klassische Nernst-Hartley Gleichung (A-7) (S.3) als auch Gleichung (Ah5-6) (S.91) zum Ausdruck.

⁵⁹ c^x (markiertes BSA) $> c^{xx}$ (Poly-L-Lysin), obwohl die Salzkonzentration bei den eigenen Experimenten mit $c_s = 10^{-3} \text{ mol/l}$ kleiner ist als bei Experiment (V) in Abbildung (A-1) (S.8) [6].

Für beide Experimente wurde aus Abbildung (E-6) im linearen Abhängigkeitsbereich (Experiment 1: $2 \text{ g/l} \leq c_p \leq 3 \text{ g/l}$, Experiment 2: $2 \text{ g/l} < c_p < 3.3 \text{ g/l}$) die Steigung p bestimmt. Aus Gleichung (Ah5-5) (S.91) kann man anschließend die effektive Polyelektrolytladungszahl $z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}}$ ermitteln:

$$(\text{E-20}) \quad \left| z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}} \right| = \sqrt{\frac{2 M c_s p}{D_0}}$$

Tabelle (E-5) enthält die Ergebnisse⁶⁰:

Experiment	$p \cdot 10^7 \cdot \text{s} \cdot \text{g} / (\text{cm}^2 \cdot \text{l})$	$z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}}$
1 (5°C)	0.80	5.2
2 (17°C)	2.09	6.9

Tabelle (E-5): Steigung p im linearen Abhängigkeitsbereich des Diffusionskoeffizienten und $\left| z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}} \right|$ nach Gleichung (E-20).

Die berechnete effektive Nettoladungszahl $z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}}$ ist betragsmäßig für Experiment 2 etwas größer als für Experiment 1. Dies kann als Folge thermischer Dissoziation aufgefasst werden. Erwartungsgemäß ist $\left| z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}} \right|$ deutlich kleiner als $\left| z_p \right|$, das aus der Debye-Hückel-Theorie bzw. aus Titrationsexperimenten erhalten wurde ($z_p = -18$) (siehe Kapitel D.4, S.53 ff.).

Nach Gleichung (Ah5-4) (S.91) wird die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten nach einem linearen Abschnitt schwächer, um in einen Sättigungswert D_s (Gleichung (Ah5-6), S.91) einzumünden (siehe Abbildung (E-7), nächste Seite). Abbildung (E-5) zufolge ist für $c_p > 3.4 \text{ g/l}$ der lineare Bereich überschritten, der Diffusionskoeffizient nähert sich D_s . Für $c_p \approx 3.4 \text{ g/l}$ ist $\left| z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}} \right| c_p / (2 M) \approx 0.15 \cdot c_s$, wenn man $z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}} \approx -6$ zugrundelegt. Mit Hilfe von Gleichung (Ah5-4) (S.91) kann man deshalb die deutliche Abschwächung der Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten in

⁶⁰ Für D_0 wurden die Werte aus Kapitel E.5.1 (S.70) eingesetzt.

Abbildung (E-5) nicht erklären. Unter Verweis auf Kapitel E.4 könnte man vermuten, dass die Werte für den Diffusionskoeffizienten ab $c_p \approx 3.4$ g/l unsicher sind.

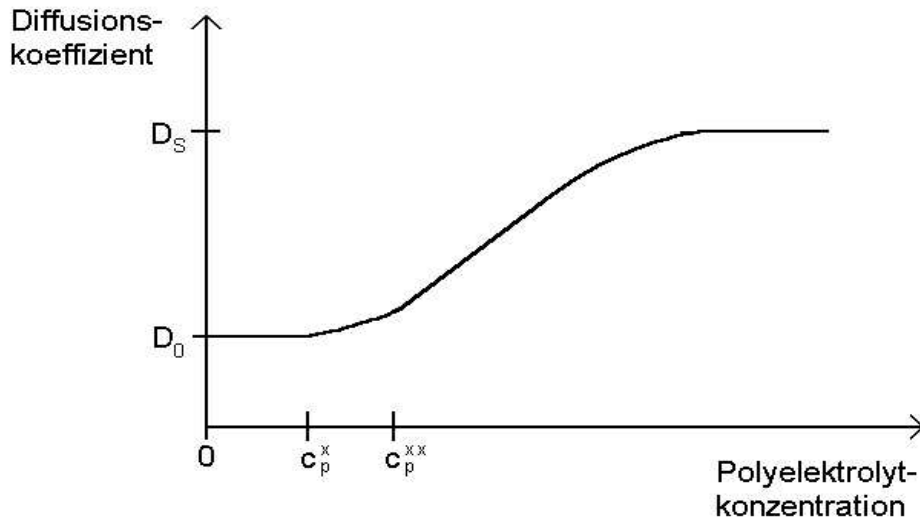


Abbildung (E-7): Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten (Prinzipiskizze)

Allerdings zeigt Abbildung (E-5), dass alle vier Kurvenverläufe eine Abflachung nach dem linearen Anstieg aufweisen. Nach Kapitel E.4 handelt es sich bei den Intensitätsfluktuationen ab $I \approx 110$ a. u. um ein statistisches Signalrauschen. Deshalb könnte das grundsätzlich einheitliche Verhalten des Diffusionskoeffizienten für $c_p > 3.4$ g/l über einen Zufall hinausweisen, insbesondere da in qualitativer Hinsicht die Abbildungen (E-6) und (E-7) übereinstimmen und dieser Verlauf des Diffusionskoeffizienten für $c_p > c_p^{xx}$ durch Lichtstreuexperimente [59,66] gedeckt wird. Man kann sich deshalb fragen, ob Gleichung (Ah5-4) (S.91) für $c_p > 3.4$ g/l zu einer quantitativen Beschreibung des Diffusionskoeffizienten taugt. Schließlich wurde unterstellt, dass alle Abweichungen von einer idealen Lösung in nur einen anpassbaren Parameter, eine effektive Nettoladungszahl $z_{p,eff}$ des Polyelektrolytions, eingehen. Diese Struktur mag für $c_p > 3.4$ g/l zu einfach sein (vgl. Fußnote 57).

F Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde aus nur einem dynamischen Gradientenexperiment der Diffusionskoeffizient eines Polyelektrolytions für $0 < c_p < c_{p0}$ (c_{p0} : Polyelektrolytkonzentration im Reservoir) nach der von Boltzmann abgeleiteten Gleichung (A-15) (S.5) bestimmt. Ältere Experimente [6,18], die das gleiche Ziel verfolgten, lieferten widersprüchliche Resultate. Eine mögliche Ursache könnte man in einer fehlerhaften Abbildung des Diffusionsvorgangs sehen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Tiefe d des Lösungsraums stark reduziert ($d=0.4$ mm). Dies erforderte die Entwicklung einer geeigneten Diffusionszelle. Dabei stellte sich heraus, dass der Erfolg der eingeführten Grenz- bildungstechnik, die für ein stufenförmiges Anfangskonzentrationsprofil zwischen Polyelektrolytlösung und Salzlösung sorgen soll, eng mit der Salzkonzentration der Lösungen verknüpft ist. In salzreichen Lösungen ($c_s = 1$ mol/l) versagt die Grenz- bildungstechnik. Dies wird mit einem elektrokinetischen Effekt begründet.

Ein anderer Grund für die widersprüchlichen Resultate der Literatur wurde in Streuungen der Kettenlänge um den Mittelwert gesehen, die bei synthetischen Polyelektrolyten auftreten können und in den älteren Gradientenexperimenten [6,18] hingenommen wurden. Da der Diffusionskoeffizient eine Funktion des Polymerisationsgrades ist, erscheint nur unter der Voraussetzung eines einheitlichen Polymerisationsgrades eine Bestimmung konzentrationsabhängiger Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (A-15) (S.5) sinnvoll. In dieser Arbeit wurde deshalb mit dem Protein BSA ein natürlicher Polyelektrolyt ausgewählt, der diese Voraussetzung erfüllt.

Die theoretische Beschreibung des Diffusionskoeffizienten sollte durch eine verallgemeinerte Stokes-Einstein Gleichung (Gleichungen (D-1), S.44 und (Ah1-6), S.85) erfolgen, wobei ein stetiges Donnan-Gleichgewicht und in Analogie zur Literatur [6,7,8,9,10] a priori ein konstantes $z_{p,eff}$ angenommen wurden. Alle Abweichungen von der Idealität der Lösung sollten sich in einer effektiven Nettoladungszahl $z_{p,eff}$ des Polyelektrolytions als anpassbarem Parameter widerspiegeln.

Der Diffusionskoeffizient wurde in einer salzarmen Lösung bestimmt, da geladene Makromoleküle dort gemäß Literatur stark konzentrationsabhängig sind. Dabei erschien der Grenzbereich starker Verdünnung besonders interessant, weil er bisher wenig Beach-

tung fand und auch in den Auswertungen eines älteren Gradientenexperiments (Abbildung (A-1), S.8, [6]) kommentarlos ausgespart wurde.

Häufig wurde in Gradientenexperimenten die Polyelektrolytkonzentration aus UV/VIS-Absorptionsmessungen gewonnen oder es wurde der Gradient der Polyelektrolytkonzentration aus der Lichtkrümmung beim Passieren heterogener Lösungen bestimmt (z. B. Schlierenmethode). Beide Verfahren scheiden wegen der geringen Tiefe des Lösungsraums und dem Interesse am Grenzbereich starker Verdünnung für die eigene Arbeit aus, da die zu erwartenden Signale für die Polyelektrolytkonzentration bzw. den Konzentrationsgradienten zu schwach wären. Die Fluoreszenzintensität ausgewählter Moleküle kann dagegen bis in den Bereich weniger Teilchen detektiert werden. Da BSA von Natur aus nicht ausreichend fluoresziert, wurde es mit einem leistungsstarken Marker versehen. Der Lösungsraum wurde mit einer LED belichtet und das resultierende Fluoreszenzintensitätsprofil mit einer CCD-Kamera gemessen. Zur Umrechnung der Fluoreszenzintensität auf die Polyelektrolytkonzentration wurde eine Eichkurve erstellt. Diese ergab eine Proportionalität zwischen beiden (c_p (markiertes BSA) ≤ 4 g/l).

Es wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, bereits fluoreszenzmarkiertes BSA zu erwerben. Nach Angabe des Herstellers besitzt es einen Markierungsgrad von 6. Der in dieser Arbeit verwendete Alexafarbstoff (Abbildung (D-1), S.47) trägt selbst zwei negative Ladungen. Da eine markierungsbedingte Veränderung der Nettoladungszahl z_p des nativen Proteins sich auf $z_{p,eff}$ und damit nach den Gleichungen (D-1) (S.44) und (Ah1-6) (S.85) auf den Diffusionskoeffizienten auswirken sollte, wurde die Nettoladungszahl des markierten Proteins abgeschätzt. Dazu wurde die Debye-Hückel-Theorie verwendet, deren Relevanz an die Gültigkeit der Bedingung $|\varphi(\kappa^{-1})| \ll 25.7$ mV geknüpft wurde. Die Berechnungen ergaben: z_p (natives BSA) ≈ -5 , z_p (markiertes BSA) ≈ -18 . In beiden Fällen war $|\varphi(\kappa^{-1})| \ll 25.7$ mV gegeben. Alternativ kann mit Hilfe der Titrationskurve (Abbildung (D-2), S.48) und einer erweiterten Henderson-Hasselbalch-Gleichung (D-6) (S.49) die markierungsbedingte Ladungsveränderung des Proteins bestimmt werden. Danach erhält man in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Debye-Hückel-Theorie: z_p (natives BSA) ≈ -5 bzw. z_p (markiertes BSA) ≈ -18 .

Nach Abbildung (E-6) (S.68) bleibt der Diffusionskoeffizient von markiertem BSA ausgehend vom Grenzbereich starker Verdünnung bis zu einer Grenzkonzentration c_p^x konstant, um anschließend zuzunehmen. Dies widerspricht der in der Literatur häufig postu-

lierten linearen Konzentrationsabhängigkeit bis in den Grenzbereich starker Verdünnung. Lichtstreuexperimente in salzarmen und salzfreien Lösungen bestätigen die Konstanz des Diffusionskoeffizienten bei sehr kleinen Konzentrationen c_p [65,66]. Diesen Befund kann man erklären, wenn man anstelle von $z_{p,eff} = \text{konstant}$ ein konzentrationsabhängiges $z_{p,eff}$ annimmt (siehe Anhang 5). Für $c_p < c_p^x$ kommt die Ladung des Polyelektrolytions nicht zum Tragen ($z_{p,eff} = 0$). Erst für $c_p > c_p^x$ wird $|z_{p,eff}| > 0$. Nach Gleichung (Ah5-3) (S.90) nimmt der Diffusionskoeffizient in nichtlinearer Form mit der Polyelektrolytkonzentration zu. Nach diesem Modell sollte die Stoffmengengrenzkonzentration c^x für kompakte Polyelektrolyte (z. B. Proteine) unabhängig von den Moleküleigenschaften lediglich eine Funktion der Salzkonzentration sein. Dies wird durch einen Vergleich zwischen c^x (markiertes BSA) und c^x (Apoferitin) in einer 10^{-3} -molaren Salzlösung bestätigt. Wegen der sperrigen Gestalt synthetischer Polyelektrolyte ist c^x bei kleinen bis verschwindenden Salzkonzentrationen deutlich niedriger als bei den kompakten Proteinen [65].

Nach Abbildung (E-6) (S.68) gilt ab einer zweiten Grenzkonzentration c_p^{xx} ($c_p^{xx} > c_p^x$) eine genähert lineare Beziehung zwischen Diffusionskoeffizient und Polyelektrolytkonzentration. Diese Beobachtung lässt sich mit Hilfe der Gleichung (Ah5-3) (S.90) erklären, wenn man zum einen $z_{p,eff}^{xx} = \text{konstant}$ für $c_p \geq c_p^{xx}$ annimmt und zum anderen $|z_{p,eff}^{xx}| c_p / (2M) \ll c_s$. Diese Bedingung ist in den linearen Abschnitten der Abbildung (E-6) erfüllt⁶¹. Deshalb gilt Gleichung (Ah5-5) (S.91).

Nach Abbildung (A-1) (S.8) [6] ist in salzarmer Lösung nicht nur c^x sondern auch c^{xx} für Poly-L-Lysin kleiner als c^x von markiertem BSA bzw. Apoferitin. Dies gilt offensichtlich allgemein [7,8,10,20], d. h. bei gleicher, geringer Salzkonzentration setzt bezogen auf die Stoffmengenkonzentration des Polyelektrolytions das lineare Verhalten des Diffusionskoeffizienten bei synthetischen Polyelektrolyten deutlich eher ein als bei Proteinen.

Nach Gleichung (E-20) (S.77) kann man die effektive Nettoladungszahl $z_{p,eff}^{xx}$ von markiertem BSA bestimmen, indem man aus Abbildung (E-6) (S.68) im linearen Bereich die Steigung $\Delta D / \Delta c_p$ für die Experimente 1 und 2 bestimmt. Die erhaltenen Werte unterscheiden sich nur geringfügig, man erhält im Mittel $z_{p,eff}^{xx} \approx -6$. Erwartungsgemäß

⁶¹ $z_{p,eff}^{xx} \approx -6$ (siehe unten) und M (markiertes BSA) $\approx 69\,500$ g/mol (vgl. Fußnote 56)

ist der Betrag der effektiven Nettoladungszahl $|z_{p,\text{eff}}^{\text{xx}}|$ deutlich kleiner als der Betrag der Nettoladungszahl $|z_p|$ ($z_p \approx -18$) des markierten Proteins.

Nach Abbildung (E-6) (S.68) wird der lineare Bereich vor der maximalen Polyelektrolytkonzentration ($c_p = 4 \text{ g/l}$) verlassen, um einem Sättigungswert für den Diffusionskoeffizienten zuzustreben. Es kann nicht entschieden werden, ob der Diffusionskoeffizient in diesem Bereich durch Abbildung (E-6) richtig wiedergegeben wird, da Abbildungsungenauigkeiten in Form größerer Intensitätsfluktuationen vorliegen (vgl. Abbildungen (E-1) bis (E-4), S.57 ff.) und sich Gleichung (Ah5-4) (S.91) nicht mit dem Kurvenverlauf zur Deckung bringen lässt. Da Abbildung (E-6) und Abbildung (E-7) (S.78), deren grundsätzliche Richtigkeit durch Lichtstreuexperimente bestätigt wird, qualitativ übereinstimmen, könnte für größere Polyelektrolytkonzentrationen ein Versagen der Gleichung (Ah5-4) vorliegen.

Nach Gleichung (D-5) (S.45) wird der Diffusionskoeffizient D_0 durch eine markierungsbedingt deutlich veränderte Nettoladungszahl z_p nicht beeinflusst. Die für zwei unterschiedliche Temperaturen (Experiment 1: 5°C , Experiment 2: 17°C bei Schwankungen von jeweils $\pm 1^\circ\text{C}$) berechneten Werte für D_0 fügen sich in befriedigender Weise in entsprechende Literaturwerte für natives BSA ein. Die eigenen Werte sind in sich stimmig, da sie die Walden-Regel (Konstanz des Produkts $D_0(T) \cdot \eta_0(T) \cdot T^{-1}$) erfüllen. Der Verzicht auf eine Thermostatisierung, die in älteren Gradientenexperimenten zur Vermeidung von Konvektion eingesetzt wurde, erscheint angesichts der eigenen Messergebnisse für die entwickelte Diffusionszelle gerechtfertigt.

Trotz zweifelhafter Werte im Bereich ausgeprägter Intensitätsfluktuationen sind die eigenen Bemühungen, den Diffusionskoeffizienten eines Polyelektrolytions nach Gleichung (A-15) (S.5) zu bestimmen, im Gesamtbild als erfolgreich einzustufen.

Ausblick

In Kapitel D.4 (S.55 ff.) wurden Vorschläge unterbreitet, wie man den ladungsverändernden Effekt der Markierung aufheben kann. Dies ist die Voraussetzung für eine generelle Anwendbarkeit der Messmethode. Bei negativ geladenen Proteinen kann ausgehend vom stark sauren bis in den schwach basischen pH -Bereich die native Nettola-

dungszahl durch die Verwendung derivatisierter Pyryliumionen als Fluoreszenzmarker (Abbildung (D-3), S.55) gewahrt werden, da pK_{s0} (Lysin) ≈ 10 . Eine Ausnahme könnten jedoch positiv geladene lysinarmer Proteine bilden. Bei diesen und in stark basischen Lösungen könnten die auf S.56 angedachten, noch zu synthetisierenden Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz kommen.

Um physiologische Vorgänge besser zu verstehen, wächst das Interesse an Diffusionskoeffizienten bei sehr großer Polyelektrolytkonzentration (z. B. c_p (BSA) > 100 g/l). Wegen der Trübheit der Lösungen ist dieser Konzentrationsbereich Lichtstreuexperimenten nicht zugänglich⁶², es existieren aber bereits Prognosen für die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten [59,70]. Es wäre interessant zu überprüfen, ob man in diesem Konzentrationsbereich mit der Gradientenmethode in der Variante der vorliegenden Arbeit, d. h. unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Polyelektrolyte⁶³, erfolgreich Neuland betreten könnte.

Intensitätsfluktuationen stellten in dieser Arbeit einen begrenzenden Faktor dar. Dieses Signalrauschen muss so stark unterdrückt werden, dass z. B. der Intensitätsverlauf einer homogenen Lösung markierter Polyelektrolyte in x -Richtung eine horizontale Linie bildet (vgl. Abbildung (B-4), S.25). Dazu könnte man für jedes $I(x)$ einen Mittelwert über einen größeren Ausschnitt der Breite b des Lösungsraums (Abbildung (C-1), S.29) bilden.

In Kapitel B.2 (S.21) wurde die konfokale Mikroskopie mit dynamischer Laserabtastung (LSCM) des Lösungsraums als Idealverfahren zur Aufnahme eines räumlichen Intensitätsprofils geschildert. Man könnte an das Prinzip dieses Verfahrens anknüpfen und eine Apparatur entwickeln, mit der man mittels eines horizontal anregenden Lasers die Diffusionsstrecke mit konstanter Geschwindigkeit in vertikaler Richtung abtasten kann. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant für eine homogene Lösung markierter Proteine zu überprüfen, ob das mit einer Standardapparatur aufgenommene Fluoreszenzintensitätsprofil der oben geforderten horizontalen Linie näher kommt als Abbildung (B-4) (S.25). Nur wenn die LSCM dies leisten kann, wäre sie der eigenen Methode zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten überlegen.

⁶² Die Maximalkonzentration an BSA beträgt bei den Lichtstreuexperimenten von Bowen [59] 90 g/l.

⁶³ In diesem Konzentrationsbereich wäre ein Markierungsgrad deutlich unter 1 zu empfehlen.

Anhang 1: Osmotischer Druck und osmotische Kompressibilität nach Donnan

Nach Donnan [5] gilt im Gleichgewicht:

$$(Ah1-1) \quad c_g \cdot c_c = c_s^2$$

c_g : Gegenionenkonzentration in der Polyelektrolytlösung, $[c_g] = \text{mol/l}$

c_c : Coionenkonzentration in der Polyelektrolytlösung, $[c_c] = \text{mol/l}$

c_s : Referenzsalzkonzentration (polyelektrolytfreie Lösung), $[c_s] = \text{mol/l}$

Wegen der Elektroneutralität der Polyelektrolytlösung muss gelten:

$$(Ah1-2) \quad c_g = c_c + \frac{|z_{p,\text{eff}}| \cdot c_p}{M}$$

c_p : Polyelektrolytkonzentration, $[c_p] = \text{g/l}$

M : Molare Masse des Polyelektrolytions

$z_{p,\text{eff}}$: effektive Ladungszahl des Polyelektrolytions ($z_{p,\text{eff}} = \text{konstant}$)

Aus den Gleichungen (Ah1-1) und (Ah1-2) erhält man:

$$(Ah1-3) \quad c_g = \frac{|z_{p,\text{eff}}| c_p}{2M} + \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}|^2 c_p^2}{4M^2} + c_s^2}$$

$$(Ah1-4) \quad c_c = -\frac{|z_{p,\text{eff}}| c_p}{2M} + \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}|^2 c_p^2}{4M^2} + c_s^2}$$

Der Donnan-osmotische Druck π beträgt deshalb:

$$(Ah1-5) \quad \pi = RT \left(2 \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}|^2 c_p^2}{4M^2} + c_s^2} + \frac{c_p}{M} - 2c_s \right)$$

R : Allgemeine Gaskonstante, $R = 8.314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$

Für die osmotische Kompressibilität erhält man:

$$(\text{Ah1-6}) \quad \left(\frac{\partial \pi}{\partial c_p} \right)_{c_s, T} = \frac{k_B T}{m} \left(1 + \frac{|z_{p,\text{eff}}|^2 c_p}{2 M \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}|^2 c_p^2}{4 M^2} + c_s^2}} \right)$$

k_B : Boltzmann-Konstante, $k_B = 1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K

m : Masse des Polyelektrolytions

Im Grenzbereich starker Verdünnung gelte:

$$(\text{Ah1-7}) \quad \frac{|z_{p,\text{eff}}| c_p}{2 M} \ll c_s$$

Damit erhält man aus Gleichung (Ah1-6):

$$(\text{Ah1-8}) \quad \left(\frac{\partial \pi}{\partial c_p} \right)_{c_s, T} = \frac{k_B T}{m} \left(1 + \frac{|z_{p,\text{eff}}|^2 c_p}{2 M c_s} \right)$$

In salzfreier Lösung wird aus Gleichung (Ah1-6):

$$(\text{Ah1-9}) \quad \left(\frac{\partial \pi}{\partial c_p} \right)_T = \frac{k_B T}{m} (1 + |z_{p,\text{eff}}|)$$

Anhang 2: Unschärfe von Bildpunkten

Diskussionsgrundlage ist die Prinzipskizze Abbildung (B-2) (S.19). Die Bedeutung der folgenden Parameter ist in Kapitel B.1 (S. 18, 19) erklärt. Nach dem Strahlensatz ist:

$$(\text{Ah2-1}) \quad \frac{R}{(-\Delta b)} = \frac{r}{b_2} \quad \Delta b < 0$$

Nach der Linsenformel gilt:

$$(\text{Ah2-2}) \quad \frac{1}{f} = \frac{1}{b_1} + \frac{1}{g_1}$$

bzw.:

$$(\text{Ah2-3}) \quad \frac{1}{f} = \frac{1}{b_2} + \frac{1}{g_2} = \frac{1}{b_1 + \Delta b} + \frac{1}{g_1 + \Delta g}$$

Für $\Delta g \ll g_1$ und $|\Delta b| \ll b_1$ kann man die rechte Seite der Gleichung (Ah2-3) linearisieren:

$$(\text{Ah2-4}) \quad \frac{1}{b_1 + \Delta b} + \frac{1}{g_1 + \Delta g} \approx \frac{1}{b_1} \left(1 - \frac{\Delta b}{b_1} \right) + \frac{1}{g_1} \left(1 - \frac{\Delta g}{g_1} \right)$$

Mit den Gleichungen (Ah2-4) und (Ah2-2) wird aus Gleichung (Ah2-3):

$$(\text{Ah2-5}) \quad \Delta b = - \Delta g \cdot \frac{b_1^2}{g_1^2}$$

Mit Gleichung (Ah2-5) erhält man anstelle von Gleichung (Ah2-1):

$$(\text{Ah2-6}) \quad R = \frac{r \Delta g b_1^2}{b_2 g_1^2}$$

Da $|\Delta b| \ll b_1$, kann man $b_1 \approx b_2$ setzen und das verbleibende b_1 unter Verwendung der Gleichung (Ah2-2) substituieren:

$$(\text{Ah2-7}) \quad R = \frac{r \Delta g f}{g_1 (g_1 - f)}$$

Es wurde die größtmögliche Blendenzahl des Kameraobjektivs eingestellt ($f/(2r) = 16$). Die Gegenstandsweite g_1 beträgt im Experiment ca. 14 cm. Nach Gleichung (Ah2-7) erhält man ($f = 1.6$ cm, $\Delta g = 0.4$ mm): $R = 1.8 \cdot 10^{-4}$ mm. Mit $G = x_{\text{ob}} = |x_{\text{un}}| \approx 1.0$ cm (vgl. Kapitel C.2, S.31) berechnet man nach Gleichung (B-10) (S.20): $B_1 = 0.13$ cm. Nach Gleichung (B-11) (S.20) ergibt sich für den relativen Abbildungsfehler: $R/B_1 = 1.4 \cdot 10^{-4}$.

Anhang 3: Parameterwerte⁶⁴

Experiment 1: Diffusionszeit 5 h

$$\begin{aligned}
 a &= 64.4 \text{ a.u.} && \pm 0.088 \text{ a.u.} \\
 b_1 &= 0.0684/P^{65} && \pm 0.0014/P \\
 c_1 &= 0.615 P && \pm 0.22 P \\
 b_2 &= 0.0564/P && \pm 0.0023/P \\
 c_2 &= -0.743 P && \pm 0.54 P \\
 f &= 6.34 \cdot 10^{-3} P^{-3} && \pm 7.8 \cdot 10^{-3} P^{-3} \\
 g &= 0.207 && \pm 0.21 \\
 h &= 1 \text{ a.u.} \\
 v &= -0.011 \text{ cm} && v_{Pi}^{66} \approx -0.9 P
 \end{aligned}$$

Experiment 1: Diffusionszeit 7 h

$$\begin{aligned}
 a &= 64.8 \text{ a.u.} && \pm 0.11 \text{ a.u.} \\
 b_1 &= 0.0598/P && \pm 0.0023/P \\
 c_1 &= -0.301 P && \pm 0.55 P \\
 b_2 &= 0.0533/P && \pm 0.0034/P \\
 c_2 &= 0.691 P && \pm 1.3 P \\
 f &= 1.03 \cdot 10^{-3} P^{-3} && \pm 0.80 \cdot 10^{-3} P^{-3} \\
 g &= 0.279 && \pm 0.40 \\
 h &= 0.59 \text{ a.u.} \\
 v &= -0.005 \text{ cm} && v_{Pi} \approx -0.4 P
 \end{aligned}$$

Experiment 1: Diffusionszeit 9 h

$$\begin{aligned}
 a &= 64.6 \text{ a.u.} && \pm 0.08937 \text{ a.u.} \\
 b_1 &= 0.0529/P && \pm 0.00049/P \\
 c_1 &= -0.396 P && \pm 0.07442 P \\
 b_2 &= 0.0442/P && \pm 0.00213/P \\
 c_2 &= 1.137 P && \pm 0.9152 P \\
 f &= 3.26 \cdot 10^{-3} P^{-3} && \pm 2.7 \cdot 10^{-3} P^{-3} \\
 g &= 0.0174 && \pm 0.056 \\
 h &= 1 \text{ a.u.} \\
 v &= -2.55 \cdot 10^{-3} \text{ cm} && v_{Pi} \approx -0.2 P
 \end{aligned}$$

Experiment 2: Diffusionszeit 9 h

$$\begin{aligned}
 a &= 71.5 \text{ a.u.} && \pm 0.080 \text{ a.u.} \\
 b_1 &= 0.0431/P \pm 0.00032/P \\
 c_1 &= -1.57 P \quad 0.0901 P \\
 b_2 &= 0.0336/P \pm 0.0003/P \\
 c_2 &= 0 \\
 f &= 1.6 \cdot 10^{-3} P^{-3} && \pm 0.66 \cdot 10^{-3} P^{-3} \\
 g &= 0.0457 && \pm 0.058 \\
 h &= 0.4 \text{ a.u.} \\
 v &= -0.032 \text{ cm} && v_{Pi} \approx -2.7 P
 \end{aligned}$$

⁶⁴ Die Parameterwerte schließen z. T. Standardabweichungen ein.

⁶⁵ P ≡ Pixel

⁶⁶ Die Verschiebungskonstante v wird zusätzlich in Pixel angegeben: v_{Pi} .

Anhang 4: Einfluss der Intensitätsfluktuationen auf die Flächenterme A bzw. A_{al}

Um Konsequenzen für den Diffusionskoeffizienten außerhalb des Fluktuationbereichs $I < 110$ a. u. ($\equiv c_p < 3.4$ g/l für Experiment 1) zu untersuchen, wird in Abbildung (Ah4-1) dem eingezeichneten Intensitätsprofil, das die Kurvenanpassung an eine Messung darstellen soll (vgl. Abbildungen (E-1) bis (E-4), S.57 ff.), eine willkürlich als korrekt postulierte gepunktete Linie für $I > 110$ a. u. gegenübergestellt. Dabei wird angenommen, dass für die Kurvenanpassung gilt: $A(0) = A_{al}(0)$. In der Abbildung ist $A = A_1 - A_2$. Die „korrekten“ Größen werden im Folgenden mit einem Stern (*) versehen.

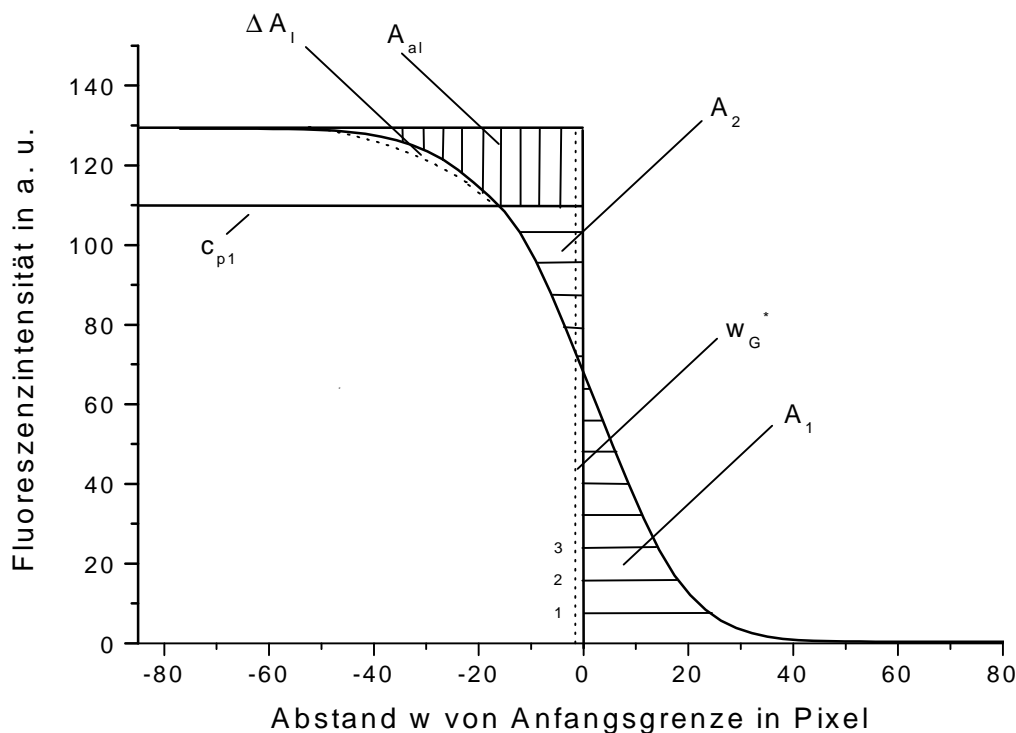


Abbildung (Ah4-1): Kurvenanpassung an ein gemessenes Intensitätsprofil und „korrekter“ Intensitätsverlauf (gepunktet) für $I > 110$ a.u. Die Abweichungen sind der Übersichtlichkeit halber deutlich größer als die Abbildungen (E-1) bis (E-4) (S.57 ff.) hergeben. Die Lage der „korrekten“ Anfangsgrenze $w = w_G^*$ (gepunktete Gerade) ist willkürlich eingezeichnet.

Durch den unterschiedlichen Kurvenverlauf für $I > 110$ a. u. entsteht die Fläche ΔA_I :

$$(Ah4-1) \quad \Delta A_I = \int_{-\infty}^{w \approx -15 \text{ Pixel}} (I^* - I) dw < 0$$

Wegen Gleichung (E-14) (S.65) muss die Anfangsgrenze an die Stelle $w = w_G^*$ verschoben werden:

$$(\text{Ah4-2}) \quad \Delta A_I = w_G^* \cdot I_{\max}$$

Die Veränderungen in den Flächentermen betragen (s: Flächenanteil⁶⁷):

$$(\text{Ah4-3}) \quad \Delta A_{\text{al}} = A_{\text{al}} - A_{\text{al}}^* = s \cdot \Delta A_I - w_G^* \cdot (I_{\max} - I)$$

$$(\text{Ah4-4})^{68} \quad \Delta A = A - A^* = - (1 - s) \cdot \Delta A_I + w_G^* \cdot I$$

Auskunft über die Größenordnung möglicher Veränderungen des Diffusionskoeffizienten (Gleichungen (E-11) bzw. (E-12), S.64) geben die relativen Fehler $\Delta A/A$. Ausgehend von der ersten eingezeichneten Sprosse in Fläche A_1 der Abbildung (Ah4-1) soll der relative Fehler in Abhängigkeit von der Intensität diskutiert werden. Nach Gleichung (Ah4-4) gilt für $w > 0$: $\Delta A = w_G^* \cdot I$. $\Delta A/A$ nimmt an der ersten Sprosse einen kleinen Wert an⁶⁹. Da die eingezeichneten Sprossen äquidistant sind, verdoppelt sich der absolute Fehler ΔA beim Übergang zur zweiten Sprosse, während sich die Fläche A in geringerem Maße vergrößert. Aus diesem Grund nimmt der relative Fehler bis zur Anfangsgrenze kontinuierlich zu. Dennoch streut nach Abbildung (E-5) (S.67) der Wert für den Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Diffusionszeit bis $c_p \approx 2 \text{ g/l}$ kaum. Dieser Fehler besitzt offensichtlich eine vernachlässigbare Größenordnung.

Bei Überschreitung der Anfangsgrenze steigt der absolute Fehler von Sprosse zu Sprosse weiterhin in gleichem Maße an. Während aber für $w > 0$ der gleichzeitige Anstieg von A kompensierend in Hinblick auf den relativen Fehler wirkte, verringert sich A für $w < 0$ beim Übergang von einer Sprosse zur nächsthöheren. Deshalb nimmt der relative Fehler bis $c_p = c_{p1}$ ($I \approx 110 \text{ a. u.}$, Abbildung (Ah4-1)) in immer größerem Maße zu. Dies begründet die stärker divergierenden Werte für den Diffusionskoeffizienten bei $c_p \approx 3 \text{ g/l}$ ($\equiv I \approx 100 \text{ a. u.}$) (Abbildung (E-5), S.67). Dennoch sollte an dieser Stelle A noch

⁶⁷ Für $I > 110 \text{ a. u.}$ wird die Gesamtfläche ΔA_I geteilt. Der Anteil der oberen Fläche an ΔA_I ist s .

⁶⁸ Den Gleichungen (Ah4-2), (Ah4-3) und (Ah4-4) zufolge ist stets $\Delta A = \Delta A_{\text{al}}$.

⁶⁹ Relative Fehler können an dieser Stelle nur für Berechnungen nach sehr kurzer Diffusionszeit den Diffusionskoeffizienten merklich beeinflussen. Damit lassen sich aber nicht die Abweichungen des nach einer Diffusionszeit von 5 h berechneten Diffusionskoeffizienten erklären, die sich ausgehend vom Grenzbereich starker Verdünnung bis $c_p \approx 0.5 \text{ g/l}$ erstrecken (siehe Abbildung (E-5), S.67).

groß genug sein⁷⁰, um den relativen Fehler in engen Grenzen zu halten. Deshalb ist ausgehend von $c_p \approx 2$ g/l die Tendenz des Diffusionskoeffizienten bis $c_p \approx 3$ g/l einheitlich.

Anhang 5: Osmotische Kompressibilität und Diffusionskoeffizient für $z_{p,\text{eff}}(c_p)$

Im Unterschied zu Anhang 1 wird eine Konzentrationsabhängigkeit der effektiven Nettoladungszahl $z_{p,\text{eff}}$ („Overbeek-Theorie“) eingeführt. Damit wird aus den Gleichungen (Ah1-5) und (Ah1-6) (Anhang 1):

$$(Ah5-1) \quad \pi = RT \left(2 \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}(c_p)|^2 c_p^2}{4M^2} + c_s^2} + \frac{c_p}{M} - 2c_s \right)$$

$$(Ah5-2) \quad \left(\frac{\partial \pi}{\partial c_p} \right)_{c_s, T} = \frac{k_B T}{m} \left(1 + \frac{\left(|z_{p,\text{eff}}(c_p)|^2 c_p + |z_{p,\text{eff}}(c_p)| \left(\frac{\partial |z_{p,\text{eff}}|}{\partial c_p} \right)_{c_s} c_p^2 \right)}{2M \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}(c_p)|^2 c_p^2}{4M^2} + c_s^2}} \right)$$

Mit den Gleichungen (D-1) und (D-5) (S.44,45) erhält man für den Diffusionskoeffizienten:

$$(Ah5-3) \quad D = D_0 \left(1 + \frac{\left(|z_{p,\text{eff}}(c_p)|^2 c_p + |z_{p,\text{eff}}(c_p)| \left(\frac{\partial |z_{p,\text{eff}}|}{\partial c_p} \right)_{c_s} c_p^2 \right)}{2M \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}(c_p)|^2 c_p^2}{4M^2} + c_s^2}} \right)$$

⁷⁰ Dies sollte nach Abbildung (E-1) (S.57) selbst für eine Diffusionszeit von 5 h gelten.

Für $c_p > c_p^{xx}$ (siehe Kapitel E.6, S.76 ff.) wird aus Gleichung (Ah5-3):

$$(\text{Ah5-4}) \quad D = D_0 \left(1 + \frac{|z_{p,\text{eff}}^{xx}|^2 c_p}{2 M \sqrt{\frac{|z_{p,\text{eff}}^{xx}|^2 c_p^2}{4 M^2} + c_s^2}} \right)$$

Für $|z_{p,\text{eff}}^{xx}| c_p / (2 M) \ll c_s$ erhält man:

$$(\text{Ah5-5}) \quad D = D_0 \left(1 + \frac{|z_{p,\text{eff}}^{xx}|^2 c_p}{2 M c_s} \right)$$

Für $|z_{p,\text{eff}}^{xx}| c_p / (2 M) \gg c_s$ wird aus Gleichung (Ah5-4):

$$(\text{Ah5-6}) \quad D = D_s = D_0 \left(1 + |z_{p,\text{eff}}^{xx}| \right)$$

Anhang 6: Einstellung der Lösungsbedingungen

Das verwendete Salz (KCl) besitzt analytischen Reinheitsgrad⁷¹. Zur Herstellung einer 10^{-3} -molaren Lösung wird bidestilliertes Wasser verwendet. Der pH-Wert wird durch Zugabe vernachlässigbarer Volumina⁷² 1-molarer KOH-Lösung⁷¹ auf $\text{pH } 6.5 \pm 0.1$ eingestellt.

Das bereits markierte BSA liegt als Feststoff vor⁷³. Zur Einstellung einer Polyelektrolytkonzentration von 4 g/l werden ca. 1 mg des Feststoffs verwendet und in einem berechneten Volumen der Salzlösung gelöst. Dabei wird für das partielle spezifische Volumen des markierten Proteins der Wert des nativen Proteins von 0.73 l/kg [58,68] angenom-

⁷¹ Merck, Darmstadt.

⁷² Die Salzkonzentration wird deshalb als unverändert betrachtet.

⁷³ Produktnummer: A13100, albumin from bovine serum (BSA), Alexa Fluor 488 conjugate, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

men. Der pH -Wert der Polyelektrolytlösung⁷⁴ beträgt ca. 5.3. Durch Spuren⁷² 1-molarer KOH-Lösung wird der pH -Wert auf 6.5 ± 0.1 nachjustiert.

Die Cl^- -Konzentration ist vor dem Start eines Diffusionsexperiments in beiden Lösungshälften der Diffusionszelle gleich. In der Polyelektrolytlösung sind deshalb bei gleichem pH -Wert beider Lösungen sowohl die Cl^- -Ionen als auch die K^+ -Ionen (Elektroneutralität der Lösung) gegenüber dem Donnan-Gleichgewicht überrepräsentiert. Mit dem Kontakt beider Lösungen zu Beginn des Diffusionsexperiments stellt sich das Donnan-Gleichgewicht ein. Durch die größere Beweglichkeit der „kleinen“ Ionen im Vergleich zum Protein sollte dieser Vorgang keinen (merklichen) Einfluss auf die Diffusion des Proteins haben.

Proteinlösung und Salzlösung werden luftdicht verschlossen und im Kühlraum maximal einige Tage bei 6°C gelagert. Beide Lösungen werden ca. 12 Stunden vor Start des Diffusionsexperiments in den Messraum gebracht, damit sie Raumtemperatur annehmen.

⁷⁴ Wenn das erworbene markierte BSA (Feststoff) ausschließlich Protonen als Gegenionen besitzt, sollte deren Konzentration für z_p (markiertes Protein) ≈ -18 (siehe Kapitel D.4, S.53 ff.) in einer idealen Lösung $1.0 \cdot 10^{-3}$ mol/l betragen, d. h. der pH -Wert der Lösung wäre 3. Dabei wurde M (markiertes BSA) = 69500 g/mol verwendet (siehe Fussnote 56). Falls die Differenz zum gemessenen pH -Wert von ca. 5.3 zu einem Teil an Salzkationen im BSA-Feststoff liegen sollte, so ändert sich zumindest der Größenordnungsbereich (10^{-3} -molare Salzlösung) nicht. In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich von einer Salzkonzentration von 10^{-3} mol/l gesprochen und der Einfachheit halber unterstellt, dass das erworbene markierte BSA keine Salzkationen enthielt.

H Literaturverzeichnis

- [1] A. Fick, *Ann. Physik*, **94**, 59 (1855)
- [2] J. D. R. Scheffer, *Z. f. phys. Chem.*, **2**, 629 (1888)
- [3] S. Arrhenius, *Z. f. phys. Chem.*, **10**, 51 (1892)
- [4] O. Wiener, *Ann. Physik*, **49**, 105 (1893)
- [5] F. G. Donnan, *Z. Elektrochemie*, **17**, 572 (1911)
- [6] Z. Alexandrowicz, E. Daniel, *Biopolymers*, **1**, 447 (1963),
E. Daniel, Z. Alexandrowicz, *Biopolymers*, **1**, 473 (1963)
- [7] Y. Suzuki, I. Noda, M. Nagasawa, *J. Phys. Chem.*, **73**, 797 (1969)
- [8] M. Nagasawa, in: *Polyelectrolytes*, Ed: E. Selegny, D. Reidel Publishing, Dordrecht, Boston, 241 (1974)
- [9] B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, Wiley, New York (1976)
- [10] S. C. Lin, W. I. Lee, J. M. Schurr, *Biopolymers*, **17**, 1041 (1978)
- [11] L. Boltzmann, *Ann. Physik*, **53**, 959 (1894)
- [12] R. Pecora, *J. Chem. Phys.*, **40**, 1604 (1964)
- [13] A. Einstein, *Ann. Phys.*, **33**, 1275 (1910)
- [14] P. Debye, *J. Phys. & Coll. Chem.*, **51**, 18 (1947)
- [15] A. Vrij, J. Th. Overbeek, *J. Coll. Sci.*, **17**, 570 (1962)
- [16] B. W. Clack, *Proc. Phys. Soc.*, **36**, 313 (1924)
- [17] R. A. Robinson, R. H. Stokes, *Electrolyte Solutions*, Butterworth Scientific Publications, London (1955)
- [18] M. Nagasawa, H. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3005 (1964)
- [19] R. G. Smits, M. E. Kuil, M. Mandel, *Macromolecules*, **26**, 6808 (1993)
- [20] J. J. Tanahatoe, M. E. Kuil, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 10839 (1997)
J. J. Tanahatoe, M. E. Kuil, *Macromolecules*, **30**, 6102 (1997)
- [21] S. Förster, M. Schmidt, M. Antonietti, *Polymer*, **31**, 781 (1990)
- [22] M. Sedlak, E. Amis, *J. Chem. Phys.*, **96**, 826 (1992)
- [23] J. M. Creeth, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6428 (1955)
- [24] M. L. Wagner, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **60**, 1066 (1956)
- [25] G. Kegeles, L. J. Gosting, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2516 (1947)
- [26] J. Roots, B. Nyström, L.-O. Sundelöf, B. Porsch, *Polymer*, **20**, 337 (1979)
- [27] M. Adam, M. Delsanti, G. Pouyet, *J. Phys., Lett.*, **40** (1979)
- [28] H. S. Harned, *Chem. Rev.*, **40**, 461 (1947)
- [29] J. S. L. Philpot, *Nature*, **141**, 283 (1938)

- [30] L. G. Longsworth, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 529 (1939)
- [31] H. Wolter, *Ann. Physik*, **7**, 182 (1950)
- [32] R. Trautman, V. W. Burns, *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 26 (1954)
- [33] R. H. Stokes, *Trans. Faraday Soc.*, **48**, 887 (1952)
- [34] T. Svedberg, *Kolloid-Zeitschrift, Ergänzungsband zu* **36**, 53 (1925)
- [35] A. Tiselius, D. Gross, *Kolloid-Zeitschrift*, **66**, 11 (1934)
- [36] T. R. Corle, *Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems*, Acad. Press, San Diego (1996)
- [37] C. Sheppard, *Confocal laser scanning microscopy*, BIOS Scientific Publ., Oxford (1997)
- [38] E. A. Guggenheim, *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 1319 (1930)
- [39] H. Fujita, *J. Phys. Soc. Japan*, **11**, 1018 (1956)
- [40] L. G. Longsworth, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2510 (1947)
- [41] O. Bryngdahl, *Acta Chem. Scand.*, **12**, 684 (1958)
- [42] G. Scatchard, I. H. Scheinberg, S. H. Armstrong, jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 535 (1950)
- [43] D. S. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3892 (1958)
- [44] J. Oakes, *Trans. Faraday Soc.*, **70**, 2200 (1974)
- [45] A. Wishnia, T. W. Pinder, *Biochemistry*, **5**, 1534 (1966)
- [46] E. G. Rochow, *Silicium und Silicone*, Springer, Berlin (1991)
- [47] C. Tanford, *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121 (1968)
C. Tanford, *Adv. Protein Chem.*, **24**, 1 (1970)
- [48] J. Th. Overbeek in *Colloid Science*, Vol. I, Ed.: H. R. Kruyt, Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1965)
- [49] A. J. Rutgers, M. De Smet, *Trans. Faraday Soc.*, **41**, 764 (1945)
- [50] E. J. W. Verwey, J. H. De Boer, *Rec. trav. Chim.*, **55**, 675 (1936)
- [51] M. Gouy, *J. Phys.*, **9**, 457 (1910)
- [52] D. L. Chapman, *Phil. Mag.*, **25**, 475 (1919)
- [53] P. Debye, E. Hückel, *Phys. Z.*, **24**, 185 (1923)
- [54] L. G. Longsworth, *Rev. Sci. Instr.*, **21**, 524 (1950)
- [55] C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, *Talanta*, **56**, 365 (2002)
- [56] C. Tanford, S. A. Swanson, W. S. Shore, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6414 (1955)
- [57] J. R. Brown, P. Shockley in "*Lipid-Protein Interactions*", Ed.: P. Jost, O. H. Griffiths, Wiley, New York (1982)
- [58] J. L. Anderson, F. Rauh, A. Morales, *J. Phys. Chem.*, **82**, 608 (1978)

-
- [59] W. R. Bowen, Y. Liang, P. M. Williams, *Chem. Eng. Sci.*, **55**, 2359 (2000)
W. R. Bowen, A. Mongruel, *Colloids Surf. A*, **138**, 161 (1998)
- [60] T. L. Hill, „*An introduction to statistical thermodynamics*“, Addison-Wiley, New York (1962)
- [61] J. T. Edsall in „*Proteins, Amino Acids and Peptides*“, ED.: E. J. Cohn, J. T. Edsall, Hafner, New York (1965).
- [62] O. M. Kostenko, S. Y. Dmitrieva, O. I. Tolmachew, S. M. Yarmoluk, *J. Fluoresc.*, **12**, 173 (2002)
- [63] D. B. Craig, B. K. Wetzl, A. Duerkop, O. S. Wolfbeis, *Electrophor.*, **26**, 2208 (2005)
- [64] A. K. Gaigalas, J. B. Hubbard, M. McCurley, S. Woo, *J. Phys. Chem.*, **96**, 2355 (1992)
- [65] F. Grüner, W. P. Lehmann, H. Fahlbusch, R. Weber, *J. Phys. A* (1981)
- [66] J. Gapinski, A. Wilk, A. Patkowski, W. Häußler, A. J. Banchio, R. Pecora, G. Nägele, *J. Chem. Phys.*, **123**, 054708 (2005)
- [67] J. Th. G. Overbeek, *Progr. Biophys. Biophys. Chem.*, **6**, 66 (1956)
- [68] R. C. Cantor, P. R. Schimmel in „*Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structures and function*“, Freeman, New York (1980)
- [69] W. Häußler, A. Wilk, J. Gapinski, A. Patkowski, *J. Chem. Phys.*, **117**, 413 (2002)
- [70] Y. X. Yu, A. W. Tian, G. H. Gao, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**, 2423 (2005)