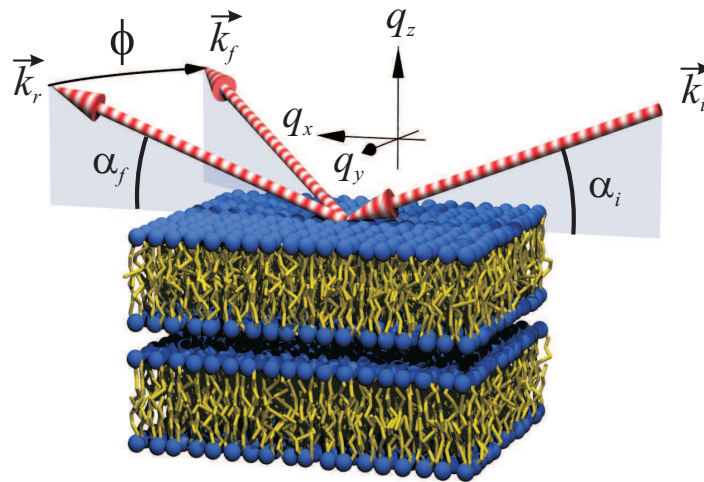


Master Forschungspraktikum

Schwerpunkt Biophysik und Komplexe Systeme (M.phy.402)



Versuchsanleitung zu BK.SLM

Strukturuntersuchung von Lipidmembranen mit Röntgenreflektivität

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Lipid-Modellsysteme	4
2.1	Die Biologische Membran	4
2.2	Chemische Struktur der Lipidmoleküle	4
2.3	Form und Struktur der Lipidstapel	6
2.4	Geometrische Eigenschaften der Lipide	7
2.5	Wechselwirkungen zwischen Membranen	8
2.6	DOPC als Modellsystem	9
3	Röntgenstrukturanalyse von Lipidmembranen	10
3.1	Streuvektoren	10
3.2	Brechungsindex und Totalreflexion	11
3.3	Fresnelreflektivität der Röntgenstrahlung	12
3.4	Bragg-Reflexion	13
3.5	Messverfahren	14
3.6	Ausleuchtungskorrektur	15
4	Theoretische Beschreibung der Lipiddoppelschicht	16
4.1	Formfaktor, Strukturfaktor	16
4.2	Rekonstruktion des Elektronendichteprofiles	17
4.3	Lösung des Phasenproblems mit der <i>swelling</i> -Methode	18
5	Präparation und Messung	23
5.1	Präparation auf Festkörpersubstrat	23
5.2	Probenumgebung	23
5.3	Aufbau und Bedienung des Diffraktometers	24
5.4	Justage	25
5.5	Messung	26
6	Auswertung	26
6.1	Auswertung ohne swelling-Methode (Standard)	27
6.2	Auswertung mit der swelling-Methode	27

7	Literatur	29
8	Anmerkung	29

1 Zusammenfassung

Biologische Membranen sind die vielleicht wichtigsten Grenzflächen in der Natur. Sie grenzen jede Zelle von ihrer Umgebung ab und ermöglichen es, dass sich spezialisierte Zelltypen und somit höherentwickeltes Leben entwickeln können. Bei einer Vielzahl von Prozessen auf zellulärer und subzellulärer Ebene, z.B. Nervenreizleitung, Zellteilung oder Eintritt eines Virus in eine Zelle, spielen Membranen eine zentrale Rolle.

Grundgerüst jeder biologischen Membran ist die Lipiddoppelschicht. In diesem Versuch lernen Sie einige ihrer grundlegenden Eigenschaften kennen. Die Dicke einer Lipiddoppelschicht beträgt typischerweise ca. 5 nm, daher ist harte Röntgenstrahlung mit Wellenlängen von etwa 0.1 nm besonders gut geeignet, um ihre Struktur zu untersuchen.

Ziel des Versuches ist es, das Elektronendichteprofil einer Lipiddoppelschicht zu ermitteln. Zu diesem Zweck werden Sie zunächst als Modellsystem festkörpergestützten Membranstapel herstellen. Anschließend werden Sie an diesen Proben Röntgenreflektivitätsmessungen durchführen. Aufgrund des verhältnismäßig einfachen Aufbaus dieser Proben (1d-Flüssigkristalle, Zentrosymmetrie) sind sie sehr gut geeignet, um die Grundlagen der Streutheorie zu üben. Ein wichtiger Punkt hierbei ist das Phasenproblem der Kristallographie, welches in diesem Versuch mit der sogenannten *swelling*-Methode gelöst werden kann.

2 Lipid-Modellsysteme

2.1 Die Biologische Membran

Grundelement aller Organismen ist die Zelle. Durch die Zellmembran ist die Zelle von der Außenwelt getrennt. Im Jahr 1972 entwarfen Singer und Nicolson ein Modell für die Organisation biologischer Membranen, das *Flüssig-Mosaik-Modell* [2]. Nach dieser heute allgemein akzeptierten und vielfach bestätigten Modellvorstellung bestehen biologische Membranen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen. Dabei besteht das Grundgerüst der Membran aus einer planaren Lipiddoppelschicht von ca. 50 Å Dicke, in die oder auf deren Oberseite spezielle Membranproteine integriert sind (vgl. Abb.1). Die Lipiddoppelschicht bildet eine zweidimensionale Flüssigkeit und kann als Grundstruktur biologischer Membranen angesehen werden. Zwischen den Lipiden sind Proteinmoleküle eingebettet. Manche der Proteine reichen durch die Membran hindurch und sind auf beiden Seiten der Membran dem wässrigen Medium ausgesetzt. Obwohl die Lipidmoleküle senkrecht zur Oberfläche der Membran relativ starr ausgerichtet sind, sind sie in lateraler Bewegung sehr beweglich. Auch Proteine können sich lateral ungehindert in der Lipiddoppelschicht bewegen. Es ist dagegen für die Proteine wie auch für die Lipide nahezu unmöglich, von einer Membranoberfläche zur anderen zu wandern (*engl. flip-flop*).

2.2 Chemische Struktur der Lipidmoleküle

Als Hauptbestandteile von biologischen Membranen sind Lipide von zentraler Bedeutung. Es handelt sich um sog. amphiphile Moleküle, die sowohl hydrophobe (Wasser abweisende) als

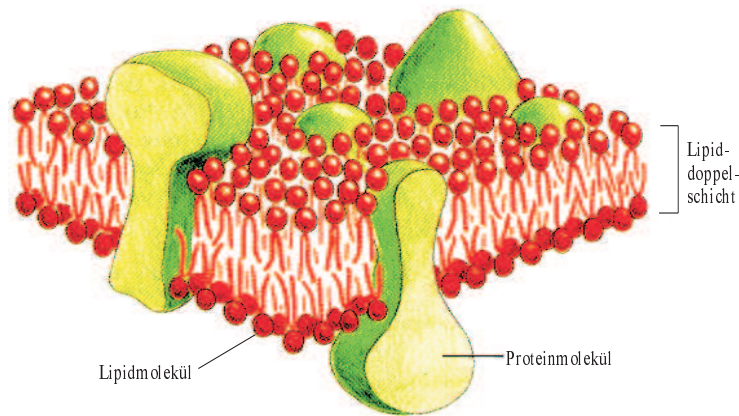


Abbildung 1: *Dreidimensionale schematische Darstellung einer biologischen Membran. Die Lipiddoppelschicht dient zum einen als Lösungsmittel für sog. integrale Proteine, zum anderen als Permeabilitätsbarriere. Abb. entnommen aus [3]*

auch hydrophile (Wasser bevorzugende) Eigenschaften in einem Molekül vereinen. Der wesentliche Unterschied der hydrophilen gegenüber den hydrophoben Regionen eines Moleküls besteht in ihrer unterschiedlichen Polarität: Sind die hydrophoben Regionen eher apolar und damit nur unter Energieaufwand im polaren Lösungsmittel Wasser zu lösen, so lagern sich an den hydrophoben bzw. polaren Oberflächenbereichen polare Wassermoleküle unter Freisetzung von elektrostatischer Energie an. Bei den Lipidmolekülen ist die Kopfgruppe hydrophil, die Kettenregion dagegen hydrophob. Dieser Gegensatz hat entscheidenden Einfluss auf die energetisch günstigsten Strukturen, die sich spontan in einem Wasser-Lipid-Gemisch bilden.

In biologischen Membranen gibt es eine Reihe natürlich vorkommender Lipide. Davon stellen Phospholipide die wichtigste Gruppe dar. Ein Phospholipid besteht aus einem Glycerolrückgrat, an das durch Veresterung eine Phosphatkopfgruppe mit angehängtem Rest (Cholin, Serin, etc.) sowie zwei Fettsäurereste gebunden sind. In Abb. 2 ist die chemische Struktur eines Phospholipids (DOPC) dargestellt. In Tab. 1 sind einige in der Natur häufig vorkommenden Phospholipide sowie ihre gebräuchlichen Abkürzungen aufgeführt.

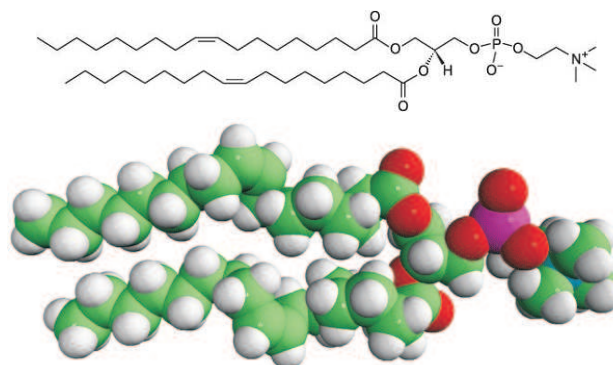


Abbildung 2: *Chemische Struktur des im Versuch verwendeten Phospholipids DOPC.*

Kurzbez.	vollständiger Name	R1	R2	Ladung
DMPC	Dimyristoyl-Glycero-Phospho-Choline	14:0	14:0	0
POPS	Oleoyl-Palmitoyl-Glycero-[Phospho-L-Serine]	18:1	16:0	-1
DLPC	Dilauroyl-Glycero-Phosphocholine	12:0	12:0	0
DOPC	Di-oleoyl-Glycero-Phosphocholine	18:1	18:1	0
DPPC	Dipalmitoyl-Glycero-Phosphocholine	16:0	16:0	0
DMPG	Dimyristoyl-Glycero-[Phospho-rac-(1-Glycerol)]	14:0	14:0	-1
DMPE	Dimyristoyl-Glycero-Phosphoethanolamine	14:0	14:0	0
OPPC	Oleoyl-Palmitoyl-Glycero-Phospho-Choline	18:1	16:0	0

Tabelle 1: *Bezeichnungen, Kettenlängen und Nettoladungen einiger häufig in der Natur vorkommenden Phospholipide. R1 bzw. R2 bezeichnen die Länge der ersten bzw. zweiten Kette in der Anzahl von C-Atomen. Die Nettoladungen sind in Einheiten der Elementarladung e^- angegeben.*

2.3 Form und Struktur der Lipidstapel

Neben der Größe der hydrophilen und hydrophoben Bereiche der Lipidmoleküle haben auch der Wassergehalt, die Temperatur und ggf. die Konzentration im Wasser gelöster Salze großen Einfluss auf die möglichen Aggregationsformen der Lipidmoleküle, die sehr unterschiedlich sein können (Polymorphismus der Lipide). Beispiele solcher Aggregate, die unter gegebenen Umgebungsbedingungen (Druck p und Temperatur T) dem Minimum der freien Enthalpie $G(p, T) = E - TS + pV$ des Systems entsprechen, sind in Abb. 3 dargestellt. Darüberhinaus ist eine Vielzahl weiterer möglicher Phasen von Lipid-Wasser-Systemen bekannt.

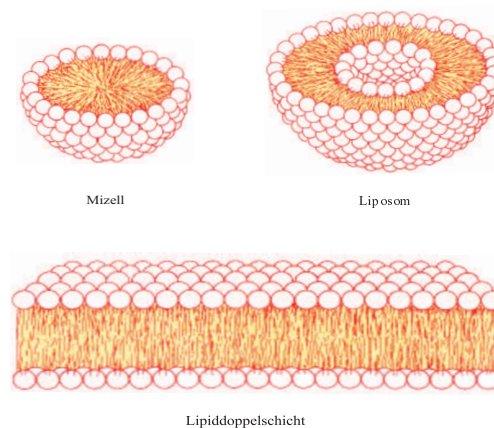


Abbildung 3: *Schematische Darstellung einiger häufig vorkommender Lipidaggregate: (links oben) Mizelle; enthält kein Lösungsmittel, (unten) Lipiddoppelschicht; häufig auch in deutschsprachiger Literatur als 'Bilayer' bezeichnet (rechts oben) Liposom oder Vesikel; aus Doppelschichten aufgebaut, enthält Lösungsmittel, in dem auch Stoffe, wie z.B. DNA in die Zelle transportiert werden können)*

Wegen der amphiphilen Eigenschaft des Phospholipidmoleküls sind die Fettsäureketten bei

Bildung der Mizellen in deren Inneren verborgen, die geladenen hydrophilen Kopfgruppen sind dagegen zum wässrigen Medium hin, an der Oberfläche liegend, angeordnet. Die Mizellen sind kugelförmig mit einem hydrophoben Zentrum, daß nur von Fettsäureketten gebildet wird. Mizellartige Strukturen können tausende von Lipidmolekülen enthalten. Liposome bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, die einen wässrigen Innenraum umgibt. Als Grenzfall großer Liposome kann die planare Lipiddoppelschicht angesehen werden.

2.4 Geometrische Eigenschaften der Lipide

Um von der Form eines einzelnen Lipidmoleküls auf dessen mögliche Aggregationsformen zu schließen, können einfache geometrische Überlegungen herangezogen werden. Dazu definiert man den Packungsparameter P durch das Verhältnis $P = \frac{V}{a_0 l_c}$, wobei a_0 die Kopfgruppenfläche, V das Volumen der Fettsäureketten und l_c die Länge der Fettsäureketten ist. In Abb. 4 sind die genannten Parameter veranschaulicht.

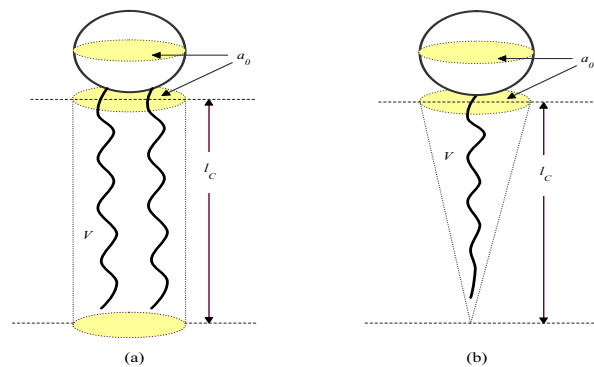


Abbildung 4: Die Packungsparameter (a_0, l_c, V) bestimmen die geometrischen Eigenschaften der Lipide. a_0 charakterisiert die zur Ausbildung eines stabilen Aggregats nötige optimale Kopfgruppenfläche an der Grenzfläche zwischen Kopfgruppe und Fettsäure eines Lipidmoleküls, l_c ist die kritische Länge, welche die Fettsäureketten der Lipide in einem stabilen Aggregat noch annehmen können und V ist das von ihnen eingenommene Volumen. (a) Ein Doppelkettenmolekül, das im Verbund zur Ausbildung von planaren Strukturen (Bilayern) neigt. (b) Ein Lipidmolekül mit nur einer Fettsäurekette. Solche Lipide können in wässriger Lösung Mizellen (Abb. 3) mit einem „inneren“ Radius $R = l_c$ ausbilden.

Für verschiedene Werte von P ergeben sich die unterschiedliche Formen. Hat das Lipidmolekül zylindrische Form, so wird tendenziell die Bildung planarer Lipiddoppelschichten bevorzugt. Wenn aber die Kopfgruppenfläche größer (kleiner) als die Kettengrundfläche ist, das Lipidmolekül also eine konische Form hat, bilden sich bevorzugt (inverse) Mizellen. Diese Modellvorstellung stellt zwar eine grobe Vereinfachung dar, bietet jedoch häufig einen ersten Erklärungsansatz.

2.5 Wechselwirkungen zwischen Membranen

Die Kräfte im Inneren eines biologischen Systems führen zur Ausbildung stabiler Strukturen unter Maßgabe der Minimierung der Gibbschen freien Enthalpie (bei konstanter Temperatur und konstantem Druck). Die Kräfte haben im einzelnen unterschiedliche Ursachen, lassen sich jedoch alle auf die elektrostatische Wechselwirkung zurückführen. Alle anderen Wechselwirkungen (Gravitation, schwache und starke WW) spielen in biologischen Systemen auf molekularer Ebene praktisch keine Rolle. Im folgenden werden die beiden wichtigsten Kräfte bei der Wechselwirkung zwischen Lipidmolekülen näher erläutert.

(1) Van-der-Waals Potential

Durch thermische Fluktuationen kommt es zu inhomogenen Ladungsverteilungen, die wiederum Ladungsverteilungen in den Membranen induzieren, so daß letztlich eine Anziehung zwischen den Lipidmolekülen resultiert. Das für diese Wechselwirkung verantwortliche Van-der-Waals Potential setzt sich zusammen aus einem statischen und einem dispersiven Anteil.

Der **statische Anteil** wird für kleine Membranabstände oft durch die Näherung zweier durch eine dünne Wasserschicht getrennter Halbräume aus Kohlenwasserstoff ausgedrückt. Es gilt dann mit $d_h \rightarrow 0$ (s.u.):

$$V_0(d_h, T) = \frac{H_{stat}(l_{DH})k_B T}{12\pi} \frac{1}{d_h^2}, \quad (1)$$

wobei $H_{stat}(l_{DH})$ die statische Hamakerkonstante, l_{DH} die Debeye-Hückel-Länge und d_h den Abstand der Schichten (vgl. Abb. 5) bezeichnen. Der **dispersive Anteil** kann wie folgt beschrieben werden:

$$V_{dis}(d_h) = \frac{H_{dis}k_B T}{16\pi d_h^2} \left[1 - \frac{2}{1 + a/d_h} + \frac{1}{1 + 2a/d_h} \right] \quad (2)$$

mit der dispersiven Hamakerkonstante $H_{dis} = 2 \sum_{n=0}^{\infty} \Delta_n^2$ [4].

Hierbei beschreibt Δ_n die relative Differenz der frequenzabhängigen Dielektrizitätskonstanten beider Medien mit $\Delta_n = (\epsilon_{H_2O}(\omega_n) - \epsilon_{CH_2}(\omega_n)) / (\epsilon_{H_2O}(\omega_n) + \epsilon_{CH_2}(\omega_n))$, a die Doppelkettenlänge in einer Membran und d_h den Abstand der Schichten (Abb. 5).

(2) Hydrationspotential

Der amphiphile Charakter der Phospholipide führt zu einer Absenkung der freien Enthalpie, wenn die hydrophilen Kopfgruppen mit Wasser umgeben sind. Die Ausbildung einer endlichen Wasserschicht zwischen den Membranen wird somit begünstigt. Dies führt zu dem Auftreten der sogenannten abstoßenden Hydrationswechselwirkung. Das Hydrationspotential pro Flächeneinheit wird durch den empirischen Ansatz

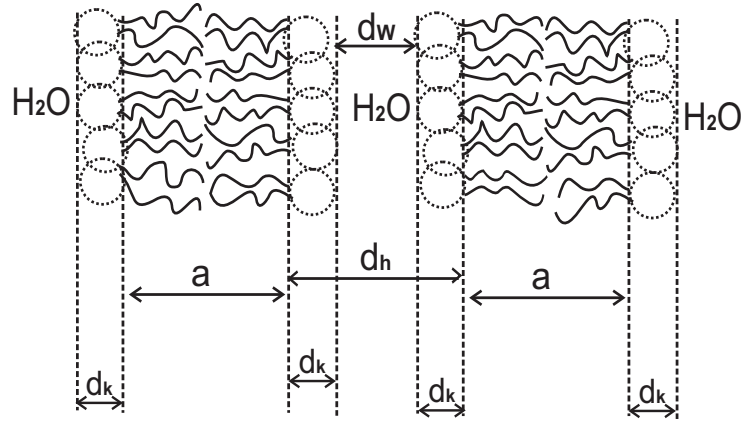


Abbildung 5: Modelldarstellung für die Berechnung des van der Waals Potentials zwischen zwei Membranen.

$$V_{hyd}(d_w) = H_0 e^{-d_w/\lambda_h} \quad (3)$$

mit den Konstanten $H_0 \approx 4 \text{ k}_B T$ und $\lambda_h \simeq 2 \text{ \AA}$ beschrieben.

Aufgabe 1.

Bestimmen Sie graphisch den Gleichgewichtsabstand d_w für zwei Membranen in wässriger Umgebung. Verwenden Sie dazu das Gesamtpotential $V_{ges}(d_w) = V_0(d_w) + V_{dis}(d_w) + V_{hyd}(d_w)$ entsprechend den Gleichungen (1), (2) und (3). Tragen Sie zunächst den abstoßenden und anziehenden Anteil des Potentials getrennt gegen die Wasserschichtdicke d_w auf, danach das Gesamtpotential. In welcher Energieeinheit sollte man die Potentiale auftragen? Wählen Sie einen sinnvollen Energiebereich für die Graphik. Was ist der Wert von V_{ges} für den Gleichgewichtsabstand? ($d_k = 9 \text{ \AA}$, $a = 27 \text{ \AA}$, $T = 313 \text{ K}$, $H_{dis} = -0.75 \text{ \AA}^2$, $H_{stat} = -0.6 \text{ \AA}^2$. Es gilt gemäß Abbildung 5: $d_h = 2d_k + d_w$).

2.6 DOPC als Modellsystem

Das im Praktikum zu untersuchende Lipid DOPC (Di-Palmitoyl-Glycero-Phosphotidylcholin) eines der im Rahmen der Membranbiophysik am häufigsten verwendeten Lipide. Es besitzt zwei identische, einfach ungesättigte Dioleoyl-Fettsäureketten, die jeweils aus 18 Kohlenstoffatomen bestehen (siehe auch Abb. 2), und ein Phosphatidylcholin als Kopfgruppe. DOPC ist elektrisch neutral. Oberhalb von einer Luftfeuchtigkeit von ca. $RH = 42\%$ bildet DOPC eine lamellare Phase aus, welche aus Lipid-Doppelschichten besteht. Bei stärkerer Dehydrierung lässt sich eine Phase rhomboedrischer Symmetrie beobachten, in diesem Versuch werden wir uns jedoch auf die lamellare Phase konzentrieren. Wie wir sehen werden, besteht eine der großen experimentellen Schwierigkeiten in der Membranbiophysik in der reproduzierbaren Einstellung der Umgebungsbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, Salzkonzentrationen, Vorgeschichte des Systems etc.).

Aufgabe 2.

Berechnen Sie den Erwartungswert für die Elektronendichte von DOPC im Stufenmodell.¹ Die Parameter für einen voll hydratisierten DOPC-Bilayer sind [6]: Fläche der Kopfgruppe $A_H = 72.4 \text{ \AA}^2$, Länge der Kopfgruppe $d_k = 9 \text{ \AA}$, Länge des Kohlenwasserstoffkettenkerns $a = 26.8 \text{ \AA}$. Für d_w nehme man den aus Aufgabe 1 erhaltenen Gleichgewichtsabstand der Membrane, zur Definition der Parameter vgl. auch Abbildung 5. Welche Periodizität D der Multischicht ist zu erwarten?

Anleitung: Berechnen Sie für die drei räumlichen Untereinheiten Kopfgruppe, Kettenregion und Wasser den erwarteten mittleren Wert der Elektronendichte als Anzahl der Elektronen pro Rauminhalt, d.h. in \AA^{-3} , und zwar aufgrund der in den jeweiligen Regionen enthaltenen Elektronen gemäß den entsprechenden Summenformeln. Die Grenze zwischen Kettenregion und Kopfgruppe ist dabei am 18. C-Atom anzusetzen (vom Kettenende her gezählt), das einen doppelt gebundenen Sauerstoff besitzt (vgl. Abbildung 2) und noch zum Kettenanteil dazugehören soll.

3 Röntgenstrukturanalyse von Lipidmembranen

3.1 Streuvektoren

Seien \vec{k}_i , \vec{k}_r und \vec{k}_f die Wellenvektoren der einfallenden, reflektierten und der gebeugten Welle mit Wellenlänge λ (Abb. 6), wobei $|\vec{k}_i| = |\vec{k}_r| = |\vec{k}_f| = \frac{2\pi}{\lambda}$. Der Wellenvektor \vec{k}_i und die Oberflächennormale der Probe bestimmen die Einfallsebene. Der Röntgenstrahl trifft unter dem Einfallswinkel α_i auf die Probenoberfläche und wird von der Probe unter einen Winkel α_f zur Probenoberfläche und einem Winkel 2θ zur Einfallsebene gestreut. Für die Röntgenreflektivität wird nur die Intensität in Richtung des reflektierten Wellenvektors \vec{k}_r detektiert. Die gebeugte Welle in Richtung \vec{k}_f bildet den diffusen Untergrund, der Aufschluss über die laterale Struktur der Oberflächenstruktur liefert, während die Reflektivität eine Sonde für die Elektronendichte senkrecht zur Oberfläche darstellt. Der allgemeine Streuvektor oder Impulsübertrag $\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i$ läßt sich schreiben durch:

$$q_x = \frac{2\pi}{\lambda} (\cos \alpha_f \cos \phi - \cos \alpha_i) \quad (4)$$

$$q_y = \frac{2\pi}{\lambda} \cos \alpha_f \sin \phi \quad (5)$$

$$q_z = \frac{2\pi}{\lambda} (\sin \alpha_i + \sin \alpha_f) \quad (6)$$

Abb. 6 stellt die Streugeometrie an einer Lipiddoppelschicht schematisch dar.

¹Im Stufenmodell wird die Lipiddoppelschicht drei Bereiche konstanter Elektronendichten unterteilt: (a) Kopfgruppe, (b) Fettsäureketten, (c) Wasserschicht. Jedem Bereich wird hier dessen mittlere Elektronendichte zugeordnet, die jeweils bestimmt werden soll.

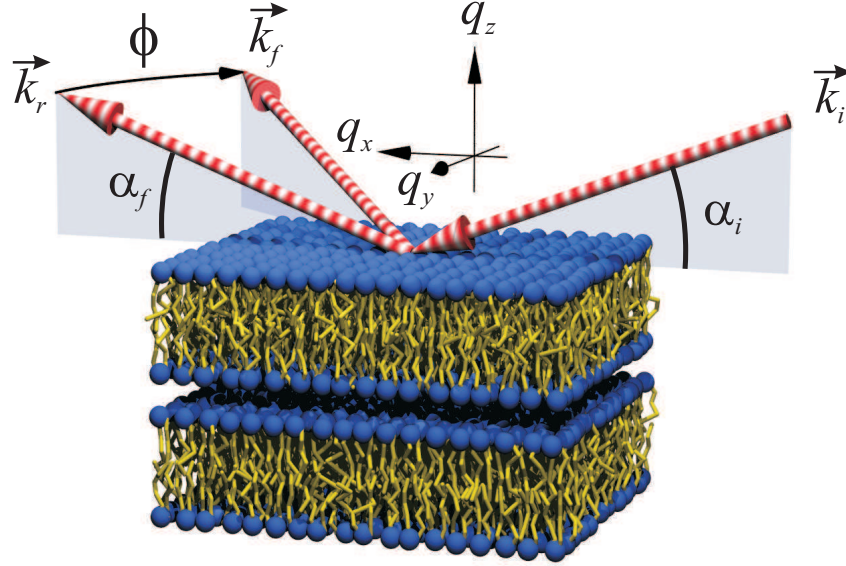


Abbildung 6: Streugeometrie an Lipiddoppelschichten. Mit der grauen Kopfgruppe und hellen Kettenregion wird ein einzelnes Lipidmolekül bezeichnet. Die gestreiften Pfeile stellen jeweils den einfallenden Strahl \vec{k}_i , den reflektierten Strahl \vec{k}_r und den gebeugten Strahl \vec{k}_f dar.

3.2 Brechungsindex und Totalreflexion

Die Grundlage für das Verständnis der Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Materie ist der material- und wellenlängenabhängige Brechungsindex n . Er wird definiert durch

$$n = \frac{c}{v}, \quad (7)$$

wobei c und v die Phasengeschwindigkeiten der Welle im Vakuum bzw. im Medium bezeichnen. Im sichtbaren Bereich der elektromagnetischen Welle gilt dabei $v < c$ und damit $n > 1$. Für Röntgenstrahlung ist die Phasengeschwindigkeit der Welle in Materie größer als c , deshalb ist hier $n < 1$. Bezieht man zusätzlich die Absorption mit ein, so erhält man als komplexwertigen Brechungsindex

$$n = 1 - \delta + i\beta. \quad (8)$$

Hierbei beschreibt δ die Dispersion und β die Absorption im Material. Es handelt sich in beiden Fällen um Materialkonstanten, zur Herleitung siehe etwa [1]. Ein Festkörper ist somit für Röntgenstrahlung optisch dünner als Vakuum (oder Luft). Der Röntgenstrahl wird daher beim Grenzübergang von Luft nach Materie von der Grenzflächennormalen weg gebrochen (Abb. 7). Dieser Effekt ermöglicht eine Totalreflexion für des Röntgenstrahl an der Grenzfläche. Man kann also einen kritischen Winkel α_c für den einfallenden Strahl finden, unter dem Totalreflexion auftritt.

Wenn ein Röntgenstrahl von einem Medium i mit Brechungsindex n_i in ein zweites Medium t mit Brechungsindex n_t übergeht (Abb. 7), gilt nach dem Brechungsgesetz von Snellius:

$$n_i \cos \alpha_i = n_t \cos \alpha_t \quad (9)$$

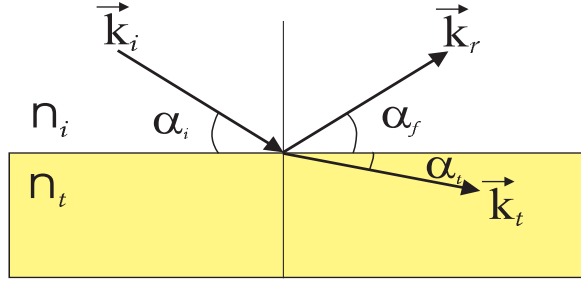


Abbildung 7: *Reflexion und Transmission der Röntgenstrahlung an einer Grenzfläche.*

Beim Grenzfall der Totalreflexion wird $\alpha_t = 0$, $\alpha_i = \alpha_c$. Mit $n_i = 1$ für Luft läßt sich Gl. (9) bei Totalreflexion schreiben als:

$$\cos \alpha_c = \frac{n_t}{n_i} \cos \alpha_t = n_t \quad (10)$$

Für kleines α_c kann $\cos \alpha_c$ nach α_c entwickelt werden. Man setzt n_t in Gl. (8) ein, und erhält unter Vernachlässigung der Absorption des Mediums:

$$1 - \frac{1}{2}\alpha_c^2 \approx 1 - \delta \implies \alpha_c \approx \sqrt{2\delta} \quad (11)$$

Die Abweichung $1 - |n|$ des komplexen Brechungsindex von 1 ist für Röntgenstrahlen im Allgemeinen allerdings sehr gering, d.h. im Bereich von ca. 10^{-6} bis 10^{-7} . Dies führt zu einem sehr kleinen Grenzwinkel der Totalreflexion, $\alpha_c < 0.2^\circ$.

3.3 Fresnelreflektivität der Röntgenstrahlung

Von besonderem Interesse ist die reflektierte Intensität der Röntgenstrahlung an einer ideal glatten Oberfläche. Diese reflektierte Intensität wird als Fresnelreflektivität bezeichnet. Für einen gegebenen kritischen Winkel α_c bei $n_i = 1$ läßt sich die Fresnelreflektivität bestimmen [1]:

$$R_F = \left| \frac{\sin \alpha_i - \sqrt{\sin^2 \alpha_i - \sin^2 \alpha_c}}{\sin \alpha_i + \sqrt{\sin^2 \alpha_i - \sin^2 \alpha_c}} \right|^2 \quad (12)$$

Mit $q_z = \frac{2\pi}{\lambda}(\sin \alpha_i + \sin \alpha_f) = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \alpha_i$ und $q_c = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \alpha_c$ läßt sich Gl. (12) schreiben als

$$R_F(q_z) = \left| \frac{q_z - \sqrt{q_z^2 - q_c^2}}{q_z + \sqrt{q_z^2 - q_c^2}} \right|^2. \quad (13)$$

Für $q_z < q_c$ ist der Wurzel Ausdruck eine reine imaginäre Größe, so daß sich $R_F(q_z) = 1$ ergibt, entsprechend liegt in diesem Fall Totalreflexion vor. Dagegen ist für $q_z > q_c$ der Wurzelterm reell und es ist $R_F(q_z) < 1$, wobei $R_F(q_z)$ mit steigendem q_z immer mehr abnimmt. Diese Abnahme kann für großes q_z gut charakterisiert werden, indem man den Zähler und den Nenner in Gl. (13) durch q_z dividiert und die Wurzel Ausdrücke für $q_z \gg q_c$ entwickelt. Man kann dann ableiten:

$$R_F(q_z) \approx \left| \frac{q_c^2}{4q_z^2 - q_c^2} \right|^2 \approx \left(\frac{q_c}{2q_z} \right)^4 \propto q_z^{-4} \quad (q_z \gg q_c) \quad (14)$$

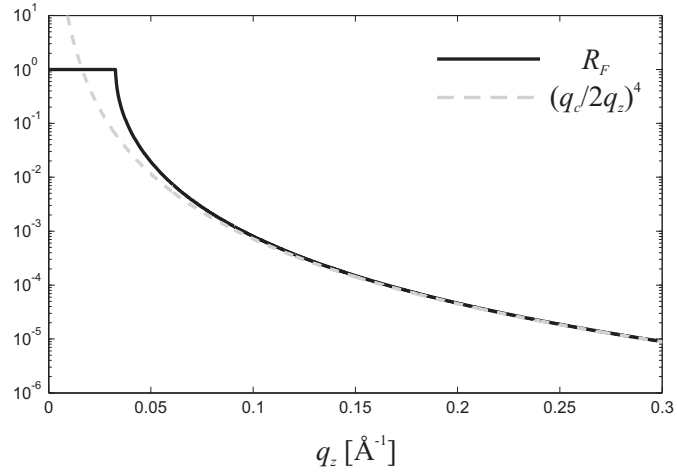


Abbildung 8: *Fresnel-Reflektivität für $\alpha_c = 0.23^\circ$ und Approximation für $q_z \gg q_c$.*

Die Fresnelreflektivität nimmt somit jenseits von q_c wie in Abb. 3.3 skizziert mit q_z^{-4} ab.

3.4 Bragg-Reflexion

Das zu untersuchende Lipidsystem besitzt eine stark periodische Struktur mit mehreren hundert bis zu Tausenden von Doppelschichten. Die Reflektivität an einer Struktur mit einer Periode D kann mit der Bragg-Reflexion gut beschrieben werden. Man betrachtet einen

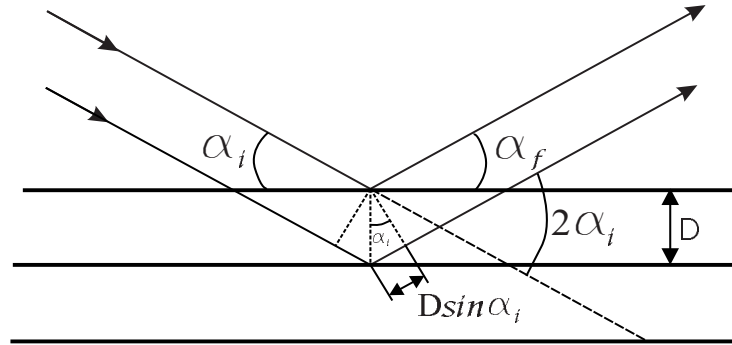


Abbildung 9: *Geometrie zur Bragg-Bedingung.*

Röntgenstrahl der Wellenlänge λ , der an parallelen Netzebenen eines Kristalls oder allg. an einer periodischen Struktur reflektiert wird (Abb. 9). Dabei ist $\alpha_i = \alpha_f$, und der gegenseitige Abstand der Netzebenen ist D . Der Gangunterschied an zwei aufeinander folgenden Netzebenen reflektierten Röntgenstrahlen ist dann $2D \sin \alpha_i$. Wenn der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ ist, findet konstruktive Interferenz statt. Die Bragg-Bedingung für ein Maximum der reflektierten Intensität lautet dann:

$$2D \sin \alpha_i = n\lambda, \quad n \in \mathbb{N}. \quad (15)$$

Mit $q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \alpha_i$ lässt sich dies umformen zur Laue-Bedingung

$$q_z = n \frac{2\pi}{D}, \quad n \in \mathbb{N}, \quad (16)$$

welche analog zur Bragg-Bedingung beschreibt, bei welchen Impulsüberträgen konstruktive Interferenz stattfinden kann.

3.5 Messverfahren

Um die verschiedenen Meßziele (z.B. Reflektivität) zu erreichen, gibt es unterschiedliche Messverfahren. Beim *Reflektivitäts-Scan* mißt man unter der „spiegelnden“ Bedingung $\alpha_i = \alpha_f$ den spekulär reflektierten Röntgenstrahl. Es wird folglich die Intensität entlang der q_z -Achse erfasst. Die Reflektivität an Lipiddoppelschichten ist in Richtung senkrecht zur Probenoberfläche sensitiv, weshalb man durch Reflektivitätsmessungen Informationen über Lipiddoppelschichten in Richtung senkrecht zur Oberfläche der Lipiddoppelschicht gewinnen kann.

Im *offset-Scan* ist die Geometrie ähnlich dem *Reflektivitäts-Scan*. Die Eichung zwischen α_i und α_f ist um einen offset-Winkel $\Delta\alpha_i$ dejustiert. Mit dem *offset-Scan* kann die diffuse Streuung neben der spekulären Reflektivität gemessen und für den diffusen Untergrundabzug der spekulären Reflektivität extrapoliert werden.

Ein Verfahren, mit dem die Orientierung (Mosaizität) der Probe bestimmt werden kann, ist der *Rocking-Scan*. Dabei wird die Summe $\alpha_i + \alpha_f$ immer konstant gehalten. Abb. 10 zeigt schematisch den reziproken Raum eines Membranstapels. Die eben erklärten Messverfahren werden durch ihre eindimensionale Bahn charakterisiert.

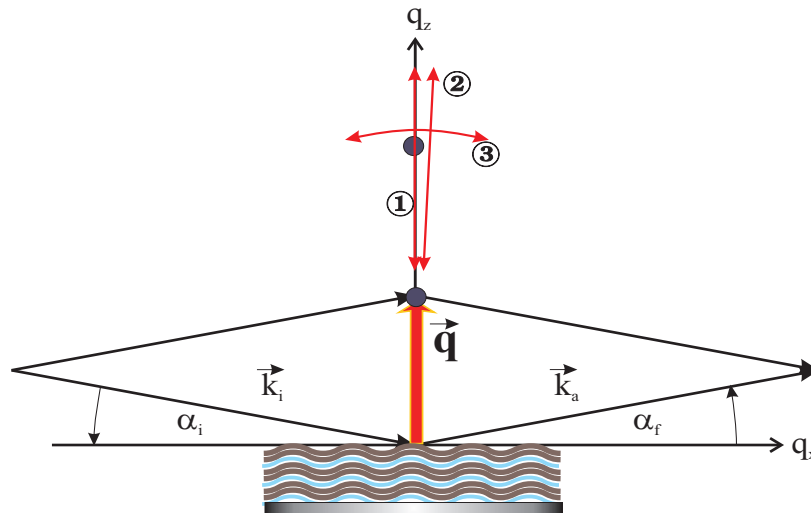


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Bahnen der verschiedenen Meßverfahren im reziproken Raum. ①: Reflektivitäts-Scan, ②: Offset-Scan, ③: Rocking-Scan.

3.6 Ausleuchtungskorrektur

Die Probe wird bei den Messungen gegen den Primärstrahl gedreht. Bei kleinen Einfallswinkeln kann nicht der gesamte Primärstrahl von der Probe erfaßt werden (Abb. 11(a)), so daß der Primärstrahl teilweise vorbeigeht. Folglich kann nicht alles reflektiert werden, was prinzipiell zur Verfügung stünde. Man muss deswegen Ausleuchtungskorrekturen in die Datenauswertung miteinbeziehen, solange bis die Projektion der Probe der Strahlbreite des Primärstrahls entspricht (Abb. 11(b)). Ab jetzt wird der gesamte Primärstrahl von der Probe erfasst und es kann prinzipiell der gesamte Primärstrahl reflektiert werden. Für alle Winkel, die größer sind (Abb. 11(c)), ist daher für Reflektivitätsmessungen keine Ausleuchtungskorrektur mehr nötig.

Seien l die Probelänge, h die Strahlbreite, α_G der Grenzwinkel, bei dem die Projektion der Probe gleich der Strahlbreite des Primärstrahls ist, mit $\sin \alpha_G = \frac{h}{l}$ (Abb. 12).

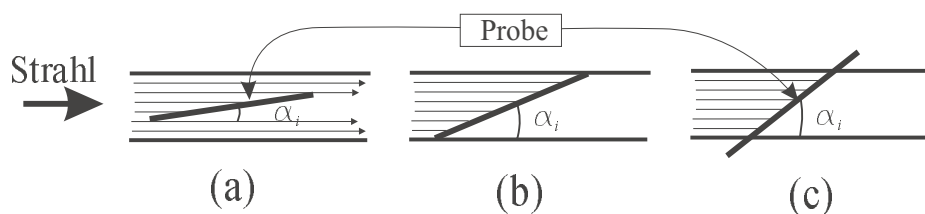


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Probedrehung gegen Primärstrahl

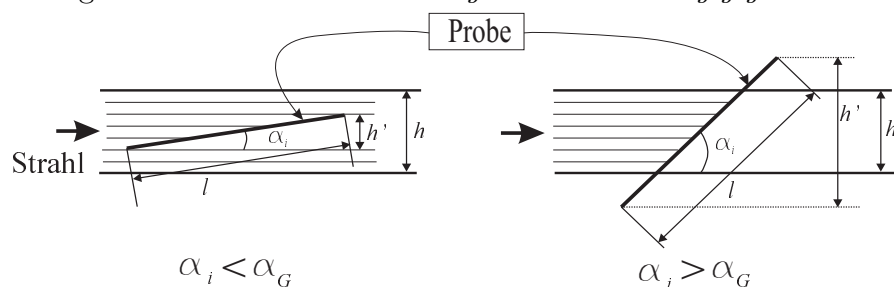


Abbildung 12: Geometrie zur Ausleuchtungskorrektur.

Bei $\alpha_i < \alpha_G$ kann der Primärstrahl nicht vollständig reflektiert werden, weil nicht der gesamte Primärstrahl die Probe erreicht. Deshalb muß die reflektierte Intensität in diesem Bereich mit einem winkelabhängigen Faktor

$$\frac{h}{h'} = \frac{h}{l \sin \alpha_i} = \frac{1}{\sin \alpha_i} \frac{h}{l} \quad (17)$$

als Ausleuchtungskorrektur multipliziert werden.

Für unseren Versuch gilt: $h = 0.5 \text{ mm}$ (vertikale Breite der Austrittsblende) und $l \approx 25 \text{ mm}$ (Länge der Probe in Strahlrichtung).

4 Theoretische Beschreibung der Lipiddoppelschicht

4.1 Formfaktor, Strukturfaktor

Wir gehen davon aus, dass unsere Probe aus N perfekten Doppelschichten der Periode D besteht. In x - und y -Richtung herrsche völlige Homogenität und Isotropie (Abb. 13). Mit

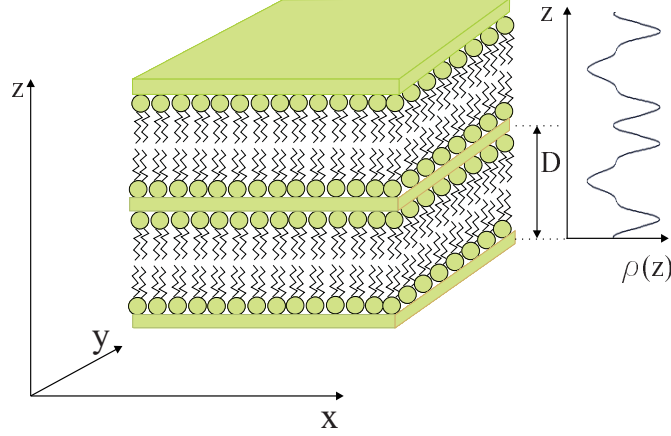


Abbildung 13: *Geometrie zur Berechnung des Elektronendichteprofiles. Die Lipiddoppelschichten sind perfekt geordnet, und in x - und y -Richtung herrscht völlige Homogenität und Isotropie.*

diesem Modell kann man die Elektronendichteverteilung in z -Richtung schreiben als

$$\rho(z) = \sum_{m=0}^{N-1} \rho_0(z - mD). \quad (18)$$

Hierbei ist N die Anzahl der Lipiddoppelschichten und $\rho_0(z)$ das Elektronendichteprofil einer einzelnen Einheitszelle. Die Funktion $\rho_0(z)$ ist symmetrisch und nur für $z \in [-\frac{D}{2}, \frac{D}{2}]$ ungleich Null.

Für die Reflektivität an einer Oberfläche eines Materials mit kontinuierlicher Elektronendichteverteilung gilt die sog. 'Master'-Formel der Reflektivität (ohne Herleitung, siehe dafür z.B. [1]):

$$R(q_z) = R_F(q_z) \left| \frac{1}{\rho_e(\infty)} \int \frac{\partial \rho(z)}{\partial z} e^{-iq_z z} dz \right|^2 \quad (19)$$

wobei $R_F(q_z)$ die Fresnelreflektivität einer ideal glatten Grenzfläche zweier Medien und $\rho_e(\infty)$ die mittlere Elektronendichte im Substratmaterial bezeichnet. Wenn man nun $\rho(z)$ aus Gl. (18) in Gl. (19) einsetzt und die Variable $(z - mD)$ durch z' substituiert, erhält man

$$\begin{aligned} R(q_z) &= R_F(q_z) \left| \frac{1}{\rho_e(\infty)} \right|^2 \left| \sum_{m=0}^{N-1} \int \frac{\partial \rho_0(z')}{\partial z'} e^{-iq_z(z'+mD)} dz' \right|^2 \\ &= R_F(q_z) \left| \frac{1}{\rho_e(\infty)} \right|^2 \left| \sum_{m=0}^{N-1} e^{-iq_z mD} \right|^2 \left| \int \frac{\partial \rho_0(z')}{\partial z'} e^{-iq_z z'} dz' \right|^2 \end{aligned} \quad (20)$$

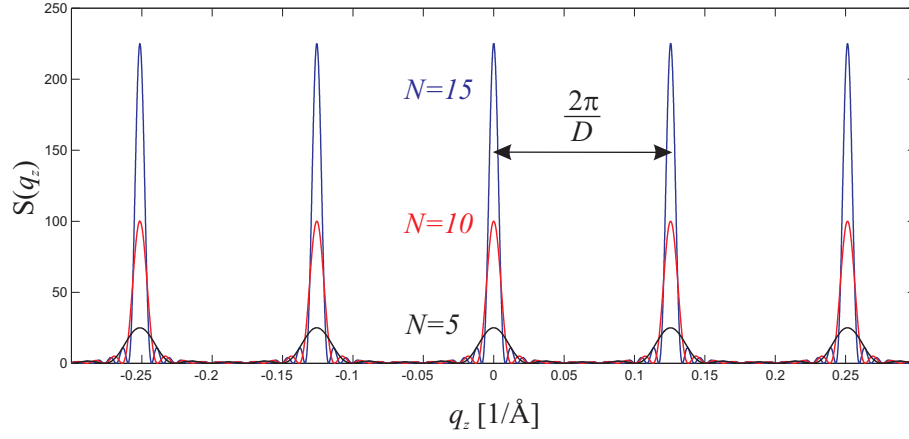


Abbildung 14: Strukturfaktor $S(q)$ für eindimensionale Kristalle aus 5, 10 und 15 Einheitszellen der Breite $D = 50 \text{ Å}$.

Verwenden wir nun noch die Näherung (14) für die Fresnel-Reflektivität sowie die Ableitungsregel der Fouriertransformation, so erhalten wir

$$R(q_z) \propto S(q_z) \cdot q_z^{-2} \cdot |F(q_z)|^2, \quad (21)$$

wobei wir die Größen

$$S(q_z) = \left| \sum_{m=0}^{N-1} e^{-iq_z m D} \right|^2 \quad \text{und} \quad F(q_z) = \int \rho_0(z) e^{-iq_z z} dz \quad (22)$$

in Anlehnung an die Kristallographie als Struktur- und Formfaktor der Lipiddoppelschicht bezeichnen. Der Strukturfaktor $S(q_z)$ ist in Abb. 14 für verschiedene N geplottet, er wird jeweils maximal wenn die Bragg- bzw. Laue-Bedingung erfüllt ist. Mit zunehmender Periodenzahl N werden die entsprechenden Peaks immer schärfer, für $N \rightarrow \infty$ kann $S(q_z)$ als Dirac-Kamm der Periode $\frac{2\pi}{D}$ aufgefasst werden. Bei Winkeln bzw. Impulsüberträgen, welche die Bragg- bzw. Laue-Bedingung nicht erfüllen, tritt somit im Idealfall kein von den Lipiddoppelschichten stammendes Signal auf. Der Formfaktor $F(q_z)$ der Lipiddoppelschicht entspricht gerade der Fouriertransformierten des Elektronendichteprofiles $\rho_0(z)$. Dieser Zusammenhang spielt bei der Rekonstruktion von $\rho_0(z)$, welche uns im folgenden beschäftigen wird, eine entscheidende Rolle.

4.2 Rekonstruktion des Elektronendichteprofiles

Da $\rho_0(z)$ o.B.d.A. als eine gerade Funktion mit $\rho_0(z) = 0 \forall z \notin [-\frac{D}{2}, \frac{D}{2}]$ angenommen werden kann, lässt sie sich in eine Fourier Cosinus-Reihe entwickeln gemäß

$$\rho_0(z) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} a_n \cos\left(n \frac{2\pi}{D} z\right). \quad (23)$$

Die Fourierkoeffizienten a_n sind gegeben durch

$$a_n = \frac{2}{D} \int_{-D/2}^{D/2} \rho_0(z) \cos\left(n \frac{2\pi}{D} z\right) dz, \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (24)$$

Vergleich mit Gl. (22) ergibt, dass dies bis auf einen konstanten Faktor jeweils dem Wert des Formfaktors an der Position $q_z^{(n)} = n \cdot \frac{2\pi}{D}$ des n -ten Bragg-Peaks entspricht. Wir erhalten daher

$$\rho(z) = \frac{1}{D} \sum_{n=-\infty}^{\infty} F(q_z^{(n)}) \cos(q_z^{(n)} \cdot z). \quad (25)$$

Mit

$$F(q_z^{(n)}) = \nu_n \cdot \sqrt{R(q_z^{(n)})} \cdot q_z^{(n)} \quad , \quad \nu_n = \pm 1 \quad (26)$$

bekommen wir schließlich

$$\rho_0(z) = \bar{\rho} + A \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \nu_n \cdot \sqrt{R(q_z^{(n)})} \cdot n \cdot \cos(q_z^{(n)} \cdot z). \quad (27)$$

A ist hierbei ein konstanter Skalierungsfaktor, der von den experimentellen Rahmenbedingungen abhängt. $\bar{\rho}$ bezeichnet die mittlere Elektronendichte in der Einheitszelle. Sie ist im Formfaktor $F(0)$ der nullten Beugungsordnung codiert, welche mit dem Primärstrahl überlappt und daher für eine Messung nicht zugänglich ist. Für die meisten Anwendungen ist Kenntnis des Elektronendichtekontrasts $\Delta\rho(z) = \rho(z) - \bar{\rho}$ auf einheitenloser Skala ausreichend, da man oft nicht an absoluten Werten, sondern an Änderungen der Positionen vom Elektronendichtemaxima und -minima u.ä. interessiert ist. Die Konstante A wird daher im folgenden weggelassen.

Im Experiment können wir die Reflektivität $R(q_z^{(n)})$ an den Positionen der Bragg-Peaks messen, aus den Abständen der Peaks ergibt sich außerdem die Periode D . Zur Rekonstruktion von $\Delta\rho(z)$ auf relativer Skala fehlt nun noch die Kenntnis der Phasenfaktoren $\nu_n = \pm 1$, d.h. der Vorzeichen der Werte $F(q_z^{(n)})$ des Formfaktors. Da wir lediglich Betragsquadrate $|F(q_z^{(n)})|^2$ messen können (vgl. Gl. 21), geht diese Information während des Messprozesses verloren. Dies ist bekannt als das *Phasenproblem* der Kristallographie. Eine Lösungsmöglichkeit besteht in diesem speziellen Fall darin, unter der Annahme, dass als Resultat ein Dichteprofil mit typischen bilayer-Eigenschaften herauskommen sollte, die physikalisch sinnvollste Phasenkombination durch Ausprobieren der $2^{n_{max}}$ Kombinationen zu ermitteln. Hierbei ist es hilfreich, zunächst nur mit den ersten 3-4 Beugungsordnungen zu beginnen, für diese die plausibelste Phasenkombination zu ermitteln, und schließlich nach und nach die höheren Beugungsordnungen zu dieser hinzuzufügen.

4.3 Lösung des Phasenproblems mit der *swelling*-Methode

Anmerkung: Die Bearbeitung dieses Abschnitts ist freiwillig, die Phasenwahl kann in der Auswertung auch wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt werden.

Eine etwas elegantere Methode zur Lösung des Phasenproblems, die auch bei uns in der laufenden Forschung erst seit kürzerer Zeit eingesetzt wird, ist die *swelling*-Methode. Voraussetzung für ihren Einsatz ist, dass die Dicke d_w der Wasserschicht zwischen benachbarten Doppelschichten (s. Abb. 15) durch Steuerung des Wassergehalts der Probe in kleinen Schritten variiert werden kann.

Einsetzen der Fourierreihe des Elektronendichteprofiles in die Definition des Formfaktors liefert

$$F(q_z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \nu_n |F(q_z^{(n)})| \operatorname{sinc} \left(\frac{D}{2} q_z - n\pi \right), \quad (28)$$

wobei $\operatorname{sinc}(x) = \sin(x)/x$. Aus den Werten des Formfaktors an diskreten Punkten $q_z^{(n)} = n \cdot \frac{2\pi}{D}$ können wir mit Gl. (28) den kontinuierlichen Formfaktor $F(q_z)$ rekonstruieren. Diese Aussage entspricht gerade dem aus der Signaltheorie bekannten *Abtasttheorem*. Die Summation erstreckt sich über alle theoretisch beobachtbaren Beugungsordnungen, in jedem Experiment ist die Anzahl der messbaren Beugungsordnungen n_{\max} jedoch endlich, in unserem Fall typischerweise $n_{\max} = 7-8$. Die hier abgeleiteten Methoden sind in der Praxis somit durchgehend als Approximation zu verstehen.

Für das weitere Vorgehen ist es hilfreich, das Elektronendichteprofil $\rho_0(z)$ in einen konstanten Beitrag ρ_w (Elektronendichte von Wasser) und einen Beitrag $\rho_0(z) - \rho_w$ zu zerlegen (siehe Abb. 15):

$$\rho^{(-)}(z) = \rho_0(z) - \rho_w. \quad (29)$$

Diese Art der Betrachtung ist in der Literatur unter dem Namen *minus-fluid*-Modell bekannt. Der entsprechende Formfaktor ist demnach

$$F^{(-)}(q_z) = \int_{-D/2}^{D/2} [\rho(z) - \rho_w] \cos(q_z z) dz. \quad (30)$$

Mit Gln. (25) und (28) erhalten wir

$$F^{(-)}(q_z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \nu_n |F(q_z^{(n)})| \operatorname{sinc} \left(\frac{D}{2} q_z - n\pi \right) - \rho_w D \operatorname{sinc} \left(\frac{D}{2} q_z \right). \quad (31)$$

Bis auf einen zusätzlichen, um $q_z = 0$ zentrierten sinc-Term entspricht dies genau dem ursprünglichen Formfaktor $F(q_z)$ in Gl. (28) (warum muss das so sein?). Wegen $\operatorname{sinc}(n\pi) = 0$ für $n \in \mathbb{Z}/\{0\}$ ist

$$F^{(-)}(q_z^{(n)}) = \begin{cases} F(0) - \rho_w D & n = 0, \\ F(q_z^{(n)}) & n \neq 0. \end{cases} \quad (32)$$

und somit

$$F^{(-)}(q_z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \nu_n |F^{(-)}(q_z^{(n)})| \operatorname{sinc} \left(\frac{D}{2} q_z - n\pi \right) \quad (33)$$

$$\text{mit } |F^{(-)}(q_z^{(n)})| = |F(q_z^{(n)})|, \quad n \neq 0. \quad (34)$$

Anhand der gemessenen Formfaktoren ($n \neq 0$) können wir $F(q_z)$ und $F^{(-)}(q_z)$ somit nicht unterscheiden, die Differenz ist allein in der nullten Beugungsordnung codiert. Betrachten wir im minus-fluid-Modell die Elektronendichte an der Stelle $z = \frac{D}{2}$:

$$\rho^{(-)} \left(\frac{D}{2} \right) = \frac{1}{D} \nu_0 |F^{(-)}(0)| + \frac{2}{D} \sum_{n=1}^{\infty} \nu_n |F(q_z^{(n)})| \cos \left(n \frac{2\pi}{D} \frac{D}{2} \right) \stackrel{!}{=} 0 \quad (35)$$

$$\Rightarrow \nu_0 |F^{(-)}(0)| = 2 \cdot \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{n+1} \nu_n |F(q_z^{(n)})|. \quad (36)$$

Der erste Vorteil des minus-fluid-Modells ist somit, dass wir den Formfaktor $\nu_0|F^{(-)}(0)|$ der nullten Beugungsordnung aus den übrigen Beugungsordnungen bestimmen und somit die Güte der Rekonstruktion erhöhen können.

Um nun das Phasenproblem zu lösen und die $\{\nu_n\}$ zu bestimmen, benutzen wir die sogenannte *Swelling-Methode* [7]. Betrachten wir was passiert wenn wir die Periode D erhöhen, indem wir den Membranstapel „anschwellen“ lassen, d.h. die Dicke der Wasserschicht erhöhen: Der Verlauf des Formfaktors $F(q_z)$ ändert sich, da sich das Gewicht der nullten Beugungsordnung $F(0)$ in Gl. 28 ändert. Im minus-fluid-Modell dagegen bleibt der kontinuierliche Formfaktor

$$F^{(-)}(q_z) = \int_{-D/2}^{D/2} \rho^{(-)}(z) \cos(q_z z) dz = \int_{-B/2}^{B/2} \rho^{(-)}(z) \cos(q_z z) dz \quad (37)$$

unverändert, solange sich während des Anschwellens die auf $z \in [-\frac{B}{2}, \frac{B}{2}]$ begrenzte Struktur der Lipiddoppelschicht nicht ändert (Abb. 15). Dies ist der zweite Vorteil des minus-fluid-Modells, welchen wir ausnutzen können. Wenn wir nämlich die Periode D durch Zugabe von Wasser leicht ändern und jeweils die $|F(q_z^{(n)})|$ messen, dann tasten wir $|F^{(-)}(q_z)|$ an unterschiedlichen Positionen ab. Man kann auf diese Weise zusätzlich den Betrag der Steigung von $F(q_z)$ in mehreren kurzen Intervallen bestimmen.

Wenn man nun die Amplituden $|F(q_z^{(n)})|$ mit Phasenfaktoren ν_n multipliziert und mithilfe der Werte für ein D die kontinuierliche Funktion $F^{(-)}(q_z)$ rekonstruiert, so sollten die diskreten Datenpunkte und die kontinuierliche Rekonstruktion möglichst gut übereinstimmen. Dies ist allerdings nur für eine bestimmte der $2^{n_{\max}}$ Phasenkombinationen der Fall, die meisten Phasenkombinationen liefern nur unzureichende Übereinstimmung (in der Auswertung können Sie sich hiervon überzeugen). Man muss daher aus allen $2^{n_{\max}}$ Varianten diejenige ermitteln, welche zur besten Übereinstimmung von diskreten Datenpunkten und kontinuierlicher Rekonstruktion führt. Dies ist dann die nach der swelling-Methode plausibelste Wahl.

Vor Anwendung der swelling-Methode ist es empfehlenswert, die verschiedenen Reflektivitäten zueinander zu normalisieren [8]. Dies führt oft zu besseren Ergebnissen, da die Qualität der Probe erfahrungsgemäß mit zunehmender Verweildauer in der Probenkammer abnimmt oder sich ihre Justage leicht verändert. Unter der Annahme, dass $F^{(-)}(q_z)$ und somit auch $|F^{(-)}(q_z)|^2$ für die in der swelling-Methode verwendeten RH-Werte denselben Verlauf hat, kann man zeigen, dass gelten muss:

$$\sum_{n=-n_{\max}}^{n_{\max}} |F^{(-)}(q_z^{(n)})|^2 \propto D. \quad (38)$$

Für verschiedene Luftfeuchtigkeit muss somit die Summe der quadrierten Formfaktor-Amplituden proportional zur Periode D gemacht werden.

Zusatzaufgabe

Machen Sie sich das Prinzip der Swelling-Methode klar und leiten Sie noch einmal ausgehend von der Definition des Formfaktors in Gl. (22) die Formel (28) für den kontinuierlichen Formfaktor her.

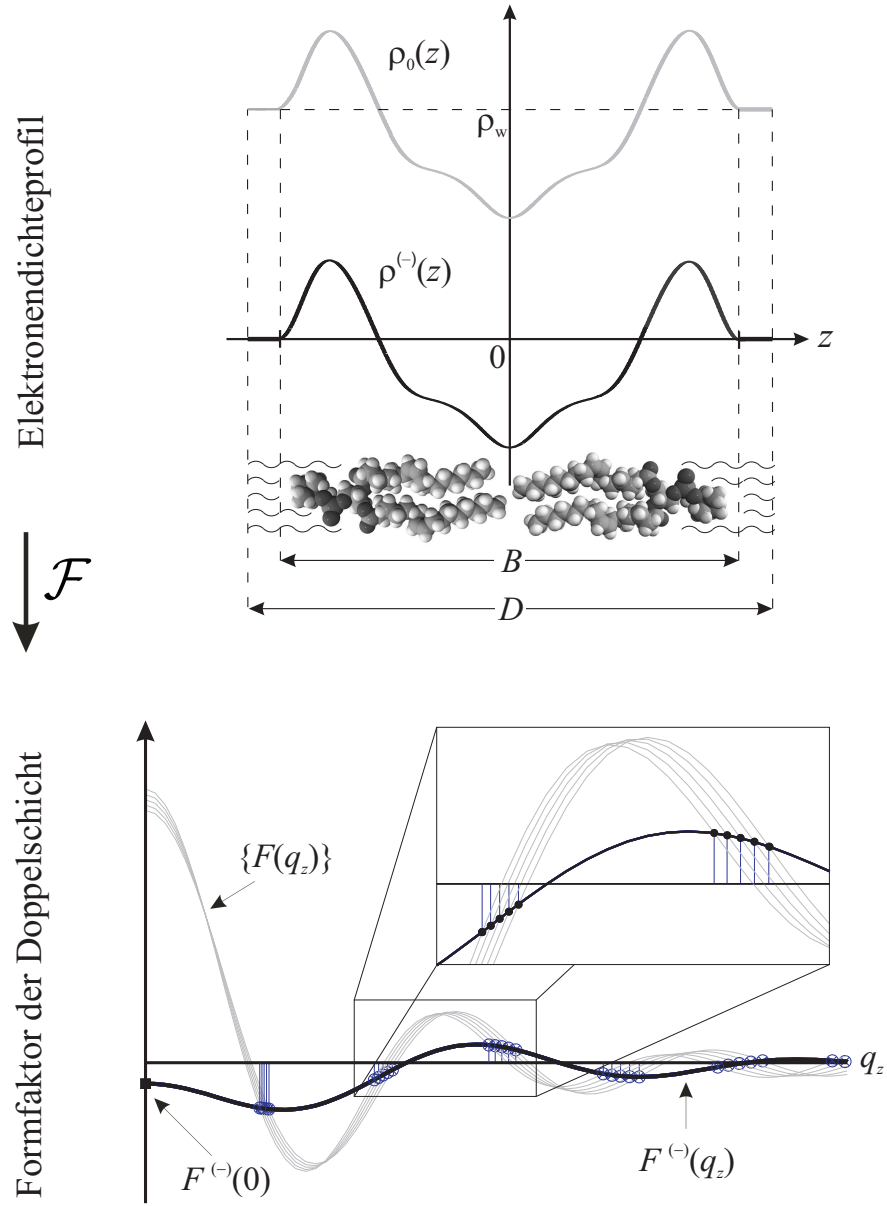


Abbildung 15: *Minus-fluid-Modell und Swelling-Methode: Subtraktion der Elektronendichte ρ_w von Wasser vom Elektronendichteprofil $\rho_0(z)$ der gesamten Einheitszelle liefert das reduzierte Dichteprofil $\rho^{(-)}(z)$. Der Verlauf des Formfaktors $F(q_z)$ ändert sich mit der Dicke der Wasserschicht $d_w = D - B$ (gezeigt für 5 verschiedene Werte von d_w), der Formfaktor $F^{(-)}(q_z)$ im minus-fluid-Modell dagegen bleibt unverändert. Für $q_z = n \cdot \frac{2\pi}{D}$ gilt jeweils $F(q_z) = F^{(-)}(q_z)$. Wenn man nun D und somit d_w über den Wassergehalt ändert, kann man den Betrag von $F^{(-)}(q_z)$ an unterschiedlichen Positionen „abtasten“.*

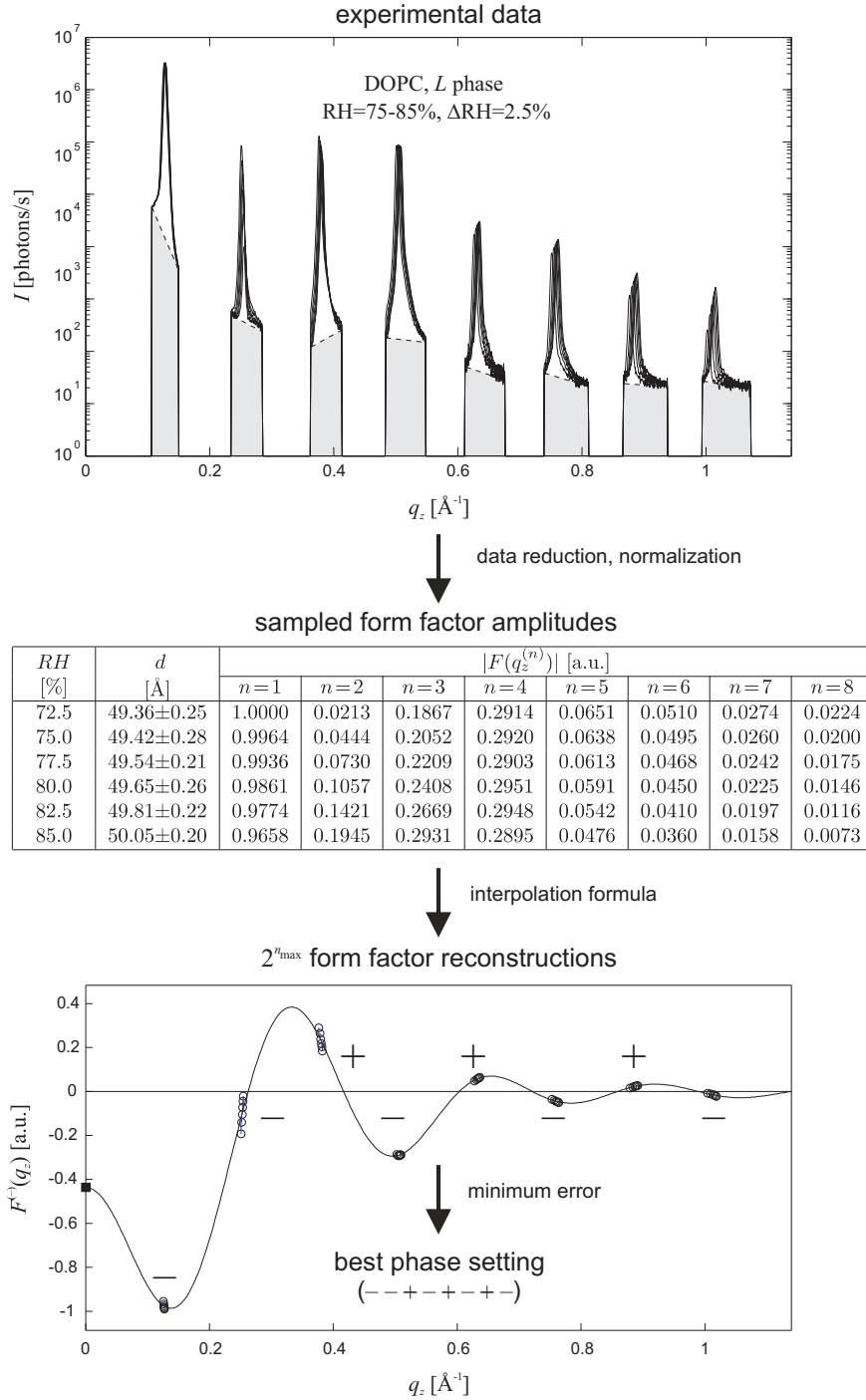


Abbildung 16: Arbeitsschritte zur Phasenbestimmung mit der swelling-Methode: Durch Steuerung der relativen Luftfeuchtigkeit in der Probenkammer wird der Wassergehalt des Membranstapels und somit der Wert von D in kleinen Schritten verändert. Es werden jeweils Reflektivitätsmessungen durchgeführt und die integrierten Intensitäten der Bragg-Peaks bestimmt. Nach Durchführung aller notwendigen Korrekturen sowie der Normalisierung erhält man eine Tabelle mit D -Abständen und Formfaktor-Amplituden. Die mit Phasenfaktoren $\nu_n = \pm 1$ versehenen Formfaktoren bestimmen den kontinuierlichen Formfaktor $F^{(-)}(q_z)$ im minus-fluid-Modell, welcher sich mittels Gl. 28 rekonstruieren lässt. Bei Wahl der „richtigen“ Phasenkombination sollten diskrete Datenpunkte und kontinuierliche Rekonstruktion am besten übereinstimmen.

5 Präparation und Messung

5.1 Präparation auf Festkörpersubstrat

Stammlösung herstellen:

Das Lipid (DOPC) wird gewogen und in einer Mischung (1:1) von TFE (2-2-2-Trifluoro-ethanol) und Chloroform in einer definierten Konzentration von 10mg/ml gelöst. Diese Stammlösung wird etwa eine Minute mit einem Rüttler stark geschüttelt.

Si-Substrate reinigen:

Wir stellen einen orientierten Membranstapel auf vorgesägten Silizium-Substraten der Größe $25 \times 15 \text{ mm}^2$ her. Zuerst sollten zwei Si-Substrate sehr gut gereinigt werden. Dazu werden sie über 10 Minuten in einen Behälter mit Methanol in einem Ultraschallbad gelegt. Anschließend erfolgt ein zweiter Reinigungsgang in Reinstwasser (MQ, Millipore, $\rho \geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) statt Methanol. Vor und nach dem zweiten Reinigungsgang werden die Substrate mit Reinstwasser abgespült, am Ende durch Ablasen mit Stickstoff getrocknet. Dabei sollte man darauf achten, das Substrat-Plättchen nur seitlich mit Stickstoff anzublasen, sonst weht es leicht mal durchs Labor, und die ganze Reinigungsarbeit war umsonst. Anschließend werden die Substrate in einem Plasma-Cleaner hydrophilisiert.

Stammlösung auf Si-Substrate spreiten:

Die Silizium-Substrate werden auf eine waagrecht ausgerichtete Platte gelegt, um die Stammlösung möglichst homogen auf den Substraten zu verteilen. Die Stammlösung wird mit einer Pipette, die mit einer Einweg-Spitze versehen wird, gleichmäßig auf das Si-Substrat gespreitet; jeweils $200 \mu\text{l}$ pro Substrat. Nach dem Spreiten verdunstet das Lösungsmittel langsam. Nach dem Trocknen werden die Lösungsmittelrückstände aus den Proben extrahiert, indem die Proben in einem Vakuumschrank über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde, besser über Nacht, aufbewahrt werden. Aus diesem Grund wird Ihnen der Versuchsbetreuer vorschlagen, sofern es möglich ist, die Probenpräparation bereits am Vortag des eigentlichen Versuches durchzuführen.

5.2 Probenumgebung

Da die Phase von Lipidsystemen von der Temperatur und vom Wassergehalt (und somit der Luftfeuchtigkeit der Umgebung) abhängig ist, benötigt man eine Probenumgebung mit möglichst präzise einstellbarer und stabiler Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die Messung erfolgt in diesem Versuch bei Raumtemperatur und variierbarer Luftfeuchtigkeit (engl. *relative humidity*, RH). Der schematische Aufbau der Messkammer und des PID-Kreislaufs zur Steuerung der Luftfeuchtigkeit sowie eine damit erzeugte Rampe in RH sind in Abb. 17 zu sehen. Die Probe wird mit doppelseitigem Klebeband am Probenhalter in der Kammer befestigt. Dabei sollte die Probe nur mit einer sterilen Pinzette oder mit Latexhandschuhen, sowie nur seitlich angefasst werden. Nach dem Verschließen der Kammer sollte die relative Luftfeuchtigkeit auf einen Sollwert von $RH = 85\%$ geregelt werden, so dass dieser bereits während der Justage erreicht wird und sich zwischen benachbarten Lipid-Doppelschichten der Probe der entsprechende Gleichgewichtsabstand ausbilden kann.

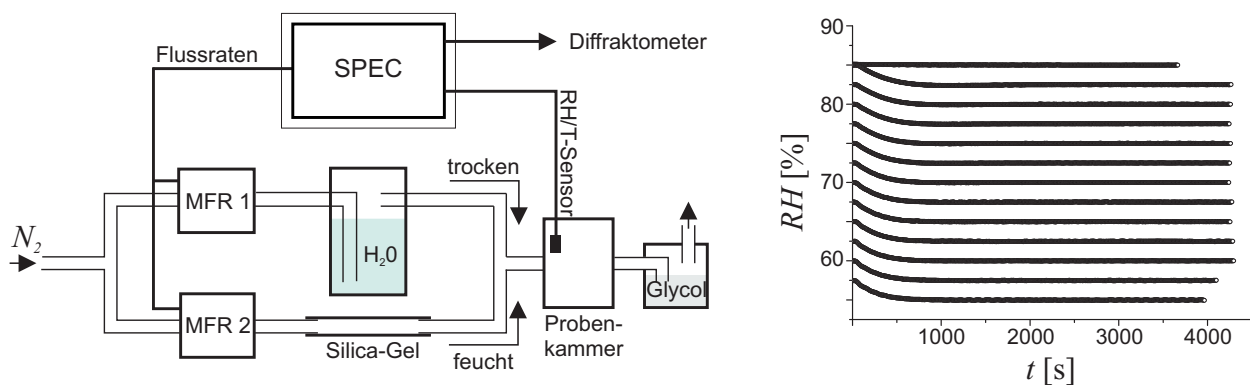


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Kontrolle der relativen Luftfeuchtigkeit in der Probenkammer. Die Steuerung erfolgt vom selben Rechner, von dem auch das Diffraktometer bedient wird.

5.3 Aufbau und Bedienung des Diffraktometers

Die Reflektivitätsmessungen werden in diesem Versuch mit einem Diffraktometer durchgeführt, das aus einzelnen Komponenten verschiedener Hersteller an unserem Institut zusammengebaut wurde. Auf diese Weise ist im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen Lösungen größtmögliche Flexibilität gewährleistet. Es wird mit derselben Software wie viele Synchrotron-Messplätze betrieben und regelmäßig auch in der aktuellen Forschung eingesetzt. Die Röntgenstrahlung wird von einer

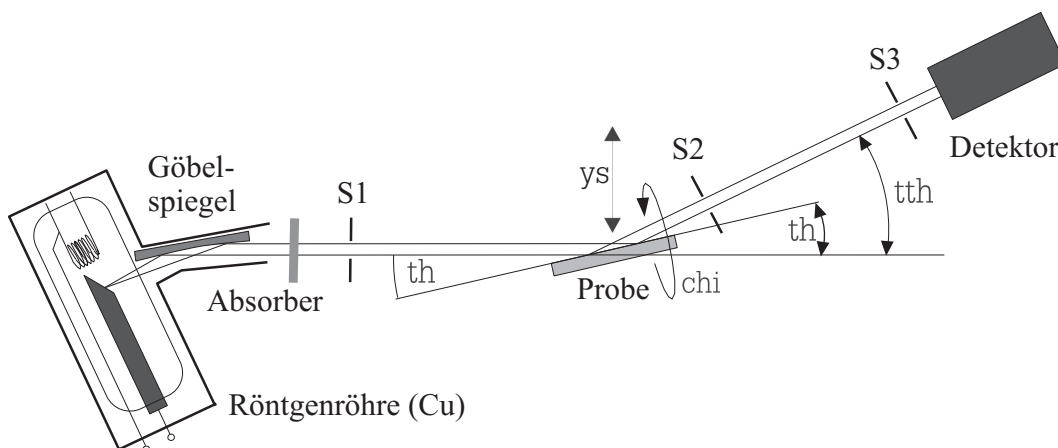


Abbildung 18: Schematischer Aufbau des benutzten Diffraktometers (Draufsicht). Die Probenkammer ist hier aus Platzgründen nicht gezeigt. Die Röntgenröhre steht fest im Raum, der Detektor kann um den Winkel tth gedreht werden. Die Probe kann in allen 6 Freiheitsgraden bewegt werden, im Versuch werden normalerweise jedoch nur 3 davon benötigt (Motoren ys , th , chi).

Röntgenröhre mit Kupferanode erzeugt (K_{α} -Strahlung, $E = 8048 \text{ eV}$ bzw. $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$). Ein parabolischer Spiegel (Göbelspiegel) macht die zunächst divergente Strahlung parallel. Mit der Blende S1 werden der Querschnitt des Primärstrahls festgelegt sowie nicht-parallele Anteile ausgeblendet. Die Blenden S2 und S3 legen die Winkelauflösung des Detektors fest und sorgen dafür, dass möglichst nur Strahlung, die von der Probe kommt, den Detektor erreicht. Die Röntgenröhre liefert einen sehr intensiven Strahl, der ohne zusätzliche Absorber den Detektor überlasten würde. Wenn man direkt im Primärstrahl, im Bereich der Totalreflexion oder eines Bragg-Peaks misst, ist es daher notwendig, den Strahl durch entsprechende Absorberfolien abzuschwächen. Die Software, mit der die Messungen durchgeführt werden, kann diese Absorberfolien automatisch in den Strahl

hinein- und wieder herausfahren und die gemessene Intensität entsprechend korrigieren.

Die Bedienung des Diffraktometers erfolgt aus Strahlenschutzgründen von einem Rechner im Nebenraum über das Programm SPEC. Die Röntgenröhre wird bei einer Leistung von $35\text{ kV} \times 40\text{ mA}$ betrieben. Das Anschalten des Röntgenstrahls ist nur bei geschlossener Tür möglich.

Wer die Tür schließt, ist dafür verantwortlich, dass sich niemand mehr im Raum des Diffraktometers befindet. An der Konfiguration von Meßrechner und -software darf unter keinen Umständen herumgespielt werden!

5.4 Justage

Wie man anhand des Elektronik-Racks sowie in SPEC sehen kann (z.B. mit dem Befehl `wa`), lässt sich an dem Diffraktometer eine Vielzahl von Motoren fahren. Sofern das Diffraktometer selbst optimal justiert ist (Aufgabe des Betreuers), können wir uns im Praktikum auf die vier Motoren `ys`, `chi`, `th` und `tth` beschränken. Diese Motoren müssen so eingestellt sein, dass bei `th = 0` und `tth = 0` der Detektor das Maximum des Primärstrahls misst und die Probenoberfläche möglichst genau parallel zum Primärstrahl ist sowie der reflektierte Strahl in der Ebene des Detektors liegt. Die hierzu notwendigen Schritte werden im Folgenden beschrieben. Der Betreuer wird Ihnen am Versuchstag eine Einführung in die benötigten Kommandos in SPEC geben.

1. *Finden der Primärstrahlposition:*

Als erstes wird sichergestellt, dass der Primärstrahl die Probenkammer (abgesehen von den Fenstern) ungehindert durchqueren kann und zum Detektor gelangt. Bei `tth=0` wird hierzu ein scan in *y*-Richtung durchgeführt und der Motor `ys` auf eine passende Position gesetzt. Dann wird ein Detektor-Scan durchgeführt (nur `tth` wird bewegt) und das Maximum als neue Nullposition von `tth` gesetzt.

2. *Positionierung der Lipid-Multischicht im Zentrum des Primärstrahls:*

Als nächstes wird die Probe in *y*-Richtung (Motor `ys`) so positioniert, dass sie den Primärstrahl genau zur Hälfte abschattet.

3. *Grobausrichtung parallel zum Primärstrahl:*

Im Allgemeinen ist die Probe zu Beginn der Justage nicht parallel zum Primärstrahl. Um dies zu korrigieren, drehen wir sie nun mit dem Motor `th` leicht nach links und rechts und schauen bei welcher Position am meisten Primärstrahlintensität am Detektor gemessen wird. Diese Position wird als Nullposition von `th` gewählt. Die Schrittweite sollte etwa 0.05° betragen. Da in Schritt 2 die noch verkippte Probe positioniert wurde, müssen die Schritte 2 und 3 nun (mindestens) einmal wiederholt werden. Wenn sich die so ermittelten Positionen von `ys` und `th` nicht mehr ändern, geht es weiter mit Schritt 4.

4. *Feinausrichtung parallel zum Primärstrahl:*

Die bisher erreichte Genauigkeit der Justage in `th` ist noch nicht zufriedenstellend, wir können sie durch die beiden folgenden Maßnahmen noch weiter steigern:

Zunächst fahren wir den Detektor aus dem Primärstrahl hinaus zu einer Position, die immer noch in der Nähe des Totalreflexions-Plateaus von Silizium liegt (z.B. `tth=0.3°`), und drehen anschließend die Probe so, dass die Bedingung „Einfallswinkel = Ausfallswinkel“ erfüllt ist, d.h. das Maximum an reflektierter Intensität am Detektor ankommt. An dieser Position muss

th genau halb so groß sein wie tth , also weisen wir dem Motor th den entsprechenden Wert zu.

Noch genauer wird die Justage durch Ausnutzen der Bragg-Reflexion: Wir führen nun einen ersten Reflektivitätsscan durch und setzen den Detektor (Motor tth) genau auf den ersten Bragg-Peak. Dann führen wir einen Scan durch, bei dem wir die Probe (Motor th) in sehr genauen Schritten (0.002°) um die Position $\frac{1}{2}\text{tth}$ rotieren und prüfen, wo genau die Reflektivität maximal wird. Diese Position ist dann die "wahre" Position $\text{th} = \frac{1}{2}\text{tth}$. th wird dann auf diesen Wert gefahren und der Wert $\frac{1}{2}\text{tth}$ zugewiesen.

5. *Horizontale Ausrichtung der Probennormalen:*

Bei unveränderten Motorpositionen ($\text{th} = \text{tth}/2$, tth auf Position des 1. Bragg-Peaks) wird der Winkel χ so eingestellt, dass die am Detektor gemessene Intensität maximiert wird.

6. Als abschließender Test wird noch einmal Schritt 4b (rocking-scan um ersten Bragg-Peak) wiederholt

Wie bereits im letzten Abschnitt beschrieben, sind alle Messungen mit automatischen Absorbern durchzuführen (`atton`). Vor jedem Schritt sollten sie verstanden haben, was sie gerade warum tun wollen. Nach jedem Scan sollten Sie überlegen, ob das Ergebnis sinnvoll ist oder eventuell ein Scan-Parameter falsch eingestellt war. Für die meisten Scans ist eine Darstellung auf linearer Skala am sinnvollsten. Umschalten zwischen linearer und logarithmischer Skalierung geschieht mit den Befehlen `linplot` bzw. `logplot`.

Aufgabe 3.

Machen Sie sich vor der Versuchsdurchführung die beschriebenen Schritte zur Justage der Probe anschaulich klar. Fertigen Sie zu jedem Schritt eine kleine Skizze an, die Sie am Versuchstag mitbringen. Die Skizze sollte enthalten, wie Sie die beteiligten Motoren verfahren und welches Signal Sie am Detektor erwarten.

5.5 Messung

Nun ist der Großteil der Arbeit getan und wir sind an dem Punkt angekommen, dass wir die eigentliche Messung durchführen können. Starten Sie einen kurzen Reflektivitätsscan (z.B. $\text{tth} = 0 \dots 6$, Schrittweite in tth 0.02°) und überzeugen Sie sich davon, dass die erhaltene Reflektivitätskurve vernünftig aussieht. Bei Verwendung von automatischen Absorbern gilt in etwa, dass pro Punkt mit einer Zählzeit von 1 s tatsächlich etwa 3 s benötigt werden.

Dann setzen Sie zusammen mit dem Betreuer ein Makro auf, welches alle Reflektivitätsscans bei verschiedenen RH -Werten nacheinander abarbeitet. Die fertigen Messdaten bekommen sie dann am darauffolgenden Tag vom Betreuer per email zugeschickt.

6 Auswertung

Je nachdem ob Sie die Auswertung ohne oder mit der Swelling-Methode durchführen möchten, unterscheidet sich die Vorgehensweise etwas.

6.1 Auswertung ohne swelling-Methode (Standard)

Per email erhalten Sie am Tag nach dem Versuch die Messdaten als .dat-files (2 Spalten: t_{th} , Intensität). Ermitteln Sie für jeden Wert RH die Periode D und plotten Sie das Resultat als Funktion von RH . Nehmen Sie die Reflektivitätskurve, die bei dem höchsten RH -Wert aufgenommen wurde, führen Sie die Ausleuchtungskorrektur durch, und plotten Sie die korrigierte Reflektivität als Funktion von q_z . Ermitteln Sie mit einem geeigneten Programm (z.B. Origin etc.) die integrierten Intensitäten, d.h. die Fläche unter den Bragg-Peaks. Rekonstruieren Sie dann wie in Abschnitt 4.2 beschrieben das Elektronendichteprofil. Wie würden Sie d_w aus dem erhaltenen Dichteprofil bestimmen? Vergleichen Sie den von Ihnen ermittelten d_w -Wert mit dem in Aufgabe 1 berechneten Wert. Wie begründen Sie die Abweichung, worin liegen die Schwierigkeiten?

6.2 Auswertung mit der swelling-Methode

In diesem Fall erfolgt die gesamte Auswertung inklusive Phasenbestimmung und Rekonstruktion des Dichteprofiles mit dem Programm Matlab®, welches Sie z.B. im CIP-Pool benutzen können. Um Problemen bei der Datenkonvertierung u.ä. vorzubeugen, wird der Versuchsbetreuer die von SPEC erzeugten Messdaten in Dateien umwandeln, welche direkt in Matlab eingelesen werden können. Zusammen mit zwei kleinen Auswertetools erhalten Sie diese dann am Tag nach dem Versuch per email. Wenn Probleme auftauchen, können Sie die wesentlichen Schritte der Auswertung auch zusammen mit dem Betreuer durchführen. Sie erhalten die folgenden Dateien:

`data_extraction_lamellar.m`, `swelling_lamellar.m`, `reflectivities_Versuchsdatum.txt`

Im letzten Dateinamen ist das entsprechende Versuchsdatum eingetragen. Speichern Sie diese Dateien in einem neuen Verzeichnis, starten Sie Matlab und wählen Sie das Verzeichnis als Arbeitsverzeichnis. Eingabe von `data_extraction_lamellar` ruft das entsprechende Programm auf. Dieses erledigt die folgenden Schritte:

- Einlesen der Reflektivitätsdaten
- Ausleuchtungskorrektur, ggf. Korrektur unterschiedlicher Zählzeiten
- Bestimmung der integrierten Intensität jedes Peaks
- Normalisierung der Datensätze

Am Bildschirm wird jeweils der aktuelle Arbeitsschritt angezeigt. Es werden nacheinander alle Reflektivitätskurven geplottet. Sie müssen jeweils die ungefähre Position der Bragg-Peaks per Mausklick markieren. Die exakte Bestimmung der Peakpositionen (angezeigt durch senkrechte Linien) und der Fläche unter den Peaks, d.h. der integrierten Intensität, erfolgt dann automatisch. Als Ergebnis erhalten Sie einen Datensatz wie in der Tabelle in Abb. 16, dieser wird automatisch unter dem angezeigten Dateinamen (z.B. `23-Mar-2010_D0PC.m`) gespeichert. Außerdem wird noch einmal das Ergebnis aller Reflektivitätsmessungen geplottet, dies sollten Sie ebenfalls abspeichern und in das Versuchsprotokoll einfügen.

Als nächstes erfolgt die Ermittlung der sinnvollsten Phasenkombination mithilfe der Swelling-Methode. Stellen Sie zunächst sicher, dass im file `swelling_lamellar.m` in Zeile 14 die soeben erzeugte Datei aufgerufen wird. Dann starten sie das Programm aus Matlab durch Eingabe von `swelling_lamellar`. Zunächst müssen sie angeben, welche RH-Werte berücksichtigt werden sollen. Dann werden alle möglichen Phasenkombinationen $\{\nu_n\}$ durchprobiert und für jede ermittelt, wie gut der resultierende kontinuierliche Formfaktor $F^{(-)}(q_z)$ die diskreten $\{\nu_n|F(q_z)^{(n)}|\}$ interpoliert. Hierzu wird die Methode der kleinsten Quadrate benutzt. Die nach der Fitgüte geordneten Phasenkombinationen und die zugehörigen Fehler werden in den arrays `nu_sorted` bzw. `errors_sorted` gespeichert.

Für die besten n Phasenkombinationen (Eingabe von n am Bildschirm) werden die entsprechenden Plots angezeigt (Anmerkung: Phasenkombinationen, die sich lediglich durch einen globalen Faktor ± 1 unterscheiden, führen zum selben Ergebnis, die resultierenden Dichteprofile sind lediglich um $\frac{d}{2}$ gegeneinander verschoben. Das Programm zeigt nur diejenigen an, für die das bilayer-Zentrum bei $z=0$ liegt). Überzeugen Sie sich „per Auge“ davon, dass für die weniger guten Phasenkombinationen für mindestens eine Beugungsordnung keine gute Übereinstimmung mehr zwischen diskreten Datenpunkten und kontinuierlichem Formfaktor besteht. Der Plot zur besten Phasenkombination gehört in das Protokoll.

Außerdem wird in einem weiteren Fenster der mit der besten Phasenkombination ermittelte Elektronendichtekontrast $\Delta\rho(z)$ für alle RH-Werte geplottet (Abb. 19).

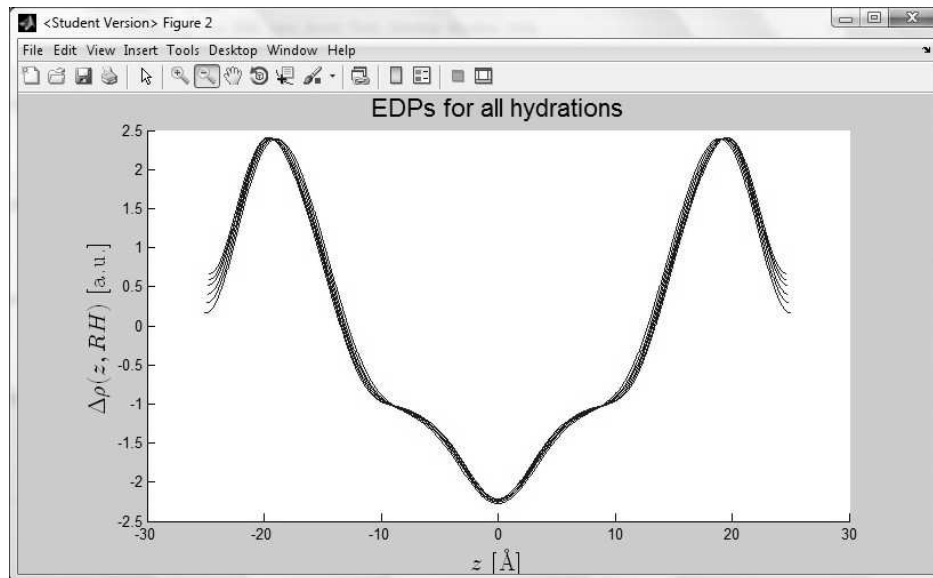


Abbildung 19: Screenshot der Plots des Elektronendichteprofiles $\Delta\rho(z, RH)$ für alle verwendeten RH-Werte. Es lässt sich erkennen, dass $\Delta\rho(z)$ sich leicht mit dem Wassergehalt des Membranstapels ändert. Was genau kann man beobachten und wie erklären Sie dies?

Wie würden Sie d_w aus den erhaltenen Dichteprofilen bestimmen? Vergleichen Sie den von Ihnen ermittelten d_w -Wert mit dem in Aufgabe 1 berechneten Wert. Wie begründen Sie die Abweichung, worin liegen die Schwierigkeiten? Ermitteln Sie außerdem für jeden RH-Wert die Periode D sowie den Abstand d_{HH} der Kopfgruppen (Abstand der beiden Maxima von $\Delta\rho(z)$) und tragen sie D , d_{HH} und d_w als Funktion von RH auf. Was beobachten Sie und wie würden Sie diesen Effekt erklären?

7 Literatur

Literatur

- [1] ALS-NIELSEN J., MCMORROW D., *Elements of Modern X-Ray Physics* (John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2001).
- [2] SINGER, S.J. AND NICOLSON, G.L., *Science* **175**, 720 (1972).
- [3] STRYER, L., *Biochemie* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996).
- [4] FENZL W., *Zeitschr. f. Physik* **97**, 333 (1995).
- [5] KODAMA, M., *Thermochim. Act.* **109**, 81 (1986).
- [6] NAGLE, J.F. AND TRISTRAM-NAGLE, S., *Biochim. Biophys. Act.* **1469**, 159 (2000).
- [7] WORTHINGTON, C.R., *J. Appl. Cryst.* **21**, 322 (1988).
- [8] BLAUROCK, A.E. AND W. STOECKENIUS, *Nature New Biol.* **233**, 152 (1971).

8 Anmerkung

Der hier vorgestellte Versuch und die Anleitung wurden in ihrer ersten Version von Chenghao Li hier am Institut für Röntgenphysik entwickelt. Die zweite Version der Anleitung stammt von Klaus Giewekemeyer, diese wurde zu großen Teilen übernommen. Die wesentlichen Änderungen zur vorliegenden dritten Version betreffen die Nutzung der Swelling-Methode sowie den Wechsel vom Diffraktometer D8 zum Diffraktometer WENDI.