

## Kapitel 5

# Optisch isotrope Objekte im System DGDG/Wasser/NaCl

### 5.1 Einführung

Der Klarheit halber wollen wir vorab einige häufig zur Charakterisierung mikroskopischer Objekte verwendete Begriffe definieren. Unter „optisch isotropen Objekten“ verstehen wir Lipidstrukturen, welche unabhängig von ihrer Orientierung zwischen gekreuzten Polarisatoren dunkel bleiben. Sie sind daher über die Weglänge des durchtretenden Lichts gemittelt nicht doppelbrechend, auch wenn sie lokal aus Membranen zusammengesetzt sind, die eine Brechungsindexanisotropie aufweisen. Bekannte Membranstrukturen, die diese Eigenschaft besitzen, sind beispielsweise kubische Phasen [14][5][16][15] oder sog. Schwammphasen<sup>1</sup> [154]. Bei der ersteren nimmt die Membran innerhalb einer Einheitszelle alle möglichen Orientierungen an. Da die Schwammphase modellhaft als eine ungeordnete kubische Phase angesehen werden kann [155][156], weist sie lokal auch keine Orientierung auf. Optische Isotropie ist also mit der Eigenschaft verknüpft, daß die Elemente der Struktur lokal keine Orientierung besitzen. Je nachdem, ob ein isotropes Objekt eine sichtbare Grenze zur wässrigen Lösung ausbildet, bezeichnen wir es als „kondensierte“ oder „gelöste“ isotrope Phase. Ohne Kenntnis der Vorgeschichte ist demnach eine mikroskopische Unterscheidung zwischen gelöster Phase und Wasser nicht möglich.

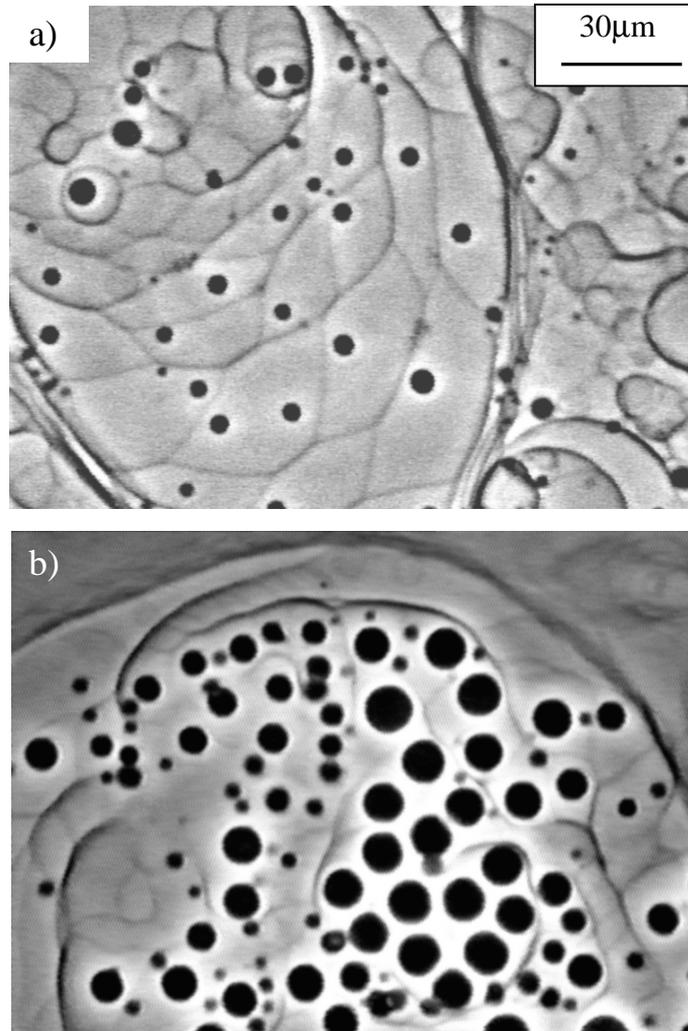
Als „optisch homogene Objekte“ bezeichnen wir solche, die gegenüber dem äußeren Medium eine deutliche Grenze bilden, innerhalb derer jedoch keine detaillierten Strukturen wie z.B. Membranverläufe erkennbar sind.

Der Begriff der „Dichte“ einer Lipidphase bezieht sich durchweg auf den Volumenanteil des Lipids innerhalb der Phase und nicht auf dessen intrinsische Dichte. Dieser Ausdruck ist insofern suggestiv, als die mikroskopische Abbildung unter Umständen direkt einen Eindruck der Dichte isotroper Phasen vermittelt.

Zunächst gehen wir nochmals auf die in Kap.4.3.8 mit mikroskopischen Methoden untersuchten Membranstrukturen zurück, die sich aus einem ursprünglich homogen hydratisierten Vielschichtsystem herausbilden. Alle charakterisierten optisch homogenen neuen Objekte wurden als lokal aus Stapeln ebener Membranen zusammengesetzt gedeutet. Am Beispiel neu entstandener Myelinzyylinder konnte

---

<sup>1</sup>„sponge phase“



**Abbildung 5.1:** Videomikroskopische Phasenkontrastaufnahme von dunklen Körpern (DGDG(Spinat)/H<sub>2</sub>O/100mMNaCl) in Koexistenz mit der stark verdünnten lamellaren Phase. Die Fokusebene liegt ungefähr in der Kammermitte, so daß die dunklen Linien dem Querschnitt von Membranverläufen entsprechen. Dunklere Linien weisen auf eine höhere Lamellarität hin [48], was einer Adhäsion von Membranen entspricht. In a) (3 Tage alt, seit 30min bei 18°C) sind Adhäsionskammern erkennbar, innerhalb derer die dunklen Körper eingeschlossen sind, in b) (40h alt, seither bei 50°C) liegen sie z.T. so dicht, daß durch Überblendung keine Membranverläufe mehr sichtbar sind.

nachgewiesen werden, daß sie, genauso wie ihre dichter gepackten Vorgänger, aus Membranstapeln in zylindrischer Anordnung bestehen (Kap.4.3.8). Der Abstand zwischen benachbarten Membranen ist nun jedoch wesentlich größer. Somit können die neuen Strukturen als eine stark verdünnte lamellare Phase aufgefaßt werden. Sie sind nach der oben genannten Definition optisch nicht isotrop. Allerdings wurden die Proben maximal über einen Zeitraum von 10h nach Beginn von Phase II untersucht, und die optische Auflösung des Mikroskops konnte nicht ausgenutzt werden (Kap.4.3.8), um optisch isotrope Objekte ausfindig zu machen. Unter welchen

Umständen und zu welchem Zeitpunkt sie entstehen, ist Gegenstand der folgenden Unterkapitel. Zuvor wollen wir den bisherigen Kenntnisstand schildern.

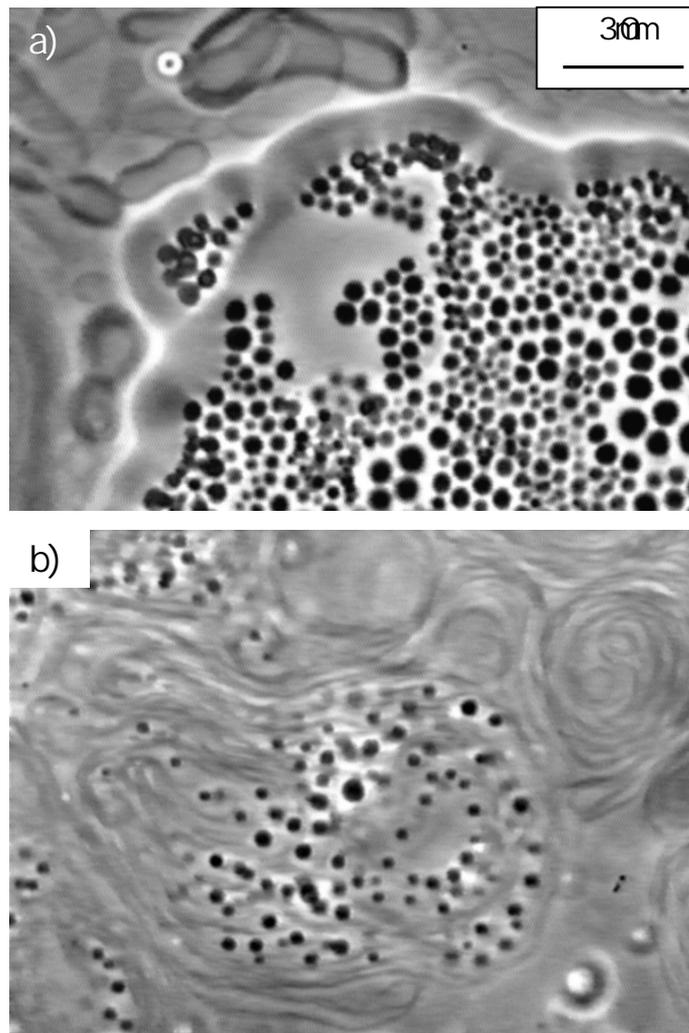
Optisch isotrope Strukturen wurden in der Gruppe Helfrich wiederholt in weit gequollenen Vielschichtsystemen beobachtet. Besondere Aufmerksamkeit erlangten aufgrund ihres Phasenverhaltens die sog. dunklen Körper. Sie wurden so benannt, da sie im Phasenkontrastmikroskop vollkommen dunkel aussehen (vgl. Abb.5.1, 5.2). Sie sind optisch homogen, so daß ihre Struktur wesentlich weniger ausgedehnt ist als die mikroskopische Auflösungsgrenze. Zwischen gekreuzten Polarisatoren bleiben die Objekte dunkel. Dunkle Körper traten immer wieder in folgenden Lipid/Wasser-Systemen auf: EYPC [38], einkomponentiges PC (z.B. DMPC, POPC) [38] sowie DGDG [157]. Während die Verwendung von NaCl bei DGDG essentiell ist, erhöht sie bei EYPC die Wahrscheinlichkeit ihrer Entstehung [38].

Erste systematische Untersuchungen wurden am System EYPC/Wasser von W.-Harbich in ebenen Probenkammern durchgeführt [121]. Die Schichten wurden dabei durch Scheren weitgehend parallel zum Glas orientiert. Das Vielschichtsystem füllte die Höhe der Kammer zu Beginn vollständig aus. Dadurch findet nach der Zugabe von Überschußwasser bei Temperaturen um  $50^{\circ}\text{C}$  ein kontrollierter Quellvorgang statt, wobei sich das System bei abnehmender Lipidkonzentration lateral immer weiter nach außen ausbreitet und dabei seine Orientierung weitgehend beibehält. Dunkle Körper können nach einigen Tagen Inkubationszeit direkt durch Abkühlen im ausgedünnten Vielschichtsystem ausgefällt werden. Bei einer alternativen Methode folgt auf eine längere Inkubationszeit bei hohen Temperaturen eine weitere bei tiefen Temperaturen (z.B.  $14^{\circ}\text{C}$ ), und die Körper entstehen durch Erwärmen über  $23^{\circ}\text{C}$ . Im letzteren Fall befinden sich die dunklen Körper innerhalb abgeschlossener Kammern adhärerender Membranen, wo sie frei diffundieren. Unterhalb von  $23^{\circ}\text{C}$  sowie oberhalb von  $70^{\circ}\text{C}$  lösen sie sich im umgebenden Medium auf und können durch Rückkehr in das Temperaturintervall reversibel ausgefällt werden. Dabei bilden sich an mehreren Orten innerhalb einer Membrantasche Untereinheiten, die größer werden und schließlich zu einem dunklen Körper fusionieren. Die unbekannt Phase, in die der Körper beim Abkühlen übergeht, wurde „disperse“ Phase genannt. Der Autor beziffert die Wahrscheinlichkeit, mit der nach der direkten Abkühlungsmethode dunkle Körper ausfallen, auf 50% [38].

Aus dem letzten Abschnitt geht hervor, daß sich die benannten optisch isotropen Objekte nicht auf direkte Weise, d.h. durch Abwägen der entsprechenden Anteile von Wasser und Lipid, anschließende homogene Durchmischung und Einstellen der Temperatur erzeugen lassen. Ihre Entstehung hängt von der Art der Präparation und der Vorgeschichte der Probe ab. Besonders deutlich zeichnet sich die Bedeutung der Präparation auf die spätere Entwicklung des Systems am Beispiel der Suspensionen multilamellarer Liposomen ab, welche die lamellare Phase mit einem homogenen Abstand im wesentlichen beibehalten, d.h. das in Kap.4.3.2 beschriebene Stadium des Abquellens gar nicht erst erreichen. Die mit der Präparationsweise isotroper Körper verbundenen Schwierigkeiten wollen wir an dieser Stelle benennen.

Da zum einen ein unbekannter Anteil des Lipids als ausgedünnte lamellare Phase koexistiert, ist die gesamte Lipidkonzentration beider isotroper Phasen von vornherein nicht bekannt. Daher ist das Phasenverhalten von seiten der Konzentration noch nicht näher erschlossen. Auf der anderen Seite ist der Quellprozeß als solcher im Detail (an welchem Ort innerhalb der Probe entsteht zu welchem Zeitpunkt welche

Struktur) nicht vorhersehbar und führt außerdem zu einer inhomogenen Verteilung



**Abbildung 5.2:** Videomikroskopische Phasenkontrastaufnahme von dunklen Körpern (DGDG/H<sub>2</sub>O/NaCl) in Koexistenz mit der lamellaren Phase. In a) (100mMNaCl, 2 Tage alt, seither bei 50°C) sind sie innerhalb der optisch homogenen lamellaren Phase in Feldern angeordnet. Dabei bewegen sie sich nur geringfügig um ihre mittlere Position, welche sie über einen längeren Zeitraum (Stunden) beibehalten. In b) (20mMNaCl, 16h alt, bei 40°C) befinden sie sich zwischen stark fluktuierenden Membranen.

des Lipids innerhalb der Probe. Dementsprechend unterschiedlich kann sowohl lokal als auch zu verschiedenen Zeitpunkten die Ausbeute an dunklen Körpern ausfallen (vgl. Abb.5.3).

Ein Hinweis auf die Struktur der dispersen Phase ergibt sich aus elektronenmikroskopischen Gefrierätztaufnahmen von PC-Vesikeln [40][39]. In einigen der Vesikelsuspensionen sind die Vesikel vollständig auf Kosten einer neuen Struktur (vgl. Abb.1.7) verschwunden. Durch mit der Art der Replikaherstellung verbundene Artefakte ist eine Interpretation der Struktur mit Schwierigkeiten behaftet. Sie läßt

sich als eine Aneinanderreihung von kleinen ( $\approx 20nm$ ) Ellipsoiden in Längsrichtung auffassen, die durch Passagen, d.h. enge Verbindungen, miteinander verknüpft sind. An einigen Stellen gibt es Verzweigungen, die bevorzugt einen Winkel von  $120^\circ$  bilden (vgl. Abb.1.7). Ob die genannten Strukturen mit der dispersen Phase übereinstimmen, in die dunkle Körper beim Abkühlen übergehen, bedarf noch weiterer Klärung.

In den folgenden Abschnitten werden Ergebnisse vorgestellt, die auf mikroskopischen Beobachtungen und Röntgenbeugungsuntersuchungen beruhen.

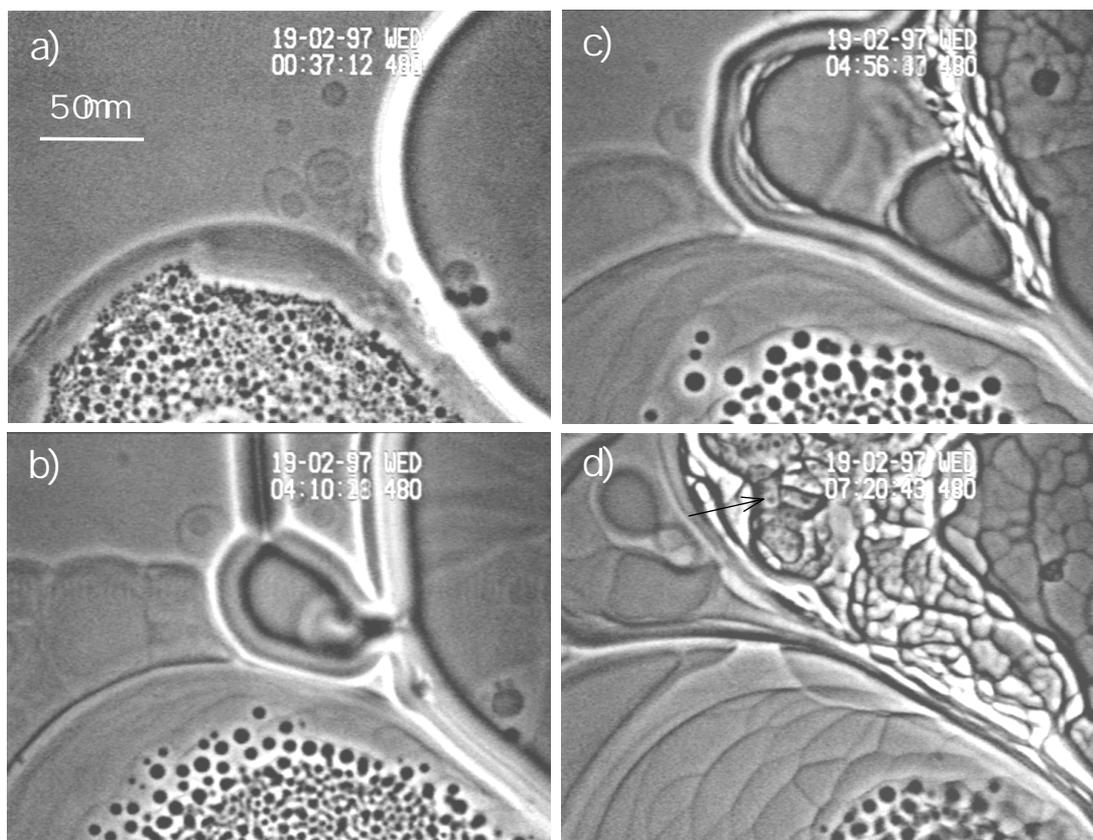
## 5.2 Optische Beobachtungen

### 5.2.1 Entstehung

Im System DGDG/Wasser/NaCl findet für Salzkonzentrationen zwischen  $5mM/l$  und  $100mM/l$  bei konstanter Temperatur eine spontane Bildung optisch isotroper Strukturen reproduzierbar in planen Mikroskopiekammern ( $30 - 80\mu m$  Höhe) statt (vgl. Kap.2.1.2). Sie setzt bei einer Quelltemperatur von  $50^\circ C$  innerhalb eines Zeitraumes von typischerweise  $12h$  bis  $48h$  nach der Präparation ein. Durch eine Absenkung der Temperatur können dunkle Körper zusätzlich zu vorhandenen oder neu ausgefällt werden. Da sowohl die spontane als auch die durch Abkühlen induzierte Entstehung optisch isotroper Strukturen eine gute Ausbeute besitzt, wurde die von Harbich et. al. eingeführte Inkubationsmethode [38] bei tiefen Temperaturen nicht angewendet.

Im folgenden gehen wir näher auf die zeitliche Entwicklung der örtlichen Verteilung isotroper Objekte in Bezug auf das Vielschichtsystem innerhalb der Probenkammer ein. Dabei werden sowohl die in Kap.4 referierten als auch die von Harbich et al. veröffentlichten [25] Ergebnisse zum Quellverhalten eines Vielschichtsystems berücksichtigt. Nach dem Einengen nimmt das Lipid eine Fläche in der Größenordnung von wenigen Prozent innerhalb der Kammer ein. Mit der Zugabe von Wasser bildet sich ein zusammenhängendes Vielschichtsystem heraus, das zunächst einen einheitlichen Membranabstand besitzt und im wesentlichen parallel zum Substrat ausgerichtet ist. Das Lipid wird beispielsweise in Form von Myelinzylindern in das umgebende Medium transportiert. Dieser Prozeß setzt sich während des Übergangs in den ungebundenen Zustand weiter fort, so daß das ausgedünnte Vielschichtsystem insgesamt eine größere Fläche als vorher einnimmt (Abb.5.3). Es entstehen z.T. ausgedehnte Bereiche konstanter mittlerer Lipiddichte, die nach Harbich et al. als sekundäre  $L_\alpha$ -Phase bezeichnet werden [25]. Dort sind die Membranen im wesentlichen parallel zum Substrat orientiert. Mehrere Gebiete unterschiedlicher Dichte können zu einem Zeitpunkt koexistieren [25] (Abb.5.3). In der Regel füllt das Quellsystem lateral die Kammer nicht vollständig aus, d.h. es besitzt einen äußeren Rand zur wässrigen Lösung. Seine Lipiddichte nimmt im Mittel zum Schwerpunkt der Verteilung hin zu.

Zunächst treten isotrope Objekte im Verlauf des Quellprozesses im ausgedünnten Vielschichtsystem auf, wobei sie in der Regel auf einige lokale Bereiche innerhalb der Probe beschränkt bleiben (Abb.5.3). Das Vielschichtsystem, in das die Objekte eingebettet sind, läßt sich nicht einheitlich charakterisieren. So können dunkle Körper schon zu einem Zeitpunkt auftreten, zu dem das Vielschichtsystem noch optisch ho-

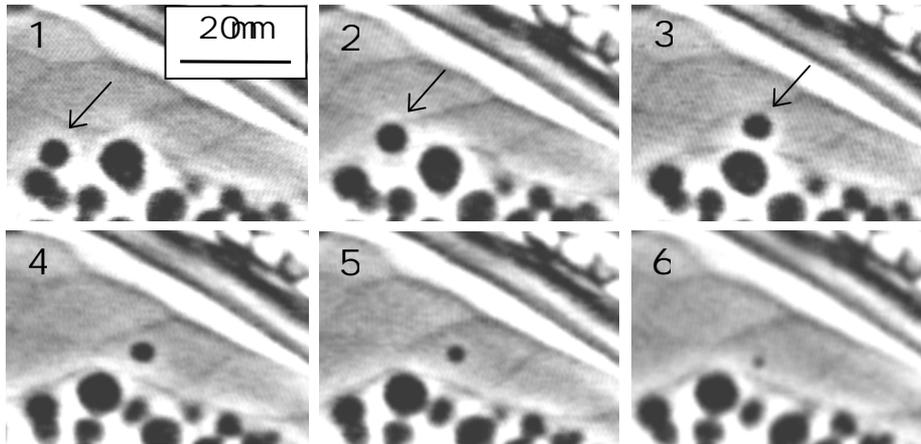


**Abbildung 5.3:** Zeitliche Entwicklung von zwei benachbarten Quellgebieten innerhalb einer Flachprobe am Rand zum Überschußwasser. Die Probe besteht aus DG DG (Spinat) in  $100mM$  NaCl-Lösung und wird seit der Präparation auf einer Temperatur von  $50^{\circ}C$  gehalten. Zwischen der Präparation und der ersten Aufnahme liegen  $32h$ . Der jeweilige Zeitpunkt der Aufnahme ist in Stunden:Minuten von a) bis d) 00:37, 04:12, 04:56, 07:20.

mogen aussieht, d.h. sich keine Membranverläufe abzeichnen (Abb.5.2a). Sie sind dann dicht an dicht in Feldern angeordnet und bewegen sich zwar um ihre Gleichgewichtslage, behalten jedoch ihre Position in Bezug auf ihre Nachbarn über längere Zeit bei. Andererseits sind dunkle Körper häufig in Membrantaschen eingeschlossen, wo sie frei diffundieren (Abb.5.1) oder befinden sich zwischen ungebundenen fluktuierenden Membranen (Abb.5.2b).

Später werden isotrope Objekte unter Umständen jedoch auch außerhalb der äußersten Membran zum Überschußwasser hin sichtbar (Abb.5.5). Größtenteils sind sie dann nicht mehr mit dem Vielschichtsystem verbunden und als Überbleibsel der isotropen Phase aufzufassen, nachdem die lamellare Phase aufgebraucht ist. In einigen Fällen wurde beobachtet, daß über Membranbrücken Material von der lamellaren in die isotrope Phase transportiert wird. Auf dieses Phänomen werden wir am Ende dieses Abschnitts näher eingehen.

In einigen Fällen bildet sich die lamellare Phase vollständig auf Kosten der isotropen Phase zurück. Es bleiben dann anstelle des Vielschichtsystems vereinzelt-



**Abbildung 5.4:** Durch Freisetzen eines dunklen Körpers in eine größere Adhäsionskammer (Bild 1-3) eingeleiteter Auflösungsprozeß (Bild 4-6). Die zeitliche Abfolge der Aufnahmen 1-6 entspricht  $t = 0s, 12s, 39s, 2min41s, 4min24s, 5min32s$ . Der Prozeß findet während des Ausdünnens des unteren Quellgebietes der in Abb.5.3 gezeigten Probe zum Zeitpunkt  $t = 06h : 09min$  statt, d.h. zwischen Teilbild c) und d).

te optisch isotrope Objekte zurück, die von wässriger Lösung umgeben sind (vgl. Kap.5.2.2). Auch diese lösen sich im Verlauf einiger Tage in eine optisch nicht sichtbare Phase auf. Mit dem Phasenkontrastmikroskop sind dann innerhalb eines Temperaturintervalls zwischen  $5^{\circ}C$  und  $65^{\circ}C$  keine Objekte mehr innerhalb der gesamten Probenkammer erkennbar. Das Lipid bildet demnach eine gelöste Phase mit einer mittleren Volumenkonzentration im Bereich von einem Prozent. Im Kapitel 5.2.2.1 kommen wir erneut auf diese Beobachtung zurück.

Während isotrope Objekte innerhalb des Vielschichtsystems kaum einen Durchmesser von  $15\mu m$  überschreiten und im Phasenkontrastbild, abgesehen vom Halo, homogen schwarz aussehen (Abb.5.1, 5.2), können sie in der wässrigen Lösung eine laterale Abmessung von mehreren  $100\mu m$  erreichen und nehmen, außer im Randbereich, einen homogenen Grauton an (Abb.5.5, 5.7, vgl. Kap.5.2.3).

Abb.5.3 zeigt die zeitliche Entwicklung von zwei benachbarten Quellgebieten am Rand zum Überschußwasser. Die Temperatur der Probe wird seit der Präparation konstant bei  $50^{\circ}C$  gehalten. Zwischen der ersten Aufnahme (Abb.5.3a) und der Präparation liegen  $32h$ . Während in dem einen Gebiet schon dunkle Körper entstanden sind, ist das andere noch weitgehend homogen (a). In den folgenden Aufnahmen ist zu erkennen, daß beide benachbarten Vielschichtsysteme eine größere Fläche einnehmen und dabei ausdünnen.

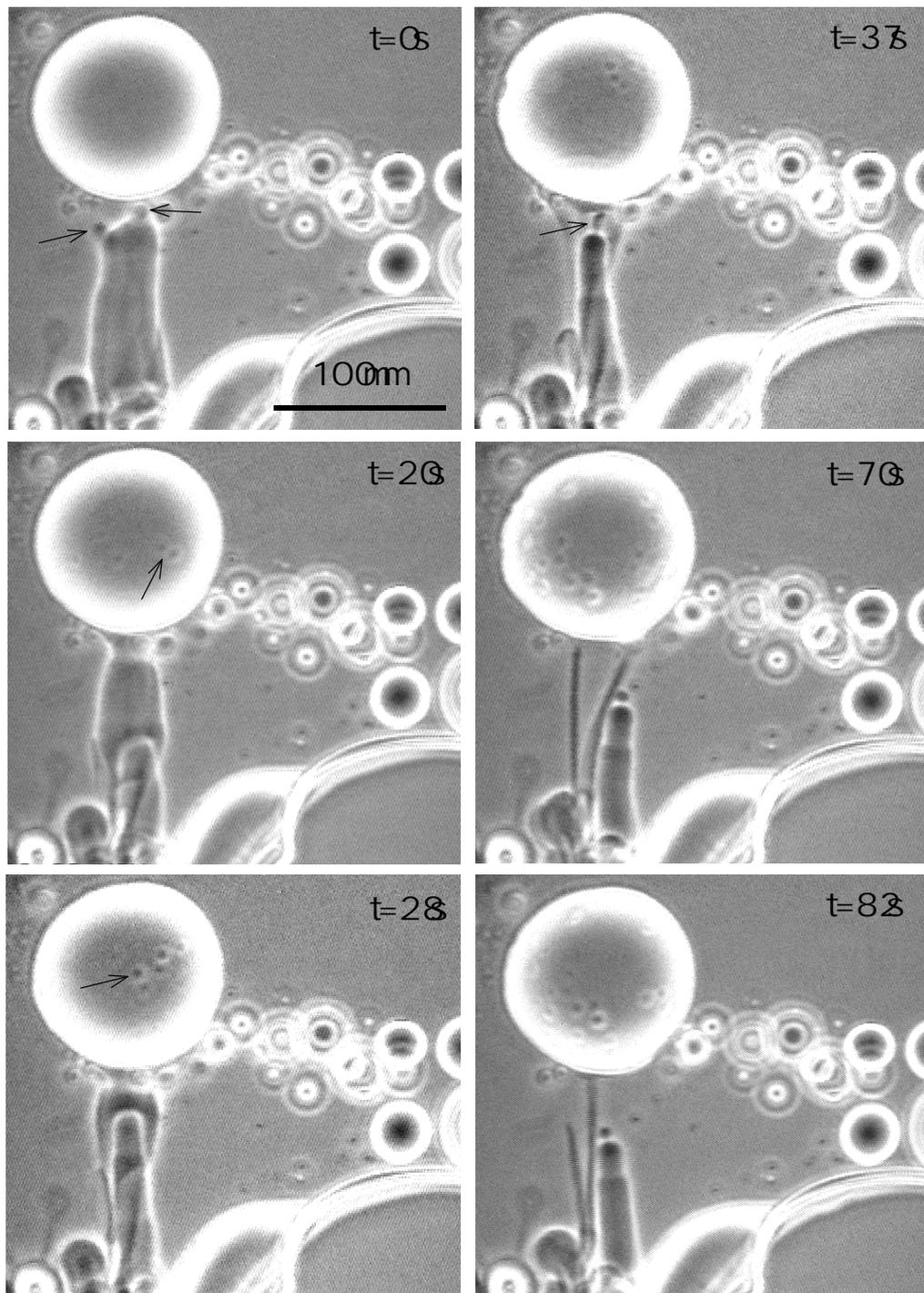
In dem ursprünglich homogenen System (Abb.5.3a, rechts außen) wird Lipid durch neu entstandene Quellstrukturen (b) ausverlagert. Im nächsten Schritt (c) findet eine Phasensegregation zwischen der lamellaren Phase und der wässrigen Lösung statt. In den Wassertaschen fallen daraufhin spontan dunkle Körper aus (siehe Markierung, d).

In dem anderen Quellgebiet (Abb.5.3a, Mitte unten) geht die Ausdünnung mit der Entstehung großer Wasserkammern einher. Gleichzeitig ist ein immer kleinerer

Bereich des Gebietes von dunklen Körpern durchsetzt. Es ist zudem erkennbar, daß die dunklen Körper im Außenbereich des Feldes vergleichsweise am größten sind. In den äußeren großen Kammern verschwinden sie vollends (d). Es wurde beobachtet, daß dunkle Körper sich auflösen, wenn ihre Adhäsionskammer beispielsweise durch Lösen eines adhäsiven Kontaktes mit einer Nachbarkammer zusammenwächst, die keinen dunklen Körper enthält (Abb.5.4). Daraus ist auf den Mechanismus zu schließen, der während des Ausdünnprozesses des Vielschichtsystems zu der Umverteilung der dunklen Körper führt. Durch Auflösen adhäsiver Kontakte nimmt die Größe der Wasserkammern stetig zu. Befindet sich in zuvor getrennten Kammern jeweils ein dunkler Körper, fusionieren sie, wobei sie sich vergrößern. Ist eine Kammer leer, gibt der vorhandene dunkle Körper Material an die Lösung in Form von disperser Phase ab. Die Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß dunkle Körper innerhalb einer Kammer nur dann ausfallen, wenn die disperse Phase eine Grenzkonzentration überschreitet. In diesem Bild sind beide Phasen als koexistierende Phasen aufzufassen, die bei einer gegebenen Temperatur jeweils eine definierte Dichte annehmen.

Abschließend beschreiben wir in diesem Abschnitt anhand eines Beispiels die Einverleibung von Membranstrukturen durch ein optisch isotropes Objekt. Die Probe ist zum Zeitpunkt der Beobachtung ca. 3 Tage alt und wird seit der Präparation auf  $50^{\circ}\text{C}$  gehalten. Das Objekt befindet sich außerhalb des gequollenen Vielschichtsystems, welches am unteren Bildrand anschließt (Abb.5.5). Es liegt mit der Unterseite auf dem Kammerboden auf und füllt die Höhe der Kammer ( $\approx 60 - 80\mu\text{m}$ ) nicht vollständig aus. Die dargestellte Bildfolge umfaßt nur einen kurzen Ausschnitt des Prozesses, der sich auf die beschriebene Art über einen Zeitraum von knapp 4 Stunden fortsetzt und in dessen Verlauf sich der Durchmesser des isotropen Objektes von  $\approx 70\mu\text{m}$  auf  $\approx 145\mu\text{m}$  mehr als verdoppelt.

Zunächst wird eine zylinderförmige Membranstruktur aus dem Gebiet des Vielschichtsystems bis an das isotrope Objekt herangezogen. Die Membranstruktur nähert sich dem isotropen Objekt auf direktem Wege und an seiner Spitze sind zwei Auswüchse (durch Pfeile markiert,  $t_0\text{s}$ ) erkennbar, die als Ausgangspunkt für die Verknüpfung zwischen beiden Objekten gedeutet werden. Als Brücke zwischen beiden Phasen innerhalb der wässrigen Lösung kommen sog. „Tether“ in Frage. Dies sind Membranzylinder mit einem z.T. submikroskopischen Durchmesser, die sehr große Längen überbrücken und häufig als Verbindung zwischen zwei vermeintlich getrennten Membranobjekten übrig bleiben können [158]. Sie sind in Lipidquellproben allgegenwärtig und dabei kaum sichtbar, so daß zur Gewährleistung der Trennung zweier Objekte ein Transfer in eine andere Kammer notwendig ist. Nachdem die sichtbare Membranstruktur das isotrope Objekt erreicht hat, bildet sich eine Kontaktfläche, von der aus sie einverleibt wird. Während die Struktur sukzessiv im isotropen Körper verschwindet, werden innerhalb des isotropen Objektes Inhomogenitäten sichtbar (einzelne Beispiele sind durch Pfeile markiert,  $t = 20\text{s}$ ,  $t = 28\text{s}$ ). Sie entstehen größtenteils im Bereich der Kontaktstelle, besitzen eine Lebensdauer zwischen  $10\text{s}$  und  $20\text{s}$  und können sich währenddessen vom Ursprungsort bis zu einem Objektradius ( $\approx 50\mu\text{m}$ ) fortbewegen. Ihrer Bewegung nach zu urteilen befinden sie sich nahe der Oberseite des Objektes. Zeitweise sind die Inhomogenitäten über das gesamte isotrope Objekt verteilt (z.B.  $t = 70$ ). Während Bereiche des ursprünglichen Zylinders inkorporiert werden, wird ein weiterer erkennbar, der den Abstand zum isotropen Körper innerhalb  $t = 0\text{s}$  und  $t = 37\text{s}$  überbrückt,



**Abbildung 5.5:** Optisch isotropes Objekt, welches über direkten Kontakt Membranstrukturen inkorporiert, die aus der lamellaren Phase hervorgehen. Bei dem Übergang in die isotrope Phase entstehen optische Inhomogenitäten ( $t = 20s$ ,  $t = 28s$ , Marke), die sich bis zum Verschwinden innerhalb von  $(10-20)s$  von ihrem Ausgangsort bis zu einem Objekt-radius ( $\approx 50\mu m$ ) fortbewegen können. Die Probe (DGDG(Spinat)/Wasser/ $10mMNaCl$ , Kammerhöhe:  $60-80\mu m$ ) wird seit der Präparation vor 3 Tagen konstant bei  $50^\circ C$  gehalten.

ihn jedoch nicht kontaktiert. Auch er besitzt eine Verjüngung an der Spitze (Marke in  $t = 37s$ ). Die beiden dünnen Zylinder, die ab  $t = 70s$  deutlich zu erkennen sind, werden als Überbleibsel des ersten Zylinders betrachtet. Über sie wird der Transport von Membranmaterial aus dem Vielschichtsystem noch solange aufrecht erhalten, bis einer ( $t = 82s$ ) nach dem anderen (nicht dargestellt,  $t = 105s$ ) den Kontakt verliert und dabei zurückschnellt.

### 5.2.1.1 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß im System DGDG/Wasser/NaCl die Entstehung isotroper Strukturen mit dem Ausdünnen des Vielschichtsystems bei konstanter Temperatur spontan erfolgt. Dabei wurden zwei Mechanismen beobachtet. Bei dem einen wird durch direkten Kontakt Material von lamellaren zu isotropen Objekten transportiert und daraufhin inkorporiert. Bei der anderen fallen dunkle Körper aus einer Lösung aus, ohne dabei sichtbaren Kontakt zur umgebenden lamellaren Phase herzustellen. Zumindest stellen dunkle Körper innerhalb der Adhäsionskammern keinen dauerhaften Kontakt zu den umgebenden Membranen her, was daran zu erkennen ist, daß sie frei diffundieren (vgl. Kap.5.2.4). Sind die dunklen Körper dichter innerhalb des Vielschichtsystems eingebettet (vgl. Abb.5.2a), ist mit mikroskopischen Mitteln nicht klärbar, ob sie die lamellare Phase durch direkten Kontakt aufzehren.

Wir diskutieren nun die Beobachtungen zur spontanen Entstehung und Rückbildung dunkler Körper im Vielschichtsystem (Abb.5.3) anhand der Hypothese, daß beim Ausdünnen der lamellaren Phase disperse Phase in Lösung geht, welche oberhalb einer definierten Konzentration mit dunklen Körpern koexistiert.

Mechanismen, die zur Bildung der gelösten Lipidphase führen, sind bislang unbekannt. Nach Harbich et al. treten dunkle Körper bei der Abkühlmethode vermehrt in der Umgebung von Schraubendislokationen im Vielschichtsystem auf [38]. Dies wurde als Hinweis gedeutet, daß die Defekte am Nukleationsvorgang der nicht-lamellaren Phase beteiligt sein können.

Es ist denkbar, daß die beobachtete Phasensegregation des zuvor homogenen Vielschichtsystems auf die Einlagerung disperser Phase zwischen die Membranen zurückgeht (Abb.5.3c). Kräfte, die dies bewirken können, sind von kolloidalen Systemen her bekannt. Sie beruhen darauf, daß gelöste Kolloide aus dem Bereich zwischen ausgedehnten Flächen verdrängt werden und werden daher als „depletion forces“ bezeichnet [75]. Zur Veranschaulichung der Wechselwirkung geben wir ein konkretes Beispiel.

Eine Ausdünnung nicht absorbierender gut löslicher Polymere aus dem Zwischenbereich benachbarter Membranen konnte von Evans et al. mit Mikropipettenversuchen zweifelsfrei belegt werden [159]. Mit zunehmender Volumenkonzentration von Dextran (0.01–0.1%) wurde ein deutlicher Anstieg der Haftungsenergie zwischen adhärierenden neutralen PC-Membranen in Salzlösung gemessen (0.01–0.2erg/cm<sup>2</sup>). Oberhalb einer kritischen Größe spielt dabei das Molekulargewicht des Polymers nur eine untergeordnete Rolle. Durch das Ausschließen der Polymere erfahren diese einen osmotischen Druck

$$P = \Delta\rho k_B T, \quad (5.1)$$

der proportional zur Konzentrationsdifferenz der Teilchenzahldichte  $\Delta\rho$  des Polymers in der Mittelebene zwischen den Membranen und der Überschußlösung ist. Die Adhäsionsenergie pro Fläche  $W$  kann aus (5.1) abgeschätzt werden, indem man  $P$  mit dem Radius  $R_P$  des Polymers multipliziert:  $W = P \cdot R_P$  [75].

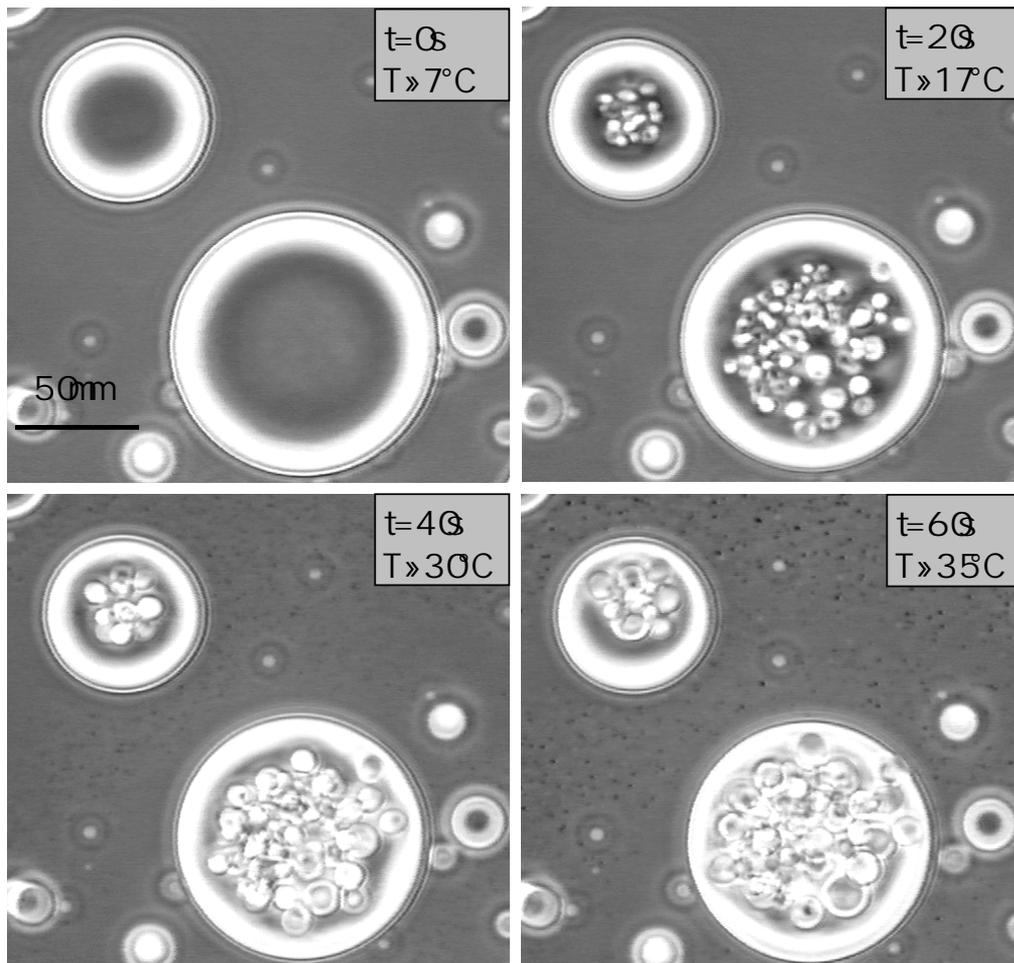
Nachdem die Phasensegregation eingetreten ist, sind die weiteren Beobachtungen mit folgender Beschreibung vereinbar: Die disperse Phase konzentriert sich innerhalb der Wassertaschen so lange auf, bis oberhalb einer Grenzkonzentration dunkle Körper ausfallen (Abb.5.3d). Da die Konzentration der gelösten Phase innerhalb des Vielschichtsystems größer ist als im Überschußwasser, entsteht ein osmotischer Druck. Dadurch ist das Eindringen von zusätzlichem Wasser in das Vielschichtsystem begünstigt. Wenn die Bildungsrate der dispersen Phase nicht ausreicht, um die Abnahme der Konzentration zu kompensieren, lösen sich die dunklen Körper wieder auf. Durch die Anwesenheit der abgeschlossenen Membrantaschen kann die Verdünnung – wie im letzten Kapitel geschildert (vgl. Abb.5.4) – stufenweise ablaufen.

Eine Eingrenzung des osmotischen Druckes  $P$  nach (5.1) für das gegebene System ist mit mehreren Unsicherheiten behaftet. Am unbekanntesten sind die Größenverteilung und die genaue Struktur der dispersen Phase (vgl. Kap.1, Abb.1.7). Wir nehmen vereinfachend an, daß eine Einheit aus 50 Membrankugeln zusammengesetzt ist, deren Radius jeweils  $10nm$  beträgt (Abb.1.7). Daraus läßt sich das Lipidvolumen  $V_L$  pro Einheit bestimmen. Nimmt man für die Lipidkonzentration  $K_L$  der gelösten Phase 1% an, ergibt sich für die Teilchenzahldichte  $\rho = K_L/V_L \approx 40/(\mu m)^3$ . Der Druck geht dann aus (5.1) zu  $P \approx 0.2Pa$  hervor.

### 5.2.2 Temperaturabhängiges Verhalten – kritischer Punkt?

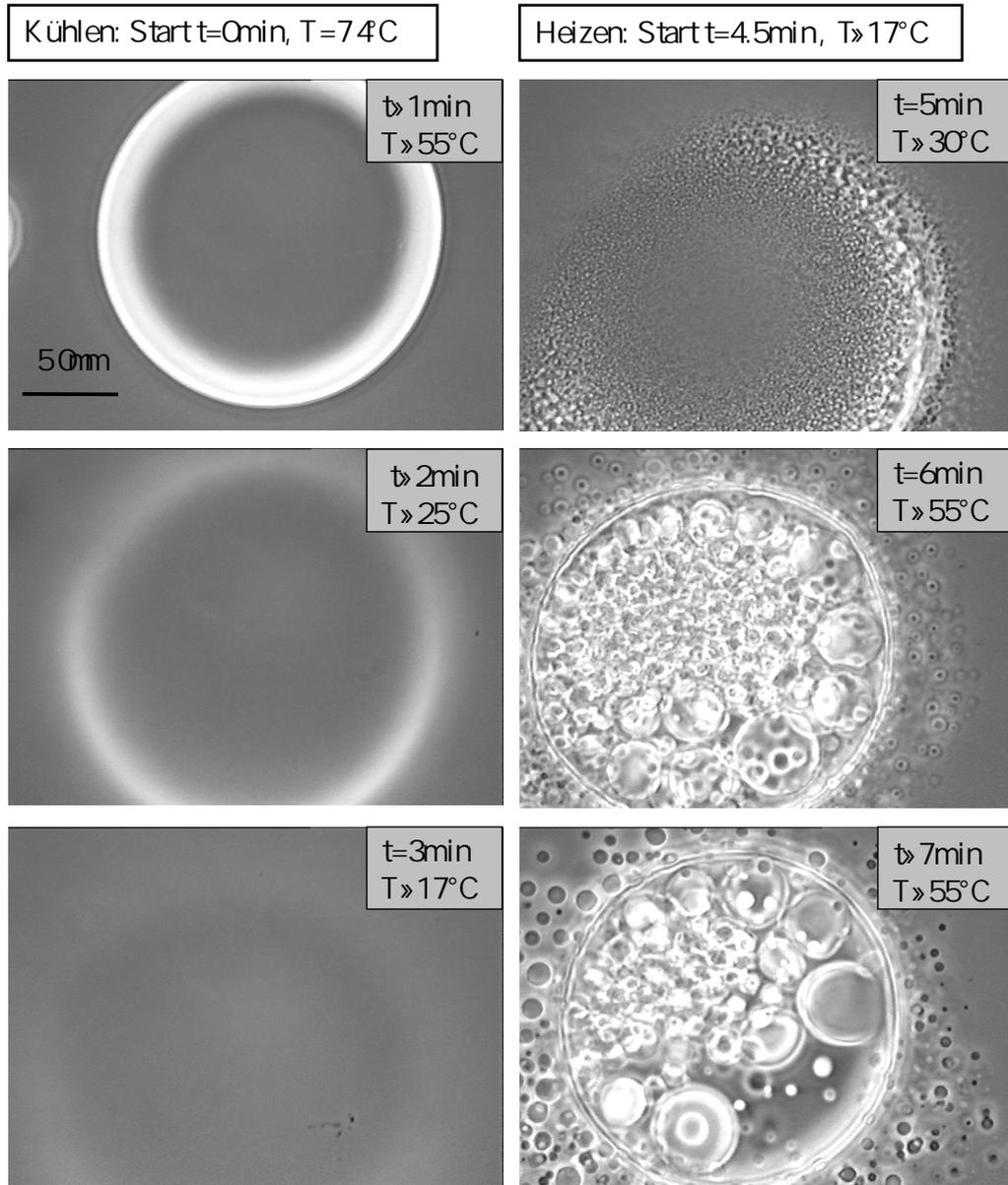
Im folgenden beschreiben wir Beobachtungen, die sich ausschließlich auf isotrope Objekte beziehen, die sich außerhalb des gequollenen Vielschichtsystems befinden und dem optischen Eindruck nach während des gesamten Zeitraums nicht mit der lamellaren Phase verbunden sind. Die Objekte besitzen laterale Abmessungen von bis zu einigen  $100\mu m$  und liegen unbeweglich auf dem Kammerboden. Sie gruppieren sich um den äußeren Rand des gequollenen Vielschichtsystems und besitzen in der Regel davon einen Abstand, der – ähnlich wie der zwischen zwei Nachbarn – einige Objektdurchmesser beträgt. Zwischen der Ansammlung isotroper Objekte und dem äußersten Rand der Kammer ist typischerweise ein Drittel der Kammerlänge Platz, das von wässriger Lösung ausgefüllt wird. Die temperaturabhängigen Untersuchungen wurden mit Proben durchgeführt, bei denen die Salzkonzentration der Lösung zwischen  $10mM$  und  $20mMNaCl$  beträgt. Zwei Mechanismen kommen für die spontane Entstehung der Objekte in Frage (vgl. Kap.5.2.1). Nach dem einen findet ein direkter Transport von Material aus der lamellaren Phase zu den Objekten über sichtbare Membranbrücken statt (Abb.5.5), während sich nach dem anderen isotrope Objekte innerhalb des Vielschichtsystems so lange aufkonzentrieren, bis es völlig aufgebraucht ist. Ein dritter Mechanismus wird durch Temperaturerhöhung eingeleitet. Darauf gehen wir im folgenden Absatz näher ein. Anschließend beschreiben wir eine durch Abkühlen eingeleitete Auflösung der Phasengrenze isotroper Objekte. Daraufhin wird an einem Beispiel gezeigt, wie sich eine Phasengrenze bei konstanter Temperatur auflöst. Im Diskussionskapitel folgt eine Eingrenzung, unter welchen

Bedingungen die beschriebenen Phänomene beobachtet werden.



**Abbildung 5.6:** Phasensegregation beim Heizen von  $7^{\circ}\text{C}$  auf  $35^{\circ}\text{C}$ . Innerhalb der isotropen Objekte bilden sich Taschen ausgedünnter Phase (ab  $t = 20\text{s}$ ), während in der Lösung dunkle Körper sichtbar werden. Probe (DGDG(Spinat)/Wasser/20mMNaCl, Kammerhöhe ca.  $80\mu\text{m}$ ) ca. 1h bei  $7^{\circ}\text{C}$  getempert.

Vor einer Zunahme der Temperatur (Abb.5.6,  $t = 0\text{s}$ ) ist die dichtere von der dünneren Phase deutlich getrennt. Sie bildet zusammenhängende Bereiche, die jeweils eine klare Grenze zur Lösung aufweisen. Die kleinen runden, unscharfen Objekte in Teilbild ( $t = 0\text{s}$ ) sind nicht im Fokus. Beim Heizen werden zunächst Inhomogenitäten innerhalb der isotropen Objekte erkennbar ( $t = 20\text{s}$ ). Sie werden als Hohlräume interpretiert, die weniger dicht sind als ihre Umgebung. Diese sog. „Löcher“ fusionieren, steigen nach oben auf und treten aus dem Objekt aus, indem sie in die äußere Lösung übergehen. Dort bilden sich neue, anfangs kleine Objekte ( $t = 40\text{s}$ ), die darin diffundieren, durch Fusion an Größe gewinnen ( $t = 60\text{s}$ ) und auf den Kammerboden absinken. Der Bereich, in dem innerhalb der Lösung neue Objekte ausfallen, umfaßt die gesamte Umgebung der ursprünglichen Objekte. In Abb.5.10 sind in der unteren Reihe isotrope Objekte erkennbar, die durch



**Abbildung 5.7:** Auflösen der Phasengrenze zwischen gelöster und kondensierter Phase durch Abkühlen von  $74^\circ\text{C}$  auf  $17^\circ\text{C}$  (linke Seite). Darauffolgendes Heizen führt zu einem erneuten Ausbilden der Phasengrenze sowie der in Abb.5.6 gezeigten Phasensegregation (rechte Seite). Vor dem Abkühlen wird die Probe (DGDG(Spinat)/Wasser/20mMNaCl, 3 Tage alt, Kammerhöhe ca.  $80\mu\text{m}$ ) ca. 1h bei  $74^\circ\text{C}$  getempert.

Temperaturerhöhung aus der Lösung ausgefällt werden (c) und sich innerhalb von 5min größtenteils auf dem Kammerboden angesammelt haben (d). Es ist auch eine Verschmelzung zwischen der neu ausgefallenen dichten Phase und der ursprünglichen beobachtet worden (nicht dargestellt).

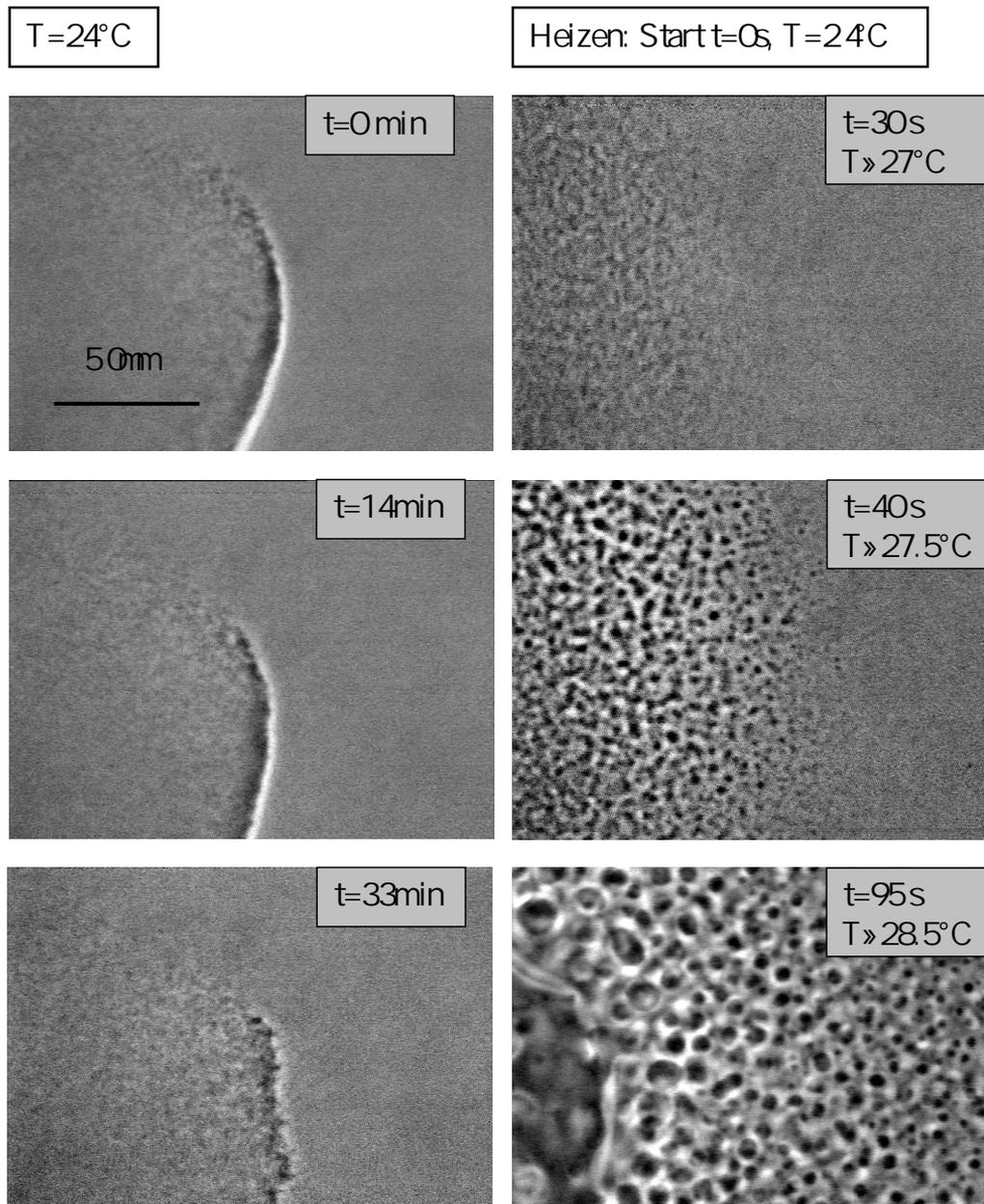
Zwei Schlüsse können aus den Beobachtungen gezogen werden: Zum einen liegen schon vor der Temperaturerhöhung zwei koexistierende Lipid-Phasen vor. Während

die eine als abgegrenztes isotropes Objekt optisch sichtbar ist, befindet sich die andere in Lösung. Sie kommt erst bei Erwärmung zum Vorschein. Auf diese Eigenschaften geht die zu Beginn des Kapitels 5.1 eingeführte Nomenklatur zurück, nämlich „gelöste Phase“ für die dünnere bzw. „kondensierte Phase“ für die dichtere. Zusätzlich sind diese Bezeichnungen durch die unterschiedliche Beweglichkeit kleiner Einschlüsse der komplementären Phase innerhalb der anderen motiviert. Während neu ausgefällte dichte Objekte eine starke Brownsche Bewegung zeigen, trifft dies auf dünne nicht zu (vgl. dazu Kap.5.2.4). Der andere Schluß bezieht sich auf die durch Temperaturerhöhung bewirkte Änderung der Dichte beider Phasen. Aus den beschriebenen Beobachtungen geht hervor, daß sich beim Erwärmen innerhalb getrennt vorliegender Phasen die jeweils komplementäre Phase ausbildet – es tritt eine Phasensegregation auf. Als Erklärung kommt folgender Mechanismus in Betracht. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkt, daß die Dichte der kondensierten Phase zunimmt, während die gelöste Phase ausdünt. Da sich die kondensierte Lipidphase aufkonzentriert, hinterläßt sie Löcher. Andererseits fällt die überschüssige Lipidmenge beim Ausdünnen der gelösten Phase in kondensierter Form aus.

Abb.5.7 zeigt ein isotropes Objekt, dessen Grenze sich durch Abkühlen von  $74^{\circ}\text{C}$  auf  $17^{\circ}\text{C}$  auflöst. Während sich die Grenze bei  $55^{\circ}\text{C}$  noch deutlich abzeichnet, ist der Übergang zur gelösten Phase bei  $25^{\circ}\text{C}$  nicht mehr klar definiert. Bei  $17^{\circ}\text{C}$  ist dann das Objekt kaum noch auszumachen. Durch die anschließende Erhöhung der Temperatur bildet sich die Phasengrenze erneut aus. Da die Lipiddichte an der ursprünglichen Position des isotropen Objektes noch deutlich größer ist als in der Umgebung, fusionieren die dort ausfallenden kleinen kondensierten Objekte schnell zu einem großen mit einer einheitlichen Grenze zur gelösten Phase. Die dunklen Linien am äußeren Rand innerhalb der letzten beiden Aufnahmen entstehen dadurch, daß die Mittelebene des Objektes nicht im Fokus liegt. Sie geben daher keinen Membranverlauf wider. Während des Aufheizens bilden sich innerhalb des kondensierten Objektes, wie schon weiter oben beschrieben, Kammern gelöster Phase aus, die sowohl untereinander als auch mit dem äußeren Medium fusionieren.

In einer weiteren Sequenz von Videoaufnahmen ist das Verschwinden der Phasengrenze bei konstant gehaltener Temperatur ( $24^{\circ}\text{C}$ ) zu sehen (Abb.5.8, linke Spalte). Die kondensierte Phase nimmt die linke Bildhälfte ein. Während im oberen Bildbereich der ersten Aufnahme kein deutlicher Übergang zwischen beiden Phasen erkennbar ist, zeichnet sich weiter unten noch eine Grenze ab. Dem Kontrast nach zu urteilen ist dort der Dichteunterschied zwischen beiden Phasen verhältnismäßig gering. In Kammern vergleichbarer Höhe zeigen isotrope Objekte dieser Größe am Rand häufig Kontrastumkehr. Die Grenze zwischen beiden Phasen zieht sich innerhalb der nächsten Aufnahmen ( $t = 14\text{min}$ ,  $t = 33\text{min}$ ) weiter nach unten zurück. Gleichzeitig wird ihr Verlauf undeutlicher und unregelmäßiger ( $t = 33\text{min}$ ). Sie ist ungefähr  $5\text{min}$  nach der Aufnahme nicht mehr zu erkennen. Nach weiteren  $10\text{min}$  sind jegliche Strukturen im Bildbereich verschwunden. Auf der Seite zur kondensierten Phase sind stellenweise im Verlauf der Videoaufnahmen wiederholt deutliche Änderungen des Kontrastes zu beobachten, welche als lokale Schwankungen der Lipiddichte interpretiert werden können.

Die  $40\text{min}$  nach der Aufnahme ( $t = 33\text{min}$ ) eingeleitete Temperaturerhöhung bewirkt, daß nach völligem Verschwinden der sichtbaren Strukturen an der Stelle erneut kondensierte Phase ausfällt (rechte Spalte). Die Konzentration des Lipids ist



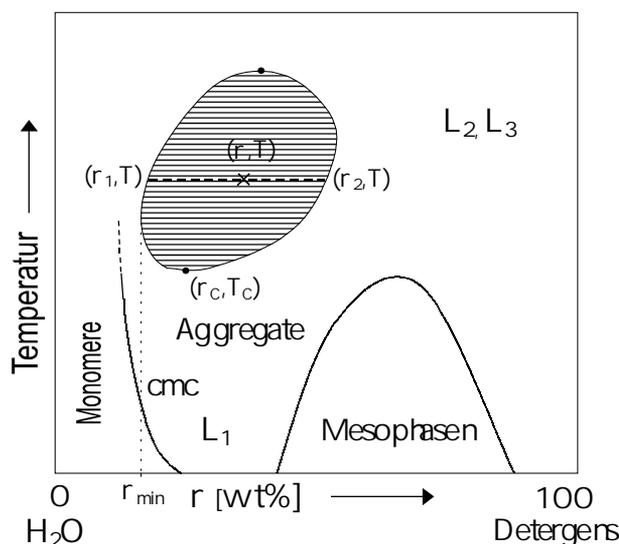
**Abbildung 5.8:** Auflösen der Phasengrenze zwischen gelöster und kondensierter Phase bei konstanter Temperatur ( $24^{\circ}\text{C}$ ) (linke Seite). Durch Heizen bildet sich die Phasengrenze neu aus und gleiche Phasen fusionieren (rechte Seite). Die Probe (DGDG(Schwarzwurz)/Wasser/ $10\text{mMNaCl}$ , Kammerhöhe ca.  $50\mu\text{m}$ ) wird vor der ersten Aufnahme seit ca.  $24\text{h}$  bei der Temperatur gehalten.

nach wie vor auf der linken Bildhälfte größer als auf der rechten. Darauf ist zurückzuführen, daß auf der linken Seite schon dunkle Strukturen erkennbar sind, während die rechte noch homogen aussieht ( $t = 30\text{s}$ ). Dementsprechend weiter fortgeschritten ist auch im letzten Bild ( $t = 90\text{s}$ ) der Fusionsprozeß der kondensierten Phase auf der linken Seite. Dort ist im unteren Bereich der Aufnahme eine durchgehende

Phasengrenze zu sehen. Allerdings ist das davon eingegrenzte Gebiet kondensierter Phase nicht homogen, sondern weist aufgehellte Bereiche auf. Eine endgültige Trennung beider Phasen ist dort also noch nicht vollzogen.

### 5.2.2.1 Diskussion

Die, wie oben beschrieben, durch Temperaturerhöhung eingeleitete Phasensegregation (vgl. Abb.5.6) gilt als der Prozeß, welcher uneingeschränkt in allen Proben beobachtet wurde. Zum Vergleich gehen wir im folgenden näher auf das Phasendiagramm eines Systems ein, welches in Bereichen eine Koexistenz einer dichten mit einer verdünnten Phase amphiphiler Moleküle in Lösung aufweist (Abb.5.9). Es handelt sich um das System  $C_iE_j/H_2O$ , wobei  $C_iE_j$  (n-Alkyl Polyoxyethylen-Ether) ein anionisches Tensid variabler Länge ( $C_i$ ,  $i = 10 - 12$ ) und Kopfgruppengröße ( $E_j$ ,  $j = 4 - 6$ ) ist. Eine schematische Darstellung des vereinfachten Phasendiagramms ist in Abb.5.9 gegeben (nach Strey, [160]).



**Abbildung 5.9:** Schematische, vereinfachte Darstellung des Phasendiagramms des Systems  $C_iE_j/H_2O$  (nach Strey, [160]). Erläuterungen stehen im Text.

Oberhalb einer kritischen Konzentration („cmc“) schließen sich die Monomere des Detergens zu Aggregaten zusammen. Diese bilden bei geringen Konzentrationen eine isotrope mizellare Phase („ $L_1$ “) [160]. Mesophasen, wie beispielsweise  $L_\alpha$ , treten bei größeren Konzentrationen auf. Die geordneten Phasen gehen bei höheren Temperaturen in eine ungeordnete bikontinuierliche Phase („ $L_2$ “ oder „ $L_3$ “) über [160]. Ein detaillierteres Phasendiagramm für  $C_{12}E_5$  findet man z.B. in [154].

Unsere Aufmerksamkeit gilt besonders der schraffierten Fläche in Abb.5.9. Sie entspricht einem verbotenen Bereich innerhalb des Phasendiagramms. Anstelle des in Abb.5.9 eingezeichneten Zustandes mit einer Dichte  $\rho$  bei gegebener Temperatur  $T$  nimmt das System einen Zustand größerer Dichte  $\rho_2$  und einer geringeren Dichte  $\rho_1$  an, welche miteinander koexistieren. Mit sinkender Temperatur nimmt der Dichteunterschied zwischen beiden Phasen ab, bis er am kritischen Punkt ( $\rho_C, T_C$ ) Null ist.

Für das System  $C_iE_j/H_2O$  beträgt die kritische Dichte ungefähr einen Gewichtsprozent [160]. Der obere kritische Punkt liegt gewöhnlich oberhalb der Siedetemperatur von Wasser.

Die beobachtete Phasensegregation (Abb.5.6) und das Auflösen der Phasengrenze beim Abkühlen (Abb.5.7) sowie bei konstanten tiefen Temperaturen (Abb.5.8) lassen den Schluß zu, daß das System DGDG/ $H_2O$ /NaCl ein Phasendiagramm besitzt, welches durch eine Entmischungszone charakterisierbar ist (vgl. Abb.5.9). Der Koexistenzbereich beider Phasen wird durch einen unteren kritischen Punkt bei  $T_C \approx 25^\circ C$  begrenzt. Optische Eindrücke alleine sind indessen nicht ausreichend, um diese Behauptung zweifelsfrei zu beweisen. Zum einen ist eine Bestimmung der Lipiddichte notwendig, um den Verlauf der Randkurve der Entmischungszone zu bestimmen. Zum anderen kann der kritische Punkt nur anhand der dort erwarteten Systemeigenschaften wie Zunahme der Dichtefluktuationen oder Auftreten langreichweitiger Perkolationen nachgewiesen werden (s. z.B. [161]).

Eine Interpretation der Beobachtungen wird zusätzlich dadurch erschwert, daß sich die untersuchten Proben nicht einheitlich verhalten. Nicht alle isotropen Objekte innerhalb einer Probe lösen sich durch Abkühlen auf. In einigen Fällen verschwinden sie auch dann nicht, wenn die Probe mehrere Stunden bei tiefen Temperaturen gehalten wird (z.B.  $7^\circ C$ , Abb.5.6). Genausowenig verhalten sich alle sichtbaren isotropen Objekte innerhalb der Probe so wie das in Abb.5.8 gezeigte Beispiel. Viele behalten ihre Phasengrenze weiter bei, während sich andere auflösen. Das Phasenverhalten isotroper Objekte ist daher innerhalb einer Probe unterschiedlich.

Ein Anhaltspunkt für das abweichende Verhalten isotroper Objekte innerhalb einer Probe wird in ihrem unterschiedlichen Alter seit ihrer Entstehung vermutet. Während gerade aus der Lösung ausgefällte Objekte durch Abkühlen ausnahmslos reversibel auflösbar sind, trifft dies auf mehrere Stunden alte Objekte nicht ohne weiteres zu. Viele behalten ihre Phasengrenze beim Abkühlen unterhalb des kritischen Punktes bei. Eine vergleichbare Beobachtung wurde von Harbich et al. im System EYPC/Wasser gemacht [38]. Während durch Abkühlung ausgefällte dunkle Körper (vgl. Kap.5.1) durch anschließendes Erwärmen oberhalb der Entstehungstemperatur  $T_E$  wieder aufgelöst werden können, ist dies nach einer Inkubationszeit von einigen Stunden nicht mehr möglich. Die Temperatur muß dann deutlich höher als  $T_E$  gewählt werden.

Ein weiterer Grund für das vielfältige Verhalten ist vermutlich die inhomogene Lipiddichte innerhalb der Probe. Da in den Randbereichen eine geringere Lipidkonzentration zu erwarten ist als in der Umgebung isotroper Objekte (vgl. Beginn von Kap.5.2), ist mit einem Ausdünnen der gelösten Phase im Bereich der Objekte zu rechnen. Eine Abnahme der Lipidkonzentration in der Umgebung der kondensierten Phase bewirkt, daß diese solange abgebaut wird, bis das Gleichgewicht mit der gelösten Phase wiederhergestellt ist. Dabei sollte die Phasengrenze weitgehend erhalten bleiben, sofern sich das System nicht in der Nähe des kritischen Punktes befindet. Dies wurde am Beispiel eines dunklen Körpers gezeigt, der beim Zusammenwachsen benachbarter Adhäsionskammern in eine Umgebung geringerer Lipiddichte überführt wird und sich unter Beibehaltung seiner Phasengrenze auflöst (Kap.5.2.1, Abb.5.4).

In vielen Fällen wird unabhängig von der Temperatur eine vollständige, irreversible Rückbildung aller kondensierter Objekte innerhalb einer Probe beobachtet

(Kap.5.2.2). Wenn die mittlere Lipidkonzentration innerhalb der Probe geringer ist als die kleinstmögliche Dichte  $\rho_{min}$  der koexistierenden gelösten Phase (Abb.5.9), ist zu erwarten, daß sich alle kondensierten Objekte unabhängig von der Temperatur auf Kosten der gelösten Phase zurückbilden. Die untere Grenze für  $\rho_{min}$  entspricht dann der Lipidkonzentration innerhalb der Kammer ( $\approx 0.5\%$ , vgl. Kap.2.1.2).

### 5.2.3 Abschätzung der Lipidkonzentration

Mit Hilfe des Phasenkontrastes ist eine Eingrenzung der Lipidkonzentration optisch isotroper homogener Strukturen möglich. Der Schwerpunkt der angewandten Methode besteht weniger in einer systematischen Bestimmung der Dichte z.B. in Abhängigkeit von der Temperatur als eher in einer grundsätzlichen Einschätzung, wie groß sie im Vergleich zu anderen bekannten Lipidstrukturen ist und ob sie innerhalb einer Probe unterschiedliche Werte annehmen kann. Die hier verwendeten Begriffe der Phasenkontrastmikroskopie werden in Kap.2.2.1 näher erläutert.

Einem Phasenhub von  $\Delta\varphi$  zwischen dem Objekt und der Umgebung entspricht eine optische Weglängendifferenz  $\Delta L_{opt}$ , die durch

$$\Delta L_{opt} = \Delta L \bar{\Delta n} = \frac{\lambda \Delta\varphi}{2\pi} \quad (5.2)$$

gegeben ist, worin  $\Delta L$  für die durch das Objekt zurückgelegte Wegstrecke und  $\bar{\Delta n} = \bar{n}_O - \bar{n}_U$  für den Unterschied des mittleren Brechungsindex zwischen Objekt und Medium steht. Der mittlere Brechungsindex  $\bar{n}$  einer Membranstruktur wird als eine Mittelung des Volumenanteils des Lipids  $K_L$  und des Wassers  $K_W = 1 - K_L$  angenommen:  $\bar{n} = K_L \cdot n_L + K_W \cdot n_W$ , wobei  $n_L$  und  $n_W$  die entsprechenden Brechungsindices sind. Der Unterschied des Brechungsindex zwischen Objekt und Umgebung ist dementsprechend durch

$$\begin{aligned} \bar{\Delta n} &= K_{LO} \cdot n_L - K_{WO} \cdot n_W - (K_{LU} \cdot n_L - K_{WU} \cdot n_W) \\ &= (K_{LO} - K_{LU})(n_L - n_W) = \Delta K_L \Delta n \end{aligned} \quad (5.3)$$

gegeben, wobei der Index  $O$  bzw.  $U$  für das Objekt bzw. die Umgebung steht und  $\Delta n$  den Unterschied des Brechungsindex zwischen Lipidmembranen und Wasser bezeichnet. Aus (5.2) und (5.3) läßt sich der Unterschied der Volumenkonzentration des Lipids im Objekt und der Umgebung durch

$$\Delta K_L = \frac{\lambda \Delta\varphi}{2\pi \Delta n \Delta L} \quad (5.4)$$

bestimmen. Die mittlere Wellenlänge des weißen Lichtes beträgt  $\lambda = 550nm$ , der Unterschied des Brechungsindex für Lipid und Wasser  $\Delta n = 1.55 - 1.33 = 0.22$  [45][46]. Der Brechungsindex von 1.55 entspricht dem von Eilecithin bei  $30^\circ C$ , welches eine vergleichbare Zusammensetzung der Ketten aufweist wie DGDG. Der Beitrag des Salzes zum Brechungsindex des Wassers  $n_W$  kann genauso vernachlässigt werden wie der Einfluß der Temperatur. Eine Konzentration von  $100mM$  NaCl bewirkt bei  $25^\circ C$  eine Zunahme von  $n_W$  um 0.01 [162], während  $n_W$  zwischen  $20^\circ C$  und  $50^\circ C$  um 0.01 abnimmt [46]. Bei Kontrastumkehr beträgt die Phasendifferenz  $\Delta\varphi = 48.2^\circ$ .

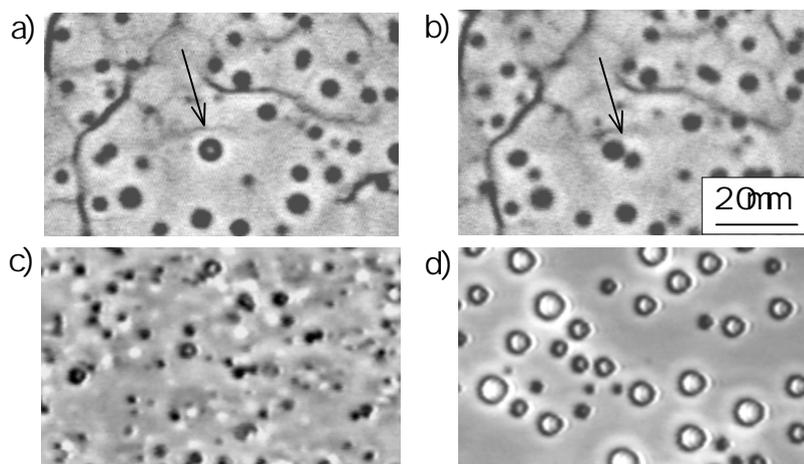
Methode	$T[^\circ C]$	$\Delta L[\mu m]$	$\Delta K_L$ [vol%]
Ausfällen	41	3.3	$\approx 10.1$
Ausfällen	44	3	$\approx 10.2$
Ausfällen	57	2.2	$\approx 15$
Superposition	22	5.2	$> 6.5$
Superposition	22	5.5	$> 6.1$
Superposition	22	5.0	$> 6.7$
Superposition	22	4.9	$> 6.8$
Superposition	22	4.5	$< 7.5$
Superposition	23	3.9	$> 8.7$
Superposition	45	3.6	$> 9.3$

**Tabelle 5.1:** Durch Kontrastumkehr bestimmter Unterschied der Volumenkonzentration des Lipids im isotropen Objekt und der Umgebung. Nach der ersten Methode werden isotrope Objekte durch Temperaturerhöhung in der Lösung ausgefällt und der Radius  $r$  bestimmt, oberhalb dem sie sich aufhellen. Die maximale Weglänge des Lichtes durch das Objekt beträgt  $\Delta L = 2r$ . Nach der zweiten Methode wurde bei der Superposition zweier Objekte festgestellt, ob Kontrastumkehr auftritt. In diesem Fall steht  $\Delta L$  für die Summe beider Radien.

Es werden ausschließlich isotrope Objekte ausgewählt, die eine definierte Geometrie besitzen, so daß die Bestimmung der Durchtrittslänge des Lichtes am Ort der Kontrastumkehr möglich ist. Als solche kommen kugelförmige Objekte in Frage, die entweder temperaturinduziert in der Lösung ausgefällt werden können oder als dunkle Körper mit der ausgedünnten lamellaren Phase koexistieren. Die ausgewählten Objekte besitzen einen geringeren Radius als  $3\mu m$ , so daß die Abbildung nach der in Kap.2.2.1 eingeführten Definition als objekt-treu bezeichnet werden kann. Damit ist sichergestellt, daß die beobachtete Aufhellung in der Mitte der Objekte nicht auf deren laterale Ausdehnung zurückgeht. Die Tiefenschärfe der eingesetzten Objektiv (LD20x, LD32x) ist mit  $16\mu m$  bzw.  $10\mu m$  (Tab.2.1) größer als die Ausdehnung der Objekte längs der optischen Achse.

Die frisch ausgefällten Objekte sind anfangs sehr klein und wachsen durch Fusion an, so daß im Laufe der Zeit die mittlere Größe innerhalb der Verteilung zunimmt (Abb.5.10c). Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, den Radius zu bestimmen, oberhalb dem die Objekte Kontrastumkehr zeigen. Der Mindestradius wurde für drei unterschiedliche Verteilungen ermittelt (Tab.5.1).

In einer zweiten Methode wird die Kontrastumkehr ausgenutzt, die bei der Überlagerung zweier Objekte auftritt. Abb.5.10a zeigt zwei dunkle Körper innerhalb eines ausgedünnten Vielschichtsystems, die sich zentral überdecken (Marke). Dadurch ist die Mitte des sichtbaren Objektes kurzzeitig aufgehellt. Nach einem Zeitraum von  $6.5min$  haben sich beide Objekte durch Diffusion soweit voneinander entfernt, daß sie getrennt sichtbar werden (Abb.5.10a). Zu einem späteren Zeitpunkt ist auch das zuvor verdeckte Objekt in den Fokus gewandert, so daß sein Radius bestimmt werden kann. Im Gegensatz zu der anderen Methode ist jedoch eine Eingrenzung der Durchtrittslänge, oberhalb der Kontrastumkehr auftritt, nicht so genau möglich. Wenn sich die überlagerten Objekte aufhellen, entspricht der berechnete Wert für



**Abbildung 5.10:** Einsetzen von Kontrastumkehr durch Überlagerung ((a), Markierung) sonst dunkler isotroper Objekte ((b), 6.5min nach a), Marke) oder durch Erhöhung der Temperatur von  $23^{\circ}\text{C}$  auf  $44^{\circ}\text{C}$  induziertes Ausfällen (c) aus der Lösung und darauffolgende Fusion und Absinken auf den Kammerboden (d). Zwischen der Aufnahme (c) und (d) vergehen  $\approx 5\text{min}$ , und die Bildausschnitte stimmen nicht überein. In beiden Fällen kann aus der Weglänge des Lichtes durch das Objekt der Konzentrationsunterschied des Lipids zwischen dem Objekt und der Lösung abgeschätzt werden (vgl. Tab.5.1).

$\Delta K_L$  einer Abschätzung nach unten (Tab.5.1), andernfalls einer nach oben.

Wie weiter oben beschrieben, kann bei gegebener Größenverteilung von ausgefallenen kugelförmigen isotropen Objekten die Abmessung eindeutig bestimmt werden, ab der Kontrastumkehr auftritt. Es kommen weder wesentlich größere Objekte vor, die keine Umkehr zeigen, noch kleinere, die hell sind. Daher erwarten wir, daß die isotropen Objekte innerhalb begrenzter Bereiche der Probe zu einem gegebenen Zeitpunkt einen einheitlichen Wert für  $\Delta K_L$  besitzen. Dies trifft auch auf dunkle Körper in Membrantaschen zu. Solange sie sich nicht überlagern, sind sie ausnahmslos bis zu einem Radius von  $15\mu\text{m}$  homogen schwarz. Erst wenn die Gesamtdicke von superponierten Objekten einen Grenzwert überschreitet, findet Kontrastumkehr statt. Auch bei ihnen gehen wir daher von einem definierten Wert für  $\Delta K_L$  aus. Dies wurde schon an anderer Stelle aus der spontanen Entstehung und Rückbildung dunkler Körper im ausgedünnten Vielschichtsystem geschlossen (Kap.5.2.1). Einzelne dunkle Körper in Membrantaschen zeigen innerhalb des eingestellten Temperaturbereichs bis zu  $55^{\circ}\text{C}$  im Gegensatz zu den außerhalb des Vielschichtsystems ausgefallenen isotropen Objekten bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. innerhalb einer Kammer) keine Kontrastumkehr. Optisch isotrope homogene Objekte im System DGDG/Wasser/NaCl besitzen daher bei vorgegebener Temperatur nur innerhalb begrenzter Bereiche einer Probe einen einheitlichen Wert für  $\Delta K_L$ .

Eine einfache Überlegung erlaubt eine Abschätzung der Lipidkonzentration der koexistierenden gelösten Phase. Adhäsionstaschen, die einen dunklen Körper enthalten und sich an der äußersten Grenze des Vielschichtsystems befinden, unterscheiden sich optisch nicht von solchen, die weiter innen liegen. Diese Beobachtung trifft auch zu, wenn außerhalb des Vielschichtsystems keine isotropen Objekte sichtbar sind und

zu erwarten ist, daß dort die Lipidkonzentration verschwindend gering ist. Würde zwischen der Lösung innerhalb und außerhalb der Adhäsionstasche ein vergleichbarer Unterschied in der Lipidkonzentration vorherrschen wie zwischen der gelösten und der kondensierten Phase, dann sollte die Adhäsionstasche abgesehen von den umgebenden Membranen einen ähnlichen optischen Eindruck vermitteln wie ausgedehnte isotrope Objekte in Lösung. Da dies nicht einmal im Ansatz gegeben ist, gehen wir davon aus, daß die Konzentrationsdifferenz des Lipids in beiden Lösungen verglichen mit der zwischen gelöster und kondensierter Phase geringfügig ist. Als untere Grenze für die Lipidkonzentration der koexistierenden gelösten Phase kann nach den Ausführungen in Kap.5.2.2.1 ein Wert von  $\approx 0.5\%$  angenommen werden.

### 5.2.3.1 Diskussion

Nach den obigen Erwägungen gehen wir davon aus, daß die Lipidkonzentration der kondensierten Phase  $K_K$  kaum größer ist als die im vorherigen Abschnitt bestimmte Differenz  $\Delta K_L$  zur gelösten Phase (Tab.5.1). Für die Lipidkonzentration der isotropen Objekte ergeben sich somit Werte zwischen  $6\text{vol}\%$  und  $15\text{vol}\%$ . Die Untersuchungen der Lipiddichte sind zu unsystematisch, um einen Grund für die große Spanne zwischen dem kleinsten und größten Wert angeben zu können. Zwar legen die Meßwerte in Tab.5.1 einen Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Konzentration nahe, doch wurde die Superpositionsmethode nicht auf dunkle Körper in Adhäsionstaschen bei hohen Temperaturen angewendet. Wie im letzten Abschnitt ausgeführt, zeigen sie im Unterschied zu neu ausgefällten isotropen Objekten vergleichbarer Größe bei derselben Temperatur keine Kontrastumkehr. Die Dichte isotroper Objekte im System DGDG/Wasser/NaCl ist daher nicht alleine durch die Temperatur vorgegeben. Während die durch Kontrastumkehr bestimmten Werte für  $K_K$  in der Relation zueinander gültig sind, ist die Ungenauigkeit der Einzelwerte schwer einzuschätzen. Einen Beitrag liefert der Fehler des Radius, der sich auf  $10\% - 20\%$  des gemessenen Wertes abschätzen läßt. Schlecht zu beurteilen ist der Beitrag zur Aufhellung des Objektes, der durch dessen laterale Ausdehnung zustande kommt („Objektuntreue“, vgl. Kap.2.2.1) und bewirkt, daß  $K_K$  zu groß eingeschätzt wird. Eine weitere Unsicherheit kommt dadurch zustande, daß die Kontrastumkehr qualitativ festgestellt wird.

Abschließend vergleichen wir die Werte für  $K_K$  mit der Lipidkonzentration anderer optisch isotroper Strukturen. Kubische Phasen weisen mit  $50\text{wt}\%$  für das System DOPE/Wasser [163] bzw.  $33\text{wt}\%$  für DOPE-Me<sup>2</sup>/Wasser/100mMNaCl [14] eine deutlich höhere Dichte auf<sup>3</sup> [15]. Zur Ergänzung geben wir den Lipidanteil in der homogen hydratisierten lamellaren Phase von DOPC in Wasser an. Er beträgt bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und  $P = 1\text{atm}$   $55\text{vol}\%$  [42].

Isotrope Objekte mit einer hohen Lipidkonzentration ( $\approx 30\%$ ) wurden gelegentlich für POPC bzw. EYPC in Überschußwasser gefunden [164]. Sie bilden sich innerhalb von weniger als  $1\text{s}$  beim Kollaps von Vesikeln. Ihre große Dichte deutet auf eine kubische Struktur hin [164].

Um einen Eindruck der Volumenkonzentration amphiphiler Moleküle für bekannte

<sup>2</sup>Einfach methyliertes DOPE

<sup>3</sup>Die Dichte dieser Lipidmembranen ist mit der von Wasser ( $\approx 1\text{g}/\text{cm}^3$ ) vergleichbar, so daß  $\text{wt}\%$  durch  $\text{vol}\%$  ersetzt werden kann.

ungeordnete isotrope Phasen zu gewinnen, geben wir im folgenden Werte für das in Kap.5.2.2.1 vorgestellte binäre System  $C_{12}E_5$ /Wasser an (vgl. Abb.5.9). Eine vielfach verknüpfte Schwammphase ( $L_3$ ) kann in Abhängigkeit von der Temperatur Konzentrationen zwischen einem und ca. 20 Volumenprozent annehmen [160][154].

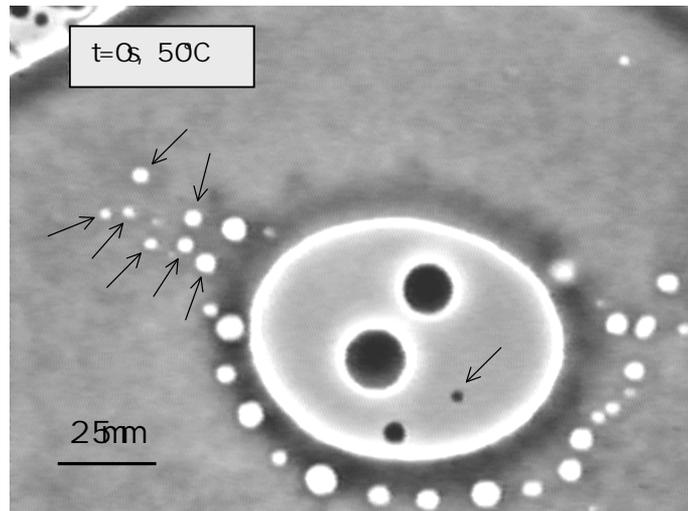
#### 5.2.4 Abschätzung der Viskosität

In diesem Kapitel wird durch die Untersuchung der Brownschen Bewegung von Sonden innerhalb der kondensierten optisch isotropen Phase und der dispersen Phase deren Viskosität abgeschätzt. Vor allem im Hinblick auf die disperse Phase eröffnet sich dadurch die Möglichkeit festzustellen, ob sie vernetzt ist. Als Sonde der jeweiligen Phase kommt deren komplementäre Phase in Betracht, die zum Beispiel durch Temperaturerhöhung entsteht (Kap.5.2.2). Die Auswahl der Sonde erfolgt nach folgenden Kriterien:

- Sie ist möglichst klein und dabei jedoch ausmeßbar. Somit kommen Objekte in Betracht, die einen Radius im Bereich von einem  $\mu m$  besitzen.
- Sie bewegt sich ungehindert.
- Sie ist über einen ausreichend langen Zeitraum zu beobachten.

Die genannten Bedingungen sind für die disperse Phase innerhalb von Membrantaschen gut erfüllt, wenn die darin enthaltenen dunklen Körper klein gegenüber der Ausdehnung der Taschen sind. Die durch Temperaturerhöhung induzierten Löcher innerhalb kondensierter isotroper Objekte liegen allerdings zu dicht, so daß die optische Qualität zur Beobachtung einzelner Objekte nicht ausreicht. Außerdem fusionieren sie ab dem Zeitpunkt ihrer Entstehung (Kap.5.2.2). Daher wurde es vorgezogen, durch mechanische Einwirkung „Löcher“, d.h. Einschlüsse gelöster Phase, in dem kondensierten Objekt zu erzeugen. Ein geeignetes Objekt füllt die Kammer der Höhe nach aus. Dort wird das Deckglas lokal bis auf den Kammerboden durchgedrückt, so daß sich das Objekt aufteilt. Läßt man das Deckglas zurückschnellen, entstehen bei der Fusion unter Umständen stellenweise Löcher. Abb.5.11 zeigt ein wie beschrieben behandeltes kondensiertes Objekt. Oben links ist sein äußerer Rand erkennbar. In der Mitte hat sich ein großes Loch gebildet, in dem sich 4 unterschiedlich große dunkle Körper befinden. Der kleinste besitzt einen Durchmesser von ca.  $1.3\mu m$  und ist daher als Sonde für die disperse Phase geeignet (s. Marke). Die hellen runden Punkte sind Einschlüsse disperser Phase im kondensierten Objekt. Sie bilden sich nach ihrer Entstehung vorwiegend zurück, indem sie von den Rändern mit dichter Phase aufgefüllt werden. Löcher mit einem anfänglichen Radius von  $r \approx 1\mu m$  sind nach ungefähr einer Minute verschwunden. Alternativ stülpen sie sich auch nach außen aus, d.h. sie fusionieren mit dem äußeren Medium. Dicht benachbarte Löcher können auch fusionieren.

Zur Analyse der Diffusion in der kondensierten Phase wurden die in Abb.5.11 markierten Löcher ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, daß sie keinen nahen Nachbarn besitzen und weit genug vom Rand entfernt sind. Da die Brownsche Bewegung der Löcher innerhalb der optisch isotropen Phase kaum erkennbar ist, wurde die Änderung des Ortes in Bezug auf den jeweiligen Schwerpunkt ausgewertet. Dadurch ist gewährleistet, daß kollektive Driftbewegungen innerhalb der Kammer



**Abbildung 5.11:** Videomikroskopische Phasenkontrastaufnahme eines optisch isotropen Objektes bei  $50^{\circ}\text{C}$ , das durch vorherige mechanische Einwirkung Löcher aufweist (helle Kreise). Innerhalb des großen Hohlräumens befinden sich dunkle Körper in wässriger Lösung. Die markierten Objekte werden für eine Diffusionsanalyse verwendet. Probe: DGDG(Spinat)/ $\text{H}_2\text{O}/100\text{mMNaCl}$ , 4 Tage alt.

herausgemittelt werden. Als Sonde für die disperse Phase wurden neben dem in Abb.5.11 markierten dunklen Körper drei weitere ausgewählt. Einer davon befindet sich in vergleichbarer Umgebung wie der gezeigte ( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ), die beiden anderen befinden sich innerhalb großer Adhäsionstaschen bei  $18^{\circ}\text{C}$  (vgl. z.B. Abb.5.1). Die dunklen Körper zeigen im Gegensatz zu Löchern vergleichbarer Größe deutlich eine Brownsche Bewegung. In allen Fällen wurde darauf geachtet, daß die umgebende Umrandung der dunklen Körper während der Beobachtung ihre Position beibehält, wodurch eine kollektive Drift als Ursache für die Bewegung ausgeschlossen ist. Die Position der Objekte sowie deren Abmessungen wurden auf dem Bildschirm per Cursor bestimmt. Der damit verbundene Meßfehler entspricht ungefähr der Größe eines Bildpunktes, d.h.  $0.22\mu\text{m}$ . Die Trajektorie wurde in konstanten Intervallen von  $1\text{s}$  oder  $2\text{s}$  ausgemessen. Der gesamte Zeitraum ist für die Löcher aufgrund ihrer Lebensdauer auf maximal eine Minute beschränkt. Für die dunklen Körper wurde eine vergleichbare Zeitspanne ausgewählt.

Die Trajektorien werden auf folgende Weise ausgewertet. Da die Sonden während der Diffusion gegebenenfalls durch Nachjustieren im Fokus gehalten wurden, kann die Bewegung als zweidimensional betrachtet werden. Die Verschiebung innerhalb des  $i$ -ten Zeitintervalls  $\Delta t$  wird in zwei senkrechte Komponenten,  $\Delta x_i$  und  $\Delta y_i$ , zerlegt. Zu jeder Richtung wird die Summe der einzelnen Verschiebungsquadrate über den gesamten Zeitraum, d.h. die Gesamtzahl  $n$  der Schritte, gebildet. Sind die Schritte äquidistant und  $\Delta t$  groß, kann aus dem Mittelwert des Verschiebungsquadrates  $\overline{\Delta x^2}$  die Diffusionskonstante  $D$  nach

$$2D = \frac{\overline{\Delta x^2}}{\Delta t} \quad , \quad \text{mit} \quad \overline{\Delta x^2} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta x_i^2 \quad (5.5)$$

Sonde	$\bar{r}[\mu m]$	$T[^\circ C]$	$2D[\mu m^2 s^{-1}]$	$\eta[10^{-3} Pas]$
„dK“ (Tasche)	1.0	18	$0.29 \pm 0.47$	1.5
„dK“ (Tasche)	1.4	18	$0.19 \pm 0.22$	1.6
„dK“ (Hohlraum)	0.5	50	$0.98 \pm 1.53$	1.0
„dK“ (Hohlraum)	1.3	50	$0.28 \pm 0.38$	1.1
7 Löcher	1.0–2.4	50	$(<0.04 \pm 0.008)$	$(>11.0)$

**Tabelle 5.2:** Nach den verschiedenen Sonden („dK“ steht für dunkler Körper) aufgeschlüsselte Kenngrößen zur Bestimmung der Zähigkeit  $\eta$  aus (5.7). Die ergänzenden Werte zur doppelten Diffusionskonstanten  $2D$  entsprechen der Streuung der intervallweise bestimmten Werte von  $2D$  um den Mittelwert. Die Daten für die 7 Löcher wurden zusammengefaßt. Der Mittelwert von  $2D$  bezieht sich auf einen Radius von  $r = 1\mu m$  und ist als obere Grenze für die Diffusionskonstante aufzufassen. Er ist um die Streuung der Einzelwerte ergänzt. Der Wert für die Zähigkeit stellt die untere Grenze dar.

berechnet werden. Bei ungleichen Intervallschritten trägt man die Summe der Abstandsquadrate gegen die Zeit auf und liest aus der Steigung der Ausgleichsgeraden den Wert für  $2D$  ab. Um zu prüfen, ob die gemessene Verschiebung vorwiegend auf die Brownsche Bewegung zurückzuführen ist, wurden folgende Tests durchgeführt:

1. Wenn keine erkennbare Einschränkung in einer der beiden Bewegungsrichtungen, z.B. in Form von einer Begrenzung, vorliegt, sollten die aus beiden Koordinaten bestimmten Werte für  $2D$  übereinstimmen.
2. Vergleicht man innerhalb einer Trajektorie anstelle von zeitlich aufeinanderfolgenden Orten solche, die  $n$  äquidistante Intervalle auseinanderliegen, so sollte ihr Abstandsquadrat im Mittel  $n$  mal größer sein.

Das letzte der beiden Kriterien wird von den Sonden im optisch isotropen Objekt nicht erfüllt. Daher ist davon auszugehen, daß die Unsicherheit der einzelnen Ortsbestimmung größer ausfällt als die innerhalb eines Zeitintervalls zurückgelegte Wegdifferenz. Die Dauer der Beobachtung reicht nicht aus, um die Brownsche Bewegung von anderen Effekten zu trennen. Daher ist der eingeklammerte Wert von  $2D$  in Tab.5.2 allenfalls als eine obere Abschätzung anzusehen.

Die Zähigkeit kann auf direkte Weise mit Hilfe der Diffusionskonstanten bestimmt werden. Aus der Einstein-Relation

$$\gamma_r D = k_B T \quad (5.6)$$

folgt unter der Annahme, daß die Reibungskonstante mit  $\gamma_r = 6\pi\eta r$  der einer Kugel mit Radius  $r$  im viskosen Medium entspricht, für die Zähigkeit

$$\eta = \frac{k_B T}{6\pi D r}. \quad (5.7)$$

Im Fall einer Änderung der Größe der Sonde während des Zeitraums der Beobachtung wurde für  $r$  in (5.7) der zeitliche Mittelwert eingesetzt.

In Tab.5.2 sind die nach (5.5) und (5.7) bestimmten Werte für die zweifache Diffusionskonstante  $2D$  der Sonde bzw. für die Zähigkeit des Mediums  $\eta$  zusammengestellt. Ein wesentlicher Beitrag zur Unsicherheit des bestimmten Wertes für

die Zähigkeit ist nach (5.7) durch den relativen Fehler der Abmessung  $r$  der Sonde von ca. 20%–40% gegeben. Zunächst vergleichen wir die Werte von  $\eta$  für das dünnere Medium mit der Zähigkeit von Wasser. Diese beträgt bei  $T = 20^\circ\text{C}$   $1.0\text{mPas}$  bzw. bei  $T = 50^\circ\text{C}$   $0.6\text{mPas}$  [46] und liegt somit in derselben Größenordnung wie die gemessenen Werte. Daraus schließen wir, daß die Phase, die mit der dichteren optisch isotropen Phase koexistiert, nicht vernetzt ist. Die dichtere optisch isotrope Phase besitzt eine um mindestens eine Größenordnung höhere Zähigkeit.

Zum Vergleich geben wir die Scherviskosität einer bikontinuierlichen Phase ( $L_2$ ) im System AOT<sup>4</sup>/Octanol/Wasser an. Sie beträgt für ein festgelegtes Gewichtsverhältnis von AOT zu Octanol (5.7/4.3) für Wasseranteile zwischen 0% und 60%  $64\text{mPas}$  bzw.  $45\text{mPas}$  [165]. Das System bildet dabei eine vernetzte Phase mit einer vergleichsweise geringen Viskosität aus [165].

## 5.3 Röntgenuntersuchungen

### 5.3.1 Flachprobenkammer

Die Probenkammer soll sowohl zu Mikroskopiezwecken einsetzbar als auch für den Röntgenstrahl durchlässig sein. Natronglas besitzt eine Absorptionslänge<sup>5</sup> im Bereich von  $\lambda_A \approx 0.1\text{mm}$  für eine Wellenlänge von  $1.54\text{\AA}$ . Daher kommt es bei einer Standarddicke von  $0.17\text{mm}$  als Material für die Kammerfenster nicht in Betracht. Als Alternative wurde zunächst Glimmer verwendet, das in  $20\mu\text{m}$  dünnen Schichten gespalten werden kann und eine vergleichbare Absorptionslänge wie Glas besitzt, doch zeigten die darauf präparierten Proben eine zu schlechte Ausbeute an isotropen Objekten. Stattdessen fiel daher die Wahl auf Mylarfolie ( $\lambda_A \approx 1\text{mm}$ ). Diese ist zwar in begrenztem Umfang wasserdurchlässig, doch konnte einem Austrocknen der Proben durch Lagerung bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% vorgebeugt werden. Ein anderer Nachteil der Mylarfolien besteht in einem verhältnismäßig starken Kleinwinkelstreuuntergrund. Bei  $s \approx 1/12.2\text{nm}^{-1} \equiv 2\theta \approx 0.7^\circ$  liegen zwei diffuse gerichtete Reflexe, die auf die Orientierung der Polymere innerhalb der Folie zurückgehen. Ihre volle Halbwertsbreite beträgt ca.  $0.28^\circ$ .

Die Unterseite der flachen Probenkammer besteht aus einem ebenen Aluminiumblech, welches in der Mitte eine Bohrung mit einem Durchmesser von ca.  $10\text{mm}$  besitzt. Flächendeckend wird darauf eine Mylarfolie festgeklebt, die durch Tempern gespannt wird. Eine Menge von wenigen  $100\mu\text{g}$  des Lipids wird aus einer Chloroform/Methanol-Lösung ( $10\text{mM/l}$  DGDG) im Bereich des Fensters aufpipetiert und bildet eine Fläche von einigen  $\text{mm}^2$ . Das aufgetragene Lipid wird zur Beseitigung der Lösungsmittelreste mehrere Stunden bei reduziertem Druck gelagert. Kurze Streifen von  $50\mu\text{m}$ – $75\mu\text{m}$  dicker Mylarfolie werden am Rand des Lipidflecks als Abstandshalter eingesetzt. Als Oberseite der Kammer wird wiederum Mylarfolie verwendet, deren Fläche im Bereich von einem  $\text{cm}^2$  liegt. Zwischen beide Folien kann die Salzlösung durch Kapillarkräfte eindringen. Die Abdichtung erfolgt wie bei den reinen Mikroskopiekammern, indem ein überlappender Mylarfolienring durch Paraffin die Ober- und Unterseite der Kammer verbindet. Für die Kammer-

<sup>4</sup>Englisch: Sodium-1,4-bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate

<sup>5</sup>Die Absorptionslängen wurden experimentell am Laboraufbau bestimmt.

fenster wurden Mylarfolien mit einer Dicke zwischen  $50\mu\text{m}$  und  $75\mu\text{m}$  ausgewählt. Wie die optischen Proben werden die Röntgenproben zunächst einige Zeit bei ca.  $50^\circ\text{C}$  getempert. Dabei wird die Entwicklung innerhalb der Probe regelmäßig mikroskopisch untersucht. Wenn der Anteil an optisch isotropen Objekten hoch genug ist, wird die Probe langsam (innerhalb ca. einer halben Stunde) auf Raumtemperatur gebracht. Dieser Zeitpunkt ist frühestens innerhalb von  $12\text{h}$  bei  $50^\circ\text{C}$  erreicht, kann sich jedoch auch mehrere Tage hinziehen.

Die Position der Objekte innerhalb der Probe wird zu Justagezwecken mit einem Markerpunkt versehen und die Kammer aufrecht im Strahl montiert, da nur Meßplätze mit horizontalem Strahlengang zugänglich waren. Dies hat zum Nachteil, daß justierte Objekte unter Umständen während der Messung innerhalb der Kammer nach unten wandern und daher nicht mehr zentral im Strahl positioniert sind. Außerdem können andere Objekte ungewollt im Strahl auftauchen. Daher mußte nach jeder Messung die Position des untersuchten Objekts innerhalb der Kammer verifiziert werden. In diesem Punkt sind die kurzen Aufnahmedauern ( $\approx 5\text{min}$ ) am Synchrotronmeßplatz gegenüber den Zeiten am Laboraufbau ( $\approx 2 - 10\text{h}$ ) von großem Vorteil.

### 5.3.2 Justage

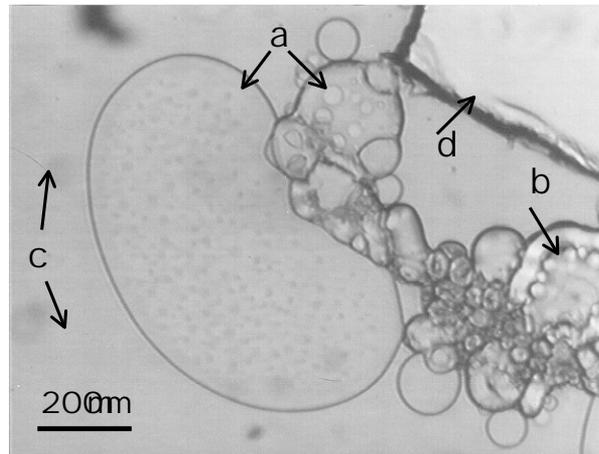
Die Positionierung der optisch isotropen Objekte im Strahl wurde am Synchrotronmeßplatz auf drei alternative Arten durchgeführt.

- Die unter dem Mikroskop eingezeichnete Markierung wurde mit einem Laser-spot zur Deckung gebracht, dessen Position mit der des Strahles am Probenort übereinstimmt.
- Auf der Probe wurde in der Nähe der Sollposition ein Krümel Eichsubstanz (AgBeh) aufgebracht und seine relative Position dazu ausgemessen. Nachdem der Kalibrationsort aufgefunden war, konnte durch Schrittmotoren die Sollposition mit einer Genauigkeit von  $100\mu\text{m}$  eingestellt werden.
- Wenn innerhalb der Probe noch ein Gebiet existiert, wo sich die Probe in der homogen hydratisierten  $L_\alpha$ -Phase befindet, kann sie anstelle der Eichsubstanz – wie im letzten Stichpunkt beschrieben – als Referenzpunkt herangezogen werden.

Zu jeder Probe wurden sowohl Messungen im Bereich der optisch isotropen Objekte als auch im Bereich des Überschußwassers vorgenommen. Dadurch ist eine Korrektur des Untergrundes prinzipiell möglich.

#### 5.3.2.1 Optische Charakterisierung

Die Charakterisierung bezieht sich speziell auf die für Beugungsexperimente konzipierten Proben. Die Objekte wurden zwischen gekreuzte Polarisatoren gebracht, um deren Isotropie zu prüfen. Der zusätzliche Beitrag der Mylarfolien führt unter Umständen dazu, daß isotrope Objekte nicht mehr völlig dunkel erscheinen. Da sie jedoch im Vergleich zu doppelbrechenden Objekten dunkler sind, kann zwischen beiden unterschieden werden. In Abb.5.12 sind neben isotropen (a) auch doppelbre-

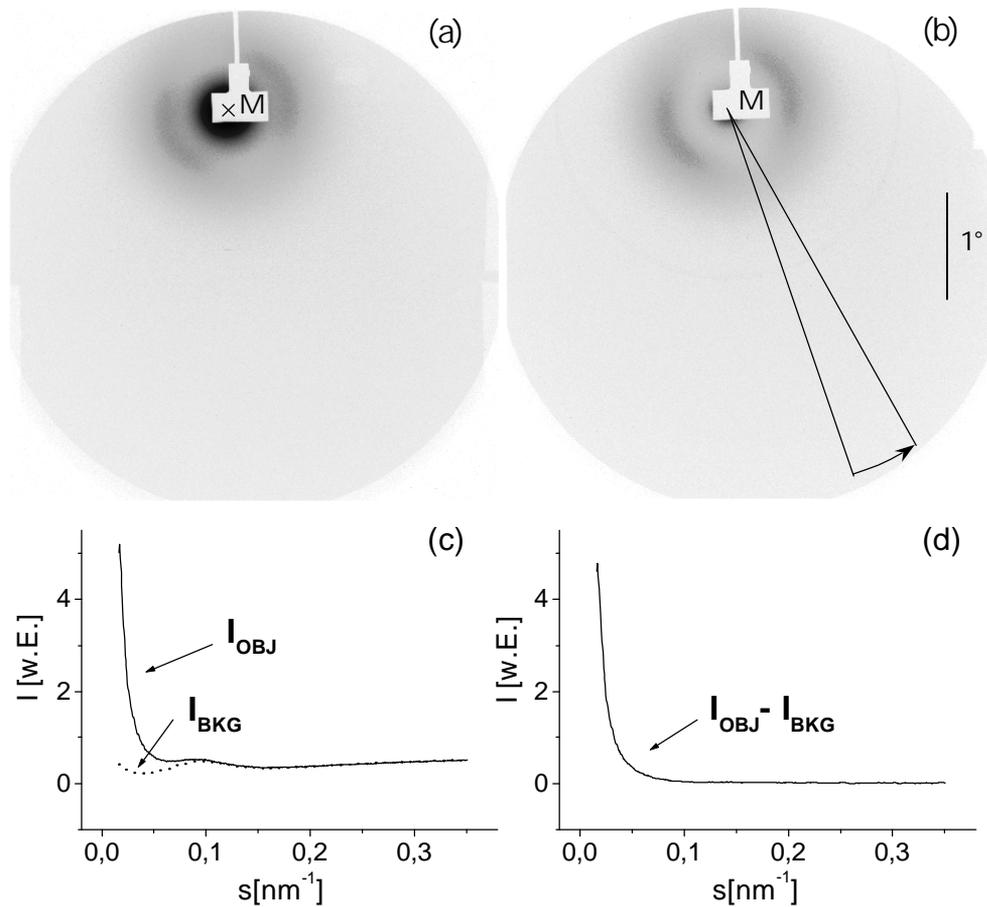


**Abbildung 5.12:** Videomikroskopische Aufnahme einer Flachprobe mit Kammerfenstern aus Mylarfolie. Letztere bewirken gemeinsam mit dem Polarisator, daß zwischen isotropen **a** und doppelbrechenden **b** Strukturen unterschieden werden kann. Beide befinden sich in der Nähe des Abstandshalters **d** und sind von einer wässrigen Lösung **c** umgeben. Die dunklen Ränder um die Objekte sind Eigenheiten der Abbildung und fallen bei stärkerer Vergrößerung weg. Die erkennbaren Löcher in **a** sind Überbleibsel einer temperaturinduzierten Phasensegregation (Kap.5.2.2).

chende Objekte (b) erkennbar. Beide sind von einer wässrigen Lösung umgeben (c). Die Aufnahme wurde ohne Analysator gemacht. Der Einfluß der Folien reicht hier schon aus, um doppelbrechende von isotropen Objekten grob zu unterscheiden. Einige der isotropen Objekte sehen inhomogen aus, was darauf zurückzuführen ist, daß die Temperatur der Probe ca. 20min vor der Aufnahme zunächst innerhalb weniger Minuten um ca.  $15^{\circ}\text{C}$  erhöht wurde. Zur Zeit der Aufnahme ist sie wieder auf ihren Ausgangswert, Raumtemperatur, abgesunken. Die stellenweise sichtbaren Löcher (a, rechts) sind demnach Überbleibsel der temperaturinduzierten Phasensegregation (Kap.5.2.2). Durch die o.g. Präparationsweise können optisch isotrope Objekte hergestellt werden, die eine laterale Ausdehnung bis zu einem mm (Abb.5.12a) besitzen. Ihre Größe ist somit mit der des Primärstrahles am Probenort vergleichbar (vgl. Kap.2.2). Sie füllen die Probenkammer über die gesamte Höhe aus und sind somit geeignete Kandidaten zur Strukturbestimmung.

### 5.3.3 Ergebnisse

Abb.5.13 zeigt zwei Diffraktogramme einer Probe bei Raumtemperatur. Für die erste Aufnahme (a) wurde ein optisch isotropes Objekt mit einer lateralen Abmessung im Bereich eines mm nach einem der oben beschriebenen Verfahren zentral im Strahl positioniert. Anschließend wurde die Probe per Schrittmotor so verfahren, daß der Strahl sie dort trifft, wo optisch kein Objekt erkennbar ist und eine weitere Aufnahme gemacht (b). Sie wird im folgenden vereinfachend als Untergrundmessung bezeichnet. Die Integrationszeit beträgt in beiden Fällen 5min.



**Abbildung 5.13:** Diffraktogramm einer DGDG–Probe nach Justage auf ein optisch isotropes Objekt (a) bzw. auf den Bereich der wässrigen Lösung (b) (vgl. Abb.5.12). Die in beiden Aufnahmen erkennbaren diffusen Teilringe gehen auf die als Kammerfenster eingesetzte Mylarfolie zurück. Der Nullpunkt der Aufnahme ist mit M gekennzeichnet. Integration über Kreisbögen innerhalb des in (b) eingezeichneten Bereichs liefert für beide Aufnahmen die in (c) gezeigten Spektren, nachdem deren Intensität für  $s > 0.2\text{nm}^{-1}$  aufeinander normiert wurde. Die Differenz beider Spektren ist in (d) dargestellt.

Als wichtigstes Ergebnis ist hervorzuheben, daß die Aufnahme des isotropen Objektes in Abb.5.13a innerhalb des gesamten Meßfensters zwischen  $0.12^\circ < 2\theta < 3.8^\circ$ , d.h.  $22.4\text{\AA} < d < 715\text{\AA}$ , keine diskreten Reflexe aufweist. Stattdessen ist außer den diffusen Reflexen der Mylarfenster bei  $2\theta = 0.7^\circ$  im Bereich des Nullstrahls ein starker Streuuntergrund erkennbar. Ein Vergleich mit der Untergrundaufnahme (b) zeigt, daß er dort nicht auftritt. Demnach ist er dem isotropen Objekt zuzuordnen. Eine wie in Abb.5.13b angedeutete Integration der Image-Plate-Einträge über Kreisbögen von  $10^\circ$  liefert die in (c) dargestellten Spektren. Der Mittelwert beider Spektren wurde für  $s > 0.2\text{nm}^{-1}$  aufeinander normiert. Aus dem Verlauf des vom Untergrund bereinigten Spektrums (d) wird ersichtlich, daß die Streuintensität bis einschließlich  $s \approx 0.1\text{nm}^{-1}$ , d.h.  $2\theta \approx 0.85^\circ$ , erhöht ist.

### 5.3.4 Diskussion

Insgesamt wurden 7 verschiedene Flachproben im Bereich von optisch isotropen Objekten mit Röntgenbeugung untersucht. Auf keiner der insgesamt 19 Aufnahmen sind im Kleinwinkelbereich Braggreflexe erkennbar. Daraus schließen wir, daß die Objekte keine geordnete Struktur mit Braggebenenabständen bis zu ungefähr  $700\text{\AA}$  aufweisen können. Wenn mittlere Abstände in diesem Bereich vorliegen, ist die Struktur ungeordnet. Lipid/Wasser-Systeme, die eine geordnete isotrope Phase mit Abständen größer als  $700\text{\AA}$  bilden, sind jedoch bislang unbekannt. Vielmehr beträgt die Größe der Einheitszelle bekannter kubischer Phasen weniger als  $200\text{\AA}$  [14].

In weit gequollenen Lipid/Wasser-Systemen wurden mit mikroskopischen Methoden dreidimensionale, regelmäßige Anordnungen von Passagen gefunden, die als innen-zentriertes kubisches Gitter gedeutet wurden [92]. Die Größe der Einheitszelle liegt im Bereich von Mikrometern. Allerdings ist ungeklärt, ob es sich bei diesen ausgesprochen selten beobachteten Objekten um eine stabile Phase handelt.

Im Hinblick auf den erhöhten Kleinwinkelstreueuntergrund sind die Ergebnisse nicht so eindeutig. Bei nur 10 von 19 Aufnahmen ist eine verstärkte Streuung um den Nullstrahl erkennbar, bei den restlichen 9 nicht. Sogar innerhalb einer Probenkammer können unterschiedliche isotrope Objekte in ihrem Kleinwinkelstreubeitrag deutlich voneinander abweichen. Andererseits wurde eine erhöhte Kleinwinkelstreuung auch bei ungefähr der Hälfte der Untergrundmessungen festgestellt.

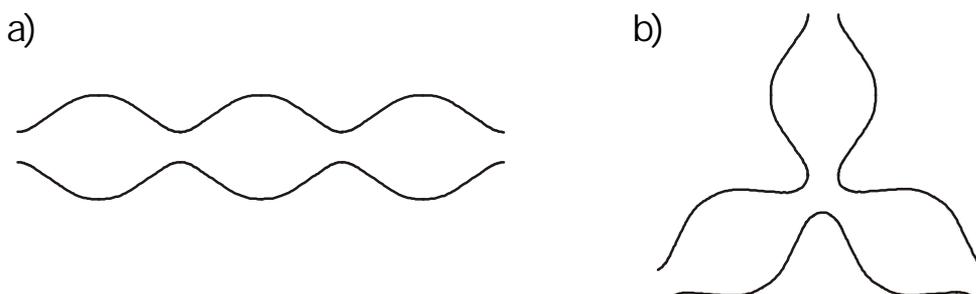
Schließt man Ungenauigkeiten bei der Justage auf die Objekte als Grund für die abweichenden Beobachtungen aus, so folgt daraus, daß eine optische Charakterisierung der Objekte für die vorliegenden Proben nicht eindeutig ist. Sowohl gleichartig aussehende isotrope Objekte können unterschiedliche strukturelle Eigenschaften besitzen als auch das umgebende Medium. Erstere können innerhalb einer Probenkammer koexistieren.

## 5.4 Strukturmodell für isotrope Objekte

Wir stellen ein Strukturmodell der isotropen Objekte vor, welches auf dem Ausdruck für die Krümmungselastische Energie höherer Ordnung basiert. Der Ausgangspunkt besteht in der Annahme, daß die mit der Methode der Gefrierätzelektronenmikroskopie gemachten Aufnahmen der Lipidstruktur [40][39] (Abb.1.7) der dispersen Phase entspricht, die durch Temperaturänderung in die kondensierte isotrope Phase überführt werden kann.

Aus den elektronenmikroskopischen Gefrierätztaufnahmen der dispersen Phase lassen sich stellenweise deren Strukturelemente erkennen. Diese sind aus Membranen aufgebaut und bestehen idealisiert aus aneinandergereihten Sphäroiden mit einem Durchmesser von  $20\text{--}25\text{nm}$ . Die rotationselliptischen Körper sind durch dünne Verengungen miteinander verbunden (Abb.5.14a). Als Grundelemente der dispersen Phase gelten somit Sphäroide und passagenförmige Verbindungen. Die Einheiten der dispersen Phase, d.h. der Zusammenschluß mehrerer Grundelemente, sind im wesentlichen langgestreckt und erreichen eine Länge im Bereich von mehreren  $100\text{nm}$  (Abb.1.7a). Sie weisen an einigen Stellen Verzweigungen auf, die einen Winkel von näherungsweise  $120^\circ$  bilden (b).

Im folgenden schätzen wir qualitativ die einzelnen Beiträge zur Krümmungsenergie (3.8) für die beiden Grundelemente der Struktur ab. Der Gradiententerm sowie der Term achter Ordnung in den Krümmungen aus (3.8) bleiben unberücksichtigt. Gegenüber dem planaren Membranzustand sind die Membranformen der dispersen Phase hauptsächlich durch den Beitrag des quadratischen Terms Gaußscher Krümmung  $\bar{\kappa}_2 K^2$ ,  $\bar{\kappa}_2 < 0$ , zur Krümmungsenergie (3.8) bevorzugt. Dieser Term macht sich insbesondere dann bemerkbar, wenn hohe Gaußsche Krümmungen  $K$  vorliegen. Dies ist der Fall, wenn beide Hauptkrümmungen dem Betrag nach groß sind und trifft demnach gleichermaßen auf stark gekrümmte Kugeln und Passagen zu. Da die Sphäroide im Mittel einen deutlich größeren Krümmungsradius



**Abbildung 5.14:** Schematische Darstellung von Strukturelementen einer dispersen Phase, die von Dunger et al. im System PC/Wasser/(Salz) elektronenmikroskopisch abgebildet wurde [40]. Der Durchmesser der aneinandergereihten Sphäroide beträgt zwischen  $20\text{nm}$  und  $25\text{nm}$ . Es wurden aneinandergereihte a) sowie verzweigte b) Elemente beobachtet (Abb.1.7).

als die Verbindungen besitzen, ist für sie die Absenkung der Biegeenergie geringer. Ein weiterer Unterschied der Biegeenergie zwischen Sphäroiden und Verbindungen kommt durch den quadratischen Term der Gesamtkrümmung  $\kappa J^2$ ,  $\kappa > 0$  (3.8), zustande. Dieser Beitrag ist für die Verbindungen wegen  $J \approx 0$  verschwindend gering. Die Krümmungsenergie der Sphäroide wird durch diesen Anteil wegen der großen Gesamtkrümmung  $J$  stark angehoben. Wir nehmen an, daß sie insgesamt positiv ist, da im System keine spontane Vesikulation beobachtet wurde [39].

Ein Abschluß des Aggregats <sup>6</sup> durch eine Halbkugel ist ungünstiger als durch eine anknüpfende Verbindung. Auf diese Weise ist die Entstehung von Verzweigungen favorisiert.

---

<sup>6</sup>Mit Aggregat ist in diesem Zusammenhang eine Einheit der dispersen Phase gemeint.