

# Struktur und Fluktuationen festkörpergestützter Phospholipidmembranen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Ulrike Katharina Mennicke**  
aus München

Göttingen, 2003

D7

Referent: Prof. Dr. Tim Salditt

Koreferent: PD Dr. Helmut Grubmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 18. August 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Systeme</b>	<b>3</b>
2.1 Lipidmembranen . . . . .	3
2.1.1 Lipidmembranen als Modell für biologische Membranen und andere Anwendungen . . . . .	4
2.1.2 Chemischer Aufbau von Lipidmembranen . . . . .	4
2.1.3 Strukturanalyse von Lipidmembranen . . . . .	9
2.1.4 Systeme festkörpergestützter Lipidmembranen . . . . .	10
2.1.5 Präparation von festkörpergestützten Lipidmembranen . .	12
2.2 Lipidmembranen als smektische Phase . . . . .	14
2.2.1 Fluktuationen einer Membran . . . . .	14
2.2.2 Fluktuationen multilamellarer Membranen im Volumen ( <i>bulk</i> ) . . . . .	16
2.2.3 Fluktuationen festkörpergestützter Lipidmembranen . . .	18
2.3 Wechselwirkungen zwischen Membranen . . . . .	22
2.3.1 Wechselwirkungspotentiale . . . . .	22
2.3.2 Bestimmung der Membraneigenschaften aus den Wech- selwirkungspotentialen . . . . .	29

2.3.3	Osmotischer Druck als veränderliches attraktives Potential	31
2.3.4	Definition der Wasserschichtdicke $d_w$	32
<b>3</b>	<b>Grundlagen der Reflektivität und Modellbildung</b>	<b>35</b>
3.1	Grundlagen	35
3.1.1	Streu geometrie und Reziproker Raum	36
3.1.2	spekuläre Reflektivität	39
3.2	Modellbildung: Reflektivität an dünnen substratgestützten Lipid-filmen	43
3.2.1	Formfaktor und Strukturfaktor	43
3.2.2	Der diffuse Beitrag in Reflektivität und Offset Messung	45
3.2.3	Parametrisierung des Formfaktors und des Elektronen-dichteprofiles einer Membran	47
3.3	Anpassung an die Reflektivitätsdaten	48
3.3.1	Das Phasenproblem	48
3.3.2	Probendefekte im Streuexperiment	49
3.3.3	Parameterisierung der Reflektivität	50
3.4	Diffuse Streuung	51
<b>4</b>	<b>Experimente</b>	<b>55</b>
4.1	Probenpräparation	55
4.1.1	Präparation durch Spreiten	56
4.1.2	Präparation von Oligo-Membranstackeln	57
4.1.3	Charakterisierung der Oligo-Membran Proben	61
4.1.4	Herstellung der Polymerlösungen	63
4.1.5	Bestimmung des osmotischen Druckes	65
4.2	Röntgenmessungen	68

4.2.1	Aufbau der Streuexperimente . . . . .	68
4.2.2	Probenumgebung . . . . .	70
4.2.3	Hydratisation unter osmotischem Druck . . . . .	71
4.2.4	Reflektivitätsmessungen an ungeladenen DMPC-Membranen . . . . .	73
4.2.5	Reflektivitätsmessungen an geladenen POPS-Membranen	74
4.2.6	Messungen der diffusen Streuung an dicken Proben . . . .	74
<b>5</b>	<b>Auswertung der Röntgenreflektivitäten und Schlussfolgerungen</b>	<b>77</b>
5.1	Ungeladene Membranen: DMPC . . . . .	77
5.1.1	Anpassung der Reflektivitätskurven und Elektronendichtepprofile . . . . .	77
5.1.2	Elektronendichtepprofile als Funktion des Osmotischen Druckes . . . . .	92
5.1.3	Ergebnisse im Rahmen der Theorie der Wechselwirkungspotentiale . . . . .	98
5.2	geladene Membranen: POPS . . . . .	102
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>A</b>	<b>Parameterliste für die Anpassungen der Reflektivitätsmessungen von Oligo-DMPC-Membranen</b>	<b>117</b>
<b>B</b>	<b>Reflektivitätsmessungen an dicken DMPC Proben unter osmotischem Druck</b>	<b>119</b>
<b>C</b>	<b>Offset Messungen der POPS Proben unter osmotischem Druck</b>	<b>121</b>
<b>D</b>	<b>Skript zur Berechnung der Reflektivitäten</b>	<b>123</b>
<b>E</b>	<b>Mathematica Skript zur Berechnung des Van der Waals Potentials</b>	<b>131</b>



# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden festkörpergestützte Phospholipidmembranen mit der Methode der Röntgenreflektivität untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Präparationsmethode entwickelt, mit der erstmals Oligo-Membranstackel von Phospholipiden hergestellt werden konnten. An den so hergestellten, geladenen und ungeladenen Oligo-Membranstackeln sowie an multilamellaren Systemen wurden Röntgenreflektivitätsmessungen bei voller und partieller Hydratisierung durch osmotischen Druck durchgeführt. Es wurde ein theoretisches Modell zur Beschreibung der Reflektivitätsmessungen an Oligo-Membranen entwickelt, das die Fluktuationen in substratgestützten Membransystemen berücksichtigt. Aus Anpassungen an die gemessenen Reflektivitätskurven mit Hilfe dieses Modells wurde das Elektronendichteprofil von Membranen des ungeladenen Phospholipids DMPC unter verschiedenen osmotischen Drücken bestimmt. Durch die Berücksichtigung der Fluktuationen in der Beschreibung der Reflektivität konnten die Biegesteifigkeit  $\kappa$  und der Kompressionsmodul  $B$  der DMPC-Membranen in Abhängigkeit des osmotischen Druckes bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden im Rahmen der Theorie der Wechselwirkungspotentiale zwischen Membranen untersucht.

Durch die Anwendung des bekannten *Spin-Coating* Verfahrens konnten erstmals Stackel von drei bis zu dreißig Phospholipidmembranen - Oligo-Membranstackel genannt - auf Festkörperoberflächen hergestellt werden. Durch Verwendung von Lipidlösungen unterschiedlicher Konzentrationen im Präparationsprozess konnte reproduzierbar die Zahl der Membranen im Stackel kontrolliert werden. Die Proben zeichnen sich durch eine äußerst geringe Mosaizität, in der Größenordnung von  $0.01^\circ$ , und eine sehr geringe Defektdichte aus. Die Anzahl der Membranen kann in Reflektivitätsmessungen eindeutig bestimmt werden.

Reflektivitätsmessungen an Oligo-Membranstackeln und multilamellaren Membranstackeln aus mehreren hundert Membranen wurden am Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB durchgeführt. Dabei wurden die Membranen in

einer temperierbaren Probenkammer entweder aus der Wasserdampfatosphäre oder durch direkten Kontakt mit einem Wasserreservoir hydratisiert. Durch Austausch des Wassers im Reservoir gegen Polymer- bzw. Polyelektrolytlösungen konnten osmotische Drücke auf den Membranstapel ausgeübt werden. Die an Oligo-Membranstapeln gemessenen Reflektivitätskurven werden durch Strukturen wie Defekte und Randeefekte an Grenzflächen deutlich verändert. Daher ist zur theoretischen Beschreibung ein entsprechend komplexes Modell notwendig.

Ausgehend von der kinematischen Theorie wurde ein theoretisches Modell zur Beschreibung der Reflektivitätsmessungen unter Berücksichtigung der Membranfluktuationen entwickelt. Die Fluktuationen in substratgestützten Membranstapeln wurden durch ein, auf dem smektischen Kontinuummodell basierendes Modell beschrieben.

Die Ergebnisse der Reflektivitätsmessungen an Oligo-Membranstapeln des ungeladenen Lipids DMPC unter neun verschiedenen osmotischen Drücken, zwischen Null und  $8.7 \cdot 10^5$  Pa, konnten mit dem theoretischen Modell zur Deckung gebracht werden. Aus der Veränderung der lamellaren Periode  $d$  zeigt sich, dass sich die Hydratisation der Membranen bei verschiedenen osmotischen Drücken zwischen 18 und 27.5 Wassermolekülen pro Lipid verändert hat. In der Rekonstruktion der Elektronendichteprofile lassen sich im untersuchten Bereich der Dehydratisation keine signifikanten Änderungen in der Membran selbst beobachten. Der unterschiedliche Grad an Hydratisation spiegelt sich hauptsächlich in der Dicke der Wasserschicht zwischen den Membranen wieder. Durch die Anpassungen des Modells an die Daten der Reflektivitätsmessungen konnte auch die Stärke der Fluktuationen in Form des Caillé-Parameters  $\eta$  in Abhängigkeit vom osmotischen Druck bestimmt werden.

Die Veränderung der lamellaren Periode  $d$  durch den osmotischen Druck wurde im Rahmen der Theorie der Wechselwirkungspotentiale zwischen Membranen betrachtet. Die Druck-Abstands Relation konnte durch Beiträge des van der Waals Potentials und des Hydrationspotentials quantitativ beschrieben werden. Aus der numerischen Ableitung der Daten wurde zusätzlich der Kompressionsmodul der Membranen  $B(d)$  in Abhängigkeit ihrer Hydratisation bestimmt. Durch Kombination mit dem Caillé Parameter  $\eta(d)$  konnte auch die Biegesteifigkeit der Membranen  $\kappa(d)$  in Abhängigkeit von  $d$  ermittelt werden. Es ergab sich ein mittlerer Wert von  $\kappa = 26 k_B T$ . Durch ein umfassendes Modell konnten so aus den Daten der spekulären Reflektivität nicht nur die Struktur der Membranen bestimmt werden, sondern auch deren elastische Eigenschaften.



Mit dieser Arbeit konnte durch die Entwicklung der Präparationsmethode ein neues Arbeitsgebiet erschlossen werden. Wichtige theoretische Grundlagen für die Analyse der Röntgenreflektivitäts-Messungen bilden nun die Basis für weitere Untersuchungen an komplexeren Systemen. Membranaktive Biomoleküle wie z.B. antibiotische Peptide können in der Präparation leicht in die Membranen eingebaut werden. Eine hohe Qualität der Anpassung der Reflektivitätsdaten ermöglicht die Erfassung auch kleiner Änderungen in der Membrankonformation.



# Kapitel 1

## Einleitung

Seit von Laue, Friedrich und Knipping im Jahr 1912 die ersten Röntgenbeugungsexperimente an Kristallen vorgenommen haben, hat sich die Röntgenbeugung zur klassischen Methode für die Untersuchung struktureller Eigenschaften in kondensierter Materie entwickelt. Nachdem die Methode in den letzten Jahrzehnten durch den Bau von Speicherringen als hoch brillante Strahlungsquellen einen zweiten Höhepunkt erlebt hat, steht durch die geplante Entwicklung des Röntgenlasers eine Erschließung vieler neuer Anwendungen bevor. Seit einigen Jahren werden in zunehmendem Maße weiche biologische Materialien (engl., *soft matter*) mit Röntgenstreuung untersucht. Ein wichtiges Forschungsgebiet ist dabei die Physik biologischer Membranen.

Das Grundgerüst jeder biologischen Zellmembran besteht aus Lipidmembranen. Mit der Methode der Röntgenreflektometrie können die Struktur und die elastischen Eigenschaften von Membranen unter unterschiedlichsten Bedingungen untersucht werden. Neben der Untersuchung von unorientierten Vesikeln spielen festkörpergestützte orientierte Membransysteme eine immer größere Rolle. Die Voraussetzung dafür sind geeignete Präparationsmethoden, um möglichst gut definierte Proben mit geringer Defektdichte herzustellen. Bisher konnten im wesentlichen multilamellare Membranstapel von hoher Defektdichte oder aber Einzel- bzw. Doppelmembranen auf Festkörpern präpariert werden. Eine Kontrolle der Probendicke zwischen drei Membranen und einigen hundert Membranen war allerdings nicht möglich. Von solchen Oligo-Membransystemen, bestehend aus etwa drei bis dreißig Membranen erwartete man jedoch, dass sie sich besonders gut für Streuexperimente eignen.

In dieser Arbeit wird unter Anwendung der *Spin-Coating*-Technik ein Präparationsverfahren für Oligo-Membransysteme entwickelt. Durch Weiterentwicklung eines Modells zur Auswertung, sollen die Struktur und elastischen Eigenschaften von Lipidmembranen in Zuständen unterschiedlicher Hydratisierung durch Röntgenreflektivität bestimmt werden. Die Arbeit beginnt mit einer Einführung in die biologische Relevanz und verschiedene Untersuchungsmöglichkeiten von Phospholipidmembranen. Anschließend werden Lipidmembranstapel im Rahmen der Theorie smektischer Flüssigkristalle und der Wechselwirkungspotentiale beschrieben. In Kapitel drei wird die Methode der Röntgenreflektivität vorgestellt und ein Modell zur theoretischen Beschreibung der Experimente entwickelt. Die Durchführung der Experimente ist Gegenstand von Kapitel vier. Im fünften und letzten Kapitel werden die Ergebnisse anhand der Messdaten von Reflektivitätsmessungen und diffuser Streuung diskutiert.

# Kapitel 2

## Systeme

### 2.1 Lipidmembranen

In diesem Kapitel werden die biologische Relevanz sowie der Aufbau und die physikalischen Eigenschaften von Lipidmembranen erläutert. Dabei soll weniger auf die eigentlichen biologischen Zellmembranen eingegangen werden, als vielmehr auf reine Lipiddoppelschichten. Sie eignen sich sowohl als Modellsystem für biologische Membranen als auch als Material für neuartige medizinische Anwendungen, beispielsweise in der Galenik bzw. *drug delivery*. Grundlegend hierfür ist eine genaue Kenntnis der Struktur sowie der physikalischen Eigenschaften der Membran wie zum Beispiel Elastizität, Phasenverhalten oder Wechselwirkungspotentiale. Beginnend mit einer kurzen Einordnung zur Relevanz und zu den Anwendungsmöglichkeiten der bearbeiteten Systeme wird im folgenden neben dem Aufbau der Lipidmembranen eine kurze Einführung in Methoden der Strukturanalyse und Probenpräparation gegeben. Davon ausgehend wird ein Modell zur theoretischen Beschreibung der verwendeten Systeme erarbeitet. Dies beinhaltet eine Betrachtung multilamellarer Lipidmembranen im Rahmen der Theorie smektischer Flüssigkristalle und eine kurze Betrachtung der Wechselwirkungspotentiale zwischen Membranen.

### 2.1.1 Lipidmembranen als Modell für biologische Membranen und andere Anwendungen

Membranen sind Hauptbestandteil jeder biologischen Zelle. Jede Zelle ist von einer Membran umgeben. Sie grenzt das innere Cytosol gegenüber der extrazellulären Umwelt ab. Zusätzlich verfügen die meisten Zellen über umfangreiche intrazelluläre Membransysteme (Mitochondrien, Chloroplasten, Golgi-Apparat, etc.). Durch die Membranen werden einzelne Kompartimente mit ihren charakteristischen Eigenschaften (chemisches Potential, elektrisches Potential, osmotischer Druck) voneinander getrennt. Im Allgemeinen bestehen biologische Membranen aus einer Vielzahl von Komponenten, hauptsächlich aus verschiedenen Lipiden und Proteinen. Viele Zellprozesse wie Ionentransport werden durch sogenannte Membranproteine gesteuert. Das Grundgerüst der Zellmembranen bilden jedoch stets Lipiddoppelschichten. Durch sie werden physikalischen Eigenschaften wie Elastizität und thermische Stabilität ganz wesentlich bestimmt. Voraussetzung für das Verständnis der vielfältigen Prozesse in Membranen ist das Verständnis der reinen Lipiddoppelschichten. Lipidmembranen sind darüber hinaus nicht nur als Modell für natürliche Membranen interessant, sie bieten auch Möglichkeiten für direkte Anwendungen. Lipidbeschichtungen auf Festkörpern können in Biosensoren zum Einsatz kommen [1, 2]. Spezielle Aggregate (z.B. Vesikel) werden für intelligente Lösungen zur Medikamenten Verabreichung (engl. *drug delivery*) eingesetzt. Durch geschicktes Ausnutzen der Kenntnis über die Phasenübergänge der Lipide in solchen Aggregaten ist es beispielsweise gelungen, Krebsmedikamente gezielt an den Ort eines Tumors zu transportieren [3].

### 2.1.2 Chemischer Aufbau von Lipidmembranen

Lipiddoppelschichten sind Aggregate von Lipidmolekülen, die sich unter bestimmten Voraussetzungen in einem Selbstorganisationsprozess bilden. Eine wichtige Klasse von Lipiden stellen Phosphoglyceride (Phospholipide) dar. Sie sind wegen ihres Vorkommens in menschlichen und tierischen Zellen von besonderem Interesse.

Ein Phosphoglyceridmolekül setzt sich aus einem Glycerolbaustein (Trialkohol), zwei Fettsäuren und einem Phosphorsäurester zusammen. Dabei sind die Fettsäuren und der Phosphatester über Esterverbindungen mit dem Glycerol verknüpft. In dem Phosphorsäureester wiederum ist die Phosphorsäure mit einem

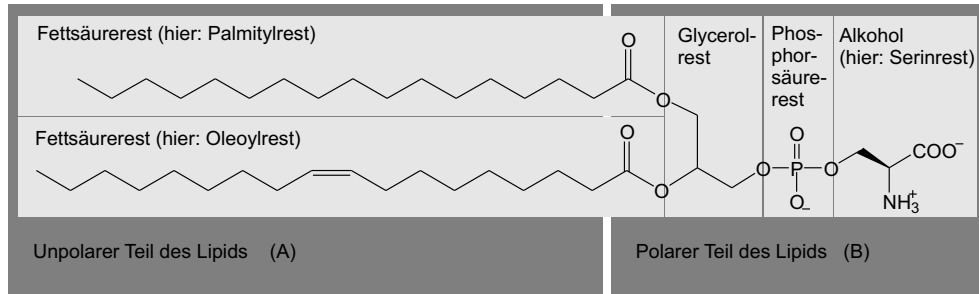


Abbildung 2.1: Aufbau eines POPS Moleküls: Teil (A) zeigt die unpolaren Acylketten, Teil (B) zeigt die geladene, polare Kopfgruppe

der Alkohole Cholin, Serin, Ethanolamin, Inositol oder Glycerol verestert. Phosphorsäureester und Glycerol bilden gemeinsam eine so genannte polare Kopfgruppe (Abb. 2.1.2 B). Bei den angehängten Alkoholen Cholin und Ethanolamin ist diese im physiologischen pH-Bereich zwitterionisch. Bei Serin und Glycerol trägt die Kopfgruppe eine negative Nettoladung. In dieser Arbeit wurden vorwiegend Vertreter der ungeladenen Phosphocholine und der anionischen Phosphoserine verwendet. Diese spielen in eukaryotischen Zellen eine wichtige Rolle. Die vor allem in bakteriellen Zellmembranen (z.B. E. Coli) vorkommenden Phosphoglycerole und Phosphoethanolamine wurden in dieser Arbeit auch verwendet, um die Anwendbarkeit der Präparationsmethode (s. Kapitel 4.1) nachzuweisen. Die Fettsäurereste (Fig.2.1.2 Teil A) können entweder aus zwei gleichen oder zwei unterschiedlichen Acylketten bestehen. Entsprechend spricht man von symmetrischen bzw. asymmetrischen Lipiden. Die Fettsäurereste werden je nach Kettenlänge und Zahl der ungesättigten Bindungen (= Doppelbindungen) systematisch klassifiziert. Physikalische Eigenschaften der Lipide (wie z.B. Schmelzpunkt, Löslichkeit, Biegesteifigkeit,...) werden stark von den Ketten beeinflusst. In Tabelle 2.1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Lipide unter Angabe der Kettenlängen und Doppelbindungen aufgelistet. Die Fettsäureketten sind unpolar und damit lipophil bzw. hydrophob, während die polare Kopfgruppe hydrophil ist.

Moleküle, die aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil bestehen, bezeichnet man als Amphiphile.

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

Tabelle 2.1: *Bezeichnungen, Kettenlängen und Nettoladungen der verwendeten Phospholipide. R1 bzw. R2 bezeichnet die Länge der ersten bzw. zweiten Kette (R: Rest) in der Anzahl von C-Atomen. In der Darstellung  $x : y$  gibt  $x$  die Kettenlänge und  $y$  die Zahl der Doppelbindungen an. Die Nettoladungen verstehen sich in Einheiten der Elementarladung  $e^-$ .*

Amphiphile werden sich, wenn möglich, immer so anordnen, dass ihre jeweiligen hydrophoben und ihre hydrophilen Enden sich nahe kommen. Auf dieser Tatsache beruht die Fähigkeit der Lipide zur Selbstorganisation (*self assembly*). In Kontakt mit Wasser umgeben sich die polaren Kopfgruppen mit den ebenfalls polaren Wassermolekülen, während der Kontakt der unpolaren Fettsäureketten mit Wasser mit einem hohen Energieaufwand verbunden ist. Die sogenannte hydrophobe Energie ist direkt proportional zur Fläche des Kohlenwasserstoff-Wasser Kontakts, ca.  $10.5 \text{ kJ/mol nm}^2$  [4]. In wässriger Lösung bilden sich daher ab einer bestimmten Konzentration Aggregate. Bei dieser so genannten kritischen Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration, CMC*) gleicht die hydrophobe Energie den Entropieverlust gerade aus.

Diese Aggregate haben charakteristische Strukturen von denen hier beispielhaft einige kurz skizziert werden sollen. Die kleinsten Aggregate werden als sphärische Mizellen bezeichnet. Es sind kugelförmige Gebilde aus Lipiden deren Kopfgruppen die Kugeloberfläche bilden und die Fettsäureketten im Inneren der Kugel gegenüber dem umgebenden Wasser abschirmen. Andere mögliche Strukturen sind inverse (bei unpolaren Lösungsmitteln) oder zylindrische Mizellen (Abb. 2.1.2 a), sowie größere Aggregate wie z.B. kubische Phasen (b), Doppelschichten (c) oder Vesikel (d). In Doppelschichten stehen sich zwei Monolagen von Lipidmolekülen, die alle gleich ausgerichtet sind, gegenüber. Dabei zeigen die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zueinander, während sie durch die Köpfe gegenüber einer



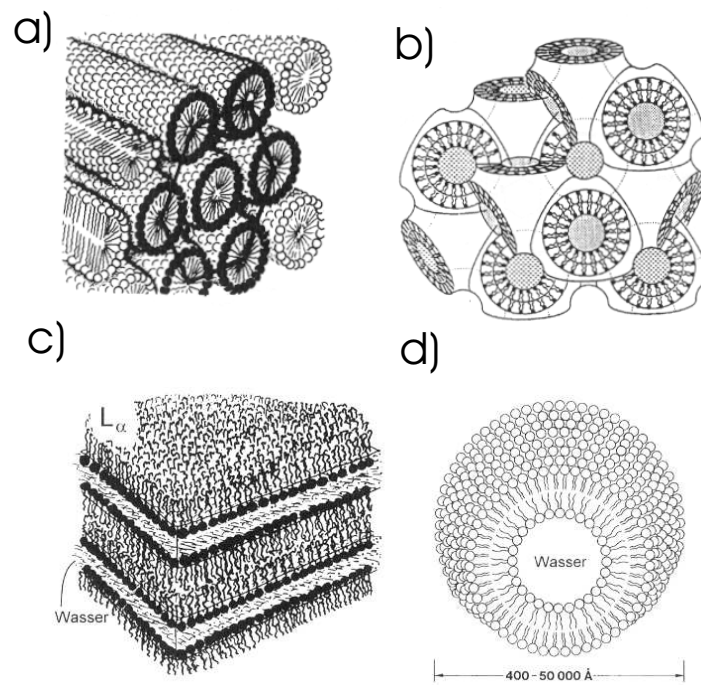


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einiger häufiger Lipidaggregate aus [4].  
a): zylindrische Mizellen, b): kubische Phase, c): multilamellare Phase, d): Vesikel.

Wasserschicht abgeschirmt werden. Eine Doppelschicht bildet eine Membran. Wenn sich mehrere solcher Membranen, jeweils getrennt durch eine dünne Wasserschicht, zu einem Stapel anordnen, so spricht man von einer multilamellaren Phase. Die in dieser Arbeit untersuchten Systeme sind der multilamellaren Phase zuzuordnen. Eine geschlossene Membran die ein Wasservolumen vollständig umschließt wie eine Blase, bezeichnet man als Vesikel. Vesikel können entweder aus nur einer Membranhülle bestehen, oder aus Mehrfachschichten. Entsprechend werden diese als unilamellare Vesikel oder multilamellare Vesikel bezeichnet. Welche Phase gebildet wird hängt vom Packungsparameter der Lipide aber auch von den thermodynamischen Randbedingungen wie Konzentration oder Temperatur ab [5]. Der Packungsparameter der Lipide wird durch die geometrischen und physikalischen Eigenschaften der Lipide, wie Länge der Fettsäureketten, Größe der Kopfgruppe, sowie Polarität bestimmt. Kegelförmige Moleküle neigen eher zur Mizellenbildung während zylinderförmige Moleküle eher Doppelschichten bilden. In dieser Arbeit werden Lipidmembranen, also Lipiddoppelschichten untersucht. Abhängig von Wassergehalt und Temperatur können diese unterschiedliche Phasen, so genannte lyotrope Phasen annehmen. Abgesehen von Subphasen unterscheidet man grob zwischen der Subgel-Phase ( $L_c$ ), der gelartigen Phase ( $L'_\beta$ ) und der fluiden Phase ( $L_\alpha$ ). In Abbildung (2.3) sind diese, sowie einige wichtige Subphasen schematisch dargestellt. Die fluide Phase  $L_\alpha$  ist aus biologischer Sicht die relevanteste Phase. In ihr sind die Ketten weich und die Lipidmoleküle sind innerhalb der Schicht frei beweglich und bilden eine zweidimensionale Flüssigkeit.

Den Übergang von der gelartigen Phase zu der fluiden Phase nennt man auch den Hauptphasenübergang. Der Hauptphasenübergang des in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Lipids DMPC liegt bei voller Hydratisierung bei  $23.6^\circ\text{C}$ . [6] Das Phasendiagramm mit der Aufklärung der unterschiedlichen Strukturen und Zwischenphasen ist schon seit einigen Jahren Ziel intensiver Forschung [7, 8]. Um aber schon relativ einfache Phasendiagramme, wie das von DPPC in Abb. (2.3) quantitativ zu beschreiben, sind komplexere analytische und numerische Methoden der statistischen Physik erforderlich (siehe z.B. [9, 10]). In den letzten Jahren wurden, auch in Folge immer größerer und schneller werdender Rechner, große Fortschritte auf dem Gebiet der Molekulardynamik Simulation gemacht [11, 12, 13]. Ein anderer Weg zum Verständnis der Lipidmembranen führt über experimentelle Strukturanalyse der Membranen in unterschiedlichen Bedingungen. Wie in fast allen Gebieten der Physik, ist es gerade das Zusammenspiel von theoretischen Vorhersagen und Experimenten das Erfolg verspricht.

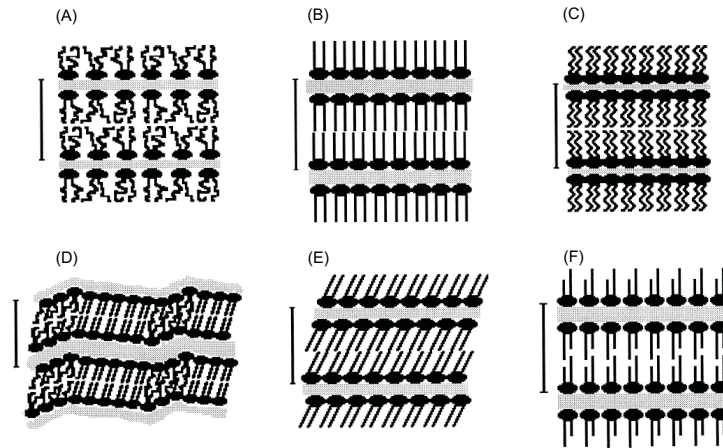


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung einiger wichtiger, in Phosphocholinen vorkommender, lyotroper Phasen: (A): fluid  $L_\alpha$ , (B): gelartig  $L_\beta$ , (C): subgel  $L_c$ . Subphasen: (D): Ripple-Phase  $P_{\beta'}$ , (E): gelartig, verkippt  $L_{\beta'}$ , (F): gelartig, partiell-interdigitierend. aus [6]

### 2.1.3 Strukturanalyse von Lipidmembranen

Lipiddoppelschichten, wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben wurden, sind üblicherweise zwischen drei und vier Nanometer dick und weisen interne Strukturen in Größenordnungen von einigen Å auf. Die experimentelle Untersuchung erfordert also Methoden, die auf den entsprechenden Längenskalen sensitiv sind. Da es sich um biologisch relevante Systeme handelt, sollten diese auch in einem biologisch relevanten Zustand untersucht werden. Bei biologischen Membranen ist dies die  $L_\alpha$ -Phase, die, aufgrund der freien Beweglichkeit der Moleküle innerhalb der Membranebene, auch fluide-Phase genannt wird. Typischerweise untersucht man hier unter Normaldruck, hoher Luftfeuchtigkeit oder direkt in wässriger Umgebung und bei Temperaturen von Raumtemperatur bis um  $45^\circ\text{C}$ . Rasterkraftmikroskopische Verfahren, für Lipide in der Gel-Phase noch anwendbar, sind aufgrund der Weichheit der Membranen in der fluiden Phase aber problematisch [14]. Bei elektronenmikroskopischen Methoden werden die Membranen meist durch Kontrastierungsmaterial, vor allem aber durch die Untersuchung unter unphysiologischen Bedingungen wie Hochvakuum entscheidend verändert. Die klassischen Untersuchungsmethoden zum Studium struktureller Eigenschaften kondensierter Materie sind die Streuung von Röntgen- und Neutronenstrahlung. Beide Metho-

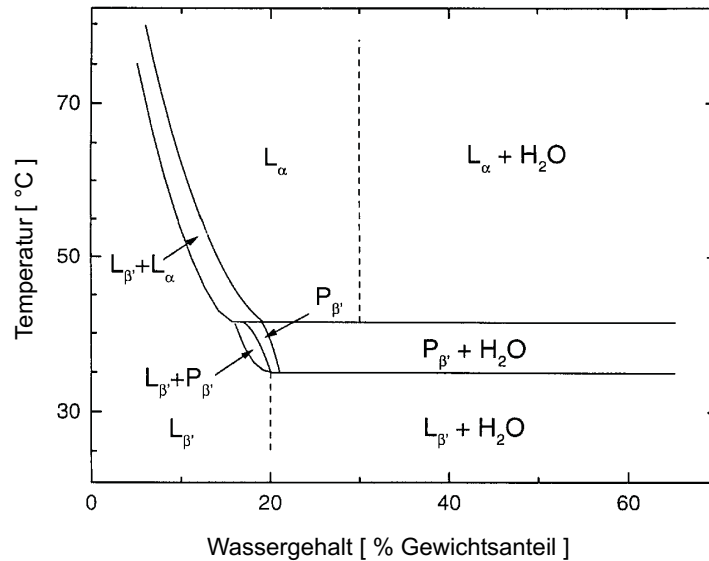


Abbildung 2.4: Phasendiagramm von DPPC [6]

den sind berührungsfrei und *in situ* möglich. Streuexperimente können an Vesikeln in wässriger Lösung vorgenommen werden. Die Struktur der Membranen weist dann keine ausgezeichnete Richtung aus, die Proben sind unorientiert. Im Zusammenhang mit Streuexperimenten spricht man auch von Pulverproben, da die Strukturen wie bei einem kristallinen Pulver isotrop in alle Raumrichtungen verteilt ist. Durch verschiedene Präparationsverfahren ist es darüber hinaus auch möglich Membranen zu orientieren. Dabei sind die Membranen meist durch ein Festkörper-Substrat unterstützt. Zur Untersuchung in Streuexperimenten bieten orientierte Membranen gegenüber unorientierten Vesikeln entscheidende Vorteile. Durch die Orientierung der Probe ist es möglich den reziproken Raum in zwei Dimensionen zu erfassen (siehe Kapitel 3). Durch die Trennung von spekulärer und diffuser Streuung kann zwischen lateralen und vertikalen Strukturen klar unterschieden werden. Multilamellare Systeme sind hier besonders interessant, weil sie im Vergleich mit Einzelmembranen ein stärkeres Streusignal geben.

#### 2.1.4 Systeme festkörpergestützter Lipidmembranen

Unilamellare Vesikel kommen sicherlich der gängigen Vorstellung von einer Zellmembran am nächsten. Festkörpergestützte Membranstapel scheinen auf den

ersten Blick weit von der biologischen Zellmembran entfernt zu sein. Sicherlich ist der Einfluss eines festen Substrates auf eine Membran nicht generell zu vernachlässigen, jedoch kann man auch gerade dadurch über die Eigenschaften der Membran lernen. Nicht zuletzt stellen membranbeschichtete Oberflächen ein interessantes System für neue Materialien dar. Daher ist die Herstellung von substratgestützten Membranen selbst seit einiger Zeit Objekt der Forschung geworden. Es gibt derzeit verschiedene Methoden Lipidmembranen auf

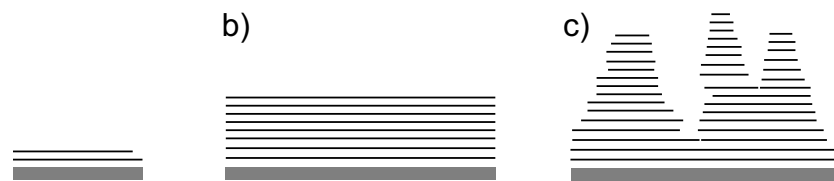


Abbildung 2.5: Drei verschiedene Systeme festkörpergestützter Membranen: a) Einzel und Doppelmembranen, b) Oligo-Membranen, c) Multilamellare Stapel

Festkörper-Oberflächen zu fixieren. Phospholipide können chemisch beispielsweise über Thiolgruppen auf Goldoberflächen verankert werden [15, 16]. In den meisten Verfahren werden die Membranen aber nicht chemisch an das Substrat gebunden sondern allein durch physikalische Wechselwirkung. In dieser Arbeit wird die Untersuchung auf solche Systeme beschränkt. Durch verschiedene Präparationsverfahren (Kapitel 4) ist es möglich unterschiedlich dicke Membranstapel auf Substrate aufzutragen. Dabei ist anhand der unterschiedlichen Anzahl an Membranen zwischen drei Systemen zu unterscheiden (Abb. 2.5). Sehr dicke Stapel von einigen hundert bis tausend Membranen bieten für Streuexperimente den Vorteil eines hohen Streusignals. Zudem wird der (störende) Einfluss des Substrates mit dem Abstand davon nachlassen. Durch die Mittelung in Streuexperimenten über viele hundert Schichten werden solche Randeffekte vernachlässigbar. Derartige Systeme zeichnen sich auch durch ein hohes Maß an Orientierung aus (Fehlorientierungen liegen in der Größenordnung von  $1/100^\circ$  [17]). Die Gesamtdicke der Membranstapel unterliegt jedoch meist einer breiten Verteilungsfunktion über die Probenfläche, so dass keine einheitliche Dicke zugeordnet werden kann (Abb.2.5 c)). Dies ist für die quantitative Auswertung der Experimente häufig störend. Diese Membransysteme werden im folgenden auch als „dicke Proben“ oder „multilamellare Stapel“ bezeichnet.

Bei sehr dünnen Schichten, bestehend aus Einzel- oder Doppelmembranen, hat

man meist sehr gut definierte Systeme. Jedoch muss davon ausgegangen werden, dass beispielsweise Fluktuationen durch das Substrat stark unterdrückt werden (Kap.(2.2)). Die Membran wird so entscheidend verändert. Eine interessante Alternative zu den genannten Systemen stellen Oligo-Membranstapel dar. Solche Stapel, bestehend aus ca. zehn Membranen auf einem Substrat, sind für Streuexperimente interessant, weil die periodische Struktur der Stapel nicht so dominant ist wie bei sehr dicken Filmen, wobei sie aber trotzdem ein stärkeres Signal abgeben als Einzelmembranen. Der Einfluss des Substrates ist auch hier nicht vernachlässigbar, jedoch spiegelt ein strukturreiches Streubild diesen wieder. Insbesondere in spekulärer Reflektivität (siehe Kap. 3) ist das Streubild nicht reduziert auf intensive und scharfe Reflexe, sondern enthält kontinuierliche Strukturen im gesamten  $q_z$ -Bereich des Streuvektors. Die intrinsischen Breiten der Reflexe können hier experimentell gut aufgelöst werden. Kleine Effekte an der Reflexbreite und des Profils, die zum Beispiel durch die Fluktuationen der Membranen hervorgerufen werden, werden messbar.

Aufgrund der vielfältigen Informationen die aus den Streuexperimenten gewonnen werden können muss das Modell zur Beschreibung entsprechend komplex behandelt werden. Der Einfluss des Substrates muss theoretisch sorgfältig berücksichtigt werden. Für ein Verständnis dieser Fragen ist es notwendig, sich sowohl genauer mit den Kräften, die zwischen den Membranen wirken, auseinanderzusetzen, als auch eine Betrachtung der Korrelationsfunktionen bezüglich der Membran-fluktuationen zu berücksichtigen.

### **2.1.5 Präparation von festkörpergestützten Lipidmembranen**

Grundlage für Strukturuntersuchungen an festkörpergestützten Membranen ist eine geeignete Präparationsmethode, um solche Systeme herzustellen. Es gibt verschiedene Verfahren mit denen Membranfilme in unterschiedlichen Dicken hergestellt werden können. Dünne Filme von Einzel- oder Doppelmembranen können mit den bekannten Methoden nach Langmuir-Blodgett und Langmuir-Schaeffer [18, 19, 20], oder durch eine Vesikelfusion (engl. *vesicle fusion*) hergestellt werden [21]. Dicke Filme von einigen hundert bis tausend Membranen können durch das Spreiten (engl. *spreading*) aus organischer Lösung [22] hergestellt werden. Alle Methoden basieren auf der Fähigkeit der Lipide zur Selbstorganisation in Verbindung mit einem hydrophilen oder hydrophoben Substrat. In den Methoden nach

Langmuir-Blodgett und Langmuir-Schaeffer werden, auf einer Wasseroberfläche schwimmende, Monoschichten von Lipiden auf ein hydrophiles Substrat aufgetragen. Durch Wiederholung und Tauchvorgänge können so üblicherweise bis zu zwei Doppelschichten aufgetragen werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Lipide während des ganzen Präparationsprozesses in wässriger Umgebung sind und so keine Änderungen in der Molekülkonformation zu erwarten sind. Dadurch, dass die einzelnen Monoschichten getrennt aufgetragen werden, ist es auch möglich asymmetrische Membranen zu präparieren [23]. Jedoch lassen sich aus Phospholipiden mit dieser Methode kaum mehr als zwei Membranen herstellen, da die Defektdichte mit jeder Monolage zunimmt und der Grad der Bedeckung stark nachlässt. Ähnliches gilt für die Methode der Vesikelfusion. Hier wird in einem Wasserbad eine erste Lipidlage auf dem Substrat adsorbiert. Weitere Lagen können durch Verschmelzung unilamellarer Vesikel mit dieser bestehenden Lipidlage entstehen.

Die Methode des Spreitens aus organischer Lösung ist für dicke Lipidfilme gut etabliert [22, 24, 17, 25]. Dabei werden Lipide in bestimmter Konzentration in einem organischen Lösungsmittel gelöst und auf ein hydrophiles oder hydrophobes Substrat pipettiert. Durch langsame und kontrollierte Verdunstung des Lösungsmittels bilden sich sehr gut orientierte Membranstapel mit Fehlorientierungen (Mosaizität) in der Größenordnung von  $0.01^\circ$  [17, 14]. Die Dicke der daraus entstehenden Lipidfilme liegt üblicherweise zwischen einigen hundert und wenigen tausend Membranen. Durch die Konzentration der Lösung und die verwendete Menge kann die Dicke in diesem Rahmen variiert werden. Es ist jedoch unmöglich eine genau definierte Anzahl von Membranen herzustellen, oder überhaupt einer Probe zuzuordnen. Die Gesamtschichtdicke einer Probe variiert üblicherweise sehr stark über die gesamte Probenfläche.

Für die Präparation von Oligo-Membranen war bisher keine Methode bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, in dem die Methode des Spreitens mit dem für Polymerbeschichtungen sehr verbreiteten [26] Lackschleuder-Verfahrens (engl. *Spin-Coating*) kombiniert wurde [27]. Damit konnten erstmals Lipidfilme von ca. zwei bis ca. 30 Membranen auf Substraten hergestellt werden. Dazu werden die Lipide in einem organischen Lösungsmittel gelöst und auf ein hydrophiles oder hydrophobes Substrat pipettiert, welches mit einer Belackungsschleuder in Rotation versetzt wird (siehe Kap. 4.1.2). Durch Variation der Lösungskonzentration und der Rotationsfrequenzen ist es möglich, die Anzahl der Membranen in den Filmen zu kontrollieren. Die so präparierten Filme zeichnen sich durch eine hohe Homogenität und eine sehr geringe Mo-

saizität (= Grad an Fehlorientierung) ähnlich den gespreiteten Proben aus. Die genaue Vorgehensweise und eine Charakterisierung der Proben werden in Kapitel 4.1.2 ausführlicher beschrieben.

## 2.2 Lipidmembranen als smektische Phase

### 2.2.1 Fluktuationen einer Membran

Theoretisch lassen sich multilamellare Lipidmembranstapel in der  $L_\alpha$  Phase als in zwei Dimensionen isotrope Schichten beschreiben. Senkrecht zu den Schichten ist die Symmetrie gebrochen. Es handelt sich also weder um eine Flüssigkeit noch handelt es sich um einen kristallinen Festkörper, da dieser ausschließlich gegenüber diskreten Symmetriegruppen invariant ist. Man spricht hier von einem Flüssigkristall [28, 29]. Flüssigkristalle unterscheidet man nach ihrer Struktur in cholesterische, nematische und smektische Phasen. Scheibenförmige Moleküle aggregieren eher zu cholesterischen Phasen, stäbchenförmige Moleküle bilden nematische oder smektische Phasen. Nematische Flüssigkristalle zeichnen sich dadurch aus, dass sich die Moleküle in translatorischer Unordnung befinden. Die Rotation der Moleküle ist jedoch stark anisotrop. Alle Moleküle haben die gleiche mittlere Orientierung im Raum. In einem smektischen Flüssigkristall sind die Moleküle zusätzlich zu Schichten angeordnet, innerhalb derer sich die Moleküle jedoch frei bewegen können. Zu der Anisotropie bezüglich der Rotation kommt also hier ein eindimensionale Anisotropie bezüglich der Translation. Je nach Orientierung der Moleküle in den Schichten unterscheidet man wiederum zwischen den Klassen smektisch A (Moleküle parallel zur Normalen der Schichtebene) und smektisch C (Moleküle gegenüber der Schichtnormalen gekippt). Die in dieser Arbeit untersuchten, multilamellaren Lipidstapel gehören zum Typ smektisch A. Eine Membran mit den angrenzenden Wasserschichten bildet eine Schicht des smektischen Flüssigkristalls. Die Dicke der Wasserschicht  $d_W$  zwischen zwei Membranen wird durch ein Gleichgewicht von repulsiven und attraktiven Kräften (siehe unten) bestimmt. Die Struktur ist also in dieser Dimension periodisch mit der Periode  $d$ . Lateral (in der Membranebene) zeichnen sich die Lipidmoleküle durch eine hohe Diffusionskonstante aus. Aus der Festkörper-Theorie ist bekannt, dass Systeme von eindimensionaler Ordnung unter Berücksichtigung thermischer Fluktuationen keine langreichweitige Ordnung besitzen [28]. Diesen Sachverhalt



nennt man Landau-Peierls Instabilität. Um die Stabilität eines solchen Flüssigkristalls zu beschreiben, muss man die elastische Verformungsenergie betrachten. Die Scherelastizität verschwindet aufgrund der lateralen Mobilität der Moleküle. Dagegen ist die Biegeelastizität für die Konformation von Membranen wesentlich [30, 31]. Die freie Energie pro Flächenelement einer Membran lässt sich in Entwicklung bis zur zweiten Ordnung der Krümmung schreiben als [32]

$$f = 2\gamma + 0.5\kappa_s \frac{(A - A_0)^2}{A_0^2} + 2\kappa(M - M_0) + \bar{\kappa}G, \quad (2.1)$$

mit der Grenzflächenenergie  $\gamma$ . Dabei stellt sich die mittlere Fläche pro Kopfgruppe  $A_0$  so ein, dass  $f$  minimiert wird, - die erste Ordnung fällt also weg. Die Kompressibilität der Lipide innerhalb der Membran ist, mit typischerweise  $\kappa_s \simeq 0.3k_B T/\text{\AA}^2$ , so groß, dass der zweite Term vernachlässigt werden kann. Es bleiben die Terme der Gaußschen Krümmung  $G = 1/(R_1 R_2)$  und der mittleren Krümmung  $M = 0.5(1/R_1 + 1/R_2)$  mit den Hauptkrümmungsradien  $R_1$  und  $R_2$ . Die Koeffizienten  $\kappa$  und  $\bar{\kappa}$  lassen sich aus dem molekularen Aufbau der Lipiddoppelschicht herleiten [33]. Für eine Membran der hydrophoben Kettenlänge  $l_0$  und der mittleren Fläche pro Kopfgruppe  $A_0$  erhält man

$$\kappa \propto \frac{l_0^3}{A_0^5}. \quad (2.2)$$

Im Fall von geladenen Membranen muss ein elektrostatischer Anteil addiert werden [34, 35]:

$$\delta\kappa^{el} = \pi \frac{\sigma^2 \lambda_D^3}{\epsilon_{H_2O}} \quad (2.3)$$

mit der Oberflächenladungsdichte  $\sigma$ , der Debye-Hückel Länge  $\lambda_D$  und der Dielektrizitätskonstante für Wasser  $\epsilon_{H_2O}$ . Das Konzept der Biegeelastizität ist schon seit einigen Jahren durch quantitative Experimente an Membranen [36] und Vesikeln [37, 38, 39] experimentell gut bestätigt. Nun verschwindet nach dem Theorem von Gauß und Bonnet jedes Integral über eine geschlossene Fläche vom Genus 0, so dass man für Membranen ohne Poren und Ränder nur den vorletzten Term der Gleichung 2.1 berücksichtigen muss.

In dieser Arbeit werden keine isolierten Einzelmembranen untersucht, sondern multilamellare Systeme. Thermische Fluktuationen führen nun neben Krümmungsmoden auch zu Dichteschwankungen, also lokaler Kompression und Dekompression durch Schwankungen des Membranabstandes. Die freie Energie

des Lipidmembranstapels läßt sich dann in Analogie zum dreidimensionalen smektischen Flüssigkristall behandeln. Sie setzt sich zusammen aus der freien Energie des Volumens und einem Oberflächenbeitrag. Im Grenzfall eines unendlich ausgedehnten Membranstapels kann man die Oberflächenterme vernachlässigen und die freie Energie in Kontinuumsnäherung angeben. Im folgenden Abschnitt soll dieser Grenzfall mit den Auswirkungen auf die lokalen Fluktuationsamplituden etwas näher beleuchtet werden.

### 2.2.2 Fluktuationen multilamellarer Membranen im Volumen (*bulk*)

In Kontinuumsnäherung lässt sich die linearisierte freie Energie im Volumen eines smektischen Flüssigkristalls in der Monge-Darstellung schreiben: [28, 29]

$$\frac{F}{V} = \frac{1}{2} \left[ B \left( \frac{\partial u(r_{\parallel}, z)}{\partial z} \right)^2 + K (\nabla_{\parallel} u(r_{\parallel}, z))^2 \right]. \quad (2.4)$$

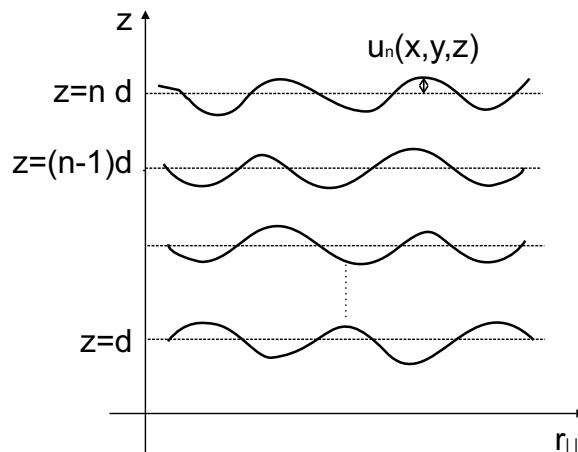


Abbildung 2.6: Die freie Energie eines Membranstapels wird in Koordinaten der lokalen Auslenkungen der Membranen aus der Gleichgewichtslage in z-Richtung beschrieben.

Fluktuationen werden dabei als lokale Auslenkungen der Membran aus der Gleichgewichtslage in z-Richtung  $u = u(r_{\parallel}, z)$  ausgedrückt (siehe Abb. 2.6). Da die Schichten in  $xy$ -Richtung isotrop sind, können die lateralen Koordinaten zu

$r_{||} = \sqrt{x^2 + y^2}$  zusammengefasst werden. Die freie Energie ist charakterisiert durch die elastischen Konstanten, den Biegemodul  $K[J/m^3]$  und den Kompressionsmodul  $B[J/m]$ .  $K$  ist proportional zur Biegesteifigkeit  $\kappa$  einer einzelnen Membran  $K = \kappa/d$  mit dem lamellaren Gleichgewichtsabstand  $d$  als Proportionalitätsfaktor. Nach Fouriertransformation in drei Dimensionen lautet das Freie-Energie-Funktional

$$F = \frac{1}{2} (Bq_z^2 + Kq_{||}^4) u^2(\mathbf{q}). \quad (2.5)$$

mit  $q_{||} = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$ . Durch Anwendung des Gleichverteilungssatzes folgt

$$\langle u^2(\mathbf{q}) \rangle = \frac{k_B T}{Bq_z^2 + Kq_{||}^4}. \quad (2.6)$$

Für das mittlere Auslenkungsquadrat  $\langle u^2(\mathbf{r} = 0) \rangle$  einer Membran erhält man

$$\begin{aligned} \langle u^2(0) \rangle &= \frac{kT}{(2\pi)^3} \int d^3\mathbf{q} \frac{1}{Bq_z^2 + Kq_{||}^4} \\ &\approx \frac{k_B T}{4\pi\sqrt{BK}} \ln\left(\frac{q_{max}}{q_{min}}\right), \end{aligned} \quad (2.7)$$

wobei  $q_{max} = 2\pi/a_0$  und  $q_{min} = 2\pi/S$  durch den intermolekularen Abstand  $a_0$  und die laterale Probenausdehnung  $S$  gegeben sind. Entsprechend kann die vollständige Korrelationsfunktion<sup>1</sup>  $G(r_{||}, z) = \langle \exp(iq_0[u(r_{||}, z) - u(0, 0)]) \rangle$  berechnet werden (siehe z.B. [40] und [41])

$$G(r_{||}, z) = \exp(-8\eta\Gamma) \left(\frac{4d^2}{r_{||}^2}\right)^\eta \cdot \exp\left[-\eta E_1\left(\frac{r_{||}^2}{4\lambda z}\right)\right]. \quad (2.8)$$

Hierbei wurden die so genannte de Gennes'sche-Eindringtiefe  $\lambda = \sqrt{K/B}$  und der Caillé-Parameter  $\eta = \frac{\pi}{2} \frac{k_B T}{B\lambda d^2}$  [40] eingeführt.  $\Gamma$  bezeichnet die Eulerzahl und  $E_1(z)$  das Exponentialintegral [42]

$$E_1(x) := \int_{t=x}^{\infty} dt \frac{e^{-t}}{t}. \quad (2.9)$$

Man beachte, dass der Ursprung des Koordinatensystems im Volumen nicht festgelegt ist. Die Koordinaten beziehen sich also auf die relative Lage zu einem

<sup>1</sup>Diese Definition der Korrelationsfunktion beruht auf der Originalarbeit von Caillé [40]. In den folgenden Kapiteln wird mit  $g(r_{||}, z) = \langle [u(r_{||}, z) - u(0, 0)]^2 \rangle$  eine andere Definition der Korrelationsfunktion verwendet.

willkürlichen Ursprung. Diese Darstellung der Fluktuationen auf Basis der linearisierten freien Energie in Kontinuumsnäherung bildet die Grundlage des so genannten Caillé-Modells [40] zur Beschreibung des Strukturfaktors in Streuexperimenten. Theoretisch lassen sich dadurch die elastischen Konstanten  $K$  und  $B$  durch Linienprofilanalyse bestimmen. Experimente an hochorientierten Membransystemen bei partieller Hydratisierung zeigten eine Unterdrückung des Landau-Peierls-Effekts [25]. Damit lassen sich die elastischen Konstanten auch nicht direkt bestimmen. Neben dem Einfluss statischer Defekte auf die Fluktuationen muss auch der Einfluss des flachen Substrates und der partiellen Hydratisierung berücksichtigt werden [32].

### 2.2.3 Fluktuationen festkörpergestützter Lipidmembranen

Die Beschreibung der Oligo-Membranstapel erfordert zusätzliche Betrachtungen, da die Membranen in dem Stapel einem unterschiedlich starken Einfluss des Substrates unterliegen. Durch das flache, starre Substrat werden die Fluktuationen an der Substrat-Lipid Grenzfläche unterdrückt. Die Korrelation der Fluktuationen hängt somit nicht nur von den relativen Koordinaten zweier Membranen ab, sondern auch von der absoluten Lage der Membran bezogen zum Substrat. Durch das Substrat ist ein Nullpunkt festgelegt. Auch ist die reine Betrachtung in Kontinuumsnäherung für Oligo-Membranstapel, die aus nur wenigen Membranen bestehen, in Frage zu stellen. Im folgenden wird, speziell für die in dieser Arbeit untersuchten Oligo-Membranen, ein Modell zur Beschreibung der Fluktuationen in festkörpergestützten Membranen hergeleitet [43]. Wir betrachten einen Stapel von  $N$  Membranen auf einem festen Substrat in Wasser. Die Membranen haben untereinander den Gleichgewichtsabstand  $d$ . Man beginnt mit der freien Energie in Kontinuumsnäherung. Im Unterschied zu der obigen Betrachtung werden jetzt die Oberflächenbeiträge der freien Energie berücksichtigt. Zu dem bekannten Volumen-Term (2.4) wird ein Oberflächenterm mit der Oberflächenspannung  $\gamma$  addiert (Vergl. [44, 45, 46]). Das Freie-Energie-Funktional lautet dann

$$F = \frac{1}{2} \int_V d\mathbf{r} \left[ B \left( \frac{\partial u(\mathbf{r}_{||}, z)}{\partial z} \right)^2 + K (\Delta_{||} u(\mathbf{r}_{||}, z))^2 \right] + \frac{\gamma}{2} \int_S d\mathbf{r}_{||} (\nabla_{||} u(\mathbf{r}_{||}, L))^2. \quad (2.10)$$

$L = n \cdot d$  ist hierbei die  $z$ -Koordinate der Grenzfläche von Membranstapel zu Wasser. Der Beitrag der unteren Grenzfläche zwischen Substrat und Membranstapel bei  $z = 0$  verschwindet, da die Fluktuationen hier durch das flache Substrat

unterdrückt werden und das Substrat selbst als 0-te Membran mit  $u(\mathbf{r}_{||}, 0) = 0$  berücksichtigt wird. Einem Ansatz von Poniewierski und Hołyst [46] folgend, sollen die Deformationen in unabhängige Moden zerlegt werden. Nach Fouriertransformation von  $u(\mathbf{r}_{||}, z)$  in der Ebene der Membranen:

$$u(\mathbf{r}_{||}, z) = \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\mathbf{q}_{||}} \exp(-i\mathbf{q}_{||}\mathbf{r}_{||}) u(\mathbf{q}_{||}, z), \quad (2.11)$$

lässt sich die freie Energie als Summe  $F = \sum_{\mathbf{q}_{||}} F_{\mathbf{q}_{||}}$  schreiben mit:

$$F_{\mathbf{q}_{||}} = \frac{1}{2} \int_0^L dz [B \left| \frac{\partial u(\mathbf{q}_{||}, z)}{\partial z} \right|^2 + K \mathbf{q}_{||}^4 |u(\mathbf{q}_{||}, z)|^2] + \frac{\gamma}{2} \mathbf{q}_{||}^2 |u(\mathbf{q}_{||}, L)|^2. \quad (2.12)$$

Durch geeignete Wahl der Randbedingungen können die Oberflächenterme eliminiert werden. In diesem Fall, da das angrenzende Medium an der Grenzfläche  $z = L$  Wasser ist, kann die Oberflächenspannung  $\gamma = 0$  angenommen werden [47, 35, 48, 49]. Die Randbedingungen für  $u(\mathbf{q}_{||}, z)$  lauten dann:

$$\begin{aligned} u(\mathbf{r}_{||}, 0) &= 0 \\ \frac{\partial u(\mathbf{r}_{||}, z)}{\partial z} \Big|_{z=L} &= 0. \end{aligned} \quad (2.13)$$

$u(\mathbf{q}_{||}, z)$  kann dann in ein System von  $N$  orthonormalen, harmonischen Funktionen  $f_n(z)$  entwickelt werden:

$$u(\mathbf{q}_{||}, z) = \sum_{n=1}^{N-1} \delta u_n(\mathbf{q}_{||}) f_n(z). \quad (2.14)$$

Die Summation geht über  $N$  unabhängige Moden, wobei der diskrete Charakter der  $N$  Membranen in das Modell eingeht. Für die gegebenen Randbedingungen lauten die  $f_n(z)$ :

$$f_n(z) = \sqrt{\frac{2}{L}} \sin\left(\frac{2n-1}{2} \pi \frac{z}{L}\right). \quad (2.15)$$

nach Anwendung des Gleichverteilungssatzes kann wieder die Korrelationsfunktion  $C(\mathbf{q}_{||}, z, z') = \langle u(\mathbf{q}_{||}, z) u(-\mathbf{q}_{||}, z') \rangle$  berechnet werden zu:

$$C(\mathbf{q}_{||}, z, z') = \sum_{n=1}^{N-1} f_n(z) f_n(z') \langle |\delta u_n(\mathbf{q}_{||})|^2 \rangle. \quad (2.16)$$

Die Amplituden sind gegeben durch:

$$\begin{aligned} \langle |\delta u_n(\mathbf{q}_{||})|^2 \rangle &= \frac{k_B T}{B \left( \frac{2n-1}{2} \frac{\pi}{L} \right)^2 + K \mathbf{q}_{||}^4} \\ &= \frac{k_B T}{B} \frac{4L^2}{(2n-1)^2 \pi^2} \frac{1}{1 + (\xi_n q_{||})^4}, \end{aligned} \quad (2.17)$$

wobei  $\xi_n^2 = \frac{2L\lambda}{(2n-1)\pi}$ , und  $\lambda = \sqrt{K/B}$  eingeführt wurden. Nach Rücktransformation in den Realraum und für den Fall  $\mathbf{r}_{||} = 0$  lautet die Korrelationsfunktion dann [43]

$$C(0, z, z') = \eta \left( \frac{d}{\pi} \right)^2 \sum_{n=1}^{N-1} \frac{1}{2n-1} \sin\left( \frac{2n-1}{2} \pi \frac{z}{L} \right) \sin\left( \frac{2n-1}{2} \pi \frac{z'}{L} \right), \quad (2.18)$$

wobei  $\eta = \frac{\pi}{2} \frac{k_B T}{B \lambda d^2}$  wieder der Caillé-Parameter ist.

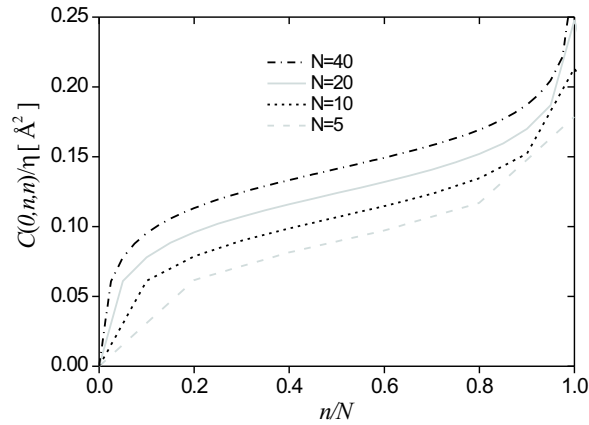


Abbildung 2.7: Korrelationsfunktion  $C(0, n, n)$  für die  $n$ -te Membran in einem Stapel von  $N$  Membranen auf einem Festkörpersubstrat

In drei Dimensionen lautet die Korrelationsfunktion [43]:

$$\begin{aligned} C(r, z, z') &= \eta \left( \frac{d}{\pi} \right)^2 \sum_{n=1}^N \frac{4}{(2n-1)\pi} \\ &\cdot \sin\left( \frac{2n-1}{2} \pi \frac{z}{L} \right) \sin\left( \frac{2n-1}{2} \pi \frac{z'}{L} \right) \mathcal{M}\left( \frac{r}{\xi_n} \right), \end{aligned} \quad (2.19)$$

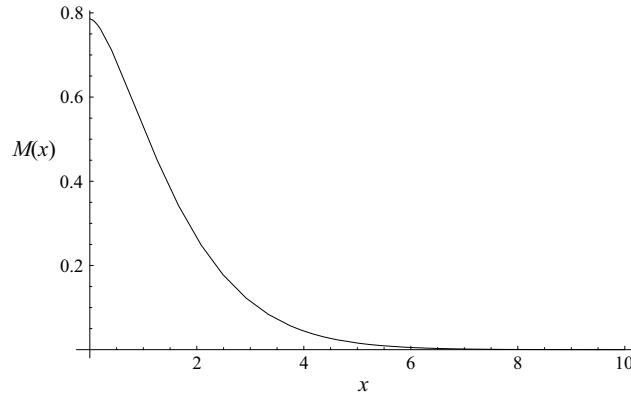


Abbildung 2.8: Die Funktion  $\mathcal{M}(x)$   
[43]

wobei die Funktion  $\mathcal{M}$  durch die Meijer G Funktion ausgedrückt werden kann:

$$\mathcal{M}(x) = \int_0^\infty dq q \frac{J_0(qx)}{1+q^4} = \frac{1}{4} G_{01}^{04} \left( \frac{x^4}{256} \mid 0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0 \right) \quad (2.20)$$

Zur Verdeutlichung der diskreten Struktur des Membranstapels soll die Korrelationsfunktion im folgenden mit  $C_{m,n}(r_{||}) = C(r_{||}, z = md, z' = nd)$  bezeichnet werden.

Von Shalaginov und Romanov [44] wurde, ebenfalls von dem kontinuierlichen Freie-Energie-Funktional Gleichung (2.4) ausgehend, ein Modell für die Fluktuationen in Abhängigkeit der Oberflächenspannungen an den beiden Grenzflächen  $\gamma_0$  und  $\gamma_L$  hergeleitet. Dabei wird in 3-Dimensionen Fourier-transformiert und über die Wellenlängen der Fluktuationen lateral integriert. Das Ergebnis ist stark abhängig von den Integrationsgrenzen, welche durch den lateralen Molekülabstand  $a_0$  und die Probenausdehnung  $S$  bestimmt sein sollen. Für eine bestimmte obere Grenze  $2\pi/a_0$  und die Oberflächenspannungen  $\gamma_0 = \infty$  und  $\gamma_L = 0$  stimmt das Ergebnis von Shalaginov und Romanov mit dem oben hergeleiteten Ergebnis überein. Durch die Diskretisierung und die Summation über  $N$  unabhängige Moden ergibt sich im oben beschriebenen Modell das Problem der Integrationsgrenzen nicht. Ein Vorteil dieses Modells liegt auch in der einfachen Berechenbarkeit, besonders für den spekulären Fall (Gleichung 2.18).

## 2.3 Wechselwirkungen zwischen Membranen

Die Periode  $d$  im multilamellaren Membranstapel ist bestimmt durch ein Gleichgewicht repulsiver und attraktiver Kräfte. Auch die elastischen Eigenschaften wie zum Beispiel der Kompressionsmodul  $B$  hängen von den Potentialen ab. Im diesem Abschnitt sollen die einzelnen Beiträge zum Wechselwirkungspotential zwischen zwei benachbarten Membranen näher betrachtet werden. Nach einem zusammenfassenden Abschnitt über das Gesamtpotential und die Folgerungen daraus wird eine Methode zur Bestimmung der Potentiale mit osmotischem Druck vorgestellt. Alle Potentiale sind Funktionen der Wasserschichtdicke zwischen den Membranen. Für die Bestimmung der Wasserschichtdicke gibt es verschiedene Konventionen, die sich in unterschiedlichen Potentialparametern äussern. Das Kapitel schliesst mit einem Abschnitt, in dem diese verschiedenen Definitionen erläutert werden.

### 2.3.1 Wechselwirkungspotentiale

#### Van der Waals Potential

Die Van der Waals Wechselwirkung resultiert auf molekularer Ebene aus dem Einfluss gegenseitig induzierter Dipolmomente. [5]. Die aufwändige Herleitung erfolgt üblicherweise über die Lifshitz-Theorie [50]. Der allgemeine Fall der Wechselwirkung zweier Schichtsysteme über eine Grenzschicht wurde von Parsegian und Ninham hergeleitet [51]. Darauf beruht die ausführliche Betrachtung von Fenzl [52] für den Fall der Wechselwirkung zwischen zwei Membranen. Die folgende Darstellung orientiert sich in wesentlichen Teilen an Fenzls Betrachtung. Das Potential zwischen zwei Membranen wird berechnet für das vereinfachte System zweier, durch eine Wasserschicht der Dicke  $d_h$  getrennte, Kohlenwasserstoffschichten der Dicke  $a$ , die zwei Halbräume, bestehend aus Wasser, abgrenzen (siehe Abb. 2.9). Die Kohlenwasserstoffschichten stellen die Acylketten der Lipide einer Membran mit der hydrophoben Dicke  $a$  dar. Die polaren Kopfgruppen der Lipide werden aufgrund ihrer dielektrischen Eigenschaften in diesem Modell der Wasserschicht zugeordnet. Der Abstand  $d_h$  der Schichten bezeichnet also die hydrophile Dicke  $d_h = d_{fl} + 2d_k$  als Summe der eigentlichen *flüssigen* Wasserschichtdicke  $d_{fl}$  und der zweifachen Kopfgruppendiffe  $d_k$  der Lipide. Das Van der Waals Potential wird summiert über Beiträge in Abhängigkeit der tempera-





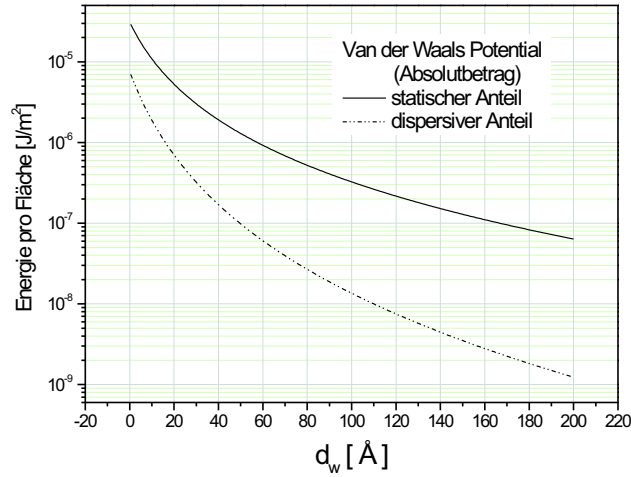


Abbildung 2.10: Absolutbetrag des statischen (Gleichung 2.21) und des dispersiven (Gleichung 2.26) Van der Waals Potentials für salzfreie Systeme<sup>3</sup>. Berechnung für  $a = 25 \text{ \AA}$ ,  $d_k = 9 \text{ \AA}$  und  $T=313 \text{ K}$ .

zweier, durch eine dünne Wasserschicht getrennter Halbräume aus Kohlenwasserstoff ausgedrückt. Es gilt dann mit  $d_h \rightarrow 0$  [52]:

$$V_0(d_h, T) = \frac{H_{stat}(l_{DH})k_B T}{12\pi} \frac{1}{d_h^2}, \quad (2.22)$$

wobei  $H_{stat}(l_{DH})$  die statische Hamakerkonstante bezeichnet. Durch die Abhängigkeit der Debye-Hückel-Länge  $l_{DH}$  hängt auch  $H_{stat}$  von einer Elektrolytkonzentration in der Wasserschicht ab. Wenn die Wasserschicht pro Einheitsvolumen  $n_i$  Ionen der Sorte  $i$  und der Ladung  $q_i$  enthält, ist die Debye-Hückel-Länge gegeben durch [54]

$$l_{DH} \equiv \left[ \epsilon_{H_2O} T \sum n_i q_i^2 \right]^{1/2}. \quad (2.23)$$

Im Grenzfall hoher Elektrolytkonzentrationen, wenn  $l_{DH}/d_h \ll 1$  gilt für die statische Hamakerkonstante [54]

$$H_{stat}(l_{DH}) = H_{stat}(\infty) \exp\left(-\frac{2d_h}{l_{DH}}\right), \quad (2.24)$$

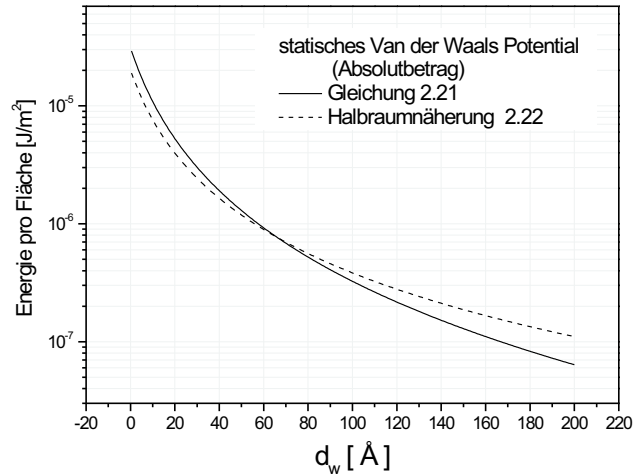


Abbildung 2.11: Absolutbetrag des statischen Van der Waals Potentials<sup>3</sup> berechnet nach 2.21 im Vergleich mit der Halbraumnäherung 2.22 mit  $H_{stat} = -0.6$ .

mit der statischen Hamakerkonstante in salzfreien Systemen [52]

$$H_{stat}(\infty) = -\frac{3}{4} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{(\Delta_0^2)^j}{j^3}. \quad (2.25)$$

Der statische Anteil des Van der Waals Potentials wird also in stark elektrolythaltigen Systemen unterdrückt, wohingegen er in salzfreien Systemen dominiert (vgl. Abb. 2.10<sup>3</sup>)[54].

Für den **dispersiven Anteil** gilt die Bedingung (Siehe Fußnote <sup>2</sup> auf der vorherigen Seite)  $\Delta_n^2 \ll 1$ . Der Faktor  $(1 - \Delta_n^2 \exp(-ax/d_h))^{-2}$  in Gleichung (2.21) kann dann vernachlässigt werden und nach Entwicklung des Logarithmus bis zur

<sup>3</sup> Der statische Anteil wurde berechnet durch den Term  $n = 0$  von Gleichung (2.21). Für die numerische Integration wurde eine obere Grenze von 100 gewählt. Der dispersive Anteil wurde berechnet mit Gleichung (2.26), wobei die Summe nach dem 200. Glied abgebrochen wurde. Für alle Berechnungen wurde  $a = 25 \text{ \AA}$  und  $d_k = 9 \text{ \AA}$  angenommen

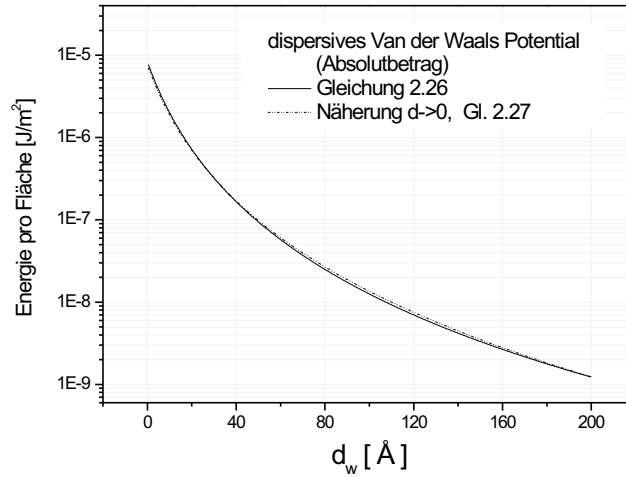


Abbildung 2.12: Absolutbetrag des dispersiven Van-der-Waals-Potentials berechnet<sup>3</sup> nach Gleichung 2.26 im Vergleich mit der Berechnung nach Gleichung (2.27) mit  $H_{dis} = -0.75$ .

ersten Ordnung folgt [52]

$$\begin{aligned}
 V_{VdW}(d_h, T) = & - \frac{k_B T}{8\pi d_h^2} \sum_{n=0}^{\infty} \Delta_n^2 \left\{ (1 + r_n) \exp(-r_n) \right. \\
 & - 2 \frac{1 + (1 + a/d_h)r_n}{1 + a/d_h} \exp(-(1 + a/d_h)r_n) \\
 & \left. + \frac{1 + (1 + 2a/d_h)r_n}{1 + 2a/d_h} \exp(-(1 + 2a/d_h)r_n) \right\}. \quad (2.26)
 \end{aligned}$$

Mit der Bedingung  $\omega_n = 0$  oder  $d_h = 0$  folgt aus 2.26 eine in der Literatur [55, 56, 57] häufig verwendete Form des Potentials

$$V_{dis}(d_h) = \frac{H_{dis} k_B T}{16\pi d_h^2} \left[ 1 - \frac{2}{(1 + a/d_h)^2} + \frac{1}{(1 + 2a/d_h)^2} \right] \quad (2.27)$$

mit der dispersiven Hamakerkonstante  $H_{dis} = 2 \sum_{n=0}^{\infty} \Delta_n^2$  [52].

Durch die Bedingung  $\omega_n = 0$  ist der statische Anteil definiert. Für ein Kohlenwasserstoff-Wasser-System gilt jedoch  $\Delta_0 \approx (80 - 2)/(80 + 2) = 0.95$

was nur wenig kleiner als 1 ist. Die Voraussetzung für 2.26 ist also für den statischen Fall nicht erfüllt und damit die Näherung 2.27 nicht gültig (vergl. [52]). Der dispersive Anteil hingegen wird durch Gleichung (2.27) gut angenähert (Abb. (2.12)).

Zusammenfassend lässt sich der statische Anteil für Wasserschichtdicken von 10–200 Å durch die Halbraumnäherung mit einem großen Fehler <30% annähern. Wie aber aus Abb. 2.11 ersichtlich, weicht die Steigung in der Halbraumnäherung (2.22) stark von der Steigung aus Gleichung (2.21) ab. Für die Berechnung des Druckes und höherer Ableitungen sollte deshalb auf Gleichung 2.21 zurückgegriffen werden. Für den dispersiven Anteil kann die Näherung 2.27 verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der statische Anteil des Van der Waals Potentials durch den Term  $n=0$  der Gleichung 2.21 berechnet. Der dispersive Term wurde nach Gleichung 2.26 berechnet<sup>3</sup>. Das zur Berechnung verwendete Mathematica Skript ist in Anhang B zu finden.

### Hydrationspotential

Aus Messungen der lamellaren Periode  $d$  in multilamellaren Vesikeln bei verschiedenen osmotischen Drücken wurde die Existenz einer kurzreichweitigen repulsiven Wechselwirkung postuliert [58, 59]. Der hydrophile Charakter der Phospholipide führt zu einer Absenkung der freien Energie, wenn die hydrophilen Kopfgruppen mit Wasser umgeben sind. Die Ausbildung einer endlichen Wasserschicht zwischen den Membranen wird begünstigt. Dies führt zu dem Auftreten der sogenannten Hydrationswechselwirkung. Sie wird durch den empirischen Ansatz

$$V_{hyd}(d_w) = H_0 e^{-d_w/\lambda_h} \quad (2.28)$$

mit  $H_0$  typischerweise in der Größenordnung von wenigen  $k_B T \text{Å}^{-2}$  und  $\lambda_h \simeq 2 \text{Å}$  beschrieben [57]. Die theoretische Beschreibung der Wechselwirkung wird noch immer kontrovers diskutiert. Der empirische Ansatz ist jedoch gut bestätigt.

### Geladene Membranen und Poisson-Boltzmann-Gleichung

Natürliche Membranen bestehen häufig aus geladenen Lipiden, also aus Lipiden deren Kopfgruppe eine Ladung trägt. Diese Ladung wird von mehr oder weniger gebundenen Gegenionen (z.B.  $Na^+$ ,  $K^+$ ) ausgeglichen so, dass die Membranen makroskopisch neutral sind. Wenn sich diese geladenen Lipide zu Doppelschichten in Multilamellaren Systemen ausbilden, sind diese Gegenionen in der Wasserschicht zwischen den Membranen gelöst. Die Verteilung der Gegenionen in der Wasserschicht wird durch die Poisson-Boltzmann Gleichung beschrieben [5, 51].

Die Ladungsträgerkonzentration in der Wasserschicht führt zu einer Erhöhung des osmotischen Druckes zwischen den Membranen. Dadurch wird eine starke Repulsion ausgeübt. Das repulsive Potential zwischen geladenen Membranen resultiert daher nur indirekt von einer elektrostatischen Kraft. Es ist vielmehr entropischer Natur. Für den Fall zweier, gleichmäßig negativ geladener Platten der Flächenladungsdichte  $\sigma$ , welche durch eine Wasserschicht mit positiven Gegenionen getrennt sind, lässt sich eine einfache Lösung der Poisson-Boltzmann Gleichung in Mean-Field-Theorie angeben [60, 61, 62]. Für hohe Ladungsdichten und große Abstände gilt für die Wechselwirkungsenergie der Platten pro Einheitsfläche

$$V(d_w) = \frac{\pi^2 kT}{4L_e d} \cdot \left[ 1 - \frac{1}{\sigma L_e d_w} + \left( \frac{1}{\sigma L_e d_w} \right)^2 \right] \quad (2.29)$$

[62] mit der Bjerrumlänge  $L_e = \frac{\pi \cdot e^2}{\epsilon_{H_2O} k_B T}$ . In Gegenwart von Überschuss-Wasser sind solche Systeme niemals stabil. Bringt man ein System von geladenen Membranen in Kontakt mit einem Wasserreservoir, so vergrößert sich die Wasserschicht zwischen den Membranen immer weiter. Aus entropischen Gründen bildet sich kein Gleichgewicht, und die Membranen entbinden. Dass in der Natur trotzdem häufig geladene Membranen auftreten können liegt daran, dass die Membranen hier nie mit reinem Wasser in Kontakt sind, sondern immer eine Elektrolytkonzentration vorliegt. Dadurch kann der osmotische Druck zwischen den Membranen und außerhalb ausgeglichen sein. Eine Ladungskonzentration im Wasser bewirkt durch die veränderte Debeye-Hückel-Länge auch eine Änderung des Van-der-Waals-Potentials [35]. Neuere Arbeiten zeigen, dass die Gegenionverteilung in geladenen Membranen nur unter Einschränkungen durch die Poisson-Boltzmann-Verteilung beschreibbar ist [63].

**Helfrich-Potential** Für die oben beschriebenen Potentiale konnte außer Acht gelassen werden, dass die Membranen keine starren Platten sind, sondern vielmehr thermisch um ihre Gleichgewichtslage fluktuieren. Tatsächlich jedoch verursachen diese Fluktuationen im Membranstapel ein zusätzliches langreichweitiges repulsives Potential. Anschaulich gesprochen führt die Tatsache, dass sich benachbarte Membranen nicht gegenseitig durchdringen können, zu einer sterischen Repulsion. Im Gegensatz zum Zustand freier Membranen schränken in multilamellarer Anordnung die umgebenden Membranen den Phasenraum der Membranfluktuationen ein, was die Entropie des Systems verringert. Die repulsive Wechselwirkung ist also eine Folge der Entropiedifferenz zwischen einer einzelnen freien Membran und einer in einem Stapel gebundenen Membran. Sie wurde von Helfrich [64] in

Molekularfeldnäherung angegeben:

$$f_s = \frac{2\pi^2}{128} \frac{(k_B T)^2}{\kappa} \frac{1}{d_w^2}, \quad (2.30)$$

Es gibt auch zahlreiche andere Formulierungen unter Einbeziehung starrer oder weicher Begrenzungen (engl. *hard confinement*, *soft confinement*) für eine einzelne Membran [65, 66]. In der Tat zeigt sich aus theoretischen Betrachtungen, dass das Potential stark von Randbedingungen, wie den anderen Potentialen und der Stapelgeometrie abhängig ist [67]. Eine einfache Superposition der Potentiale ist daher unter Einbeziehung der sterischen Abstoßung nicht immer zulässig [56]. Mecke et al. [68, 19] hat entsprechende Berechnungen für Substratgestützte Einzelmembranen im Rahmen einer selbstkonsistenten Theorie angestellt. Eine Ausweitung der Theorie auf multilamellare Systeme verspricht eine Verbesserung des Ansatzes für festkörpergestützte Membranen.

Die Fluktuations-Wechselwirkung spielt vor allem für den thermisch induzierten Adhäsionsübergang [56, 69, 17, 70] eine Rolle, da die Abstoßung quadratisch mit der Temperatur zunimmt. Bei Temperaturen von 30°C bis 45°C, bei denen die Experimente durchgeführt wurden, spielt die Fluktuations-Wechselwirkung für die vergleichsweise steifen DMPC-Membranen mit  $\kappa \geq 9 k_B T$  eine untergeordnete Rolle.

### 2.3.2 Bestimmung der Membraneigenschaften aus den Wechselwirkungspotentialen

Aus den Potentialen lassen sich fundamentale Eigenschaften der Membranstapel ableiten. Der Gleichgewichtsabstand  $d_w$  zweier Membranen im Stapel ist bestimmt durch das Minimum des Gesamtpotentials. Hier herrscht ein Gleichgewicht zwischen attraktiven und repulsiven Kräften. Nun kann aber nicht nur die Gleichgewichtsperiode durch die Potentiale berechnet werden. Auch die elastischen Eigenschaften der Membranen hängen von den Potentialen ab. Durch die zweite Ableitung des Potentials an der Stelle des Minimums kann der Kompressionsmodul  $B$  errechnet werden nach

$$B = d \cdot \left( \frac{\partial^2 V}{\partial d_w^2} \right). \quad (2.31)$$

Für geladene Membranen überwiegt der Beitrag der elektrostatischen Abstoßung alle anderen natürlichen Kräfte und ohne einen osmotischen Gegendruck ist bei

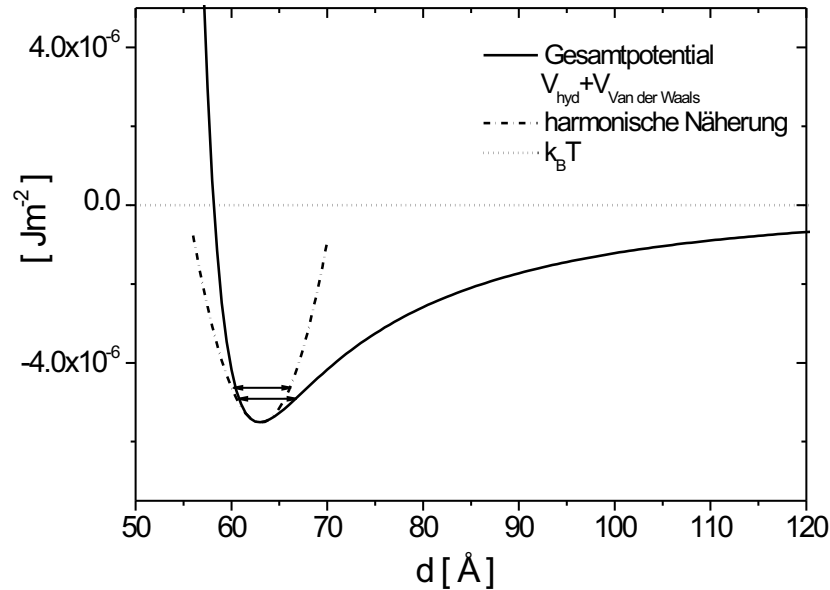


Abbildung 2.13: Die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei DMPC Membranen ohne äußeren osmotischen Druck setzt sich im Wesentlichen zusammen aus dem Van der Waals Potential und dem Hydrationspotential. Die horizontale Linie markiert die Energie  $k_B T$ . Die Parabel zeigt eine harmonische Näherung an das Potential in der Umgebung des Gleichgewichtsabstandes  $d_w$ . Durch die Pfeile wird exemplarisch die Fluktuationsamplitude der zehnten Membran im Stapel von ca. 6 Å markiert.

voller Hydratisierung kein Gleichgewicht möglich. Die Beiträge aus Van der Waals Potential, Hydrationskraft und sterischer Abstoßung liegen zwei bis drei Größenordnungen unterhalb der elektrostatischen Abstoßung. Sie haben praktisch keinen Einfluß auf den Gleichgewichtsabstand und das Krümmungsmodul. Diese Werte werden allein aus den Beiträgen von elektrostatischer Abstoßung und osmotischem Druck bestimmt. Für die Betrachtung an ungeladenen Membranen fällt dieser Term des elektrostatischen Potentials weg, das Gesamtpotential wird dominiert von den Beiträgen aus Van der Waals Kraft und Hydrationskraft, auch hier liegt die Fluktuationswechselwirkung zwei Größenordnungen unter den beiden anderen Beiträgen und kann daher vernachlässigt werden. Hier ist das



einzig attraktive Potential der Van der Waals Kraft ausreichend für einen stabilen Gleichgewichtszustand. Durch einen äußeren osmotischen Druck kann ein zusätzliches attraktives Potential künstlich erzeugt werden. Durch gezielte Variation des Druckes kann die Gleichgewichtsperiode  $d$  verändert werden, und so der Verlauf der Potentiale mit der Wasserschichtdicke  $d_w$  gemessen werden.

### 2.3.3 Osmotischer Druck als veränderliches attraktives Potential

Zur experimentellen Bestimmung der Wechselwirkungspotentiale gibt es verschiedenen Ansätze. Neben der direkten Kraftmessung durch Rasterkraftmikroskopie oder den surface force apparatus [59] ist eine elegante Methode die Anwendung von osmotischem Druck. Die Methode beruht im Prinzip darauf, dass die Aktivität des Wassers im System durch einen darin gelösten Stoff, der ansonsten nicht mit dem System in Wechselwirkung tritt, herabgesetzt wird. Der gelöste Stoff kann beispielsweise aus großen Polymeren bestehen. Die Aktivität aller Wasserkompartimente, die für die Polymere unerreichbar sind wird durch die Polymerkonzentration kontrolliert. Im Fall von Lipidmembranenstapeln sind diese Wasserkompartimente die Wasserschichten zwischen den Membranen. Die großen Polymere können nicht in diese eindringen. Es entsteht eine Differenz des osmotischen Druckes zwischen den Membranen und außerhalb. Durch diesen osmotischen Druck  $\Pi_{osm}$  verringert sich der Abstand der wechselwirkenden Komponenten – also der Membranen – bis ein neues Gleichgewicht mit den Wechselwirkungspotentialen erreicht ist. Der osmotische Druck bewirkt also ein zusätzliches attraktives Potential. Dieses ist proportional zur Wasserschichtdicke  $d_w$  [59]

$$V(d_w) = \Pi_{osm} \cdot d_w. \quad (2.32)$$

Der Definitionsbereich des Potentials 2.32 ist durch die Größe der verwendeten Polymere eingeschränkt. Wenn die Wasserschichtdicke zu groß wird können Polymere zwischen die Membranen eindringen und das Druckgefälle zerstören. Osmotischer Druck kann, außer über Polymerlösungen, auch durch Hydratisation des Systems aus Wasserdampf von bekannter relativer Luftfeuchtigkeit ausgeübt werden. Eine relative Luftfeuchtigkeit  $p/p_0$  bewirkt einen effektiven osmotischen Druck  $\Pi_{osm} = (k_B T / v_w) \ln(p_0/p)$ , wobei  $v_w$  das partielle molare Volumen des Wassers ist. Die experimentelle Umsetzung des osmotischen Druckes mit Polymerlösungen ist in Kapitel 4 beschrieben.

### 2.3.4 Definition der Wasserschichtdicke $d_w$

Die genannten Potentiale sind alle Funktionen der Wasserschichtdicke  $d_w$  zwischen den Membranen. Aus den Reflektivitätsmessungen (siehe Kapitel 3) ist zunächst nur die Gesamtperiode  $d$  direkt ablesbar. Die Wasserdicke  $d_w$  wird meist anhand des Elektronendichteprofiles ermittelt oder aus dem Mol-Verhältnis der Komponenten Wasser und Lipid berechnet [59]. Dabei ergeben sich, je nach Konvention, verschiedene Werte. Um die Potential-Parameter (auch) mit Literaturwerten vergleichen zu können, muss man die jeweilige Definition von  $d_w$  berücksichtigen. Eine Methode basiert auf der Bestimmung des Wasservolumens pro Lipidmolekül. Durch Integration der Elektronendichte über eine Periode  $d$  erhält man die Gesamtelektronenzahl  $n_\Sigma$  pro Fläche.

$$n_\Sigma = \int_{-d/2}^{d/2} \rho(z) dz, \quad N_\Sigma = n_\Sigma A_{lip} \quad (2.33)$$

Nach Multiplikation mit der mittleren Fläche pro Lipid  $A_{lip}$  und Subtraktion der Gesamtzahl von Elektronen in zwei Lipidmolekülen  $2N_{lip}$  erhält man die Anzahl der Wasser-Elektronen pro zwei Lipidmoleküle. Daraus lässt sich leicht das Wasservolumen berechnen. Durch Teilen des Wasservolumens durch die mittlere Fläche pro Lipid  $A_{lip}$  erhält man die Dicke  $d_w$ . Aufgrund der strengen Aufteilung in ein Wasservolumen und ein Lipidvolumen wird diese Methode auch als Komponenten Methode bezeichnet. Sie ist sinnvoll für die Beschreibung des durch osmotischen Druck ausgeübten Potentials und des Hydrationspotentials, da der physikalische Effekt des Hinzufügens oder Wegnehmens von Wassermolekülen gut wiedergespiegelt wird. Der Nullpunkt mit der nominellen Wasserdicke  $d_w = 0$  beschreibt hier den Zustand völlig dehydratisierter Membranen.

Eine andere Methode definiert sich anhand des experimentell bestimmten Elektronendichteprofiles (Kapitel 3). In Abbildung 2.14 ist diese veranschaulicht. Hier geht man davon aus, dass sich ein Teil der Wassermoleküle zwischen den Lipidkopfgruppen einer Monoschicht befindet. Damit werden sie zur Membrandicke  $d_{bil}$  gerechnet. Der andere Teil der Wassermoleküle bildet die flüssige Wasserschicht der Dicke  $d_{fl}$ . Die Membrandicke  $d_{bil}$  wird aus dem experimentell bestimmten Elektronendichteprofil (Abb. 2.14 und Kapitel 3) bestimmt zu  $d_{bil} = d_{pp} + d_k$ . Dabei bezeichnet  $d_{pp}$  den Abstand der beiden Maxima im Elektronendichteprofil, welcher die Positionen der Phosphoratome im Molekül markiert. Die mittlere

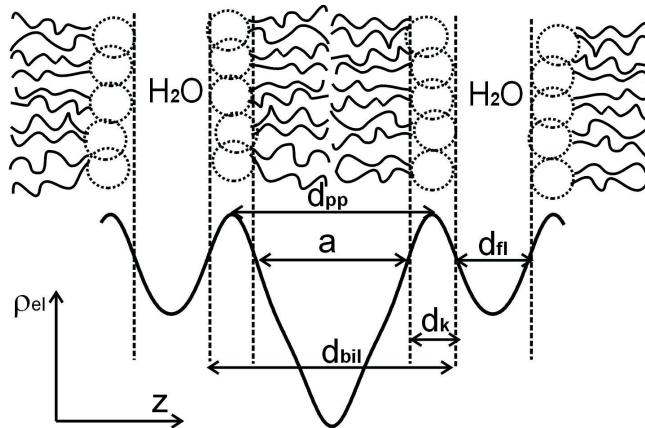


Abbildung 2.14: Definition der Wasserschichtdicke und Membrandicke anhand des Elektronendichteprofiles.

Kopfgruppendicke wird mit  $d_k \approx 9 \text{ \AA}$  angenommen. Der Nullpunkt  $d_{fl} = 0$  bezeichnet hier einen Zustand bei dem noch reichlich Wasser im System vorhanden ist. Bei der Verwendung dieser Konvention muss beachtet werden, wie ein Offset in der Wasserschichtdicke in die Potentiale eingeht. Für das Hydrationspotential verändert sich nur der empirisch bestimmte Vorfaktor  $H_0$ . Zu dem Potential des osmotischen Druckes muss ein konstanter Offset addiert werden. Für die Berechnung des Van-der-Waals-Potentials ist diese Konvention dagegen sinnvoll, da Wasser und Kopfgruppen aufgrund ihrer polaren Eigenschaften zusammen gefasst werden. Zwar geht in die Berechnung nicht die Wasserschichtdicke  $d_{fl}$  ein, sondern die hydrophile Dicke  $d_h$  und die hydrophobe Dicke  $a$ , diese lassen sich jedoch in entsprechender Weise aus dem Phosphor-Phosphor Abstand  $d_{pp}$  bestimmen durch  $a = d_{pp} - d_k$  und  $d_h = d - a$ . Der Unterschied zwischen den beiden Konventionen liegt für DMPC bei  $7 - 8 \text{ \AA}$ . Die Membrandicke  $d_m$  aus der Komponenten Methode ist üblicherweise nur um  $1 - 2 \text{ \AA}$  dicker als der Phosphor-Phosphor Abstand  $d_{pp}$ , welcher somit einen guten Anhaltspunkt für die Membrandicke bzw. die Wasserdicke  $d_w$  bietet.



# Kapitel 3

## Grundlagen der Reflektivität und Modellbildung

In diesem Kapitel sollen die Grundlagen der Reflektivitätsmessungen mittels Röntgenstrahlung erläutert werden. Es wird die Streugeometrie und die Konstruktion des Reziproken Raumes vorgestellt. Verschiedene Messmodi werden besprochen, wobei der Schwerpunkt auf der Messung der spekulären Reflektivität liegt. Sie ist die wichtigste in dieser Arbeit verwendete Methode. Ausgehend von der kinematischen Theorie wird ein Modell zur Beschreibung der in dieser Arbeit untersuchten Systeme entwickelt.

### 3.1 Grundlagen

Die Streuung von Röntgenstrahlen ist (neben der Streuung von Neutronen) die klassische Untersuchungsmethode zum Studium struktureller Eigenschaften kondensierter Materie. Sie hat in den letzten Jahrzehnten durch den Bau von leistungsstarken Speicherringen mit hoch brillanten Strahlungsquellen einen neuen Aufschwung erlebt. Für ausführliche Darstellungen der Methoden sei auf ein breites Spektrum an Büchern, welche die verschiedensten Aspekte abdecken, verwiesen (z.B. [71, 72, 73, 74, 75]). Bei der Methode der Reflektivität trifft ein monochromatischer Röntgenstrahl unter bestimmtem Einfallswinkel auf eine Probe, wird daran gestreut und unter einem definierten Ausfallswinkel detektiert. Aus der Messung der gestreuten Intensität des gestreuten Strahls als Funktion der Impulsänderung zwischen einfallender und gestreuter Welle im Streuprozess wird die

Strukturamplitude des zu untersuchenden Systems bestimmt. Da Röntgenstrahlung an den Hüllenelektronen der Atome gestreut wird, ist die zu bestimmende Größe, die Elektronendichte.

### 3.1.1 Streugeometrie und Reziproker Raum

In diesem Abschnitt wird die Streugeometrie und die Konstruktion des reziproken Raumes vorgestellt. Dabei werden die grundlegenden Definitionen bezüglich des Koordinatensystems und der verwendeten Winkelbezeichnungen in den Experimenten festgelegt. Das Koordinatensystem wird so gewählt, dass die positive z-Achse parallel zur Probenormalen zeigt. Die x-Achse steht dazu senkrecht und zeigt in Richtung des einfallenden Strahls. Zusammen mit der y-Achse ergibt sich ein rechtshändiges Koordinatensystem. Ein einfallender Strahl der Wellenlänge  $\lambda$  mit dem Wellenvektor  $\vec{k}_i$  definiert mit der Oberflächennormalen der Probe die Einfallsebene. Der Strahl trifft unter dem Winkel  $\alpha_i$  auf die Probe.

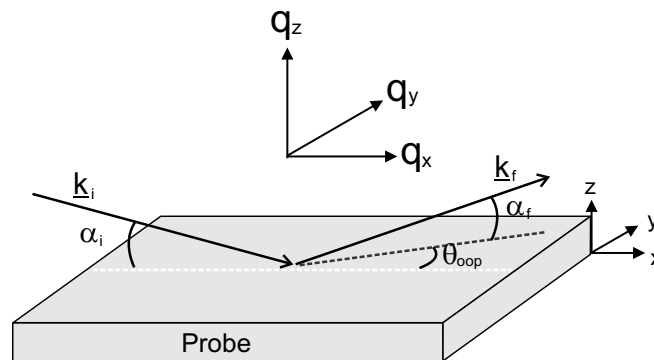


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten Streugeometrie. Der einfallende Strahl trifft unter dem Winkel  $\alpha_i$  auf die Probe. Der ausfallende Strahl wird unter dem Winkel  $\alpha_f$  und dem Winkel  $\theta_{oop}$  senkrecht zur Einfallsebene detektiert. Entgegen der in der Optik üblichen Konvention werden die Winkel nicht gegenüber der Grenzflächennormalen sondern gegenüber der Grenzfläche gerechnet.

Unter dem Winkel  $\alpha_f$  und einem Winkel  $\theta_{oop}$  senkrecht zur Einfallsebene wird die Intensität des gestreuten Strahls mit Wellenvektor  $\vec{k}_f$  gemessen. Die durch

den Streuprozess verursachte Impulsdifferenz  $\vec{q}$  zwischen Anfangszustand  $|\vec{k}_i\rangle$  und Endzustand  $|\vec{k}_f\rangle$  der Röntgenquanten definiert den Streuvektor  $\vec{q}$

$$\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i. \quad (3.1)$$

Seine Komponenten lauten:

$$q_x = \frac{2\pi}{\lambda} (\cos(\alpha_f) \cos(\theta_{oop}) - \cos(\alpha_i)), \quad (3.2)$$

$$q_y = \frac{2\pi}{\lambda} (\cos(\alpha_f) \sin(\theta_{oop})), \quad (3.3)$$

$$q_z = \frac{2\pi}{\lambda} (\sin(\alpha_f) + \sin(\alpha_i)). \quad (3.4)$$

Sie spannen den reziproken Raum auf. Anhand der in Abhängigkeit des Impulsübertrags  $\vec{q}$  gemessenen Intensität  $I(\vec{q})$  kann nun die Strukturamplitude  $F(\vec{q})$ <sup>1</sup> des zu untersuchenden Systems bestimmt werden:

$$I(\vec{q}) \sim |F(\vec{q})|^2 \text{ mit } F(\vec{q}) = \int_{dV} e^{i\vec{q}\vec{r}} \rho(\vec{r}) d\vec{r}. \quad (3.5)$$

Da Röntgenstrahlen an den Hüllenelektronen in der Probe gestreut werden, stellt die Strukturamplitude  $F(\vec{q})$  gemäß Gleichung 3.5 die Fouriertransformierte der Ortsraumelektronendichte  $\rho(\vec{r})$  dar.

Unter der spekulären Bedingung in der Reflexionsebene (Einfallswinkel  $\alpha_i =$  Ausfallswinkel  $\alpha_f$ , und  $\theta_{oop} = 0$ ) hat man einen Impulsübertrag nur in vertikaler  $z$ -Richtung. Im Idealfall der Streuung eines einfallenden Strahls mit verschwindender Divergenz an einem lateral völlig homogenen und glatten Schichtsystem mit der Periode  $d$  in Stapelrichtung  $z$  ist die  $q_z$  Achse im Reziproken Raum einziger Träger endlicher Intensität. An den Positionen  $q_z = n \frac{2\pi}{d}$  ( $n \in \mathbb{IN}$ ) treten Intensitätsmaxima, sogenannte Bragg-Maxima auf. Im Fall einer realen Probe, bestehend aus weichen Lipdmembranen sind die Schichten zwar lateral weitgehend homogen, jedoch fluktuieren diese um ihre Gleichgewichtslage in Stapelrichtung. Die Fluktuationen der Membranen im Stapel sind, abhängig von ihrer lateralen Längenskala und dem Abstand der Membranen, in vertikaler Stapelrichtung korreliert. Dadurch werden die Bragg-Maxima im Streubild in  $q_x$  und

<sup>1</sup>Eigentlich muss hier der Impulsübertrag in der Probe  $\vec{q}' = \vec{k}_f' - \vec{k}_i'$  betrachtet werden. Durch Brechung der ein- und ausfallenden Wellen ist dieser nicht in jedem Fall identisch mit dem außerhalb ermittelten Impulsübertrag. Diese Abweichung spielt vor allem bei kleinen Impulsüberträgen eine Rolle und muss bei der Auswertung von Experimenten berücksichtigt werden.

$q_y$  Richtung ausgedehnt zu so genannten Bragg-Sheets. Für ein in  $x$ - $y$ -Richtung isotropes System kann man die beiden lateralen Komponenten des Streuvektors zusammenfassen zu  $q_{||} = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$ . Entsprechend bezeichnet man auch  $q_z = q_{\perp}$ . Abbildung 3.2 zeigt schematisch das Streubild eines fluktuierenden Lipidmembranstapels im reziproken Raum für  $q_y = 0$ . Die beiden grau unterlegten

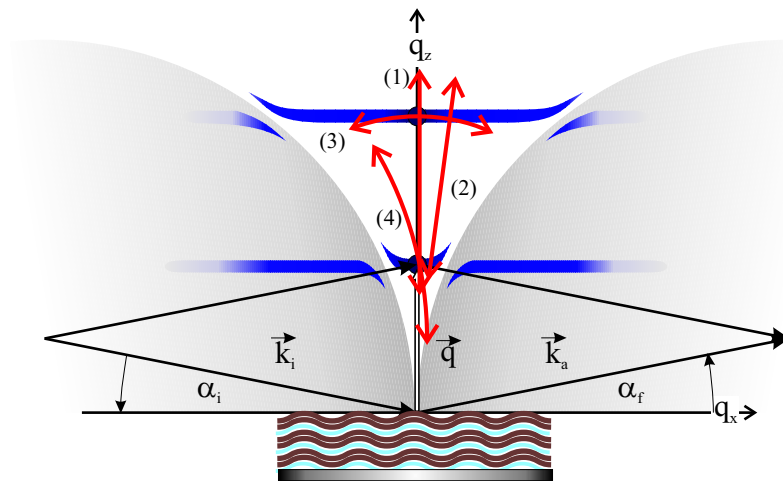


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Streubildes eines Stapels aus fluktuierenden Lipidmembranen im reziproken Raum mit der Konstruktion aus einfallendem und ausfallendem Strahl. Die nummerierten Pfeile im Bild stellen die geläufigsten Messmodi dar.

Halbkreisflächen stellen die Laue Bereiche dar. Mit Röntgenstrahlen sind diese nicht zu erreichen, da entweder der einfallende oder der ausfallende Strahl durch den Probenhorizont ausgeblendet werden<sup>2</sup>. Um entsprechende Impulsüberträge mit Röntgenstrahlen zu erreichen muss man die Einfallsebene verlassen und die Intensität unter einem Winkel  $\theta_{oop} \neq 0$  messen. Als nummerierte Linien eingezeichnet sind die geläufigsten Messmodi: Die spekuläre Reflektivität (1) erhält man wenn man die Winkel des einfallenden und reflektierten Strahls gemeinsam variiert, so dass immer gilt  $\alpha_i = \alpha_f$ . Technisch erreicht man das bei festem Einfallstrahl damit, dass man Winkel von Detektor ( $\alpha_i + \alpha_f$ ) und Probe ( $\alpha_i$ ) im Verhältnis 2:1 bewegt. Die Reflektivität wird daher oft auch als 2:1 Scan be-

<sup>2</sup>Mit Neutronen können diese Bereiche erreicht werden, da das Probenmaterial für diese in der Regel transparent ist und daher ein Wechsel von Reflektionsgeometrie in Transmissionsgeometrie möglich ist.



zeichnet. Sie ist die wichtigste in dieser Arbeit verwendete Methode und wird in den folgenden Abschnitten genauer behandelt. Mit Nummer (2) gekennzeichnet ist die sogenannte *Offset*-Messung. Sie wird ähnlich wie die spekuläre Reflektivität gemessen, jedoch wird der Einfallswinkel mit einem kleinen konstanten Offsetwinkel zum halben Detektorwinkel variiert. Die Offset-Messung wird häufig verwendet um das diffuse Streusignal nahe der spekulären Achse zu bestimmen. Dieses kann dann für die Auswertung der spekulären Intensität als diffuser Untergrund abgezogen werden (siehe Kapitel 3.2.2). Bei der Messung des so genannten *Rocking-Scans* (3) wird der Detektorwinkel ( $\alpha_i + \alpha_f$ ) konstant gehalten, während der Einfallswinkel  $\alpha_i$  von 0 bis  $\alpha_f$  variiert wird. Im *Rocking-Scan* ist die Auflösung bezüglich des lateralen Impulsübertrags  $q_{||}$  besonders gut, mit ihm lässt sich die Orientierungsverteilung, oder *Mosaizität* in einer Probe bestimmen. Schliesslich sei noch der *Detektor-Scan* (4) erwähnt. Bei ihm wird der Einfallswinkel konstant gehalten während der Detektorwinkel variiert wird. Häufig wird mit einem eindimensionalen oder zweidimensionalen ortsauflösenden Detektor (PSD, engl. *position sensitive detector*) gemessen. Dabei wird automatisch ein Detektor-Scan gemessen. Mit Diffraktometersteuerungsprogrammen lassen sich auch beliebige andere Bahnen oder mehrdimensionale Rastermessungen (engl. *reciprocal space mappings*) im reziproken Raum fahren.

### 3.1.2 spekuläre Reflektivität

Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben, erfolgt die Messung der spekulären Reflektivität indem ein monochromatischer Röntgenstrahl unter dem Einfallswinkel  $\alpha_i$  auf die Probe trifft und das reflektierte Signal unter dem Ausfallswinkel  $\alpha_f = \alpha_i$  in der Einfallsebene ( $\theta_{opp} = 0$ ) detektiert wird. Ein Impulsübertrag erfolgt dabei nur in  $z$ -Richtung. Daher ist die Messung sensitiv auf das Elektronendichteprofil entlang der  $z$ -Richtung. Bevor ein Modell zur Auswertung solcher Messungen mit der Bestimmung des Elektronendichteprofiles eingeführt und diskutiert wird, sollen zunächst einige Grundbegriffe erläutert werden.

Man betrachte eine ebene elektromagnetische Welle, die aus einem Medium mit Brechungsindex  $n_1$  auf eine glatte Grenzfläche zu einem Medium mit Brechungsindex  $n_2$  fällt. Aus den Stetigkeitsbedingungen an die Felder in den Maxwell Gleichungen lassen sich die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten nach den Fresnelschen Formeln berechnen. Im Grenzfall kleiner Einfallswinkel und kleiner Abweichungen der Brechungsindizes von eins, sind diese unabhängig von der Po-

larisationsrichtung [76] und ergeben sich zu

$$r = \frac{k_z^i - k_z^t}{k_z^i + k_z^t}, \quad t = \frac{2k_z^i}{k_z^i + k_z^t} = 1 + r, \quad (3.6)$$

mit den  $z$ -Komponenten der Wellenvektoren des einfallenden und des gebrochenen Strahls:

$$k_z^i = \frac{2\pi \sin\alpha_i}{\lambda}, \quad k_z^t = \frac{2\pi \sin\alpha_t}{\lambda}, \quad \text{mit } \alpha_{i,t} := \text{Einfalls-/Brechungswinkel.} \quad (3.7)$$

Aufgrund der Abhängigkeit des Brechungsindex von elektronischen Resonanzen ist der Brechungsindex für Röntgenstrahlen in Materie geringfügig kleiner als eins. Nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz existiert daher für den Übergang von Luft zu Materie ein Winkelbereich externer Totalreflexion. Dieser Bereich endet am so genannten kritischen Winkel  $\alpha_c \approx \sqrt{2\delta}$  mit  $\delta := \text{Re}(1 - n)$ . Für Röntgenstrahlung lässt sich der Brechungsindex schreiben als

$$n = 1 - \frac{r_e \rho_{el} N_A \lambda^2}{2\pi A} (f_0 + f' + i f'') = 1 - \delta + i\beta \quad (3.8)$$

mit

$$\delta = \frac{r_e \rho_{el} N_A \lambda^2}{2\pi A} (f_0 + f'), \quad (3.9)$$

$$\beta = \frac{r_e \rho_{el} N_A \lambda^2}{2\pi A} f'', \quad (3.10)$$

$$f = f_0 + f' + i f'', \quad (3.11)$$

wobei die auftretenden Variablen folgende Bedeutung haben [77], [78]:

- $r_e$  : klassischer Elektronenradius ( $2.814 \cdot 10^{-5} \text{Å}$ )
- $\rho_{el}$  : Elektronendichte
- $N_A$  : Avogadrokonstante ( $6.022 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}$ )
- $f$  : Atomformfaktor des streuenden Elements
- $f_0$  : unkorrigierter Atomformfaktor; bei Streuung in Vorwärtsrichtung :  $f_0 \approx Z$
- $Z$  : Kernladungszahl
- $f'$  : erste Korrektur des Atomformfaktors (dispersiver Anteil)
- $f''$  : zweite Korrektur des Atomformfaktors (Absorptionskorrektur)
- $\delta$  : Dispersionsanteil des Brechungsindex
- $\beta$  : Absorptionsanteil des Brechungsindex.

Typische Werte für  $\delta$  liegen in der Größenordnung von  $10^{-5}$ , so daß  $n$  in der Tat sehr nahe bei eins liegt, falls der Absorptionsanteil  $\beta$  - wie in den meisten Fällen zutreffend - zu vernachlässigen ist. Mit dem so genannten 'Parratt-Algorithmus' [79] lässt sich die Reflexion bzw. Transmission durch rekursive Anwendung für beliebige Schichtsysteme berechnen. Dabei wird  $n(z)$  dem Schichtsystem entsprechend als Stufenfunktion vorgegeben und die Amplituden der ebenen Wellen werden von Schicht zu Schicht durch Multiplikation von Übergangsmatrizen bestimmt.

Kontinuierliche Elektronendichteprofile bzw. Verläufe des Brechungsindex  $n(z)$  werden dann abschnittsweise als Stufenfunktion mit Grenzflächen endlicher Breite  $\sigma$  (bzw. endlichen Fluktuationen  $\sigma_{fl}$ ) definiert.

Für ein Modell mit endlicher Gaußscher Grenzflächenbreite lassen sich die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten berechnen [80], [81], [82]:

$$r'_{j,i} = r_{j,i} \cdot e^{-2k_j k_i \sigma^2}, \quad t'_{j,i} = t_{j,i} \cdot e^{\frac{1}{2}(k_j - k_i)^2 \sigma^2}, \quad (3.12)$$

wobei  $r_{j,i}$  und  $t_{j,i}$  die Reflexions- bzw. Transmissionskoeffizienten beim Übergang von der  $i$ -ten zur  $j$ -ten Schicht unter der Annahme ideal glatter Grenzflächen bezeichnen und  $r'_{j,i}$  und  $t'_{j,i}$  die entsprechenden Koeffizienten im Falle

rauer Grenzflächen. Die Grenzflächenbreite oder Rauigkeit  $\sigma$  (definiert über die Fehlerfunktion bzw. die entsprechende Gaußfunktion) führt also zu einer Verminderung der Reflektivität. Für  $\alpha_0 \geq \alpha_c$  konvergiert der Faktor sehr schnell gegen den gewöhnlichen Debye-Waller-Faktor  $\exp[-(q_z\sigma)^2]$ . Die Reflektivität  $R$  lässt sich damit als Produkt der Fresnelreflektivität  $R_F$  und einem Rauigkeitsterm schreiben als

$$R = R_F \cdot e^{-(q_z\sigma)^2}, \quad (3.13)$$

$$R_F = r^2 = \left( \frac{q_z - q'_z}{q_z + q'_z} \right)^2, \quad (3.14)$$

wobei für den Impulsübertrag  $q'_z$  im Medium gilt:

$$q'_z = \sqrt{q_z^2 - q_c^2}, \quad (3.15)$$

mit dem Impulsübertrag  $q_c$  am kritischen Winkel  $\alpha_c$ .

Die Verwendung des Parratt-Algorithmus ist für die Anpassungen multilamellarer Membransysteme problematisch. Die Näherung für die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten in Gleichung 3.12 ist lediglich für Systeme mit, im Vergleich zur Einzelschichtdicke, kleiner Grenzflächenbreite ohne Einschränkung anwendbar.

Weiche Membranstapel weisen – lateral über die Probenfläche gemittelt – ein stark ausgedehntes Elektronendichteprofil auf. In diesem Profil steckt ein Beitrag der intrinsischen Membranrauigkeit und die Rauigkeit durch laterale Fluktuationen. In früheren Experimenten zeigte sich, dass die in Gl. (3.12) gemachte Näherung für  $r$  und  $t$  für diese Systeme nicht anwendbar ist [83, 84]. Darüberhinaus lassen sich sowohl der Verlust der langreichweitigen Ordnung im Stapel durch starke Fluktuationen im Zustand vollständiger Hydratation als auch Variationen in der Gesamtschichtdicke in einen dynamischen Ansatz nur schwer integrieren. Eine bessere Lösung dieser Probleme bietet ein Ansatz in kinematischer (Born-scher) Näherung. Ein verallgemeinertes kinematisches Modell wurde in Salditt *et al.* [85] beschrieben. Im folgenden soll dieses Modell für die Berechnung der Reflektivität an substratgestützten Membransystemen durch die Berücksichtigung der Membranfluktuationen erweitert werden.

## 3.2 Modellbildung: Reflektivität an dünnen substratgestützten Lipidfilmen

### 3.2.1 Formfaktor und Strukturfaktor

Unter Vernachlässigung von Vielfachstreuungprozessen kann die Reflektivität an einer rauen Grenzfläche in Bornscher Näherung durch die so genannte Master Formel [73] der Reflektivität berechnet werden:

$$R(q_z) = R_F(q_z) \cdot \left| \frac{1}{\rho_{12}} \int_0^\infty \frac{d\rho(z)}{dz} e^{iq_z z} dz \right|^2 \quad (3.16)$$

$\rho(z)$  bezeichnet dabei das Elektronendichteprofil der Probe in  $z$ -Richtung.  $R_F$  ist die Fresnel Reflektivität einer gedachten Grenzfläche zwischen Wasser und Siliziumsubstrat nach Gleichung (3.14).  $\rho_{12}$  bezeichnet den Gesamtsprung der Elektronendichte von Wasser zu Substrat. Das Elektronendichteprofil des Membranstapels wird in diesem Ansatz als intrinsisches Grenzflächenprofil behandelt. Das Elektronendichteprofil der gesamten Probe, bestehend aus  $N$  Membranen auf einem Substrat in wässriger Umgebung lässt sich wie folgt ausdrücken

$$\rho(z) = \rho_{Si} - \text{erf}(-d_0, \sigma, \rho_{12}) + \sum_{n=0}^{N-1} \rho_0(z - nd + u_n), \quad (3.17)$$

wobei  $\rho_0(z)$  die Elektronendichte einer einzelnen Membran im Stapel ist. Sie ist nur innerhalb der Grenzen  $-d/2 \leq z \leq d/2$  von Null verschieden. Die thermischen Fluktuationen der Membranen werden durch den Term  $u_n = u(z = nd)$  berücksichtigt. Er beschreibt die Auslenkung der  $n$ -ten Membran in  $z$ -Richtung aus ihrer Ruhelage bei  $z = nd$  (siehe auch Kapitel 2.2). Zunächst seien die  $u_n$  unabhängig von der lateralen Koordinate  $r_{||}$  angenommen [86]. Mit der Normierung auf den Gesamtsprung der Elektronendichte  $\rho_{12} = \rho_{Si} - \rho_{H_2O}$

$$\rho'(z) := \frac{\rho(z) - \rho_{H_2O}}{\rho_{12}} \quad (3.18)$$

$$\rho'(z) = 0 - \text{erf}(-d_0, \sigma, 1) + \sum_{n=0}^{N-1} \rho'_0(z - nd + u_n) \quad (3.19)$$

und der Substitution  $z_n := z - nd + u_n$  lautet die Formel für die Reflektivität:

$$R(q_z) = R_F(q_z) \cdot \left| \int_0^\infty \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{z+d_0}{\sigma}\right)^2} \cdot e^{iq_z z} dz + \int_0^\infty \sum_{n=0}^{N-1} \frac{d\rho'_0(z_n)}{dz_n} e^{iq_z(z_n+nd-u_n)} dz_n \right|^2 \quad (3.20)$$

$$= R_F(q_z) \cdot \left| \underbrace{e^{-iq_z d_0} e^{\frac{q_z^2 \sigma^2}{2}}}_{\text{Substrat}} + \underbrace{\int_0^\infty \frac{d\rho'_0(z)}{dz} e^{iq_z z} dz}_{\text{Formfaktor}} \cdot \underbrace{\sum_{n=0}^{N-1} e^{iq_z nd} e^{-iq_z u_n}}_{\text{Strukturfaktor}} \right|^2 \quad (3.21)$$

Nach Ausmultiplizieren des Quadrates spaltet der Term in drei Summanden:

$$R(q_z) = R_F(q_z) \cdot (R1(q_z) + R2(q_z) + R3(q_z)) \quad (3.22)$$

mit

$$R1(q_z) = \left\langle e^{-q_z^2 \sigma^2} \right\rangle \quad (3.23)$$

$$\begin{aligned} C - \left\langle e^{-iq_z d_0 - \frac{q_z^2 \sigma^2}{2}} \cdot F f(q_z)^* \cdot \sum_{n=0}^{N-1} e^{-iq_z nd} e^{iq_z u_n} \right. \\ \left. + e^{iq_z d_0 - \frac{q_z^2 \sigma^2}{2}} \cdot F f(q_z) \cdot \sum_{n=0}^{N-1} e^{iq_z nd} e^{-iq_z u_n} \right\rangle \\ = -e^{-\frac{q_z^2 \sigma^2}{2}} \sum_{n=0}^{N-1} \left\langle F f^*(q_z) \cdot e^{-iq_z(d_0+nd)} e^{iq_z u_n} + F f(q_z) \cdot e^{iq_z(d_0+nd)} e^{-iq_z u_n} \right\rangle, \end{aligned}$$

mit dem Formfaktor

$$F f(q_z) = \int_0^\infty \frac{d\rho'_0(z)}{dz} e^{iq_z z} dz. \quad (3.25)$$

Nach Anwendung des Baker-Hausdorff-Theorems (BHT) [73] folgt

$$= -e^{-\frac{q_z^2 \sigma^2}{2}} \sum_{n=0}^{N-1} \left( F f^*(q_z) \cdot e^{-iq_z(d_0+nd)} e^{-\frac{q_z^2}{2} \langle u_n^2 \rangle} + F f(q_z) \cdot e^{iq_z(d_0+nd)} e^{-\frac{q_z^2}{2} \langle u_n^2 \rangle} \right).$$

Da der Formfaktor  $F f(q_z)$  rein imaginär ist, gilt  $F f^*(q_z) = -F f(q_z)$ . Man kann weiter vereinfachen zu

$$R2(q_z) = -2i \cdot e^{-\frac{q_z^2 \sigma^2}{2}} \sum_{n=0}^{N-1} \left( F f(q_z) \cdot \sin(q_z(d_0 + nd)) e^{-\frac{q_z^2}{2} \langle u_n^2 \rangle} \right) \quad (3.27)$$

Für den dritten Summanden  $R3(q_z)$  gilt

$$R3(q_z) = \left\langle |F f(q_z)|^2 \cdot \left( \sum_{n=0}^{N-1} e^{iq_z nd} \cdot e^{-iq_z u_n} \right)^2 \right\rangle \quad (3.28)$$

wieder mit dem BHT folgt

$$\begin{aligned} &= |F f(q_z)|^2 \cdot \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} e^{iq_z d(m-n)} e^{-\frac{q_z^2}{2} \langle (u_m - u_n)^2 \rangle} \\ &= |F f(q_z)|^2 \cdot \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} \left( e^{-iq_z d(m-n)} e^{-\frac{q_z^2}{2} \langle u_m^2 \rangle - 2\langle u_m u_n \rangle + \langle u_n^2 \rangle} \right). \end{aligned} \quad (3.30)$$

### 3.2.2 Der diffuse Beitrag in Reflektivität und Offset Messung

In den obigen Berechnung spielt lediglich die  $z$ -Abhängigkeit der Elektronendichte und der Fluktuationsamplituden  $u_n(z = nd)$  eine Rolle. Es wurde die rein spekuläre Reflektivität betrachtet. Tatsächlich liefert aber auch die diffuse Streuung, die durch laterale Strukturen und Fluktuationen hervorgerufen wird, einen Beitrag unter spekulärer Bedingung ( $q_{||} = 0$ ). Betrachtet man die Höhendifferenzfunktion  $g_{mn}(r_{||})$  der Auslenkungen  $u_m$  und  $u_n$  in Abhängigkeit der lateralen Komponenten  $r_{||}$ :

$$g_{mn}(r_{||}) = \langle [u_m(r_{||}) - u_n(0)]^2 \rangle = C_{m,m}(0) + C_{n,n}(0) - 2C_{m,n}(r_{||}), \quad (3.31)$$

mit der Höhen-Höhen-Kreuzkorrelation  $C_{m,n}(r_{||})$  (siehe Kapitel 3.4) so lässt sich der quadratische Strukturfaktor in Ausdruck (3.30) schreiben als

$$\begin{aligned} |Sf(q_{||}, q_z)|^2 &= \frac{R3(q_{||}, q_z)}{|Ff(q_z)|^2} \\ &= \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} e^{iq_d(m-n)} \int_S d\vec{r}_{||} e^{iq_{||}r_{||}} \underbrace{e^{-\frac{q_z^2}{2}g_{mn}(r_{||})}}_{=:f(r_{||})}. \end{aligned} \quad (3.32)$$

Die Integration erfolgt über die laterale Probenausdehnung bzw. die Kohärenzlänge der Röntgenstrahlung. Das Integral entspricht der Fouriertransformierten von  $f(r_{||})$ . Um die Abhängigkeit des Strukturfaktors vom lateralen Impulsübertrag  $q_{||}$  zu untersuchen muss daher die Funktion  $f(r_{||})$  betrachtet werden. Mit Gleichung (3.31) lässt sie sich umschreiben zu

$$f(r_{||}) = e^{-\frac{q_z^2}{2}(C_{n,n}(0)+C_{m,m}(0))} + e^{-\frac{q_z^2}{2}(C_{n,n}(0)+C_{m,m}(0))} \cdot [e^{q_z^2 C_{m,n}(r_{||})} - 1]. \quad (3.33)$$

Nun kann dieser Ausdruck in einen spekulären und einen diffusen Anteil aufgespalten werden. Der erste Term ist unabhängig von  $r_{||}$  und wird durch die Fouriertransformation in ein deltaförmiges Maximum bei  $q_{||} = 0$  abgebildet. Dieses ist der rein spekuläre Anteil des Strukturfaktors. Der zweite Term besteht aus einem breiten Maximum an der Stelle  $r_{||} = 0$  [43], das durch die Transformation in ein breites Maximum bei  $q_{||} = 0$  abgebildet wird. Dieser Term ist der diffuse Beitrag zum Strukturfaktor. Die Abhängigkeit dieses Terms vom lateralen Impulsübertrag ist für kleine  $q_{||}$  sehr gering. Durch die Messung eines Offset-Scans nahe an der spekulären Achse kann daher der diffuse Beitrag zur Reflektivität bestimmt werden. Zur Auswertung der reinen spekulären Reflektivität wird deshalb von der unter spekulärer Bedingung gemessenen Intensität ein Offset-Scan subtrahiert. Entsprechend muss nach vorstehender Überlegung der Strukturfaktor in Ausdruck (3.30) korrigiert werden zu

$$= |Ff(q_z)|^2 \cdot \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} \left( e^{-iq_z d(m-n)} e^{-\frac{q_z^2}{2}(\langle u_m^2 \rangle + \langle u_n^2 \rangle)} \right). \quad (3.34)$$

Der Term der Kreuzkorrelationen  $\langle u_m u_n \rangle$  entfällt.



### 3.2.3 Parametrisierung des Formfaktors und des Elektronendichteprofiles einer Membran

Der Formfaktor

$$\int_0^\infty \frac{d\rho'_0(z)}{dz} e^{iq_z z} dz \quad (3.35)$$

ist die Fourier Transformierte des Elektronendichteprofiles einer einzelnen Membran  $\rho_0(z)$  mit angrenzender Wasserschicht. Eine Möglichkeit das Elektronendichteprofil zu beschreiben ist, wie für den Parratt-Algorithmus, durch ein Blockmodell möglich. Dafür wird die Membran in dünnere Teilschichten mit konstanter Elektronendichte unterteilt. Da die Membranen jedoch weich sind gibt es keine scharfen Grenzflächen zwischen diesen einzelnen Bereichen. Jede Grenzfläche müsste noch mit einer bestimmten Rauigkeit versehen werden um das Streubild korrekt zu beschreiben. Dies bedeutet eine hohe Anzahl an Parametern was für numerische Anpassung der gemessenen Daten ungünstig ist. Eine elegantere Lösung ist die Beschreibung des Elektronendichteprofiles mit Fourierkoeffizienten [85, 87]. Diese Möglichkeit bietet den Vorteil, dass die Fourierkoeffizienten direkt den gemessenen Beugungsordnungen zugeordnet werden können. Die Parametrisierung durch Fourierkoeffizienten wird daher auch bei der Strukturbestimmung durch Fouriersynthese verwendet [88, 89, 90].

Die periodische Elektronendichte eines Membranstapels schreibt man dann als Fourierreihe

$$\rho'(z) = \sum_{m=1}^{N_0} f_m \cdot \cos\left(\frac{2\pi m z}{d}\right) \cdot \Delta_{max} \rho_{12} + \rho_{lip}, \quad (3.36)$$

wobei  $N_0$  die Anzahl der Fourierkoeffizienten  $f_m$  ist. Je mehr Fourierkoeffizienten man betrachtet, desto genauer ist das Elektronendichteprofil bestimmt. Die Anzahl hängt hauptsächlich von der Anzahl der experimentell beobachteten Ordnungen der Bragg Maxima ab.  $\Delta_{max}$  bezeichnet die Amplitude der Schwankungen um die mittlere Elektronendichte im Membranstapel  $\rho_{lip}$ , während  $\rho_{12}$  den Gesamtsprung der Elektronendichte über den gesamten Membranstapel<sup>3</sup> bezeichnet. Der Formfaktor beschreibt nur die Elektronendichte einer einzelnen Membran im Stapel, deren Symmetrieebene bei  $z = 0$  liegt. Gleichung 3.35 wird dann zu

$$Ff(q_z) = \int_{-D/2}^{D/2} \frac{d\rho'(z)}{dz} e^{iq_z z} dz \quad (3.37)$$

<sup>3</sup>Differenz der Elektronendichten der angrenzenden Medien, z.B. Wasser und Silizium

Durch Einsetzen von 3.36 in 3.37 und Integration ergibt sich schliesslich

$$Ff(q_z) = \sum_{m=1}^{N_0} f_m \Delta_{max} \rho_{12} \frac{i8\pi^2 m^2 \sin(q_z D/2)}{-q_z^2 D^2 + 4\pi^2 m^2} \cdot \cos(\pi m). \quad (3.38)$$

Zu beachten ist hierbei, dass das Zentrum der Membran bei  $z = 0$  liegt. Durch diese Konvention und die Normierung auf den Gesamtsprung der Elektronendichte  $\rho_{12}$  und die Amplitude  $\Delta_{max}$  ist der erste Fourierkoeffizient für realistische Membranmodelle immer  $f_1 = -1$ .

## 3.3 Anpassung an die Reflektivitätsdaten

### 3.3.1 Das Phasenproblem

Eine Hauptschwierigkeit der Methode ist der Verlust der Phase bei der Messung. Gemessen wird die Intensität der gestreuten Welle, die proportional zum Quadrat der Amplitude ist. Die Phaseninformation der Welle geht dabei verloren. Für eine Rekonstruktion der Realstruktur ist die Phase aber wichtig. Da die gemessenen Daten nicht einfach invertiert werden können, muss die Phaseninformation meistens durch numerische Anpassung ermittelt werden. Dafür ist es wichtig ein möglichst detailliertes Modell von der Probe zu haben. Der Sachverhalt vereinfacht sich, wenn der Formfaktor ein symmetrisches Elektronendichteprofil beschreibt, wie im vorliegenden Fall der Lipidmembranen. Die möglichen Phasen reduzieren sich dann auf  $\pm 1$ . In der Rekonstruktion der Phasen scheiden häufig viele der theoretisch möglichen Phasenkombinationen aus, da sie sich nicht mit der Vorstellung von der Probe vereinbaren lassen. Huang und Mitarbeiter verwenden für die Rekonstruktion der Phasen in Streuexperimenten an unorientierten Membranensystemen eine Schwellmethode [89, 91]. Durch Anwendung verschiedener osmotischer Drücke wird die lamellare Periode  $d$  variiert, wodurch sich die Positionen der Maxima verschieben. Dadurch kann der Formfaktor über einen größeren  $q$ -Bereich abgetastet werden. Aus dem Verlauf schließt man auf Nulldurchgänge der Phasen zwischen den einzelnen Beugungsordnungen. Bei großen Änderungen des osmotischen Druckes kann sich der Formfaktor der Probe allerdings entscheidend verändern, und so das Ergebnis verfälschen. Bei der Messung von Reflektivitäten an Oligo-Membransystemen besteht ein ausgewogenes Verhältnis der Intensitäten der einzelnen Beugungsordnungen und des Intensitätsverlaufes dazwischen. Dadurch kann die Reflektivität über einen kontinuierlichen

Bereich des Impulsübertrages  $q_z$  beschrieben werden. Die Intensitätsverläufe zwischen den Maxima in der numerischen Anpassung reagieren sehr empfindlich auf Änderungen der Phasen. Die Phasen der einzelnen Beugungsordnungen sind daher meist eindeutig an dem Verlauf der Intensität zwischen den Bragg-Maxima zu bestimmen. Durch die Möglichkeit der Anpassung über einen kontinuierlichen  $q_z$ -Bereich zeigt sich hier ein Vorteil der Reflektivität an Oligo-Membranen.

Die Lösung des Phasenproblems ist immer wieder Ziel vieler Forschungsarbeiten [92, 93, 94]. In der Kristallographie von Makromolekülen wird das Phasenproblem meist mit anomaler Streuung (engl. *multi-wavelength anomalous diffraction MAD*) gelöst. Bei dem in letzter Zeit häufig diskutierten *Oversampling* Verfahren wird die zu bestimmende Struktur in eine Matrix mit bekannter Struktur eingesetzt und die Phaseninformation rekursiv ermittelt [95, 93, 96].

### 3.3.2 Probendefekte im Streuexperiment

Auch wenn den Proben eine definierte mittlere Gesamtschichtdicke zugeordnet werden kann, so bestehen doch Defekte in Form von entnetzten Flächen oder Unvollständigkeit der einzelnen Schichten. Dies ist besonders bei den durch spreiten hergestellten Proben der Fall. Jedoch wurde es in geringerem Maße auch bei den durch *Spin-Coating* hergestellten Membranen beobachtet. Diese Defekte werden häufig durch die Hydratisation im Experiment verstärkt. Bei der Messung unter voller Hydratisation in Überschuss-Wasser lösen sich oft ganze Bereiche des Membranstapels vom Substrat. Insbesondere, beim Wechsel der Lösungen *in situ* wurde ein Ablösen solcher Domänen beobachtet. Diese Defekte machen sich auch deutlich im Streubild bemerkbar und müssen bei der theoretischen Beschreibung der Messung berücksichtigt werden. Die Reflektivität eines perfekten homogenen Membranstapels mit konstanter Gesamtdicke zeigt zwischen den Bragg-Maxima deutlich ausgeprägte Oszillationen (sog. *Kiessig Fringes*) an denen sich die Zahl der Membranen ablesen lässt. Solche Oszillationen wurden in den Reflektivitäten von partiell hydratisierten Membranstapeln beobachtet und zur Schichtdickenbestimmung verwendet (Kapitel 4). In den Reflektivitätsmessungen bei voller Hydratisation und bei kontrolliertem osmotischem Druck durch Polymerlösungen waren diese jedoch nicht sichtbar. Dieses ist einerseits durch die mit zunehmender Hydratisierung verstärkten Fluktuationen zu erklären. Andererseits zeigt sich bei Simulation der Reflektivitäten, dass die Fluktuationen nicht ausreichen, um diese Oszillationen vollständig zu unterdrücken. Hier muss noch die Unvoll-

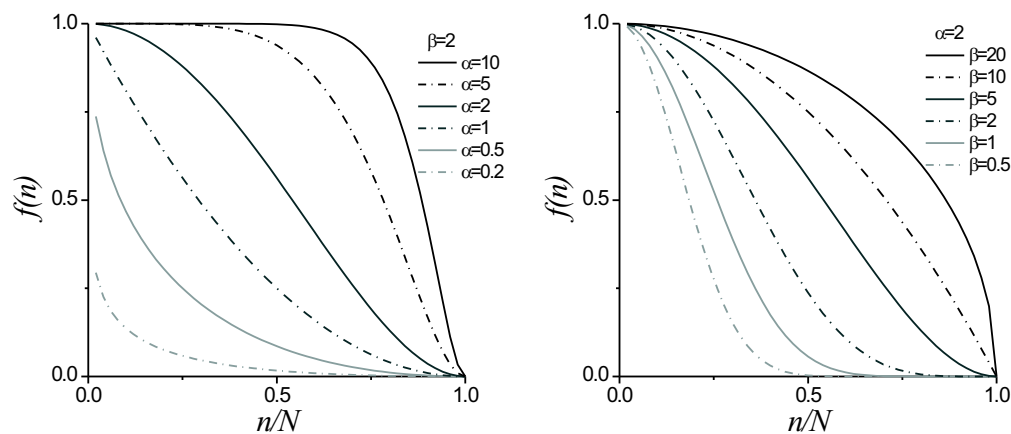


Abbildung 3.3: Bedeckungsfunktion  $f(n)$  für verschiedene Kombinationen der Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  mit festem  $\beta = 2$  (links) und  $\alpha = 2$  (rechts)

ständigkeit der Schichten mit in das Modell aufgenommen werden. Dazu wird der Beitrag der  $n$ -ten Membran im Strukturfaktor mit einem Bedeckungsfaktor  $f(n)$  multipliziert. Für eine funktionelle Beschreibung wurde angenommen, dass die Vollständigkeit der Membranen mit dem Abstand vom Substrat abnimmt. Die erste Membran soll vollständig sein, ihr Bedeckungsfaktor ist  $f(1) = 1$ . Die Bedeckungsfunktion wurde empirisch definiert

$$f(n) = \left[ 1 - \left( \frac{n}{N} \right)^\alpha \right]^\beta, \quad (3.39)$$

die Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  sind dabei Skalierungsparameter um den Grad der Bedeckung bei einer Maximalzahl von  $N$  Membranen zu bestimmen. Abbildung 3.3.2 zeigt den funktionellen Verlauf von  $f(n)$  für verschiedene Parameter  $\alpha$  und  $\beta$ .

### 3.3.3 Parameterisierung der Reflektivität

Zusammenfassend lassen sich die in dieser Arbeit gemessenen Reflektivitätskurven mit den Formeln (3.22)-(3.27), (3.34), (3.38)-(3.39) und den folgenden Pa-

parametern beschreiben.

$$\begin{aligned}
 f_1 & : \text{Erster Fourierkoeffizient} = -1 \\
 f_2 - f_{N_0} & : \text{Fourierkoeffizienten} \\
 d & : \text{Periode} \\
 q_c & : \text{Kritischer Winkel der Totalreflektion am Substrat} \\
 d_0 & : \text{Abstand Substrat zu Mitte der ersten Membran} \\
 \Delta_{max} & : \text{Amplitude der Variation um die mittlere Elektronendichte } \rho_{lip} \\
 \sigma & : \text{Rauigkeit des Substrates} \\
 \alpha, \beta & : \text{Parameter der Bedeckungsfunktion} \\
 N & : \text{Maximalzahl an Membranen} \\
 \eta & : \text{Caillé Parameter der Fluktuationen} \\
 U & : \text{konstanter Streuuntergrund bzw. Dunkelstrom} \\
 c & : \text{konstanter Skalierungsfaktor} .
 \end{aligned}
 \tag{3.40}$$

Die aus den Anpassungen gewonnenen Parameter werden in Kapitel 5 diskutiert und in einer Tabelle im Anhang angegeben.

### 3.4 Diffuse Streuung

In Kapitel 2.2 wurden verschiedene Korrelationsfunktionen zur statistischen Beschreibung der Membranfluktuationen in multilamellaren Phasen eingeführt. Im einfachsten Fall betrachtet man die Höhendifferenzfunktion

$$g_{m,n}(r) = \langle [u_m(0) - u_n(r)]^2 \rangle \tag{3.41}$$

als Funktion der vertikalen Auslenkung  $u_n(r)$  aus der Gleichgewichtslage  $z = nd$  der  $n$ -ten Membran im Stapel. Mit der Höhen-Höhen-Kreuzkorrelationsfunktion

$$C_{m,n}(r) = \langle u_m(0)u_n(r) \rangle \tag{3.42}$$

kann  $g_{m,n}(r)$  umgeschrieben werden:

$$g_{m,n}(r) = C_{m,m}(0) + C_{n,n}(0) + 2C_{m,n}(r). \tag{3.43}$$

Die  $C_{n,n}(0)$  werden oft auch als  $\sigma_n$  bezeichnet. Sie sind den in Kapitel (3.2.1) von  $r_{||}$  unabhängigen  $\langle u_n^2 \rangle$  äquivalent und sind daher aus der Analyse der Reflektivitätsmessungen zu erhalten. Aus ihnen kann der Caillé Parameter  $\eta$  bestimmt werden. Die Höhen-Höhen-Kreuzkorrelation muss dagegen aus der diffusen Streuung bestimmt werden [24].

Sinha et al. [97] haben gezeigt, dass die diffuse Intensität als Transformation der Höhendifferenzfunktion  $g_{m,n}(r)$  ausgedrückt werden kann. Eine allgemeine Darstellung des Strukturfaktors der diffusen Streuung findet sich z.B. in dem Buch von Tolan [74] oder in Salditt [98]. Bei der Auswertung der diffusen Streuung wurde der Methode von Salditt *et al.* [24] gefolgt. Die Darstellung hier beschränkt sich auf die Bestimmung der Höhen-Höhen-Kreuzkorrelationsfunktion aus zweidimensionalen diffusen Streudaten. Die diffuse Streuung wurde (außer in den oben genannten Offset-Messungen) mit einem zweidimensionalen Detektor gemessen (siehe Kapitel 4). Damit erhält man die Intensität der diffusen Streuung in Abhängigkeit von  $q_z$  und  $q_y$ <sup>4</sup>. Die Höhen-Höhen-Kreuzkorrelation kann dann aus den  $q_z$  Profilen der diffusen Bragg-sheets ermittelt werden. Sie beschreibt die vertikale Korrelation der Membranen in Abhängigkeit von der lateralen Ausdehnung der Fluktuationen. Entsprechend kann sie aus der  $q_z$ -Breite der Bragg-sheets in Abhängigkeit vom lateralen Impulsübertrag  $q_{||}$  bestimmt werden. Vertikale Schnitte (entlang  $q_z$ , mit konstantem  $q_y$ ) durch die Bragg-sheets lassen sich mit Lorentz-Profilen beschreiben [24, 84]. Diese Form spiegelt eine exponentielle Abnahme der Kreuzkorrelation in  $z$ -Richtung mit einer charakteristischen Längenkala von

$$\Lambda = 2/\Delta q_z \quad (3.44)$$

wieder.  $\Delta q_z$  bezeichnet hier die volle Halbwertsbreite der Lorentzpeaks (engl. *FWHM = full width half maximum*). Nach der smektischen Elastizitätstheorie gilt dann die Abhängigkeit

$$\Lambda = \frac{1}{q_{||}^2 \lambda}. \quad (3.45)$$

Aus einer Darstellung der  $q_z$ -Breiten der Bragg-Sheets in Abhängigkeit von  $q_{||}$  kann also die deGenne'sche Eindringtiefe  $\lambda$  bestimmt werden.

---

<sup>4</sup>Genau genommen trägt auch  $q_x$  zum lateralen Impulsübertrag bei, und nur für einen Punkt auf der Datenmatrix gilt die spekuläre Bedingung  $q_{||} = 0$ . Die  $q_x$  Komponente kann für die Auswertung berücksichtigt werden und entsprechend der laterale Impulsübertrag  $q_{||} = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$  betrachtet werden. In den im folgenden beschriebenen Messungen ist der Beitrag jedoch sehr klein und kann daher vernachlässigt werden.

Zusammen mit dem, aus spekulärer Reflektivität bestimmten, Caillé Parameter  $\eta$  können daraus die elastischen Konstanten  $K$  und  $B$  ermittelt werden.

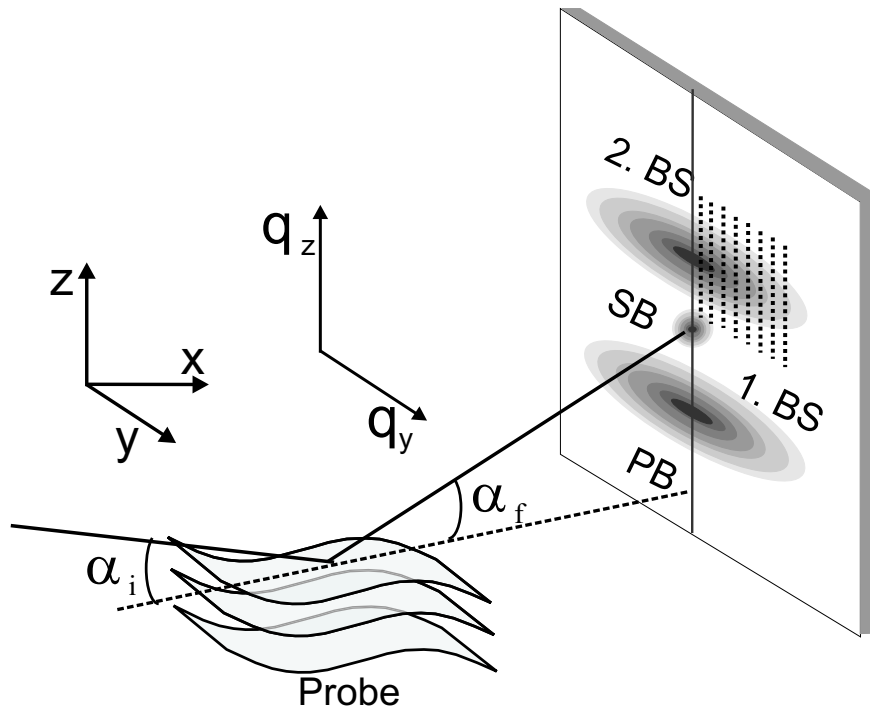


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der diffusen Streuung an fluktuierenden Membranstapeln. Auf dem zweidimensionalen Detektor sind zwei Bragg-Sheets zu sehen, in der Mitte davon befindet sich der spekulär reflektierte Strahl SB. Die vertikalen Schnitte durch das erste Bragg-Sheet sind durch die vertikal gepunkteten Linien dargestellt.





# Kapitel 4

## Experimente

In diesem Kapitel wird die experimentelle Durchführung der Experimente beschrieben. Die Probenpräparation durch *Spin-Coating* wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. An eine ausführliche Beschreibung des Präparationsverfahrens schließt ein Abschnitt über die Charakterisierung der Proben. Ebenso werden in diesem Kapitel, neben der Präparation der Polymerlösungen, auch die Messung der osmotischen Drücke mit den Ergebnissen beschrieben. Die Beschreibung der Röntgenexperimente unter osmotischem Druck wird in diesem Kapitel auf die reine Durchführung beschränkt. Experimentelle Daten werden in Kapitel (5) zusammen mit den Ergebnissen vorgestellt.

### 4.1 Probenpräparation

In dieser Arbeit wurden Oligo Membranstapel bestehend aus 2 - 30 Membranen und dicke Proben mit Stapeln aus einigen hundert bis tausend Membranen untersucht. Die dicken Proben wurden mit der gut etablierten [14, 84] Methode des **Spreitens** (engl. *spreading*) nach Seul und Sammon [22] hergestellt. Für die Herstellung von Oligo-Membranstapeln war bisher kein geeignetes Verfahren bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Präparation von hochorientierten Oligo Membranstapeln mit dem Lackschleuder-Verfahren (*Spin-Coating*) entwickelt [27]. Das *Spin-Coating* Verfahren ist eine Standard Methode für Polymerbeschichtungen [26]. Die Anwendung dieses Verfahrens auf amphiphile Lipide zur Herstellung von multilamellaren Phasen war jedoch bisher nicht bekannt. An

die Beschreibung der Präparationsschritte 4.1.2 folgt ein Abschnitt zur Charakterisierung der entstandenen Proben.

### 4.1.1 Präparation durch Spreiten

Zur Herstellung von hochorientierten multilamellaren Lipidmembranstapeln auf Substraten wird eine Lipidlösung in einem organischen Lösungsmittel auf sorgfältig gereinigte Substrate getropft. Nachdem die Oberfläche des Substrates von der Lösung benetzt ist, lässt man das Lösungsmittel langsam verdunsten. Dabei bilden sich in einem Selbstorganisationsprozess, der auf dem Substrat nukleiert, multilamellare Lipidstapel. Das Lösungsmittel muss so gewählt werden, dass es einerseits die Lipide gut löst und andererseits die Oberfläche des Substrates vollständig benetzt. Bei der Verwendung stark hydrophiler Lösungsmittel (z.B. Isopropanol) muss das Substrat evtl. vor dem Spreiten durch einen Ätzprozess hydrophilisiert werden. Als Substrate eignen sich beispielsweise handelsübliches Objektträgerglas, Quarzglas oder polierte Siliziumwafer. In dieser Arbeit wurden Silizium Substrate verwendet. 5" Silizium Wafer der Orientierung  $\langle 100 \rangle$  und der Dicke  $\approx 0.5\text{mm}$  (Fa. Silchem, Freiberg) wurden auf eine Größe von  $15 \times 25\text{mm}^2$  zugeschnitten und in einem 10 minütigen Methanolbad mit Ultraschall gereinigt. Anschließend folgte ein gründliches Spülen in Methanol und zweifaches Spülen in hochreinem Wasser (Milli-Q, Fa. Millipore, Bedford, Mass.). Die Substrate wurden daraufhin mit einem  $N_2$  Strom getrocknet. Die Lipide Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) und Palmitoyloleoylphosphoserine (POPS) wurden in einer Mischung aus Chloroform und Trifluoroethanol (TFE) im Mischungsverhältnis 1:1, in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Auf die waagrecht positionierten gereinigten Substrate wurde je ein Tropfen von  $100\mu\text{l}$  der Lipidlösung pipettiert. Nachdem die Substratoberfläche vollständig durch die Lösung benetzt war, wurde die Evaporation des Lösungsmittels durch eine Glasabdeckung auf einem niedrigen Niveau gehalten. Die Proben konnten über eine Dauer von mehreren Stunden trocknen. Auf diese Weise konnten sich wohlgeordnete multilamellare Membranstapel auf dem Substrat bilden. Zuletzt wurden die Proben noch für ca. 20 Stunden in einem evakuierten Exsikkator gelagert, um Lösungsmittelreste vollständig zu entfernen. Die Proben wurden bis zur Messung bei einer Temperatur von  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für die Messung wurden die Proben in einer Feuchtigkeitskammer oder einer Nasszelle hydratisiert und temperiert (siehe Kap. 4.2.2). Die so präparierten Proben zeichnen sich durch einen hohen Grad

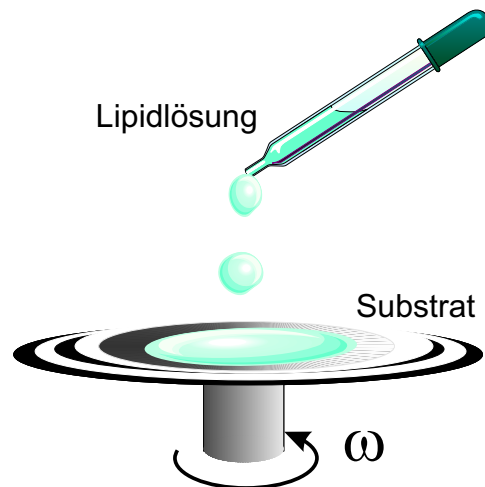


Abbildung 4.1: Präparation mit dem *Spin-Coating* Verfahren

an Orientierung aus. Die Fehlorientierung (Mosaizität) liegt typischerweise in der Größenordnung von  $0.02^\circ$  jedoch ist ihre Gesamtdicke über die Probenfläche sehr inhomogen und es lässt sich keine einheitliche Schichtzahl bestimmen [14].

### 4.1.2 Präparation von Oligo-Membranstapeln

Wie bei der Methode des Spreitens wurden Lipide aus einer organischen Lösung auf ein gereinigtes und evtl. geätztes Substrat pipettiert. Nachdem die Lösung das Substrat benetzt hatte, wurde das Substrat in Rotation versetzt. Durch die Rotation wurde die Lösung gleichmäßig über das Substrat verteilt und überschüssige Lösung abgeschleudert.

#### Substratvorbehandlung

Als Substrate eignen sich wie für das Spreiten beispielsweise Objektträgerglas, Quarzglas oder polierte Siliziumwafer. Die Reinigung der Substrate erfolgte wie oben beschrieben. Für Lipidlösungen in den Lösungsmitteln Isopropanol oder TFE wurden die Substrate nach der Reinigung noch hydrophilisiert. Dafür wurden in dieser Arbeit drei alternative Ätzmethoden verwendet. Eine Methode ist ein halbminütiges Ätzbad in einer KOH Lösung. Für Silizium

Substrate wurde eine gesättigte Lösung von KOH in Ethanol verwendet, für Glas Substrate eine 5-molare Lösung von KOH in  $H_2O$ . Nach dem Ätzbad war ein intensives Spülen der Substrate mit hochreinem Wasser (Milli-Q, Fa. Millipore, Bedford, Mass.) erforderlich und ein erneutes Trocknen in einem  $N_2$  Strom. Zwei weitere Ätzmethode, die keine weiteren Spülungen erfordern, wurden verwendet: die Bestrahlung der Substrate mit einer Ozon erzeugenden UV-Lampe (PenRay, UVP, Upland, CA) für eine halbe Stunde, oder ein Ätzen durch Plasma in einem Plasma Cleaner (Fa. Harrick scientific, Ossining, NY) für 30 Sekunden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resultaten der verschiedenen Ätzmethode beobachtet.

## Lipidlösungen

Die synthetischen Lipide 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DMPE), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)](DMPG), 1-oleoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (OPPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine] (POPS) wurden von der Firma Avanti Lipids (Alabaster, Alabama) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die gewünschten Lipide oder Lipidmischungen wurden in einem organischen Lösungsmittel in den Konzentrationen 1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml 15 mg/ml und 10 mg/ml gelöst. Die Wahl des Lösungsmittels richtet sich auch hier vor allem nach der Löslichkeit der Lipide und den Benetzungseigenschaften des Substrates. Für Phosphocholine wie DMPC und DLPC etc. haben sich Isopropanol und Chloroform bewährt. Phosphoethanolamine und die geladenen Phosphoglycerole und Phosphoserine sind in Chloroform wesentlich besser löslich. Die für das Spreiten verwendete Mischung aus Chloroform und TFE hat sich für das *Spin-Coating* Verfahren weniger bewährt. Durch Betrachtung der fertigen Proben mit dem bloßen Auge zeigt sich, dass die Wahl des Lösungsmittels die Probenhomogenität auf Längenskalen von 10 – 100  $\mu m$  beeinflusst. So haben Chloroform Lösungen auf ungeätzten (leicht hydrophoben) Substraten besonders schöne glatte Proben ergeben. In Tabelle 4.1.2 sind alle verwendeten Lipide mit den entsprechenden Lösungsmitteln aufgelistet.

Lipide/Peptide	Lösungsmittel	ätzen	Größe <i>mm</i> <sup>2</sup>	Menge <i>μl</i>	Stufe 1 <i>Upm</i>	Stufe 2 <i>Upm</i>
DMPC, DLPC, DOPC, OPPC	Isopropanol	ja	15 × 25	100 – 200	500	3000
DMPC,	Chloroform	nein	15 × 25	100 – 200	–	3000
DMPG, DPPG	Chloroform	nein	15 × 25	100 – 200	–	3000
DMPE, DPPE (*)	Chloroform	nein	15 × 25	100 – 200	–	3000
PE:PC, 1:1 - 1:10	Chloroform	nein	15 × 25	100 – 200	–	3000
PG:PC, 1:1 - 1:10	Chloroform	nein	15 × 25	100 – 200	–	3000
POPS	Chloroform	nein	15 × 25	100 – 200	–	3000
DPPC, DOPC	TFE	ja	15 × 25	100 – 200	500	3000
DMPC/Alamethicin 10:1-200:1	Isopropanol	ja	2in.∅	500	1000	3000
DLPC/Alamethicin 10:1-200:1	Isopropanol	ja	15 × 25	100 – 200	500	3000

Tabelle 4.1: Liste der erprobten Lipide und Lipid/Peptid-Mischungen mit den entsprechenden Lösungsmitteln und den Präparationsparametern (Stufe 1: Rotationsfrequenz in der ersten Sekunde, Stufe 2: Rotationsfrequenz in weiteren 30 Sekunden). Mischungen sind durch Molare Verhältnisse angezeigt. (\*) DMPE und DPPE ergaben mehrphasige Systeme.

### *Spin-Coating-Prozess*

Das gereinigte und evtl. geätzte Substrat wurde auf den Drehteller einer Belackungsschleuder gelegt und mittels einer Membran-Vakuumpumpe angesaugt und fixiert. Ein Tropfen der Lipidlösung zwischen 100 und 500  $\mu\text{l}$ , je nach Konzentration der Lösung und Substratgröße, wurde auf das Substrat pipettiert (Abb. 4.1). Sobald die Lösung das Substrat vollständig benetzt hatte, wurde das Substrat mit in Rotation versetzt. Die Rotation erfolgte üblicherweise in zwei Schritten. In einem ersten Schritt mit einer relativ niedrigen Rotations Frequenz (500 - 1000 Umdrehungen pro Minute, Upm) wurde die Lösung gleichmäßig verteilt. Nach einer Sekunde wurde die überschüssige Lösung in einem zweiten Schritt mit 3000 Umdrehungen pro Minute abgeschleudert. Der Film trocknete so während einer Rotationsdauer von insgesamt 30 Sekunden.

Anschliessend wurden die Proben für 20 Stunden in einem evakuierten Exsikkator gelagert, um alle Restbestände des organischen Lösungsmittels zu entfernen. Bei der Verwendung von Isopropanol als Lösungsmittel ist dabei der niedrige Dampfdruck bei Raumtemperatur zu beachten. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

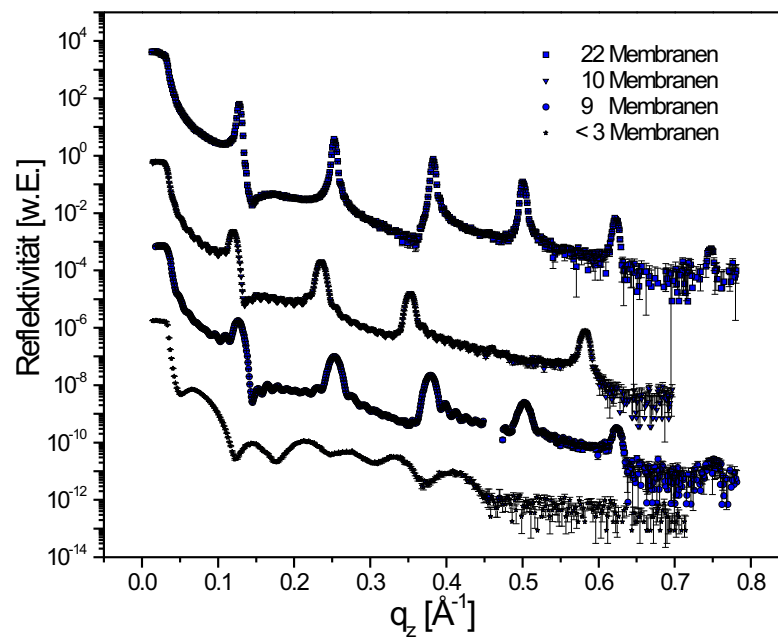


Abbildung 4.2: Reflektivitäten von vier DMPC Proben, präpariert aus Lösungen in Iso-propanol in abnehmenden Konzentrationen von oben: 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml und 1 mg/ml. An den beiden mittleren Kurven sind gut die Gesamtschichtdicken-Oszillationen (*Kiessig-Fringen*) zwischen den Bragg-Maxima zu erkennen.

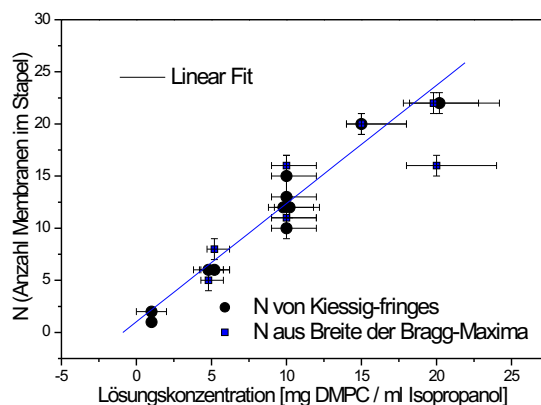


Abbildung 4.3: Anzahl  $N$  von DMPC Membranen auf Silizium und Glas Substraten der Größe  $15 \times 25 \text{ mm}^2$  als Funktion der Lösungskonzentration. ●  $N$  bestimmt aus Gesamtschichtdicken-Oszillationen; ■  $N$  bestimmt aus der Halbwertsbreite der Braggmaxima

### 4.1.3 Charakterisierung der Oligo-Membran Proben

#### Schichtdicke

Abbildung 4.2 zeigt die Röntgenreflektivitäten von vier DMPC Proben, die im *Spin-Coating* Verfahren hergestellt wurden. Die Kurven wurden gemessen am Strahlrohr D4 des Hamburger HASYLAB Labors und sind korrigiert bezüglich der Probenausleuchtung, Untergrund und Ringstrom. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven vertikal verschoben. Die Messungen wurden in einer Temperierkammer (s. 4.2.2) durchgeführt, wobei die Proben aus der Wasserdampf-atmosphäre hydratisiert wurden. Die erreichte Luftfeuchtigkeit betrug ca. 97% - 99% und die Temperatur in der Kammer betrug  $T = 40.2^\circ\text{C}$ . Alle Proben wurden aus DMPC Lösungen in Isopropanol mit unterschiedlichen Konzentrationen präpariert. Aus den Reflektivitätsdaten ist zu erkennen, dass die Anzahl der Membranen mit der Konzentration der verwendeten Lösung zunimmt. In Abb. 4.3 ist für verschiedene Proben die Anzahl der DMPC Membranen auf Silizium und Glas-Substraten der Größe  $15 \times 25 \text{ mm}^2$  gegen die Konzentrationen der verwendeten Lösungen in Isopropanol aufgetragen. Die runden Symbole bezeichnen  $N$ -Werte die aus

Gesamtschichtdickenoszillationen der Messungen bestimmt wurden. Die offenen Quadrate bezeichnen Werte, welche aus der Halbwertsbreiten der Bragg-Maxima bestimmt wurden. Die Linie zeigt eine lineare Anpassung an die Datenpunkte. Durch die ständige Verdunstung von Lösungsmittel während des gesamten Präparationsprozesses sind die Konzentrationen mit großen Fehlerbalken versehen. Es zeigt sich, dass die Zahl  $N$  einen annähernd linearen Verlauf mit der Konzentration der Lösung hat. Man kann also mit der Konzentration der Lösung die Stapeldicke kontrollieren. Das ist deshalb bemerkenswert, da die Dicke aufgrund der periodischen Schichtstruktur im Membranstapel nur diskrete Werte annehmen kann und ein Selbstorganisationsprozess beteiligt ist. Dieses Verhalten zeigten auch alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Lipidsysteme (Tabelle 4.1.2). Die Anzahl der Membranen auf einer Probe ließ sich auch durch die Rotationsfrequenz auf der Lackschleuder variieren. Durch Reduktion der Frequenz auf ca. 100 – 200  $U_{pm}$  ließen sich beispielsweise sehr dicke Proben von 100-1000 Membranen herstellen. Bei der langsamen Rotation wurden die Lipide nicht vom Substrat abgeschleudert, so dass die gesamte aufgetragene Lipidmenge auf dem Substrat haften blieb. Diese Methode kann als Alternative zum Spreiten verwendet werden.

### **Orientierung und Laterale Homogenität**

Die im *Spin-Coating* Verfahren hergestellten Proben wiesen eine sehr geringe Mosaizität auf. Abbildung 4.4 zeigt den *Rocking-Scan* einer DMPC Probe am ersten Bragg Maximum, gemessen unter partieller Hydratisierung aus Wasserdampf, ( $r.H. \approx 98\%$ ). Die Mosaizität der Probe ist durch die Halbwertsbreite des Maximums bestimmbar. Ähnlich wie bei den im Spreitverfahren hergestellte Proben liegt sie der Größenordnung von  $0.01^\circ$  nahe der instrumentellen Auflösung im Experiment. In Abbildung 4.4 sieht man, dass die diffuse Intensität am ersten Bragg Maximum vier Größenordnungen unter der spekulären Intensität liegt, was auf eine starke Unterdrückung der thermischen Fluktuationen und einen hohen Grad an lateraler Homogenität hinweist. Die Messung ist dabei empfindlich auf Inhomogenitäten bis zur Größenordnung der Kohärenzlänge des Röntgenstrahls, die bei einigen  $\mu m$  liegt. Ein weiterer Hinweis auf die laterale Homogenität der Proben ist die Ausbildung von ausgeprägten Gesamtschichtdicken-Oszillationen den so genannten *Kiessig Fringes* [74], in der spekulären Reflektivität in Abb. 4.2. Sie zeigen, dass den Proben über weite Teile der Oberfläche eine einheitliche Dicke bzw. Anzahl von Membranen zugeordnet werden kann. Bei einer Betrachtung



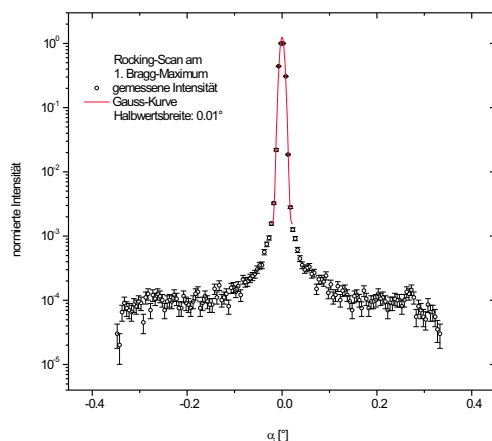


Abbildung 4.4: *Rocking-Scan* einer DMPC-Probe, hergestellt durch *Spin-Coating* aus einer Lösung in Isopropanol (10mg/ml) auf Silizium

tung mit optischer Mikroskopie, aber auch mit Rasterkraftmikroskopie lassen sich dennoch Defekte in der Probenoberfläche beobachten. Sie zeigen entnetzte Flächen mit blankem Substrat auf Längenskalen größer als  $10\ \mu\text{m}$  (Abb. 4.5). Beobachtungen an Proben vor und nach Temperierung und Hydratisierung in einer Temperierkammer, zeigen bei einigen Proben eine Verstärkung der Defekte durch die Hydratisierung [99]. Zwischen einzelnen Defekten ist die Oberfläche jedoch sehr homogen, so dass die Zuordnung einer Gesamtschichtdicke sinnvoll ist. Im Gegensatz dazu weisen Proben, die durch Spreiten hergestellt wurden, bedingt durch viele einzelne Domänen üblicherweise Schichtdickenvariationen in der Größenordnung von einigen  $10\ \mu\text{m}$  über die Probenoberfläche auf [14].

#### 4.1.4 Herstellung der Polymerlösungen

Für Messungen an dem ungeladenen Lipid DMPC wurde das neutrale Polyethylenglycol (PEG, Fluka) mit einer Molekülmasse von 20000 Dalton verwendet. Das Polymer wurde bei Fluka bezogen und ohne weitere Reinigung in Reinstwasser (Milli-Q, Millipore) gelöst. Es wurden Lösungen der Konzentrationen (in Gewichtsanteilen) 1.5% , 2.9%, 3.6%, 5.8%, 9%, 12.1%, 14.2%, 19.3% und 25% hergestellt. Polyethylenglycol der Masse 20000 Dalton ist gut wasserlöslich.

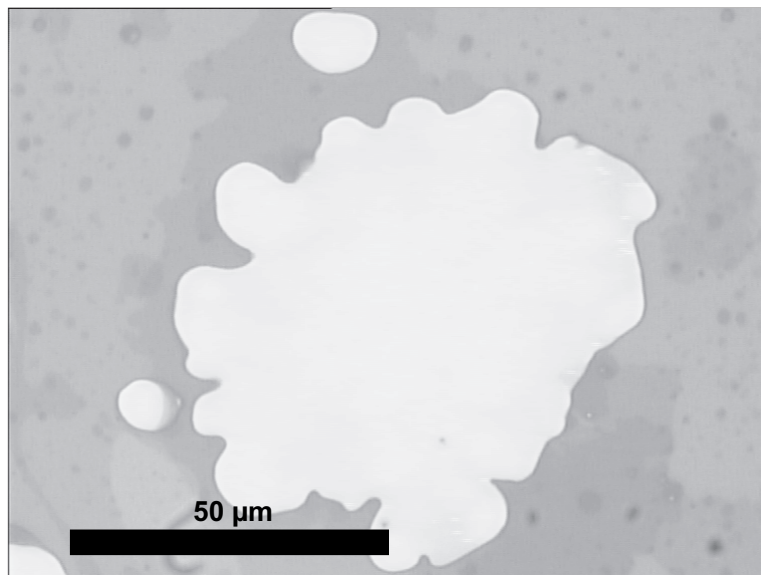


Abbildung 4.5: Hellfeld Mikroskopie Aufnahme eines Defekts in einer im *Spin-Coating* Verfahren hergestellten DMPC Probe auf Silizium (20 mg/ml in Isopropanol). Das Bild wurde bei Raumtemperatur bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 60% aufgenommen. Die Probe befand sich in der Gel Phase. Die Aufnahme zeigt eine entnetzte Fläche mit blankem Silizium.

Die Lösungen waren farblos und je nach Konzentration, flüssig bis zähflüssig. Der osmotische Druck der PEG Lösungen wurde Literaturwerten [100] entnommen. Für die Messungen an dem einfach negativ geladenen Lipid POPS wurde das ebenfalls negativ geladene Polystyrenesulfonat  $\text{Na}^+$  (PSS) der Masse 70000 Dalton verwendet. Es wurde von Sigma Aldrich bezogen und in Reinstwasser (Milli-Q, Millipore) gelöst. Zur Reinigung der PSS Lösungen wurden die Lösungen über mehrere Tage in Dialysebädern gespült. Der molekulare *CutOff* der Dialyseschläuche (Fa. Spektrum) lag bei 30000 Dalton. Die Lösungen wurden durch die Dialyse stark verdünnt und mussten anschließend in einem Rotationsverdampfer wieder konzentriert werden. Die Reinigung ist sehr zeitaufwändig. Für die Röntgenmessungen wurden hauptsächlich ungereinigte Lösungen verwendet. Es wurden Lösungen der Konzentrationen (in Gewichtsanteilen) 0.5% , 1%, 2%, 3.95%, 6%, 9.7%, und 13% hergestellt. Polystyrenesulfonat der Masse 70000 Dalton ist gut wasserlöslich. Die Lösungen waren flüssig und je nach Konzentration schwach gelb bis dunkelgelb. Die fertigen PSS Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt<sup>1</sup>. Der osmotischen Druck der PSS Lösungen wurde mit einem Dampfdruckosmometer bestimmt.

#### 4.1.5 Bestimmung des osmotischen Druckes

Der osmotische Druck der Polymerlösungen gegenüber reinem Wasser wurde mit einem Dampfdruck-Osmometer der Firma Gonotec gemessen. Die Messung beruht auf der Dampfdruckerniedrigung einer Lösung gegenüber dem reinen Lösungsmittel, die durch eine Temperaturerhöhung ausgeglichen wird. Zwei Thermostoren, die als Temperaturfühler in Differenzmessung geschaltet sind, werden in einer mit Lösungsmitteldampf gesättigten thermostatisierten Messzelle hängend angeordnet (Abb. 4.6). Zunächst werden die Temperaturfühler mit Hilfe von Spritzen mit Lösungsmitteltropfen umhüllt. Sobald sich diese der Zelltemperatur angeglichen haben und zwischen den Temperaturfühlern kein Temperaturunterschied mehr besteht, wird ein Tropfen gegen einen Tropfen der zu bestimmenden Lösung ausgetauscht. In Folge des geringeren Lösungsmittel-Dampfdruckes über der Lösung kommt es zur Kondensation von Lösungsmitteldampf. Die dabei frei werdende Kondensationsenthalpie erhöht die Temperatur des Lösungstropfens, was wiederum gleichzeitig eine Dampfdruckerhöhung zur Folge hat. Nach

---

<sup>1</sup>Bei einer Aufbewahrung bei Raumtemperatur über mehrere Wochen wurde die Lösung von Schimmelpilzen befallen.

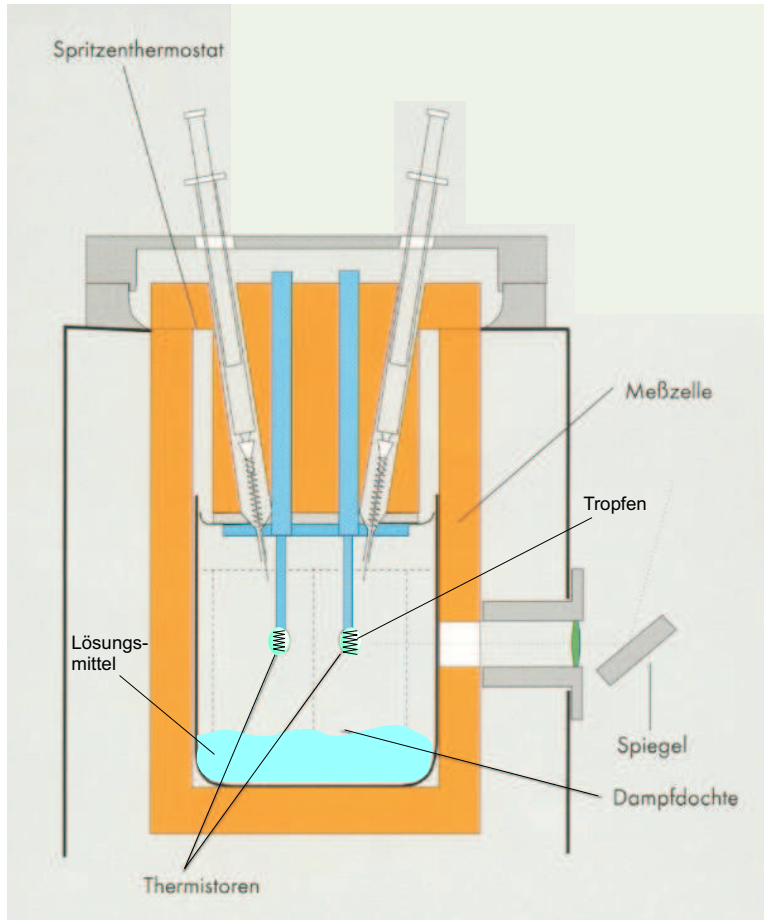


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Messzelle des Dampfdruckosmometers der Firma Gonotec, Berlin

einer Equilibrierungsdauer von ca. sechs Minuten stellte sich bei einer relativ stabilen erhöhten Temperatur an dem Lösungstropfen ein Gleichgewicht zwischen der gesättigten Dampfatosphäre der Messzelle und der Oberfläche des Lösungstropfens ein. Die Temperaturdifferenz wurde von den beiden Temperaturfühlern, die Bestandteil einer Wheatstoneschen Messbrücke waren, mit einer Auflösung von ca.  $5 \cdot 10^{-5} \text{ } ^\circ\text{C}$  (Herstellerangabe, Gonotec) erfasst und in ein Gleichspannungssignal überführt. Der relative Messwert ist proportional der osmolalen Konzentration<sup>2</sup>  $O$  der Lösung. Der osmotische Druck einer Lösung mit

<sup>2</sup>Osmometer werden häufig für medizinische Anwendungen verwendet, Das Messergebnis wird üblicherweise als osmolale oder osmolare Konzentration angegeben, entsprechend der

osmolaler Konzentration  $O$  entspricht dabei dem Druck eines idealen Gases der molalen<sup>3</sup> Konzentration  $O = \frac{n}{m_{solv}}$ .

$$\Pi = \frac{n}{V_{solv}} RT = \frac{n}{m_{solv}} \rho_{solv} RT = O \rho_{solv} RT, \quad (4.1)$$

mit  $V_{solv}$  =Volumen der Lösung,  $m_{solv}$  = Masse des Lösungsmittels,  $n$  = Menge des gelösten Stoffes in mol und  $\rho_{solv}$  =Dichte des Lösungsmittels. Das System wurde mit NaCl Lösungen bekannter Osmolalität kalibriert. Der Messfehler war bei der Messung aus verschiedenen Gründen relativ groß. Zum einen kann der Messwert generell durch Wärmeverluste und sich nicht ideal verhaltende Polymerlösungen beeinflusst werden. Zum anderen ergeben sich durch den Messvorgang systematische Fehler.

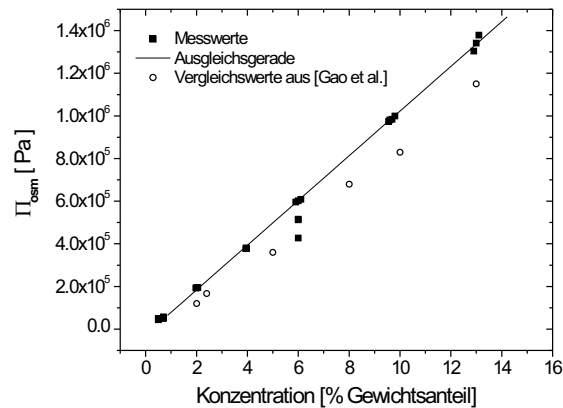


Abbildung 4.7: Gemessener osmotischer Druck der PSS-Lösungen gegen die Konzentration (Gewichtsprozent) aufgetragen. Die mit offenen Symbolen dargestellten Werte sind zum Vergleich aus Gao *et al.* entnommen.[101]

Dadurch, dass zuerst beide Temperaturfühler mit einem reinen Lösungsmittel tropfen umhüllt sind, wovon dann einer durch Lösung ersetzt wird, muss man

molalen bzw. molaren<sup>3</sup> Konzentration einer sich ideal verhaltenden Lösung.

<sup>3</sup> Die Molalität einer Lösung bezeichnet die Menge des gelösten Stoffes in Mol pro **Kilogramm** des Lösungsmittels. Unter Molarität versteht man die Menge des gelösten Stoffes in Mol pro **Liter** des Lösungsmittels.

diesen Temperaturfühler erst einige male mit der Lösung spülen, um nicht einen verdünnten Tropfen am Fühler zu erhalten. Durch das wiederholte Tropfen von Lösung an die Fühler und das Abtropfen in das Lösungsmittelreservoir erhöht sich die Konzentration des gelösten Stoffes im Reservoir, wodurch sich der Dampfdruck im Behälter verringert. Um den sicherlich größeren Fehler durch Verdünnung gering zu halten wurden für jede Konzentration mehrer Messungen durchgeführt, bis sich über drei aufeinanderfolgende Messungen ein stabiler Messwert ergeben hat. Die Messpunkte wurden mit einer Ausgleichsgeraden  $P(\text{Konz.}) = A + B \cdot \text{Konz}$  angepasst, mit den Parametern  $A = -25899.9$  und  $B = 104839$  für den Druck in Pa und die Konzentration in Gewichtsprozent. Zum Vergleich sind die gemessenen Daten in Abbildung 4.7 zusammen mit Literaturdaten von Gao *et al.* eingetragen [101].

## 4.2 Röntgenmessungen

### 4.2.1 Aufbau der Streuexperimente

Die Messungen der spekulären Reflektivitäten wurden an dem Strahlrohr des Ablenkmagneten D4 am Hamburger Synchrotron Strahlungs Labors HASYLAB durchgeführt. In Abbildung 4.8 ist der Aufbau des Messplatzes schematisch dargestellt. Der vom Ablenkmagneten kommende Photonenstrahl trat horizontal durch eine Eingangsblende in die Experimentierkammer. Um den Anteil hochenergetischer Photonen im Strahl zu verringern wurde der Strahl zunächst an einem Rh-Spiegel knapp unterhalb des Grenzwinkels für externe Totalreflexion für die gewünschte Energie reflektiert. Mit einem einfachen Si(111) Monochromator wurde anschließend eine Energie von 19.92 keV ( $\lambda = 0.622\text{\AA}$ ) gewählt und der Strahl gleichzeitig wieder horizontal gelegt. Die für Streuexperimente relativ hohe Energie von 19.92 keV wurde gewählt, um einerseits die Strahlenschäden in der Probe gering zu halten, und um andererseits durch eine 18 mm dicke Wasserschicht in der Probenkammer ohne allzugroße Absorptionsverluste messen zu können. Nach dem Monochromator wurde der Strahl durch Blenden horizontal und Vertikal räumlich definiert, so dass er in einer Größe von 0.5 mm Durchmesser auf die Probe im Drehzentrum eines Goniometers traf. Der an der Probe reflektierte Strahl wurde nach dem passieren einer Gesichtsfeldblende und einer Kollimationsstrecke, die den Streuuntergrund reduzieren sollte, hinter einer De-

tektorblende mit einem schnellen Szintillationszähler detektiert (Cyberstar, Oxford Instruments).

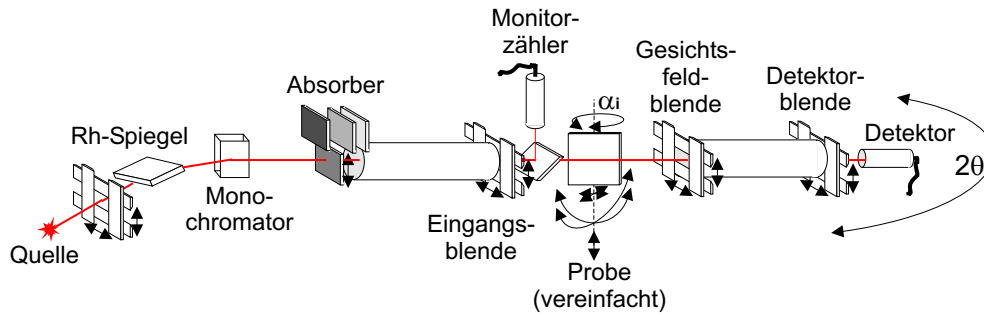


Abbildung 4.8: Aufbau des Streuexperimentes am Strahlrohr D4 des HASYLAB in Hamburg <sup>4</sup>

Die Messungen der diffusen Bragg-Sheets wurden am Undulatormeßplatz ID01 der Europäischen Synchrotron Strahlungsquelle ESRF in Grenoble durchgeführt. Hierbei wurde Strahlung der Energie 20 keV verwendet, die durch einen Si  $\langle 311 \rangle$  Doppelmonochromator selektiert wurde. Die Intensität wurde mit einer CCD-Kamera (Princeton CCD) zweidimensional aufgenommen. Der Detektor wurde senkrecht zur Strahlrichtung in Transmissionsgeometrie hinter der Probe aufgestellt (Abb. 4.9<sup>4</sup>), wobei der Primärstrahl und der Probenhorizont durch eine Blende hinter der Probe ausgeblendet wurden. Die Ausrichtung der CCD-Kamera war näherungsweise entlang der  $q_y - q_z$ -Ebene. Da die Form des Detektors auch durch Fouriertransformation in den reziproken Raum transformiert, ergibt sich ein leicht gekrümmter Verlauf im reziproken Raum. Bei konstantem Einfallswinkel gilt nur für einen Punkt auf dem Detektor die spekuläre Bedingung. Da die Intensität unter spekulärer Bedingung am höchsten ist, wurde der Einfallswinkel auf die Probe jeweils so gewählt, dass der spekulär reflektierte Strahl immer zwischen zwei benachbarten Bragg-Maxima lag. Auf diese Weise wurde eine zu schnelle Sättigung der gezählten Intensität vermieden. Da die CCD-Kamera nur über einen sehr kleinen Intensitätsbereich dynamisch zählt, mussten trotzdem von jeder Einstellung mehrere Aufnahmen mit unterschiedlicher Zählzeit aufgenommen werden. Bei den Messungen betrug der Abstand zwischen Detektor und

<sup>4</sup> Grafikkausteine © Dr. C. Münster

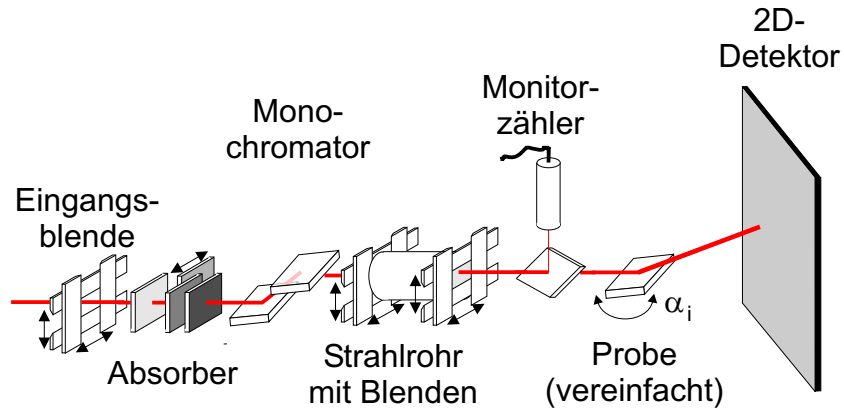


Abbildung 4.9: Aufbau des Streuexperimentes am Strahlrohr ID01 der ESRF in Grenoble <sup>4</sup>

Probe 1.567 m, was bei einer Pixelgröße von  $54.5 \cdot 10^{-6}$  m einer theoretischen Auflösung von  $\Delta q_z = 3.5210^{-4} \text{Å}^{-1}$  entspricht.

### 4.2.2 Probenumgebung

Für die Röntgenmessungen sollten die Proben in biologisch relevantem Zustand sein, das heißt sie mussten hydratisiert und temperiert werden. Die Hydratisierung geschah zum einen aus der Gasphase aus einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre oder durch direkten Kontakt mit einem Wasserbad. Zur Hydratisierung aus der Gasphase wurde die Probe in einer doppelwandigen Temperierkammer aus Edelstahl mit Kaptonfenstern (Abbildung 4.10, A) montiert [14]. Die Temperaturkontrolle erfolgte durch den Durchfluss einer Temperierflüssigkeit mit einem Wärmereservoir (Julabo). Durch eine externe Steuerung konnte die Temperatur so über mehrerer Stunden auf  $\pm 1^\circ\text{C}$  konstant gehalten werden bzw. kontrolliert variiert werden. Durch ein Wasserreservoir in der Kammer wurde eine hohe relative Luftfeuchtigkeit in der Kammer gewährleistet. Nominell sollte die Luftfeuchtigkeit bei 100 % liegen, tatsächlich wurde jedoch bereits in früheren Studien [58, 102, 103] beobachtet, dass festkörpergestützte Membranen in solchen Umgebungen nicht ihren voll hydratisierten Zustand erreichen. Dieses Phänomen wurde als *vapor pressure paradoxon* bekannt. Katsaras et al. [104] haben dies jedoch auf kleine Temperaturgradienten in den Kammern und daraus resul-



tierende Abweichungen der relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % zurückgeführt. Schon kleine Abweichungen entsprechen einem starken osmotischen Druck auf die Proben (Kapitel 2). Man spricht hier von partieller Hydratisierung. Mit einer verbesserten Kammerkonsruktion [105] ist es auch durch Hydratisation aus der Gasphase möglich eine volle Hydratisierung zu erreichen. In der in dieser Arbeit verwendeten Kammer war dies nicht möglich. Es wurde eine relative Luftfeuchtigkeit von ca. 95 – 98 % erreicht. Messungen bei voller Hydratisierung und bei kontrollierten osmotischen Druck erfolgten in einer separaten Nasskammer aus Edelstahl (Abbildung 4.10, B) mit Kaptonfenstern [84], welche zur Temperierung in die oben beschriebene Kammer eingesetzt wurde. Die Nasskammer ermöglicht die Montage der Probe im trockenen Zustand und das spätere Fluten der Kammer mit Wasser bzw. Polymerlösung. Durch ein Spülen der Kammer kann die Lösung *in situ* gewechselt werden. Zum Wechsel der Polymerlösungen wurde die Kammer jeweils mit mindestens dem dreifachen Kammervolumen der neuen Lösung gespült, um den Fehler in der Konzentration gering zu halten.

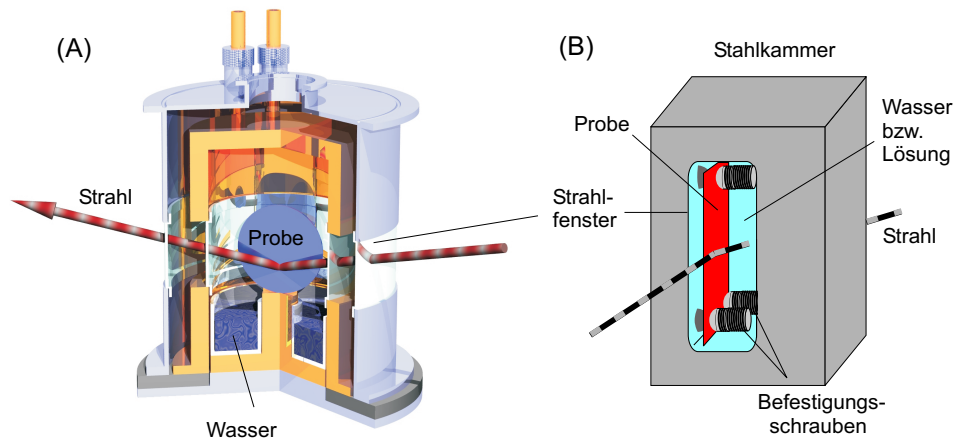


Abbildung 4.10: (A) Temperierkammer [14], (B) Nasskammer [84]

### 4.2.3 Hydratisation unter osmotischem Druck

In der Nasskammer wurde sowohl bei voller Hydratisation als auch bei partieller Hydratisation unter osmotischem Druck gemessen. Für volle Hydratisation wurde die Kammer mit hochreinem Wasser geflutet. Für die Messungen unter

osmotischem Druck wurde stattdessen eine Polymerlösung verwendet. Die Methode beruht auf dem Austausch der Wasserphase durch eine wässrige Lösung von großen Polymeren. Die Polymere müssen so groß sein, dass sie nicht in die, nur einige nm dicke, Wasserschicht eindringen können. Für das ungeladene Lipid DMPC, das bei voller Hydratisierung eine Wasserschichtdicke von 28 Å hat, wurde das ungeladene Polymer Polyethyleneglycol (PEG) der Masse 20000 Dalton verwendet. Bei einer Masse der Monomere von 44 Dalton bestehen die Polymere im Mittel aus etwa 455 Monomeren [106]. Der Gyrationradius<sup>5</sup> lässt sich dann über

$$R_g = \frac{\sqrt{N} \cdot l_0}{\sqrt{6}} = \frac{R_E}{\sqrt{6}} \quad (4.2)$$

abschätzen [107], wobei  $N$  die Anzahl der Monomere bezeichnet und  $l_0$  deren mittleren Abstand.  $R_E$  ist der mittlere End-zu-End-Abstand der Polymerkette. Mit einem Abstand  $l_0 = 1.6\text{Å}$  [108] ergibt sich ein Gyrationradius von 14 Å bzw. ein End-zu-End Abstand von  $R_E = 34.1\text{Å}$ . Damit ist ein Eindringen der Polymere in die Wasserschicht, die im höchsten Fall ca. 28 Å dick ist unwahrscheinlich. Die Membranen wirken daher wie eine semipermeable Membran, indem sie die Polymer von den dünnen Wasserschichten trennen. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht im chemischen Potential, und ein Druck wird auf die Wasserschicht ausgeübt. Es wurden PEG Lösungen in Konzentrationen von 1.5% bis 25% verwendet. Die entsprechenden osmotischen Drücke wurden der Literatur entnommen. [100]. Für das einfach negativ geladene Lipid POPS zeigte sich das ungeladene PEG 20000 als nicht ausreichend. Die Abstoßung durch die Gegenionen in der Wasserschicht ist so stark, dass das Polymer zwischen die Membranen eindringen konnte. Mit dem ebenfalls negativ geladene Polymer Polystyrenesulfonat  $Na^+$  PSS (Fluka) 70000 Dalton konnte das Eindringen der Polymere in die Wasserschicht verhindert werden. Die elektrostatische Abstoßung ist so stark, dass die Polymere nicht in die Wasserschicht eintreten [109]. Lediglich die Gegenionen können sich austauschen. Die elektrostatische Abstoßung zwischen Lipiden und Polymeren überwiegt hier den Effekt der Polymergröße. Mit dem Polymer der Masse 70000 Dalton konnten die POPS-Membranen bei einer Membrandicke von ca. 37 Å bis zu einer Gleichgewichtsdicke  $d = 220\text{Å}$  quellen. Es wurde mit PSS Lösungen der Konzentration 1%, 2%, 3.95%, 6%, 9.7% und 13% (Gew. %) gemessen. Die gemessenen Drücke sind in Kapitel 4.1.5 dargestellt.

---

<sup>5</sup>Maß für die räumliche Ausdehnung eines Polymermoleküls, entspricht ca. dem Durchmesser des Moleküls in Lösung

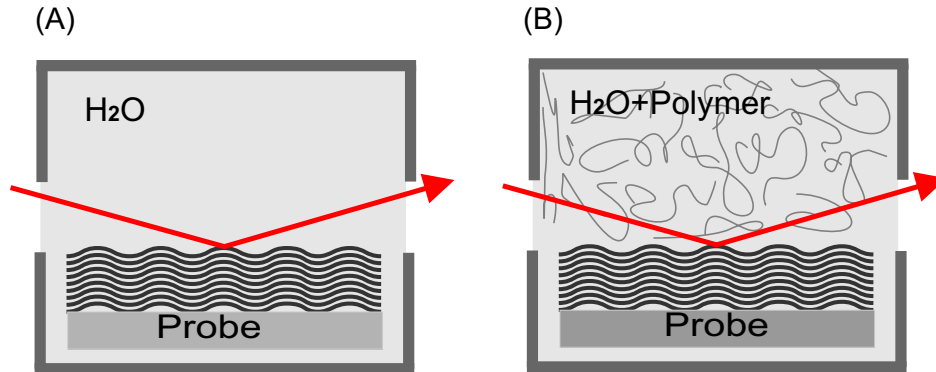


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des Streuexperiments an voll hydratisierten Membranen (A) und unter osmotischen Druck durch Hydratisierung aus einer Polymerlösung (B)

#### 4.2.4 Reflektivitätsmessungen an ungeladenen DMPC-Membranen

Oligo-Membranstackel des ungeladenen Lipids DMPC wurden bei voller Hydratisierung in reinem Überschuss-Wasser und in Polymerlösungen bekannten osmotischen Druckes gemessen. Die Temperatur betrug dabei 45°C. Diese Temperatur wurde gewählt, damit sich die Membranen sicher in der  $L_{\alpha}$ -Phase befinden. Zwar liegt die Hauptphasenübergangstemperatur für voll hydratisiertes DMPC bei 23.5°C, die Übergangstemperatur nimmt aber mit sinkender Hydratisierung zu. Durch die Wahl der hohen Temperatur wurde gewährleistet, dass die Membranen auch bei starkem osmotischem Druck, und entsprechend geringer Hydratisierung in der  $L_{\alpha}$ -Phase vorliegen. Reflektivitätskurven wurden aufgenommen, beginnend mit der höchsten PEG Konzentration von 14.2% Gewichtsanteil, entsprechend einem osmotischen Druck von  $1.95 \cdot 10^5$  Pa. Die Polymerkonzentrationen wurden anschließend in neun Schritten variiert, indem die Kammer zwischen den Messungen mit der jeweils nächsten Lösung gespült wurde. Für die Messreihe von neun Konzentrationen wurden zwei identische Proben, die jeweils aus 100  $\mu$ l DMPC Lösung in Chloroform (10 mg/ml) durch spin-coating hergestellt wurden, verwendet. Probe A wurde in nachstehender Reihenfolge in den PEG-Konzentrationen 14.2%; 25% und 9% gemessen. Probe B wurde in den übrigen PEG-Lösungen der Konzentrationen: 12.1%; 9%; 5.8%; 3.6%; 2.9%; 1.5%

und 0 gemessen. Alle Daten wurden korrigiert bezüglich der winkelabhängigen Probenausleuchtung, bezüglich des Ringstromes und, durch Abzug eines Offset-Scans, bezüglich des diffusen Streuuntergrundes. Die gemessenen Kurven werden im nächsten Kapitel 5 zusammen mit den numerischen Anpassungen gezeigt. Zusätzlich wurden Reflektivitätsmessungen an dicken, durch spreiten präparierten DMPC-Proben durchgeführt. Die „dicken“ Proben wurden in PEG Lösungen mit aufsteigender Konzentration gemessen. Eine Probe mit den Konzentrationen 1.5%; 3.6%; 9%; 19.3%; Gewichtsprozent und eine weitere Probe beginnend mit reinem Wasser und anschließend bei 9% und 14.2%-iger Lösung.

#### **4.2.5 Reflektivitätsmessungen an geladenen POPS-Membranen**

Reflektivitätsmessungen wurden an dünnen und dicken POPS Proben in PSS Lösungen verschiedener Konzentrationen durchgeführt. Eine Messung in reinem Wasser war nicht möglich, da die geladenen Membranen ohne osmotischen Druck nicht stabil sind. Dünne Proben wurden mit den Lösungen der Konzentrationen 2%, 3.95%, 6%, 9.7%, 13% Gewichtsprozent gemessen. Dicke Proben wurden in Lösungen der Konzentrationen 1%, 2%, 3.95%, 6%, 9.7% und 13% Gewichtsprozent gemessen. Dazwischen wurden die Proben mehrmals gewechselt.

#### **4.2.6 Messungen der diffusen Streuung an dicken Proben**

Die Intensität der diffusen Streuung von Membranstapeln liegt üblicherweise einige Größenordnungen unterhalb der spekulären Intensität. Oligo-Membranen geben zudem aufgrund der geringen Zahl von beitragenden Membranen ein niedriges Streusignal. Für die Messung der diffusen Streuung mit Hilfe eines 2D-Detektors wurden daher nur dicke Proben aus mehreren hundert Membranen verwendet. Die diffusen Bragg-sheets wurden an DMPC-Proben bei drei verschiedenen osmotischen Drücken durchgeführt. In reinem Wasser wurde bei einer Temperatur von  $30^{\circ}\text{C}$  gemessen. Die Messungen in einer PEG Lösung mit einer Konzentration von 9% (Gewichtsprozent) wurden bei einer Temperatur von  $39^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C}$  aufgenommen. Eine Messung von DMPC in einer Konzentration 20% wurde bei  $T = 34^{\circ}\text{C}$  aufgenommen. Die Proben wurden hier zwischendurch gewechselt so, dass kein Lösungsaustausch notwendig war. Die Messungen der

diffusen Bragg-Sheets wurden an dem Undulator-Meßplatz ID01 der ESRF in Grenoble durchgeführt. Bedingt durch messtechnische Probleme konnten die diffusen Bragg-Sheets von DMPC nur bei unterschiedlichen Temperaturen, ungleich der  $45^{\circ}\text{C}$  bei welcher die Reflektivitätsmessungen aufgenommen wurden, gemessen werden. Hohe Anforderungen an Strahlintensität und Strahlbedingung lassen eine Durchführung nur an wenigen Strahlrohren, die aufgrund ihrer Leistungsstärke auch entsprechend ausgelastet sind, zu. Eine Wiederholung der Messungen war daher im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.



# Kapitel 5

## Auswertung der Röntgenreflektivitäten und Schlussfolgerungen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Röntgenexperimente mit den Messdaten besprochen. Die Darstellung der Reflektivitätsdaten von Oligo-DMPC-Membranen unter osmotischem Druck mit numerischen Anpassungen nimmt dabei einen großen Raum ein, da das Modell zur Anpassung an sich ein Ergebnis dieser Arbeit ist. Zu den Reflektivitätsdaten werden die, durch die Anpassung ermittelten, Elektronendichteprofile angegeben. In den darauffolgenden Abschnitten werden die aus den Anpassungen ermittelten Parameter wie Gleichgewichtsabstand und elastische Parameter mit den Vorhersagen aus den Membranpotentialen verglichen.

### 5.1 Ungeladene Membranen: DMPC

#### 5.1.1 Anpassung der Reflektivitätskurven und Elektronendichteprofile

Abbildungen 5.1 bis 5.10 zeigen die gemessenen Kurven in zunehmender Reihenfolge der Polymerkonzentrationen. Alle gemessenen Kurven wurden korrigiert bezüglich der winkelabhängigen Probenausleuchtung. Bei gleichbleibender

Strahlgröße verändert sich bei Drehung der Probe im Strahl der Anteil der an Streuprozessen beteiligten Strahlung. Die Dauer der Messung einer typischen Reflektivitätskurve betrug ca. zwei Stunden. Die Abnahme des Speicherringstromes während dieser Zeit wurde in der Auswertung ebenfalls berücksichtigt. Um die spekulär reflektierte Intensität von der diffusen Intensität zu trennen, wurde von den Messdaten ein Offsetscan abgezogen. Die so korrigierten Daten konnten nun mit dem in Kapitel 3 entwickelten Modell beschrieben werden. Im folgenden werden die einzelnen Ergebnisse der Anpassungen beschrieben. Im Anhang wird eine Tabelle mit allen Parametern der Anpassungen gegeben.

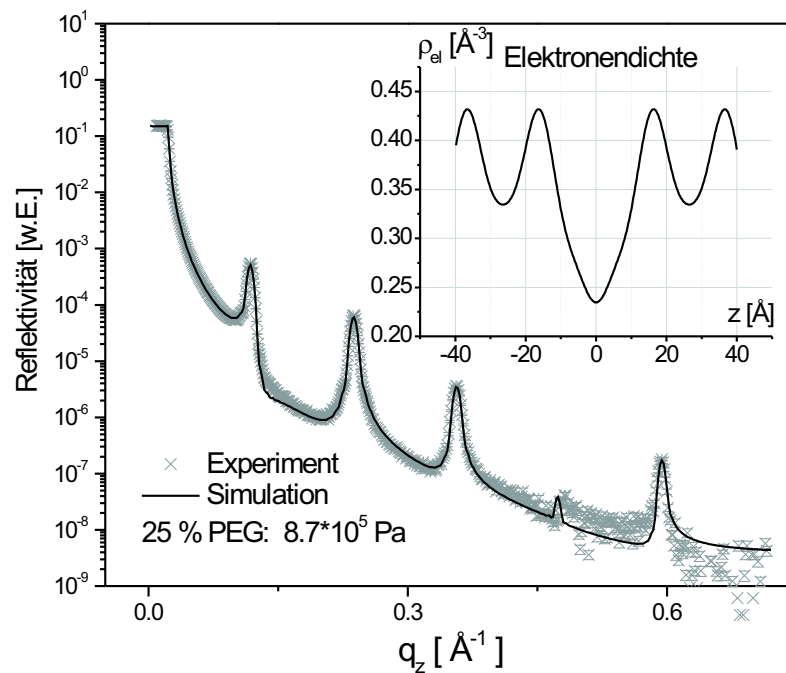


Abbildung 5.1: Reflektivität von 17 DMPC Membranen in 25%-iger PEG Lösung mit Anpassung und Elektronendichteprofil

Abbildung 5.1 zeigt die Reflektivität von 17 DMPC-Membranen auf Silizium Substrat, hydratisiert aus einer wässrigen PEG-Lösung der Konzentration von



25% (Gewichtsanteil). Die Zahl von  $N = 17$  Membranen bezeichnet hier die maximale Schichtdicke über die Probenoberfläche. Mit einem Bedeckungsfaktor von  $\alpha = 1.6$  und  $\beta = 2$  (siehe Kapitel 3.3.2) beträgt die mittlere Schichtdicke nur 8 Membranen. Bei einem Vergleich mit den aus der Gasphase hydratisierten Proben (Abbildung 4.2) zeigt sich eine höhere Defektdichte, wenn die Proben in direktem Kontakt mit der Lösung sind. Die Defekte zeigen sich vor allem in der Unterdrückung der *Kiessig-Fringes*, die bei Hydratisation aus der Gasphase deutlich zu erkennen sind. Die Polymerlösung übt einen osmotischen Druck von  $8.7 \cdot 10^5$  Pa auf die Probe aus. Aus der Position der 5 Bragg Maxima konnte eine Periode  $d = 52.9 \text{ \AA}$  ermittelt werden. Ein vergleichbarer Grad an Hydratisation konnte auch aus der Gasphase in der Temperierkammer erreicht werden. Auffallend ist hier die Unterdrückung des vierten Bragg Maximums durch den Formfaktor, die auch in einer Messung mit vergleichbarer Hydratisation aus der Gasphase (in Abbildung 4.2) zu sehen ist. Die hier gemessene Periode von  $d = 52.9 \text{ \AA}$  entspricht einer Hydratisation von 18 Wassermolekülen pro Lipidmolekül. Unter der Annahme, dass die Wasserschicht zwischen den Membranen von den Lipidmolekülen durch eine glatte ebene Grenzfläche getrennt ist und dass die Lipidmoleküle eine mittlere laterale Fläche von  $61.7 \text{ \AA}^2$  [59] einnehmen, entspricht das einer Wasserschichtdicke von  $d_w = 17.4 \text{ \AA}$ . Dies entspricht mit einer Abweichung von  $2.5 \text{ \AA}$  dem Phosphor-Phosphor-Abstand über der Wasserschicht  $d_{pp-}$  im Elektronendichteprofil (markiert durch die Maxima im Einschub von Abbildung 5.1), der  $20.0 \text{ \AA}$  beträgt. Der Phosphor-Phosphor-Abstand über die Membran  $d_{pp}$  beträgt  $32.9 \text{ \AA}$ . Tatsächlich kann man die Wasserschicht räumlich nicht streng von der Membran trennen. Vielmehr umgeben sich die polaren Kopfgruppen der Lipide an allen Seiten von Wassermolekülen, weshalb auch Wassermoleküle zwischen den Kopfgruppen in der Membranebene zu finden sind. Die mittlere Fläche pro Kopfgruppe von  $61.7 \text{ \AA}^2$  bezieht sich so auch auf die Fläche von voll hydratisierten Lipiden und beinhaltet auch den Beitrag der Wassermoleküle.

Die Anpassung in Abbildung 5.1 zeigt im Intensitätsverlauf zwischen den Bragg-Maxima vierter und fünfter Ordnung eine Abweichung von der gemessenen Intensität. Der gemessene Verlauf konnte durch Phasenumkehr des fünften Fourier-Koeffizienten besser angepasst werden. Dadurch ergibt sich jedoch ein Elektronendichteprofil (Abbildung 5.2), das den Erfahrungen aus Experimenten an un-orientierten und orientierten Membranen [88, 110, 89] und Ergebnissen aus Molekulardynamik-Simulationen [111, 13, 11] widerspricht. Vor

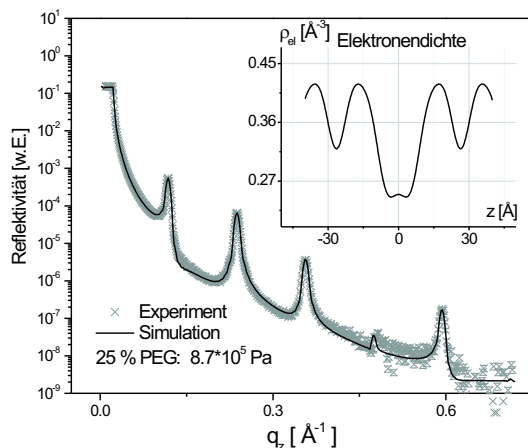


Abbildung 5.2: Reflektivität von 17 DMPC Membranen in 25%-iger PEG Lösung mit Anpassung und Elektronendichteprofil mit  $f_5 = + 0.11$

dem Hintergrund einer recht genauen Vorstellung von Elektronendichteprofilen von Lipidmembranen wurde diese Möglichkeit verworfen. Aus der bevorzugten Anpassung in Abbildung (5.1) wurde ein Wert  $\eta = 0.003$  für den Caillé Parameter für die Stärke der Fluktuationen bestimmt. Dieser Wert ist jedoch mit einem großen Fehler behaftet. Vor allem in den Messungen unter starkem osmotischen Druck spielen die Fluktuationen keine große Rolle. Bei zunehmenden Fluktuationen unter niedrigerem osmotischem Druck werden dadurch vor allem die Bragg-Maxima höherer Ordnungen unterdrückt.(s.o.)

Die Maxima im Elektronendichteprofil im Einschub von Abbildung (5.1) markieren die Positionen der Phosphoratome in den Membranen, die mit einer Elektronenzahl von 15 Elektronen pro Atom am stärksten zur Elektronendichte beitragen. Zwischen den Phosphoratomen über die kürzere Distanz  $d_{pp}$  von  $20 \text{ \AA}$  geht die Elektronendichte auf den Wert der Elektronendichte von Wasser von  $0.33e^-/\text{\AA}^3$ . Auf der anderen Seite zwischen den Maxima, im Zentrum der Grafik bei  $z = 0$  hat die Elektronendichte ein ausgeprägtes Minimum von  $0.235e^-/\text{\AA}^3$  was der Elektronendichte der  $CH_3$ -Gruppen am Ende der Acylketten entspricht. Die Tatsache, dass die Acylketten nicht als Plateau im Elektronendichteprofil zu sehen sind sondern nur als Abfall der Dichte von

den Kopfgruppen zu Membranmitte, lässt sich dadurch erklären, dass die Membranen schließlich in der  $L_\alpha$ -Phase sind und die Ketten entsprechend weich sind. Zusätzlich ist in einem solchen Profil die intrinsische Rauigkeit der Membranen enthalten, die beispielsweise durch Versetzungen einzelner Moleküle entsteht.

Abbildung 5.3 zeigt die Reflektivität derselben Probe, hier in einer PEG-Lösung von 14.2% (Gewichtsanteil), entsprechend einem osmotischen Druck von  $1.95 \cdot 10^5$  Pa. Wieder sind fünf Bragg-Maxima zu erkennen. Im Vergleich zur vorigen Kurve ist jedoch das vierte Maximum deutlicher ausgeprägt. Die Position der Bragg-Maxima lässt auf eine Periode von  $55.4 \text{ \AA}$  schließen. Der Verlauf der Simulation stimmt gut mit der Messung überein. Wie oben ergibt die Simulation eine Zahl  $N = 17$ . Der Bedeckungsfaktor beträgt  $\alpha = 1.7$ , was einer geringeren Defektdichte entspricht und nahe liegend ist, da diese Messung vor der obigen durchgeführt wurde und die Probe in der Zwischenzeit mit der neuen PEG-Lösung gespült wurde. Auch nach optischer Beobachtung des Spülvorgangs scheint es wahrscheinlich dass sich bei dem Spülen kleine Teile von dem Membranstapel lösen. Der Caillé Parameter wurde mit  $\eta = 0.02$  bestimmt. Dieser Wert ist wesentlich höher als der obige, jedoch gelten auch hier die Einschränkungen bezüglich der Genauigkeit in der Bestimmung von  $\eta$ . Der hier bestimmte Wert  $\eta = 0.02$  entspricht jedoch eher den theoretischen Vorhersagen (siehe unten).

Aus der Periode  $d=55.4 \text{ \AA}$  lässt sich eine Hydratisation von 20.7 Wassermolekülen pro Lipid errechnen, woraus eine theoretische Wasserschichtdicke  $d_w$  von  $20 \text{ \AA}$  folgt. Der aus dem Elektronendichteprofil im Einschub von Abb. 5.3 entnommene Abstand  $d_{pp-}$  beträgt  $21.4 \text{ \AA}$ , und  $d_{pp} = 34.0 \text{ \AA}$  entsprechend. Das Elektronendichteprofil ist im Verlauf dem oben ermittelten sehr ähnlich, jedoch erscheint die Membrandicke etwas breiter und die Minima in der Mitte der Membran mit  $0.217 e^-/\text{\AA}^3$ , und auch in der Wasserschicht mit  $0.327 e^-/\text{\AA}^3$  liegen etwas niedriger. In dieser Kurve ist auch der charakteristische Wendepunkt in den Flanken der Maxima zur Membranmitte zu erkennen. Dieser Wendepunkt ist bekannt aus früheren Ergebnissen zu Elektronendichteprofilen von Membranen [88, 110, 89]. Er deutet ein Plateau, entsprechend den Acylketten in der Membran an.

Abbildung 5.4 zeigt die Reflektivität einer zweiten gleichartigen Probe, gemessen in einer PEG Lösung der Konzentration 12% (Gewichtsanteil). Der entsprechende osmotische Druck beträgt  $1.2 \cdot 10^5$  Pa. Die Reflektivitätskurve sieht ähnlich aus

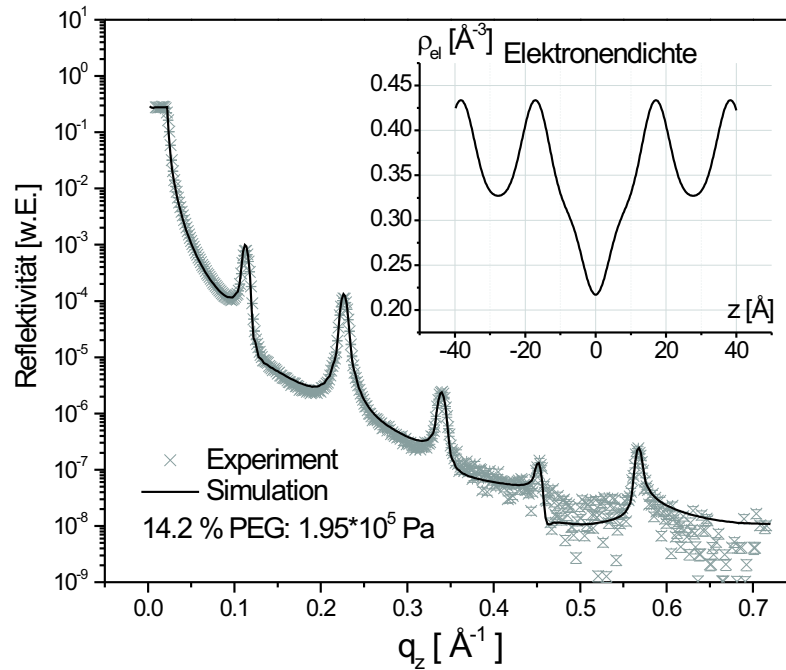


Abbildung 5.3: Reflektivität von 17 DMPC Membranen in 14.2%-iger PEG Lösung

wie die obigen. Das vierte Bragg-Maximum ist jedoch stärker und es lässt sich eine leichte Verbreiterung der Maxima höherer Ordnungen erkennen. Zwischen den Maxima vierter und fünfter Ordnung zeigt sich ein leichtes Minimum. Aus den Positionen der Maxima errechnet sich eine Periode  $d = 55.9 \text{ \AA}$ . Die Anpassung stimmt im Bereich von kleineren  $q_z$  Werten sehr gut mit der Messung überein. Das Minimum zwischen dem vierten und fünften Maximum ist jedoch nicht gut getroffen. Aus der Anpassung ergibt sich eine maximale Schichtdicke von  $N = 18$  Membranen mit einem Bedeckungsparameter  $\alpha = 1.6$ . Der Caillé Parameter wurde mit  $\eta = 0.0065$  bestimmt. Die Hydratisierung entspricht 21.2 Wassermolekülen pro Lipid mit einer theoretischen Wasserdicke von  $20.6 \text{ \AA}$ . Im Elektronendichteprofil ergibt sich  $d_{pp-} = 22.3 \text{ \AA}$  und  $d_{pp} = 33.6 \text{ \AA}$ . Das Profil stimmt relativ gut mit dem für 14%-ige PEG-Lösung bestimmten überein,

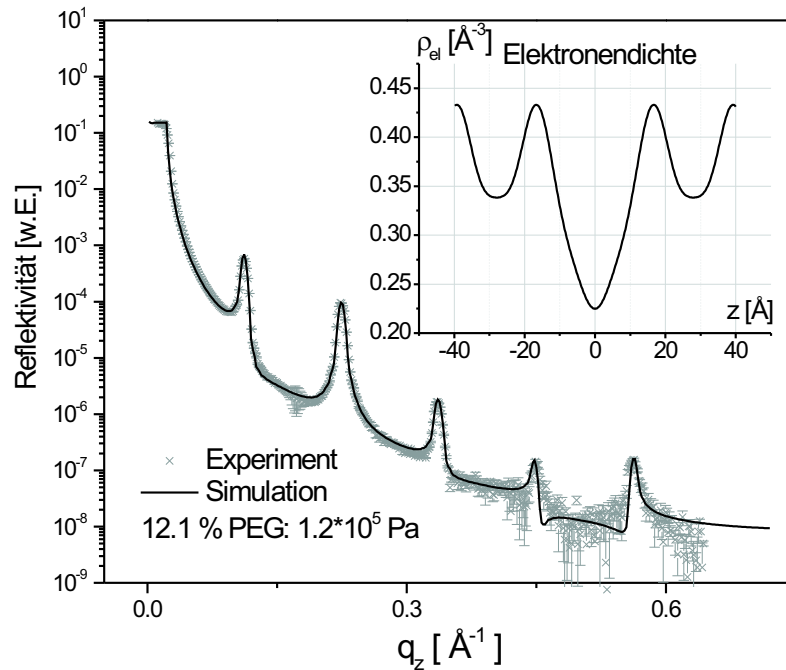


Abbildung 5.4: Reflektivität von 18 DMPC Membranen in 12.1%-iger PEG Lösung

jedoch sind die charakteristische Wendepunkte nicht sichtbar, und die Dichte der Wasserschicht ist mit  $0.338 e^-/\text{\AA}^3$  etwas höher. Allerdings zeigt sich hier in der Wasserschicht bereits ein Plateau in der Dichte, was auf eine tatsächliche reine Wasserschicht hindeutet.

In der folgenden Abbildung (5.5) ist wieder eine Reflektivitätsmessung an der Probe aus den ersten beiden Abbildungen (5.1 und 5.3) zu sehen, hier in einer PEG-Lösung der Konzentration 9% (Gewichtsanteil). Dies entspricht einem Druck von  $7.7 \cdot 10^4$  Pa. Das Minimum zwischen den Bragg-Maxima vierter und fünfter Ordnung ist hier stärker ausgeprägt. Die Periode errechnet sich zu  $56.9 \text{\AA}$ . Die Anpassung gibt den Verlauf der Messdaten sehr gut wieder. Die Maximalzahl

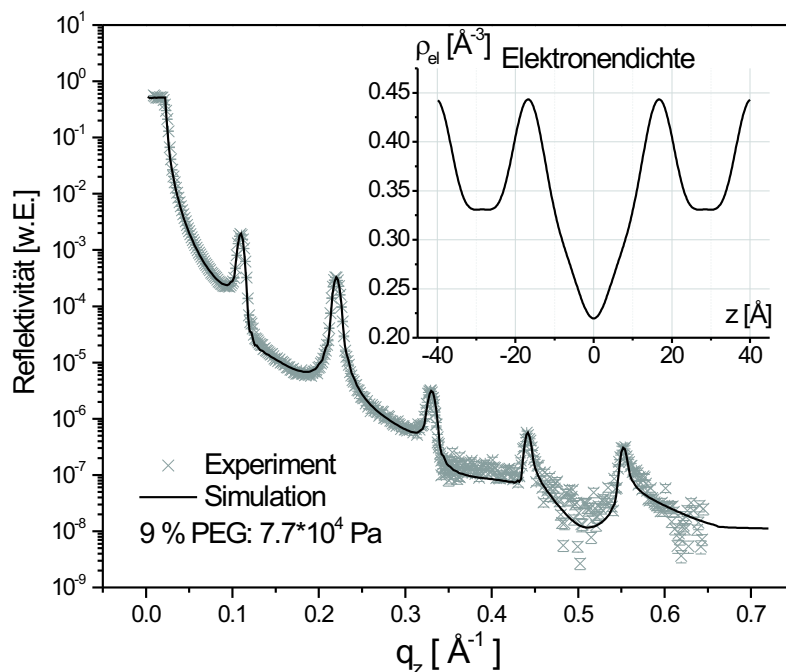


Abbildung 5.5: Reflektivität von 16 DMPC Membranen in 9%-iger PEG Lösung

der Schichten wurde hier mit  $N = 16$  angepasst, mit einem Bedeckungsparameter von  $\alpha = 1.8$  passt das gut mit den vorherigen Ergebnissen überein, wenn man annimmt, dass sich die oberste Membran beim Spülen mit der Lösung abgelöst hat, während die übrigen Membranen weitgehend unverändert bleiben. Der ermittelte Caillé Parameter beträgt  $\eta = 0.0026$ . Die Hydratisierung entspricht 22.3  $H_2O$ -Molekülen pro Lipid, woraus sich eine theoretische Wasserdicke  $d_w = 21.6 \text{ \AA}$  ergibt. Im Vergleich dazu lässt sich aus dem Elektronendichteprofil ein Phosphor-Phosphor-Abstand über die Wasserschicht von  $d_{pp-} = 23.4 \text{ \AA}$  ablesen. Über die Membran ergibt sich somit  $d_{pp} = 33.5 \text{ \AA}$ . Das Profil stimmt wieder sehr gut mit den vorangegangenen überein. Wieder sind keine Wendepunkte in den Bereichen der Acylketten zu erkennen. Wie bei dem vorigen Ergebnis in Abb. 5.4 haben die Maxima eine leicht höhere Dichte mit  $0.44 e^-/\text{\AA}^3$ . In der Wasserschicht zeigt sich ein ausgeprägteres Plateau.

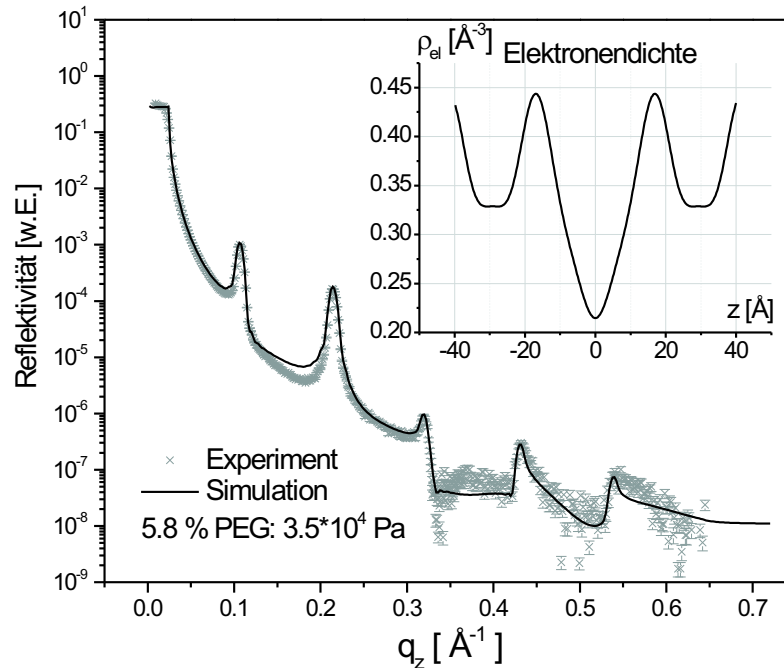


Abbildung 5.6: Reflektivität von 14 DMPC Membranen in 5.8%-iger PEG Lösung

Abbildung 5.6 zeigt erneut eine Reflektivität derselben Probe wie in Abb. 5.4. Hier wurde die Probe aus einer 5.8%-igen Lösung hydratisiert. Der osmotische Druck betrug entsprechend  $3.5 \cdot 10^4$  Pa. Die Messung zeigt nun deutlich eine Verbreiterung und Dämpfung der höheren Ordnungen. Das dritte Maximum hat im Vergleich zu obigen Messungen abgenommen und direkt dahinter zeigt sich ein scharfes Intensitätsminimum, bevor die Intensität über ein Plateau steil zum vierten Maximum ansteigt. Die Periode wurde zu  $d = 58.5 \text{ \AA}$  ermittelt. Das ergibt eine Hydratisation von 24  $H_2O$ -Molekülen pro Lipid und eine theoretische Wasserdicke von  $23.2 \text{ \AA}$ . Die Anpassung weicht besonders vor dem 2. Bragg-Maximum und zwischen der dritten und vierten Ordnung von der gemessenen Kurve ab. Das daraus ermittelte Elektronendichteprofil fügt sich dagegen gut in die bisherigen Ergebnisse ein. Insbesondere mit dem für 9%-ige PEG-Lösung bestimmten Profil (Abb. 5.5) ist dieses fast vollständig deckungsgleich, bis auf

ein breiteres Plateau an der Wasserschicht. Demnach betragen die Phosphor-Phosphor-Abstände  $d_{pp} = 34.4 \text{ \AA}$  und  $d_{pp-} = 24.1 \text{ \AA}$ . Der Caillé Parameter wurde mit  $\eta = 0.034$  angepasst. Aus der Anpassung ergeben sich außerdem die Werte  $N = 14$  und  $\alpha = 1.75$ , jedoch erscheinen diese aufgrund der relativ schlechten Übereinstimmung mit dem Verlauf der gemessenen Daten nicht besonders vertrauenswürdig.

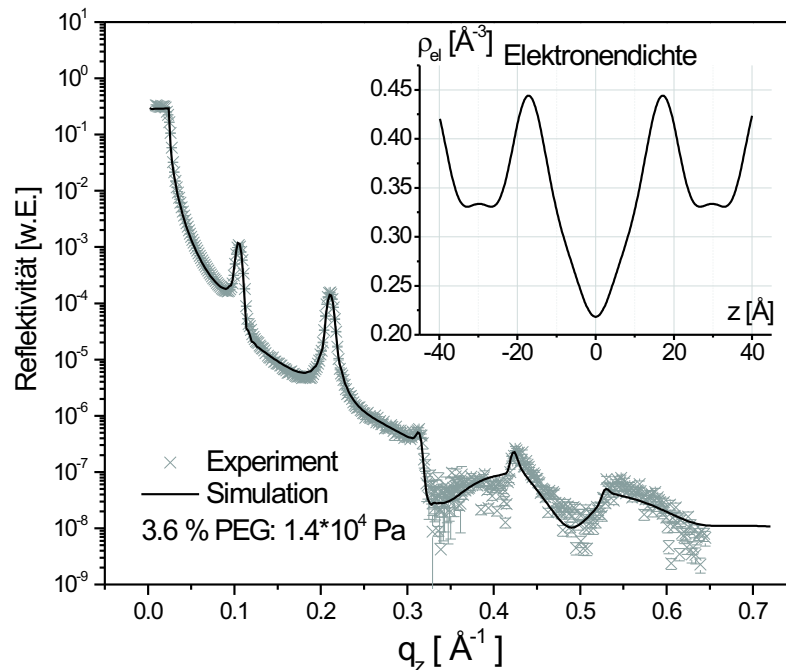


Abbildung 5.7: Reflektivität von 16 DMPC Membranen in 3.6%-iger PEG Lösung

Dieselbe Probe wurde in einer PEG-Konzentration von 3.6% , entsprechend einem osmotischen Druck von  $0.14 \cdot 10^5 \text{ Pa}$  gemessen. Die Reflektivitätskurve ist in Abbildung (5.7) zu sehen. Die Kurve ist der vorhergehenden sehr ähnlich, das dritte Maximum ist nur noch als keine Schwelle vor einem Intensitätsabbruch zu erkennen. Die Maxima vierter und fünfter Ordnung verschwinden immer mehr in breiten Oszillationen. Die Periode lässt sich bestimmen zu  $d = 59.5 \text{ \AA}$ . das ergibt eine Hydratisierung von 25  $H_2O$ -Molekülen pro Lipid und eine theoretische



Wasserdicke  $d_w = 24.2 \text{ \AA}$ . Die Anpassung stimmt hier sehr gut mit der gemessenen Kurve überein. Ab dem dritten Maximum lässt sich aber eine geringe Verschiebung der Positionen in  $q_z$  beobachten. Die höheren Ordnungen lassen sich besser mit einer geringeren Periode  $d$  anpassen, wobei aber die ersten beiden - verhältnismäßig scharfen - Maxima nicht mehr getroffen werden. Aus der Anpassung ergibt sich eine maximale Probendicke mit  $N = 16$  Membranen und einem Bedeckungsparameter  $\alpha = 1.7$ . Dies widerspricht dem Ergebnis der vorangegangenen Messung mit einer geringeren Bedeckung von  $N = 14$  und  $\alpha = 1.75$ . In Anbetracht der besseren Übereinstimmung dieser Kurve und dem Ergebnis aus Abbildung (5.4) erscheinen die hier ermittelten Werte glaubwürdiger. Für den Caillé Parameter ergibt sich  $\eta = 0.065$ . Das durch die Anpassung ermittelte Elektronendichteprofil im Einschub ist dagegen wieder fast deckungsgleich mit den beiden zuvor ermittelten Profilen für 9% PEG-Lösung und 5.8% PEG-Lösung. Lediglich das Wasserplateau ist erneut verbreitert. In der Mitte der Wasserplateaus sind kleine *Überschwinger* zu erkennen. Dabei handelt es sich vermutlich um Artefakte. Aus dem Profil lassen sich  $d_{pp} = 34.4 \text{ \AA}$  und  $d_{pp-} = 25.1 \text{ \AA}$  ablesen.

Abbildung 5.8 zeigt die Reflektivität derselben Probe bei einem osmotischen Druck von  $9 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ , ausgeübt durch eine 2.9% -ige PEG-Lösung. Die Kurve unterscheidet sich nur wenig von der vorhergehenden Kurve. Die Periode wurde zu  $d = 60.2 \text{ \AA}$  bestimmt. Dies entspricht einer Hydratisierung von 25.7  $H_2O$ -Molekülen pro Lipid, was eine theoretische Wasserdicke  $d_w = 24.9 \text{ \AA}$  ergibt. Mit  $N = 14$  und  $\alpha = 2$  erscheint die Bedeckung im Umfeld der übrigen Messungen wieder zu gering. Das Elektronendichteprofil passt im Verlauf sehr gut zu dem vorherigen Ergebnis, jedoch ist das Minimum im Zentrum der Membran mit  $0.235 e^-/\text{\AA}^3$  etwas höher. Die Wasserplateaus liegen etwas niedriger als bei den anderen Profilen bei  $0.32 e^-/\text{\AA}^3$ . Aus dem Profil lassen sich  $d_{pp} = 34.8 \text{ \AA}$  und  $d_{pp-} = 25.4 \text{ \AA}$  ablesen.

In Abbildung 5.9 ist wieder eine Messung derselben Probe zu sehen, gemessen in einer 1.5% -igen PEG-Lösung, die einen osmotischen Druck von  $4 \cdot 10^3 \text{ Pa}$  auf die Probe ausübt. Die Veränderung gegenüber dem nächst höheren gemessenen Druck ist gering. Das Maximum dritter Ordnung ist fast ganz verschwunden und die fünfte Ordnung ist ebenfalls kaum mehr als Peak wahrnehmbar. Die Anpassung stimmt hier gut mit der Messung überein. Daraus ergab sich eine Periode  $d = 60.7 \text{ \AA}$  und eine Hydratisierung von 25.7  $H_2O$ -Molekülen pro Lipid. Die theoretische Wasserdicke  $d_w$  beträgt demnach  $24.9 \text{ \AA}$ . Zum Vergleich ergeben sich aus dem Elektronendichteprofil wieder  $d_{pp} = 34 \text{ \AA}$  und  $d_{pp-} = 26.7 \text{ \AA}$ .

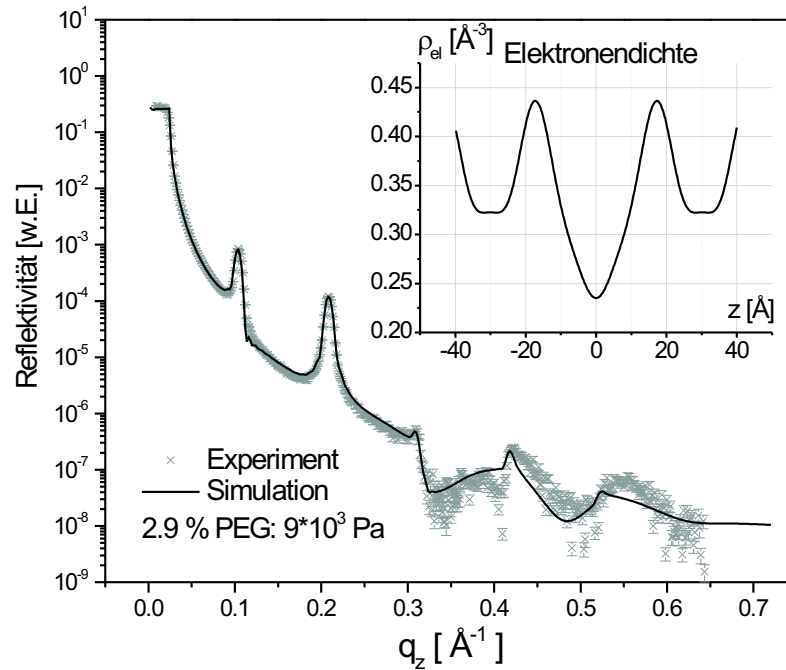


Abbildung 5.8: Reflektivität von 14 DMPC Membranen in 2.9%-iger PEG Lösung

Das Profil unterscheidet sich von dem in Abb. 5.3 gezeigten hauptsächlich durch die verbreiterte Wasserschicht.

Die letzte Reflektivitätsmessung aus dieser Reihe wurde bei voller Hydratisierung ohne osmotischen Druck in reinem Wasser durchgeführt. Die Kurve ist in Abbildung 5.10 dargestellt. An der Messkurve sind nur noch zwei deutlichen Maxima erster und zweiter Ordnung zu erkennen. Das dritte Maximum ist nur mehr als Kante eines Intensitätsabbruches zu erkennen, die vierte und fünfte Ordnung existieren nur als breite Oszillationen. Ab der dritten Ordnung lässt sich wieder eine Verschiebung in der Periode erkennen, die sich schon in den letzten beiden Kurven angedeutet hat. Aus den Peak-Positionen ergibt sich eine Periode von  $61.8 \text{ \AA}$ . Dieser Wert entspricht nicht ganz den Literaturwerten für die Pe-

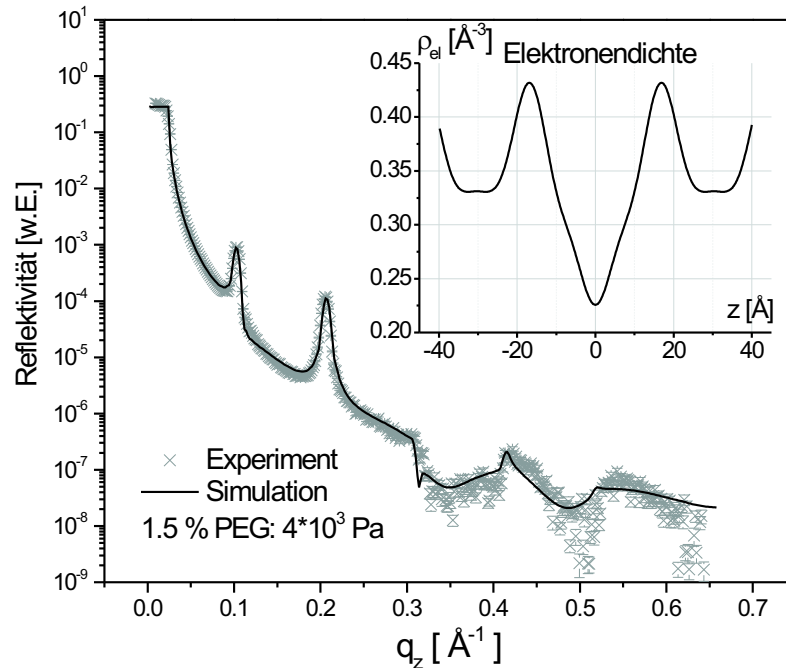


Abbildung 5.9: Reflektivität von 16 DMPC Membranen in 1.5%-iger PEG Lösung

riode von voll hydratisiertem DMPC, die bei  $30^\circ\text{C}$  zwischen  $62.8 \text{ \AA}$  [112] und  $64.3 \text{ \AA}$  [24] schwanken. Diese Abweichung könnte durch einen durch die Messung bedingten systematischen Fehler im osmotischen Druck erklärt werden. Die Messung von dicken DMPC Filmen unter gleichen Bedingungen in Reinstwasser bestätigt jedoch das Messergebnis (vgl. Kapitel 5.1.3, Abbildung 5.17). Die widersprüchlichen Literaturangaben und hier gemessenen Werte können dadurch nicht erklärt werden. Anscheinend hängt die Gleichgewichtsperiode  $d$  bei voller Hydratisation noch von anderen, hier nicht diskutierten Begebenheiten ab (vgl. [113]). Die gemessenen Membranen waren mit  $27.5 H_2O$ -Molekülen pro Lipid hydratisiert. Die theoretische Wasserdicke betrug  $d_w = 26.7 \text{ \AA}$ . Das Elektronendichteprofil stimmt wiederum mit dem Profil bei 14% PEG überein. Nur in der Wasserschicht unterscheiden sie sich durch die Breite der Wasserschicht. In diesem Profil ist die Wasserschicht nicht als Plateau zu erkennen. Vielmehr ist es ein

breites Minimum. Aus dem Profil ergeben sich  $d_{pp} = 34 \text{ \AA}$  und  $d_{pp-} = 27.8 \text{ \AA}$ . Der Caillé Parameter wurde mit  $\eta = 0.085$  bestimmt.

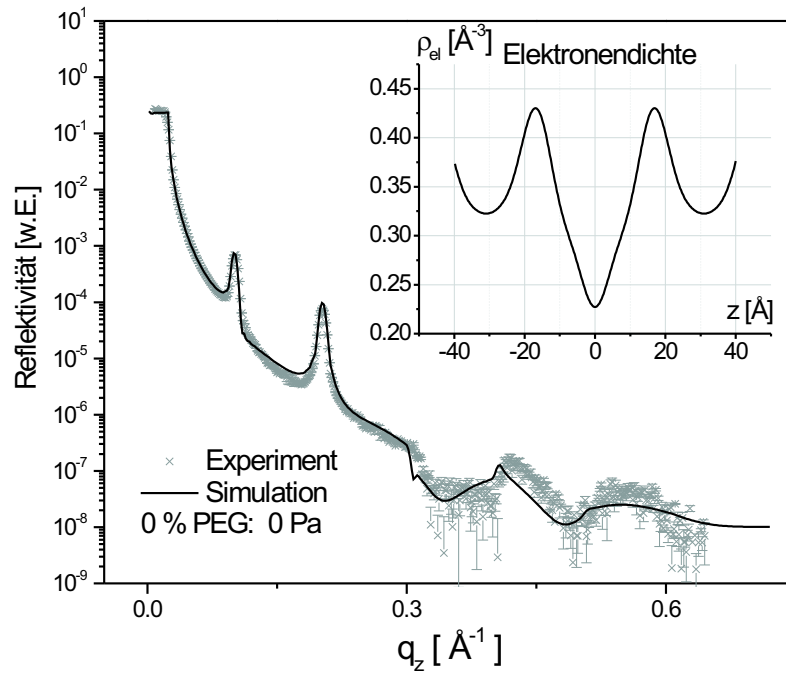


Abbildung 5.10: Reflektivität von 16 DMPC Membranen in Wasser mit Elektronendichteprofil

### Bestimmung der Phasen

Der charakteristische Wendepunkt in den Flanken des Elektronendichteprofiles an der Position der Acylketten, der aus der Literatur [88, 89] bekannt ist, ist in den hier ermittelten Profilen nur schwach (vgl. z.B. auch Abb. 5.3, und 5.10 ) bzw. überhaupt nicht (Abb. 5.4, 5.6 und 5.8 ) zu sehen. Am Beispiel der Reflektivität bei  $\Pi = 0.14 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ , (3.6 % PEG) soll dieses Ergebnis noch einmal begründet

und genauer belegt werden. Die oben ermittelte Phase für den vierten Fourierkoeffizienten ist  $+1$ . Damit wird das oben beschriebene Elektronendichteprofil erzeugt. Durch Umkehr der Phase des vierten Fourier-Koeffizienten zu  $-1$  wird der Wendepunkt im Profil sichtbar (Einschub in Abbildung 5.11, durchgezogene Linie). Die entsprechende Reflektivitäts-Anpassung (Abbildung 5.11, durchgezogene Linie) passt jedoch den Intensitätsverlauf zwischen dem dritten und fünften Maximum wesentlich schlechter an, als die oben beschriebene Kurve (ebenfalls in Abb. 5.11, gestrichelte Linie). Durch die Anpassung der Reflektivitäten über

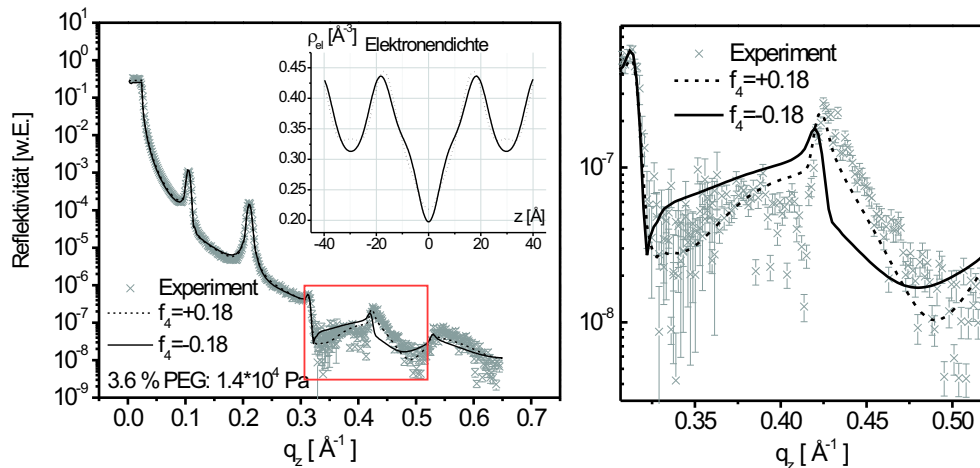


Abbildung 5.11: Vergleich der Anpassungen der Reflektivität bei  $\Pi = 0.14 \cdot 10^5$  Pa mit einer positiven Phase des vierten Fourierkoeffizienten (gestrichelte Linie) und einer negativen Phase des vierten Fourierkoeffizienten (durchgezogene Linie)

einen kontinuierlichen  $q_z$ -Bereich konnte die Phase des Koeffizienten zu  $+1$  so bestimmt werden. In Abbildung 5.12 sind alle Fourier-Koeffizienten für die beschriebenen Reflektivitätsanpassungen dargestellt.

Zusammenfassend wurden die Reflektivitätskurven gut mit den in den Kapiteln (2) und (3) hergeleiteten Formeln angepasst. In den folgenden Abschnitten soll noch einmal auf die daraus gewonnenen Parameter und Elektronendichteprofile in Abhängigkeit des ausgeübten osmotischen Druckes eingegangen werden.

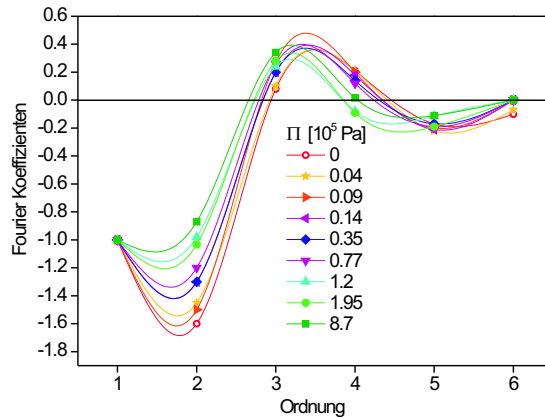


Abbildung 5.12: Fourierkoeffizienten mit Phasen (Symbole) aus den oben beschriebenen Anpassungen für die verschiedenen Osmotischen Drücke  $\Pi$ . Die durchgezogenen Linien stellen Spline Interpolationen dar.

### 5.1.2 Elektronendichteprofile als Funktion des Osmotischen Druckes

Aus den oben beschriebenen Reflektivitätsanpassungen für DMPC bei verschiedenen osmotischen Drücken ergeben sich sehr ähnliche Elektronendichteprofile. In Abbildung (5.13) sind sie zum Vergleich für alle Drücke dargestellt.

Deutlich lässt sich erkennen, dass sich das Profil der Membranen selbst wenig ändert. Die stärkste Veränderung ist erwartungsgemäß in der Dicke der Wasserschicht zu beobachten<sup>1</sup>. Eine Veränderung der Membrandicke durch den osmotische Druck lässt sich aus den gewonnenen Daten nicht ablesen. Bei mittleren Drücken von  $0.14 \cdot 10^5$  Pa bis  $0.77 \cdot 10^5$  Pa zeigt sich eine Erhöhung der Dichte im Bereich der Phosphor-Atome. Die Integrierte Differenz der Elektronendichte für die Profile für  $1.95 \cdot 10^5$  Pa und  $0.77 \cdot 10^5$  Pa beträgt ca. 5.5 Elektronen pro

<sup>1</sup>Die angeschnittenen Maxima an den Rändern bei  $z = \pm 40$  zeigen die Kopfgruppe bzw. den Anstieg zur Kopfgruppe der nächsten Membran. Die unterschiedlichen Höhen am Rand kommen durch die unterschiedlichen Perioden für die verschiedenen Drücke zustande. Aufgrund der unterschiedlichen Perioden  $d$  sind die Profile alle in unterschiedlichen Positionen abgeschnitten

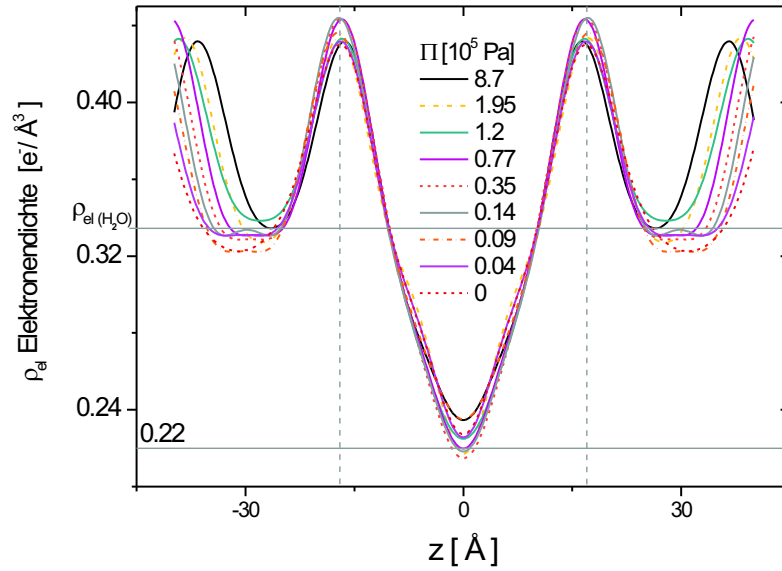


Abbildung 5.13: Elektronendichteprofil von DMPC Membranen unter verschiedenen osmotischen Drücken  $\Pi$

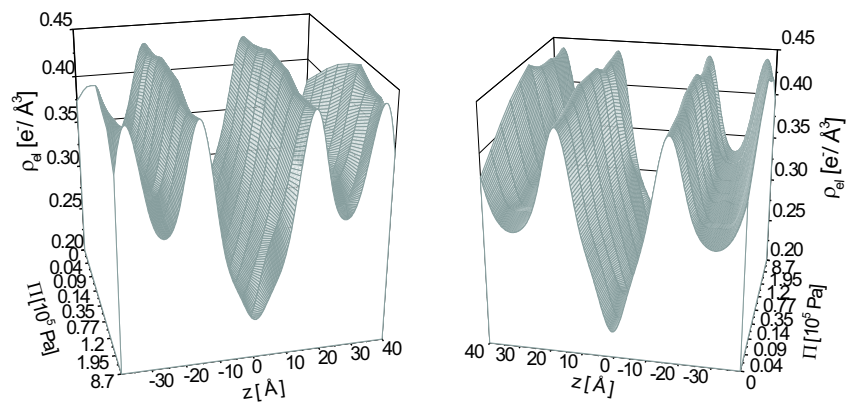


Abbildung 5.14: Elektronendichteprofil von DMPC gegen den osmotischen Druck aufgetragen. Links: aus Sicht von niedrigen Drücken zu hohen Drücken, Rechts: aus Sicht von hohen zu niedrigen Drücken.

Lipid. Auffällig ist, dass diese erhöhte Dichte bei niedrigerem **und** bei stärkerem Druck wieder abnimmt. Dies ist in der dreidimensional dargestellten Grafik in Abbildung 5.14 gut zu erkennen. Die Wasserschicht ist bei allen gemessenen Drücken als Plateau bei der Elektronendichte von Wasser  $\rho_{el}(H_2O) = 0.3345 e^- / \text{\AA}^3$  zu erkennen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Membran selbst unter den gemessenen Drücken und entsprechender Dehydratisierung nicht verändert. Dies ist eine wichtige Information für weiterführende Experimente bei partieller Hydratisierung und bestätigt Ergebnisse von Nagle et al. [90].

### Auswertung der diffusen Streuung

Die zweidimensionalen Datensätze der diffusen Streuung an DMPC wurden ausgewertet nach einem in der Literatur [24] beschriebenen Verfahren. Da die Intensität der ersten Bragg-Sheets auch bei einer kurzen Zähldauer von 0.1 Sekunden schon nahe an der Sättigungsgrenze des CCD-Detektors lag, konnten die ersten Bragg-Sheets nur unzureichend ausgewertet werden. Deshalb wurde jeweils das zweite Bragg-Sheet betrachtet. Dafür wurden durch die zweidimensionale Intensitätsverteilung vertikale (entlang  $q_z$ ) Schnitte gelegt. (gepunktete Linien in Abbildung 3.4). Gegenüber  $q_z$  aufgetragen, zeigen die Intensitätsverteilungen der Schnitte Maxima an der Stelle  $q_z = 4\pi/d$ . Diese Maxima konnten durch Lorentz-Funktionen verschiedener Breiten beschrieben werden. Die Halbwertsbreiten (HWHM, engl. *Half Width Half Maximum*) der Lorentz-Funktionen wurden gegen  $q_y$  aufgetragen (Abb. 5.15). Diese Kurven wurden durch eine Parabel der Form  $HWHM = A + \lambda^{(2)} \cdot q_y^2$  angepasst. Für die Messung in reinem Wasser (Abbildung 5.15 A)) ohne osmotischen Druck bei 30°C ergab sich dabei ein Wert  $\lambda^{(2)} = 16.8 \pm 2.8 \text{\AA}$ . Die hochgestellte (2) bedeutet, dass der Wert am zweiten Bragg-Sheet ermittelt wurde. Der eigentlich zu ermittelnde Wert der de Gennes'schen Eindringtiefe  $\lambda$  ergibt sich durch die Beziehung  $\lambda = \lambda^{(2)} / \sqrt{2}$  [24]. Für DMPC in einer 9%-igen PEG-Lösung bei einer Temperatur von 39 °C (Abbildung 5.15 B) ) ergab sich ein Wert  $\lambda^{(2)} = 9.9 \pm 0.9 \text{\AA}$ . Die gemessenen Daten sind etwas asymmetrisch um den Nullpunkt, was auf einen nicht ideal positionierten Detektor hindeutet. Auch der Fehler bei der Bestimmung der Halbwertsbreiten aus den Lorentz-Funktionen ist relativ groß. Die drei fehlenden Punkte bei positiven  $q_y$  Werten sind auf Fehler bei der automatischen Anpassung der Lorentz-Funktionen zurückzuführen.

Bei Messung in 20%-iger PEG-Lösung ( Abbildung 5.15 C) ) lässt sich die Halb-



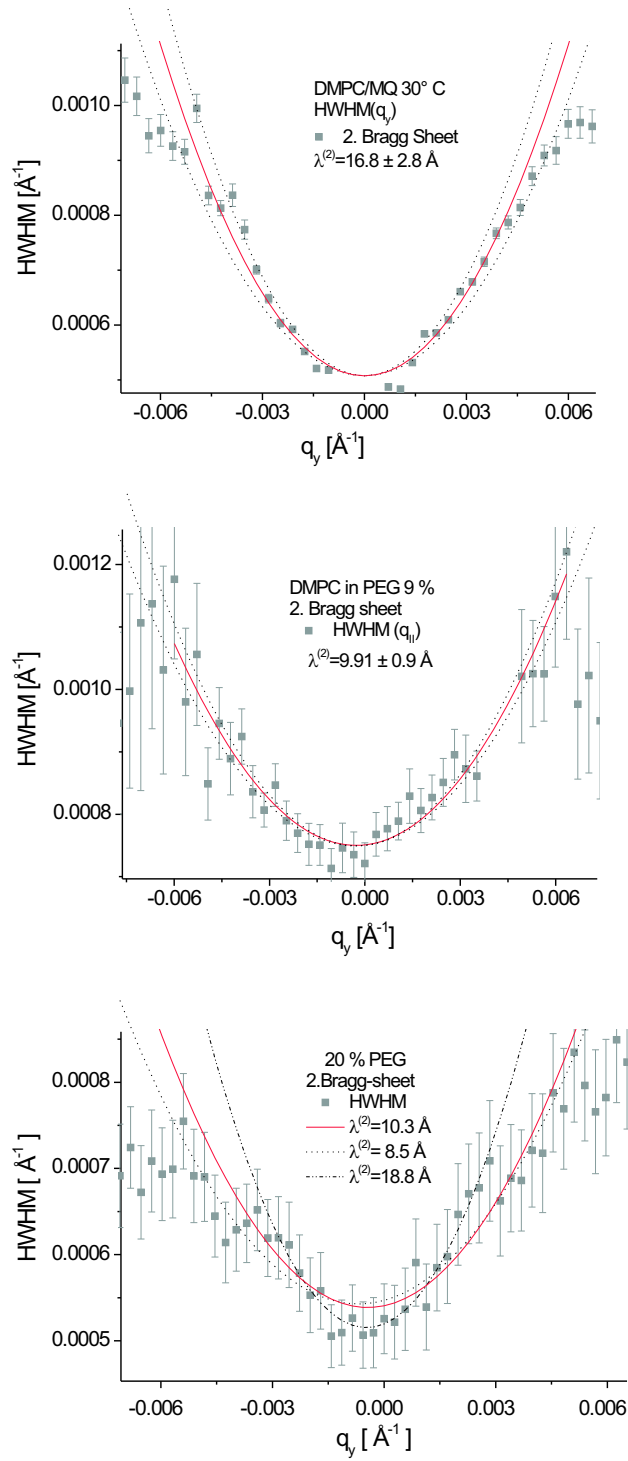


Abbildung 5.15: Die  $q_z$ -Halbwertsbreiten der zweiten Bragg-Sheets von DMPC in PEG Lösungen verschiedener Konzentrationen als Funktion von  $q_y$ . Aus den Anpassungen durch eine Parabel wird  $\lambda^{(2)}$  bestimmt

wertsbreite der Lorentz-Funktionen nicht eindeutig anpassen. Die Variation der Halbwertsbreiten beträgt hier weniger als einen Faktor zwei. Je nach Eingrenzung des anzupassenden Bereichs ergibt sich für  $\lambda^{(2)}$  ein Wert zwischen 8.5 Å und 18.8 Å. Daraus wurde der Mittelwert von 12.5 Å gebildet. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 36°C. Die ermittelten Werte  $\lambda^{(2)}$  wurden nach obiger Formel zu  $\lambda$  umgerechnet. Da die Messungen von  $\lambda$  bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt wurden, mussten die Werte diesbezüglich korrigiert werden. Aus [24] ergibt sich für voll hydratisiertes DMPC im Temperaturbereich zwischen 30°C und 45°C eine lineare Abhängigkeit  $\lambda(T)$  mit der Steigung 0.4 Å/°C. Den  $\lambda$ -Werten wurde ein entsprechender Differenzbetrag hinzu addiert.  $\lambda^t$  bezeichnet den bezüglich der Temperatur korrigierten Wert für  $T = 45^\circ\text{C}$ . Alle Werte sind in Tabelle 5.1.2 aufgelistet.

PEG-Konzentration	T [°C] Messung	$\lambda^{(2)}$ [Å]	$\lambda$ [Å]	$\lambda^t$ [Å]
0 %	30	16.8	11.9	17.9
9 %	39	9.9	7	9.4
20%	36	12.5	8.8	12.4
31 %	35	-	9.5	13.5
0 %	45	-	-	30

Tabelle 5.1: gemessene  $\lambda^{(2)}$ -Werte für DMPC in PEG-Lösungen unterschiedlicher Konzentration bei der Temperatur T am zweiten Bragg-Sheet.  $\lambda$  ist der bezüglich der Ordnung korrigierte Wert.  $\lambda^t$  geht durch Korrektur auf 45°C daraus hervor.

Aus den experimentell bestimmten  $\lambda$ -Werten in Verbindung mit den, aus den Reflektivitätsmessungen bestimmten,  $\eta$ -Werten lassen sich die elastischen Konstanten der Membranen B und K durch die Beziehungen  $\lambda = \sqrt{K/B}$  und  $\eta = \frac{\pi}{2} \frac{k_B T}{B \lambda d^2}$  berechnen. Aus dem Biegemodul K folgt die Biegesteifigkeit einer Membranen mit  $\kappa = K \cdot d$ . Die hier ermittelten Werte für  $\lambda$  sind mit großen Fehlern behaftet. Diese kommen zum einen durch ein geringes Signal-Untergrund Verhältnis in den Messdaten zustande. Zum Anderen ist auch die Richtigkeit der Korrektur bezüglich der Temperatur nicht gesichert. Die Addition eines Differenzterms ist nur die einfachste Möglichkeit und basiert lediglich auf Daten bei voller Hydratisation. Eine Änderung der Temperaturabhängigkeit mit dem osmotischen Druck ist aber möglich. Zum Vergleich wurden noch zwei Datenpunkte aus anderen Arbeiten in die Tabelle aufgenommen<sup>2</sup>. Sie sind in Abbildung 5.16

<sup>2</sup>Wert für 31% PEG zur Verfügung gestellt von Dr. D. Constantin und Literaturwert für  $\lambda$

als offene Symbole dargestellt dargestellt. Die Graphik zeigt einen großen Va-

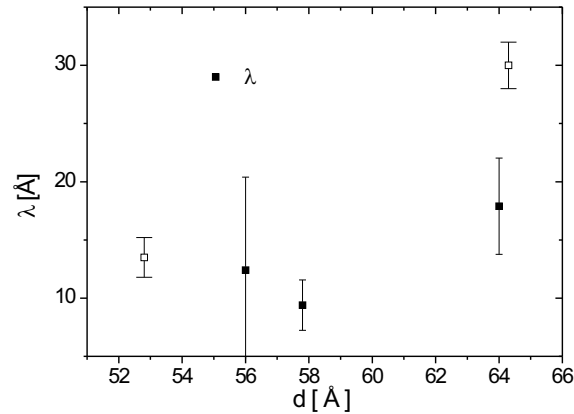


Abbildung 5.16: Experimentell bestimmte  $\lambda$ -Werte als Funktion der Periode  $d$ . Die offenen Symbole zeigen die zusätzlichen Werte <sup>2</sup>

riationsbereich von  $\lambda$  ohne erkennbare Tendenz in der Abhängigkeit von  $d$ . Eine weitere Auswertung bezüglich der elastischen Konstanten auf Basis dieser Daten ist nicht sinnvoll. Um zuverlässigere Daten zu erhalten müssten aufwändigere Messungen vorgenommen werden. Ein reciprocal space mapping mit einem Punkt-Detektor könnte helfen, ein besseres Signal-Untergrund Verhältnis zu erreichen. Messungen bei mehreren verschiedenen Drücken aber gleicher Temperatur könnten hier Klarheit bringen. Diese Messungen konnten im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden. Aus der genauen Analyse der spekulären Reflektivitätsmessungen zu Beginn dieses Kapitels ergibt sich jedoch eine weitere Möglichkeit die elastischen Eigenschaften zu bestimmen. Diese Möglichkeit wird im nächsten Abschnitt im Zusammenhang mit den zwischen den Membranen wirkenden Wechselwirkungspotentialen diskutiert.

bei voller Hydratisation und  $T = 45^\circ\text{C}$  [24]

### 5.1.3 Ergebnisse im Rahmen der Theorie der Wechselwirkungspotentiale

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels wurden die Reflektivitätsmessungen von DMPC Proben bei unterschiedlichen osmotischen Drücken analysiert und die Veränderung des Elektronendichteprofiles betrachtet. Nun sollen die Veränderungen einzelner Parameter mit dem osmotischen Druck diskutiert werden. Der wichtigste Parameter ist hier die Veränderung der lamellaren Periode  $d$ . Bei konstanter Membrandicke entspricht diese der Änderung der Wasserschichtdicke zwischen zwei Membranen im Stapel. In Abbildung 5.17 ist diese Druck-Abstands-Relation für Oligo-Membran Proben und multilamellare Proben dargestellt. Üblicherweise wird hierfür der Druck  $\Pi(d)$  gegen die Periode  $d$  aufgetragen. Die Werte für Oligo-Membranen und multilamellare Proben unterscheiden sich leicht. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Druck bei den multilamellaren Proben aus messtechnischen Gründen überschätzt wurde. Bei den Messungen der dicken multilamellaren Proben wurde die Lösungskonzentration schrittweise erhöht, im Gegensatz zu den Oligo-Membranen wo die Lösung schrittweise verdünnt wurde. Durch Restwasser in der Kammer könnten die Lösungen verdünnt gewesen sein. Zu bemerken ist jedoch, dass bei  $\Pi = 0$  sowohl bei den Oligo-Membranen, als auch bei den multilamellaren Proben lediglich ein Gleichgewichtsperiode von  $61.7 \text{ \AA}$  bis  $61.9 \text{ \AA}$  erreicht wurde. Wohingegen in der Literatur für voll hydratisiertes DMPC bei  $30^\circ\text{C}$  von Werten zwischen  $62.7 \text{ \AA}$  [112] bis  $64.3 \text{ \AA}$  [24] (auch bei festkörpergestützten Membranen) berichtet wird. Durch die umgekehrte Reihenfolge der Messungen bei beiden Probensystemen kann aber ein Fehler durch Polymerrückstände in der Kammer ausgeschlossen werden. Die Ursache für die geringe Gleichgewichtsperiode konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die durchgezogene Linie in Abbildung 5.17 zeigt eine Simulation des Druckes auf Basis der Wechselwirkungspotentiale, wie sie in Kapitel 2 beschrieben wurden. Die Druck-Abstands Kurve ergibt sich durch die Nullstellen der ersten Ableitung des Gesamtpotentials nach  $d$ . Das theoretische Potential setzt sich hier zusammen aus einem Beitrag des Van der Waals Potentials und des Hydrationspotentials. Hinzu kommt der experimentelle Beitrag des osmotischen Druckes. Für die Berechnung des Hydrationspotentials nach Gleichung (2.28) wurden aus der Anpassung die Parameter  $\lambda_h = 1.88 \text{ \AA}$  und  $H_0 = 4.8 k_B T / \text{\AA}^2$  ermittelt. Das Van der Waals Potential wurde berechnet nach Gleichung 2.21 für den statischen Anteil mit  $n=0$  und nach Gleichung 2.26 für den dispersiven Anteil. Die Summe in (2.21) wurde nach dem zehnten Glied abgebrochen, die Reihe in 2.26 wurde

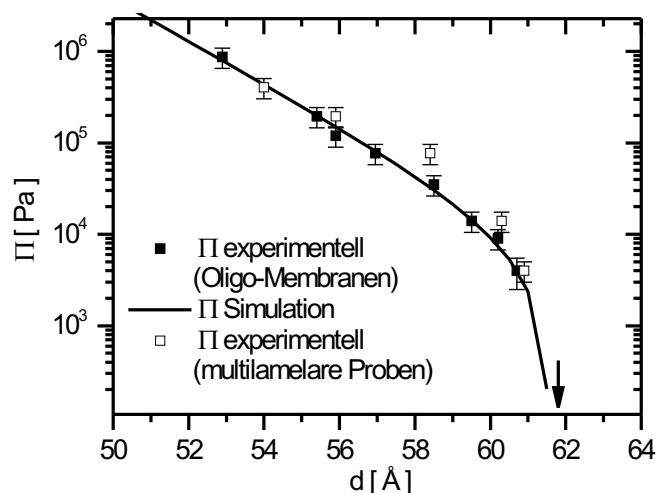


Abbildung 5.17: Der osmotische Druck  $\Pi$  als Funktion der lamellaren Periode  $d$ , bestimmt aus Reflektivitätsmessungen an Oligo-Membranen  $\blacksquare$  und an Multilamellaren Proben  $\square$ . Die Linie zeigt eine Simulation des Druckes anhand der Potentiale.

nach dem 200. Glied abgebrochen. Die hydrophobe Dicke der Membran wurde mit  $a=26 \text{ \AA}$  berücksichtigt. Zur Anpassung an die experimentelle  $\Pi(d)$ -Kurve wurde das gesamte Van der Waals Potential mit einem Faktor von 0.9 multipliziert. Die Berechnung ist sehr empfindlich auf kleine Änderungen ( $1 \text{ \AA}$ ) des eingesetzten Wertes für die hydrophobe Dicke  $a$ . Die genaue Abgrenzung in den hydrophoben und die hydrophilen Teilbereiche der Membran in dieser Genauigkeit ist jedoch schwierig. Durch Anpassung des Vorfaktors vor dem Van der Waals Potential und der Parameter des Hydrationspotentials konnte die experimentelle Kurve durch das Gesamtpotential gut beschrieben werden. Auch die Gleichgewichtsperiode bei voller Hydratisierung ( $\Pi = 0$ ) wird gut getroffen. Im Hinblick auf den Vorfaktor des Van der Waals Potentials, und auf die im Vergleich zu Literaturwerten, relativ kleine Gleichgewichtsperiode, muss man bei dem hier ermittelten Modell von einem effektiven Gesamtpotential sprechen. Die ermittelten Werte sind möglicherweise nicht eins zu eins auf andere Systeme übertragbar. Das untersuchte System bei den gegebenen Bedingungen lässt sich aber gut dadurch beschreiben.

Aus der zweiten Ableitung des Gesamtpotentials nach  $d$  folgt mit Gleichung 2.31 der elastische Kompressionsmodul  $B$ . Der Term des osmotischen Druckes fällt dann ganz weg, und  $B$  ist nur von den natürlichen Potentialbeiträgen bestimmt. Experimentell konnte  $B$  mit den verwendeten Methoden nicht direkt gemessen werden. Die Messung der  $\Pi(d)$  Kurve über einen weiten Bereich eröffnet aber die Möglichkeit  $B$  aus der numerischen Ableitung<sup>3</sup> der experimentellen Daten zu ermitteln. Abbildung 5.18 zeigt die experimentellen Werte zusammen mit einer Simulation auf Basis der oben berechneten Potentiale. Die gute Übereinstimmung zwischen Messdaten und Simulation bestätigt das Modell. Nach dem

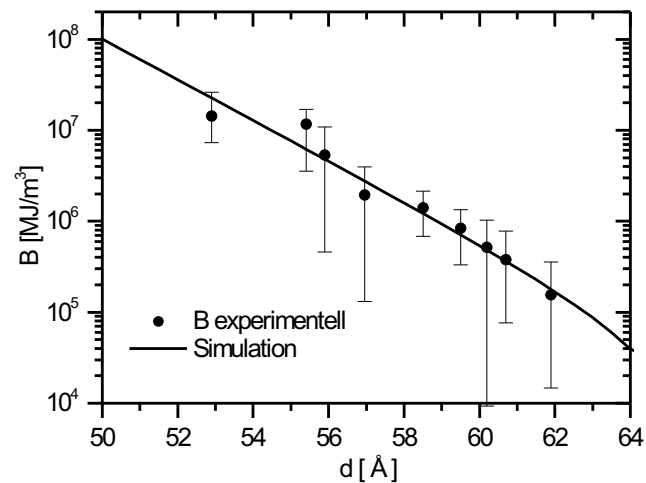


Abbildung 5.18: Experimentell bestimmtes  $B$  mit Simulation anhand der Potentiale.

Caillé-Modell ist die Stärke der thermischen Fluktuationen allein bestimmt durch den Kompressionsmodul  $B$  und den Biegemodul  $K$  der Membranen. Quantitativ lässt sich die Stärke der Fluktuationen durch den Parameter  $\eta$  ausdrücken. Im Caillé-Modell ist  $\eta$  für jedes  $d$  gegeben durch

$$\eta = \frac{\pi}{2d^2} \frac{k_B T}{\sqrt{BK}}. \quad (5.1)$$

Aus der Analyse der Reflektivitätsmessungen in Kapitel 5.2 konnte  $\eta$  für jeden Druck experimentell bestimmt werden. Abbildung 5.19 zeigt diese gemessenen

<sup>3</sup>numerische Differentiation in erster Näherung mit Origin

Werte  $\eta(d)$  als Funktion von  $d$ .  $\eta$  nimmt mit steigender Hydratisierung, also größerem  $d$  deutlich zu. Durch einen osmotischen Druck und daraus resultierende geringere Hydratisierung der Membranen werden also die thermischen Fluktuationen unterdrückt. Um dieses Verhalten mit den Vorhersagen des theoretischen Modells vergleichen zu können, fehlt die Größe  $K(d)$  bzw.  $\kappa(d)$ . Umgekehrt ist es aber nun möglich  $\kappa(d)$  experimentell zu bestimmen, da  $B(d)$  und  $\eta(d)$  unabhängig voneinander bestimmt werden konnten.

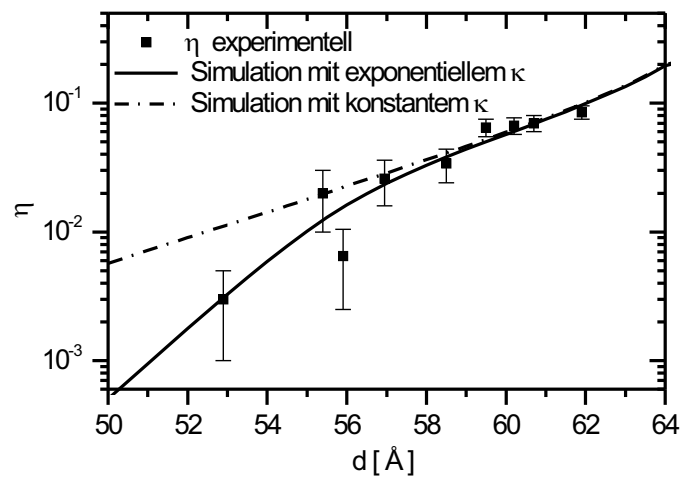


Abbildung 5.19: Aus den Reflektivitätsmessungen experimentell bestimmtes  $\eta$ . Die durchgezogene Linie zeigt eine Simulation anhand der Potentiale mit einem exponentiell verlaufenden  $\kappa$ , die unterbrochene Linie mit einem konstanten  $\kappa$

Setzt man die Werte für  $B$  und  $\kappa$  in Gleichung 5.1 ein und löst nach  $K$  auf, so erhält man für  $\kappa = Kd$  die Werte in Abbildung 5.20 in Einheiten von  $k_B T$ . Die Werte bei großem  $d$  sind gestreut um einen Wert von  $26 k_B T$ , bei kleinem  $d$  steigen sie um eine Größenordnung stark an. Die durchgezogene Linie zeigt eine empirische Anpassung der Form  $26 + 2.3 \cdot 10^{21} e^{-d/1.217} k_B T$ . Die großen Fehlerbalken bei kleinem  $d$  lassen auch eine konstante Interpretation von  $\kappa(d)$  zu. Der konstante Wert liegt dann ca. bei  $26 k_B T$  (unterbrochene Linie). Ausgehend von diesen beiden möglichen Abhängigkeiten von  $\kappa(d)$  wurde  $\eta$  berechnet und in Abbildung 5.19 als durchgezogene bzw. unterbrochene Linie dargestellt. Die beiden Kurven unterscheiden sich bei großen  $d$  nur wenig. Bei kleinen  $d$  laufen sie stark auseinander. Eine mögliche Ursache für die Abweichung der Kurve

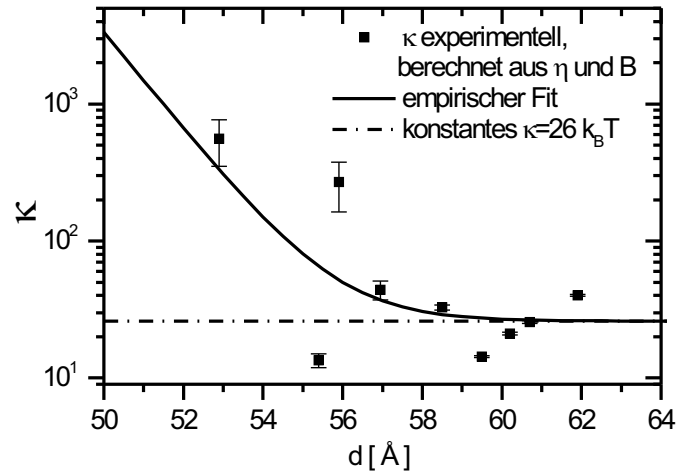


Abbildung 5.20: Experimentell bestimmtes  $\kappa(d)$  mit exponentieller Anpassung (durchgezogene Linie) und konstantem Wert  $\kappa = 26 k_B T$  (unterbrochene Linie)

für konstantes  $\kappa$  bei kleinen  $d$  könnte darin liegen, dass bei hohen osmotischen Drücken (kleinem  $d$ ) die Annahme einer verschwindenden Oberflächenspannung  $\gamma$  bei der Beschreibung der Fluktuationsamplituden nicht mehr gerechtfertigt ist. Eine endliche Oberflächenspannung würde zu einer zusätzlichen Unterdrückung der Fluktuationen im Membranstapel führen, was bei Vernachlässigung dieses Effekts letztendlich zu einer Unterschätzung von  $\eta$  führt. Dieser Effekt könnte auch die Differenz des beobachteten Wertes von  $26 k_B T$  für  $\kappa$  mit dem von Petrache *et al.* [66] beobachteten Wert ( $\kappa = 19 k_B T$  bei  $30^\circ\text{C}$ ) erklären.

## 5.2 geladene Membranen: POPS

Geladene POPS Membranen wurden in Form von Oligo-Membranen und in Form von dicken multilamellaren Proben gemessen. Abbildung 5.21 zeigt die Reflektivitätsmessungen an Oligo-Membranen in PSS Lösungen verschiedener Konzentrationen. Die Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben, korrigiert. Für eine bessere Übersicht wurden die gemessenen Kurven vertikal verschoben. Die



oberen vier Reflektivitätskurven zeigen ein breites zweites Bragg Maximum. Deutlich ist die Verschiebung seiner Position mit der PSS-Konzentration zu erkennen. Das erste Maximum ist nur als Kante von einem Intensitätsabfall zu erkennen, während höhere Ordnungen nur andeutungsweise zu erkennen sind. Die unterste

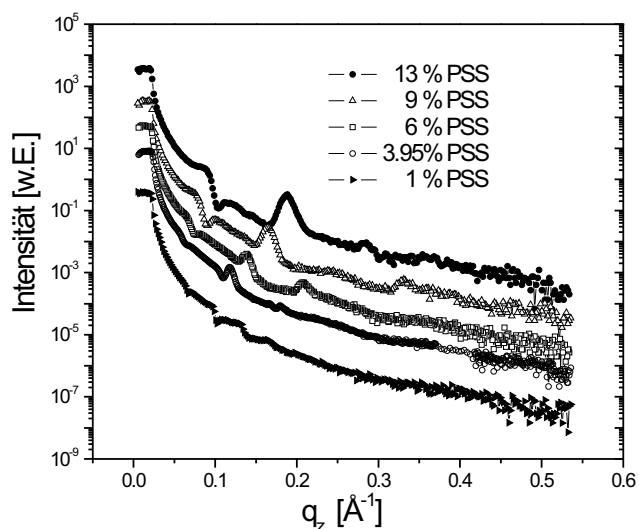


Abbildung 5.21: Reflektivitätsmessungen an POPS Oligo-Membranen in Lösungen verschiedener PSS Konzentrationen. Die Kurven sind vertikal verschoben (Intensität in willkürlichen Einheiten).

Kurve wurde in einer 1%-igen PSS Lösung aufgenommen. Sie zeigt gar kein ausgeprägtes Bragg-Maximum. Die ersten drei Ordnungen sind lediglich als kleine Kanten sichtbar. Die Positionen der beobachtbaren Maxima lassen auf eine Periodizität  $d$  zwischen  $68 \text{ \AA}$  bei 13% PSS und ca.  $180 \text{ \AA}$  bei 1% PSS schließen. Auf Grund der großen Periode liegen die Bragg-Maxima bei entsprechend kleinen Werten. So heben sie sich nur schwach von der Reflektivität des Substrates ab. Die beobachteten breiten Maxima deuten zudem auf eine geringere Korrelation der einzelnen Schichten untereinander hin. Eine Auswertung der gemessenen Daten ist hier nicht in der selben Qualität wie bei den oben untersuchten DMPC Daten möglich. Weiter gehende Auswertungen wurden daher an Messungen von dicken POPS-Proben vorgenommen. Abbildung 5.22 zeigt die Reflektivitätsmessungen

von dicken POPS-Proben in verschiedenen PSS-Lösungen in abnehmender Konzentration von oben nach unten. Die Messung von POPS in 13%-iger PSS Lösung zeigt fünf ausgeprägte Bragg-Maxima: Aus der Position der Bragg-Maxima ergibt sich eine lamellare Periode  $d = 68.9\text{\AA}$ . Die Polyelektrolytkonzentration von 13% entspricht einem osmotischen Druck von  $13.4 \cdot 10^5$  Pa. Die zweite Kurve von oben wurde bei einer PSS-Konzentration von 9.7% aufgenommen. Dies entspricht einem osmotischen Druck von  $9.85 \cdot 10^5$  Pa. Die lamellare Periode ergibt sich zu  $d = 77.5 \text{\AA}$ . Das dritte Bragg-Maximum ist deutlich unterdrückt, was auf ein Minimum des Formfaktors hindeutet. Die dritte Kurve wurde in einer 6%-igen PSS Lösung, entsprechend einem osmotischen Druck von  $6 \cdot 10^5$  Pa, aufgenommen.  $d$  beträgt hier  $91.7 \text{\AA}$ . Auffällig ist bei dieser Kurve, dass das erste Bragg-Maximum schwächer ist als das zweite. Die vierte Kurve von unten wurde bei einem osmotischen Druck von  $3.9 \cdot 10^5$  Pa durch eine PSS-Lösung der Konzentration 3.95% ausgeübt. Hier zeigt sich das erste Bragg-Maximum noch schwächer. Durch die mit Abnahme des Druckes immer größer werdende Periode  $d$ , hier  $d=106.7 \text{\AA}$ , verschiebt sich das erste Maximum immer näher an den Bereich der Totalreflektion und verschwindet im Untergrund der Streuung am Substrat. Zusätzlich sind die vierte und fünfte Ordnung in dieser Messung stark unterdrückt. Die zweite Kurve von unten zeigt die Reflektivität an einer POPS Probe in 2%-iger PSS- Lösung. Dies entsprach einem osmotischen Druck von  $1.94 \cdot 10^5 \text{\AA}$ . Die erste Ordnung ist hier gar nicht mehr zu erkennen. Die Maxima der zweiten bis vierten Ordnung lassen auf eine Periode  $d=139.8 \text{\AA}$  schließen. Die unterste Kurve wurde bei einem osmotischen Druck von  $1.3 \cdot 10^5$  Pa in einer 1%-igen PSS-Lösung gemessen. Die Periode  $d$  ergab sich zu  $182.4 \text{\AA}$ .

Die Methode der Anpassung der Reflektivitäten wie sie im Kapitel 5.1.1 besprochen und gezeigt wurde lässt sich nicht direkt auf die dicken Systeme anwenden. Durch die Doppelsumme über die Zahl  $N$  der Schichten im Stapel ergibt sich für die dicken Stapel ein Rechenzeit-Problem. Neben diesem technischen Hindernis gibt es aber noch eine weitere Schwierigkeit. Die Bragg-Maxima der dicken Proben sind teilweise so scharf, dass man an die Grenze der instrumentellen Auflösung gerät. Die simulierte Kurve muss mit einer Auflösungsfunktion gefaltet werden um die Kurve korrekt beschreiben zu können. Zudem muss in den dicken Proben noch die Absorption in der Probe berücksichtigt werden. An entsprechenden Modifizierungen der Formeln wird zur Zeit in der Arbeitsgruppe gearbeitet [114]. Die dicken Proben, deren Bragg-Maxima bei niedrigem osmotischen Druck in spekulärer Reflektivität beinahe im Streuuntergrund des Substrates untergehen, weisen auch eine intensive diffuse Streuung auf. Abbildung 5.23 zeigt die Reflekti-

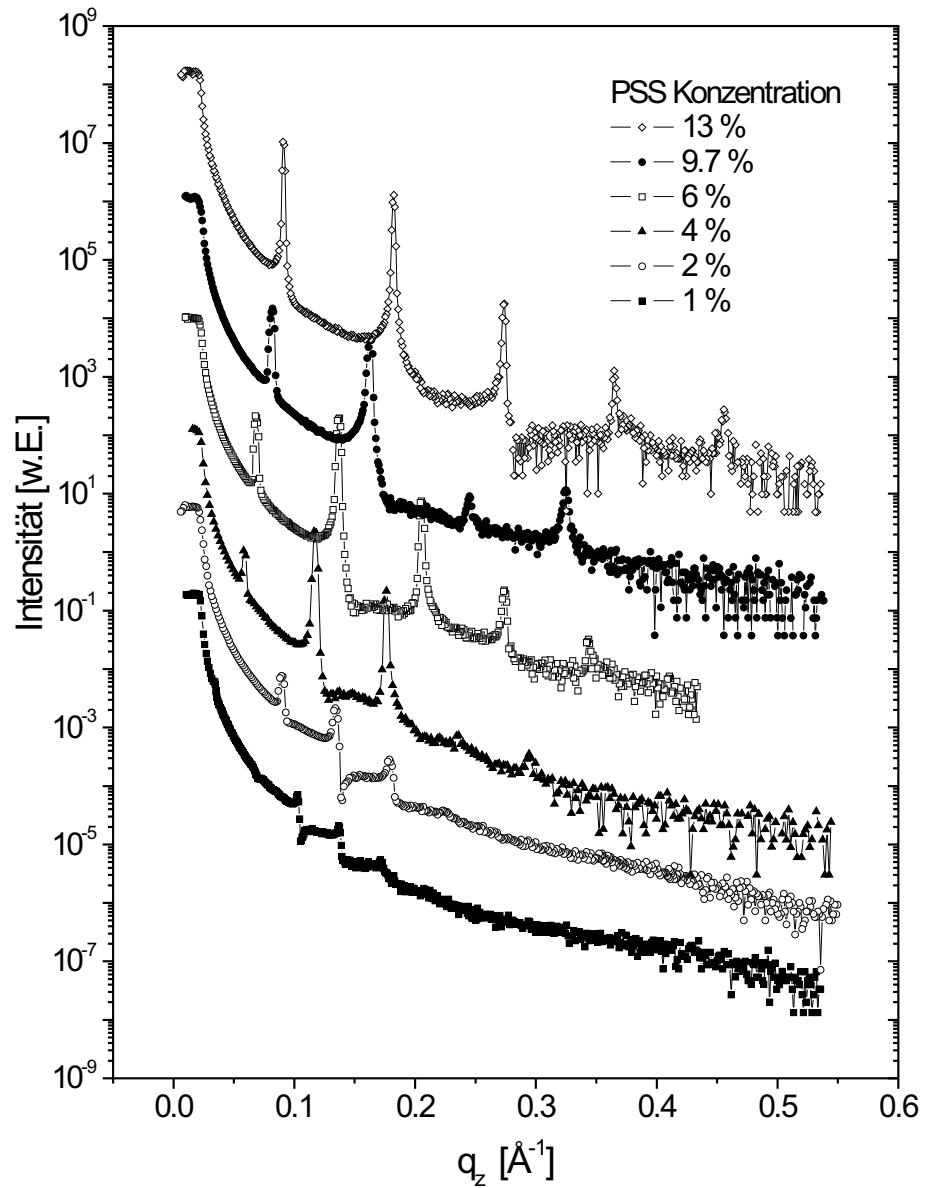


Abbildung 5.22: Reflektivitätsmessungen an multilamellaren POPS-Membranen in Lösungen verschiedener PSS Konzentrationen, Kurven vertikal verschoben (Intensität in willkürlichen Einheiten).

vität einer dicken POPS Probe in einer PEG Lösung einer Konzentration zwischen 0.5% und 1.5% zusammen mit einer Offsetmessung die unter einem Offsetwinkel von  $0.05^\circ$  aufgenommen wurde. Das erste Bragg-Maximum tritt hier deutlich

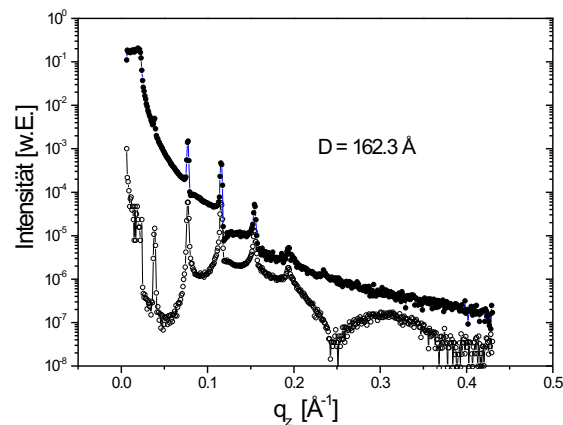


Abbildung 5.23: ● Reflektivitäts- und ○ Offset-Messung einer multilamellaren POPS Probe in PSS-Lösung. In der Offset-Messung ist neben den Bragg-Maxima sehr gut der Verlauf des Formfaktors zu erkennen

hervor. Neben den fünf Bragg-Maxima ist dabei auch die Modulierung des Formfaktors mit zwei breiten Maxima und einem Minimum an der Stelle der sechsten Ordnung zu sehen. Die Offsetmessung zeigt wesentlich mehr Struktur, als die spekuläre Reflektivität. Für solche Proben mit hoher lamellarer Periode  $d$  würde sich eine Anpassung der Offset-Messung an Stelle der spekulären Reflektivität anbieten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies leider nicht mehr durchgeführt werden.

In Abbildung 5.24 wurden die osmotischen Drücke  $\Pi$  gegenüber den bei ihnen gemessenen Gleichgewichtsperioden  $d$  aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt eine Anpassung von  $\Pi$  als Funktion der Periode  $d$  durch die Wechselwirkungspotentiale in Kapitel 2.3. Zur Berechnung wurden nur die Beiträge der elektrostatischen Abstoßung nach der Poisson-Boltzmann Gleichung und der osmotische Gegendruck des Polyelektrolyts betrachtet. Die Parameter der Simulation ergaben sich zu einer Oberflächenladungsdichte der Membranen von  $\sigma = 0.143 e^{-\text{Å}^{-2}}$ ,

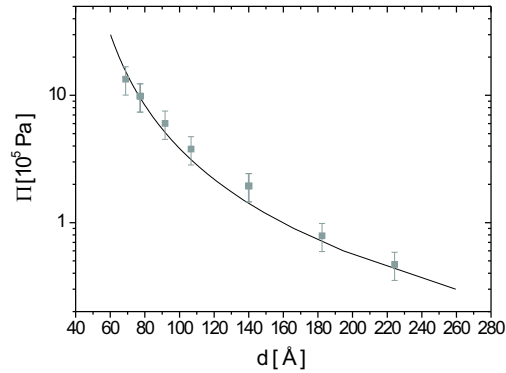


Abbildung 5.24:  $P$  von  $D$  für das geladene POPS. Die durchgezogene Linie entspricht einer Simulation des elektrostatischen Potentials mit den Parametern  $L_e = 7 \text{ \AA}$ ,  $\sigma = 0.143 e^{-\text{\AA}^{-2}}$  und  $d_m = 38 \text{ \AA}$

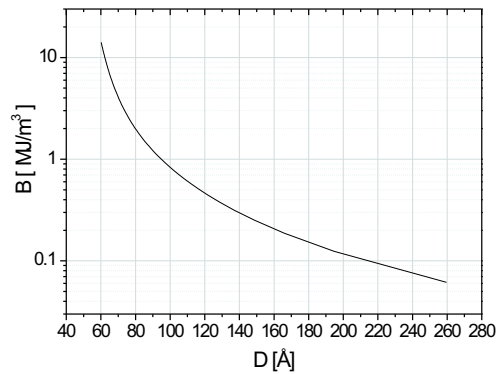


Abbildung 5.25:  $B$  aus dem elektrostatischen Potential berechnet mit den Parametern der Simulation in Abbildung 5.24

eine Bjerrumlänge  $L_e = 7 \text{ \AA}$  und eine Membrandicke  $d_m = 38 \text{ \AA}$ . Die Simulation passt relativ gut zu den experimentell bestimmten Werten. Auf Basis dieser Potentiale wurde aus der zweiten Ableitung das Kompressionsmodul  $B$  berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.25 dargestellt.



# Literaturverzeichnis

- [1] B.A. Cornell, V.L.B. Braach-Makyvytis, L.G. King, P.D.J. Osman, B. Rague, L. Wieczorek, und R.J. Pace. *Nature*, 387:580, 1997.
- [2] C. Steinem. *in Innovative Biosystemtechnik - Sensorik, Aktorik und Auswertung biotechnologischer Prozesse*. Waldheim/Sa. ISBN 3-00-009026-6.
- [3] D. Needham und M.W. Dewhirst. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53:285–305, 2001.
- [4] B.L. Silver. *The physical chemistry of membranes*. Allen and Unwin, Winchenster/Mass., 1985.
- [5] J. Israelachvili. *Intermolecular Surface Forces*. Academic Press, London, 2 Auflage, 1992.
- [6] R. Koynova und M. Caffrey. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376:91–145, 1998.
- [7] P.C. Mason, J.F. Nagle, R.M. Epand, und J. Katsaras. *Phys. Rev. E*, 63:30902, 2001.
- [8] G.S. Smith, E.B. Sirota, C.R. Safinya, und N.A. Clark. *Phys. Rev. Lett.*, 60:813, 1988.
- [9] G. Gompper und M. Schick. *in Self-Assembling Amphiphilic Systems, Ed.: C. Domb and J. Lebowitz*, Band 16. Academic Press.
- [10] C.-M. Chen und F.C. MacKintosh. *Phys. Rev. E*, 53:4933–4943, 1996.
- [11] R.A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, und H. Grubmüller. *Biophys. J.*, 85, 2003.

- [12] S.E. Feller, D. Yin, R.W. Pastor, und D. Jr. MacKerell. *Biophys. J.*, 73:2269–2279, 1997.
- [13] D.P. Tieleman, S.J. Marrink, und H.J.C. Berendsen. *Biochim. Biophys Acta*, 1331:235–270, 1997.
- [14] C. Münster. *Antibiotische Peptide in Phospholipiden: Strukturuntersuchungen mit Beugungsmethoden*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2000.
- [15] C.W. Meuse, S. Krueger, C.F. Majkrzak, J.A. Dura, J. Fu, J.T. Connor, und A.L. Plant. *Biophys. J.*, 74:1388–1398, 1998.
- [16] K. Mirigaki, T. Baumgart, A. Offenhäuser, und W. Knoll. *Angew. Chem.*, 113:184–186, 2001.
- [17] W. Fenzl M. Vogel, C. Münster und T. Salditt. *Physical Review Letters*, 84:390–393, 2000.
- [18] H.M. Mc Connell L.K. Tamm. *Biophys. J.*, 47:104–113, 1985.
- [19] G. Fragneto, T. Charitat, F. Graner, K. Mecke, L. Perino-Gallice, und E. Bellet-Amalric. *Europhys. Lett.*, 53:100–106, 2001.
- [20] E. Evans R. Merkel, E. Sackmann. *J. Phys. Fr.*, 50:1535, 1989.
- [21] H.M. Mc Connell A.A. Brian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6159–6163, 1984.
- [22] M. J. Sammon M. Seul. *Thin Solid Films*, 185:287, 1990.
- [23] A.V. Hughes, S.J. Roser, M. Gerstenberg, A. Goldar, B. Stidder, R. Feidenhans'l, und J. Bradshaw. *Langmuir*, 18:8161–8171, 2002.
- [24] T. Salditt, M. Vogel, und W. Fenzl. *Phys Rev. Lett.*, 90,17:178101, 2003.
- [25] C. Münster, T. Salditt, M. Vogel, R. Siebrecht, und J. Peisl. *Europhysics Letters*, 46:486–492, 1999.
- [26] A. Weill. *The Spin-Coating-Process Mechanism*, in M.J. Kelly: *The Physics and Fabrication of Microstructures and Microdevices*, Band 13 of *Springer Proceedings in Physics*. Springer, 1986.



- [27] U. Mennicke und T. Salditt. *Langmuir*, 18:8172–8177, 2002.
- [28] de Gennes P. G. und Prost J. *The Physics of Liquid Crystals*. Clarendon Press, Oxford, 2 Auflage, 1993.
- [29] S. Chandrasekhar. *Liquid Crystals*. Cambridge University Press, Cambridge, 2 Auflage, 1992.
- [30] W. Helfrich. *Z. Naturforsch.*, 28c:693, 1973.
- [31] S.A. Safran. *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces and Membranes*. Addison-Wesley, Reading, 1994.
- [32] Tim Salditt. *Habilitationsschrift: Struktur und Fluktuationen multilamellarer Membransysteme*. LMU, München, 2000.
- [33] W.M. Gelbart I. Szleifer, A. Ben-Shaul. *J. Chem. Phys.*, 83:3612, 1988.
- [34] G.D. Guttman und D. Andelman. *J. Phys. II France*, 3:1411–1425, 1993.
- [35] D. Andelman. *in Handbook of biological physics, Ed.: R. Lipowsky and E. Sackmann*, Band 1. Elsevier Science, 1995.
- [36] C.R. Safinya, E.B. Sirota, D. Roux, und G.S. Smith. *Phys Rev. Lett.*, 62:1134, 1989.
- [37] E. Evans. *Langmuir*, 7:1900, 1991.
- [38] J.O. Rädler, T.J. Feder, H.H. Strey, und E. Sackmann. *Phys. Rev. E.*, 51:4526, 1995.
- [39] H.G. Döbereiner, E. Evans, U. Seifert, und M. Wortis. *Phys. Rev. Lett.*, 75:3360, 1995.
- [40] A. Caille. *C.R. Acad. sc. Ser. B*, 274:891, 1972.
- [41] J. Als-Nielsen, J. D. Litster, R. J. Birgenau, M. Kaplan, C. R. Safinya, A. Lindegaard-Andersen, und S. Mathiesen. *Physical Review B*, 22, 1:312–320, 1980.
- [42] M. Abramowitz und I.A. Stegun. *Pocketbook of Mathematical Functions*. Thun, Frankfurt/Main, 1984.

- [43] D. Constantin, U. Mennicke, C. Li, und T Salditt. *eingereicht bei Eur.Phys.J.E*, 2003.
- [44] A. N. Shalaginov und V. P. Romanov. *Physical Review E*, 48, 2:1073–1083, 1993.
- [45] R. Hołyst. *Physical Review A*, 44, 6:3692–3709, 1991.
- [46] A. Poniewierski und R. Hołyst. *Physical Review B*, 47, 15:9840–9843, 1993.
- [47] S. A. Safran. *Adv. Phys.*, 48:395–448, 1999.
- [48] P.G. de Gennes und C. Taupin. *J. Phys. Chem.*, 86:2294, 1982.
- [49] J.H. Schulman und J.B. Montagne. *Ann. NY Acad. Sci.*, 92:366, 1961.
- [50] J. Mahatny und B.W. Ninham. *Dispersion Forces*. Academic Press, New York, 1976.
- [51] V.A. Parsegian und B.W. Ninham. *J. Theor. Biol.*, 38:101, 1973.
- [52] Willi Fenzl. *Zeitschrift für Physik B*, 97:333–336, 1995.
- [53] D.B. Hough und L.R. White. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 14:3, 1980.
- [54] R. Lipowsky. *in Handbook of biological physics, Ed.: R. Lipowsky and E. Sackmann*, Band 1. Elsevier Science, 1995.
- [55] C.R. Safinya, D. Roux, G.S. Smith, S.K. Sinha, P. Dimon, N.A. Clark, und A.M. Bellocq. *Phys Rev. Lett.*, 57,21:2718–2721, 1986.
- [56] R. Lipowsky und S. Leibler. *Phys. Rev. Lett.*, 56:2541, 1986.
- [57] R.P. Rand. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:277, 1981.
- [58] R.P. Rand und V.A. Parsegian. *Biochim. Biophys. Acta*, 988:351, 1989.
- [59] V.A. Parsegian und R.P. Rand. *in Handbook of biological physics, Ed, R. Lipowsky and E. Sackmann*, Band 1. Elsevier Science, 1995.
- [60] S. Leibler und R. Lipowsky. *Phys. Rev. B*, 35:7004, 1987.

- [61] A.C. Cowley, N.L. Fuller, R.P. Rand, und V.A. Parsegian. *Biochem.*, 17:3163, 1978.
- [62] D. Roux und C. R. Safinya. *J. Phys. France*, 49:307–318, 1988.
- [63] C. Fleck, R.R. Netz, und H. H. von Grünberg. *Biophys. J.*, 82:76–92, 2002.
- [64] W. Helfrich. *Z. Naturforsch*, 33 a:305–315, 1978.
- [65] N Gouliaev und J.F. Nagle. *Phys. Rev. Lett.*, 81:2610–2613, 1998.
- [66] Petrache H.I., N. Gouliaev, S. Tristram-Nagle, R. Zhang, R. M. Suter, und J.F. Nagle. *Physical Review E*, 57,6:7014–7024, 1998.
- [67] R. Lipowsky. *Z. Phys. B*, 97:193, 1995.
- [68] K.R. Mecke, T. Charitat, und F. Graner. *Langmuir*, 19:2080–2087, 2003.
- [69] R.R. Netz und R. Lipowsky. *Phys. Rev. Lett*, 71:3596, 1993.
- [70] G. Pabst, J. Katsaras, und V.A. Raghunathan. *Phys. Rev. Lett.*, 88:128101, 2002.
- [71] B. D. Cullity. Addison-Wesley Publishing Company, Inc., Reading, Mass., Menlo Park, London, 2 Auflage, 1978.
- [72] B.E. Warren. *X-Ray Diffraction*. Dover Publ., New York, 1990.
- [73] J. Als-Nielsen und D. McMorrow. *Elements of Modern X-Ray Physics*. Wiley, Chichester, 2001.
- [74] M. Tolan. *X-Ray Scattering from Soft-Matter Thin Films*. Springer, New York, 1999.
- [75] H. Dosch. *Critical Phenomena at Surfaces and Interfaces*. Springer, Berlin, 1992.
- [76] M. Born und E. Wolf. *Principles of Optics*. Oxford, 1986.
- [77] R.W. James. *The optical priniples of the diffraction of x-rays*. Bell and Sons, London, 1958.
- [78] J. Als-Nielsen. *Handbook on Synchrotron Radiation*. Springer, 1987.

- [79] L.G. Parratt. *Phys. Rev.*, 95:359, 1954.
- [80] L. Nevot und P. Croce. *Rev. Phys. Appl.*, 15:761, 1980.
- [81] B. Vidal und P. Vincent. *Appl. Opt.*, 23:1794, 1984.
- [82] D.K.G. deBoer. *Phys. Rev. B*, 49:5817, 1994.
- [83] J. Lu. *Diplomarbeit*. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1998.
- [84] M. Vogel. *Röntgenbeugung an hochorientierten Phospholipidmembranen*. Dissertation, Universität Potsdam, Potsdam, 2000.
- [85] T. Salditt, C. Li, A. Spaar, und U. Mennicke. *European Physical Journal E*, 7:105–116, 2002.
- [86] F. Nallet, R. Laversanne, und D. Roux. *J. Phys. II France*, 3:487–502, 1993.
- [87] A. Asmussen und H. Riegler. *J. Chem. Phys.*, 104:8159, 1996.
- [88] M.C. Wiener, G. I. King, und S.H. White. *Biophys. J.*, 60:568–576, 1991.
- [89] L. Yang und H. Huang. *Biophysical J.*, 84:1808–1817, 2003.
- [90] J.F. Nagle, R. Zhang, S. Tristram-Nagle, W. Sun, H.I. Petrache, und R.M. Suter. *Biophys. J.*, 70:1419–1431, 1996.
- [91] J Torbet und M. H. F. Wilkins. *J. Thoer. Biol.*, 62:447–458, 1976.
- [92] A van der Lee. *Eur. Phys. J. B*, 13:755–763, 2000.
- [93] J. Miao, P Charalambous, J Kirz, und D. Sayre. *Nature*, 400:342–344, 1999.
- [94] A.E. Blaurock. *J. Mol. Biol.*, 56:35–52, 1971.
- [95] J.R. Fienup. *Optics Letters*, 3, 1978.
- [96] J. Miao, T. Ishikawa, E.H. Anderson, und K.O. Hodgson. *Phys. Rev. B*, 67:174104, 2003.
- [97] S.K. Sinha, E. B. Sirota, S. Garoff, und H.B. Stanley. *Physical Review B*, 38:2297–2311, 1988.

- [98] T. Salditt. *Diffuse Röntgenstreuung an rauhen Grenzflächen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1995.
- [99] L. Perino-Gallice, G. Fragneto, U. Mennicke, T. Salditt, und F. Rieutord. *European Physical Journal E*, 8:275–282, 2002.
- [100] R.P. Rand. <http://aqueous.labs.brocku.ca/osfile.html>.
- [101] C. Gao, E. Donath, S. Moya, V. Dudnik, und H. Möhwald. *Eur. Phys. J. E*, 5:21–27, 2001.
- [102] J. Katsaras, S.C. Yang, und R.M. Eppard. *Biophys. J.*, 63:1170, 1992.
- [103] G.S. Smith, C.R. Safinya, D. Roux, und N.A. Clark. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 144:235, 1987.
- [104] J. Nagle und J. Katsaras. *Phys.Rev.E*, 59:7018, 1999.
- [105] J. Katsaras und M.J. Watson. *Rev. Sci. Instrum.*, 71:1737–1739, 2000.
- [106] Christoph Ollinger, 2003.
- [107] Verschiedene Autoren. Vorlesungsskripte zum 33. IFF-Ferienkurs.
- [108] H. Kuhn und H.D. Försterling. *Principles of Physical Chemistry*. John Wiley and Sons, 1999.
- [109] G. Brotons, T. Salditt, M. Dubois, und T. Zemb. eingereicht bei Langmuir, 2003.
- [110] H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, und J.F. Nagle. *Chem. Phys. Lipids*, 95:83–94, 1998.
- [111] H. Heller, M. Schaefer, und K. Schulten. *Journal of Physical Chemistry*, 97:8343–8366, 1993.
- [112] J. F. Nagle und Tristram-Nagle S. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469:159–195, 2000.
- [113] S. Tristram-Nagle, H.I. Petrache, R.M. Suter, und J.F. Nagle. *Biophys. J.*, 74:1421–1427, 1998.
- [114] Chenghao Li. *Dissertation, in Vorbereitung*. Georg-August-Universität, Göttingen, 2004.



## **Anhang A**

### **Parameterliste für die Anpassungen der Reflektivitätsmessungen von Oligo-DMPC-Membranen**

PEG	$\Pi$	$f_2$	$f_3$	$f_4$	$f_5$	$f_6$	$d$	$q_c$	$d_0$	$\Delta_{max}$	$\sigma$	$\alpha$	$\beta$	$N$	$\eta$	$U$	$c$
MQ	0	-1.6	0.08	0.21	-0.17	-0.1	61.9	0.0242	23.5	0.13	3.15	1.7	2	16	0.085	1E-8	0.26
1.5	4000	-1.45	0.10	0.21	-0.22	-0.07	60.7	0.0242	23.2	0.14	2.9	1.6	2	16	0.07	2E-8	0.3
2.9	9000	-1.5	0.27	0.2	-0.2	0	60.2	0.0242	23.47	0.14	2.8	2	2	14	0.067	1E-8	0.29
3.6	14000	-1.3	0.20	0.18	-0.21	0	59.5	0.0242	22.8	0.17	2.7	1.7	2	16	0.065	1E-8	0.3
5.8	35000	-1.3	0.20	0.14	-0.17	0	58.5	0.0242	22	0.175	2.5	1.75	2	14	0.034	1E-8	0.3
9	77000	-1.2	0.26	0.12	-0.19	0	56.95	0.0233	22.4	0.178	2.7	1.8	2	16	0.026	1E-8	0.54
12	120000	-0.98	0.24	-0.08	-0.115	0	55.9	0.023	22	0.193	2	1.6	2	18	0.0065	8E-9	0.16 <sub>3</sub>
14	195000	-1.032	0.28	-0.09	-0.19	0	55.4	0.0231	22	0.18	2.5	1.7	2	17	0.02	1E-8	0.3
25	870000	-0.87	0.34	0.015	-0.11	0	52.9	0.0235	22.1	0.193	2.6	1.6	2	17	0.003	4E-9	0.15 <sub>5</sub>

Tabelle A1: Fit Parameter für die Anpassung der Reflektivitätskurven der Oligo DMPC Membransysteme in PEG Lösungen verschiedener Konzentrationen aus Kapitel 5.1.1.



## **Anhang B**

### **Reflektivitätsmessungen an dicken DMPC Proben unter osmotischem Druck**

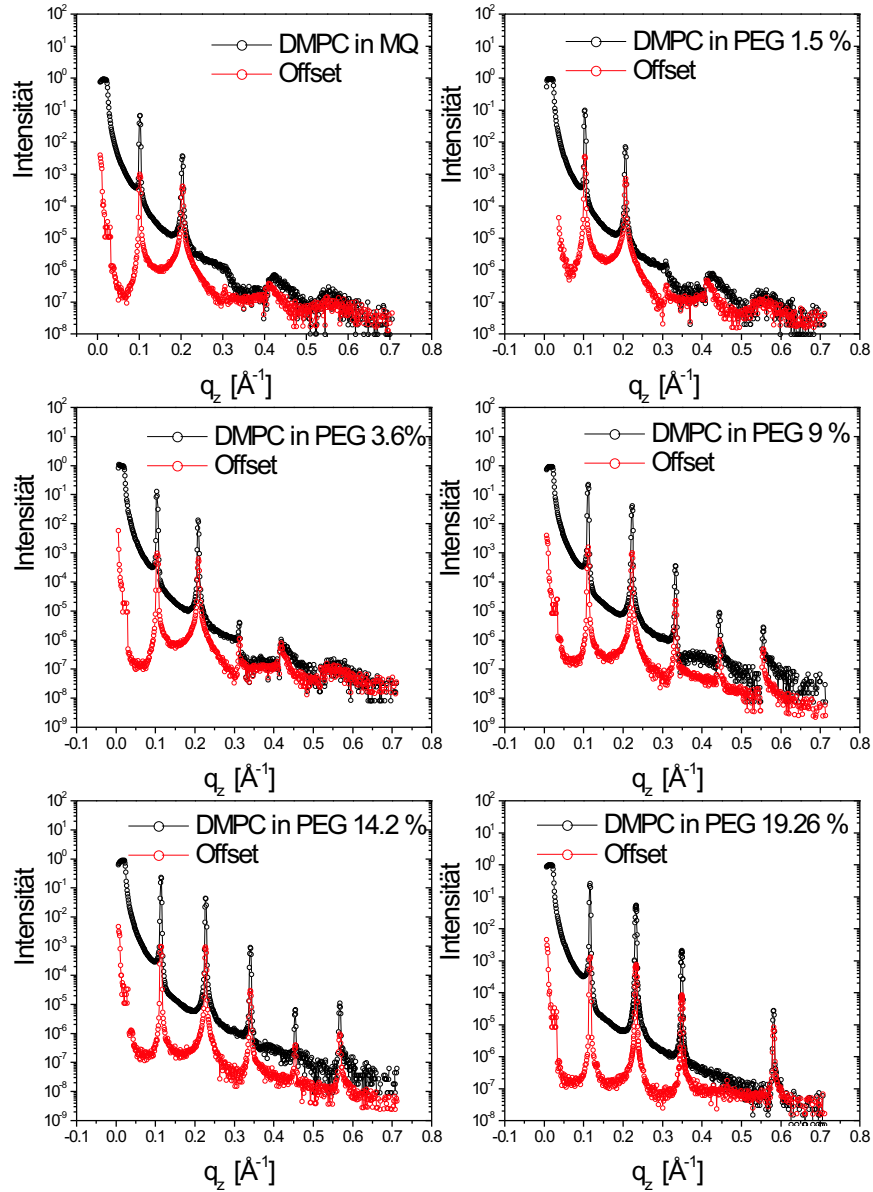


Abbildung B.1: Reflektivitätsmessungen von multilamellaren DMPC-Proben in PEG-Lösungen verschiedener Konzentrationen mit den dazu gehörigen Offset-Messungen.

## **Anhang C**

### **Offset Messungen der POPS Proben unter osmotischem Druck**

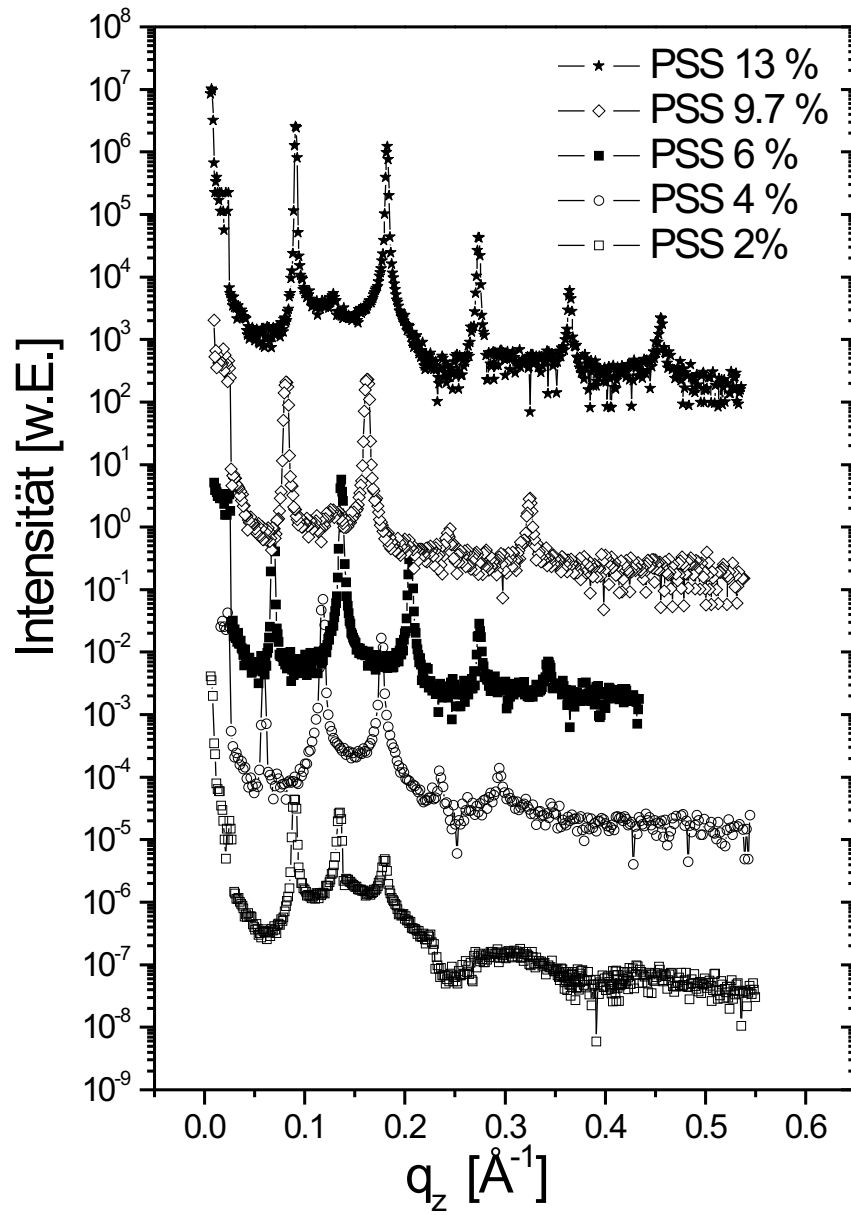


Abbildung C.1: Offset-Messungen von multilamellaren POPS-Proben in PSS-Lösungen verschiedener Konzentrationen.

# Anhang D

## Skript zur Berechnung der Reflektivitäten

Simulation der Reflektivität mit DevPascal:

```
program refl(input,output);

uses crt,dos;

const
  pi=3.14159265358979876;
  nkoeff=7;           (*Anzahl der Fouriekoeffizienten*)
  Nmax=2000;

type UMarray=array[0..Nmax,0..Nmax] of real; type
koef_array=array[1..nkoeff]of real; type
k1_array=array[1..nkoeff]of String; type
k2_array=array[1..nkoeff]of integer;

var  qz,d,eta,formfaktor,sf1,sf2,ref,c:real;
     fresnel_ref_si,qc_si,d0,delta_max,sig,ugr,alpha:real;
     N: integer;
     i,j:integer;
     d2,qc_si2,d02,delta_max2,sig2,alpha2,N2,eta2,ugr2,c2:integer;
```

```

fm1:k1_array;
fm2:k2_array;
fm:koef_array;      (*FourierKoeff., Phase fuer Formfaktor *)
UM:UMarray;
F,G: text;
d1,qc_si1,d01,delta_max1,sig1,alpha1,N1,eta1,ugr1,c1:String;

```

```

procedure formfaktor_proc(fm:koef_array;delta_max,d,qz:real;var
formfaktor:real);
var i:integer;
begin
  formfaktor:=0;
  for i:=1 to nkoeff do
  begin
    formfaktor:=formfaktor+delta_max*fm[i]*8*pi*pi*i*i*sin(qz*d/2)
      *cos(pi*i)/(qz*qz*d*d-4*pi*pi*i*i)
  end;
end;

```

```

procedure Umn_proc(N,x,y:integer;eta,d:real;var U:real);
(*correlation matrix (fuction) from Doru *)
var i: integer; begin
  U:=0 ;
  for i:=1 to N do
    begin
      U:=U+eta*d*d/(pi*pi)*(1/(2*i-1))*sin(0.5*(2*i-1)*pi*x/N)*
      sin(0.5*(2*i-1)*pi*y/N);
    end
end;

```

```

procedure calc_UM(N:integer;eta,d:real);
var i,j:integer;
    U:real;
begin
  for i:=1 to N do
    begin

```

```

    for j:=1 to N do
      begin
        Umn_proc(N,i,j,eta,d,U);
        UM[i,j]:=U;
      end;
    end;
end;

function coverage(i,N:integer;alpha:real):real;
begin
  if (i=0) then
    coverage:=1
  else
    coverage:=(1-exp(alpha*ln(i/N)))*(1-exp(alpha*ln(i/N)))
  end;
end;

procedure calc_structfactor_1(N:integer;alpha,sig,d0,d,qz:
real;var sf1: real);
(*structure factor 1*)

var i:integer;
begin

  sf1:= 0;

  for i:=0 to N-1 do
    begin

      sf1:=sf1-2*exp(-qz*qz*sig*sig/2)*sin(qz*(d0+i*d))
      *exp(-qz*qz*UM[i,i]/2)*coverage(i,N,alpha);
    end;
  end;
end;

procedure calc_structfactor_2(N:integer;alpha,d,qz:
real;var sf2: real);

```

```

(*squared structure factor 2 *)

var i,j:integer;

begin
  sf2:=0;
  for j:=0 to N-1 do
  begin
    for i:= 0 to N-1 do
      sf2:=sf2+cos(qz*d*(j-i))*exp(-0.5*qz*qz*(UM[i,i]
      +UM[j,j]))*coverage(i,N,alpha)*coverage(j,N,alpha);
    end;
  end;
end;

function fresnel_ref(qz,qc:real):real;
begin
  if (qz<qc) then
  begin
    fresnel_ref:=1;
  end
  else
  begin
    fresnel_ref:=(qz-sqrt(qz*qz-qc*qc))/(qz+sqrt(qz*qz-qc*qc))
    *(qz-sqrt(qz*qz-qc*qc))/(qz+sqrt(qz*qz-qc*qc));
  end;
end;

begin (*****Main*****)

  fm1[2]:=ParamStr(1);
  fm1[3]:=ParamStr(2);
  fm1[4]:=ParamStr(3);
  fm1[5]:=ParamStr(4);

```



```
fm1[6]:=ParamStr(5);
fm1[7]:=ParamStr(6);
d1:=ParamStr(7);
qc_si1:=ParamStr(8);
d01:=ParamStr(9);
delta_max1:=ParamStr(10);
sig1:=ParamStr(11);
alpha1:=ParamStr(12);
N1:=ParamStr(13);
eta1:=ParamStr(14);
ugr1:=ParamStr(15);
c1:=ParamStr(16);

writeln('command line:');
writeln('init f2 f3 f4 f5 f6 f7 d qc_si d0 delta_max
  sigma alpha N eta ugr c');

if ParamCount<16 then
writeln('too little parameters are given !')
else if ParamCount>16 then
writeln('too many parameters are given !')
else if ParamCount=16 then
begin

  fm[1]:=-1;
  val(fm1[2],fm[2],fm2[2]);
  val(fm1[3],fm[3],fm2[3]);
  val(fm1[4],fm[4],fm2[4]);
  val(fm1[5],fm[5],fm2[5]);
  val(fm1[6],fm[6],fm2[6]);
  val(fm1[7],fm[7],fm2[7]);
  val(d1,d,d2);
  val(qc_si1,qc_si,qc_si2);
  val(d01,d0,d02);
  val(delta_max1,delta_max,delta_max2);
  val(sig1,sig,sig2);
  val(alpha1,alpha,alpha2);
```

```

val(N1,N,N2);
val(eta1,eta,eta2);
val(ugr1,ugr,ugr2);
val(c1,c,c2);

  Assign(G,'C:\Data\fitting_freepascal\paralist.dat');
Rewrite(G);
writeln(G,'f2=',fm[2]:5:6);
writeln(G,'f3=',fm[3]:5:6);
writeln(G,'f4=',fm[4]:5:6);
writeln(G,'f5=',fm[5]:5:6);
writeln(G,'f6=',fm[6]:5:6);
  writeln(G,'f7=',fm[7]:5:6);
writeln(G,'d=',d:5:6);
writeln(G,'qzc_si=',qc_si:5:6);
writeln(G,'d0=',d0:5:6);
writeln(G,'delta_max=',delta_max:5:6);
writeln(G,'sigma=',sig:3:3);
writeln(G,'alpha=',alpha);
writeln(G,'N=',N);
writeln(G,'eta=',eta:5:6);
writeln(G,'ugr=',ugr:5:15);
writeln(G,'c=',c:5:6);
close(G);

  calc_UM(N,eta,d);

Assign(F,'C:\Data\fitting_freepascal\fitting.dat');
Rewrite(F);
for i:=1 to 1000 do
begin
  qz:=0.001*i;
  formfaktor_proc(fm,delta_max,d,qz,formfaktor);
  calc_strucfactor_1(N,alpha,sig,d0,d,qz,sf1);
  calc_strucfactor_2(N,alpha,d,qz,sf2);
  fresnel_ref_si:=fresnel_ref(qz,qc_si);

```

```
    ref:= fresnel_ref_si*c*(exp(-qz*qz*sig*sig)+formfaktor*
    sf1+formfaktor*formfaktor*sf2)+ugr;

    write(F,qz:8:10);
    writeln(F,ref:25);
    end;
close(F);

(*open gnuplot*)

(*exec('wgnuplot.exe','plot.ini -');*)

(*initialisation gnuplot ini file*)
(*exec('load "plot.ini"', ''); *)

(*plot SF.dat file*)
(*exec('plot "SF.dat"', ''); *)
end;

end.
```



## Anhang E

# Mathematica Skript zur Berechnung des Van der Waals Potentials

```
(*****  
(***** Naturkonstanten *****)  
h := 6.626*10(-34) (* Js*)  
k := 1.38*10(-23) (* J/K *)  
T := 313 (* K *)  
c := 2.9979*108 (*m/s *)  
\[Epsilon] := 8.85*10(-12)  
  
Cw := 0.755  
\[Omega]w := 1.9*1016 (* rad/s *)  
\[Epsilon]w0 := 80  
Chc := 1.01  
\[Omega]hc := 1.85*1016(* rad/s *)  
\[Epsilon]hc0 := 2  
  
a := 26*10(-10) (** hydrophobe Membrandicke DMPC **)  
dk := 9*10(-10) (** einfache Kopfgruppendiffe *)
```

$$\omega[n_] := n^2 \pi k T / (h / (2 \pi))$$

$$\epsilon_w[n_] := 1 + C_w / (1 + (\omega[n] / \omega_w)^2)$$

$$\epsilon_{hc}[n_] := 1 + C_{hc} / (1 + (\omega[n] / \omega_{hc})^2)$$

$$\Delta[n]$$

$$:= (\epsilon_w[n] - \epsilon_{hc}[n]) / (\epsilon_w[n] + \epsilon_{hc}[n])$$

$$r[n_, d_] := 2(d + dk) \sqrt{\epsilon_w[n]} \omega[n] / c$$

$$S[n_, d_] = \Delta[n]^2 \left( (1 + r[n, d]) \exp[-r[n, d]] - 2(1 + (1 + a/(d + dk))r[n, d]) / (1 + a/(d + dk)) \exp[-(1 + a/(d + dk))r[n, d]] + (1 + (1 + 2a/(d + dk))r[n, d]) / (1 + 2a/(d + dk)) \exp[-(1 + 2a/(d + dk))r[n, d]] \right)$$

$$F_{vdW5}[d_, T_] := -kT / (8 \pi (d + dk)^2) \sum_{\{n, 1, 200\}} S[n, d]$$

$$S1[n_] := \Delta[n]^2 \quad H1 := S1[1] + 2 \sum_{\{n, 2, 12000\}} S1[n]$$

(\*\*\*\*\* Van der Waals : statisch nach der exakten Formel: \*\*\*\*\*)

$$\Delta_0 := (80 - 2) / (80 + 2)$$

$$\text{integrand}[x_, d_, T_] :=$$

```

x*Log[1 - (((\[CapitalDelta]0*(1 -
                Exp[-a*x/(d + dk)])))/(1 - \[CapitalDelta]0^2*
                Exp[-a*x/(d + dk)]))^2]*Exp[-x]]
integrand[1/2, a, 13] NIntegrate[integrand[x, a, 313], {x, 0, 1}]

Fstatexakt1[d_, T_] :=
  0.5*(k*T)/(8*\[Pi]*(d + dk)^2)*NIntegrate[integrand[x, d, T], {x, 0, 10}]

Fhalb[d_, T_] := -k*T*0.75/(16*\[Pi]*(d + dk)^2)*
  Sum[((\[CapitalDelta]0^2)^j)/(j^3), {j, 1, 50}] (*unendliche Reihe*)
(* Halbraumnäherung nach W. Fenzl *)

FvdW[d_, T_] := FvdWdis5[d, T] + Fstatexakt1[d, T]
(* dispersions Anteil und statischer Anteil *)

HVdW[d_, T_] := (-0.7925 - 0.1)*k*T/(16*\[Pi]*(d + dk)^2)
(* Halbraumnäherung für gesamte Van der Waals *)

Plot[{HVdW[d, 313], FvdW[d, 313]}, {d, 10*10^(-10), 3.5*10^(-9)}]

dishalb[d_, T_] := (-0.1)*k*T/(16*\[Pi]*(d + dk)^2)

disfehler[d_, T_] :=
  2*(FvdWdis5[d, T] - dishalb[d, T])/(FvdWdis5[d, T] + dishalb[d, T])

Table[Fstatexakt1[i*0.5*10^(-10), 313], {i, 1, 400}]

```





# Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Tim Salditt für die Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Bei aller Freiheit, die ich in der Ausgestaltung des interessanten und vielseitigen Themas besaß, konnte ich immer mit seiner Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft und seiner Unterstützung rechnen. Besonders erwähnen möchte ich auch die gute Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe, die nicht zuletzt durch das uns Doktoranden entgegengebrachte Vertrauen begründet war.

Ich danke auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Salditt (an inzwischen drei Universitäten) für die gute Arbeitsatmosphäre. Allen voran gilt mein Dank den Doktoranden Chenghao Li, Ansgar Jarre und Christoph Ollinger. Auf eine gute und freundschaftliche Zusammenarbeit mit Ihnen, insbesondere bei anstrengenden Messzeiten, war immer Verlass.

Für das Korrekturlesen des Manuskripts danke ich Herrn Dr. Markus Born, Herrn Christoph Ollinger und Herrn Ansgar Jarre.

I thank Dr. Doru Constantin for fruitful discussions and his support in calculating the membrane fluctuations.

Ich danke der letzten Doktorandengeneration des Lehrstuhls Peisl in München. Die freundschaftliche Atmosphäre unter den Mitarbeitern hat zu einem nicht unwesentlichen Teil zu meiner Entscheidung, die Promotion anzugehen beigetragen.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Christian Münster und Herrn Dr. Michael Vogel für Ihre fachliche und auch moralische Unterstützung, die auch weit über die Münchner Zeit hinaus bestand.

Frau Eva Zaslosz und Frau Judith Rech danke ich für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft. Es ist schwer zu sagen, wer die gute Seele der Saarbrücker Arbeitsgruppe war. Sie waren es wohl beide zusammen.

Ich danke der Feinmechanikwerkstatt an der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Herrn Schmitt für die gute und schnelle Ausführung vieler Aufträge, die meist „am besten bis gestern fertig“ sein sollten.

Herrn Dr. Stefan Große und Prof. Dr. Wenz vom Lehrstuhl für Organische Makromolekulare Chemie der Universität des Saarlandes danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Osmometriemessungen und ihre Unterstützung dabei.

Für anregende Zusammenarbeit bei gemeinsamen Messzeiten danke ich Frau Dr. Giovanna Fragneto, Frau Dr. Laurence Perino-Gallice, Herrn Dr. Bruno Deme und Herrn Dr. Guillaume Brotons,

Allen Mitarbeitern des HASYLAB, des ILL und der ESRF danke ich für die guten Arbeitsbedingungen bei den Experimenten.

Meinem Freund Dr. Markus Born danke ich für die Geduld, mit der er meine Launen ertragen hat, aber auch für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat. Seine Hinweise aus Sicht eines Chemikers waren oft hilfreich.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern danken, die mich während des gesamten Studiums und - bei Engpässen auch während der Promotion - finanziell, aber vor allem durch ihren Glauben an mich moralisch unterstützt haben.

## Veröffentlichungen

- T. Salditt, C. Li, A. Spaar, U. Mennicke  
„X-ray reflectivity of solid-supported, multilamellar membranes”  
Eur. Phys. J. E **7**, 105-116 (2002).
- L. Perino-Gallice, G. Fragneto, U. Mennicke, T. Salditt, F. Rieutord  
„Dewetting of solid-supported multilamellar lipid layers”  
Eur. Phys. J. E **8**, 275-282 (2002).
- F. Pfeiffer, U. Mennicke, T. Salditt  
„Waveguide-enhanced scattering from thin biomolecular films”  
J. Appl. Cryst. **35**, 163-167, (2002).
- U. Mennicke, T. Salditt  
„Preparation of Solid-Supported Lipid Bilayers by Spin-Coating”  
Langmuir **18**, 8172-8177, (2002).
- T. Salditt, F. Pfeiffer, H. Perzl, A. Vix, U. Mennicke, A. Jarre, A. Mazuelas,  
T.H. Metzger  
„X-ray waveguides and thin macromolecular films”  
Physica B **336**, 181-192, (2003).
- T. Salditt, C. Münster, U. Mennicke, C. Ollinger, G. Fragneto  
„Thermal fluctuations of oriented lipid membranes by nonspecular neutron  
reflectometry”  
Langmuir (2003) (in press).
- D. Constantin, U. Mennicke, C. Li, T. Salditt, „Solid-Supported Lipid Mul-  
tilayers : Structure Factor and Fluctuations”  
eingereicht bei Eur. Phys. J. E.



---

## Lebenslauf

Ulrike Katharina Mennicke

---

Familienstand:	ledig
11. November 1973	geboren in München
09/1979-12/1980	Grundschule am Ravensburger Ring/München
01/1981-07/1983	Grundschule Pullach im Isartal
09/1983-07/1992	Staatliches Gymnasium Pullach
8. Juli 1992	Abitur
11/1992-03/1993	Studium der Pädagogik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/1993-09/1993	Aufenthalt in Vancouver/Kanada Besuch des Pacific Language Institute
11/1993-12/1999	Studium der Mathematik und Physik für das Lehramt an Gymnasien an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Herbst 1999	Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien (Bayerisches Staatsministerium für Unterricht und Kultus)
02/2000-12/2000	wissenschaftliche Angestellte der Sektion Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München
01/2001-10/2002	wissenschaftliche Angestellte der Universität des Saarlandes
seit 11/2002	wissenschaftliche Angestellte der Georg-August-Universität Göttingen