Amphiphile und Makromoleküle: Phasenverhalten hybrider Mizellen

Andreas Hohner

München 2005

Amphiphile und Makromoleküle: Phasenverhalten hybrider Mizellen

Andreas Hohner

München, den 21. Dezember 2005

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

vorgelegt von
Andreas Hohner
aus Landsberg am Lech

Erstgutachter: Prof. Dr. Joachim O. Rädler
Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Bein
Tag der mündlichen Prüfung: 21.12. 2005

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis xi

Tabellenverzeichnis xiii

Zusammenfassung xv

1. Einleitung 1

2. Materialien und Probenpräparation 5
2.1. Materialien . . . 5
2.1.1. DNA und Lipide . . . 5
2.1.2. Dendrimere und Tenside . . . 8
2.2. Probenpräparation . . . 9
2.2.1. Präparation der Lipid/DNA-Komplexe . . . 9
2.2.2. Präparation der Tensid/Dendrimer-Komplexe . . . 10

3. Röntgenkleinwinkelstreuung 11
3.1. Einleitung . . . 11
3.2. Rayleigh-Debye-Gans Theorie . . . 12
3.3. Formfaktor . . . 16
3.3.1. Formfaktor Sphärischer Objekte . . . 17
3.3.2. Formfaktor Zylindrischer und Polymerartiger Objekte . . . 18
3.4. Strukturfaktor . . . 19
3.4.1. Hard-Sphere Strukturfaktor . . . 21
3.4.2. Strukturfaktor bei Polymeren und Zylinder . . . 22
3.4.3. Behandlung der Polydispersität . . . 24

4. Aufbau der Kleinwinkelinstrumente 27
4.1. Aufbau der Laboreigenen Kleinwinkelanlage . . . 27
4.1.1. Quelle . . . 28
4.1.2. Lochblenden . . . 30
4.1.3. Probenumgebung . . . 30
4.1.4. Beamstop . . . 31
4.1.5. Detektoren . . . 32

CCD Kamera . . . 32
Szintillationszähler . . . 33
Bildplatte . . . 33
4.1.6. Vakuum . . . 35
4.1.7. Steuerungseinrichtungen . . . 36
4.1.8. Sicherheitseinrichtungen . . . 36
4.1.9. Ausblick . . . 37
4.2. Die Beamline A2 am Hasylab . . . 38
4.2.1. Experimentelle Durchführung . . . 39
4.2.2. Probenbehälter . . . 39

5. Charakterisierung der Laboreigenen Kleinwinkelanlage 41
5.1. Untergrund und Signalspeicherung der Bildplatten . . . 41
5.2. Charakterisierung des Röntgenstrahls . . . 43
5.2.1. Bestimmung des Polarisierungsfaktor . . . 43
5.2.2. Messung des absoluten Photonenflusses . . . 44
5.2.3. Absolute Kalibration des Photonenflusses . . . 45
5.3. Bestimmung der Auflösungsfunktion . . . 48
5.3.1. Bestimmung des Strahlprofil und der Divergenz . . . 52
5.3.2. Einfluß der Detektorposition . . . 53
5.3.3. Einfluß verschiedener Blendensätze . . . 54
5.4. Ausblick . . . 59

6. Invertierte Zylinderartige Lipid/DNA-Mizellen 61
6.1. Einleitung . . . 61
6.2. Datenauswertung . . . 63
6.2.1. Anpassungen an die Daten . . . 63
6.2.2. Bestimmung der Standardabweichung . . . 64
6.2.3. Beschreibung der Modelle . . . 65
6.2.4. Strukturbestimmung . . . 70
6.3. Ergebnisse . . . 71
6.3.1. Lipid in Dodekan ohne Zugabe von Wasser und DNA . . . 71
6.3.2. Einfluß des Wassergehaltes auf die Lipid/DNA-Komplexe . . . 72
6.3.3. Unterschiede mit und ohne DNA Zugabe . . . 74
6.3.4. Einfluß der Lipidzusammensetzung . . . 76
6.3.5. Einfluß der Lösungsmittel . . . 82
6.4. Zusammenfassung . . . 86
6.5. Ausblick . . . 88

7. Tensid/Dendrimer-Komplexe 91
7.1. Einleitung . . . 91
7.2. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie . . . 91
7.3. Ergebnisse . . . 95

7.3.1. Auswahl des geeigneten Tensids 95
7.3.2. Abhängigkeit des Löslichkeit von der Tensidkonzentration 95
7.3.3. Abhängigkeit von der Dendrimerkonzentration 98
7.4. Schlußfolgerung 99

A. Anhang **103**
A.1. Transmission und Hintergrundkorrektur 103
A.2. Technische Daten der Röntgenkleinwinkelanlage 104
A.3. Molekulare Einschränkung 105
A.4. Berechnung der Elektronendichteprofile 107
A.5. Physikalische Daten der Materialien 109
A.5.1. Lösungsmittel 109
A.5.2. Lipide und Tenside 110
A.6. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis 111

Literaturverzeichnis **113**

Abbildungsverzeichnis

2.1. Struktur der DNA 6
2.2. Die Lipide DOPE und DOTAP 7
2.3. Struktur des verwendeten Dendrimers 9

3.1. Streuung an einem Partikel 13
3.2. Geometrie zur Berechnung des Strukturfaktors 15
3.3. Form- und Strukturfaktor bei sphärischen Partikeln 20

4.1. Fotografie der Röntgenkleinwinkelapparatur 27
4.2. Schema der Röntgenkleinwinkelapparatur 28
4.3. Strahlprofil mit dem unreflektierten, sowie einfach- und zweifach reflektierten Anteilen 29
4.4. Fotografie des Probenkontainers 31
4.5. Aufbau des Beamstop 32
4.6. Bänderschema der Photostimulierten Lumineszenz 34
4.7. Fotografie der Luke am Strahlrohrende mit Bildplattenhalter 35
4.8. Die Beamline A2 am HASYLAB im schematischen Überblick 38
4.9. Schema des für die Kleinwinkelstreuung verwendeten Probendurchflußsystems 39

5.1. Messung der von der Bildplatte detektierten Hintergrundstrahlung 42
5.2. Zeitliche Änderung eines auf der Bildplatte gespeicherten Signals 43
5.3. Steigender Untergrund und fallende gespeicherte Signalstärke der Bildplatte 44
5.4. Die Intensität einer Silberbehenat-Pulverprobe in Polarkoordinaten. 45
5.5. Gemessener Fluß abhängig von der Absorberdicke 46
5.6. Differenzieller Wirkungsquerschnitt bei der Streuung an einer Probe 47
5.7. Streuintensität einer Wasserprobe 49
5.8. Grundlegende Strahlgeometrie bei der Verwendung dreier Lochblenden . . 50
5.9. Einfluß der Divergenz und Energieauflösung auf das Fehlerquadrat des Impulsübertrages 51
5.10. Zweidimensionales Intensitätsprofil des direkten Strahles 52
5.11. Radialintegriertes Intensitätsprofil des direkten Strahles 53
5.12. Abstandsabhängige Strahlbreite 54
5.13. Intensitätsverlauf einer Silberbehenatprobe für verschiedene Detektorabstände 55

5.14. Abstandsabhängige Gaußbreite der 1., 2. und 7. Ordnung einer Silberbehenatprobe . . . 56
5.15. Fluß und Auflösung für verschiedene Blendenkombinationen . . . 57
5.16. Fehlerquadrat Δq^2 abhängig vom Impulsübertrag q . . . 58
5.17. Die Auflösungsfunktion für Schlitz- und Kreisblenden . . . 59

6.1. Untersuchte Bereiche des Phasendiagramms . . . 62
6.2. Test zur Bestimmung von Chi Quadrat . . . 66
6.3. Modell einer mit DNA gefüllten zylindrischen Mizelle . . . 67
6.4. Elektronendichteprofile des Querschnitts der zylindrischen Mizellen . . . 68
6.5. Modell einer mit DNA gefüllten sphärischen Mizelle . . . 69
6.6. Streukurven des Lipides in Dodekan ohne Zugabe von Wasser und DNA. . 71
6.7. Streukurven der Lipid/DNA Mischung bei variierendem Wassergehalt . . . 73
6.8. Vergleich der Streukurven in Systemen mit und ohne DNA . . . 75
6.9. Streuintensität für verschiedene Lipidzusammensetzungen Φ . . . 77
6.10. Reduziertes Chi Quadrat χ_r^2 in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung Φ 78
6.11. Elektronendichteprofile für verschiedene Lipidzusammensetzungen Φ . . . 79
6.12. Anteil F der zylindrischen Mizellen bei verschiedener Lipidzusammensetzungen Φ . . . 80
6.13. Anzahl der Elektronen der Lipidkopfgruppen pro Einheitslänge entlang der DNA Achse . . . 82
6.14. Aus der Interpartikelkorrelation abgeleitete Konzentration der Komplexe . 83
6.15. Einfluß der Lösungsmittel Oktan, Dekan und Dodekan . . . 84
6.16. Phasendiagramm der Komplexe . . . 87
6.17. Gyrationsradien der Komplexe . . . 88

7.1. Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops . . . 92
7.2. Theoretischer Verlauf der Fluoreszenzautokorrelationskurve . . . 94
7.3. Fluoreszenzmikroskopiebilder der Dendrimerlösung . . . 95
7.4. Fluoreszenzautokorrelation der Tensid/Dendrimer-Komplexe bei verschiedenen Tween 20 Konzentrationen . . . 96
7.5. Diffusionszeiten in Abhängigkeit der Tween 20 Konzentration . . . 97
7.6. Autokorrelationskurven in Abhängig von der Konzentration des Dendrimers 99
7.7. Teilchendichte in Abhängig von der Konzentration des Dendrimers . . . 100
7.8. Dreidimensionales Modell des Dendrimer und des Tensids . . . 101
7.9. Schematische Darstellung des Tensid/Dendrimer-Komplexes . . . 101

Tabellenverzeichnis

2.1. Probenpräparationswege 10

4.1. Maße und Präzision der verwendeten Platin/Iridium Lochblenden 30

5.1. Gaußbreite und $\Delta\Theta$ für verschieden Blendensätze 58

6.1. Anpassungsparameter des Skalenverhaltens für das binäre System Lipid/Alkan 72
6.2. Anpassungsparameter für sphärische Mizellen für das binäre System Lipid/Alkan 72
6.3. Molekularen Größen der Komplexe in unterschiedlichen Alkanen bei 76 % . 85
6.4. Molekularen Größen der Komplexe in unterschiedlichen Alkanen bei 64 % . 85

A.1. Einschränkungen der Anpassungsparameter für das zylindrische Modell . . 106
A.2. Physikalische Daten der Lösungsmittel 109
A.3. Verwendete Tenside und Co-Tenside 110

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) die Struktur und das Phasenverhalten supramolekularer Komplexe aus Lipiden und hydrophiler DNA in unpolarem Lösungsmittel (Alkan) sowie von Komplexen aus Tensiden und hydrophoben Dendrimeren in wäßriger Umgebung untersucht. In beiden Fällen wurden Makromoleküle mit Amphiphilen komplexiert, die eine sowohl zur Oberfläche der Makromoleküle als auch zum Lösungsmittel kompatible Grenzfläche erzeugen.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Klein- und Weitwinkel Röntgenstreuanlage konzipiert und aufgebaut, die für Untersuchungen an weicher kondensierter Materie unter maximalen Fluß optimierte wurde. Der absolute Photonenfluß und die Auflösungsfunktion, sowie das Signal-Rausch-Verhalten und die zeitabhängige Speicherung des Bildplattensignals wurden bestimmt und mit der Theorie verglichen.

Um eine DNA-basierte selbstorganisierte Strukturbildung in unpolaren Lösungsmitteln zu verstehen, wurden Grundlagenuntersuchungen an Lipid/DNA-Komplexen in Alkan durchgeführt und das Phasendiagramm des quaternären System aus DNA, Lipid, Wasser und Alkan bestimmt. Es wurden Lipidmischungen aus dem zwitterionischen DOPE und dem kationische DOTAP verwendet, und die Untersuchungen auf ein isoelektrisches Verhältnis zwischen DOTAP und DNA beschränkt. Das Phasendiagramm wurde als Funktion des Gewichtsanteil Φ des zwitterionischen Lipides DOPE an der Lipidgesamtmenge beschrieben. Bei einer ausreichenden Zugabe von Wasser und Alkan bilden diese zwei getrennte Phasen, wobei sich die Messungen auf die Alkanphase konzentrierten.

Die Lipid/DNA-Komplexe wurden mit Röntgenkleinwinkelmessungen am Hamburger Synchrotronstrahlungslabor (HASYLAB) untersucht. Es konnte eine stabile Mesophase aus inversen zylinderartigen Lipid/DNA-Mizellen nachgewiesen werden, die bei steigendem DOPE Anteil Φ in eine Phase aus inversen sphärischen Lipid-Mizellen mit DNA-freiem Wasserkern übergeht. Zwischen beiden Phasen befindet sich ein Koexistenzbereich aus zylindrischen und sphärischen Mizellen, welcher sich zwischen $\Phi_0 = 72\,\%$ und $\Phi_0 = 82\,\%$ erstreckt.

Die DNA befindet sich im Inneren der zylinderartigen inversen Lipidmizellen und ist entlang der Mizelle gestreckt. Sie wird von einer 1 nm dicken Wasserschicht von dem umgebenden Lipid getrennt. Die aus der Elektronendichteverteilung ermittelte Zusammensetzung der Lipidhülle ist gegenüber der zugegebenen Lipidzusammensetzung Φ zu einem höheren

DOPE Gehalt verschoben. Aus der Interpartikelkorrelation kann eine starke Zunahme der Konzentration der Lipid/DNA-Mizellen mit steigendem Φ nachgewiesen werden.

Interessanterweise ist die Struktur der zylinderartigen Lipid/DNA-Mizellen weitgehend unabhängig von der Sorte der verwendeten Alkane (Oktan, Dekan und Dodekan). Der Koexistenzbereich verschiebt sich bei Oktan in Vergleich zu Dekan und Dodekan zu einem höheren Wert. Außerdem können in Dekan für reines DOTAP ($\Phi = 0\,\%$) keine Komplexe festgestellt werden.

Es wurde das Phasenverhalten der Lipid/DNA-Komplexe als Funktion der Wasserkonzentration bestimmt. Dies wurde exemplarisch bei einer Lipidzusammensetzung von $\Phi = 76\,\%$ durchgeführt, bei der unter Wasserüberschuß annähernd die gesamte DNA in Alkan übergeht. Bei niedrigem Wassergehalt bilden sich in Alkan invertierte sphärische Lipidmizellen, die mit steigendem Wassergehalt anschwellen. Ab einem Wassergehalt von 163 % (Gewichtsprozent Wasser zu DNA) treten zylinderartige Lipid/DNA-Mizellen auf, deren Wassergehalt mit der zugegebenen Wassermenge bis zu einer Schichtdicke von 1 nm zunimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie hydrophobe Polyphenylen-Chromophor-Dendrimere untersucht. Drei Arme des Dendrimers weisen fluoreszierende Gruppen auf, der vierte einen bioaktiven Biotinanker. Es konnte gezeigt werden, daß die Dendrimere supramolekulare Komplexe mit Tensiden formen und so in wäßrigen Medien gelöst und als multichromophorer Fluoreszenzmarker verwendet werden können. Die Komplexe zeigen bei Verwendung verschiedener Tenside unterschiedliche Strukturen. Alle weiteren Messungen wurden mit dem Tensid Tween 20 durchgeführt, das monodisperse Tensid/Dendrimer-Mizellen mit jeweils einem einzelnen Dendrimer bilden kann.

Aus der Analyse der Fluoreszenzautokorrelation bei einer Dendrimerkonzentration von 50 nM erhält man zwei stark unterschiedliche Diffusionszeiten von $\tau_D = 168\,\mu s$ und $\tau_D = 2470\,\mu s$, die beide über den gesamten Tensid-Konzentrationsbereich nachweisbar sind. Die schnellere Komponente aus Tensid/Dendrimer-Mizellen mit jeweils einem einzelnen Dendrimer pro Mizelle, dominiert die Autokorrelationsfunktion oberhalb einer Tensidkonzentration von $1,7 \cdot 10^{-4}$ M. Ihre Diffusionskonstante bleibt für alle Tensidkonzentrationen konstant und ergibt einen hydrodynamischen Radius $R_H = 7,1\,nm$. Die langsamere Komponente aus großen Aggregaten mit einer Vielzahl von Dendrimeren überwiegt unterhalb der Übergangskonzentration. Ihr hydrodynamischer Radius divergiert mit sinkender Tensidkonzentration bis hin zu einer Größe von über 20 µm.

Die Tensid/Dendrimer-Mizellen bleiben auch bei Verdünnung stabil. Innerhalb eines Konzentrationsbereiches der Dendrimere zwischen 10 nM und 10 µM ist die gemessene Konzentration proportional zu dem Verdünnungsfaktor. Damit können die Tensid/Dendrimer-Mizellen als Fluoreszenzmarker für quantitative Fluoreszenzmessungen genutzt werden.

1. Einleitung

Die Evolution des Lebens begann vor etwa vier Milliarden Jahre im Wasser. Bis heute ist die wäßrige Umgebung das natürliche Umfeld der meisten biologischen Materialien und alle wichtigen molekularen Vorgänge der Biologie finden dort statt. Ein wichtiger Teil der beteiligten Biomoleküle ist amphiphil, sie besitzen also sowohl hydrophile als auch hydrophobe Anteile. Das Zusammenspiel dieser Bereiche mit der Umgebung ist ein wichtiger Faktor für die Strukturbildung, da entropisch ungünstige Kontakte zwischen hydrophoben Molekülteilen und Wasser minimiert werden. Nichtpolare Umgebungen liegen nur im Inneren biologischer Komplexe vor, welche dann durch die hydrophilen Gruppen der Amphiphile vom Wasser abgeschirmt werden.

Auch außerhalb von Organismen bilden amphiphile Moleküle in Lösung eine Vielzahl verschiedener Strukturen, die von Mizellen bis hin zu bikontinuierlichen Anordnungen [18, 65] reichen. Die entstehenden Strukturen werden weitgehend durch Konzentration, Temperatur, den verwendeten Lösungsmitteln und dem Verhältnis der hydrophilen zu hydrophoben Molekülоberfläche der stabilisierenden Amphiphile bestimmt. Bietet man den Amphiphilen eine hydrophobe oder hydrophile Oberfläche an, ordnen sie sich dort unter den richtigen Bedingung an und bilden geordnete Strukturen. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind auch polymerartige Mizellen. Diese bestehen aus selbstassemblierten polymerartigen Strukturen und weisen sowohl Eigenschaften von Mizellen als auch von Polymeren auf

Oftmals ist es wünschenswert, hydrophobe oder hydrophile Makromoleküle in dem jeweils entgegengesetzten Lösungsmittel zu lösen. Entweder um die spezifischen Eigenschaften der Moleküle in einer neuen Umgebung zu nutzten, oder aber um neue Möglichkeiten zu gewinnen, das Lösungsmittel zu beeinflussen. Zu diesem Zweck muß die Oberfläche der Moleküle von hydrophob nach hydrophil oder umgekehrt geändert werden. Gerade bei kleinen Partikeln, Polymeren und anderen Makromolekülen ist eine Modifizierung oftmals umständlich oder mit weiteren aber unerwünschten Änderungen der Eigenschaften verbunden. Eine optimale Methode wird versuchen, diesen Effekt zu minimieren und vielleicht sogar noch zusätzliche Eigenschaften erzeugen. Der hydrophobe Effekt läßt sich ausnützten, um hybride Mizellen zu bilden, bei denen die zu lösenden Makromoleküle in einer amphiphilen Hülle verpackt werden, welche eine sowohl zur Oberfläche als auch zum Lösungsmittel kompatible Grenzfläche erzeugt. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, daß die Grenzfläche auf die konkrete Anwendung ausgerichtet werden kann. So ist beispielsweise für biophysikalische Anwendungen Biokompatibilität ein wichtiges Kriterium. Dies bedeutet, daß die Materialien physiologische Prozesse kaum beeinflussen und daher keine nennenswerte Störung in den Organismen verursachen können. Die konkrete Wahl der einhüllenden Amphiphile und die Vorgehensweise zur Komplexbildung hängt dabei vom Teilchen, vom

Medium und der gewünschten Anwendung ab und muß für jeden Fall passend gewählt werden.

In dieser Arbeit wurde diese Fragestellung an zwei biophysikalisch relevanten Systemen untersucht. Der Übergang von hydrophilen Teilchen in ein hydrophobes Medium wurde für den Transfer von DNA[1] in Alkan behandelt. Der umgekehrte Übergang von hydrophoben Teilchen in ein hydrophiles Medium wurde für fluoreszenzmarkierte Dendrimere untersucht, die in Wasser gelöst wurden.

Aktuelle Fragestellungen der Nano- oder Biotechnologie betreffen Wege, Strukturen auf nano- und mesoskoper Skala gezielt zu steuern (Bottom-up Assemblierung). Dies kann unter anderen durch die Nutzung der herausragenden Eigenschaften der DNA ermöglicht werden, die es erlaubt, ihre Struktur molekülgenau durch Standardtechniken zu steuern. So können komplexe dreidimensionale Strukturen aufgebaut werden, wie dies beispielweise in Arbeiten von Seeman et al. [66, 67] und Simmel et al. [73] demonstriert wurde. Diese können wiederum als ein Gerüst oder eine Schablone dienen, um eine weitergehende Strukturbildung zu kontrollieren. Die Bildung verschiedenster Strukturen und Komplexe aus DNA und Lipiden (Lipoplexe) in wäßrigen Lösungen wurde bereits auf vielfältige Weise realisiert. Ein aktuelles Forschungsgebiet ist die Charakterisierung und Anwendung von Lipoplexen als künstliche Genvektoren [61]. Dabei dienen die Lipide als Verpackung, um DNA in Zellen einführen zu können. Wechselt man von wäßrigen zu unpolaren Medien, kann die native DNA aufgrund ihrer hydrophilen Natur nicht mehr gelöst werden. Da unpolare Lösungsmittel ein verbreiteter Ansatzpunkt für die Bildung nano- und mesoskoper Phasen sind, beispielsweise bei der Synthese von Nanokristallen [87], können mit DNA weitere Anwendungen möglich werden. Die Löslichkeit der DNA kann beispielsweise durch eine Komplexierung der DNA mit amphiphilen Molekülen ermöglicht werden, wie es bereits in der Literatur [57, 69, 86] gezeigt wurde.

In dieser Arbeit wurden DNA-Moleküle in Alkan gelöst, indem sie durch Selbstorganisation einzeln in Lipidmizellen eingebettet wurden. Dadurch werden einzelne DNA-Moleküle durch die hydrophobe Umgebung voneinander abgeschirmt, und es sind weitere Einzelmolekülanwendungen möglich.

Am zweiten untersuchten System wurde der umgekehrte Weg der Lösung eines hydrophoben Moleküls in einem wäßrigen Medium betrachtet. Einige der Haupttechniken der Biophysik beruhen auf Fluoreszenz. Hierbei werden die zu untersuchenden Materialien mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit mikroskopischen oder spektroskopischen Techniken untersucht. Eine wichtige Aufgabe ist es, Fluoreszenzfarbstoffe zu finden, die sich durch eine möglichst hohe Quantenausbeute auszeichnen. Dies bedeutet, daß das Verhältnis zwischen fluoreszenten Signal und absorbierten Licht möglichst hoch ist. Dadurch läßt sich die benötigten Beleuchtungsmenge reduzieren, die das Objekt schädigen könnte, sowie eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis erreichen. Eine naheliegende Möglichkeit zur Effizienzverbesserung ist die Zusammenfassung mehrerer Chromophore zu einem multichromophoren Molekül, wie es am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz in der Gruppe von Prof. Müllen durchgeführt wurde. Dazu wurden Dendrimere syntheti-

[1] deoxyribonucleic acid oder deutsch: Desoxyribonukleinsäure(DNS)

siert, daß heißt Makromoleküle mit einer, von einem Zentrum ausgehenden, wohldefinierten baumartigen Struktur. Drei der vier Äste enden in den Chromophore, der übrige Ast kann über eine Biotingruppe an das zu markierende Objekt anbinden. Neben dem Vorteil einer erhöhten Quantenausbeute ermöglicht dieser Entwurf auch eine Verwendung für quantitative Fluoreszenztechniken wie Bioassays, da die Quanteneffizienz der einzelnen Marker genau definiert ist und damit ein zur Konzentration der markierten Moleküle proportionales Signal erzeugt. Sowohl Farbstoffmoleküle als auch Dendrimere sind oftmals hydrophob, so auch in diesem Fall. Um auch Verwendungen in wäßrigen Medien und damit für biologische Systeme überhaupt möglich zu machen, wurden in dieser Arbeit wasserlösliche Komplexe aus Dendrimeren und amphiphilen Tensiden erstellt und mittels Fluoreszenztechniken charakterisiert.

Zur Untersuchung der Systeme werden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet. Die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS[2]) gehört zu den klassischen Untersuchungsmethoden zur Strukturaufklärung nanoskopischer bis mesoskopischer Strukturen der biologischen Materie, Kolloide und anderer selbstorganisierten Systeme. Dazu wird ein intensiver Röntgenstrahl auf die Probe gelenkt und das Streusignal unter einem kleinen Winkel ($<5°$) detektiert. Aus der Streuamplitude können dann Aussagen über die Elektronendichteverteilung der Probe bei einer Größenskala zwischen 1 Å bis etwas 100 nm gewonnen werden. Die Röntgenkleinwinkelstreuung wurde in den letzten Jahren insbesondere im Bereich der Strukturanalyse von Kolloiden und Polymerlösungen [47], Lipidphasen [22] und hochorganisierten Lipid/DNA-Komplexen [89] verwendet. In dieser Arbeit verbinden sich diese Bereiche, indem sie auf die Strukturbestimmung polymerartiger Lipid/DNA-Komplexe ausgedehnt wird.

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine mikroskopische Fluoreszenztechnik, die besonders für Farbstoffmoleküle in geringer Konzentration (etwa 1 µM bis 0,1 nM) sensitiv ist. Sie basiert auf der Beobachtung der Intensitätsfluktuationen eines, durch ein konfokalen Mikroskop erzeugten, kleinen Beobachtungsvolumen ($\approx$ 1 fl). Probenmoleküle diffundieren durch diesen Fokus und erzeugen ein Fluoreszenzsignal fluktuierender Stärke. Durch eine Korrelationsanalyse des zeitlichen Verlaufs dieses Signals können Aussagen über Größe und Konzentration der Probe gewonnen werden.

Der Aufbau dieser Arbeit ist wie folgt:

In Kapitel 2 werden die Materialien vorgestellt und die Probenpräparation erläutert.

Kapitel 3 beschreibt die hier angewandete Theorie zur Röntgenkleinwinkelstreuung.

Kapitel 4 beschreibt den experimentellen Aufbau der verwendeten Röntgenkleinwinkelapparaturen. Ein wichtiger Teil dieser Arbeit bestand im Aufbau einer laboreigenen Röntgenkleinwinkelanlage. Der Charakterisierung von Fluß, Auflösung und Detektionseigenschaften dieser Anlage ist Kapitel 5 gewidmet.

In Kapitel 6 werden die Ergebnisse zu den Lipid/DNA-Mikroemulsionen vorgestellt. Die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung wird angewendet, um Struktur und Lösungseigenschaften von Lipid/DNA-Komplexen in Alkan zu untersuchen. Das Phasenverhalten der

[2] eng: Small-Angle-Xray-Scattering

Komplexe wird erforscht und eine Prozedur etabliert um einzelne DNA Ketten in Alkan zu lösen, die dann in invertierten polymerartigen Lipidmizellen vorliegen.

In Kapitel 7 wird eine Prozedur vorgestellt, um hydrophobe Dendrimeren in Wasser zu lösen. Die entstehenden Komplexe werden mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Laser Scanning Microscopy (LSM) charakterisiert. Hier wird besonders auf den Einfluß unterschiedlicher Tensid- und Dendrimerkonzentrationen eingegangen und der Bereich bestimmt, in dem einzelne Dendrimere in Lösung vorliegen.

2. Materialien und Probenpräparation

2.1. Materialien

2.1.1. DNA und Lipide

DNA

Die biologische Aufgabe der DNA beist die langfristige Speicherung der genetischen Information aller Lebewesen. Ihre in der Natur am häufigsten vorliegende Form, die B-DNA, ist eine Doppelhelix aus zwei rechtsgängig umeinander gewundener Polymere. Die einzelnen Monomere werden als Nukleotide bezeichnet und bestehen aus einer Phosphat- und Desoxyribosegruppe mit angehängter Base Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin (T). Aus sterischen Gründen können sich in der doppelsträngigen Anordnung jeweils nur zwei Basen mit der spezifischen Basenpaarung A mit C und G mit T über Wasserstoffbrücken verbinden. Die Phosphatgruppe und Desoxyribose bilden dabei ein doppelsträngiges helikales Rückgrat, während die Basen übereinander gestapelt werden. Der typische Basenabstand für die B-DNA liegt zwischen 0,33 - 0,34 nm. Andere Formen der DNA besitzen einen anderen Drehsinn und eine andere Art der Basenstapelung. Die genetische Information ist über die Sequenz der Basen auf jedem Strang codiert, welche durch Transkription in die chemisch verwandte RNA übergeführt wird und durch Translation in eine eindeutige Sequenz von Aminosäuren auf einem Polypeptidstrang umgewandelt werden kann.

Neben der biologischen Bedeutung der DNA machen sie ihre herausragenden Eigenschaften auch für andere Gebiete interessant. Auf Grund ihrer Dimensionen, kann man sie bereits mit optischen Methoden untersuchen. Die aus der Biologie abgeleiteteten Methoden erlauben es, DNA beliebiger, auf ein Basenpaar genau definierter Längen zu erhalten und verschiedene DNA Stücke auf eindeutige Weise zu verbinden. Dies macht sie zu einem nahezu universal einsetzbaren Untersuchungsobjekt für die Polymerphysik.

In dieser Arbeit wurde Kalbsthymus DNA (Sigma, Deisenhofen) benutzt, die als hochpolymere und polydisperse DNA in der B-Konformation vorliegt. Sie wurde mittels Phenolextraktion gereinigt, in Wasser gelöst und für mindestens 12 Stunden equilibriert. Um die Löslichkeit zu verbessern wurde sie für 15 Minuten in einem Bandelin Sonorex Ultraschallbad (240 W/35 kHz) beschallte. Mittels Agarose Gelelektrophorese wurde sie mit unbeschallter DNA verglichen (nicht gezeigt). Hierbei konnte kein Unterschied in der Längenverteilung festgestellt werden.

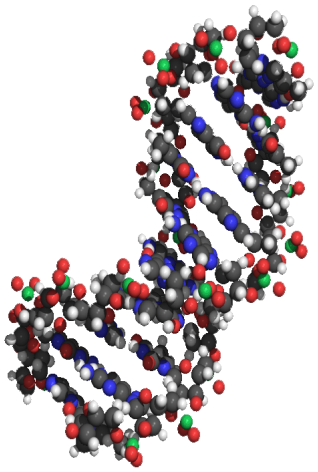


Abbildung 2.1.: B-DNA besteht aus einer Doppelhelix zweier umeinander gewickelten Einzelstränge. Die Basenpaare sind in einem Abstand von 0,33 - 0,34 nm übereinander gestapelt. Der Radius beträgt 1 nm.

Lipide

Lipide sind amphiphile Moleküle mit zumeist zwei unverzweigten Alkylketten und einer hydrophilen Kopfgruppe.

In dieser Arbeit wurden zwei Lipidsorten verwendet. Dioleoyl-Glycero-Phosphoethanolamin (DOPE) ist ein ladungsneutrales Lipid mit einer negativen NH_3 und einer positiven Phosphatgruppe. Dioleoyl-Trimethylammonium-Propan (DOTAP) ist ein kationisches Lipid mit einer positiv geladenen $N(C_3H)_3$ Gruppe. Beide Lipide wurden von Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA) in Chloroform gelöst bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Die Lipidketten sind jeweils einfach ungesättigt. Dies verringert in Gegensatz zu den gesättigten Ketten die Hauptphasenübergangstemperatur weit unterhalb 0 °C.

Hydrophober Effekt und Lipid/DNA-Phasen

Lipide sind ein wichtiges Bestandteil biologischer Membranen und geben dieser ihre zweidimensionale Gestalt. Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung ordnen sie sich derart an, daß die hydrophoben Ketten den Kontakt mit Wasser vermeiden und die hydrophilen Köpfe diesen suchen. Daher weisen sie abhängig von der Lipidsorte, dem Wassergehalt und der Anwesenheit anderer unpolare Lösungsmittel eine Vielzahl unterschiedlicher Phasen auf [35, 60, 65].

Die hydrophobe Wechselwirkung resultiert aus der Struktur des Wassers. Bei einem Wassermolekül sind die Orbitale tetrahedral um das Sauerstoffatom herum angeordnet. Zwei Orbitale sind dabei von den Wasserstoffmolekülen besetzt, während die beiden übrigen frei

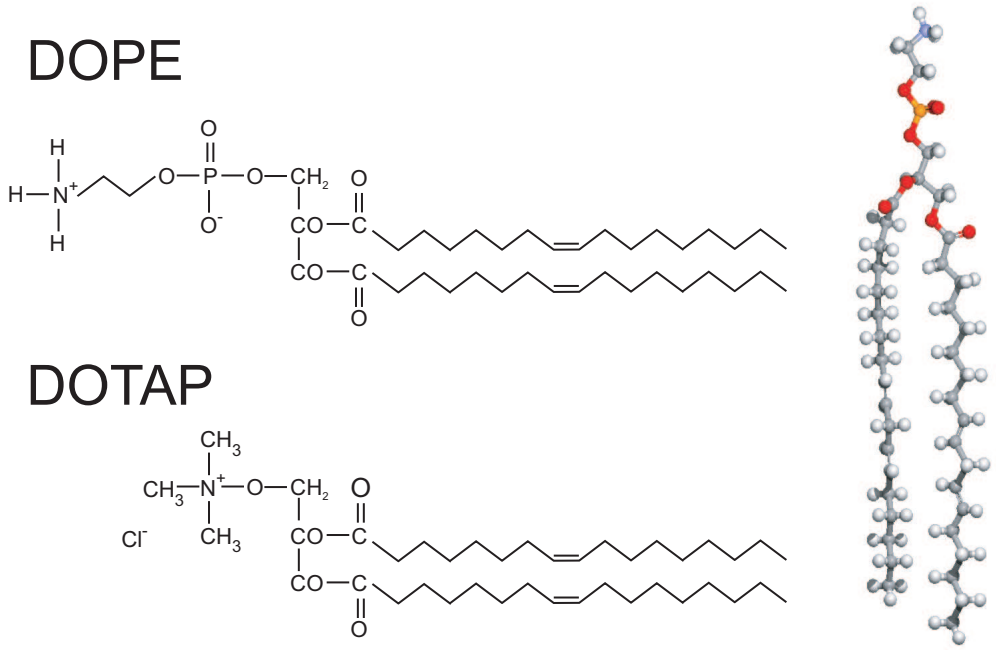


Abbildung 2.2.: Die Lipide DOPE und DOTAP als Strukturformel sowie DOPE in dreidimensionaler Ansicht

bleiben. Dabei weisen die von Wasserstoff besetzten Arme eine positive und die unbesetzten Arme eine negative Ladung auf. Die elektrostatische Anziehungskraft zwischen den unterschiedlich geladenen Orbitalen ist die Ursache für die Wasserstoffbrückenbindung, bei der die beteiligten Wasserstoffatome zwischen beiden Wassermolekülen hin und her tunneln können [43]. Die einzelnen Wassermoleküle bilden so ein Netzwerk untereinander verbundener Tetraeder mit dem Sauerstoffatom in der Mitte. Die Wasserstoffatome sind dabei nicht mehr fest dem jeweiligen Sauerstoffatom zugeordnet, so daß aus der Vielzahl der möglichen Verbindungen die hohe Entropie des Wassers resultiert.

Wird nun ein hydrophobes Material, das sich dadurch auszeichnet, keine Wasserstoffbrücken eingehen zu können, in das Wasser eingebracht, bildet sich um dieses Molekül ein Käfig aus Wassermolekülen. Die fehlende Möglichkeit zur Wasserstoffbrückenbindung verursacht ein geringere Entropie, die üblicherweise jeden enthalpischen Vorteil anderer Wechselwirkungen übertrifft. Die freie Energie $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ wird daher ansteigen und hydrophobe Moleküle aggregieren, um diesen Effekt zu vermindern.

Lipide sind amphiphil, besitzen also sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche. Aufgrund dieser gegensätzlichen Natur bilden sie komplexe Strukturen, bei der die hydrophoben Bereiche nach Möglichkeit versuchen, keinen Kontakt zu Wasser zu erhalten, und die hydrophilen Bereiche genau diesen suchen. Die Temperatur, Konzentration, geometrische Gestalt der Lipide [21] und etwaige elektrostatischen Wechselwirkung der Kopfgruppen [32] entscheidet dabei, welche Phase gebildet wird. Ist der Flächenbedarf der Ketten gerin-

ger als der der Kopfgruppe bilden sich Mizellen, im umgekehrten Fall hexagonale Phasen. Hält sich der Flächenbedarf in der Waage bilden sich Doppelschichten aus.

DNA ist aus obigen Gründen löslich in Wasser und unlöslich in organischen Lösungsmitteln. Im Zusammenspiel mit Lipiden wenden sich die Lipidköpfe der DNA zu und bilden sogenannte Lipoplexe. Dieses Verhalten kann noch verstärkt werden, wenn eine Teil der Lipide positiv geladen ist, um so ladungsneutrale Komplexe zu erzeugen. Die letztliche Anordnung ist von der Geometrie der Lipide, deren Ladung, Lipidmischung und den jeweiligen Lösungsmitteln abhängig [18, 65, 89].

2.1.2. Dendrimere und Tenside

Dendrimere

Dendrimere sind Makromoleküle mit einer, von einem Zentrum ausgehenden, wohldefinierten baumartigen Struktur. Die hier verwendeten Polyphenylen-Dendrimere wurden am Max-Planck-Institut in für Polymerforschung Mainz in der Gruppe von Prof. Müllen synthetisiert [38]. Die chemische Struktur ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Drei Äste der Dendrimere enden in Perylendicarboximid-Chromophore (PMI), der vierte Ast in einer Biotingruppe. Durch diesen Aufbau ist es hervorragend als Fluoreszenzmarker geeignet. Die Biotingruppe kann mit einer hohen Affinitätskonstante an die Proteine Avidin und Streptavidin anbinden. Durch die drei stark fluoreszierenden Chromophore zeigt das Dendrimer eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute. Die Anregung liegt bei 520 nm und die Emission bei 600 nm. Da jedes Dendrimer die exakt gleiche Anzahl an Chromophoren enthält und damit die Quanteneffizienz der einzelnen Makromoleküle genau definiert ist, erzeugt es ein zur Konzentration der markierten Moleküle proportionales Signal. Damit kann es als Farbstoffmolekül für quantitative Fluoreszenztechniken wie Bioassays verwendet werden. Durch die Hydrophobizität der Dendrimere können sie nicht direkt in wäßrigen Medien eingesetzt werden, sondern müssen mit einer hydrophilen Hülle, wie in dieser Arbeit beschrieben, ummantelt werden.

Tenside

Tenside sind amphiphile Moleküle mit zumeist einer unverzweigten hydrophoben Alkylkette und einem hydrophilen Bereich. Um Dendrimere in Wasser zu lösen wurden die nichtionischen, zwitterionischen und ionischen Tenside SDS, Didodecyldimethylammoniumbromid, CHAPS, Tween 20 und 60, sowie die Co-Tenside Ethanol, Phenol und Benzaldehyd eingesetzt (siehe auch Tabelle A.3).

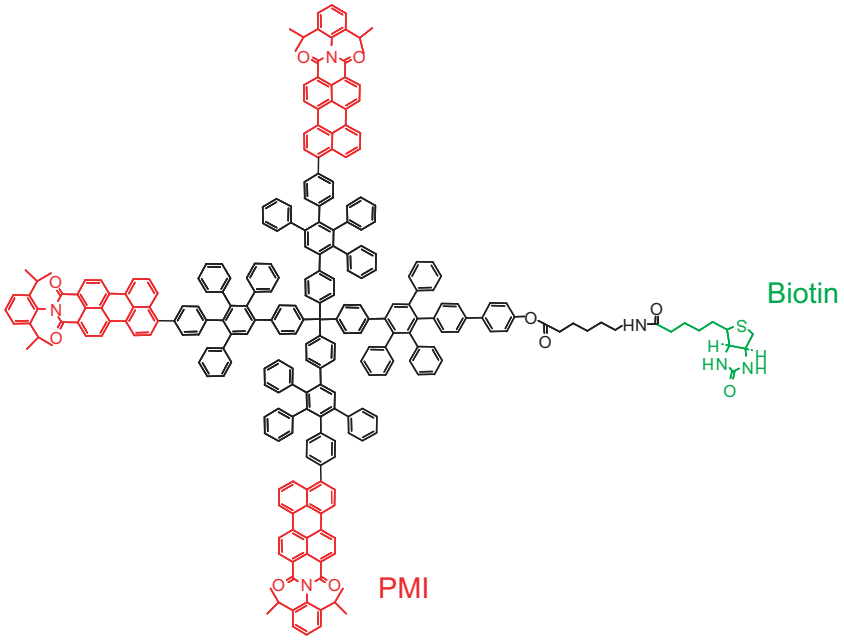


Abbildung 2.3.: Struktur des verwendeten Dendrimers mit den angehängten PMI Chromophoren und der Biotingruppe

2.2. Probenpräparation

2.2.1. Präparation der Lipid/DNA-Komplexe

Die Präparation der Lipid/DNA-Komplexe erfolgte analog zur Arbeit von Koltover et al. [28]. Dort wurde bei einem geeigneten Mischungsverhältnis von neutralen und kationischen Lipiden und DNA, eine hexagonale Phase aus Lipid/DNA-Komplexen beobachtet, bei der einzelne DNA Moleküle von einer Schale Lipide umgeben sind.

Die in Chloroform gelösten Lipide wurden im Gewichtsverhältnis $\Phi = \frac{\text{DOPE}}{\text{DOPE+DOTAP}}$ gemischt[1]. Bei $\Phi = 100\,\%$ wurde die selbe Menge DOPE wie bei $94\,\%$ verwendet, allerdings wurde der Anteil DOTAP weggelassen. Das Chloroform wurde unter einem Stickstoffstrahl verdampft und die übrig gebliebenen Lipide für mindestens 12 Stunden in Vakuum getrocknet. Daraufhin wurden sie im jeweiligen Lösungsmittel (siehe Tabelle 2.1) gelöst und mit der ebenfalls gelösten DNA in einem Gewichtsverhältnis von $\frac{\text{DOTAP}}{\text{DNA}} = 2,2$ gemischt, um so neutrale Komplexe ohne Gegenionen zu erhalten [82]. Anschließend wurde die Probe für einige Tage equilibriert.

Um auszuschließen, daß aufgrund der Präparation vorkomplexierte Nichtgleichgewichtsstrukturen in der Alkanphase längere Zeit weiterbestehen können, wurde die Präparation auf unterschiedlichen Wegen durchgeführt (siehe Tabelle 2.1) und die entstehenden Strukturen verglichen.

[1] bzw. $\text{DOTAP} = \frac{(1-\Phi)}{\Phi}\text{DOPE}$; $\text{DOPE} = \frac{\Phi}{(1-\Phi)}\text{DOTAP}$; $\text{DOTAP} + \text{DOPE} = \frac{\text{DOTAP}}{(1-\Phi)}$

Tabelle 2.1.: Präparationswege zur Erzeugung Lipid/DNA-Komplexe in Alkan

A	B	C	D
Lipide in Alkan lösen	Lipid in Wasser lösen	Lipid in Wasser lösen	Lipid in Wasser lösen
DNA in Wasser lösen	DNA in Wasser lösen	DNA in Wasser lösen	DNA in Wasser lösen
DNA- und Lipidlösung mischen	DNA- und Lipidlösung mischen	lyophilisieren	lyophilisieren
	Wasser und Alkan mischen	mit einer geringen Menge Wasser mischen	mit Alkan mischen
		mit Alkan mischen	

Alle Präparationswege zeigen mittels UV/Vis einen ähnlich hohen Anteil an DNA in der Alkanphase. Ein exemplarischer Vergleich der Röntgenstreudaten bei $\Phi = 64\,\%$ zeigt bis auf Weg D, bei dem kein Wasser in die Komplexe eingearbeitet werden kann, eine vergleichbare Struktur (ohne Abbildung). Weg A ist präparativ aufwendig, da DOTAP in Alkan nur schwer löslich ist, und man deshalb mit verschiedenen Temperaturen arbeiten muß, um eine vollständige Lösung von DOTAP zu ermöglichen. Weg C zeigt keinen Vorteil und ist wegen dem Zwischenschritt der Lyophilisierung etwas aufwendig, so daß sämtliche Proben auf dem Weg B präpariert wurden.

Eine Ausnahme besteht in der Präparation für die Bestimmung der Auswirkung des Wassergehalts. Für diese Experimente war es notwendig, eine genau definierte Menge Wasser zu verwenden und es wurde der Präparationsweg C gewählt.

Für die Röntgenexperimente wurde die Alkanphase unmittelbar vor der Versuchsdurchführung von der Wasserphase getrennt.

2.2.2. Präparation der Tensid/Dendrimer-Komplexe

Die Tensid/Dendrimer-Komplexe wurden mit verschiedenen Tensiden und Puffern erstellt. Davon abhängig wurden unterschiedliche Löslichkeitsverhalten beobachtet, welche in Kapitel 7 beschrieben werden. Die allgemeine Präparation verlief folgendermaßen:

1 mg des Dendrimers lagen in in 1 ml DMF gelöst vor. 100 μl dieser Mischung wurden in 200 μl der Tensidlösung gegeben und 5 Minuten mit einem Vortexer geschüttelt. Anschließend wurden sie mit den jeweiligen Puffern (PBS sowie Puffer A,B und C) gemischt und mit FCS und LSM untersucht.

3. Röntgenkleinwinkelstreuung

3.1. Einleitung

Streutechniken bieten einen detaillierten Einblick in die Struktur biologischer Materie, Kolloide und selbstorganisierte Systeme. Neben den bildgebenden Verfahren wie TEM[1] und AFM[2] und spektroskopischer Verfahren wie die IR/VIS/UV- sowie Kernresonanzspektroskopie sind sie die Schlüsseltechnik zur Strukturanalyse biologischer und nicht biologischer Materie auf der atomaren bis hin zur mesoskopischen Längenskala. Ihr großer Vorteil gegenüber anderen Verfahren besteht in der Mittelung über die gesamte Probe, dem weitgehenden Verzicht auf Markierungsstoffe und ihre große Flexibilität bezüglich der Strahlungsquellen: Üblich sind hier Neutronen, Röntgenstrahlung und Licht, sowie Elektronen und Schallwellen.

In dieser Arbeit wurde Kleinwinkelstreuung eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine statische, elastische Streuung bei kleinen Winkeln, d.h. aufgrund der reziproken Natur des Streuprozesses um Untersuchungen mesoskopischer Strukturen. Die Wellenlänge ändert sich im Streuprozeß nicht und man mißt nur das zeitliches Mittel der Streuintensität und nicht deren Fluktuationen.

Zwei Arten der Kleinwinkelstreuung werden hauptsächlich verwendet, Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) und Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS). Da Röntgenstrahlung mit der Elektronenhülle und Neutronen mit Kernen wechselwirken, zeigt dieselbe Probe, mit beiden Techniken gemessen, große Unterschiede in der Streuintensität. Weiterhin bieten beide Techniken verschiedene Vor- und Nachteile, so daß man zu jeder Problemstellung die angemessene Methode wählen muß. Die letztliche Analyse der Ergebnisse ist prinzipiell identisch. Die Unterschiede liegen mehr in den unterschiedlichen Möglichkeiten der Versuchsdurchführung und damit bei der konkreten Fragestellung.

Da alle Streuexperimente dieser Arbeit ausschließlich mittels Röntgenstrahlung durchgeführt wurden, beziehe ich mich im weiteren nur auf diese Technik. Röntgenstrahlung kann wie alle elektromagnetische Strahlung im Prinzip auf drei unterschiedliche Arten erzeugt werden. Durch Elektronenübergänge, Bremsstrahlung oder Synchrotronstrahlung. Für Röntgenstreuexperimente sind alle drei Arten relevant. Elektronenübergänge werden vor allen in hauseigenen Kupfer- und Molybdänanoden eingesetzt, das weiße Spektrum der Bremsstrahlung für Laue-Apparaturen und die hochbrilliante Synchrotronstrahlung am Synchrotron. Mittlerweile sind auch Röntgenlaser in Planung bzw. im Bau, diese werden allerdings noch nicht für SAXS Messungen eingesetzt.

[1] Transmissions Elektronen Mikroskopie
[2] Atomic Force Microscopy, Rasterkraftmikroskopie

3.2. Rayleigh-Debye-Gans Theorie

Die hier dargestellt Theorie beruht auf der ersten Bornschen Näherung. Sie besteht darin, daß sowohl einfallende als auch auslaufende Welle als eben angenommen wird und sie nicht durch das Medium beeinflußt werden. Dies bedeutet insbesondere, daß keine Mehrfachstreuung auftritt. Die Rayleigh-Debye-Gans Theorie beschreibt im wesentlichen die gestreute Welle unter diesen Bedingungen. Damit ist sie die geeignete Beschreibung für Streuprozesse an kolloidale Systemen und dünnen Proben, solange folgenden Bedingungen erfüllt sind [13]:

$$|n_{\text{Partikel}} - 1| \ll 1 \tag{3.1}$$

$$\frac{2\pi D}{\lambda} \left| \frac{\Re(n_{\text{Partikel}})}{\Re(n_{\text{Lösungsmittel}})} - 1 \right| \ll 1 \tag{3.2}$$

Hier steht D für den Durchmesser der Streuteilchen und n für den Brechungsindex. Dieser ist für Röntgenstrahlung immer in der Nähe von 1 mit einer Abweichung von kleiner 10^{-5}, welche diese Näherung für Partikel kleiner als etwa 100 nm-1000 nm gültig macht.

Im folgenden betrachtet man nur noch die entstehenden monochromatischen Wellen.

$$\boldsymbol{E}_e(\boldsymbol{r}, t) = \boldsymbol{E}_0 \mathrm{e}^{\mathrm{i}(\omega t - k_e \boldsymbol{r})} \tag{3.3}$$

Hier ist ω die Kreisfrequenz, k_e die Wellenzahl und der Index e steht für *einfallend.*

Eine Probe besitzt die Elektronendichteverteilung $\tilde{\rho}(\boldsymbol{r}, t)$. Im einfachsten Fall wechselwirkt die Welle elastisch mit einzelnen Elektronen, regt diese zu Schwingungen an und erzeugt Hertzsche Dipolstrahlung [2].

$$\boldsymbol{E}_s(\boldsymbol{R}, t) = \boldsymbol{E}_0 \frac{\mathrm{e}^{\mathrm{i}(\omega t - kR)}}{R} \int_V \mathrm{d}^3 r \rho(\boldsymbol{r}, t) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}} \tag{3.4}$$

hier ist $\boldsymbol{q} = \boldsymbol{k} - \boldsymbol{k}_e$ der Impulsübertrag, $\rho(\boldsymbol{r}, t) = r_e \tilde{\rho}(\boldsymbol{r}, t)$ die Streulängendichte mit $r_e = \frac{e^2 \mu_0}{4\pi m} = 2{,}818 \cdot 10^{-13}\,\mathrm{cm}$ dem Thomson-Streuquerschnitt eines Elektrons. Er ist ein Maß dafür, wie stark elektromagnetische Wellen an freien Elektronen gestreut werden. Der Term vor dem Integral beschreibt eine ausgehende Kugelwelle, deren Amplitude zur einfallenden Welle proportional ist. Der Integralterm ist die Streuamplitude

$$A(q) = \int_V \mathrm{d}^3 r \rho(\boldsymbol{r}, t) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}} \tag{3.5}$$

und gibt an, wie die gestreute Welle von der Struktur der Probe abhängig ist. Durch den Übergang der Elektronendichte zur Streulängendichte macht man die Streutheorie unabhängig von der konkreten Strahlungsart. Jeder Streuprozeß kann durch die Gleichungen im folgenden Text beschrieben werden, solange nur die oben genannten Rahmenbedingungen der Gleichungen 3.1 und 3.2 nicht verletzt werden.

Die Streuamplitude in Gleichung 3.5 läßt sich folgendermaßen interpretieren: Eine einfallende Welle I_0 wird an einem Partikel gestreut und die Streustrahlung unter einem Winkel Θ gemessen. Strahlung, die von einem Punkt P innerhalb diese Partikels ausgesandt wird, ist gegenüber Strahlung aus dem Ursprung um $(\boldsymbol{k}_e\boldsymbol{r} - \boldsymbol{k}_s\boldsymbol{r})/k$, also um $-\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}$, in der Phase verschoben. Die resultierende Streustrahlung wird nicht nur von einem Punkt der Probe abgestrahlt, so daß sich aus der Summation über alle infinitesimalen Volumenbereiche Gleichung 3.5 ergibt.

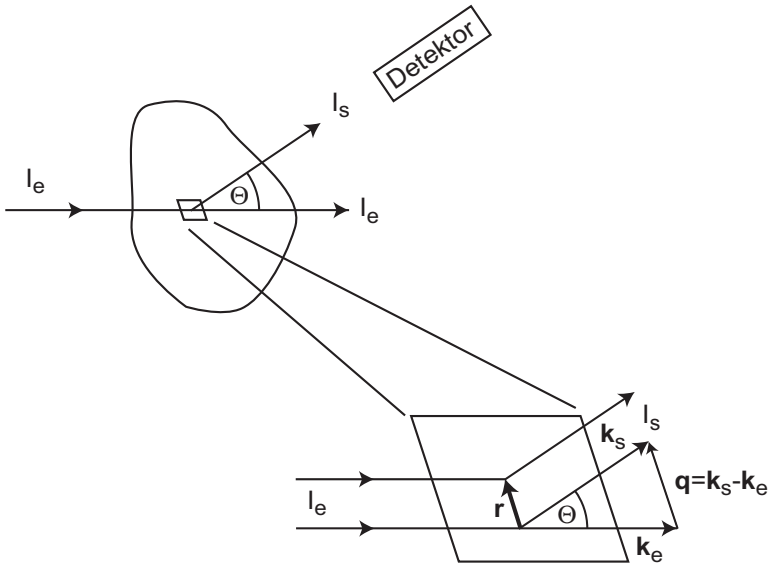


Abbildung 3.1.: Streuung an einem Partikel

Mit der Bragg-Bedingung

$$n\lambda = 2d\sin(\Theta/2) \tag{3.6}$$

ergibt sich der wichtige Zusammenhang zwischen Impulsübertrag q und Strukturgröße d:

$$d = \frac{2\pi}{q} \tag{3.7}$$

Üblicherweise ist man an Proben interessiert, bei denen Partikel und Strukturen in einem Medium eingebettet sind. Dabei kann es sich wie in dieser Arbeit, um Kolloide in Lösungen, aber auch um andere Systeme, wie beispielsweise Strukturfehler in Materialien, handeln. In allen Fällen kann die Streulängendichte aus zwei Termen zusammengesetzt werden. Das umgebende unstrukturierte Medium weist eine konstante Streulängendichte $\overline{\rho}$ auf. Die zu untersuchenden Partikeln werden durch eine Abweichung $\Delta\rho(\boldsymbol{r})$ von diesem konstanten Hintergrundterm beschrieben. Für die gesamte Streulängendichte $\rho(\boldsymbol{r})$ folgt somit:

$$\rho(\boldsymbol{r}) = \overline{\rho} + \Delta\rho(\boldsymbol{r}) \tag{3.8}$$

Aus Gleichung 3.5 wird somit

$$A(q) = \int_V \mathrm{d}^3 r \overline{\rho}\ \mathrm{e}^{(-\mathrm{i}\boldsymbol{qr})} + \int_V \mathrm{d}^3 r \Delta\rho(\boldsymbol{r})\, \mathrm{e}^{(-\mathrm{i}\boldsymbol{qr})} \tag{3.9}$$

Der erste Term aus Gleichung 3.9 ergibt ein Signal in Vorwärtsrichtung, das aufgrund des ungestreuten Strahls und des Beamstops (siehe Kapitel 4.1.4) nicht gemessen wird. Übrig bleibt nur der zweite Term - man kann also in der Kleinwinkelstreuung nur Fluktuationen der Streulängendichte um die konstante Hintergrundstreulängendichte messen. Im Prinzip besteht der zweite Beitrag wiederum aus zwei Termen, der Dichtefluktuation der Partikel selbst und spontanen Dichtefluktuation der Umgebung. Normalerweise kann man diese spontanen Fluktuation ignorieren, bzw. sie mit einer Hintergrundmessung entfernen, allerdings können sie für bestimmte Fälle auch wichtig werden. Dies ist besonders der Fall, bei der Messung von Proben mit schwachem Kontrast. Dort kann die spontane Dichtefluktuation des Lösungsmittel schnell in die selbe Größenordnung wie das Signal der Probe kommen (siehe Kapitel 5.2). In allen weiteren Formeln wird zur Vereinfachung auf das $\Delta\rho$ verzichtet und die Abweichung vom Hintergrund lediglich mit ρ bezeichnet.

Schließlich folgt für den Impulsübertrag $\boldsymbol{q} = \boldsymbol{k} - \boldsymbol{k}_e$ (siehe Abbildung 3.1) und wegen $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ die wichtige Beziehung

$$q = |\boldsymbol{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\Theta/2) \tag{3.10}$$

Gleichung 3.5 ergibt nur die Amplitude der gestreuten Strahlung, der Detektor mißt jedoch die Intensität, also auf das Streuvolumen normiert

$$I(\boldsymbol{q}) = A(\boldsymbol{q}, t)\, A^*(\boldsymbol{q}, t) \tag{3.11}$$

Mit Gleichung 3.5 ergibt dies:

$$I(q, t) = \int_V \int_V \mathrm{d}^3 r\, \mathrm{d}^3 r' \rho(\boldsymbol{r}, \boldsymbol{t})\, \rho(\boldsymbol{r}', t)\, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')} \tag{3.12}$$

Die Korrelationsfunktion

$$g(\boldsymbol{r}) = \frac{1}{V} \int_V \mathrm{d}r' \rho(\boldsymbol{r}', t)\, \rho(\boldsymbol{r} + \boldsymbol{r}', t) \tag{3.13}$$

gibt die Wahrscheinlichkeit an, in Abstand $\boldsymbol{r}$ eines Teilchens ein weiteres zu finden. Damit ergibt sich

$$I(q) = V \int_V \mathrm{d}^3 r\, g(\boldsymbol{r})\, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{qr}} \tag{3.14}$$

Die Streuintensität ist also die Fouriertransformierte der räumlichen Korrelationsfunktion. Gleichung 3.14 zeigt eine wichtige Aussage der Kleinwinkelstreuung. Selbst im günstig-

sten Fall kann man aus der Streuintensität nur die Dichtekorrelation der Probe zurücktransformieren, die räumliche Strukturinformation ist also nicht direkt zugänglich. Durch den Umstand, daß bei typischen Systemen die Partikel über alle Raumrichtungen gemittelt werden, geht zusätzlich die Information über Dichtekorrelation der einzelnen Raumrichtungen verloren. Die Fouriertransformation der Intensität ergibt dann die Paardichteverteilungsfunktion (PDDF[3]), das Histogramm über alle mit dem Volumen und der Elektronendichte gewichteten Längen.

Die obigen Gleichungen behandeln Streuung im allgemeinen. Im folgenden wird der für diese Arbeit wichtige Fall der gelösten Partikel in einen Lösungsmittel behandeln.

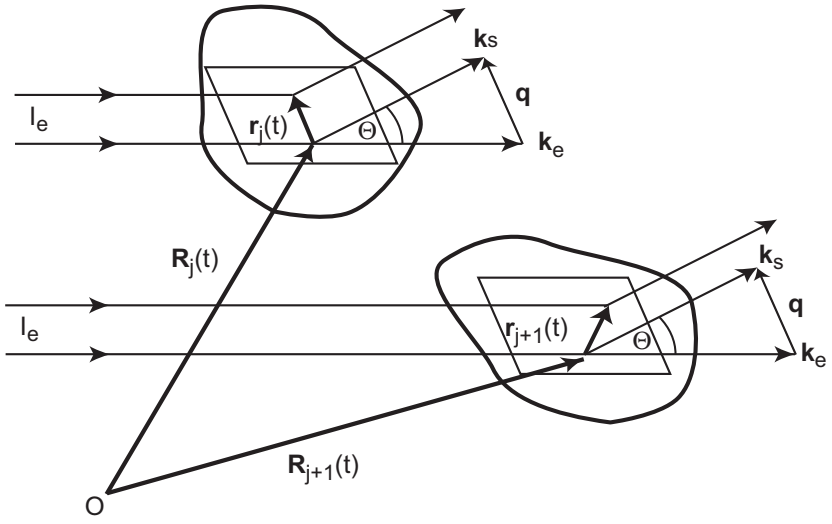


Abbildung 3.2.: Zur Herleitung des Strukturfaktors wird der Ortsvektor in einen Vektor $\boldsymbol{R}_i$ zu den einzelnen Partikeln und einen Vektor $\boldsymbol{r}_i$ innerhalb der jeweiligen Partikeln zerlegt. Es gilt $\boldsymbol{r} = \boldsymbol{R}_i + \boldsymbol{r}_i$

Abbildung 3.2 veranschaulicht diesen Fall anhand zweier getrennter Partikel. Man führt neue Koordinaten ein. Die Vektoren $\boldsymbol{R}_j\,(t)$ sind Ursprungsvektoren zu den einzelnen Masseschwerpunkten der Partikel, $\boldsymbol{r}_j\,(t)$ sind die Vektoren von dem jeweiligen Massemittelpunkt zu den einzelnen Volumenelementen. Die Streuamplitude aus Gleichung 3.5 wird nun zu

$$A\,(q) = \sum_{j=1}^{N} \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{R}_j(t)} \left\{ \int_{V_j} \mathrm{d}^3 r_j\, \rho\,(\boldsymbol{r}_j, t)\, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}_j} \right\} \tag{3.15}$$

Verbindet man nun Gleichung 3.11 und Gleichung 3.15 erhält man:

[3]Pair Density Distribution Function

$$
\begin{aligned}
I(\boldsymbol{q}) &= \left\{ \left(\sum_{j=1}^{N} \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{R}_j} \int\limits_{V_j} \mathrm{d}^3 r_j \, \rho(\boldsymbol{r}_j) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}_j} \right) \left(\sum_{i=1}^{N} \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{R}_i} \int\limits_{V_i} \mathrm{d}^3 r_i \, \rho(\boldsymbol{r}_i) \, \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}_i} \right) \right\} \qquad (3.16) \\
&= N \left(\frac{1}{N} \sum_{j=1}^{N} \sum_{i=1}^{N} \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}(\boldsymbol{R}_i - \boldsymbol{R}_j)} \int\limits_{V_j} \int\limits_{V_i} \mathrm{d}^3 r_j \, \mathrm{d}^3 r_i \, \rho(\boldsymbol{r}_j) \, \rho(\boldsymbol{r}_i) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}(\boldsymbol{r}_j - \boldsymbol{r}_i)} \right)
\end{aligned}
$$

3.3. Formfaktor

Zuerst betrachtet man monodisperse verdünnte Lösungen. In diesem Fall besteht wegen dem großen Abstand unter den Partikeln keine Wechselwirkung. Der Detektor mißt das zeitliche Mittel der Streuintensität und da es sich im allgemeinen auch immer um ergodische Systeme handelt, kann man das Scharmittel mit dem Zeitmittel gleich setzten. So wird aus Gleichung 3.11 und Gleichung 3.16

$$
\begin{aligned}
\langle I(\boldsymbol{q}) \rangle &= \langle A(\boldsymbol{q}) \, A^*(\boldsymbol{q}) \rangle = \\
&= \sum_{j=1}^{N} \left\langle \left| \int\limits_{V_j} \mathrm{d}^3 r \rho(\boldsymbol{r}) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}} \right|^2 \right\rangle \\
&\quad + \sum_{i \neq}^{N} \sum_{j=1}^{N} \left\langle \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{R}_j} \int\limits_{V_j} \mathrm{d}^3 r_j \, \rho(\boldsymbol{r}_j) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}_j} \right\rangle \left\langle \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{R}_i} \int\limits_{V_i} \mathrm{d}^3 r_i \, \rho(\boldsymbol{r}_i) \, \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}_i} \right\rangle \qquad (3.17) \\
&= N \left\langle \left| \int\limits_{V_j} \mathrm{d}^3 r \rho(\boldsymbol{r}) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}} \right|^2 \right\rangle \\
&= N F(q)^2 = N P(q)
\end{aligned}
$$

Die Doppelsumme in der Gleichung ergibt Null, da wechselwirkungsfreie Partikel im statistischen Mittel gleichmäßig über die Probe verteilt sind. Die Exponentialfunktion ist deswegen gleichmäßig um Null verteilt und ihr Mittel ergibt auch Null.

$F(q)$ bzw. $P(q)$ wird Formfaktor des Partikels genannt, wobei $P = F^2$ gilt. Er ist die normierte Streuamplitude eines einzelnen Partikels und damit die Fouriertransformierte der Streulängendichte.

$$
F(q) = \frac{\int\limits_{V} \mathrm{d}^3 r \rho(\boldsymbol{r}) \, \mathrm{e}^{-\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}}}{\int\limits_{V} \mathrm{d}^3 r \rho(\boldsymbol{r})} \qquad (3.18)
$$

Der Formfaktor beinhaltet damit prinzipiell die komplette Struktur der Streukörper. Er ist normiert, so daß $F(q \to 0) = 1$ und $F(q \to \infty) = 0$ gilt.

In dieser Arbeit werden Formfaktoren für sphärische und zylindrische Strukturen verwendet, deswegen werden diese hier im Besonderen erörtert.

3.3.1. Formfaktor Sphärischer Objekte

Der hier hergeleitete Formfaktor beschreibt die Streuung an homogenen sphärischen Partikeln. Aus Gleichung 3.18 erhält man durch den Übergang in sphärische Koordinaten ($dV = r^2 \,\mathrm{d}\varphi \,\mathrm{d}\vartheta \cos\vartheta$ und $\boldsymbol{q} \cdot \boldsymbol{r} = qr\cos\vartheta$) und Lösen des Integrales den Formfaktor für sphärische Strukturen. Dieser lautet für Kugeln mit Radius R und unter der Annahme einer homogenen Streulängendichte:

$$F_{\mathrm{Kugel}}(q) = \frac{3\sin(qR) - qR\cos(qr)}{(qR)^3} \tag{3.19}$$

Der Formfaktor für mehrschalige sphärische Strukturen ergibt sich direkt aus der Linearität der Fouriertransformation und kann durch einfache Addition der jeweiligen homogenen Formfaktoren gewonnen werden. Dabei muß auf die korrekte Streulängendifferenz geachtet werden:

$$F = \frac{1}{M}\left(\Sigma_{i=1}^{N-1}(\rho_i - \rho_{i+1})\,V(R_i)\,F_i(q,R_i) + (\rho_N - \rho_0)\,V(R_N)\,F_N(q,R_N)\right) \tag{3.20}$$

$$M = \Sigma_{i=1}^{N-1}(\rho_i - \rho_{i+1})\,V(R_i) + (\rho_N - \rho_0)\,V(R_N) \tag{3.21}$$

Hierbei ist die Nummerierung von innen nach außen zu vollziehen, $\rho_1 V(R_1) F_1(q,R_1)$ bezieht sich also auf den Kern, ρ_0 ist die Streulängendichte des Mediums.

Der Formfaktor läßt sich für kleine Impulsüberträge entwickeln. Aus Gleichung 3.19 wird damit

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3}q^2 R_G^2 \tag{3.22}$$

beziehungsweise in der bekannteren, aber meist ungenaueren Form

$$P(q) = \mathrm{e}^{-q^2 R_G^2/3} \tag{3.23}$$

Dir Größe R_G wird als Gyrationsradius bezeichnet. Er ist das zweite Moment der Streulängendichteverteilung und damit definiert als

$$R_G^2 = \frac{\int dV \Delta\rho r^2}{\int dV \Delta\rho} \tag{3.24}$$

Für homogene sphärische Partikel mit Radius R_0 gilt $R_G = \sqrt{3/5}R_0$.

Bei der Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel ist zu beachten, daß bei inhomogenen Partikeln, im Gegensatz zu homogenen, der Gyrationsradius abhängig von der Elektronendichte des Lösungsmittel ist:

$$R_G^2 = \frac{\int dV\left(\rho\left(\boldsymbol{r}\right)-\overline{\rho}\right)r^2}{\int dV\left(\rho\left(\boldsymbol{r}\right)-\overline{\rho}\right)} = \frac{\int dV\rho\left(\boldsymbol{r}\right)r^2-\overline{\rho}V^{5/3}}{\int dV\rho\left(\boldsymbol{r}\right)-\overline{\rho}V} \tag{3.25}$$

3.3.2. Formfaktor Zylindrischer und Polymerartiger Objekte

Zur Entwicklung des zylindrischen Formfaktors zerlegt man den Ortsvektor $\boldsymbol{r}$ in einem Teil parallel zu Zylinderachse $\boldsymbol{r}_{\parallel}$ und einem Teil rechtwinklig zur Zylinderachse $\boldsymbol{r}_{\perp}$ und betrachtet das System in Zylinderkoordinaten $\left(\varphi,\ r_{\parallel},\ z\right)$. Der Winkel zwischen $\boldsymbol{q}$ und der Zylinderachse sei α. Damit gilt $\boldsymbol{q}\cdot\boldsymbol{r} = r_{\parallel}cos\left(\alpha\right)+r_{\perp}cos\left(\varphi\right)sin\left(\alpha\right)$ und Gleichung 3.18 geht über in:

$$F\left(q,\vartheta\right) = \frac{1}{V}\int\limits_{-L/2}^{L/2} dr_{\parallel}\int\limits_{0}^{R} dr_{\perp}r_{\perp}\int\limits_{0}^{2\pi} d\varphi\rho\left(r_{\perp}\right)\mathrm{e}^{-\mathrm{i}qr_{\parallel}\cos(\alpha)+\mathrm{i}qr_{\perp}\cos(\alpha)\sin(\alpha)} \tag{3.26}$$

Durch Integration wird daraus [9]:

$$F\left(q,\alpha\right) = \frac{\sin\left(q\cos\left(\alpha\right)L/2\right)}{q\cos\left(\alpha\right)L/2}2\pi\int\limits_{0}^{R} dr_{\perp}r_{\perp}\rho\left(r_{\perp}\right)J_0\left(qr_{\perp}\sin\left(\alpha\right)\right) \tag{3.27}$$

Hier ist J_0 die Besselfunktion 0-ter Ordnung.

An Gleichung 3.27 erkennt man , daß sich der Formfaktoren zylindrischer Strukturen in zwei Teile aufspaltet. Der erste Term

$$F_{\parallel}\left(q,\alpha\right) = \frac{\sin\left(q\cos\left(\alpha\right)L/2\right)}{q\cos\left(\alpha\right)L/2} \tag{3.28}$$

beinhaltet nur den Beitrag des Zylinders in Längsrichtung und entspricht dem Formfaktor eines infinitesimal dünnen Zylinder.

Der zweite Term

$$2\pi\int\limits_{0}^{R} dr_{\perp}r_{\perp}\rho\left(r_{\perp}\right)J_0\left(qr_{\perp}\sin\left(\alpha\right)\right) \tag{3.29}$$

stellt den durch den Querschnitt verursachten Formfaktor dar.

In Lösung liegen Stäbchen in willkürlicher Anordnung vor. Mittelung über alle Richtungen für den Term 3.28 ergibt unter der Annahme $q \gg 2\pi/L$:

$$\left\langle F_{\parallel}\left(q,\alpha\right)^2\right\rangle = \int d\alpha\frac{\sin\left(q\cos\left(\alpha\right)L/2\right)}{q\cos\left(\alpha\right)L/2} = \frac{\pi}{Lq} \tag{3.30}$$

Für den Formfaktor des Querschnitts erkennt man aus dem Parametern der Besselfunktion $J_=$ in Gleichung 3.27, daß in diesem Fall nur Zylinder, deren Längsachse weitgehend senkrecht zu $\boldsymbol{q}$ stehen (also für $\alpha = 90°$) einen nennenswerten Beitrag zur Streuamplitude leisten. Auch für geringe Abweichungen von dieser Position ändert sich der Querschnitt bezüglich $\boldsymbol{q}$ nur unwesentlich. Es gilt also näherungsweise für den Formfaktor des Querschnitts [14]:

$$F_\perp(q) = 2\pi \int_0^\infty dr_\perp r_\perp \rho(r_\perp) J_0(qr_\perp) \tag{3.31}$$

Die gesamte Streuintensität einer Lösung aus nicht interagierenden Zylindern ist damit

$$I = \frac{\pi}{Lq} F_\perp(q)^2 \tag{3.32}$$

Entwickelt man diese Gleichung 3.32 für kleine q wird daraus

$$I(q) = I = \pi \frac{L}{q} e^{-q^2 R_C^2/2} \tag{3.33}$$

Hier ist R_C der Gyrationsradius des Querschnitts. Für einfache homogene Zylinder mit dem Radius R_0 gilt $R_C = \frac{R_0}{\sqrt{2}}$.

Für Polymere bleiben die obigen Aussagen prinzipiell bestehen [51, 63]. Die Herleitung des Formfaktors $F_\parallel$ muß für die jeweiligen Polymermodelle geändert werden. Die Entkoppelung der Terme für den Querschnitt und für die Längsrichtung bleibt aber weiterhin bestehen, da dieser ursprünglich aus der Zerlegung des Ortsvektors $\boldsymbol{r}$ resultiert. Darüber hinaus zeigt DNA das Verhalten eines semiflexiblen Polymers. Dieses kann unterhalb der Persistenzlänge immer als steifer Zylinder angenähert werden.

3.4. Strukturfaktor

Im weiteren betrachtet man die Verallgemeinerung auf konzentrierte monodisperse Systeme. Gleichung 3.17 ist damit nicht mehr gültig, da nun auch die Korrelationen zwischen den Partikeln in die Streuamplitude eingehen. Verbindet man Gleichung 3.16 und 3.18 und bildet das Mittel erhält man für sphärische identische Partikel:

$$\begin{aligned} \langle I(\boldsymbol{q}) \rangle &= NP(q) \frac{1}{N} \sum_{j\neq}^{N} \sum_{i=1}^{N} \left\langle \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}(\boldsymbol{R}_i - \boldsymbol{R}_j)} \right\rangle = \\ &= NP(q) S(q) \end{aligned} \tag{3.34}$$

Der Term $S(q)$ wird (statischer) Strukturfaktor genannt und beschreibt die Korrelation der Partikel untereinander. Er ist:

$$S(q) = 1 + \frac{1}{N} \sum_{j=1}^{N} \sum_{i=1}^{N} \left\langle \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}(\boldsymbol{R}_i - \boldsymbol{R}_j)} \right\rangle \tag{3.35}$$

Der Term "1+" entsteht durch die unterschiedlichen Indizierung in Gleichung 3.34 und Gleichung 3.35.

Im kontinuierlichen Limes gilt die Beziehung

$$S(q) = 1 + \frac{N-1}{V} \int_V \mathrm{d}^3 r \; (\mathrm{g}(\boldsymbol{r}) - 1) \, \mathrm{e}^{\mathrm{i}\boldsymbol{q}\boldsymbol{r}} \tag{3.36}$$

Hier ist $g(r)$ die Paarkorrelationsfunktion der Partikel (analog Gleichung 3.13).

Gleichung 3.34 zeigt den für die Kleinwinkelstreuung wichtigen Punkt, daß für monodisperse Systeme der Form- und der Strukturfaktor entkoppelt sind. Es existieren auch Näherungslösungen für die Entkoppelung schwach polydisperse Systeme, diese werden in Kapitel 3.4.3 gesondert behandelt.

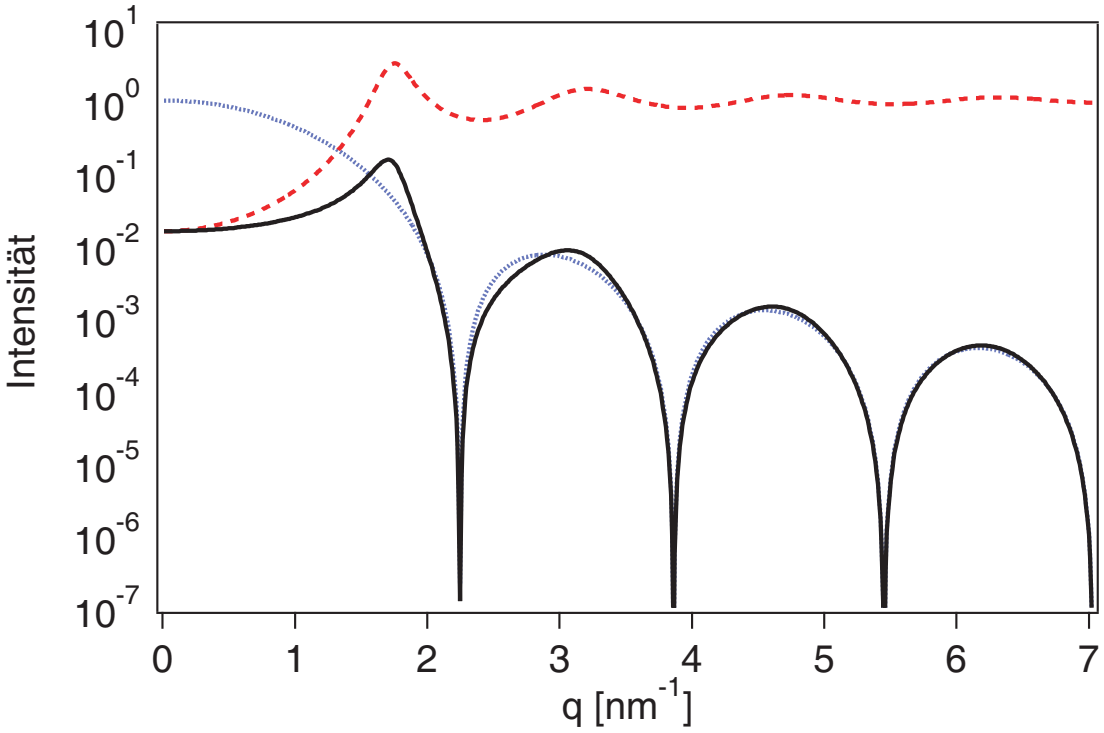


Abbildung 3.3.: Die Streuamplitude ist für monodisperse Systeme die Multiplikation des Form- und Strukturfaktors. Die blaue durchgezogene Linie zeigt den Formfaktor einer homogenen Kugel mit Radius 2nm und die rot gestrichelte Linie den Hard Sphere Strukturfaktor einer Lösung mit 50 % Volumenanteil Die schwarze durchgezogene Linie gibt die gesamte Streuintensität an.

Für verdünnte Lösungen kann angenommen werden, daß es keine Korrelationen zwischen den Partikeln gibt, deswegen geht das Integral in Gleichung 3.36 zu Null über, und es gilt für den Strukturfaktor $S = 1$. Er hat deswegen keinen Einfluß auf die Streuintensität. Für konzentrierte Lösungen ist dies nicht mehr der Fall und er muß in die Berechnung mit einbezogen werden. Im Gegensatz zur Herleitung des Formfaktors für Kugeln und Zylinder würde die Herleitung der zugehörigen Strukturfaktoren den Umfang dieser Arbeit sprengen, deswegen wird diese hier nur kurz skizziert.

3.4.1. Hard-Sphere Strukturfaktor

Aufgrund der unpolaren Natur des Lösungsmittels werden für die Herleitung des Strukturfaktors nur die Volumenausschlußkräfte berücksichtigt (Hard Sphere Structure Factor), langreichweitige elektrostatische Kräfte werden durch das Lösungsmittel abgeschirmt. Das Potential kann durch folgende Form angenähert werden:

$$u(r) = \begin{cases} +\infty & r < R \\ 0 & r \geq R \end{cases} \tag{3.37}$$

Da zur Berechnung der zugehörigen Korrelationsfunktion auch Vielteilchenkorrelationen berücksichtigt werden müssen, wird von der Ornstein Zernike Theorie ausgegangen [45]. Die Herleitung erfolgt anhand Veröffentlichungen von Klein und Kinning [25, 27].

Die totale Korrelationsfunktion $h(r_{ab}) = g(r_{ab}) - 1$ wird in zwei Teile zerlegt. Die direkte Korrelation zwischen zwei Teilchen $c(r_{ab})$ und einen iterativen Term, der die Wechselwirkung über weitere Teilchen beschreibt. Insgesamt ergibt sich die Ornstein-Zernike Integralgleichung:

$$h(r_{ab}) = c(r_{ab}) + n \int \mathrm{d}r_c^3 \, c(r_{ac}) \, h(r_{bc}) \tag{3.38}$$

Hier ist n die Teilchendichte. Damit reduziert sich die sich die Herleitung des Strukturfaktors auf die Bestimmung der direkten Korrelation $c(r)$.

Die Fouriertransformation der obigen Gleichung 3.38 ergibt

$$\tilde{h}(q) = \frac{\tilde{c}(q)}{1 - n\tilde{c}(q)} \tag{3.39}$$

Durch Kombination dieser Gleichung 3.39 mit der Gleichung für den Strukturfaktor 3.36 ergibt sich folgende Beziehung:

$$S(q) = \frac{1}{1 - n\tilde{c}(q)} \tag{3.40}$$

Zur weiteren Berechnung werden Abgeschlossenheitsrelation oder *Closure Relation* benötigt, welche $c(r)$, $h(r)$ sowie den noch nicht berücksichtigen Wechselwirkungspotential zwischen zwei Teilchen $u(r)$ verbinden.

Besonders geeignet, für die Berechnung kurzreichweitiger Korrelationen wie Volumenausschlußkräfte, ist die Percus-Yevick Relation [52]

$$g(r) = e^{-\beta u(r)} (1 + h(r) - c(r)) \tag{3.41}$$

Diese kann für die Hard Sphere Wechselwirkung aus Gleichung 3.37 eindeutig gelöst werden und ergibt [80, 85]

$$c(r) = -\left(\alpha + \beta\frac{r}{2R} + \gamma\left(\frac{r}{2R}\right)^3\right) \tag{3.42}$$

wobei α, β, und γ vom Volumenbruchteil abhängige Parameter sind.
Damit folgt mit Gleichung 3.40 für den Hard Sphere Strukturfaktor:

$$S(q) = \frac{1}{1 + 24\eta G(2R_{\mathrm{HS}}q)/(2R_{\mathrm{HS}}q)} \tag{3.43}$$

Hier ist

$$G(A) = \frac{\alpha}{A^2}(sinA - AcosA) + \frac{\beta}{A^3}\left(2AsinA + \left(2 - A^2\right)cosA - 2\right) + \tag{3.44}$$

$$+ \frac{\gamma}{A^5}\left(-A^4 cosA + 4\left(\left(3A^2 - 6\right)cosA + \left(A^3 - 6A\right)sinA + 6\right)\right) \tag{3.45}$$

mit $A = 2qR$, $\alpha = \frac{(1+2\eta)^2}{(1-\eta)^4}$, $\beta = \frac{-6\eta(1+\eta/2)^2}{(1-\eta)^4}$, $\gamma = \frac{\eta\alpha}{2}$
η gibt den Volumenbruchteil an.

3.4.2. Strukturfaktor bei Polymeren und Zylinder

Für Partikel mit einer großen Anisotropie wie Zylinder und Polymere ist die Entkoppelung von Form und Strukturfaktor aus Gleichung 3.34 nicht mehr gültig. Zur Berechnung der Interaktion zwischen den Streukörpern muß auch die jeweilige Orientierung zueinander beachtet werden. Diese kann beispielsweise durch die Random Phase Approximation [71] geschehen, bei der die jeweilige Wechselwirkung über eine Mean-Field Näherung berechnet wird. Der Strukturfaktor für Zylinder ist damit [48]:

$$I(q) = n\rho^2 \frac{P(q)}{1 + \nu P(q)} \tag{3.46}$$

Hier ist n, die Teilchendichte, ν ein zur Konzentration proportionaler Parameter und $P(q)$ der Formfaktor eines Zylinders. Gleichung 3.46 ist nur gültig für Zylinder und dort besonders für hohe Konzentrationen.

Eine weitaus bessere Behandlung der Teilchen-Teilchen Wechselwirkung bietet das Polymer Reference Interaction Site Model PRISM [64]. Dieses besteht aus einer Verallgemeinerung dem aus der Ornstein-Zernike Theorie abgeleiteten molekularen Flüssigkeitstheorie RISM [6].

Bei diesem Modell betrachtet man nicht nur eine allgemeine Korrelation zwischen den Partikeln, sondern detailliert eine Korrelation zwischen verschiedenen Stellen auf den einzeln Partikeln und der Korrelation verschiedener Stellen auf dem selben Partikel.

Zu diesem Zweck wird die Paarkorrelation als Matrix dargestellt:

$$g_{\alpha\gamma}(\boldsymbol{r}) = \frac{1}{n^2} \sum_{i \neq j} \delta\left(\boldsymbol{r}_i^{\alpha}\right) \delta\left(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}_j^{\gamma}\right) \tag{3.47}$$

Die totale Korrelation h ist ebenfalls eine Matrix und wird definiert wie in Kapitel 3.4.1 $h_{\alpha\beta}(\boldsymbol{r}) = g_{\alpha\beta}(\boldsymbol{r}) - 1$. Die Verallgemeinerung der Ornstein Zernike ist dann:

$$h_{\alpha\beta}(r)\, n_{\beta} = c_{\alpha\beta}(r)\, n_{\alpha\beta} + \sum_{\gamma} \int \mathrm{d}r'^3\, c_{\alpha\gamma}(\boldsymbol{r'})\, n_{\gamma} h_{\gamma\beta}(|\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r'}|)\, n_{\beta} \tag{3.48}$$

beziehungsweise im Fourierraum

$$\tilde{h}(q) = \tilde{c}(q) + \tilde{c}(q)\, n \tilde{h}(q) \tag{3.49}$$

Hier ist n eine Matrix mit den Diagonalelementen $n_{\alpha\beta} = \delta_{\alpha\beta} n_{\alpha}$

Die totale Korrelationsfunktion wird nun in zwei Beiträgen aufgespaltet, welche die Korrelation zwischen zwei Teilchen beziehungsweise innerhalb eines Teilchens beschreiben. Nach einigen Umformungen ergibt sich dann die RISM Gleichung

$$\tilde{h}(q) = \tilde{\omega}(q)\, \tilde{C}(q)\, \tilde{\omega}(q) + n_m \tilde{\omega}(q)\, \tilde{C}(q)\, \tilde{h}(q)$$

Die Funktionen $h(q)$ und $C(q)$ beschreiben die Wechselwirkung zwischen verschiedenen Teilchen, währen $\omega(q)$ die Korrelation innerhalb desselben Teilchens beschreibt und gleich dem Formfaktor $P(q)$ ist.

Die grundlegende Vereinfachung des PRISM Modells ist die besonders für lange Polymere gerechtfertigte Vernachlässigung der durch die Enden der Polymere verursachten Effekte. Man geht also davon aus, daß die konkreten Wechselwirkungen unabhängig von der Position auf dem Polymer ist, die Korrelationsfunktion wird damit unabhängig von α und β und es gilt:

$$g(r) = g_{\alpha\beta}(r) \tag{3.50}$$
$$C(r) = C_{\alpha\beta}(r) \tag{3.51}$$
$$h(r) = h_{\alpha\beta}(r) \tag{3.52}$$

Damit erhält man die grundlegende Gleichung der PRISM Theorie

$$\tilde{h}(q) = \tilde{\omega}^2(q)\, \tilde{C}(q) + n \tilde{\omega}(q)\, \tilde{c}(q)\, \tilde{h}(q) \tag{3.53}$$

Mit der Fouriertransformierte der Gesamtstreuintensität

$$I(q) = \tilde{\omega}(q) - n\tilde{h}(q) \tag{3.54}$$

erhält man so

$$I(q) = \frac{P(q)}{1 - nC(q)P(q)} \tag{3.55}$$

Damit ist die Streuintensität auch bei konzentrierten Systemen nur noch abhängig von der Konzentration n, dem Formfaktor $P(q)$ und der direkten Korrelationsfunktion $C(q)$. Diese kann bei Volumenausschlußkräften durch die Fouriertransformation des Korrelationslochs [12] um jede Stelle des Zylinders angenähert werden [48]:

$$C(q) = 3\frac{(sin(qD) - qRcos(qD))}{(qD)^3} \tag{3.56}$$

Hier ist D der Durchmesser des Zylinders.

3.4.3. Behandlung der Polydispersität

In dieser Arbeit wird die Polydispersität der Partikel durch eine Schulz-Zimm Verteilung beschrieben. Sie ist das übliche Modell für die Längenpolydispersität von Polymeren [62, 90] sowie der Größenpolydispersität von Vesikel und Mizellen [88]:

$$D(x) = \frac{w+1}{x_0}\frac{x^w}{\Gamma(w+1)}exp\left(-(w+1)\frac{x}{x_0}\right) \tag{3.57}$$

Hier ist x_0 die durchschnittliche Größe und Γ die Gammafunktion, die Varianz der Verteilung ist $z = \frac{x_0^2}{w+1}$. Sie ist eine asymetrische Verteilung, die zu größeren Partikeln hin verbreitert ist. Für kleine Polydispersitäten geht sie in eine Gaußverteilung über beziehungsweise im Grenzfall zu einer Diracschen Deltadistribution und damit zum monodispersen Fall.

Die Streuintensität verdünnter Lösungen, für die man $S = 1$ voraussetzten kann, berechnet sich nach:

$$I(q) = \int_0^\infty \mathrm{d}r D(r) V(r)^2 P(q,r) \tag{3.58}$$

Für polydisperse Systeme ist Gleichung 3.34 nicht mehr ohne weiteres gültig, da diese identische Partikel voraussetzten. Um Gleichung 3.16 nicht explizit lösen zu müssen, verwendet man unterschiedliche Näherungen.

In dieser Arbeit wurde die besonders für hohe Polydispersitäten und Konzentrationen geeignete *Local Monodisperse Approximation* verwendet [48], bei der davon ausgegangen wird, daß Partikel immer von Partikeln der gleichen Größe umgeben sind. Die Streuintensität ist dann

$$I(q) = \int_0^\infty \mathrm{d}r D(r) V(r)^2 P(q,r) S(q,r) \tag{3.59}$$

Daneben gibt es noch weitere Näherungsmethoden. Die Entkoppelungsnäherung [30] nimmt einen von der Größe unabhängige Wechselwirkung an, die Skalierungsnäherung [11] einen Wechselwirkung, die bis auf eine Konstante größenunabhängig ist.

4. Aufbau der Kleinwinkelinstrumente

4.1. Aufbau der Laboreigenen Kleinwinkelanlage

Abbildung 4.1.: Fotografie der Röntgenkleinwinkelapparatur

Die Kleinwinkelanlage wurde besonders für die Streuung an typischen Systemen der weichen kondensierten Materie konzipiert. Hier ist besonders der geringen Kontrast zwischen Probe und Umgebung von Bedeutung, der besondere Anforderung an Quelle und Detektor stellt. Aus diesem Grund wurde ein Aufbau mit möglichst hohem Fluß bei annehmbarer Auflösung entwickelt, wobei auch eine hohe Flexibilität und ein geringer Wartungsaufwand von Bedeutung sind.

Eine Bild der kompletten Anlage ist in Abbildung 4.1 dargestellt, der skizzierte Aufbau in Abbildung 4.2. Die Röntgenstrahlung wird in einer Röntgenanode erzeugt und mit Göbelspiegel fokussiert. Der Strahl wird durch drei Lochblenden definiert und durch die Probe geleitet. Der nicht gestreute Anteil des direkten Strahls wird durch den Beamstop ausgeblendet, das Streusignal mittels eines Bildplattendetektors aufgenommen. Im folgenden werden die einzelnen Komponenten gesondert behandelt.

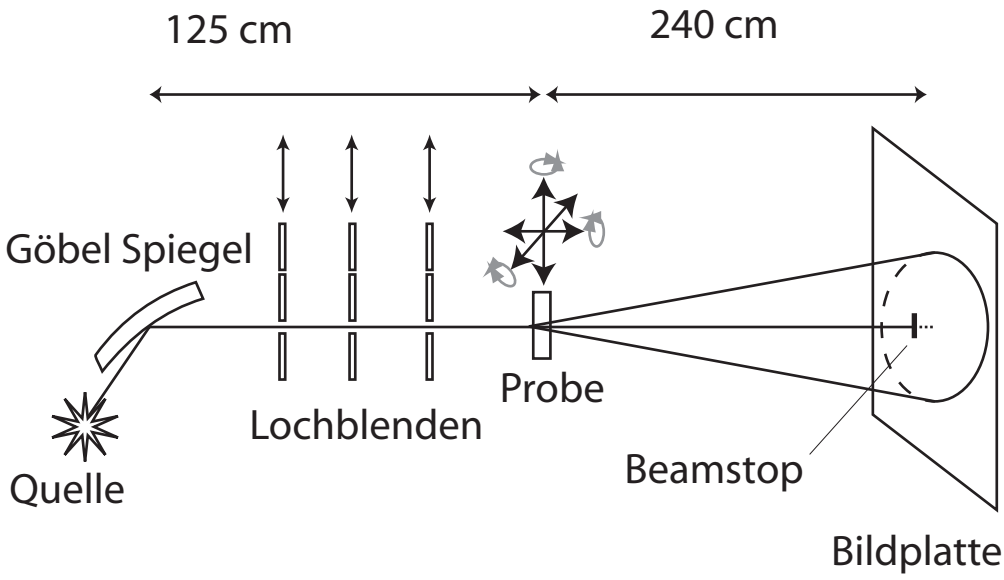


Abbildung 4.2.: Schema der Röntgenkleinwinkelapparatur

4.1.1. Quelle

Die Röntgenquelle ist eine Osmic Molymax Stehanode, basierend auf der Bede Micro-Source Molybdän Anode und der Confocal Max-Flux Optik von Osmic. Die Molymax arbeitet standardmäßig bei einer Leistung von 30 W bei 50 kV und 0,6 mA. Der erzeugte Fluß beträgt 10^7ph/s (siehe Abschnitt 5.2.2), dies entspricht ca. 80 % einer rotierenden 5 kW Anode. Die Energieauflösung $\frac{\Delta E}{E}$ ist nach Herstellerangaben 5 %.

Die Röntgenstrahlung wird durch den Beschuß der Anode mit hochenergetischen Elektronen erzeugt. Durch diese werden aus der innersten Schale des Anodenmaterials Elektronen herausgeschlagen. Die aufgrund der nachrückenden Elektronen freigesetzten Photonen ergeben die für die Messung verwendete diskrete K_α-Röntgenlinie. Darüber hinaus wird durch die im Anodenmaterial abgebremsten Elektronen kontinuierliche Röntgenbremsstrahlung erzeugt, die aber nur als unerwünschter Untergrund Bedeutung hat. Bei Molybdän liegt die K_α-Linie bei 17,5 keV, dies entspricht einer Wellenlänge von 0,71 Å. Die Größe des Brennflecks auf der Anode beträgt 20 µm.

Bei dieser Wellenlänge weisen biologisch relevante Materialien eine hohe Abschwächlänge auf, diese beträgt zum Beispiel bei Wasser 10 mm. Die Probendicke kann man in derselben Dicke wählen, um den Effekt des schwachen Kontrastes zwischen Probe und Umgebung wieder auszugleichen (siehe Anhang A.1). Dies ist der wesentliche Grund für die Wahl von Molybdän bei dieser Anlage. Ein weiterer Vorteil dieser Wellenlänge ist, daß sie nahe dem optimalen Wert für das beste Signal zu Rausch-Verhältnis aus der kohärenten Rayleighstreuung und der inkohärenten Comptonstreuung sowie dem Photoelektrischen Effekt bei Kohlenstoff bei 22 keV liegt [56]. Da der Anteil der Comptonstreuung bei kleinen Winkeln

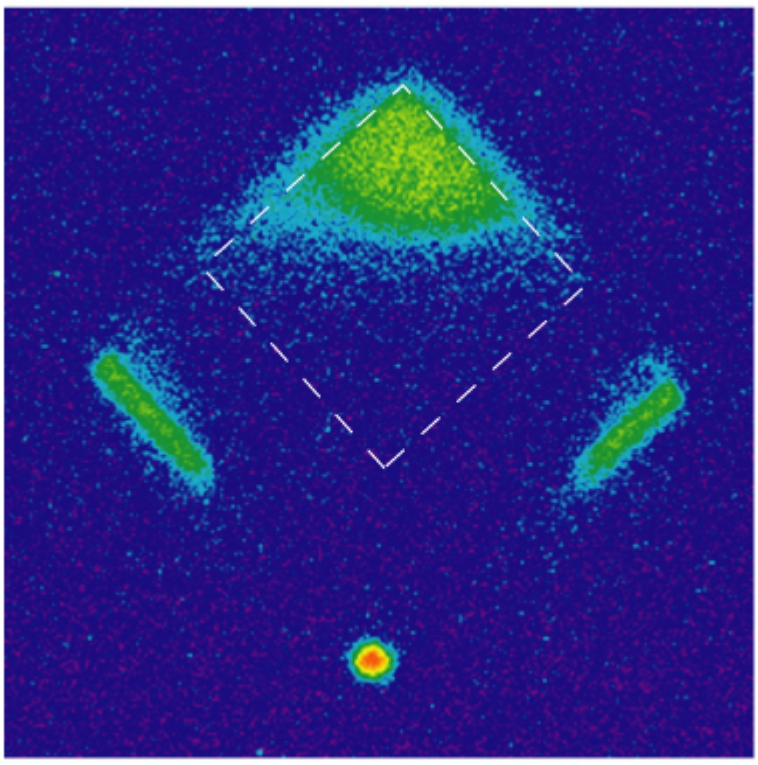


Abbildung 4.3.: Darstellung das aus der Quelle austretende Strahlprofil. Der ursprünglich ungespiegelte Bereich wird in der Abbildung durch eine gestrichelte Linie begrenzt. Die einfach reflektierten Bereich sind die beiden Linien links und rechts unten. Der zweifach gespiegelte direkte Strahl, mit dem letztendlich gemessen wird, ist unten in der Mitte zu erkennen.

vernachlässigbar ist, verschiebt sich das Optimum zu kleineren Werten, und die 17,5 keV sind noch besser geeignet.

Der direkte Strahl wird mit einem Göbelspiegel fokussiert und monochromatisiert. Dieser besteht aus gekrümmten Multilayern mit großen Elektronendichtedifferenzen und arbeitet nach dem Prinzip der Braggreflexion. Durch passende Wahl von Material, Krümmung, Anzahl der Schichten und den jeweiligen Schichtdicken, deckt die Bandbreite genau die K_α-Linie ab, während die K_β-Linie nahezu vollständig unterdrückt wird. Durch die Krümmung wird der Strahl fokussiert und erhöht so den Fluß auf die Probe.

Die Molymax verwendet die Confocal Max-Flux Optik von Osmic. Dabei handelt es sich um zwei, in rechtwinkliger Anordnung verbundener Göbel Spiegel im selben Abstand zur Quelle, durch die der Primärstrahl zweifach reflektiert wird und so den gewünschten Strahl erzeugt. Abbildung 4.3 zeigt das aus der Anlage austretende Strahlprofil. Der polychromatische Primärstrahl ist aufgrund einer Blende ursprünglich quadratisch. Die einfach

Tabelle 4.1.: Maße und Präzision der verwendeten Platin/Iridium Lochblenden

Scheibendurchmesser	+0/-0,02 mm	
Dicke:	+0/-0,02 mm	
Lochgröße:	±5 µm	≤300 µm
	±10 µm	>300 µm
Rundheit des Loches:	1,0 µm	≤200 µm
	2,0 µm	>200 µm
Zentrizität:	±0,02 mm	

reflektierten Strahlen sind als Striche zu erkennen, während der zweifach reflektierte direkte Strahl punktförmig erscheint. Durch diese spezielle Wahl der Anordnung kann die Optik nahe an der Anode plaziert werden, damit einen großen Raumwinkelbereich der entstehenden Röntgenstrahlung eingefangen, und so den hohen Fluß bei niedriger Leistung erzeugen. Darüber hinaus ermöglicht diese Anordnung eine einfache Justierung. Die Spiegel besitzen sechs Freiheitsgrade von denen für die meisten Justagen nur zwei benötigt werden.

4.1.2. Lochblenden

Die Strahlgröße wird durch drei Lochblenden eingestellt, die so Fluß und Auflösung der Anlage beeinflussen. Blende 1 und 2 schränken den Strahl ein und erzeugen den gewünschten Fluß und Divergenz. Blende 3 räumt den Strahl auf, um unerwünschte Streustrahlen der ersten beiden Blenden und dem Vakuumfenster zu entfernen. Die Blenden befinden sich an den Positionen 57 cm, 91 cm und 124 cm ab Quelle. Bei Blenden 1 ist eine Wahl zwischen den Durchmessern 100, 700, 1000 und 1200 µm möglich, bei Blende 2 zwischen 300, 600, 700 und 1000 µm. Blende 3, die sich in der Probenkammer befindet, ist mit 100, 300, 750 und 1000 µm Lochblenden ausgestattet. Die für Messungen unter hohem Fluß üblicherweise verwendeten Blenden sind 700, 600 und 1000 µm (von Blende 1 nach 3). Die jeweilige Auswahl wird mittels Schrittmotoren vorgenommen. Die hochpräzisen Blenden (siehe Tabelle 4.1) wurden von der Firma Plano GmbH in Wetzlar bezogen, bestehen aus einer Platin-Iridium Legierung und werden normalerweise benutzt, um den Elektronenstrahl eines Elektronenmikroskops zu definieren. Die Abschwächlänge der verwendeten Legierung ist 4,6 µm. Dies ergibt bei der verwendeten Blendendicke eine Transmission von $4 \cdot 10^{-10}$.

4.1.3. Probenumgebung

Die Probe befindet sich unmittelbar hinter der letzten Blende 3. Sie wird in Glaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld) mit 2 mm Durchmesser und 10 µm Wanddicke gefüllt und diese vakuumdicht versiegelt. In dem Probenhalter aus Aluminium ist eine Mulde eingelassen, durch welche die Kapillare vertikal eindeutig in die Höhe des Strahls positioniert werden kann, horizontal ist sie frei verschiebbar. Der gesamte Probentisch ist um alle sechs

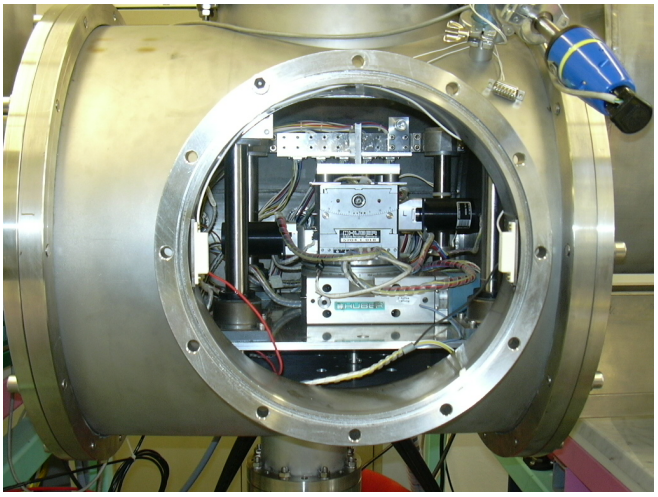


Abbildung 4.4.: Fotografie des Probenkontainers mit Probenhalter und motorisierten Verstelltisch

Freiheitsgrade durch Schrittmotoren verstellbar. Um Luftstreuung zu vermeiden, kann die gesamte Probenumgebung evakuiert werden.

4.1.4. Beamstop

Die Intensität des ungestreuten Strahls ist mehrere Größenordnungen höher als die der gestreuten Strahlung. Um Überbelichtung und Strahlschädigung des Detektors zu vermeiden, wird der direkte Strahl mit einem Beamstop[1] abgeblockt. Dieser besteht aus einer 1,5 mm dicken Stahlschicht die auf einen 4,8 mm dicken Aluminiumträger aufgeklebt ist. Der 2 mm dicke Befestigungsstab besteht ebenfalls aus Aluminium und ist wegen der geringen Dicke und der hohen Abschwächlänge in Messungen nur schwach zu erkennen. Diese Konstruktion wurde gewählt, um die gewünschte Absorption mit der nötigen Stabilität uns Flexibilität zu vereinigen. Der direkte Strahl kann sowohl für Meßzeiten von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden durch den Beamstop hindurch gesehen werden, ohne das Bild bei sehr langen Meßzeiten überzubelichten. Der Beamstop läßt sich durch Verbiegen und Verschieben des Befestigungsstabs grob- und durch zwei Mikrometerschrauben manuell feinjustieren.

Eine Transmissionsmessung mit einer Bildplatte ergab eine scheinbare Transmission des Beamstops von $5,6 \cdot 10^{-4}$. Da die verwendete Multilayeroptik wie alle Bragg-Gitter auch Strahlung höherer Ordnung spiegelt und durch die wellenlängenabhängigen Abschwächlänge kürzere Wellenlängen weniger absorbiert werden als längere, werden nach dem Beamstop hauptsächlich noch diese Anteile gemessen. Für die Bestimmung der Strahlmitte hat dies keine Konsequenz, wie nach Überprüfung an einer Silberbehenatprobe festgestellt wurde. Allerdings wird ein elliptisches Strahlprofil gemessen, welches vom symmetrischen direk-

[1] engl. für Strahlblocker, der deutsche Begriff ist unüblich

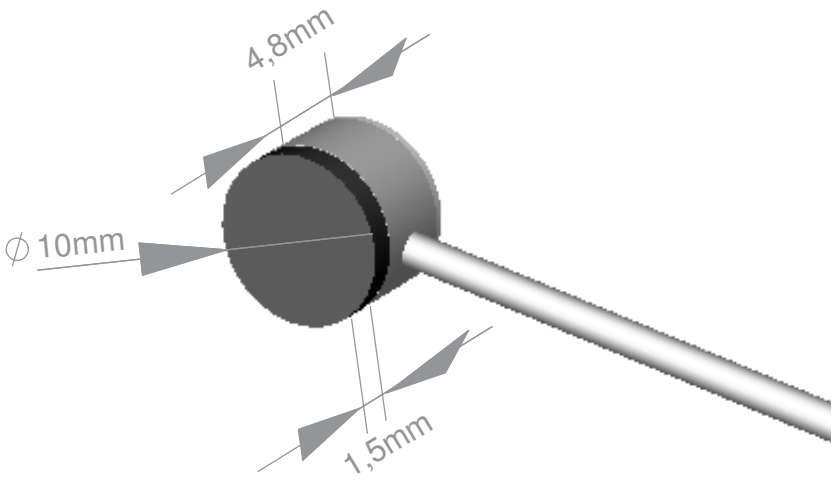


Abbildung 4.5.: Aufbau des Beamstop mit Stahlabsorber und Aluminiumhalter

ten Strahl abweicht. Im weiteren verhindert dieser Anteil der höheren Harmonischen auch generell eine Messung der Probentransmission anhand des direkten Strahls.

4.1.5. Detektoren

Es werden drei Detektoren verwendet. Die Einstellung der Göbelspiegel wird mit einer zweidimensionalen CCD Kamera vorgenommen. Diese ist speziell dafür ausgelegt, den direkten Strahl abzubilden. Zur Kalibrierung der Probe und der Blenden, sowie zur allgemeinen Flußmessung wir ein Szintillationszähler verwendet. Röntgenstreuexperimente werden mit Bildplatten durchgeführt.

CCD Kamera

Eine CCD-Kamera[2] ist ein zweidimensionaler Halbleiterdetektor, der aus einzelnen Metall-Oxid-Kondensatoren aufgebaut ist. Durch Bestrahlung mit Photonen werden im Halbleiter Ladungen erzeugt, die zunächst am Ort ihrer Entstehung akkumuliert werden. Zum Auslesen werden die Ladungen durch das Anlegen einer periodischen Spannung zum Rand der Halbleiterfläche geschoben, und dort sukzessive detektiert.

Die hier verwendete CCD-Kamera besitzt eine Empfindlichkeit im Röntgenbereich und ist dafür konstruiert, den direkten Strahl zu detektieren, für die Messung von Streustrahlung ist sie nicht ausreichend empfindlich. Das Signal wird direkt an den TV-Eingang eines Monitors geleitet und kann mit diesem betrachtet werden.

[2]Charge-coupled Device

Szintillationszähler

Ein Szintillationszähler besteht aus einer Szintillationsschicht mit nachgeschaltetem Photomultiplier. Er ist in der Lage, sowohl Fluß als auch Energie der ankommenden Photonen zu bestimmen und dabei auch nach einzelnen Photonen aufzulösen. In der Szintillationsschicht erzeugen ankommende Röntgenquanten Elektronen-Loch Paare, die wieder kombinieren und dabei sichtbares Licht abgeben. Dieses Licht setzt in einer Photokathode Elektronen frei, die dann über einen Sekundärelektronenvervielfacher in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Der Verstärkungsfaktor ist dabei abhängig von der Höhe der anliegenden Hochspannung. Die Impulshöhe des erzeugten Signals ist proportional zu der Energie der ankommenden Röntgenquanten. In diesem Aufbau werden mit einem Diskriminator Impulse einer bestimmten Höhe ausgefiltert, so daß nur die Röntgenstrahlung der passenden Wellenlänge detektiert wird. Dabei muß beachtet werden, daß das Beobachtungsfenster nicht zu groß gewählt wird, damit weder der Untergrund noch die Wellenlängen höherer Ordnung mit gemessen werden.

Bildplatte

Eine Bildplatte[3] ist ein zweidimensionaler akkumulierender Photodetektor, der auf photostimulierter Lumineszenz (PSL) basiert. Die hier verwendete Bildplatte BAS-MS 2040 (Fujifilm bzw. Raytest, Berlin) besteht aus einem flexiblen Kunststoffträger, auf dem ein 150 µm dicker Phosphor und eine etwa 10 µm dicke Schutzschicht aufgetragen ist. Der Kunststoffträger ist magnetisch und erlaubt die einfache Fixierung der Platte in der Meßanordnung. Der Phosphor besteht aus einer Polymerschicht, in die etwa 5 µm große $BaFBr:Eu^{2+}$ Kristalle eingebettet sind. Die Phosphoreszenzschicht kann durch Röntgenstrahlung angeregt werden und diese Anregung über längere Zeiträume speichern. Vor einer Aufnahme muß die Platte vor bereits vorhandenen Anregungen gelöscht werden. Nachdem die Platte belichtet wurde, wird sie in einem Scanner ausgelesen. Die hier verwendeten Bildplatten haben eine Größe von 20×40 cm und sind für Röntgenstrahlung besonders sensitiv. Der verwendete Scanner BAS 2500 (Raytest, Berlin) besitzt nach Herstellerangabe eine maximale Auflösung von 50 µm und einem linearen dynamischen Bereich von 10^6. Dieses System zeichnet sich gegenüber anderen Detektoren in der selben Preisklasse durch eine weit größere Detektionsfläche und größerer Sensitivität bei ähnlicher Auflösung aus. Außerdem ist es möglich, denselben Scanner für andere Anwendungen (andere Röntgenquellen sowie radioaktiv markierte Gele) anzuwenden.

Die physikalischen Vorgänge, auf welche die Bildplatte basiert, sind nicht vollständig geklärt, über die grundlegenden Prinzipien besteht allerdings Einigkeit. Eine Übersicht gibt es dazu in den Artikeln von Seggern [68] und Takahashi [76], eine Charakterisierung der physikalischen Detektionseigenschaften und Artefakte in den Artikeln von Ne [42] und Hall [15].

Der erste Schritt ist die Bildung von Farbzentren durch die auftreffende Röntgenstrahlung. Unter einem Farbzentrum versteht man eine Leerstelle im Kristallgitter, welche ein

[3] auch üblich: image plate (en.)

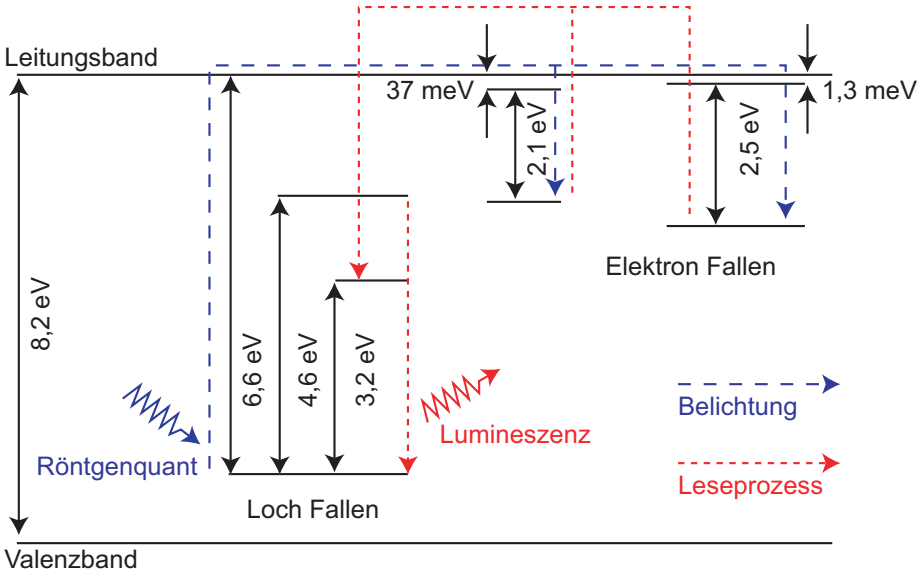


Abbildung 4.6.: Bänderschema der Photostimulierten Lumineszenz. Die F^-(Br) und $F^-(F)$ können durch eine Stimulierung von 2,1 bzw. 2,5 eV in die Nähe des Leitungsbandes gehoben werden. Nach der Rekombination mit den gefangenen Löchern wird ein Photon mit einer Energie von 3,2 eV freigesetzt. Dieses wird anschließend gemessen.

gebundenes Elektron (F^-) oder Loch (F^+) beinhaltet. Für die Bildung der Farbzentren wurden zwei Alternativen vorgeschlagen. Eine besagt, daß schon vor der Bestrahlung ein positives Farbzentrum mit gebundenem Loch besteht. Die Energie des Röntgenquantes setzt ein Elektron frei, welches in diesem Farbzentrum gespeichert wird. Die andere Möglichkeit ist, daß durch die Energie des Röntgenquantes ein Halogenidatom auf einen Nebengitterplatz geschoben wird. Ein zurückbleibendes Elektron bildet in der entstehenden Lücke dann das Farbzentrum. In BaFBr:Eu^{2+} werden die Farbzentren von Fluor- als auch von Brom-Fehlstellen erzeugt. Das in beiden Alternativen gebildete Loch wird von dem so genannten Aktivator, den Eu^{2+} Ion eingefangen.

Der nächste Schritt ist das Auslesen im Scanner. Die Farbzentren besitzen eine Anregungsenergie von 2,1 eV (590 nm) und 2,5 eV (500 nm) und können von einem He-Ne Laser angeregt werden. Dadurch kommen die Elektronen in die Nähe des Leitungsbandes, von dem sie dann nur noch durch eine Lücke von etwa 35 meV getrennt sind. Von hier aus fallen sie unter Ausstrahlung von IR-Strahlung entweder zurück in das Grundniveau des Farbzentrums, oder sie können mit dem an die Aktivatoren gebundenen Löcher rekombinieren. Dazu müssen sie entweder thermisch in das Leitungsband gehoben werden, um von dort zum Aktivator zu gelangen, oder sie können bei hinreichender Nähe direkt hintunneln. Welche der beiden Mechanismen oder ob beide gleichzeitig auftreten, ist noch nicht geklärt. Das Elektron rekombiniert direkt oder indirekt mit dem an das Eu^{2+} gebundene Loch und sendet Strahlung aus, die gleich der Anregungsenergie des Eu^{2+} Ions von 3,2 eV

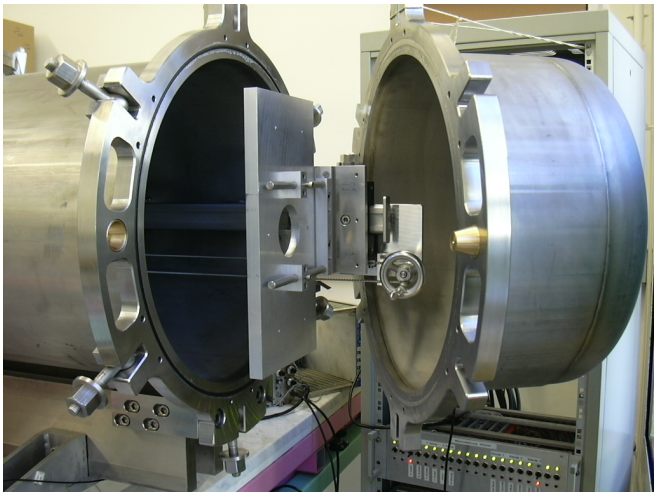


Abbildung 4.7.: Fotografie der Luke am Strahlrohrende mit Bildplattenhalter.

bzw. 390 nm ist. Diese Strahlung wir mit einem Photomultiplier detektiert und mit einem Computer in die zweidimensionale Bildinformation umgerechnet.

Anschließend werden im Löschprozeß durch eine Belichtung mit hoher Intensität noch bestehende Farbzentren angeregt, so daß auch diese mit Löchern rekombinieren können und die Bildplatte für die nächste Messung vorbereitet ist.

Die Bildplatte wird zur Messung magnetisch in einem Halter fixiert (siehe Bild 4.7). Dieser kann am hinteren Ende des Strahlrohrs beladen werden. Durch ein Schienen-Band System wird sie manuell auf die jeweilige Meßposition gefahren. Der Abstand zur Probe wird mit einer Silberbehenat-Kalibrierprobe (The Gem Dugout, State Collage, USA) bestimmt, die Bragg-Reflex bei $(1{,}076 \pm 0{,}004)\,\mathrm{nm}^{-1}$ und dessen Vielfache erzeugt [3, 19].

4.1.6. Vakuum

Um Luftstreuung zu verhindern, wird der gesamte Strahlverlauf unter Vakuum gesetzt. Der evakuierte Bereich wird durch ein Fenster aus Kaptonfolie in zwei Bereiche unterteilt. Das kleinere Kompartiment, welches die Quelle und die ersten zwei Blenden enthält, wird ständig von einer Membranpumpe auf 0,6 mPa gehalten. Diese Pumpe erzeugt ein ölfreies Vakuum, welches zur längeren Lebensdauer der Göbelspiegel beiträgt. Das von der Folie gestreute Signal wird von Blende 3 entfernt.

Das größere Kompartiment beinhaltet die Probenumgebung und das Strahlrohr bis zum Detektor. Dieser Bereich wird nur für die Messung evakuiert und muß für jeden Bildplattenwechsel belüftet werden. Zur Evakuierung dient eine leistungsstarke Drehschieberpumpe, welche diesen Bereich innerhalb weniger Minuten auf etwa 0,05 mBar evakuieren kann. Die Kammer ist dicht genug, daß man die Pumpe auch für längere Messungen nicht in ununterbrochenem Betrieb halten muß.

4.1.7. Steuerungseinrichtungen

Insgesamt werden in der gesamten Anlage 12 Schrittmotoren verwendet. Für jede Blende zwei (insgesamt sechs), sowie für den Probentisch eine für jeden Freiheitsgrad (insgesamt sechs). Die Motoren werden üblicherweise nur für die Justage benötigt, bzw. wenn eine Änderung der Auflösung gewünscht wird. Die Motorsteuerung wird durch kommerziellen Phytron Controller vorgenommen und über einen PC gesteuert.

Die Quelle wird entweder manuell oder über eine RS232 Schnittstelle über das Programm Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, USA) angesteuert.

4.1.8. Sicherheitseinrichtungen

Durch die Röntgenanlage können folgende Sicherheitsrisiken auftreten, die alle adäquat berücksichtigt werden müssen:

Gefahr durch Strahlung

Die erzeugt Strahlung kann im normalen Betrieb nicht aus dem Strahlrohr entweichen. Sämtliche ohne Werkzeug zu öffnenden Zugänge werden durch einen Sicherheitsschaltkreis überwacht. Bei diesen Zugängen handelt es sich um die Kopplung der Quelle an das Strahlrohr, die Türe zur Probenkammer und die Luke am Ende des Strahlrohres mit dem Zugang zum Bildplattenhalter. Im Falle einer Unterbrechung dieses Kreises, schaltet sich die komplette Anlage unverzüglich ab, für Justagearbeiten kann er über einen Schlüsselschalter überbrückt werden. In diesem Fall ist kein computergesteuerter Betrieb der Röntgenquelle mehr möglich. Um Gefahr für Unbeteiligte zu vermeiden, ist der Platz hinter dem Strahlrohr zusätzlich durch eine Bleiabschirmung gesichert.

Vakuum

Sämtliche Gefäßwände haben eine ausreichende Stärke, um eine mögliche Implosion zu verhindern.

Hochspannung

Die Anlage wird unter 50 kV Hochspannung betrieben, die vollständig abgekapselt ist. Sobald Hochspannung erzeugt wird, wird dies durch eine rote Warnleuchte angezeigt.

Wasser

Der geschlossene Wasserkühlkreislauf beinhaltet insgesamt etwa 5 l. Ein Leck kann aufgrund der geringen Menge keinen nennenswerten Schaden anrichten, ebenso kann durch die Plazierung der Schläuche die Hochspannungsquelle nicht beschädigt werden.

4.1.9. Ausblick

Die Anlage wurde konzipiert, um flexibel für etwaige Erweiterungen zu sein. Abhängig von zukünftigen Anwendungen bieten sich verschiedene Änderungen an:

Die wohl interessanteste Möglichkeit besteht darin, sie für Streuung unter streifenden Einfall (GISAXS[4]) analog der REFSANS Anlage [23, 24] am FRM-II in München zu modifizieren. Der Probentisch und der Bildplattendetektor sind bereits dafür ausgelegt. Im Wesentlichen wird noch einen modifizierten Beamstop, ein Lineardetektor für die nötigen Justierungen sowie eine flexiblere Motorsteuerung benötigt.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Installation einer temperierbaren Probenumgebung. Eine interessante Möglichkeit wäre es in diesem Fall, für Temperaturreihen einen zeitauflösenden Detektor zu verwenden. Dieser könnte aus dem oben genannten Lineardetektor bestehen, oder man erweitert die Bildplatte durch eine verschiebbare Blende (z.B. eine rotierende Scheibe mit ausgeschnittenem Sektor). Mit dieser Alternative kann man auch mehrere Proben in einer Reihe ohne Unterbrechung des Vakuums messen.

Der momentane q- Bereich erstreckt sich von 0,2 bis 40 nm^{-1}. Für bestimmte Messungen kann man diesen nach oben bis 125 nm^{-1} und nach unten bis etwa 0,1 nm^{-1} erweitern. Für Messungen unter größeren Winkeln muß der Detektor noch näher an der Probe befestigt werden. Dazu muß ein neuer Halter gebaut werden. Messungen unter kleinerem q können bereits durchgeführt werden, indem man den Beamstop nicht zentriert justiert und ein kleinerer Blendensatz zu Verbesserung der Auflösung verwendet. Um das Auflösungs-Fluß Verhältnis zu verbessern können für diesen Fall auch andere Blendengrößen und -Abstände benötigt werden. Dabei handelt es sich um einen größeren Umbau, der sorgfältig abgewogen werden sollte.

Ansonsten gibt es noch eine Reihe weiteren Verbesserungsmöglichkeiten um den laufenden Betrieb zu vereinfachen. Zum ersten ist die Verwendung des Szintillationszählers als Strahlmonitor unpraktisch, da dieser unhandlich ist und nicht im Vakuum betrieben werden kann. Hier wäre eine einfachere Lösung zum Justieren der Anlage und zur Messung der Transmission durch die Probe wünschenswert. Ebenfalls zur Justierung der Anlage dient die CCD Kamera. Diese wird zur Zeit direkt an einen externen Monitor angeschlossen. Zur quantitativen Auswertung wäre es günstig, sie über einen TV-Eingang an einen Computer zu koppeln.

[4]Grazing Incident Small Angle X-Ray Scattering

4.2. Die Beamline A2 am Hasylab

Die Kleinwinkelexperimente wurden an der Beamline A2 des Hamburger Synchrotronstrahlungslabor (HASYLAB) durchgeführt. Diese Beamline wird am DORIS III Speicherring des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) betrieben. Der prinzipielle Aufbau des A2 Instrument ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

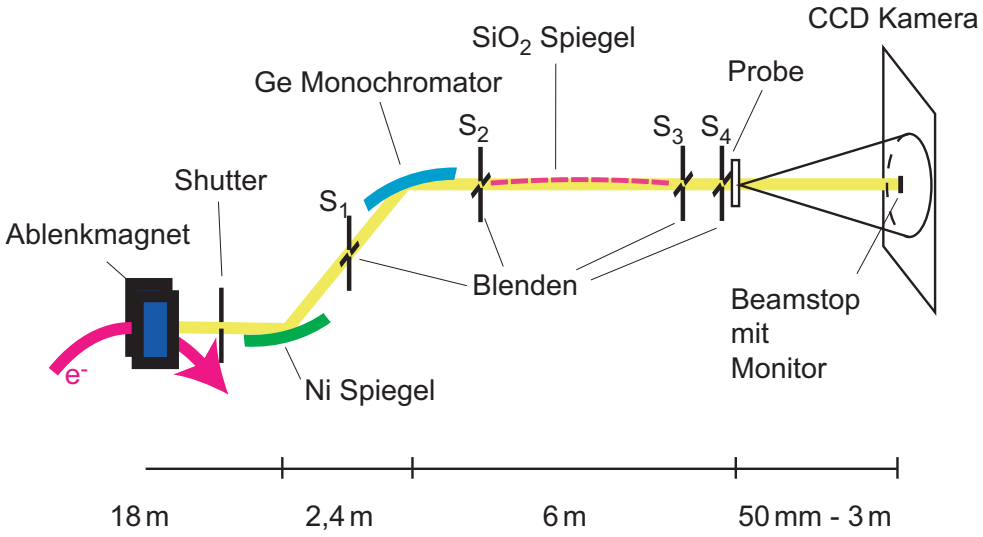


Abbildung 4.8.: Die Beamline A2 am HASYLAB im schematischen Überblick. Das im Ablenkmagneten erzeugte Röntgenlicht wird nach einem Shutter und Nickel Spiegel an einem Germaniumkristall monochromatisiert und dort horizontal fokussiert. Die vertikale Fokussierung wird durch eine Reihe von ebenen Quarzspiegeln vollzogen. Nach der Probe wird die Streustrahlung durch ein Vakuumrohr bis zu einen frei positionierbaren Detektor geleitet.

Synchrotronstrahlung entsteht, wenn hochenergetische Elektronen beschleunigt werden. An der Beamline A2 werden die Elektronen durch einen Magneten von ihrem Weg abgelenkt und erzeugen so weiße Synchrotronstrahlung.

Die Anlage ist speziell für Hochflußmessungen an schwach streuenden Proben der weichen Materie bei einer festen Energie von 8 keV (1,5 Å) konzipiert. Die Energieauflösung beträgt $\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = 10^{-3}$. Das Röntgenlicht aus dem Ablenkmagneten wird nach einem Shutter und Nickel Spiegel an einem Germaniumkristall monochromatisiert und horizontal fokussiert. Die vertikale Fokussierung wird durch eine Reihe von ebenen Quarzspiegeln vollzogen, die gleichzeitig Wellenlängen höherer Ordnung heraus filtern. Üblicherweise wird der Fokus unmittelbar auf den Detektor gerichtet. Die räumliche Auflösung wird hauptsächlich durch die Blenden S2 und S4 sowie dem Detektorabstand zur Probe bestimmt. Je nach gewünschter Auflösung ist dieser Abstand zwischen wenigen Zentimetern bis zu drei Metern frei wählbar. Nach der Probe wird die Streustrahlung durch ein Vakuumrohr bis zum Detektor geleitet. Diese sind frei auf einer optischen Bank wählbar und können je nach

Anforderung an die Messung ausgewählt werden. Als ortsauflösende Detektoren können eine CCD Kamera (MarCCD) oder Bildplatten verwendet werden. Zusätzlich befindet sich im Beamstop ein Monitor zur Messung der transmittierten Strahlung.

4.2.1. Experimentelle Durchführung

Die Messungen an der Beamline A2, Hasylab, wurden unter einer Detektordistanz von 2,4 m durchgeführt. Die Wellenlänge betrug 1,5 Å, und der Beobachtungsbereich erstreckte sich von $0{,}18\,\mathrm{nm}^{-1}$ bis $3\,\mathrm{nm}^{-1}$. Jede Probe wurde für 500 s gemessen. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte keine Veränderung der Streuungscharakteristik festgestellt werden.

4.2.2. Probenbehälter

Zur optimalen Hintergrundkorrektur wurden die Proben in einem Durchflußsystem gemessen. So konnte garantiert werden, daß der Einfluß des Behälters auf die Strahlintensität sowohl bei Messung der Probe als auch bei Messung des Hintergrunds gleich blieb. Der Probenbehälter besteht aus einer Glaskapillare (Hilgenberg, Malsfeld) mit einem Durchmesser von 2 mm und einer Wanddicke von $0{,}01\,\mathrm{mm}$, die in eine Teflonhalterung eingespannt wird. Die Probe bzw. das Lösungsmittel wird über ein Schlauchsystem eingeführt. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Hintergrund und Probe wurden ohne Modifikation des Aufbaus jeweils in derselben Kapillare gemessen. Anschließend wurden die Streudaten anhand der im Beamstop gemessener Intensität transmissionskorrigiert und das Hintergrund- vom Probensignal abgezogen (siehe Anhang A.1).

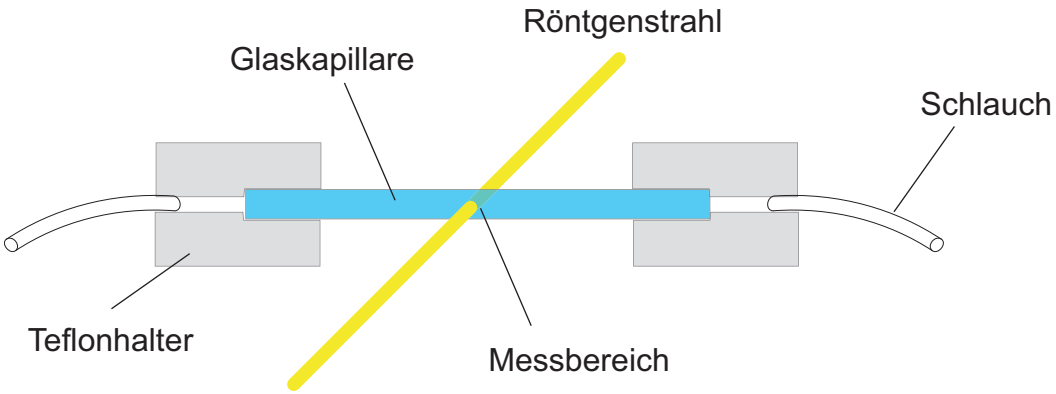


Abbildung 4.9.: Schema des für die Kleinwinkelstreuung verwendeten Probendurchflußsystems.

5. Charakterisierung der Laboreigenen Kleinwinkelanlage

5.1. Untergrund und Signalspeicherung der Bildplatten

Typische Meßzeiten der laboreigenen Kleinwinkelanlage für starke Streuer liegen bei wenigen Minuten, für biologische Materialien mit einer übergeordneten Struktur wie lamellare oder hexagonale Lipidphasen bei 30 Minuten bis wenige Stunden, bei schwachen Streuern wie mizellare System bei einigen Stunden. Will man das Signal-Rausch-Verhältnis durch noch längere Meßzeiten verbessern, kann es notwendig werden, eine Reihe von bildplattenspezifischen Effekten zu berücksichtigen. Dies ist immer der Fall, wenn für Formfaktoranalysen eine sorgfältige Hintergrundkorrektur notwendig wird.

Da die Sensitivität der Bildplatte nicht nur auf den Bereich der Molybdän K_α-Linie konzentriert ist, mißt sie sowohl die relevante Streustrahlung der Probe, als auch eine inkohärente Hintergrundstrahlung aufgrund natürlicher Radioaktivität. Diese setzt sich aus drei Teilen zusammen: Kosmische, terrestrische und innere Strahlung. Üblicherweise liefert Radongas den größten Beitrag zum terrestrischen Anteil. Durch die evakuierte Meßanordnung in der Edelstahlröhre wird der größte Anteil der terrestrischen Strahlung entfernt und der gesamte Untergrund um einen Faktor 1,8 reduziert. Für besonders empfindliche Messungen kann hier eine zusätzliche Abschirmung sinnvoll sein, um den Untergrund weiter zu minimieren. Der innere Anteil wird durch radioaktive Isotope in der Bildplatte selbst erzeugt. Für typische Messungen an biologischen Materialien muß als Hintergrund vom Signal subtrahiert werden. Insbesondere muß darauf geachtet werden, daß die Bildplatte vor der Messung gelöscht wird [40]. Für besonders empfindliche Messungen ist es daher empfehlenswert, durch eine Bleiabschirmung einen Teil der Bildplatte von der kohärenten Strahlung abzuschirmen, um so einen Maßstab für den inkohärenten Hintergrundterm zu erlangen.

Der zweite wichtige Effekt ist die spontane Abregung bereits gebildeter Farbzentren durch die Thermostimulierte Lumineszenz [31], durch die das bereits akkumulierte Signal wieder verloren geht. Dieser Effekte wird in Abbildung 5.2 veranschaulicht. Hier wurde eine Silberbehenat Probe gemessen, die Bildplatte aber erst nach dem Verstreichen einer gewissen Zeitspanne vom Scanner eingelesen. Auf der linken Seite von Abbildung 5.2 sieht man die integrierte Intensität für verschiedene Zeiten (sofort, 40, 550 und 1870 Minuten). Der steigende Untergrund und die vergleichsweise sinkende Intensität der Bragg Reflexe sind deutlich erkennbar. Auf der rechten Seite der Abbildung wurden die jeweiligen Intensitätswerte nach einer Wartezeit I_{Ende} mit dem unmittelbar gemessenen Intensitätswerten

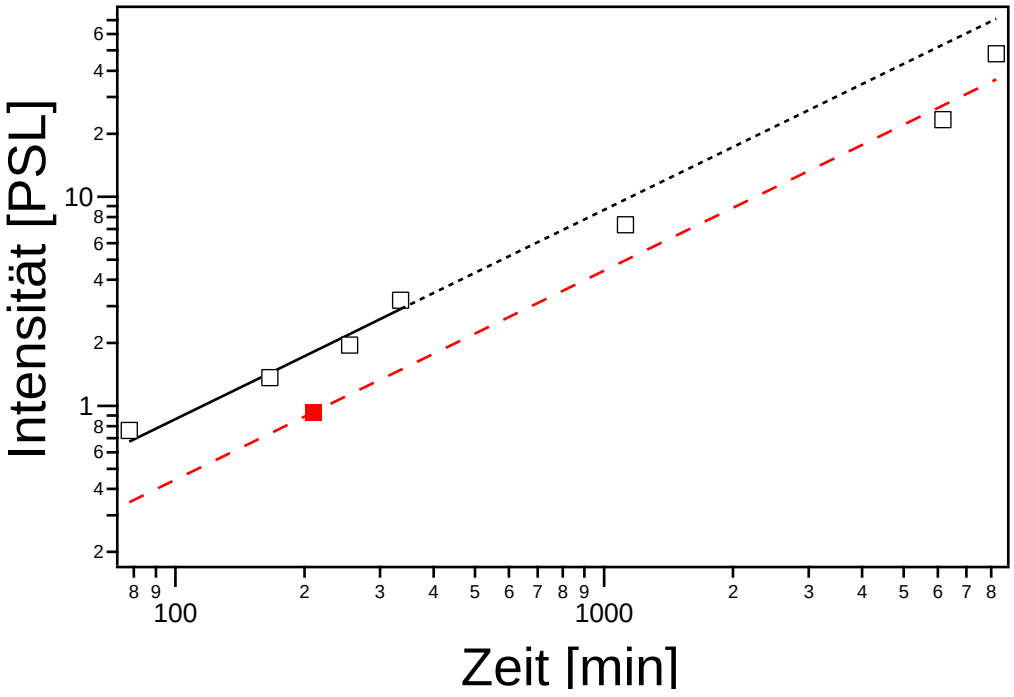


Abbildung 5.1.: Messung der von der Bildplatte detektierten Hintergrundstrahlung. Für die Messung wurde die Platte gelöscht und im Dunkeln für den angegebenen Zeitraum in Luft liegen gelassen (leere Symbole). Anschließend wurde sie eingelesen und die Intensität über die Platte gemittelt. Der Nullwert von 0,2 ist nicht gezeigt. Als Vergleichswerte ist der Untergrund nach einer Wartezeit im Vakuum eingetragen (gefülltes Symbol). Lineare Anpassungen sind als durchgezogenen Linie beziehungsweise deren Extrapolation als gepunktete Linie eingetragen.

I_{Anfang} verglichen. Sind beide Intensitätsverläufe identisch, liegen sie auf der Diagonalen. Ein konstanter Untergrund ergibt einen konstanten Offset, eine gleichmäßige multiplikative Abnahme eine Verkippung. Für alle gemessenen Zeiten liegen die derart transformierten Intensitäten auf Geraden, bis auf einen konstanten und einen multiplikativen Anteil gibt es daher keine meßbaren Artefakte. Insbesondere verhält sich die Bildplatte für niedrige und hohe Signale prinzipiell identisch, eine Krümmung der Kurven ist nicht festzustellen.

Abbildung 5.3 zeigt den zeitlichen Verlauf beider Anteile. Nach Ne et al. [42] wurde dieser Verlauf doppelexponentiell angepaßt. Die Anpassung ergab die Zeitkonstanten 40 und 1125 Minuten. Der schnellere Anteil ist um den Faktor 2,8 höher vertreten. Der Offset steigt zuerst schnell an und flacht dann langsam ab. Die Abflachung kann ebenfalls durch den Abbau des Signals erklärt werden. Die anfängliche Steigung entspricht dem aus Abbildung 5.1 ermittelten Wert.

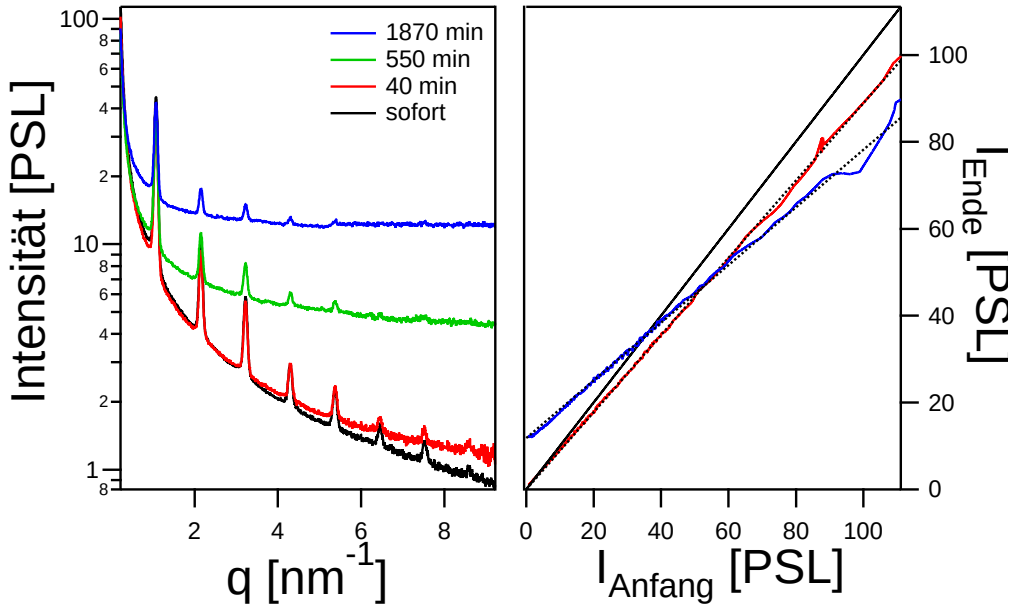


Abbildung 5.2.: Zeitliche Änderung eines auf der Bildplatte gespeicherten Signals einer Silberbehenatprobe. **Links)** Mit zunehmender Wartezeit steigt der Untergrund an und das gespeicherte Signal fällt ab **Rechts)** Gespeicherte Intensität I_{Ende} nach einer Wartezeit in Abhängigkeit von der Startintensität I_{Anfang} für eine Wartezeit von 0 min (schwarz), 40 min (rot) und 1870 min (blau) mit linearen Anpassungen (gepunktet)

5.2. Charakterisierung des Röntgenstrahls

5.2.1. Bestimmung des Polarisierungsfaktor

Der direkte Strahl enthält sowohl horizontal als auch vertikal polarisierte Anteile, die zu einer richtungsabhängigen Streuintensität führen. Sind beide Anteile gleich groß, hat dies keinen Einfluß auf die Intensität für kleine Winkel ($q < 5\,\text{nm}^{-1}$). Ebenso, bei einer ungleichen Verteilung beider Anteile, solange die Streustrahlung über die kompletten 360° aufintegriert wird. Ist dies aufgrund der Dimensionierung oder einer Maskierung nicht möglich, muß diese Anisotropie mit berücksichtigt werden.

Die Bestimmung dieses Einflusses wurde anhand einer Silberbehenat-Pulverprobe vorgenommen. Die einzelnen Kristalle des Pulvers sind isotrop orientiert, so daß Abweichungen von einem radial homogenes Intensitätsprofil nur der Polarisierung zuzuschreiben sind. Zur Bestimmung wurde der Intensitätsverlauf der 2. Ordnung bestimmt. Diese ist in Abbildung 5.4 in Polarkoordinaten dargestellt.

Eine Anpassung mit einer Ellipsengleichung $I = A/\sqrt{1 - e^2 \cos^2(\vartheta - \vartheta_0)}$ zeigt ein Verhältnis zwischen horizontaler und vertikaler Intensität von 1,25. Dies entspricht einem

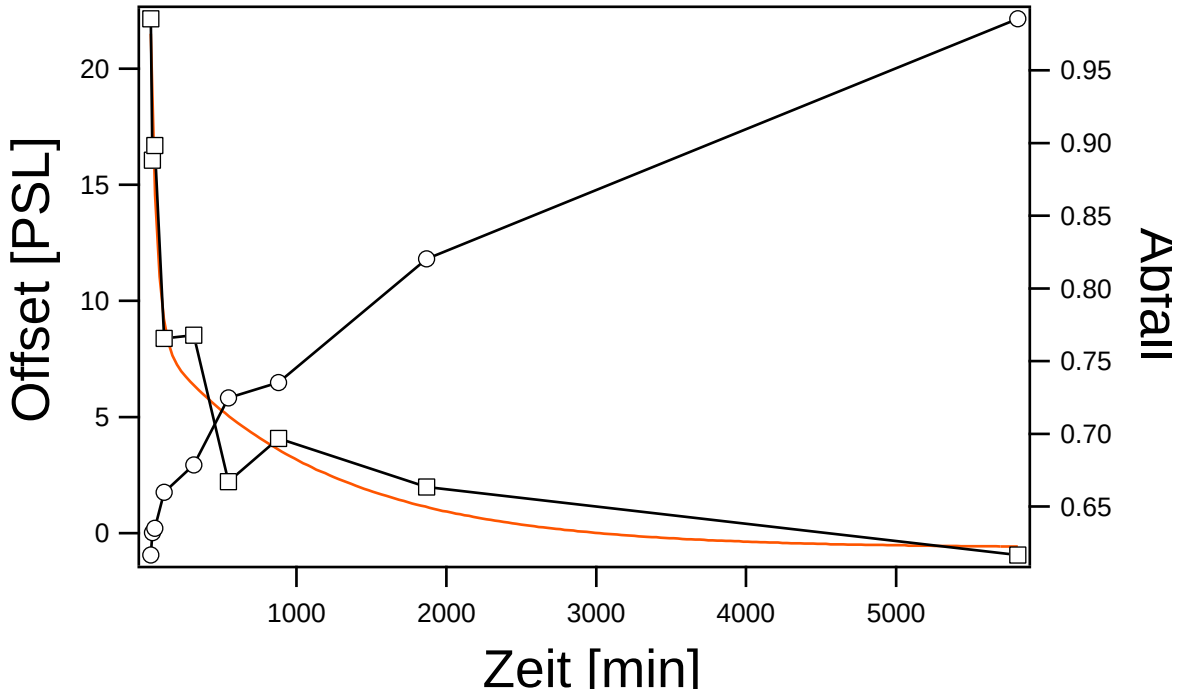


Abbildung 5.3.: Steigender Untergrund (runde Symbole) und fallende gespeicherte Signalstärke (quadratische Symbole) eines gespeicherten Signals. Der Abfall wurde durch eine doppelexponentielle Funktion angepaßt (rote durchgezogene Linie).

Polarisierungsfaktor[1] $(I_H - I_V) / (I_H + I_V)$ von 0,11. Die Ellipse ist um 3±2° leicht in Gegenuhrzeigerrichtung gedreht.

5.2.2. Messung des absoluten Photonenflusses

Ein wichtiges Kennzeichen der Quelle ist die Höhe des erzeugten Flusses Φ in Photonen pro Sekunde. Eine direkte absolute Messung durch Einzelphotonennachweis ist aufgrund der hohen Intensität mit üblichen Detektionssystemen nicht möglich. Aus diesem Grund wird zwischen Quelle und Detektor ein Absorber eingeführt, um den Fluß auf ein meßbares Niveau zu verringern.

Die Messung wurde mit einem Szintillationszähler (siehe 4.1.5) als Detektor und einer Anzahl 0,5 mm dünner Aluminiumbleche als Absorber durchgeführt. Der direkte Strahl enthält Anteile der doppelter Energie bzw. halber Wellenlänge. Da diese im Absorber weniger abgeschwächt werden, nimmt deren Einfluß mit steigender Absorberdicke überproportional zu und kann so das Ergebnis verfälschen. Um dies zu verhindern wird die Detektorelektronik so eingestellt, daß nur Photonen mit passenden Energie akzeptiert werden.

[1] Dies ist die Definition, die auch von Auswertesoftware wie zum Beispiel Fit2D verwendet wird

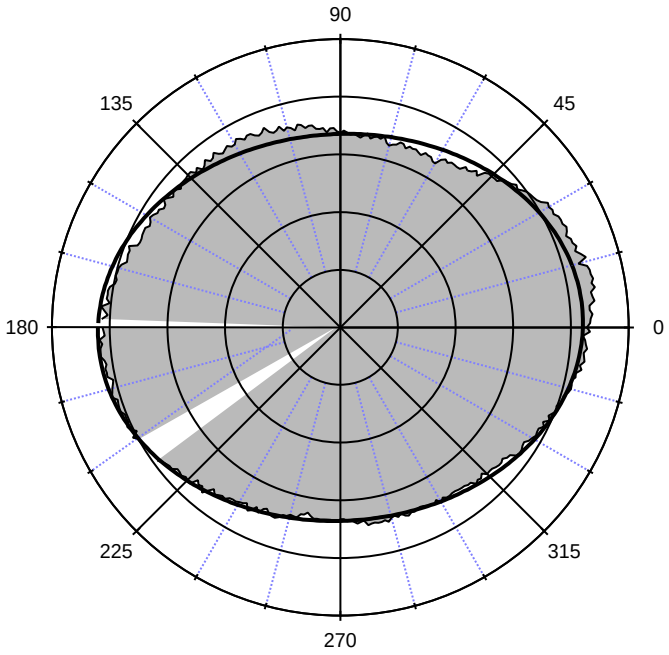


Abbildung 5.4.: Die Intensität der 2. Ordnung einer Silberbehenat-Pulverprobe in Polarkoordinaten. Die Winkelabhängigkeit wird durch die Polarisierung des direkten Strahles erzeugt. Die durchgezogenen Linie ist eine Anpassung durch eine Ellipse. Der weiße Sektor bei 210° entsteht durch die Halterung des Beamstops.

In Abbildung 5.5 ist die gemessene Intensität in Abhängigkeit der Absorberdicke aufgetragen. Zur Bestimmung der Abschwächlänge des Absorbers wurde eine Vergleichsmessung mit dem an der Luft gestreuten Anteil des direkten Strahles durchgeführt. Die so bestimme Abschwächlänge wurde dann als Steigung für die Messung des Flusses des direkten Strahles verwendet. Da aufgrund von Totzeiteffekten für hohe Intensitäten der Detektor ein zu geringes Signal liefert, muß die Intensität ohne Absorber durch Extrapolation ermittelt werden. Dies ergibt einen Fluß von $6{,}7 \cdot 10^6 \frac{\text{Photonen}}{s}$.

5.2.3. Absolute Kalibration des Photonenflusses

Durch eine absolute Kalibration wird die Streuintensität weitgehend unabhängig von Fluß, Strahlung und Probengeometrie gemacht, indem sie auf die einfallende Intensität normiert wird. Diese Kalibration hat verschieden Vorteile: Bestimmte Meßgrößen wie Masse, Fläche oder Konzentration der Streupartikel können nur so bestimmt werden, der Vergleich der Meßkurven die mit verschiedenen Aufbauten gemessen wurde wird möglich und schließlich können bei der Datenauswertung die verwendeten Modelle auf Selbstkonsistenz getestet werden. Um dies zu erreichen ist es notwendig, die Intensität der einfallenden sowie der

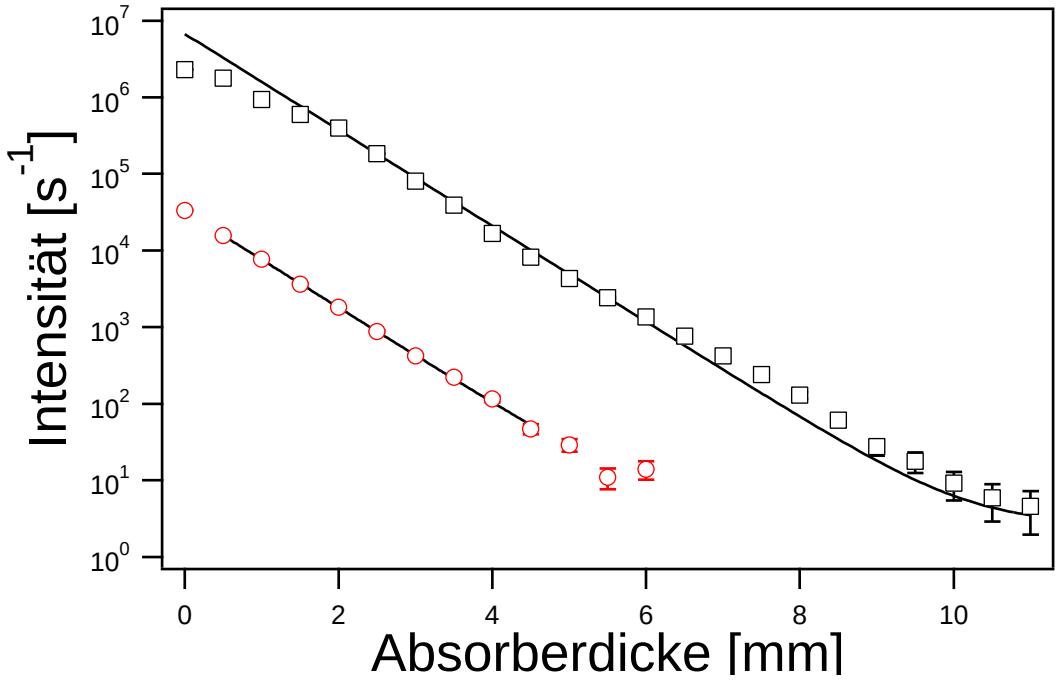


Abbildung 5.5.: Gemessener Fluß abhängig von der Absorberdicke des gestreuten (◯) und des direkten Strahls (□) mit den Anpassungsfunktionen (durchgezogene Linie). Extrapolation für eine Dicke gegen 0 ergibt einen Fluß der Anlage von $6,7 \cdot 10^6$ Photonen/s.

gestreuten Strahlung zu messen. Da dies aufgrund eines Intensitätsunterschiedes von etlichen Größenordnungen oft nicht möglich ist, verwendet man entweder geeichte Detektoren oder man kalibriert einen Detektor mit einem bekannten Standard.

Die absolute Kalibration geht von der Streulänge b der verwendeten Probe aus:

$$b = Z \cdot r_0 \,[\mathrm{cm}] \tag{5.1}$$

mit der Elektronenzahl Z und dem Thomson-Streuquerschnitt $r_e = \frac{e^2 \mu_0}{4\pi m} = 2.818 \cdot 10^{-13}$cm. Die Streulängendichte eines Moleküls wird damit zu

$$\rho = b/V = Z \cdot r_0 \frac{c}{N_A \cdot M_W} \left[\mathrm{cm}^{-2}\right] \tag{5.2}$$

mit dem Molekülvolumen V, der Avogadrokonstante N_A der Konzentration c und dem Molekulargewicht M_W.

Der differentielle Streuquerschnitt $\frac{\mathrm{d}\sigma}{\mathrm{d}\Omega}$ ist das Verhältnis zwischen einfallenden Fluß $\frac{E_e^2}{A \cdot t}$ und gestreuter Streuintensität pro Raumwinkel $\frac{\langle I_s \rangle}{\Delta\Omega \cdot t}$

$$\frac{\mathrm{d}\sigma}{\mathrm{d}\Omega} = \frac{\langle I_s \rangle / \Delta\Omega}{E_e^2 / A} = \frac{I_s R^2}{I_e} \,[\mathrm{cm}^2] \tag{5.3}$$

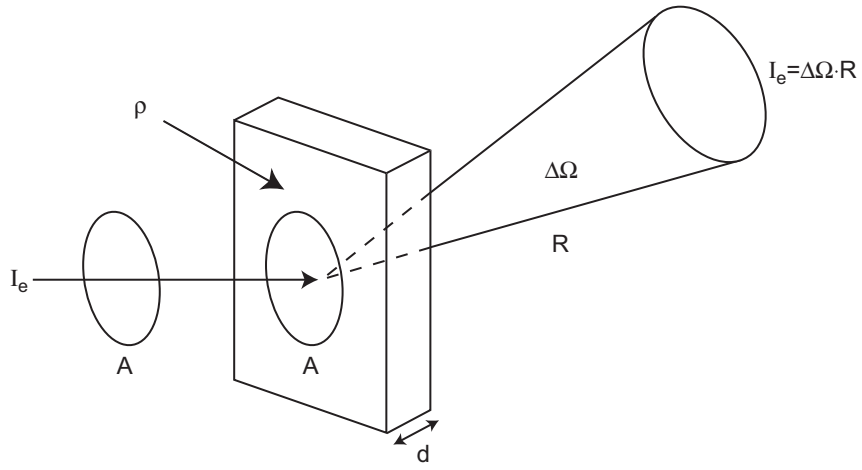


Abbildung 5.6.: Differenzieller Wirkungsquerschnitt bei der Streuung an einer Probe

Hier wurde $\Delta\Omega = \frac{A}{R^2}$ angewandt, wobei R der Abstand zwischen Probe und Detektor ist. Mit Gleichung 3.4 und Gleichung 3.5 ergibt sich

$$\frac{\mathrm{d}\sigma}{\mathrm{d}\Omega} = \langle A(q)\, A^*(q) \rangle \ [\mathrm{cm}^2]$$

bzw. mit Gleichung 3.34

$$\frac{\mathrm{d}\sigma}{\mathrm{d}\Omega} = N \cdot P \cdot S \, [\mathrm{cm}^2] \tag{5.4}$$

Falls Gleichung 5.4 auf das Probenvolumen normiert wird, spricht man von dem Differentiellen Streuquerschnitt pro Probenvolumen

$$\frac{\mathrm{d}\Sigma}{\mathrm{d}\Omega} = \frac{1}{V}\frac{\mathrm{d}\sigma}{\mathrm{d}\Omega} = n \cdot P \cdot S \, [\mathrm{cm}^{-1}] \tag{5.5}$$

In der Literatur wird zwischen beiden Formulierungen nicht immer unterschieden, jedoch ist die Bezeichnung $\frac{\mathrm{d}\Sigma}{\mathrm{d}\Omega}$ und $\frac{\mathrm{d}\sigma}{\mathrm{d}\Omega}$ bzw. zwischen $[\mathrm{cm}^{-1}]$ und $[\mathrm{cm}^2]$ eindeutig.

Im folgenden betrachtet man eine Probe der Dicke d. Es wird eine Fläche A mit dem einfallenden Fluß I_e beleuchtet. Die Strahlung wird an der Probe mit der Teilchendichte ρ zuerst um den Faktor T abgeschwächt, gestreut und unter dem Raumwinkel $\Delta\Omega = A_{\mathrm{Detektor}}/R^2$mit der Effizienz E gemessen. Damit folgt aus Gleichung 5.3 für die am Detektor gemessene Streuintensität I_s:

$$I_S(q) = C_I \cdot C_P \cdot \frac{\mathrm{d}\Sigma}{\mathrm{d}\Omega}(q) \tag{5.6}$$

mit den beiden Proportionalitätskonstante C_I und C_P. Die erste Konstante beschreibt die Abhängigkeit vom experimentellen Aufbau:

$$C_I = I_e \cdot E \cdot \Delta\Omega \cdot A \tag{5.7}$$

Der zweite Konstante ist nur von der Probe abhängig:

$$C_P = d \cdot T \tag{5.8}$$

Durchführung der Absoluten Kalibration Die absolute Kalibrierung kann mit Wasser als Standard durchgeführt werden [46]. Wasser weist aufgrund thermischer Fluktuationen einen vom Impulsübertrag unabhängigen differentiellen Streuquerschnitt auf. Dieser ist nur von der Dichte ρ, der isothermen Kompressibilität χ_T und der Temperatur T abhängig,

$$\frac{\mathrm{d}\Sigma}{\mathrm{d}\Omega} = \rho^2 k_B T \chi_T \tag{5.9}$$

und ist nach einfacher Rechnung $\frac{\mathrm{d}\Sigma}{\mathrm{d}\Omega} = 1,632 \cdot 10^{-2}\,\mathrm{cm}^{-1}$ bei 22 °C.

Dieser Wert ist wichtig, da er eine untere Schwelle für den meßbaren Kontrast von in Wasser gelösten Proben angibt. Ist der Kontrast zwischen der Probe und Wasser in der selben Größe wie die thermische Fluktuation, geht das Streusignal in diesem Untergrund verloren.

Die verwendete Probe bestand aus einer 5 mm dicken Wasserschicht, die sich in einer Kammer mit 200 µm dicken COC[2] Folie (ibidi, München) befand. Die Abschwächlängen der Materialien sind: H_2O 10,1 mm und COC 17,8 mm, dies ergibt eine Transmission bei den oben genannten Schichtdicken von $T_{H_2O} = 61,0\,\%$ und $T_{COC} = 98,9\,\%$. Die Meßwerte wurden auf eine Minute normiert und die Transmission von H_2O und der COC Folie nach Kapitel 5.2.3 berücksichtigt.

Mit diesem Mittel kann man nun die Anlage absolut kalibrieren. Dazu benötigt man eine Probe mit bekanntem differentiellem Streuquerschnitt, außerdem muß der Parameter C_P bekannt sein.

Eine Messung ergab (0,01360 ± 0,00003)PSL/min, PSL bezeichnet hier das vom Scanner ausgegebenen Intensitätssignal. Für diese spezielle Probengeometrie ergibt sich so ein Verhältnis von 1,2 zwischen dem Photolumineszenssignal pro Minute und dem Differenziellen Streuquerschnitt pro Probenvolumen. Damit sind alle Werte bis auf die Effizienz E aus Gleichung 5.6 bekannt. Einsetzen ergibt einen Wert von $E = 725\,\frac{\text{Photonen}}{\text{PSL}}$ für dieses Detektionssystem[3]. Abbildung 5.7 zeigt die Streuintensitäten der Wasserprobe in PSL und in cm^{-1}.

5.3. Bestimmung der Auflösungsfunktion

Kapitel 3.2 beschreibt, wie die Streuamplitude von der Struktur des Streuobjekts abhängig ist. Zusätzlich zu diesen grundlegenden Beziehungen wird die Streuintensität auch durch die

[2] Cyclic Olefin Copolymer

[3] sämtliche Einstellung des Scanners waren hier auf maximal gesetzt.

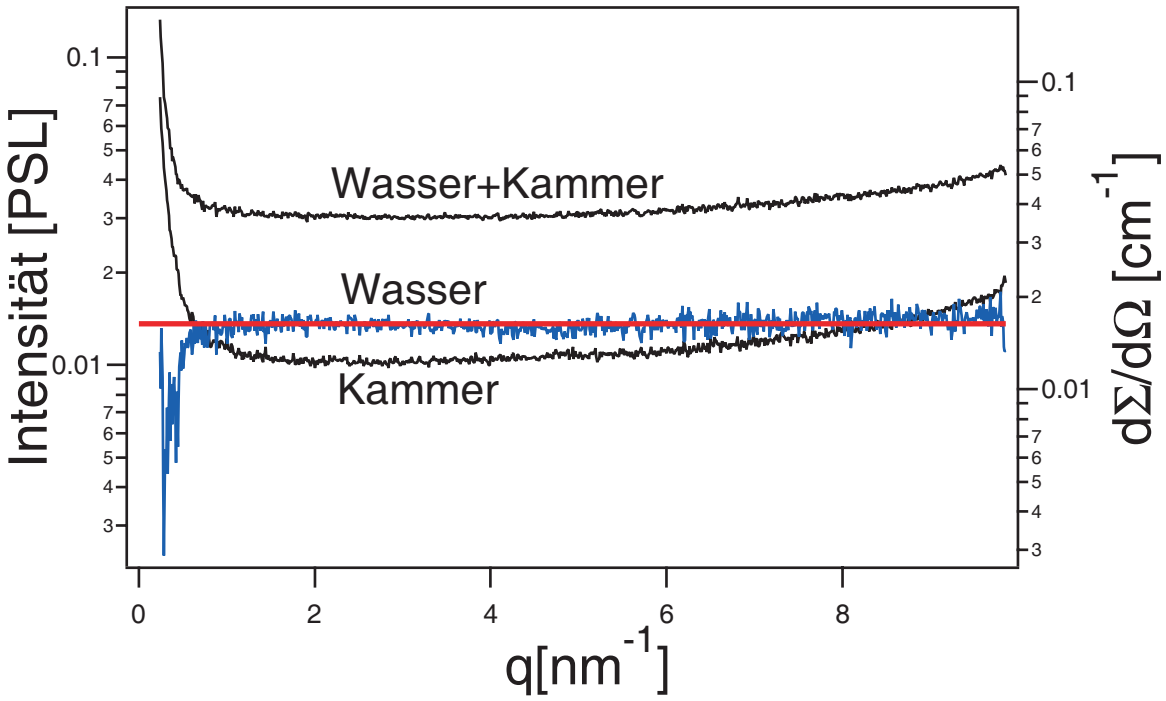


Abbildung 5.7.: Streuintensität einer Wasserprobe. Die Kurven geben die Streukurven für die Probenkammer mit Wasser, der leeren Kammer sowie die daraus ermittelte Streuintensität des Wassers ohne Kammer an. Die linke Ordinate gibt die vom Scanner ausgegebene Intensität an, die rechte Ordinate die absolut kalibrierte Intensität.

Geometrie der Anlage verändert. Die Verschmierung und Auflösung einer Röntgenanlage beschreibt diesen Einfluß, sie wird in diesem Kapitel erläutert und bestimmt.

Abbildung 5.8 zeigt die übliche Strahlgeometrie eines 3-Blenden Systems. Der Strahl wird durch Blende 1 und Blende 2 definiert. Durch Blende 3 wird Streustrahlung, die an den Kante von Blenden 2 entstehen, ausgeblendet. Am Detektor kann man daher drei Bereiche unterscheiden:

- Der Anteil der Strahlung, welche durch alle drei Blenden hindurch von der Quelle zum Detektor gelangen, wird als direkten Strahl bezeichnet.
- An den Kanten von Blende 2 gestreute Strahlung erzeugt den parasitären Strahl. Der direkte Strahl hat in diesem Bereich keinen Einfluß.
- Außerhalb dieser beiden Bereiche wird nur die Streustrahlung der Probe gemessen.

Eine Verschmierung des gemessenen Streusignals erfolgt aus zwei Gründen. Zum einen können um einen Winkel Θ gestreute Wellen, die von zwei unterschiedlichen Punkten der Probe

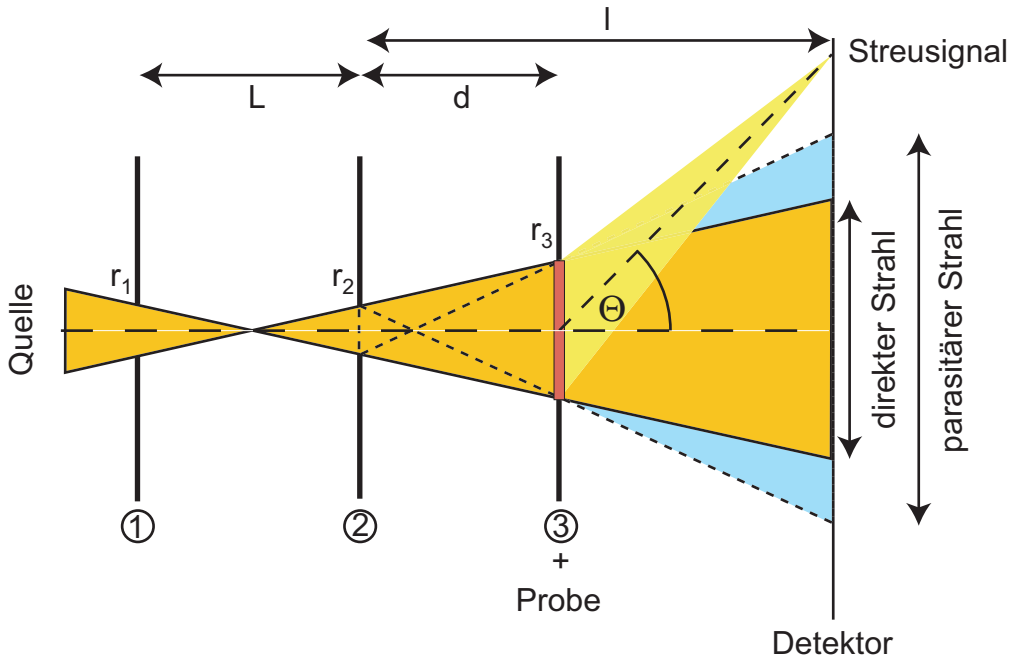


Abbildung 5.8.: Grundlegende Strahlgeometrie bei der Verwendung dreier Lochblenden. Blende 1 und 2 bestimmen Fluß und Divergenz. Blende 3 entfernt an den Kanten von Blende 2 entstehende parasitäre Streustrahlung.

kommen, nicht immer auf demselben Punkt am Detektor zusammenlaufen[4]. Zum anderen werden Strahlen, die unter demselben Winkel gestreut werden, aufgrund der Divergenz auf unterschiedlichen Detektorpositionen abgelenkt. Zusammengefaßt wird für jeden Streuvektor das Abbild des direkten Strahls auf der Probe unter Berücksichtigung der Divergenz auf dem Detektor abgebildet. Schließlich geht auch noch die Energieauflösung der Quelle und die Ortsauflösung des Detektors in die Auflösung ein.

Diese Einflüsse werden durch die Auflösungsfunktion $R(\boldsymbol{q}, \boldsymbol{q}')$ definiert. Die gemessene Streuamplitude ist damit die Faltung der Auflösungsfunktion R mit dem theoretischen Streuquerschnitt $\frac{d\sigma}{d\Omega}$:

$$I(\boldsymbol{q}) = \int d\boldsymbol{q}' \, R(\boldsymbol{q}, \boldsymbol{q}') \, \frac{d\sigma(\boldsymbol{q}')}{d\Omega} \tag{5.10}$$

Die Auflösungsfunktion R ist von einer Vielzahl Parameter abhängig, kann aber zur Vereinfachung nach Pedersen [49] durch eine zweidimensionale Gaußkurve angenähert werden.

$$R(q, q') = \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{(q_x - q)^2}{\sigma_x^2}\right) + \frac{q_y^2}{\sigma_y^2}\right)$$

[4]Die bekannte Linienverbreiterung aufgrund der Probengröße (Debye-Scherrer Gleichung) liefert einen entgegengesetzten Effekt

Hier sind q_x und q_y die orthogonalen Impulsüberträge senkrecht zur Strahlrichtung. Der Vektor parallel zum Strahl q_z wird ignoriert, da sein Einfluß entweder herausintegriert wird oder er zu gering ist. σ_x und σ_y sind die entsprechenden Gaußbreiten.

Die dominierenden Faktoren sind die Divergenz und Energieauflösung. Für eine Abschätzung wendet man die Gaußsche Fehlerfortpflanzung auf Gleichung 3.10 an:

$$\begin{aligned} \Delta q^2 &= \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)^2 q^2 + \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \cos^2(\Theta/2)\,\Delta\Theta^2 \\ &= \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)^2 q^2 + \left(\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 - \frac{q^2}{4}\right)\Delta\Theta^2 \end{aligned} \tag{5.11}$$

An Gleichung 5.11 kann der unterschiedliche Einfluß beider Terme abgelesen werden. Abbildung 5.9 zeigt diesen Zusammenhang. Der Einfluß der Divergenz ist nur für kleine Impulsüberträge q relevant. Hier gilt näherungsweise der konstante Zusammenhang $\Delta q = \frac{2\pi}{\lambda}\Delta\Theta$. Für größere Impulsüberträge liefert nur noch die Energieauflösung einen Beitrag. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang $\Delta q = \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right) q$, für die Röntgenkleinwinkelanlage liegt der Übergang bei $1{,}4\,\mathrm{nm}^{-1}$. Da die Energieauflösung nur von Quelle und Spiegel abhängig ist, kann ab einem bestimmten q_0 unter maximalen Blendengrößen bzw. Fluß gemessen werden. Der tatsächliche Kurvenverlauf wird im folgenden Kapitel bestimmt.

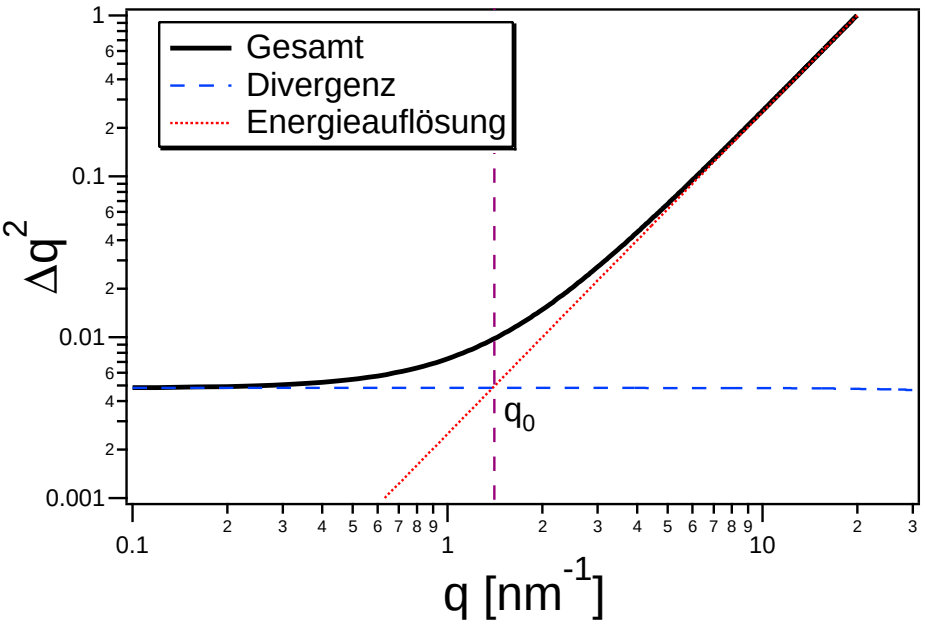


Abbildung 5.9.: Einfluß der Divergenz $\Delta\Theta$ und Energieauflösung $\frac{\Delta\lambda}{\lambda}$ auf das Fehlerquadrat Δq^2 des Impulsübertrages.

5.3.1. Bestimmung des Strahlprofil und der Divergenz

Anhand Gleichung 5.11 ist erkennbar, daß der Einfluß der Divergenz auf die Auflösungsfunktion nur für kleinen Impulsüberträge relevant wird. Die Streuintensität des ungestreuten Strahls ist $\frac{d\sigma(\boldsymbol{q})}{\Omega} = \delta(\boldsymbol{q})$. Somit folgt aus Gleichung 5.10 für kleine Impulsübertrag $I(\boldsymbol{q}) = R(\boldsymbol{q})$. Die Auflösungsfunktion R ist also gleich dem Bild der Quelle auf dem Detektor. Die Auflösungsfunktion für alle größeren Impulsüberträge wurde mit Silberbehenat bestimmt. Dieses erzeugt Braggreflexe an Vielfachen von $1{,}076\,\mathrm{nm}^{-1}$. Für ideale kristalline Probe sind diese Reflexe δ-förmig, eine intrinsische Linienverbreiterung durch die Debye-Scherrer Relation aufgrund der Kristallgröße wird vernachlässigt. Somit entspricht die gemessene Linienform der jeweiligen Ordnungen näherungsweise der Auflösungsfunktion R an diesen Impulsüberträge q.

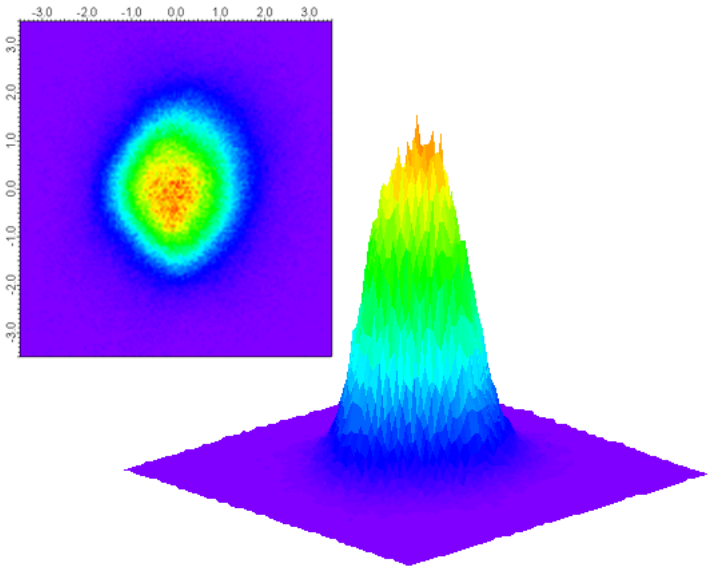


Abbildung 5.10.: Zweidimensionales Intensitätsprofil des direkten Strahles in 2137 mm Abstand von der Probe.

Für kleine Impulsüberträge wurde zunächst das Intensitätsprofil des direkten Strahles bestimmt. Aufgrund der hohen Intensität wird der Strahl so kurz wie möglich gemessen (ca. $0{,}1\,s$). Das zweidimensionale Intensitätsprofil für eine Messung in 2137 mm Abstand zu Probe wird in Abbildung 5.10 als Bild und dreidimensionales Höhenprofil gezeigt. Das Strahlprofil entspricht weitgehend einer zweidimensionalen Gaußfunktion (siehe Abb. 5.10 und 5.11).

Durch radiale Integration um den Mittelpunkt erhält man ein eindimensionales Intensitätsprofil, wie in Abbildung 5.11 für einen Abstand zwischen Probe und Detektor von 325 mm dargestellt wird. Das Intensitätsprofil entspricht einer Gaußfunktion, wie die durchgezogene Anpassungskurve in der Abbildung zeigt. Zur Bestimmung der Divergenz wird dieses radiale Intensitätsprofil für verschiedenen Abstände zur Quelle bestimmt. Abbil-

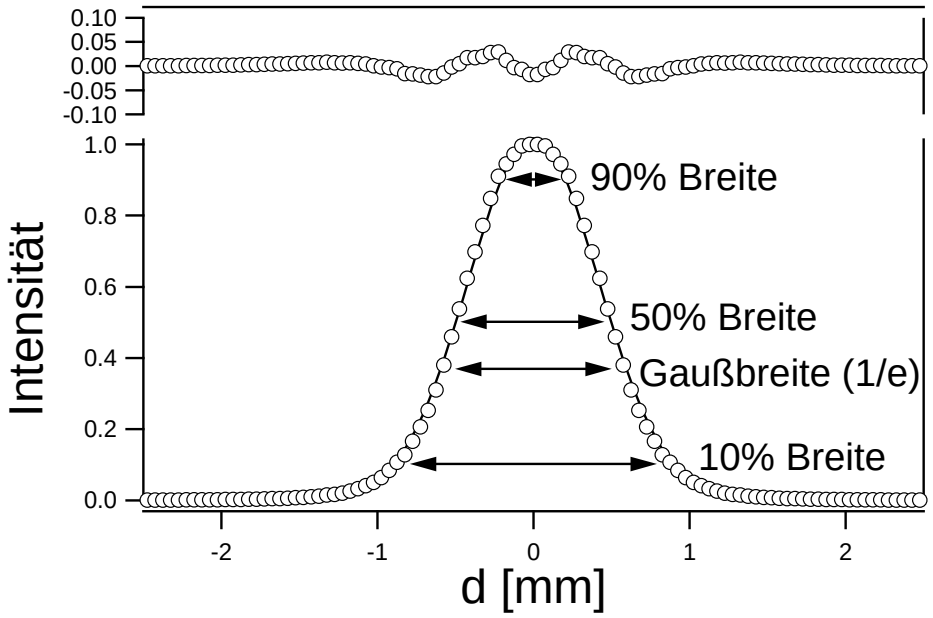


Abbildung 5.11.: Radialintegriertes Intensitätsprofil des direkten Strahles in 325 mm Abstand von der Probe (runde Symbole). Eine gaußförmige Anpassungsfunktion ist durch eine durchgezogene Linie dargestellt, im oberen Bereich des Graphen das zugehörige Residuum. Die Halbwertsbreite und die analogen Breiten für 10 % und 90 % der Maximalintensität sowie die Gaußbreite für $\frac{1}{e}$ der Maximalintensität sind durch Pfeile markiert.

dung 5.12 zeigt die Breite dieses Profil für 10 %, 50 % und 90 % der Maximalintensität für verschiedene Abstände. Die 50 % Breite entspricht der üblichen Halbwertsbreite.

Alle drei Kurven zeigen ein Minimum bei etwa 600 mm Abstand zur Quelle und steigen dann linear an. Die Kurven sind durch einen Überlagerung einer Exponentialfunktion mit einem linearen Anteil anpaßbar. Der lineare Anteil aller drei Kurven schneidet die Abszisse bei 530 mm, dies entspricht der Fokallänge der Quelle. Der Öffnungswinkel für die verschiedenen Intensitätsanteile beträgt 4,4' für 10 %, 2,6' für 50 % und 1,1' für 90 % der Maximalintensität. Die Divergenz bezieht sich üblicherweise auf den Öffnungswinkel der Halbwertsbreite, beträgt also 2,6'.

5.3.2. Einfluß der Detektorposition

Abbildung 5.13 zeigt das Intensitätsprofil einer Silberbehenatprobe für einen Detektorabstand von 325, 530, 730, 1130, 1573, 1937 und 2137 mm. Da der Fokus weder auf der Probe noch auf dem Detektor liegt, verbessert sich die Auflösung mit steigendem Abstand. Für Messungen mit dem Detektor nahe der Probe sind die Reflexe deutlich verbreitert. Die unterschiedlichen $q_{\min}$ entstehen, da für jede Messung der selbe Beamstop verwendet wurde.

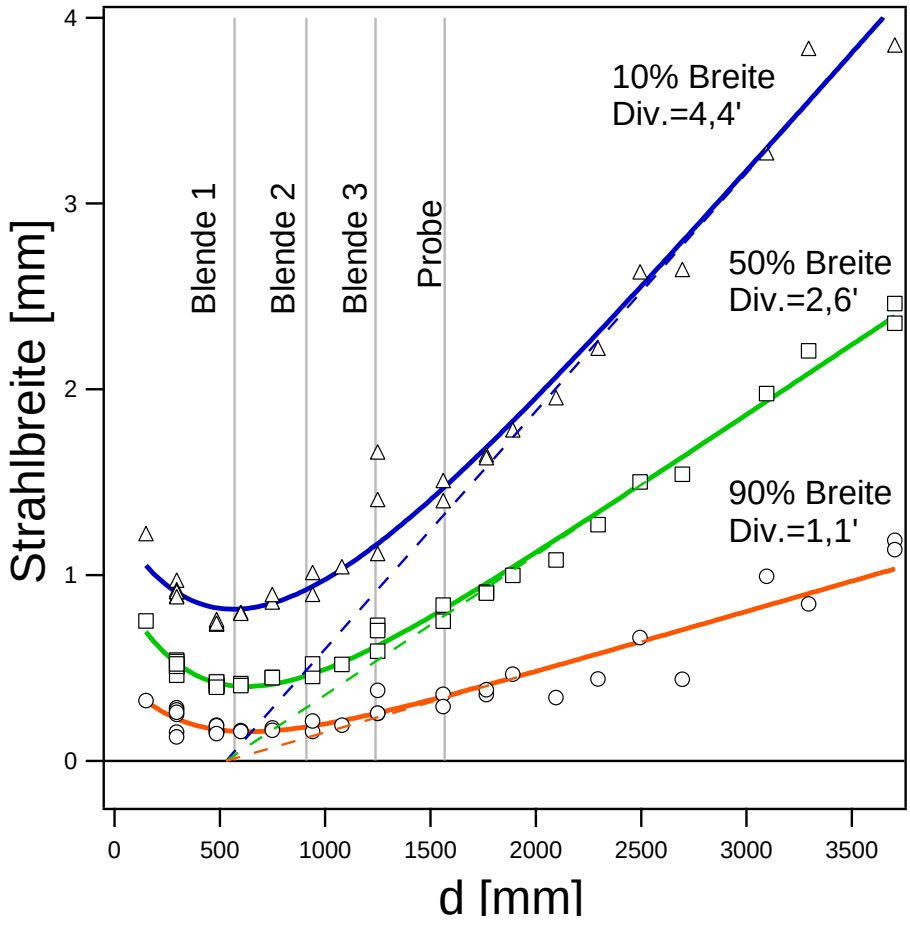


Abbildung 5.12.: Abstandsabhängige Strahlbreite für 10 %, 50 % und 90 % der Maximalintensität wie in Abbildung 5.11 definiert.

Die Intensitätskurven wurden durch multiple Gaußkurve angepaßt. Diese sind als dünne durchgezogenen Linien für einen Detektorabstand von 325 mm eingezeichnet.

Abbildung 5.14 zeigt die Gaußbreite der 1., 2. und 7. Ordnung der Silberbehenatprobe aus Abbildung 5.13, also bei 1,1 nm^{-1}, 2,2 nm^{-1} und 7,5 nm^{-1}. Unabhängig vom Impulsübertrag zeigen alle Braggreflexe für geringe Detektorabstände annähernd die selbe Breite von 0,1 bis 0,2 nm^{-1}. Mit steigenden Abständen verbessert sich diese auf bis zu 0,06 nm^{-1}, wobei der Effekt für die 1. und 2. Ordnung stärker als für die 7. Ordnung ist. Wird eine hohe Auflösung benötigt, ist es demnach sinnvoll, den Detektorabstand möglichst groß zu wählen, insbesondere, wenn man an kleinen Impulsüberträgen interessiert ist.

5.3.3. Einfluß verschiedener Blendensätze

Sämtliche obige Messungen und Aussagen waren weitgehend unabhängig von den jeweiligen Blendeneinstellungen. Durch die jeweilige Wahl der Blenden kann man zusätzlich

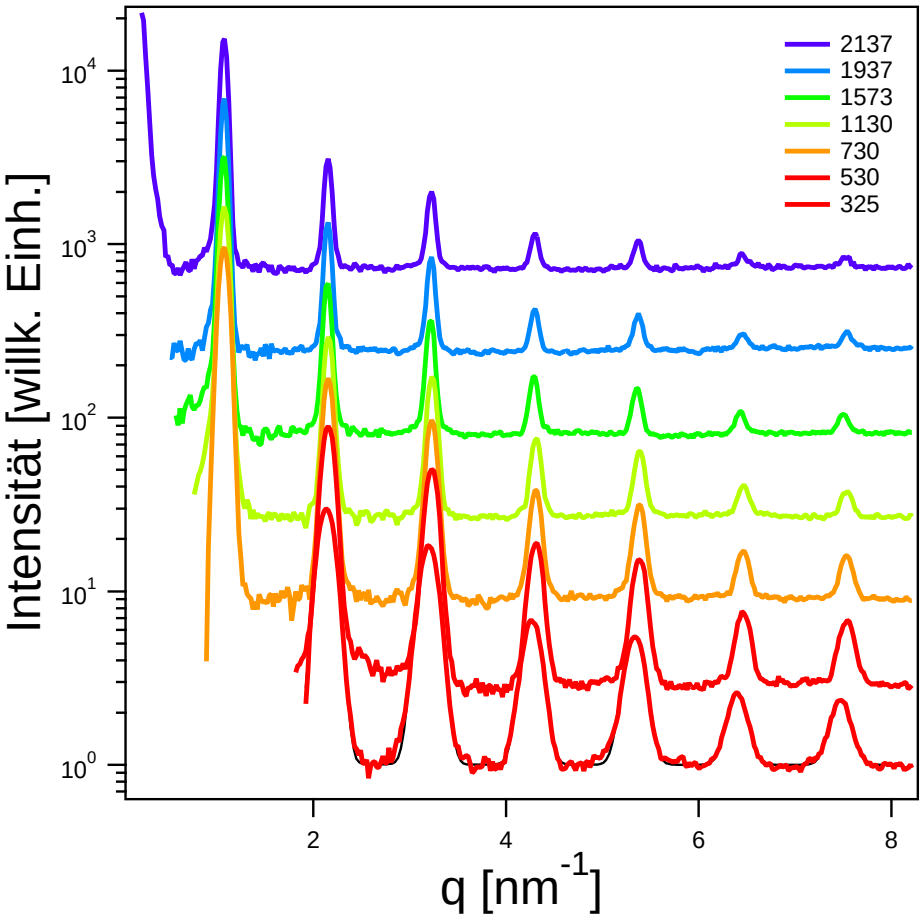


Abbildung 5.13.: Intensitätsverlauf einer Silberbehenatprobe für verschiedene Detektorabstände (in mm). Die dünne schwarze Linie bei einem Detektorabstand von 325 mm stellt eine Anpassung mit einer Reihe von Gaußfunktionen dar.

Strahlgröße und Fluß beeinflussen. Die von der Quelle ausgesendeten Photonen nehmen ein bestimmtes Phasenraumvolumen ein, daß von ihrer Ort- und Impulsdichte bestimmt wird. Dies ist ist gleichbedeutend mit einem bestimmten Fluß und Divergenz. Nach dem Satz von Liouville ist dieses Phasenraumvolumen konstant. Wird der Fluß erhöht indem man den Strahl stärker fokusiert, muß sich deswegen ebenfalls die Divergenz erhöhen. Umgekehrt führt eine verminderte Divergenz zu einem geringern Fluß. Daher erzeugt generell ein kleinerer Blendensatz einen kleineren Strahl bei niedrigerem Fluß, eine kleine Strahlgröße bei hohem Fluß ist prinzipiell nicht möglich. Abhängig von der gewünschten Anwendung wird man deswegen zwischen diesen beiden Größen abwägen müssen.

Abbildung 5.15 zeigt die Beziehung zwischen Fluß und Strahlgröße für alle verfügbaren Blendeneinstellungen der Anlage. Blende 3 wurde hierbei ignoriert, da diese nur den parasitären Hintergrund entfernt und im optimalen Fall die Auflösung nur wenig beein-

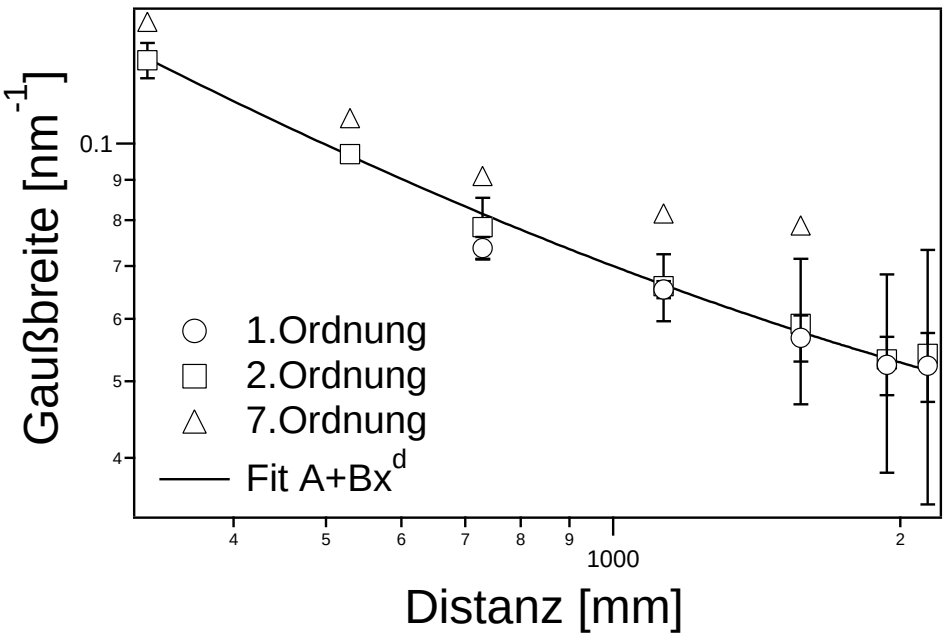


Abbildung 5.14.: Gaußbreite der 1., 2. und 7. Ordnung einer Silberbehenatprobe (1,1 nm^{-1}, 2,2 nm^{-1} und 7.5 nm^{-1}) für unterschiedliche Abstände von der Probe.

flußt. Dazu wurden die Braggreflex der 2. Ordnung (2,2 nm^{-1}) einer Silberbehenatprobe bestimmt und mit einer Gaußfunktion angepaßt. Der Graph zeigt die Beziehung zwischen der normierten Höhe, welche dem Fluß entspricht, und der Gaußbreite, welche ein Maß für die Auflösung ist. Die beste Auflösung wird mit einer Gaußbreite von 0,04 nm^{-1} für die kleinste Blenden erzielt. Der Reflexe hat hier eine um den Faktor 1,5 geringere Breite als für die größten Blendensatz (1200/1000), allerdings beträgt der Fluß nur etwa 1 % des Maximalwertes. Der generelle Trend ist, daß durch Verbesserung der Auflösung der Fluß drastisch reduziert wird. Hierbei wird wie erwartet, der Fluß hauptsächlich durch Blende 1 bestimmt. Die gemessenen Gaußbreiten einiger ausgewählten Blendensätze finden sich in Tabelle 5.16.

Wie in Gleichung 5.11 gezeigt wurde, ist durch die unterschiedliche Auswirkung von Divergenz und Energieauflösung die Auflösung abhängig vom Impulsübertrag q. Abbildung 5.16 zeigt diesen Zusammenhang exemplarisch für die Blendensätze 1200/1000, 1000/700, 1200/300 und 100/100. Dazu wurden die einzelnen Ordnungen einer Silberbehenatprobe mit einer Gaußverteilung angepaßt. Das Fehlerquadrat Δq^2 wurde aus der Gaußbreite σ mit $\Delta q^2 = \frac{1}{2}\sigma^2$ abgeleitet. Die Daten wurden mit Gleichung 5.11 angepaßt, wobei für alle Datensätze dieselbe Energieauflösung als freien Anpassungsparameter nutzen und sich die Parameter nur in der Divergenz unterscheiden. Im Gegensatz zur Theorie ergeben die Anpassungen eine Energieauflösung $\frac{\Delta E}{E}$ von 0,5 %. Die Divergenz für die verschieden Blendensätze sind in Tabelle 5.1 angegeben.

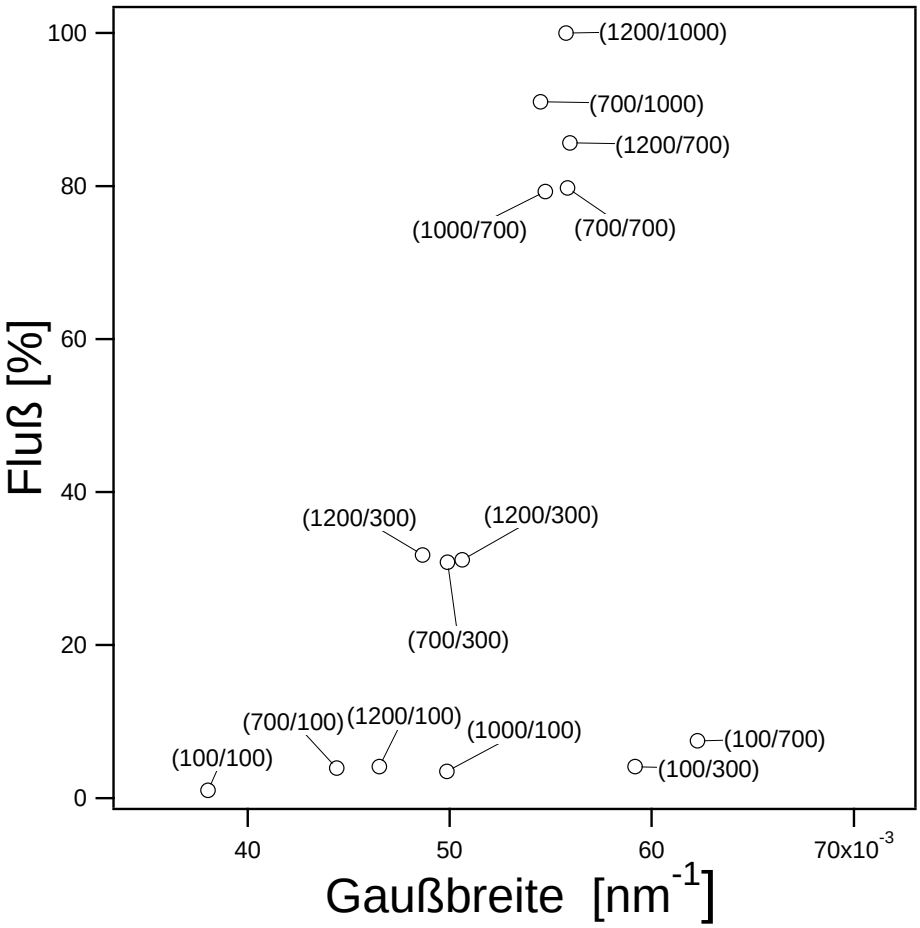


Abbildung 5.15.: Fluß und Auflösung (als Gaußbreite) für verschiedene Blendenkombinationen anhand der zweiten Ordnung einer Silberbehenatprobe, gemessen in 2137 mm Probenabstand. Die Werte in Klammern geben den Durchmesser der ersten und zweiten Blende in Mikrometer an.

Die so bestimmten Werte weichen stark von den zuvor ermittelten Werten ab. Der aus den Anpassungen ermittelte Wert für die Energieauflösung $\frac{\Delta E}{E}$ ist um einen Faktor 10 besser als die Herstellerangaben. Aufgrund der intrinsischen Linienbreite der K_α-Linie ist die Herstellerangabe weitaus glaubhafter. Die aus der Anpassung erzielte Divergenz ist um einen Faktor 20 schlechter als der aus Abbildung 5.11 ermittelte Wert. Würde man eine Divergenz von 20 mrad Voraussetzten, hätte der direkte Strahl bei einem Detektorabstand von 2137 mm eine Weite von 8 cm, also entspricht auch hier der Anpassungsparameter nicht der tatsächlichen Divergenz. Die Ursache dieses Verhaltens liegt in dem vereinfachten Modell von 5.11. Dieses kann hier nur als phänomenologische Beschreibung dienen, um mit ihr für verschiedene Blendensätze die vom Impulsübertrag abhängige Auflösungsfunktion anzunähern.

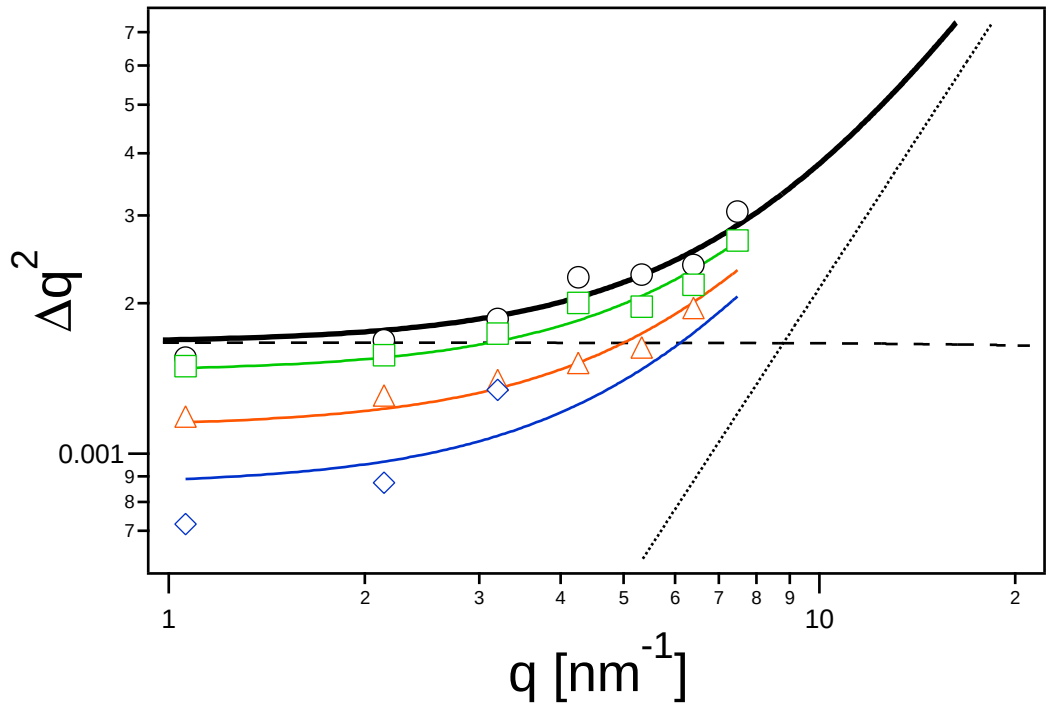


Abbildung 5.16.: Aus einer Silberbehenatprobe abgeleitetes Fehlerquadrat Δq^2 abhängig vom Impulsübertrag q. Die Symbole geben die aus der Gaußbreite abgeleiteten Fehlerquadrat Δq^2 für die Blendensätze 1200/1000 (○), 1000/700 (□), 1200/300 (△) und 100/100 (◇) an. Die Durchgezogene Linie entspricht einer Anpassung nach Gleichung 5.11 mit den Anteilen der Divergenz als gestichelte und den Anteil der Energieauflösung als gepunktete Linie.

Tabelle 5.1.: Anhand einer Silberbehenatprobe ermittelte Gaußbreite der 2. Ordnung und den Anpassungsparameter $\Delta\Theta$ aus Gleichung 5.11 für verschieden Blendensätze (siehe Abbildung 5.16). Der Parameter der Energieauflösung ist für alle Messungen $\frac{\Delta E}{E} = 0,5\,\%$.

Blendensatz	Gaußbreite 2. Ordnung [nm^{-1}]	$\Delta\Theta$ [mrad]
1200/1000	0,056	21,5
1000/700	0,055	20,8
1200/300	0,049	19,5
100/100	0,038	18,2

5.4. Ausblick

Zur korrekten Betrachtung ist es notwendig, den Einfluß der jeweiligen Blenden auf den direkten Strahl zu berechnen. Da hierzu das Abbild des direkten Strahls nach Durchgang durch die verschiedenen Blenden berechnet werden muß, ist es notwendig, die genaue Verteilung der Photonen vor Blende 1 im fünfdimensionalen Phasenraum zu kennen (x, y, dx, dy, $\Delta\lambda/\lambda$). Vereinfachte Behandlungen gehen von einer uniformen Verteilung aus [49]. Unter diesen Annahmen, ist die Auflösungsfunktion lediglich die von jeder Detektorposition aus beobachtete Überlappfläche der jeweiligen Blenden. Die Auflösungsfunktion für Schlitzblenden wird damit zu einer Trapezfunktion (siehe Abbildung 5.17), die, abhängig von den jeweiligen Öffnungswinkel a_1 und a_2 der Blenden 1 und 2 vom Detektor aus gesehen, zu einer Dreiecks oder Kastenfunktion übergehen kann. Die Verwendung von Kreisstatt Schlitzblenden glättet die Kurvenform etwas ab.

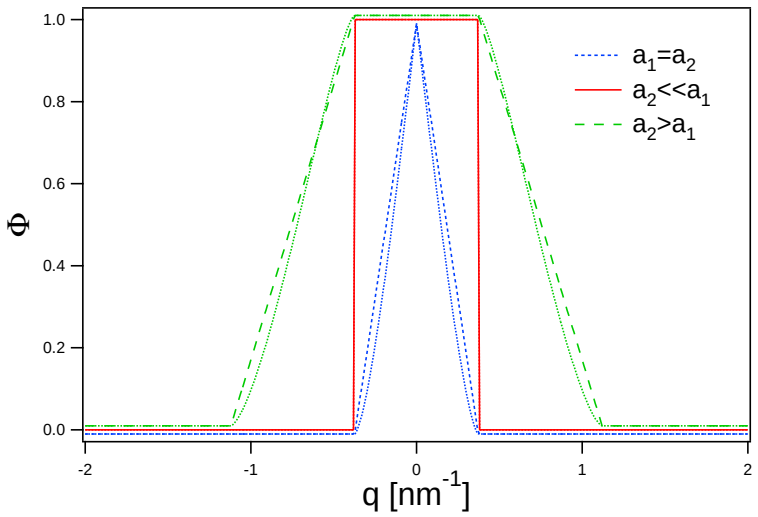


Abbildung 5.17.: Die Auflösungsfunktion für Schlitzblenden unter der Annahme einer homogenen Phasenraumverteilung für die drei Fälle $a_1 = a_2$, $a_1 < a_2$ und $a_1 > a_2$ jeweils auf 1 normiert. Die Kurven haben zur besseren Darstellung eine kleinen Offset. Die Auflösungsfunktion für kreisförmige Blenden sind jeweils gepunktet.

Der in der Anlage verwendete Mikrofokus mit Göbelspiegel kompliziert die Behandlung, da hier die exakte Phasenrauminformation des Strahls bekannt sein muß. Dann läßt sich dieses Problem entweder analytisch [50] oder mittels Ray-Tracing [84] lösen. Da sowohl die Geometrie des Brennflecks als auch der Spiegel nicht bekannt sind, wurde versuchsweise von einer aus einem punktförmigen Fokus abstrahlenden Intensitätsverteilung mit gaußförmigen Intensitätsprofil ausgegangen. Allerdings ist unter dieser Annahme das berechnete Profil des direkten Strahles zu breit, so daß von einem komplexeren Phasenraumzustand ausgegangen werden muß, der hier nicht weiter behandelt wurde.

6. Invertierte Zylinderartige Lipid/DNA-Mizellen

6.1. Einleitung

Lipide und Lipid/DNA-Komplexe (Lipoplexe) sind ein wichtiger Untersuchungsgegenstand der Biophysik. Sie bilden abhängig von den verwendeten Molekülen, ihrer Konzentration, Temperatur und den verwendeten Lösungsmitteln eine Vielzahl unterschiedlicher nano- und mesoskaliger Strukturen aus. In dieser Arbeit wurde das zwitterionische Lipid DOPE und das kationische Lipid DOTAP verwendet. DOPE ist in der Lage, hexagonale Phasen zu bilden [8, 10]. Das kationische Lipid DOTAP kann über die elektrostatische Wechselwirkung an die anionische DNA binden und ist dadurch ein wichtiger Bestandteil vieler Lipoplexe [29, 54, 82, 89].

Das System aus DOPE, DOTAP und DNA wurde in wäßriger Umgebung von Koltover et al. untersucht [28]. Es wurde gezeigt, daß sich unter geeigneten Umständen eine hexagonale DOPE/DOTAP/DNA-Phase (H_{II}^{C}-Phase) bilden kann. Die H_{II}^{C}-Phase zeichnet sich dadurch aus, daß sich einzelne DNA-Moleküle im polaren Inneren der zylinderartigen Strukturen befindet und von der unpolaren Umgebung der Alkylketten abgeschirmt wird. Verschiedene DNA Moleküle beziehungsweise unterschiedliche Bereiche desselben langen Moleküls sind voneinander abgeschirmt und können nicht untereinander in Berührung kommen. Damit unterscheiden sie sich wesentlich von lamellaren Komplexen, der anderen wichtigen Struktur der Lipoplexe. Wird dem System Alkan zugefügt, beginnt die hexagonale Phase zu quellen [7]. Bei Alkanüberschuß kann erwartet werden, daß sie sich schließlich in einzelne zylinderartige Mizellen auflöst. Damit ist dieses System ein guter Kandidat für die hier untersuchte Fragestellung, einzelne DNA Moleküle in polaren Flüssigkeiten zu lösen und zu charakterisieren.

In diesem Kapitel wird das Phasendiagramm des quaternären Systems aus Lipid, DNA, Wasser und Alkan analysiert. Aufgrund der hohen Anzahl der Komponenten wird die Untersuchung auf Bereiche des Phasendiagramms beschränkt, die für die Fragestellung besonders interessant erscheinen. Dazu wurden insbesondere nur isoelektrische Systeme betrachtet, daß heißt die Menge des zugegebene DOTAP wurde gleich der Menge der DNA Basen gewählt (siehe Abbildung 6.1B) Der Gewichtsanteil des zwitterionischen Lipids an der Lipidgesamtmenge wird durch den Parameter Φ beschrieben und zwischen 0 % bis 100 % variiert. Bis auf wenige Ausnahmen wurde ein Überschuß an Wasser und Alkan hinzu gegeben, so daß sich zwei klar getrennte Bereiche bilden können. Das leichtere Alkan setzt sich hier über der Wasserphase ab (siehe Abbildung 6.1A). Unter hoher DNA Konzentration

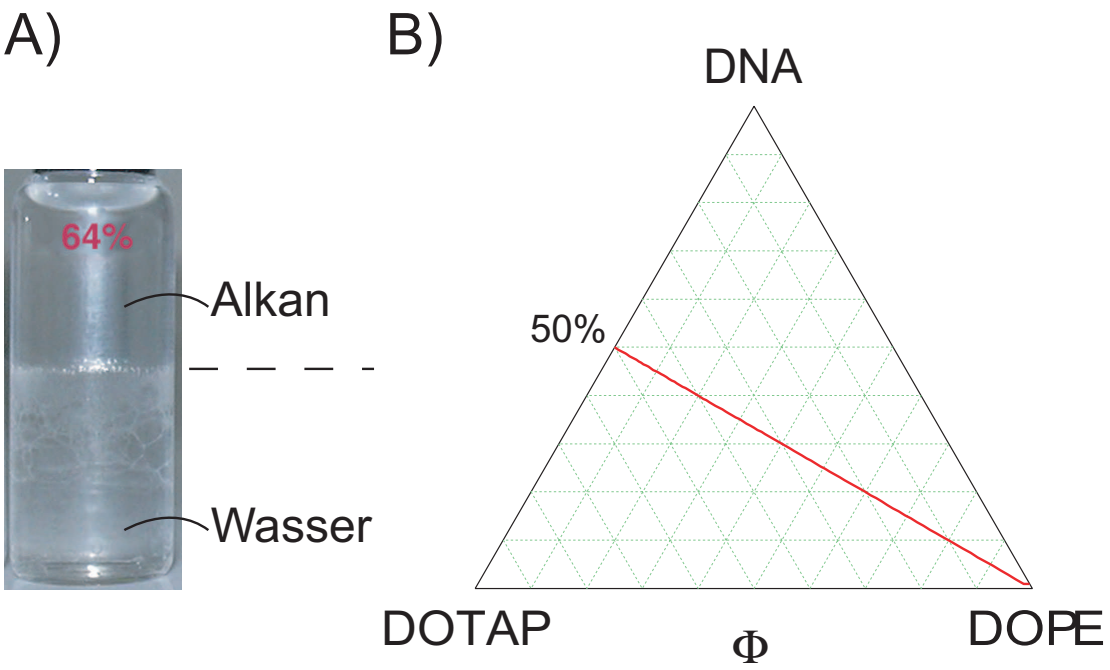


Abbildung 6.1.: Untersuchte Bereiche des Phasendiagramms der Komponenten DOPE, DOTAP, DNA, Wasser und Alkan. **A)** Bei Überschuß an Wasser und Alkan bilden sich zwei klar getrennte Bereiche, das leichtere Alkan setzt sich dabei über der Wasserphase ab. Unter hoher DNA Konzentration ($\gtrsim 5\,\mathrm{mg/ml}$) bilden sich gelartige Strukturen zwischen der Wasser- und Alkanphase. **B)** Ternäres Phasendiagramm der Komponenten DOPE, DOTAP und DNA. Die Untersuchungen wurden auf dem isoelektrischen Pfad durchgeführt (rote Linie), bei der die DOTAP Menge gleich der Menge an DNA Basen ist. Der Gewichtsanteil des zwitterionischen Lipids an der Lipidgesamtmenge (Φ) variiert zwischen 0 % bis 100 %.

($\gtrsim 5\,\mathrm{mg/ml}$) sind gelartige Strukturen zwischen Wasser und Alkanphase zu beobachten. SAXS-Untersuchungen der Wasserphase ergaben keine wesentliche Information, deswegen wurde die Analyse hier auf die Alkanphase beschränkt. Alle Phasengrenze sind auch über mehrere Monate stabil.

In diesem Kapitel wird eine Methode vorgestellt, DNA in ein unpolares Lösungsmittel zu überführen. Dazu wird sie von einer Lipidschicht umgeben, so daß inverse Lipidmizellen mit DNA im Inneren entstehen können. Die Kleinwinkelstreuung wird genutzt, um die lokale Struktur der Lipid/DNA-Komplexe zu charakterisieren, indem modellierte Formfaktoren an die Streuintensitäten angepaßt werden.

6.2. Datenauswertung

6.2.1. Anpassungen an die Daten

Zur Strukturbestimmung wird das Modell gesucht, dessen Streuamplitude die Streudaten am besten erklärt. Dazu müssen zunächst ein oder mehrere Modelle postuliert werden, die durch eine Reihe von variablen Parametern beschrieben werden. Bei mizellaren Systemen sind beispielsweise sphärische und zylinderähnliche Strukturen mit verschiedenen Abmessungen zur Beschreibung der Streudaten in Erwägung zu ziehen. Eine Anpassung versucht diejenigen Werte für die Parameter zu finden, welche die theoretische Streuamplitude am besten mit den gemessenen Daten in Übereinstimmung bringt. Gleichzeitig wird die Standardabweichung der Parameter bestimmt und die Güte der Anpassung geliefert. Um entscheiden zu können, welches der Modelle das System am besten beschreibt, wird zunächst betrachtet, ob die gefundenen Anpassungsparameter physikalisch sinnvoll sind (siehe Anhang A.3). Anhand der Güte der Anpassung kann dann eine Wahl unter den übrig gebliebenen Alternativen getroffen werden.

In dieser Arbeit wird zur Anpassung der Levenberg-Marquard Algorithmus verwendet, der in der Lage ist, nichtlineare Probleme hinreichend schnell zu optimieren und dabei ebenfalls die Standardabweichung der Parameter und die Güte der Anpassung liefert. Verwendet wurde dazu das Programm Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, USA). Für die Bestimmung der Strukturdaten wurden jeweils zylindrische als auch sphärische Modelle mit verschiedenen internen Strukturen und Parametern getestet.

Die Streuintensität $I(q)$ ist eindeutig durch das Elektronendichteprofil $\rho(r)$ der Strukturen bestimmt (siehe Absatz 6.2.3). Allerdings ist die genaue Funktion $I(q)$ unbekannt, da prinzipiell nur die diskreten Meßwerte $I^m(q_i)$ innerhalb des Bereichs zwischen $q_{\min}$ und $q_{\max}$ mit einer Genauigkeit σ_i bestimmt werden können. Die Anzahl der Meßpunkte sei dabei N. Das Modell hingegen wird durch eine theoretische Kurve $\rho^{\text{theo}}(r, C)$ bestimmt, das von von dem Parametern $C = \{c_1, c_2, ..., c_M\}$ abhängig ist. Man sucht nun diejenigen Parameter C_{opt}, die eine theoretische Kurve $\rho^{\text{theo}}(r, C)$ bzw. $I^{\text{theo}}(q_i, C)$ beschreiben. Um dieses Problem zu lösen, muß die von C abhängige Wahrscheinlichkeit $p(C)$ berechnen werden, daß die theoretische Funktion I^{theo} der tatsächlichen Funktion I entspricht. Man erkennt, daß dies nur möglich ist, wenn zu jedem gemessenen Datenpunkt auch die Standardabweichung σ_i bekannt ist. Zur Anpassung muß dann die Wahrscheinlichkeit $p(C)$ maximiert werden. Es kann gezeigt werden [53], daß dies gleichbedeutend mit der Minimierung des Chi-Quadrat χ^2 ist.

$$\chi^2 = \Sigma_{i=1}^{N} \left(\frac{I^m(q_i) - I^{\text{theo}}(q_i, C)}{\sigma_i} \right)^2 \tag{6.1}$$

Damit ist χ^2 ein Maß, für die Güte einer Anpassung. Für eine große Anzahl der Freiheitsgrade $\nu = N - M$ ist der Mittelwert von χ^2 gleich ν und die Standardabweichung gleich $\sqrt{2\nu}$. Für das reduzierte Chi-Quadrat $\chi_r^2 = \frac{1}{\nu}\chi^2$ gilt dann:

$$\langle \chi_r^2 \rangle = 1 \qquad (6.2)$$
$$\delta\chi_r^2 = \sqrt{\tfrac{2}{\nu}}$$

Dies dient damit als eine Abschätzung, ob der Anpassungsalgorithmus ein gültiges Ergebnis geliefert hat. Optimal beträgt das reduzierte Chi-Quadrat χ_r^2 gleich 1, für eine vernünftige Anpassung sollte es wenigstens die selbe Größenordnung aufweisen. Abweichungen größer als ein Faktor von 10 sind ein Zeichen, daß die Daten nicht mit dem Modell beziehungsweise den gefundenen Parametern beschrieben werden können, oder daß die verwendete Standardabweichung der Datenpunkte nicht korrekt war.

Einige Gedanken zur Anzahl der Anpassungsparameter

Jede Streukurve wird durch $q_{\min}$ und $q_{\max}$ eingeschränkt. Mit dieser begrenzten Bandbreite folgt aus dem Shannon Theorem [39, 70, 79], daß der maximale Informationsgehalt durch

$$N_{\mathrm{ST}} = \frac{1}{\pi} D_{\max} \left(q_{\max} - q_{\min} \right) \qquad (6.3)$$

abgeschätzt werden kann. Hier ist $D_{\max}$ der maximale Durchmesser des Streukörpers. N_{ST} ist die minimale Anzahl der Meßpunkte bzw. die Anzahl der Freiheitsgrade, welche die Streuamplitude $A(q)$ bzw. die Struktur $\rho(r)$ eindeutig beschreiben. Eine Erweiterung der Anzahl der Meßpunkte ergibt nicht notwendigerweise mehr Informationen. Auf der anderen Seite darf die Anzahl der Meßpunkte den Wert N_{St} nicht unterschreiten, damit keine Information verloren gehen kann, die tatsächliche Detailtreue kann allerdings durch eine höhere Anzahl von Datenpunkten verbessert werden (Oversampling). Die Informationen, die man dadurch zusätzlich erhalten kann, hängen dann auch noch von der Meßgenauigkeit und bekannten Randbedingungen ab [75].

Der in diesen Arbeit verwendete q-Bereich ist meisten $\Delta q = 3\,\mathrm{nm}^{-1}$, der Radius der untersuchten Strukturen liegt im Bereich von 2,5 nm bis 3,5 nm, dies entspricht einer Parameterzahl zwischen 2,4 und 3,4. Die tatsächlich verwendete Anzahl ist mit 4 für inverse sphärische und 5 für inverse zylindrische Mizellen höher, dies läßt sich aus den oben genannten Gründen rechtfertigen.

Das kleinste gemessene q beträgt $0{,}18\,\mathrm{nm}^{-1}$, damit lassen sich Strukturen bis $\frac{\pi}{q_{\min}} = 18\,\mathrm{nm}$ bestimmen.

6.2.2. Bestimmung der Standardabweichung

Röntgenstreuexperimente bestehen im Wesentlichen darin, die Anzahl N der Photonen zu zählen, die unter einem bestimmten Streuvektor q einfallen. Die zugehörige Statistik ist die Poissonstatistik mit der Standardabweichung $\sqrt{N(q)}$. Falls der einfallende Fluß und der absolut kalibrierte differenzielle Wirkungsquerschnitt $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ bekannt ist, kann damit auch die Standardabweichung für jeden Punkt bestimmt werden. Ohne diese Angaben gilt

immer noch die Beziehung $\sigma_i \propto \sqrt{I(q_i)}$, allerdings ist der genaue Proportionalitätsfaktor unbekannt. Der Anpassungsalgorithmus ist immer noch gerechtfertigt, allerdings sind dann weder die Fehler der Anpassungsparameter noch das Chi Quadrat χ^2 normiert.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde in dieser Arbeit für die Standardabweichung $\sigma_i = k\sqrt{I(q_i)}$ angenommen, wobei k eine zunächst willkürliche Proportionalitätskonstante ist, die zunächst als $k = 1$ angenommen wurde. Der Anpassungsalgorithmus liefert dadurch ein modifiziertes Chi Quadrat $\tilde{\chi}_r^2 = k^2\chi_r^2$, sowie die modifizierten Fehler $\delta\tilde{C}$ der Parameter, welche zunächst ohne Aussagekraft sind.

Die Vorgehensweise ist k über die Beziehung $\langle\chi_r^2\rangle = 1$ bzw. $\langle\tilde{\chi}_r^2\rangle = k^2$ zu bestimmen. Das reduzierte Chi Quadrat $\chi_{r,\mathrm{opt}}^2$ ist unabhängig vom konkreten Modell, solange dieses die Daten hinreichend genau beschreibt. Aus diesem Grund muß zur Normierung nicht die Modellfunktion für die Elektronendichteverteilung benützt werden, sondern $I(q)$ kann durch eine Polynom des Grades N angepaßt werden. Da jede Kurve hinreichend genau durch ein Polynom beschrieben werden kann, hat diese Vorgehensweise den Vorteil auch dann zu funktionieren, wenn bekannte Modelle die Daten nicht exakt beschreiben. Mit steigenden N kann das Polynom den Daten besser folgen und $\tilde{\chi}^2$ nimmt gleichmäßig ab, das reduzierte Chi Quadrat $\tilde{\chi}_r^2$ nähert sich allerdings einem Grenzwert $\tilde{\chi}_{r,\mathrm{opt}}^2$ (siehe Abbildung 6.2). Die Normierung erfolgt dann über die Beziehung $k = \sqrt{\langle\tilde{\chi}_{r,\mathrm{opt}}^2\rangle}$. Daraus kann über Gleichung 6.2 die Standardabweichung der Daten abgeschätzt werden und der Anpassungsalgorithmus liefert richtig normierte Standardabweichungen der Parameter.

6.2.3. Beschreibung der Modelle

DOPE sowie DOPE/DOTAP/DNA Mischungen bilden unter geeigneten Bedingungen zylindrische Strukturen [8, 10, 28]. Dieses Verhalten wird durch die Zugabe von Alkanen noch unterstützt [7, 72, 81]. Da DNA aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung nur in Wasser gelöst vorliegen kann, ist das wahrscheinlichste Modell eine von einer Lipidmonolage umgebene hydratisierte DNA. Ein alternatives Modell ist, daß die DNA in kompakter Form in einer Mizelle vorliegt, wie beispielsweise in der Arbeit von Budker et. al. [4] beobachtet wurde. Gegen dieses Modell spricht allerdings, daß die Oszillation im Porod Regime der Röntgendaten auf Strukturen von nur wenigen Nanometern hinweisen, welche selbst bei gepackter DNA [4, 78] weit überschritten würde. DNA kann also nur in gestreckter Form in zylindrischen Strukturen und nicht in in inversen sphärischen Mizellen vorliegen. Für Strukturen ohne DNA kommen sowohl sphärische als auch zylindrische Mizellen in Frage, da hier die Größe der DNA als Einschränkung entfällt.

Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung müssen die Lipidköpfe dem Wasser und die Lipidketten dem Alkan zugewandt sein. Daher sollten alle Mizellen im Inneren einen Wasserkern aufweisen. Da sowohl Lipidketten als auch Alkan aus Kohlenstoffketten ähnlicher Länge bestehen, ist die Elektronendichte für beide Stoffe identisch [77] und verursacht keine Streuung.

Die Modelle wurden durch stufenförmige Elektronendichteprofile beschrieben. Die Anpassungsparameter sind dabei die jeweiligen Dicken und Streulängen- bzw. Elektronen-

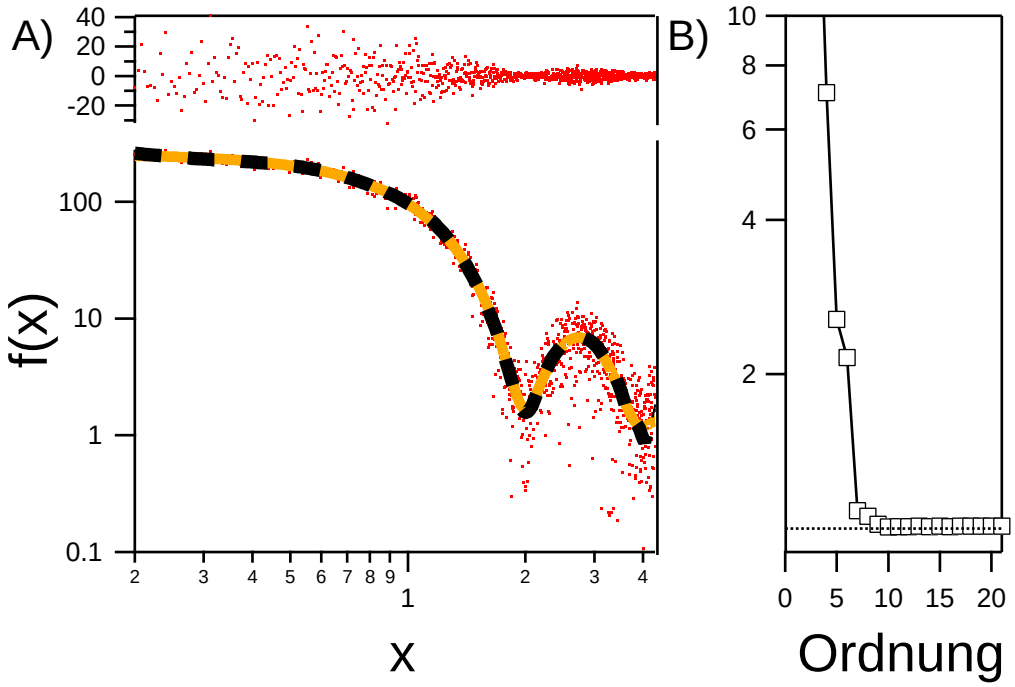


Abbildung 6.2.: Test zur Bestimmung von Chi Quadrat χ^2. **A, unten)** Die durchgezogene Kurve stellt den Formfaktor $f(x)$ einer Kugel dar, die punktförmigen Symbole darum die selbe Kurve, allerdings mit einer theoretisch berechneten Standardabweichung von $\sqrt{f(x)}$. Die gestrichelte schwarze Kurve ist ein daran angepaßtes Polynom der Ordnung 20. **A, oben)** Residuum der Anpassungsfunktion **B)** reduziertes χ^2_r eines angepaßten Polynoms abhängig von dessen Ordnungen. χ^2_r läuft asymptotisch auf den Wert 1,009 zu.

dichten sowie die Polydispersität und der Einfluß der durch die Volumenausschlußkräfte verursachten Korrelation der Partikel.

Zur Bestimmung des wahrscheinlichsten Modells wurde nur physikalisch mögliche Ergebnisse berücksichtigt (siehe Anhang A.3). Auch unter Annahme der Einschränkungen aus Tabelle A.1 liefert der Anpassungsalgorithmus für die betrachteten Modelle normalerweise mehrere mögliche Parametersätze, so daß als zweites Kriterium, die Güte der Anpassungen verglichen wurde. Das Chi Quadrat $\chi^2(C)$ steht in direkter Beziehung zu der Wahrscheinlichkeit, daß das angepaßte Modell den gemessenen Daten entspricht. Je höher das Chi Quadrat, desto unwahrscheinlicher ist die Gültigkeit des Ergebnisses (Abbildung 6.10).

Inverse zylindrische Mizellen

Für lange Polymere, deren Querschnitt klein im Vergleich zur Länge ist, läßt sich das Streuverhalten des Querschnitts vom longitudinalen Anteil trennen (siehe Kapitel 3.3.2).

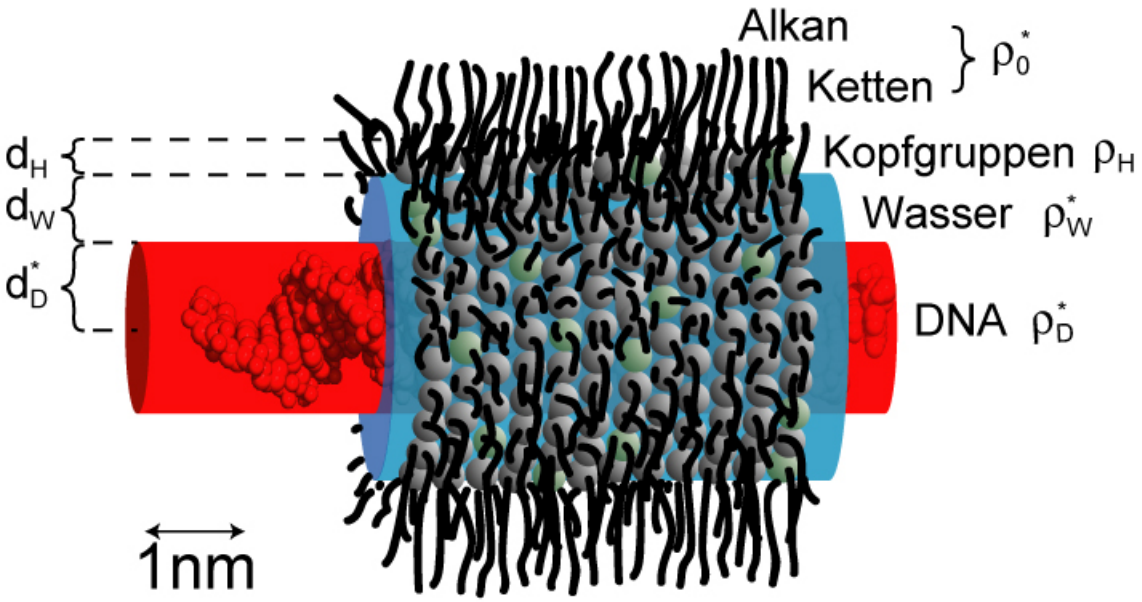


Abbildung 6.3.: Modell einer mit DNA gefüllten zylindrischen Mizelle. Die DNA im Inneren wird von einer Lage Wasser umgeben und wird durch eine Monolage Lipid vom umgebenden Alkan abgetrennt.

In dem hier untersuchten q-Bereich verhält sich die semiflexible DNA wie ein steifer Zylinder. Der Querschnitt der zylindrischen Mizellen besteht aus einer doppelsträngigen DNA, die von einer dünnen Wasserschicht umgeben ist. Die äußere Hülle besteht aus einer Monolage Lipidköpfe (Abbildung 6.4). Für monodisperse zylindrische Mizellen sind die Minima der gemessenen Streuamplituden nicht ausgeprägt genug, daher wurde ein polydisperser Ansatz für die Wasserschicht gewählt. Bei dem zylindrischen Modell ergab ein stufenförmiges Streulängendichteprofil aufgrund Anpassungsartefakte eine unrealistische hohe Elektronendichte, so daß bei diesem Modell die Übergänge durch einen sigmoidalen Verlauf (siehe Anhang A.4) verbreitert wurden.

Da die Konzentration der Lipide gerade für höhere DOPE Anteile nicht erwarten ließen, daß die einzelnen Mizellen keine Wechselwirkung untereinander haben, wurden Ausschlußvolumenkräfte berücksichtigt (siehe Kapitel 3.4.2).

Die Parameter um dieses Modell zu beschreiben sind:

- *Radius DNA*: d_D^*
- *Streulängendichte DNA*: ρ_D^*
- *Breite des Übergangs DNA/Wasser:* b_D^*
- Dicke der Wasserschicht: d_W
- *Streulängendichte der Wasserschicht*: ρ_W^*

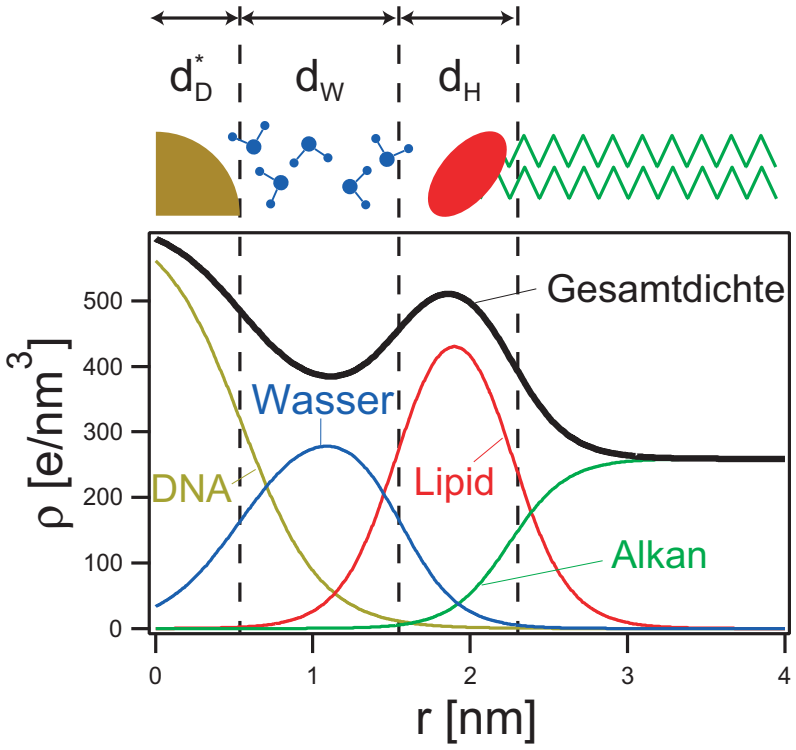


Abbildung 6.4.: Elektronendichteprofile des Querschnitts der zylindrischen Mizellen. Sie bestehen aus in Wasser gelöster DNA, die von einer Monolage Lipide umgeben ist (schwarze Linie). Das gesamte Elektronendichteprofil läßt sich in die Anteile der DNA (ocker), Wasserschicht (blau), Lipide (rot) und Alkylketten (grün) aufteilen.

- Polydispersität der Wasserdicke: z
- Dicke der Lipidkopfgruppen: d_H
- Streulängendichte der Lipidkopfgruppen: ρ_H
- *Breite des Übergangs der Lipidköpfe zu Wasser oder Alkan:* b_H^*
- Volumenanteil: n

Um die Anzahl der Parameter einzuschränken, wurde die Streulängendichte ρ_D^*, der Radius d_D^* und die Übergangsbreite b_D^* der DNA so gewählt, daß der Gyrationsradius des Querschnitts in Wasser $R_C = 0,8\,\mathrm{nm}$ [5] ergibt und auch die Streulängendichte ρ_D^* über den Querschnitt integriert die richtige Anzahl Elektronen liefert (siehe Anhang A.3). Des weiteren wurden die Streulängendichte der Wasserschicht ρ_W^* und die Übergangsbreite der Lipidkopfgruppe b_H^* konstant gehalten (*kursiv* bzw. mit Asterisk *).

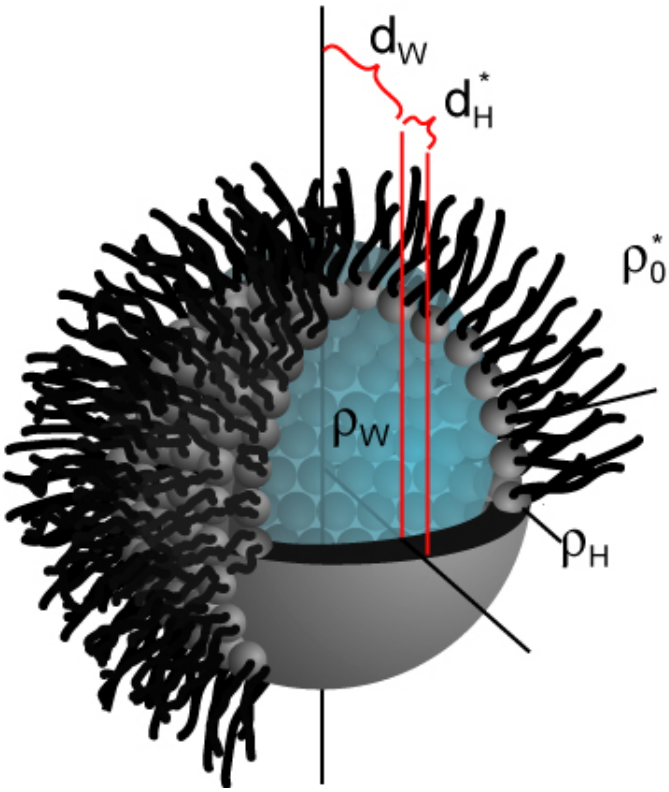


Abbildung 6.5.: Modell einer wassergefüllten inversen sphärischen Mizelle. Der Wasserkern im Inneren wird durch eine Monolage Lipid vom umgebenden Alkan abgetrennt.

Inverse sphärische Mizellen

Diese bestehen aus einem sphärischen Wasserkern, der von einer Lipidmonolage umgeben wird. Das erste Minimum in den Oszillationen im Porodregime befindet sich bei etwas $1,2\,\mathrm{nm}^{-1}$, daher können die Strukturgrößen $\frac{2\pi}{1.2}\,\mathrm{nm} \approx 5\,\mathrm{nm}$ nicht weit überschreiten, DNA kann also nicht in inversen sphärischen Mizellen gelöst vorkommen. Aus denselben Überlegungen wie bei den inversen zylindrischen Mizellen wurde eine polydisperse Wasserschicht und ein Strukturfaktor eingeführt, der die Volumenausschlußkräfte berücksichtigt (siehe Kapitel 3.4.1). Die Dicke der Kopfgruppe d_H^* blieb dabei konstant. Das Streulängendichteprofil wurde zur einfacheren Berechnung als stufenförmig ohne Übergänge angenommen, Anpassungsartefakte sind dabei nicht aufgetreten.

Die Parameter um dieses Modell zu beschreiben sind:

- Radius Wasserkern: d_W
- *Streulängendichte Wasserkern:* ρ_W^*
- Polydispersität des Wasserradius: z

- *Dicke Lipidkopfgruppe*: d_H^*
- Streulängendichte Lipidkopfgruppe: ρ_H
- Volumenanteil: n

Hiervon wurden die Streulängendichte des Wasserkern ρ_W^* und die Dicke der Lipidkopfgruppe d_H^* konstant gehalten (*kursiv* bzw. mit Asterisk *).

6.2.4. Strukturbestimmung

Aus dem sigmoidalen Elektronendichtemodell wird berechnet, wie sich die Moleküle in den Komplexen anordnen. Dazu wird aus dem Elektronendichteprofil $\rho(r)$ durch Integration die Anzahl der Elektronen und damit der Moleküle gewonnen.

Die DNA ist lokal als Zylinder angeordnet, deswegen wird die Integration in Zylinderkoordinaten durchgeführt

$$\int_0^L \int_0^{2\pi} \int_0^R \rho(r)\, r dr d\varphi dz = 2\pi L \int_0^R \rho(r)\, r dr \tag{6.4}$$

Das Elektronendichteprofil wird durch einen Summe sigmoidaler Verläufe modelliert

$$\rho(r) = \sum_i \frac{A_i}{1 + \exp\left(\frac{x_i - x}{r_i}\right)} \tag{6.5}$$

Hier sind x_i die Grenzen und r_i die Abfallraten der Übergänge. Die Amplituden A_i beschreibt die Elektronendichte in den jeweiligen Stufen. Die genaue Beschreibung des Elektronendichteprofils $\rho(r)$ findet sich in Anhang A.4.

Um die genaue molekulare Zusammensetzung der Mizellen zu bestimmen, muß aus den Streulängendichten die genaue Elektronenanzahl berechnet werden. Für Zylinder sind die Streulängendichten in Zylinderkoordinaten gegeben. Die Elektronenzahl folgt aus

$$N_{e^-} = L \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^R dr \rho(r)\, r = 2\pi L \int_0^R dr \rho(r)\, r \tag{6.6}$$

Die Vorgehensweise ist in Kugelsymmetrie analog:

$$N_{e^-} = \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\vartheta \sin\vartheta \int_0^R dr\, r^2 \rho(r) = 4\pi \int_0^R dr\, r^2 \rho(r) \tag{6.7}$$

Die Anzahl der jeweiligen Moleküle berechnet sich, indem man die Elektronenzahl N_{e^-} durch die Zahl der Elektronen pro Molekül teilt. So ergibt sich beispielsweise die Lipidzahl N_H oder die Zahl der Wassermoleküle N_W.

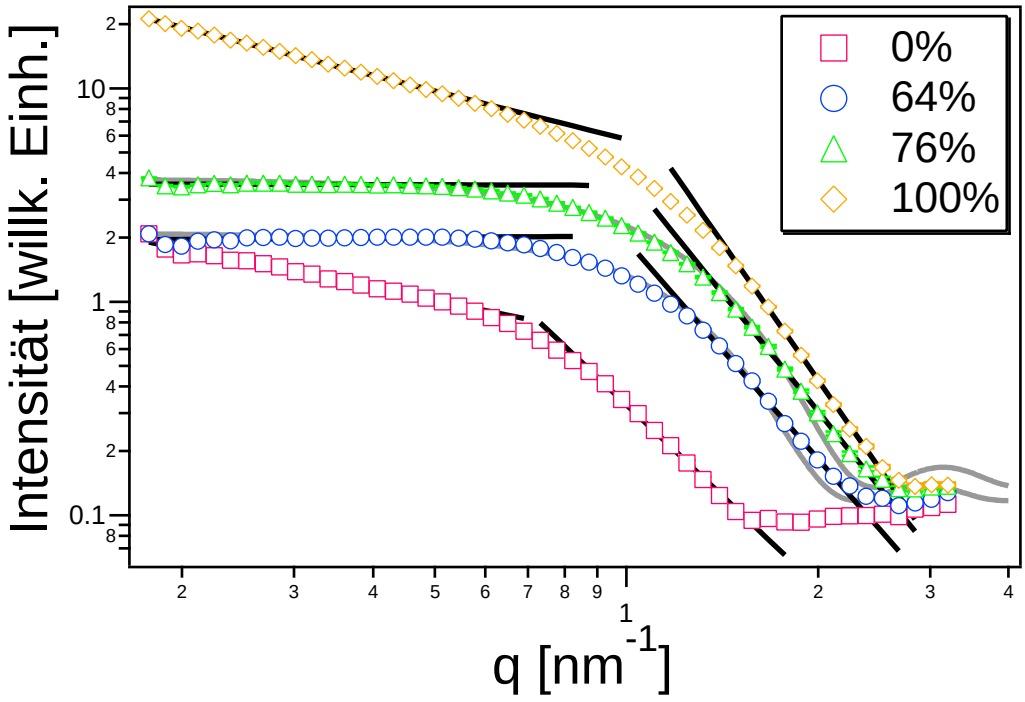


Abbildung 6.6.: Lipid in Dodekan ohne Zugabe von Wasser und DNA. Die Symbole zeigen die Daten für 0 %, 64 %, 76 % und 100 % DOPE Gehalt. Die durchgezogenen schwarzen Linien sind Anpassungen der Form q^{-D}. Die durchgezogenen grauen Linien entsprechen Anpassungen mit polydispersen sphärischen Mizellen mit einer homogenen Elektronendichteverteilung.

6.3. Ergebnisse

6.3.1. Lipid in Dodekan ohne Zugabe von Wasser und DNA

Die Struktur der Lipid/DNA-Komplexe wird durch die Lipide mitbestimmt, daher ist deren Struktur auch ohne DNA von Interesse. Es wurde die Lipidzusammensetzungen $\phi = 0\,\%$, 64 %, 76 % und 100 % in Dodekan untersucht.

Alle Kurven weisen in der Kratky Darstellung $q^2 \cdot I$ vs. q^2 (ohne Abbildung) einen mehr oder weniger ausgeprägte gaußförmige Spitze auf, die ein Hinweis auf kollabierte Partikel ist. In der doppellogarithmischen Darstellung weisen alle Kurven sowohl für geringe als auch hohe Impulsüberträge q eine eindeutige lineare Steigung auf. Die Streukurven für 64 % und 76 % zeigen das für punktförmige Partikel typische Plateau. Anpassungen mit polydispersen sphärischen Strukturen mit einer homogenen Elektronendichte für diese Mischungsverhältnisse ergeben Strukturen mit einem Radius von $r = 1,9\,\mathrm{nm}$ für $\Phi = 64\,\%$ und $r = 1,8\,\mathrm{nm}$ für $\Phi = 76\,\%$. Diese Werte sind für einfache sphärische Mizellen mit nach innen gerichteten Kopfgruppen und nach außen gerichteten Alkylketten mit derselben Elektro-

Tabelle 6.1.: Anpassungsparameter aus der Beziehung q^{-D} für das System ohne Wasser und DNA.

Φ	D Guinierregime	χ^2_r	Bereich [nm^{-1}]	D Porodregime	χ^2_r	Bereich [nm^{-1}]
0 %	0,609±0,008	1,4	0,2-0,6	2,83±0,04	0,653	0,9-1,6
64 %	0,023±0,006	2,0	0,2-0,6	3,40±0,04	1,411	1,3-2,1
76 %	-0,009±0,005	3,5	0,2-0,5	3,68±0,03	3,122	1,4-2,4
100 %	0,752±0,001	6,9	0,2-0,5	4,28±0,03	3,316	1,6-2,5

Tabelle 6.2.: Anpassungsparameter für sphärische Mizellen bei einem DOPE Anteil von 64 % und 76 %. Die Elektronendichte wurde auf 500 e$^-$/nm^3 fixiert.

	64 %	76 %
r [nm]	1,95	1,82
Polydispersität	0,033	0,024
Volumenbruchteil	0,048	0,025
χ^2	18,3	26,3

nendichte wie die Umgebung zu hoch, so daß hier kompliziertere Aggregate zu vermuten sind.

Die reinen Lipide zeigen in der doppellogarithmischen Darstellung mit $D = 0,75$ für DOPE und $D = 0,6$ für DOTAP eine ungewöhnliche Steigung D im Guinierregime. Bekannterweise ist diese Steigung gleich der fraktalen Dimension d der Streukörper für Volumenintegrale und gleich $6 - d$ für Oberflächenintegrale [37]. Unter der Annahme, daß es sich um ein fraktales Systeme handelt, kann man schließen, daß es zwischen punktförmig und zylinderförmig angesiedelt ist. Für reines DOPE ist die Dimension im Porodregime nahe $D = 4$, was auf eine beinahe glatte Oberfläche schließen läßt. Für reines DOTAP folgt aus der Steigung eine Dimension von $D = 3,2$, die auf eine unregelmäßige Oberfläche hindeutet. Um hier eine bessere Aussage machen zu können, müßte das Skalenverhalten über mehrere Größenordnungen beobachtet werden.

6.3.2. Einfluß des Wassergehaltes auf die Lipid/DNA-Komplexe

Der Einfluß des Wassergehaltes bei Anwesenheit von DNA wurde exemplarisch für einen DOPE Gehalt von $\Phi = 76\,\%$ untersucht. Es konnte nachgewiesen werden (Absatz 6.3.4 sowie FCS Ergebnisse aus [17]), daß bei dieser Lipidzusammensetzung annähernd die gesamte DNA ($\geq 90\,\%$) in Alkan übergegangen ist. Die Proben wurde wie in Kapitel 2.1 beschrieben präpariert. Die Wassermenge wurde so abgemessen, daß sich bei einem vollständigen Transfer der DNA in die Alkanphase eine abgeschätzte Hydrationschicht von 0, ½, 2, 4

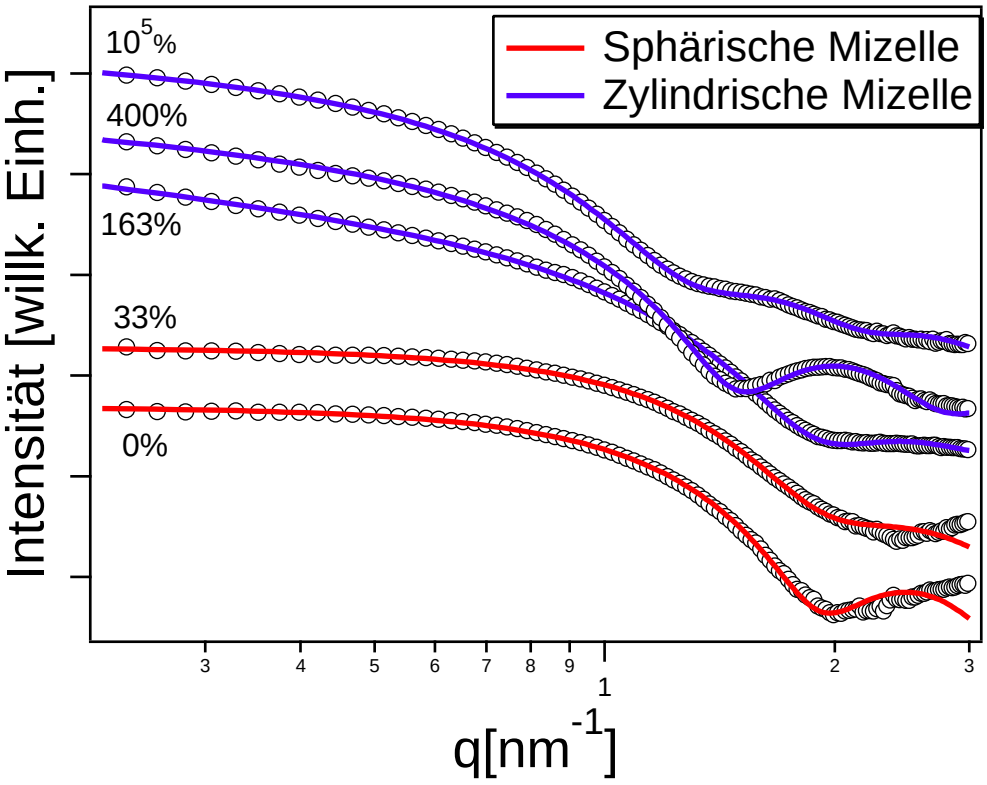


Abbildung 6.7.: Streukurven von Lipid/DNA Mischungen in Dodekan bei einem DOPE Gehalt von 76 % und variierendem Wassergehalt. Das Gewichtsverhältnis Wasser zu DNA beträgt von unten nach oben 0 %, 33 %, 163 %, 400 % und 10^5 %. Die durchgezogenen Anpassungskurven sind für 0 % und 33 % die einer sphärischen Mizelle (rot), für die restlichen Kurven zylindrische Mizellen mit einem DNA Kern (blau). Die Kurven wurden zur besseren Darstellung jeweils um einen Faktor 3 skaliert.

und beliebig viele Monolagen Wasser um die DNA anlagern können. Die entsprechende Menge Wasser ω ist hierfür (pro mg DNA) 0 $\frac{\mu l}{mg}$, 0,33 $\frac{\mu l}{mg}$, 1,63 $\frac{\mu l}{mg}$, 4 $\frac{\mu l}{mg}$ und 1,0 $\frac{ml}{mg}$, bzw. in relativen Einheiten (Gewichtsprozent Wasser zu DNA) 0 %, 33 %, 163 %, 400 % und 10^5 %.

Abbildung 6.7 zeigt die Streudaten in doppellogarithmischer Darstellung mit den entsprechenden Anpassungskurven. Für $\omega = 0\,\%$ bzw. 33 % zeigen die Kurven die für sphärische Strukturen typischen Plateaus. Anpassungen mit sphärischen Mizellen ergeben Mizellen mit einem Wasserkern mit Radius $d_W = 1,5\,\mathrm{nm}$ für $\omega = 0\,\%$ und Radius $d_W = 1,3\,\mathrm{nm}$ für $\omega = 33\,\%$. Hierbei wurde die Elektronendichte der Schale auf $\rho_H^* = 500\,\mathrm{e^-/nm^3}$ und die Dicke der Schale auf $d_H^* = 0,56\,\mathrm{nm}$ gesetzt, da sonst die Anpassungen instabil wurden. Die Kurven passen bei höherem Impulsübertrag nicht gut mit den Daten überein, so daß zwar von sphärischen Strukturen in etwa der angegeben Größe ausgegangen werden kann, die genau Struktur aber unsicher bleibt.

Für Proben mit höherem Wassergehalt von $\omega = 163\,\%$, $400\,\%$ und $10^5\,\%$ zeigt die Steigung für niedrigen Impulsübertrag den typischen q^{-1} Abfall zylindrischer Strukturen. Die Anpassungskurven für zylindrische Mizellen passen über den kompletten Bereich gut mit den Daten überein. Auffallend war auch hier die Instabilität der Anpassungen. So liegt die Abweichung der Lipiddicke Δd_H in derselben Größenordnung wie der Parameter d_H selbst. Aus den Anpassungen läßt sich schließen, daß die Änderungen in dem Streuverhalten hauptsächlich durch den vermehrten Einbau von Wassermolekülen verursacht wird. Die Anzahl steigt pro nm Länge von $N_W = 51$ bei $\omega = 163\,\%$ über $N_H = 80$ bis auf $N_H = 85$ bei $\omega = 10^5\,\%$. Gleichzeitig steigt die Position der Lipidkopfgruppen von $r_H = 1,48\,\mathrm{nm}$ über $1,8\,\mathrm{nm}$ nach $1,96\,\mathrm{nm}$.

Bei niedrigem Wassergehalt kann die DNA nicht ausreichend hydratisiert werden. Sie bleibt daher in der Wasserphase und das Lipid bildet sphärische Mizellen mit einem Wasserkern.

6.3.3. Unterschiede mit und ohne DNA Zugabe

Der Unterschied zwischen den Komplexen mit und ohne DNA wurde an Lipidmischungen mit einem DOPE Gehalt von $0\,\%$, $64\,\%$, $76\,\%$ und $100\,\%$ untersucht. Die Probe wurde wie in Kapitel 2.1 beschrieben präpariert, mit der Änderung, daß der Hälfte der Probe keine DNA hinzu gegeben wurde.

Abbildung 6.8 zeigt die Streuintensitäten für die ternären Lipid/Wasser/Alkan Mischungen sowohl mit als auch ohne der Zugabe von DNA als vierte Komponente in doppellogarithmischer Darstellung mit den entsprechenden Anpassungskurven. Messungen wurden in der Alkanphase für vier verschiedene DOPE Anteile Φ von $0\,\%$, $64\,\%$, $76\,\%$ und $100\,\%$ durchgeführt.

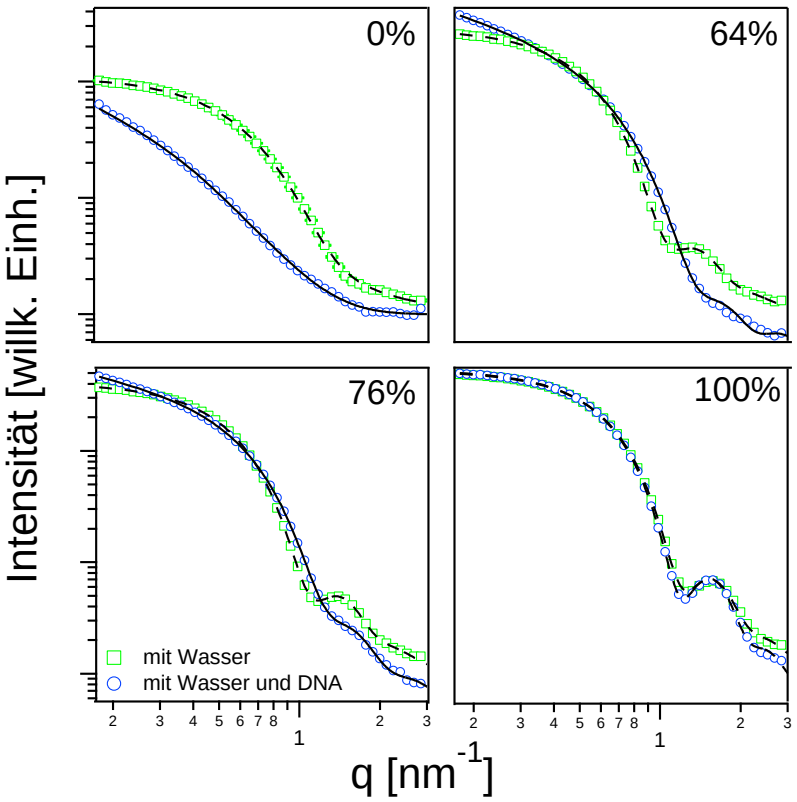
100 %

Für $\Phi = 100\,\%$ sind die Streukurven mit und ohne DNA beinahe identisch. Beide zeigen das typische Plateau sphärischer Teilchen und können mit dem Modell der inversen sphärischen Mizellen (siehe Abbildung 6.5) angepaßt werden. Anpassungen beider Kurven zeigen nur geringe Unterschiede und ergeben einen Wasserradius von $d_W = 2,5\,\mathrm{nm}$ ohne und $d_W = 2,6\,\mathrm{nm}$ mit DNA, sowie eine Elektronendichte der Lipidkopfgruppen von $\rho_H = 435\,\mathrm{e^-/nm^3}$ ohne und $\rho_H = 456\,\mathrm{e^-/nm^3}$ mit DNA

Die Bildung sphärischer Strukturen ist naheliegend, da hier nur zwitterionische Lipide im System vorliegen. Die elektrostatische Wechselwirkung kann daher die Bildung von Lipid/DNA-Komplexen nicht induzieren. Die DNA wird in der Wasserphase bleiben und die Lipide in der Alkanphase inverse Mizellen bilden.

64 % und 76 %

Streukurven bei $\Phi = 64\%$ und $76\,\%$ für Systeme ohne DNA zeigen wieder das typische Plateau sphärischer Teilchen. Anpassungen mit inversen sphärische Mizellen ergeben einen



d

Abbildung 6.8.: Streuintensitäten eines in der Alkanphase gemessenen Lipid/Wasser/Dodekan-Systems. Es werden Streukurven mit DNA (○) und ohne DNA (□) für einen DOPE Gehalt von $\Phi = 0\,\%$, $64\,\%$, $76\,\%$ und $100\,\%$ gezeigt. Anpassungen mit einem zylindrischen Modellen sind als durchgezogenen Linie und mit sphärischen Modellen als gestrichelte Linie gezeigt.

Wasserradius von $d_W = 3,0\,\text{nm}$ für $\Phi = 64\,\%$ und $d_W = 2,9\,\text{nm}$ für $\Phi = 76\,\%$. Die Elektronendichte der Kopfgruppen ρ_H beträgt $\rho_H = 472\,\text{e}^-/\text{nm}^3$ beziehungsweise $446\,\text{e}^-/\text{nm}^3$. Dagegen zeigen Systeme mit DNA für niedrige Impulsüberträge das typische q^{-1} Verhalten zylindrischer Strukturen. Aus Anpassungen mit inversen zylindrischen Mizellen leitet man $N_W = 76 \pm 3$ Wassermoleküle pro DNA Basenpaar für $\Phi = 64\,\%$ ab, beziehungsweise $N_W = 71 \pm 6$ Wassermoleküle für $\Phi = 76\,\%$. Für gute Anpassungen muß die Korrelationen der Teilchen untereinander in dem Modell berücksichtigt werden, was mit einer hohen Transferrate der DNA von Wasser nach Alkan übereinstimmt.

Die Anwesenheit der DNA scheint einen Übergang von sphärischen zu zylindrischen Mizellen zu induzieren. Durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen kationischem Lipid und DNA wird das vorgeschlagene System aus zylindrischen Strukturen mit einem Kern aus hydratisierter DNA favorisiert. Die von Koltover et al. [28] durchgeführte Arbeit

mit den selben Lipid/DNA Mischungen, allerdings ohne Alkan, zeigen ein von Φ abhängiges Phasenverhalten mit lamellaren und hexagonalen Strukturen, jeweils mit und ohne DNA. Des weiteren ist bekannt, daß kleinere Mengen Alkan die Bildung invertierter hexagonaler Phasen induzieren können [7, 8, 26, 55, 72]. Bei Alkanüberfluß, wie in unserem Fall, können weder hydrophobe noch elektrostatische Wechselwirkung diese Strukturen stabilisieren und es bilden sich die vorgeschlagenen zylinderartigen Mizellen.

0 %

Bei $\Phi = 0\,\%$ sind erhebliche Unterschiede zwischen den Streukurven mit und ohne DNA zu erkennen. Die Streukurve der Probe ohne DNA zeigt erneut das typische Plateau sphärischer Partikel. Eine Anpassung mit dem Modell der invertierten sphärischen Mizellen ergibt ein Wasserradius von $d_W = 2,0\,\mathrm{nm}$ und eine Elektronendichte der Lipidkopfgruppe von $\rho_H = 438\,\mathrm{e^-/nm^3}$. Die Streukurven der Probe mit DNA ist in Übereinstimmung mit dem Modell der invertierten zylindrischen Mizelle. Aus der Anpassung kann man $N_H = 1,2$ Moleküle DOTAP und eine dünne Wasserschicht aus $N_W = 23$ Molekülen pro DNA Basenpaar ableiten. Es kann keine Korrelation der Teilchen untereinander in der Anpassung berücksichtigt werden, daher wird eine niedrige Konzentration der Komplexe in Alkan gefolgert.

Die Oberfläche der DNA pro Basenpaar ist näherungsweise $210\,\mathrm{Å^2}$. Dies folgt aus einem DNA Radius von 10 Å und einem Basenabstand von 3,3 Å. Die typische Fläche einer Lipidkopfgruppe liegt etwa zwischen $30\,\mathrm{Å^2}$ und $70\,\mathrm{Å^2}$. 1,2 Lipidmoleküle pro Basenpaar sind daher nicht ausreichend, um eine geschlossene Schale um die DNA herum zu bilden. Deswegen wird hier ein Modell vorgeschlagen, bei der Wasser und Lipid auf die hydrophilen Teile der DNA beschränkt bleiben und die hydrophoben Taschen der DNA in direkten Kontakt mir dem umgebenden Alkan geraten. Die Mittelung entlang der DNA Achse ist dann für die niedrigen Werte verantwortlich.

6.3.4. Einfluß der Lipidzusammensetzung

Die Ergebnisse aus Absatz 6.3.3 zeigen einen starken Einfluß der Lipidzusammensetzung Φ auf das Streuverhalten der Lipid/DNA-Komplexe. Dieser Einfluß wurde hier für das Alkan Dodekan detailliert betrachtet. Die Probe wurde, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, präpariert.

Abbildung 6.9 zeigt die in den Alkanphasen gemessenen Streudaten der quaternären Lipid/DNA/Wasser/Alkan Mischungen in doppellogarithmischer Darstellung mit den entsprechenden Anpassungskurven. Der Gehalt an DOPE Φ wurde von 0 % bis 100 % variiert, wobei besondere Aufmerksamkeit auf den Bereich zwischen 60 % und 100 % gelegt wurde. Wie in Abschnitt 6.2.1 beschrieben wird, können den Streukurven anhand der Güte der Anpassung und den physikalischen Einschränkungen jeweils die Anpassungen eines sphärischen oder zylindrischen Modells zugeordnet werden.

Das reduzierte Chi-Quadrat χ^2_r der verwendeten Anpassungen ist in Abbildung 6.10 in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung Φ dargestellt. Proben mit Φ zwischen 0 %

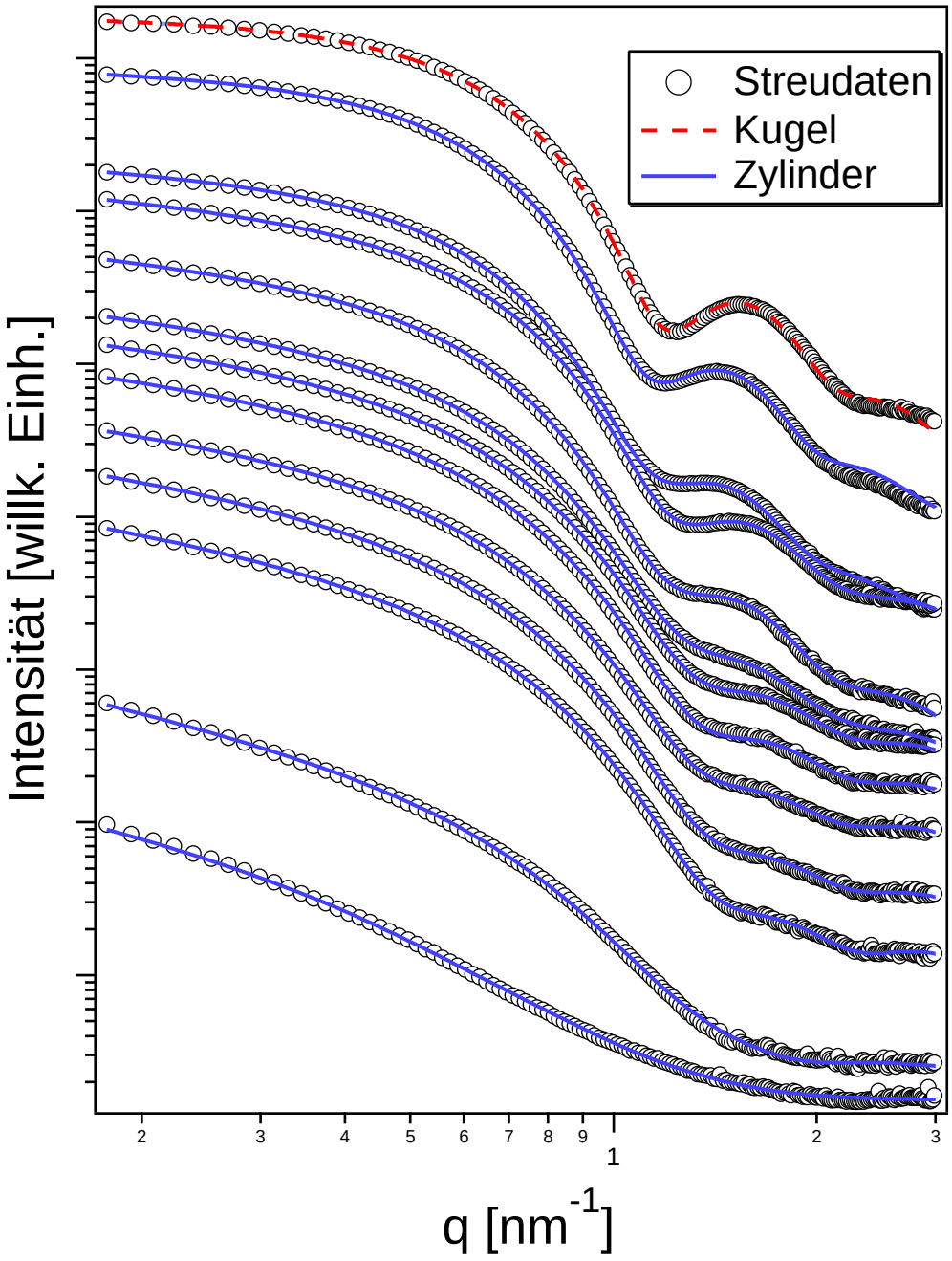


Abbildung 6.9.: Streuintensität der Lipid/DNA-Komplexe in Dodekan für verschiedene Lipidzusammensetzungen. Die Kurven entsprechen von unten nach oben 0 %, 20 %, 60 %, 64 %, 68 %, 72 %, 74 %, 76 %, 80 %, 84 %, 86 %, 94 %, 100 % DOPE. Für 0 % bis 94 % geben die durchgezogenen Linien Anpassungen für kombinierte sphärische und zylindrische Modelle. Die gestrichelte Linie bei 100 % stammt von einem rein sphärischen Modell. Daten und Anpassungen wurden um einen Faktor skaliert, der Φ entspricht.

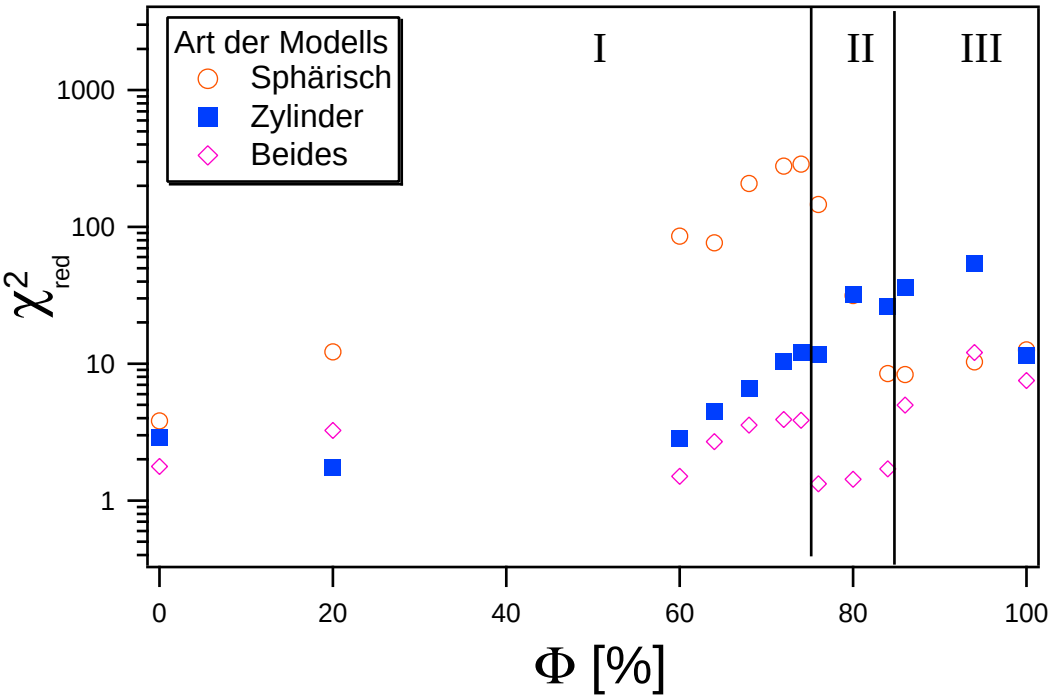


Abbildung 6.10.: Reduziertes Chi Quadrat χ_r^2 in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung Φ für sphärische (○) und zylindrische Mizellen (■) sowie der Kombination beider Modelle (◇). Über den gesamten Φ kann man drei Gebiete unterscheiden: sphärischen Strukturen (I), zylindrischen Strukturen (III) und einer Mischung beider (III).

und 84 % können mit dem zylindrischen Modell angepaßt werden, Proben mit Φ zwischen 74 % und 100 % mit dem Modell der sphärischen Mizellen. Zylindrische Anpassungen in diesem Bereich mit niedrigem χ_r^2 können aufgrund unphysikalischen Parameter ausgeschlossen werden. Insgesamt läßt sich auf einen Übergang von zylindrischen zu sphärischen Strukturen mit einer Zweikomponentenbereich zwischen 74 % und 84 % schließen. Daher wurden Anpassungen mit einem Zweikomponentensystem beider Strukturen durchgeführt, wobei F dem Anteil an zylindrischen Objekten entspricht. Es wurden die Ergebnisse der Anpassung der rein zylindrischen Modelle als Startparameter verwendet, die Parameter d_H, ρ_H und n des sphärischen Anteils wurde durch die Ergebnisse der Anpassung für $\Phi = 100\,\%$ festgelegt und während der Anpassung konstant gehalten. Zusammen mit F ist der Wasserradius d_W der sphärischen Mizelle der einzige zusätzliche freie Parameter. In Abbildung 6.9 sind die Anpassungen als durchgezogenen Linien für das Zweikomponentenmodel und als gestrichelte Linie für das rein sphärische Modell dargestellt. Ein Modell aus zylindrischen Mizellen ohne DNA im Wasserkern liefert in keinem Fall mögliche Anpassungen, kann also ausgeschlossen werden.

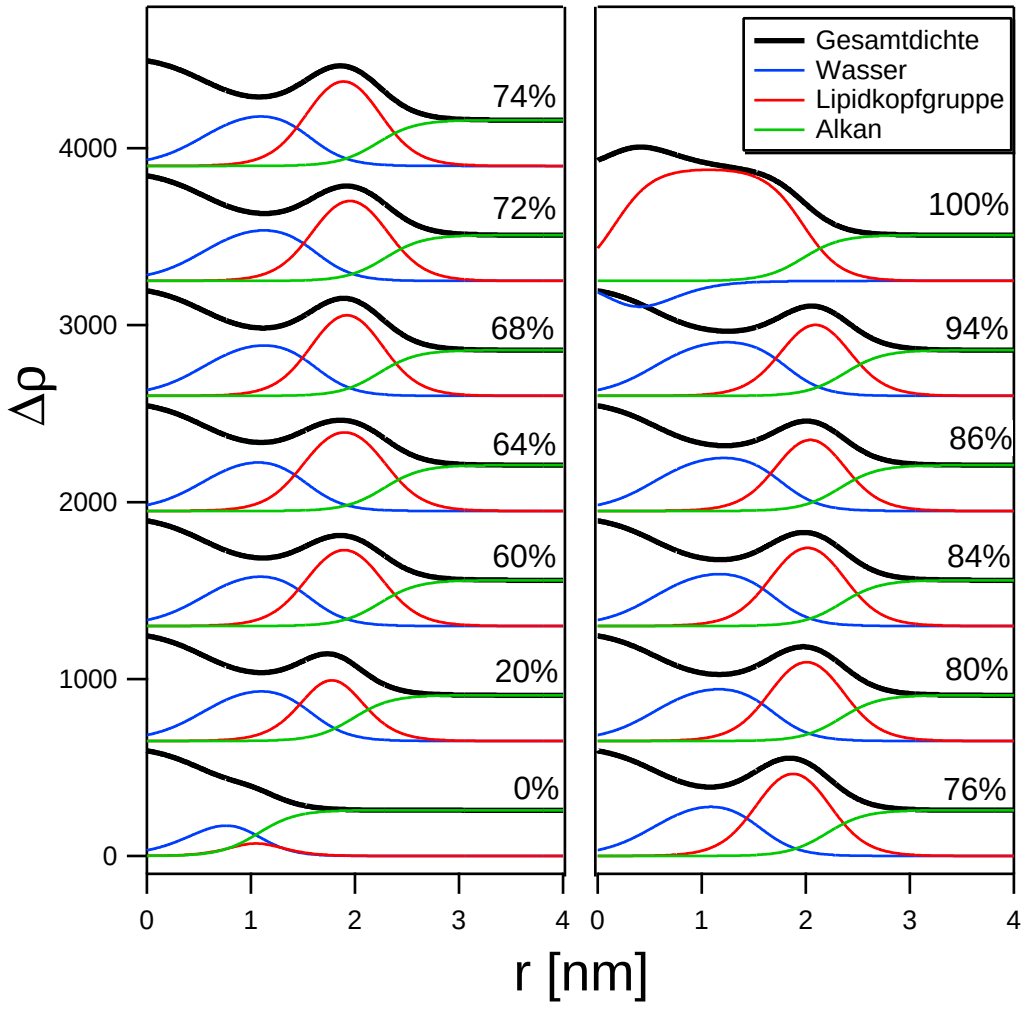


Abbildung 6.11.: Elektronendichteprofile der zylindrischen Anteile für verschiedene Lipidzusammensetzungen. Die dicke schwarze Linie ist das angepaßte gesamte Elektronendichteprofil. Die grünen Linien sind die des Dodekans, roten der Lipidkopfgruppen und blauen der Wasserschicht. Die Elektronendichte des DNA Kerns wurde nicht dargestellt, da es als konstant angenommen wurde.

Abbildung 6.11 zeigt die aus den Anpassungen gewonnenen Elektronendichteprofile der zylindrischen Anteile für die entsprechenden Lipidkonzentrationen. Die schwarze Linie ist das angepaßte gesamte Elektronendichteprofil. Die grünen Linien sind die Anteile des Dodekans, roten der Lipidkopfgruppen und blauen der Wasserschicht. Da der Elektronendichteverlauf des DNA Kerns während den Anpassungen konstant blieb, wird er hier nicht dargestellt (siehe dazu Abb. 6.4).

Das Elektronendichteprofil für $\Phi = 0\,\%$ zeigt den im letzten Abschnitt diskutierten Fall eines Komplexes, bei dem die Lipidhülle nicht vollständig aufgefüllt ist. Das Maximum der

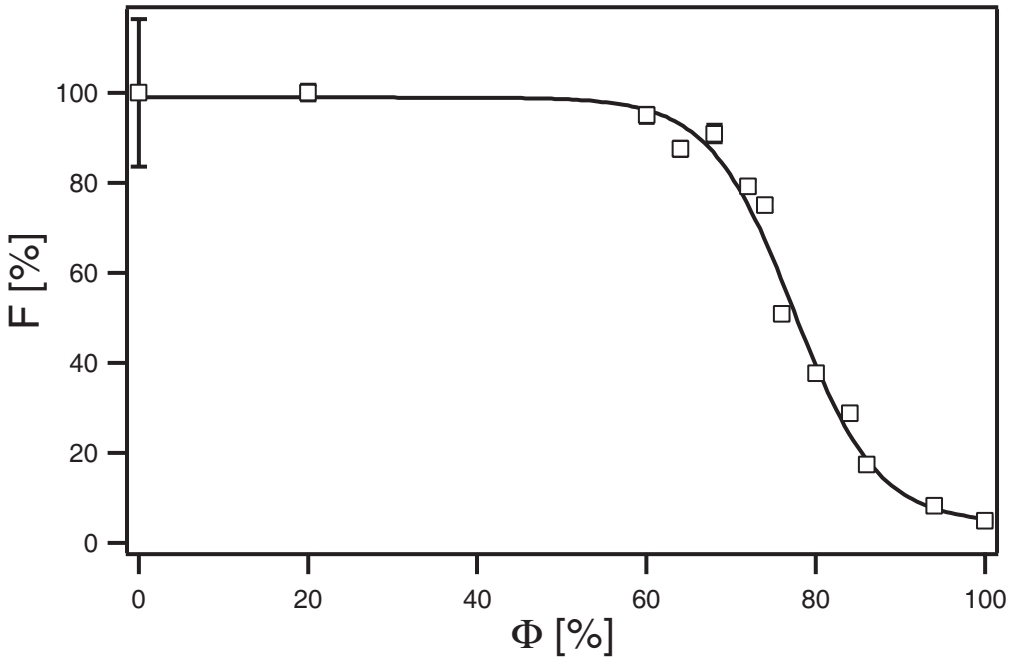


Abbildung 6.12.: Anteil F der zylindrischen Mizellen bei verschiedenen DOPE Gehalt Φ. Zwischen $\Phi = 0\,\%$ und $72\,\%$ ergeben Anpassungen keinen Hinweis auf sphärische Mizellen. Ab $\Phi = 74\,\%$ erhöht sich der Anteil der sphärischen Mizellen bis zu $100\,\%$ für reines DOPE. Die durchgezogenen Linie entspricht eine sigmoidale Anpassung mit einem Übergangspunkt bei $\Phi = 77,4\,\%$.

Elektronendichte der Lipidköpfe liegen direkt am Rand der DNA bei $r_H = 1\,\mathrm{nm}$ Radius, der Wasseranteil ist mit umgerechnet $N_W = 23$ Wassermoleküle pro DNA Basenpaar kaum vorhanden. Zudem weist die Dicke der Wasserschicht eine hohe Polydispersität von $z = 0,9$ auf (ohne Abbildung).

Bereits die nächste Elektronendichteverteilung bei $\Phi = 20\,\%$ zeigt den für alle weiteren Profile typischen Verlauf. Der Wasseranteil beträgt $V_W = 6,6\,\mathrm{nm}^3$ pro nm Länge bei einer Polydispersität von $z = 0,3$. Bei dieser Lipidzusammensetzung ist die Hülle bereits vollständig geschlossen und eine ausgeprägte Wasserschale kann sich bilden.

Im übrigen Verlauf von Φ nimmt der Wasseranteil bis hin zu $N_W = 101$ Wassermoleküle bei $\Phi = 94\,\%$ zu. Die Polydispersität des Wasserradius sinkt von $z = 0,2$ bei $\Phi = 60\,\%$ bis zu $z = 0,1$ bei $\Phi = 94\,\%$. Gleichzeitig erhöht sich die Position der Lipidköpfe von $r_H = 1,8\,\mathrm{nm}$ bei $\Phi = 20\,\%$ bis hin zu $r_H = 2,1\,\mathrm{nm}$ bei $\Phi = 94\,\%$.

Für $\Phi = 100\,\%$ kann das zylindrische Modell die Daten nicht erklären, da hier die Kopfgruppen eine physikalisch unmögliche Dicke aufweisen.

Abbildung 6.12 stellt die Abhängigkeit des Verhältnisses zwischen zylindrischen und sphärischen Mizellen F von dem DOPE Anteil Φ dar. Die durchgezogene Linie entspricht

einer Anpassung zu der sigmoidalen Funktion $F(\Phi) = 1/(1+\exp((\Phi-\Phi_0)/\Delta\Phi))$. Es ergibt sich einen Übergangspunkt $\Phi_0 = 77,4\,\%$ und eine Übergangsbreite von $\Delta\Phi = 5,0\,\%$.

Abhängig vom DOPE Anteil Φ durchläuft das System drei Phasen. Zwischen $\Phi = 0\,\%$ und $72\,\%$ kommen nur zylinderartige Mizellen in Alkan gelöst vor. Bei Abwesenheit von DOPE bei $\Phi = 0\,\%$ sind nicht genug Lipide vorhanden, um die DNA komplett zu umhüllen und gleichzeitig ladungsneutrale Komplexe zu erhalten. Dennoch treten die bereits zuvor beschriebenen zylindrischen Komplexe mit einer unvollständigen Hülle aus DOTAP auf. Mit steigendem Φ sind genug Lipide vorhanden, und die Lipidhülle kann sich füllen. Zwischen $\Phi = 72\,\%$ und $82\,\%$ existiert ein Koexistenzbereich mit zylindrischen und sphärischen Mizellen. Bei noch höheren DOPE Gehalt ist es es sterisch nicht mehr möglich, alle DOPE Moleküle in der Hülle unterzubringen und der Überschuß formt Mizellen ohne DNA. Bei Φ über $84\,\%$ kann kein Hinweis auf zylindrische Strukturen mehr festgestellt werden. Entweder ist das vorhandene DOTAP ebenfalls in den neu entstandenen Mizellen gelöst und DNA kann nicht mehr in Alkan gelöst werden, oder das schwache Intensitätssignal der zylindrischen Mizellen wird durch das Signal der sphärischen überlagert. Bei $\Phi = 100\,\%$ kann keine elektrostatische Wechselwirkung die Bildung zylindrischer Strukturen in Alkan induzieren.

Die obigen Ergebnisse zeigen einen Einfluß von Φ auf das Phasenverhalten der Lipid/DNA-Komplexe, deswegen ist auch die Zahl der in den zylinderartigen Mizellen eingebauten Lipide von Interesse. Abbildung 6.13 zeigt die Elektronenzahl N_e, also die integrierte Elektronendichte der Kopfgruppe pro Einheitslänge, in Abhängigkeit von Φ. Mit steigendem Φ kann ein hyperbolisches Anwachsen der Elektronenzahl N_e festgestellt werden (durchgezogenen Linie). Dies kann durch eine Zunahme der an den DNA gebundenen Lipide erklärt werden. Im Gegensatz zur divergierenden Zahl der Lipide im Gesamtsystem, konvergiert die Elektronenzahl der Lipide in der Hülle gegen $5,3 \cdot 10^3\,\mathrm{e^-/nm}$ bei $\Phi = 100\,\%$. Unter der Annahme ladungsneutraler Komplexe bedeutet dies eine Lipidzusammensetzung Φ_{DNA} der mit der DNA komplexierten Lipide von $\Phi_{\mathrm{DNA}} = 90\,\%$. Dies entspricht 2 Moleküle DOTAP und 17,4 Moleküle DOPE pro DNA Basenpaar. Die gestrichelte Linie in Abbildung 6.13 zeigt die Elektronenzahl N_e' unter der Annahme, daß die Lipidzusammensetzung auf der DNA gleich der zugegebenen Lipidzusammensetzung ist ($\Phi_{\mathrm{DNA}} = \Phi$). Es ist offenkundig, daß diese Annahme nicht zutreffen kann. Da das System auf Ladungsneutralität beschränkt ist, konvergiert das Verhältnis zwischen der Anzahl der Lipide und DNA-Basenpaare $\frac{2}{(1-\Phi)}$ für $\Phi \to 100\,\%$. Es können daher aus sterischen Gründen nicht alle Lipide vollständig in die zylinderartigen Mizellen eingebaut werden. Auf der anderen Seite wird eine geschlossene Schale bevorzugt werden, deswegen ist im Gegensatz zur ursprünglichen Lipidmischung ein Überschuß DOPE an die DNA ($\Phi_{\mathrm{DNA}} > \Phi$) gebunden.

Dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit der Konzentration der Mizellen, dargestellt in Abbildung 6.14. Für zylindrische Strukturen wird die Konzentration vom Interpartikel-Korrelationsparamter n aus Gleichung 3.55 abgeleitet. In erster Näherung ist n proportional zur Konzentration C. Die Konzentration der sphärischen Mizellen ist direkt aus dem Hard-Sphere-Strukturfaktor als Volumenprozent abgeleitet. In beiden Fällen wird angenommen,

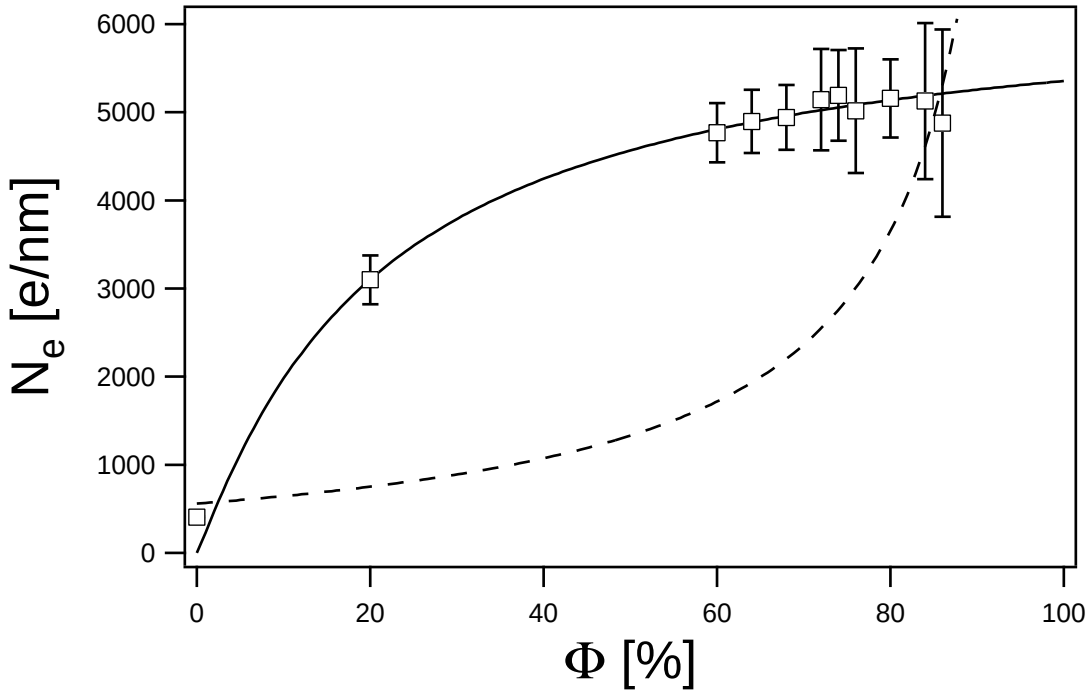


Abbildung 6.13.: Anzahl der Elektronen der Lipidkopfgruppen pro Einheitslänge entlang der DNA Achse. Die durchgezogene Linie entspricht eine hyperbolische Anpassung an die Daten. Die gestrichelte Linie entspricht einer theoretischen Elektronenzahl unter der Annahme, daß die Lipidzusammensetzung auf der DNA Φ_{DNA} gleich der Zusammensetzung der Präparation Φ ist.

daß nur Wechselwirkung zwischen Partikeln derselben Art stattfindet. Mit steigendem Φ zeigt das System eine starke Zunahme der zylinderartigen Mizellen in der Alkanphase.

Die Abhängigkeit des Korrelationsparameters n von Φ läßt sich mit einer modifizierten Sigmoidalfunktion anpassen:

$$n(\Phi) \propto \frac{1}{1+\exp\left(\left(\frac{\Phi_0-\Phi}{r}\right)^p\right)} \tag{6.8}$$

Die Anpassung ergibt die Parameter $r = 50\,\%$ und $p = 0,45$. Φ_0 wurde auf $\Phi_0 = 100\,\%$ festgehalten.

6.3.5. Einfluß der Lösungsmittel

Der Einfluß unterschiedlicher Alkansorten wurde exemplarisch für eine DOPE Gehalt Φ von 0 %, 64 %, 76 %, 86 % und 100 % für die Alkane Oktan, Dekan und Dodekan untersucht. Die Probe wurde wie in Kapitel 2.1 beschrieben präpariert. Abbildung 6.15 zeigt die Streudaten mit den entsprechenden Anpassungskurven.

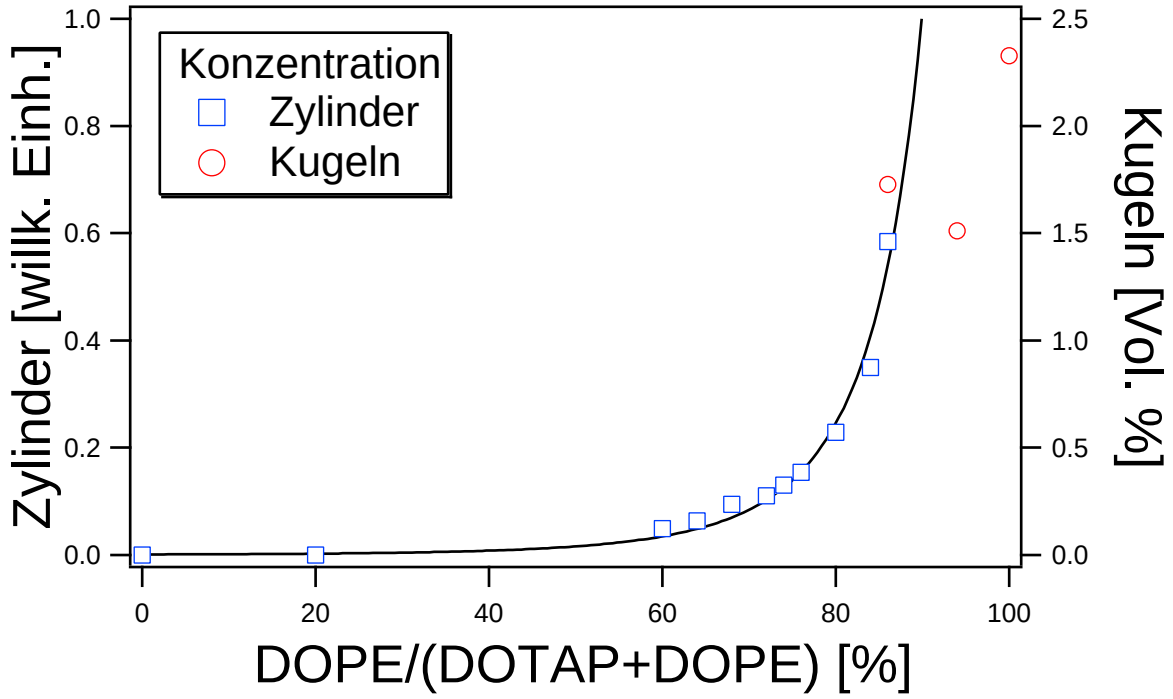


Abbildung 6.14.: Aus der Interpartikelkorrelation abgeleitete Konzentration der Komplexe. Die Werte für Zylinder werden als Teilchenkonzentration in willkürlichen Einheiten angegeben und steigen monoton von 0 bei 0 % DOPE bis 0,6 bei 86 % DOPE. Die Konzentration der sphärischen Strukturen schwankt um 18 % (Volumen-%). Die durchgezogene Linie zeigt eine Anpassung mittels einer modifizierten Sigmoidalfunktion.

100 %

Alle Streukurven für $\Phi = 100\,\%$ lassen sich mit den Formfaktoren der inversen sphärischen Mizellen anpassen. Von Oktan über Dekan nach Dodekan steigt die Größe des Wasserkerns von $d_W = 2,5\,\mathrm{nm}$ über 2,6 nm bis auf 2,7 nm. Die Elektronendichte der Kopfgruppen steigt von $\rho_H = 425\,\mathrm{e^-/nm^3}$ über $443\,\mathrm{e^-/nm^3}$ auf $474\,\mathrm{e^-/nm^3}$. Da für alle Systeme dieselbe Lipidzusammensetzung verwendet wurde, bedeutet dies, daß die Packungsdichte der Lipide von Oktan nach Dodekan zunimmt.

86 %

Die Streuintensitäten bei $\Phi = 86\,\%$ lassen sich in Dekan und Dodekan durch das Modell der inversen sphärische Mizellen anpassen. Bei Dekan ergibt die Anpassung eine Größe des Wasserkerns von $d_W = 3,1\,\mathrm{nm}$ und eine Elektronendichte der Kopfgruppen von $\rho_H = 422\,\mathrm{e^-/nm^3}$. Bei Dodekan ergibt die Anpassung eine Größe des Wasserkerns von $d_W = 3,0\,\mathrm{nm}$ und eine Elektronendichte der Kopfgruppen von $\rho_H = 430\,\mathrm{e^-/nm^3}$.

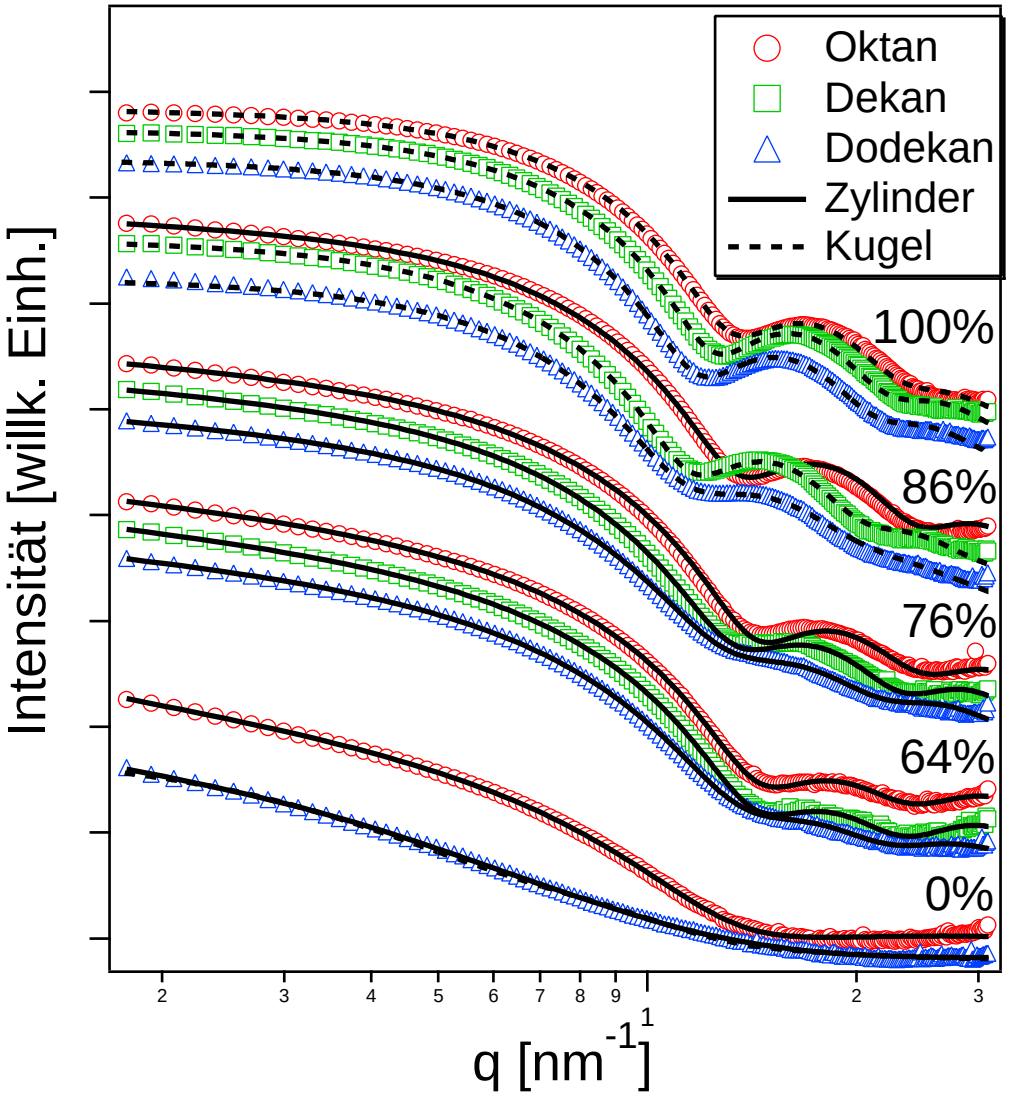


Abbildung 6.15.: Streuintensität der Lipid/DNA-Komplexe in Oktan, Dekan und Dodekan und den Lipidzusammensetzungen 0 %, 64 %, 76 %, 86 %, und 100 % DOPE. Bei 0 % konnte in Dekan keine Streusignal der Komplexe gemessen werden. Für 0 %, 64 % und 76 % sind alle Daten durch zylindrische Modelle anpaßbar. Bei 86 % Dodekan liegen in Oktan noch als zylindrische Mizellen vor, für die anderen Alkane mißt man hier sphärische Mizellen. Bei 100 % DOPE liegen in allen Alkanen sphärische Mizelle vor.

Tabelle 6.3.: Die aus den Anpassungen abgeleiteten molekularen Größen der Lipid/DNA Mischung bei einem DOPE Gehalt von 76 % in unterschiedlichen Alkanen. In allen untersuchten Alkanen lagen zylindrische Mizelle vor.

76 %	Oktan	Dekan	Dodekan
r_L [nm]	1,91±0,04	2,02±0,03	1,96±0,03
ρ_L [e$^-$/nm^3]	498±7	543±10	603±18
N_W	57±4	80±3	85±2

Tabelle 6.4.: Die aus den Anpassungsparametern abgeleiteten molekularen Größen der Lipid/DNA Mischung bei einem DOPE Gehalt von 64 % in unterschiedlichen Alkanen. In allen untersuchten Alkanen lagen zylindrische Mizelle vor.

64 %	Oktan	Dekan	Dodekan
r_L [nm]	2,039±0,008	2,04±0,06	1,95±0,04
ρ_L [e$^-$/nm^3]	445±3	452±13	511±13
N_W	77	77±6	76±4

Für Oktan lassen sich die Kurven mit zylindrischen Mizellen anpassen. Aus den Anpassungen lassen sich pro DNA Basenpaar eine Anzahl Wassermolekülen von $N_W = 63 \pm 2$ und eine Anzahl von Lipidmoleküle von $N_H = 17 \pm 1$ ableiten. Es muß die Korrelationen der Teilchen untereinander in dem Modell berücksichtigt werden, was mit einer hohen Transferrate der DNA von Wasser nach Alkan übereinstimmt.

76 % und 64 %

Die Streuintensitäten bei 64 % und 76 % lassen sich bei allen drei Alkanen durch inverse zylindrische Mizellen anpassen. Die zugehörigen Parameter sind in Tabelle 6.3 und 6.4 zu finden.

0 %

Für reines DOTAP ($\Phi = 100\,\%$) konnte in Dekan keine Probe nachgewiesen werden. Die Streukurve der Probe mit Lipid und DNA entsprach weitgehend der Streukurve des reinen Dekans. Nach Abzug des Hintergrundes blieben nur Artefakte mit niedriger Amplitude zurück.

Die Streukurven der übrigen Alkane Oktan und Dodekan lassen sich mit den Formfaktoren der inversen zylindrischen Mizellen anpassen. Die Streukurve in Dodekan wurde bereits in Abschnitt 6.3.3 und 6.3.4 beschrieben. Die Streuintensitäten des Systems in Oktan lassen sich ebenso durch inverse zylindrische Mizellen anpassen. Im Gegensatz zum System in Dodekan weisen die Mizellen einen Wassergehalt von $N_W = 107$ Wassermoleküle pro

DNA Basenpaar auf. Es ist also eine ausreichende Wasserschicht vorhanden, um die DNA komplett zu umhüllen. Auch die Anzahl der Lipide $N_H = 8$ ist ausreichend, um eine geschlossene Schale zu bilden. Die hohe Polydispersität von $z = 0,34$ weißt aber hier darauf hin, daß sich eine geschlossene Hülle nicht für alle zylindrischen Mizellen gleichermaßen ideal ausbilden kann.

6.4. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß Lipide, DNA und Wasser in der Alkanphase zylinderartige Mizellen bilden. Diese Mizellen bestehen aus gestreckter hydratisierter DNA, die von einer Lipidmonolage vom umgebenden Alkan abgeschirmt wird. Es wurde eine Lipidmischung aus kationischem DOTAP und zwitterionischem DOPE verwendet, der Anteil des zwitterionischen Lipides an der Gesamtmenge wird durch den Parameter Φ beschrieben. Die zugegebenen Menge des kationischen Lipides entsprach der Anzahl der DNA-Basen, so daß sich ladungsneutrale Lipid/DNA-Komplexe bilden können. Die zugegebene Menge des zwitterionischen Lipides gewährleistet eine ausreichend geschlossene Lipidhülle um die DNA.

Mit steigenden DOPE Gehalt Φ findet ein Übergang von zylinderartigen zu sphärischen Mizellen statt und DNA kann nicht mehr in der Alkanphase beobachtet werden. Der Koexistenzbereich liegt zwischen $\Phi_0 = 72\,\%$ und $\Phi_0 = 82\,\%$, bei kleineren Φ liegen zylinderartige Mizellen und bei größeren Φ sphärische Mizellen vor. Die sphärischen Mizellen enthalten keine DNA und die Zugabe von DNA kann deren Struktur nicht beeinflussen. In allen Fällen unterhalb 76 % induziert DNA eine Umstrukturierung der Komplexe von sphärischen zu zylindrischen Strukturen.

Es wurden weder zylindrische Mizellen ohne DNA Kern noch übergeordnete Gitterstrukturen beobachtet.

Neben dem Einfluß der Lipidzusammensetzung Φ wurde auch die Abhängigkeit vom Wassergehalt, den unterschiedlichen Lösungsmitteln Oktan, Dekan und Dodekan, sowie Unterschiede von Systemen mit und ohne DNA untersucht. Eine Übersicht aller auftretenden Strukturen zeigt Abbildung 6.16.

Systeme in den Lösungsmitteln Oktan, Dekan und Dodekan verhalten sich ähnlich. Leichte Unterschiede treten bei der Lipidzusammensetzung Φ_0 auf, bei der der Übergang von zylinderartigen zu sphärischen Mizellen stattfindet. Dieser ist bei Oktan zu höheren Werten verschoben. Außerdem konnten in Dekan für reines DOTAP ($\Phi = 0\,\%$) keine Komplexe festgestellt werden.

Bei Systemen mit DNA wurde exemplarisch bei einer Lipidzusammensetzung $\Phi = 76\,\%$ der Einfluß des Wassergehalts untersucht. Für einen niedrigen Gehalt an Wasser ist die DNA nicht mehr in Alkan löslich und es bilden sich wieder sphärische Mizellen.

Systeme ohne DNA zeigen ebenfalls ein vom Wassergehalt und der Lipidzusammensetzung Φ abhängiges Verhalten. Bei Wasserüberschuß liegen durchgängig sphärische Mizellen vor. System ohne Wasser hingegen weisen kein eindeutiges Streuverhalten auf. Proben mit reinem DOTAP beziehungsweise reinem DOPE zeigen eine zylinderähnliche Charakteristik,

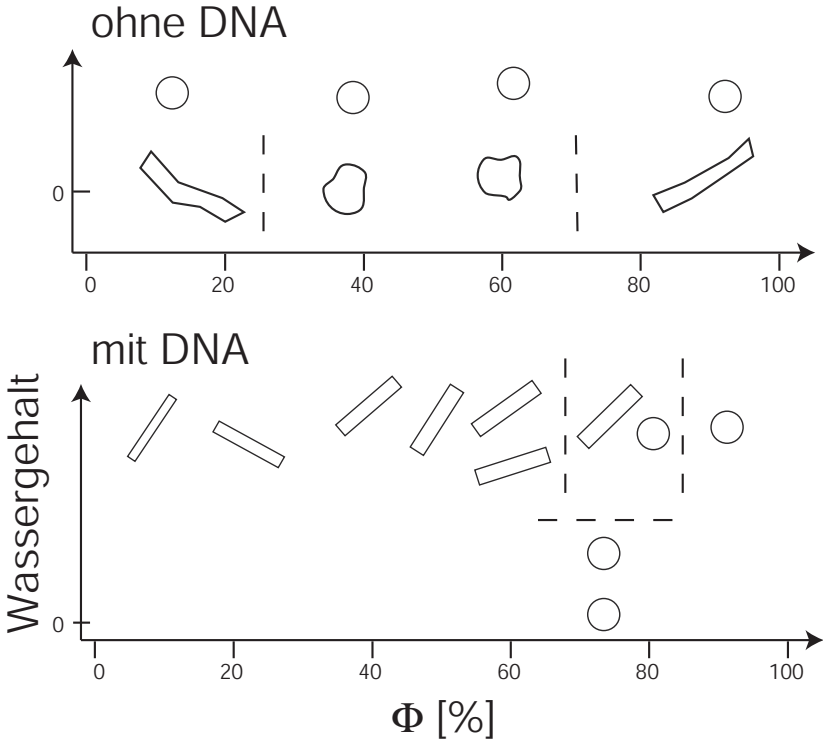


Abbildung 6.16.: Zusammenfassendes Phasendiagramm für unterschiedliche Lipidzusammensetzung. **Ohne DNA)** treten ohne Wasser zylindrische und sphärische Strukturen auf, bei Wasserüberschuß nur sphärische Mizellen. **Mit DNA)** treten bei Wasserüberschuß zylindrische Mizellen mit DNA und sphärische Mizellen ohne DNA auf, bei Wassermangel hingegen nur sphärische Mizellen

Mischungen der beiden Lipidsorten ein zu sphärischen Strukturen passendes Streuverhalten. Die exakte Struktur konnte nicht bestimmt werden.

Neben den grundlegenden unterschiedlichen Strukturen variieren die untersuchten Komplexe ebenfalls in ihren Abmessungen. Diese sind in Abbildung 6.17 als Gyrationsradius in einer Übersicht zu sehen. Gezeigt wird der Gyrationsradius des Querschnitts R_C für zylinderähnliche Strukturen (quadratischen Symbole) und der eigentliche Gyrationsradius R_G der sphärischen Strukturen (kreisförmigen Symbole).

Die Gyrationsradien R_C der zylindrischen Phasen bewegen sich um etwa $R_C = 1,8\,\mathrm{nm}$ und steigt dabei linear von $R_C = 1,6\,\mathrm{nm}$ bei $\Phi = 20\,\%$ bis hin zu $R_{CS} = 1,9\,\mathrm{nm}$ bei $\Phi = 94\,\%$ an. Die Zunahme läßt sich durch den vermehrten Einbau von DOPE in die Lipidhülle sowie dem dadurch steigenden Wassergehalt der Mizellen erklären. Ausnahmen treten daher nur für System mit weniger Wasser (blaue Symbole) auf, deren Gyrationsradius ist bis hin zu $R_C = 1,4\,\mathrm{nm}$ verringert. Ebenso eine Ausnahme ist das System bei $\Phi = 0\,\%$. Hier kann keine vollständige Lipidhülle bzw. Wasserschicht entstehen und der Gyrationsradius ist mit $R_C = 0,95\,\mathrm{nm}$ nur leicht zu dem der nativen DNA erhöht.

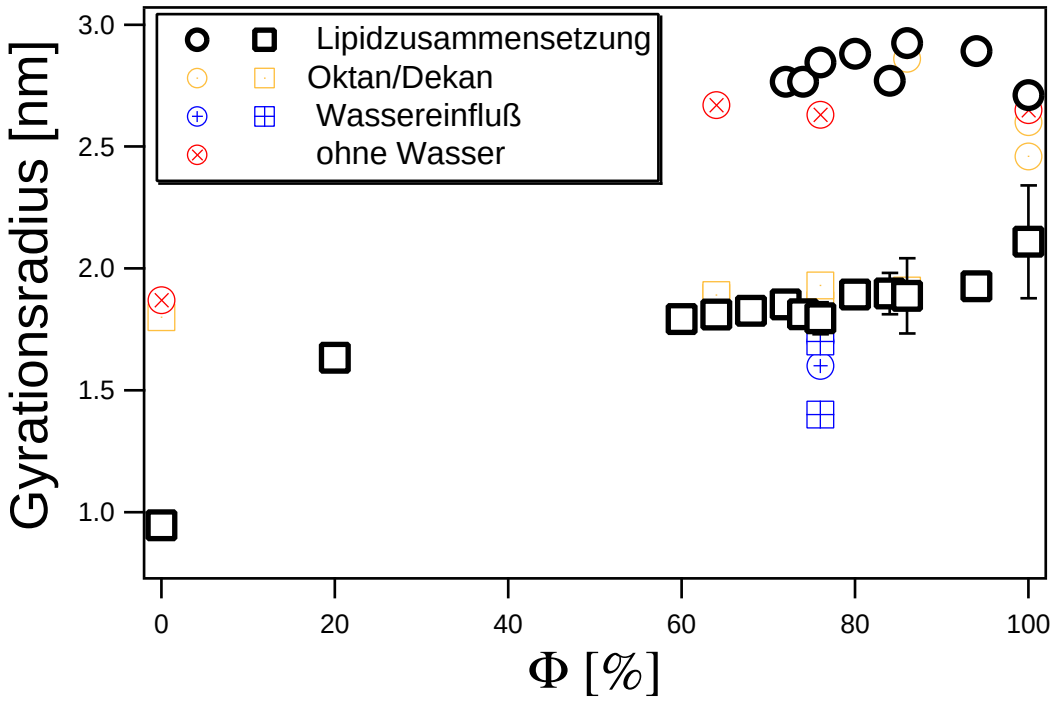


Abbildung 6.17.: Gyrationsradien aller untersuchten Komplexe (Kreise für sphärischen Strukturen und Quadrate zylindrische Strukturen).

Die Gyrationsradien der sphärischen Strukturen fluktuieren um den Wert R_G =2,7 nm. Ausnahmen sind hier wieder die Systeme mit weniger Wasser mit einem Gyrationsradius bis hin zu $R_G = 1,6\,\text{nm}$.

6.5. Ausblick

Aktuelle Fragestellungen der Nano- und Biotechnologie betreffen Wege, Strukturen auf nano- und mesoskoper Skala gezielt zu steuern (Bottom-up Assemblierung). Die hier untersuchten zylinderartigen Lipid/DNA-Mizellen bieten dafür neue Möglichkeiten, da man die Fähigkeit, die DNA molekülgenau zu strukturieren, mit den für viele Anwendungen vorteilhaften unpolaren Lösungsmitteln kombinieren kann. So dient die DNA als ein Gerüst oder eine Schablone, um eine weitergehende Strukturbildung zu kontrollieren, ähnlich wie es bereits in wäßrigen Medien etabliert ist [33, 66, 73]. Ein interessantes Beispiel ist die Bildung von Nanokristallen innerhalb der Mizelle, welche so die Form der Kristalle beeinflussen kann [83]. Schließlich können die Komplexe durch Modifikation des Lösungsmittels auch als Schablone zur Herstellung nanoporöser Strukturen dienen [20].

Da die hydrophile DNA von der hydrophoben Umgebung abgeschirmt wird, existieren einzelne, nicht kondensierte DNA-Stränge in Lösung. Dies mag ein zusätzlicher Ansatzpunkt zur Herstellung nichtviraler Genvektoren sein, ähnlich zu bereits existierenden Pro-

tokollen [69]. Ebenso können die Mizellen als Mikroreaktor dienen, in denen PCR [41] oder andere enzymatische Reaktionen [44] ablaufen können.

Die potentielle Fähigkeit des Systems als Grundbaustein für supramolekulare Strukturen zu dienen, wurde in den Arbeiten von Abdalla et al. bereits nachgewiesen [1]. Hier wurden supramolekulare Verbindungen aus hydrophoben Perylenediimid und hydrophilen Oligonukleotiden durch Komplexierung mit DOPE/DOTAP in Alkan gelöst und hybridisierte Oligomere nachgewiesen. In weiteren Messungen mit FCS wurde bestätigt, daß die DNA in Alkan in monomeren Mizellen vorliegt [17].

7. Tensid/Dendrimer-Komplexe

7.1. Einleitung

Einige der wichtigsten Methoden der Biophysik und verwandter Gebiete beruhen auf Fluoreszenz. Dabei werden die zu untersuchenden Materialien mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit mikroskopischen oder spektroskopischen Techniken untersucht. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses werden Fluoreszenzfarbstoffe gesucht, die sich durch eine möglichst hohe Quantenausbeute auszeichnen. Eine naheliegende Methode zur Effizienzverbesserung ist die Zusammenfassung mehrerer Chromophore zu einem multichromophoren Molekül.

Bei den hier untersuchten multichromophoren Fluoreszenzmarkern handelt es sich um Dendrimere. Sie wurden am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz von Tanja Weil aus der Gruppe von Prof. Müllen synthetisiert, die Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Claire Basquin aus derselben Arbeitsgruppe. Drei der vier Äste des Dendrimers wurden mit Chromophore versehen, der übrige Ast kann über eine Biotingruppe an das zu markierenden Objekt anbinden. Jedes Dendrimer weist die gleiche Anzahl von Chromophore und damit die gleiche Quanteneffizienz auf und kann so für quantitative Fluoreszenztechniken eingesetzt werden. Sowohl die verwendeten Chromophore als auch das eigentliche Dendrimere sind hydrophob, für eine weitere Verwendung werden wasserlösliche Komplexe aus Dendrimeren und Tensiden erstellt. Diese Komplexe benötigen weniger Syntheseschritte im Vergleich zu Dendrimeren, bei denen kovalent gebundene Gruppen eine erhöhte Wasserlöslichkeit erzeugen. Darüber hinaus kann die Fluoreszenzausbeute durch weitere Syntheseschritte nicht beeinträchtigt werden. Da das Dendrimer stark fluoreszierende Chromophore trägt und in geringer Konzentration verwendet werden soll, ist die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) die geeignetste Methode, um die Größe und die Löslichkeit der mit Tensiden komplexierten und fluoreszierenden Partikel zu bestimmen.

7.2. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) basiert auf der zeitlichen Analyse eines Signals, welches durch eine fluoreszierende Probe verursacht wird. Mit einem konfokalen Mikroskop werden Probenmoleküle innerhalb eines Beobachtungsvolumen V_{eff} in der Größe von etwa einem Femtoliters beobachtet. Die Probenmoleküle bewegen sich durch das Volumen, erzeugen dabei ein fluktuierendes Lichtsignal, welches detektiert und autokorreliert wird. Aus der Analyse dieses Signals können dann beispielsweise Aussagen über Größe

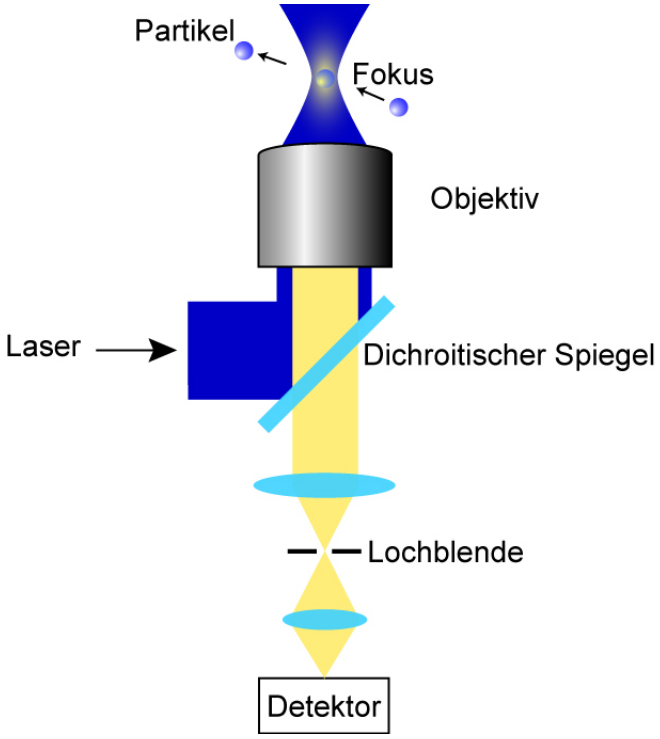


Abbildung 7.1.: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Ein Laserstrahl wird am dichroitischen Spiegel reflektiert und im Probenraum fokussiert. Fluoreszenzmarkierte Partikel diffundieren durch diesen Fokus. Deren Fluoreszenzlicht fällt ungehindert durch den dichroitischen Spiegel und wird auf eine zum Fokus konvokale Lochblende abgebildet, dadurch wird Fluoreszenzlicht von Probenmolekülen außerhalb des Fokus ausgeblendet. Schließlich wird das Fluoreszenzlicht von einer Avalanchediode detektiert und dann weiterverarbeitet.

und Konzentration der Probe gewonnen werden. Die Methode ist besonders sensitiv für Fluorophore in einer geringen Konzentration (etwa 1 µM bis 0,1 nM).

Der schematische Aufbau eines konfokalen Mikroskops ist in Abbildung 7.1 dargestellt. Der Laserstrahl wird am dichroitischen Spiegel reflektiert und durch das Objektiv im Probenraum fokussiert. Fluoreszenzmarkierte Partikel diffundieren durch diesen Fokus, werden angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht größerer Wellenlänge. Dieses fällt durch das Objektiv zurück, durchquert aufgrund der Wellenlängenverschiebung weitgehend ungehindert den dichroitischen Spiegel und wird anschließend auf eine Lochblende fokussiert. Die Lochblende ist konfokal zum Fokus im Probenraum, dies bedeutet, daß nur Fluoreszenzlicht von Probenmolekülen innerhalb des Fokus auf der Lochblende abgebildet wird, Licht von anderen Stellen im Probenvolumen wird ausgeblendet. Schließlich wird das Fluoreszenzlicht von einer Avalanchediode detektiert.

Durch Diffusion und anderen zeitabhängigen Prozessen wie dem Tripletübergang mißt der Detektor ein zeitlich fluktuierendes Intensitätssignal $I(t)$. Daraus wird die zeitliche Autokorrelation $G(\tau)$ bestimmt:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t+\tau)\, I(t)\rangle}{\langle I\rangle^2} \tag{7.1}$$

Die Autokorrelation $G(\tau)$ entspricht der konzentrationsabhängigen Wahrscheinlichkeit, daß sich ein Partikel innerhalb des effektiven konfokalen Volumens V_{eff} nach einer Zeitspanne τ immer noch innerhalb des Volumens befindet. Für ein Ensemble von Partikeln, die sich mit idealer Braunschen Diffusion $\langle r^2\rangle = 4D_i t$ innerhalb eines gaußschen Detektionsvolumen V_{eff} bewegen, läßt sich Gleichung 7.1 exakt lösen [16]:

$$G(\tau) = 1 + \left[1 + \sum F_j \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{T,j}}\right) \frac{1}{N} \sum \rho_i \frac{1}{1+\tau_{D,j}} \frac{1}{\sqrt{1+S^2\frac{\tau}{\tau_{T,j}}}}\right] \tag{7.2}$$

Hier ist F_j die durchschnittliche Anzahl der im Triplettzustand angeregten Moleküle, $\tau_{T,j}$ ist die Triplettabfallzeit und ρ_i der von der Emissionsstärke abhängige Bruchteil [74] der Partikel, die mit der durchschnittlichen Diffusionszeit $\tau_{D,i}$ durch den Fokus mit dem effektivem Volumen $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2}\omega_0^2 z_0$ diffundieren. Die Gesamtzahl der Teilchen im Fokus beträgt N. Der Strukturparameter $S = {}^{z_0}/_{\omega_0}$ entspricht der Geometrie des konfokalen Volumes mit den Radien der beiden Halbachsen z_0 und ω_0.

Der theoretische Verlauf dieser Gleichung ohne Triplettanteil ist in Abbildung 7.2 für eine Diffusionszeit von $\tau_D = 20\,\mu\text{s}$ mit durchschnittlichen einem Partikel im Fokus dargestellt ($N = 1$).

Für Partikel kleiner der Fokalweite ω_0 gilt folgende Beziehung zwischen Diffusionszeit τ_D und der Diffusionskonstante D:

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \tag{7.3}$$

Mit der Stokes-Einstein Beziehung folgt damit für den hydrodynamischen Radius R_H:

$$R_H = \frac{2}{3}\frac{k_B T}{\pi\eta\omega_0^2}\tau_{D,i} \tag{7.4}$$

Hier ist T die Temperatur k_B die Boltzmannkonstante und η die Viskosität des Lösungsmittels. Für größere Partikel mit $R_H > \omega_0$ muß eine Korrektur angewendet werden [74]

$$\tau_{D,i} = \frac{\omega_0^2 + R_H^2}{4D} \tag{7.5}$$

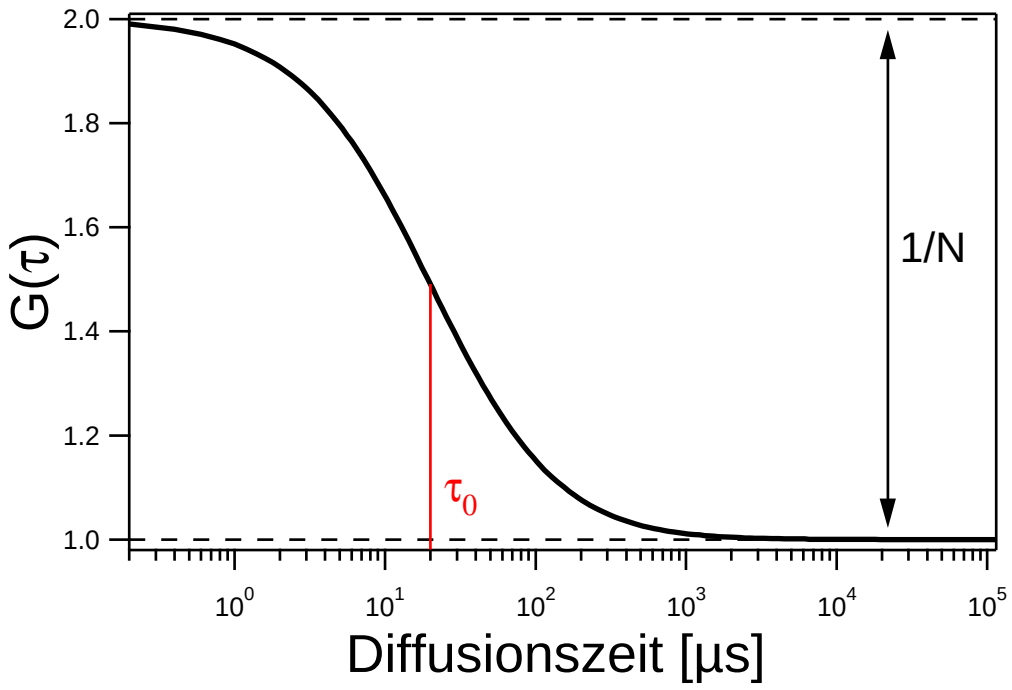


Abbildung 7.2.: Theoretischer Verlauf der Fluoreszenzautokorrelationskurve ohne Triplettanteil für $\tau_D = 20\,\mu s$ und $N = 1$.

Experimentelle Durchführung

Die FCS Messungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop Confocor 2 (Zeiss, Jena) mit einem Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss C-Apochromat 40x/1,2 W corr) durchgeführt. Die Probe wurde mit einem 488 nm Argon Laser angeregt und die Emission im Bereich zwischen 505 und 550 nm mit einer Avalanche Photodiode detektiert. Als Probenbehälter dienten die achtfach unterteilten LabTek II Kammern (Nunc, Wiesbaden).

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius R_H muß nach Gleichungen 7.4 und 7.5 der fokale Radius ω_0 separat gemessen werden. Hier wurde Rhodamin 6G (Supelco, Bellefonte) mit der bekannten Diffusionskonstante $D = 2,8 \cdot 10^{-10} m^2 s^{-1}$ [36] als Kalibrationsstandard verwendet.

Das Confocor 2 ist zusätzlich mit einem Laser Scanning Modul ausgestattet, mit dem Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen durchgeführt werden können. Dafür wird der Fokus durch ein motorisiertes Spiegelsystem durch den Probenraum bewegt und das Fluoreszenzsignal ortsabhängig gemessen. Daraus erstellt der Computer ein zwei- oder dreidimensionales Abbild der Probe.

7.3. Ergebnisse

7.3.1. Auswahl des geeigneten Tensids

Die erste Fragestellung war ein Tensid zu finden, um das hydrophobe Dendrimers in wäßriger Lösung überzuführen. Ein geeignetes Tensid soll das Dendrimer lösen können, ohne daß eine Vielzahl Dendrimere untereinander aggregieren. Es wurden eine Reihe kommerziell erhältlicher ionischer, anionischer und zwitterionischer Tenside und Co-Tenside auf ihre Eignung untersucht. Tabelle A.3 in Anhang A.5 gibt einen Überblick über die verwendeten Stoffe. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben präpariert.

Die Zugabe der Co-Tenside Ethanol, Phenol und Benzaldehyd zu einer Dendrimerlösung erzeugten einen bereits mit bloßem Auge erkennbaren Niederschlag. Dies war ebenso für das Tensid CHAPS der Fall. Die negativ bzw. positiv geladenen Tenside SDS und DDAB haben nahezu dieselbe Kettenlänge. Beide Tenside erzeugten eine mit dem Auge homogene Lösung, mit dem Fluoreszenzmikroskop waren allerdings Aggregate in der Größe von etwas 20 µm zu erkennen. Diese Aggregate konnten weder durch intensives schütteln noch durch Ultraschall aufgelöst werden. Die nichtionischen Tenside Tween 20 und Tween 60 ergaben mit bloßem Auge die vielversprechendsten Ergebnisse. Insbesondere zeigten Mikroskopieaufnahmen der Dendrimer/Tween 20 Mischung eine homogene Lösung (siehe Abb. 7.3a). Dies konnte dadurch erklärt werden, daß dessen flexible hydrophobe Ketten die optimale Länge haben, um sich in die hydrophoben Taschen des Dendrimers einzupassen. Alle weiteren Untersuchungen wurden daher mit Tween 20 durchgeführt.

7.3.2. Abhängigkeit des Löslichkeit von der Tensidkonzentration

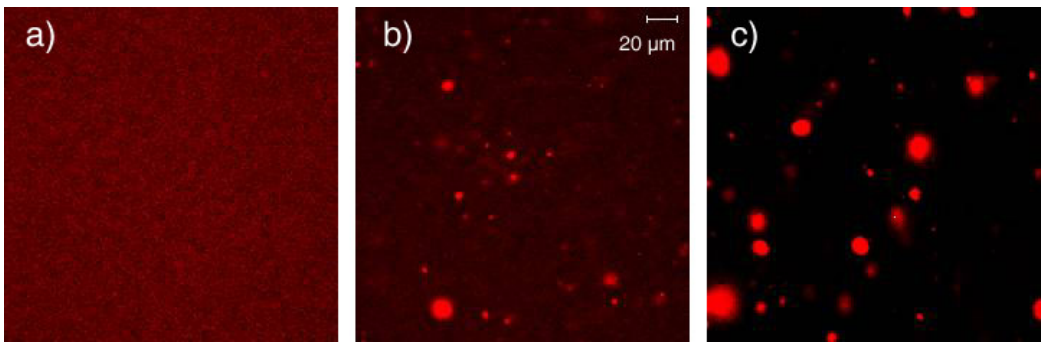


Abbildung 7.3.: Fluoreszenzmikroskopiebilder der Dendrimerlösung (Konzentration des Dendrimers $c = 50\,\mathrm{nM}$) mit fallendem Tensidgehalts. Das Tween 20/Dendrimer Verhältnis beträgt (a) 11600, (b) 2910, und (c) 580.

Um die kritische mizellare Konzentration (CMC) von Tween 20 zu untersuchen, wurde ein Titrationsexperiment mit einer konstanten Konzentration des Dendrimers (50 nM) und variierender Konzentrationen von Tween 20 (von $1,45 \cdot 10^{-5}$ bis $1,8 \cdot 10^{-3}$ M) durchgeführt.

Abbildung 7.3 zeigt drei mittels LSM aufgenommene Fluoreszenzmikroskopiebilder des in Puffer B gelösten Dendrimers. Bei einer Tensidkonzentration von $5,8 \cdot 10^{-4}$ M konnte keine Aggregation beobachtet werden (Abb. 7.3a), das LSM zeigt eine homogene Lösung. An diesem Punkt war die Konzentration von Tween 20 höher als dessen CMC, was ein Hinweis darauf ist, daß sowohl Tween 20 alleine, als auch Komplexe aus Dendrimer und Tween 20 in der Lösung existieren. Eine Verringerung der Tensidkonzentration von $1,45 \cdot 10^{-4}$ auf $1,45 \cdot 10^{-5}$ M erhöhte dramatisch die Menge und Größe der Aggregate (Abb. 7.3b und c). Die Aufnahmen zeigen, daß Aggregate bis zu einer Größe von 20 µm vorlagen.

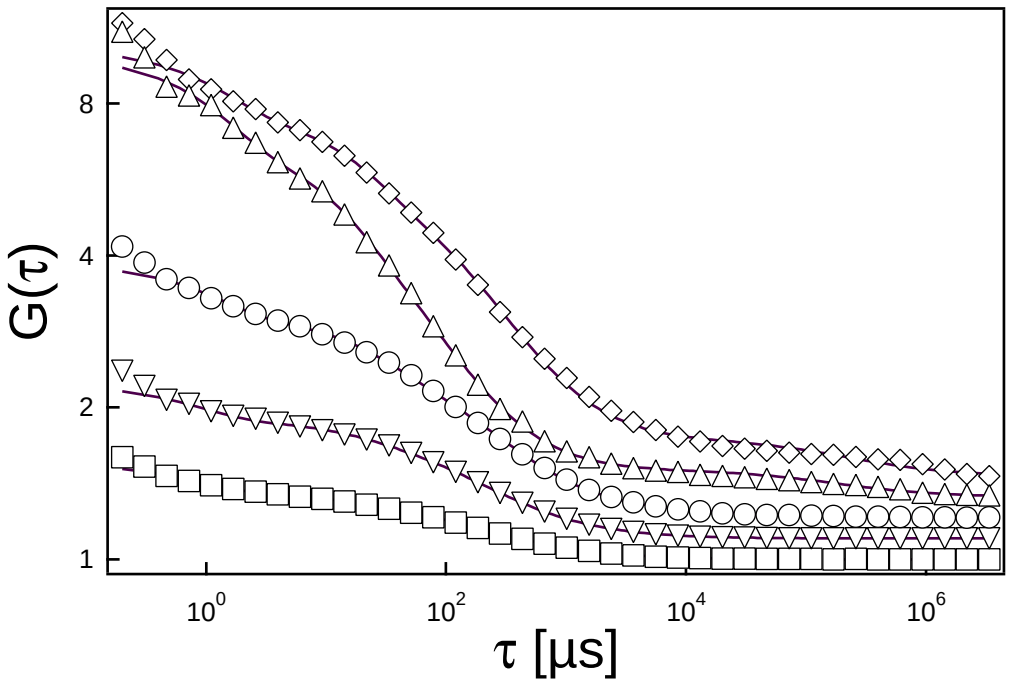


Abbildung 7.4.: Fluoreszenzautokorrelation $G(\tau)$ der Partikel bei verschiedenen Tween 20 Konzentration (Δ) $2,9 \cdot 10^{-6}$ M, ($\diamondsuit$) $1,45 \cdot 10^{-5}$ M, (O) $8,75 \cdot 10^{-5}$ M, (∇) $8,8 \cdot 10^{-4}$ M und ($\square$) $1,8 \cdot 10^{-3}$ M. Die durchgezogenen Linien entsprechen Anpassungen mit zwei diffusiven Anteilen. Zur besseren Darstellung besitzt jede Kurve ein Offset von 10 % zur nächsten.

Im weiteren wurde die FCS Methode verwendet, um Komplexe oder Aggregate unterhalb der Auflösungsgrenze des LSM festzustellen und zu charakterisieren. Abbildung 7.4 zeigt die experimentell bestimmte Korrelationsfunktion $G(\tau)$ für fünf verschiedene Tween 20 Konzentrationen $2,9 \cdot 10^{-6}$ M, $1,45 \cdot 10^{-5}$ M, $8,75 \cdot 10^{-5}$ M, $8,8 \cdot 10^{-4}$ M und $1,8 \cdot 10^{-3}$ M. Mit sinkender Tween 20 Konzentration steigt die Amplitude der Fluoreszenzautokorrelationsfunktion $G(\tau \to 0)$ an. Diese ist umgekehrt proportional zur Teilchenzahl N der detektierten Partikel im Fokus, so daß dies ein deutlicher Hinweis darauf ist, daß die Dendrimere mit sinkender Tensidkonzentration untereinander aggregieren. Neben dem vorherrschenden Abfall bei etwas $\tau_D = 200$ µs erkennt man außerdem das Aufkommen einer weiteren diffusi-

ven Komponente mit $\tau_D = 10^5$ µs. Da die Diffusionszeit τ_D mit der Partikelgröße korreliert, wird angenommen, daß diese langsamere diffusive Komponente von den entstehenden Aggregaten verursacht wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die FCS Daten mit einem Zweikomponentenmodell angepaßt. Abbildung 7.5 zeigt die daraus ermittelten Diffusionszeiten für die unterschiedlichen Tween 20 Konzentrationen.

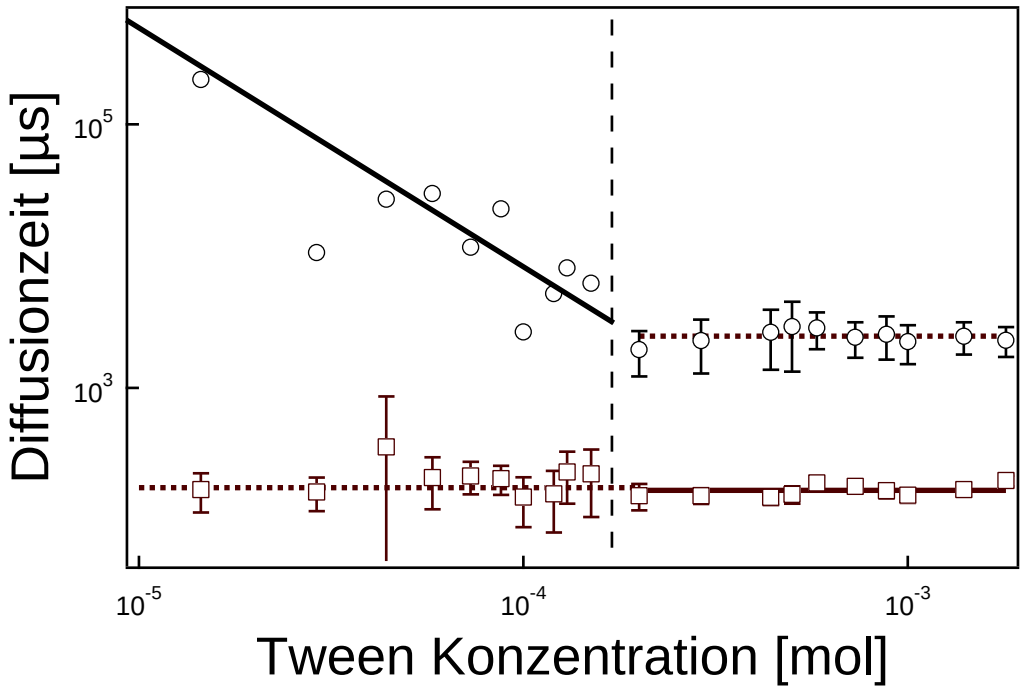


Abbildung 7.5.: Diffusionszeiten in Abhängigkeit der Tween 20 Konzentration: (O) langsamer Anteil, (□) schneller Anteil. Bei Konzentrationen größer als $1{,}7 \cdot 10^{-4}$ M dominiert der schnellere Anteil mit einer durchschnittlichen Diffusionszeit von $\tau_D = 168$µs die Autokorrelationsfunktion zu nahezu 100 %. Unterhalb der Übergangskonzentration überwiegt die langsamere Population.

Wie zuvor erwähnt, ergeben die Anpassungen zwei unterschiedliche Populationen mit einer schnellen und einer langsamen diffusiven Komponente. Abbildung 7.5 zeigt, daß die schnelle Komponente eine konstante Diffusionszeit von $\tau_D = 168$ µs über den gesamten Konzentrationsbereich aufweist. Diese Diffusionszeit korrespondiert über Gleichung 7.4 mit einem hydrodynamischen Radius von $R_H = 7{,}1$ nm.

Bei Tween 20 Konzentrationen über $1{,}7 \cdot 10^{-4}$ M, zeigt die langsamere Komponente eine Diffusionszeit von $\tau_D = 2470$ µs, die einem hydrodynamischen Radius von $R_H = 80$ nm entspricht. Der Einfluß beider Komponenten auf die Korrelationsfunktion ist abhängig von der Emmisionsstärke der Partikel [74], die näherungsweise zur Zahl der gebundenen Den-

drimere und damit wieder zum Volumen der Partikel proportional ist. Aus den jeweiligen Fraktionen beider Populationen in diesem Konzentrationsbereich kann man ein Verhältnis zwischen langsamen und schnellen Komponenten von etwa $6 \cdot 10^{-7}$ schließen.

Bei Tensidkonzentrationen unterhalb von $1,7 \cdot 10^{-4}$ M divergiert die Diffusionszeit der langsameren Komponente, die Aggregaten mit einem hydrodynamischen Radius von $R_H = 80$ nm und höher entsprechen. Die Diffusionszeit der schnelleren Komponente bleibt bestehen. Daraus kann man schließen, daß auch bei aggregierenden Partikeln eine stabile Fraktion der schnelleren Komponente vorhanden ist.

Diese Ergebnisse kann folgendermaßen erklärt werden: Die schnellen Diffusionszeiten werden von Tensid/Dendrimer-Komplexen verursacht, während die langsamere Zeit von aggregierten Komplexen stammen. Die experimentellen Ergebnisse können dann durch einen Übergang von aggregierten zu nichtaggregierten Komplexen erklärt werden. Dieser Übergang findet bei einer Tensidkonzentration von $1,7 \cdot 10^{-4}$ M statt und führt damit zu einem molaren Verhältnis zwischen Tensid und Dendrimer von 3400. Bei niedrigeren Tween 20 Konzentrationen sind die Tenside nicht in der Lage, die Dendrimere komplett in wäßrigem Medium zu lösen und es entstehen Aggregate

7.3.3. Abhängigkeit von der Dendrimerkonzentration

Die vorhergehenden Ergebnisse wurden für unterschiedliche Tensidkonzentrationen erhalten. Um das Aggregationsverhalten der Dendrimer zu verstehen, ist es weiterhin wichtig, die Abhängigkeit der Konzentration der Aggregate von unterschiedlichen Konzentrationen des Dendrimers zu untersuchen. Dies zielt besonders auf zukünftige Anwendungen hin, bei denen durch die Messung der Dendrimerkonzentration Aussagen über die damit markierte Probe erhalten werden sollen.

Für dieses Experiment wurde eine Stammlösung mit einem Verhältnis zwischen Tensid zu Dendrimer von 5800 verwendet. Damit befindet man sich unmittelbar oberhalb des für 50 nM beobachteten Übergangs. Diese Lösung wurde mit Puffer C verdünnt, um so verschiedene Konzentrationen der Dendrimere zu erhalten. Abbildung 7.6 zeigt die Fluoreszenzkorrelationskurven für unterschiedliche Dendrimerkonzentrationen.

Mit sinkender Dendrimerkonzentration steigt wie erwartet die Amplitude der Fluoreszenzautokorrelationsfunktion $G(\tau \to 0)$ an. Die Kurvenform ändert sich jedoch nicht, die Diffusionszeit scheint für alle Kurven identisch zu sein und es kann kein Hinweis für eine etwaige Aggregation der Komplexe gefunden werden.

Abbildung 7.7 zeigt die aus den Anpassungen gewonnene Partikelzahl N abhängig von der Konzentration der Dendrimere. In einer Region zwischen 10 nM und 10 µM nimmt die Partikelzahl N linear mit der Konzentration der Dendrimere zu. Dieses Verhalten kann damit erklärt werden, daß sich die Anzahl Dendrimere pro Mizelle über den gesamten linearen Konzentrationsbereich nicht ändert. Für Konzentrationen unterhalb 10 nM beginnt das Hintergrundrauschen zu dominieren und die Kurve weicht von dem idealen linearen Verhalten ab.

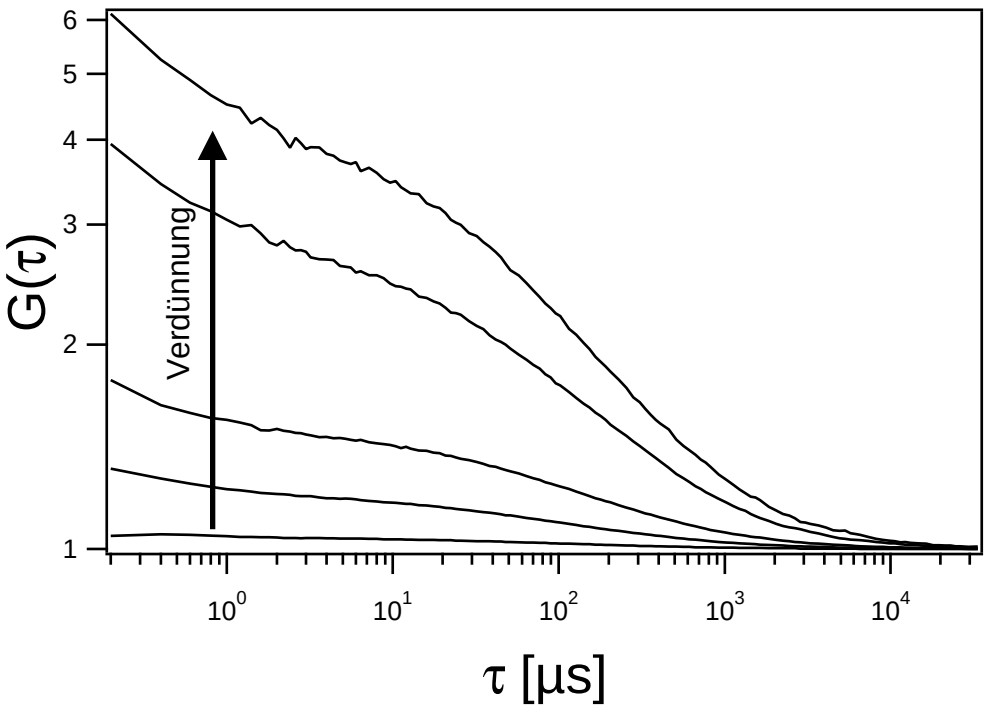


Abbildung 7.6.: Autokorrelationskurven in Abhängig von der Konzentration des Dendrimers. Die Daten stammen von Lösungen mit einer Dendrimerkonzentration von 5, 10, 50, 100 und 500 nM (von oben nach unten).

7.4. Schlußfolgerung

Es wurde die Löslichkeit eines hydrophoben Polyphenylen-Chromophor-Dendrimers mit drei fluoreszierenden Gruppen und eines bioaktiven Biotinankers bestimmt. Die Nutzung dieses Dendrimers als Fluoreszenzmarker für biologische Anwendungen benötigt eine ausreichende Löslichkeit in wäßrigen Lösungen. Diese wurde durch Komplexierung mit dem Tensid Tween 20 erreicht, welches mit dem Dendrimer einen supramolekularen Komplex bildet, wie es in Abbildung 7.9 skizziert ist.

Aus FCS Messungen bei einer Dendrimerkonzentration von 50 nM in verschiedenen Puffern ergeben sich zwei Diffusionszeiten. Für die schnellere Komponente liegt diese bei 168 µs und bleibt für alle Tensidkonzentrationen konstant, bei Konzentrationen über $1,7 \cdot 10^{-4}$ M überwiegt dieser Anteil (siehe Abbildung 7.5). Der hydrodynamische Radius R_H der Tensid/Dendrimer-Komplexe kann indirekt über die Diffusionszeit berechnet werden. Nach Gleichung 7.4 ergibt sich so ein Wert von $R_H = 7,1$ nm. Hier nicht dargestellte molekularmechnische Berechnungen [38] ergeben einen Radius des Dendrimers von 2,9 nm und eine Kettenlänge des Tween 20 Tensids von 3,9 nm. Daher kann bei 7,1 nm Radius der Mizellen nur ein einziges Dendrimer pro Mizellen vorliegen. Anhand dieser experimentellen Werte kann man ableiten, daß sich die Tenside teilweise in die hydrophoben Taschen des

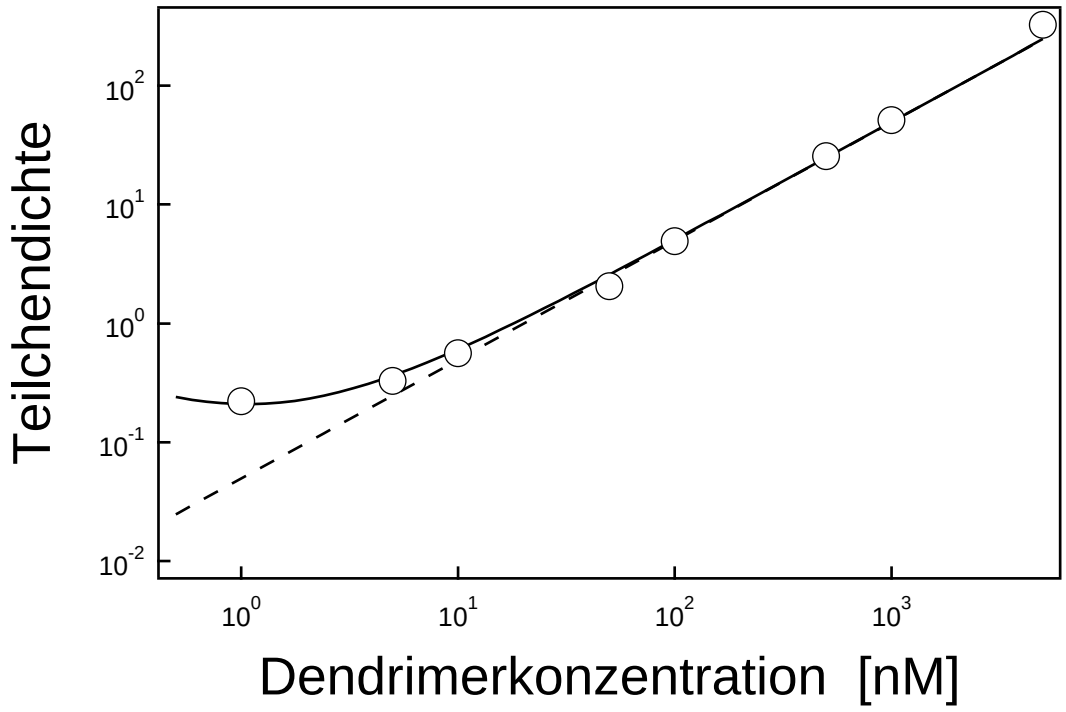


Abbildung 7.7.: Teilchendichte (N/V_{eff}) in Abhängig von der Konzentration des Dendrimers im Puffer C. Die gestrichelte Linie mit einer Steigung 1 entspricht einen direkten Proportionalität zwischen Konzentration der Dendrimere und der gemessenen Teilchendichte.

Dendrimers einbauen. In Abbildung 7.8 wird diese dendritische Mizelle skizziert und eine mögliche Anordnungen der Moleküle gezeigt.

Die hier behandelten Tensid/Dendrimer-Komplexe wurden als hocheffiziente Fluoreszenzfarbstoffe für quantitative Fluoreszenztechniken in wäßrigen Lösungen entwickelt. Insbesondere würde ihr Anwendungsgebiet auf Einzelmolekülmessungen abzielen. Ihre prinzipielle Eignung als Markierungsstoff wurde bereits demonstriert [38], indem mit den Dendrimeren Streptavidin beschichteten Kugeln spezifisch markiert wurden. Es wurde noch nicht gezeigt, daß damit eine erhöhte Sensitivität und eine Verringerung des Detektionslimits von Proben erreicht werden kann.

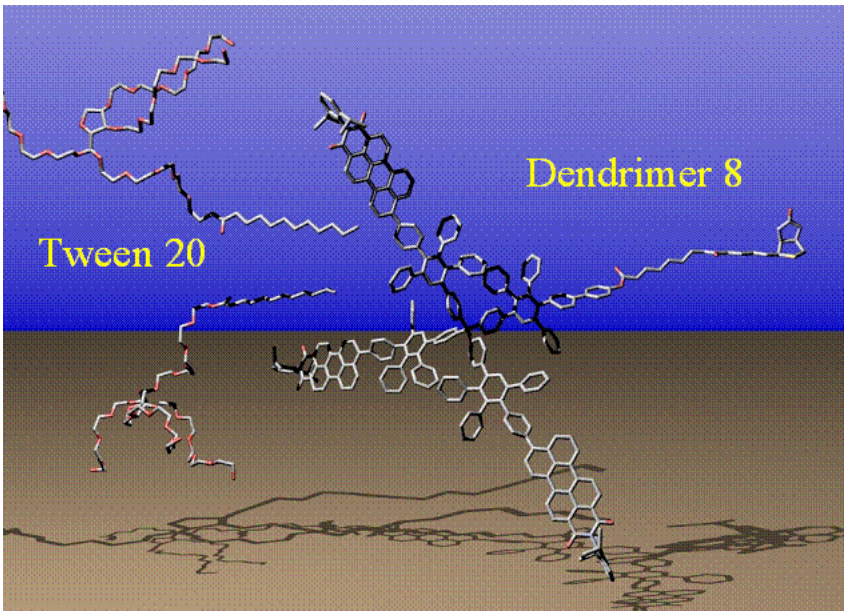


Abbildung 7.8.: Dreidimensionales Modell des Dendrimer und des Tensids

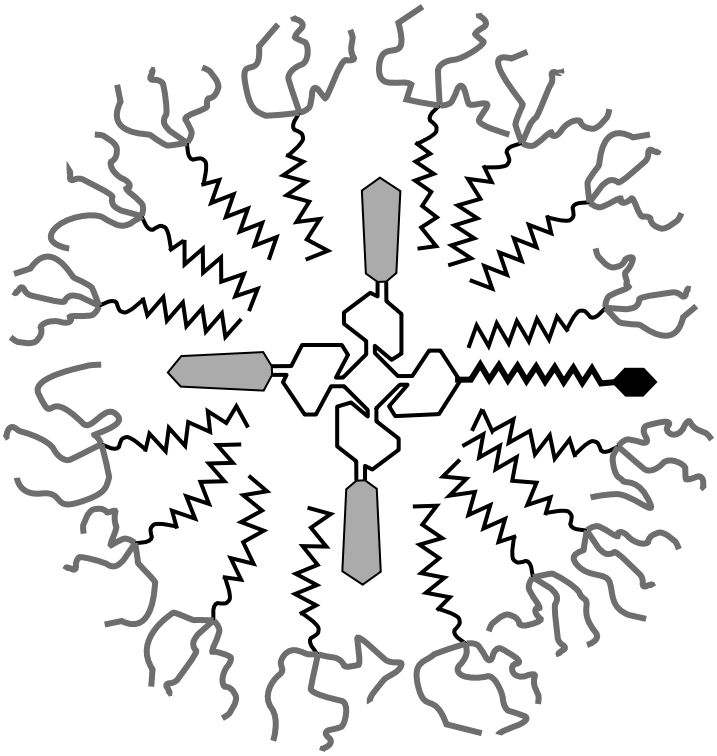


Abbildung 7.9.: Schematische Darstellung des Tensid/Dendrimer-Komplexes

A. Anhang

A.1. Transmission und Hintergrundkorrektur

Jedes Streusignal setzt sich aus unterschiedlichen Anteilen zusammen. Zu den wichtigsten Beiträgen gehören das Streusignal der Probenkammer und des Lösungsmittel. Andere Einflüsse wie inkohärente Streuung der Probe oder eine externe Hintergrundstrahlung sind auch vorhanden, liefern aber in der Röntgenkleinwinkelstreuung nur einen unbedeutenden Anteil und werden üblicherweise vernachlässigt. Zur korrekten Analyse des Signals der Probe müssen diese anderen Anteile abgezogen werden. Hierbei ist besonders zu beachten, daß die jeweilige Absorption in den unterschiedlichen Teilen der Probenumgebung berücksichtigt wird, da insbesondere die Ergebnisse einer Formfaktoranalyse dadurch stark verfälscht werden können.

Zur Subtraktion der verschiedenen Anteile muß die Abschwächung des Signals in den verschiedenen Medien berücksichtigt werden. Eine Probe der Dicke d mit der energieabhängigen Abschwächlänge l schwächt einen einfallende Strahlung der Intensität I_e nach dem Lambertschen Gesetz ab, so daß für die transmittierte Strahlung I_t gilt:

$$I_t = I_e \mathrm{e}^{-d/l} \tag{A.1}$$

Das Verhältnis $T = I_t/I_e$bezeichnet man als Transmission und wird ermittelt, indem die Abschwächung des ungestreuten Strahles (also für $q \to 0$) durch die Probe bestimmt wird.

Optimal für Messung sind Proben, die ausreichend dick sind, um genügend Streusignal zu erzeugen, aber nicht zu dick, damit dieses Signal nicht wieder in der Probe abgeschwächt wird. Durch Integration dieses Wechselspiels anhand Gleichung A.1 ergibt sich eine optimale Dicke gleich der Abschwächlänge.

Gesucht ist die Streuintensität I_P, welche nur von der Probe und nicht von Kammer und Lösungsmittel verursacht wird. Dieser Beitrag ist allerdings nicht direkt zugänglich, sondern nur die Intensität I^*_{P+K} der Probe zusammen mit der Kammer[1]. Hier kennzeichnet der Stern (*) einen direkt gemessenen Wert. Zur Berechnung der Probenintensität I_P wird der Beitrag der Kammer ohne Probe I^*_K von der Gesamtintensität I^*_{P+K} abgezogen, wobei noch die jeweiligen Transmissionen der Probe T_P und der Kammer T^*_K berücksichtigt werden. Zusätzlich muß von jedem Beitrag der externe Untergrund I^*_U wie Hintergrundstrahlung, Elektronenrauschen, Reste des direkten Strahls und Luftstreuung abgezogen werden.

$$I_P = \frac{I^*_{P+K} - I^*_U}{(T_P T_K)^*} - \frac{I^*_K - I^*_U}{T^*_K} \tag{A.2}$$

[1] In dieser Arbeit wurde auch der Beitrag des Lösungsmittels zum Streusignal der Kammer gerechnet.

A.2. Technische Daten der Röntgenkleinwinkelanlage

Leistung [W]	30
Wellenlänge [Å]	0,71
Energie [keV]	17,5
q-Bereich (SAXS und WAXS) [nm^{-1}]	0,2-40
Fluß [Photonen/s]	$7 \cdot 10^6$
Typische Auflösung ($2\pi/q_{min}$) [nm]	31
Halbwertsbreite des direkten Strahl am Detektor [mm]	2,5
Halbwertsbreite des direkten Strahl an der Probe [mm]	0,75
10 % Breite des direkten Strahl am Detektor [mm]	1,4
10 % Breite des direkten Strahl an der Probe [mm]	3,9
Strahldivergenz [Bogensekunden]	
aus 10 % Breite	4,4
aus Halbwertsbreite	2,6
aus 90 % Breite	1,1
Hintergrundsstreuquerschnitt [cm^{-1}]	
bei $q = 0,2\,nm$	0,11
bei $q = 1\,nm$	0,012
bei $q = 5\,nm$	0,011

A.3. Molekulare Einschränkung

In diesem Anhang werden die physikalischen Einschränkungen für die möglichen Elektronendichtemodelle der Lipid/DNA-Komplexe in Alkan erklärt.

DNA Aus der Basenverteilung der λ Phagen DNA erhält man eine 50/50 Verteilung der Basenpaare AT und GC. Bei einem bekannten Molekulargewicht von 660 g/mol ergibt dies eine durchschnittliche Anzahl der Elektronen pro Basenpaar von 322, d.h. bei einem Basenpaarabstand von 0,332 nm eine relative Elektronenanzahl von 970 e^-/nm^3. Nach Castelletto et al. [5] ist der Gyrationsradius $R_C = 7,91$ Å, daraus folgt eine Elektronendichte von 623 e^-/nm. Im Modell wurde ein sigmodiales Elektronendichteprofil (siehe Anhang A.4) verwendet, das diesen Gyrationsradius und Elektronenanzahl erzeugt.

Hydrationsschicht Das molekulare Volumen von flüssigen H_2O bei Raumtemperatur ist 34 $Å^3$ bei einer Elektronenanzahl von 10, dies entspricht einer Elektronendichte von 338 e^-/nm^3.

Lipide Aus den unterschiedlichen Lipidmischungen von DOPE/DOTAP folgen unterschiedliche Volumen und Elektronendichten für den Bereich der Kopfgruppen. Die unten abgeleiteten Werte wurden nur als Richtwerte angenommen, da sie aufgrund unterschiedlicher Packung und eingelagerten Wasser bzw. Alkanmolekülen variieren kann. Die Alkylketten werden davon allerdings nicht beeinflußt, da diese denselben Kontrast wie das umgebende Alkan aufweisen.

DOPE Die Köpfe ($C_7H_{12}NO_8P$) besitzen 140 Elektronen bei einem Volumen von 312 $Å^3$ [7]. Dies ergibt eine Elektronendichte von 450 e^-/nm^3. Die Fläche beträgt 50 $Å^2$ [7, 10]. Daraus folgt eine Dicke von 6,2 Å.

DOTAP Die Köpfe ($C_8H_8NO_4$) besitzen 95 Elektronen bei einer Oberfläche von 70 $Å^2$ [29]. Die Länge entspricht nach Molekularmodellen etwa die Hälfte der von DOPE , also 3,1 Å. Dies ergibt ein Volumen von 217 $Å^3$ und eine Elektronendichte von 438 e^-/nm^3.

Ketten Beide Lipidsorten habe dieselben Alkylketten, so daß man hier nicht unterscheiden braucht. Die chemische Formel ist $C_{34}H_{66}$, dem entspricht eine Elektronenzahl von 270. Das Volumen wird mit der Formel $V = 2 \cdot (27,4 + 26,9n)$ $Å^3 = 969,4$ $Å^3$ abgeschätzt, die maximale Länge mit $L = 2 \cdot (27,4 + 26,9n)$ Å $= 22,9$ Å [77]. Der Parameter n ist hierbei die Anzahl der Kohlenstoffatome. Aus diesen Angabe folgt eine Elektronendichte von 279 e^-/nm^3. Im geschmolzenen Zustand ist die Länge üblicherweise 80 % der Gesamtlänge, daher folgt eine Fläche von 42,3 $Å^2$ im gestreckten Zustand und von 52,9 Åbei 80 % der Länge.

Tabelle A.1.: Einschränkungen der Anpassungsparameter für das zylindrische Modell

Parameter	Einschränkung	Werte
Offset	keine	
Amplitude	keine	
DNA		
Radius d_D	Die Werte wurden gewählt, so daß der Gyrationsradius im Wasser gleich $R_C = 7,91$ Å und die Elektronenanzahl gleich 970 e^-/nm ist	0,55 nm
Elektronendichte ρ_D		623 e^-/nm^3
Abfallbreite b_D		0,25 nm
Wasserschicht		
Dicke d_W		0 bis 3
Elektronendichte ρ_D		338 e^-/nm^3
Polydispersität z		0 bis 2
Kopfgruppen		
Dicke d_H		0 bis 1
Elektronendichte ρ_H		338 bis 1000 e^-/nm^3
Abfallbreite b_H	Willkürlich. Zu scharfer Abfall kann eine zu hohe Elektronendichten verursachen	0,183 nm
Hintergrunddichte	für Oktan, Dekan, Dodekan	221, 253, 259 e^-/nm^3
Teilchendichte n	minimal, wir gleich Null gesetzt, falls möglich	0 bis 1

Lösungsmittel

Dodekan ($C_{12}H_{26}$) hat eine Dichte von 0,749 g/cm^3 und ein Molekulargewicht von 170,4 g/mol. Die Anzahl der Elektronen ist 98, daraus folgt ein Volumen von 377,8 Å^3 und eine Elektronendichte von 259 e^-/nm^3.

Dodekan ($C_{10}H_{22}$) hat eine Dichte von 0,730 g/cm^3 und ein Molekulargewicht von 142,28 g/mol. Die Anzahl der Elektronen ist 82, daraus folgt ein Volumen von 323,7Å^3 und eine Elektronendichte von 253 e^-/nm^3.

Oktan (C_8H_{18}) hat eine Dichte von 0,699 g/cm^3 und ein Molekulargewicht von 114,23 g/mol. Die Anzahl der Elektronen ist 66, daraus folgt ein Volumen von 271,4 Å^3 und eine Elektronendichte von 221 e^-/nm^3.

A.4. Berechnung der Elektronendichteprofile

Zur einfacheren Modellierung der Elektronendichteprofile wurden diese durch einen sigmoidalen Verlauf berechnet. Die Komplette Kurve wurde dabei abschnittsweise durch die Addition verschiedener Sigmoide $1/\left(1+\exp\left(\frac{x_0-x}{r}\right)\right)$ zusammengesetzt. Die vom Radius abhängige Elektronendichte ist dann:

$$\begin{aligned}\rho(r) &= (\rho_{\text{DNA}}-\rho_{\text{Wasser}})\frac{1}{1+\exp\left(-\frac{r_{\text{DNA}}-r}{b_{\text{DNA}}}\right)}\\ &\quad+(\rho_{\text{Lipid}}-\rho_{\text{Wasser}})\frac{1}{1+\exp\left(\frac{r_{\text{WL}}-r}{b_{\text{Lipid}}}\right)}\\ &\quad-(\rho_{\text{Lipid}}-\rho_{\text{Alkan}})\frac{1}{1+\exp\left(\frac{r_{\text{LA}}-r}{b_{\text{Lipid}}}\right)}+\rho_{\text{Wasser}}\end{aligned} \tag{A.3}$$

Hier ist ρ_{DNA} die Elektronendichten der DNA, ρ_{Wasser} die des Wassers, ρ_{Lipid} die der Lipidkopfgruppen und ρ_{Alkan} die des Alkans. r_{DNA} ist die Übergangsposition zwischen DNA und Wasser, r_{WL} zwischen Wasser und Lipidkopf und r_{LA} zwischen Lipidkopf und Alkylketten bzw. Alkan. a_{DNA} ist die Abfallbreiten der Grenze der DNA und a_{Lipid} der Grenzen der Lipidköpfe.

Die Elektronendichten der einzelnen Komponenten sind:

Lipid

$$\rho_H(r) = (\rho_{\text{Lipid}})\frac{1}{1+\exp\left(\frac{r_{\text{WL}}-r}{b_{\text{Lipid}}}\right)}-(\rho_{\text{Lipid}})\frac{1}{1+\exp\left(\frac{r_{\text{LA}}-r}{b_{\text{Lipid}}}\right)} \tag{A.4}$$

DNA

$$\rho_D(r) = (\rho_{\text{DNA}})\frac{1}{1+\exp\left(\frac{r_{\text{WL}}-r}{b_{\text{Lipid}}}\right)} \tag{A.5}$$

Wasser

$$\begin{aligned}\rho_W(r) &= -(\rho_{\text{Wasser}})\frac{1}{1+\exp\left(-\frac{r_{\text{DNA}}-r}{b_{\text{DNA}}}\right)}\\ &\quad-(\rho_{\text{Wasser}})\frac{1}{1+\exp\left(\frac{r_{\text{WL}}-r}{b_{\text{Lipid}}}\right)}+\rho_{\text{Wasser}}\end{aligned} \tag{A.6}$$

Alkan

$$\rho_{\text{Alkan}}(r) = (\rho_{\text{Alkan}})\frac{1}{1+\exp\left(\frac{r_{\text{LA}}-r}{b_{\text{Lipid}}}\right)} \tag{A.7}$$

In den Ergebnissen (Kapitel 6) wurde nicht der Parametern ρ_{Lipid} angegeben, sondern der Maximalwert der Elektronendichteverteilung $\rho_H = \rho_H\left(\left(r_{\text{LA}} + r_{\text{WL}}\right)/2\right)$.

Fehlerrechnung

Die Bestimmung der molekularen Zusammensetzung setzt eine Integration der Sigmoide in Zylinder- und Kugelkoordinaten voraus. Diese Integrale sind nicht allgemein analytisch lösbar und wurden numerisch berechnet. In dieser Arbeit wurde aus dem Elektronendichteprofil weitere Erkenntnisse wie zum Beispiel das Volumen der Wasserschicht oder die Fläche der Lipidkopfgruppen berechnet. Um für diese Werte einen Fehler angeben zu können ist eine gaußsche Fehlerfortpflanzung nicht möglich. Um dennoch einen Fehler angeben zu könne wurde er über einen Monte Carlo Algorithmus bestimmt. Die einzelnen Anpassungsparameter wurden in Zufallsgrößen mit der jeweiligen Standardabweichung übergeführt und die jeweiligen Elektronendichten abhängig von diesen Zufallsgrößen jeweils 1000mal berechnet. Daraus wurden dann der Durchschnittswert und die Standardabweichung bestimmt.

A.5. Physikalische Daten der Materialien

A.5.1. Lösungsmittel

Alkane

n-Alkane sind unverzweigte Kohlenwasserstoffe der Strukturformel C_nH_{2n+2}. Sie wurden von Sigma-Aldrich (München) in Purum Qualität ($\geq 98\%$) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. In dieser Arbeit wurden die Alkane Oktan (C_8H_{18}), Dekan ($C_{10}H_{22}$) und Dodekan ($C_{12}H_{26}$) verwendet, die sich dadurch auszeichnen, im Temperaturbereich zwischen 0 °C und 100 °C in fluider Form vorzuliegen.

Dimethylformamid (DMF)

DMF ($HCON(CH_3)_2$) wurde als organisches Lösungsmittel für die Dendrimere verwendet.

Wässrige Lösungen

Alle wässrigen Lösungen wurden mit doppeldeionisiertem Wasser mit einem spezifischen Widerstand von 18,2 $M\Omega cm^{-1}$ aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Schwalbach) erzeugt. Dieses wurde für die Lipid/DNA-Komplexe direkt verwendet. Die Tensid/Dendrimer-Komplexe wurden mit verschiedenen Puffern präpariert:

PBS aus 0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4 bei pH=7,4

Puffer A aus 20 mM TrisCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,01 % Tween 20[2], 0,1 mg/mL BSA bei pH=7,5

Puffer B aus 10 mM TrisCl, 150 mM NaCl bei pH=7,3

Puffer C aus 20 mM TrisCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA bei pH=7,5

Table A.2.: Phyikalische Daten der Lösungsmittel [34] bei 20°C, Kompressibilität und Viskosität bei 25°C

Lösungsmittel	(Mol.gew.) $\frac{g}{mol}$	$n_{589\,nm}$	Schmelzp. [°C]	Siedep. [°C]	Dichte $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$	Kompres. $[10^{-10}Pa^{-1}]$	Viskosität [mPa s]
Wasser (H_2O)	18,015	1,33336	0	100	997	4,524	4,524
Oktan(C_8H_{18})	114,23	1,3974	-56,8	125,6	699	12,82	0,508
Dekan($C_{10}H_{22}$)	142,28	1,4102	-29,7	174,1	730	10,94	0,838
Dodekan($C_{12}H_{26}$)	170,34	1,4216	-9,6	216,3	749	9,88	1,383

[2]Gewichtsprozent

A.5.2. Lipide und Tenside

DOPE ($C_{41}H_{78}NO_8P$)
1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
Molekulargewicht 744,05
Hauptübergangstemperatur: -18

DOTAP ($C_{41}H_{80}NO_4Cl$)
1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan
Molekulargewicht: 698,55

Tabelle A.3.: Verwendete Tenside und Co-Tenside [58, 59]

Tenside/ Co-Tenside	Struktur	M [g/mol]	CMC [M]
SDS	$H_3C(CH_2)_{11}SO_4^-Na^+$	288	8,4·10-3
DDAB	Didodecyldimethylammoniumbromid	463	/
CHAPS	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$	615	$4{,}2\cdot10^{-3}$-$6{,}3\cdot10^{-3}$
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	1228	$5{,}9\cdot10^{-5}$
Tween 60	$C_{64}H_{126}O_{26}$	310	10^{-5}
Ethanol	C_2H_5OH	46	/
Phenol	C_6H_5OH	94	/
Benzaldehyd	C_7H_6O	106	/

A.6. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
LSM	Laser Scanning Microscopy
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
CMC	Critical Micelle Concentration

Symbole aus dem Bereich Röntgenkleinwinkelstreuung an zylinderartigen Mizellen

Symbol	Bezeichnung
b_{D}	Abfallbreiten der Grenze der DNA [nm]
b_H	Abfallbreiten der Grenzen der Lipidköpfe [nm]
d_D	Radius der DNA [nm]
d_{W}	Dicke bzw. Radius der Wasserschicht [nm]
d_H	Breite Kopfgruppe [nm]
ρ_{D}	Elektronendichten der DNA [e^-/nm^3]
ρ_{W}	Elektronendichten des Wassers [e^-/nm^3]
ρ_H	Elektronendichten der Lipidkopfgruppen [e^-/nm^3]
ρ_{Alkan}	Elektronendichten des Alkans [e^-/nm^3]
n	Teilchenkonzentration - Einfluß des Strukturfaktors
z	Polydispersität
R_G	Gyrationsradius [nm]
R_C	Gyrationsradius des Querschnitts [nm]
N_{e^-}	Elektronenanzahl
N_H	Anzahl Lipidmoleküle
N_W	Anzahl Wasserermoleküle
F	Anteil der zylindrischer Mizellen [%]
χ^2	Chi-Quadrat, Güte der Anpassung
Φ	DOPE Anteil an der Gesamtlipidmenge [Gewichts-%]
Φ_{DNA}	Φ auf das an die DNA gebundene Lipid bezogen [Gewichts-%]

Symbole aus dem Bereich Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie an Tensid/Dendrimer-Komplexen

Symbol	Bezeichnung
D	Diffusionskonstante
τ_D	Diffusionszeit
N	Teilchenzahl im Fokus
R_H	hydrodynamischer Radius

Literaturverzeichnis

[1] Abdalla, M. A., J. Bayer, J. O. Rädler und K. Müllen: *Synthesis and self-assembly of perylenediimide-oligonucleotide conjugates.* Angewandte Chemie-International Edition, 43(30):3967–3970, 2004.

[2] Berne, B.J. und R. Pecora: *Dynamic Light Scattering.* Wiley, New York, 1976.

[3] Blanton, T.N., T.C. Huang, H. Toraya, C.R. Hubbard, S.B. Robie, D. Louer, H.E. Gobel, G. Will, R. Gilles und T. Raftery: *JCPDS - International Centre for Diffraction Data round robin study of silver behenate. A possible low-angle X-ray diffraction calibration standard.* Powder Diffraction, 10:91–95, 1995.

[4] Budker, V. G., P. M. Slattum, S. D. Monahan und J. A. Wolff: *Entrapment and condensation of DNA in neutral reverse micelles.* Biophysical Journal, 82(3):1570–1579, 2002.

[5] Castelletto, V., R. Itri, L. Q. Amaral und G. P. Spada: *Small-Angle X-Ray-Scattering of DNA Fragments - Form and Interference Factors.* Macromolecules, 28(24):8395–8400, 1995.

[6] Chandler, David und Hans C. Andersen: *Optimized Cluster Expansions for Classical Fluids. II. Theory of Molecular Liquids.* The Journal of Chemical Physics, 57(5):1930–1937, 1972.

[7] Chen, Z. und R. P. Rand: *Comparative study of the effects of several n-alkanes on phospholipid hexagonal phases.* Biophysical Journal, 74(2):944–952, 1998.

[8] Epand, R. M., N. Fuller und R. P. Rand: *Role of the position of unsaturation on the phase behavior and intrinsic curvature of phosphatidylethanolamines.* Biophysical Journal, 71(4):1806–1810, 1996.

[9] Fournet, G.: *Étude Théorique et Expérimentale de la Diffusion des Rayons X, par les Ensembles Denses de Particules.* Bull. Soc. Franc. Mineral. Crist, 74:39, 1951.

[10] Gawrisch, K., V. A. Parsegian, D. A. Hajduk, M. W. Tate, S. M. Gruner, N. L. Fuller und R. P. Rand: *Energetics of a Hexagonal Lamellar Hexagonal-Phase Transition Sequence in Dioleoylphosphatidylethanolamine Membranes.* Biochemistry, 31(11):2856–2864, 1992.

[11] Gazzillo, D., A. Giacometti, R. G. Della Valle, E. Venuti und F. Carsughi: *A scaling approximation for structure factors in the integral equation theory of polydisperse nonionic colloidal fluids.* Journal of Chemical Physics, 111(16):7636–7645, 1999.

[12] Gennes, Pierre-Gilles de: *Scaling Concepts in Polymer Physics.* Cornell University Press., London, 1979.

[13] Glatter, O.: *Static Light Scattering of Large Systems.* In: Lindner, P. und T. Zemb (Herausgeber): *Neutrons, X-Rays and Light*, Seiten 171–201. Elsevier Science, 2002.

[14] Glatter, O. und O. Kratky: *Small Angle X-Ray Scattering.* Academic Press, London, 1982.

[15] Hall, C. J., R. A. Lewis, B. Parker und J. S. Worgan: *The Secret Life of Image Plate Phosphors.* Review of Scientific Instruments, 63(1):697–699, 1992.

[16] Hess, S. T., S. H. Huang, A. A. Heikal und W. W. Webb: *Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: A review.* Biochemistry, 41(3):697–705, 2002.

[17] Hohner, A. Bayer, J. Rädler J.O.: *Wormlike reverse DNA/Lipid micelles.* in Vorbereitung.

[18] Holmberg, K., B. Jönsson, B Kronberg und B. Lindman: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution.* Yohn Wiley Sons Ltd, 2003.

[19] Huang, T. C., H. Toraya, T. N. Blanton und Y. Wu: *X-Ray-Powder Diffraction Analysis of Silver Behenate, a Possible Low-Angle Diffraction Standard.* Journal of Applied Crystallography, 26:180–184, 1993.

[20] Huczko, A.: *Template-based synthesis of nanomaterials.* Applied Physics a-Materials Science & Processing, 70(4):365–376, 2000.

[21] Israelachvili, J.N.: *Physics of amphiphiles: micelles, vesicles and microemulsions.* North Holland, Amsterndam, 1985.

[22] Jerke, G., J. S. Pedersen, S. U. Egelhaaf und P. Schurtenberger: *Static structure factor of polymerlike micelles: Overall dimension, flexibility, and local properties of lecithin reverse micelles in deuterated isooctane.* Physical Review E, 56(5):5772–5788, 1997.

[23] Kampmann, R., V. Deriglazov, M. Haese-Seiller, M. Marmotti, M. Tristl und E. Sackmann: *REFSANS: a novel reflectometer for analyses of liquid and soft surfaces at the new research reactor FRM-II in Munich/Germany.* Physica B, 276:212–213, 2000.

[24] Kampmann, R., M. Haese-Seiller, M. Marmotti, J. Burmester, V. Deriglazov, V. Syromiatnikov, A. Okorokov, F. Frisius, M. Tristl und E. Sackmann: *The novel reflectometer REFSANS for analyses of liquid and soft surfaces at the new research reactor FRM-II in Munich, Germany.* Applied Physics a-Materials Science & Processing, 74:S249–S251, 2002.

[25] Kinning, D. J. und E. L. Thomas: *Hard-Sphere Interactions between Spherical Domains in Diblock Copolymers.* Macromolecules, 17(9):1712–1718, 1984.

[26] Kirk, G. L., S. M. Gruner und D. L. Stein: *A Thermodynamic Model of the Lamellar to Inverse Hexagonal Phase-Transition of Lipid-Membrane Water-Systems.* Biochemistry, 23(6):1093–1102, 1984.

[27] Klein, R.: *Interacting Colloidal Suspensions.* In: Lindner, P. und T. Zemb (Herausgeber): *Neutrons, X-Rays and Light*, Seiten 351–379. Elsevier Science, 2002.

[28] Koltover, I., T. Salditt, J. O. Rädler und C. R. Safinya: *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery.* Science, 281(5373):78–81, 1998.

[29] Koltover, I., T. Salditt und C. R. Safinya: *Phase diagram, stability, and overcharging of lamellar cationic lipid-DNA self-assembled complexes.* Biophysical Journal, 77(2):915–924, 1999.

[30] Kotlarchyk, M. und S. H. Chen: *Analysis of Small-Angle Neutron-Scattering Spectra from Polydisperse Interacting Colloids.* Journal of Chemical Physics, 79(5):2461–2469, 1983.

[31] Lakshmanan, A. R., N. Murase, T. Yazawa, J. Qiu, T. Mitsuyu, K. Hirao, A. Tomita und W. Hoffmann: *Luminescence studies in BaFBr and BaFBr : Eu.* Radiation Measurements, 33(1):119–127, 2001.

[32] Lewis, R.N.A.H. und R.N. McElhaney: *Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: Calorimetric and 31P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids.* Biophysical Journal, 79:1455–1464, 2000.

[33] Li, X. B., Z. C. Lin, J. Cai, L. E. Scriven und H. T. Davis: *Polymer-Induced Microstructural Transitions in Surfactant Solutions.* Journal of Physical Chemistry, 99(27):10865–10878, 1995.

[34] Lide, David R (Herausgeber): *Handbook of Chemistry and Physics.* CRC Press LCC, 82nd Edition Auflage, 2001.

[35] Luzzati, V. und D. Taupin: *Information-Content and Retrieval in Solution Scattering Studies. 2. Evaluation of Accuracy and Resolution.* Journal of Applied Crystallography, 19:39–50, 1986.

[36] Magde, D. und E.L. Elson: *Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization.* Biopolymers, 13:29–61, 1974.

[37] Martin, J.E. und A.J. Hurd: *Scattering from Fractals.* J. Appl. Cryst., 20:61–78, 1987.

[38] Minard-Basquin, C., T. Weil, A. Hohner, J. O. Rädler und K. Müllen: *A polyphenylene dendrimer-detergent complex as a highly fluorescent probe for bioassays.* Journal of the American Chemical Society, 125(19):5832–5838, 2003.

[39] Moore, Peter B.: *Small-Angle Scattering. Information Content and Error Analysis.* Journal of Applied Crystallography, 13:168–175, 1980.

[40] Mori, C., T. Suzuki, S. Koido, A. Uritani, H. Miyahara, K. Yanagida und J. Miyahara: *Effect of background radiation shielding on natural radioactivity distribution measurement with imaging plate.* Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment, 369(2-3):544–546, 1996.

[41] Nakano, M., J. Komatsu, S. Matsuura, K. Takashima, S. Katsura und A. Mizuno: *Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion.* Journal of Biotechnology, 102(2):117–124, 2003.

[42] Ne, F., D. Gazeau, J. Lambard, P. Lesieur, T. Zemb und A. Gabriel: *Characterization of an Image-Plate Detector Used for Quantitative Small-Angle-Scattering Studies.* Journal of Applied Crystallography, 26:763–773, 1993.

[43] Oppenlander, A., C. Rambaud, H. P. Trommsdorff und J. C. Vial: *Translational Tunneling of Protons in Benzoic-Acid Crystals.* Physical Review Letters, 63(13):1432–1435, 1989.

[44] Orlich, B. und R. Schomacker: *Enzyme catalysis in reverse micelles.* In: *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation*, Band 75 der Reihe *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Seiten 185–208. 2002.

[45] Ornstein, L.S. und F. Zernike: *Accidental deviations of density and opalesence at the critical point of a single substance.* Proceedings of the Section of Science, Royal Acadmey of Sciences, 17:793–806, 1914.

[46] Orthaber, D., A. Bergmann und O. Glatter: *SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard.* Journal of Applied Crystallography, 33:218–225, 2000.

[47] Pedersen, J. S.: *Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions: modeling and least-squares fitting.* Advances in Colloid and Interface Science, 70:171–210, 1997.

[48] Pedersen, J. S.: *Modelling of Small-Angle Scattering Data from Colloids and Polymer Systems.* In: Lindner, P. und T. Zemb (Herausgeber): *Neutrons, X-Rays and Light*, Seiten 391–420. Elsevier Science, 2002.

[49] Pedersen, J. S., D. Posselt und K. Mortensen: *Analytical Treatment of the Resolution Function for Small-Angle Scattering.* Journal of Applied Crystallography, 23:321–333, 1990.

[50] Pedersen, J. S. und C. Riekel: *Resolution Function and Flux at the Sample for Small-Angle X-Ray-Scattering Calculated in Position Angle Wavelength Space.* Journal of Applied Crystallography, 24:893–909, 1991.

[51] Pedersen, J. S. und P. Schurtenberger: *Cross-section structure of cylindrical and polymer-like micelles from small-angle scattering data. 1. Test of analysis methods.* Journal of Applied Crystallography, 29:646–661, 1996.

[52] Percus, J. K. und G. J. Yevick: *Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Coordinates.* Physical Review, 110(1):1–13, 1958.

[53] Press, William H., Saul A. Teukolsky, William T. Vetterilng und Brian P. Flannery: *Numerical Recipes in C.* Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

[54] Rädler, J. O., I. Koltover, T. Salditt und C. R. Safinya: *Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes.* Science, 275(5301):810–814, 1997.

[55] Rappolt, M., A. Hickel, F. Bringezu und K. Lohner: *Mechanism of the lamellar/inverse hexagonal phase transition examined by high resolution X-ray diffraction.* Biophysical Journal, 84(5):3111–3122, 2003.

[56] Reich, C., M. Hochrein, B. Krause und B. Nickel: *A Microfluidic Setup for Studies of Solid-Liquid Interfaces using X-ray Reflectivity and Fluorescence Microscopy.* Review of Scientific Instruments, 76:095103, 2005.

[57] Reimer, D. L., Y. P. Zhang, S. Kong, J. J. Wheeler, R. W. Graham und M. B. Bally: *Formation of Novel Hydrophobic Complexes between Cationic Lipids and Plasmid DNA.* Biochemistry, 34(39):12877–12883, 1995.

[58] Ruckenstein, E. und R. Nagarajan: *Critical Concentrations in Micellar Solutions.* Journal of Colloid and Interface Science, 57(2):388–390, 1976.

[59] Ruckenstein, E. und R. Nagarajan: *Critical Micelle Concentration and the Transition Point for Micellar Size Distribution.* Journal of Physical Chemistry, 85(20):3010–3014, 1981.

[60] Sackmann, E.: *Physikalische Grundlagen der molekularen Dynamik von Membranen.* In: Hoppe, W. (Herausgeber): *Biophysik.* Springer-Verlag, Heidelberg, 1984.

[61] Safinya, C. R.: *Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery.* Current Opinion in Structural Biology, 11:440–448, 2001.

[62] Schoot, P. van der: *Growth of living polymers in a good solvent.* Europhysics Letters, 39(1):25–30, 1997.

[63] Schurtenberger, P., G. Jerke, C. Cavaco und J. S. Pedersen: *Cross-section structure of cylindrical and polymer-like micelles from small-angle scattering data. 2. Experimental results.* Langmuir, 12(10):2433–2440, 1996.

[64] Schweizer, K. S. und J. G. Curro: *PRISM Theory of the Structure, Thermodynamics, and Phase-Transitions of Polymer Liquids and Alloys.* Advances in Polymer Science, 116:319–377, 1994.

[65] Seddon, J.M. und R.H. TEMPLER: *Polymorphism of Lipid-Water Systems.* In: Lipowsky, R. und E. Sackmann (Herausgeber): *Handbook of Biological Physics*, Band 1, Seiten 97–160. Elsevier Science B.V., 1995.

[66] Seeman, N. C.: *DNA nanotechnology: Novel DNA constructions.* Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 27:225–248, 1998.

[67] Seeman, N. C.: *DNA nicks and nodes and nanotechnology.* Nano Letters, 1(1):22–26, 2001.

[68] Seggern, H. von: *Photostimulable X-ray storage phosphors: a review of present understanding.* Brazilian Journal of Physics, 29(2):254–268, 1999.

[69] Shangguan, T., D. Cabral-Lilly, U. Purandare, N. Godin, P. Ahl, A. Janoff und P. Meers: *A novel N-acyl phosphatidylethanolamine-containing delivery vehicle for spermine-condensed plasmid DNA.* Gene Therapy, 7(9):769–783, 2000.

[70] Shannon, C.E. und W. Weaver: *The mathematical theory of communication.* University of Illinois Press, Urbana, 1949.

[71] Shimada, T., M. Doi und K. Okano: *Concentration Fluctuation of Stiff Polymers. 1. Static Structure Factor.* Journal of Chemical Physics, 88(4):2815–2821, 1988.

[72] Siegel, D. P., J. Banschbach und P. L. Yeagle: *Stabilization of Hii Phases by Low-Levels of Diglycerides and Alkanes - an NMR, Calorimetric, and X-Ray-Diffraction Study.* Biochemistry, 28(12):5010–5019, 1989.

[73] Simmel, F. C. und B. Yurke: *A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states.* Applied Physics Letters, 80:883–885, 2002.

[74] Starchev, K., J. W. Zhang und J. Buffle: *Applications of fluorescence correlation spectroscopy - Particle size effect.* Journal of Colloid and Interface Science, 203(1):189–196, 1998.

[75] Svergun, D. I. und M. H. J. Koch: *Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution.* Reports on Progress in Physics, 66(10):1735–1782, 2003.

[76] Takahashi, K.: *Progress in science and technology on photostimulable BaFX : Eu2+ (X = Cl, Br, I) and imaging plates.* Journal of Luminescence, 100(1-4):307–315, 2002.

[77] Tanford, Charles: *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes.* Wiley, New York, 1980.

[78] Tao, Y. Z., N. H. Olson, W. Xu, D. L. Anderson, M. G. Rossmann und T. S. Baker: *Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions.* Cell, 95(3):431–437, 1998.

[79] Taupin, D. und V. Luzzati: *Information-Content and Retrieval in Solution Scattering Studies. 1. Degrees of Freedom and Data Reduction.* Journal of Applied Crystallography, 15(JUN):289–300, 1982.

[80] Thiele, E.: *Equation of State for Hard Spheres.* Journal of Chemical Physics, 39(2):474–, 1963.

[81] Turner, D. C., S. M. Gruner und J. S. Huang: *Distribution of Decane within the Unit-Cell of the Inverted Hexagonal (Hii) Phase of Lipid Water Decane Systems Determined by Neutron-Diffraction.* Biochemistry, 31(5):1356–1363, 1992.

[82] Wagner, K., D. Harries, S. May, V. Kahl, J. O. Rädler und A. Ben-Shaul: *Direct evidence for counterion release upon cationic lipid-DNA condensation.* Langmuir, 16(2):303–306, 2000.

[83] Wang, W. Z., Z. H. Liu, C. L. Zheng, C. K. Xu, Y. K. Liu und G. H. Wang: *Synthesis of CdS nanoparticles by a novel and simple one-step, solid-state reaction in the presence of a nonionic surfactant.* Materials Letters, 57(18):2755–2760, 2003.

[84] Welnak, C., G. J. Chen und F. Cerrina: *Shadow - a Synchrotron-Radiation and X-Ray Optics Simulation Tool.* Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment, 347(1-3):344–347, 1994.

[85] Wertheim, M. S.: *Exact Solution of Percus-Yevick Integral Equation for Hard Spheres.* Physical Review Letters, 10(8):321, 1963.

[86] Wong, F. M. P., D. L. Reimer und M. B. Bally: *Cationic lipid binding to DNA: Characterization of complex formation.* Biochemistry, 35(18):5756–5763, 1996.

[87] Yin, Y. Alivisatos, A. P.: *Colloidal nanocrystal synthesis and the organic?inorganic interface.* Nature, 437:664–670, 2005.

[88] Zanten, John H. van: *The Zimm plot and its analogs as indicators of vesicle and micelle size polydispersity.* Journal of Chemical Physics, 102(22):9121–9128, 1995.

[89] Zantl, Roman: *Flüssigkristalle aus DNA und kationischen Lipidmembranen:Struktur und Phasenverhalten.* Doktorarbeit, Technischen Universität München, 2001.

[90] Zimm, B. H.: *Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering; Preliminary Results on Polystyrene Solutions.* The Journal of Chemical Physics, 16(12):1099–1116, 1948.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Hohner

Familienstand: verheiratet, ein Kind (Chantal Kiara, geboren am 23.08.2001)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdaten: 17. September 1972 in Landsberg am Lech

Studium und Schulbildung

1979-1983	Grundschule
1983-1993	Ignaz-Kögler-Gymnasium Landsberg, Abschluß:Allgemeine Hochschulreife
1994-2000	Studium der Fachrichtung Diplom Physik an der Technischen Universität München
2000	Abschluß: Diplom Physiker Univ. Diplomarbeitsthema "Lyo- und thermotrope Physisorption von Lipiden an hydrophilen Festkörperoberflächen - Eine Untersuchung mittels ATR-FTIR und SAXS"

Promotion

ab 03/2000	an der TU München
08/2000	Umzug an das Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz
11/2001	Umzug an die Ludwig-Maximilians-Universität München

Zum Abschluß möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet und die zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Danke an ...

... **Prof. Dr. Joachim O. Rädler** für die vielfältigen Anregungen und für die Möglichkeit, diese Arbeit in weitgehender Freiheit aber nie ohne Hilfe durchführen zu können.

... **Dr. Claire Basquin** für die vielen schönen Stunden am FCS.

... **Dr. Willi Fenzl** für die interessanten Gespräche über Technik, Wissenschaft und Philosophie. Aber auch dafür, daß ich die hier aufgebaute Anlage bei dir in guten Händen weiß.

... **Dr. Marion Hochrein** für die Erkenntnis, daß scheinbar einfache Frage nie so einfach sind. Unsere gemeinsamen Stunden in dunklen Kellergewölben werde ich immer in guter Erinnerung halten.

... **Özcan Kaya** für interessante Einblicke in Vielerlei. Danke auch dafür, daß du viele frustrierende Momente nahrungstechnisch entschärfen konntest.

... **Dr. Simon Keller** für deine Ausflüge in fremde Civilisationen. Deine Grillkünste werde ich hoffentlich nie vermissen.

... **Christian Reich**. Du hast mir durch deine schonungslos ehrliche Art gerade vor der Prüfung sehr geholfen.

... **Dr. Laura Rusu**, die mich durchs Studium begleitet hat und nicht ganz unschuldig war, daß ich an diesem Lehrstuhl promoviert habe.

... **Gerlinde Schwake** und **Susi Kempter**, die sich um das Chaos im Labor gekümmert haben. Besonders an Gerlinde ein Danke für dein oft freundliches und hilfsbereites Wesen.

Von großer Bedeutung für mich sind besonders eine freundschaftliche und anregende Atmosphäre. Diese wurden durch meine Zimmergenossen in den verschiedenen Büros **Martin Clausen, Dr. Jason DeRouchey, Alex Gansen**, **Dr. Stephanie Mangenot und Kirstin Seidl** mitgetragen. Aber auch von den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe **Dr. Johannes Bayer, Daniel Hönig, Judith Leierseder, Dr. Bert Nickel**, **Lana Polero, Alexander Rapp** und **allen anderen**. Ein herzliches Dankeschön an euch alle. Da ich diese Promotion nicht an der LMU begonnen habe, ebenso ein herzliches Dankeschön **nach Mainz**.

Mein besonderer Dank geht an meine Frau **Britta** für Alles.