

Universität Bielefeld
Fakultät Chemie
Abteilung Physikalische
und Biophysikalische Chemie

Entwicklung eines verbesserten Messprinzips für frequenz aufgelöste depolarisierte dynamische Lichtstreuung

Dissertation

Christoph Angermann

22. Dezember 2016

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

von

Christoph Angermann

geboren am 05.11.1982 in Marktredwitz

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Hellweg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Huser

Abstract

Unlike photon-correlation spectroscopy (PCS), frequency resolved depolarized dynamic light scattering (FPI-DDLS) is a rather barely used method. In this technique, the broadening of the Rayleigh line is resolved in the frequency domain with the use of a tunable Fabry-Perot interferometer (FPI). The free spectral range (FSR) is determining the observable rotational diffusion timescale of small particles in solution [1, 2].

In particular, this work deals with the rotational reorientation in a timescale of 1 ns–150 ns, which is too fast to be easily resolved with conventional techniques. Three different setups, each equipped with a custom modified FPI with a FSR of 150 MHz, were developed to cover this timescale. One of the key problems is to correctly sum up the weak depolarized and frequency analyzed signal without broadening the line artificially. The suitable method, which is based on two shutters to switch between the reference and depolarized beam, is not appropriate due to the long distance between the interferometer mirrors. Another setup, equipped with an acousto-optic modulator (AOM), was developed. The AOM can be used to generate a reference beam that is shifted 80 MHz to the depolarized signal. This frequency spacing, however is not constant enough to ensure an accurate accumulation. The latter can only be achieved with a simultaneous detection of the frequency resolved reference and depolarized beam with two separate photomultipliers. For this purpose, the attenuated reference beam is coupled into the FPI together with the depolarized signal. Pinholes and polarizers are used to subsequently isolate the two beams. The signal processing and filtering is performed by means of special LabVIEW routines. Finally the apparatus with simultaneous detection was used to study depolarized Rayleigh spectra of tRNA as well as equimolar solutions of 5'-AMP/5'-UMP and 5'-AMP/5'-CMP at different temperatures.

Kurzzusammenfassung

Im Gegensatz zu Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist die frequenz aufgelöste depolarisierte dynamische Lichtstreuung (FPI-DDLS) eine eher selten genutzte Analyse-methode. Bei dieser Technik wird die Frequenzverschiebung des Primärstrahls in Form einer Linienverbreiterung in der Frequenzdomäne erfasst. Mit Hilfe eines durchstimmbaren Fabry-Perot Interferometers (FPI) kann die Frequenzanalyse durchgeführt werden. Der freie Spektralbereich (FSR) des verwendeten Interferometers bestimmt hierbei den de-tek-tierbaren Zeitbereich der Rotationsreorientierung von Partikeln in Lösung [1, 2].

In dieser Arbeit wird speziell auf den Zeitbereich von 1 ns – 150 ns eingegangen, der mit konventionellen Lichtstremethoden bisher nicht zugänglich war. Es wurden drei un-ter-schiedliche Versuchsanordnungen untersucht, bzw. entwickelt, um diesen Zeitbereich abbilden zu können. Dazu wurde ein modifiziertes FPI mit einem FSR von 150 MHz verwendet. Ein zentrales Problem besteht darin, das schwache depolarisierte, frequenz-analysierte Signal korrekt aufzusummieren, ohne die Linie künstlich zu verbreitern. Die etablierte Methode, die darauf basiert, mittels zweier Shutter zwischen Referenzsignal und Messsignal zu wechseln, ist aufgrund des großen Spiegelabstands für diese Problem-stellung nicht geeignet. Ein Aufbau mit akusto-optischem Modulator, der ein um 80 MHz vom Messsignal verschobenes Referenzsignal erzeugt, wurde entwickelt. Jedoch ist der Frequenzabstand nicht konstant genug, um eine korrekte Akkumulation zu gewährleis-ten. Dies kann nur durch eine simultane Detektion von Referenzsignal und Messsignal erreicht werden. Dazu ist es notwendig, dass beide Teilstrahlen gleichzeitig frequenzana-lysiert und mit zwei unterschiedlichen Photomultipliern detektiert werden. Dazu wird ein stark abgeschwächter Teil des Primärstrahls nach dem Streuprozess in das FPI eingekop-pelt. Die Signalweiterverarbeitung geschieht durch dafür entwickelte LabVIEW Routinen. Im letzten Teil dieser Arbeit wird die Methode mit simultaner Detektion verwendet, um die depolarisierten Rayleigh-Spektren von tRNA, sowie Mischungen von 5'-AMP/5'-UMP und 5'-AMP/5'-CMP bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	4
2.1	Allgemeine Lichtstreuungstheorie	4
2.2	Polarisierte Lichtstreuung und Autokorrelationsfunktion	6
2.3	Depolarisierte Lichtstreuung	8
2.4	Hydrodynamik	9
2.5	Entfaltung nach van Cittert	13
3	Untersuchte Modellsysteme	14
3.1	Mononukleotide	15
3.2	Transport RNA (tRNA)	17
4	Experimenteller Teil	18
4.1	FPI-DDLS	18
4.1.1	Fabry-Perot-Interferometer	18
4.1.2	Akustooptischer Modulator	24
4.1.3	Polarisation	25
4.1.4	Versuchsarrordnungen	26
4.2	Photonenkorrelationsspektroskopie	36
4.3	Probenvorbereitung	37
5	Software Entwicklung	39
5.1	LabVIEW und NI-DAQmx	39
5.2	Programme	40
5.2.1	Messapplikation - batch.vi	45
5.2.2	Entfaltungsapplikation - convbatch.vi	49

6	Auswertemethoden	52
6.1	Depolarisierte Spektren	52
6.2	Photonenkorrelationsspektren	55
7	Ergebnisse	58
7.1	Apparatur	58
7.1.1	Shuttertechnik	58
7.1.2	Aufbau mit Akustooptischem Modulator	59
7.1.3	Aufbau mit Simultandektion	61
7.2	Plausibilitätsüberprüfung	66
7.3	DDLS-FPI an 5'-AMP/5'-CMP	72
7.3.1	Temperaturabhängige Messungen	72
7.3.2	Konzentrationsabhängigkeit	78
7.4	PCS an 5'-AMP/5'-CMP	80
7.5	Hydrodynamik	83
8	Zusammenfassung	86

1 Einleitung

Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist eine etablierte und leistungsstarke Analysemethode, die Anwendung in der Nanotechnologie, Proteinkristallographie, Polymerwissenschaft und Medizintechnik findet [3–6]. Es kann der hydrodynamische Radius sowie die Polydispersität und das Aggregationsverhalten von Makromolekülen und Nanopartikeln im Bereich von 1 nm bis 1000 nm studiert werden. Die obere Grenze ist hierbei auch abhängig vom Brechungsindex der untersuchten Partikel. Häufig wird der Überbegriff „Dynamische Lichtstreuung“ (DLS) anstelle von „PCS“ für diese Korrelationstechnik verwendet [7–10].

Eine weitaus weniger verbreitete Lichtstremethode ist die frequenz aufgelöste depolarisierte dynamische Lichtstreuung (FPI-DDLS). Anders als bei der PCS, bei der Intensitätsschwankungen des Streulichtes detektiert und mit einem Korrelator in der Zeitdomäne aufgelöst werden, wird bei der FPI-DDLS die Frequenzverschiebung des Primärstrahls in Form einer Linienverbreiterung des Streulichtes in der Frequenzdomäne erfasst [1]. Die Frequenzanalyse wird dabei durch ein durchstimmbares Fabry-Perot Interferometer realisiert [2].

Diese Methode erlaubt es, weitreichende Aussagen über die Dynamik und Struktur von DNA/RNA und DNA Fragmenten [11–18] sowie kleineren Proteinen, z.B. dem Enzym Lysozym [19] zu treffen. Neben der Bestimmung der Orientierungsrelaxation von Benzol, Toluol und anderen Lösungsmitteln [20, 21] wurden außerdem kombinierte NMR/DDLS Studien durchgeführt, um verschiedene Reorientierungszeiten entlang der Molekülachsen zu gewinnen [22].

Aus den Anwendungsgebieten wird deutlich, dass sich die Möglichkeiten der Untersuchung von Reorientierungs- und Struktureigenschaften über einen breiten Diffusionszeitenbereich erstrecken. Es können Reorientierungszeiten im Pikosekundenbereich bis hin zu mehreren Nanosekunden verfolgt werden. Der detektierbare Zeitbereich wird durch die Wahl des Interferometers, bzw. dessen freien Spektralbereich (FSR, free spectral range) bestimmt. Voraussetzung für ein depolarisiertes Streusignal ist lediglich die optische

Anisotropie der Moleküle, welche häufig bereits durch die geometrische Struktur des Moleküls gegeben ist [23].

Die dynamische Lichtstreuung stellt somit eine leistungsfähige Methode dar, mit der die Struktur und die Dynamik von Molekülen in Lösung studiert werden kann. Eine Kombination der interferometrischen Methode und der Photonenkorrelationsspektroskopie erlaubt es, Aussagen über die entstandenen Strukturen zu treffen, ohne konkrete Kristallstrukturexperimente durchzuführen. Mit Hilfe hydrodynamischer Modellrechnungen kann auf Moleküldimensionen geschlossen werden und es muss dabei nicht in das Probensystem eingegriffen werden [24–32].

Tabelle 1.1: Einordnung der Leistungsparameter der Apparatur in eine hydrodynamische Größenskala, bzw. in Rotationsrelaxationsraten τ_r und Rotationsdiffusionskoeffizienten Θ_r

	FPI-DDLS (FSR \gg 1 GHz)	FPI-DDLS (FSR = 150 MHz)	PCS-DDLS
τ_r	\ll 1000 ps	1 ns - 200 ns	\gg 1 μ s
Θ_r	\gg 10^8 1/s	$\approx 10^6$ 1/s	\ll 10^3 1/s
Hydrodyn. Größe	$<$ 1 nm	\approx 1 nm	\gg 1 nm

Tabelle 1.1 zeigt, dass die erwähnten Lichtstremethoden FPI- und PCS-DDLS einen breiten Bereich an Rotationsrelaxationsraten abbilden können. Für größere bzw. langsamere Partikel eignet sich die PCS sehr gut, während die interferometrische Methode für sehr kleine bzw. schnelle Partikel/Moleküle besser geeignet ist. Der Übergangsbereich, der gleichzeitig untere, bzw. obere Grenze der technischen Realisierbarkeit beider Methoden darstellt, ist mit PCS-Lichtstreuapparaturen kaum zugänglich. Der Relaxationsbereich von wenigen Nanosekunden ist zu schnell, um mit konventionellen Korrelationstechniken zeitlich erfasst zu werden. Um diesen Bereich in der Frequenzdomäne erschließen zu kön-

nen, ist der Einsatz eines Interferometers mit besonders kleinem freiem Spektralbereich notwendig, das jedoch u.a. durch den großen Spiegelabstand sehr anfällig für Störeinflüsse ist. Eine elementare Schwierigkeit besteht außerdem darin, das depolarisierte Streulicht, dessen Intensität um mehrere Größenordnungen geringer ist als das polarisierte zu detektieren, korrekt aufzusummieren und auszuwerten.

Dieser Umstand stellt die Motivation und zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit dar. Ziel ist es, eine Messapparatur zu entwickeln, mit der die Reorientierungsraten im Bereich von 1 ns – 200 ns detektiert werden können, um die o.g. Lücke zu schließen.

Zu diesem Zweck wurde eine Lichtstreuapparatur mit einem konfokalen Fabry Perot Interferometer mit einem freiem Spektralbereich von 150 MHz aufgebaut, in dem durch Nutzung verschiedener optischer Achsen erstmals eine simultane Messung des Streulichtspektrums und der Apparatefunktion möglich wird und somit das Stabilitätsproblem des optischen Aufbaus [33] keine Rolle mehr spielt. Die Detektion des Streulichtes erfolgt über Photomultiplier, deren Signale mit Hilfe von neu entwickelten LabVIEW Routinen erfasst, aufbereitet und weiterverarbeitet werden.

2 Theorie

Dieses Kapitel geht auf die wichtigsten Grundlagen der dynamischen Lichtstreuung ein, die für die spätere Verwendung in dieser Arbeit relevant sind. Es werden zunächst Begrifflichkeiten erläutert und das Phänomen der Lichtstreuung beschrieben. Das Kapitel führt, außer in die Grundlagen der allgemeinen Lichtstreuung, auch in die der polarisierten und depolarisierten Lichtstreuung ein. Es werden hydrodynamische Modelle vorgestellt, die für die vorliegende Arbeit zutreffend sind.

2.1 Allgemeine Lichtstreuungstheorie

Trifft eine elektromagnetische Welle auf eine Probe, so bewirkt diese eine erzwungene, anisotrope Ladungsverteilung in den Elektronenhüllen der Probenmoleküle. Die Elektronen schwingen in der Frequenz der Primärwelle und sind somit Ursprung der sog. Sekundärstrahlung, dem *Streulicht*, das sich in alle Raumrichtungen ausbreiten kann [34]. Bei kleinen¹ Proben bzw. optisch isotropen Medien kommt es zu destruktiver Interferenz in alle Richtungen außer der Vorwärtsrichtung.

Das Phänomen der Streuung kann also nur beobachtet werden, wenn die Probe einen Dielektrizitätsgradienten aufweist, oder es aufgrund von beispielsweise thermischen Bewegungen der Probenmoleküle zu Konzentrationsfluktuationen und damit zu Fluktuationen der Dielektrizitätszahl kommt. Die daraus resultierende Dopplerverschiebung des Streulichts zur Frequenz der Primärwelle, die letztendlich auf die Rotation und Translation der Probenmoleküle zurückzuführen ist, lässt sich mit modernen Methoden sowohl in der Zeit- [9] (mit Hilfe der PCS) als auch der Frequenzdomäne [1, 18, 35–37] (mit Hilfe der frequenz aufgelösten depolarisierten Lichtstreuung) beobachten. Dabei lassen sich die Zeitautokorrelationsfunktion der fluktuierenden Streulichtintensität mit Hilfe des Wiener-Khinchine Theorems [38] in das zugehörige Frequenzspektrum umrechnen. Durch die mit

¹gemeint ist das Verhältnis zur Wellenlänge der Primärstrahlung

diesen Methoden gefundenen Parameter lassen sich Rückschlüsse auf Form und Größe der beobachteten Probenmoleküle ziehen.

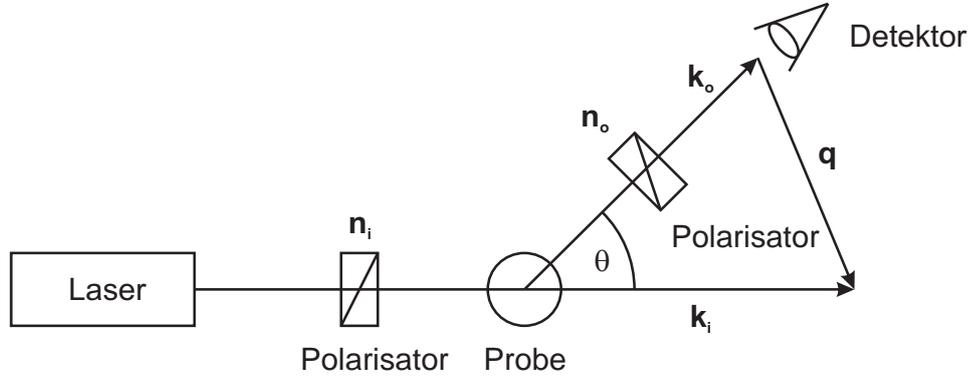


Abbildung 2.1: Definition des Streuvektors \mathbf{q} mit Wellenvektor \mathbf{k} . [39]

Abb. 2.1 skizziert ein typisches Streuexperiment: Monochromatisches Licht mit dem Wellenvektor \mathbf{k}_i eines Lasers wird mit Hilfe eines ersten Polarisators linear polarisiert, auf eine Probe gelenkt und unter dem Winkel θ mit dem Wellenvektor \mathbf{k}_o gestreut. Der Streuvektor \mathbf{q} ist die Differenz der Wellenvektoren des einfallenden und gestreuten Lichtes [35]

$$\mathbf{q} = \mathbf{k}_i - \mathbf{k}_o \quad (2.1)$$

mit dem Betrag des Wellenvektors

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (2.2)$$

λ : Wellenlänge der einfallenden Strahlung

n : Brechungsindex der Lösung

Je nach Stellung des Polarisators im Detektionspfad (vgl. Abb. 2.1) unterscheidet man zwischen VH-Geometrie, bei der der einfallende Wellenvektor linear vertikal und der gestreute Wellenvektor linear horizontal polarisiert ist und der VV-Geometrie, bei der beide Polarisatoren linear vertikal eingestellt sind. In der vorliegenden Arbeit wird letztere mit der Photonenkorrelationsspektroskopie und die VH-Geometrie mit der frequenz aufgelösten DDLS gemessen.

2.2 Polarisierte Lichtstreuung und Autokorrelationsfunktion

In einem Experiment wie in Abb.2.1, bei dem sich N streuende Teilchen am zeitabhängigen Ort $\mathbf{r}(t)$ befinden, ist das elektrische Feld [35] des Streulichtes eine Superposition der Felder aller streuenden Teilchen mit den Amplituden A_N

$$\mathbf{E}(\mathbf{q}, t) = \sum_N A_N(t) \exp[\omega_0 t - \mathbf{q}\mathbf{r}_N(t)]. \quad (2.3)$$

In einem *heterodynen* Experiment, bei dem das elektrische Feld des gestreuten Lichts mit dem des Referenzstrahls gemischt wird, lautet die Feldautokorrelationsfunktion [40]

$$g^{(1)}(q, \tau) = \frac{\langle E^*(q, t)E(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle}. \quad (2.4)$$

In der Regel wird jedoch die Intensität (Betragsquadrat der Feldstärke) des gestreuten Lichtes mit dem Detektor aufgezeichnet. Speziell bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) werden die auf den Detektor auftreffenden gestreuten Photonen gezählt. Da die Zählraten proportional zur Intensität des Streulichtes sind, kann die *Intensitäts-Autokorrelationsfunktion*

$$g^{(2)}(q, \tau) = \frac{\sum n(t)n(t + \tau)}{\langle n \rangle^2} = \frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle^2} \quad (2.5)$$

für einem sog. *homodynes* Streuexperiment angegeben werden. In einem Gaußschen Strahlungsfeld lässt sich mit Hilfe der Siegert-Relation

$$g^{(2)}(q, \tau) = 1 + |g^{(1)}(q, \tau)|^2 \quad (2.6)$$

$g^{(2)}$ in $g^{(1)}$ überführen. Im einfachsten Fall handelt es sich bei der Probe um eine verdünnte Lösung sehr kleiner, sphärischer, monodisperser Partikel, dann wird die Feld-Autokorrelationsfunktion durch eine einfache Exponentialfunktion

$$g^{(1)}(q, \tau) = \exp[-\Gamma\tau] \quad (2.7)$$

beschrieben. Bei Translationsdiffusion ist die Relaxationsrate Γ , dem Kehrwert der Rela-

xationszeit τ_r^{-1} über die Landau-Plazcek Beziehung [41]

$$\Gamma = \frac{1}{\tau_r} = q^2 D_T \quad (2.8)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D_T und dem Betrag des Streuvektors q verknüpft. In der Praxis untersucht man häufig Proben, die eine statistische Größenverteilung aufweisen. Wegen dieser Polydispersität setzt sich die Autokorrelationsfunktion aus einer Summe von Exponentialfunktionen mit einer Verteilung der Relaxationsraten $G(\Gamma)$ zusammen:

$$g^{(1)}(q, \tau) = \int_0^{+\infty} G(\Gamma) \exp[-\Gamma\tau] d\Gamma. \quad (2.9)$$

Um die aus dem Experiment gewonnene Autokorrelationsfunktion mit einer Verteilung von Exponentialfunktionen anpassen zu können muss die Verteilungsfunktion $G(\Gamma)$ bekannt sein. Für Proben mit nur einer Spezies bzw. einem einzelnen Relaxationsprozess eignet sich die Kumulantenmethode[42] um die gesuchte Verteilungsfunktion zu finden, bei der die logarithmierte Feldautokorrelation in eine Kumulantenreihe K_i entwickelt wird:

$$\ln |g^{(1)}(\tau)| = K_1\tau + \frac{K_2}{2!}\tau^2 + \frac{K_3}{3!}\tau^3 + \dots \quad (2.10)$$

K_1 entspricht dem Mittelwert der Relaxationsrate $\langle\Gamma\rangle$, K_2 der Breite, während K_3 die Asymmetrie der Verteilung beschreibt.

Bei Proben mit mehreren Relaxationsprozessen kann die Kumulantenmethode nicht mehr angewendet werden. Provencher [43, 44] entwickelte für diese Zwecke das Fortran Programmpaket **CONTIN**. Die Lösungen von Gl. (2.9) werden durch eine inverse Laplace Transformation gefunden, aus denen die sog. **CONTIN**- Analyse durch Regularisierung die einzelnen Momente ermittelt:

$$\mu_0 = \int_0^{\infty} G(\Gamma) d\Gamma \quad (2.11a)$$

$$\mu_1 = \int_0^{\infty} \Gamma G(\Gamma) d\Gamma \quad (2.11b)$$

$$\mu_2 = \int_0^{\infty} \Gamma^2 G(\Gamma) d\Gamma \quad (2.11c)$$

Normierte Varianz und mittlere Relaxationsrate sind dann über die gefundenen Momente definiert:

$$\langle \Gamma \rangle = \frac{\mu_1}{\mu_0} \quad (2.12a)$$

$$\langle \Gamma^2 \rangle = \frac{\mu_2}{\mu_0} \quad (2.12b)$$

$$\mu = \text{Var} \left(\frac{\Gamma}{\langle \Gamma \rangle} \right) = \frac{\langle \Gamma^2 \rangle - \langle \Gamma \rangle^2}{\langle \Gamma \rangle^2} \quad (2.12c)$$

2.3 Depolarisierte Lichtstreuung

In einem sog. DDLs-Experiment wird die horizontal polarisierte Komponente des Streulichtes betrachtet. Pecora [35] zeigte, dass das gestreute elektrische Feld in VH- Geometrie durch die yz-Komponente des Polarisierbarkeitstensors bestimmt wird. Er zeigte außerdem [37, 45], dass die Korrelationsfunktion durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben wird, wenn Rotation und Translation getrennt voneinander betrachtet werden können. Sie reduziert sich auf eine einzige Exponentialfunktion, wenn ein zylindersymmetrisches oder ellipsoidales Molekül betrachtet wird[46, 47]. Die Korrelationsfunktion

$$S^{VH}(q, t) = \frac{N\beta^2}{15}(1 + fN) \exp \left[-\frac{t}{\tau_s} \left(\frac{1 + gN}{1 + fN} \right) \right] \quad (2.13)$$

ist die Summe aus einem sog. *distinct*-Term

$$S_d^{VH}(q, t) = \beta^2 \left[\left[\left(\frac{1}{N} \right) + f \right] \exp \left[-\frac{t}{\tau_s} \left(\frac{1 + gN}{1 + fN} \right) \right] - \frac{1}{N} \exp \left(-\frac{t}{\tau_s} \right) \right], \quad (2.14)$$

der die Korrelation sowohl vom Ort, als auch von der Orientierung von Molekülpaaren beschreibt und einem sog. *self*-Term

$$S_s^{VH}(q, t) = \beta^2 \exp \left(-\frac{t}{\tau_s} \right), \quad (2.15)$$

der die Kopplung von Rotation und Translation beschreibt.

β : optische Anisotropie $\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp}$ (= Komponenten des Polarisierbarkeitstensors parallel und senkrecht zur Molekülachse)

τ_s : Ein-Teilchen Reorientierungs-Relaxationszeit

f, g : statischer und dynamischer Paarkorrelationsfaktor

Die Rotationsrelaxation von kleinen Molekülen ist zu schnell, um mit Korrelationsspektroskopie noch aufgelöst werden zu können. Daher wird der Streuprozess nicht in der Zeit-Domäne, sondern mit Hilfe des Wiener-Khinchine Theorems [38] in der Frequenzdomäne betrachtet. Unter der Annahme, dass der Beitrag der Translation zum Spektrum vernachlässigbar ist, lautet die Spektrale Dichte in der VH-Geometrie [35]:

$$I^{VH}(q, \omega) = N\beta^2(1 + fN) \frac{6\Theta}{6\Theta^2 + \omega^2}. \quad (2.16)$$

Das bedeutet, das depolarisierte Spektrum des gestreuten Lichts wird durch eine einfache Lorentz-Linie mit der Halbwertsbreite

$$\Gamma = \frac{1}{2\pi\tau_s} \frac{1 + gN}{1 + fN} = \frac{6\Theta}{2\pi} \quad (2.17)$$

beschrieben². In ideal verdünnten Lösungen verschwinden die Paarkorrelationsfunktionen f und g , so dass i.A. die einfache Beziehung

$$\Gamma = (2\pi\tau_c)^{-1} \quad (2.18)$$

gilt [47] und unmittelbar von der Halbwertsbreite des gestreuten Lorentzprofils auf die Rotationsdiffusionszeit geschlossen werden kann.³ Durch die Verwendung von Strahlungsquellen mit endlicher Linienbreite muss lediglich noch eine Entfaltung nach van Cittert [48, 49] (vgl. Abschnitt 2.5) berücksichtigt werden.

2.4 Hydrodynamik

Die diskutierten Streuexperimente liefern sowohl Rotations- als auch Translationsdiffusionskoeffizienten. Durch Kenntnis dieser Größen ist es möglich, hydrodynamische Di-

²Übergang von Kreisfrequenz ω zu Frequenz ν

³ $\tau_c = \left(\frac{1+fN}{1+gN} \right) \tau_s$

mensionen mit Hilfe der Stokes-Einstein(-Debye) (SE(D)) Relationen abzuschätzen. Die Grenzen der Gültigkeit von SE und SED sind ein aktiver Bereich der theoretischen und experimentellen Forschung [50–52]. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch ausschließlich auf die Modifikationen von Perrin und Tirado / Garcia de la Torre eingegangen. [24, 26]

Stokes-Einstein-Debye

Der Translationsdiffusionskoeffizient D und der Rotationsdiffusionskoeffizient Θ werden durch die Stokes-Einstein Relation [53]

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_h} \quad (2.19)$$

beziehungsweise der Stokes-Einstein-Debye Relation [54]

$$\Theta = \frac{k_B T}{8\pi\eta_0 R_h^3} \quad (2.20)$$

für ideal sphärische Partikel beschrieben.

k_B : Boltzmann Konstante

T : Temperatur

η_0 : makroskopische Viskosität des Lösungsmittels

R_h : hydrodynamischer Teilchenradius

Gleichung (2.20) kann durch Einführung des hydrodynamischen Volumens V_h auch so formuliert werden, dass aus einer Auftragung von τ gegen η_0/T ebendies abgelesen werden kann (SED-Plot):

$$\tau = \frac{V_h}{k_B} \cdot \frac{\eta_0}{T} + \tau_0 \quad (2.21)$$

V_h ist abhängig von der Molekülgeometrie und einem Formfaktor [55], der je nach Schalenmodell (z.B. biaxiales Ellipsoid oder zylindrisches Modell) variiert:

$$V_h = V_m \cdot f_m \quad (2.22)$$

Ellipsoidmodell nach Perrin

Perrin [24, 56] modifizierte die SE(-D) Relationen, die ausschließlich für sphärische Partikel gelten

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 a} S(\rho) \quad (2.23)$$

$$\Theta = \frac{k_B T}{8\pi\eta_0 a^3} \left[\underbrace{\frac{3}{2} \left(\frac{(2 - \rho^2)S(\rho) - 1}{1 - \rho^4} \right)}_{f_m^{-1}} \right] \quad (2.24)$$

um das Diffusionsverhalten von Molekülen mit biaxialer, ellipsoidaler Struktur beschreiben zu können.

$\rho = b/a$: Verhältnis der beiden Halbachsen des Rotationsellipsoids

$S(\rho)$: Formfaktor

Für diskusförmige ($a < b$, oblat) bzw. zigarrenförmige ($a > b$, prolat) Sphäroide gilt für den Profilmfaktor

$$S(\rho) = \frac{1}{\sqrt{1 - \rho^2}} \ln \left(\frac{1 + \sqrt{1 - \rho^2}}{\rho} \right) \quad \text{prolat } (\rho < 1)$$

$$S(\rho) = \frac{1}{\sqrt{\rho^2 - 1}} \tan^{-1} \left(\sqrt{\rho^2 - 1} \right) \quad \text{oblat } (\rho > 1).$$

Mit Hilfe der Gleichungen (2.23) und (2.24) sowie einer graphischen Lösung des resultierenden Gleichungssystems

$$\frac{(1 - \rho^4)\Theta}{(2 - \rho^2)S(\rho) - 1} = \left(\frac{6\pi\eta_0 D}{S(\rho)k_B T} \right)^3 \frac{3k_B T}{16\pi\eta_0} \quad (2.25)$$

können die beiden Halbachsen a und b , und damit das (hydrodynamische) Volumen ermittelt werden [56].

Zylindermodell nach Tirado und Garcia de la Torre

Tirado und Garcia de la Torre [26, 28] stellten eine Theorie auf, um anisotrope Biopolymere wie z.B. DNS als zylindrischen Stab zu beschreiben. Die Diffusionskoeffizienten

werden hier dimensionslos formuliert:

$$\frac{3\pi\eta_0 L}{k_B T} D = \ln p + \nu \quad (2.26)$$

$$\frac{\pi\eta_0 L^3}{3k_B T} \Theta = \ln p + \delta. \quad (2.27)$$

$p = L/d$: Verhältnis aus Länge zu Durchmesser des Stabs (Gültigkeitsbereich $2 \leq p \leq 30$)

ν, δ : end-effect-Korrektur

Die end-effect-Korrekturen wurden mit Polynomen 2. Ordnung in p^{-1} zu

$$\nu = 0.312 + 0.565p^{-1} - 0.100p^{-2} \quad (2.28)$$

und

$$\delta = -0.662 + 0.917p^{-1} - 0.050p^{-2}. \quad (2.29)$$

angepasst [29]. Sind die Diffusionskoeffizienten Θ und D aus den Streuexperimenten bekannt, so können L und d simultan [28] ermittelt werden. Zu diesem Zweck wird eine Funktion des Länge-zu-Durchmesser Verhältnisses definiert:

$$f(p) \equiv \left(\frac{9\pi\eta_0}{k_B T} \right)^{2/3} \frac{D}{\Theta^{1/3}} = \frac{\ln p + \nu}{(\ln p + \delta)^{1/3}} \quad (2.30)$$

Auch dieses Gleichungssystem kann grafisch gelöst werden, um schließlich die Dimensionen des zylindrischen Moleküls zu erhalten. Für diesen Zweck wurde eine Excel Mappe angefertigt, in der lediglich die Diffusionskoeffizienten eingetragen werden müssen um, die die Halbachsen (Perrin) bzw. Länge und Durchmesser (Tirado und Garcia de la Torre) bestimmen zu können.

2.5 Entfaltung nach van Cittert

Für Relaxationsprozesse in der hier behandelten Zeitskala ($\tau_c \approx 100$ ns) liegen die Linienbreiten der zugehörigen Lorentzprofile (vgl. 2.18) unter 5 MHz und somit in der Größenordnung des verwendeten Coherent Verdi V5 Lasers [57]. Es ist von zentraler Bedeutung, die wahre Linienbreite der depolarisierten Komponente des Streulichtes zu ermitteln. Es muss also berücksichtigt werden, dass es sich bei dem gemessenen Spektrum $S(\omega)$ um eine Faltung aus der für den Messaufbau charakteristischen Apparatfunktion $A(\omega)$ und dem wahren Spektrum $W(\omega)$ handelt:

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} W(\omega)A(\omega - \omega')d\omega'. \quad (2.31)$$

In diesem Versuchsaufbau ist die Apparatfunktion durch die Verwendung eines Diffusors bekannt (vgl. Abschnitt 4.1.4). Sie entspricht der Linienbreite einer Probe mit unendlich langsamer Diffusion. Dadurch kann das wahre Linienprofil mit Hilfe eines iterativen Entfaltungsalgorithmus basierend auf der van Cittert Methode [48, 49] ermittelt werden (siehe auch Kapitel 5.2.2). Gleichung (2.31) kann als Integral des Fredholm Typus [58] geschrieben werden, dessen Lösung durch eine iterative Approximation ermittelt werden kann

$$W_n = nS - \mathcal{A}_n. \quad (2.32)$$

Mit Hilfe des Lösungskerns

$$\mathcal{A}_n = \int S \frac{n(n-1)}{2!} A - \frac{n(n-1)(n-2)}{3!} A_1 + A \cdots \pm A_{n-2}$$

und

$$A_n(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} A_{n-1}(\omega)A(\omega - \omega')d\omega'.$$

erkennt man, dass die wahre Intensitätsverteilung n -ter Ordnung berechnet werden kann, wenn die Apparatfunktion bekannt ist. Die Lösung 1. Ordnung ist dabei das scheinbare Spektrum selbst. Der Autor gibt an, dass besonders bei vergleichsweise schmalen Apparatfunktionen in vielen Fällen bereits für $n = 4$ ausreichende Ergebnisse erzielt werden [48].

3 Untersuchte Modellsysteme

Die hier beschriebene Methode soll einen Messbereich erschließen, der mit konventionellen Lichtreuapparaturen nicht oder nur bedingt zugänglich ist. Um den Versuchsaufbau auf Plausibilität prüfen zu können, werden also Aggregatstrukturen benötigt, die gut in den Messbereich passen. D.h. aufgrund der Tatsache, dass das depolarisierte Rayleigh Spektrum erfasst wird, sollte eine gewisse optische Anisotropie vorhanden sein. Außerdem muss die hydrodyn. Größe, bzw. die damit verknüpfte Rotationsrelaxation für das Messfenster geeignet sein. Das bedeutet Relaxationsraten τ_r im Bereich von 1 ns - 200 ns. Also Aggregate in der Größenordnung um 1 nm.

Als geeignete Modellsysteme werden bereits untersuchte Strukturen angesehen, von denen man die o.g. Spezifikationen erwartet. Dies sind z.B. Mononukleotide, die bereits durch Eimer und Dorfmueller näher charakterisiert wurden [12, 25]. Außerdem lässt sich die Dynamik kurzer Ribonukleinsäuren, wie z.B. die der tRNA aufgrund ihrer geringen Größe verfolgen [16].

3.1 Mononukleotide

Nukleotide, bestehend aus einem Phosphorsäurerest, Pentose und einer von fünf Nucleobasen der Purine (Adenin, Guanin) oder Pyrimidine (Cytosin, Uracil, Thymin) bilden das Grundgerüst der DNA und RNA [59]. Der Zucker ist über eine β -glykosidische Bindung mit Nucleobasen verbunden. Die Nucleotide sind über Esterbindungen miteinander verknüpft (vgl. Abb. 3.1) [60].

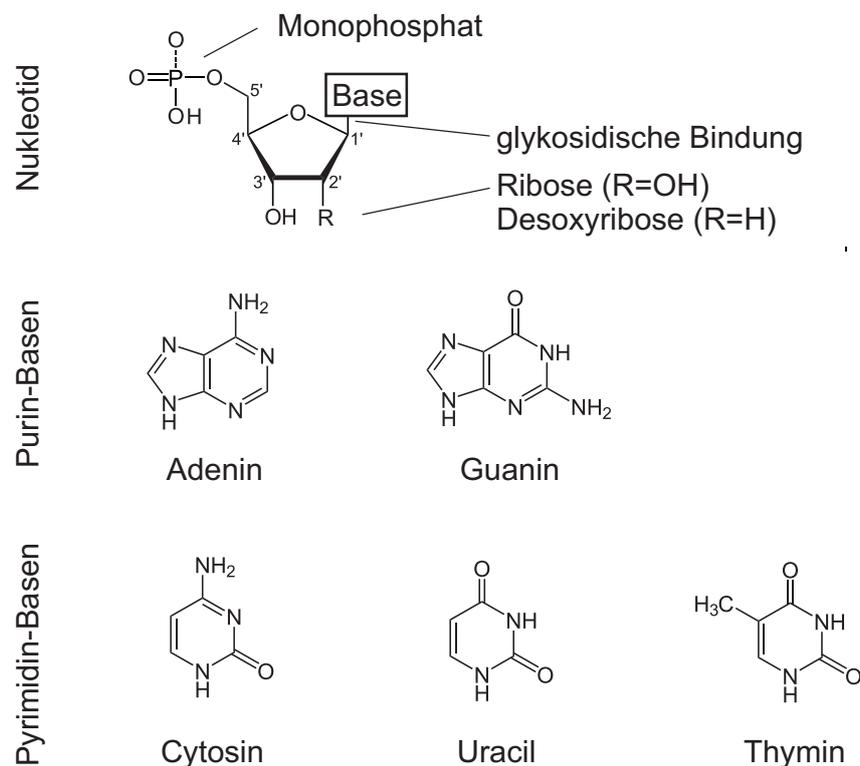


Abbildung 3.1: Struktur von Nucleotiden und fünf Nucleobasen. Ein Nucleotid setzt sich aus einem Phosphorsäurerest verestert mit einer Pentose und einer Purin- bzw. Pyrimidinbase zusammen.

Die o.g. Nucleotide bilden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren und durch Wechselwirkung benachbarter Basen die bekannte helikale Struktur. Nach Watson und Crick [61] bilden jeweils Adenin / Thymin und Guanin / Cytosin komplementäre Basenpaarungen in der DNA (bzw. Uracil anstelle von Thymin in der RNA). Neben diesen treten auch Wobble-Paarungen [62] auf, deren Assoziation ebenfalls auf Wasserstoffbrückenbindungen beruht (G-U und A-C Wobble-Paarung).

Eimer und Dorf Müller [13, 25, 63] untersuchten mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung das spezifische Aggregationsverhalten von Guanosin-5'-Monophosphat (5'-GMP). Es bildet durch Eigenaggregation von vier Monomereinheiten eine tetramere Grundstruktur, die in Abhängigkeit von Druck, Temperatur und Konzentration zu einer ausgeprägten Stapelbildung führt. Sie behandeln außerdem die Interaktion komplementärer Mononukleotide (5'-GMP/5'-CMP, 5'-AMP/5'-UMP) und führen die Ergebnisse ebenfalls auf vertikale Stapelbildung der Basenpaare zurück.

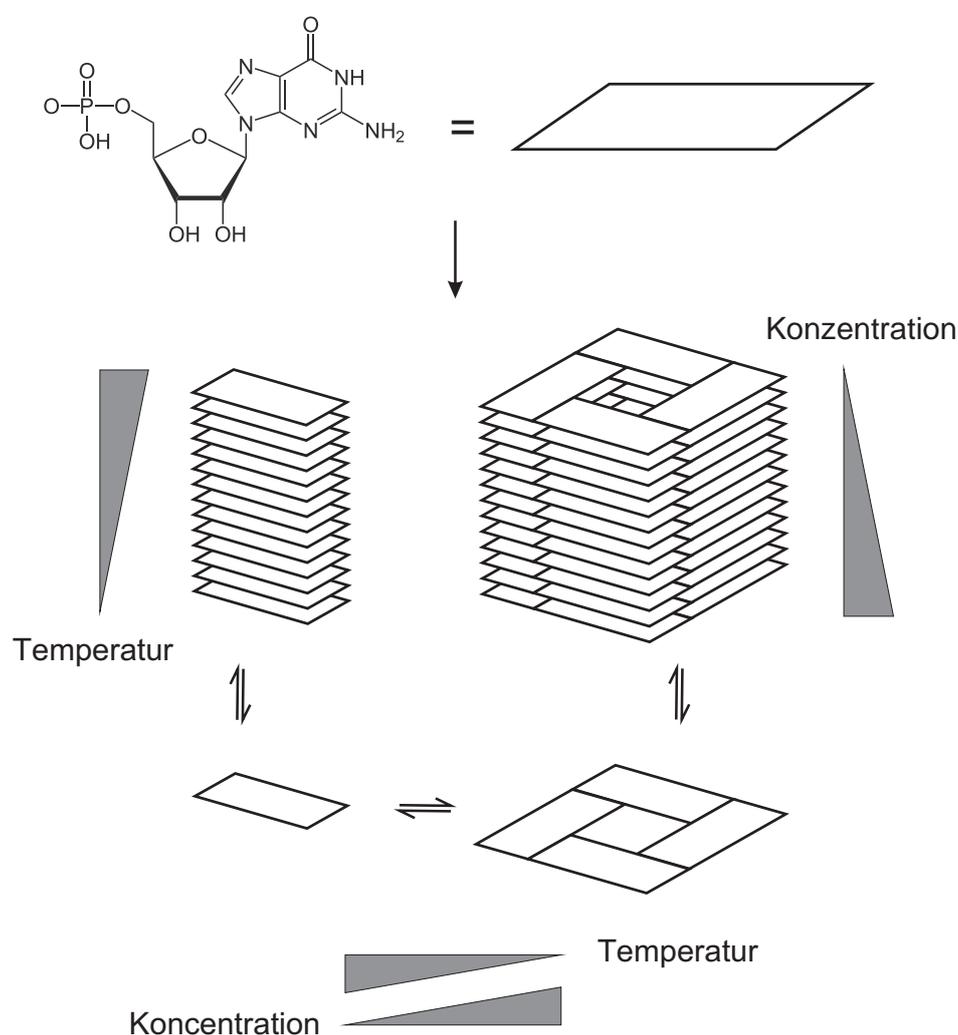


Abbildung 3.2: Einfluss von Temperatur und Konzentration auf das Aggregationsverhalten von 5'-GMP.

3.2 Transport RNA (tRNA)

Anders als die DNA ist RNA bis auf einige wenige Bereiche einzelsträngig. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Pyrimidin Base Thymin durch Uracil ersetzt wird. Es wird zwischen den drei, funktionell unterschiedlichen Typen von RNA unterschieden: Messenger RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA) und Transport RNA (tRNA) [61]. Transport RNA transportiert die Aminosäuren zur Translation zu den Ribosomen. Für die insgesamt 20 proteinogenen Aminosäuren gibt es jeweils mindestens eine Art von tRNA Molekül. Wegen der Degeneration (eine Art Fehlertoleranz) des genetischen Codes existieren aber über 60 unterschiedliche tRNA Moleküle in den Zellen [64].

Bildet man ein tRNA Molekül in die Ebene ab, entsteht eine Kleeblattstruktur wie in Abb. 3.3.

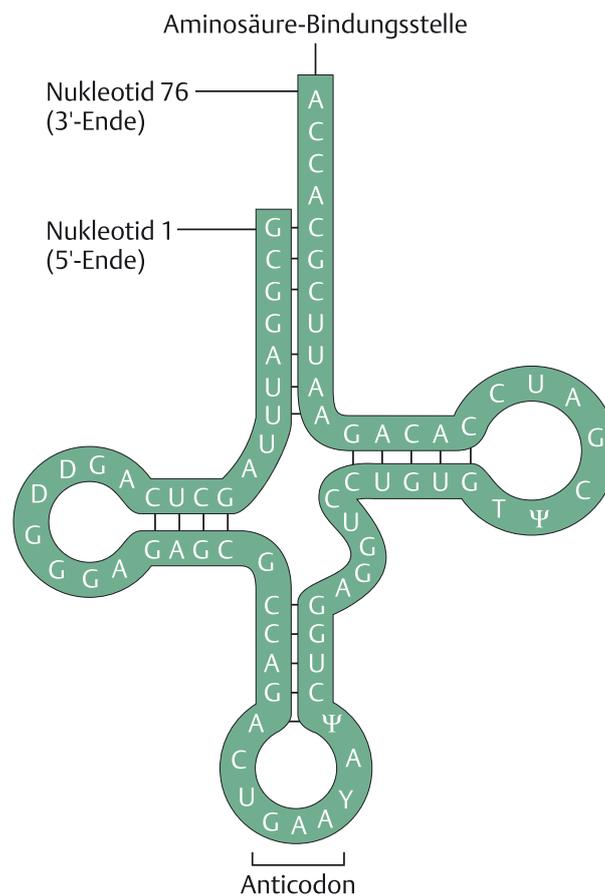


Abbildung 3.3: Kleeblattstruktur eines tRNA Moleküls [64]

4 Experimenteller Teil

Im folgenden Abschnitt werden drei grundlegend unterschiedliche Ansätze präsentiert, eine depolarisierte Lichtstreuungsanlage aufzubauen. Dazu werden zunächst die für die Methoden essentiellen Komponenten vorgestellt. Es wird außerdem der Versuchsaufbau beschrieben, der zur Bestimmung des Translationsdiffusionskoeffizienten benutzt wurde.

4.1 Frequenz aufgelöste depolarisierte Lichtstreuung

Bei der frequenz aufgelösten depolarisierten dynamischen Lichtstreuung übernimmt ein Fabry-Perot Interferometer (FPI) die Frequenzanalyse des Streulichts. Bei den drei vorgestellten Methoden (Shutter-Methode, Aufbau mit akustooptischem Modulator und Simultanmethode) stellt das FPI das Herzstück der Apparatur dar, deshalb wird im folgenden Abschnitt genauer auf die Funktionsweise und die wichtigsten Kenngrößen eines FPI eingegangen.

4.1.1 Fabry-Perot-Interferometer

Fabry-Perot Interferometer[65] dienen als sehr schmalbandige, durchstimmbare Interferenzfilter in der Laser Spektroskopie. Im einfachsten Fall, wenn die Reflexionsschichten einen festen Abstand zueinander haben, besteht ein solcher Filter aus einer auf beiden Seiten verspiegelten Quarz-Glasplatte (Fabry-Perot Etalon, vgl. Abb. 4.1). Planparallele Fabry-Perot Interferometer sind Vielstrahlinterferometer, deren zwei parallele Grenzflächen durch hochreflektierende gegenüberliegende Spiegel mit einem Luftspalt der optischen Dicke $n_L \cdot d$ realisiert werden.

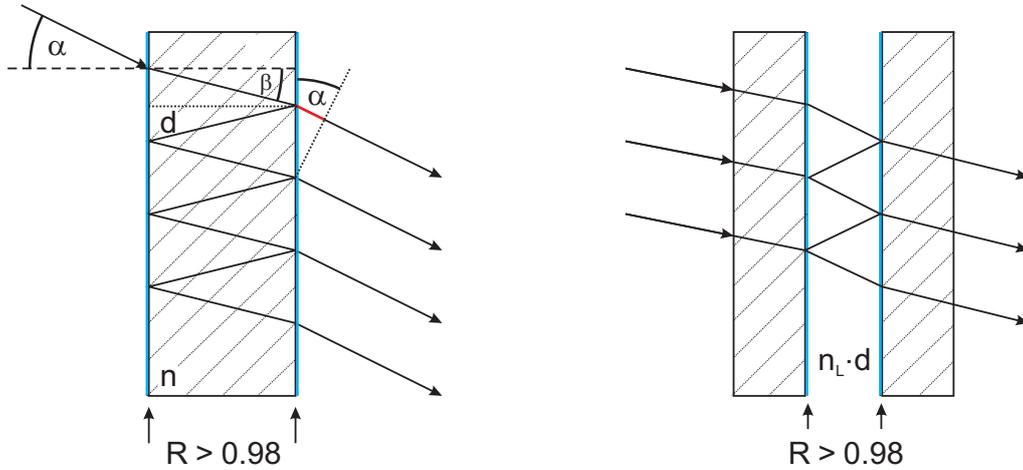


Abbildung 4.1: Beidseitig verspiegelte Glasplatte, ein sog. Fabry-Perot Etalon (links) und ein ebenes FPI mit Luftspalt der optischen Dicke $n_L \cdot d$ mit hochreflektierenden Spiegeln (rechts) [65].

Aus Abb. 4.1 kann auf den optischen Gangunterschied zwischen zwei benachbarten Teilstrahlen

$$\Delta s = 2nd \cos \beta \quad (4.1)$$

in einem Interferometer geschlossen werden [65]. Dies führt zu einer Phasendifferenz von

$$\delta = 2\pi \frac{\Delta s}{\lambda} + \Delta \phi. \quad (4.2)$$

Wenn die Oberflächen jeweils eine Reflektivität von R aufweisen, dann lautet die Transmissionskurve in Abhängigkeit der Phasendifferenz δ nach den Airy-Formeln [66]

$$T = \frac{(1 - R)^2}{(1 - R)^2 + 4R \sin^2(\delta/2)} = \frac{1}{1 + F \sin^2(\delta/2)} \quad (4.3)$$

mit $F = 4R/(1 - R)^2$. Abb. 4.2 zeigt die Transmissionskurve für unterschiedliche Werte der Finesse F^* . Sie charakterisiert den Resonator und ist das Verhältnis aus freiem Spektralbereich $\delta\nu$ (FSR) und Halbwertsbreite $\Delta\nu$ (FWHM) der Transmissionskurve.

$$F^* = \frac{\delta\nu}{\Delta\nu} = \frac{\pi \cdot \sqrt{F}}{2} \quad (4.4)$$

Der freie Spektralbereich ist der Frequenzabstand zweier aufeinanderfolgender Maxima im Transmissionsspektrum. Aus Gl. (4.2) ergibt sich für die Phasendifferenzen δ

$$\delta_1 - \delta_2 = \frac{2\pi\Delta s}{\lambda_1} - \frac{2\pi\Delta s}{\lambda_2} \quad (4.5)$$

$$\Rightarrow \Delta s \cdot (\lambda_2 - \lambda_1) = \lambda_1 \cdot \lambda_2 \approx \lambda^2. \quad (4.6)$$

Für den freien Spektralbereich beim ebenen Fabry-Perot Interferometer erhält man also

$$\begin{aligned} \delta\lambda &= \lambda^2/\Delta s \\ \Rightarrow \delta\nu &= \frac{c}{\Delta s} = \frac{c}{2d\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha}} \end{aligned} \quad (4.7)$$

beziehungsweise bei senkrechtem Einfall

$$\delta\nu = \frac{c}{2nd}. \quad (4.8)$$

Da FPI u.a. zur Spektralanalyse eingesetzt werden, wird ein spektrales Auflösungsvermögen $\nu/\Delta\nu$ definiert, das beschreibt, ob zwei eng benachbarte Linien noch aufgelöst werden können. Es gilt nach [65]

$$\frac{\nu}{\Delta\nu} = F^* \frac{\nu}{\delta\nu} = \frac{\Delta s}{\lambda}. \quad (4.9)$$

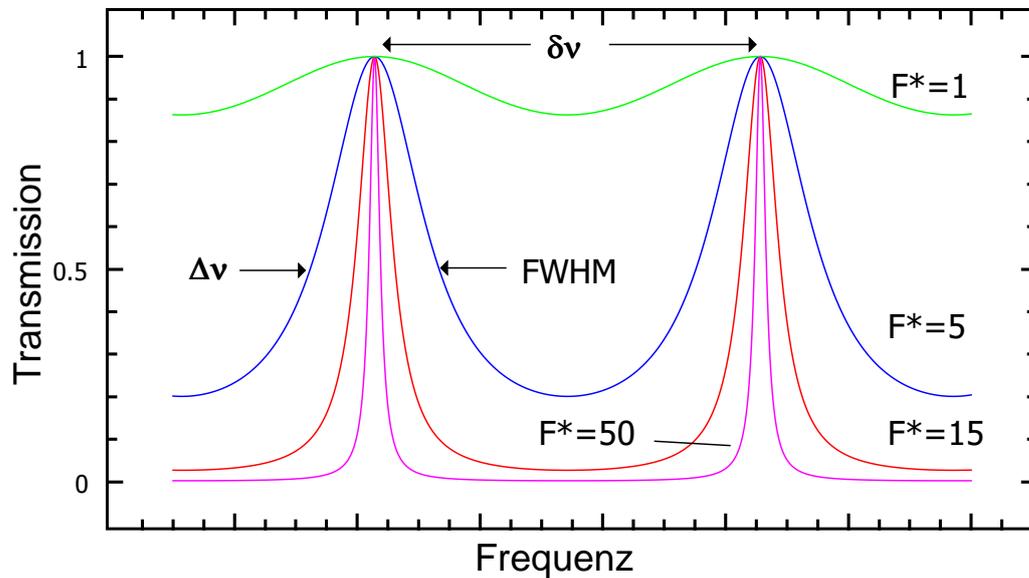


Abbildung 4.2: Transmissionsspektren eines Fabry-Perot Interferometers bei unterschiedlichen Werten der Finesse F^*

Eine weitere Realisierung eines Vielstrahlinterferometers ist das konfokale Interferometer. Es ist aus zwei gegenüberliegenden sphärischen Spiegeln mit dem Krümmungsradius r im Abstand $d = r$ aufgebaut.

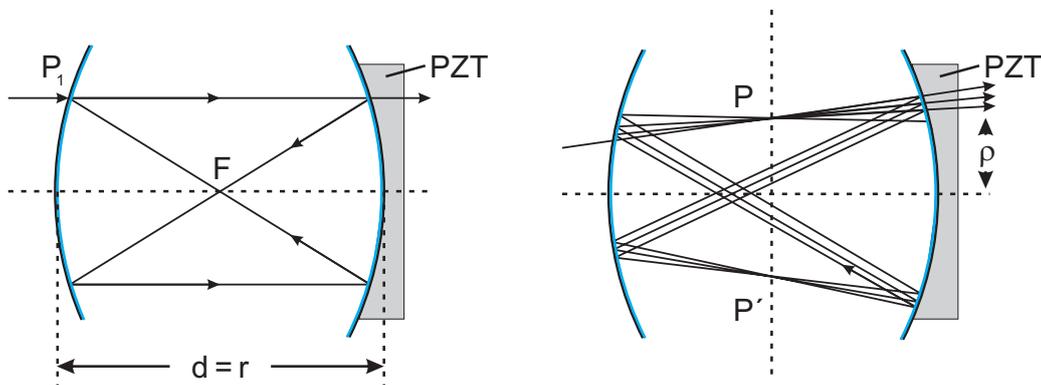


Abbildung 4.3: Konfokales Fabry-Perot Interferometer. Strahlengang für achsenparallele Strahlen ohne Abberation (links) und Strahlengang für geneigte Strahlen mit sphärischer Abberation (rechts). Es entsteht nach vier Durchgängen ein Gangunterschied von $\Delta s = 4r$. Der Piezotranslator (PZT) dient zum Durchstimmen des Interferometers.

Tritt ein Lichtstrahl in ein solches Interferometer, so würde der Strahl nach vier Durchgängen exakt am Eintrittspunkt P_1 enden. Jedoch verläuft der Strahl bei sphärischer Abberation wie in Abb. 4.3 rechts gezeigt so, dass er nicht genau am Eintrittspunkt endet. Die Strahlen schneiden sich in den Punkten P und P'. Für achsennahe Strahlen ($\rho \ll r$) beträgt also der Gangunterschied der Teilstrahlen nach vier Durchgängen $\Delta s = 4r = 4d$. Nach Gl. (4.7) gilt also für den freien Spektralbereich des konfokalen Fabry-Perot Interferometers

$$\delta\nu = \frac{c}{4nd}. \quad (4.10)$$

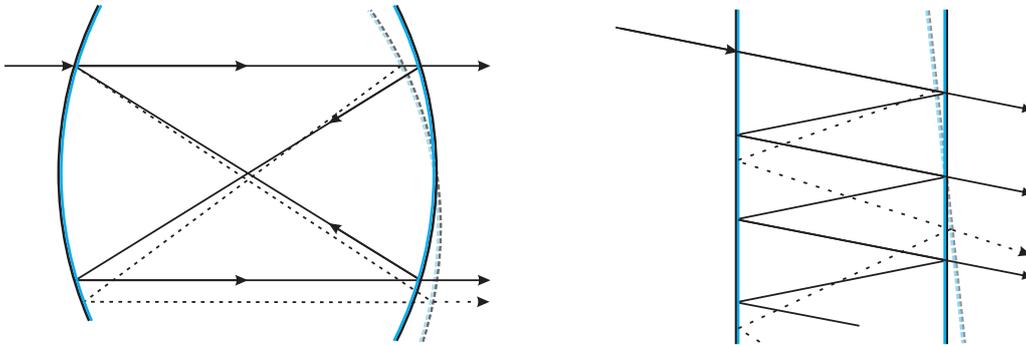


Abbildung 4.4: Auswirkung einer Verkippung auf den Strahlengang im konfokalen (links) und ebenen Fabry-Perot Interferometer (rechts). Die durchgezogenen Linien deuten den Strahlengang von ideal ausgerichteten Interferometern an, die gestrichelten Linien von leicht verkipperten Spiegeln.

Bei den in den folgenden Abschnitten verwendeten Experimenten wird ein konfokales Interferometer (Burleigh CFT-500) mit einem freien Spektralbereich von 150 MHz und einer Finesse von etwa 100 verwendet. Die Finesse ist bei konfokalen Interferometern in der Regel größer als bei ebenen Interferometern. Das liegt vor allem daran, dass Verkippungen eines sphärischen Spiegels kaum Auswirkung auf den Strahlverlauf haben, während eine Neigung eines ebenen Spiegels sehr schnell zu einer Divergenz des Strahls führen kann (vgl. Abb. 4.4). Zusätzlich erleichtert dies erheblich die Justage. Außerdem lassen sich sphärische Spiegel leichter schleifen als ebene und Unregelmäßigkeiten auf der Spiegeloberfläche bewirken nicht wie beim ebenen FPI eine Verwaschung der Interferenzmaxima sondern eine Verzerrung. Zum besseren Überblick sind die wichtigsten Größen in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Zur Durchstimmung des Interferometers wird der Plattenabstand variiert und es entsteht in den folgenden Experimenten ein Transmissionsspektrum wie in Abb. 4.2. Zu diesem Zweck muss einer der beiden Spiegel beweglich sein und durch Druck, Wärme oder Schallwellen bewegt werden, so dass der freie Spektralbereich abgefahren werden kann, um in diesem Bereich die Spektralanalyse durchzuführen. Bei dem hier verwendeten Burleigh Interferometer ist ein Piezo-Translator am Auskoppelspiegel angebracht, der mit einer Sägezahnspannung angesteuert wird, so dass der Spiegel periodisch aus seiner Ausgangsposition in Strahlrichtung ausgelenkt wird.

Tabelle 4.1: Übersicht über die wichtigsten Kenngrößen von Fabry-Perot Interferometern

		planparalleles FPI	konfokales FPI
freier Spektralbereich (FSR)	$\delta\nu$	$\frac{c}{2nd}$	$\frac{c}{4nr}$
Finesse (Reflexionsfinesse)	F^*	$\frac{\delta\nu}{\Delta\nu} = \frac{\pi\sqrt{R}}{1-R}$	$\frac{\pi R}{(1-R)^2}$
spektrales Auflösungsvermögen	$\frac{\nu}{\Delta\nu}$	$\frac{2ndF^*}{\lambda}$	$\frac{4nrF^*}{\lambda}$

4.1.2 Akustooptischer Modulator

Akustooptische Modulatoren [67, 68] werden verwendet, um Intensität, Ausbreitungsrichtung oder Frequenz von Laserstrahlen gezielt zu verändern. Dies geschieht in der Praxis durch die Beugung des eingestrahnten Lichtes an einem periodischen Brechungsindexgitter in einem transparenten Kristall (z.B. Quarzglas). Dieses Brechungsindexgitter kann durch mechanische Spannungen, beispielsweise durch Schallwellen im Material induziert werden, die wiederum von einem Piezoelement erzeugt werden (vgl. Abb. 4.5). Daran wird der Laserstrahl analog zur Bragg-Reflexion von Röntgenstrahlen an den Gitterebenen eines Kristalls am variierenden Brechungsindex gebeugt. Somit entstehen unter diskreten Winkeln zwischen einfallendem Laserstrahl und Ausbreitungsrichtung Θ_B unterschiedliche Beugungsordnungen konstruktiver Interferenz gemäß der Bragg-Bedingung

$$\sin \Theta_B = \frac{\lambda}{2\Lambda} \quad (4.11)$$

mit der Wellenlänge der Schallwelle, bzw. der Periode des Gitters Λ , sowie λ der Lichtwellenlänge. Drückt man die Bragg-Bedingung mit den Wellenvektoren \mathbf{k} (einfallende Lichtwelle), \mathbf{k}' (gebeugte Welle) und Gittervektor \mathbf{k}_G aus

$$\mathbf{k}' = \mathbf{k} \pm \mathbf{k}_G, \quad (4.12)$$

bzw. mit Hilfe des Photonenimpulses $p = hk = h\omega/c$, so lautet sie im vorliegenden Fall:

$$\omega' = \omega \pm \Omega_G. \quad (4.13)$$

Diese Dopplerverschiebung der einfallenden Strahlung um den Wert der Trägerfrequenz wird in der hier vorliegenden Arbeit erstmals genutzt (vgl. 4.1.2), um eine Referenzlinie im frequenz aufgelösten Spektrum zu erzeugen, die einen festen Frequenzabstand zum Maximum des depolarisierten Signals aufweist.

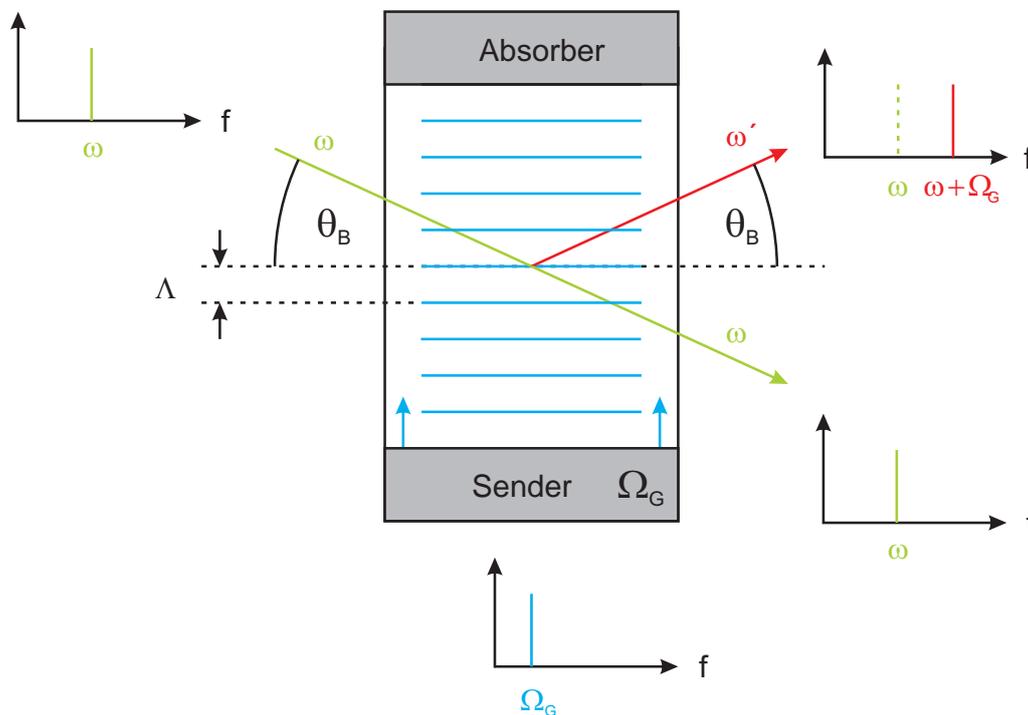


Abbildung 4.5: Prinzipielle Funktionsweise eines akustooptischen Modulators im Amplitudenmodulationsmodus. In einem transparenten Kristall wird mit Hilfe eines periodisch schwingenden Piezoelements der Frequenz Ω_G ein Brechungsindexgitter induziert. Die einfallende Welle mit der Frequenz ω wird an diesem Gitter gemäß der Bragg-Bedingung unter dem Winkel Θ_B mit der Frequenz $\omega' = \omega + \Omega_G$ gebeugt.

4.1.3 Polarisation

Nach den Fresnelschen Formeln ändert sich die Polarisation einer linear polarisierten Lichtwelle beim schrägen Aufprall auf eine Grenzfläche, so dass im reflektierten und gebrochenen Strahl eine Drehung der Polarisationsebene auftritt. Das bedeutet insbesondere, dass optische Bauteile mit sphärischer Oberfläche (Linsen und Spiegel des FPI) selbst bei achsennahem Durchgang nicht vollkommen polarisationserhaltend sind. Aus diesem Grund muss das letzte optische Bauteil im Anregungspfad und das erste optische Bauteil im Detektionspfad jeweils der Polarisator sein, da es sonst zu einer Mischung der Polarisation führen würde und Polarisationsfilter mit hohem Extinktionskoeffizienten nutzlos wären.

4.1.4 Versuchsanordnungen

In diesem Abschnitt werden die im Verlauf dieser Arbeit entwickelten Methoden zur präzisen Messung von frequenz aufgelösten depolarisierten Streuspektren vorgestellt. Das zentrale Problem ist dabei, das depolarisierte Signal, welches um sechs Größenordnungen schwächer als der polarisierte Lichtanteil gestreut wird, zu detektieren und zu einem verwertbaren Signal zu formen. Letzteres geschieht durch eine Akkumulation von mehreren tausend Einzelspektren. Dazu wurden drei unterschiedliche Versuchsaufbauten entwickelt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Shutter-Methode

Eimer et al. [13, 25, 63] verwendeten einen Aufbau, der im Rahmen dieser Arbeit zunächst nachempfunden wurde. Im Unterschied zu der hier entwickelten Methode verwendete Eimer Interferometer mit planparallelen Spiegeln und kleinere konfokal-Interferometer. Die höhere Transmission und die deutlich größeren freien Spektralbereiche (FSR) von 750 MHz bzw. 1.5 GHz erlaubten einen Aufbau mit zwei Shuttern, wie in Abb. 4.6 gezeigt. Der Spiegelabstand limitiert die obere Auflösungsgrenze der Diffusionszeit auf max. 10 ns. In dem hier beschriebenen Aufbau kommt jedoch ein konfokales Interferometer (modifiziertes Burleigh CFT-500¹) mit einem Spektralbereich von 150 MHz zum Einsatz. Der Spiegelabstand beträgt nach Gl. 4.10 also 50 cm. Durch diesen großen Spiegelabstand ist das Interferometer deutlich anfälliger für Vibrationen als Geräte mit kleinerem FSR.

¹die notwendige Modifizierung wird im nächsten Abschnitt näher beschrieben

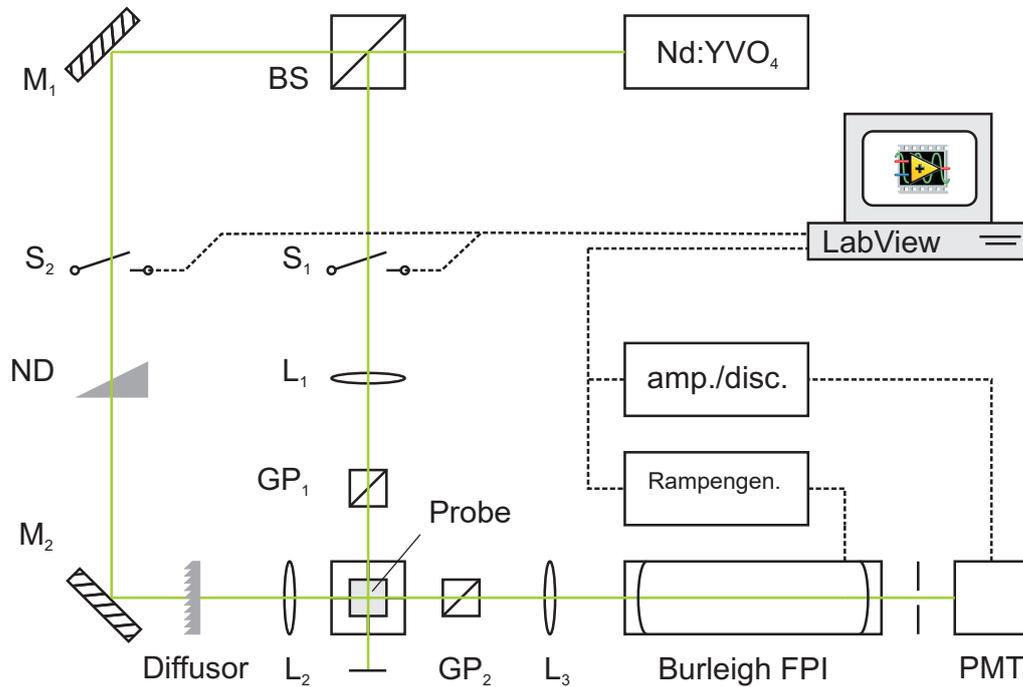


Abbildung 4.6: Schematischer Aufbau nach Eimer et al.: Die Spiegel des FPI bewegen sich langsam (ca. 10s pro Spektrum). In dieser Zeit wird zwischen Instrumentenspektrum und depolarisiertem Spektrum mit Hilfe der Shutter gewechselt

Nd:YVO₄: Festkörperlaser mit sehr schmaler Linie bei 532 nm, linear vertikal polarisiert

BS: Strahlteilerwürfel mit ca. 95% Transmission in Durchlassrichtung

M: Spiegel

S: mit LabView Routine ansteuerbare Shutter

ND: Graufilter zur Anpassung der Lichtmenge in Probendurchlassrichtung

Diffusor: Milchglas zur Zerstreuung des Lichtes in Durchlassrichtung

L: Linse

GP: Glan-Polarisator

PMT: Photomultiplier

ramp. gen.: Rampengenerator zur Interferometeransteuerung

amp./disc.: Verstärker/Diskriminator-Einheit zur Verbesserung des SNR durch Unterdrückung von Signalen des PMT, die nicht aus der Probe stammen

Burleigh FPI: konfokales Burleigh Interferometer

Wegen der geringen Intensität des depolarisierten Streulichts ist ein Laser mit hoher Leistung erforderlich. Als Lichtquelle dient daher ein Coherent Verdi V5 Festkörperlaser mit einer maximalen Leistung von 5.5 W c.w. bei einer Wellenlänge von 532 nm. Um Relaxationsraten in dem Bereich von 100 ns mit dieser Methode auflösen zu können, muss die Linienbreite (HWHM) des Lasers möglichst gering sein. Das Datenblatt [57] gibt eine Linienbreite < 2.5 MHz an. Mit Hilfe des verwendeten konfokalen Interferometers wurde eine Linienbreite von 1.8 MHz bestimmt. Abb. 4.6 zeigt den bekannten Aufbau: Das Licht des Nd:YVO₄ Lasers wird vom Strahlteiler (BS) in Haupt- und Nebenstrahl aufgeteilt, wobei mehr als 95 % der Intensität auf den Hauptstrahl fallen. Durch die beiden Shutter S₁ und S₂ (Thorlabs SH05/SC10), die durch eine Labview Routine angesteuert werden, kann ausgewählt werden, ob die Probe von Hauptstrahl oder Nebenstrahl bestrahlt wird. Die Linsen L₁ bzw. L₂ fokussieren das Licht auf das Probenvolumen. Ein Glan-Polarisator (B.Halle Nachfl. GmbH, Berlin) unterdrückt den Rest der linear horizontalen Komponente des nativ leicht linear vertikal polarisierten Laserlichts um sechs Größenordnungen. Das Licht des Nebenstrahls passiert zunächst einen Graufilter (ND), da der Photomultiplier (PMT) nur einen begrenzten Dynamikumfang hat, und der Nebenstrahl, sowie das sehr schwache depolarisierte Messsignal detektieren soll. Bevor das Licht des Nebenstrahls auf die Probe trifft, wird es an einem Milchglas (diffusor) diffus gestreut, um als Referenzsignal mit unendlich langsamer Diffusion zur späteren Entfaltung als Apparatefunktion zu dienen. Nach dem Streuprozess wird unter 90° mit Hilfe des zweiten Polarisators GP₂ die linear horizontale Komponente, der *depolarisierte* Anteil des Streulichts selektiert, der auf die Rotation optisch anisotroper Moleküle in der Probe zurückzuführen ist. Je nach Shutterstellung bündelt L₃ das depolarisierte Licht oder den Nebenstrahl in das Zentrum des konfokalen Fabry-Perot Interferometers (cFPI), in dem, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, das Licht spektral analysiert wird. Der Photomultiplier detektiert schließlich die Apparatefunktion bzw. das verbreiterte depolarisierte Spektrum der Probe. Das Messsignal und die beiden Shutter sind mit einem Multifunction DAQ (Data Acquisition, National Instruments BNC 2110) verbunden und können in der LabView Entwicklungsumgebung ausgelesen, bzw. angesprochen werden.

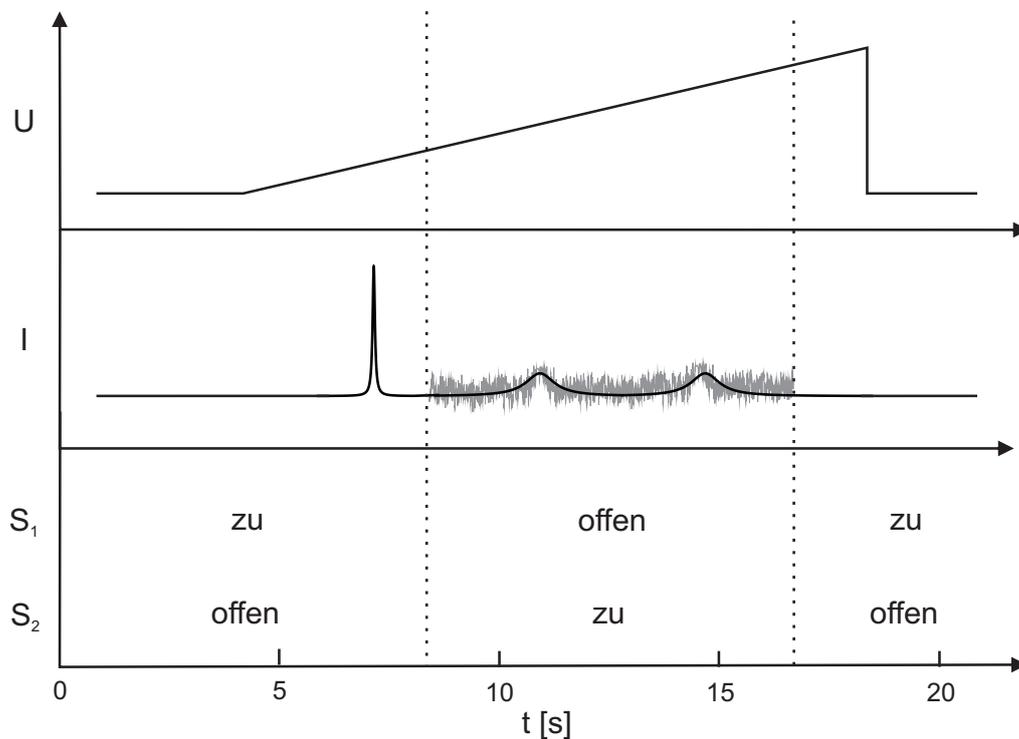


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung einer Einzelmessung mit der Shutter-Methode um die Apparatfunktion als Referenz zu verwenden: Sägezahnspannung des Rampengenerators (oben), Signal am Detektor (Mitte) und Stellung der Shutter S_1 und S_2 (unten)

Um das SNR des schwachen Signals aufzubereiten muss das depolarisierte Spektrum wiederholt aufgenommen werden. Je nach Streuvermögen der Probe sind hunderte, bzw. tausende Akkumulationen notwendig. Wegen der schwachen Intensität einer Einzelmessung (angedeutet in Abb. 4.7 mitte) wird die Apparatfunktion verwendet um die einzelnen Spektren auszurichten. Dazu wird der Rampengenerator (Burleigh RC-44) für die Piezo-Translatoren des FPI zunächst so eingestellt, dass bei geöffnetem Shutter S_2 (Nebenstrahl) genau drei Linien (=konstruktive Interferenzbedingung) während eines Durchlaufs entstehen. Die Labview Software erkennt mittels des integrierten VI's peak detector das Maximum der Apparatfunktion, schließt S_2 und öffnet S_1 . Dadurch detektiert der Photomultiplier das schwache depolarisierte Signal. Nach einer festen Zeit nach der Detektion der Apparatfunktion werden die Öffnungszustände der Shutter wieder invertiert.

Aufbau mit AOM

Um die Auswirkungen von Temperaturschwankungen, Frequenzdrifts des Lasers und langsamen Schwingungen des Tisches bzw. Gebäudes zu minimieren, muss zunächst die Rampendauer von 10 s auf 20 ms reduziert werden. Bei einer derart hohen Shutter-Öffnungs/Schließungsfrequenz übertragen sich jedoch zu starke Vibrationen auf das Interferometer, so dass ein Aufbau ohne Shutter notwendig ist. Durch das Fehlen der Shutter geht allerdings die Information über die Lage des Messsignals im kontinuierlichen Spektrum verloren, so dass ein korrektes Addieren nicht möglich ist. Um das zentrale Problem inkonsistenter Akkumulationen zu lösen, wird der Aufbau und die Datenerfassungsmethode unter Verwendung eines AOM (Pegasus AOM MT80) wie in Abb. 4.8 modifiziert. An Stelle des Shutters S_2 im Nebenstrahl wird ein solcher AOM im Amplitudenmodulationsverfahren mit einer Trägerfrequenz von 80 MHz integriert. Der Strahlengang wird so justiert, dass das gebeugte Licht +1. Ordnung ungehindert eine Iris passieren kann und der ungebeugte Strahl ausgeblendet wird.

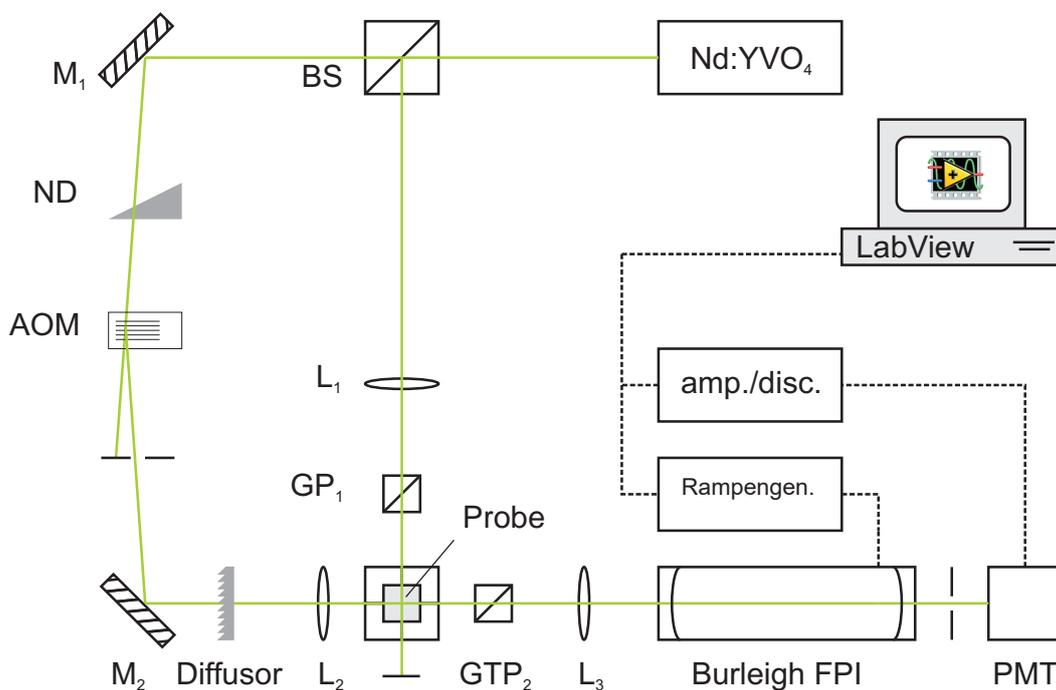


Abbildung 4.8: Aufbau mit Akusto-Optischem Modulator (AOM): Das frequenzverschobene Licht in Durchlassrichtung wird zusammen mit dem Streulicht spektral analysiert.

GTP: Glan-Thomson Polarisator

AOM: Akusto-optischer Modulator

Der Rampengenerator wird so eingestellt, dass bei einem Rampendurchlauf gerade zwei Apparatfunktionen im Spektrum entstehen. Durch die hohe Rampengeschwindigkeit ist außerdem eine nichtlineare Korrektur (Burleigh FP Stabilization System DAS-10) der Ausgangsspannung des RC-44 notwendig. Durch den Wegfall der beiden Shutter gelangt nun das depolarisierte Streulicht und der Nebenstrahl *gleichzeitig* aber *frequenzverschoben* um 80 MHz durch das Interferometer, wie in Abb. 4.9 schematisch dargestellt.

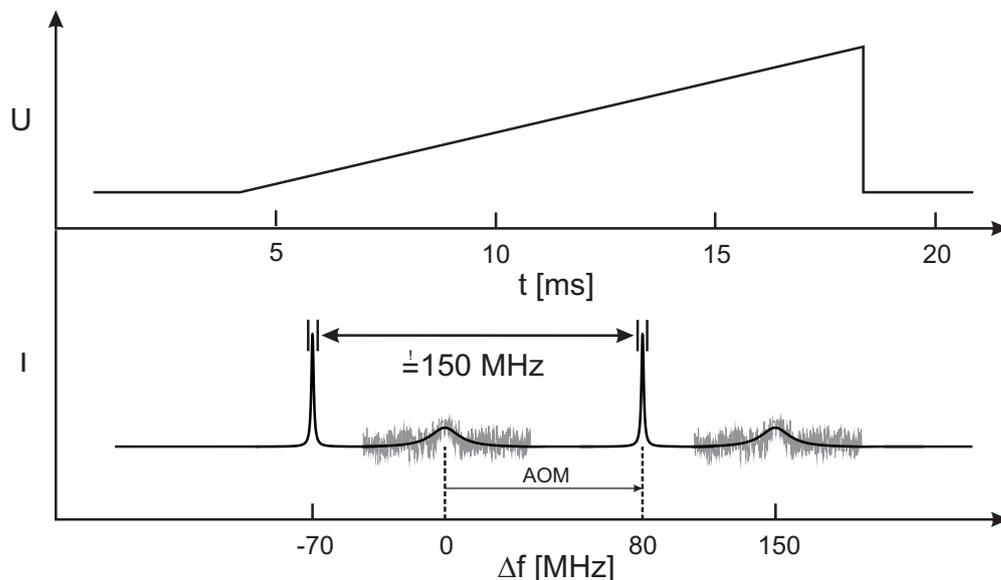


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Messprinzips mit AOM. Nur Einzelspektren mit einer FSR von 150 MHz werden zur Akkumulation verwendet.

Das LabView SubVI `ma_filter.vi` misst den Frequenzabstand dieser beiden Apparatfunktionen. Liegt dieser in einem engen festgelegten Bereich (150.0(3) MHz) sollte durch die akkurate² Frequenzverschiebung das depolarisierte Spektrum mit ausreichender Genauigkeit bekannt und eine korrekte Akkumulation realisierbar sein, indem man das zweite Maximum zur Ausrichtung der Einzelspektren verwendet.

²laut Datenblatt besser als $0.1 \text{ kHz } ^\circ\text{C}^{-1}$

Aufbau mit simultaner Detektion

Durch die beschriebenen Modifikationen ist es möglich, die Messdauer drastisch zu senken. Außerdem werden Auswirkungen langsamer Schwingungen der Apparatur und Frequenzdrifts des Lasers gemindert. Bei den bisher beschriebenen Methoden ist allerdings die Lage des depolarisierten Spektrums dennoch nicht sicher vorherzusagen. Eine Vibration oder eine gestörte Rampenspannung würde zur Verschiebung der Lage des Messsignals und schließlich ebenfalls zu einer künstlichen Verbreiterung der Linie führen.

Eine dadurch resultierende fehlerhafte Akkumulation kann nur vermieden werden, wenn das Maximum des depolarisierten Signals genau bekannt ist. Dies wird durch den Einsatz zweier Detektoren (vgl. Abb. 4.10) realisiert, die *gleichzeitig* das frequenzanalytisierte Licht des Messsignals (PMT₁) und eines Referenzstrahls (PMT₂) detektieren. Abb. 4.12 verdeutlicht, dass die Lage des depolarisierten Spektrums auch bei Vibrationen oder Spannungsschwankungen des Rampengenerators stets exakt bekannt ist.

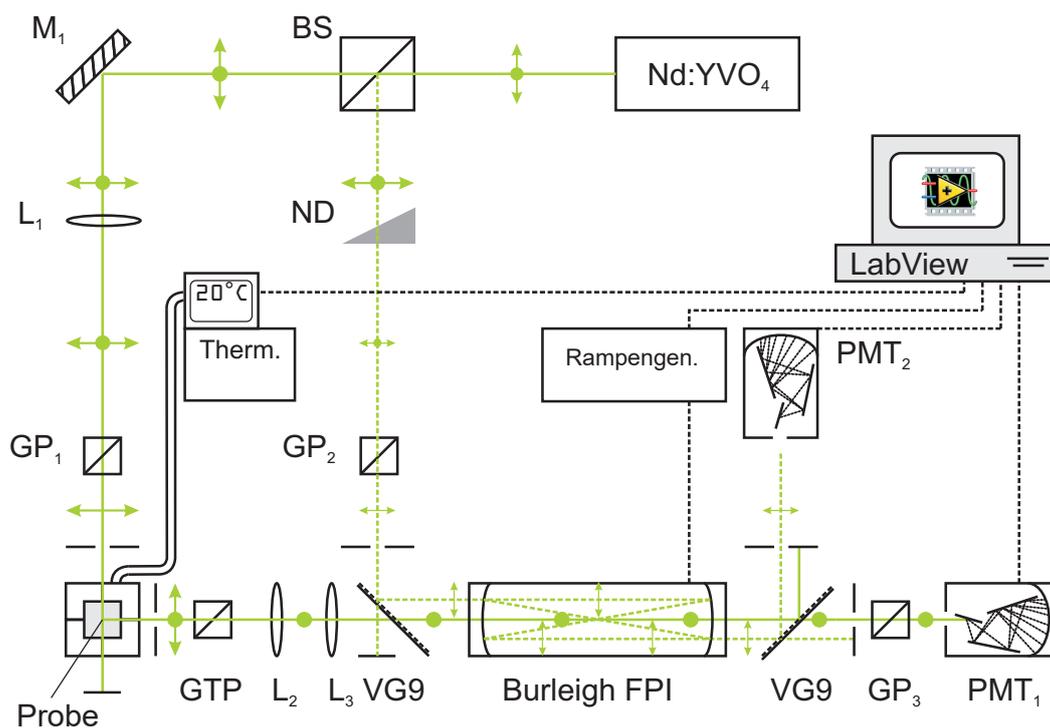


Abbildung 4.10: Aufbau mit simultaner Detektion. Die gestrichelte Linie skizziert den Strahlengang der Referenz, Pfeile und Punkte deuten die jeweilige Polarisation an. Durch den Grünfilter (VG9), gelangen Referenz- und Messstrahl auf unterschiedliche optischen Achsen.

Hierbei ist es von besonderer Bedeutung, das Messsignal so zu isolieren, dass PMT_1 ausschließlich das depolarisierte Streulicht detektiert um unerwünschte Überlagerungen zu vermeiden. Anders als bei den bereits beschriebenen Versionen trifft der Referenzstrahl nicht auf die Probe, sondern wird nach dem Streuprozess eingekoppelt. Um dies zu erreichen, werden die beiden Strahlengänge mit Hilfe eines einfachen Farbfilters³ auf unterschiedlichen optische Achsen justiert, bevor sie das Interferometer passieren. Der Verlauf des Messstrahls entspricht dem des vorhergehenden Aufbaus: Das intensive Licht des Verdi V5 wird mit linear vertikaler Polarisation auf die Probe fokussiert. Ein Glan-Thomson-Polarisator (GTP, B.Halle Nachfl. GmbH, Berlin) mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 10^{-8}$ unterdrückt das polarisierte Streulicht. Mit den Linsen L_2 und L_3 wird das linear horizontal polarisierte Streulicht gesammelt in das Zentrum des konfokalen Interferometers fokussiert. Mit Hilfe eines zweiten Glan Polarisators (GP_2) wird die linear horizontal polarisierte Komponente aus dem Referenzstrahl gefiltert und gelangt kollimiert durch das Interferometer. Somit unterscheiden sich Mess- und Referenzstrahl in Polarisation *und* optischer Achse (vgl. Abb. 4.11). Nach der Frequenzanalyse durch das modifizierte konfokale Interferometer⁴ wird ein zweiter Farbfilter verwendet, um mit PMT_2 die Referenzlinie zu erfassen. Zur bestmöglichen Isolation der beiden Strahlengänge blockiert GP_3 linear vertikal polarisiertes Licht, um ungewünschte Beugungen und Reflexionen des Referenzstrahles zusätzlich abzuschwächen, so dass schließlich PMT_1 das schwache verbreiterte Spektrum zeitgleich mit dem Referenzstrahl an PMT_2 erfasst.

³Schott VG9, unterdrückt außerdem störende Fluoreszenz der Proben

⁴Ein- und Austrittsfenster wurden entfernt, da diese störende Reflexionen verursachen. Außerdem wurde das Gehäuse zur einfacheren Justage der beiden Strahlengänge entfernt

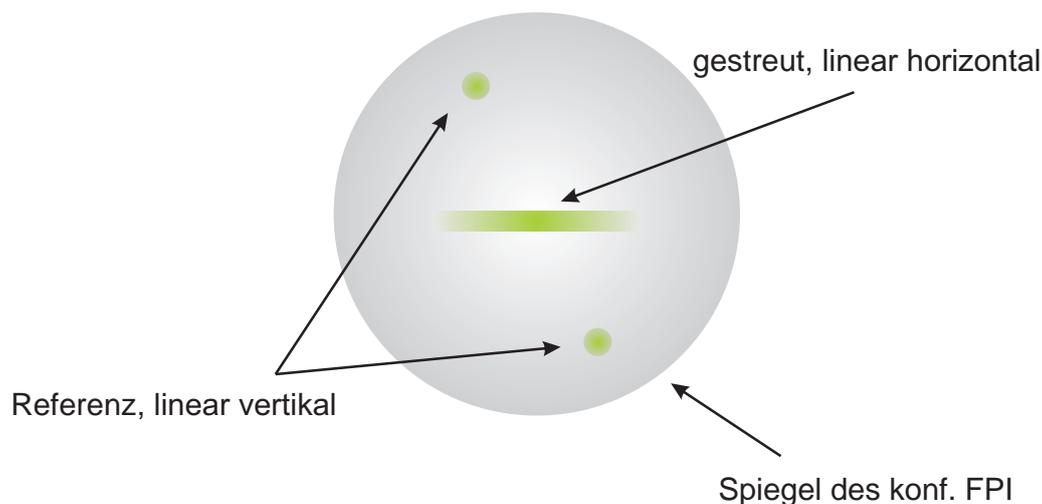


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des Auskoppelspiegels des FPI. Die beiden Punkte repräsentieren den Referenzstrahl, das breitere Profil entspricht dem Messsignal. Es bildet den Verlauf des Laserstrahls durch die Probe ab. Entscheidend ist die räumliche Trennung, da die Polarisation durch Vielfachreflexion an den sphärischen Spiegeln nicht exakt erhalten bleibt.

Da für beide Signale unterschiedliche Detektoren verwendet werden, kann auch deren Versorgungsspannung getrennt geregelt werden. Dies hat den Vorteil, dass nach einem Probenwechsel die Empfindlichkeit von PMT_1 an das Streuvermögen der Probe angepasst werden kann, ohne dass dies einen Einfluss auf die Datenverarbeitung (z.B. peak detector) hat. Zur Probentemperierung steht ein Thermo-Haake DC30 Thermostat zur Verfügung, der mit dem Probenhalter aus Kupfer (Anfertigung der Mechanikwerkstatt Universität Bayreuth) verbunden ist. Dazu wurde eine Steuersoftware in LabView entwickelt (`t_control.vi`). Mit Hilfe des LabView Programms `messapp.vi` werden die Messsignale weiterverarbeitet und aufbereitet. Die verwendeten Programme werden in Abschnitt 5 erklärt.

Eine einfache Trennung der beiden Strahlengänge durch unterschiedliche Polarisation ist wegen der gekrümmten optischen Bauteile (sphärische Spiegel des Interferometers) nicht möglich, da diese nicht polarisationserhaltend sind (vgl. 4.1.3). Dies würde zu einer Mischung von Mess- und Referenzstrahl führen.

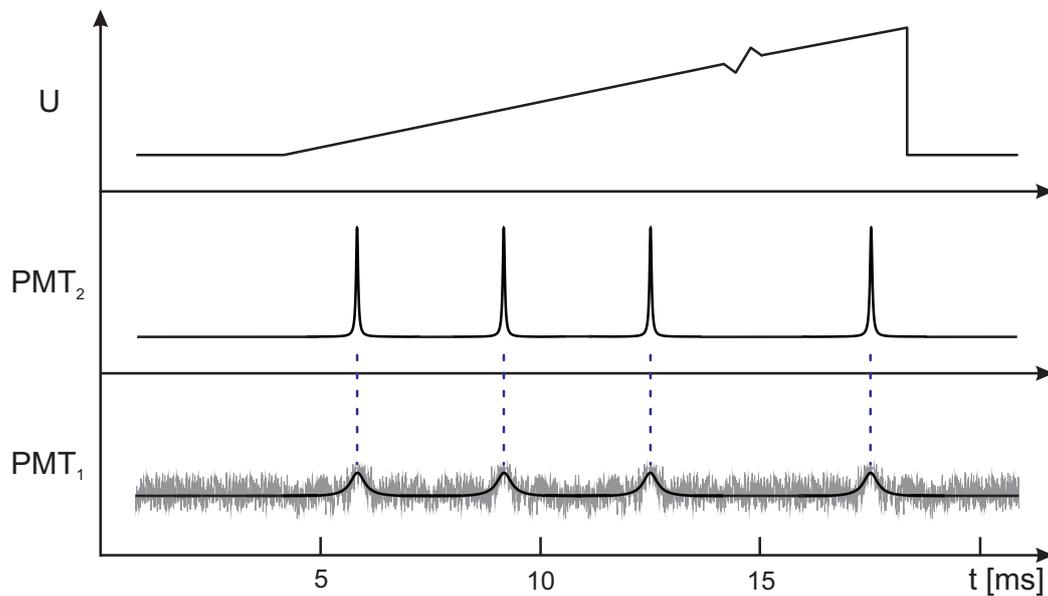


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Messmethode mit simultaner Detektion: Auch bei Vibrationen kann das depolarisierte Spektrum (PMT_1) durch gleichzeitiges Erfassen des Referenzstrahls (PMT_2) exakt ermittelt werden.

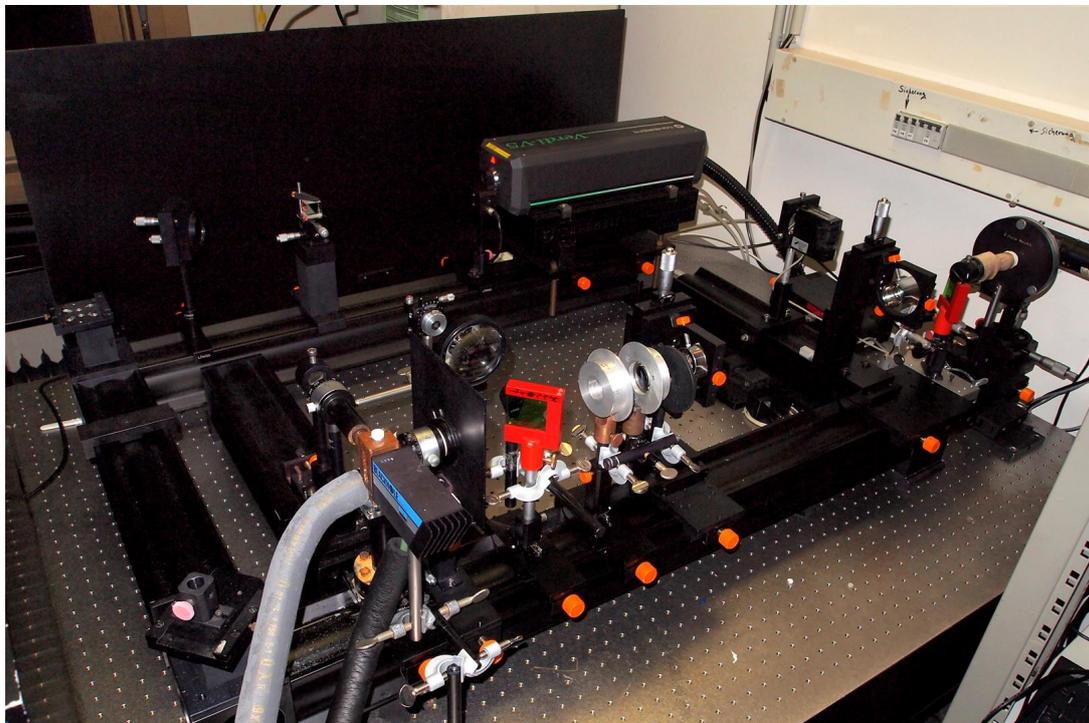


Abbildung 4.13: Aufbau der Lichtstreuanlage mit zwei Detektoren.

4.2 Photonenkorrelationspektroskopie

Die Messungen des polarisierten Streulichtes mittels Photonenkorrelationspektroskopie wurden an einer ALV-5000/EPP Lichtstreuanlage durchgeführt. Durch eine Modifikation kann entweder ein HeNe-Gaslaser mit einer Lichtleistung von max. 35 mW bei 632.8 nm oder ein Nd:YVO₄-Festkörperlaser mit einer maximalen Lichtleistung von 2.2 W bei 532 nm als Strahlungsquelle verwendet werden (vgl. Abb. 4.14). Zur stufenlosen Regulierung dient ein variabler Graukeil im Strahlengang. Das Licht des jeweils ausgewählten Strahls wird mit einer langbrennweitigen Linse durch einen Polarisator auf das Probenvolumen fokussiert. Das Streulicht wird durch den beweglichen Goniometerarm winkelabhängig mittels Photomultipliereinheit detektiert und an den Photonenzähler weitergegeben. Der Korrelator verarbeitet die Zählrate und erzeugt die Autokorrelationsfunktion, die durch die Software grafisch dargestellt wird.

Zur Bestimmung hydrodynamischer Größen ist eine genaue Temperaturangabe der Probe nötig. Zur Einstellung der Temperatur wird das Goniometer von der Flüssigkeit eines Thermostaten durchspült. Die Probe im Goniometer befindet sich allerdings in einem mit Toluol gefüllten Gefäß aus Quarzglas. Das Toluolbad dient zum Einen als Puffer zum Abfangen von Temperaturschwankungen und zum Anderen zur Anpassung des Brechungsindex, um die Anzahl brechungsbehafteten Oberflächen zu minimieren⁵. Die Temperatur des Toluolbades wird mit einem Widerstandsthermometer kontrolliert und mit in die Messdaten aufgenommen.

⁵Quarzglas und Toluol haben sehr ähnliche Brechzahlen ca. 1.46 (Quarzglas) und 1.49 (Toluol)

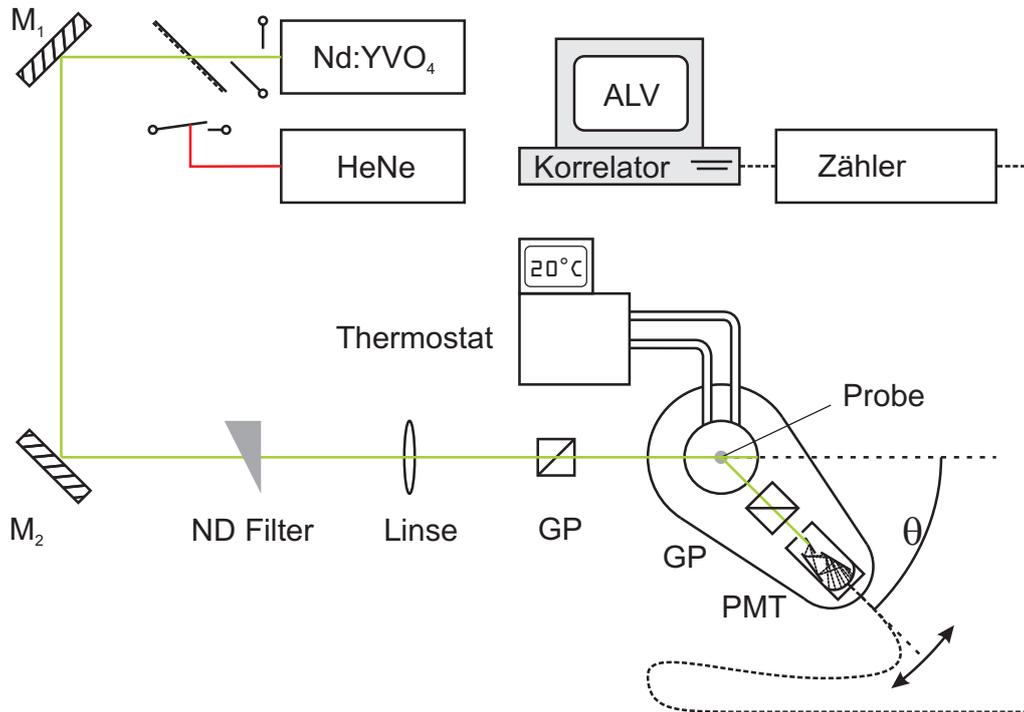


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung des Photonenkorrelationspektrometers. Der Detektor kann auf einer Kreisbahn um die Probe bewegt werden. Die Photonen des Streulichts werden gezählt und mit der Korrelatorkarte und der ALV-Software im PC ausgewertet.

4.3 Probenvorbereitung

Die verwendeten Proben Guanosinmonophosphat (5'-GMP), Adenosinmonophosphat (5'-AMP), Cytosinmonophosphat (5'-CMP) und tRNA (aus Hefe) wurden von der Firma Sigma/Aldrich bezogen. Den Datenblättern zu Folge weisen die Natriumsalze der Nucleotide eine Reinheit von über 99% auf. Für die depolarisierten Lichtstreuexperimente werden Fluoreszenzküvetten und für die Photonenkorrelationspektroskopie zylindrische Küvetten aus Quarzglas verwendet. Die Küvetten werden mehrfach mit Aceton gespült. Speziell bei der PCS⁶ können Staub oder Luftbläschen die Messung stark verfälschen. Daher werden alle Proben mit Reinwasser aus einer Aufbereitungsanlage⁷ und Spritzenvor-

⁶in die Software für die DDLS wurde ein "dustfilter" integriert, so dass diese Methode weniger anfällig für Staub und Luftbläschen ist

⁷Fa. Merck Millipore

satzfiltern mit einer Porengröße von 0.1 μm angesetzt. Die verwendeten Konzentrationen werden durch Einwaage der Feststoffe angesetzt.

Tabelle 4.2: Übersicht über die verwendeten Proben

Probe	Temperaturbereich [°C]	Konzentrationsbereich	Methoden
5'-AMP	2 – 48	2.88 M	DDLS (simultan)
5'-GMP	5 – 25	2.2 M – 5.5 M	DDLS (simultan) DDLS (AOM, Shutter)
5'-AMP / 5'-CMP	5 – 48	1.5 M – 4.1 M	DDLS (simultan) PCS, Viskosimetrie
5'-AMP / 5'-UMP	3 – 55	2.1 M – 3.1 M	DDLS (simultan)
tRNA (Baker's yeast)	3 – 55	80 mg/ml	DDLS (simultan)

5 Software Entwicklung

Die großen Datenmengen und die Geschwindigkeit, mit der Messdaten aufgezeichnet und weiterverarbeitet werden müssen stellt eine besondere Herausforderung dar. LabVIEW stellt mit seiner Entwicklungsumgebung die Schnittstelle zwischen dem Experimentator und dem Messsystem her. Im folgenden Abschnitt werden die für die Signalerfassung, und Weiterverarbeitung notwendigen Programme näher erläutert.

5.1 LabVIEW und NI-DAQmx

LabVIEW (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench) [69] ist eine Programmierumgebung zur Erstellung von Funktionsblöcken (VI's, Virtuelle Instrumente), die zur grafischen Programmierung nach dem Datenflussprinzip (vgl. Abb. 5.1) verknüpft werden können. Eine umfangreiche Funktionsbibliothek zur Ein- und Ausgabe sowie Signalverarbeitung ermöglicht die Realisierung komplexer Steuer- und Regelstrukturen.

Anders als in anderen Programmiersprachen müssen Variablen nicht deklariert werden, und die Verwendung und Umwandlung von Datentypen ist unkompliziert. Mit Hilfe von sog. subVI's (Unterprogramme mit Ein- und Ausgabeanschlüssen) können beliebig komplexe Programme modular und übersichtlich erstellt werden.

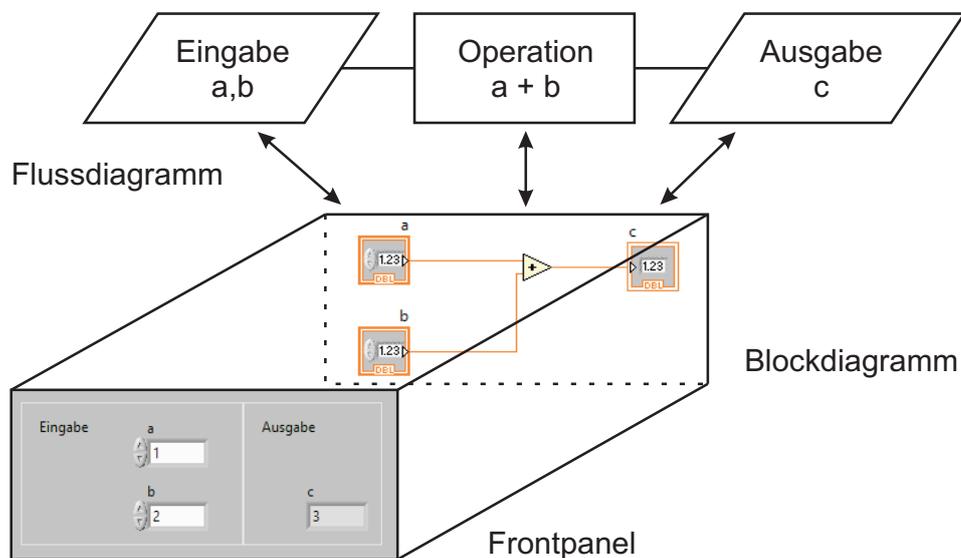


Abbildung 5.1: Prinzip der Datenflussprogrammierung. Die grafische Programmierung im Blockdiagramm orientiert sich eng am Flussdiagramm. Für den Nutzer relevante Ein-/Ausgabe Symbole werden mit dem Frontpanel verknüpft.

Die Kommunikation mit Endgeräten wird durch unterschiedliche Schnittstellen wie z.B. RS232, USB, Soundkarte und PCI-Steckkarten realisiert. Zur Steuerung und Signalerfassung der hier beschriebenen Lichtstreuapparatur wird ein National Instruments DAQ-mx 2110 verwendet. Es handelt sich um einen geschirmten Anschlussblock mit 15 BNC Anschlüssen, die mit analogen Ein- und Ausgängen, Trigger und Zählerfunktionen belegt werden können. Er ist verbunden mit einer PCI-Schnittstellenkarte des Messrechners, für die Ansteuerungs- und Ausleseroutinen für LabVIEW als VI mitgeliefert werden.

5.2 Programme

Im folgenden Abschnitt wird eine prinzipielle Funktionsbeschreibung der im Laufe der Arbeit entwickelten (Unter-)Programme skizziert und ein Überblick über deren Funktionsumfang gegeben. Es wird dabei ausschließlich auf die Routinen eingegangen, die für den Aufbau mit simultaner Detektion (vgl. 4.1.4) verwendet wurden. Dabei handelt es sich zum Einen um die Portierung des Entfaltungsalgorithmus [48] und zum Anderen um die eigentliche Messsoftware mit den entsprechenden Unterprogrammen.

Graphische Benutzeroberfläche

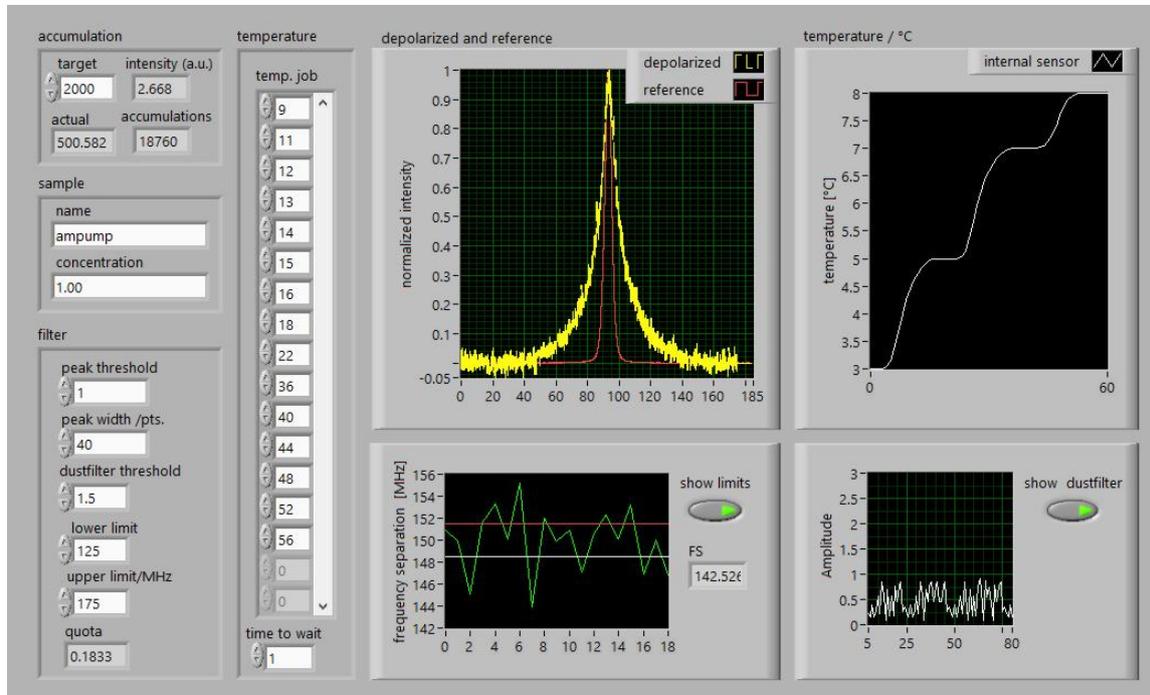


Abbildung 5.2: Frontpanel des Hauptprogrammes `batch.vi`. Der Benutzer hat Zugriff auf die wichtigsten Parameter von Akkumulation, Temperatur und Filtermechanismus.

In der linken Hälfte des Frontpanels befinden sich diverse Einstellungsmöglichkeiten des VI's, mit denen der Benutzer den Messverlauf an die Anforderungen des Experiments anpassen kann.

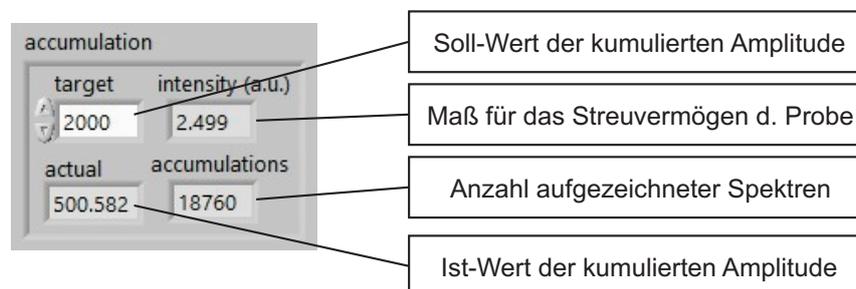


Abbildung 5.3: Eingabemaske "accumulation": Notwendige Eingabe ist "target". Als Richtwert gilt 2000.

Im Abschnitt “accumulation“ wird unter “target“ der gewünschte kumulierte Pegel¹ eingestellt. Das Programm zeichnet so lange Daten auf, bis der eingetragene Wert erreicht wird. Im Verlauf der Messungen hat sich ein Wert von 2000 als guter Kompromiss zwischen Messdauer und Signalqualität erwiesen. Je nach Streuvermögen der Probe variiert die Anzahl der dazu nötigen Akkumulationen deutlich (um bis zu drei Größenordnungen). Das Anzeigeelement “intensity a.u.“ spiegelt das Streuvermögen der Probe wieder und ist proportional zum Verhältnis aus “actual“ und “accumulations“ .

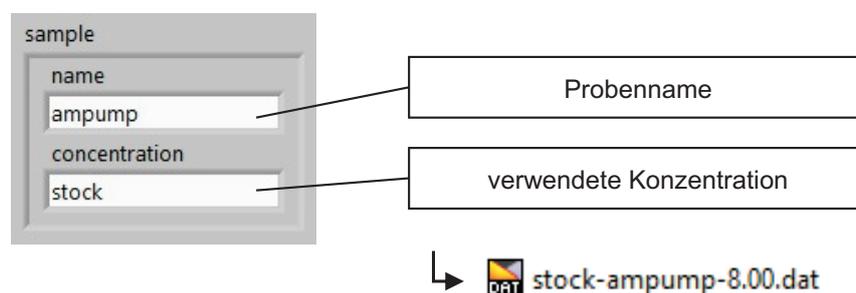


Abbildung 5.4: Eingabemaske “sample“: Der Dateiname setzt sich aus Probenname, Konzentration und aktueller Temperatur zusammen.

Unter “sample“ kann Probenname und Konzentration eingetragen werden. Aus diesen Angaben und der eingestellten Temperatur setzt sich der Dateiname nach folgendem Muster zusammen: **Konzentration-Probenname-Temperatur.dat**. Bei den Rohdaten handelt es sich um Tabulator getrennte ASCII-Dateien des depolarisierten Streuspektrums. Der Messbereich wird auf ± 87.3 MHz in 1204 Schritten um das Maximum beschränkt, was einer Schrittweite von 0.143 MHz entspricht.

¹entspricht der Summe der einzelnen Pegel, die proportional zum PMT-Signal sind.

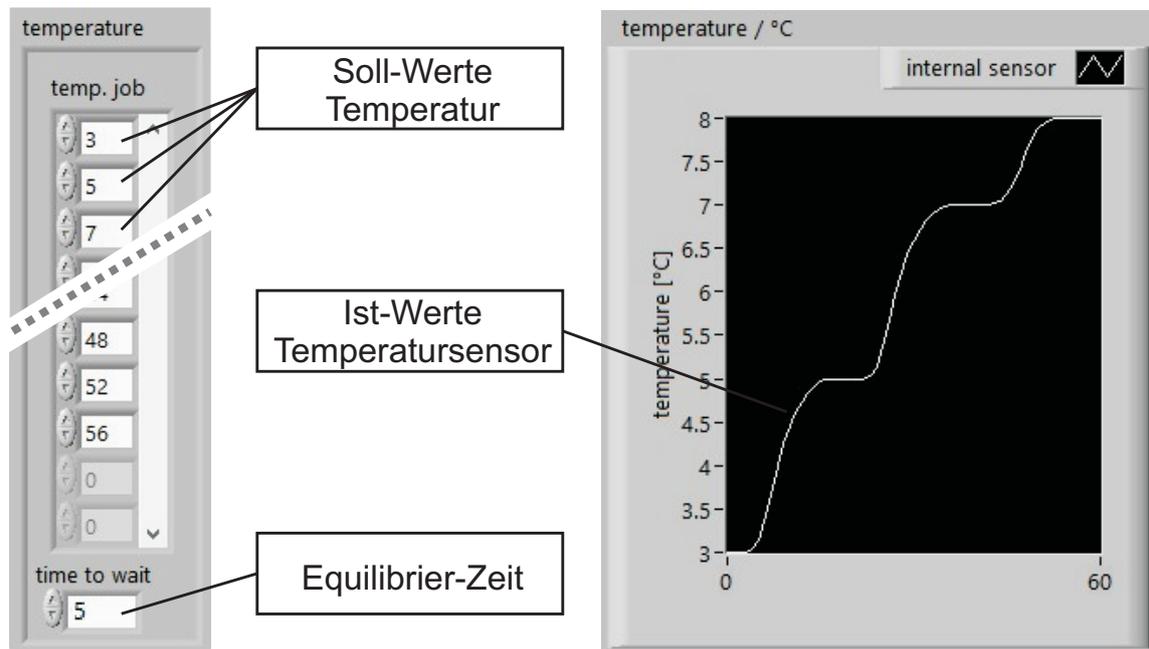


Abbildung 5.5: Eingabemaske “temperature“: Der Benutzer erstellt einen Temperaturablaufplan und gibt die Zeit zum Equilibrieren an.

Für eine temperaturabhängige Messung können die abzuarbeitenden Temperaturen in die Liste “temp. job“ eingetragen werden. Unter “time to wait“ wählt der Benutzer die Zeit zum Equilibrieren jedes Temperaturschrittes in Minuten. Im Abschnitt “filter“ werden Kriterien zum Aussortieren von unbrauchbaren Spektren festgelegt. “peak threshold“ und “peak width“ gehören zum subVI `peak detector.vi` und geben an, wie die Referenzlinien beschaffen sein sollen, dass sie als solche identifiziert werden. “lower limit“ und “upper limit“ sind obere und untere Grenze des akzeptierbaren freien Spektralbereichs (vgl. Abb. 5.6 wobei “quota“ dabei den Anteil an verwertbaren Spektren anzeigt (Verhältnis der Anzahl an Iterationen und “accumulations“). Mit dem Regler “dustfilter threshold“ kann der Schwellwert eingestellt werden, der Spektren mit unverhältnismäßig hohen Spannungsspitzen ausblendet, die durch Staub oder Luftbläschen in der Probe verursacht werden.

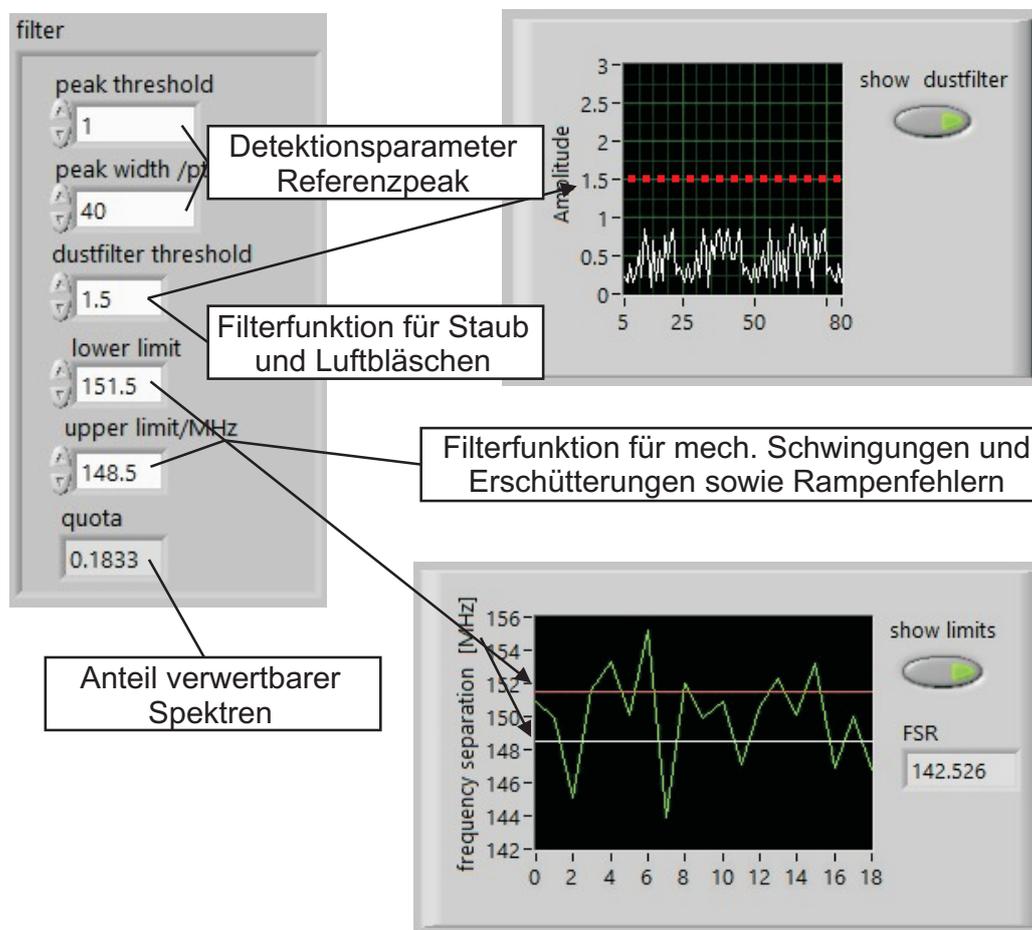


Abbildung 5.6: Eingabemaske “filter“: Standardwerte für “peak threshold“: 1, für “peak width“: 40. Diese Werte sollten nur verändert werden, wenn sich die Güte des Referenzstrahls ändert. Die Werte für “dustfilter threshold“ und “lower/upper limit“ müssen an das Streuvermögen der Probe angepasst werden.

In der Mitte des GUI’s kann der Benutzer den Messverlauf kontrollieren. Zu diesem Zweck werden die akkumulierten Kurven von depolarisiertem und Referenzstrahl sowie Temperaturverlauf (interner Sensor des Haake DC30) angezeigt. Die Tasten “show limits“ und “show dustfilter“ aktivieren zwei Graphen, die dazu dienen, geeignete Werte für den Filter zu ermitteln.

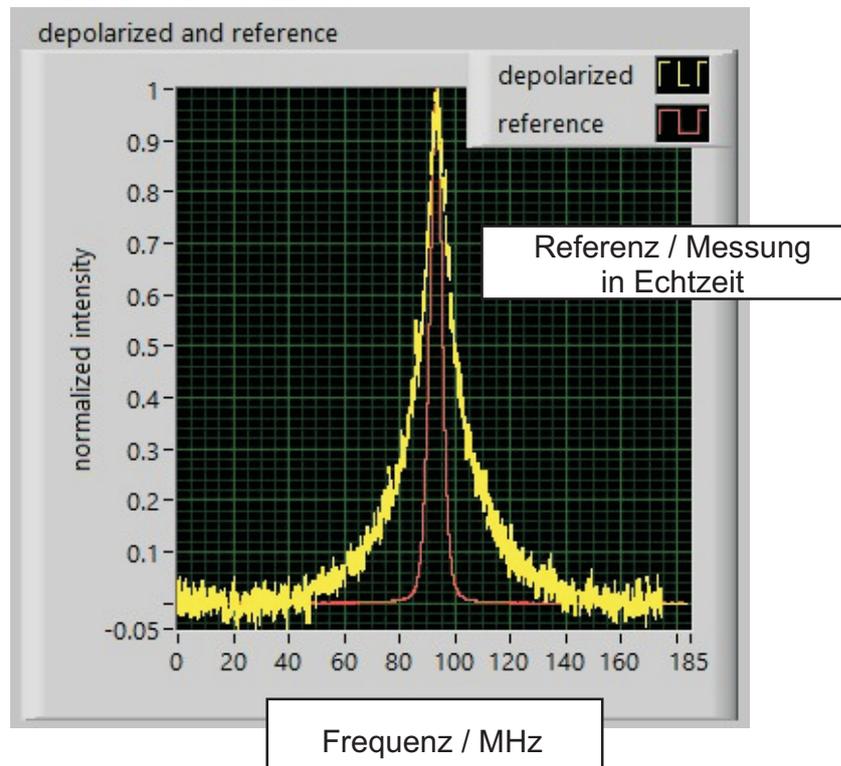


Abbildung 5.7: Eingabemaske “depolarized and reference“: Der Benutzer kann den Messverlauf in Echtzeit kontrollieren.

5.2.1 Messapplikation - batch.vi

Die Messapplikation `batch.vi` ist aus mehreren unabhängigen Teilen zusammengesetzt: Datenerfassung, -konditionierung, -anzeige und -speicherung (`DAQ.subvi` und `batch.vi`), Signalfilterung (`filter.subvi`) und Temperaturkontrolle (`t_control.subvi`). Eine graphische Benutzeroberfläche (GUI) ermöglicht das Steuern und Überwachen der wichtigsten Parameter. Der Programmablauf ist im Flussdiagramm 5.8 dargestellt: Der Benutzer bestimmt im Frontpanel unter “target“ die gewünschte Anzahl an Akkumulationen² n und trägt ggf. verschiedene Temperaturen ein. Die erste Temperatur aus der Liste wird gesetzt (vgl. Abb. 5.10) und Rohdaten werden erfasst. Diese bestehen aus zwei Arrays, dem Referenzsignal und dem Messsignal, die dem SubVI `filter.vi` übergeben werden (vgl. Abb. 5.9). Das Unterprogramm prüft, ob die Rohdaten den Anforderungen genügen

²der Übersichtlichkeit wegen im Flussdiagramm als Anzahl von Akkumulationen, eigentlich die gewünschte Signalstärke

und gibt außerdem die Lage des Maximums x an. Handelt es sich um ein ungültiges Signal, so beginnt der Algorithmus erneut bei der Rohdatenerfassung. Bei einem gültigen Spektrum wird die Anzahl an Akkumulationen inkrementiert und das Einzelspektrum um x verschoben und gespeichert. Ist die gewünschte Anzahl an Akkumulationen noch nicht erreicht, werden die nächsten Rohdaten erfasst. Andernfalls wird geprüft, ob die abgearbeitete Temperatur die letzte in der Liste war und das Programm beendet wird, oder ob der Algorithmus mit dem Setzen der nächsten Temperatur wiederholt wird.

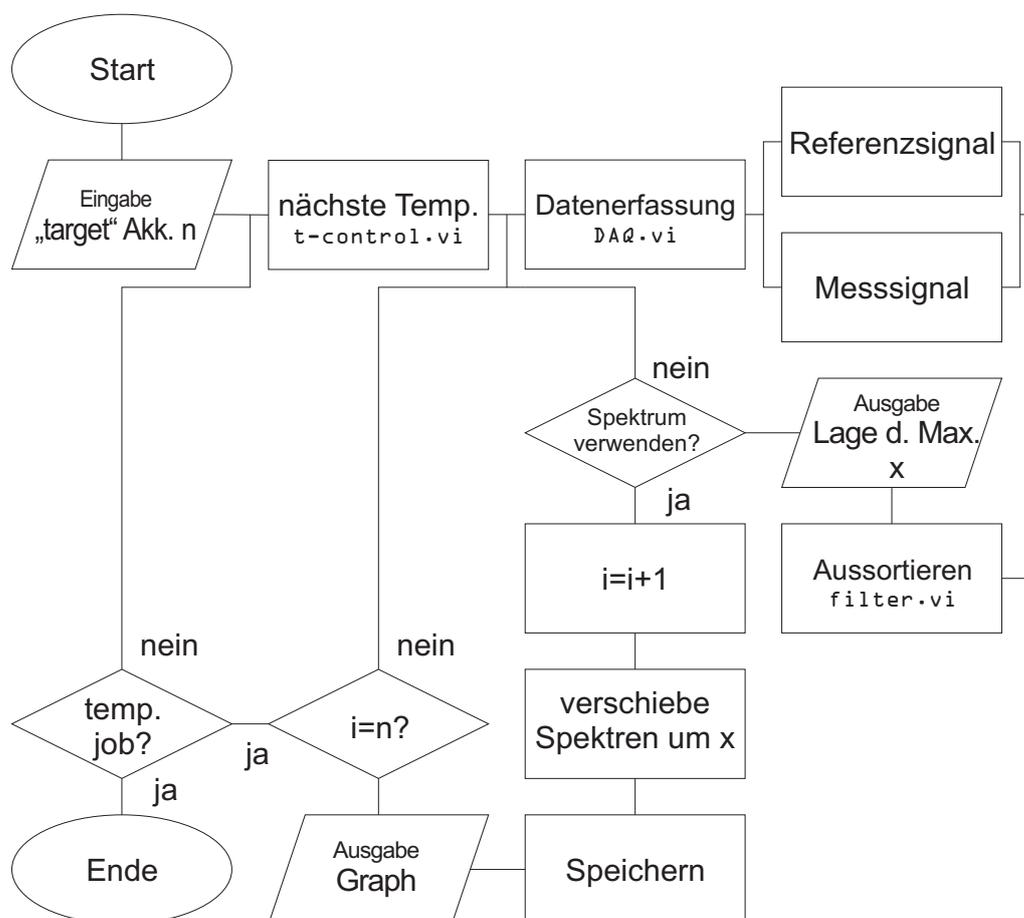


Abbildung 5.8: Flussdiagramm zum LabView Programm `batch.vi`. Es werden so lange gefilterte Einzelmessungen akkumuliert, bis die gewünschte Signalstärke erreicht und die Temperaturliste abgearbeitet wurde.

Signalfilterung - filter.vi

Das Unterprogramm `filter.vi` dient dazu, zur Akkumulation ungeeignete Spektren auszusortieren und ist somit von zentraler Bedeutung (vgl. Abb. 5.9). Die Eingangsarrays *Referenzsignal* und *Messsignal* werden getrennt voneinander geprüft. Der Benutzer gibt im Frontpanel Werte für einen akzeptablen FSR für das Referenzsignal und einen Schwellwert des Staubfilters für das Messsignal an. Das Referenzsignal wird auf Maxima untersucht und falls der Messbereich genau drei Maxima aufweist, so wird geprüft ob die FSR innerhalb des geforderten Limits liegen. Trifft letzteres zu, so wird eine Prüfsumme um Eins erhöht. In allen anderen Fällen wird die Messung verworfen (nicht genau drei Spektren im Messbereich oder FSR ungültig). Gleichzeitig wird das Messsignal auf ungewöhnlich hohe Intensität geprüft. Liegt sie über dem vom Benutzer angegebenen Schwellwert, so wird die Messung verworfen, andernfalls wird die Prüfsumme inkrementiert. Hat schließlich die Prüfsumme den Wert Zwei, wird die Messung verwendet.

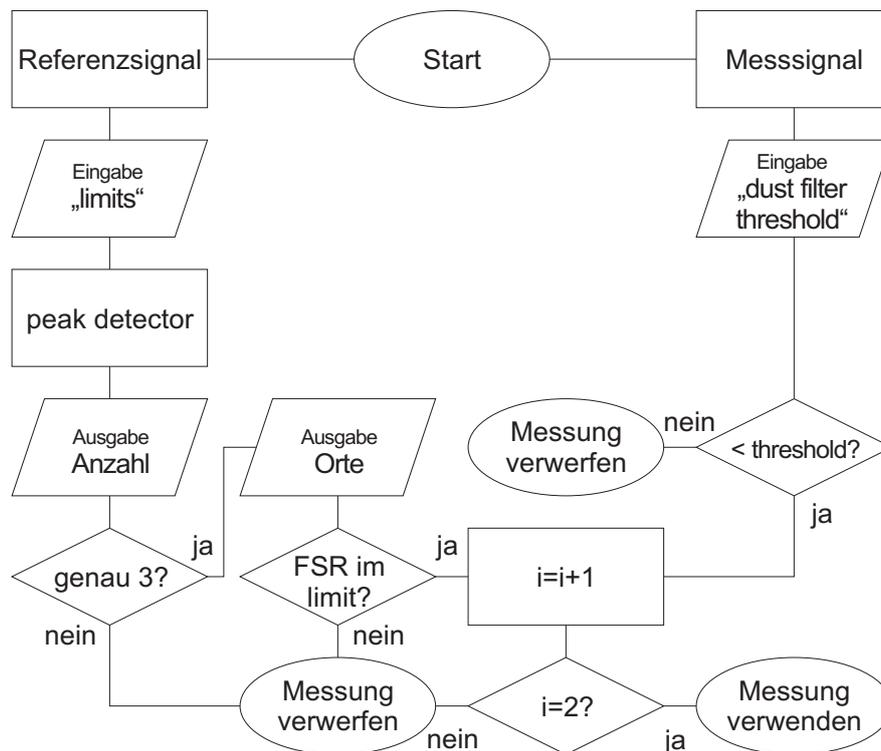


Abbildung 5.9: Flussdiagramm vom Unterprogramm `filter.vi`. Nur Spektren, die den vom Benutzer gestellten Kriterien entsprechen werden weiterverarbeitet.

DC30 Thermostatansteuerung - t_control.vi

Der Haake DC30 Thermostat wird über die RS232 Schnittstelle angesprochen und ausgelesen. Abb. 5.10 zeigt das Flussdiagramm, wie ein einzelner Temperaturschritt T gesetzt und die aktuelle Temperatur $T1$ im Frontpanel angezeigt wird. Es werden abwechselnd die Befehle für das Setzen einer Temperatur (W SW 00 T) und das Auslesen der aktuellen Temperatur des internen Sensors (R T1) an den Thermostaten geschickt. Je nach Anfrage wird dann die Temperatur oder ein Leerzeichen vom Thermostaten ausgegeben und vom Programm ausgelesen. Der Ablauf wiederholt sich bis die vom Benutzer eingetragene Equilibrierzeit erreicht ist.

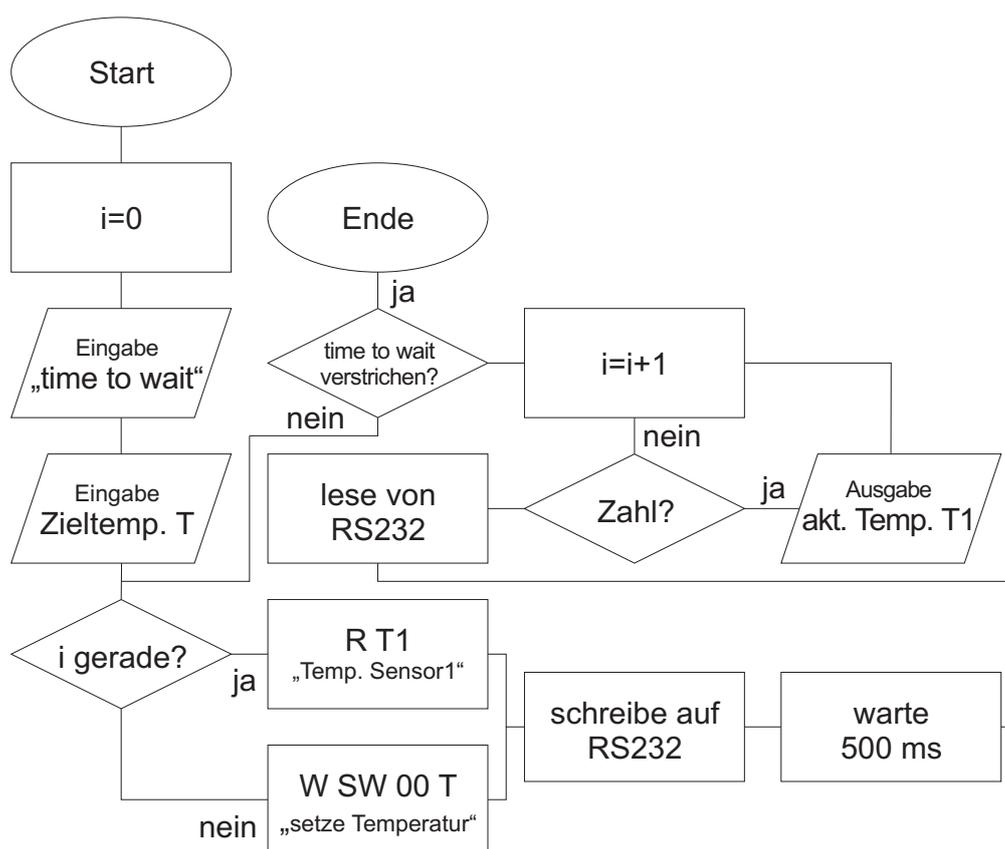


Abbildung 5.10: Flussdiagramm von t-control.vi. Die jew. Zieltemperatur T wird gesetzt und die aktuelle Temperatur $T1$ wird ausgegeben bis “time to wait“ verstrichen ist.

5.2.2 Entfaltungsalpplikation - convbatch.vi

Wird ein Spektrum mit einer Linie endlicher Breite analysiert, so ist das Ergebnis eine Faltung aus der instrumentenspezifischen Linie und dem eigentlichen Messsignal. Um auf die *wahre* Linienbreite schließen zu können, muss also das Messsignal entschmiert werden. Dies ist i.A. nicht bzw. nicht analytisch möglich, da die Apparatefunktion nicht zugänglich ist. Hier jedoch kann sie mit Hilfe einer Probe mit sehr langsamer Diffusion bestimmt werden. Die aus dieser Messung resultierende Linie entspricht quasi der Apparatefunktion. In der Praxis bietet sich eine Küvette mit Milchglasfenstern an, die in den Probenhalter platziert wird. Die entsprechende Entfaltungsroutine ist Teil des Auswertungsprozesses (vgl. auch Kapitel 6) und wurde in Anlehnung an die Formalismen aus Abschnitt 2.5 konstruiert. Sie besteht im Wesentlichen aus dem Unterprogramm `shiftconf.vi` das die Vorschrift

$$\mathcal{A}_n = \int S \frac{n(n-1)}{2!} A - \frac{n(n-1)(n-2)}{3!} A_1 + A \cdots \pm A_{n-2}$$

für $n = 10$ umgesetzt. Die Faltungsoperationen des Lösungskerns werden mit dem Unterprogramm `convolve.vi` realisiert. Es handelt sich um eine Anpassung des in LabView integrierten SubVI's `convolution.vi`. Abb. 5.11 zeigt das Frontpanel zur Entfaltung.

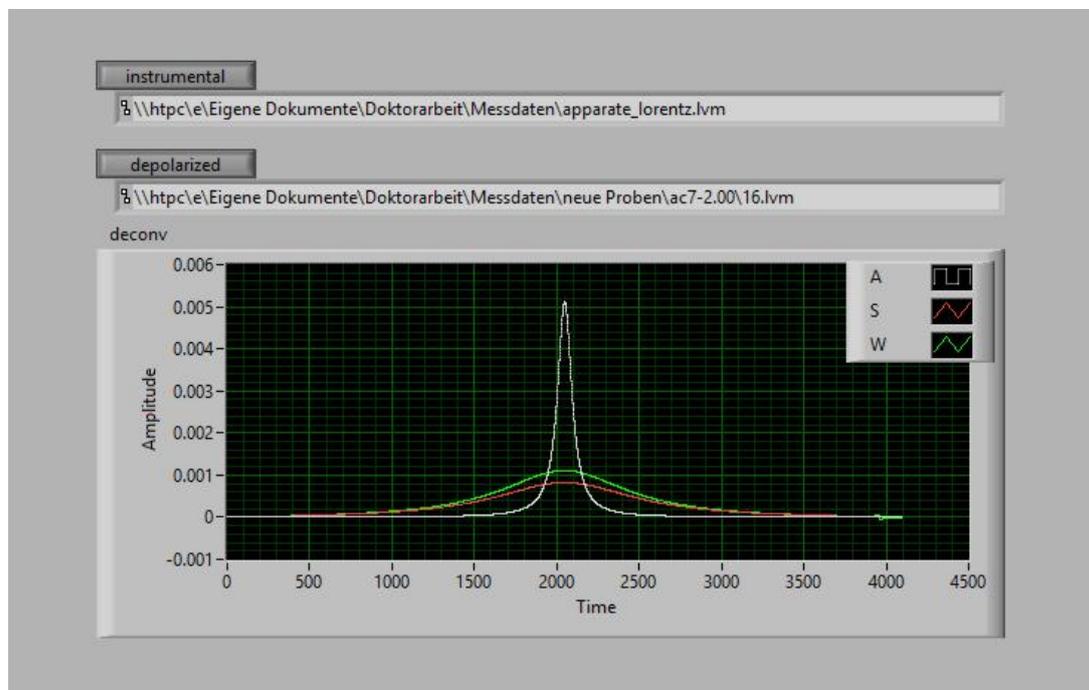


Abbildung 5.11: Frontpanel von `shiftconf.vi`. Das Programm dient zur Entfaltung W des Messsignals S mit der apparateeigenen verbreiterten Linie A .

Der Benutzer wählt eine Apparatfunktion und ein depolarisiertes Spektrum aus tabulatorgetrennten ASCII-Dateien mit gleicher Arraylänge. Der resultierende Dateiname endet auf `[depol. Spektrum]-deconv.dat` und weist die gleichen Spezifikationen wie die Eingangsdateien zur Weiterverarbeitung auf.

Zur Verifizierung der Routine wird eine analytisch berechenbare Entfaltung zweier miteinander gefalteter Gauß-Funktionen

$$W(\omega) = S(\omega) *^{-1} A(\omega) \quad (5.1)$$

mit der hier beschriebenen Methode verglichen. Dabei ist

$$\begin{aligned} W(\omega) &= \frac{4}{5} \exp \left[-\frac{16}{25} \pi \omega^2 \right] \\ S(\omega) &= \left(\frac{41}{16} \right)^{-1/2} \exp \left[-\frac{16}{41} \pi \omega^2 \right] \\ A(\omega) &= \exp \left[-\pi \omega^2 \right]. \end{aligned}$$

Abb. 5.12 zeigt den Vergleich der analytischen und der numerischen Lösung. Das Beispiel verdeutlicht zum Einen, dass eine Entfaltung notwendig ist, wenn die Apparatfunktion (hier die gestrichelte schwarze Linie) und das gemessene Spektrum (hier die durchgezogene schwarze Linie) ähnliche Halbwertsbreiten aufweisen und zum Anderen, dass die numerische Lösung bereits mit 10 Iterationen den Verlauf der analytischen Lösung sehr gut beschreibt.

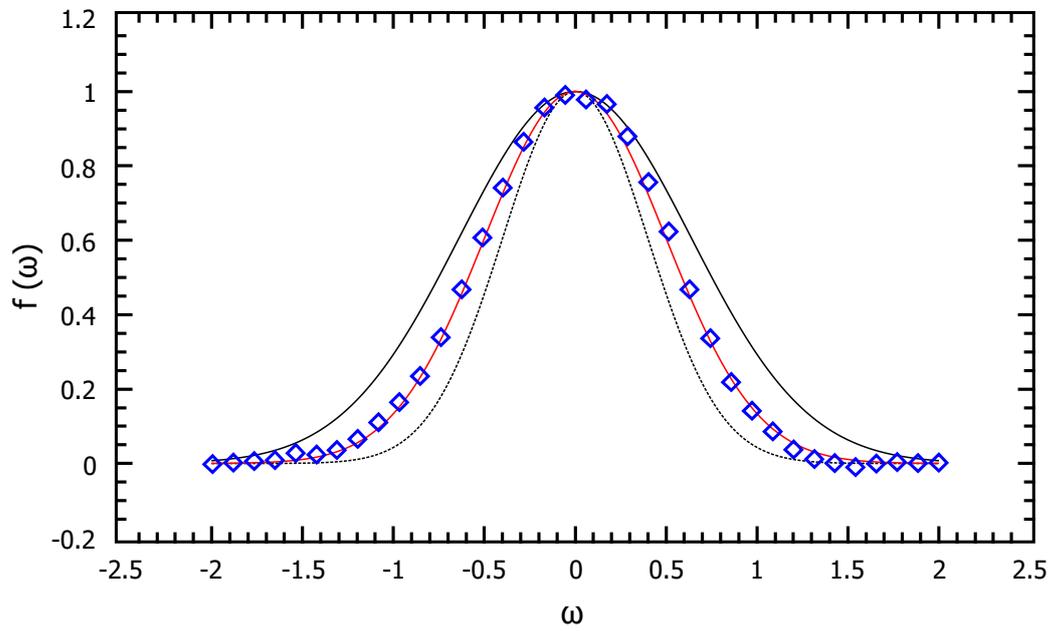


Abbildung 5.12: Vergleich der numerischen (blaue Symbole) und der analytischen (rote Linie) Entfaltung zweier Gaußfunktionen (schwarz)

6 Auswertemethoden

Im folgenden Kapitel werden die Methoden erläutert, wie Rohdaten einzelner Streulichtexperimente ausgewertet werden. Die Auswertung der depolarisierten Spektren basiert im Wesentlichen auf Anpassung geeigneter Lorentzfunktionen und anschließender Entfaltung mit der Apparatefunktion während für die Ermittlung der Translationsdiffusionskoeffizienten aus der Photonenkorrelationsspektroskopie auf das Fortran Programm CONTIN[43] zurückgegriffen wird.

6.1 Depolarisierte Spektren

Die Rohdaten der depolarisierten Spektren, wie sie das Programm `batch.vi` (vgl. 5.2.1) liefert werden mit einer, bzw. zwei Lorentzfunktionen

$$f(x) = y_0 + \frac{2A}{\pi} \cdot \frac{w_1}{4(x - x_c)^2 + w_1^2} \quad (6.1a)$$

$$g(x) = y_0 + \frac{2A}{\pi} \cdot \frac{w_1}{4(x - x_c)^2 + w_1^2} + \frac{2B}{\pi} \cdot \frac{w_2}{4(x - x_c)^2 + w_2^2} \quad (6.1b)$$

mit den Parametern

- y_0 Grundlinie
- A, B Fläche unter der jew. Lorentzfunktion
- w_1, w_2 volle Halbwertsbreiten auf halber Höhe FWHM
- x_c Lage des Maximums

mit Hilfe des Marquardt-Levenberg Algorithmus [70, 71], der auf der Methode der kleinsten Quadrate und einer Gradientensuche basiert, angepasst. Eine Anpassung mit zwei Lorentzfunktionen ist notwendig (vgl. Abb. 6.2), wenn die Residuen im Zentrum sys-

tematische Abweichungen aufweisen, ansonsten wird eine einfache Lorentzfunktion wie in Abb. 6.1 verwendet. Bei dieser Messung handelt es sich um eine äquimolare Mischung von 5'-AMP und 5'-CMP mit einer Konzentration von 4.1 M, gemessen bei 22.8 °C. Bei der Anpassung an die Summation der 27475 Einzelmessungen mit einem einfachen Lorentzprofil erhält man für die Parameter der vollen Halbwertsbreite $w_1 = 2\Gamma = 13.0$ MHz (noch gefaltet mit der Apparatefunktion). Nach

$$\tau = \frac{1}{2\pi\Gamma} = \frac{1}{6\Theta_R} \quad (6.2)$$

beträgt die Reorientierungsrelaxationszeit vor der Entfaltung also $\tau = 24.48$ ns.

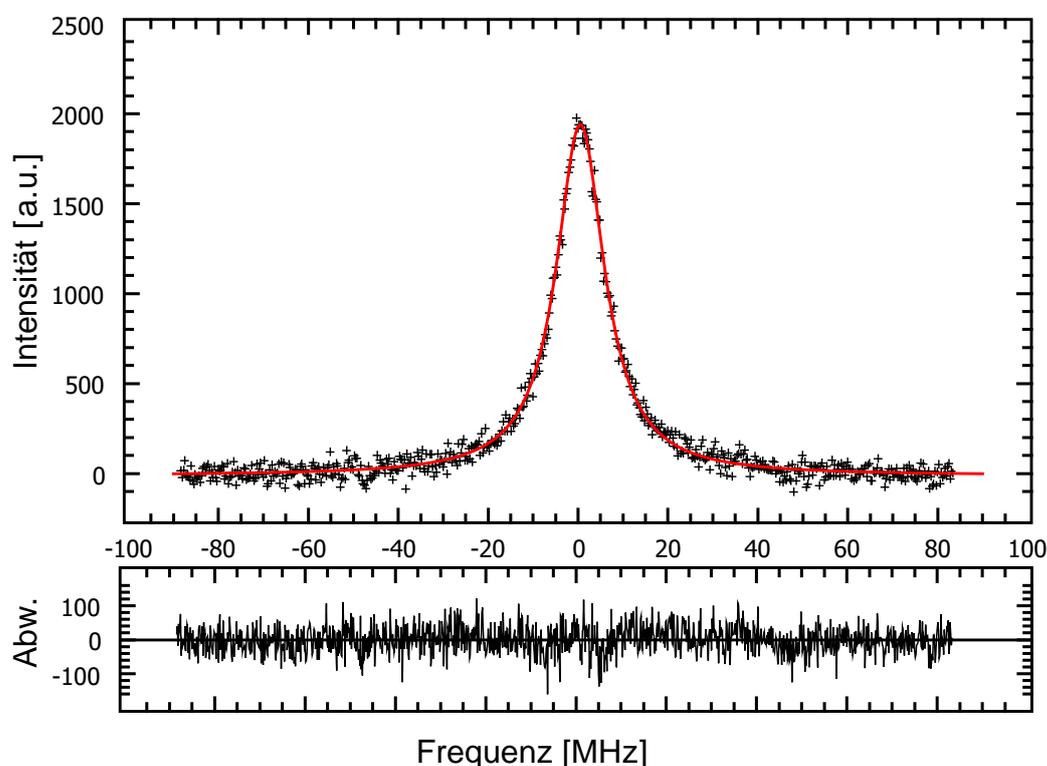


Abbildung 6.1: Depolarisiertes Streuspektrum von 5'-AMP/5'-CMP ($c=4.1$ M, $T=22.8$ °C, 27475 Akkumulationen) und Anpassung einer einzelnen Lorentzfunktion (rote Linie).

Bei Spektren, die zwei Komponenten aufweisen, wird stichprobenartig (d.h. bei niedriger, mittlerer und hoher Temperatur) das Verhalten der schmalen Komponente überprüft.

Wenn kein Arrhenius Verhalten¹ vorliegt, handelt es sich um die Summation störender Reflexe der Küvette bzw. nicht unterdrücktem polarisiertem Streulicht oder um sehr große Aggregate. In diesem Fall wird der Parameter für die Halbwertsbreite des schmalen Liniensprofils w_2 für die Anpassung fixiert. Abb. 6.2 zeigt das depolarisierte Streuspektrum von 5'-GMP, mit einer Konzentration von 1.0 M bei 23 °C. Die Anpassung liefert für die volle Halbwertsbreite der gefalteten schnelleren Komponente einen Wert von $w_1 = 28$ MHz, bzw. einer Rotationsrelaxationszeit von $\tau = 11.4$ ns.

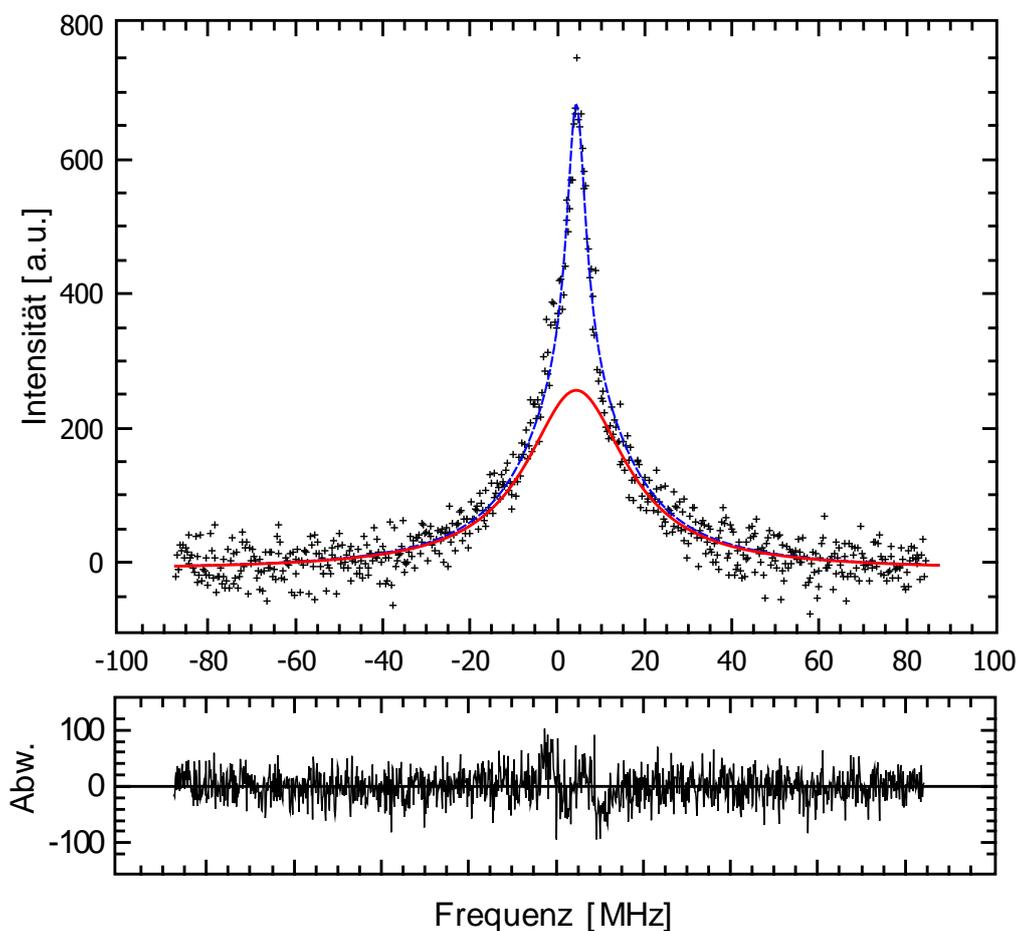


Abbildung 6.2: Depolarisiertes Streuspektrum von 5'-GMP ($T = 23$ °C), Anpassung zweier Lorentzfunktionen (blau) und Lorentzprofil der schnellen Komponente (rot).

Nach dieser Prozedur wird das angepasste gefaltete Lorentzprofil exportiert, um es im

¹d.h. die Linie würde sich beim Erhöhen der Temperatur signifikant verbreitern

LabView Programm `batchconf.vi` zur Entfaltung zu laden. Wie in 5.2.2 erwähnt, ist es notwendig, dass die ASCII Dateien für Apparatefunktion und depolarisiertem Spektrum die gleiche Array-Länge aufweisen. Die aus der LabView Routine erzeugte ASCII-Datei enthält schließlich das entfaltete Lorentzprofil dessen Linienbreite ausgelesen werden kann. Der Vergleich vor und nach der Entfaltung ist in Tabelle 6.1 aufgeführt. Es ergibt sich, dass nur die Entschmierung von, im Vergleich zur Apparatefunktion, schmalen Linienprofilen eine signifikante Änderung der Linienbreite und damit der Rotationsrelaxationszeit hervorruft.

Tabelle 6.1: Einfluss der Entfaltung auf schmale und breite Linienprofile

		gefaltet	entfaltet
5'-AMP/5'-CMP ($c = 4.1 \text{ M}$, $T = 22.8 \text{ }^\circ\text{C}$)	τ	24.48 ns	36.75 ns
	w_1	13.0 MHz	8.7 MHz
5'-AMP/5'-CMP ($c = 2.75 \text{ M}$, $T = 20.3 \text{ }^\circ\text{C}$)	τ	7.38 ns	7.75 ns
	w_1	43.1 MHz	41.0 MHz

6.2 Photonenkorrelationsspektren

Die Auswertung der Photonenkorrelationsspektren erfolgt entweder durch die Kumulantenmethode [42], oder durch die bereits angesprochene inverse Laplace Transformation mit Hilfe des Fortran Programmes `CONTIN` von Provencher [43]. Im Fall polydispenser Proben wird die Autokorrelationsfunktion durch eine gewichtete Summe von Exponentialfunktionen beschrieben [40]

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^{+\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma, \quad (6.3)$$

wobei $G(\Gamma)$ die Verteilung der Relaxationsraten darstellt. Die Spektren in der vorliegenden Arbeit wurden mit letzterer Methode ausgewertet. Abb. 6.3 zeigt eine exemplarische PCS-Messung an einer äquimolaren Mischung von 5'-AMP/5'-CMP ($c = 2 \text{ M}$, $T = 18.1 \text{ }^\circ\text{C}$) unter einem Streuwinkel von $\Theta = 90^\circ$.

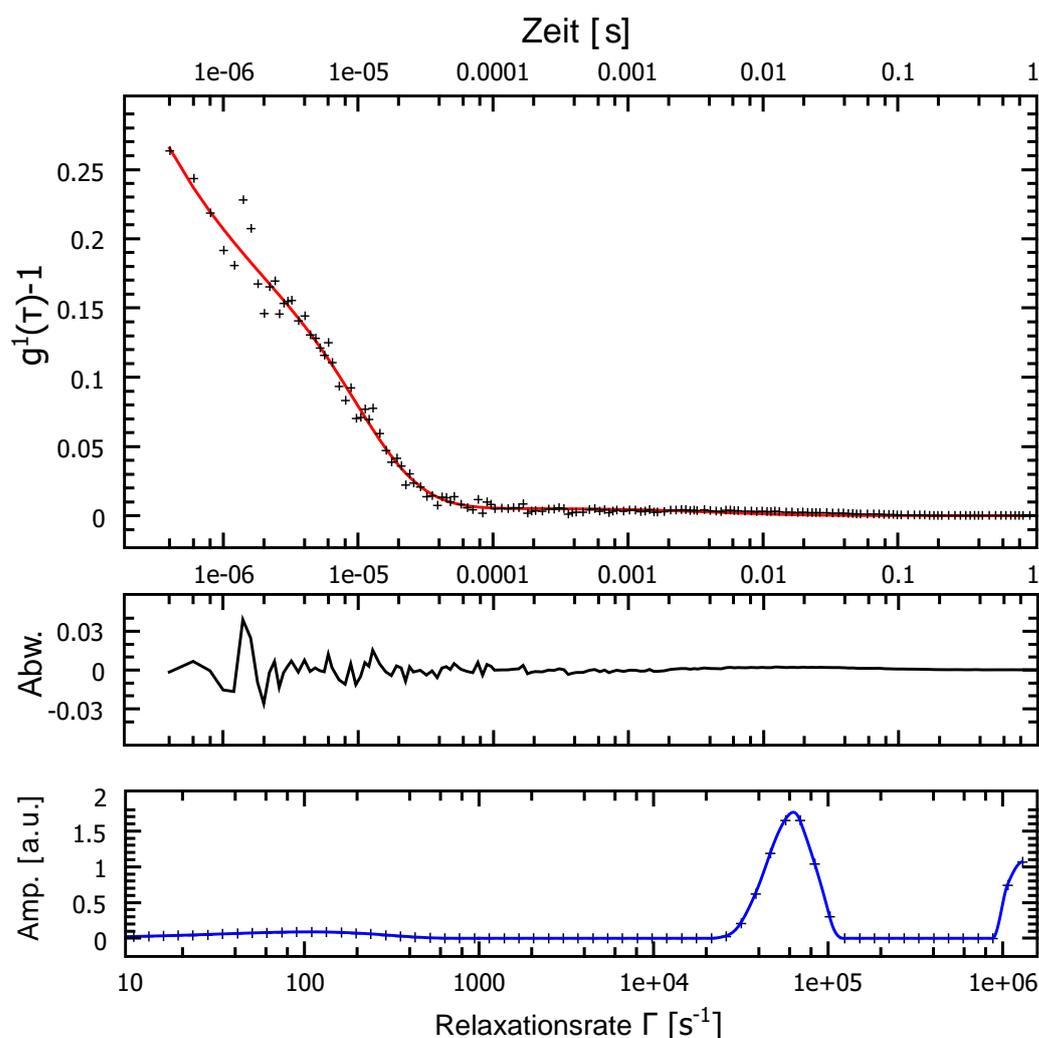


Abbildung 6.3: PCS-Messung von 5'-AMP/5'-CMP ($c = 2 \text{ M}$, $T = 18.1 \text{ }^\circ\text{C}$, oben) in Form einer Autokorrelationsfunktion sowie die Verteilung der Relaxationsraten (unten).

Der obere Graph zeigt die Autokorrelation $g^1(\tau) - 1$, wie sie in der Rohform von der ALV-Software erzeugt wird. CONTIN liefert die Relaxationsratenverteilung (blau, unterer Graph), die ein lokales Maximum bei $\Gamma = 60534 \text{ s}^{-1}$ aufweist. Diese Prozedur wird für mehrere Winkel wiederholt und die gefundenen Relaxationsraten gegen q^2 aufgetragen.

Schließlich wird der Translationsdiffusionskoeffizient D_T aus der Steigung wegen

$$\Gamma = q^2 D_T \quad (6.4)$$

ermittelt (vgl. Abb. 6.4 und 2.2).

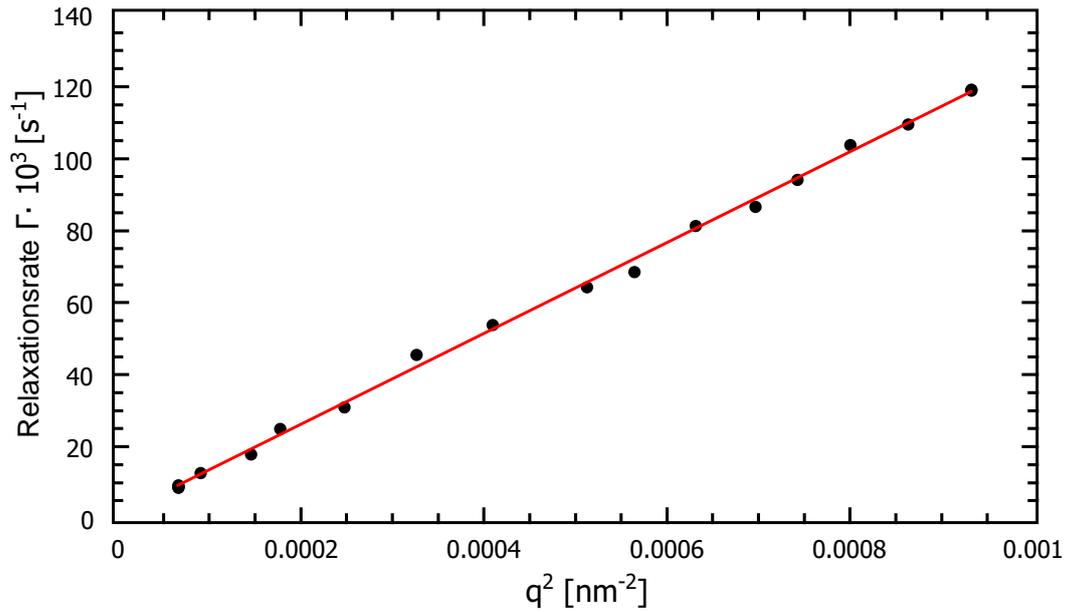


Abbildung 6.4: Auftragung der mittels CONTIN gefundenen Relaxationsraten Γ gegen q^2 zur Ermittlung des Translationsdiffusionskoeffizienten D_T aus der Steigung (5'-AMP/5'-CMP mit $c = 2$ M, $T = 18.1$ °C).

7 Ergebnisse

7.1 Apparatur

Die in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Versuchsanordnungen für depolarisierte Lichtstreuung werden im folgenden Kapitel charakterisiert und auf ihre Eignung für hochauflösende Spektroskopie untersucht. Es werden Messungen an Mononukleotiden und tRNA mit dem Aufbau mit simultaner Detektion vorgestellt und mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen.

7.1.1 Shuttertechnik

Diese Methode liefert ausreichende Genauigkeit bei Interferometern mit kleinem Spiegelabstand (bedeutet größerer FSR). Bei einem Spiegelabstand von 50 cm und einer Messdauer von mehreren Sekunden ist die Apparatur sehr anfällig für Vibrationen und Erschütterungen. Sogar Erschütterungen, die die mechanischen Shutter auslösen, können störend sein. U.a. aus diesem Grund ist ein langsames Abfahren der Rampe notwendig, so dass die Intensität der Vibration nach dem Schließen des zweiten Shutters bereits wieder abgeklungen ist. Dieser Sachverhalt hat zur Folge, dass selbst bei sehr präzisiertem Abfahren der Rampe die Abstände zweier einzelner Maxima nicht konstant sind. Auch kann nicht mit ausreichender Genauigkeit sichergestellt werden, dass die Bedingung für konstruktive Interferenz immer mit der gleichen Spannung des Rampengenerators übereinstimmt. Werden solche Messungen dann nach dem Maximum erster Ordnung, der Apparatfunktion, ausgerichtet und zur vorhergehenden Messung addiert, wie in Abb. 7.1, führt dies zu einer unkorrekten Akkumulation der Messsignale. Diese Methode führt also zu einer künstlichen Verbreiterung der Linie und schließlich einer Verfälschung der Diffusionszeit. Eine solche Apparatur erfordert einen Aufbau auf einem schwingungsgedämpften optischen Tisch. Selbst dann müssen Messungen über Nacht erfolgen, um das Risiko von Erschütterungen zu minimieren, da fehlerhafte Akkumulationen im Nachhin-

ein nicht identifiziert werden können.

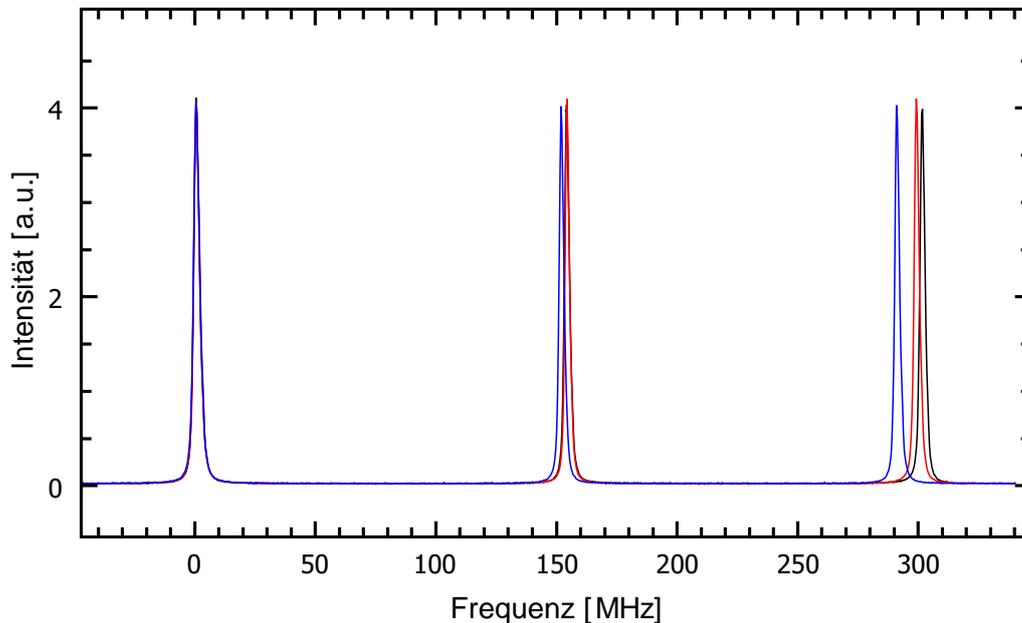


Abbildung 7.1: Werden die Einzelmessungen (rot, schwarz und blau) nach dem Maximum 1. Ordnung ausgerichtet, kann es zu Fehlüberlagerungen bei Maxima höherer Ordnung kommen, was zu einer künstlichen Verbreiterung der Linie führt, da gerade die Maxima bei 150 MHz und 300 MHz dem Messsignal entsprechen. Diese Inkonsistenz kann nur im polarisierten Aufbau beobachtet werden (Polarisator im Detektionspfad hat die gleiche Polarisation wie der Polarisator im Anregungspfad).

Unter den beschriebenen Prämissen können nur etwa ca. 4-5 Spektren pro Minute erfasst werden.

7.1.2 Aufbau mit Akustooptischem Modulator

Die Modifikation der Apparatur mit einem akustooptischen Modulator im Strahlengang des Referenzstrahls nach Abb. 4.8 ist ein vielversprechender Ansatz, da hier keine mechanisch bewegten Bauteile verwendet werden müssen, so dass es zu keinen Erschütterungen durch die Shutter kommen kann. Dieser Aufbau hat den Vorteil, dass die Rampendauer um ein Vielfaches reduziert werden kann (20 ms ggü. 10 s) wodurch sich die Anfälligkeit für Vibrationen und auch die Messdauer drastisch verringert.

Die Stabilität des Frequenzversatzes des AOM Treibers liegt laut Datenblatt bei 1 ppm/°C.

Dadurch ist sichergestellt, dass die Mittenfrequenz des frequenzverschobenen Lichtes ausreichend genau konstant und bekannt ist. Abb. 7.2 und 7.3 zeigen jedoch, dass ein solcher Aufbau nicht die erforderliche Frequenzauflösung erreicht.

In Abb. 7.2 sind vier Einzelmessungen übereinander gelegt und nach dem intensiven Referenzstrahl ausgerichtet. Um die Verhältnisse deutlich zu machen, wird der Polarisator im Detektionspfad leicht gedreht, so dass genug polarisiertes Streulicht detektiert werden kann. Es wird deutlich, dass der detektierte Frequenzabstand nicht ausreichend konstant ist, so dass es auch mit diesem Aufbau zu fehlerhaften Akkumulationen kommt. Wird davon ausgegangen, dass die Ungenauigkeit der Frequenzlage nicht durch den AOM verursacht wird, so muss die starke Schwankung der Lage des Messsignals von bis zu ± 8 MHz trotz der kurzen Rampendauer durch Vibrationen verursacht werden.

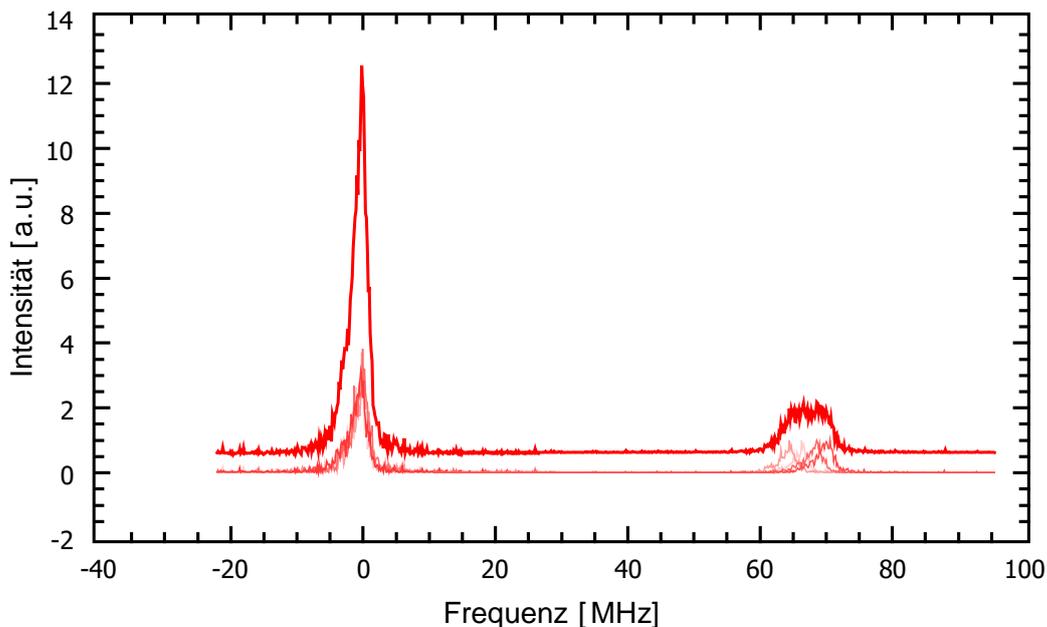


Abbildung 7.2: Beispielhafte Akkumulation (dunkelrot) von vier Einzelmessungen (hell) mit dem Aufbau mit akustooptischem Modulator im Referenzpfad. Wegen den stark unterschiedlichen Frequenzlagen des Messsignals (bei 70 MHz) kann durch Ausrichtung an das frequenzverschobene Referenzlicht (bei 0 MHz) keine korrekte Aufsummierung gewährleistet werden.

Zwar wurden zur Verdeutlichung absichtlich vier Spektren mit besonders unterschiedlichen Frequenzabständen gewählt, Abb. 7.3 bestätigt jedoch, dass eine Lösung mit AOM zunächst elegant scheint, aber schließlich nicht zur hochauflösenden Analyse verwendet

werden kann. Für eine quantitative Einschätzung wird die Intensität des Messsignals wie erwähnt künstlich verstärkt, so dass die Halbwertsbreite nach jeder einzelnen Akkumulation bestimmt werden kann. Abb. 7.3 zeigt, wie sich die FWHM mit steigender Anzahl von Akkumulationen entwickelt.

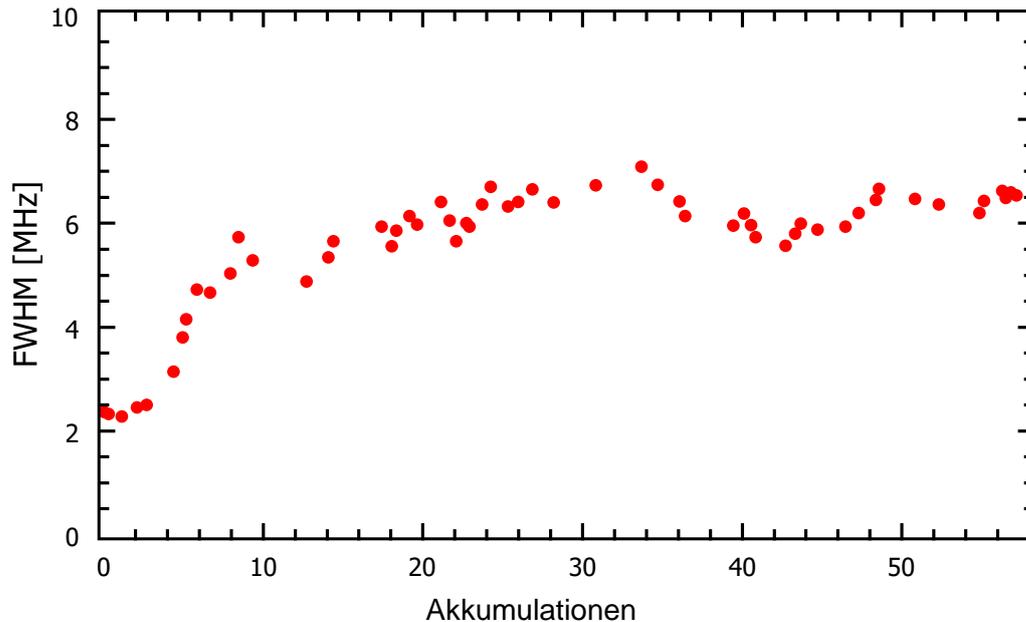


Abbildung 7.3: Entwicklung der Halbwertsbreite mit steigender Anzahl an Akkumulationen. Bereits nach wenigen Akkumulationen steigt die scheinbare Linienbreite von anfänglich 2.5 MHz auf ca. 6.5 MHz.

Die ersten vier Spektren können aufsummiert werden, ohne dass sich die Linienbreite verändert (ca. 2.5 MHz). Danach steigt die Linienbreite an und nähert sich einem Wert von etwa 7 MHz. Das Ansteigen der Linienbreite lässt sich weder durch Justierung am luftgefederten Tisch zur besseren Dämpfung von Schwingungen noch durch Stabilisierungseinstellungen des DAS-10 unterdrücken.

7.1.3 Aufbau mit Simultandetektion

Die bisherigen Versuchsanordnungen zeigen, dass es nicht möglich ist, die exakte Lage des Messsignals während eines Rampendurchlaufs vorherzusagen. Um die depolarisierten Spektren dennoch aufsummieren zu können, werden Referenzstrahl und Messsignal wie in 4.1.4 beschrieben simultan vom FPI frequenzanalysiert. Die Signale werden also mit

getrennten Detektoren registriert, aber dennoch *zeitgleich* verarbeitet. Durch eine solche feste Verknüpfung mit dem stets messbaren Referenzstrahl ist die exakte Lage des Maximums des depolarisierten Spektrum jederzeit bekannt. Dies wird wie in Abb. 7.4 geprüft, indem ein leicht zu detektierendes Messsignal zusammen mit dem Referenzstrahl vom FPI analysiert wird. Bei diesen exemplarischen Spektren zeigt sich die Stärke dieser Methode: Die Maxima, die genau bei ± 150 MHz liegen müssten, sind auch in diesem Beispiel leicht verschoben. Bedingt durch die simultane Aufnahme des Messsignals ist aber auch dieses um den selben Wert versetzt und daher dennoch zur korrekten Weiterverarbeitung geeignet. Tabelle 7.1 gibt den Fehler einer Einzelmessung von Simultan- und AOM-Methode in Zahlen wieder.

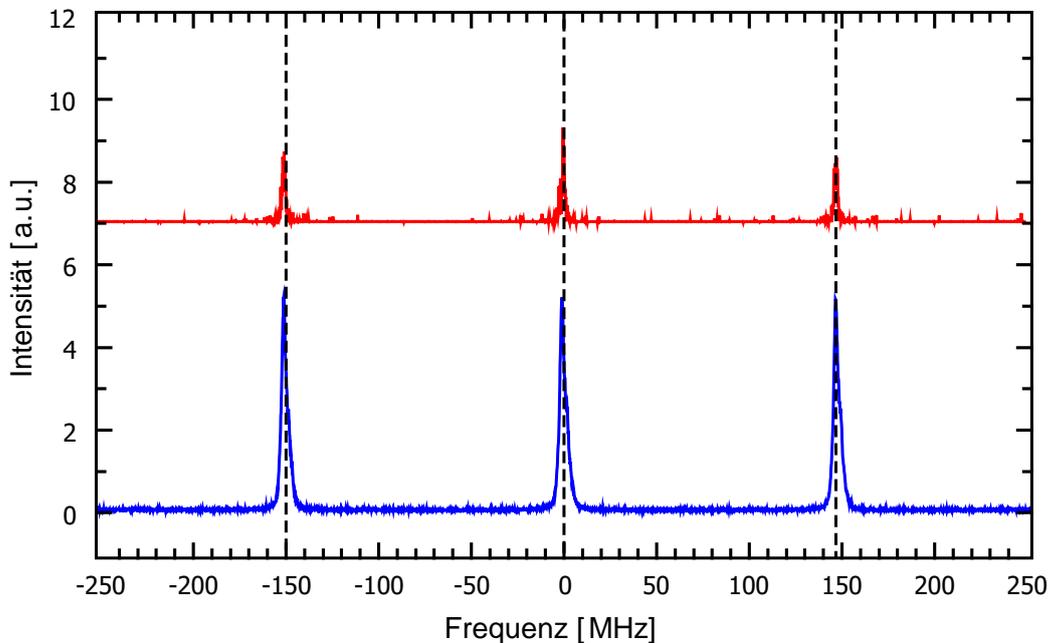


Abbildung 7.4: Simultane Detektion von Referenzstrahl (blau) und dem Messsignal (rot, Amplitude künstlich erhöht). Durch diese Versuchsanordnung ist die Lage des Messsignals stets bekannt.

Es muss also überprüft werden, wie sich die Linienbreite mit steigender Anzahl Akkumulationen entwickelt. Der zeitliche Verlauf der Simultanmessung und der Vergleich mit der Methode mit AOM ist in 7.5 dargestellt. Auch hier wird das Spektrum nach jeder Einzelmessung mit einer Lorentzlinie angepasst und die Linienbreiten (FWHM) gegen die Anzahl an Akkumulationen aufgetragen. Im Gegensatz zur Messmethode mit Frequenzverschiebung durch akustooptische Modulation bleibt die Halbwertsbreite kon-

stant. Dadurch ist es erstmals möglich, mittels dynamischer Lichtstreuung Linienverbreiterungen von unter 5 MHz zu beobachten. Somit wird ein schwer zugänglicher Bereich an Rotationsdiffusionszeiten erschlossen. Abb. 7.6 verdeutlicht den Auflösungsgewinn der beschriebenen Methode gegenüber einem Aufbau mit einem FPI mit einem FSR von 1.5 GHz. Bei diesem Vergleichsspektrum sind weder die beschriebenen Schwierigkeiten der Signalakkumulation noch Entfaltung einbezogen. Die Kurven zeigen also das theoretisch schmalste Spektrum eines 1.5 GHz Apparates verglichen mit dem tatsächlichen Spektrum der hier beschriebenen Methode.

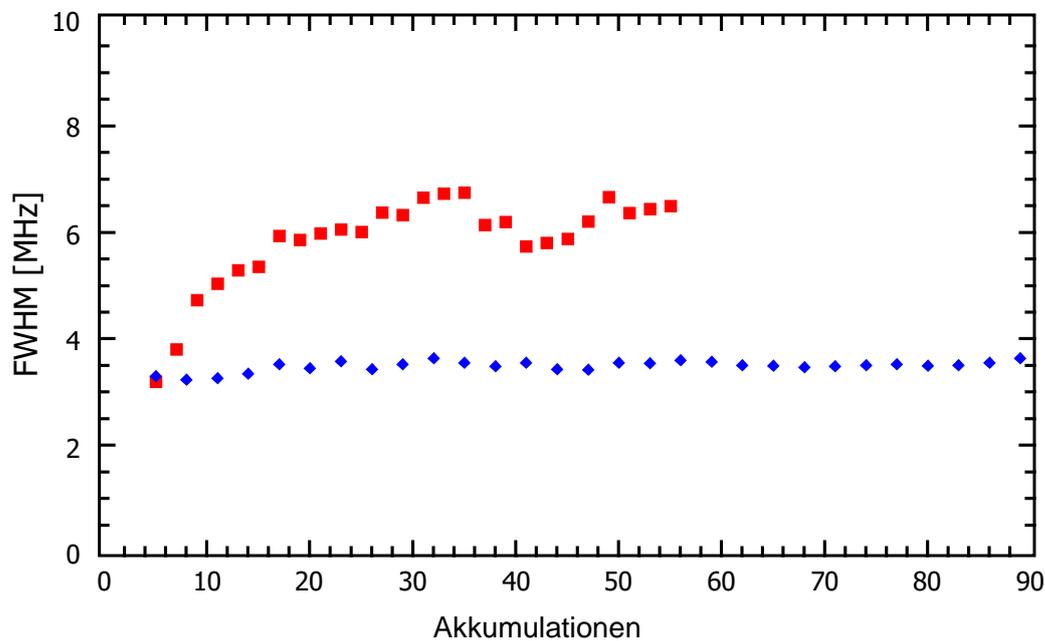


Abbildung 7.5: Vergleich der Halbwertsbreitenentwicklung mit der Methode mit AOM (rot) und mit Simultandetektion (blau). Die Linienbreite bleibt bei gleichzeitiger Erfassung konstant bei ca. 3.6 MHz

Bei einer angenommenen Finesse von $F^* = 80$ liegt die Grenze der auflösbaren Diffusionszeit bei 18.75 ns gegenüber von 72.34 ns des gemessenen Spektrums. Der Zeitbereich kann, wie beschrieben durch die Entfaltung des Messsignals und einer Optimierung der Lochblendenöffnung auf über 100 ns erweitert werden. Werden kleine Lochblenden verwendet, erreicht man auf Kosten der Messdauer bedingt durch die geringere Intensität eine höhere Finesse. Da es durch die beschriebene Technik allerdings möglich ist, beliebig viele Spektren aufzusummieren, beeinflusst eine lange Messdauer die Qualität des Ergebnisses nicht. Durch die Justierung der Lochblenden kann je nach Anwendung ein

geeignetes Mittelmaß zwischen Auflösung und Messdauer gewählt werden.

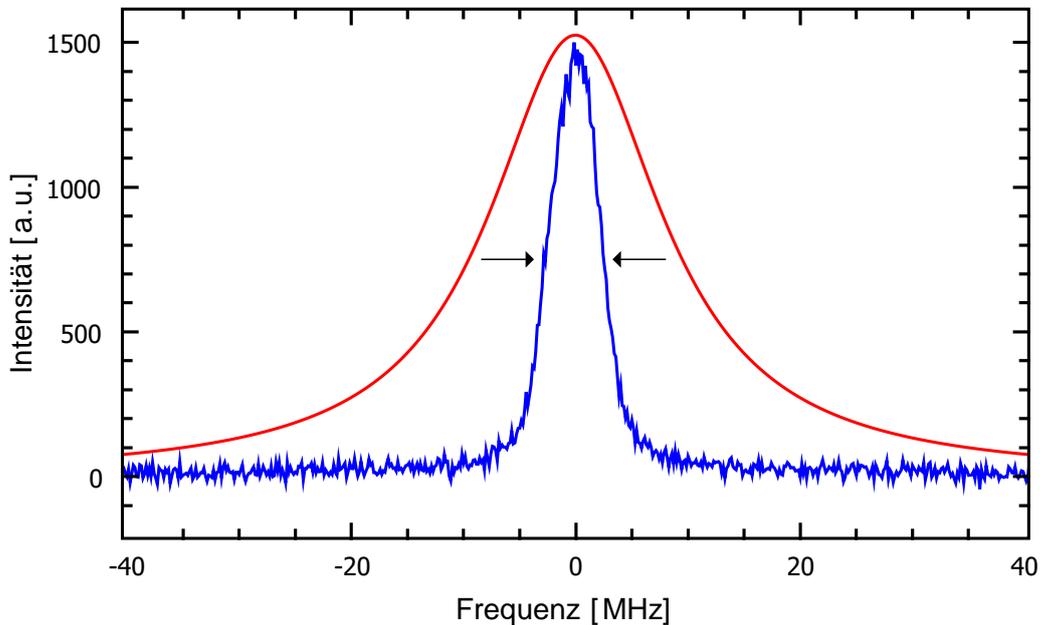


Abbildung 7.6: Vergleich zwischen der theoretisch minimal erreichbaren Linienbreite mit einem FPI mit 1.5 GHz FSR (rot, $\tau = 16.98$ ns) und einer tatsächlichen Messung (blau, $\tau = 72.34$ ns)

Tabelle 7.2 gibt hierzu eine Übersicht über typische Messdauern. Je nach Konzentration und Temperatur sind sehr unterschiedliche Integrationszeiten notwendig. Eine genauere Betrachtung der Abhängigkeiten wird in Abschnitt 7.3 durchgeführt. Zur Vergleichbarkeit der Messdauern untereinander werden Messungen mit etwa gleichem SNR verwendet. Die Werte aus der Tabelle wurden aus Messungen mit einem *target* (vgl. 5.2.1) von 1000 ermittelt. Der Wertebereich liegt typischerweise zwischen 30 Minuten bzw. 5000 Akkumulationen (5'-AMP / 5'-CMP, $c = 4.1$ M, 10°C) und 11 Stunden, bzw. 120000 Akkumulationen ($c = 80$ mg, 40°C). In diesem Fall ermöglicht das Programm `batch.vi` eine Stapelverarbeitung einer vorgegebenen Temperaturrampe. Je nach Temperaturinkrement sind zur Durchführung einige Stunden bis mehrere Tage notwendig, um den Temperaturbereich zu vermessen. Erst eine solche Apparatur, die durch gleichzeitige Detektion von Referenz und Messsignal von äußeren Einflüssen entkoppelt ist, ermöglicht einen derartigen selbstständigen Messablauf. Eine konstante Lichtquelle und stabile Proben ohne starke Absorption im verwendeten Wellenlängenbereich sind ohnehin obligatorisch.

Tabelle 7.1: Frequenzlagen der Maxima einer Einzelmessung

	1. Maximum	2. Maximum	3. Maximum
rel. Lage d. Apparatefunktion	-149.95 MHz	0 MHz	147.54 MHz
rel. Lage d. Signals	-149.89 MHz	-0.08 MHz	147.44 MHz
Differenz (simultan)	0.06 MHz	0.08 MHz	0.10 MHz
Differenz von FSR (entspricht AOM)	0.05 MHz	–	2.46 MHz

Tabelle 7.2: Typische Messdauern bzw. benötigte Anzahl Akkumulationen für den Aufbau mit simultaner Detektion

Temperatur	5'-AMP / 5'-CMP 4.1 M	5'-AMP / 5'-CMP 2.5 M	tRNA (Hefe) 80 mg/ml
10 °C	34 min 5791 Akk.	184 min 31 250 Akk.	183 min 53 668 Akk.
20 °C	95 min 10 438 Akk.	4.9 h 51 056 Akk.	3.9 h 66 000 Akk.
40 °C	4.1 h 45 045 Akk.	7.1 h 83 333 Akk.	11 h 117 647 Akk.

7.2 Plausibilitätsüberprüfung der Methode an Mononukleotiden und tRNA (aus Hefe)

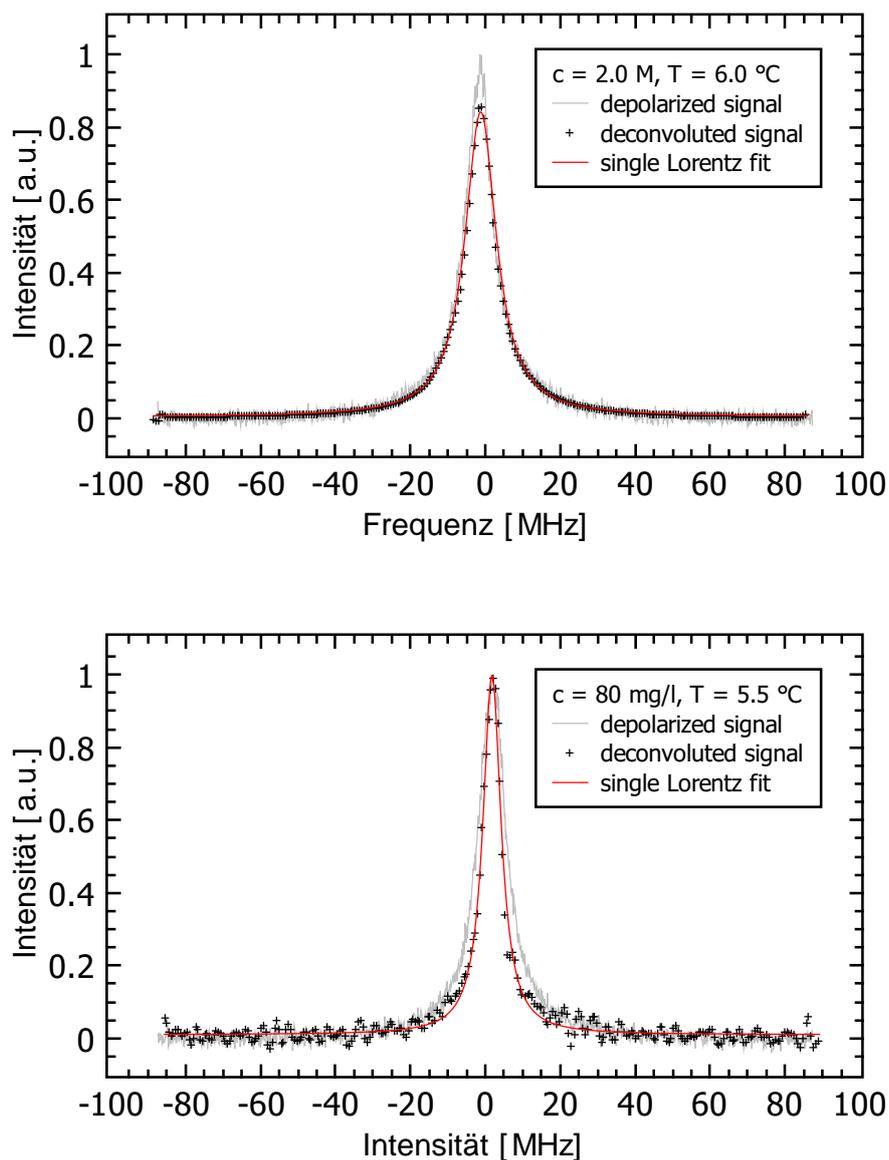


Abbildung 7.7: oben: Depolarisiertes Streuspektrum von 5'-AMP/5'-UMP ($c = 2.0 \text{ M}$, $T = 6.0 \text{ }^\circ\text{C}$) unten: Depolarisiertes Streuspektrum von tRNA ($c = 80 \text{ mg/l}$, $T = 5.5 \text{ }^\circ\text{C}$). Anpassung einer einzelnen Lorentzfunktion (rote Linie) an die Entfaltung (schwarz) der jew. Messung (grau).

Mit der hier beschriebenen Messmethode ist es möglich, diffusive Prozesse im Bereich von über 100 ns zu verfolgen. Zwar werden durch die Messung des depolarisierten Anteils gerade nicht- sphärische Partikel betrachtet, eine Abschätzung nach der Stokes-Einstein-Debye Gleichung für kugelförmige Teilchen

$$\Theta = \frac{k_B T}{8\pi\eta_0 R_H^3} \quad (7.1)$$

ist aber dennoch sinnvoll. Man erkennt, dass der Rotationsdiffusionskoeffizient von der dritten Potenz des Teilchenradius abhängt. Wegen der Beziehung

$$\Gamma = \frac{6\Theta}{2\pi} = (2\pi\tau_c)^{-1} \quad (7.2)$$

wirkt sich also eine Größenänderung massiv auf die Halbwertsbreite aus der DDLS Messung aus. Dies hat den Vorteil, dass die Methode sehr sensibel auf Größenänderungen reagiert. Andererseits hat dies zur Folge, dass mit dieser Apparatur nur ein enges Fenster an Relaxationszeiten erschlossen werden kann. Dem kann man nur mit einem Wechsel des Interferometers bzw. des FSR entgegenwirken. Zur Verifizierung der Methode müssen also Proben verwendet werden, deren Diffusionsverhalten bereits näher untersucht wurde [15, 25, 72]. Der zu erwartende Zeitbereich sollte dabei im Bereich zwischen $\tau = 1$ ns und $\tau = 200$ ns liegen. Der direkte Vergleich mit anderen Ergebnissen aus dynamischer Lichtstreuung ist jedoch nur für sehr kurze¹ Orientierungszeiten möglich.

Jeder Datenpunkt entsteht durch die in Abschnitt 6 beschriebenen halbautomatisierten Prozeduren. Die Rohdaten, nämlich die mit der Apparatfunktion verschmierten Lorentzprofile sind eine Aufsummierung von bis zu 120000 Einzelspektren. Nach der Entfaltung wird eine Lorentzlinie angepasst und deren Halbwertsbreite bestimmt. Schließlich wird nach Gl. 7.2 die Diffusionszeit bestimmt. Mit dem Tool `batch.vi` kann unbeaufsichtigt die Temperatur nach einer vorher festgelegten Abfolge abgearbeitet werden. Trägt man die so erhaltenen Daten wie in Abb. 7.8 auf, so können diese unmittelbar interpretiert und auf grundsätzliche Plausibilität geprüft werden.

¹bezogen auf den Messbereich der hier beschriebenen Apparatur mit 150 MHz FSR

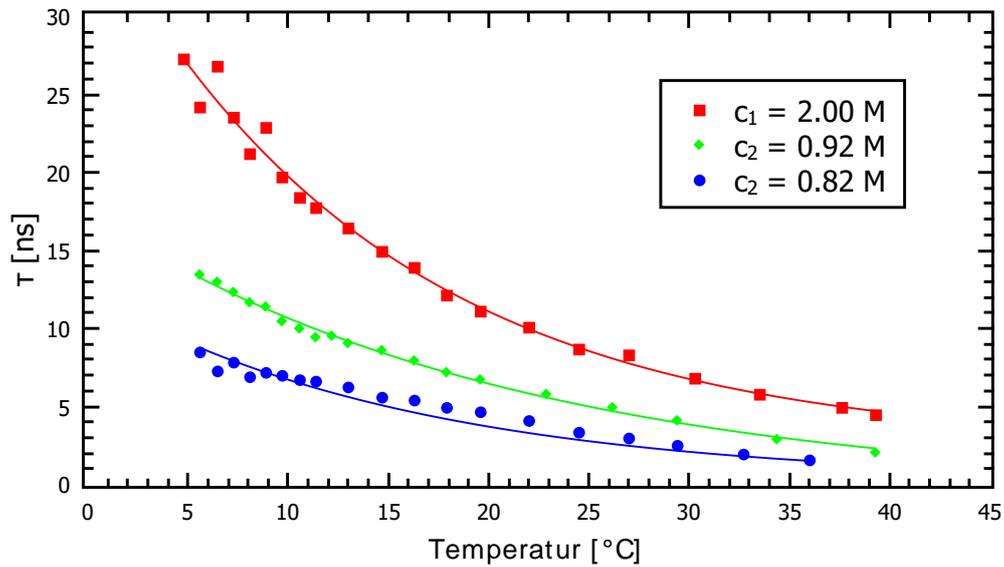


Abbildung 7.8: Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate von äquimolaren Mischungen 5'-AMP/5'UMP bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Bei Messungen mit einem 750 MHz FPI an einer äquimolaren Mischung von 5'-AMP/5'-UMP wurde bei hohen Konzentrationen eine langsame Diffusionskomponente beobachtet [25].

Abb. 7.8 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate, bei drei unterschiedlichen Konzentrationen ($c_1 = 2.0$ M, $c_2 = 0.92$ M, $c_3 = 0.82$ M) die mit dem aktuellen Versuchsaufbau vermessen wurde. Grundsätzlich erscheinen die Messergebnisse schlüssig, unabhängig davon, welcher Mechanismus letztlich für die Bildung von Aggregatstrukturen verantwortlich ist: Eine Erhöhung der Konzentration führt zu langsameren Relaxationsraten, was für ein Anwachsen von Aggregatstrukturen spricht. Die Temperaturabhängigkeit folgt dem erwarteten Verlauf, der in Abb. 7.9 in Form eines Arrheniusgraphen dargestellt ist. Tabelle 7.3 zeigt die gefundenen Diffusionskoeffizienten im Vergleich zur Literatur. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit [25] ist nicht möglich, da die Linienbreite auf halber Höhe bei einer Konzentration von $c = 0.40$ M bereits über 100 MHz betragen würde. Diese relativ langsamen Reorientierungszeiten lassen sich mit einem Interferometer mit einem FSR von 150 MHz nicht verfolgen, weil sich die Spektren eines Rampensweeps überlagern würden und dies zu einer Verfälschung der Halbwertsbreite führen würde.

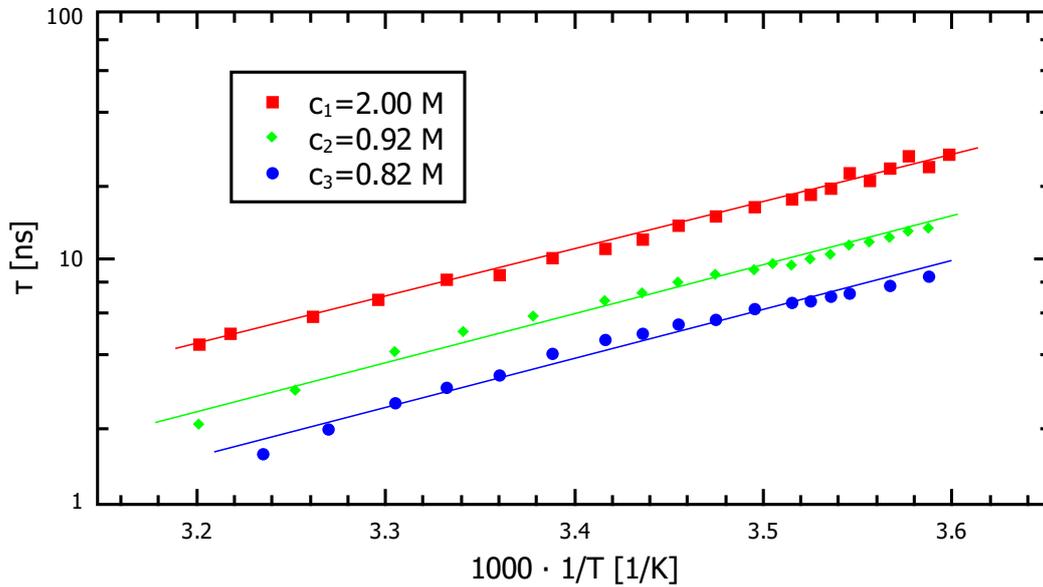


Abbildung 7.9: Arrheniusgraph der äquimolaren Mischungen 5'-AMP/5'-UMP bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Tabelle 7.3: Rotations-Diffusionskoeffizienten Θ_R in $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen,[†] sind extrapolierte Werte; gemessen mit simultaner Detektion

	10 °C	20 °C	40 °C
5'-AMP / 5'-UMP $c = 0.92 \text{ M}$	15.66	25.68	80.12 [†]
5'-AMP / 5'-UMP $c = 0.777 \text{ M}$	25.76	33.37	–
5'-AMP / 5'-UMP[25] $c = 0.40 \text{ M}$	33	55	138

Kurze Ribonukleinsäuren, z.B. tRNA eignen sich wegen ihrer geringen Größe ebenfalls zur Untersuchung mit dieser Lichtstreuapparatur. Patkowski, Eimer und Dorfmueller [15] führten entsprechende Messungen mit einem 750 MHz FPI durch. Wegen dem geringeren Auflösungsvermögen einer solchen Apparatur ist es allerdings nicht möglich, die Dynamik einer solchen Lösung unterhalb von 20 °C zu verfolgen, da die Linienbreite des Signals außerhalb des Messbereichs liegt.

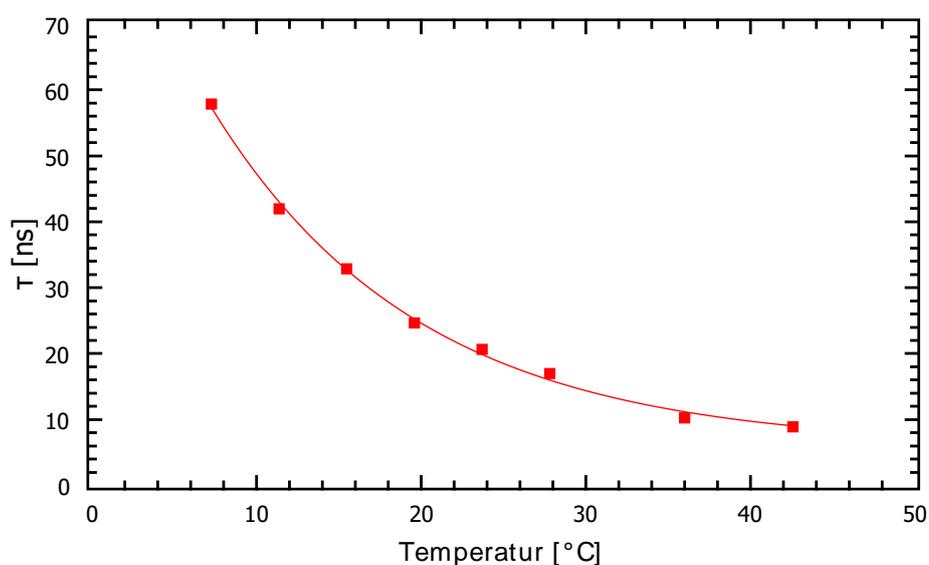


Abbildung 7.10: Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate von tRNA (Hefe) bei einer Konzentration von 80 mg/ml.

In Abb. 7.10 ist das Temperaturverhalten der Relaxationszeit von tRNA aus Hefe in einer Konzentration von 80 mg/ml dargestellt. Es zeigt sich, dass der hier beschriebene Versuchsaufbau mit einem 150 MHz cFPI sehr gut geeignet ist um das Diffusionsverhalten solcher Strukturen wie sie in tRNA vorkommen über einen Temperaturbereich von 10 – 40 °C zu charakterisieren. Tabelle 7.4 zeigt einen Vergleich zur Literatur.

Tabelle 7.4: Rotations-Diffusionskoeffizienten Θ_R in $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ gemessen mit simultaner Detektion

	10 °C	20 °C	24 °C	40 °C
tRNA ^{phe} (Hefe) <i>c</i> = 80 mg/ml	3.55	6.97	8.33	17.13
tRNA ^{val} (e. coli)[72] <i>c</i> = 54 mg/ml	–	7.23	–	–
tRNA ^{phe} (Hefe)[15] <i>c</i> = 75 mg/ml	–	–	9.97	–

7.3 Adenosin-5' Monophosphat / Cytidin-5' Monophosphat

Im folgenden Abschnitt wird das Aggregationsverhalten von äquimolaren Mischungen aus Adenosin-5' Monophosphat / Cytidin-5' Monophosphat in Lösung näher untersucht. Eimer und Dorfmueller stellten fest [25], dass die Mononukleotide 5'-AMP und 5'-CMP eine geringere Tendenz zur Eigenaggregat Bildung aufweisen als 5'-GMP. In diesem Abschnitt wird untersucht, ob es mit dem entwickelten Aufbau möglich ist, die entstehenden Strukturen näher zu charakterisieren. Es stellt sich die Frage ob Mischaggregate entstehen, oder ob jeweils Aggregate der Reinstoffe 5'-AMP und 5'-CMP gebildet werden. Eine Möglichkeit der Aggregatbildung sind vertikale Stapel aus A-C Dimeren.

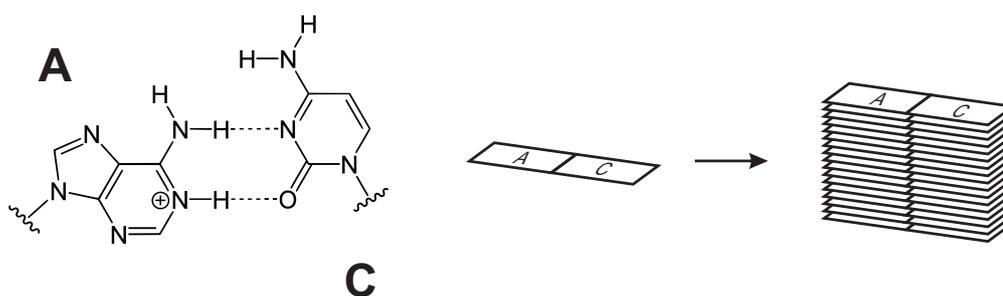
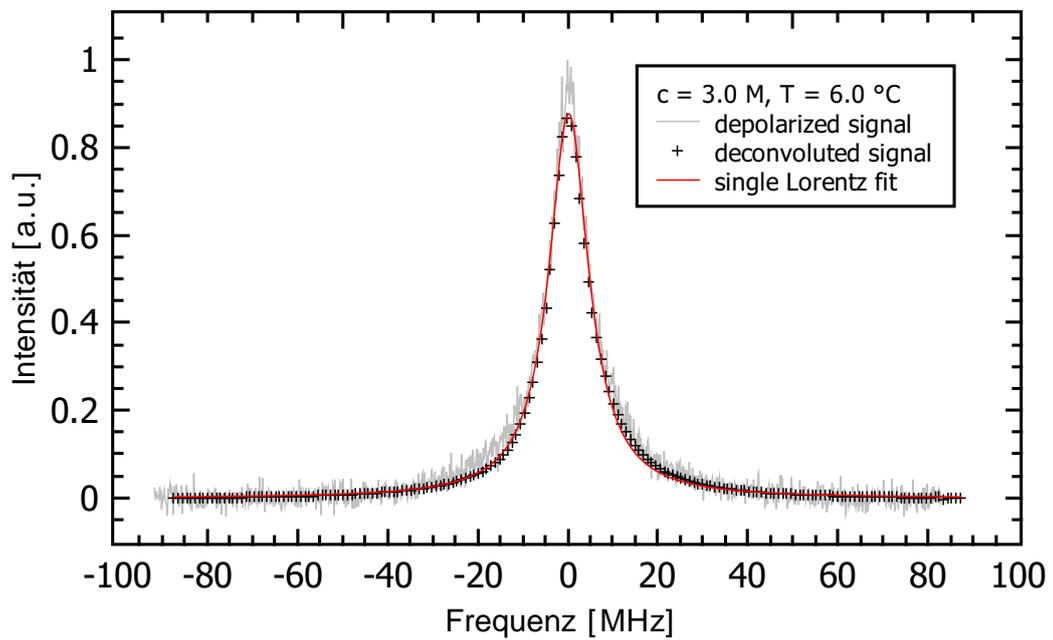
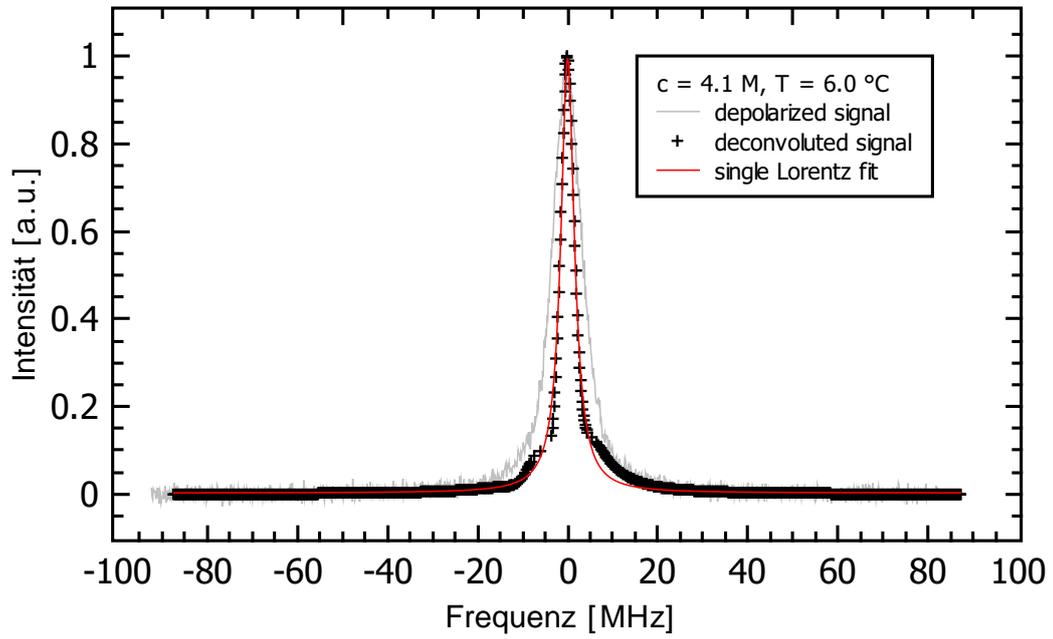


Abbildung 7.11: Stapelbildung von A-C Wobble Paaren ist denkbar

Es wird daher auf die Temperaturabhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit der Reorientierungsrelaxation eingegangen, die mit der vorgestellten Apparatur, der frequenz aufgelösten DDLs (FPI) ermittelt wurde. Die Ergebnisse können Rückschlüsse auf Form und Größe der Aggregate geben.

7.3.1 Temperaturabhängige Messungen

Die Temperaturabhängigkeit der Rotationsrelaxationszeit ist in Abb. 7.13 für vier unterschiedliche Konzentrationen ($c_1 = 4.1$ M, $c_2 = 3.0$ M, $c_3 = 2.5$ M, $c_4 = 1.5$ M) aufgetragen. Die Relaxationsraten steigen erwartungsgemäß für niedrige Temperaturen.



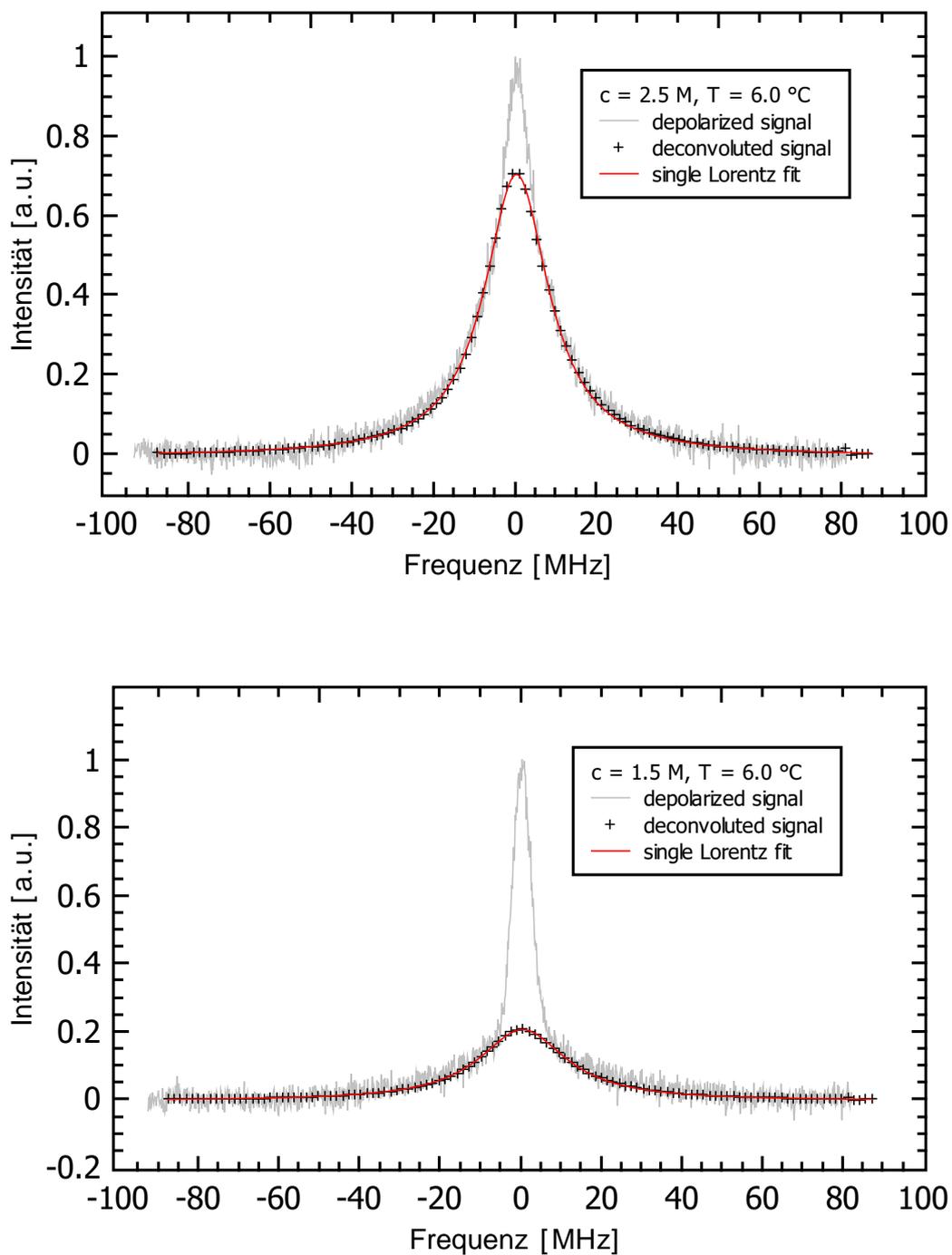


Abbildung 7.12: Depolarisierte Streuspektren und 5'-AMP/5'-CMP ($c = 1.5$ bis 4.1 M , $T = 6.0 \text{ }^\circ\text{C}$, grau) und Anpassung von einzelnen Lorentzfunktionen (rote Linie) an die jeweilige Entfaltung (schwarz).

Eine Erhöhung der Konzentration führt zu generell langsameren Reorientierungen. Die Konzentrationsabhängigkeit wird im nächsten Abschnitt näher dargestellt. Im folgenden Graphen äußert sich die eigentliche Stärke der Apparatur, da eine Reorientierungszeit von ca. $\tau = 90$ ns einer Linienbreite von nur ca. $\Gamma = 3.5$ MHz entspricht. Dennoch kann ohne das Interferometer tauschen zu müssen, auch die schnellere Dynamik bei hohen Temperaturen/niedrigen Konzentrationen ($\tau \leq 5$ ns, bzw. $\Gamma \geq 64$ MHz) beobachtet werden. Die durchgezogenen Linien dienen in den folgenden Graphen lediglich als Orientierungshilfe.

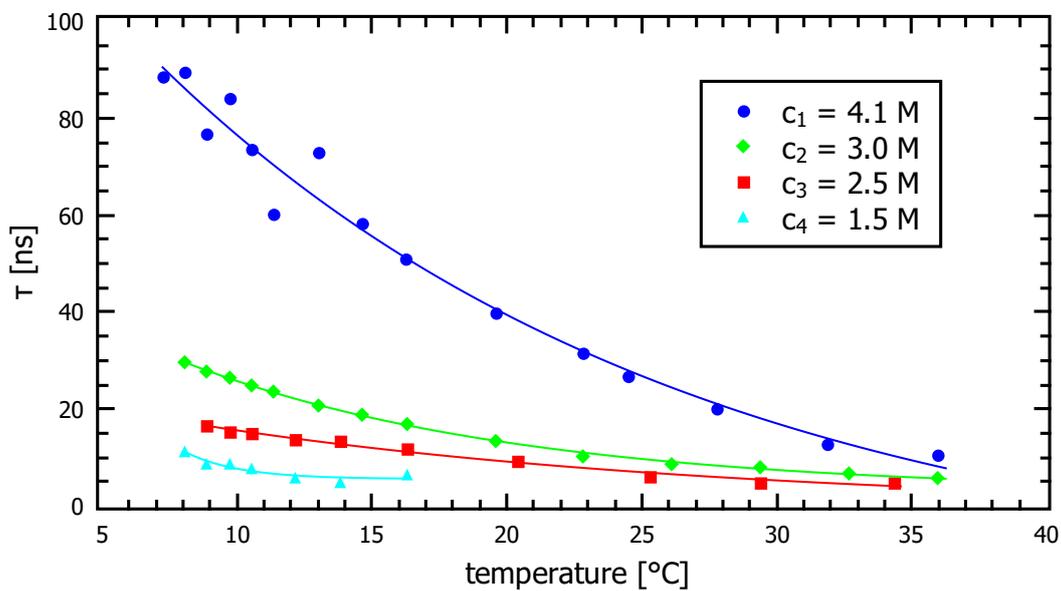


Abbildung 7.13: Reorientierungszeiten von äquimolaren Mischungen von 5'-AMP / 5'-CMP in Abhängigkeit der Temperatur bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Integrationszeit für einen Datenpunkt liegt zwischen 25 Minuten (4.1 M/6 °C) und 11 Stunden (1.5 M/16 °C) bei vergleichbarem Signal/Rauschabstand. Diese starke Temperaturabhängigkeit der Intensität ist in Abb. 7.14 halblogarithmisch dargestellt. Es wird deutlich, dass die Intensität mit steigender Temperatur exponentiell abfällt. Die starke Abhängigkeit der Intensität von der Konzentration wird im nächsten Abschnitt, Abb. 7.17 gezeigt. Das spezifische Aggregationsverhalten von 5'-GMP [13], nämlich einer Änderung der Stapelanordnung zeigt sich u.A. auch in Form einer stufenartigen Intensitätserhöhung. Eine derartig sprunghafte Änderung ist bei der Mischung 5'-AMP/5'-CMP nicht zu beobachten. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass in dem beobachteten Temperaturbereich von ca. 5–45 °C kein Wechsel des Aggregationsmechanismus stattfindet.

Außerdem können alle Spektren mit einer einzelnen Lorentzfunktion angepasst werden (Vgl. Abb. 7.12). Vereinzelt existieren zwar schnellere Komponenten im depolarisierten Spektrum², deren Temperaturabhängigkeiten allerdings nicht dem Arrhenius-Verhalten folgen und somit keinem Relaxationsprozess zuzuordnen sind. Demnach liegt bei der Mischung 5'-AMP/5'-CMP lediglich nur ein einzelner Reorientierungsprozess vor. Diese Beobachtung wird im nächsten Abschnitt bestätigt (vgl. 7.4).

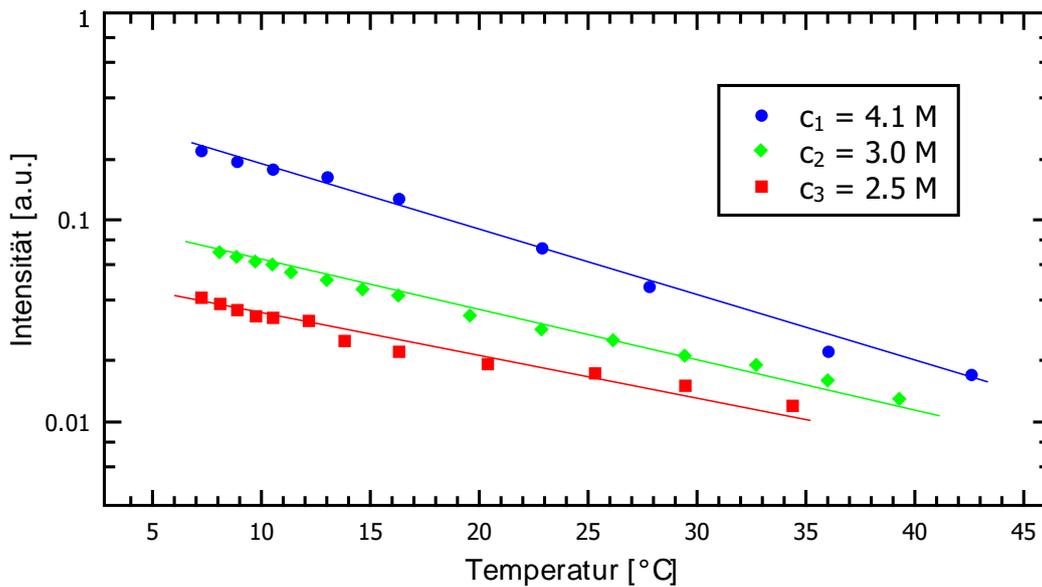


Abbildung 7.14: Intensität in Abhängigkeit der Temperatur von 5'-AMP/5'-CMP bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Bei einer Auftragung von τ gegen η_0/T kann direkt das hydrodynamische Volumen abgelesen werden (vgl. auch Abschnitt 2.4). Hierbei ist η_0 die Viskosität des Lösungsmittels. In einem sog. Stokes-Einstein-Debye Graphen (SED) sollte demnach die Reorientierungszeit ein lineares Verhalten zeigen, wenn tatsächlich ein diffusiver Vorgang vorliegt.

$$\tau = \frac{V_h}{k_B} \cdot \frac{\eta_0}{T} + \tau_0 \quad (7.3)$$

Demnach ist in Abb. 7.15 die Reorientierungszeit entsprechend aufgetragen und es zeigt sich erwartungsgemäß für alle Konzentrationen ein linearer Zusammenhang. Eine Übersicht über die resultierenden hydrodynamischen Volumina ist in Tabelle 7.5 gegeben.

²dies äußert sich in der Überlagerung einer schmalen Lorentzlinie

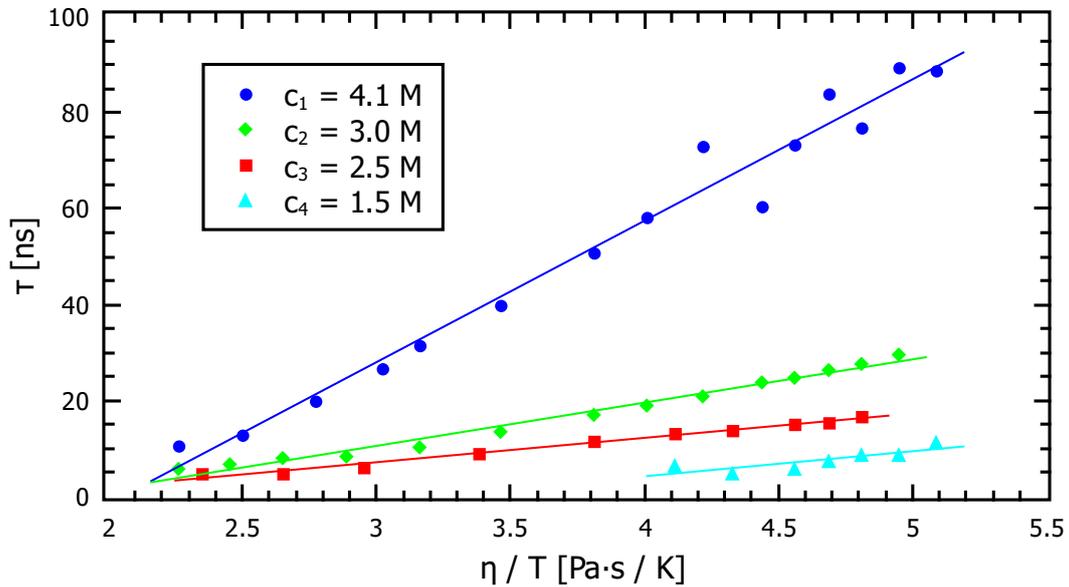


Abbildung 7.15: Stokes-Einstein-Debye (SED) - Plot für unterschiedliche Konzentrationen von 5'-AMP/5'-CMP. Aus den Steigungen lassen sich die hydrodynamischen Volumina bestimmen. $m_1(4.1 \text{ M}) = 29.45 \times 10^{-9} \frac{\text{K}}{\text{Pa}}$, $m_2(3.0 \text{ M}) = 9.01 \times 10^{-9} \frac{\text{K}}{\text{Pa}}$, $m_3(2.5 \text{ M}) = 5.08 \times 10^{-9} \frac{\text{K}}{\text{Pa}}$, $m_4(1.5 \text{ M}) = 5.22 \times 10^{-9} \frac{\text{K}}{\text{Pa}}$.

Tabelle 7.5: Hydrodynamische Volumina für unterschiedliche Konzentrationen von 5'-AMP/5'-CMP, die aus der Stokes-Einstein-Debye Auftragung ermittelt werden.

Konzentration c [mol/l]	Steigung m $1 \times 10^{-9} \left[\frac{\text{K}}{\text{Pa}} \right]$	hydrodynamisches Volumen V_H [Å ³]
4.1	29.45	406 000
3.0	9.01	124 000
2.5	5.08	70 000
1.5	5.22	72 000

7.3.2 Konzentrationsabhängigkeit

Neben temperaturabhängigen Messungen wurden auch drei Messreihen bei konstanter Temperatur ($T_1 = 8^\circ\text{C}$, $T_2 = 16^\circ\text{C}$, $T_3 = 20^\circ\text{C}$) durchgeführt. Die Konzentration der Mischung lag im Bereich von 1.5 M bis 4.1 M. Abb. 7.16 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Reorientierungszeit in halblogarithmischer Darstellung. Die Relaxationszeit steigt bei den drei Temperaturen stark mit der Konzentration an. Die durchgezogenen Linien stellen in den folgenden Graphen lediglich eine Trendlinie dar. Die starke nichtlineare Konzentrationsabhängigkeit zeigt sich auch bei der Betrachtung der Streuintensität. Diese nimmt ebenfalls stark mit der Konzentration zu. (vgl. halblogarithmische Darstellung 7.17).

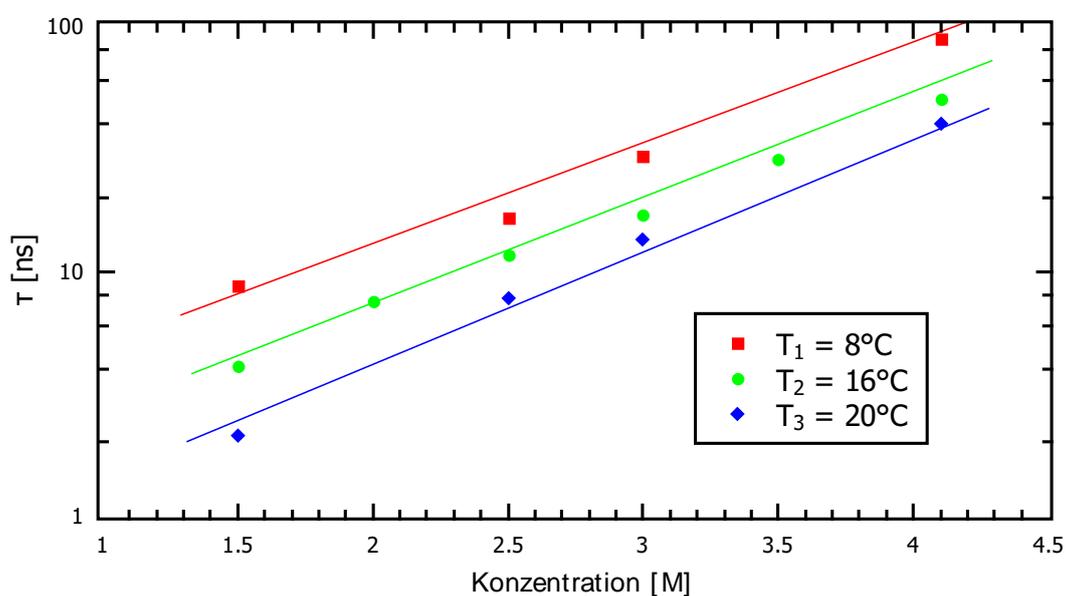


Abbildung 7.16: Konzentrationsabhängigkeit der Relaxationsrate von 5'-AMP/5'-CMP bei unterschiedlichen Temperaturen.

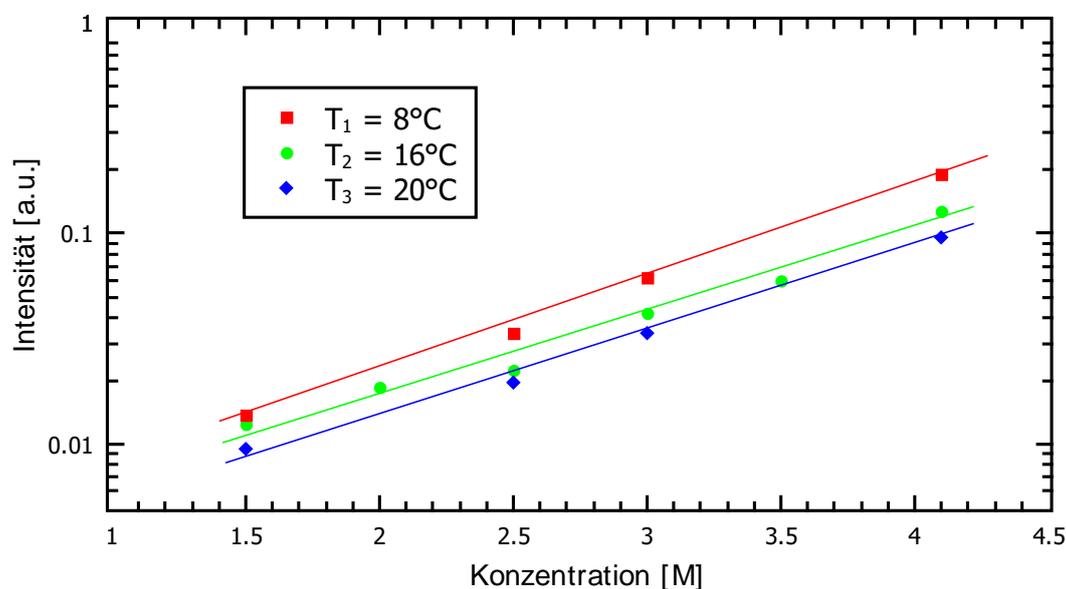


Abbildung 7.17: Konzentrationsabhängigkeit der Streuintensität von 5'-AMP/5'-CMP bei unterschiedlichen Temperaturen.

7.4 Photonenkorrelationspektroskopie an 5'-AMP/5'-CMP

Neben depolarisierten Messungen mit der frequenz aufgelösten Methode wurden auch polarisierte Lichtstreuexperimente in der Zeitdomäne zur Messung des Translationsdiffusionskoeffizienten D_T durchgeführt.

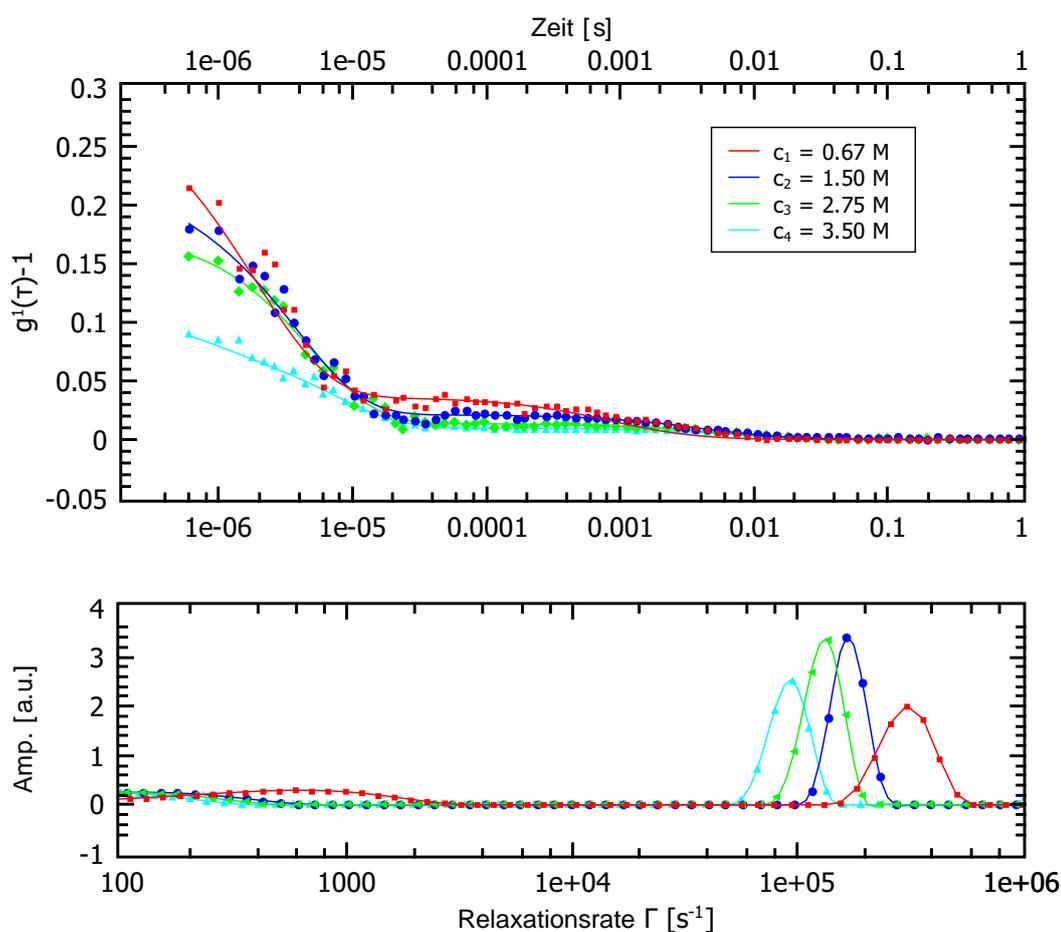


Abbildung 7.18: Autokorrelationsfunktionen und Relaxationsratenverteilung von PCS an 5'-AMP/5'-CMP bei unterschiedlichen Konzentrationen.

In Abb. 7.19 ist die Relaxationsrate Γ gegen das Quadrat des Streuvektorbetrages für vier unterschiedliche Konzentrationen $c_1 = 0.33 \text{ M}$, $c_2 = 1.50 \text{ M}$, $c_3 = 2.75 \text{ M}$ und $c_4 = 3.50 \text{ M}$ bei einer Temperatur von $T = 18.1 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgetragen. Die Steigung in diesem

Graphen entspricht nach

$$\Gamma = \frac{1}{\tau_r} = q^2 D_T \quad (7.4)$$

dem Translationsdiffusionskoeffizient [41]. Die Auswertung der Relaxationsratenverteilung (Abb. 7.18) zeigt, dass bei allen Konzentrationen nur ein einzelner maßgeblicher Relaxationsprozess vorhanden ist, sich die Autokorrelationsfunktion also mit einer einzelnen Exponentialfunktion anpassen lässt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen aus den depolarisierten Messungen. Die resultierenden Werte sind in Tabelle 7.6 aufgeführt.

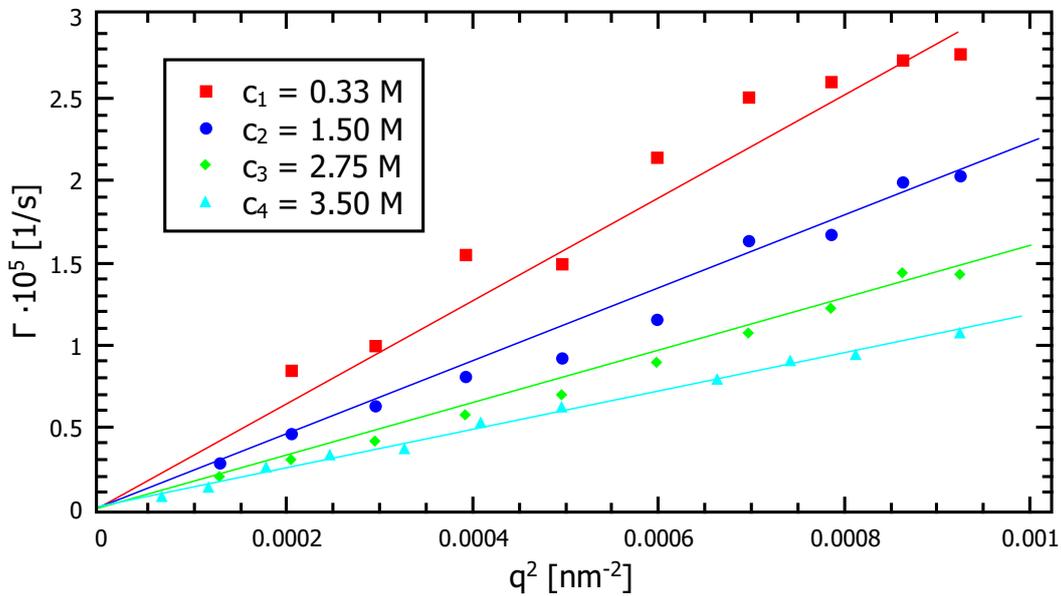


Abbildung 7.19: Bestimmung des Translationsdiffusionskoeffizienten D_T für unterschiedliche Konzentrationen aus der Steigung

Anders als bei den Messungen des depolarisierten Streulichtanteils besteht nur eine schwache Abhängigkeit der Intensität von der Probenkonzentration. Dieser Unterschied wird klar, wenn man berücksichtigt, dass die polarisierte Streulichtintensität

$$I^{VV} \propto \sum_i M_i \cdot P_i \quad (7.5)$$

im Wesentlichen von Molekulargewicht M_i und dem Strukturfaktor P_i der Partikel ab-

hängt [9], während die depolarisierte Streulichtintensität

$$I^{VH} = N\beta^2(1 + fN) \frac{6\Theta}{6\Theta^2 + \omega^2}. \quad (7.6)$$

eine starke Abhängigkeit vom Paarkorrelationskoeffizienten f aufweist [35]. Abb. 7.20 verdeutlicht die unterschiedlichen Abhängigkeiten in einem normierten Diagramm.

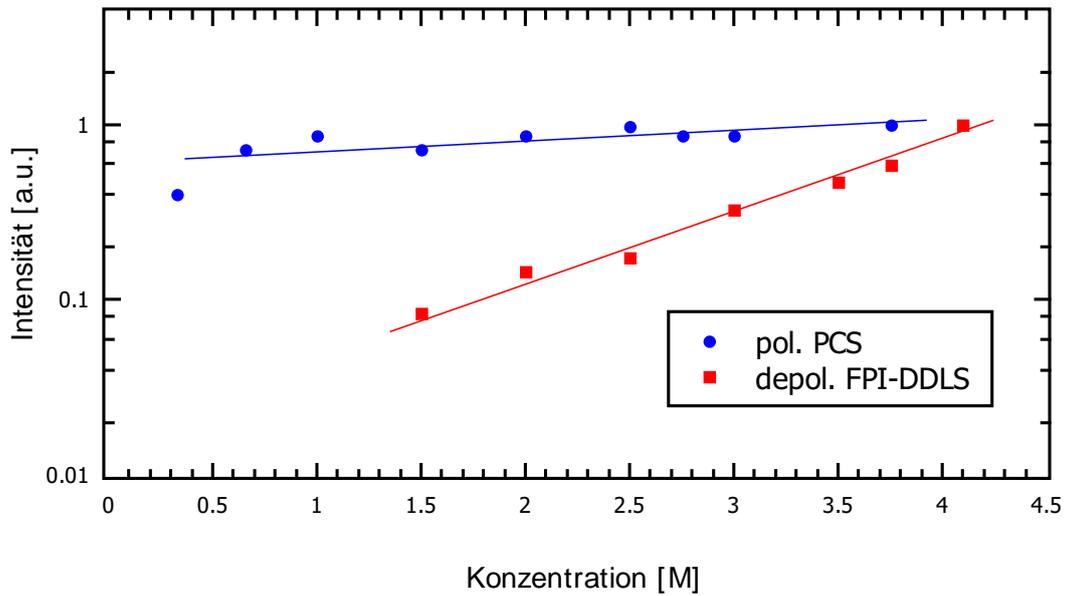


Abbildung 7.20: Unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeit der polarisierten und depolarisierten Streulichtintensität von 5'-AMP/5'-CMP

Tabelle 7.6: Translationsdiffusionskoeffizienten von 5'-AMP/5'-CMP für unterschiedliche Konzentrationen bei $T = 18.1\text{ }^\circ\text{C}$

	$c_1 = 0.33\text{ M}$	$c_2 = 1.50\text{ M}$	$c_3 = 2.75\text{ M}$	$c_4 = 3.50\text{ M}$
$D_T \cdot 10^{12} \left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right]$	290.2	217.5	155.0	119.4

7.5 Hydrodynamische Modellrechnung

Sind der Translations-Diffusionskoeffizient D_T und der Rotations-Diffusionskoeffizient Θ_R bekannt, so lassen sich mit Hilfe der Modelle nach Perrin und Tirado / Garcia de La Torre hydrodynamische Dimensionen bestimmen. Mit Hilfe der Gleichungen aus Abschnitt 2.4 können die Halbachsen a und b eines prolates Rotationsellipsoiden nach Perrin bzw. die Länge L und der Durchmesser d des Zylinders nach Tirado und Garcia de la Torre (vgl. Abb. 7.21) berechnet werden. Im Folgenden werden also die experimentellen Daten aus polarisierter und depolarisierter Lichtstreuung kombiniert, um eine Abschätzung der hydrodynamischen Dimension der stapelbildenden Monomere zu liefern. Dies wird exemplarisch für die Mischung 5'-AMP / 5'-CMP durchgeführt. Eine solche Betrachtung ist allerdings nur für freie Diffusion zulässig. Daher wird eine Extrapolation von D_T und Θ_R von $c \rightarrow 0$ durchgeführt und $D_{T,18.1^\circ\text{C}}$ mit Hilfe der SED-Gleichungen auf $D_{T,20^\circ\text{C}}$ interpoliert. Wegen der Vielzahl an Annahmen kann es sich bei der Berechnung der Aggregatstrukturdimensionen nur um eine Abschätzung handeln und soll hier lediglich als Plausibilitätsüberprüfung dienen.

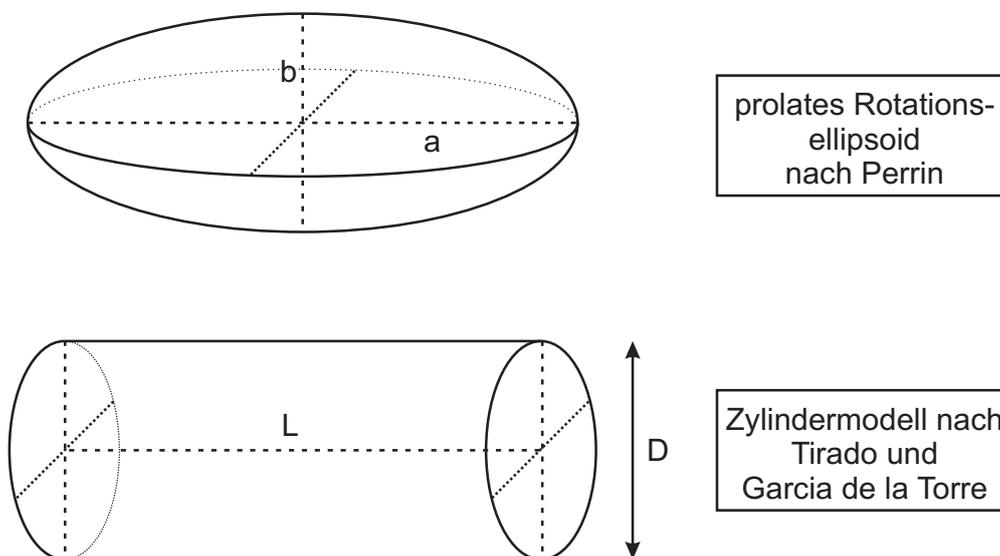


Abbildung 7.21: hydrodynamisches Rotationsellipsoid- und Zylindermodell nach Perrin bzw. Tirado und Garcia de la Torre

Die Abb. 7.22 und 7.23 zeigen den Rotations-bzw. Translations- Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Extrapolation der depolarisierten Messung

bei 20 °C für $c \rightarrow 0$ ergibt $\Theta_R = 360 \times 10^6$ 1/s. Da die polarisierte Messung bei $T = 18.1$ °C durchgeführt wurde, wird D_T durch

$$D_{T,20^\circ} = \frac{\eta_{18.1^\circ}}{\eta_{20^\circ}} \cdot \frac{293.15}{291.25} \cdot D_T \quad (7.7)$$

ersetzt. Die Extrapolation mit anschließender Korrektur ergibt $D_{T,20^\circ} = 314 \times 10^{-12}$ m²/s. Die Ergebnisse der Modellrechnungen sind in Tabelle 7.7 zusammengefasst.

Tabelle 7.7: Aggregatgrößen nach den Modellen von Perrin bzw. Tirado und Garcia de la Torre

Zylinder		prolates Ellipsoid	
$f(p)$	1.613	$S(\rho)$	1.603
p	1.643	ρ	0.453
L	15.6 Å	2a	21.9 Å
d	9.5 Å	2b	9.9 Å

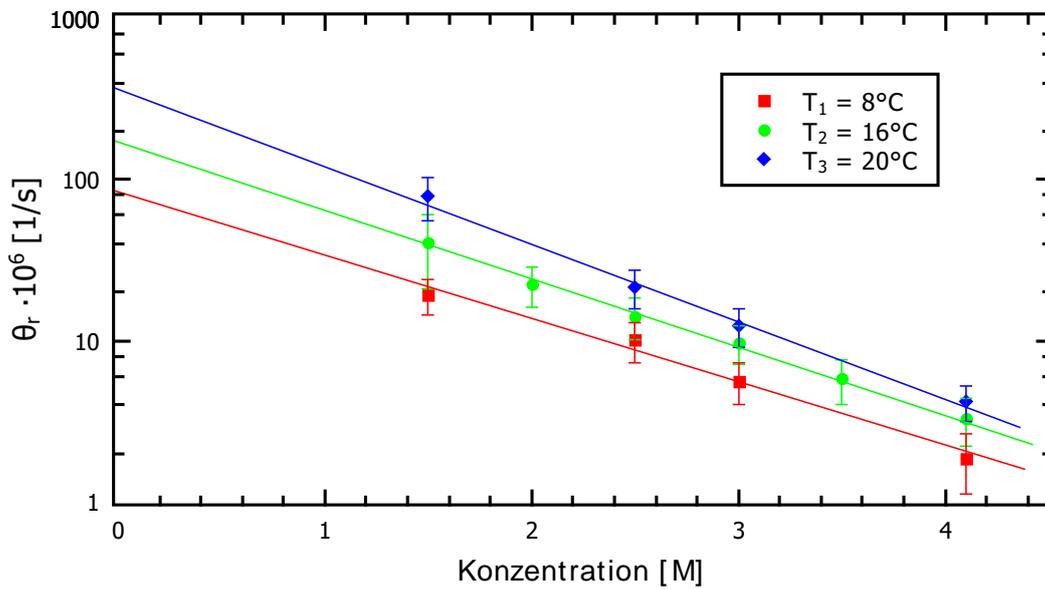


Abbildung 7.22: Extrapolation des Rotations-Diffusionskoeffizienten Θ_R bei unterschiedlichen Temperaturen zur Bestimmung der freien-Teilchen-Diffusion.

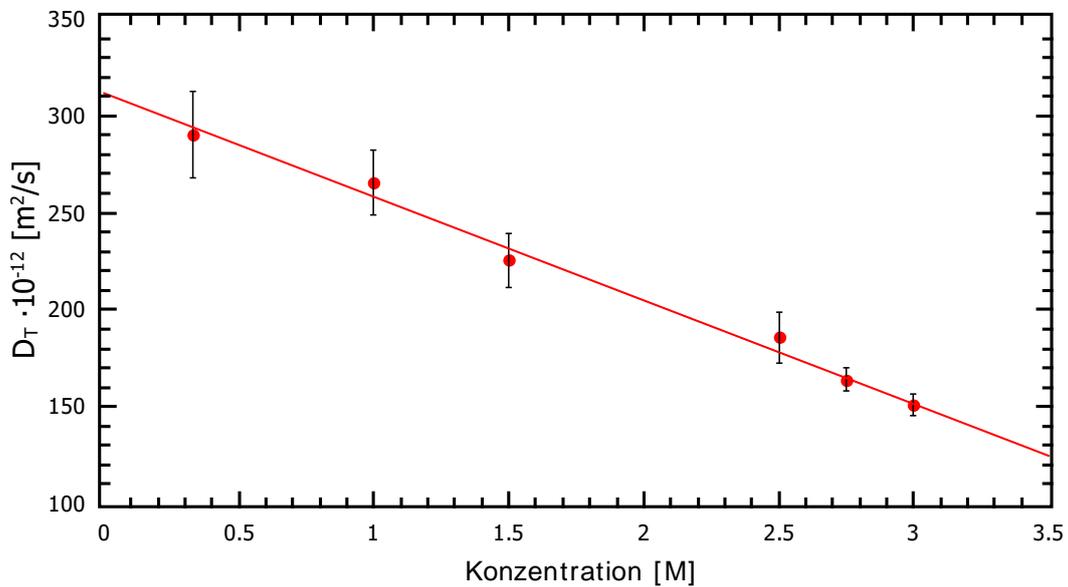


Abbildung 7.23: Extrapolation des Translationsdiffusionskoeffizienten D_T

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine depolarisierte Lichtstreuapparatur und die dazu notwendige Auswertesoftware entwickelt, mit der Reorientierungs-Relaxationsprozesse von Molekülen in Lösung im Zeitbereich von 1 – 150 ns aufgelöst werden können. Ein zentrales Problem besteht darin, das schwache depolarisierte Signal in Form eines Lorentzprofils aufzusummieren, ohne die Linie künstlich zu verbreitern. Um dies zu erreichen, wurden drei grundlegend unterschiedliche Ansätze untersucht bzw. entwickelt: Shutter-Methode, Aufbau mit akustooptischem Modulator und Simultandetektion.

Die Shutter-Methode entspricht einem etablierten Versuchsaufbau, der für Interferometer mit freiem Spektralabstand im GHz-Bereich Anwendung findet und mit den geringeren Spiegelabständen und höheren Transmissionen der planparallelen FPI gut funktioniert. Innerhalb eines Rampendurchlaufes wird mittels mechanischer Shutter zwischen Primärstrahl und Messsignal alterniert, um eine Referenz zu generieren, so dass die depolarisierten Spektren aufsummiert werden können. Das FPI mit 150 MHz FSR besitzt einen Spiegelabstand von 50 cm und ein Rampendurchlauf benötigt wegen den mechanischen Shuttern ca. 10 s. Es zeigt sich, dass dieser Aufbau sehr lange Integrationszeiten benötigt und zu anfällig für externe Störeinflüsse ist und somit für die vorliegende Problemstellung nicht geeignet ist.

Der Aufbau mit AOM ist ein vielversprechender Ansatz, um den Einfluss von Temperaturschwankungen, Frequenzdrifts des Lasers und mechanischen Schwingungen zu minimieren. Es wird dabei auf die mechanischen Shutter verzichtet, wodurch eine Rampendauer von 20 ms ermöglicht wird. Als Referenz für die Signalakkumulation wird das um 80 MHz frequenzverschobene gebeugte Licht 1. Ordnung des AOM verwendet, so dass eine feste Beziehung zwischen Referenzlinie und Messsignal besteht. Die vorliegenden Messungen zeigen jedoch, dass die relative Lage des Messsignals zum Referenzstrahl um bis zu ± 8 MHz schwankt. Dadurch kommt es auch bei dieser Methode zu einer künstlichen Linienverbreiterung des Messsignals.

Nur wenn das Referenzsignal und das Streulicht gleichzeitig erfasst werden, ist es aus-

geschlossen, dass sich Störeinflüsse durch Rampenfehler oder Vibrationen negativ auf die Aufsummierung auswirken. Die simultane Detektion von Referenzsignal und depolarisiertem Streulicht wird durch einen zweiten Photomultiplier ermöglicht. Ein stark abgeschwächter Teil des polarisierten Primärstrahls wird nach dem Streuprozess in den Strahlengang, versetzt zur optischen Achse des Messsignals, eingekoppelt und zusammen mit dem depolarisierten Streulicht frequenzanalysiert. Durch Blenden und einen zusätzlichen Polarisator wird eine Trennung der beiden Signale gewährleistet, die von den Photomultipliern gleichzeitig detektiert wurde.

Die rechnergestützte Signaldetektion und Weiterverarbeitung wird durch speziell für diesen Anwendungsfall entwickelte LabVIEW Routinen realisiert. Das Hauptprogramm `batch.vi` besteht aus unabhängigen Unterprogrammen zur Detektion, Anzeige, Filterung und Entfaltung der Daten sowie einer Ansteuerung des Thermostaten. Die wichtigsten Parameter sind durch eine graphische Benutzeroberfläche zugänglich.

Es wurde gezeigt, dass sich der Versuchsaufbau mit simultaner Detektion eignet, um die depolarisierten Rayleigh-Spektren von tRNA (aus Hefe), sowie die der Mischungen aus 5'-AMP/5'-UMP und 5'-AMP/5'-CMP bei unterschiedlichen Temperaturen zu verfolgen. Ein Vergleich bzw. Extrapolation der gemessenen Rotationsdiffusionskoeffizienten von tRNA sowie der Mischung aus 5'-AMP/5'-UMP mit Werten aus der Literatur erscheint plausibel. Die Änderung der Reorientierungszeiten der Mischung aus 5'-AMP/5'-CMP bei konstanter Konzentration ist linear in η_0/T . Dies lässt auf Stokes-Einstein-Debye Verhalten der rotierenden Aggregate schließen. Die aus der Steigung resultierenden Volumina der Aggregate steigen mit zunehmender Konzentration. Die Reorientierung der Aggregate wird mit steigender Konzentration deutlich langsamer. Die Streuintensität nimmt für niedrige Konzentrationen und hohe Temperaturen sehr stark ab. Die Reorientierungszeiten werden durch eine Entfaltung mit einer Lorentzlinie bestimmt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den entstehenden Strukturen um Mischaggregate handeln könnte. Zur Untersuchung der Translationsbewegung wurden PCS Messungen an der Mischung 5'-AMP/5'-CMP bei $T = 18\text{ °C}$ bei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. In einem Konzentrationsbereich von 0.33 bis 3.5 M liegt der Translationsdiffusionskoeffizient D_T zwischen 290 und $120 \times 10^{12}\text{ m}^2/\text{s}$.

Verknüpft man die Rotations-Diffusionskoeffizienten, die mit der hier beschriebenen depolarisierten dynamischen Lichtstreuanlage gefunden wurden mit den Ergebnissen der polarisierten DLS so kann auf die Form und die Größe der Aggregate der Mischung von 5'-AMP/5'-CMP geschlossen werden. Eine solche Berechnung basiert auf einer Extrapo-

lation der Messdaten für Θ_R und D_T für $c \rightarrow 0$ und kann daher nur als grobe Abschätzung dienen. Geht man von einer zylindrischen Hülle aus, so ergibt sich bei einer Temperatur von $T = 20^\circ\text{C}$ Rotationsellipsoide mit $2a = 21.9 \text{ \AA}$ und $2b = 9.9 \text{ \AA}$.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mit der beschriebenen simultanen Messmethode, das dynamische Verhalten von durch self-assembly entstehenden Strukturen in Lösung in einem bisher für Lichtstreuuanwendungen schwer zugänglichen Bereich zu verfolgen und Aussagen über deren Größe zu treffen.

Abkürzungen

DLS dynamische Lichtstreuung

DDLS depolarisierte dynamische Lichtschreuung

PCS photon correlation spectroscopy

VH vertikal-horizontal

VV vertikal-vertikal

SE Stokes-Einstein

SED Stokes-Einstein-Debye

AMP Adenosinmonophosphat

GMP Guanosinmonophosphat

CMP Cytidinmonophosphat

UMP Uridinmonophosphat

TMP Thymidinmonophosphat

cFPI (konfokales) Fabry-Perot Interferometer

PZT Piezo Translator

FSR Freier Spektralbereich

AOM Akustooptischer Modulator

ND Graufilter

BS Strahlteiler

GP Glan Polarisator

GTP Glan-Thomson Polarisator

PMT Photomultiplier tube

c.w. continuous wave

HWHM half width at half maximum (halbe Halbwertsbreite)

FWHM full width at half maximum (Halbwertsbreite)

SNR Signal/Rausch Verhältnis

VI LabVIEW virtuelles Instrument

GUI graphische Benutzeroberfläche

Abbildungsverzeichnis

2.1	Definition des Streuvektors	5
3.1	Aufbau von Nukleotiden	15
3.2	Aggregationsverhalten von 5'-GMP	16
3.3	Kleeblattstruktur von tRNA	17
4.1	Beidseitig verspiegelte Glasplatte, ein sog. Fabry-Perot Etalon	19
4.2	Transmissionsspektren eines Fabry-Perot Interferometers	21
4.3	Konfokales Fabry-Perot Interferometer	21
4.4	Auswirkung auf den Strahlengang in FPI und cFPI	22
4.5	Prinzipielle Funktionsweise eines akustooptischen Modulators	25
4.6	Versuchsaufbau nach Eimer et al.	27
4.7	Darstellung einer Einzelmessung mit der Shutter-Methode	29
4.8	Aufbau mit Akusto-Optischem Modulator (AOM)	30
4.9	Schematische Darstellung des Messprinzips mit AOM	31
4.10	Aufbau mit simultaner Detektion	32
4.11	Darstellung des Auskoppelspiegels des FPI	34
4.12	Messmethode mit simultaner Detektion	35
4.13	Aufbau der Lichtstreuanlage mit zwei Detektoren	35
4.14	Darstellung des Photonenkorrelationsspektrometers	37
5.1	Prinzip der Datenflussprogrammierung	40
5.2	Frontpanel des Hauptprogrammes <code>batch.vi</code>	41
5.3	Eingabemaske "accumulation"	41
5.4	Eingabemaske "sample"	42
5.5	Eingabemaske "temperature"	43
5.6	Eingabemaske "filter"	44
5.7	Eingabemaske "depolarized and reference"	45

5.8	Flussdiagramm zum LabView Programm <code>batch.vi</code>	46
5.9	Flussdiagramm vom Unterprogramm <code>filter.vi</code>	47
5.10	Flussdiagramm von <code>t-control.vi</code>	48
5.11	Frontpanel von <code>shiftconf.vi</code>	49
5.12	Vergleich von numerischer und analytischer Entfaltung	51
6.1	Depolarisiertes Streuspektrum von 5'-AMP/5'-CMP ($c=4.1$ M, $T=22.8$ °C)	53
6.2	Depolarisiertes Streuspektrum von 5'-GMP ($T = 23$ °C)	54
6.3	PCS-Messung von 5'-AMP/5'-CMP ($c=2$ M, $T=18.1$ °C)	56
6.4	Auftragung der mittels CONTIN gefundenen Relaxationsraten	57
7.1	Fehlüberlagerungen bei Maxima höherer Ordnung (Shutter)	59
7.2	Beispielhafte Akkumulation von vier Einzelmessungen (AOM)	60
7.3	Entwicklung der Halbwertsbreite mit steigender Anzahl an Akkumulatio- nen (AOM)	61
7.4	Simultane Detektion von Referenzstrahl und dem Messsignal	62
7.5	Vergleich der Halbwertsbreitenentwicklung	63
7.6	Vergleich mit 1.5 GHz FPI	64
7.7	Depolarisiertes Streuspektren von 5'-AMP/5'-UMP und tRNA	66
7.8	Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate (5'-AMP/5'-UMP)	68
7.9	Arrheniusgraph (5'-AMP/5'-UMP)	69
7.10	Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate (tRNA)	70
7.11	Wobble Basenpaar	72
7.12	Depolarisierte Streuspektren von 5'-AMP/5'-CMP	74
7.13	Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate (5'-AMP/5'-CMP)	75
7.14	Temperaturabhängigkeit der Intensität (5'-AMP/5'-CMP)	76
7.15	SED-Plot (5'-AMP/5'-CMP)	77
7.16	Konzentrationsabhängigkeit der Relaxationsrate (5'-AMP/5'-CMP)	79
7.17	Konzentrationsabhängigkeit der Intensität (5'-AMP/5'-CMP)	79
7.18	PCS Messung an 5'-AMP/5'-CMP	80
7.19	polarisierte PCS (5'-AMP/5'-CMP)	81
7.20	Vergleich PCS-DDLS (Konzentrationsabhängigkeit)	82
7.21	Rotationsellipsoid- und Zylindermodell	83
7.22	Extrapolation des Rotations-Diffusionskoeffizienten Θ_R	85
7.23	Extrapolation des Translationsdiffusionskoeffizienten D_T	85

Tabellenverzeichnis

1.1	Einordnung der Methode	2
4.1	Die wichtigsten Kenngrößen von Fabry-Perot Interferometern	23
4.2	Übersicht über die verwendeten Proben	38
6.1	Einfluss der Entfaltung auf schmale und breite Linienprofile	55
7.1	Frequenzlagen der Maxima einer Einzelmessung	65
7.2	Typische Messdauern	65
7.3	Rotations-Diffusionskoeffizienten	69
7.4	Rotations-Diffusionskoeffizienten	71
7.5	hydrodyn. Volumina aus SED-Plot (5'-AMP/5'-CMP)	78
7.6	Translationsdiffusionskoeffizienten von 5'-AMP/5'-CMP	82
7.7	hydrodyn. Dimensionen nach Zylinder bzw. Ellipsoidmodell	84

Literaturverzeichnis

- [1] STEFFEN, W. ; PATKOWSKI, A. ; MEIER, G. ; FISCHER, E. W.: Depolarized dynamic light scattering studies of ortho-terphenyl dynamics above T_g. In: *J. Chem. Phys.* 96 (1992), S. 4171
- [2] HERCHER, Michael: The Spherical Mirror Fabry-Perot Interferometer. In: *Appl. Opt.* 7 (1968), May, Nr. 5, S. 951–966
- [3] SAXENA, Antariksh ; TRIPATHI, RM ; SINGH, RP: Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity. In: *Dig J Nanomater Bios* 5 (2010), April - June, Nr. 2, S. 427 – 432
- [4] KRATZ, Karl ; HELLWEG, Thomas ; EIMER, Wolfgang: Structural changes in PNIPAM microgel particles as seen by SANS, DLS, and EM techniques. In: *Polymer* 42 (2001), July, Nr. 15, S. 6631–6639
- [5] MURDOCK, Richard C. ; BRAYDICH-STOLLE, Laura ; SCHRAND, Amanda M. ; SCHLAGER, John J. ; HUSSAIN, Saber M.: Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. In: *Toxicological sciences* 101 (2008), Nr. 2, S. 239–253
- [6] FERRÉ-D'AMARÉ, Adrian R. ; BURLEY, Stephen K.: Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. In: *Methods in enzymology* (1997)
- [7] HELLWEG, T. ; DEWHURST, C. D. ; BRÜCKNER, E. ; KRATZ, K. ; EIMER, W.: Colloidal crystals made of poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles. In: *Colloid and Polymer Science* 278 (2000), Nr. 10, S. 972–978. – ISSN 0303–402X
- [8] BERNE, Bruce J. ; PECORA, Robert: *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Dover Publications, 2000

-
- [9] PECORA, R.: *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. Springer, 1985
- [10] LEHNER, D. ; LINDNER, H. ; GLATTER, O.: Determination of the Translational and Rotational Diffusion Coefficients of Rodlike Particles Using Depolarized Dynamic Light Scattering. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 1689–1695
- [11] EIMER, Wolfgang ; WILLIAMSON, James R. ; BOXER, Steven G. ; PECORA, Robert: Characterization of the overall and internal dynamics of short oligonucleotides by depolarized dynamic light scattering and NMR relaxation measurements. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 3, S. 799–811
- [12] EIMER, Wolfgang ; PECORA, R.: Rotational and translational diffusion of short rodlike molecules in solution: oligonucleotides. In: *J. Chem. Phys.* 94 (1991), Nr. 3, S. 2324–2329
- [13] EIMER, W. ; DORFMÜLLER, T.: Self-aggregation of guanosine 5'-monophosphate, studied by dynamic light scattering techniques. In: *J. Phys. Chem.* 96 (1992), S. 6790–6800
- [14] BOLTEN, M. ; NIERMANN, M. ; EIMER, W.: Structural Analysis of G-DNA in Solution: A Combination of Polarized and Depolarized Dynamic Light Scattering with Hydrodynamic Model Calculations. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 38, S. 12416–12423
- [15] PATKOWSKI, A ; EIMER, W ; DORFMÜLLER, Th: Internal dynamics of tRNAPhe studied by depolarized dynamic light scattering. In: *Biopolymers* 30 (1990), Nr. 9-10, S. 975–983
- [16] PATKOWSKI, A. ; EIMER, W. ; DORFMUELLER, Th.: A Polarized and Depolarized Dynamic Light Scattering Study of the tRNA Conformation in Solution. In: *Biopolymers* 30 (1990), S. 93–105
- [17] PATKOWSKI, A. ; EIMER, W. ; SEILS, J. ; SCHNEIDER, G. ; JOCKUSCH, B. M. ; DORFMÜLLER, Th.: The molecular dimensions of G-actin in solution as studied by dynamic light scattering. In: *Biopolymers* 30 (1990), Nr. 13-14, S. 1281–1287. – ISSN 1097–0282

- [18] HABER-POHLMEIER, S. ; EIMER, W.: Depolarized dynamic light scattering in the nanosecond time range: analyzing rotational motion of B- and Z-DNA in solution. In: *J. Phys. Chem.* 97 (1993), April, Nr. 13, S. 3095–3097
- [19] DUBIN, Stuart B. ; CLARK, Noel A. ; BENEDEK, George B.: Measurement of the Rotational Diffusion Coefficient of Lysozyme by Depolarized Light Scattering: Configuration of Lysozyme in Solution. In: *J. Chem. Phys.* 54 (1971), S. 5158
- [20] ALMS, G.R. ; BAUER, D.R. ; BRAUMANN, J.I. ; PECORA, R.: Depolarized Rayleigh scattering and orientational relaxation of molecules in solution. I. Benzene, toluene, and paraxylene. In: *J. Chem. Phys.* 58 (1972), S. 5570
- [21] ALMS, G.R. ; BAUER, D.R. ; BRAUMANN, J.I. ; PECORA, R.: Depolarized Rayleigh scattering and orientational relaxation of molecules in solution. II Chloroform and nitrobenzene. In: *J. Chem. Phys.* 59 (1973), Nr. 10, S. 5310–5320
- [22] BAUER, D. R. ; ALMS, G. R. ; BRAUMAN, J. I. ; PECORA, R.: Depolarized Rayleigh scattering and ¹³C NMR studies of anisotropic molecular reorientation of aromatic compounds in solution. In: *J. Chem. Phys.* 61 (1974), Nr. 6, S. 2255–2261
- [23] STUART, HA ; VOLKMANN, H: Über den Zusammenhang zwischen der Anisotropie der optischen Polarisierbarkeit und der geometrischen Struktur eines Moleküls. In: *Zeitschrift für Physik* 80 (1933), Nr. 1-2, S. 107–124
- [24] PERRIN, Francis: Mouvement brownien d'un ellipsoïde - I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales. In: *J. Phys. Radium* 5 (1934), S. 497–511
- [25] EIMER, W. ; DORFMÜLLER, T.: Interaction of the complementary mononucleotides in aqueous solution. In: *J. Phys. Chem.* 96 (1992), S. 6801–6804
- [26] TIRADO, Maria M. ; TORRE, Jose G. l.: Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders. In: *J. Chem. Phys.* 73 (1980), S. 1986–1993
- [27] TIRADO, Maria M. ; TORRE, Jose G. l.: Translational friction coefficients of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders. In: *J. Chem. Phys.* 71 (1979), Nr. 6, S. 2581–2587

-
- [28] TORRE, Jose G. I. ; MARTINEZ, Maria C. L.: Dimensions of Short, Rodlike Macromolecules from Translational and Rotational Diffusion Coefficients. Study of the Gramicidin Dimer. In: *Biopolymers* 23 (1984), S. 611–615
- [29] TORRE, Jose G. I. ; BLOOMFIELD, Victor A.: Hydrodynamic properties of complex, rigid, biological macromolecules: theory and applications. In: *Q. Rev. Biophys.* 14 (1981), S. 81–139
- [30] ALDER, B. J. ; ALLEY, W. E. ; POLLOCK, E. L.: Validity of Macroscopic Concepts for Fluids on a Microscopic Scale. In: *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 85 (1981), Nr. 11, S. 944–952. – ISSN 0005–9021
- [31] LANGOWSKI, Jörg ; GIESEN, Ursula: Configurational and dynamic properties of different length superhelical DNA measured by dynamic light scattering. In: *Biophysical Chemistry* 34 (1989), Nr. 1, S. 9 – 18. – ISSN 0301–4622
- [32] WONG, Alan ; IDA, Ramsey ; SPINDLER, Lea ; WU, Gang: Disodium Guanosine-Monophosphate Self-Associates into Nanoscale Cylinders at pH 8: A Combined Diffusion NMR Spectroscopy and Dynamic Light Scattering Study. In: *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005), Nr. 19, S. 6990–6998. – PMID: 15884942
- [33] BOLTEN, M.: *Struktur und Dynamik telomerer DNA in Lösung. Kationenspezifischer Einfluss auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen.*, Universitaet Bielefeld, Diss., 2001
- [34] LANDAU, Lev. D. ; LIFSCHITZ, Ewgeni M.: *Lehrbuch der theoretischen Physik: Elektrodynamik der Kontinua. Band VIII.* Harri Deutsch Verlag, 1990
- [35] BAUER, D. R. ; BRAUMAN, J. I. ; PECORA, R.: Depolarized light scattering from liquids. In: *Ann. Rev. Phys. Chem.* 27 (1976), S. 443
- [36] PATKOWSKI, A. ; STEFFEN, W. ; NILGENS, H. ; FISCHER, Erhard W. ; PECORA, R.: Depolarized dynamic light scattering from three low molecular weight glass forming liquids: A test of the scattering mechanism. In: *J. Chem. Phys.* 106 (1997), Nr. 20, S. 8401–8408
- [37] PECORA, R.: Spectrum of Light Scattered from Optically Anisotropic Macromolecules. In: *J. Chem. Phys.* 49 (1968), S. 1036

- [38] QUARRIE, D.A. M.: *Statistical Thermodynamics*. Harper and Row, 1976
- [39] GUNIER, A. ; FOURNET, G.: *Small-Angle Scattering of X-Rays*. Wiley, 1955
- [40] ZWANZIG, R.: Time-Correlation Functions and Transport Coefficients in Statistical Mechanics. In: *Ann. Rev. Phys. Chem.* 16 (1965), S. 67–102
- [41] SCHWABL: *Statistische Mechanik*. Springer, 2006
- [42] KOPPEL, D. E.: Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. In: *J. Chem. Phys.* 57 (1972), S. 4814–4821
- [43] PROVENCHER, S.W.: CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. In: *Comput. Phys. Commun.* 27 (1982), S. 229
- [44] PROVENCHER, S.W.: A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. In: *Comput. Phys. Commun.* 27 (1982), S. 213–217
- [45] PECORA, R.: Spectral Distribution of Light Scattered by Monodisperse Rigid Rods. In: *J. Chem. Phys.* 48 (1968), S. 4126
- [46] PECORA, R. ; STEELE, W.A.: Scattering from Fluids of Nonspherical Molecules. II. Light. In: *J. Chem. Phys.* 42 (1965), S. 1872
- [47] KEYES, T.: Microscopic theory of collective anisotropic molecular reorientation. In: *Molecular Physics* 23 (1972), S. 737
- [48] BURGER, H. C. ; CITTERT, P. H.: Wahre und scheinbare Intensitätsverteilung in Spektrallinien. In: *Z. Phys.* 79 (1932), S. 772–730
- [49] CITTERT, P.H. van: Zum Einfluss der Spaltbreite auf die Intensitätsverteilung in Spektrallinien. In: *Zeitschrift für Physik* 69 (1931), S. 298 – 308
- [50] ROESSLER, E.: Indication for a Change of Diffusion Mechanism in Supercooled Liquids. In: *Physical Review Letters* 65 (1990), S. 1595
- [51] FRANOSCH, T. ; FUCHS, M. ; GOETZE, W. ; MAYR, M. R. ; SINGH, A. P.: Theory for the reorientational dynamics in glass-forming liquids. In: *Physical Review E* 56 (1997), S. 5659

- [52] MAZZA, Marco G. ; GIOVAMBATTISTA, Nicolas ; STANLEY, H. E. ; STARR, Francis W.: Connection of translational and rotational dynamical heterogeneities with the breakdown of the Stokes-Einstein and Stokes-Einstein-Debye relations in water. In: *Physical Review E* 76 (2007), S. 031203
- [53] EINSTEIN, Albert: *Investigations on the theory of Brownian movement*. Dover Publications, 1956
- [54] DEBYE, P.: *Polar molecules*. 1945
- [55] DOTE, J. L. ; KIVELSON, D.: Hydrodynamic rotational friction coefficients for nonspheroidal particles. In: *J. Phys. Chem.* 87 (1983), S. 3889
- [56] KOENIG, Seymour H.: Brownian motion of an ellipsoid. A correction to Perrin's results. In: *Biopolymers* 14 (1975), S. 2421–2423
- [57] *Verdi V5 Manual. : Verdi V5 Manual*
- [58] ORNSTEIN, L.S. ; WYK, W.R.v.: Optische Untersuchung des Akkommodationskoeffizienten der Molekulartranslation und dessen Verteilungsfunktion in einem verdunnten Gase. In: *Zeitschrift für Physik* 78 (1932), S. 734 – 743
- [59] D. VOET, C. P. J. Voet V. J. Voet: *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH, 2010
- [60] HOPPE, W. ; LOHMANN, W. ; MARKL, H. ; ZIEGLER, H.: *Biophysik, ein Lehrbuch*. Springer, 1982
- [61] J.D., Watson ; F.H., Crick: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. In: *Nature* 171 (1953), S. 737
- [62] CRICK, F.H.C.: Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. In: *J. Mol. Biol.* 19 (1966), S. 548
- [63] EIMER, Wolfgang: *Dynamische Streulichtuntersuchungen ueber das Aggregationsverhalten des Guanodin-5'-Monophosphat und der komplementaeren Mononukleotide*, Universitaet Bielefeld, Diss., 1987
- [64] POEGGEL, Gerd: *Kurzlehrbuch Biologie*. Theme, 2013

- [65] DEMTRÖDER, Wolfgang: *Laserspektroskopie Grundlagen und Techniken*. Springer, 2007
- [66] SHEN, Y.R.: *The Principles of Nonlinear Optics*. John Wiley and Sons Ltd., 2002
- [67] JAHNS, Jürgen: *Photonik - Grundlagen, Komponenten und Systeme*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 2001
- [68] MESCHEDÉ, Dieter: *Optik, Licht und Laser*. Springer, 2008
- [69] WOLFGANG GEORGI, Ergun M.: *Einführung in LabVIEW*. Hanser Verlag, 2009
- [70] LEVENBERG, K.: A Method for the Solution of Certain Problems in Least Squares. In: *Quart. Appl. Math.* 2 (1944), S. 164–168
- [71] MARQUARDT, D.: An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. In: *SIAM J. Appl. Math.* 11 (1963), S. 431–441
- [72] THOMAS, J.C. ; SCHNURR, J.M. ; HARE, D. R.: Rotational Dynamics of Transfer Ribonucleic Acid: Effect of Ionic Strength and Concentration. In: *Biochemistry* 23 (1984), S. 5407–5413