

Kapitel 4

Quellen und Trennen von PC-Vielschichtsystemen in Überschußwasser

4.1 Einführung

Viele der experimentellen Ergebnisse, die in der Gruppe Helfrich erzielt wurden, gehen auf optische Untersuchungen von Membranstrukturen in Überschußwasser zurück. So wurden beispielsweise die ersten Werte für die Biegesteifigkeit von EYPC-Membranen aus dem Schwankungsquadrat des Winkels abgeleitet, den die Enden schlauchförmiger Vesikeln bilden [41]. Später wurde die Biegesteifigkeit von PC-Membranen durch die Analyse der Fluktuationseigenschaften einschaliger Vesikeln [31] oder ausgedehnter ebener Membranenflächen [78] bestimmt. Auch wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop erstmals Verbindungen zwischen benachbarten EYPC-Membranen, sog. „Passagen“, entdeckt [92]. Sie kommen sowohl einzeln als auch in regelmäßigen Arrangements vor.

Die o.g. Membranformen – kugel- bzw. schlauchförmige Vesikel, ausgedehnte Membranflächen oder Passagen – bilden sich spontan, wenn die Proben nach einer Methode präpariert werden, die auf Reeves und Dowben zurückgeht [24] (vgl. Kap.2.1.2, 2.1.3). Dazu wird Lipid aus einer Lösung auf einem Substrat, das z.B. aus Teflon oder Glas besteht, eingeengt und nach Abzug der Lösungsmittelreste Wasser in Überschuß hinzugegeben. Wird die Probe auf einer Temperatur gehalten, bei der die Membranen fluide sind, werden im Verlauf des Quellprozesses einzelne Membranen sichtbar, die z.T. die o.g. Formen annehmen. Diese Methode kam bislang in vielen Labors zur Anwendung, um für weitere Untersuchungen Objekte zu präparieren, die einzelne Membranen enthalten (z.B. [143][144]).

Röntgenuntersuchungen haben gezeigt, daß neutrale fluide PC-Membranen in Wasser eine geordnete stabile lamellare Phase (L_α) ausbilden können [20][145][21]. Der Abstand zwischen den Membranen innerhalb des Vielschichtsystems wächst mit zunehmender Konzentration des Wassers bis zu einem gewissen Grenzwert an. Systeme, die diesen Abstand erreicht haben, werden als „voll hydratisiert“ bezeichnet, weil sie kein weiteres Wasser mehr aufnehmen. Eine weitere Erhöhung der Wasser-

konzentration führt zu einer Segregation zwischen der voll hydratisierten lamellaren Phase und dem Überschußwasser [10]. Wir bezeichnen den Abstand zwischen den Membranen bei voller Hydratisierung im folgenden mitunter als „Gleichgewichtsabstand“.

Der Abstand, den voll hydratisierte PC-Membranen im Vielschichtsystem einnehmen, hängt von der Temperatur, dem osmotischen Druck und der Art des Lipids ab. Für DOPC wurde in Überschußwasser bei $T = 30^\circ\text{C}$ und $P = 0\text{atm}$ von Tristram–Nagle et al. aus Röntgenbeugungsexperimenten ein Abstand von 27\AA [42] bestimmt¹. Für alle in der Arbeit verwendeten Lipide (vgl. Kap.2.1.1) liegen Werte der Schichtperiode im voll hydratisierten Zustand vor. Die Abstände wurden durch Röntgen- oder Neutronenbeugung bestimmt. Als Proben werden für diese Untersuchungen Suspensionen multilamellarer Liposomen in Überschußwasser verwendet (vgl. Kap.2.1.3). Die Liposomen bilden dabei jeweils einzelne getrennte Vielschichtsysteme, innerhalb denen die Schichten konzentrisch wie „Zwiebelschalen“ angeordnet sind. Eine umfassende Zusammenstellung der Literaturangaben für Schichtperioden voll hydratisierter PC/Wasser-Systeme ist in [146] gegeben.

Zur Bestimmung der Schichtperiode voll hydratisierter *orientierter* Vielschichtsysteme werden die Proben nach einer gängigen Methode bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% gehalten. Dabei wurden jedoch bei sonst gleichen Bedingungen Abstände gemessen, die bis zu 10\AA geringer sind als die unorientierter Proben (s. z.B. [147]). Dieses Phänomen ist in der Literatur als „vapor pressure paradoxon“ bekannt [21]. Bei einem für beide Probentypen gleichen chemischen Potential des Wassers wurden Oberflächenspannungen an der Grenzfläche orientierter Membranen zur Gasphase und der Einfluß des Substrates als Ursache für den verringerten Abstand in Betracht gezogen [148][147]. Neuste Messungen von Katsaras et al. zeigen, daß auf Glimmer präparierte orientierte PC-Vielschichtsysteme in geeigneten Kammern sowohl in gesättigter Dampfatmosfera als auch in Überschußwasser dieselbe Periode einnehmen wie unorientierte Liposomen in Überschußwasser [149]. Außerdem wurde beobachtet, daß die Vielschichtsysteme in Überschußwasser über mehrere Tage stabil bleiben. Ein davon abweichendes Verhalten wurde für (teil-)orientierte Vielschichtsysteme auf einem Glassubstrat nachgewiesen [26]. Bevor wir auf diese Messungen näher eingehen, beschreiben wir eine weitere Methode, mit der untersucht werden kann, ob Membranen aneinander haften.

Die Beobachtung, daß sich neutrale fluide PC-Membranen in Überschußwasser nicht vom Vielschichtsystem lösen, wurde durch die Anwendung weiterer Methoden bestätigt. Mit Hilfe von Mikropipettenaspirationsexperimenten wurde beispielsweise eine negative Adhäsionsenergie von $(0.01\text{--}0.015)\text{mJ}/\text{m}^2$ zwischen PC-Vesikeln gemessen [22][23]. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß durch die Aspiration bei den untersuchten Vesikeln eine laterale Spannung induziert wird, welche nach den Ausführungen in Kap.3.2.4 die abstoßende Undulationswechselwirkung eindämmt. Durch die Abschwächung des abstoßenden Beitrags zur Gesamtwechselwirkung zwischen benachbarten Membranen kann Adhäsion induziert werden. Untersuchungen an weit gequollenen Vielschichtsystemen zeigen, daß PC-Membranen bei Spann-

¹Der angegebene Wert wurde aus der Elektronendichteverteilung innerhalb einer Schichtperiode entnommen. Er entspricht der Differenz zwischen der Periode und dem Abstand der Maxima, deren Position den Kopfgruppen der Lipide zugeordnet wird.

gen zwischen 10^{-6} und $10^{-3}mN/m$ aneinander haften [120]. Da sie nahezu konstante Kontaktwinkel ausbilden, nimmt die Adhäsionsenergie pro Fläche nach der Younggleichung linear mit der Spannung zu.

Systematische Untersuchungen zum Quellen von PC-Vielschichtsystemen (EY-PC) in Überschußwasser wurden von Harbich et al. mit mikroskopischen Methoden durchgeführt [25]. Die Schichten werden durch Scheren weitgehend parallel zum Glassubstrat orientiert und füllen vor dem Einleiten von Wasser die plane Kammer im zentralen Bereich der Höhe nach aus. Durch die Begrenzung der Kammerhöhe auf $20\mu m$ findet ein geordneter Quellprozeß statt, in dessen Verlauf die Ausrichtung des Vielschichtsystems größtenteils erhalten bleibt, während die Lipidkonzentration beständig abnimmt. Bei einem Prozeß, durch den der Stapel ausgedünnt wird, entstehen anfangs an seinem Rand Myelinzylinder, die sich später wiederum aufweiten und erneut ein planares Vielschichtsystem bilden. Aus der Lipidkonzentration in der planaren Phase konnte der mittlere Abstand zwischen den Membranen abgeleitet werden. Bis zu einem Abstand von $15nm$ wurde der Quellprozeß verfolgt [25]. Dabei gab es keine Anzeichen für einen Gleichgewichtsabstand. Eine Phasensegregation innerhalb des gequollenen Vielschichtsystems konnte nur durch Abkühlen induziert werden [121].

Zur weiteren Klärung der Fragestellung, unter welchen Bedingungen PC-Vielschichtsysteme unbegrenzt Wasser aufnehmen, wurden von Hartung et al. „Lipidringe“ (POPC oder EYPC) in Glaskapillaren präpariert (vgl. Kap.2.1.3), und der Quellprozeß nach der Zugabe von Wasser durch Röntgenbeugung beobachtet [26]. Die Proben besitzen den Vorteil, daß sie in Anlehnung an die Methode von Reeves und Dowben präpariert sind [24] und daher zumindest ein Trennen einzelner Membranen vom Vielschichtsystem erwartet werden kann. Das eingeeengte Lipid ist anfangs vorwiegend auf ein begrenztes Gebiet innerhalb der Probe konzentriert. Während die Membranen des Vielschichtsystems einen einheitlichen Abstand aufweisen, sind die lamellaren Beugungsordnungen sichtbar. Aus der zeitlichen Entwicklung der Position und der Intensität der Reflexe konnten folgende Schlüsse gezogen werden: Nach der Zugabe von Wasser im Überschuß nimmt die Schichtperiode solange zu, bis das System voll hydratisiert ist. Zu einem späteren Zeitpunkt geht bei den meisten Proben die Intensität der Beugungsordnung zurück und verschwindet im Streuuntergrund. Dabei entstehen keine neuen Beugungsreflexe. Der Abbau der Ordnung findet z.T. über einen Zeitraum von einigen Tagen statt. Andere Proben bleiben während dieser Zeitspanne unverändert.

Nachdem Hartung et al. erstmalig den Abbau der lamellaren Ordnung von PC-Vielschichtsystemen mittels Röntgenbeugung beobachten hatten [26], blieben noch viele Fragen offen. Einige davon werden wir im folgenden benennen. Im Anschluß an jede Frage geben wir die Kapitel der vorliegenden Arbeit an, welche dieser Fragestellung gewidmet sind.

- Wieviel Zeit vergeht zwischen dem Erreichen der vollen Hydratisierung des geordneten Vielschichtsystems und dem Beginn des Abbaus der Ordnung? (Kap.4.3.2)
- Findet der Abbau der Ordnung in allen Bereichen der Probe zur gleichen Zeit statt? (Kap.4.3.3, 4.3.4)

- Wie ist der zeitliche Verlauf des Abbaus der Beugungsordnungen? (Kap.4.3.2, 4.3.4, 4.3.5.1, 4.3.5.2)
- Welche neuen Strukturen entstehen beim Verschwinden des geordneten Vielschichtsystems und zu welchem Zeitpunkt ist mit ihrer Bildung zu rechnen? Zur Klärung dieser Frage wurden optische Beobachtungen z.T. simultan mit der Aufnahme der Röntgenspektren durchgeführt (Kap.4.3.6). Außerdem wurden gleichartig präparierte Proben mit höherer Auflösung mikroskopisch beobachtet (Kap.4.3.7).
- Wie wirkt sich die Temperatur auf den Quellprozeß aus? (Kap.4.3.4, 4.3.7)

Voraussetzung für die Beantwortung der Fragen sind Proben, die einen Abbau der lamellaren Ordnung zeigen. Zunächst wurde folgender Weg eingeschlagen, um wie Hartung Lipidringe innerhalb von Kapillaren zu präparieren: Ausgehend von einer Lipidlösung innerhalb der Kapillare entweicht das Lösungsmittel bei Normaldruck in Stickstoffatmosphäre innerhalb von ca. 20h und ein Ring bleibt zurück (Methode MR2, Kap.2.1.3). Nach der Zugabe von Überschußwasser wurde anhand von Röntgenuntersuchungen z.T. über einen Zeitraum von mehreren Monaten kein Abbau der Ordnung beobachtet. Nur bei einem geringen Anteil der Proben verschwanden die Braggreflexe des Vielschichtsystems frühestens drei Tage nach Zugabe von Wasser. Dieser Prozeß ließ sich weder durch erhöhte Quelltemperaturen noch durch Quenchen² der Proben bei -20°C beschleunigen. Einer detaillierten Untersuchung des Abbaus der Ordnung standen demnach die geringe Ausbeute an Proben mit diesen Eigenschaften und die lange Dauer des Prozesses im Wege.

Stattdessen wurde dieser Probentyp verwendet, um den Prozeß der Hydratisierung im Anschluß an die Zugabe von Wasser genauer zu untersuchen (Kap.4.2).

Der Durchbruch wurde erst durch die Einführung einer alternativen Präparationsart von Lipidringen erzielt. Dabei wird der Ring aus der Lösung bei Unterdruck innerhalb weniger Minuten in der Kapillare eingeengt (Methode MR1, Kap.2.1.3). Bei allen derartig hergestellten Proben fand ein Abbau der lamellaren Ordnung statt. Die systematischen Untersuchungen zum Trennen von Vielschichtsystemen (Kap.4.3) wurden daher ausschließlich mit diesem Probentyp durchgeführt.

Neben den o.g. Fragestellungen wird dem Aspekt der Entwicklung der Halbwertsbreite sowie des Intensitätsverhältnisses der Beugungsordnungen große Aufmerksamkeit zuteil (Kap.4.3.5). Durch die Beobachtung der Entwicklung beider Größen soll auf den Zustand des Vielschichtsystems vor allem während des Abbaus der Ordnung geschlossen werden. Die beobachtete Veränderung der genannten Meßgrößen wird unter dem Gesichtspunkt der Ordnung des Vielschichtsystems, der Verteilung der Abstände, der Größe der Streudomänen und der Ortsverteilung des Streuvolumens in Kap.4.3.5.1 und Kap.4.3.5.1 diskutiert. Eine Einführung in die Thematik findet in Kap.2.3.4 statt.

Als weitere Probenart wurden zur Kontrolle auch Liposomensuspensionen verwendet (Methode MFT, Kap.2.1.3). Die Vielschichtliposomen blieben über einen Zeitraum von bis zu drei Monaten stabil. In Kap.4.4 findet ein Vergleich der nach den verschiedenen Methoden präparierten Proben in Hinblick auf durch Temperaturerhöhung eingeleitete Veränderungen statt.

²Der Begriff „Quenchen“ stammt aus dem Englischen und bedeutet kühlen.

Der erste Abschnitt dieses Kapitels ist dem Quellen des geordneten Vielschichtsystems bis zum Erreichen der vollen Hydratisierung gewidmet. Wie weiter oben beschrieben, wurden diese Versuche mit Proben vom Typ MR2 durchgeführt und nicht auf die Probenart MR1 ausgedehnt. Die dabei erzielten Ergebnisse stehen daher mit den Untersuchungen des Abbaus der Ordnung in Kap.4.3 in keinem Zusammenhang. Sie werden anhand eines einfachen, in Kap.3.3 vorgestellten, Permeationsmodells diskutiert.

4.2 Durch Wasserzugabe eingeleitete Hydratisierung

Quellen von Vielschichtsystemen in Wasser ist gleichbedeutend mit der zeitlichen Zunahme der Wassermenge zwischen den Membranen im Stapel. Bezogen auf die Lipidmenge steigt demnach die Wasserkonzentration im Laufe der Zeit an. Bei der Präparation von Liposomensuspensionen wird die Aufnahme von Wasser unterstützt, so daß das System als Ergebnis eine homogene Hydratisierung aufweist. Als Methoden kommen beispielsweise mechanische Durchmischung, Schockgefrieren und Heizen oder Tempern sowie die Kombination der Verfahren in Betracht (Kap.2).

Bei den zur Untersuchung des Quellprozesses hauptsächlich eingesetzten Proben ist das Lipid in Form eines Ringes innerhalb einer Glaskapillare eingeeengt (Kap.2.1.3). Für aus einem Lösungsmittel auf ein Substrat eingeeengtes Lipid beginnt die Hydratisierung, sobald die Probe in Kontakt mit der Gas- oder flüssigen Phase von Wasser kommt. Da zwischen der Entnahme aus dem Vakuumschrank und dem Befüllen der im Experiment verwendeten Proben typischerweise einige Minuten liegen, fängt das System währenddessen schon an, Wasser aufzunehmen. Die endgültige, über die Dampfphase erreichbare Konzentration von Wasser im System hängt von der relativen Luftfeuchtigkeit ab. Einer geringeren Luftfeuchtigkeit als dem Sättigungswert entspricht ein osmotischer Druck, der den Abstand zwischen den Membranen verringert (s. z.B. [142]).

In diesem Abschnitt betrachten wir den Prozeß der Hydratisierung des Vielschichtsystems vom Beginn der Wasserzugabe bis zum Erreichen des sog. „Gleichgewichtsabstandes“.

4.2.1 Experimentelle Ergebnisse

Der durch Zugabe von (flüssigem) Wasser fortgesetzte Quellprozeß wurde in einigen Fällen durch Anwendung von Röntgenbeugung am Synchrotron untersucht. Vor der Befüllung der im Probenhalter montierten offenen Kapillare mit Wasser wird der eingeeengte Lipidring (Kap.2.1.3) mehrere Stunden lang der Raumatmosphäre ausgesetzt, um das Vielschichtsystem gleichmäßig zu hydratisieren. Die Befüllung der Probe erfolgt durch eine vom Meßplatz aus ansteuerbare Motorspritze (Reichelt). Währenddessen wird mit einem linearen Detektor (OED) das Kleinwinkelspektrum in der Äquatorebene (yz -Ebene in Abb.2.9) bis einschließlich der zweiten Beugungsordnung aufgenommen. Das Signal stammt hauptsächlich von parallel zur Kapillarenwand ausgerichteten Schichten. Durch einen vergleichsweise geringen Abstand zwischen Probe und Detektor (82cm, vgl. Tab.2.2) beträgt die Integrationszeit eines Spektrums für eine ausreichende Statistik 10 Sekunden.

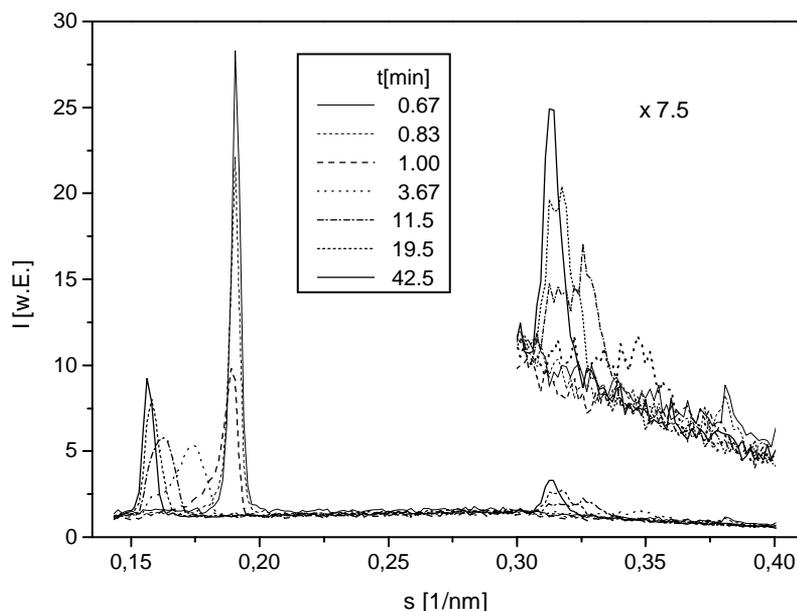


Abbildung 4.1: Durch Zugabe von Wasser eingeleiteter Quellprozeß einer POPC–Probe bei Raumtemperatur. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem OED aufgenommene Spektren im Kleinwinkelbereich. Der Bereich der zweiten Ordnung ist zusätzlich 7,5–fach herausvergrößert.

Im folgenden wird das Quellverhalten bei Zugabe von Wasser an einer POPC–Probe vom Typ MR2 bei Raumtemperatur ($\approx 23^\circ\text{C}$) gezeigt. Die Beobachtung umfaßt einen Zeitraum von ca. einer Minute vor bis 42min nach Befüllen mit Wasser. Nach insgesamt zehn Minuten Meßzeit wurde für ca. 90s unterbrochen und mit einer Wartezeit zwischen den Spektren von 20s statt der anfänglichen 20ms fortgefahren. Die Integrationsdauer pro Spektrum ist während der gesamten Messung auf 10s festgelegt. Der Zeitpunkt der Messung wird fortan wie in Abb.4.1 definiert angegeben: Der Meßbeginn entspricht $t=0\text{min}$, das Wasser wird ab $t=0.83\text{min}$ eingeleitet.

Vor der Injektion sind sowohl eine intensive erste als auch die dazugehörige sehr schwache zweite Beugungsordnung sichtbar (Abb.4.1a, $t=0.67\text{min}$). Die entsprechende lamellare Ortsperiode beträgt 52.24\AA und die volle Halbwertsbreite der ersten Ordnung liegt mit 0.029° in der Größenordnung der instrumentellen Breite. Mit dem Beginn der Aufnahme des nächsten Spektrums ($t=0.83\text{min}$) wird Wasser zugeführt. Es ist erkennbar, daß die erste Ordnung deutlich an Intensität eingebüßt hat: Das Maximum ist um ca. 25% abgesunken. Außerdem sind beide Ordnungen geringfügig zu kleineren s –Werten hin verschoben. Es liegt eine Periode von 52.25\AA vor. Zum nächsten Spektrum ($t=1.0\text{min}$) hin fällt die Abnahme der Intensität noch deutlicher aus: Der Maximalwert der ersten Ordnung sinkt um $\approx 60\%$, die zweite Ordnung ist nun vollständig verschwunden. Zusätzlich wird nun eine deutliche Asymmetrie im Verlauf der ersten Beugungsordnung erkennbar. Die linke³ Flanke

³„Links“ und „rechts“ ist im Zusammenhang mit der Beschreibung eines Streuprofiles gleichbe-

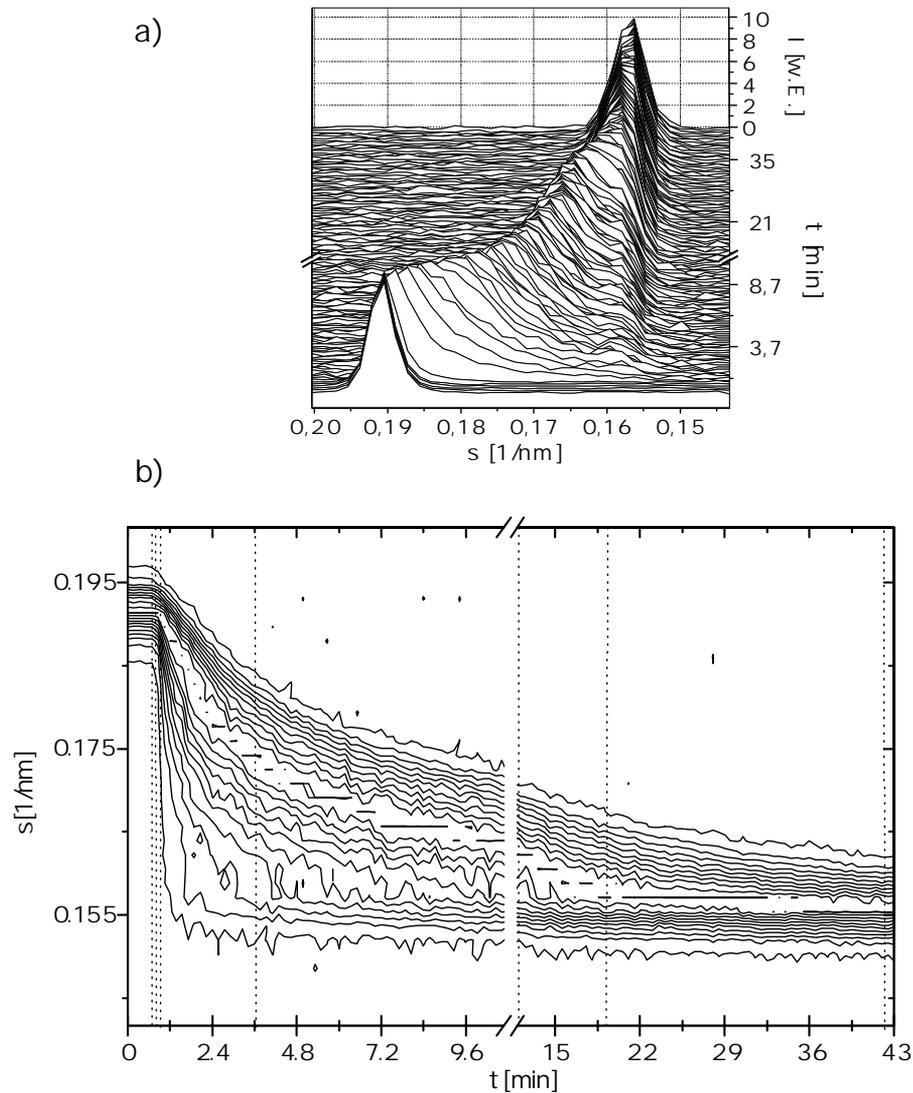


Abbildung 4.2: a) Zeitliche Abfolge von untergrundkorrigierten, auf das jeweilige Maximum der ersten Ordnung normierten Spektren im Bereich der ersten Beugungsordnung. b) Höhenlinien-Profil der in (a) gezeigten Spektren. Die Linien geben konstante relative Intensitäten von 5% bis 100% in ca. 10%-Schritten an. Zwischen $t=10\text{min}$ und $t=11.5\text{min}$ wurden keine Spektren aufgenommen. Die Zeitpunkte der in Abb.4.1 gezeigten Spektren sind gepunktet eingetragen.

verläuft verglichen mit der rechten³ wesentlich flacher aus und verschwindet erst bei $s \approx 0.155\text{nm}^{-1}$ im Untergrund. Rechts³ vom Maximum bleibt die Verteilung ähnlich gut definiert wie zuvor auch.

Zur Illustration der zeitlichen Veränderung des Profils der ersten Ordnung⁴

deutend mit zu betragsmäßig kleineren („links“) bzw. größeren („rechts“) s -Werten.

³s. Fußnote, S.72

⁴Wir behalten die Bezeichnung „erste“ bzw. „zweite Ordnung“ im folgenden für die Intensitätsverteilungen bei.

werden folgende Darstellungsformen gewählt: Die Spektren werden nach Abzug eines linearisierten Untergrundes (Kap.2.3.4.1) auf das jeweilige Maximum der ersten Ordnung normiert. In Abb.4.2a sind die Spektren in zeitlicher Abfolge zu sehen. Wird diese zeitliche Abfolge der Beugungsordnung nach Kurven konstanter relativer Intensität parametrisiert, erhält man ein Höhenlinienprofil über der Ebene des reziproken Streuvektorbetrags s und der Zeit t (Abb.4.2b). Die Linien geben relative Intensitäten I_r von 5% bis 100% in 10.5%-Schritten an.

Ab $t \approx 1 \text{ min}$ wird die Verteilung um das Maximum breiter und wandert zu kleineren s -Werten. Gleichzeitig nimmt an der Grenze zu kleinen s -Werten die relative Intensität zu, es bildet sich eine Art „Schulter“ aus (Abb.4.1 $t=3.67 \text{ min}$, Abb.4.2a, b). Die Höhe der Schulter hat bis zu dem Zeitpunkt, an dem sie vom Rest der Verteilung nicht mehr zu trennen ist ($t \approx 12 \text{ min}$), ungefähr den Wert des Maximums erreicht. Währenddessen bleibt die linke³ Grenze zwischen der Intensitätsverteilung der ersten Ordnung und dem Untergrund so gut wie unverändert: Die Höhenlinie für $I_r=5\%$ verläuft zwischen $t=2 \text{ min}$ und $t=10 \text{ min}$ bei $s=0.154 \text{ nm}^{-1}$.

Bis $t \approx 12 \text{ min}$ hat sich die Position des Maximums soweit zu kleineren s -Werten verschoben, daß die Schulter so gut wie verschwunden ist (Abb.4.1 $t=11.5 \text{ min}$, Abb.4.2a, b). Das Maximum bewegt sich nun ($t > 12 \text{ min}$) nur noch geringfügig zu kleineren s -Werten. Die Breite der Verteilung nimmt vor allem durch das Nachrücken und Aufsteilen der rechten³ Flanke ab. Das Profil der linken³ Flanke ändert sich ab $t \approx 20 \text{ min}$ kaum noch (Abb.4.2b).

Eine statistische Auswertung der untergrundkorrigierten Intensitätsverteilung im Bereich der ersten Ordnung ($0.142 \text{ nm}^{-1} < s < 0.200 \text{ nm}^{-1}$) findet sich in Abb.4.3. Teilbild (a) vereint sowohl den aus der Position des Maximums als auch aus dem Schwerpunkt der Verteilung bestimmten d -Wert, d_{max} und d_S , gegen die Zeit. Mit dem Ausbilden der linken³ Schulter gilt zunächst $d_{max} < d_S$ (s.o., vgl. Abb.4.2). Nachdem sie verschwunden ist und die rechte³ Flanke flacher ausläuft als die linke³, gilt $d_{max} > d_S$. In Teilbild (b) sind die Höhe des Maximums und die über das s -Intervall aufintegrierte Intensität während der Messung dargestellt. Die Anfangswerte wurden gleichgesetzt. Dem anfänglich schnelleren Absinken des Maximums verglichen mit dem Integral entspricht eine Verbreiterung der Verteilung. Durch das schnelle Nachrücken des Maximums zu kleinen s -Werten ist dieser Trend schon einige Minuten später rückläufig.

Die für die erste Ordnung beschriebene zeitliche Entwicklung der Verteilung der Streuintensität kann auch grundsätzlich im Bereich der zweiten Ordnung beobachtet werden (vgl. Abb.4.3). Wegen der teilweise sehr geringen Streuintensität der zweiten Ordnung ist allerdings ein Vergleich in allen diskutierten Punkten unmöglich. Hervorzuheben ist, daß das Profil der zweiten Ordnung zwischen $t=3.67 \text{ min}$ und $t=11.5 \text{ min}$ näherungsweise aufgefaßt werden kann als in s -Richtung um den Faktor zwei gestreckte Verteilung der ersten Ordnung. Eine Interpretation dieser und der vorher genannten Eigenschaften wird im folgenden Kapitel gegeben.

Während des gesamten Quellvorgangs bleibt der Streuuntergrund innerhalb des beobachteten Winkelbereichs unverändert (Abb.4.1).

³s. Fußnote S.72

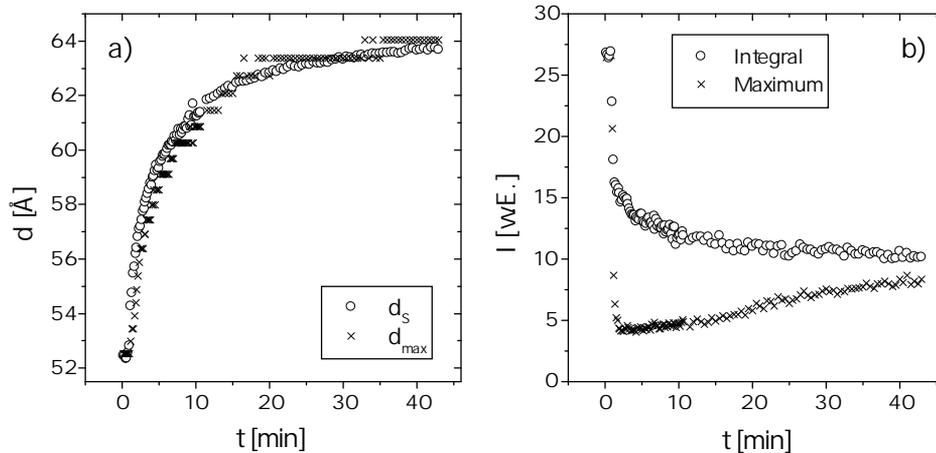


Abbildung 4.3: Durch statistische Auswertung der untergrundkorrigierten Intensitätsverteilung im Intervall $0.142\text{nm}^{-1} < s < 0.200\text{nm}^{-1}$ (vgl. Abb.4.1b) bestimmte Größen:
a) Aus der Position des Maximums bzw. des Schwerpunktes berechneter d-Wert, d_{max} bzw. d_s . Beide Abstände weisen einen asymptotischen Verlauf auf. Der Grenzwert von d_s liege bei d_g .
b) Die Anfangswerte der maximalen und integralen Intensität wurden gleichgesetzt.

4.2.2 Deutung der Messung

Folgende Möglichkeiten kommen für die deutliche Verringerung der Streuintensität während der ersten halben Minute nach dem Befüllen der Kapillare mit Wasser in Betracht:

1. Der Betrag des Formfaktors der Schicht nimmt deutlich ab. Führt man die geringfügige Zunahme des Schichtabstands von $t=0.67\text{min}$ nach $t=0.83\text{min}$ auf die Einlagerung von Wasser zurück, kann diese Änderung jedoch kaum den Formfaktor um 10% verringern (siehe z.B. [42]).
2. Mit dem Eindringen von Wasser in das Vielschichtsystem nimmt die Ordnung ab. Damit sollte jedoch gleichzeitig eine Zunahme der Halbwertsbreite und der Untergrundstreuung verbunden sein (Kap.2.3.4). Beides ist von $t=0.67\text{min}$ nach $t=0.83\text{min}$ nicht zu erkennen.
3. Durch den Wasserfluß wird Material losgelöst und weggeschwemmt.
4. Die Verteilung der Membranorientierungen innerhalb der Probe verändert sich zuungunsten der Detektorrichtung, d.h. der Anteil der Membranen, die parallel zur Kapillarenwand ausgerichtet sind, nimmt ab.
5. Im Wasser wird das Streusignal stärker absorbiert als in Luft: Die Absorptionslänge bei einer Wellenlänge von 1.5Å beträgt in Wasser ungefähr einen mm.

Im vorausgehenden Kapitel wurde eine Übereinstimmung zwischen dem Profil im Bereich der zweiten Beugungsordnung und dem der ersten eines Spektrums

festgestellt. Zudem entspricht die Verteilung der zweiten Ordnung den doppelten s -Werten der ersten. Dies spiegelt sich auch in einer doppelt so großen Gesamtbreite der zweiten Ordnung verglichen mit der ersten wider, sofern die Halbwertsbreite der beitragenden Reflexe klein ist gegenüber der Gesamtbreite. Es wird also angenommen, daß sich die Intensitätsverteilung aus den Beiträgen mehrerer Reflexe mit unterschiedlichen s -Werten zusammensetzt, die jeweils in beiden Ordnungen vorkommen. Nach der Braggformel kann dann jedem Paar von Reflexen ein Schichtabstand zugeordnet werden. Die Intensitätsverteilung im Bereich einer Ordnung (Abb.4.2a) wird demnach im folgenden vereinfacht als eine Verteilung von Schichtabständen innerhalb der Probe interpretiert.

Innerhalb weniger als einer Minute nach der Zugabe von Wasser verschiebt sich die linke³ Grenze der ersten Ordnung so gut wie auf ihren endgültigen Wert. Es liegen dann also schon Bereiche innerhalb der Probe vor mit einem Schichtabstand nahe dem asymptotischen Wert d_g (vgl. Abb.4.3a). Daneben gibt es jedoch auch Bereiche mit geringeren Abständen. Der kleinste Abstand läßt sich der Streuverteilung um das Maximum zuordnen, obschon unklar ist, ob sich dieser Anteil nicht aus mehreren anderen zusammenfügt.

Im folgenden wächst der Anteil der Streuintensität mit dem größten Abstand. Gleichzeitig nimmt der d -Wert der Verteilung um das Maximum im Lauf der Zeit zu. Nach wie vor ist keine klare Trennung zwischen beiden Verteilungen erkennbar, so daß auch Abstände zwischen dem kleinsten und größten erwartet werden. Bei $t \approx 11 \text{ min}$ sind die Anteile des kleinsten und größten Abstandes ungefähr gleich groß und lassen sich in der zweiten Ordnung gerade noch auflösen.

Aufgrund der Verteilung der Abstände innerhalb der Probe während der ersten zehn Minuten des Quellvorgangs können im wesentlichen zwei durch die Zugabe von Wasser eingeleitete Prozesse der Hydratisierung unterschieden werden:

1. Durch den einen Prozeß erreicht ein Teil des Systems innerhalb vergleichsweise kurzer Zeit nach dem Befüllen eine fast vollständige Hydratisierung. Ein immer größerer Anteil geht im weiteren Verlauf in diesen Zustand über.
2. Der andere Prozeß zeichnet sich durch eine langsame gleichmäßige Zunahme des Wassergehaltes für einen großen Anteil der Probe aus: Zu jedem Zeitpunkt ist dabei ein mittlerer Schichtabstand definiert, der mit der Zeit zunimmt.

4.2.3 Diskussion anhand eines Permeationsmodells

Es bietet sich an, die gemessene Abstandsverteilung der POPC-Probe (vgl. Abb.4.2) durch das in Kap.3.3 vorgestellte Permeationsmodell zu beschreiben. Die zeitliche Entwicklung der Verteilung wird dabei ausgehend von einem einheitlichen Abstand von 10 \AA zwischen den Membranen nach Formel (3.50), Kap.3.3, berechnet.

Wählt man für den abstandsabhängigen Druck zwischen jeweils zwei benachbarten Membranen den von Petrache et al. beim System EYPC/Wasser bei 30°C gefundenen Verlauf [130] und geht von einer Permeationskonstante $\Pi = 40 \mu\text{m/s}$ aus, ergibt sich für 125 Membranen die in Abb.4.4a gezeigte zeitliche Entwicklung der

³s. Fußnote S.72

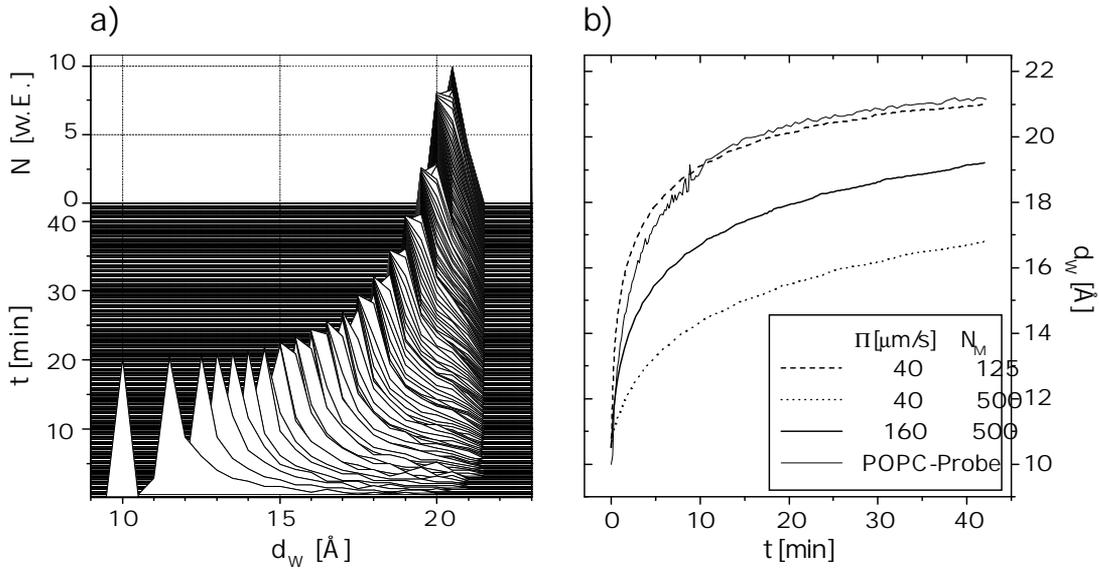


Abbildung 4.4: a) Mit Hilfe eines Permeationsmodells vorhergesagte Entwicklung der Abstandsverteilung von 125 Membranen. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verteilungen liegen 15s. Zum Zeitpunkt $t=0\text{min}$ besitzen alle Membranpaare einen einheitlichen Abstand von $d_w=10\text{\AA}$. Die Intervallbreite der Verteilung beträgt 0.5\AA . Die Verteilungen sind auf den jeweiligen Maximalwert normiert. Die Permeationskonstante wurde auf $\Pi=40\mu\text{m/s}$ gewählt. Für $d_w=21.5\text{\AA}$ ist der Druck Null, für kleinere Abstände abstoßend.

b) Mittlerer Abstand von berechneten Verteilungen gegen die Zeit für eine vorgegebene Membranzahl N_M und Permeationskonstante Π . Zusätzlich als dünne durchgezogene Linie ist der auf einen Anfangswert von 10\AA festgelegte Schwerpunkt der Intensitätsverteilung der ersten Beugungsordnung von POPC eingetragen (Abb.4.3, d_S).

Abstandsverteilung. Jeder der berechneten Abstände wurde dabei dem entsprechenden Abstandsintervall von 0.5\AA Breite zugewiesen. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Verteilungen beträgt 15s. Sie sind auf den jeweiligen Maximalwert normiert.

Die zeitliche Entwicklung der Abstandsverteilung läßt sich wie folgt charakterisieren: Das Maximum wandert mit abnehmender Geschwindigkeit zu größeren Abständen. Der asymptotische Wert von 21.5\AA ist nach 45min fast erreicht. Kurz nach Beginn des Permeationsprozesses ($t=30\text{s}$) hat der Abstand zwischen wenigen Membranpaaren schon so gut wie seinen endgültigen Wert erreicht. Der Anteil der Paare, die vorzeitig den größten Abstand einnehmen, nimmt langsam zu. Er wird indessen zu jedem Zeitpunkt von dem Anteil übertroffen, der einen Abstand zwischen dem größten und kleinsten besitzt. Zieht man Abb.4.2a zum Vergleich heran und deutet vereinfachend die gemessene Intensitäts- als Abstandsverteilung (vgl. Kap.4.2.2), so wird klar, daß in diesem Punkt keine Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Berechnung herrscht, da der Anteil mit dem größten Abstand zeitweise ein zweites Maximum ausbildet. Der Verlauf des mittleren Abstands der berechneten Verteilung weicht geringfügig von dem des Schwerpunkts der ersten Beugungsordnung ab (Abb.4.4b). Zu Beginn verläuft die berechnete Kurve zu steil.

Vergrößert man die Anzahl der Membranen im Stapel von 125 auf 500 und beläßt

alle anderen Parameter unverändert, fällt die asymptotische Zunahme des mittleren Abstandes verglichen mit der Messung viel zu langsam aus (Abb.4.4b, gepunktete Linie). Verwendet man für die Permeabilität nun $160\mu\text{m}/\text{s}$ statt $40\mu\text{m}/\text{s}$, läßt sich dieser Effekt nur teilweise kompensieren (Abb.4.4b, dicke durchgezogene Linie). Allerdings ist mit $160\mu\text{m}/\text{s}$ die bislang für fluide PC-Membranen bei vergleichbarer Temperatur gemessene obere Grenze [139] erreicht. Mit diesem Wert ist eine Anpassung der berechneten Membranverteilung an die gemessene nur für 230 Membranen möglich.

Diese Anzahl scheint indes deutlich zu gering, um für das beobachtete Beugungsspektrum verantwortlich zu sein. Dies gilt zum einen in Bezug auf das Integral des gemessenen Streusignals, an dem typischerweise einige 1000 Membranen beteiligt sein dürften. Eine Abschätzung dieser Größe erfolgt in Kap.4.3.1.2. Zum anderen ist nicht damit zu rechnen, daß sich der Streubeitrag von ein paar Dutzend Membranen, deren Abstand zwischen 15\AA und 20\AA liegt, vom Untergrund abhebt. Die Membrandichte, d.h. die Anzahl der Membranen pro Abstandsintervall, innerhalb der Verteilung ist demnach stellenweise zu gering, um überhaupt einen Interferenzbeitrag zu leisten.

Die mit Hilfe des Permeationsmodells berechnete Abstandsverteilung weicht in zwei wesentlichen Punkten von der gemessenen ab. Das Modell sagt erstens ein zu langsames Anwachsen des Anteils der Verteilung voraus, der den größten Abstand besitzt. Zweitens können nur dünne Stapel (wenige hundert Membranen) innerhalb des gegebenen Zeitraumes voll hydratisiert werden. Es können mehrere Ursachen für die abweichenden Modellvorhersagen in Betracht gezogen werden:

Zum einen ist der von Petrache et al. für das System EYPC/Wasser durch osmotische Messungen bestimmte Druck-Abstandsverlauf [130] nicht unbedingt auf das vorliegende System (POPC/Wasser) übertragbar. Durch den modellabhängig vorhergesagten Druck im Abstandsbereich zwischen 19\AA und 21.5\AA tritt eine zusätzliche Unsicherheit auf.

Zum anderen konnte eine nach dem „single file“-Modell für die Wasserpermeation durch eine Membran erwartete Zunahme der Durchlässigkeit mit steigender Druckdifferenz (Kap.3.3) nicht berücksichtigt werden, da dazu keine ausreichenden Meßdaten vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit zur Deutung der Diskrepanz zwischen Modell und Messung besteht in der Annahme, daß es Defektstellen im Vielschichtsystem gibt. Diese könnten den Wassereintritt in das Vielschichtsystem gegenüber reiner Permeation beschleunigen. Geht man davon aus, daß Wasser an einigen Stellen die Membran ungehindert passieren kann, dann reicht bei einer Diffusionskonstante von $D=2\cdot 10^{-5}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ [10] eine homogene Flächenbelegung der Defekte von $10^{-2}\%$ aus, um die Permeabilität gegenüber einem defektfreien Wert von $50\mu\text{m}/\text{s}$ zu verdoppeln. Andererseits sind durchgehende Wasserverbindungen vom Reservoir bis weit in das Vielschichtsystem hinein denkbar, so daß der in Kap.3.3 beschriebene Permeationsprozeß nicht nur von der äußersten Membran her einsetzt, sondern auch im Inneren des Vielschichtsystems stattfindet.

4.3 Trennen von Vielschichtsystemen

Das Trennen von Vielschichtsystemen in Überschußwasser wurde sowohl optisch als auch mittels Röntgenbeugung, in einigen ausgewählten Fällen gleichzeitig mit beiden Methoden untersucht. Vor und sofort nach Wasserzugabe wurde der Lipidring vom Typ MR1 optisch qualitativ hinsichtlich Definiiertheit und Orientierung charakterisiert und an der Stelle höchster Lipidkonzentration markiert, um eine schnelle und eindeutige Positionierung in der Probenkammer zu gewährleisten. Während der Optimierung der Probenposition im Strahl in Hinblick auf die vom OED aufgenommene Beugungsintensität wird die Probentemperatur bei Raumtemperatur oder niedriger (z.B. 20°C) gehalten. Innerhalb einer Zeitspanne von 15–30 Minuten nach der Präparation konnten in der Regel die ersten Spektren aufgenommen werden. Im Anschluß an die Justage wurde die Probe innerhalb weniger Minuten auf die Temperatur gebracht, bei der der Quellprozeß untersucht wurde. Im Fall von DOPC–Proben wurden Temperaturen zwischen 15°C und 62°C gewählt.

Es wurde hauptsächlich mit DOPC gearbeitet, da sich mit diesem Phospholipid die Ringe lokal am definiertesten nach der Methode MR1 präparieren ließen (vgl. Kap.4.3.1). Immer schlechter gelang dies mit SOPC, POPC und als Schlußlicht DMPC: Dort fand z.T. beim Einengen überhaupt keine definierte Ringbildung statt (vgl. Kap.2.1.3) oder die Lösungsmittelsäule kollabierte vorher. Daher beziehen sich die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse im wesentlichen auf DOPC–Proben. Sie werden nur in Kap.4.3.1.1 und Kap.4.3.4 mit den entsprechenden Resultaten für SOPC– und POPC–Proben verglichen. Der Quellprozeß wurde durch Röntgenbeugung an 56 DOPC–Proben sowohl im Labor als auch am Synchrotron untersucht. Außerdem wurde der Prozeß an 15 Kapillarenproben (DOPC) ausschließlich mit mikroskopischen Methoden beobachtet.

Es ist zu berücksichtigen, daß innerhalb einer der Meßreihen am Synchrotron der OED aufgrund eines elektronischen Fehlers Zwillingsspeaks aufweist (Kap.4.3.2). Die gemessene Aufspaltung hat sich als artefaktisch herausgestellt, da sie mit IP–Aufnahmen in keinem Fall bestätigt werden konnte. Für diese Spektren war die Auswertung ausschließlich durch Bestimmung der Position und Höhe des Maximums der Beugungsordnung möglich.

4.3.1 Charakterisierung des Systems

In diesem Kapitel geht es darum, Eigenschaften der Ringproben vom Typ MR1 zu beschreiben. Die Präparationsweise der Lipidringe innerhalb der Kapillare wird in Kap.2.1.3 näher erläutert. Der Schwerpunkt der folgenden Charakterisierung liegt auf der Orientierung der Schichten und der Definiiertheit bzw. Breite der Ringe. Außerdem gehen wir darauf ein, wie homogen das Vielschichtsystem zu Beginn des Experimentes hydratisiert ist. Nach der Einjustierphase werden die Proben auf die endgültige Temperatur gebracht. Es wird kurz beschrieben, welche Auswirkungen eine Temperaturerhöhung auf den Schichtabstand hat. Dieses Thema wird nochmals ausführlicher in Kap.4.3.5.1 behandelt.

Probe	Anzahl	R_I [%]	\bar{R}_I [%]	$\sigma(R_I)$ [%]
DOPC	7	17–97.5	62.6	32
SOPC	6	4.6–21.1	11.8	6.8
POPC	6	8.7–18.3	13.5	4

Tabelle 4.1: Übersicht der relativen Orientierung $R_I=I(5^\circ)/I(180^\circ)$ für Ringproben, aufgeschlüsselt nach der Lipidsorte. \bar{R}_I gibt den Mittelwert von R_I für die gegebene Anzahl der Proben an; $\sigma(R_I)$ entspricht der Standardabweichung.

4.3.1.1 Orientierung

In Kapitel 2.1.3 wurde vorweggenommen, daß die Lipidverteilung durch die Präparation als Ring innerhalb der Kapillare sehr inhomogen ist. Der Ring stellt idealerweise ein aufkonzentriertes Lipidgebiet in der Kapillare dar, innerhalb dessen die Schichten weitgehend parallel zur Wand ausgerichtet sind. Da die Achse der Kapillaren und des Röntgenstrahls mit der Richtung des Öffnungsfensters des linearen Detektors ein Dreieck bildet (vgl. Abb.2.9), sind die lamellaren Reflexe der zum Ring gehörenden Schichten im OED-Spektrum sichtbar. Inwiefern anders gerichtete Probenbereiche beitragen, hängt von der Breite des Detektorfensters ab verglichen mit dem Durchmesser des Beugungsrings (Abb.2.9). Am Synchrotronaufbau ist die Breite des Öffnungsfensters mit 8mm so bemessen, daß zu der ersten bzw. zweiten Ordnung ein Kreisbogen von 7° bzw. 3.5° beiträgt. Abb.4.5II zeigt ein Diffraktogramm einer Probe, in das die Eintrittsblende schematisch eingezeichnet ist.

Zur Charakterisierung des Ausmaßes der Orientierung der Membranschichten entlang der Kapillarenwand führen wir einen Parameter R_I ein. Er setzt die Streuintensität von parallel zur Kapillarenwand orientierten Probenbereichen mit dem gesamten Streubeitrag der Probe in Beziehung. Die Streuintensität der ersten Beugungsordnung wird über ein 5° -Kreissegment⁵ integriert $I(5^\circ)$, das die Intensität der gerichteten Bereiche enthält. Dazu setzen wir die über ein Kreisbogen von 180° integrierte Streuintensität $I(180^\circ)$ in Beziehung ($R_I=I(5^\circ)/I(180^\circ)$). Für ein Debye-Scherrer-Pulver beträgt R_I 2.7%, für eine vollkommen orientierte Probe 100%.

Aus dem Röntgendiffraktogramm einer frisch präparierten, 22min alten DOPC-Probe bei 20°C wird ersichtlich, daß sich ein beträchtlicher Anteil $I(5^\circ)$ des gesamten Streubeitrags $I(180^\circ)$ auf einen begrenzten Kreisbogen (5°) konzentriert (Abb.4.5, Teilbild I).

Für das Verhältnis zwischen den orientierten Beiträgen und der gesamten Streuintensität ergibt sich für die erste Ordnung $R_I=18.2\%$. Dies entspricht lokal einer 6.5-fach höheren Intensität gegenüber einem homogenen Ring. Bei einer besser orientierten, ebenfalls in Abb.4.5 dargestellten DOPC-Probe liegt $R_I=81\%$ vor. Ein Vergleich von R_I für insgesamt 7 verschiedene DOPC-Proben im Zeitraum von 7–25 Minuten nach der Präparation zeigt, daß R_I bei einem Mittelwert von 62.6% Werte zwischen 17% und 97.5% annimmt. Trotz gleicher Präparationsweise (MR1) variiert der Grad der Ausrichtung demnach von einer Probe zur anderen um Größenordnungen. Dies trifft auch auf SOPC- und POPC-Proben zu. Sie besitzen allerdings im Vergleich zu DOPC-Proben eine verringerte mittlere Ausrichtung (Tab.4.1).

⁵Dieser Wert ist so bemessen, daß er möglichst alle orientierten Beiträge umfaßt.

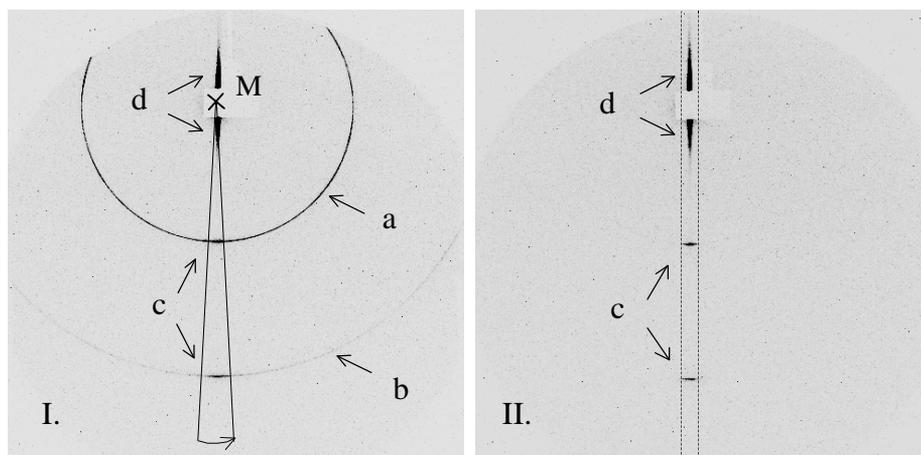


Abbildung 4.5: I.: Beugungsdiagramm einer DOPC-Probe 22min nach der Wasserzugabe. Die erste **a** und zweite Beugungsordnung **b** sind erkennbar. Beide Kreisbögen weisen eine Verdunklung **c** auf, die von Streubeiträgen parallel zur Kapillarenachse ausgehender Lamellen herrührt ($R_I=18.2\%$, siehe Text). Der eingezeichnete Winkel gibt den Bereich an, über den das Kreissegment integriert wird; „M“ bezeichnet die Position des Primärstrahles. Die dunklen Streifen **d** beruhen auf Totalreflektion des Primärstrahls an der Kapillarenwand II.: Beugungsdiagramm einer DOPC-Probe 24min nach der Präparation. Ungerichtete Streuanteile, d.h. Bögen **a** und **b**, sind nicht erkennbar ($R_I=81\%$). Der Verlauf des Öffnungsfensters des OED ist gestrichelt eingezeichnet.

Der Grund für das unterschiedliche Ausmaß der Orientierung der benannten Lipide bei gleichartiger Präparation ist unbekannt. In allen Fällen wurde als Stamm-lösung CHCl_3 verwendet. Die Kapillaren entstammen z.T. einer Charge und wurden nach einem einheitlichen Verfahren nachgereinigt (Kap.2.1.3). Daher kommen als Ursache für die systematischen Abweichung in erster Linie Eigenschaften der Lipide selbst in Betracht. Welche Eigenschaften beim Einengen ausschlaggebend für den Grad der Orientierung sind, bleibt unklar.

4.3.1.2 Der Lipidring

Optische Charakterisierung Abbildung 4.6 zeigt einen Lipidring innerhalb einer Kapillare mit einem Durchmesser von 0.8mm . Aus Teilbild (a) vor der Zugabe von Wasser wird deutlich, daß das Lipid hier hauptsächlich in Form von zwei schmalen Teilringen aufkonzentriert wurde. Zwischen gekreuzten Polarisatoren tritt um die Teilringe im trockenen Zustand normalerweise keine vollständige Dunkelheit auf, wenn die Kapillarenachse mit einer Polarisationsrichtung übereinstimmt (s. Abb. 4.6b). Daraus läßt sich schließen, daß dort keine vollkommene Ausrichtung der Schichten parallel zur Kapillarenwand vorliegt. Die Teilringe selbst sind jedoch in dieser Stellung dunkel.

Zu Beginn des Quellens gehen von den Teilringen häufig Vielschichtliposomen aus. Sie sind in Abb.4.6c (durch einen Pfeil markiert) als Körnung, erkennbar und lie-

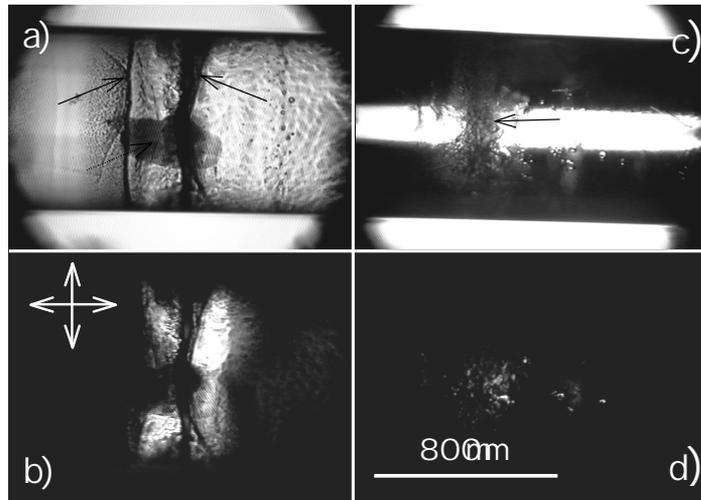


Abbildung 4.6: DOPC–Probe vor (a), (b) und nach Zugabe von Wasser (c), (d) sowie im Hellfeld (a), (c) und unter gekreuzten Polarisatoren (b), (d). Beim Einengen haben sich im wesentlichen zwei Teilringe gebildet (a, durch Pfeile markiert). Zur Justage wurde ihre Position markiert (dünner Strich). Die Ringe sind unter gekreuzten Polarisatoren dunkel, was auf eine konzentrische Ausrichtung schließen läßt. Statt dessen gibt es ohne Wasser helle Gebiete um den Hauptring, mit Wasser sind nur einzelne Liposomen hell.

gen hier offensichtlich in großer Anzahl und mit Radien um $5\mu\text{m}$ vor. Zwischen gekreuzten Polarisatoren bleiben die Teilringe bis auf die kleinen Liposomen dunkel (Abb.4.6d), was auf ihre weitgehend einheitliche Ausrichtung hindeutet. Dies wird durch das Spektrum der darauffolgenden Röntgenmessung an der Probe bestätigt (s. auch Kap.4.3.1.1). Die größte Helligkeit wird erreicht, wenn die Kapillarenachse unter 45° zu den Polarisatoren steht. Dann werden auch die Gebiete hell, in denen vom Einengen Lipid an der Kapillarenwand übrig geblieben ist (siehe Kap.2.1.3, Abb.2.2). Demnach sind die Membranen außerhalb des Ringes auch zumindest teilweise gerichtet.

Abb.4.7 zeigt eine polarisationsmikroskopische Aufnahme einer Ringprobe (DOPC, 23°C) 11min nach der Wasserzugabe. Die Polarisatoren sind fast gekreuzt. Daher sind solche einachsige doppelbrechenden Objekte hell, deren Hauptachse weder mit einer der Polarisatorrichtungen noch mit der optischen Achse des Mikroskops zusammenfällt. Der Fokus ist auf die Oberseite der in eine plane Wasserkammer eingebetteten Kapillarenprobe eingestellt. Die Kapillare verläuft horizontal im Bild. Das aufkonzentrierte Ringgebiet innerhalb der Kapillare ist in weiten Bereichen heller als die Umgebung. Das Vielschichtsystem ist demnach nicht durchgehend parallel zur Kapillarenwand ausgerichtet. Als Abweichung von diesem Verlauf sind deutlich multilamellare Liposomen (ML) sowie Myelinzyylinder (MZ) erkennbar, welche von dem Ringgebiet ausgehen.

Einige Proben weisen zu Quellbeginn als sichtbare Morphologie hauptsächlich einige breite Myelinzyylinder auf (s. Abb.4.24, 4.23). Die Zylinder wurden mit Durchmessern bis zu $120\mu\text{m}$ beobachtet, was bei einer Schichtdicke von 63\AA einer

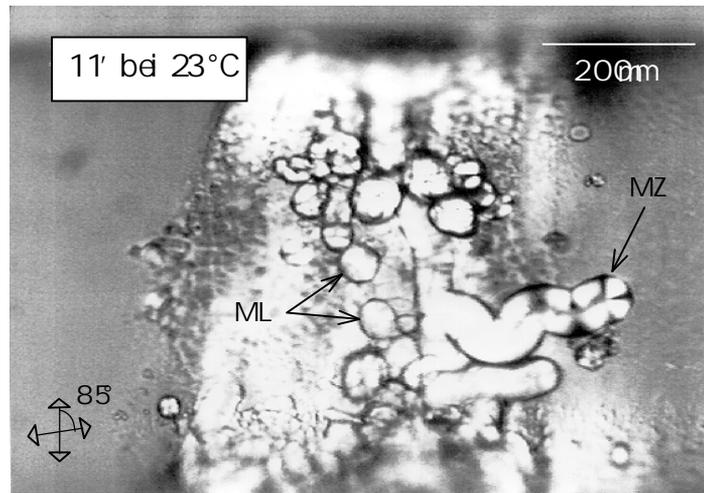


Abbildung 4.7: Kapillarenprobe (DOPC) 11min nach der Zugabe von Wasser bei 23°C unter fast gekreuzten Polarisatoren. Das Gebiet des aufkonzentrierten Lipidringes ist heller als die Umgebung. Einzelne multilamellare Liposomen (ML) und Myelinzylinder (MZ) sind erkennbar. (Weitere Einzelheiten siehe Text)

Gesamtzahl von umgerechnet 16000 Membranen entspricht, wenn man den inneren Wasserkanal des Myelinzylinders außer Acht läßt. Der Anteil eines solchen Myelinzylinders an dem gesamten Röntgenspektrum wird dementsprechend groß ausfallen. Bei einer Probe konnte beobachtet werden, wie sich innerhalb von 15 Minuten eine neue Beugungsordnung aufbaute und wieder verschwand und dabei die alte zwischendurch sogar an Intensität übertraf. Dies geht mit der optischen Beobachtung konform, daß Myelinzylinder in einem solchen Zeitraum innerhalb einer Probe deutlich ihre Richtung und Lage ändern können (Abb.4.24, 4.23).

Die optischen Beobachtungen der Proben vor und sogleich nach Zugabe von Wasser geben Aufschluß über die Homogenität sowie Begrenztheit der präparierten Ringe. Darüber hinaus konnten orientierte und nicht orientierte Objekte in Proben ausfindig gemacht werden. Diese liefern einen Anhaltspunkt dafür, was den durch Röntgenbeugung ermittelten Grad der Orientierung (vgl. Tab. 4.1) ausmacht.

Ringbreite Als Ringbreite b_R bezeichnen wir die Differenz zwischen dem Innen- und Außenradius eines idealen Ringes innerhalb der Kapillare (Abb.2.2). Die Justage der Proben im Strahl erfolgte nach dem Kriterium des größtmöglichen Streusignals in den Beugungsordnungen. Da sich das Streuvolumen am Rand der Kapillare befindet, hat dies zur Folge, daß die Kapillare dezentriert im Strahl liegt. Der Primärstrahl besitzt in der Richtung senkrecht zur Kapillarenachse eine Halbwertsbreite, die mit dem Kapillarendurchmesser vergleichbar ist (Kap.2.1.3). Dadurch tragen nur Streubereiche auf der einen Seite der Kapillare zu der Intensität der Beugungsordnung bei. Übertreffen die lateralen Abmessungen des Strahles am Probenort diejenigen des Streuvolumens, trägt nur die Projektion zur gesamten Breite bei (vgl. Kap.2.3.4). Unter der Annahme einer rein geometrisch bestimmten Halb-

wertsbreite, lassen sich aus der gemessenen Breite des Reflexes daher Rückschlüsse auf die Breite des Ringes ziehen.

Die Auswertung von am Laboraufbau gemessenen Halbwertsbreiten (FWHM) für 40 DOPC-Proben bei Quellbeginn, d.h. 15min–30min nach der Präparation, und Raumtemperatur zeigt, daß alle deutlich unter dem Wert des Primärstrahls $\Delta_P=0.21^\circ$ liegen. Die Verteilung der vollen Halbwertsbreiten der ersten Braggord-

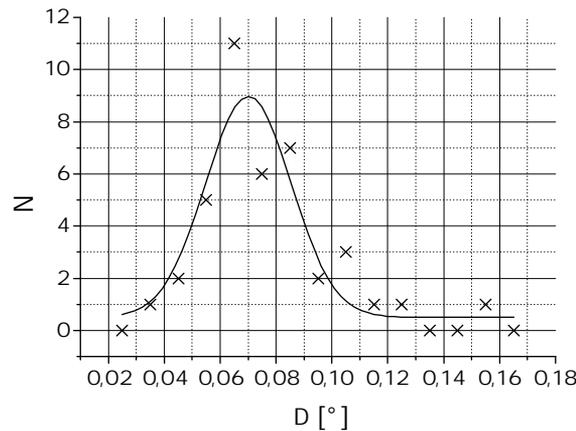


Abbildung 4.8: Verteilung von Halbwertsbreiten (FWHM) Δ der ersten Beugungsordnung für 40 DOPC-Proben. Das Spektrum zu jeder einzelnen Probe wurde 15min–30min nach der Präparation mit einem OED am Laboraufbau aufgenommen. Die Halbwertsbreite der Beugungsordnungen wurde mit einem Gaußfit bestimmt. Die Verteilung wurde durch eine Gaußfunktion angenähert.

nung ist in guter Näherung gaußförmig (Abb.4.8), besitzt ihren Schwerpunkt bei $\bar{\Delta}_R=0.07^\circ$ und hat eine volle Breite von 0.04° . Für ein Objekt der lateralen Ausdehnung (Breite des Ringes, s. Abb.2.2) von $b_R=50\mu m$ läßt sich aus dem Verlauf der Randstrahlen, die die Braggbedingung erfüllen, für den verwendeten Aufbau (siehe Abb.2.7) eine geometrische Gesamtbreite von $\Delta_F=0.067^\circ$ berechnen, $b_R=100\mu m$ ergibt $\Delta_F=0.13^\circ$. Unter der Annahme, daß die volle Halbwertsbreite nun die Hälfte der Fußbreite des Reflexes ausmacht, $\Delta_F=2\Delta_R$, entspricht der Wert von $\Delta_R=0.07^\circ$ einer Ringbreite von $b_R \approx 100\mu m$. Die Beugung an einem einzelnen freistehenden, $90\mu m$ breiten Myelinzylinder lieferte in der ersten Ordnung eine Halbwertsbreite (FWHM) von $\Delta_R=0.06^\circ$. Dies stimmt mit der Vorhersage der obigen Abschätzung zufriedenstellend überein.

Unter der Annahme, daß sich die gemessene Breite der Beugungsordnung alleine aus der projektiven Breite des Streuvolumens im Strahl ergibt, folgt für die Ringbreite von DOPC-Proben im Mittel ein Wert von $100\mu m$. Dieser Wert ist als eine Abschätzung noch oben anzusehen, da zusätzliche Effekte der Verbreiterung die Halbwertsbreite einer Beugungsordnung gegenüber der geometrischen Breite vergrößern (Kap.2.3.4). Außerdem trifft die Annahme nicht zu, daß das gesamte Streuvolumen, welches zu der vom OED gemessenen Intensität beiträgt, auf den Ring beschränkt ist. Auch dadurch wird eine größere Breite des Ringes vorgetäuscht.

Die Größe von Liposomen und Myelinzylindern, die sich am Rand des Lipid-

ringes bilden (Abb.4.24, Abb.4.23), gibt auch Aufschluß über die lokale Dicke des Vielschichtsystems. Bei Ringproben wurden Myelinzyylinder mit einem Durchmesser zwischen $5\mu m$ und $120\mu m$ beobachtet (Abb.4.24, Abb.4.23).

Schichtzahl Einer groben Abschätzung für die Anzahl der zur Beugungsordnung beitragenden Membranen liegt ein Intensitätsvergleich zwischen einer typischen Ringprobe und einem freistehenden gerichteten Myelinzyylinder mit einem Durchmesser von $90\mu m$ zugrunde. Das Streusignal im Beugungsring wird jeweils um die intensivste Stelle in einem Kreissegment von ca. 5° vom Detektor aufsummiert. Da in beiden Fällen die integrale Intensität vergleichbar ist, kann unter Vernachlässigung jeglicher geometrischer Einzelheiten gefolgert werden, daß auch die Membranzahl im Streuvolumen in derselben Größenordnung liegt. Die Anzahl der geschlossenen Membranen im Vielschichtzyylinder ergibt sich aus dem gemessenen Schichtabstand von 64Å zu 7000.

Einen weiteren Anhaltspunkt für die Anzahl der Membranen im Streuvolumen liefert die im vorherigen Abschnitt durchgeführte Abschätzung der Breite des Lipidringes im Bereich von $100\mu m$.

Die laterale Ausdehnung von Liposomen und Myelinzyindern, die mit dem Ring verbunden sind, beträgt zwischen $5\mu m$ und $120\mu m$. Dies entspricht einer Membranzahl zwischen 800 und 18000.

Aus wievielen einzelnen Domänen (vgl. Kap.2.3.4.3) sich das Streuvolumen zusammensetzt, kann für diese Probenpräparation nicht geklärt werden. Genausowenig ist die Größenverteilung der Streudomänen bekannt.

4.3.1.3 Homogenität der Hydratisierung nach der Wasserzugabe

In Kap.4.2 wurde an dem Beispiel einer Probe vom Typ MR2 gezeigt, daß zwischen der Zugabe von Wasser und der einheitlichen Hydratisierung ein Zeitraum von $\approx 40min$ vergeht. Um zu überprüfen, wie einheitlich die Hydratisierung der Ringproben vom Typ MR1 zu Beginn der Quellexperimente ist, wurden die Beugungsordnungen von 7 DOPC-Proben einer Meßreihe am Synchrotronaufbau ausgewertet. Dazu wurden im Anschluß an die Positionierung IP-Aufnahmen gemacht. Zwischen der Präparation und der Aufnahme des ersten Diffraktogramms vergehen je nach Probe 19–34 Minuten. Dabei werden die Proben bei $20^\circ C$ gehalten.

In Abb.4.5 sind Diffraktogramme von DOPC-Proben dargestellt, die $22min$ (I) bzw. $24min$ (II) nach der Wasserzugabe aufgenommen wurden. In keiner der Aufnahmen ist eine Aufspaltung der Beugungsordnungen zu erkennen. Die Reflexe der gerichteten Probenbereiche liegen auf den Beugungsringen der ungerichteten Probenbereiche. In Abb.4.9 sind die im Bereich maximaler Ausrichtung über ein Kreissegment von 5° aufsummierten Beiträge als Spektrum dargestellt (vgl. Abb.4.5I). Die Halbwertsbreite der Beugungsordnung ergibt sich durch Anfitzen einer Gaußfunktion zu 0.007° für die erste bzw. 0.008° für die zweite Ordnung (vgl. Abb.4.9b, c). Dies liegt unterhalb der Halbwertsbreite (FWHM) des Primärstrahls in der z -Richtung (vgl. Abb.2.9) von ca. 0.01° . Das läßt, wie schon im vorherigen Abschnitt gezeigt, darauf schließen, daß das Streuvolumen in der z -Projektion geringer ist als die laterale Ausdehnung des Strahls. Die volle Halbwertsbreite der ersten Ordnung

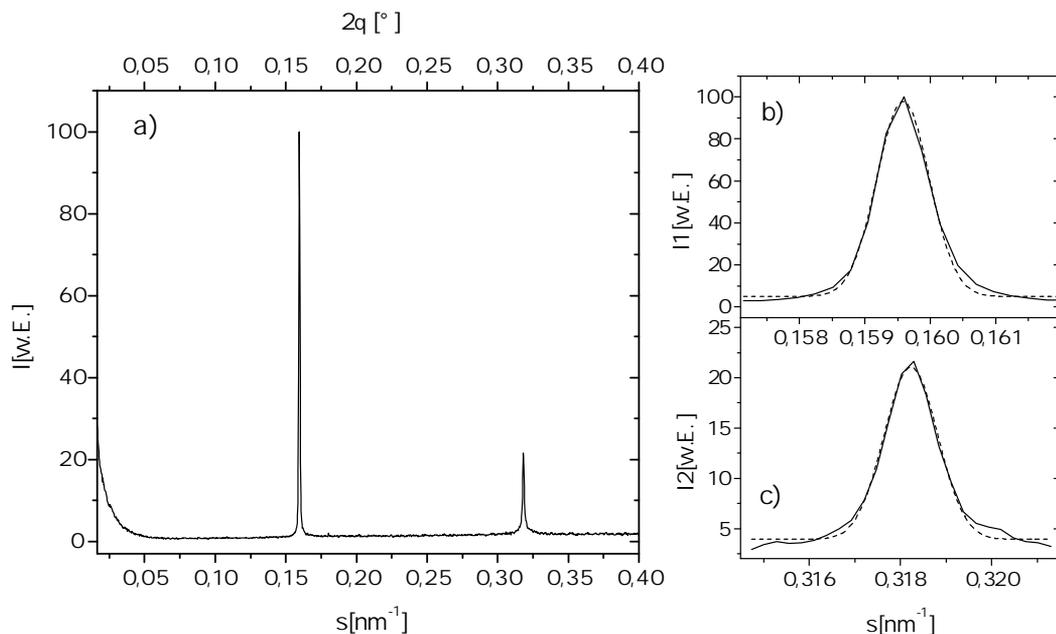


Abbildung 4.9: Über einen Kreisbogen aufintegriertes Spektrum der in Abb.4.5I dargestellten IP-Aufnahme. Während Teilbild (a) das Spektrum über den gesamten Winkelbereich zeigt, ist in (b) und (c) erkennbar, daß sich die erste und zweite Ordnung durch eine Gaußfunktion (gestrichelt) gut annähern lassen.

von sieben verschiedenen DOPC-Proben weist bei einem Mittelwert von 0.0072° nur eine Streuung von 0.0003° auf.

Bildet man das Verhältnis der Winkelschwerpunkte $2\theta_i$ von dem zweiten zum ersten Beugungsreflex $R_W = 2\theta_2/2\theta_1$ für das Spektrum in Abb.4.9, so erhält man $R_W = 1.996 \pm 0.004$. Innerhalb der Fehlergrenzen liegen demnach die erste und zweite Beugungsordnung derselben Struktur vor. Der Schichtabstand d beträgt $d = 62.86 \text{ \AA}$. Gemittelt über die Schichtabstände der 7 Proben nach 19–34 Minuten bei 20°C ergibt sich $\bar{d} = 62.97 \pm 0.13 \text{ \AA}$.

Die obigen Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen: Im Winkelbereich größter Orientierung liegt das Vielschichtsystem 19–34 Minuten nach der Präparation innerhalb der Auflösungsgrenzen mit einem einheitlichen Abstand d vor. Unter der Annahme, daß zwei gleich große Probenanteile mit um Δd verschiedenen Abständen an derselben Ordnung beteiligt sind, ist $\Delta d < 0.2 \text{ \AA}$. Je ungleicher die Anteile sind, um so weiter könnte ihr Abstand auseinanderliegen, ohne daß sie in dem Reflexprofil auflösbar sind.

4.3.1.4 Auswirkung der Temperaturerhöhung

Nach der Einstuierphase und der ersten IP-Aufnahme werden die Proben von $T = 20^\circ\text{C}$ innerhalb von 2–3 Minuten auf eine Endtemperatur bis zu 62°C gebracht. Dadurch verringert sich zunächst der Schichtabstand d : Ungefähr eine Minute nach

Erhöhen der Temperatur von 23°C auf 43°C wurde für vier ca. 20 Minuten alte DOPC-Proben im Mittel eine Veränderung des Schichtabstandes gegenüber dem Anfangswert von $\Delta d = 0.61 \pm 0.2 \text{ \AA}$ festgestellt. Dies entspricht ungefähr einem Prozent des Anfangswertes. Bei allen DOPC-Proben nimmt zunächst der Schichtabstand des Vielschichtsystems ab, wenn sie nach der Zugabe von Wasser innerhalb weniger Minuten auf eine höhere Temperatur gebracht werden (vgl. die in Abb.4.10 und Abb.4.12 vorgestellten Proben).

Wenige Minuten später ist jedoch der alte Abstand wieder erreicht und das System durchläuft eine Entwicklung, die in den folgenden Abschnitten detaillierter beschrieben werden soll.

4.3.2 Stadien des Quellens: Phase I und II

Abb.4.10a zeigt die zeitliche Entwicklung einer gut gerichteten Probe, deren IP-Aufnahme bei $t=8 \text{ min}$ in Abb.4.5II dargestellt ist. Die normierten OED-Spektren sind gegen die Zeit aufgetragen, zu Beginn der Messung ist die Probe ca. 22 Minuten alt ($t=0 \text{ min}$). Nach einer anfänglichen Phase, während der die Intensität in beiden

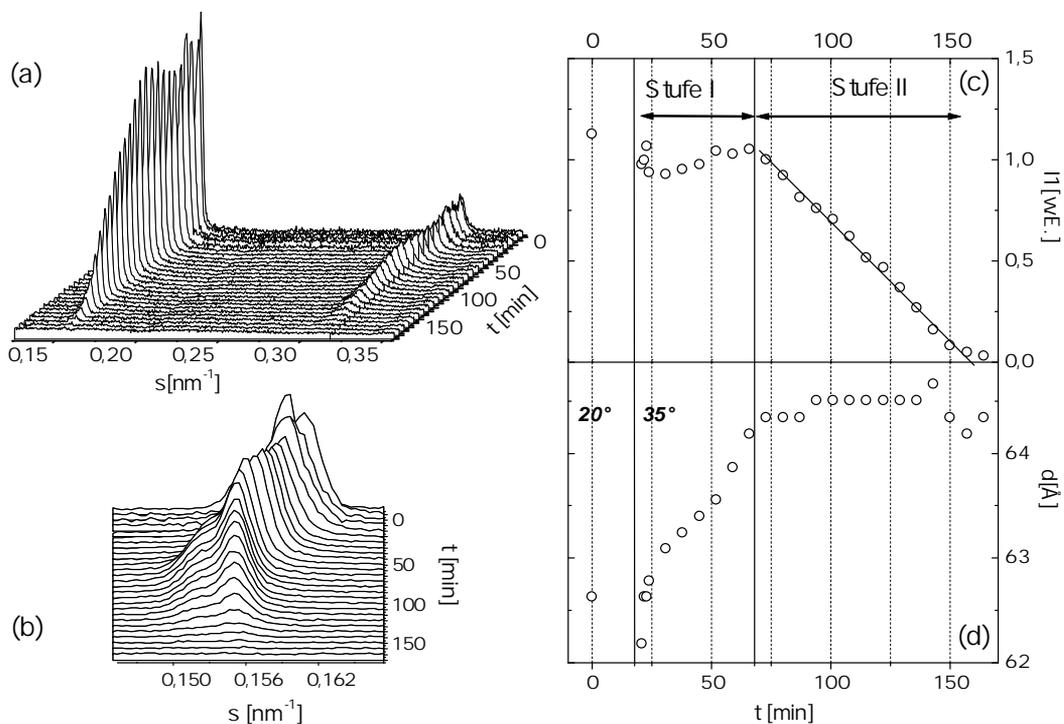


Abbildung 4.10: Teilbild (a) zeigt die zeitliche Entwicklung der ersten beiden Beugungsordnungen ab 22 Minuten nach der Präparation ($t=0 \text{ min}$). Die Temperatur T wird bei $t \approx 17 \text{ min}$ innerhalb von ca. 2 min von 20°C auf 35°C erhöht. In Ausschnitt (b) wird die Positionsänderung der ersten Ordnung erkennbar. Die linke Schulter der Intensitätsverteilung hat sich als Artefakt herausgestellt (siehe Text und Abb.4.5II). Weitere Erläuterungen zu den Auswertungen (c) und (d) der Serie von Spektren stehen im Text.

Beugungsordnungen auf hohem Niveau variiert, folgt ein Abschnitt des gleichmäßigen Abbaus der lamellaren Ordnung bis das Signal schließlich weitgehend im Streuuntergrund verschwindet. In Abb.4.10b ist zu erkennen, daß die Position der ersten Beugungsordnung sich während Phase I zu kleineren s -Werten verschiebt, daraufhin jedoch konstant bleibt. Die erhöhte Flanke der Ordnung zu kleinen Winkeln (linke Schulter) hat sich als Artefakt herausgestellt. Dies konnte durch einen Vergleich der OED-Spektren mit den entsprechenden Projektionen aus den nur in wenigen Minuten Abstand aufgenommenen IP-Aufnahmen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Eine Auswertung der Serie von Spektren wird in Abb.4.10c und (d) vorgestellt. Im oberen Bild ist die maximale Intensität der ersten Beugungsordnung I_1 gegen die Zeit aufgetragen, darunter befindet sich der aus der Position des Maximums beider Ordnungen bestimmte Schichtabstand d . Nach dem Heizen variiert die Intensität I_1 innerhalb weniger Minuten um mehr als 10% und nimmt dann stetig zu, bis sie linear abfällt, nachdem d größer als 64.3\AA ist. Die zweite Beugungsordnung verhält sich konform. Der d -Wert sinkt beim Heizen um 0.45\AA ab und steigt daraufhin zunächst sprunghaft, dann langsamer auf einen konstanten Wert von 64.5\AA an.

Zusammengefaßt lassen sich die beiden zeitlichen Stadien des Quellvorgangs folgendermaßen formulieren: In der Phase I nähert sich der Schichtabstand d kontinuierlich einem Grenzwert. Dabei ändert sich die maximale Streuintensität I_1 nur unsystematisch. Beim Annähern an den Grenzwert beginnt die Phase II: Die Intensität I_1 nimmt bei nun nahezu konstantem d bis zum Verschwinden näherungsweise linear ab.

Die benannten Phasen werden von allen DOPC-Proben durchlaufen, die nach dem Verfahren MR1 präpariert wurden und deren lamellare Ordnung sich zurückbildet. Wie schon bei dem gezeigten Beispiel angedeutet, kann sich die Intensität nach der linearen Abnahme nochmals auf niedrigem Niveau stabilisieren (Abb.4.10c). In einigen Fällen bleibt die dazugehörige Struktur über den restlichen Beobachtungszeitraum unverändert erhalten. Es wurde mehrfach – vor allem bei hohen Quelltemperaturen (ab 50°C) – beobachtet, daß die Intensität der Beugungsordnungen schon systematisch abnehmen kann, bevor der Schichtabstand einen Grenzwert erreicht hat. Zudem ist die Rate des Abbaus der Ordnung nicht immer so konstant wie hier gezeigt. In mehreren Fällen unterliegt die Intensitätsflanke in Phase II starken Schwankungen oder sie besitzt einen konkaven bzw. konvexen Verlauf.

4.3.3 Simultaner Abbau der Ordnung innerhalb einer Probe

Während die Kapillare i.A. so in den Strahl justiert wurde, daß die Intensität der Beugungsordnung im OED maximal ist, wurde sie in einigen Fällen im Strahl zentriert. Am Laboraufbau konnten dann bei gut orientierten Proben die Beugungsordnungen beider gegenüberliegender Ringbereiche im Spektrum aufgelöst werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, den Quellvorgang für zwei räumlich voneinander getrennte Gebiete gleichzeitig innerhalb der Kapillare zu untersuchen.

Die im folgenden beschriebene Probe besitzt einen Durchmesser von 0.5mm und wurde 15 Minuten nach dem Befüllen mit Wasser auf eine Temperatur von 31.7°C gebracht. Direkt im Anschluß daran wurden die Messungen durchgeführt. Die Braggreflexe sind in beiden Beugungsordnungen um den gleichen Winkelbeitrag $\Delta 2\theta = 0.21^\circ$ aufgespalten (Abb.4.11b). Im Fall koexistierender Schichtabstände

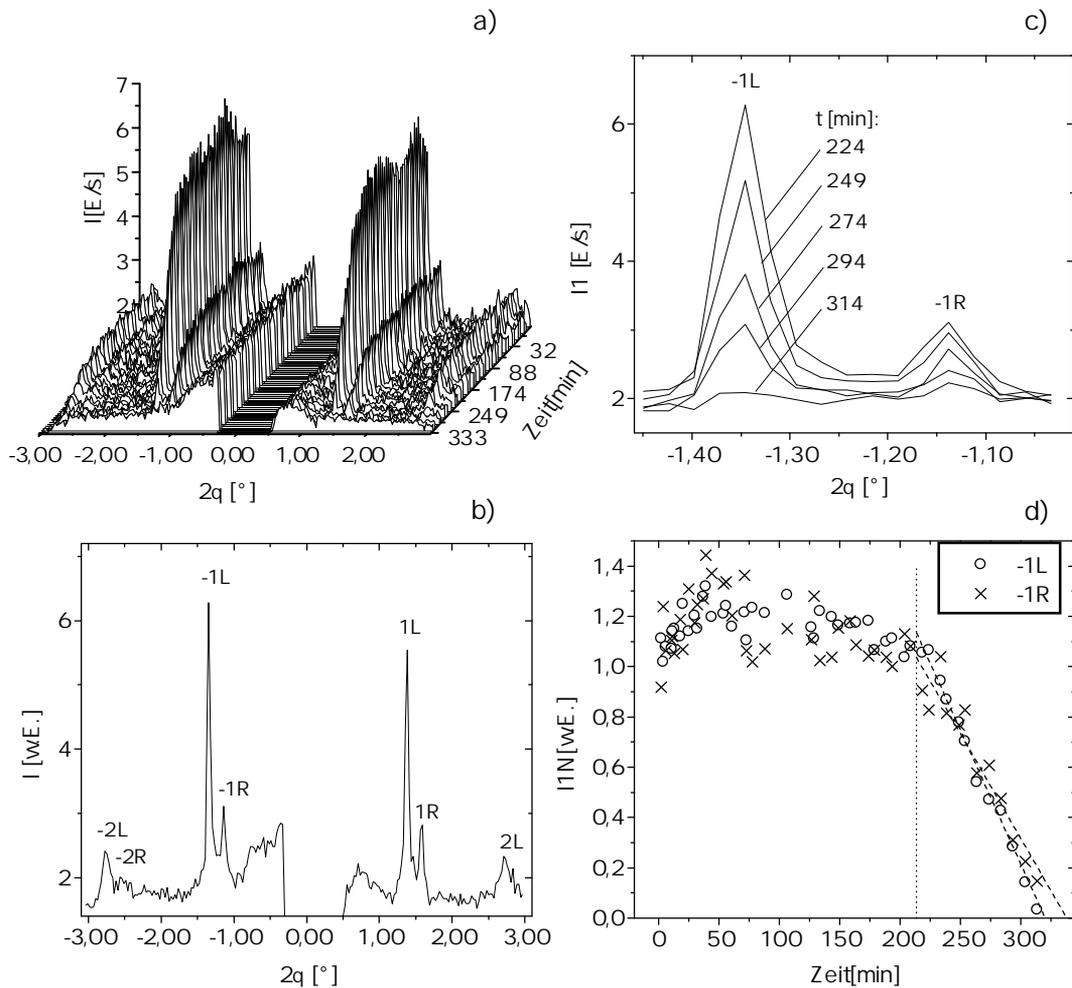


Abbildung 4.11: Zeitliche Entwicklung einer DOPC–Probe bei 31.7°C. Die Beugungsordnungen sind aufgespalten, da gegenüberliegende Ringgebiete beitragen. (a) Abfolge von OED–Spektren im Winkelbereich zwischen -3° und 3° . (b) Einzelspektrum bei $t = 224$ min. Die Abkürzung über den Reflexen, z.B. 1L, steht für die Beugungsordnung n und den Ort des Streugebietes in der Kapillare L=links. (c) Ausschnitt des Spektrums zu verschiedenen Zeitpunkten. (d) Auf den gesamten Mittelwert normierte Intensität der Ordnung -1 für den linken und rechten Kapillarenbereich vs. Zeit.

innerhalb nur eines Gebietes wäre eine Verdoppelung von $\Delta 2\theta$ von der ersten zur zweiten Ordnung zu erwarten. Zudem stimmt der gemessene Wert von 0.21° mit dem einer Abschätzung für die gegebene Strahl- und Probengeometrie überein (vgl. Kap.2.1.3, Abb.2.9, 2.7). Die zu den verschiedenen Ringgebieten gehörigen Reflexe wurden mit dem Kürzel „L“ und „R“ für die linke bzw. rechte Kapillareseite versehen. In Abb.2.9 entspricht dies den beiden Ringgebieten auf der z -Achse. Die Streuintensität der linken Seite übertrifft die der rechten in der ersten Ordnung um einen Faktor von ca. 3.5. Dies bedeutet, daß die Kapillare nicht völlig zentriert im Strahl liegt. Die Halbwertsbreite (FWHM) der ersten Beugungsordnung ist für

beide Seiten vergleichbar groß, nämlich 0.058° für die rechte sowie 0.055° für die linke. Da die Breite des an der Beugung beteiligten Teilstrahls von den lateralen Abmessungen D_L des Streugebietes abhängt, kann rückgeschlossen werden, daß D_L für beide Seiten ähnlich groß ist. Eine geometrische Abschätzung liefert $D_L \approx 50\mu m$.

Der Abbau der lamellaren Ordnung setzt bei dieser Probe erst ca. $215min$ nach Erreichen der Quelltemperatur ein (Abb.4.11d). Legt man den in Abb.4.13a angenommenen linearen Zusammenhang zwischen der Dauer von Phase I und der Temperatur zugrunde, erwartet man $52min$. Aus Abb.4.11a wird ersichtlich, daß die zeitliche Entwicklung aller Reflexe korreliert verläuft. Dies trifft sowohl auf das Intensitätsplateau als auch auf die Flanke zu. Am Beispiel der ersten linken Beugungsordnung (-1) läßt sich die zeitgleiche Intensitätsabnahme für beide Probenbereiche verfolgen (c). Die durch lineare Näherung gewonnenen Abbauraten stimmen für beide Gebiete so gut wie überein (d): Die linke Seite bildet sich mit einer Steigung von $-0.011min^{-1}$ etwas schneller zurück als die rechte mit $-0.008min^{-1}$. Eine mögliche Ursache dafür ist, daß auf der rechten Seite der Kapillare mehr Liposomen aus Phase I übrig bleiben als auf der linken. Sie sollten gegen Ende von Phase II zunehmend ins Gewicht fallen und bewirken, daß der relative Anteil der Intensität von rechts bezogen auf links zunimmt. Ab $t \approx 300min$ (Abb.4.11c, d) deutet sich dies an.

Insgesamt wurde in mehreren Fällen gut gerichteter und zentrierter Proben nachgewiesen, daß die Stadien des Quellvorgangs an gegenüberliegenden Stellen des Ringes so gut wie zeitgleich durchlaufen werden. Dieses Ergebnis wird durch lichtmikroskopische Beobachtungen bestätigt (vgl. Kap.4.3.7).

4.3.4 Temperaturabhängigkeit der Dauer von Phase I und II sowie des Schichtabstandes

An die Beobachtung der beiden Quellstadien (Kap.4.3.3) schließt sich folgende Fragestellung an: Gibt es einen Einfluß der Quelltemperatur auf die Dauer von Phase I und II?

Fünf DOPC-Proben bei 42° – $44^\circ C$ Um dies festzustellen, wurden die Daten von fünf Proben zusammengestellt, die möglichst nahe beieinander liegen, was die Dauer von der Präparation bis zur Heizphase angeht ($11min$ – $18min$), und die sich in der Endtemperatur kaum unterscheiden (42° – $44^\circ C$). Alle Proben wurden zwischen dem ersten und zweiten Spektrum auf die Endtemperatur gebracht. Die Messungen wurden am Laboraufbau durchgeführt. Abb.4.12 untergliedert sich in eine linke und rechte Spalte. Auf der linken Seite befinden sich oben die Spektren einer ausgewählten Probe in einer Übersicht während des gesamten Quellvorgangs (a) sowie an definierten Zeitpunkten (b). Hinzugefügt ist die zeitliche Entwicklung des untergrundkorrigierten Maximums der ersten Beugungsordnung I_1 sowie die Änderung des Schichtabstandes d (c). Abgesehen von der starken Intensitätsabnahme von 45% nach dem Erwärmen der Probe entspricht der Verlauf von I_1 bzw. d gegen die Zeit dem in Abb.4.10c, (d) gezeigten. Beide Phasen des Quellens sind erkennbar, der Übergang von Phase I zu II findet ca. bei $t = 40min$ statt.

Die untergrundkorrigierten Intensitäten I_1 aller fünf Proben sind im oberen rechten Bild (d) gegen die Zeit aufgetragen. Aus dem Vergleich von I_1 zwischen den

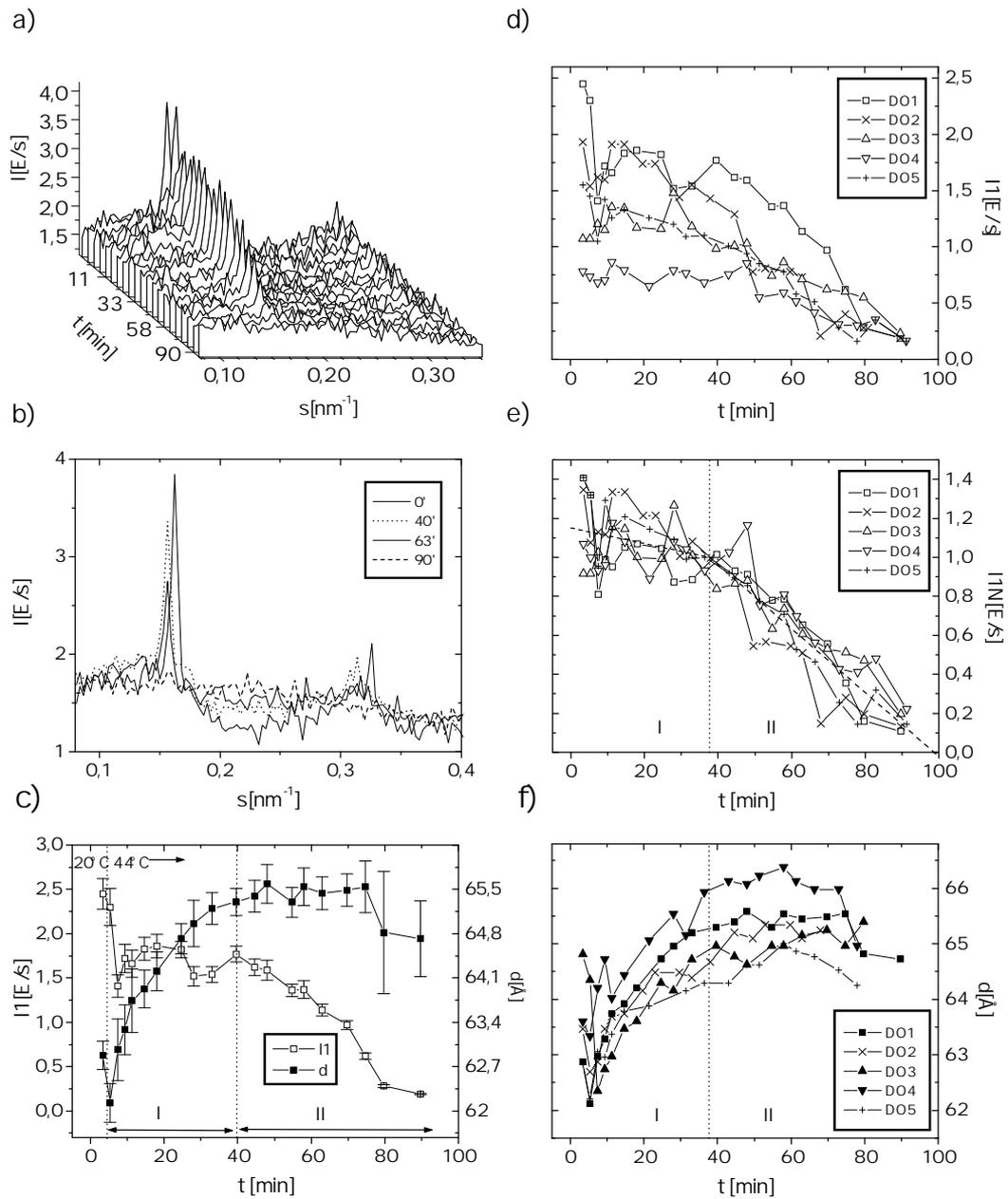


Abbildung 4.12: Am Laboraufbau gemessener Abbau der lamellaren Ordnung einer DOPC-Probe bei $T = 44^{\circ}\text{C}$ (linke Spalte (a)–(c)). Rechts werden die Intensitäten (d), (e) und d -Werte (f) von fünf Proben mit nahe beieinander liegenden Temperaturen ($42^{\circ}\text{--}44^{\circ}\text{C}$) miteinander verglichen. In (d) sind die Intensitäten im Maximum der ersten Ordnung II gegen die Zeit aufgetragen. Bild (e) zeigt die auf den jeweils maximalen $I1$ -Wert einer Probe normierte Intensität $I1N$ gegen die Zeit.

Proben wird deutlich, daß, obwohl die Anfangswerte um mehr als einen Faktor drei differieren können, die lamellare Ordnung ungefähr zum selben Zeitpunkt ($t \approx 90\text{min}$) im Untergrund verschwindet. Normiert man $I1$ jeder Probe auf den Mit-

telwert innerhalb der gesamten Meßdauer, so erhält man den in (e) dargestellten Verlauf. Die intensitätsnormierten Kurven aller Proben von $I1N$ gegen die Zeit fallen gut zusammen. Es zeichnet sich eine Art Intensitätsplateau ab, das bis $t = 35 - 40 \text{min}$ reicht (e). Dies stimmt mit dem Zeitpunkt überein, an dem die d -Werte der Proben ihrem Grenzwert nahekommen (f). Für $t > 40 \text{min}$ entspricht der Verlauf von $I1N$ im Mittel einer Geraden, die eine Steigung von $R2 = -0.0164 \pm 0,001 \text{min}^{-1}$ aufweist, wenn man den Startwert $I1N$ bei $t = 37.7 \text{min}$ auf den Wert $I1N_S=1$ festlegt. Dies entspricht der Forderung, daß der Reziprokwert von $R2$, $\Delta t_2 = R2^{-1}$, das Zeitintervall für Phase II angibt, innerhalb dessen die Intensität näherungsweise linear bis auf Null absinkt. Der Schnittpunkt der angenäherten Geraden für das Plateau mit der aus Phase II liegt bei $t = 37.7 \text{min}$. Die von Null verschiedene Steigung für die Ausgleichsgerade des Plateaus ($R1 = -0.0039 \pm 0.02 \text{min}^{-1}$) ist vor allem auf die hohen Anfangswerte einzelner Proben (z.B. DOPC1) zurückzuführen. Allerdings liegt ihr Korrelationskoeffizient nur bei 0.28, was auf die große Streuung der Intensitäten in Phase I rückschließen läßt. Für die Gerade in Phase II beträgt der Korrelationskoeffizient 0.91. Am Beispiel von fünf DOPC-Proben bei $T=42^\circ-44^\circ\text{C}$ konnte demnach eine ungefähre Übereinstimmung für die Dauer von Phase I und II nachgewiesen werden: Der Abbau der Ordnung setzt im Mittel ca. $\Delta t_I \approx 35 \text{min}$ nach Erreichen der Quelltemperatur ein und erfolgt dann innerhalb von $\Delta t_{II} = 61 \text{min}$.

Die lamellare Ordnung verschwindet bei 43°C im Mittel also nach insgesamt $\Delta t_g = \Delta t_I + \Delta t_{II} = 96 \text{min}$. Diese Dauer läßt sich aus dem Verlauf von $I1$ durch Extrapolieren der Flanke bis $I1=0$ bei allen Proben erschließen. Die Bestimmung des Übergangzeitpunktes t_0 zwischen Phase I und II ist jedoch mit Schwierigkeiten behaftet, wenn er weder am Intensitäts- noch am Schichtabstandsverlauf einer Einzelprobe eindeutig zu erkennen ist. Dies ist vor allem bei Probe DOPC5 der Fall (siehe Abb.4.10d und f): Weder $I1$ noch d erlaubt eine eindeutige Bestimmung von t_0 . Wie aus Abb.4.10f ersichtlich, läßt sich für eine gegebene Quelltemperatur T kein absoluter Grenzwert für d angeben, oberhalb derer der Abbau definitiv beginnt, da die d -Werte in Phase II zu stark streuen. Bildet man den Mittelwert \bar{d}_{II} aller Proben für $t > 38 \text{min}$, so ergibt sich $\bar{d}_{II} = 65.2 \pm 0.4 \text{Å}$.

Temperaturabhängigkeit von Δt_I , Δt_{II} und Δt_g für DOPC In Abb.4.13a, (b) ist die Dauer beider Phasen, Δt_I sowie Δt_{II} , in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Abb.4.13c zeigt die Gesamtdauer Δt_g beider Stadien als Funktion der Temperatur. Es wurden nur solche DOPC-Proben berücksichtigt, für die eine eindeutige Bestimmung des Übergangzeitpunktes zwischen Phase I und II aus dem Verlauf von $I1$ bzw. d gegen die Zeit möglich war. Es zeigt sich, daß beide Intervalle Δt_I und Δt_{II} mit steigender Temperatur T kürzer werden, d.h die Dauer von Phase I und II verringert sich bei höherem T . Der Verlauf von Δt_I und Δt_{II} gegen T wurde durch einen Arrheniusfit (lineare Näherung für den Verlauf von $\ln(\Delta t)$ gegen $1/T$) approximiert. Die entsprechenden Kurven sind in Abb.4.13 als durchgezogene Linie dargestellt. Die aus der Steigung im Arrheniusplot abgelesene Temperatur beträgt 10265°K für Δt_I bzw. 5345°K für Δt_{II} .

Der Wertebereich der Dauer ist in allen Teilbildern aus Abb.4.13 bei höheren Temperaturen ($T > 39^\circ\text{C}$) vergrößert dargestellt. Der temperaturabhängige Ver-

lauf des Zeitintervalls wurde innerhalb dieses Temperaturbereichs durch eine Gerade angenähert (gestrichelte Linie). Aus der linearen Näherung von Δt_I gegen T bestimmte Werte werden in Kap.4.3.7 mit der aus optischen Kriterien abgeleiteten Dauer von Phase I verglichen.

Zu geringen Temperaturen steigt die Dauer beider Phasen stark an. Dabei ist eine Zunahme der Streuung der gemessenen Werte für Δt_{II} zu beobachten (Abb.4.13b). Bei einer geringen Temperatur liegen die Meßwerte der Dauer von Phase II weit auseinander.

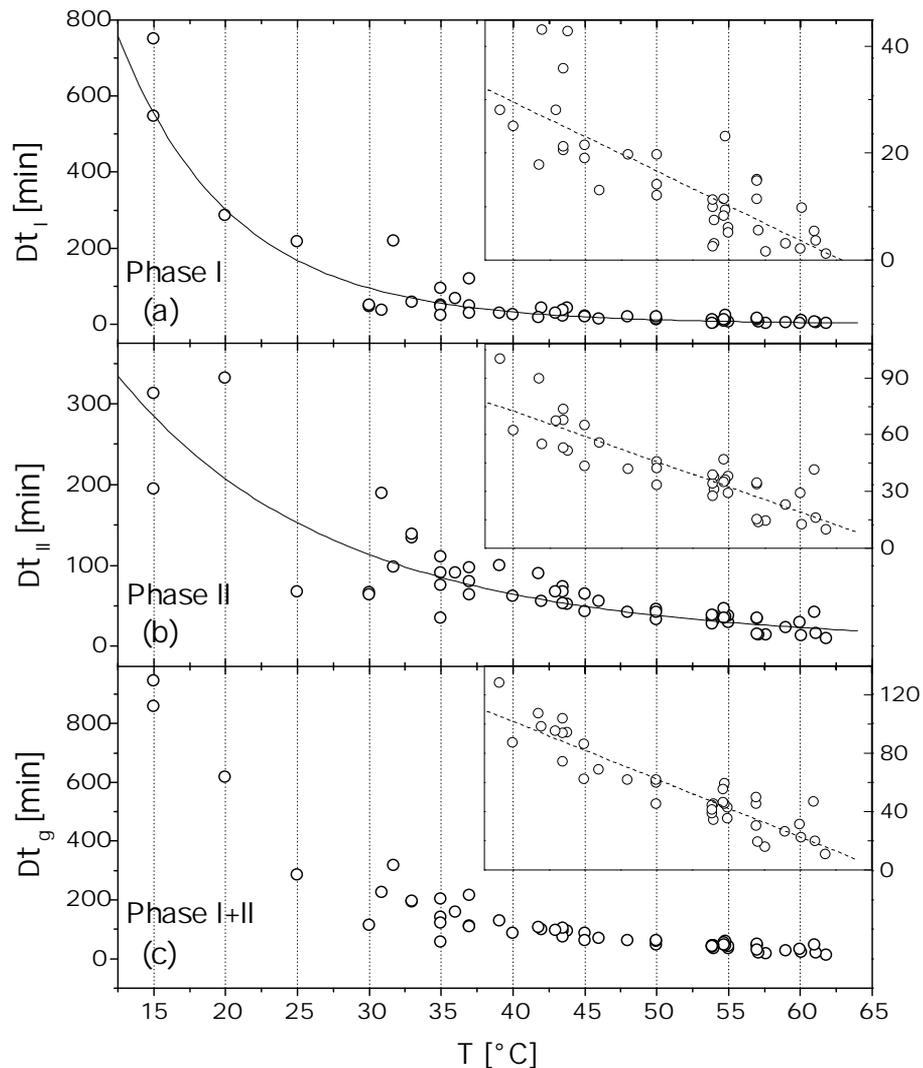


Abbildung 4.13: Dauer der Phasen I (Δt_I), (a) und II (Δt_{II}), (b) sowie Gesamtdauer beider Phasen (Δt_g), (c) als Funktion der Temperatur T . Die eingezeichneten Fitfunktionen für den temperaturabhängigen Verlauf von Δt_I und Δt_{II} sind das Ergebnis eines Arrheniusfits (durchgezogene Linien).

In allen drei Fällen ist der Bereich der Dauer bei höheren Temperaturen ($T > 39^\circ\text{C}$) vergrößert dargestellt. Innerhalb dieses Temperaturbereichs wurde der Verlauf des Zeitintervalls gegen T der Anschauung halber durch eine Gerade angenähert (gestrichelte Linie).

Temperaturabhängigkeit von Δt_I und Δt_{II} für POPC und SOPC Insgesamt wurde der Quellprozeß für sechs POPC–Proben und sechs SOPC–Proben untersucht. Es wurden Quelltemperaturen zwischen 20°C und 55°C gewählt. Im Mittel vergeht zwischen der Präparation der Proben und der Temperaturerhöhung soviel Zeit (15–30min) wie für die DOPC–Proben. In Kap.4.3.1.1 wurde ausgeführt, daß die Orientierung für POPC und SOPC wesentlich geringer ist als für DOPC.

Für POPC und SOPC folgt der systematische Abbau der lamellaren Ordnung in den meisten Fällen unmittelbar auf die Temperaturerhöhung. Bei einer seit der Präparation konstant gehaltenen Temperatur (20°C) beginnt der Abbau nach $\Delta t_I = 40\text{min}$. Vergleichsweise dauert die Phase I für DOPC–Proben bei dieser Temperatur ca. 300min (Abb.4.13a).

Abb.4.14 zeigt den Verlauf der Dauer von Phase II für jeweils sechs SOPC–Proben und POPC–Proben gegen die Quelltemperatur. Der Verlauf wurde für SOPC und POPC durch einen Arrheniusfit approximiert (durchgezogene Linien). Die gestrichelte Linie stellt den angenäherten Verlauf für DOPC dar (Abb.4.13b). Während sich der Verlauf zwischen DOPC und SOPC nur wenig unterscheidet, fallen die Abbauzeiten für POPC insgesamt viel geringer aus. Außerdem ist die Änderung von Δt_{II} über das beobachtete Temperaturintervall deutlich kleiner.

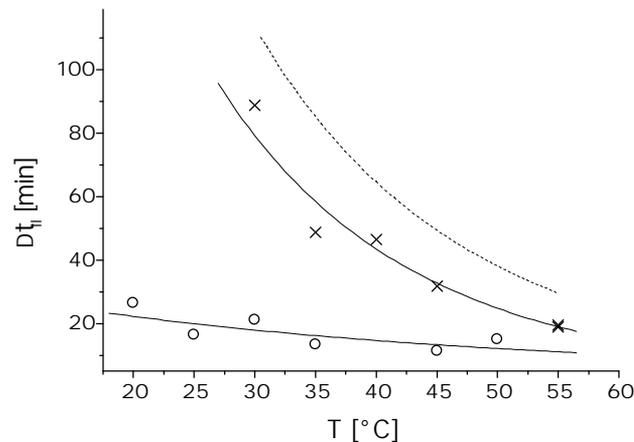


Abbildung 4.14: Dauer der Phase II (Δt_{II}) als Funktion der Temperatur T . Der Verlauf von Δt_{II} gegen T wurde für SOPC (\times) und POPC (\circ) durch einen Arrheniusfit angenähert (durchgezogene Linien). Die gestrichelte Linie stellt den angenäherten Verlauf für DOPC dar (Abb.4.13).

Temperaturabhängigkeit des Schichtabstandes von DOPC in Phase II

Faßt man den Abstand d_{II} als den Mittelwert aller gemessener Schichtabstände während Phase II auf, so stellt sich heraus, daß d_{II} mit steigender Temperatur monoton zunimmt (Abb.4.15). Im Temperaturbereich zwischen 15°C und 57°C wird der Anstieg zunehmend größer. Der temperaturabhängige Verlauf von d_{II} läßt sich durch eine exponentielle Funktion annähern. Dieser funktionelle Zusammenhang stimmt qualitativ mit der aus der Literatur bekannten Temperaturabhängigkeit des Abstandes von DOPC überein [14]. Unstimmigkeiten treten vor allem im Hinblick

auf die Absolutwerte der Abstände auf. Darauf gehen wir in Kap.4.4.2 näher ein. Die Meßwerte zeigen eine Abweichung von der angenäherten Funktion von bis zu 0.5\AA . Es ist kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Abweichung und der Temperatur erkennbar.

Der in Abb.4.15 eingezeichnete Fehler σd der Einzelwerte entspricht der Streuung der während der Phase II gemessenen Schichtabstände (vgl. Abb.4.10d bzw. Abb.4.12f). Er setzt sich aus einem statistischen und einem systematischen Anteil zusammen. Letzterer kommt v.a. bei hohen Temperaturen zum Tragen, wenn die Phase II schon beginnt, während der Abstand noch stetig ansteigt.

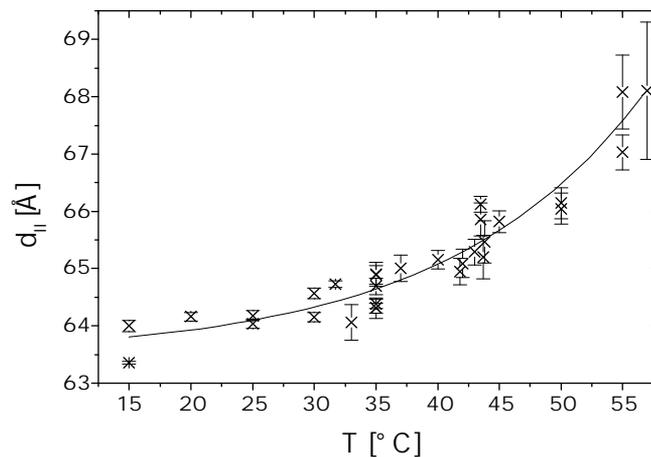


Abbildung 4.15: Mittlerer Schichtabstand d_{II} von DOPC-Proben während Phase II gegen Quelltemperatur T . Die Meßwerte wurden durch eine exponentielle Funktion angenähert.

4.3.5 Entwicklung der Halbwertsbreite

Die Analyse der Halbwertsbreite einer Beugungsordnung eröffnet die Möglichkeit, Eigenschaften des betreffenden Streuvolumens in Erfahrung zu bringen. Dazu zählen die räumliche Verteilung des Streuvolumens, die mittlere Größe einer Streudomäne, die Ordnung des Systems und die Koexistenz von Domänen mit abweichenden Schichtabständen. Jede dieser Eigenschaften trägt in spezifischer Weise zu der Gesamtbreite einer Beugungsordnung bei. Wie sich die einzelnen Faktoren auf die Halbwertsbreite auswirken, wurde an anderer Stelle erörtert: In Kap.2.3.4 werden mögliche Beiträge durch Unordnung und eine endliche Domänengröße anhand spezieller Modelle für Vielschichtsysteme diskutiert. Die Verteilung des Streuvolumens innerhalb der Kapillare ist Gegenstand von Kap.4.3.1 und wird in Kap.4.3.7.1 nochmals aufgegriffen.

Die Untersuchungen zur Entwicklung der Halbwertsbreite wurden mit dem Ziel durchgeführt, auf mögliche Änderungen von Systemeigenschaften während des Quellvorgangs zurückzuschließen. Die Versuche wurden vor allem wegen der höheren Winkelauflösung am Synchrotronaufbau durchgeführt. Die im folgenden vorgestellten Proben (DOPC/Wasser) zeichnen sich durch eine gute Orientierung des Vielschicht-

systems aus (vgl. Kap.4.3.1.1). Ein Großteil der beobachteten Beugungsintensität geht also auf Schichten zurück, die parallel zur Kapillarenwand verlaufen und Bestandteil des Lipidringes sind. Ungerichtete Probenbereiche leisten nur einen kleinen Intensitätsbeitrag. Der durch die räumliche Umverlagerung der Vielschichtliposomen erwartete Einfluß auf die Intensitätsverteilung (s. Kap.4.3.6) wird dadurch möglichst gering gehalten.

An dieser Stelle sei schon vorweggenommen, daß trotz der Einschränkung auf Proben mit einer guten Orientierung eine eindeutige Zuordnung zwischen der beobachteten Veränderung der Halbwertsbreite und einer dafür in Frage kommenden Ursache nur in Ausnahmefällen möglich ist. Vielmehr scheinen in der Regel mehrere Effekte gleichzeitig aufzutreten, die mit der angewendeten Methode nicht klar zu trennen sind. Zunächst werden die möglichen Beiträge zur Halbwertsbreite am Beispiel einer Probe bei einer niedrigen Quelltemperatur (15°C) diskutiert (Kap.4.3.5.1). Daraufhin zeigen wir, welchen Einfluß eine Temperaturerhöhung auf die Breite der Intensitätsverteilung hat (Kap.4.3.5.2, S.102). Anschließend diskutieren wir die Entwicklung der Halbwertsbreite im Hinblick auf koexistierende Schichtabstände innerhalb des Streuvolumens (Kap.4.3.5.2, S.103). Schließlich geben wir eine kurze Zusammenfassung.

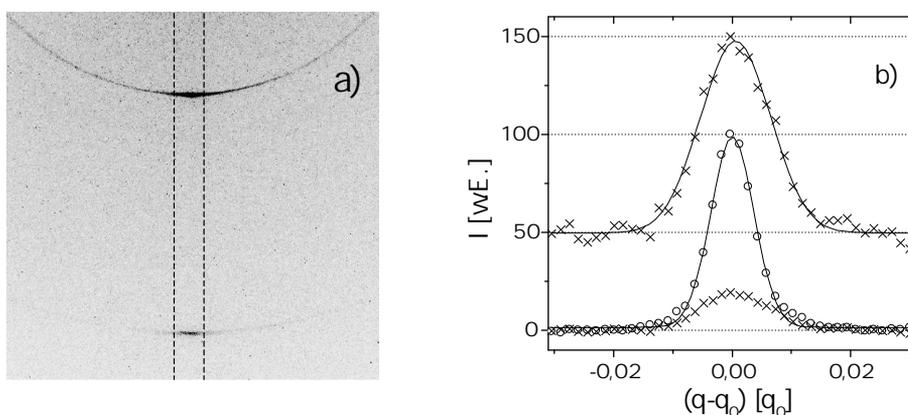


Abbildung 4.16: a) Ausschnitt aus einer Image-Plate-Aufnahme einer DOPC-Probe ca. 30min nach der Präparation bei 15°C . Innerhalb der gestrichelten Linien, die die Begrenzung des OED-Eintrittsfensters kennzeichnen, befinden sich intensive Streubeiträge aus orientierten Bereichen der Probe. Weitere Details siehe Text.

b) Bereiche des über einen Kreisbogen von 5° aufintegrierten Spektrums der in Bild (a) gezeigten IP-Aufnahme im Bereich der ersten und zweiten Beugungsordnung mit $q_0 = 0,10\text{\AA}^{-1}$. Die Integration wurde um den Winkel mit der größten Intensität durchgeführt. Unten ist der Verlauf der ersten (\circ) und zweiten (\times) Beugungsordnung dargestellt. Von beiden wurde jeweils der Untergrund in linearer Näherung abgezogen. Die auf die Höhe der ersten normierte zweite Ordnung wurde um 50 Einheiten nach oben verschoben. Beide Ordnungen lassen sich durch eine Gaußfunktion annähern (durchgezogene Linie).

4.3.5.1 Änderungen bei tiefen Temperaturen

Zunächst beschreiben wir die zeitliche Entwicklung der Halbwertsbreite von Beugungsordnungen einer DOPC-Probe bei 15°C . Zu Beginn der Messung wird eine

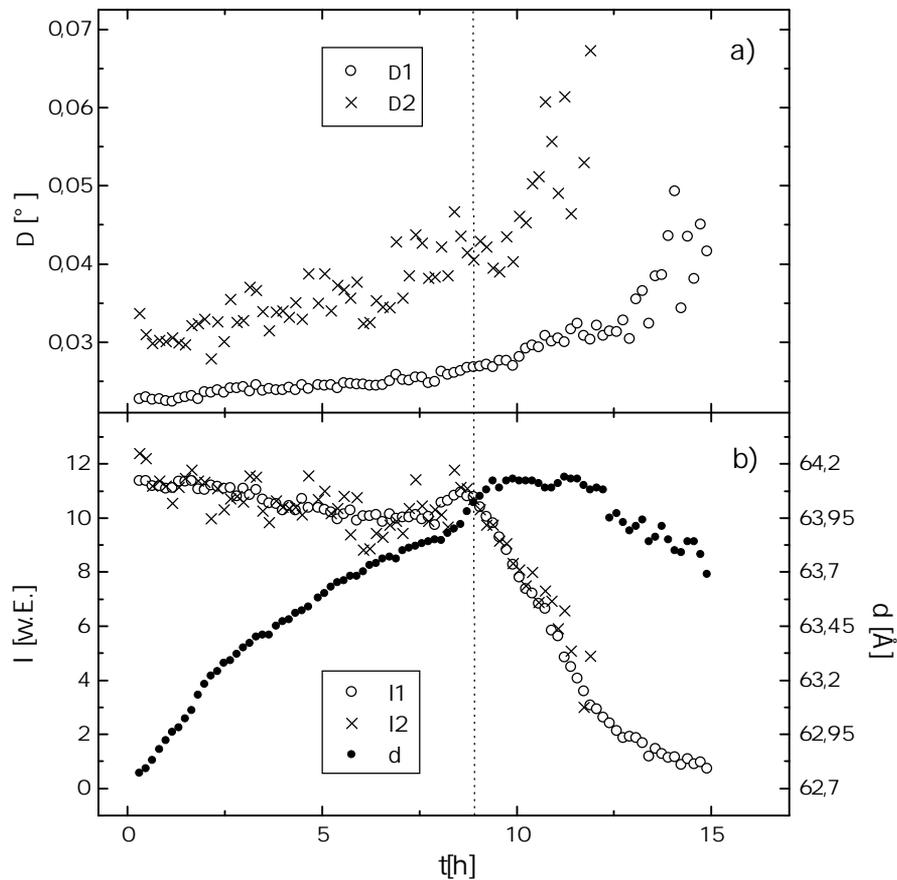


Abbildung 4.17: Auswertung der OED-Spektren: a) Zeitliche Entwicklung der vollen Halbwertsbreite Δ der ersten (○) und zweiten (×) Beugungsordnung einer DOPC-Probe bei 15°C . Die Breite Δ der Beugungsordnung sowie deren Position und Integral I wurde durch einen Gaußfit nach Abzug eines linearisierten Untergrundes bestimmt. b) Schichtperiode d (●) sowie integrale Beugungsintensität I der ersten (○) und zweiten (×) Ordnung gegen die Zeit. Letztere wurde mit einem Faktor 4.62 skaliert, dem Verhältnis der mittleren Intensität der ersten zur zweiten Ordnung in Phase I.

Image-Plate Aufnahme gemacht, daraufhin werden die Spektren mit einem linearen OED aufgenommen. Die geringe Temperatur hat zum Vorteil, daß verhältnismäßig große Integrationszeiten für ein Spektrum gewählt werden können; es wird abwechselnd jeweils 5min gemessen und gewartet. Abgesehen von einigen Unterbrechungen von jeweils wenigen Minuten wird über einen Zeitraum von 15h gemessen. Zwischen der Zugabe von Wasser und dem Einbau in die Thermostatisiereinheit liegen ca. 15min . Daraufhin wird die Probe von Raumtemperatur auf 15°C innerhalb weniger Minuten abgekühlt. Bis zum Beginn der ersten Image-Plate Aufnahme vergehen weitere 15min . Die Aufnahme Abb.4.16a zeigt die erste und zweite Beugungsordnung mit einer deutlichen Ausrichtung in vertikaler Richtung. Der Anteil geht auf Schichten zurück, die parallel zur Wand der Kapillaren verlaufen (vgl. Abb.2.9, Kap.4.3.1). Der Grad der Orientierung beträgt nach der Definition aus Kap.4.3.1.1

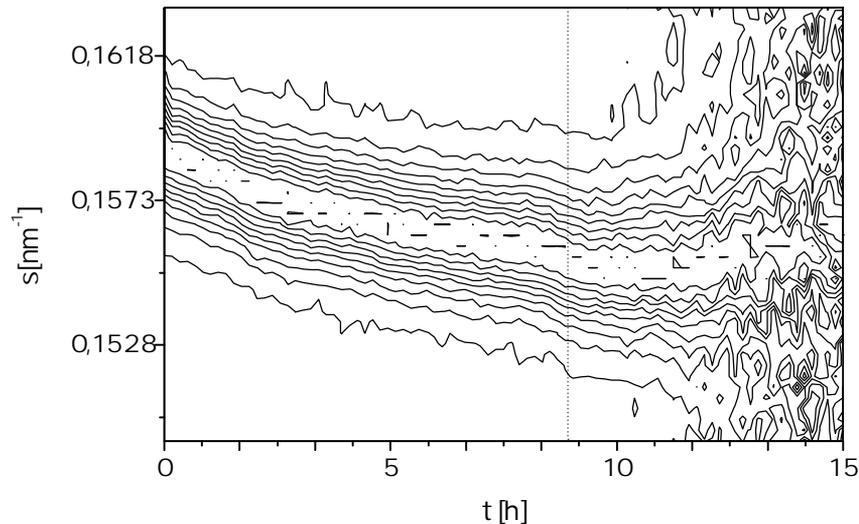


Abbildung 4.18: Höhenlinienprofil der untergrundkorrigierten ersten Beugungsordnung gegen die Zeit. Die Spektren sind zu jedem Zeitpunkt auf das Maximum der ersten Ordnung normiert. Die Auswertung der Breite und Position der ersten Ordnung dieser Probe wird in Abb.4.17 gezeigt. Die gestrichelte Linie markiert den Übergang zwischen Phase I und II.

$R_I = 41\%$. Das durch Integration über ein Kreissegment von 5° aus der Image Plate bestimmte untergrundkorrigierte Spektrum ist im Bereich beider Beugungsordnungen in Abb.4.16b dargestellt. Entsprechend einem Schichtabstand von $d = 62.8\text{\AA}$ beträgt die Position des Maximums $q = q_0 = 0.10\text{\AA}^{-1}$. Aus Abb.4.16b ist erkennbar, daß die zweite Ordnung wesentlich kleiner und zudem breiter ist als die erste. Die Auswertung eines Gaußfits ergibt 0.0117° und 0.0199° für die Halbwertsbreite der ersten bzw. zweiten Ordnung. Das Verhältnis ihrer integralen bzw. maximalen Intensität ist 3.2 bzw. 5.1. Die ungefähre Begrenzung des OED-Eintrittsfensters ist auf der Image Plate Aufnahme gestrichelt eingezeichnet (Abb.4.16). Aus der Lage im Beugungsbild ist ersichtlich, daß vor allem orientierte Bereiche zum Spektrum des OED beitragen. Die im folgenden diskutierten Halbwertsbreiten wurden nach Abzug eines linearisierten Untergrundes durch einen Gaußfit der jeweiligen Beugungsordnung aus dem Spektrum bestimmt. Gleichzeitig stehen auf diese Weise die integralen Intensitäten und die Positionen der Ordnungen zur Verfügung.

Die zeitliche Entwicklung der Beugungsordnungen verhält sich in den meisten Punkten so wie in Kap.4.3.2 beschrieben. Der Übergang von Phase I in II ist deutlich an dem Beginn der systematischen Abnahme ihrer Intensität zu erkennen (Abb.4.17b). Er erfolgt ungefähr $8.7h$ nach Einstellen der Quelltemperatur von 15°C . Der Abstand hat zu diesem Zeitpunkt fast seinen größten Wert erreicht (Abb.4.17b). Er nimmt allerdings gegen Ende der Meßperiode wieder deutlich ab. Eine mögliche Erklärung dafür geben wir im Diskussionsabschnitt. Die Mittelwerte der integralen Intensitäten beider Ordnungen wurden im Bereich von Phase I durch Skalierung zur Deckung gebracht. Ihr zeitlicher Verlauf stimmt bis zum Verschwinden der zweiten Ordnung im Untergrund gut überein.

Von Beginn an ist die Halbwertsbreite der zweiten Ordnung wesentlich größer

als die der ersten (Abb.4.17a). Eine Mittelung über die Breite des dritten bis zum sechsten Spektrum ergibt für die erste Ordnung 0.0227° , für die zweite 0.0303° . Verglichen mit den aus der Image Plate bestimmten Breiten sind die Absolutwerte für den OED zwar größer, doch bleibt der Unterschied zwischen beiden Ordnungen ungefähr gleich. Die größere Gesamtbreite der durch den OED aufgenommenen Ordnungen läßt sich auf dessen größere intrinsische Breite zurückführen. Die Halbwertsbreiten beider Ordnungen nehmen im Verlauf der Zeit monoton zu (Abb.4.17a, Abb.4.18), wobei ihre Steigung vor allem in Phase II größer wird. Die Halbwertsbreite der zweiten Ordnung steigt durchweg schneller als die der ersten an. Dies ist vor allem in Phase II der Fall.

In Abb.4.18 ist die Entwicklung der ersten Beugungsordnung als Höhenlinieprofil dargestellt. Die Spektren wurden dazu zu jedem Zeitpunkt auf das jeweilige Maximum der Ordnung normiert, so daß der Verlauf der Höhenlinien direkten Aufschluß über die Veränderung der Reflexbreite gibt.

Diskussion Anhand der zeitlichen Änderung der Breite Δ beider Ordnungen und deren Flächenverhältnis I_1/I_2 werden wir im folgenden die unterschiedlichen Faktoren, die zur Verbreiterung beitragen können, gegeneinander abwägen. Dabei nehmen wir der Einfachheit halber zunächst an, daß die Änderung von Δ ausschließlich auf eine Ursache zurückgeht. Als solche kommen, wie in Kap.2.3.4 diskutiert, in Frage:

1. Fluktuationsunordnung (Caillé–Theorie)
2. Aufweitung der räumlichen Domänenverteilung in longitudinaler Richtung
3. Abnahme der Kohärenzlänge bzw. Domänengröße
4. Koexistierende, abweichende Abstände
5. Statistische Unordnung (Parakristalline Theorie)

Zunächst gehen wir auf das konstante Verhältnis der integralen Intensität zwischen beiden Ordnungen bis zum Verschwinden der zweiten Ordnung ein. Die beobachtete Zunahme der Breite der Beugungsordnungen kann nicht auf Prozesse zurückzuführen sein, die mit einer deutlichen Änderung von I_1/I_2 verbunden sind. In Kap.2.3.4.4 wurde an einem konkreten Beispiel gezeigt, daß mit einer Zunahme der Fluktuationsunordnung nach der Caillé–Theorie zwar der zentrale Bereich der Beugungsordnungen breiter wird, doch zu höheren Ordnungen immer mehr Intensität aus dem Streupeak verloren geht. Dadurch ist nach diesem Modell mit einer Verbreiterung der Ordnung auch eine Zunahme von I_1/I_2 verbunden. Um bei einer Domänengröße von 100 Membranen eine Verbreiterung der Ordnungen in der Größenordnung zu erzielen wie sie während Phase I beobachtet wird, müßte der Caillé-Parameter (s. Kap.2.3.4.4) η_C ausgehend von 0 auf mindestens 0.2 erhöht werden. Dadurch würde I_1/I_2 von dem Anfangswert auf mehr als das achtfache ansteigen. Somit scheidet eine Zunahme der Fluktuationen als Erklärung für die beobachtete Verbreiterung in beiden Phasen aus.

Auch eine während des gesamten Quellprozesses ununterbrochen anhaltende Ausbreitung des Streuvolumens in der Richtung des OED-Fensters ist unplausibel. Der größte Abstand zweier Domänen in dieser Richtung ist durch den Durchmesser

der Kapillaren, 0.5mm , vorgegeben, was in der Projektion für beide Ordnungen einer Winkelbreite von 0.015° entspricht. Zum einen ist die gemessene Zunahme der Breite größer und zum anderen für beide Ordnungen unterschiedlich. Abgesehen davon ist der Prozeß einer kontinuierlichen Einbeziehung neuer entfernterer Domänen zur Streuung in der Richtung des OED-Fensters schwer vorstellbar.

Eine Abnahme der Kohärenzlänge kann nicht alleine für die Veränderung der Halbwertsbreite während des gesamten Quellprozesses verantwortlich sein, da, wie in Kap.2.3.4.3 beschrieben, die Differenz zwischen der Breite der ersten und zweiten Ordnung dann abnehmen sollte. Stattdessen übertrifft der Zuwachs in der zweiten stets den in der ersten Ordnung. Versucht man nun, den Anstieg der Breite der ersten Ordnung mit einer Abnahme der Kohärenzlänge in Zusammenhang zu bringen, nachdem die zweite Ordnung im Untergrund verschwunden ist, muß eine Anfangsbreite Δ_i gefunden werden, zu der die Scherrerverbreiterung nach (2.5) addiert wird. Stimmt Δ_i mit dem ersten Meßwert überein, ab dem die Verbreiterung einsetzt, muß die Rate der Domänenverkleinerung stark abnehmen, um den gemessenen Verlauf zu beschreiben. Geht man andererseits von einem deutlich kleineren Anfangswert für Δ_i als dem ersten Meßwert aus, muß die Zunahme der Breite schon vorher erfolgt sein und sollte zu einer Angleichung der Breite beider Ordnungen führen. Beide Möglichkeiten sind eher unwahrscheinlich.

Trägt zu dem Beugungsreflex eine Verteilung von Domänen mit koexistierenden Abständen bei, so ist mit einer Zunahme der Breite mit höherer Ordnung zu rechnen. In der Näherung einer vernachlässigbaren Reflexbreite der einzelnen Domänen im Vergleich zur Gesamtbreite ist die Breite der zweiten Ordnung doppelt so groß wie die der ersten. Andernfalls liegt ihre Breite zwischen der einfachen und doppelten Breite der ersten Ordnung. Die starke Zunahme der Halbwertsbreite der zweiten Ordnung mit dem Beginn von Phase II ist somit nicht mit einer Verteilung von Domänen zu deuten.

Die beobachtete Zunahme der Peakbreite in beiden Ordnungen bei konstantem Flächenverhältnis kann innerhalb des gesamten Zeitraumes qualitativ am besten mit dem Modell parakristalliner Unordnung erklärt werden. Aus Abb.2.14 geht hervor, daß die durch die parakristalline Theorie an einem speziellen Beispiel vorhergesagten Änderungen der Halbwertsbreite beider Ordnungen in der richtigen Größenordnung liegen. Eine Zunahme der mittleren Schwankungsbreite des Abstandes um ca. 2\AA reicht aus, um die Änderungen hervorzurufen.

Obwohl die parakristalline Theorie entsprechend den oben aufgelisteten Argumenten als geeignetster Kandidat für die Erklärung der beobachteten Veränderungen hervorgeht, wollen wir nochmals darauf hinweisen, daß sich diese Einschätzung anhand der vorgestellten Meßergebnisse nicht zweifelsfrei beweisen läßt. Dazu wäre an erster Stelle eine Entfaltung der instrumentellen Übertragungsfunktion notwendig (siehe Kap.2.3.4). In einem nächsten Schritt würde dann eine Profilanalyse stehen, die mit den Vorgaben des jeweiligen Modells verglichen werden müßte. Da der Verlauf der Übertragungsfunktion am Probenort unbekannt ist, ist eine Entfaltung und die damit verbundene Abseparation der instrumentellen Effekte unmöglich.

Auch wenn die Beobachtungen im wesentlichen in Übereinstimmung mit der parakristallinen Theorie interpretierbar sind, kann daraus nicht geschlossen werden, daß sie ausschließlich darauf zurückgehen. Die Kombination unterschiedlicher Ursachen muß daher auch in Betracht gezogen werden. Sie wird hier jedoch aufgrund

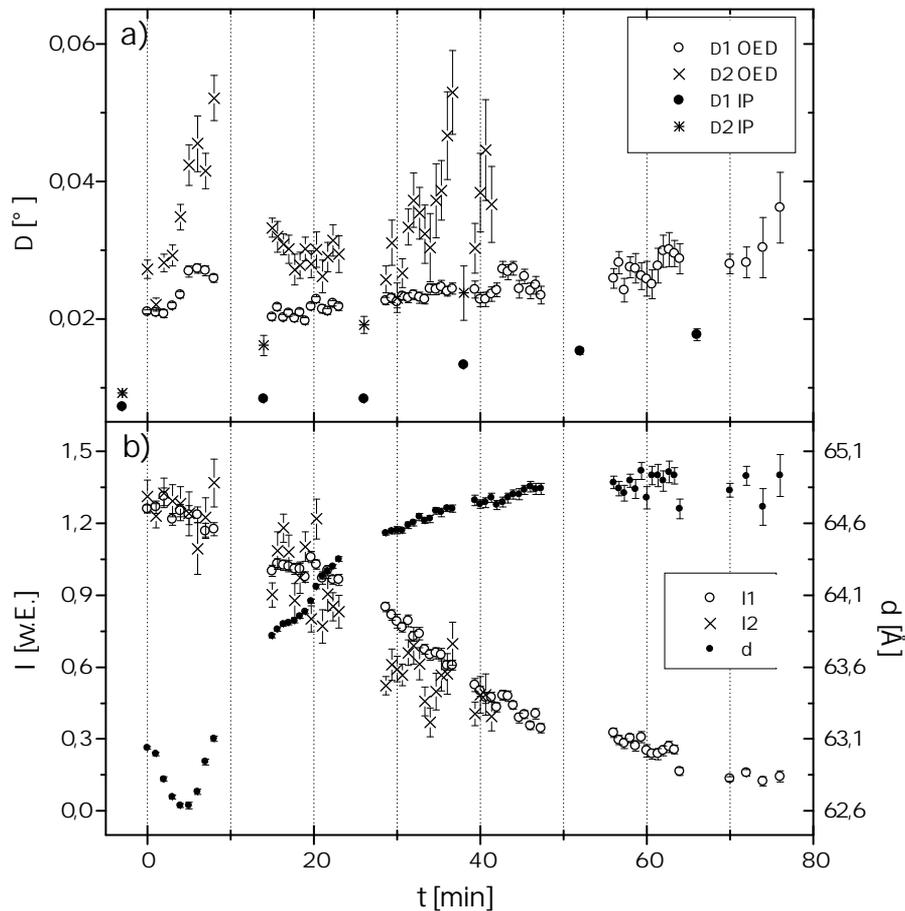


Abbildung 4.19: Auswertung von OED- und Image-Plate-Spektren einer DOPC-Probe. Die Temperatur wurde zwischen $t = 0\text{min}$ und $t = 3\text{min}$ von 20°C auf 35°C erhöht.

a) Zeitliche Entwicklung der vollen Halbwertsbreite Δ der ersten (\circ) (OED) (\bullet) (IP) und zweiten (\times) (OED) (\star) (IP) Beugungsordnung.

b) Schichtperiode d (\bullet) sowie integrale Beugungsintensität I der ersten (\circ) und zweiten (\times) Ordnung gegen die Zeit (OED). Letztere wurde mit einem Faktor 3.4 skaliert, dem Verhältnis der mittleren Intensität der ersten zur zweiten Ordnung in Phase I. Die Intensität der zweiten Ordnung weist durch das schlechte Peak-zu-Rausch-Verhältnis besonders in Phase II (Abb.4.20b) starke Schwankungen auf.

der drohenden Ambiguitäten nicht weiterverfolgt. Stattdessen gehen wir im nächsten Abschnitt an einem ausgewählten Beispiel einer weiteren Ursache für die Verbreiterung nach.

4.3.5.2 Koexistenz von Abständen

Anhand des Beispiels einer Probe, die auf eine Quelltemperatur von 35°C gebracht wird, werden zum einen die Auswirkungen der Temperaturerhöhung auf die Breite und Form der Beugungsordnungen beschrieben. Zur Charakterisierung der temperaturinduzierten Prozesse ist die Auflösung der OED-Spektren ausreichend. Dabei

kann der Vorteil einer dichten zeitlichen Rasterung mit einem Abstand von einer halben bis einer Minute genutzt werden. Zum anderen wird detaillierter als zuvor auf Änderungen der Beugungsordnungen vor allem in Phase II eingegangen. Dazu wurden Image-Plates anstelle von OED-Spektren in ca. 10–15 minütigen Abständen aufgenommen. Der hohe Grad der Orientierung von $R_I = 81\%$ (vgl. Kap.4.3.1) läßt darauf schließen, daß fast ausschließlich an der Kapillarenwand ausgerichtete Membranen zur Streuung beitragen. Die Temperaturerhöhung von 20°C auf 35°C wird zu Beginn des ersten OED-Meßintervalls bei $t = 0\text{min}$ mit einer Rate von $5^\circ\text{C}/\text{min}$ eingeleitet und ist daher bei $t = 3\text{min}$ abgeschlossen. Zwischen der Probenpräparation bei Raumtemperatur und Meßbeginn liegen 34min . Davon befindet sich die Probe die letzten 20min vor der Messung im Halter bei 20°C .

Die Auswertung der Meßdaten ist in Abb.4.19 dargestellt. Der Verlauf der untergrundkorrigierten Spektren im Bereich der Beugungsordnungen wurde durch Gaußfits angenähert. Die Spektren der Image-Plates wurden an der Position höchster Intensität durch Integration über eine Breite von vier Kanälen in transversaler Richtung, d.h. senkrecht zur Beugungsrichtung bzw. parallel zum Eintrittsfenster des OED, gewonnen. Die Fläche der ersten und zweiten Ordnung sind in Teilbild (b) gegen die Zeit aufgetragen, wobei letztere mit einem Faktor von 3.4 skaliert wurde. Dies ist das Verhältnis der Mittelwerte beider Intensitäten im Bereich zwischen $t = 0\text{min}$ und $t = 22\text{min}$. Dem Verlauf des Schichtabstandes und der Intensitäten nach zu schließen findet der Übergang von Phase I nach II ungefähr 25min nach Meßbeginn statt. Zuvor hat die Intensität beider Ordnungen schon deutlich abgenommen. In Phase II deutet sich eine geringfügig schnellere Abnahme der zweiten im Vergleich zur ersten Ordnung an. Das Intensitätsverhältnis der normierten Reflexe bleibt dabei in der Größenordnung von eins, so daß nach den Ausführungen in Kap.4.3.5.1 eine Zunahme der Fluktuationen nicht für die in dieser Phase beobachtete stetige Zunahme der Halbwertsbreiten in Abb.4.19b verantwortlich gemacht werden kann. Die Zunahme liegt in derselben Größenordnung wie für die in Kap.4.3.5.1 vorgestellte Probe. Die Änderung der Breite fällt unabhängig vom verwendeten Detektor in der zweiten Ordnung immer größer aus als in der ersten. Wie die Änderungen im einzelnen zustande kommen, ist Gegenstand der nächsten beiden Abschnitte.

Temperaturerhöhung Durch die Temperaturerhöhung von 20°C auf 35°C geht zunächst der mittlere Schichtabstand um 0.5Å zurück (Abb.4.19b). Von seinem Minimalwert aus wird der Abstand anfangs schnell größer. Er nähert sich sodann mit abnehmender Rate seinem Grenzwert asymptotisch. Gleichzeitig mit der Abnahme von d steigt die Breite beider Ordnungen deutlich an (Abb.4.19a), wobei die Änderung der zweiten wesentlich größer ist als die der ersten. Für die letztere geht Δ schneller wieder auf seinen ursprünglichen Wert zurück.

Abb.4.20 zeigt Ausschnitte von OED-Spektren im Bereich der ersten (a) und zweiten (b) Ordnung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Nachdem die Temperatur erhöht wurde ($t = 5\text{min}$), verläuft die linke Flanke beider Ordnungen flacher als die rechte. Außerdem ist die Gesamtbreite der zweiten Ordnung ungefähr doppelt so groß wie die der ersten. Beide Beobachtungen lassen darauf schließen, daß der Verbreiterung der Reflexe eine Koexistenz von Schichtabständen zugrunde liegt, welche sich

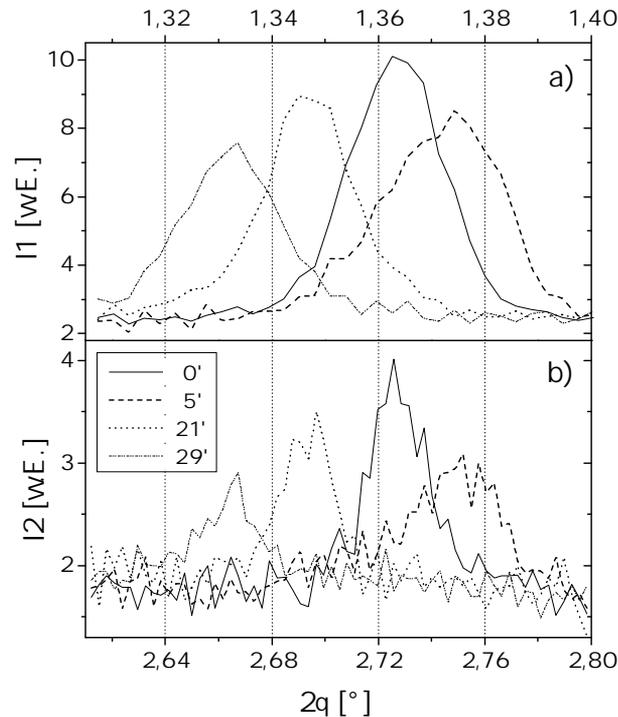


Abbildung 4.20: Durch eine Temperaturerhöhung von 20°C auf 35°C zwischen $t = 0\text{min}$ und $t = 3\text{min}$ eingeleitete Änderung von OED-Spektren einer DOPC-Probe (vgl. Abb.4.19). Der Winkelausschnitt der zweiten Beugungsordnung (b) wurde doppelt so groß gewählt wie der der ersten (a). Die in (b) aufgelisteten Zeitpunkte entsprechen dem Beginn der Aufnahme des jeweiligen Spektrums.

in der zweiten Ordnung durch einen doppelt so großen Winkelabstand bemerkbar macht. Eine zeitliche Abfolge von Abständen kommt als Ursache für die beobachtete Intensitätsverteilung nicht in Frage, da sie sich im vorhergehenden und darauffolgenden Spektrum kaum verändert. Genausowenig kann die Asymmetrie der Verteilung durch parakristalline Unordnung erklärt werden.

Bis zum Ende von Phase I ($t = 21\text{min}$) sind beide Ordnungen wieder so gut wie symmetrisch und die Halbwertsbreite ist mit dem ursprünglichen Wert ($t = 0\text{min}$) vergleichbar.

Entwicklung der Intensitätsverteilung einer gerichteten Probe In diesem Abschnitt geht es um die zeitliche Veränderung der zweidimensionalen Intensitätsverteilung im Bereich einer Beugungsordnung während des Quellvorgangs. Dazu konzentrieren wir uns auf die Image-Plate-Aufnahmen der Probe, deren OED-Spektren schon im vorherigen Abschnitt im Hinblick auf temperaturinduzierte Änderungen diskutiert wurde. Abb.4.21 zeigt die Intensitätsverteilung im Bereich der ersten Beugungsordnungen zu sechs aufeinanderfolgenden Zeitpunkten. Der Bezug zu dem aus den OED-Spektren bestimmten zeitlichen Verlauf der Intensität und des Schichtabstandes ist durch Abb.4.19 gegeben. Den dort eingezeichneten Halbwertsbreiten liegen die in Abb.4.21 dargestellten Aufnahmen zugrunde. Bevor wir

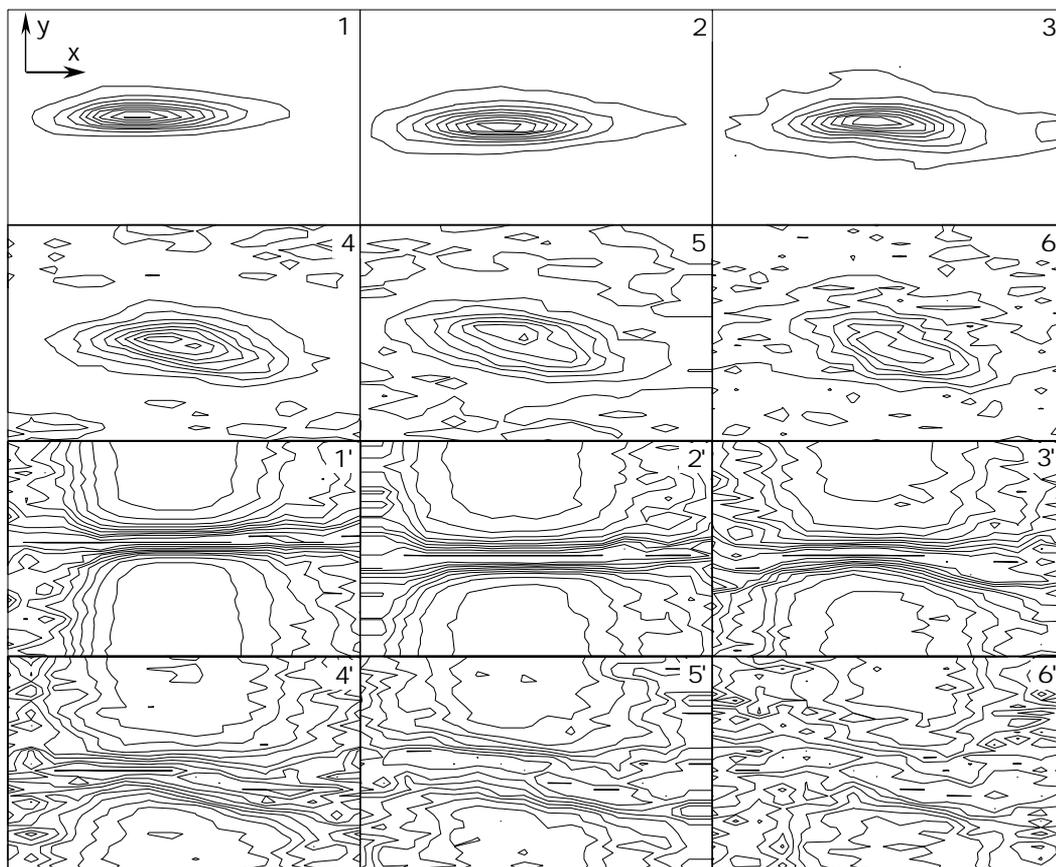


Abbildung 4.21: Ausschnitte aus Image-Plate Aufnahmen einer DOPC-Probe (Abb.4.19) im Bereich der ersten Beugungsordnung. Die Streuintensität ist in Form von Höhenlinien dargestellt, die zwischen Null und dem Maximalwert in 10%-Schritten unterteilt ist. Die zeitliche Abfolge der Aufnahmen (1-6) ist: $t = -3\text{min}, 14\text{min}, 26\text{min}, 38\text{min}, 52\text{min}, 66\text{min}$. Aus den Aufnahmen bestimmte Halbwertsbreiten werden in Abb.4.19 gezeigt. Die unteren sechs Teilbilder gehen aus den oberen dadurch hervor, daß spaltenweise die Maxima der Intensität auf einen einheitlichen Wert normiert werden. Die Lage der Spots im gewählten Ausschnitt ist willkürlich, der Nullpunkt des Streuwinkels 2θ liegt vertikal nach oben verschoben. Die horizontale Breite eines Ausschnitts beträgt 6.4mm , die vertikale 3.5mm . Der letztere Wert entspricht einer Streuwinkelbreite von $\Delta 2\theta = 0.072^\circ$.

näher auf die Ergebnisse eingehen, führen wir zwei Definitionen zur Charakterisierung einer zweidimensionalen Verteilung ein. Ihre „Längsachse“ entspricht der Geraden, entlang derer die Verteilung ihre maximale Gesamtausdehnung besitzt. Als „y-Grat“ bezeichnen wir den maximalen Höhenzug, der entsteht, wenn die Intensität der Verteilung spaltenweise so normiert wird, daß der Maximalwert für alle Spalten gleich groß ist (vgl. Abb.4.21, untere Bildreihe 1'-6').

Die Abmessungen der Intensitätsverteilung der ersten Aufnahme liegen in der Größenordnung des Primärstrahls. Nähert man den Verlauf des durch Projektion der Verteilung auf die x -Achse erhaltenen Spektrums durch eine Gaußfunktion an, erhält man eine volle Halbwertsbreite in Längsrichtung von $\Delta_L = 1.7\text{mm}$. Die nach derselben Methode bestimmte Breite des Primärstrahls beträgt 1.8mm . Bis

zur fünften Aufnahme nimmt Δ_L in der ersten Ordnung stetig auf 2mm zu. Die Längsachse sowie der y -Grat der Verteilung verlaufen in Ausschnitt 1 näherungsweise in horizontaler Richtung.

Wir richten das Augenmerk auf eine Verformung der Verteilung, die in Ausschnitt 3 am rechten Rand auftritt. Die Verteilung ist dort ein wenig nach unten verbogen. Dieser Trend setzt sich innerhalb der nächsten Aufnahmen weiter fort, so daß schließlich die Längsachse gegenüber der horizontalen Richtung deutlich verdreht ist. Allerdings ist die Verteilung bezüglich der Achse nicht mehr symmetrisch. Wäre dies der Fall, so würde der y -Grat einer Geraden entsprechen, deren Verlauf mit der Längsachse übereinstimmt. Stattdessen zeichnet sich ab, daß der y -Grat stellenweise nach wie vor horizontal verläuft. Dies wird vor allem in Ausschnitt 4' deutlich. Von links nach rechts nimmt der y -Grat zunächst einen konstanten y -Wert ein, knickt dann nach unten ab und bleibt daraufhin wiederum ungefähr konstant. Zur genaueren Bestimmung der Aufspaltung der Intensitätsverteilung in Ausschnitt 4 wird diese in x -Richtung in Einzelspektren zerlegt, die in y -Richtung verlaufen. Zu jedem Spektrum an der Position x wird nach Untergrundkorrektur durch einen Gaußfit der Schwerpunkt $y_S(x)$ und die Halbwertsbreite $\Delta(x)$ bestimmt. In Abb.4.22a ist $y_S(x)$ für beide Beugungsordnungen eingezeichnet, wobei der Schwerpunkt beider Intensitätsverteilungen zur Deckung gebracht wurde. Für die erste Ordnung besitzt $y_S(x)$ den aus Abb.4.21,4' vorhergesagten Verlauf. Der Mittelwert des unteren Plateaus liegt bei 1.332° , der des oberen bei 1.337° , was einem Unterschied von 0.005° entspricht. Die zweite Beugungsordnung ist bei der vierten Image-Plate-Aufnahme gerade noch vom Untergrund zu trennen. Dementsprechend ungenau ist die Bestimmung des Schwerpunktes der Einzelspektren in y -Richtung. Außerdem ist die auswertbare Breite der Streuverteilung in x -Richtung geringer als

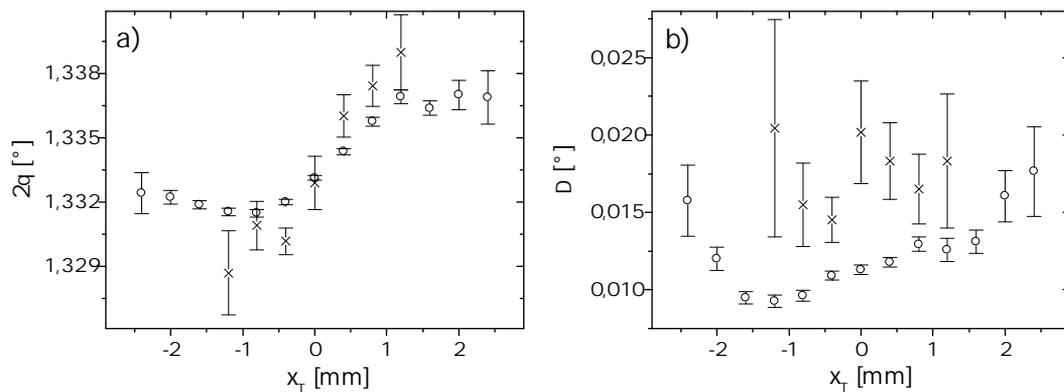


Abbildung 4.22: Auswertung der in Abb.4.21,4 bzw. 4' dargestellten Intensitätsverteilung in beiden Ordnungen. Die Verteilung wurde dazu spaltenweise (in x -Richtung) in Spektren unterteilt und deren Verlauf gegen y nach Abzug des Untergrundes mit einer Gaußfunktion angenähert. Die aus dem Fit bestimmten Größen sind gegen die x -Position der Unterteilung in mm aufgetragen.

a) Winkelschwerpunkt 2θ in Grad für die erste (\circ) und zweite (\times) Ordnung. Der Schwerpunkt der Gesamtverteilung der zweiten Ordnung wurde mit dem der ersten zur Deckung gebracht.

b) Halbwertsbreite Δ in Grad für die erste (\circ) und zweite (\times) Ordnung.

für die erste Ordnung. Innerhalb des zugänglichen Bereiches weist $y_S(x)$ in der zweiten Ordnung bei sonst gleichartigem Verlauf eine größere Änderung auf als in der ersten (Abb.4.22a). Der Unterschied zwischen dem geringsten und größten Wert für $y_S(x)$ ist mit 0.01° doppelt so groß wie der Abstand beider mittlerer Plateauwerte in der ersten Ordnung.

Abb.4.22b zeigt die Halbwertsbreite $\Delta(x)$ der in Abb.4.21,4 ausschnittsweise illustrierten Image-Plate Aufnahme für beide Beugungsordnungen. Der in der ersten Ordnung beobachtete Anstieg von $\Delta(x)$ an den Rändern der Verteilung tritt auch beim Primärstrahl auf. Die lokale Breite der zweiten Ordnung ist überall deutlich größer als die der ersten.

Diskussion Im folgenden werden wir analysieren, inwiefern die beobachtete Veränderung der Intensitätsverteilung sowie der Verlauf von $y_S(x)$ für beide Ordnungen mit der Annahme verträglich ist, daß in x-Richtung versetzte Streubereiche innerhalb der Probe im Lauf der Zeit unterschiedliche mittlere Schichtabstände einnehmen. Von der Probengeometrie her gesehen ist dies möglich, da wir uns die zur Streuverteilung in Abb.4.21 beitragenden Bereiche als parallel zur Kapillarenwand orientierte Schichten vorstellen. Diese müssen nicht unbedingt innerhalb eines schmalen Ringes aufkonzentriert sein, sondern können, wie optisch beobachtet (Abb.4.6), über mehrere Teilringe verteilt sein, die in Richtung der Kapillarenachse, d.h. in x-Richtung, mehrere Millimeter voneinander entfernt sind. Auch die Strahlgeometrie läßt einen Streubeitrag von derartig getrennten Bereichen zu, da seine Längsausdehnung am Probenort in dieser Größenordnung liegt. Nehmen wir nun an, daß zwei gleich orientierte Streubereiche infinitesimaler Ausdehnung mit unterschiedlicher Schichtperiode im Abstand von Δx_S vorliegen. Die Übertragungsfunktion sei eine zweidimensionale Deltafunktion. Dann ist zu erwarten, daß beide Beugungsordnungen jeweils aus zwei getrennten Anteilen bestehen, deren Abstand in x-Richtung jeweils gleich ist. In y-Richtung sollte der Abstand beider Anteile in der zweiten Ordnung doppelt so groß ausfallen wie in der ersten. In der Realität sind die genannten Bedingungen nicht erfüllt und daher ist nicht mit einer deutlichen Trennung zwischen dem Ort der Streubereiche und deren unterschiedlichem Schichtabstand zu rechnen. Zudem ist die Anzahl der verschiedenen Bereiche natürlich nicht von vornherein auf zwei beschränkt. Da der Abstand zwischen dem größten und kleinsten Streuwinkel in der zweiten Ordnung ungefähr doppelt so groß ist wie in der ersten, ist die Annahme mehrerer Streugebiete mit koexistierenden Perioden für Ausschnitt 4 in Abb.4.21 gerechtfertigt. Die aus den Plateaumittelwerten der ersten Ordnung in Abb.4.22a bestimmten Schichtabstände betragen 64.29\AA und 64.53\AA . Bei den darauffolgenden Aufnahmen (5,6) ist ein Vergleich der Intensitätsverteilung zwischen beiden Ordnungen nicht mehr möglich, weil die zweite im Untergrund verschwunden ist. Dadurch ist das Kriterium für die Koexistenz von Schichtabständen nicht mehr anwendbar. Außerdem nimmt die Ausdehnung der Bereiche ab, innerhalb derer der y-Grat horizontal verläuft. Dadurch reichen zwei mittlere Schichtabstände zur Erklärung der Verteilung nicht mehr aus. Stattdessen geben wir die Extremwerte an, welche für Aufnahme 5 bei 64.62\AA und 65.12\AA liegen bzw. für Aufnahme 6 bei 64.72\AA und 65.08\AA .

Eine deutlich erkennbare Verformung der Intensitätsverteilung während Pha-

se II wurde bei fünf von acht gut gerichteten DOPC-Proben beobachtet. Diese Beurteilung kann nur vorgenommen werden, wenn Image-Plate-Aufnahmen in regelmäßigen Abständen gemacht wurden. In keinem Fall zerfällt die Verteilung in Untereinheiten, noch ist der Nachweis von koexistierenden Abständen zweifelsfrei möglich. Der Grund für die schlechte Überprüfbarkeit der Hypothese koexistierender Abstände liegt hauptsächlich in der geringen Streuintensität der zweiten Ordnung zu dem Zeitpunkt, an dem die Deformierung auftritt. Weist man dennoch dem größten bzw. kleinsten Streuwinkel innerhalb der ersten Ordnung einen Abstand zu, so bleibt der Unterschied in allen Fällen unter 0.5\AA .

Obwohl anhand einer Image-Plate-Aufnahme (Abb.4.21, 4) plausibel gemacht werden konnte, daß entlang der Kapillarenwand ausgerichtete Probenbereiche unterschiedliche Schichtabstände einnehmen, ist eine weitere Eingrenzung der Gründe für die unterschiedliche Zunahme der Breite beider Beugungsordnungen während des Quellprozesses durch die detaillierte Analyse der Streuverteilung orientierter Proben nicht gegeben.

Zudem ist der zusätzliche Einfluß einer räumlichen Umverteilung von Streuvolumina innerhalb der Kapillare auf die beobachtete Veränderung der Intensitätsverteilung (Abb.4.21) nicht völlig auszuschließen. Als Mechanismus der Umverteilung kommt beispielsweise eine Änderung in der Form, Länge bzw. Position eines Myelinzylinders in Betracht wie sie optisch häufiger beobachtet wurde (Abb.4.23, 4.24). In Längs- und Querrichtung bietet die Kapillare dafür soviel Platz, daß damit die Größenordnung der beobachteten Veränderung erklärbar wäre. Wenn die Intensitätsverteilung der zweiten Ordnung wegfällt, kann zwischen beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden.

4.3.5.3 Zusammenfassung

In Kap.4.3.5 wurde untersucht, wie sich die Halbwertsbreite der ersten beiden Beugungsordnungen des lamellaren Vielschichtsystems während des Quellprozesses entwickelt. Um Effekte der Umverteilung des Streuvolumens möglichst gering zu halten, wurden nur solche Proben (insgesamt 8) berücksichtigt, die eine hohe Orientierung aufweisen. Die Entwicklung der Halbwertsbreite im Verlauf beider Quellphasen ist nicht für alle Proben einheitlich. Während die Probe bei niedrigen Temperaturen (15°C) schon während Phase I einen systematischen Anstieg der Breite in beiden Ordnungen erkennen läßt, zeigen die restlichen sieben Proben bei höheren Temperaturen (bis 35°C) erst ab Phase II eine systematische Zunahme der Breite.

Die DOPC-Probe bei 15°C zeigt während beider Quellphasen eine Zunahme der Breite in beiden Ordnungen. Der Anstieg der Breite ist in der zweiten Ordnung während des gesamten Prozesses größer als in der ersten. Dabei bleibt das Intensitätsverhältnis beider Ordnungen nahezu unverändert. Die Beobachtungen sind mit der Annahme vereinbar, daß die Unordnung des Systems in der Art zunimmt, wie es durch die parakristalline Theorie vorhergesagt wird. Der Einfluß anderer Faktoren auf die Veränderung der Reflexbreite kann nicht ausgeschlossen werden.

Durch Heizen der Proben auf die Quelltemperatur wird eine vorübergehende deutliche Verbreiterung der Beugungsordnungen hervorgerufen. Vor dem Beginn der zweiten Phase des Quellprozesses geht die Breite wieder auf ihren ursprüngli-

chen Wert zurück. Aus dem Vergleich der Änderung beider Ordnungen konnte auf koexistierende unterschiedliche Schichtabstände als Ursache für die Verbreiterung geschlossen werden.

Dieselbe Ursache kommt auch für die Entstehung einer geringfügigen Aufspaltung beider Ordnungen während Phase II in Betracht. Die Aufspaltung kann so gedeutet werden, daß lateral, d.h. längs der Kapillarenachse versetzte Domänen innerhalb der Probe Schichtabstände besitzen, welche um weniger als 0.5\AA abweichen. Hinweise für diese Ursache der Verbreiterung wurden in über der Hälfte der untersuchten Proben gefunden. Die Ursache alleine reicht nicht aus, um die beobachtete Verbreiterung in Phase II vollständig zu erklären.

Ein weiteres Ergebnis, welches in Kap.4.3.5.2, S.103, nur beiläufig benannt wurde, betrifft die Breite des Reflexes senkrecht zur Streurichtung. Sie nimmt im Verlauf des Quellprozesses zu.

4.3.6 Gleichzeitige optische Beobachtungen und Röntgenaufnahmen

Einige Proben (DOPC/Wasser) wurden gleichzeitig mit einfachen optischen Methoden und Röntgenbeugung untersucht. Dabei sollten Zusammenhänge zwischen den beiden mittels Röntgenbeugung bestimmten Quellstadien (Kap.4.3.2) und optischen Veränderungen während des Quellprozesses aufgedeckt werden.

Im folgenden beschreiben wir ein typisches Beispiel einer simultanen Beobachtung. Es wurden insgesamt fünf Proben (DOPC/Wasser) nach dieser Art jeweils am Laboraufbau untersucht (Abb.2.8). Die Videoaufnahmen wurden intervallweise gemacht. In dem dargestellten Beispiel wird die Kapillare seitlich beleuchtet, d.h. die Lichtquelle liegt abseits von der verlängerten Geraden zwischen Objekt und Linse. Dadurch ist nur der Kapillarenrand voll ausgeleuchtet (Abb.4.23a). Er endet unterhalb des hellen Streifens, darüber passen noch ca. 60% der Kapillarenbreite ins Bild. Innerhalb des hellen Bereiches der Probe ist als markantestes Objekt von Beginn an ($t = -5\text{min}$, 1) ⁶ ein Myelinzylinder erkennbar. Seine Symmetrieachse, die durch den dunklen feinen Strich in der Mitte, den Wasserkanal, definiert wird, stimmt für den rechten Teil des Myelinzylinders ungefähr mit der der Kapillare überein. Nach dem Heizen von 23°C auf 40°C bei $t = 0\text{min}$ hat seine sichtbare Länge deutlich zugenommen ($t=12\text{min}$, 2) und seine Achse ist gegenüber vorher um einige Grad verdreht. Daraufhin nimmt die Länge des Myelinzylinder bei konstanter Temperatur wiederum ab, bis er völlig in der dann optisch weitgehend strukturlosen Ringregion verschwunden ist ($t = 35\text{min}$, 7). Das zuvor klar von der Ringregion nach rechts abgetrennte helle Gebiet wird nun jedoch von dem Ring aus eingetrübt. Dieser Prozeß ist bis $t = 55\text{min}$ (Bild 8) soweit fortgeschritten, daß die Verdunkelung fast das gesamte rechte Gebiet erfaßt hat. Ob die neuen Membranstrukturen, die dafür verantwortlich sind, direkt vom Ring ausgehen oder aber vor Ort aus den Lipidresten entstanden sind, läßt sich anhand dieser Aufnahmen nicht klären. Der Zeitpunkt des Auftretens neuer Strukturen zwischen Bild 7 und 8 erfolgt in etwa dann, wenn der Schichtabstand des Systems sich nur noch langsam dem Grenzwert nähert (Abb.4.23), d.h. am Übergang zwischen Phase I und II.

⁶In diesem Abschnitt werden die Teilbilder von Abb.4.23 a) durchnummeriert und mit Zeitangaben versehen.

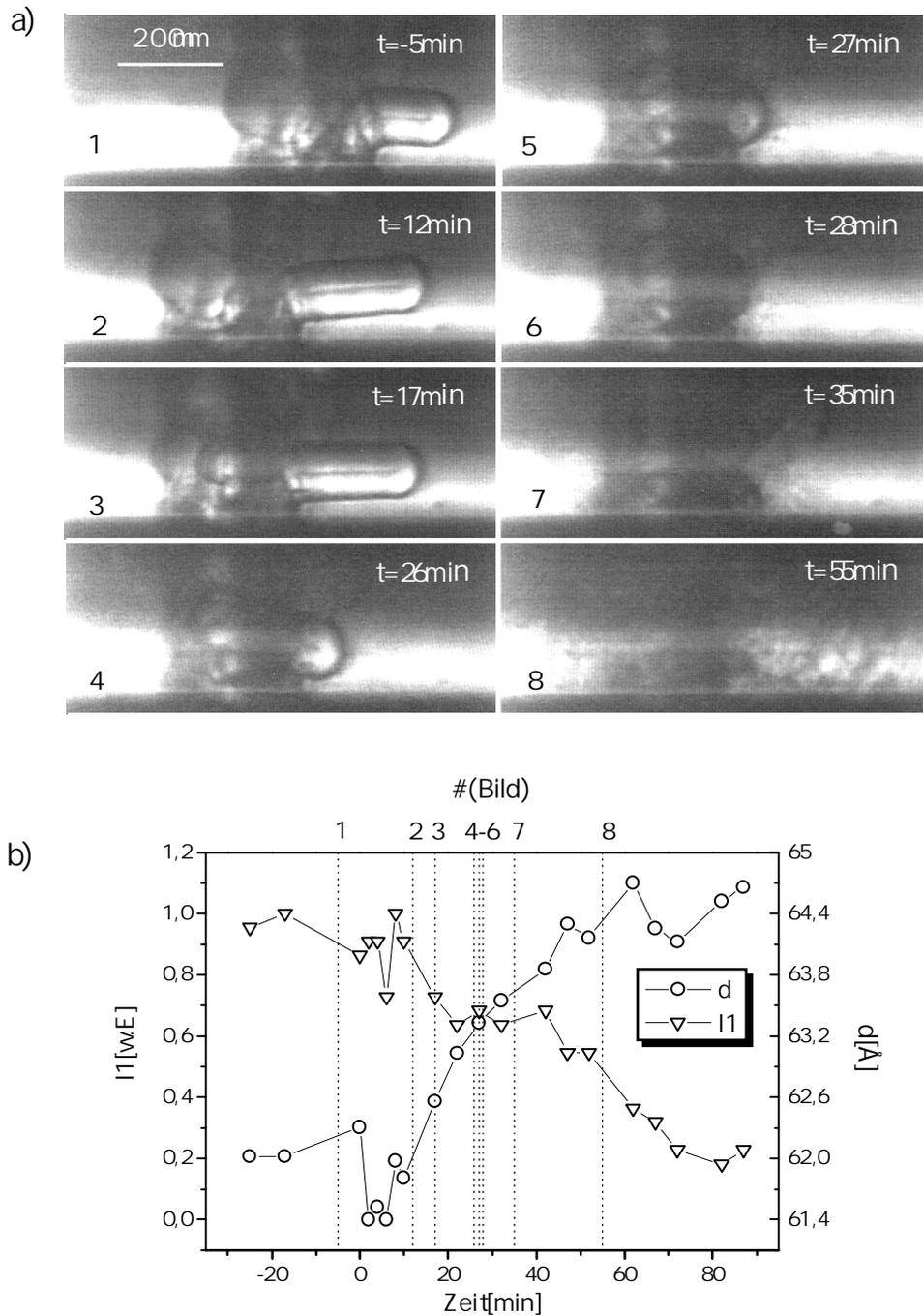


Abbildung 4.23: Probe, die gleichzeitig optisch (a) und mittels Röntgenbeugung (b) untersucht wurde. Der Zeitpunkt, an dem die Bilder aufgenommen wurden, ist in der Auswertung der Spektren (b) gestrichelt eingetragen. I_1 bezeichnet, wie zuvor auch schon, die Intensität im Maximum der ersten Beugungsordnung, d ist der Schichtabstand. Zwischen Bild 1 und 2 wurde die Optik nachjustiert. Die Temperatur wird ab $t=0\text{min}$ von 23°C auf 40°C erhöht. Die Probe ist zu diesem Zeitpunkt 52min alt.

Die noch in Phase I fallende starke Änderung sowie Abnahme der Streuintensität I_1 in der ersten Beugungsordnung gegenüber dem Anfangswert ($t = -25\text{min}$) kann mit der Umverlagerung der Vielschichten zwischen verschiedenartigen makroskopischen Strukturen in Zusammenhang gebracht werden. So entspricht der Längenzunahme eines im Strahl zentrierten und entsprechend ausgerichteteten Myelinzylinders eine Intensitätszunahme der Beugungsordnungen. Zieht der Myelinzylinder allerdings Material aus dem Ring ab und trägt nicht zur Streuintensität bei, kann seine Längenzunahme auch mit einer Intensitätsabnahme einhergehen. Da optische Beobachtungen während der Röntgenmessung jeweils nur einen – verglichen mit dem gesamten Streuvolumen – kleinen Teilbereich der Probe zugänglich machten, reichten sie im allgemeinen nicht aus, um die Variation von I_1 eindeutig auf erkennbare Morphologieänderungen in der Probe zurückzuführen. Es wird allerdings davon ausgegangen, daß solche Mechanismen verantwortlich sind für die häufig während Phase I beobachteten starken unsystematischen Intensitätsschwankungen.

Da mit dem Verschwinden der großen auffälligen optischen Strukturen auch die Schwankungen der Intensitäten kleiner werden, kann der Schluß gezogen werden, daß diese Entwicklung nicht nur im einsehbaren Gebiet, sondern koordiniert innerhalb des gesamten Streuvolumens stattfindet. Es konnte jedoch auch in mehreren Fällen aus den Spektren abgeleitet werden, daß die größten Liposomen sich gemeinsam mit dem Ringbereich in Phase II zurückbildeten.

Durch die gleichzeitige Anwendung von optischen Methoden und von Röntgenbeugung zur Untersuchung des Quellprozesses innerhalb einer Kapillarenprobe wurde festgestellt, daß sich der optische Eindruck der Probe innerhalb des Zeitraumes ändert, wenn der Übergang zwischen Phase I und II erwartet wird (vgl. Abb.4.10). Das Licht im Bereich des Lipidringes wird stärker gestreut, so daß die Kapillare eintrübt. Dafür können Membranstrukturen verantwortlich gemacht werden, die in Phase II neu entstehen. Um genauer festzustellen, zu welchem Zeitpunkt sich die neuen Objekte bilden und wie sie aussehen, wurden ausschließlich lichtmikroskopische Beobachtungen (Kap.4.3.7.1) an gleichartig präparierten Kapillarenproben (MR1) vorgenommen.

Aus den gezeigten optischen Aufnahmen läßt sich schließen, daß die häufig vor allem in Phase I beobachtete unsystematische Änderung der Streuintensität durch morphologische Veränderungen von Vielschichtliposomen bedingt sein kann.

4.3.7 Optische Beobachtungen während des Quellprozesses

Die in diesem Abschnitt vorgestellten lichtmikroskopischen Untersuchungen ergänzen die mit Röntgenbeugung gemachten Beobachtungen während beider Stadien. Der Schwerpunkt liegt auf dem Übergang zwischen Phase I und II, der sich nach den Ergebnissen aus dem letzten Abschnitt auch optisch bemerkbar macht. Hier wird das Auftreten der neuen Strukturen mit einer höheren Auflösung untersucht. Dies hat zum Vorteil, daß einzelne Objekte erkennbar werden und der Entstehungszeitpunkt präziser bestimmen werden kann. Auch werden Einzelheiten zur Verteilung des Streuvolumens innerhalb der Kapillare während beider Quellstadien erkennbar.

4.3.7.1 Entwicklung innerhalb der Kapillare

Einen Einblick in das optische Geschehen innerhalb der Kapillare während des Quellens gewährt die Bildfolge in Abb.4.24: Die dort gezeigte Probe wurde zur Verbesserung der Abbildungsqualität in eine mit Wasser gefüllte Plankammer eingebettet und während des Quellprozesses fortwährend per Mikroskop zwischen fast gekreuzten Polarisatoren (85°) beobachtet. Dadurch lassen sich sowohl sehr stark doppelbrechende Strukturen als auch dünnwandige Membranobjekte mit geringem Phasenhub auflösen. Die Kapillare verläuft horizontal im Bild, der aufkonzentrierte Ring demnach vertikal. Die Lipidreste schließen nach rechts an den Ring an. Die Temperaturerhöhung erfolgt 13min nach der Probenpräparation. Das Zeitintervall ab dem Erreichen der Quelltemperatur bezeichnen wir im folgenden als Δt . Bis zu $\Delta t=15$ Minuten nach der Temperaturerhöhung von 25°C auf 50°C sind im wesentlichen Liposomen mit starker Doppelbrechung erkennbar, einschließlich eines sehr langen Myelinzylinders (MZ_L) mit einem Durchmesser von ca. $60\mu\text{m}$. Wie im vor-

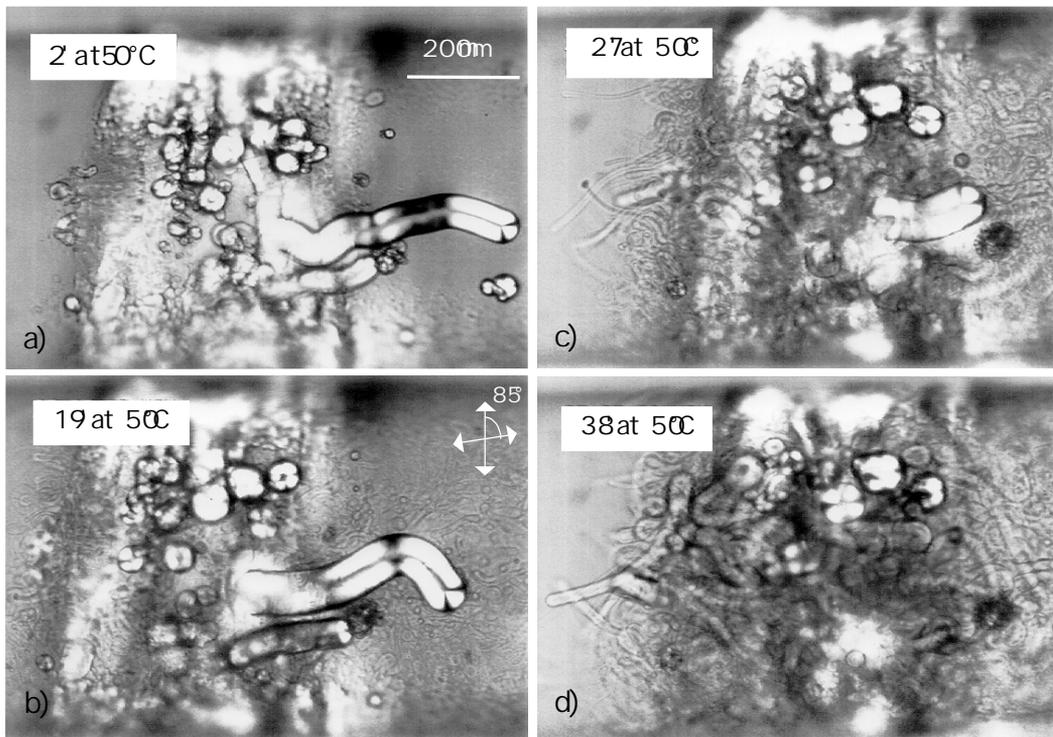


Abbildung 4.24: Videoaufnahmen einer Kapillare zwischen fast gekreuzten Polarisatoren zu verschiedenen Zeitpunkten des Quellens. Ca. 13 Minuten nach Probenpräparation wird die Temperatur (bei $t = 0\text{min}$) von 25°C auf 50°C erhöht. Der Zeitpunkt des Auftretens neuer Membranstrukturen (sichtbar ab Bild b) wird mit dem Übergang von Phase I nach II in Zusammenhang gebracht (vgl. Abb.4.26).

herigen Beispiel auch, wurde hier durch Temperaturerhöhung eine Längenzunahme des Myelinzylinder ausgelöst, und zwar um einen Faktor zwei. Ungefähr $\Delta t=15\text{min}$, nachdem die Probe auf die Quelltemperatur gebracht wurde, kommen

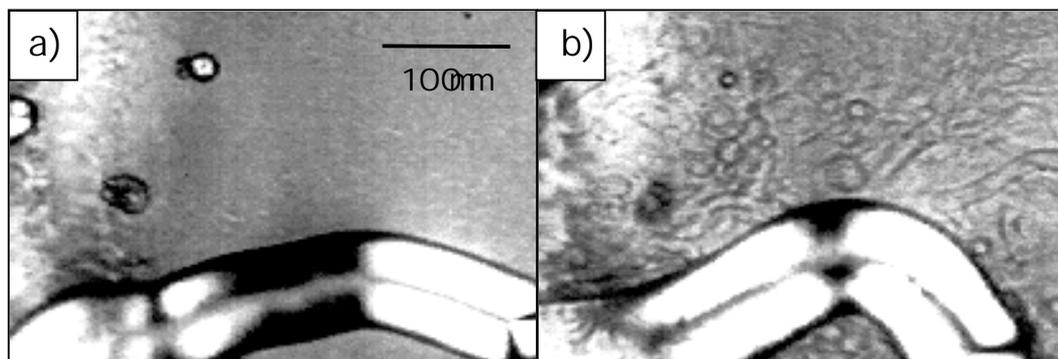


Abbildung 4.25: Ausschnitte der Aufnahmen (a) und (b) aus Abb.4.24. Die Ausschnitte zeigen denselben Bereich innerhalb der Kapillare zu verschiedenen Zeitpunkten:

a) Probe seit $2min$ bei $50^{\circ}C$.

b) Probe seit $19min$ bei $50^{\circ}C$ (s. Abb.4.24).

die ersten dünnwandigen Membranobjekte an vielen Stellen von der Kapillarenwand ausgehend zum Vorschein (b). In Abb.4.25 sind zur Verdeutlichung Ausschnitte der Aufnahmen (a) und (b) aus Abb.4.24 dargestellt. Auch in der Ringregion sind solche dünnwandigen Liposomen an geeigneten Stellen zu erkennen. Das Zeitintervall zwischen dem Erreichen der Quelltemperatur und dem Erscheinen von Einzelmembranen nennen wir Δt_M . Im folgenden nehmen gerade vom Ring aus immer größere und auch mehr Schichten beinhaltende Quellobjekte ihren Ausgang (c) und (d). Darunter können sich wiederum Myelinzyylinder mit vergleichbaren Radien wie zu Anfang befinden (vgl. Abb.4.28). Währenddessen bilden sich die meisten der ausgestülpten Vielschichtliposomen zurück. Der Längenrückgang des Myelinzyinders MZ_L beginnt ab $\Delta t = 15min$ und verläuft bis zum Verschwinden bei $t = 36min$ in guter Näherung linear. Einige, meist kleinere, stark doppelbrechende Liposomen ($\varnothing \leq 10\mu m$) bleiben z.T. den gesamten Quellprozeß über bestehen. Dies entspricht der Beobachtung, daß das Streusignal der lamellaren Ordnung nicht in allen Fällen vollkommen im Untergrund verschwindet (Kap.4.3.2), sondern sich auf niedrigem Niveau nach Phase II halten kann. Die anhand eines Beispiels beschriebenen optischen Beobachtungen sind charakteristisch für ca. 30 untersuchte Proben vom Typ MR1 bei Temperaturen zwischen $15^{\circ}C$ und $55^{\circ}C$. Im folgenden werden nochmals die wichtigsten Ergebnisse benannt:

- Sofort nach Zugabe von Wasser weist das Vielschichtsystem Ausstülpungen in Form von Liposomen oder Myelinzyindern auf.
- Bei Temperaturerhöhung entstehen z.T. neue Ausstülpungen und zusätzliches Material wandert in schon vorhandene.
- Das Entstehen neuer dünnwandiger Membranobjekte setzt überall in einer Umgebung um den Lipidring (im Bereich mehrerer mm) innerhalb eines kurzen Zeitraumes ($\approx 5min$) ein.
- Die Ausstülpungen bilden sich größtenteils zurück, nachdem neue Objekte entstanden sind.

- Die vom Ring ausgehenden Objekte nehmen an Größe und Lamellarität zu.

4.3.7.2 Dauer von Phase I

Die aus den Röntgendaten gewonnene Dauer von Phase I in Abhängigkeit von der Temperatur T konnte für $T > 39^\circ\text{C}$ linear angenähert werden (Kap.4.3.4, Abb.4.13a). Daraus läßt sich die erwartete Dauer von Phase I bei $T = 50^\circ\text{C}$ bestimmen: Sie beträgt $\Delta t_I = 17\text{min}$. Dieselbe Vorgehensweise für die Dauer von Phase II bei 50°C liefert $\Delta t_{II} = 46\text{min}$, d.h. der Abbau der lamellaren Ordnung sollte innerhalb dieses Zeitraumes erfolgen. Das Ende von Phase II – und somit auch die Dauer Δt_{II} – ist aus rein optischen Aufnahmen nicht abzuleiten, da immer nur ein geringer Anteil der entsprechenden Strukturen zu erkennen ist.

Im Fall der in Abb.4.24 gezeigten Probe beträgt der Zeitraum bis zum Auftreten neuer Membranobjekte nach Erreichen der Quelltemperatur $\Delta t_M = 15\text{min}$. Dieser Wert ist mit dem aus Röntgendaten ermittelten Intervall $\Delta t_I = 17\text{min}$ vergleichbar.

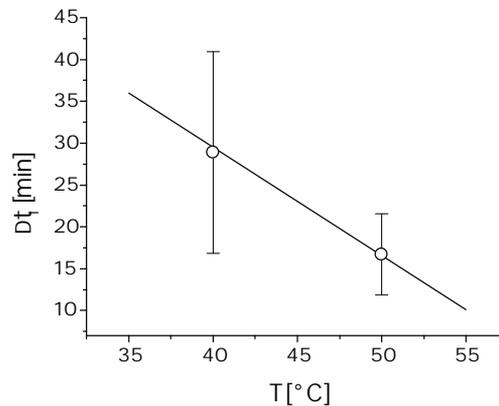


Abbildung 4.26: Linear angenäherter Verlauf für die Dauer von Phase I in Minuten gegen die Quelltemperatur in $^\circ\text{C}$ (aus Röntgendaten: Kap.4.3.4, Abb.4.13a). Mittelwert der Dauer vom Erreichen der Quelltemperatur bis zum optisch beobachteten Auftreten neuer dünnwandiger Membranobjekte für acht Proben bei 40°C bzw. sieben bei 50°C . Die Standardabweichung ist als Balken eingetragen.

Anhand von insgesamt 15 DOPC Kapillarenproben bei 40°C bzw. 50°C soll nun überprüft werden, wie gut die Übereinstimmung zwischen Δt_I und Δt_M ist. Als Temperatur wurde 40°C (8 Proben) und 50°C (7 Proben) ausgewählt, da in diesem Bereich Δt_I für die Röntgendaten linear approximierbar ist (vgl. Abb.4.13a), und die Dauer von Phase I auch noch nicht zu kurz ausfällt. Abb.4.26 zeigt den linear angenäherten Verlauf für Δt_I und den aus den Einzelwerten aller Proben bei einer Temperatur bestimmten Mittelwert von Δt_M samt einfacher Standardabweichung. Die Schwerpunkte von Δt_M liegen bei beiden Temperaturen so gut wie auf der Geraden. Dies legt den Schluß nahe, daß der Beginn von Phase II mit dem Auftreten neuer Quellobjekte verbunden ist. Sie entstehen simultan in allen einsehbaren Gebieten innerhalb der Kapillare, sowohl im aufkonzentrierten Ring als auch im Bereich der Lipidreste. Die Ergebnisse aus Kap.4.3.6 unterstützen diese Interpretation.

Die beiden Quellstadien konnten auch durch optische Untersuchungen nachgewiesen werden: In Phase I liegen im Bereich des Lipidringes häufig Ausstülpungen vor, d.h. stark doppelbrechende große Liposomen und Myelinzyylinder. Phase II wird durch das Erscheinen neuer, zunächst dünnwandiger Membranobjekte eingeleitet. Desweiteren bilden sich die dichten Liposomen größtenteils zurück, während vom Ring aus zunehmend mehrschichtige und größere Objekte ausgehen.

4.3.8 Charakterisierung neu entstandener Quellstrukturen

Die ab Phase II neu entstandenen Quellstrukturen unterscheiden sich gegenüber den in Phase I schon vorhandenen in einem wesentlichen Punkt: Sie besitzen eine deutlich geringere Lipiddichte und befinden sich daher vergleichsweise in einem „gelösten Zustand“. Der damit einhergehende geringere Phasenhub des durchtretenden Lichtes ermöglicht in den meisten Fällen optisch eine klare Abgrenzung von Strukturen aus Phase I im „gebundenen Zustand“. Dies trifft sowohl für paucilamellare Objekte wie Vesikeln als auch für optisch homogene Vielschichtsysteme zu, sofern sie sich nicht zu stark überlagern. Da im Bereich des Ringes die Lipiddichte sehr groß ist, können dort einzelne Strukturen optisch nicht zugeordnet werden. Wie im folgenden ausgeführt, ist dort eine Eingrenzung der vorliegenden Struktur aus dem Beugungsbild möglich. Im folgenden werden typische neue Quellformen aus Phase II detaillierter vorgestellt. Die darauffolgende Gegenüberstellung des Gangunterschiedes im doppelbrechenden Medium für Objekte von Phase I und II vergleichbarer Form und Größe bildet den Ausgangspunkt für die Abschätzung eines mittleren Abstandes von optisch homogenen gelösten Strukturen.

4.3.8.1 Röntgendiffraktogramm von Proben in der gelösten Phase

Bei den nach Methode MR1 präparierten Proben verschwinden die Braggreflexe beim Abbau der lamellaren Ordnung im Untergrund. Es werden im gesamten Meßbereich von $(650\text{Å})^{-1} < s < (23\text{Å})^{-1}$ während des Quellprozesses keine neuen Reflexe sichtbar, die auf einen Übergang in eine andere geordnete Struktur schließen lassen würden. Stattdessen bildet sich ab Phase II zunehmend ein diffuser Streuuntergrund heraus. Dieser reicht von $s \approx (180\text{Å})^{-1}$ bis einschließlich der zweiten Beugungsordnung, $s \approx (30\text{Å})^{-1}$, d.h. von $2\theta = 0.48^\circ$ bis 2.87° (Abb.4.27). In dieses Intervall fällt auch das erste Maximum des Formfaktors einer DOPC-Membran⁷: Es liegt für $\lambda = 1.5\text{Å}$ bei $2\theta = 2.23^\circ$, was als Abstand ausgedrückt mit etwa 38Å ungefähr der Membrandicke von 36.1Å entspricht [42]. Der Formfaktor fällt innerhalb der Grenzen von 1.55° und 2.83° auf dreiviertel des Maximalwertes ab. Die diffuse Streuung kann eindeutig auf die neu entstandenen Quellstrukturen zurückgeführt werden, weil sie erst mit dem Beginn des Abbaus der lamellaren Ordnung ansteigt und auch noch dann vorherrscht, wenn die alten Strukturen längst aufgelöst sind. Bei orientierten Proben konzentriert sich der Untergrund hauptsächlich in derselben Streuebene wie die von den gerichteten Vielschichten ursprünglich ausgehenden Reflexe, d.h. in der Ebene senkrecht zur Kapillarenachse und Einstrahlrichtung (Abb.4.27a, b). Er bildet dann in der Bildebene senkrecht zum Strahl eine Art

⁷Alle folgenden Angaben zum Formfaktor einer DOPC-Membran wurden aus der Publikation von Tristram-Nagle [42] entnommen

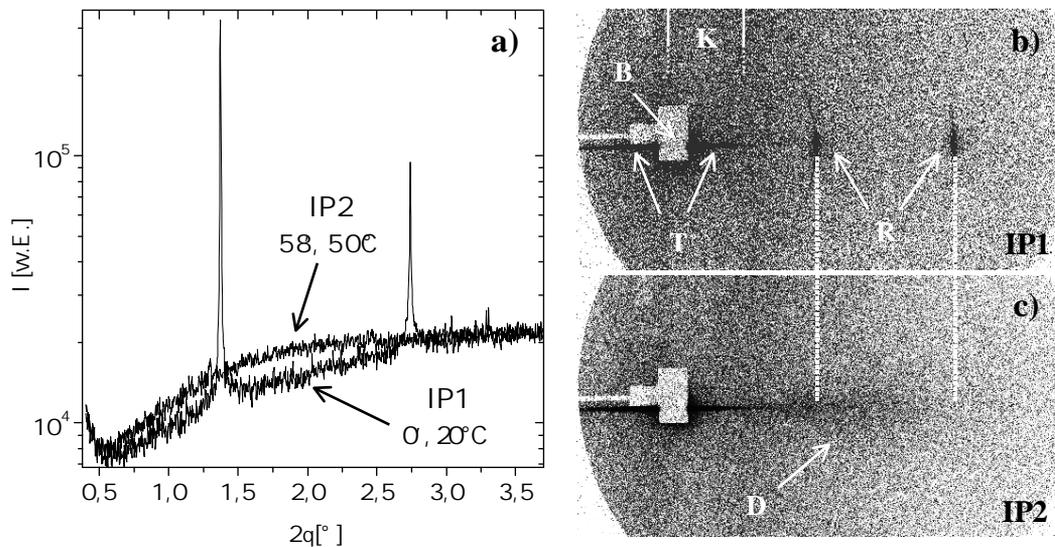


Abbildung 4.27: Ausschnitte von Image-Plate-Aufnahmen einer DOPC-Probe ca. 40min nach Präparation bei $T = 20^{\circ}\text{C}$ (b, $t = 0\text{min}$) sowie nach Abbau der lamellaren Ordnung ca. 58min später (c, $t = 58\text{min.}$) bei 50°C . In (c) sind die beiden Braggreflexe „R“ nicht mehr sichtbar. Es hat sich ein diffuser Streuuntergrund „D“ herausgebildet, der ungefähr von $2\theta = 0.6^{\circ} - 3^{\circ}$ reicht (c). Die in (c) gezeigten Spektren wurden durch Integration über einen Winkelbereich von 15° in (b) und (c) gewonnen. Aufgetragen ist dort die Streuintensität gegen den Streuwinkel. Auf beiden Image-Plates sind der Strahlfänger „B“, die Totalreflexionsstreifen des Strahls an der Glaswand „T“ und schemenartig das Bild der dezentrierten Kapillare „K“ erkennbar (vgl. dazu Kap.4.3.3).

Keule, die mitunter auch als „Schmetterlingsflügel“ bezeichnet wird [150]. Eine Ausmessung des eingrenzenden Öffnungswinkels $2\theta_K$, innerhalb dessen der erhöhte Untergrund liegt, ergibt für das in Abb.4.27 gezeigte Beispiel $2\theta_K \approx 15^{\circ}$. Die neuen Quellstrukturen im Bereich des Ringes behalten demnach die alte Orientierung zunächst weitgehend bei, d.h. die Schichten verlaufen nach wie vor weitgehend parallel zur Kapillarenwand.

4.3.8.2 Morphologie der Quellkörper aus Phase II

Im folgenden Abschnitt werden die erkennbaren gelösten Strukturen näher beschrieben. Im Bereich außerhalb des Lipidringes, in dem vom Einengen Lipidreste übrig geblieben sind (vgl. Kap.2.1.3, Abb.2.2), entstehen während Phase II vorwiegend mehrschalige Vesikeln (Abb.4.28a, (b)). Sie kleiden die Kapillare von innen als zusammenhängendes Gebiet aus. In Abb.4.28a wurde auf die Mitte der Kapillare fokussiert. Das Vesikelfeld reicht ungefähr vom Rand bis zu ca. einem Viertel des Kapillarendurchmessers. Aus der Darstellung des Querschnitts durch das Feld (b) wird ersichtlich, daß die Vesikeln dicht an dicht liegen. Die Vesikeln bleiben mit den Membranschichten verbunden, aus denen sie sich hervorgebildet haben. Die Schichten verlaufen weitgehend parallel zur Kapillarenwand: Mit Ausnahme weniger Stellen (z.B. bei „S“ in (a); dort tritt eine deutliche Stufe im Stapel auf), bleiben

unter gekreuzten Polarisatoren die Bereiche an der Kapillarenwand in

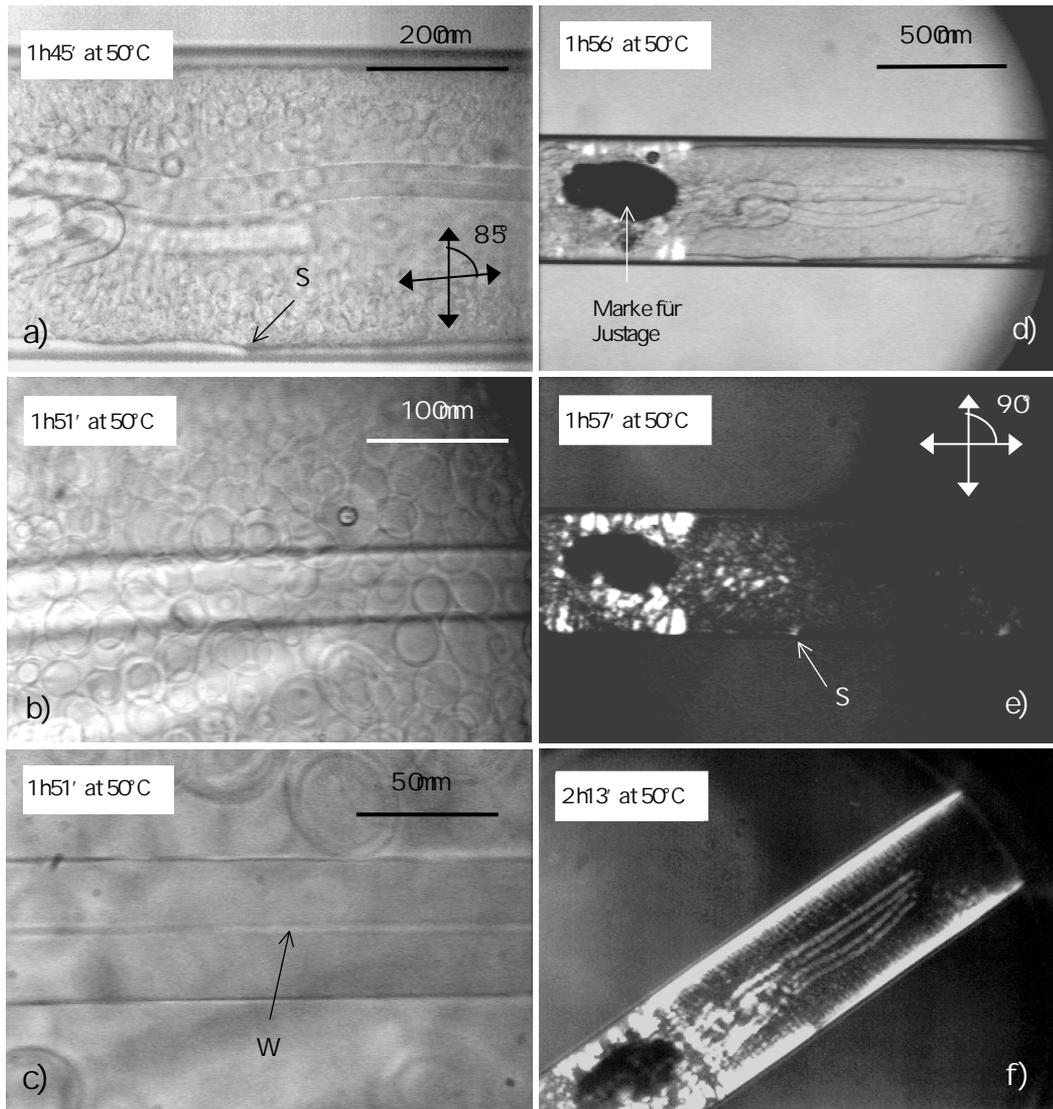


Abbildung 4.28: Zusammenstellung von ab Phase II entstandenen gelösten Quellstrukturen innerhalb einer Probe bei $T = 50^\circ\text{C}$ zwischen Polarisatoren. Von (a)-(d) bilden sie einen Winkel von 85° , ab (e) sind sie gekreuzt. Die Kapillare ist an der Position des aufkonzentrierten Ringes markiert (d)-(e). Im Einengungsbereich herrschen Felder von mehrschichtigen Vesikeln vor, die mit den Wandschichten verbunden sind (a), (b). Letztere verlaufen weitgehend parallel zur Wand (Dunkelheit in 0° -Stellung (e), Helligkeit bei 35° (f)). Ausgenommen davon sind Gebiete des Stapels die eine Stufe aufweisen („S“, (a), (d)). Vom Ring aus gehen optisch homogene Myelinzyylinder und andere gelöste Vielschichtstrukturen. Die dort vorliegenden Objekte liegen in verschiedenen Orientierungen vor (Erläuterungen siehe Text).

der Nullstellung dunkel (e), während sie unter 35° homogen hell sind (f)⁸. Die Stapel reichen vom Ring ausgehend bis zum rechten Ende des Blickfelds (siehe auch (d)) und besitzen eine Gesamtdicke von rund $10\mu m$.

In allen Bildern tauchen auch lange Quellstrukturen auf, die von dem dichteren Ringgebiet ausgehen. In 0° und 35° Stellung zwischen gekreuzten Polarisatoren verhalten sie sich ähnlich wie die parallel zur Kapillarenwand verlaufenden Stapel (Abb.4.28d, e). Nur bleibt der mittlere Bereich der Strukturen dunkel und an den Enden sind andeutungsweise halbe Malteserkreuze erkennbar (e). Daraus läßt sich schließen, daß es sich um konzentrisch angeordnete Zylinder, Myelinzylinder, handelt. Dies wird zusätzlich durch das Auftreten des Wasserkanals ((c), „W“) bestätigt, der typisch ist für konzentrisch verlaufende Vielschichtsysteme, da das Auffüllen des Innenzylinders mit Membranen viel Krümmungsenergie kosten würde. Abgesehen von Überlagerungseffekten durch Strukturen unter- und oberhalb des fokussierten Objektes erscheint der Myelinzylinder homogen grau.

Die Bildung der Zylinder findet vorwiegend gegen Ende von Phase II statt und die Längenzunahme erfolgt in der Regel auch dann noch, wenn die alte Struktur verschwunden ist. Bei Durchmessern unter $100\mu m$ wurden Myelinzylinder mit einer Gesamtlänge von über einem mm beobachtet. Vom Ring gehen auch optisch homogene Strukturen aus, die eine geringere Symmetrie aufweisen als die Myelinzylinder. Aus ihren Doppelbrechungseigenschaften konnte in einigen Fällen abgeleitet werden, daß auch innerhalb dieser Strukturen die Membranen lokal parallel angeordnet sind und ein inneres Wasservolumen umschließen.

Im Ringbereich selber können außer in der Nähe der Kapillarenwand keine Strukturen aufgelöst werden. Zwischen gekreuzten Polarisatoren tritt Helligkeit in allen Stellungen des Drehtisches auf. Dementsprechend kommen Membranen in allen Richtungen der in die Drehebene projizierten Flächennormalen vor. Dies ist zu erwarten, wenn man davon ausgeht, daß sich große geschlossene Volumenstrukturen gebildet haben, die von der Ringgeometrie mit einfachem semizylindrischem Rand abweichen.

4.3.8.3 Gangunterschied in zylindrischen optisch homogenen Objekten

Eine Gegenüberstellung der Helligkeit von Myelinzylindern aus Phase I mit der von ähnlich breiten aus II bei vergleichbaren optischen Einstellungen (z.B. Abb.4.24a, Abb.4.28a), macht deutlich, daß der Unterschied des Phasenhubs Γ beträchtlich ist. Um Γ zu bestimmen, wurde ein veränderlicher Kompensator eingesetzt. Ausgehend von der Parallelstellung zwischen Strahlrichtung und optischer Achse eines zusätzlich in den Strahlengang eingeführten negativ doppelbrechenden Kristallblättchens, wird beim Kompensator nach Berek durch dessen Kippung um eine Achse senkrecht zur Achse des Strahls und der Regelstellung eine Kompensation des Objektphasenhubs erzielt [151]. Befindet sich das Objekt in der Regelstellung, läßt sich aus dem Kippwinkel, bei dem das Objekt dunkel wird, der Phasenhub ermitteln. Wegen des radial ortsabhängigen Gangunterschieds bei Myelinzylindern kann immer nur lokal kompensiert werden. Bei den folgenden Überlegungen steht der maximale Phasenhub Γ_{max} im Mittelpunkt. Für mehrere ausgewählte optisch homogene Myelinzylinder

⁸Normalerweise werden gerichtete Proben auf 45° (anstatt 35°) als hellste Stellung gedreht.

aus Quellphase I und II mit den äußeren und inneren Radien R_{max} bzw. R_{min} sind die ermittelten Werte für Γ_{max} vergleichsweise tabellarisch zusammengestellt (Tab.4.2). Obwohl die Objekte aus Phase II wesentlich größer sind als die aus Phase I, ist bei gleicher Geometrie ihr Gangunterschied ungefähr um eine Größenordnung geringer.

Phase	$R_{min}[\mu m]$	$R_{max}[\mu m]$	$\Gamma_{max}[\text{nm}]$	$\bar{d}[\text{nm}]$
I	0.5	11.5	132	6.3
I	0.5	10	128	6.3
I	0.6	7.5	76	6.3
II	0.6	52.5	15	270
II	0.5	35	10	280
II	2	25	11.5	160

Tabelle 4.2: Mit Hilfe eines Berek-Kompensator während Phase I oder II gemessener maximaler Phasenhub Γ für Myelinzyylinder mit einem Innen- bzw. Außenradius von R_{min} bzw. R_{max} . Der mittlere Schichtabstand \bar{d} wurde für Phase I experimentell, für Phase II mit Hilfe des beschriebenen Modells bestimmt.

4.3.8.4 Mittlerer Schichtabstand in zylindersymmetrischen Objekten

Mit Hilfe eines einfachen Modells soll nun für zylindersymmetrische Objekte von Γ_{max} auf den mittleren Schichtabstand geschlossen werden. Im ersten Schritt wird für Objekte bekannter Lipidverteilung aus Phase I die Doppelbrechung von DOPC pro Lipidschicht bestimmt. Dieser Wert wird dann verwendet, um für Objekte aus Phase II, deren Membranen weiter voneinander entfernt sind, einen mittleren Abstand zu ermitteln:

Die Periode des Vielschichtsystems setzt sich aus zwei Anteilen zusammen. Der eine enthält die Alkylketten, welche bei Membranen in der L_α -Phase eine mittlere Orientierung parallel zur Schichtnormalen aufweisen, und ist daher doppelbrechend. Seine Schichtdicke d_a wird als konstant angenommen (Abb.4.29a). Der Rest der zur Periode d mit d_i beitragenden Schicht, nämlich die Kopfgruppen und das Wasser zwischen den Membranen, ist optisch isotrop und je nach Wassergehalt unterschiedlich dick. Abb.4.29a zeigt eine Gesamtschicht der Dicke $d = d_a + d_i$ innerhalb eines Myelinzyinders im Querschnitt. Die doppelbrechenden Anteile (dunkel) werden durch eine Indikatrix charakterisiert, deren Hauptachse parallel zum Normalenvektor der Schicht verläuft (b) und einen Winkel α mit der Strahlrichtung (z) bildet. Für die nachfolgenden Überlegungen werden die Strahlen „S“ parallel zur Mikroskopachse z angenommen. Sie sollen das Objekt an der Position $x = x_S$ unter Vernachlässigung von Brechung durchqueren. Der Beitrag einer doppelbrechenden Schicht in der Höhe $z = z_0$ zum Gangunterschied zwischen beiden Schwingungsrichtungen ergibt sich als Produkt der effektiven Doppelbrechung $\Delta n(\alpha) = \Delta n \sin^2 \alpha$ mit $\Delta n = n_e - n_o$ mit der Weglänge durch die Schicht $\Delta z = \sqrt{(r + d_a/2)^2 - (r - d_a/2)^2}$. Der über alle Schichten in z -Richtung aufsummierte und über eine Schichtdicke d gemittelte Gangunterschied $\Gamma(x)$ weist für einen mit Schichten homogen ausgefüllten Zylinder vom Radius R_{max} in Abhängigkeit von x folgenden Verlauf auf (Abb.4.30): Am

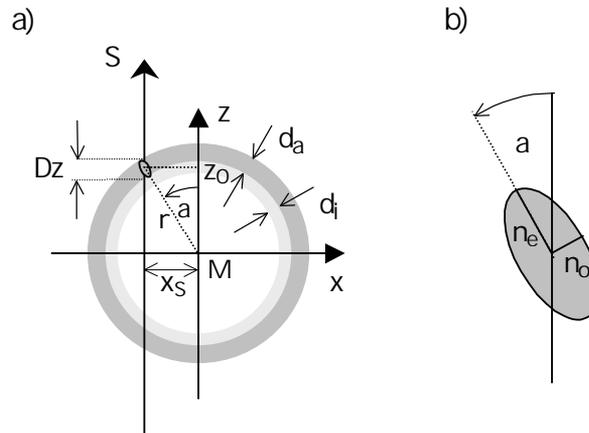


Abbildung 4.29: a) Schichtperiode innerhalb eines Myelinzylinders im Querschnitt. Der aus im Mittel parallel zur Schichtnormalen verlaufenden Alkylketten bestehende Anteil ist dunkel markiert und besitzt eine Dicke von d_a . Die am Schnittpunkt mit einem Strahl „S“ eingezeichnete und in b) vergrößert dargestellte Ellipse stellt die Indikatrix der Alkylketten dar. Ungerichtete Bereiche innerhalb der Periode sind hell schraffiert.

Mittelpunkt „M“ (Abb.4.29), $x = 0$, ist der Gangunterschied Null. Nach außen hin steigt $\Gamma(x)$ monoton bis zu einem Maximalwert Γ_{max} an, der typischerweise bei $x_{max}/R_{max}=0.65$ liegt. Dann sinkt Γ steil wieder auf Null ab.

Zunächst soll nun für Myelinzylinder in Phase I die Doppelbrechung Δn mit Hilfe des vorgestellten Modells abgeschätzt werden. Aus den Röntgenuntersuchungen geht hervor, daß im Vielschichtsystem zu Beginn von Phase I bei 20°C eine einheitliche Periode von $d=63\text{\AA}$ vorliegt (Kap.4.3.1.3). Aus R_{min} und R_{max} folgt dann die Anzahl der beteiligten Schichten. Für die Dicke der doppelbrechenden Schicht wird $d_a=27\text{\AA}$ angenommen [42]. Nun wird Δn iterativ so variiert, daß der berechnete Wert von Γ_{max} dem gemessenen (vergleiche Tab. 4.2) möglichst nahe kommt. Daraus ergibt sich für fünf verschiedene Myelinzylinder in Phase I eine mittlere Doppelbrechung von $\bar{\Delta n}=0.026\pm 0.04$. Durch Konoskopiemessungen an gerichteten DPPC-Proben in der L_α -Phase ($T = 43^\circ\text{C}$) bei einem Wassergehalt von 21% wurde $\Delta n=0.023$ bestimmt [152]. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie der von DOPC.

Einem weitreichenderem Vergleich der Werte von Δn für DOPC bei 23°C und DPPC bei 43°C stehen folgende Unterschiede im Wege:

1. Zwar sind die Ketten des DOPC-Moleküls um zwei Glieder länger als die des DPPC-Moleküls, doch ist wegen der ungesättigten Bindung in der Mitte der Kette und dem damit verbundenen Knick eine geringere Anisotropie für DOPC zu erwarten.
2. Mit steigender Temperatur nimmt die Entropie der Ketten für eine Lipidsorte in der L_α -Phase zu, wodurch Δn kleiner wird [152].
3. Bei einer geringeren Wasserkonzentration (21%) im Vergleich zum voll hydrati-

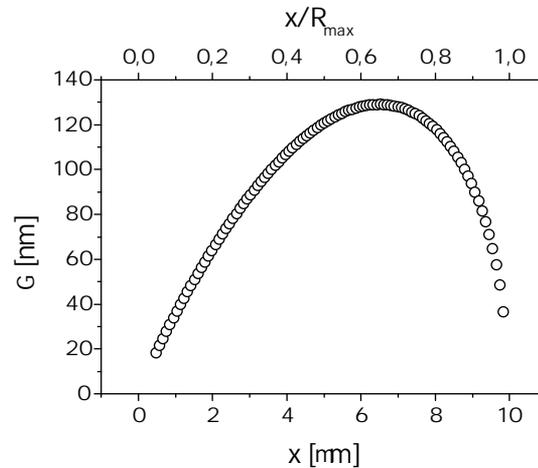


Abbildung 4.30: Berechneter Gangunterschied Γ für Strahlen, die ein zylindersymmetrisches Vielschichtsystem durchqueren, in Abhängigkeit vom Ort des Durchtritts x (vgl. Abb.4.29). Der Mittelpunkt liegt bei $x=0\mu\text{m}$. Für den Objektradius R_{max} wurde $x=10\mu\text{m}$ gewählt, der Innenradius beträgt $R_{min}=0.5\mu\text{m}$. Es wurden 1500 Membranen mit einem Schichtabstand $d=6.3\text{nm}$ und einem anisotropen Anteil von $d_a=2.7\text{nm}$ angenommen (vgl. Tab.4.2). Die Doppelbrechung beträgt $\Delta n=0.026$.

sierten Zustand (46% bei 50°C , [21]) kann erstens die Beweglichkeit der Ketten von DPPC eingeschränkt und zweitens das mittlere Schwankungsquadrat des Membrandirektors verringert sein.

Der oben ermittelte Wert für $\bar{\Delta n}$ wird übernommen, um einen mittleren Membranabstand für optisch homogene Myelinzyylinder aus Phase II zu bestimmen. Zum Abgleich des gemessenen mit dem berechneten Wert von Γ_{max} wird nun die Anzahl der Membranen innerhalb der Grenzen von R_{min} bis R_{max} variiert. Der entsprechende mittlere Schichtabstand ergab sich für fünf Objekte innerhalb verschiedener Proben zu $\bar{d} = 160 - 350\text{nm}$. Einzelne Beispiele finden sich in Tab.4.2.

Für ein Objekt mit z.T. erkennbaren Membranverläufen wurde $\bar{d}=600\text{nm}$ bestimmt. Dieser Wert liegt im Bereich der optischen Auflösung. Die Membranen müssen mindestens so weit voneinander entfernt sein, um innerhalb eines Stapels sichtbar zu sein. Insofern bewegt sich der ermittelte Wert für \bar{d} in der richtigen Größenordnung. In zwei Fällen wurde Γ_{max} für homogene Membrangebiete an der Kapillarenwand (siehe Abb.4.28a) gemessen. Nach demselben Verfahren wie bei den Myelinzyindern wurde daraus $\bar{d} = 290 - 430\text{nm}$ abgeleitet. Daraus konnte geschlossen werden, daß ca. 40–50 Schichten den Saum innerhalb der Kapillarenwand bilden, der ca. $10-20\mu\text{m}$ nach innen reicht.

Eine Abschätzung des mittleren Schichtabstandes für eine Auswahl von ab Phase II neu entstandenen Strukturen läßt den Schluß zu, daß sich die Membranen im Vergleich zu Phase I sehr weit voneinander getrennt haben. Alle bestimmten mittleren Abstände $150 < \bar{d} < 600\text{nm}$ liegen wesentlich über 65nm , der oberen Meßgrenze für den Synchrotronaufbau. Daher ist kein Schluß darüber möglich, wie groß die Streuung der Abstände innerhalb eines Objektes ist. Die starke Abweichung von \bar{d} für unterschiedliche Objekte deutet darauf hin, daß es keinen einheitlichen Abstand

für die Strukturen aus Phase II gibt.

4.3.8.5 Zusammenfassung

In Kap.4.3.8 wurden ab Phase II neu entstandene Quellstrukturen untersucht. Dazu wurden hauptsächlich polarisationsmikroskopische Methoden angewendet. Sie ermöglichen häufig auch dann eine Angabe über die mittlere Orientierung der Membranen innerhalb ausgedehnter Volumenstrukturen, wenn optisch keine einzelnen Membrankonturen auflösbar sind. Voraussetzung dafür ist, daß die Objekte eine definierte Geometrie besitzen und sich nicht gegenseitig überlagern. Als besonders geeignet erweisen sich optisch homogene Zylinder, welche ab Phase II häufig von der Ringregion ausgehen und entlang der Kapillarenachse ausgerichtet sind. Aus ihren polarisationsmikroskopischen Eigenschaften wurde geschlossen, daß die Membranen wie in Myelinzylindern konzentrisch verlaufen. Alle der untersuchten neu entstandenen Objekte weisen Eigenschaften auf, die mit der Annahme vereinbar sind, daß sie sich lokal aus einem ausgedünnten Membranvielschichtsystem zusammensetzen.

Für Objekte definierter Geometrie wurde der Phasenhub mit Hilfe eines Berek-Kompensators lokal abgeglichen und daraus der Gangunterschied ermittelt. Der maximale Wert des Gangunterschiedes für ein Objekt wurde mit einer Modellvorhersage verglichen. Der Gangunterschied von Objekten mit vorgegebenem Membranabstand aus Phase I wurde verwendet, um den freien Modellparameter, die Doppelbrechung von DOPC, zu bestimmen. Sie beträgt 0.026 ± 0.004 . Der Wert wurde übernommen, um für zylindersymmetrische Objekte aus Phase II den mittleren Schichtabstand zu ermitteln. Für unterschiedliche Objekte wurden Werte zwischen 150nm und 600nm gefunden. Dieselbe Methode ergab für auf der Kapillarenwand orientierte Schichten außerhalb des Ringbereiches (Abb.4.6) vergleichbare Werte. Daraus konnte die Anzahl der Schichten in diesem Bereich auf 40–50 abgeschätzt werden.

Durch Röntgenuntersuchungen an gut orientierten Proben konnte gezeigt werden, daß nach dem Abbau der lamellaren Ordnung innerhalb des Meßbereichs von $(650\text{Å})^{-1} < s < (23\text{Å})^{-1}$ keine neuen Beugungsreflexe sichtbar werden. Die Membranen behalten ihre Orientierung in einigen Fällen auch nach Phase II weiter bei.

4.3.9 Zusammenfassung und Diskussion

In den vorherigen Abschnitten des Kap.4.3 wurde der Prozeß des Abbaus der lamellaren Ordnung von PC-Vielschichtsystemen in Überschußwasser detailliert beschrieben. Zur Untersuchung wurden lichtmikroskopische Methoden und Röntgenbeugung verwendet. Es wurden ausschließlich Kapillarenproben vorgestellt, welche nach der Methode MR1 (Kap.2.1.3) präpariert sind. Ein Großteil der Untersuchungen wurde am System DOPC/Wasser vorgenommen.

Der mit der Zugabe von Wasser eingeleitete Quellprozeß durchläuft zwei Stadien. Während der ersten Quellphase nimmt das System Wasser auf. Erst wenn das geordnete Vielschichtsystem der vollen Hydratisierung sehr nahe ist, beginnt der Abbau der Ordnung. Zu diesem Zeitpunkt werden auch erste getrennte Membranen optisch erkennbar. In vielen Fällen erfolgt die Abnahme der Intensität der Beugungsordnungen näherungsweise linear. Sie hält so lange an, bis das Signal im Untergrund verschwindet oder sich auf niedrigem Niveau stabilisiert (Phase II).

Das geordnete Vielschichtsystem behält seinen Schichtabstand während der Auflösung nahezu bei. In Phase II nimmt die Halbwertsbreite der Beugungsordnungen zu. Als eine Ursache dafür konnten anhand eines Beispiels unterschiedliche Schichtabstände entlang der Kapillarenwand versetzter Streudomänen plausibel gemacht werden. Der größte beobachtete Unterschied koexistierender Schichtabstände beträgt 0.5\AA . Als weiterer Effekt der Verbreiterung wird vor allem eine Zunahme der parakristallinen Unordnung des Vielschichtsystems in Betracht gezogen. Am Beispiel einer Probe bei niedrigen Quelltemperaturen (15°C) wurde abgeschätzt, daß eine Zunahme des mittleren Schwankungsquadrates der Membranposition im Vielschichtsystem in der Größenordnung von 2\AA ausreicht, um die beobachtete Vergrößerung der Halbwertsbreite innerhalb beider Quellphasen zu erklären. Bei höheren Quelltemperaturen nimmt zwar durch das Erwärmen auf die Quelltemperatur die Breite der Beugungsordnungen vorübergehend zu, doch erreicht sie vor dem Beginn von Phase II in der Regel wieder den Ausgangswert. Die temporäre Zunahme der Breite durch Temperaturerhöhung ist mit der Annahme unterschiedlicher koexistierender Schichtabstände vereinbar. Als weitere Ursache für die Zunahme der Breite während Phase II kommt eine Verringerung der Domänengröße in Betracht, konnte jedoch durch die Messungen nicht direkt nachgewiesen werden.

Mit dem Abbau der lamellaren Ordnung entstehen neue Objekte. Diese wurden vor allem durch polarisationsmikroskopische Methoden charakterisiert. Zu Beginn von Phase II werden einzelne, vom geordneten Vielschichtsystem deutlich getrennte Membranen sichtbar, die z.T. Vesikeln bilden. Im Verlauf von Phase II auftretende optisch homogene Objekte setzen sich aus Membranen zusammen, die ein ausgedünntes Vielschichtsystem bilden. Der mittlere Schichtabstand übertrifft den des geordneten Vielschichtsystems um fast zwei Größenordnungen. Auch innerhalb dieser Objekte können die Membranen daher gegenüber dem Zustand im geordneten Vielschichtsystem als getrennt angesehen werden. Die mittleren Schichtabstände unterschiedlicher Objekte weichen z.T. deutlich voneinander ab. Dies deutet darauf hin, daß die Membranen innerhalb eines Objektes durch Zwangsbedingungen davon abgehalten werden können, den energetisch günstigsten Zustand einzunehmen.

Im System DOPC/Wasser findet eine endgültige Trennung der Membranen innerhalb des gesamten untersuchten Temperaturbereichs zwischen 15°C und 62°C statt. Dasselbe gilt für das System POPC/Wasser (20°C – 50°C) sowie SOPC/Wasser (30°C – 55°C). Die geordnete lamellare Phase ist somit nicht der energetisch günstigste Zustand für PC-Membranen in Überschußwasser. Vielmehr gehen sie, nachdem das Vielschichtsystem weitgehend hydratisiert ist, ohne Verzögerung in den ungebundenen Zustand über. Während des Abbaus der Ordnung ändert sich der mittlere Schichtabstand des restlichen geordneten Vielschichtsystems kaum. Außerdem bleibt das Streuprofil bis zum vollständigen Verschwinden der Beugungsordnung weitgehend symmetrisch. Es sind auch keinerlei „Satelitenreflexe“ erkennbar, die im Laufe der Zeit zu kleinen Streuwinkeln wandern.

Aus den genannten Beobachtungen läßt sich schließen, daß kein größeres Ensemble von Membranen in einen ungebundenen Zustand übergehen kann, indem der mittlere Schichtabstand kontinuierlich mit der Zeit zunimmt. Ein solcher kollektiver Übergang bliebe unbemerkt, wenn die Streuung der Abstände innerhalb des Ensembles so groß wäre, daß keine konstruktive Interferenz mehr aufträte oder wenn der

mittlere Schichtabstand der neuen Struktur innerhalb der Integrationsdauer eines Spektrums über der Nachweisgrenze läge.

Nach einer alternativen Vorstellung lösen sich die Membranen nicht kollektiv, sondern einzeln vom Stapel ab. Der Prozeß beginnt mit der äußersten Membran des Vielschichtsystems zum Überschußwasser und setzt sich sukzessive weiter nach innen fort. Da die abgelösten Membranen völlig unkorrelierte Schichtabstände besitzen, tragen sie nicht zur Beugungsordnung bei. Der jeweils innere Bereich des Vielschichtsystems bleibt von dem Abquellen unbetroffen.

Die Entstehung einzelner Membranobjekte zu Beginn des Abbaus der Ordnung kann als direkter Hinweis für den Abquellprozeß gedeutet werden. Allerdings werden im weiteren Verlauf von Phase II auch Objekte sichtbar, die zunehmend mehr Membranen beinhalten. Sie können entweder als eine Ansammlung einzeln abgequollener Membranen oder als Ensemble angesehen werden, welches sich kollektiv vom geordneten Vielschichtsystem abgelöst hat. Ein kollektiver Übergang könnte vor allem am Rand des geordneten Vielschichtsystems einsetzen und zunehmend planare Gebiete aufzehren. Ein solcher Prozeß ließe sich durch die entsprechende Abnahme der lateralen Ausdehnung gerichteter Beugungsreflexe nachweisen, wurde jedoch nicht beobachtet. Andererseits konnte auch keine Verringerung der transversalen Breite der Reflexe während Phase II nachgewiesen werden. Zu dieser Breite trägt die Höhe des geordneten Vielschichtsystems bei, welche beim Abquellen abnehmen sollte. Es ist denkbar, daß eine Abnahme der projektiven Breite einer Beugungsordnung durch andere Mechanismen der Verbreiterung unentdeckt bleibt.

Die Dauer der Phase I und II ist temperaturabhängig. Mit zunehmender Temperatur nimmt sie in beiden Fällen deutlich ab. Der Temperaturverlauf läßt sich jeweils durch einen Arrheniusfit annähern. Die Dauer von Phase I fällt für POPC und SOPC verglichen mit DOPC sehr kurz aus. Häufig wurde mit der Temperaturerhöhung der Abbau der Ordnung eingeleitet. Auch die Dauer von Phase II ist für die einfach ungesättigten Lipide geringer als für DOPC. Für POPC ist sie am geringsten.

Die Ursache für das abweichende Verhalten ist bislang ungeklärt.

4.4 Proben mit und ohne Auflösungserscheinungen

4.4.1 Stabile Proben

In Abschnitt (4.3) wurde der Vorgang des Quellens und der darauffolgende Abbau der lamellaren Ordnung mit der damit einhergehenden Herausbildung neuer Strukturen beschrieben. Dieses Verhalten konnte bei allen Proben beobachtet werden, die nach dem Verfahren MR1 präpariert sind. Dies trifft für MR2-Proben nur bedingt, für MFT-Proben nicht zu. Die im folgenden kurz beschriebenen Beobachtungen wurden mit den Lipidsorten POPC, SOPC und DOPC in Überschußwasser gemacht.

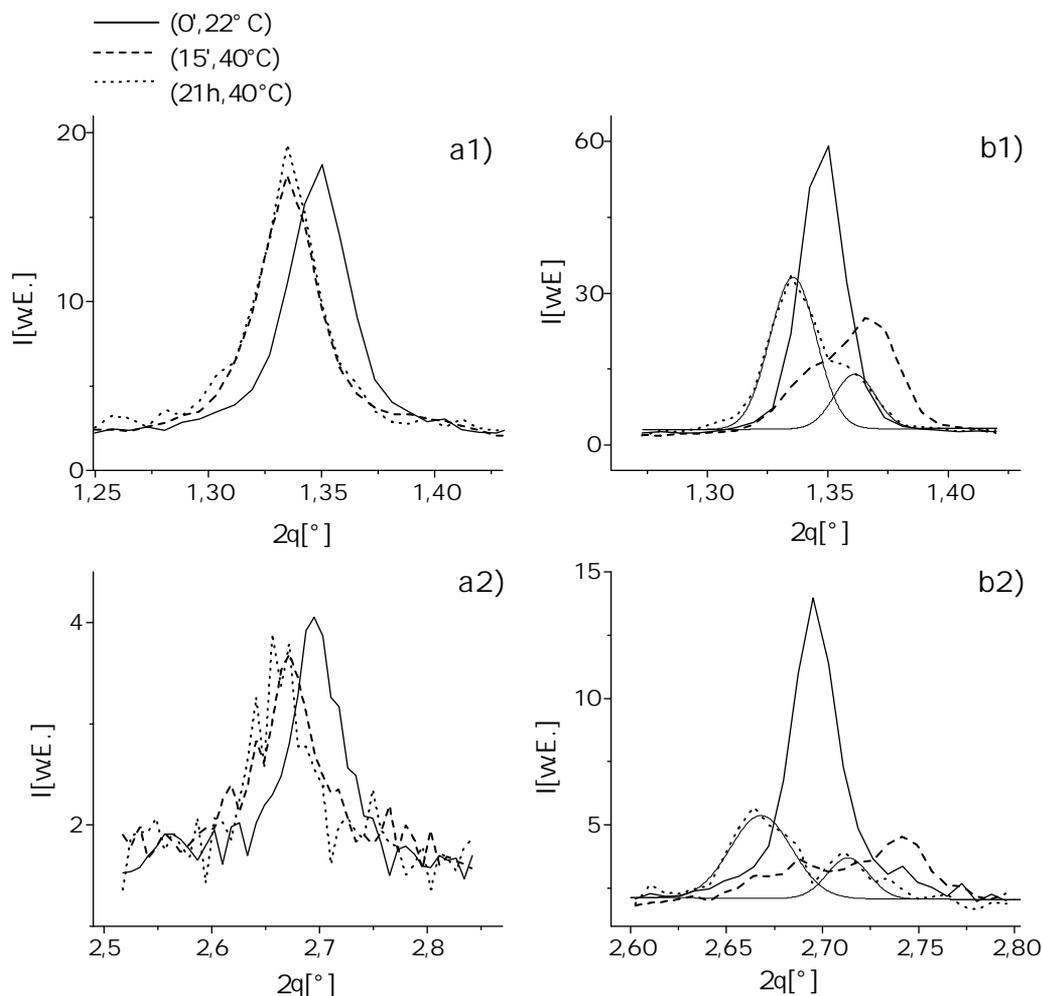


Abbildung 4.31: An drei Zeitpunkten aufgenommene Spektren mit auf die erste und zweite Beugungsordnung begrenzten Ausschnitten von DOPC-Proben unterschiedlicher Präparationsweise. Die Temperatur beider Proben wurde ab $t=0min$ innerhalb von $2min$ von $22^{\circ}C$ auf $40^{\circ}C$ erhöht. Der Schichtabstand der Probe vom Typ MFT bleibt ab $t=15min$ nahezu konstant (erste bzw. zweite Ordnung (a1) bzw. (a2)). Nach Temperaturerhöhung sind die Reflexe der Probe vom Typ MR2 aufgespalten (erste bzw. zweite Ordnung (b1) bzw. (b2)). Der durch einen Gaußfit bestimmte Unterschied des Schichtabstandes beträgt bei $t=21h$ 1.18\AA .

Nur bei einem geringen Anteil der Proben vom Typ MR2 verschwinden die Braggreflexe des Vielschichtsystems. Der Abbau setzt frühestens drei Tage nach der Zugabe von Wasser ein. Der Zeitraum bis zum Beginn des Abbaus läßt sich weder durch eine erhöhte Quelltemperatur noch durch Quenchen der Proben bei $-20^{\circ}C$ verkürzen. Einige der Proben behalten die lamellare Ordnung über mehrere Monate bis zum Abbruch des Versuches bei.

Bei Liposomensuspensionen wurde in keinem Fall ein Abbau der lamellaren Ordnung beobachtet. Die Beobachtungen wurden bis zu einem Zeitraum von mehreren

Monaten durchgeführt.

Als Beispiel für den Quellprozeß stabiler Proben beschreiben wir im folgenden die zeitliche Entwicklung der Spektren von zwei MFT- bzw. drei MR2-Proben (DOPC). Die Beugungsspektren wurden vor der Temperaturerhöhung von 22°C auf 40°C und danach in regelmäßigen Abständen 21 Stunden lang mit einem OED am EMBL aufgenommen.

Die Proben vom Typ MFT wurden ca. drei Tage nach Ansetzen der Suspension von 4°C auf 22°C und drei Stunden später innerhalb weniger Minuten von 22°C auf 40°C gebracht. Sie enthalten 20 Gewichtsprozent DOPC in Wasser. Das zweite OED-Spektrum, das ca. 13 Minuten nach der letzten Temperaturerhöhung aufgenommen wurde, weist gegenüber dem bei 22°C eine Verschiebung der Beugungsordnungen zu kleineren Winkeln hin auf (Abb.4.31a1, a2), was im Fall von Probe 1 einer Abstandszunahme von 63.73Å auf 64.39Å entspricht (Tab.4.3). Von da an findet bei annähernd konstantem Abstand keine systematische Veränderung der Streuintensität mehr über einen Zeitraum von 21h statt. Dies entspricht der 10-fachen Zeitspanne, innerhalb derer der Abbau der Ordnung beim Probentyp MR1 bei 40°C erwartet wird. Demnach wächst bei Proben vom Typ MFT die Schichtperiode nach Temperaturerhöhung einheitlich zunächst auch bis zu einem Grenzwert, doch erfolgt darauf innerhalb des für Proben vom Typ MR1 typischen Zeitraumes (siehe Abb.4.13) keine systematische Abnahme der Beugungsintensität.

Probe	(0',22°C)	(15',40°C)		(21h,40°C)	
	d[Å]	d _{min} [Å]	d _{max} [Å]	d _{min} [Å]	d _{max} [Å]
MR2-1	63.75	–	62.96	–	64.35
MR2-2	63.74	62.78	63.97	63.07	64.25
MR2-3	63.75	63.19	64.21	–	64.43
MFT-1	63.73	–	64.39	–	64.37
MFT-2	63.81	–	64.29	–	64.43

Tabelle 4.3: Schichtabstand d für DOPC-Proben vom Typ MR2 und MFT bei 22°C ($t=0min$), 13 Minuten nach Erreichen von 40°C ($t=15min$) sowie nach insgesamt 21 Stunden bei 40°C. Bei MR2-Proben konnten z.T. aus der Aufspaltung der Ordnungen zwei koexistierende Abstände d_{min} und d_{max} bestimmt werden (vgl. Abb.4.31b1), (b2)). In keiner der Proben hat nach 21 Stunden bei 40°C der Abbau der Ordnung begonnen.

Bei zwei Stunden alten DOPC-Proben vom Typ MR2 führt die Temperaturerhöhung von 22°C auf 40°C zu einer Verbreiterung der Reflexe bis hin zu einer deutlich erkennbaren Aufspaltung. In Abb.4.31b1, (b2) wird an einem Spektrum (21h, 40°C) gezeigt, daß sich beide aufgespaltenen Beugungsordnungen jeweils durch zwei Gaußfits annähern lassen. Der Abstand des Schwerpunktes beider Gaußfunktionen einer Ordnung i , $\Delta\theta_i$, nimmt dabei von der ersten zur zweiten Ordnung um den Faktor $r=\Delta\theta_2/\Delta\theta_1=0.053/0.0258=2.05$ zu. Zusammen mit den vergleichbaren Halbwertsbreiten (FWHM) aller Gaußfunktionen deutet dies auf die Koexistenz mehrerer Schichtabstände innerhalb einer Probe hin. Der Abstandsunterschied beträgt 1.18Å.

Mit der Temperaturerhöhung geht gewöhnlicherweise auch ein signifikanter Rückgang der Streuintensität einher. Der Schwerpunkt der verbreiterten Reflexe ist wie

bei den Proben vom Typ MR1 auch anfänglich gegenüber dem bei tieferen Temperaturen zu größeren Winkeln hin verschoben (vgl. Abb.4.20) und wandert im weiteren Verlauf wieder zu größeren Abständen. Dabei nimmt in der Regel die Gesamtbreite einer Ordnung wieder ab. Im Vergleich zu den Proben vom Typ MR1 erfolgt die Zunahme des Schichtabstandes allerdings in einigen Fällen deutlich verzögert: Nach 21h bei 40°C lag der größte Schichtabstand der vier DOPC-Proben im Mittel bei $\bar{d}=64.35\pm 0.07\text{Å}$. Auch zu diesem Zeitpunkt treten z.T. noch immer verschiedene Abstände in einer Probe auf und es gibt keine Anzeichen für eine systematische Intensitätsabnahme der Beugungsordnungen.

Es konnte demnach an einigen Fällen gezeigt werden, daß nach schnellem Heizen auf die Quelltemperatur von 40°C die Proben vom Typ MFT und MR2 verschiedenartig reagieren: Während bei ersteren ab 13 Minuten der Schichtabstand unverändert bleibt, treten bei letzteren z.T. gleichzeitig verschiedene Abstände auf und das System braucht wesentlich mehr Zeit, um einen endgültigen und einheitlichen Grenzwert zu erreichen. In einigen Fällen ist dies nach 21h noch nicht geschehen. Allerdings stimmt der maximale Abstand aller Proben nach dieser Zeit gut überein. Sein Mittelwert beträgt $64.37\pm 0.007\text{Å}$. Eine Gegenüberstellung dieses Wertes mit dem von DOPC-Ringproben vom Typ MR1 während Phase II sowie mit Literaturwerten findet im Kap.4.4.2 statt. Eine Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Kap.4.4.3.

4.4.2 Schichtabstände im System DOPC/Wasser

Im folgenden wird der jeweils größte bei einer Temperatur gemessene Schichtabstand des geordneten Vielschichtsystems für DOPC-Proben unterschiedlicher Präparation (MR1, MR2, MFT, vgl. Kap.2.1.3) mit Literaturwerten verglichen (Abb.4.32).

In 5°C-Schritten wurden von Gruner et al. d -Werte für DOPC-Liposomen in Überschußwasser zwischen 0°C und 80°C bestimmt [14]. Die Proben wurden nach Zugabe von Wasser "mechanisch gemischt" und über zwei Stunden stehen gelassen. Der Temperaturverlauf der Periode wurde an einer Probe gemessen, wobei in 5°C-Schritten geheizt und vor jeder Aufnahme 5–15 Minuten gewartet wurde. Da keine Angaben über systematische Veränderungen der Streuintensität gemacht wurden, kann sie über den Beobachtungszeitraum als konstant angenommen werden. Dies deckt sich mit unseren Resultaten für Proben vom Typ MFT, deren Spektren ab 10–15 Minuten nach Temperaturänderung konstant bleiben (Kap.4.4). Die d -Werte stimmen bei 22°C wesentlich besser mit denen von Gruner überein als bei 40°C (4.32). Der Grund dafür ist unbekannt.

Die über Phase II gemittelten Schichtabstandswerte für Proben vom Typ MR1 weisen eine vergleichbare Temperaturabhängigkeit auf wie die von Gruner et al. veröffentlichten d -Werte für DOPC-Liposomen in Überschußwasser (Abb.4.32). Beide Verläufe lassen sich durch eine mit der Temperatur exponentiell ansteigende Funktion annähern. Die Kurve für die Ringproben verläuft ohne Kreuzungspunkt im Mittel 0.29Å über der für die Meßwerte von Gruner, wobei der Abstand zu höheren Temperaturen zunimmt. Die Streuung der gemessenen Schichtabstände um die Fitkurve ist für die Proben vom Typ MR1 im Mittel zwischen 15°C und 57°C $\sigma=0.27\text{Å}$ und kann nicht alleine auf Meßungenauigkeiten zurückgeführt werden. Vergleichs-

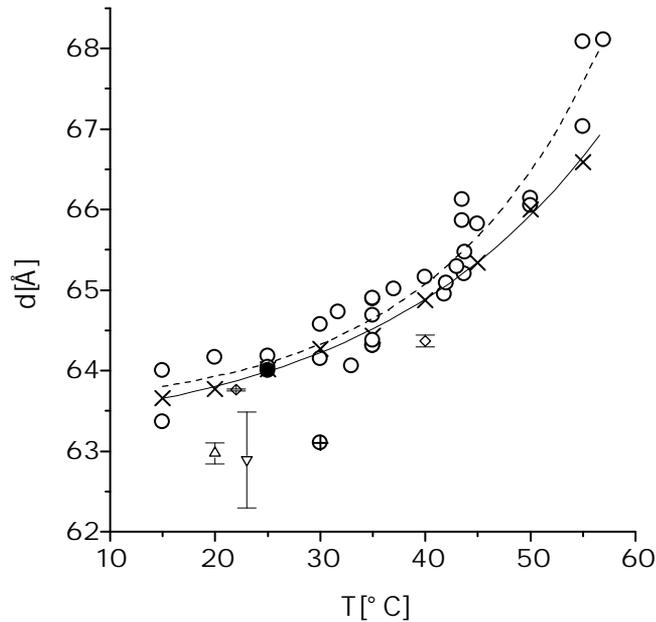


Abbildung 4.32: Schichtabstand d in \AA für DOPC in Überschußwasser als Funktion der Temperatur T in $^{\circ}\text{C}$. Proben sind nach Präparationsweise sowie Publikation mit unterschiedlichen Symbolen markiert. Nomenklatur zu den Symbolen: \circ über die Dauer von Phase II gemittelte d -Werte für Proben vom Typ MR1, \times Daten von Gruner et al. [14] für Liposomen-Suspensionen, \oplus Meßwert von Tristam-Nagle et al. [42] für Liposomen-Suspensionen, \bullet Meßwert von Lis et al. [99], \triangle Mittelwert des Abstands von sieben MR1-Proben zwischen 19 und 34 Minuten nach Präparation, ∇ Mittelwert des Abstands von 26 MR1-Proben zwischen 10 und 55 Minuten nach Präparation, \diamond Mittelwert des (größten) Abstands von zwei MFT-Proben und drei MR2-Proben nach zunächst zwei Stunden bei 22°C und dann 21.5 Stunden bei 40°C (Abb.4.31). Der temperaturabhängige Verlauf von \circ und \times ist durch eine Exponentialfunktion angenähert.

weise streuen die d -Werte von Gruner im selben Bereich nur mit $\sigma=0.04\text{\AA}$ um die Fitkurve.

Aus der großen Streuung der Schichtabstände für die Ringproben MR1 läßt sich schließen, daß bei einer vorgegebenen Quelltemperatur der Abbau der Ordnung nicht mit dem Erreichen eines genau definierten Grenzwertes des Abstandes verbunden ist, sondern innerhalb eines Abstandsintervalls erfolgen kann, dessen Sigtabreite 0.27\AA beträgt. Wenn der Schichtabstand einen solchen Wert angenommen hat, ist dies allerdings noch keine hinreichende Bedingung für den Beginn des Abbaus der Ordnung. Dies belegen eindrücklich die gemessenen d -Werte von Gruner, die zwischen 15°C und 57°C im Mittel nur 0.29\AA geringer sind als die von Ringproben (MR1) in Phase II. Der Grund für das abweichende Quellverhalten zwischen Proben vom Typ MR1 und Liposomen läßt sich daher aus dem Vergleich des größten eingenommenen Schichtabstandes nicht ableiten.

Ein wesentlich geringerer Schichtabstand für DOPC in Überschußwasser wurde von Tristam-Nagle et al. [42] bei einer Temperatur von 30°C mit hochauflösender

Röntgenbeugung gemessen (Abb.4.32): Obwohl die Proben wie bei Gruner et al. in Form von Liposomen-Suspensionen vorliegen, ist der Unterschied des Schichtabstandes etwas größer als 1Å. Dementsprechend fällt der d -Wert von Tristam-Nagle in einen Abstandsbereich, der typisch ist für frisch präparierte Proben vom Typ MR1 noch vor Einstellen der Quelltemperatur. In Abb.4.32 sind bei zwei Temperaturen Mittelwert und Streuung der Abstände für eine jeweils größere Anzahl dieser Proben dargestellt. Im Laufe von Phase I erreicht der Schichtabstand einen Wert, der bei entsprechender Temperatur im Mittel auf der für die Proben vom Typ MR1 eingezeichneten Fitkurve liegt Abb.4.32.

4.4.3 Möglicher Mechanismus für den Abbau der lamellaren Ordnung

In Kap.4.3.9 wurde dargelegt, daß sich der Abbau der lamellaren Ordnung möglicherweise durch das sukzessive Abtrennen der jeweils äußeren Membran vom geordneten Vielschichtsystem vollzieht. Diese These wird durch folgende experimentelle Beobachtungen gestützt: Zum einen behält das geordnete lamellare Vielschichtsystem während Phase II den Schichtabstand bei, und zum anderen treten keine neuen Beugungsordnungen auf. Des weiteren werden zu Beginn des Abbaus optisch einzelne Membranen innerhalb der Probe sichtbar. Außerdem setzt der Abbau innerhalb der gesamten Probe ein, sobald das geordnete Vielschichtsystem der vollen Hydratisierung nahe ist.

Im folgenden geben wir eine mögliche Erklärung für den angenommenen Abquellprozeß an. Sie beruht auf der Berücksichtigung von Beiträgen höherer Ordnung in den Krümmungen zur Biegeenergie. Die krümmungselastischen Eigenschaften spielen bei der Ausbildung von Undulationen eine wichtige Rolle. Je steifer eine Membran ist, desto geringer fallen ihre Undulationen aus. Ein Maß für die Stärke der Undulationen ist das mittlere Schwankungsquadrat der Membranauslenkung von der mittleren Position. In Kap.3.1.3.3 wurde gezeigt, daß eine freie Membran stärker fluktuiert, wenn man Krümmungsterme höherer Ordnung als in der Hooke'schen Näherung zur Biegeenergie berücksichtigt. Die Module höherer Ordnung wurden für die Abschätzung übereinstimmend mit dem Parametersatz gewählt, für den durch Monte-Carlo Methoden eine ungeordnete Überstruktur auf einer ursprünglich ebenen Membran gefunden wurde. Es wurde eine Zunahme des mittleren Schwankungsquadrates um einen Faktor von 1.48 festgestellt.

Ein weiterer Schritt der Argumentation besteht in der Annahme, daß Krümmungsbeiträge höherer Ordnung zur Fluktuation im Vielschichtsystem stärker unterdrückt werden als Hooke'sche Beiträge. Während sich das Zusammenspiel der Wechselwirkungen innerhalb des Vielschichtsystems kaum verändert, kommen am äußeren Rand des Stapels die Beiträge höherer Ordnung zunehmend ins Spiel. Die äußeren Membranen erfahren dadurch einen zusätzlichen abstoßenden Beitrag zur Wechselwirkung, welcher zu einer endgültigen Trennung vom Rest des Stapels führt.

Gerade die letzte Annahme bedarf einer Klärung. Um die Auswirkung der Krümmungsbeiträge höherer Ordnung auf die Gesamtwechselwirkung zwischen den Membranen innerhalb des Vielschichtsystems zu untersuchen, sind aufwendige Berechnungen notwendig, da die einzelnen Wechselwirkungsbeiträge nicht ohne wei-

teres superponierbar sind. Um das Wechselwirkungspotential zwischen benachbarten Membranen zu bestimmen, die einen mittleren Abstand einnehmen, muß die Abstandsverteilung zwischen den Membranen bekannt sein. Diese ist durch die Fluktuationsmoden vorgegeben. Andererseits hängt die Ausbildung der Moden wiederum von den direkten Wechselwirkungen ab. Eine Lösung des Problems ist nur mit Hilfe der Theorie der Renomierungsgruppen möglich (s. auch Kap.3.2).

Ein wesentlicher Einfluß auf die Entwicklung des Quellprozesses von Vielschichtsystemen ist durch laterale Spannungen zu erwarten. Die Ausbildung von Undulationen wird durch laterale Spannungen stark unterdrückt. In Kap.3.2.4 wurde gezeigt, daß der sterische Undulationsdruck einer Membran auf äußere Begrenzungen im Fall einer lateralen Spannung exponentiell mit dem Abstand abnimmt, während er im spannungsfreien Fall einem Potenzgesetz folgt. Dieses Verhalten kann als möglicher Grund dafür angesehen werden, warum der Quellprozeß von der Probenpräparation abhängt. Es ist denkbar, daß die Art der Probenpräparation einen Einfluß darauf hat, wie groß die laterale Spannung der Membranen innerhalb des Vielschichtsystems ist.

Hinweise auf den Einfluß von Membranspannung auf die Entwicklung eines Vielschichtsystems folgen aus den Ergebnissen in Kap.4.4.1. Dort wurden für Ringproben vom Typ MR2 nach einer Temperaturerhöhung über einen langen Zeitraum koexistierende Schichtabstände beobachtet. Es ist denkbar, daß ein Teil der Probe einen geringeren Abstand einnimmt, da dort laterale Spannungen die Ausbildung von Undulationen unterbinden. Dadurch wird der abstoßende Anteil der Wechselwirkungen verringert, was zu einem geringeren Schichtabstand führt. Für die Probenanteile, welche den „Gleichgewichtsabstand“ schon eingenommen haben, sollten die Undulationen allerdings nicht unterdrückt sein, und es ist kein Grund erkennbar, warum sie keinen Abbau der lamellaren Ordnung zeigen. Dasselbe gilt für die Proben (MFT), welche nach der Temperaturerhöhung innerhalb kurzer Zeit den „Gleichgewichtsabstand“ erreichen und stabil bleiben.

Neben Membranspannungen sollten Defektstellen innerhalb des Vielschichtsystems eine wichtige Rolle für den Quellprozeß spielen. Sie ermöglichen den Membranfluß innerhalb des Vielschichtsystems, ohne den der Abbau der Ordnung schwer vorstellbar ist und können daher als Voraussetzung für den Prozeß angesehen werden.

Hinweise auf die Defektstellendichte könnte eine systematische Bestimmung der Halbwertsbreite der Beugungsordnung unterschiedlich präparierter Proben liefern, nachdem das Vielschichtsystem den „Gleichgewichtsabstand“ erreicht hat. Eine Abseparierung der restlichen Beiträge zur Halbwertsbreite ist allerdings unerlässlich, um aus der Verbreiterung auf die Defektstellendichte zu schließen.

Vor dem Hintergrund neuerer Untersuchungen von Akashi et al. [144] müssen auch andere Ursachen als verstärkte Membranfluktuationen für das Trennen neutraler PC-Membranen in Betracht gezogen werden. Akashi konnte nachweisen, daß nach Reeves und Dowben [24] präparierte Riesenvesikeln aus neutralen PC's negative Ladungen in geringem Umfang tragen können. Die Ladungskonzentration pro Fläche wurde auf 0.1% im Fall von POPC abgeschätzt. Es wurde argumentiert, daß eine solche Konzentration ausreicht, um den Beitrag des anziehenden van der Waals-Beitrags zu kompensieren und die Membranen sich dadurch abstoßen.

Um herauszufinden, ob Ladungen am Quellprozeß beteiligt sind, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, könnte anstelle von Wasser eine Elektrolytlösung verwendet werden. Die Ionenkonzentration muß dabei so bemessen sein, daß mögliche elektrostatische Beiträge zur Wechselwirkung bei solchen Schichtabständen vernachlässigbar sind, welche das System im ungeladenen Zustand einnimmt. Durch Abschirmung des Nullfrequenzanteils ändert sich bei hohen Konzentrationen der Beitrag der van der Waals-Wechselwirkung, wodurch ein direkter Nachweis elektrostatischer Beiträge erschwert wird.

Auch Maier et al. haben kürzlich erstmals mit Methoden der Mikropipettenaspiration eine abstoßende Wechselwirkung zwischen neutralen PC-Membranen gemessen [153].

Diese Technik ermöglicht Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit der Membranwechselwirkung. Außerdem kann die Lösung zwischen beiden Vesikeln ohne weiteres verändert werden. Daher scheint diese Methode zur weiteren Eingrenzung der Ursachen für das Trennen von Membranen besonders geeignet.