

**Thermodynamische
Charakterisierung und
röntgenreflektometrische Analyse
des thermotropen
Phasenverhaltens von
Archaelipiden im Vergleich zum
Modellsystem DPPC**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht bei der
Fakultät Chemie der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Dipl. Phys. V. Michael K. Šulc

Dortmund, November 2009

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Geiger

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | i |
| 1 Einleitung: Archaeen | 1 |
| 1.1 Evolution | 1 |
| 1.2 Membranen und Lipide | 3 |
| 1.3 Phasenverhalten von Lipiden | 8 |
| 1.4 Zielsetzung | 10 |
| 2 Experimenteller Teil | 11 |
| 2.1 Probenpräparation | 11 |
| 2.2 Dichtemessungen | 13 |
| 2.3 Ultraschallmessungen | 16 |
| 2.4 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) | 20 |
| 2.5 Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC) | 23 |
| 2.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM) | 24 |
| 2.7 Röntgenreflektometrie (XRR) | 26 |
| 2.8 Steady-state Fluoreszenzanisotropie | 38 |
| 3 Ergebnisse und Diskussion | 43 |
| 3.1 Thermodynamische Analyse des thermotropen Phasenverhaltens von PLFE im Vergleich zu DPPC | 43 |
| 3.1.1 Berechnung der adiabatischen Kompressibilität aus der Ultraschall- und Dichtemessung | 43 |
| 3.1.2 Bestimmung der isothermen Kompressibilität mittels Ultraschallmessung, DSC und PPC | 48 |

| | | |
|----------|--|--------------|
| 3.1.3 | Ermittlung von Fluktuationsparametern | 56 |
| 3.2 | Strukturelle Charakterisierung der festkörperunterstützten PLFE-Membran in Abhängigkeit von der Temperatur | 59 |
| 3.2.1 | Bestimmung der Membranschichtdicke mittels AFM | 59 |
| 3.2.2 | Bestimmung der Membranschichtdicke und des temperaturabhängigen Phasenverhaltens mittels XRR | 59 |
| 3.3 | Bestimmung der Fluidität von PLFE-Membranen aus Fluoreszenz-anisotropiemessungen | 69 |
| 4 | Zusammenfassung | 71 |
| | Literaturverzeichnis | 75 |
| | Anhang | I |
| | Abkürzungsverzeichnis | IX |
| | Abbildungsverzeichnis | XV |
| | Danksagung | XIX |
| | Selbstständigkeitserklärung | XXIII |

Kapitel 1

Einleitung: Archaeen

1.1 Evolution

Die Welt der Lebewesen lässt sich mit Hilfe der Genomanalyse in drei große Abteilungen untergliedern: Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Abbildung 1.1).¹ Bei den Eukaryoten (griech. *eu* = richtig und *karyon* = Kern) befindet sich die

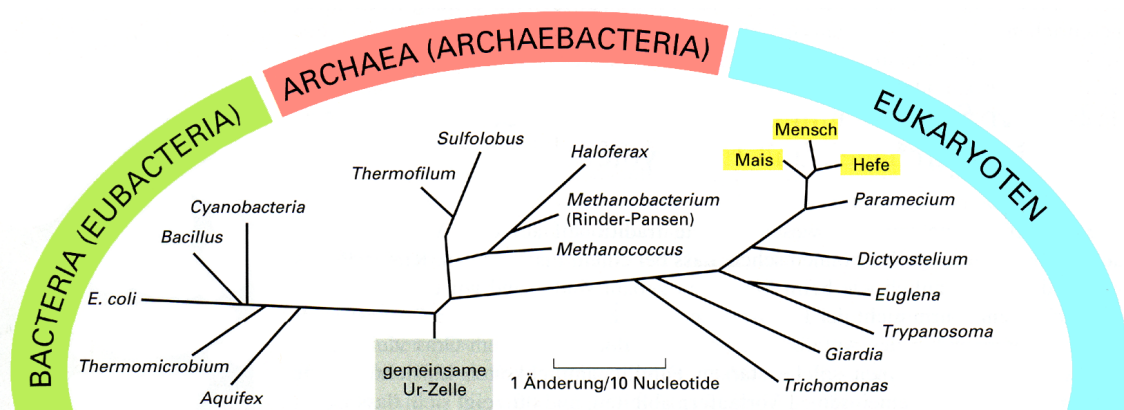


Abbildung 1.1: Evolutionärer Verlauf des Lebens²

DNA in einem speziellen von einer Membran umgebenen Kompartiment, dem Kern. Prokaryoten haben dagegen kein ausgesprochenes Kernkompartiment, um ihre DNA unterzubringen. Des Weiteren umfassen die Prokaryoten zwei verschiedene Gruppen, die sich frühzeitig in der Geschichte des Lebens auf der Erde auseinander entwickelt haben - entweder bevor sich die Urformen der Eukaryoten als getrennte Gruppe



Abbildung 1.2: Lebensraum von thermophilen Bakterien ³

abzweigten oder ungefähr zur gleichen Zeit. Die beiden Gruppen der Prokaryoten werden Bacteria (oder Eubacteria) und Archaeen (oder Archaeobacteria) genannt. Prokaryotenzellen kommen in enormer Mannigfaltigkeit in den unterschiedlichsten ökologischen Nischen vor und sind in ihren biochemischen Fähigkeiten in weit größerem Maß anpassungsfähig als Eukaryotenzellen. So sind organotrophe, phototrophe und lithotrophe Arten bekannt, die wahlweise organische Moleküle als Nahrung nutzen, Lichtenergie einfangen oder von einer einfachen Nahrung aus anorganischen Stoffen leben. Letztere erhalten ihren Kohlenstoff aus CO_2 und können als Energielieferanten z.B. elementaren Schwefel aus ihrer anorganischen Umgebung nutzen. Die Archaeen wurden erst in jüngster Zeit in extremen Lebensräumen wie Mooren, Meerestiefen, Salzlaken oder heißen, sauren Quellen (Abbildung 1.2) entdeckt.

J. A. Brierley berichtete 1966 von der Isolierung eines Organismus, der *Sulfolobus* ähnelte. ⁴ T. D. Brock gelang 1972 die Charakterisierung einer neuen Gattung von Schwefel oxidierenden Bakterien, die unter sauren Bedingungen und bei hohen Temperaturen leben. ⁵ Im Speziellen taufte er eine einzelne Spezies *Sulfolobus acidocaldarius*. Der Name rührt von der gelappten Struktur (lat. *Lobus* = Lappen) des

Organismus und den Lebensumständen her. Das Bakterium oxidiert Schwefel⁶ (lat. *sulfur* = Schwefel) und lebt in sauren (lat. *acidus* = sauer), thermalen (lat. *caldarius* = zu Wärme gehörend) Quellen. Die Membran von thermoacidophilen Archaeen ist unter verschiedensten Wachstumsbedingungen stabil.^{4,7,8} Diese Unempfindlichkeit der Archaeenmembran gegenüber extremen Umweltbedingungen weckte das Interesse, die physikalischen Eigenschaften der Membrankomponenten genauer zu untersuchen.⁹ Es wird vermutet, dass die Stabilität der Membran unter anderem von der einzigartigen chemischen Struktur der Archaealipide herrührt.^{10,11} Die Eigenschaft der Archaealipide, eine hohe mechanische Stabilität zu besitzen, macht sie einzigartig und ermöglicht neue Applikationen.¹²

1.2 Membranen und Lipide

Biologische Membranen sind flexible selbstdichtende Grenzen, welche die permeable Barriere der Zellen bilden. Die Zellen ihrerseits werden durch Membranen in verschiedene Reaktionsräume (Kompartimente) unterteilt, in denen die vielfältigen biochemischen Prozesse wohlgeordnet ablaufen können. Cytoplasmische Membranen sind sehr komplexe Strukturen und bestehen im Wesentlichen aus einer Doppel- oder Monoschicht von Lipidmolekülen, die eine Matrix bilden, in der verschiedene Membranproteine treiben (Abbildung 1.3).¹³ Dieses gedankliche Bild des Aufbaus der Membran wurde als Flüssig-Mosaik-Modell von S. J. Singer und G. L. Nicolson beschrieben.¹⁴ Die Hauptaufgabe von Lipidmembranen ist die Trennung des Zellinneren vom extrazellulären Raum. Sie fungieren dort als hochselektive Permeabilitätsschranken. Des Weiteren finden zahlreiche physiologisch bedeutende Prozesse an der Zellmembran statt. Die physikalischen Eigenschaften der Membran beeinflussen diese Prozesse direkt auf eine Art und Weise, die oftmals schwierig festzustellen ist. Jede spezialisierte Membran besitzt eine einzigartige Struktur, Beschaffenheit und Funktion. Ferner existieren innerhalb jeder Membran Subdomänen wie zum Beispiel "rafts"¹⁶, Lipid-Domänen und Organisationen von membranassoziierten Komplexen mit eigener einzigartiger Beschaffenheit. Die meisten Prokaryotenzellen leben als unabhängige Einzelzellen und nicht als multizelluläre Organismen. Sie besitzen in der Regel eine derbe Schutzhülle - die Zellwand -, unter der die Plasmamembran ein einziges Cytoplasmakompartiment einschließt, welches die

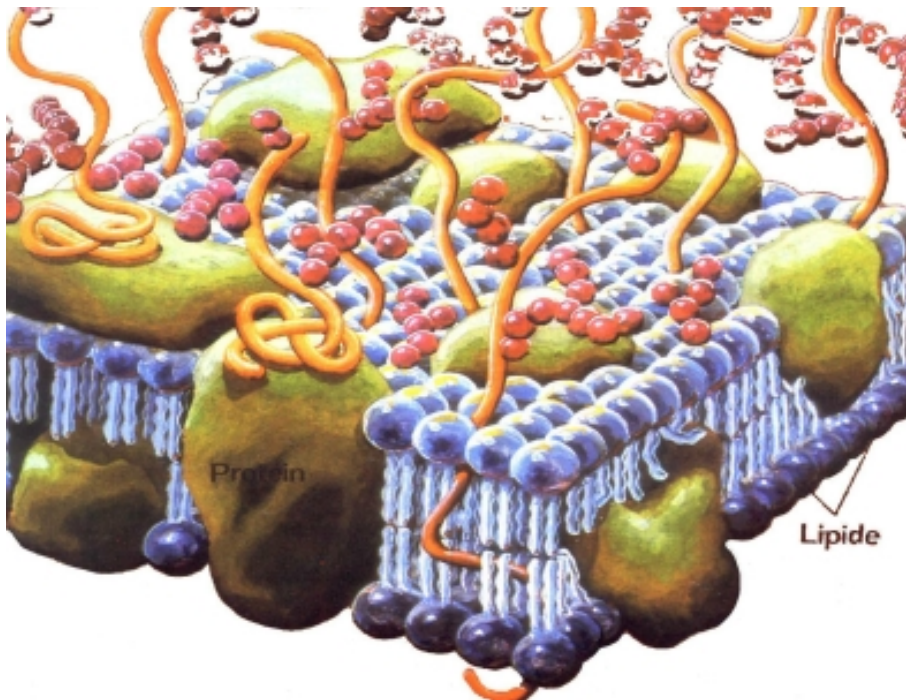


Abbildung 1.3: Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht und peripheren sowie integralen Proteinen¹⁵

DNA, RNA, Proteine und die übrigen lebensnotwendigen kleinen Moleküle enthält.

Durch den Zellwandaufbau unterscheiden sich die Archaeen deutlich von anderen Prokaryoten.¹⁷ Die Cytoplasmamembranen sind nicht aus den bei Bakterien üblichen doppelschichtigen Fettsäureglycerinestern, sondern aus einschichtigen Isoprenoidlipiden aufgebaut. Diese Zusammensetzung verleiht vielen Archaeen die Eigenschaft, auch bei extremen Bedingungen (hohe Temperatur, niedriger pH-Wert) persistieren und Stoffwechsel betreiben zu können.

Bakterielle und eukaryotische Lipide setzen sich aus zwei hydrophoben Fettsäureketten zusammen, die jeweils über eine Esterbindung mit der C(1)- und C(2)-Position des Glycerins verbunden sind. An der C(3)-Position des Glycerins befindet sich eine Phosphatgruppe, die ihrerseits mit einem Rest verestert ist, der sich von einem polaren Alkohol ableitet. Aufgrund des amphipathischen Charakters bilden diese Lipide in einer wässrigen Umgebung Lipiddoppelschichten, wobei die hydrophilen Köpfe mit dem Wasser in Kontakt bleiben, während die hydrophoben Schwänze ins Innere der Membran gerichtet sind (Abbildung 1.3 und 1.4).

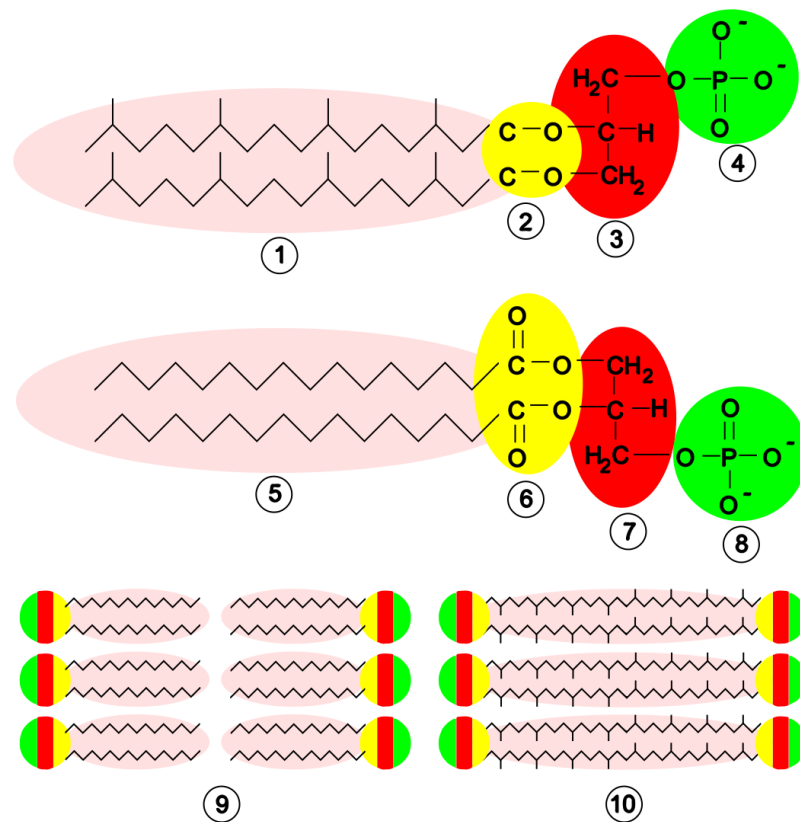


Abbildung 1.4: Struktur der Archaeenmembran. Oben: Archaeenmembran, 1 Isoprenseitenketten, 2 Etherbindung, 3 L-Glycerol, 4 Phosphatrest. Mitte: Bakterien- und Eukaryotenmembran: 5 Fettsäureketten, 6 Esterbindung, 7 D-Glycerol, 8 Phosphatrest. Unten: 9 Lipiddoppelschicht in Bakterien, Eukaryoten und den meisten Archaeen, 10 Lipidmonoschicht in einzelnen Archaeen (entnommen aus Wikipedia)

Die Phospholipide in der Zellmembran der Archaeen unterscheiden sich in vier wesentlichen Punkten von denen anderer Zellen:¹⁸

1. in der Stereochemie des Glycerins,
2. der Etherverknüpfung der Lipide,
3. den Fettalkoholen statt Fettsäuren und
4. der Verzweigung der Kohlenstoffketten.

Das in den Archaeen zum Aufbau der Phospholipide verwendete Glycerin ist ein Stereoisomer des Glycerins, welches in bakteriellen und eukaryotischen Lipiden vorkommt. Während letztere D-Glycerin enthalten, weisen Archaeemembranen

L-Glycerin auf. Aufgrund dessen wird davon ausgegangen, dass Archaeen und Bakterien/Eukaryoten völlig unterschiedliche Enzyme für die Synthese ihrer Phospholipide verwenden, da die Enzyme auf eine enantiomere Form spezialisiert sind. Eine weitere Besonderheit der Archaealipide liegt in der Verknüpfung der Seitenketten mit dem Glycerin über eine Etherbindung; es liegt also ein Fettalkoholglycerinether vor. Die größere chemische Stabilität der Etherbindung gegenüber der Esterbindung könnte eine Ursache für das Überleben der Archaeen unter extremen Bedingungen sein.^{19,20}

Die in Archaeen zum Aufbau der Phospholipide verwendeten Fettalkohole setzen sich in der Regel aus Isopreneinheiten mit 20 C-Atomen zusammen (sog. Phytane). Diese Isoprenseitenketten können miteinander verknüpft vorliegen, sodass wahlweise die beiden Seitenketten eines einzelnen Phospholipids miteinander verbunden sind oder die beiden Seitenketten mit denen eines weiteren Phospholipids auf der anderen Seite der Membran verknüpft werden. Dabei bilden sich sogenannte Tetraether, die zwei Ketten aus 40 C-Atomen besitzen, welche an beiden Enden an Glycerin gebunden sind und die einzigartige Fähigkeit aufweisen, die gesamte Dicke der Plasmamembran zu durchspannen. Dementsprechend ist in einigen Archaeen die Phospholipiddoppelschicht durch eine Monoschicht ersetzt, die zwei polare Kopfgruppen enthält (Abbildung 1.4 und 1.5).^{21–24} Dieser Aufbau führt vermutlich zu einer größeren Stabilität der Membran in extremen thermophilen und acidophilen Umgebungen.^{25,26} Es wird vermutet, dass sich ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken zwischen den polaren Kopfgruppen bildet, das mit der Rigidität und der kompakten Packung der Lipide innerhalb der Membran die thermophilen Eigenschaften verursacht.^{27–30} Eine weitere wichtige Eigenschaft der Archaealipide ist die Verzweigung der Isoprenseitenketten, welche die Ausbildung von Kohlenstoffringen wie Cyclopropan oder Cyclohexan ermöglicht. Es hat den Anschein, dass dieser Ring ähnlich wie Cholesterol in eukaryotischen Zellen einen stabilisierenden Effekt besitzt und somit die Funktionalität der Archaeemembran auch bei hohen Temperaturen gewährleistet.³¹

Die in dieser Arbeit verwendeten Archaeen *Sulfolobus acidocaldarius* besitzen eine Plasmamembran, die zu $\sim 90\%$ aus bipolaren Tetraetherlipiden besteht,^{33–35} deren Hauptbestandteil die sogenannte "Polar Lipid Fraction E" (PLFE) ist,^{36,37} welche sich ihrerseits aus 90% Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraether (GDNT) und 10% Glycerol-dialkyl-glyceryl-tetraether (GDGT) zusammensetzt. Diese beiden Hauptlinien der Tetraetherlipide sind Dimere des Diphytanyl-glycerol-Diethers und weisen

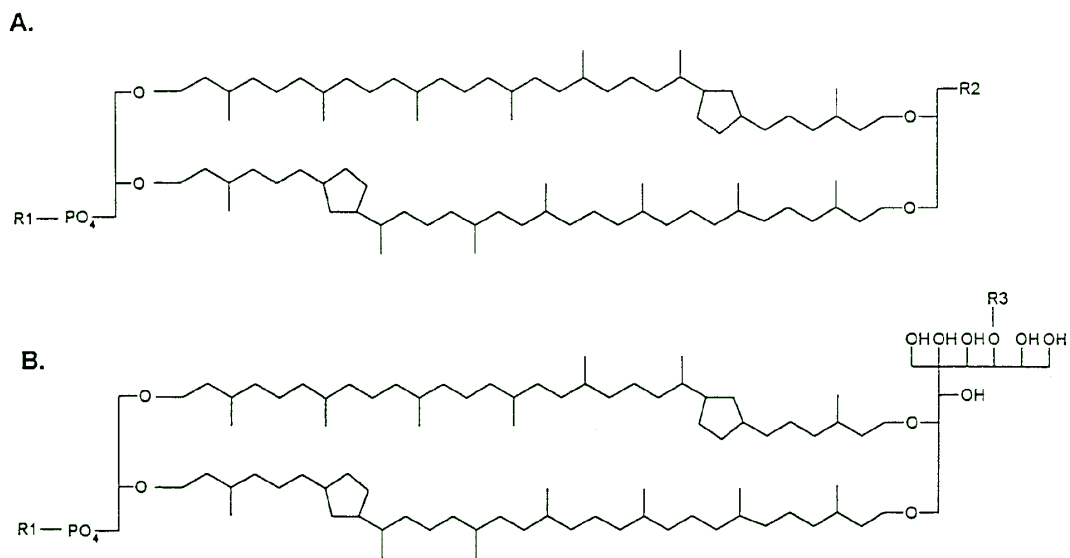


Abbildung 1.5: Struktur von PLFE: A. GDGT und B. GDNT mit $R_1 = \text{Inositol}$; $R_2 = \beta\text{-D-Glukopyranose}$; $R_3 = \beta\text{-D-Galactosyl-}\beta\text{-D-Glucopyranose}$ ³²

demzufolge eine Kettenlänge von 40 C-Atomen auf. Der Nonitolrest kann dabei sowohl in offenkettiger Form als auch in Ringform vorliegen, wobei in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur bis zu vier 1,3-verknüpfte Cytopenanringe gebildet werden können.³⁸ Weitere Modifikationen der Tetraether erfolgen durch Substitution der *sn*-1-Position mit verschiedenen hydrophilen Kopfgruppen wie Zuckerresten, Phosphatresten oder dem erwähnten Nonitolrest (Abbildung 1.4). GDNT enthält ein Phosphatidyl-*myo*-inositol an einem Ende und eine β -Glukose am anderen Ende. Dagegen ist beim GDGT ein Glycerol mit einem Phosphatidyl-*myo*-inositol und das andere mit β -D-Galactosyl-D-Glukose verknüpft (Abbildung 1.5).³²

Die Lipidzusammensetzung bestimmt die Fluiditäts- und Permeabilitätseigenschaften von Membranen. Bei der Wachstumstemperatur eines Organismus (60 – 70 °C für *Sulfolobus*) befindet sich die Membran in der flüssigkristallinen Phase³⁹, was die optimale Funktion der Membranproteine gewährleistet. Die grundlegenden Informationen über die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Lipiden stammen aus Untersuchungen der großen Klasse der Phospholipide von Eubakterien und Eukaryoten. Dagegen konnten bisher nur wenige Informationen über die Lipide der Archaeen erhalten werden.

1.3 Phasenverhalten von Lipiden

Membranlipide setzen sich vorwiegend aus Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterin zusammen, wobei die Phospholipide den weitaus größten Anteil einnehmen. Phospholipide sind Amphiphile, d.h. sie bestehen aus einer hydrophilen Phosphatgruppe, an die z.B. Cholin gebunden ist (Kopf) und zwei hydrophoben Fettsäureketten (Ketten). Aufgrund des hydrophoben Effekts richten sich die Lipide in wässriger Lösung so aus, dass die hydrophilen Kopfgruppen nach außen zum Wasser zeigen, während die hydrophoben Ketten in der Mitte aneinander stoßen und dort das Wasser verdrängen. Diese Anordnung ist in wässriger Lösung der energetisch günstigste Zustand. Daraus resultiert eine Struktur aus mehrschaligen (multilamellaren), geschlossenen Vesikeln, die sich aus Lipiddoppelschichten bildet und die Wechselwirkung der hydrophoben Ketten mit den Wassermolekülen verhindert. Die makroskopische Struktur von Phospholipidlösungen ist von der Art der Lipide und dem Wassergehalt abhängig (lyotroper Polymorphismus). So bildet Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bis zu einem Wassergehalt von etwa 30% Massenanteil lamellare Phasen aus parallelen, übereinander gestapelten Doppelschichten. Bei höherem Wassergehalt entstehen heterogene wässrige Dispersionen aus geschlossenen, multilamellaren Strukturen (Liposomen). Das temperaturabhängige Phasenverhalten (thermotroper Polymorphismus) von untersuchten Modellsystemen reiner Lipiddoppelschichten kann anhand von DPPC (Abbildung 1.6), einem Phospholipid mit zwei gesättigten C₁₆-Fettsäureketten, beispielhaft gezeigt werden.

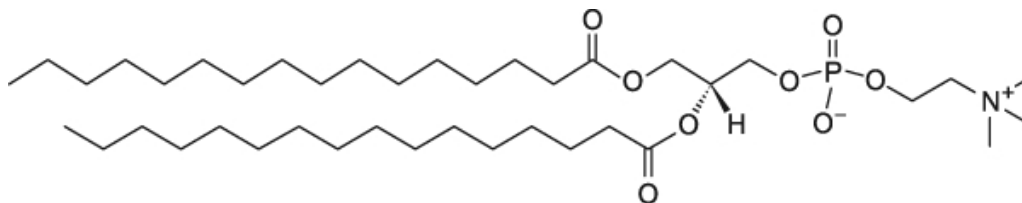


Abbildung 1.6: Struktur von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycerophosphatidylcholin

Vier thermotrope lamellare Strukturen bzw. drei endotherme Phasenumwandlungen können in Abhängigkeit von der Temperatur beobachtet werden (Abbildung 1.7). Die kristalline L_c -Phase (Sub-Gel-Phase) liegt bei $T < 18^\circ\text{C}$ vor. Sie ist aber nur nach mehrwöchiger Inkubation bei tiefen Temperaturen beobachtbar. Die Kohlenwasserstoffketten befinden sich bei diesen Temperaturen in einer kristallinen An-

ordnung und können durch ein orthorhombisches Gitter charakterisiert werden. Die freie Rotation der Lipidketten um die C-C-Achse ist dabei stark eingeschränkt.

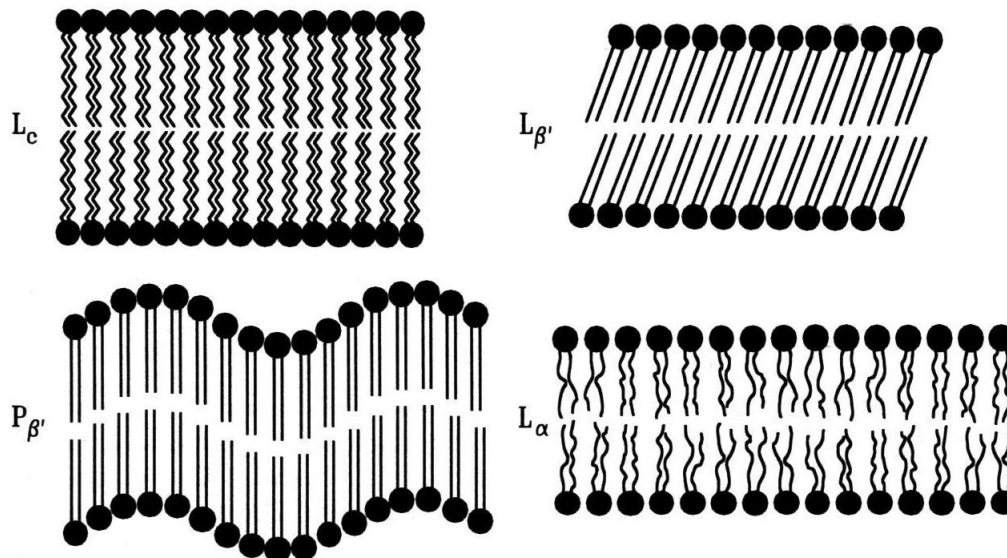


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der thermotropen lamellaren Phasen von DPPC (Abbildung in Anlehnung an Referenz⁴⁰)

Eine Subumwandlung tritt bei etwa 18°C auf, wobei die Lipide in die $L_{\beta'}$ -Phase (Gelphase bei $18^\circ\text{C} < T < 34^\circ\text{C}$) übergehen. Die Ketten liegen überwiegend gestreckt in der *all-trans*-Konformation nebeneinander vor und sind um einen Winkel von etwa 30° gegen die Membrannormale geneigt. Die Packung der Ketten erfolgt in einem verzerrten, quasi-hexagonalen Gitter.

Beim Überschreiten von 34°C tritt eine relativ langsame Vorumwandlung ein. Die Lipide bilden eine periodische wellige Überstruktur aus und liegen dann in der $P_{\beta'}$ -Phase vor (Gelphase bei $34^\circ\text{C} < T < 41^\circ\text{C}$). Die gestreckten Kohlenwasserstoffketten sind in einem regulären hexagonalen Gitter angeordnet und stehen in etwa senkrecht zur Membranoberfläche, wodurch die Schichtdicke der Membran drastisch ansteigt.

Die Hauptumwandlung findet bei $T = 41^\circ\text{C}$ statt und läuft relativ schnell ab (ca. 1 s). In dieser sogenannten L_{α} -Phase (flüssigkristalline Phase bei $T > 41^\circ\text{C}$) besitzen die Ketten eine große Zahl an *gauche*-Isomeren. Dies führt zu einer drastischen Erhöhung der Beweglichkeit der Lipidketten, da sich die Kopfgruppenabstände im Vergleich zu der $P_{\beta'}$ -Phase deutlich erhöhen. Die L_{α} -Phase wird daher auch fluide

oder flüssigkristalline Phase genannt und ist die biologisch relevante Phase, da hier die Beweglichkeit der Moleküle am größten ist. Die Kettenlängen sind durch Bildung mehrerer Rotationsisomere, z. B. g^+ - t - g^- -Kinken, verkürzt, wodurch sich die Dicke der Lipiddoppelschicht im Vergleich zur $P_{\beta'}$ -Phase verringert. Der Phasenzustand einer Membran hängt neben der Temperatur auch von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten sowie dem pH-Wert des umgebenden Mediums ab.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation ist eine systematische Analyse des thermotropen Phasenverhaltens der Hauptkomponenten PLFE der Plasmamembran von Archaeobakterien der Gattung *Sulfolobus acidocaldarius*. Kalorimetrische Methoden wie die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) erlaubten dabei Aussagen über den Phasenübergang der Lipide, da diese mit einer Wärmeänderung einhergehen. Die mit der Hauptumwandlung verbundene diskontinuierliche Volumenänderung lässt sich mit Hilfe der Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC) und der Dichtemessung bestimmen. Letztere ermöglicht in Kombination mit Ultraschallmessungen die Ermittlung der adiabatischen Kompressibilität, sodass mittels der verwendeten, sich ergänzenden Methoden eine umfassende thermodynamische Charakterisierung des PLFE's vorgenommen werden kann. Diese vorangestellten Messmethoden geben allerdings keinen Aufschluss über die strukturellen Änderungen im Verlauf der thermotropen Phasenumwandlung der Lipide. Um diese Lücke zu schließen, wird die Röntgen-Reflektometrie eingesetzt. Des Weiteren werden Fluoreszenzanisotropiemessungen durchgeführt, um Kenntnisse über die Beweglichkeit der Kopfgruppen des PLFE's zu erhalten.

Abschließend erfolgt ein Vergleich des thermotropen Phasenverhaltens von PLFE mit dem von DPPC, das als etabliertes Modellsystem unter gleichen Bedingungen analysiert wird. Die Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis der größeren Stabilität von Archaealipidmembranen führen.

Kapitel 2

Experimenteller Teil

2.1 Probenpräparation

Die Archaeen wuchsen aerob und heterotrop bei 65 °C und einem pH-Wert von 2,5 – 3,0. Die Isolation der Lipidkomponenten (PLFE) aus getrockneten Zellen von *Sulfolobus acidocaldarius* wurde durch eine 12-stündige Soxhlet-Extraktion mit Hilfe eines Chloroform/Methanol-Gemisches (1:1, v/v) und anschließender Aufreinigung erzielt.^{37,41} Das Endprodukt enthielt PLFE mit einem bis fünf Cyclopentanringen pro Molekül und wurde von Prof. Lee-Gau Chong (Temple University School of Medicine, Philadelphia) bereitgestellt.

| Eigenschaften | PLFE | DPPC |
|------------------|---------------------------------|---------------------|
| Summenformel | Mix aus GDNT und GDGT | $C_{40}H_{80}NO_8P$ |
| Molekulargewicht | ~ 2300 g/mol ⁴¹ | 733,56 g/mol |
| Membranstruktur | Lipidmonoschicht | Lipiddoppelschicht |

Tabelle 2.1: Eigenschaften der Lipide

Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) von Avanti Polar Lipids, Inc., wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Das trockene Lipid wurde nach dem Auswägen in Lösung gebracht (DPPC in Chloroform und PLFE in Wasser/Methanol/Chloroform 5:25:70, v/v/v) und gevortext. Diese Lösung wurde für die Röntgenreflektometrie direkt zum Spin-Coating benutzt, wobei die Konzentration der Lipide 10 mg/mL be-

trug. Für die weiteren Versuche (Dichte- und Ultraschallmessungen, DSC, PPC und Fluoreszenzanisotropie) wurde die Probe anschließend mit einem Stickstoffstrom vorgetrocknet und über Nacht in den Lyophilisator (Christ, ALPHA 1-2 Deutschland) gegeben. Der lösungsmittelfreie, getrocknete Film wurde in deionisiertem Wasser (Milli-Q) resuspendiert und gevortext bis kein Lipid mehr auf der Wandung des Probengefäßes angelagert war. Danach wurde die Probe für ca. 15 Minuten bei 45 °C (DPPC) bzw. 65 °C (PLFE) in ein temperierbares Ultraschallbad (Bandelin, SONOREX RK 100 SH, Deutschland) gegeben. Die Proben wurden sieben Gefrier (flüssiger Stickstoff) - Tau (Wärmebad bei 45 °C bzw. 65 °C) - Zyklen unterworfen, zwischen denen die Probe gevortext wurde.

DPPC- und PLFE-Lipide bilden in wässriger Lösung durch Schütteln beziehungsweise Extrusion stabile multilamellare Vesikel (MLV) und große unilamellare Vesikel (LUV).^{30,37,42} Um gleichförmige, große unilamellare Liposomen definierter Größe zu erhalten, wurde die Probe 21 Mal durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm nominalem Porendurchmesser (Nuclepore Polycarbonate TrackEtch, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) bei 45 °C (DPPC) bzw. 65 °C (PLFE) mit Hilfe eines Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) extrudiert.⁴³ Die berechneten Lipidkonzentrationen für die kalorimetrischen Messungen (DSC/PPC) und Dichtemessungen beliefen sich auf 5 mg/mL beziehungsweise 4 mg/mL für die Ultraschall- und Anisotropiemessung.

TMA-DPH (1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien-P-toluolsulfonat) (Invitrogen) wurde als Fluorophor für die Anisotropiemessung verwendet, da es für Untersuchungen von dynamischen strukturellen Membraneigenschaften gebraucht wird. Es wird insbesondere für Fluoreszenzpolarisationsstudien rotierender Bewegungen und für Membranfluiditätsmessungen verwendet. TMA-DPH besitzt eine zylindrische Form und hat einen Fluoreszenzemissionsübergangsdipol, welcher praktisch parallel zu der langen molekularen Achse des Moleküls ausgerichtet ist. Dadurch ist es sehr empfindlich gegenüber Reorientierungen durch Wechselwirkung mit umgebenden Lipiden. Zur Messung der Anisotropie wurden die Liposomen mit in Ethanol gelöstem TMA-DPH im Verhältnis 1:1000 versetzt. In Tabelle 2.2 werden einige physikalische Größen von TMA-DPH dargestellt.

Um gleiche Bedingungen bei den unterschiedlichen Messmethoden zu gewährleisten, wurde auf einen Puffer verzichtet, da bei der Röntgenreflektometrie kein Puffer

| Eigenschaften | |
|-------------------------------|---------------------|
| Summenformel | $C_{28}H_{31}NO_3S$ |
| Molekulargewicht | 461,62 g/mol |
| Absorptionsmaximum | 360 nm |
| Emissionsmaximum | 430 nm |
| Übergangsdipole | Winkel ca. 10 °C |
| Fluoreszenzlebensdauer τ | 1,5 – 7 ns |
| Maximale Anisotropie r_0 | 0,390 |

Tabelle 2.2: Physikalische Größen von TMA-DPH ^{44–46}

verwendet werden konnte. Messungen mit Zitratpuffer bei pH 6,5 (entspricht dem pH-Wert im Inneren von *Sulfolobus acidocaldarius*)⁵ zeigten keinen Unterschied im Kurvenverlauf der Ultraschallmessungen im Vergleich zu den Messungen ohne Puffer.

2.2 Dichtemessungen

Das Grundprinzip der Dichtemessung basiert auf der Funktionsweise eines harmonischen Oszillators. Die zu messende Lösung wird in ein schwingungsfähiges U-Rohr mit bekanntem Leergewicht m und Volumen V gefüllt. Da das Schwingungsverhalten des Rohrs nur vom freiliegenden Teil abhängt, d. h. dem zwischen den Fixierungspunkten befindlichen Rohrstück, führt eine Überfüllung des Rohrs zu keiner Verfälschung der Messung. Ein Piezoelement regt das Rohr zu Schwingungen bei seiner Eigenfrequenz an, wobei der Referenzschwinger mit angeregt wird (Abbildung 2.1). Die Schwingungsdauer T wird durch optische Messaufnehmer bestimmt, sodass sich daraus die Dichte der Lösung ermitteln lässt. In der klassischen Mechanik ist ein harmonischer Oszillator ein System, welches, wenn es aus der Gleichgewichtsbedingung gebracht wird, eine rücktreibende Kraft F_R erfährt, die proportional zur Auslenkung x ist. Nach dem Hookschen Gesetz lässt sich die rücktreibende Kraft schreiben als

$$F_R = -kx \quad (2.1)$$

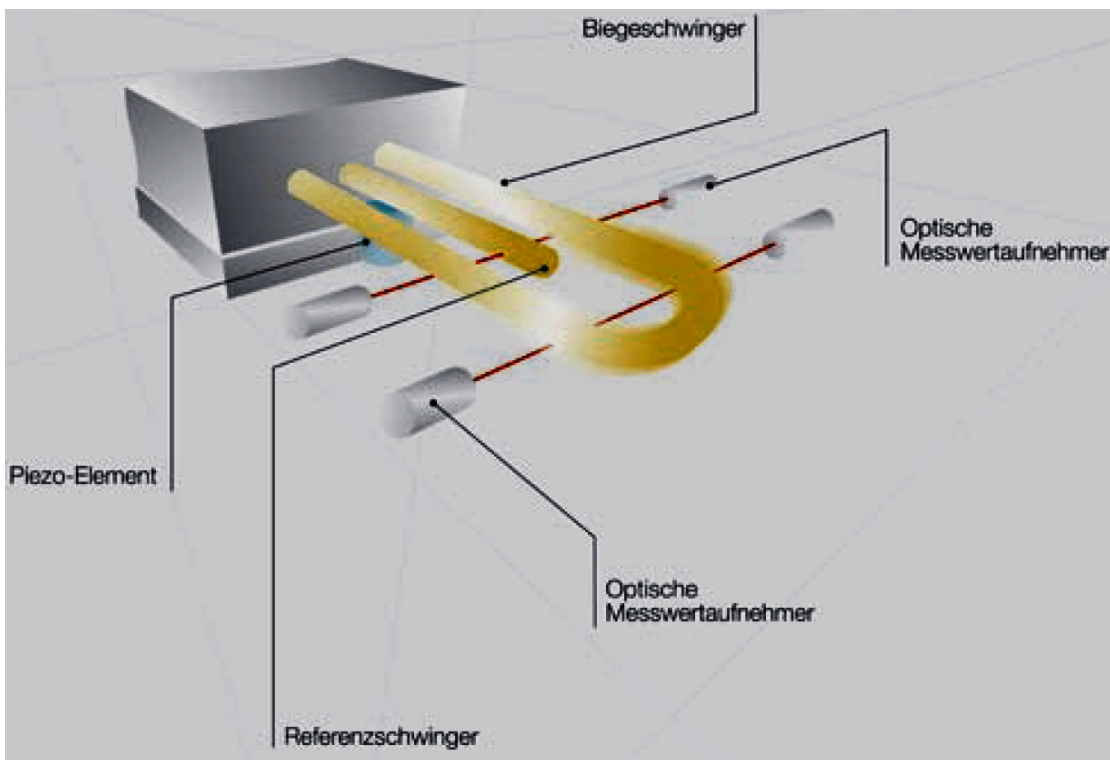


Abbildung 2.1: Dichtemessgerät mit U-Rohr als Biegeschwinger und Sensoren zur Frequenzbestimmung ⁴⁷

mit k : Federkonstante. Nach dem zweiten Newtonschen Gesetz ist die Kraft F das Produkt aus Masse (m_U : Gesamtmasse des U-Rohrs) und Beschleunigung a

$$F = m_U a = m_U \frac{d^2 x}{dt^2} \quad . \quad (2.2)$$

Die Gesamtmasse des U-Rohrs setzt sich aus der Masse des hohlen U-Rohrs m und der Masse der eingefüllten Probe mit der Dichte ρ zusammen

$$m_U = m + \rho V \quad . \quad (2.3)$$

Nach Gleichsetzen und Umformung ergibt sich eine homogene Differenzialgleichung zweiter Ordnung

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \omega_0^2 x = 0 \quad , \quad (2.4)$$

wobei

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m_U}} \quad (2.5)$$

ist. Mit dem Ansatz

$$x(t) = A \exp(\lambda t) \quad (2.6)$$

kann die Differenzialgleichung gelöst werden.

$$\lambda^2 A \exp(\lambda t) + \omega_0^2 A \exp(\lambda t) = 0 \Rightarrow \lambda = \pm i\omega_0 \quad . \quad (2.7)$$

Die Kreisfrequenz des harmonischen Oszillators ist demzufolge durch ω_0 festgelegt. Die Eigenfrequenz f des Systems ist proportional zur Kreisfrequenz ω_0 und antiproportional zur Schwingungsdauer T

$$f = \frac{\omega_0}{2\pi} = \frac{1}{T} \quad . \quad (2.8)$$

Die Schwingungsdauer ergibt sich aus 2.8 mit 2.3 und 2.5 zu

$$T = 2\pi \sqrt{\frac{m + \rho V}{k}} \quad . \quad (2.9)$$

Folglich ist die Schwingungsdauer von der Dichte der Probe abhängig. Durch Messen der Schwingungsdauer ist es möglich, eine Aussage über die Dichte der eingefüllten Probe zu erhalten

$$\rho = \frac{kT^2 - 4\pi^2 m}{4\pi^2 V} \quad (2.10)$$

bzw.

$$\rho = \frac{T^2 - A}{B} \quad , \quad (2.11)$$

wobei $A = 4\pi^2 \frac{m}{k}$ und $B = 4\pi^2 \frac{V}{k}$ gerätespezifische Konstanten sind, die durch Messungen der Dichte bekannter Substanzen (z.B. Luft, Wasser) bestimmt werden. Die Dichtemessung erlaubt es, bei Annahme einer konstanten Masse die Volumenänderung des Systems zu ermitteln. Da die Phasenumwandlung des Lipids auch mit einer diskontinuierlichen Änderung des Volumens einhergeht, ist es möglich, diese direkt zu bestimmen.⁴⁰ Die relative Volumenänderung ist klein und beträgt für DPPC am gel/fluid Hauptphasenübergang etwa vier Prozent (und nimmt ebenfalls mit steigender Kettenlänge zu). Das partielle molare Volumen einer Lipidlösung V^0 kann über die Gleichung

$$V^0 = \left(\frac{\partial V}{\partial n} \right) \approx \frac{M}{\rho_0} - \frac{\rho - \rho_0}{\rho_0 c} \quad (2.12)$$

berechnet werden (c : Stoffmengenkonzentration des Lipids, ρ und ρ_0 : Dichte der Lösung bzw. des Lösungsmittels). Die Messungen wurden mit dem Gerät DMA 5000 der Anton Paar GmbH (Graz, Österreich) und mit einer Genauigkeit von $\pm 5 \cdot 10^{-6} \text{ g/cm}^3$ durchgeführt. Das Fassungsvermögen des U-Rohrs beträgt 1 mL.

2.3 Ultraschallmessungen

Die Ultraschallmessungen wurden mit Hilfe des ResoScan-Systems der Firma TF Instruments GmbH (Heidelberg) durchgeführt. Das Gerät besteht aus zwei Resonatorkammern, welche sich aus einer oszillierenden Wand (Sender), einem Lithium-Niobat-Einkristall und einer ihr parallel gegenüberliegenden Wand (Empfänger) zusammensetzen. Der Abstand D zwischen Sender und Empfänger ist gerätespezifisch festgelegt und beträgt in diesem Fall 7,0 mm (Abbildung 2.2). Die Modifizierung

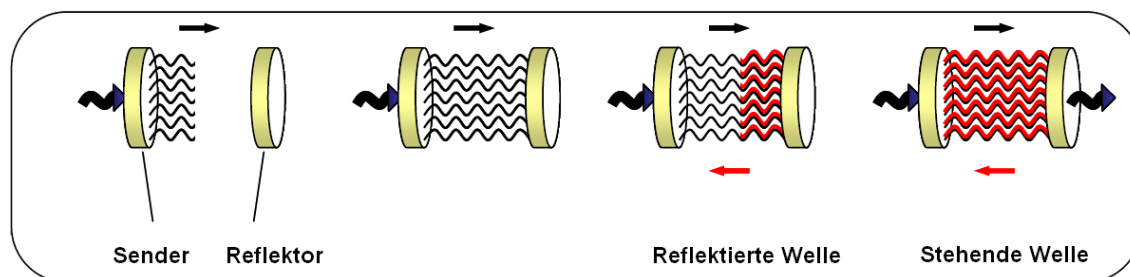


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Hohlraumresonators mit stehenden Wellen (modifizierte Abbildung aus "Short training course", TF Instruments).

der Resonator-Gleichungen mit der Nahfeldtheorie ermöglicht die Konstruktion von solch kleinen Kammern, sodass zum Befüllen ein Volumen von nur $200 \mu\text{L}$ benötigt wird.⁴⁸ Die Hohlraumresonatorkammern werden durch Peltier-Elemente bis zu einer Temperaturgenauigkeit von $\pm 0,003 \text{ K}$ stabilisiert, da die Schallgeschwindigkeit stark temperaturabhängig ist. Durch die Reflektion der Schallwelle interferiert die Welle mit sich selbst, sodass sich bei bestimmten Wellenlängen eine stehende Welle im Resonator aufbauen kann (Abbildung 2.3). Dies ist nur möglich, wenn ein ganzzahliges Vielfaches der entsprechenden Wellenlänge dem doppelten Abstand der

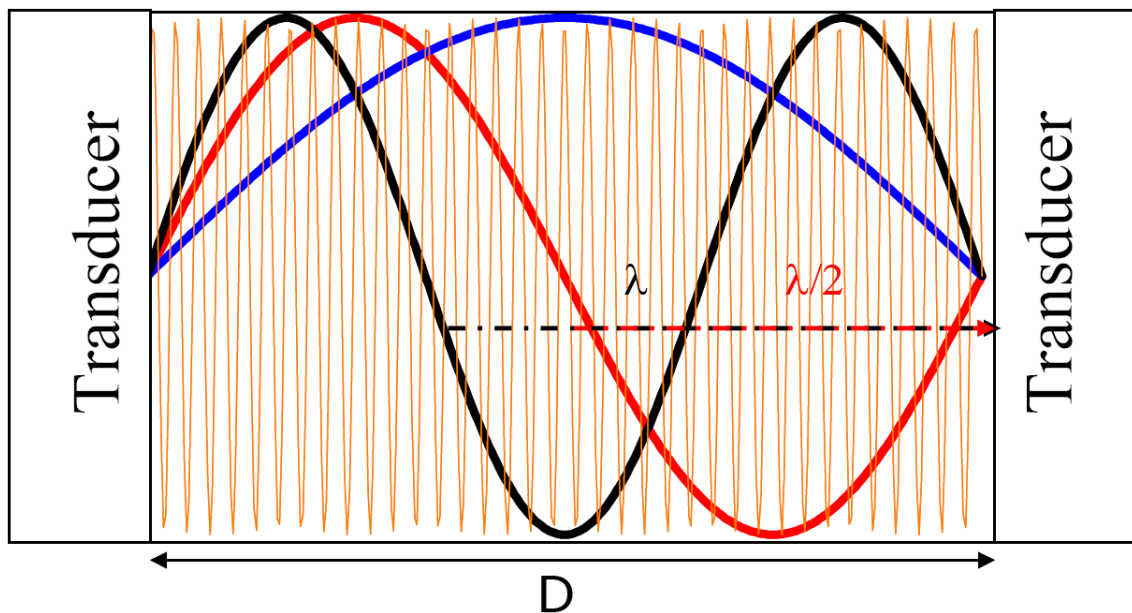


Abbildung 2.3: Bildung von stehenden Wellen durch Reflexion und Interferenz im Resonator, wenn ein ganzzahliges Vielfaches der halben Wellenlänge λ mit dem Abstand D der Transducer übereinstimmt. Gezeigt werden stehende Wellen der 1., 2., 3. und 73. Ordnung (modifizierte Abbildung aus "Short training course", TF Instruments).

Resonatorwände D entspricht, d.h.

$$D = n \frac{\lambda_n}{2} \quad , \quad (2.13)$$

sodass mit $n = 1$ die Basiswellenlänge $\lambda_{\text{Basis}} = \lambda_1 = 2D$ ist. Die Zeit, die die Welle braucht, um eine der Wellenlänge entsprechende Strecke mit der vom Medium abhängigen Schallgeschwindigkeit u zu durchlaufen, entspricht der Schwingungsdauer T . Daraus ergibt sich $T = \frac{\lambda}{u}$ bzw. unter Verwendung der Frequenz f ($T = \frac{1}{f}$)

$$f_n = \frac{u}{\lambda_n} \quad . \quad (2.14)$$

Demzufolge gibt es diskrete Frequenzen, deren Wellenlängen im Resonator stehende Wellen generieren, wodurch bei bekannter Ordnung n auf die Schallgeschwindigkeit zurückgeschlossen werden kann. Da Frequenzen generell sehr exakt bestimmt werden können, misst das Gerät die Frequenzdifferenz zweier aufeinander folgender Ordnungen (das eliminiert die Notwendigkeit der Kenntnis der konkreten Ordnung), um die Schallgeschwindigkeit zu ermitteln. Dabei wird D als Gerätekonstante von

der Firma bestimmt ⁴⁹

$$f_{\text{Basis}} = f_{n+1} - f_n = \frac{u}{2D} \quad . \quad (2.15)$$

Die Oszillation des Senders induziert lokal eine Druckänderung, die aufgrund der Wechselwirkung der Moleküle in der Lösung propagiert. Die sich ausbreitende Schallwelle ist dementsprechend eine longitudinale Welle (Druckwelle), welche die Moleküle aufgrund der Druckänderung aus ihrer Gleichgewichtsposition auslenkt. Zur Herleitung der Geschwindigkeit der Schallwelle in der Lösung wird ein kleines Teilvolumen der Welle betrachtet

$$V = A \Delta x \quad . \quad (2.16)$$

Das Wegelement soll dabei im Vergleich zur Wellenlänge λ klein sein (Abbildung 2.4). Auf dieses Volumen mit der Querschnittsfläche A wirkt eine resultierende

longitudinale Dichtewellen / Schallwellen

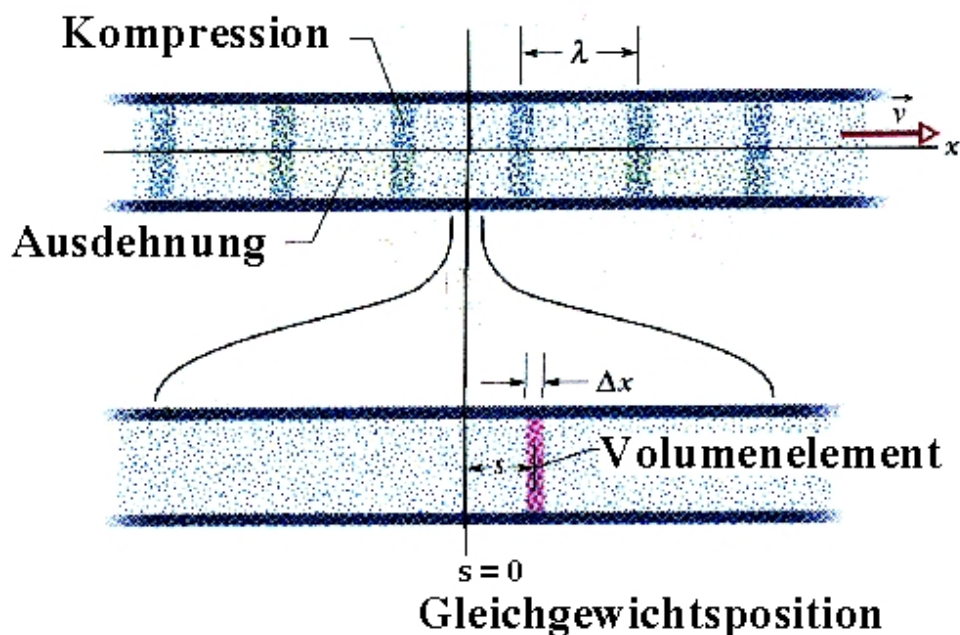


Abbildung 2.4: Longitudinale Welle und Auslenkung der Moleküle aus der Gleichgewichtsposition im betrachteten Volumenelement. (Vorlesungsnotizen Physik B3 Kapitel 5.2 (SS 2003, Prof. D. Suter))

Kraft F aus der Differenz der Normalkräfte (Druck = Kraft/Fläche) der beiden Sei-

ten

$$F = A(p(x) - p(x + dx)) = -A \frac{dp}{dx} . \quad (2.17)$$

Über die Definition des Kompressibilitätskoeffizienten

$$\beta = -\frac{1}{V} \frac{dV}{dp} \quad (2.18)$$

ist die Druckänderung mit der Volumenänderung verknüpft

$$dp = -\frac{1}{\beta} \frac{dV}{V} . \quad (2.19)$$

Die durch die Welle ausgelöste Druckdifferenz verursacht eine Verschiebung der linken (imaginären) Begrenzung $s(x)$ und rechten (imaginären) Begrenzung $s(x + dx)$ des betrachteten Volumenelements (Abbildung 2.4). Die Volumenänderung lässt sich dann wie folgt berechnen:

$$dV = A(s(x + dx) - s(x)) = A \frac{ds}{dx} dx . \quad (2.20)$$

Gleichung 2.19 wird mit 2.20 und 2.16 zu

$$dp = -\frac{1}{\beta} \frac{ds}{dx} . \quad (2.21)$$

Die Bewegungsgleichung für die Auslenkung s des Massenelements ($m = \rho V = \rho A dx$) ergibt sich schließlich aus dem Gleichsetzen des zweiten Newtonschen Gesetzes ($F = ma$) mit der Gleichung 2.17 und unter Berücksichtigung der Gleichung 2.21:

$$\begin{aligned} ma = \rho A dx \frac{d^2 s}{dt^2} &= -A \frac{dp}{dx} dx = A \frac{1}{\beta} \frac{d^2 s}{dx^2} dx \\ \Rightarrow \frac{d^2 s}{dt^2} &= \frac{1}{\rho \beta} \frac{d^2 s}{dx^2} . \end{aligned} \quad (2.22)$$

Mit der Annahme kleiner Wellenzahlen, d.h. kleiner Frequenzen, liefert die Lösung der Wellengleichung für die Schallgeschwindigkeit

$$u = \frac{1}{\sqrt{\rho \beta}} . \quad (2.23)$$

Wird die Messung bei hohen Frequenzen durchgeführt, sind die Druckänderungen nur sehr kurz, sodass ein Temperatenausgleich während der Messung nicht stattfindet. Bei der Kompressibilität handelt es sich folglich um eine adiabatische Kompressibilität. Der Vorteil der Ultraschallmessung liegt in der empfindlichen und zerstörungsfreien Analyse der Probe. Sie ist außerdem sehr empfindlich gegenüber kooperativen Phänomenen. Lipide zeigen bei Phasenumwandlungen strukturelle Änderungen. Bei dem Übergang des Lipids von der Gelphase in die fluide Phase geht das System von einem höheren Ordnungsgrad (gestreckte Ketten) in einen niedrigeren (große Zahl an *gauche*-Isomeren) über. Die Kompressibilität der Membran wird dadurch erhöht, was mit einer sinkenden Schallgeschwindigkeit einhergeht.⁵⁰ Der Unterschied zwischen der adiabatischen und isothermen Kompressibilität ist für wässrige Lösungen im Allgemeinen kleiner als ein paar Prozent,⁴⁹ da Wasser einen kleinen Wert für den Ausdehnungskoeffizienten α und einen großen Wert für die Wärmekapazität C_p besitzt. Im Bereich der Phasenumwandlung können sich die Kompressibilitäten jedoch sehr wohl unterscheiden, da zur adiabatischen Kompressibilität nur schnelle Prozesse beitragen, zur isothermen jedoch alle dynamischen Prozesse.

2.4 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Für die dynamische Differenzkalorimetrie wurde ein VP-DSC-Kalorimeter der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA) verwendet. Die Meßzellen des Instruments besitzen eine Füllmenge von ca. 0,5 mL und bestehen aus Tantal 61TM.

Kalorimetrische Messungen geben wertvolle Informationen über das Phasenverhalten von Lipiden, da bei einem Phasenübergang das System Wärme aufnimmt oder abgibt. Die hochempfindliche Methode der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) ist dafür besonders gut geeignet. Das DSC-Gerät besteht aus zwei thermisch isolierten Zellen, der Probenzelle S und der Referenzzelle R (Abbildung 2.5). Ein Mantel temperierbaren Metalls umschließt beide Zellen und sorgt damit für die isoperibole Betriebsart (konstante Temperatur der Umgebung $T = T_S = T_R$). Die Gleichheit der Umgebungstemperatur beider Zellen ist entscheidend für die Genauigkeit der Messung. Gerätebedingte Schwankungen in der Temperaturdifferenz der Zellen können durch Messung einer Basislinie anhand einer Puffermessung (Proben-

und Referenzzelle mit Puffer gefüllt) nachträglich korrigiert werden. Die Temperatur

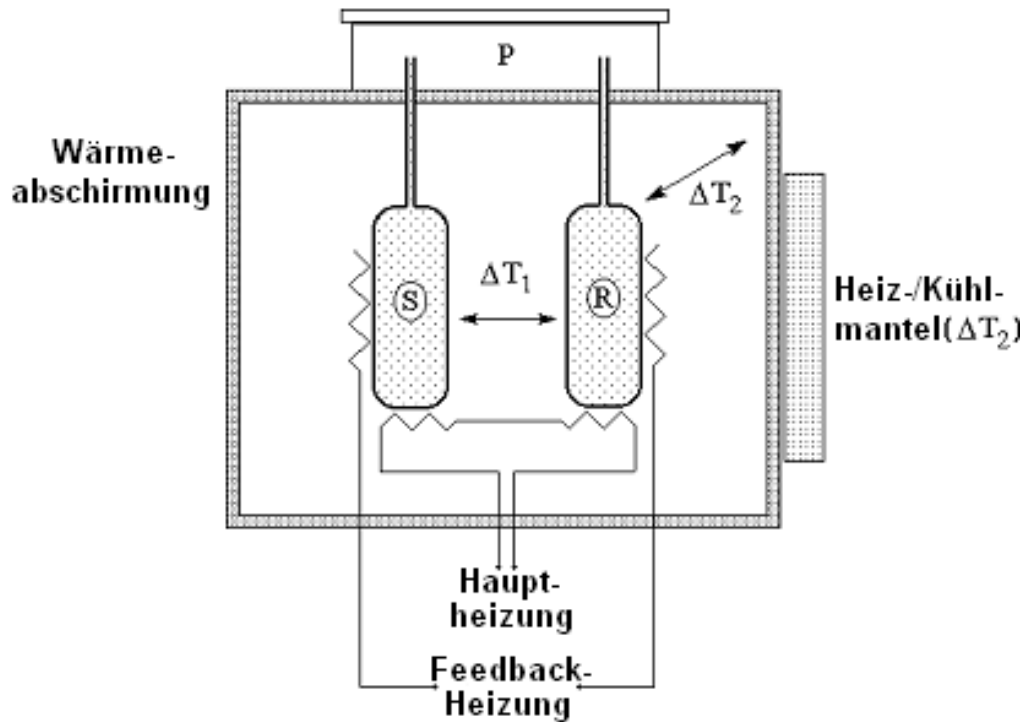


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau einer DSC-Apparatur. S: Probenzelle, R: Referenzzelle, P: Druckverschlusskappe ($\sim 1,8$ bar) zur Unterdrückung der Blasenbildung. Die Temperatur des Heizmantels wird der Temperatur der Zellen (S und R) angepasst (ΔT_2). Die Feedback-Heizung kompensiert jegliche Temperaturdifferenzen (ΔT_1) zwischen beiden Zellen, die bei der Erwärmung durch die Hauptheizung auftreten.

beider Zellen kann durch Wärmezufuhr über die Hauptheizung erhöht werden. Die Temperatur des Systems berechnet sich in Abhängigkeit der eingestellten Heizrate $h = \frac{\Delta T}{\Delta t}$ wie folgt

$$T = T_0 + ht \quad (2.24)$$

mit T_0 : Anfangstemperatur. Die DSC wird verwendet, um sowohl einen weiten Bereich von thermischen Übergängen in biologischen Systemen und Schmelztemperaturen als auch thermodynamische Parameter, welche mit diesen Änderungen korrelieren, zu analysieren. Die Rate der Wärmeabsorption ist proportional zur spezifischen Wärme der Probe, da die spezifische Wärme bei der jeweiligen Temperatur die Menge an thermischer Energie angibt, die benötigt wird, um die Temperatur um einen gewissen Betrag zu ändern. Jeder Übergang, der durch eine Änderung der spezifischen Wärme begleitet wird, erzeugt eine Diskontinuität im Leistungssignal, da

das Gerät die Temperaturdifferenz der Zellen ΔT_1 durch die Rückkopplungsheizung kompensiert. Das Gerät erhöht z.B. die Heizleistung der Probenkammer bei einer endothermen Phasenumwandlung, um die gleiche Temperatur zu erreichen wie die in der Referenzzelle. Die resultierende Differenz in der Heizleistung

$$\Delta P = P_S - P_R \quad (2.25)$$

ist demzufolge proportional zur Differenz der Wärmekapazitäten $\Delta C(T)$

$$\Delta P(T) = h(C_S - C_R) = h\Delta C(T) \quad . \quad (2.26)$$

Das Gerät gibt die Differenz der Wärmekapazitäten als Funktion der Temperatur aus. Aus der Fläche unter dem DSC-Signal lässt sich die Enthalpieänderung ΔH beim Phasenübergang bestimmen

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C(T) dT \quad , \quad (2.27)$$

dabei ist T_1 die Temperatur zu Beginn und T_2 die Temperatur am Ende des Übergangs. Unter der Annahme eines reversiblen Phasenübergangs erster Ordnung ergibt sich aus der Enthalpieänderung ΔH die Entropieänderung ΔS bei der Temperatur T_m der Phasenumwandlung

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad . \quad (2.28)$$

Die Enthalpieänderung für die Hauptumwandlung beträgt für DPPC $36,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die Entropieänderung $115,7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bei einer Temperatur von $41,4 \text{ }^\circ\text{C}$.⁵¹ Die treibende Kraft bei dem Phasenübergang ist offensichtlich die große Entropieänderung, die durch die größere Beweglichkeit der Lipidkohlenwasserstoffketten in der fluiden Phase hervorgerufen wird. Die Phasenumwandlungstemperaturen, Enthalpie- und Entropieänderungen hängen stark von der Kettenlänge ab. Die Auswertung der DSC-Kurven erfolgte mit Hilfe von einer für Origin 7 programmierten Applikation, welche speziell auf die Kalorimetrie abgestimmt ist und von MicroCal bereitgestellt wurde.

2.5 Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC)

Die Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC) ist eine experimentelle Technik, bei der analog zur DSC-Messung die Wärmedifferenz zweier Zellen detektiert wird. In der PPC wird die Wärmedifferenz in Abhängigkeit von kleinen Druckpulsen (5 – 6 bar) bestimmt. Die Änderung in der Wärme resultiert aus der Druck \times Volumen-Arbeit durch die leichte Kompression der Probe. Nach dem zweiten Satz der Thermodynamik ist die Wärmeänderung bei konstanter Temperatur für reversible Prozesse mit der Entropieänderung verbunden

$$dS = \frac{dQ_{\text{rev}}}{T} \quad . \quad (2.29)$$

Die Ableitung der Gleichung 2.29 nach dem Druck p bei konstanter Temperatur T ergibt

$$\left(\frac{\partial Q_{\text{rev}}}{\partial p} \right)_T = T \left(\frac{\partial S}{\partial p} \right)_T \quad . \quad (2.30)$$

Unter Verwendung der Maxwellrelation

$$\left(\frac{\partial S}{\partial p} \right)_T = - \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \quad (2.31)$$

lässt sich die Gleichung 2.30 wie folgt schreiben:

$$\left(\frac{\partial Q_{\text{rev}}}{\partial p} \right)_T = -T \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \quad . \quad (2.32)$$

Der thermische Expansionskoeffizient α ist definiert über

$$\alpha = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \quad . \quad (2.33)$$

Dementsprechend ist es möglich, den thermischen Expansionskoeffizienten α aus der Änderung der Wärmedifferenz ΔQ_{rev} der Zellen als Resultat einer kleinen Druckänderung Δp bei konstanter Temperatur zu messen (Gleichung 2.32 in Gleichung 2.33):

$$\alpha = - \frac{\Delta Q_{\text{rev}}}{TV \Delta p} \quad . \quad (2.34)$$

Die Integration des Expansionskoeffizienten über den Temperaturbereich des Phasenübergangs liefert die relative Volumenänderung $\Delta V/V$

$$\frac{\Delta V}{V} = \int_{T_1}^{T_2} \alpha(T) dT \quad . \quad (2.35)$$

Die Messungen wurden an demselben Instrument wie bei der DSC durchgeführt, erweitert um eine bidirektionale Gas(N_2)-Drucksprunganlage der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA). Die Messwerte wurden bei Drucksprungamplituden von 5 – 6 bar und sonst analog zur DSC-Messung bestimmt. Die Auswertung der Messungen wurde auch hier mit der schon erwähnten Software von MicroCal erzielt.

2.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy, AFM) erlaubt mikroskopische Aufnahmen mit höchsten Auflösungen (\AA) unter physiologischen Bedingungen, sodass einzelne Moleküle oder Atome detektiert werden können. Das Messprinzip eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Die AFM-Sonde

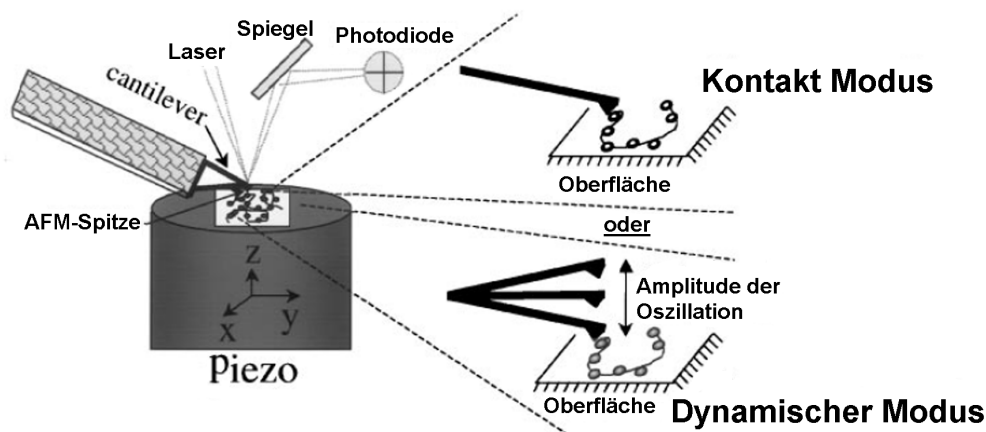


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau und Wirkungsweise eines Rasterkraftmikroskops ⁵²

besteht aus einem Federbalken (Cantilever), an dessen Ende sich eine pyramidenförmige oder konische Sensorspitze befindet, die über die Probe bewegt wird und somit die Probenoberfläche abtastet (Abbildung 2.7). Die Wechselwirkung mit der

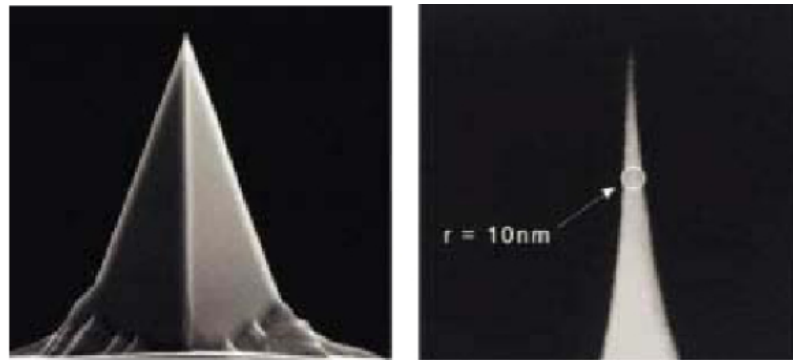


Abbildung 2.7: AFM-Spitze eines Cantilevers aus Silicium bzw. Siliciumnitrid mit einem Effektiv-Radius von 10 nm.⁵³

Probe verursacht eine Verbiegung des Federbalkens, die der auf den Federbalken wirkenden Kraft entspricht und optisch detektiert werden kann (Lichtzeigerprinzip). Bei der Laserstrahlauslenkung wird ein Laserstrahl auf die reflektierende Oberseite des Federbalkens fokussiert und von dort auf einen Photodetektor reflektiert, der die Auslenkung des Federbalkens registriert. Im dynamischen Modus wird der Federbalken durch einen Anregungspiezo in eine harmonische Schwingung versetzt, sodass die Sensorspitze die Oberfläche während der Schwingung nur kurz periodisch berührt, was zu einer Reduzierung der Amplitude führt. Sowohl die Resonanzfrequenz f_0 als auch die Schwingungsamplitude A_0 und -phase α sind experimentell zugänglich und können zur Distanzregelung verwendet werden. Im hier genutzten Semikontakt-Modus (oder auch Tapping Mode) wird die Amplitude als Regelsignal verwendet bzw. konstant gehalten, sodass jede oberflächentopographiebedingte Amplitudenmodifikation mittels eines Regelkreises durch Änderung der vertikalen Position der Probe ausgeglichen wird. Die vertikale Bewegung wird aufgezeichnet und in ein Topographiebild der Oberfläche umgewandelt.⁵⁴ Zwischen Probe und Federbalken wirken in diesem Modus sowohl anziehende als auch abstoßende Wechselwirkungskräfte. Messungen im dynamischen Modus besitzen den Vorteil, dass laterale Kräfte minimiert werden und somit eine Modifikation oder Zerstörung von weichen Proben vermieden wird, sodass auch an biologischen Materialien hohe Auflösungen erreicht werden können.^{55,56}

Die AFM-Messungen wurden an einem MultiMode-Rasterkraftmikroskop der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurden ein NanoScope IIIa Controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) und ein

J-Scanner (Scanbereich x,y $125 \times 125 \mu\text{m}$; Veeco Instruments, Mannheim) verwendet. Die Aufnahme der AFM-Bilder erfolgte im Tapping Modus mit aluminiumbeschichteten Silizium-Cantilevern des Typs NCHR (Nanosensors, NanoAndMore, Wetzlar) unter Verwendung einer Resonanzfrequenz f_0 von 314,8 kHz und einer Schwingungsamplitude A_0 von 164 und 181 mV. Die Federkonstante der Cantilever beträgt ca. 42 N/m. Die AFM-Aufnahmen erfolgten an Luft mit einer Scangeschwindigkeit von 0,2 – 1,0 Hz und die erhaltenen Bilder wurden mit der Software NanoScope Version 5 bearbeitet.

2.7 Röntgenreflektometrie (XRR)

Die Röntgenreflektometrie (XRR = X-Ray Reflectometry) bietet die Möglichkeit, Strukturinformationen von Proben im Bereich von atomaren Abständen zu erhalten. Aus den Reflektionskurven lassen sich die Dicke der Lipidschicht, die Packungsanordnung der Membran, die Elektronendichte und Rauigkeit der Oberfläche und Grenzflächen an Einfach- und Mehrschichten bestimmen. Damit lässt sich eine Vorstellung der molekularen Organisation der beobachteten Lipidphasen in Abhängigkeit von der Temperatur erhalten. Das Auflösungsvermögen ist durch die Wellen-

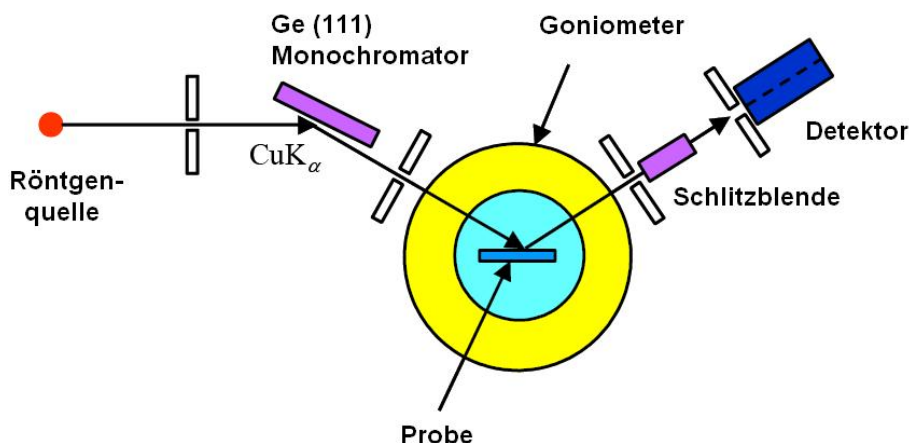


Abbildung 2.8: Modifizierter schematischer Aufbau des Röntgendiffraktometers ⁵⁷

länge der verwendeten Strahlung begrenzt. Daher ist es nicht möglich, sichtbares Licht (untere Grenze $\sim 380 \text{ nm}$) zu verwenden, sondern es muss zu kleineren Wellenlängen (Röntgenstrahlung $> 0,3 \text{ nm}$) übergegangen werden. Die Röntgenstrahlen

werden unter einem kleinem Winkel ($\theta < 2,5^\circ$) auf die Probe eingestrahlt, an der Probe spekulär reflektiert und schließlich am Detektor detektiert (Abbildung 2.8). Die reflektierte Strahlung interferiert in Abhängigkeit von der Struktur der Probe mit sich selbst und erzeugt die charakteristische winkelabhängige Intensitätsverteilung am Detektor. Die Wellenlängenabhängigkeit der Beziehung des einfallenden zum ausfallenden Strahls resultiert aus der Reflexion der Strahlung an benachbarten Gitterebenen und wird durch die Bragg-Gleichung (2.36) beschrieben. Zur Herleitung der Bragg-Gleichung wird ein Kristall betrachtet, dessen Netzebenen einen Abstand d besitzen und auf den zwei Röntgenstrahlen, die sich in Phase befinden, auftreffen und reflektiert werden (Abbildung 2.9). Die Bragg-Gleichung sagt aus,

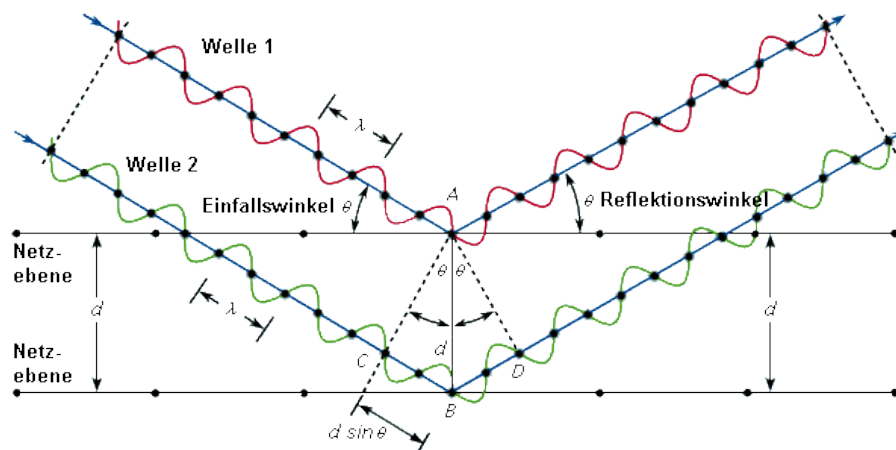


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung zur Herleitung der Bragg-Gleichung (modifiziert nach Encyclopaedia Britannica, 1998)

dass nur dann konstruktive Interferenz entsteht, wenn ein ganzzahliges Vielfaches (n) der Wellenlänge (λ) dem Doppelten des Gangunterschieds ($d \sin(\theta)$) zwischen den reflektierten Wellen entspricht. Mathematisch kann dies durch

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad (2.36)$$

ausgedrückt werden.

Die Reflektionsebenen im reellen Raum lassen sich im reziproken Raum als Streuzentren beschreiben. Damit können Berechnungen der Streuung vereinfacht werden. Ein Punkt \mathbf{G} im reziproken Gitter wird über Basisvektoren \mathbf{b}_i des reziproken Gitters

beschrieben.

$$\mathbf{G} = m_1 \mathbf{b}_1 + m_2 \mathbf{b}_2 + m_3 \mathbf{b}_3 \quad , \quad (2.37)$$

mit m_i ganze Zahlen. Die Basisvektoren des reziproken \mathbf{b}_i bzw. des reellen Raums \mathbf{a}_j lassen sich durch Gleichung 2.38 ineinander überführen

$$\mathbf{b}_i \mathbf{a}_j = 2\pi \delta_{ij} \quad (\delta_{ij} = \text{Kronecker} - \text{Delta}) \quad . \quad (2.38)$$

Im reziproken Raum lässt sich die Bragg-Gleichung dann als Differenz der einfallenden \mathbf{k}_i und gestreuten Wellenvektoren \mathbf{k}_f formulieren (Gleichung 2.39, vgl. Abbildung 2.10)

$$\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_f = |\Delta \mathbf{k}| = \mathbf{q} \quad . \quad (2.39)$$

Hierbei wurde der Streuvektor \mathbf{q} , auch bekannt als Wellenvektorübertrag (*momentum transfer vector*), eingeführt, welcher die Änderung des Wellenvektors bei der Streuung beschreibt. Konstruktive Interferenz tritt nur auf, wenn der Streuvektor auf einen Punkt des reziproken Raumes fällt, wenn also

$$\mathbf{q} = \mathbf{G} \quad (2.40)$$

ist. Anhand der Abbildung 2.10 lässt sich der Streuvektor \mathbf{q} für spekuläre Reflexion geometrisch berechnen. Wird der Wellenvektors \mathbf{k}_f parallel verschoben bis dieser mit dem Ursprung des Wellenvektors \mathbf{k}_i zusammenfällt, so beschreibt das entstandene Dreieck die Beziehung aus Gleichung 2.39. Ganz allgemein ist der Streuvektor vektoriell gegeben als

$$q_x = \frac{2\pi}{\lambda} (\cos(\theta_f) \cos(\alpha) - \cos(\theta_i)) \quad (2.41)$$

$$q_y = \frac{2\pi}{\lambda} (\cos(\theta_f) \sin(\alpha)) \quad (2.42)$$

$$q_z = \frac{2\pi}{\lambda} (\sin(\theta_i) + \sin(\theta_f)) \quad , \quad (2.43)$$

wobei α der Streuwinkel bei Streuung außerhalb der Ebene ist. Damit ist $\alpha = 0$ für Streuung in der Ebene. Der Winkel des einfallenden Strahls ist dabei θ_i und des ausfallenden Strahls θ_f . Da nur der spekuläre Fall betrachtet wird, also $\theta_f = \theta_i = \theta$,

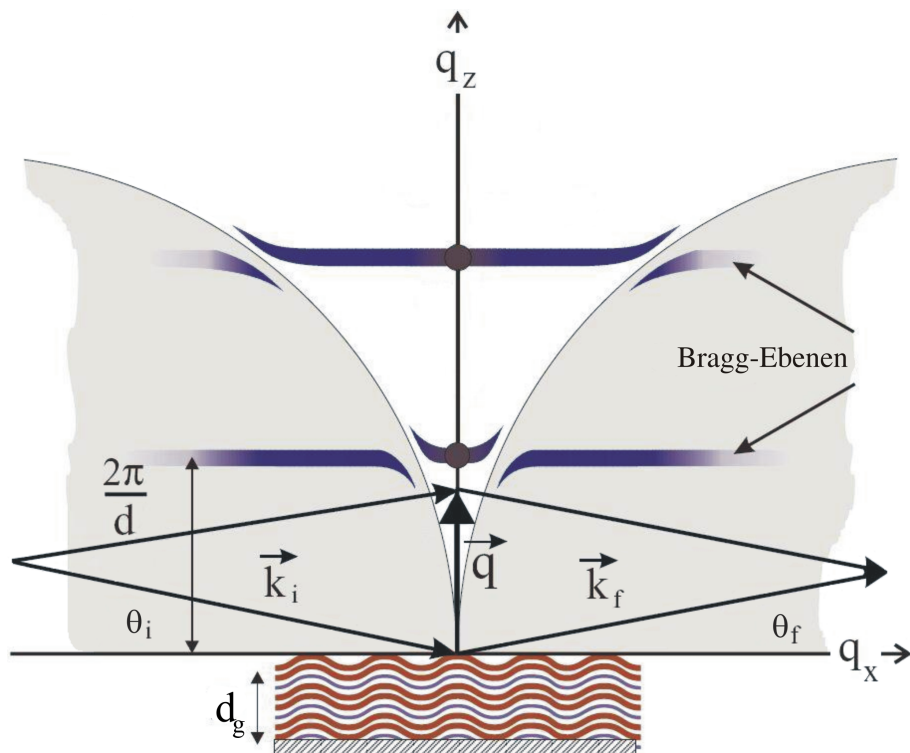


Abbildung 2.10: Modifiziertes Schema des reziproken Raums. Bei spekulärer Reflexion liegt der Streuvektor auf der q_z -Achse und entspricht betraglich dem Abstand der Bragg-Ebenen. Der grau hinterlegte Bereich ist messtechnisch nicht erreichbar, da einfallender oder ausfallender Strahl unterhalb der Proben liegt.⁵⁸

werden die x- und y-Komponenten zu 0 und die z-Komponente zu

$$q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad . \quad (2.44)$$

Dabei gilt für den Betrag des Wellenvektors $|\mathbf{k}| = k$

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.45)$$

mit λ als die Röntgenwellenlänge.

Nach Einführen des Wellenvektors \mathbf{k} , der die Richtung der Welle angibt, kann die Streuung der Röntgenstrahlung durch eine ebene elektromagnetische Welle mit der elektrischen Feldstärke $\mathbf{E}(\mathbf{r})$ am Ort \mathbf{r} und der maximalen Amplitude \mathbf{E}_0 beschrieben werden

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_0 \exp(i(\mathbf{k}_i \mathbf{r} - \omega t)) \quad . \quad (2.46)$$

Dringt die Welle in ein Medium ein, das durch die Brechzahl $n(r)$ charakterisiert ist, so propagiert sie entsprechend der Helmholtzgleichung⁵⁹

$$\Delta \mathbf{E}(\mathbf{r}) + k^2 n^2(\mathbf{r}) \mathbf{E}_r = 0 \quad . \quad (2.47)$$

Die Welle erfährt im Medium sowohl elastische als auch unelastische (Auger-Effekt, Photoeffekt, Compton-Effekt) Streueffekte. Die unelastischen Streueffekte lassen sich durch das Schwächungsgesetz zusammenfassen:

$$I = I_0 \exp(\mu z) \quad . \quad (2.48)$$

Hierbei ist I_0 die einfallende Intensität, μ der Absorptionskoeffizient und z der in dem Medium zurückgelegte Weg.

Bei der elastischen Streuung regt die Röntgenstrahlung harmonische Oszillationen der Atome an, welche die Energie wieder unter einem anderen Winkel verlustfrei abstrahlen.

Für den Fall harter Röntgenstrahlung (Energien im keV-Bereich) ist die Resonanzfrequenz der Atome viel kleiner als die Frequenz der einfallenden elektromagnetischen Welle und die elastischen und unelastischen Effekte können im Brechungsindex vereinigt und folgendermaßen dargestellt werden

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad . \quad (2.49)$$

Dabei ist

$$\delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} r_{\text{el}} \rho_{\text{el}} \quad (2.50)$$

der Dispersionsterm mit dem klassischen Elektronenradius r_{el} und der Elektronendichte ρ_{el} und

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \mu \quad (2.51)$$

der Absorptionsterm. Der Absorptionsterm ist proportional zum Absorptionskoeffizienten μ . Werte für die Dispersion liegen bei Röntgenstrahlung im Bereich von 10^{-5} – 10^{-6} . Damit ist der Realteil des Brechungsindex $(1 - \delta)$ etwas kleiner als eins. Die Dispersion ist im Allgemeinen ein bis zwei Größenordnungen kleiner und kann deswegen vernachlässigt werden.

Die elektromagnetische Welle wird an der Grenzfläche sowohl reflektiert als auch transmittiert. Es können nun mit Hilfe der Fresnelgleichungen die sogenannten Fresnelkoeffizienten in Abhängigkeit von der Polarisation berechnet werden, welche das Verhältnis der Amplituden der einfallenden Welle zu dem der reflektierten r bzw. transmittierten t wiedergeben. Eine ausführliche Herleitung ist in Max Born "Principles of Optics" gegeben.⁶⁰ Für die Polarisation senkrecht (\perp) zur Einfallsebene gilt

$$r_{\perp} = \frac{nk \sin(\theta_i) - n^2 k \sin(\theta_t)}{nk \sin(\theta_i) + n^2 k \sin(\theta_t)} \quad (2.52)$$

$$t_{\perp} = \frac{2nk \sin(\theta_i)}{nk \sin(\theta_i) + n^2 k \sin(\theta_t)} \quad (2.53)$$

Für die Polarisation parallel (\parallel) zur Einfallsebene erhält man:

$$r_{\parallel} = \frac{n^2 k \sin(\theta_i) - nk \sin(\theta_t)}{n^2 k \sin(\theta_i) + nk \sin(\theta_t)} \quad (2.54)$$

$$t_{\parallel} = \frac{2k \sin(\theta_i)}{n^2 k \sin(\theta_i) + nk \sin(\theta_t)} \quad (2.55)$$

Da bei Röntgenstrahlung $n^2 \approx 1$ ist, sind die Anteile bei senkrechter und paralleler Polarisation ungefähr gleich, sodass vereinfacht geschrieben werden kann

$$r = \frac{n^2 k \sin(\theta_i) - nk \sin(\theta_t)}{n^2 k \sin(\theta_i) + nk \sin(\theta_t)} \quad (2.56)$$

$$t = \frac{2nk \sin(\theta_i)}{n^2 k \sin(\theta_i) + nk \sin(\theta_t)} \quad (2.57)$$

In experimentellen Reflektionskurven tritt bei sehr kleinem Winkel Totalreflektion auf, welche sich als Plateau in der Reflektionskurve äussert (Abbildung 2.11). Dies lässt sich mit dem SNELLIUSschen Brechungsgesetz erklären

$$\frac{\cos(\theta_i)}{\cos(\theta_f)} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.58)$$

Hieraus folgt, dass es einen kritischen Winkel θ_c gibt, unterhalb dem Totalreflektion des Röntgenstrahls auftritt. Das heißt, dass der Strahl mit dem Winkel $\theta_i = \theta_c$

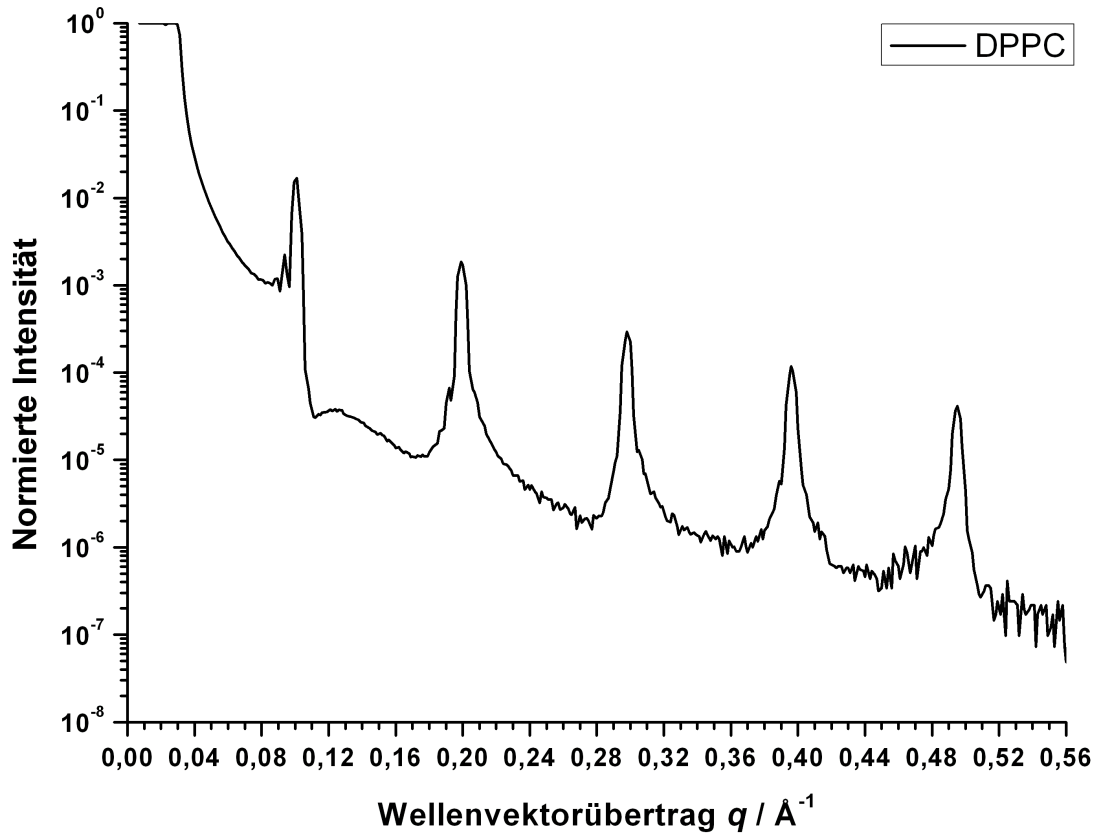


Abbildung 2.11: Normierte Reflektionskurve von DPPC im logarithmischen Maßstab. Deutlich sind sowohl die periodische Struktur durch die äquidistanten Bragg-Peaks zu erkennen als auch die Kiessig-Oszillation am Anfang des ersten Bragg-Peaks und der Bereich der Totalreflektion.

aus dem Medium n_1 nicht mehr in das Medium n_2 eindringt, sondern reflektiert wird. Der kleinste Winkel für den ausfallenden Strahl wäre $\theta_f = 0$, also parallel zur Oberfläche. Mit $n_2 = n < 1$ und $n_1 = 1$ im Vakuum gilt damit für Röntgenstrahlung

$$n = \cos(\theta_c) \quad (2.59)$$

$$= 1 - \delta \quad (2.60)$$

$$\approx 1 - \frac{\theta_c^2}{2} \quad (2.61)$$

Der Kosinus des kritischen Winkels θ_c wurde dabei entwickelt, da δ sehr klein ist. Für den kritischen Winkel ergibt sich schlussendlich

$$\theta_c \approx \sqrt{2\delta} = \lambda \sqrt{\frac{r_{\text{el}}\rho_{\text{el}}}{\pi}} \quad (2.62)$$

Bei größeren Winkeln nimmt die Intensität der reflektierten Strahlung stark ab. Sie wird daher im logarithmischen Maßstab aufgetragen (siehe Abbildung 2.11). Wegen dieses starken Intensitätsabfalls bei größeren Einfallswinkeln wird die Messung mit möglichst hoher Leistung der Röntgenröhre durchgeführt. Dies würde bei niedrigen Winkeln eine Übersättigung des Röntgendetektors bewirken. Aus diesem Grund befindet sich in diesem Messbereich ein abschwächender Absorber im Strahlengang. Bei größeren Winkeln findet zur Erniedrigung des Rauschens rechnergesteuert in mehreren Stufen eine Verlängerung der Integrationszeit für die Messdatenerfassung pro Messposition statt.

Die Interferenz der an der Ober- und Unterseite der Gesamtschicht reflektierten Strahlung erzeugt Intensitätsminima und -maxima, die sogenannten Kiessig-Oszillationen (Abbildung 2.11), die zur Ermittlung der Schichtdicke dienen.⁶¹ Die Periode dieser Oszillationen ist antiproportional zur Dicke der Gesamtschicht d_g

$$d_g = \frac{2\pi}{\Delta q_{z,\text{Kiessig}}} \quad (2.63)$$

$$\approx \frac{\lambda}{2\Delta\theta_{\text{Kiessig}}} \quad (2.64)$$

Aus dem winkelabhängigen Abfall der gesamten Kurve und der Tiefe der auftretenden Minima lässt sich auf die Oberflächenrauigkeit der Schicht und des Substrats schließen. Die Schichtdickenauswertung erfolgt durch Ausmessen der Abstände zwischen den Maxima und Mittelung über alle Bragg-Peaks sowie durch den Vergleich des Messergebnisses mit einer theoretisch berechneten Kurve, die optimal angepasst wird. Hierfür wurden die Programme Origin und Parratt32 benutzt.

Die Intensität der reflektierten Röntgenstrahlung R_f ist durch $R_f = |r|^2$ gegeben. Mit Hilfe von Gleichung 2.58 ($\cos(\theta_i) = n \cos(\theta_f)$) lässt sich Gleichung 2.57 in die Form

$$r = \frac{k \sin(\theta_i) - k \sqrt{n^2 - \cos(\theta_i)}}{k \sin(\theta_i) + k \sqrt{n^2 - \cos(\theta_i)}} \quad (2.65)$$

$$t = \frac{2k \sin(\theta_i)}{k \sin(\theta_i) + k \sqrt{n^2 - \cos(\theta_i)}} \quad (2.66)$$

umschreiben, wobei die trigonometrische Relation $\sin(\theta) = \sqrt{1 - \cos(\theta)}$ benutzt

wurde. Aus Gleichung 2.59 folgt

$$n^2 = 1 - \sin^2(\theta_c) \quad , \quad (2.67)$$

sodass Gleichung 2.66 mit $\sin^2(\theta) = 1 - \cos^2(\theta)$ in

$$r = \frac{2k \sin(\theta_i) - \sqrt{4k^2 \sin^2(\theta_i) - 4k^2 \sin^2(\theta_c)}}{2k \sin(\theta_i) + \sqrt{4k^2 \sin^2(\theta_i) - 4k^2 \sin^2(\theta_c)}} \quad (2.68)$$

$$t = \frac{4k \sin(\theta_i)}{2k \sin(\theta_i) + \sqrt{4k^2 \sin^2(\theta_i) - 4k^2 \sin^2(\theta_c)}} \quad (2.69)$$

umgeschrieben werden kann. Benutzt man weiterhin noch Gleichung 2.44, Gleichung 2.45 und 2.62, dann kann die reflektierte Intensität R_f und die transmittierte Intensität T_f letztendlich in Abhängigkeit des Streuvektors formuliert werden

$$R_f = |r|^2 = \left| \frac{q_z - \sqrt{q_z^2 - \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right)^2 2\delta}}{q_z + \sqrt{q_z^2 - \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right)^2 2\delta}} \right|^2 \quad (2.70)$$

$$T_f = |t|^2 = \left| \frac{2q_z}{q_z + \sqrt{q_z^2 - \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right)^2 2\delta}} \right|^2 . \quad (2.71)$$

Aus der winkelabhängigen Intensität der reflektierten Röntgenstrahlung lässt sich bei bekannter Phasenbeziehung die Elektronendichteverteilung der Probe direkt berechnen. Der Detektor kann aber die Phasenbeziehung der Strahlung nicht mit messen; somit ist die berechnete Elektronendichteverteilung nicht eindeutig. Trotz des Fehlens dieser wichtigen Information ermöglichen es mathematische Modelle unter Zuhilfenahme von Rahmenbedingungen und Vereinfachungen, die Elektronendichte zu rekonstruieren.

Das in dieser Arbeit verwendete Programm Parratt32 Version 1.6.0 (1997-2002 Christian Braun, HMI Berlin) beruht auf dem Modell von Parratt.⁶² Es betrachtet die Probenschicht als Stapel unterschiedlicher Schichtdicken d_j mit dem Brechungsindex n_j . Die Stapel werden beginnend mit der Schicht an der Oberfläche in Richtung des Wafers durchnummeriert $(1, 2, 3, \dots, j, \dots, N, N+1)$. Die letzte Schicht ist der Si-

Wafer, welcher als unendlich dick angenommen wird (d. h. $d_{N+1} = \infty$), sodass keine Reflektion an der Unterseite des Wafers berücksichtigt werden muss (R_{N-1}). Der Ursprung der senkrecht zur Oberfläche verlaufenden z -Achse wird zwischen Probe und dem umgebenden Medium gelegt, sodass die Probenschichten negative z -Werte besitzen (siehe Abbildung 2.12). Das rekursive Verfahren geht von dem Verhältnis

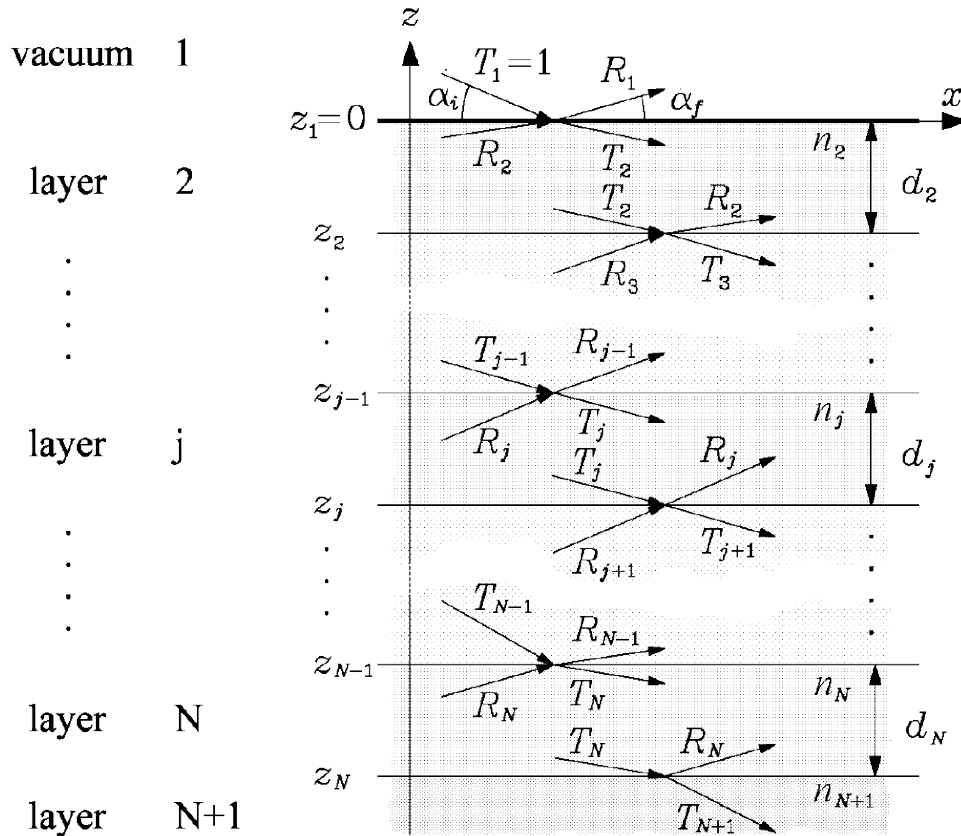


Abbildung 2.12: Stapel von Schichten mit verschiedenen Brechungsindizes und der reflektierten und transmittierten Strahlung an deren Grenzschichten.⁵⁹

der transmittierten und reflektierten Amplitude aus

$$X_j = \frac{R_j}{T_j} \quad . \quad (2.72)$$

Da die letzte ($N + 1$) Schicht, d.h. der Wafer, bekannt ist, wird für das Amplitudenverhältnis folgende Beziehung erhalten

$$X_j = \frac{r_{j,j+1} + X_{j+1} \exp(2ik_{j+1}z_j)}{1 + r_{j,j+1} + X_{j+1} \exp(2ik_{j+1}z_j)} \exp(-2ik_j z_j) \quad , \quad (2.73)$$

wobei $r_{j,j+1}$ der wie folgt definierte Fresnel-Koeffizient ist

$$r_{j,j+1} = \frac{k_j - k_{j+1}}{k_j + k_{j+1}} \quad . \quad (2.74)$$

Mit obigen Annahmen über die letzte Schicht gilt

$$R_{N+1} = X_{N+1} = 0 \quad . \quad (2.75)$$

Wird für die transmittierte Amplitude der ersten Schicht ein Wert von $T_1 = 1$ gewählt, so erhält man

$$R = |X_1|^2 = |R_1|^2 \quad . \quad (2.76)$$

Diese Randbedingungen ermöglichen die Formulierung der rekursiven Formel für die Reflektivität und Transmission ohne Berücksichtigung der Rauigkeit

$$R_{j+1} = \frac{1}{t_{j+1,j}} (T_j r_{j+1,j} \exp(-i(k_{j+1} + k_j) z_j) + R_j \exp(-i(k_{j+1} - k_j) z_j)) \quad (2.77)$$

$$T_{j+1} = \frac{1}{t_{j+1,j}} (R_j r_{j+1,j} \exp(i(k_{j+1} + k_j) z_j) + T_j \exp(i(k_{j+1} - k_j) z_j)) \quad . \quad (2.78)$$

Die Röntgenröhre des Röntgendiffraktometers XRD 3000 TT der Firma Richard Seifert & Co. Ahrensburg wurde mit einer Kupferanode bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Strom von 40 mA betrieben. Gemessen wurde mit der CuK_α -Strahlung ($\lambda = 0,154 \text{ nm}$). Die CuK_β -Strahlung wurde mit einem Nickelfilter unterdrückt (Abbildung 2.13). Die Proben wurden in einer temperierbaren Zelle mit Wasserreservoir über 72 Stunden hydratisiert. Die Zelle besteht aus zwei Aluminiumkammern mit Fenstern aus dünnem Polyethylenterephthalat (PET; „Mylar“-Folien), welche die Röntgenstrahlung fast ungehindert passieren lassen. Die Probe wird in die erste Kammer auf einen Sockel, der mit Wasser umgeben ist, gelegt und mit einem Deckel, der einen wasserbefeuchteten Schwamm über der Probe hält, dicht verschlossen. Der Aufbau der Kammer sorgt für eine 100 %-ige Luftfeuchte und eine gleichmäßige Temperatur.⁶³ Die zweite Kammer umschließt die erste und wird auf $2 - 5^\circ \text{C}$ über der Temperatur der ersten eingeregelt, um einen Wärmeverlust zu

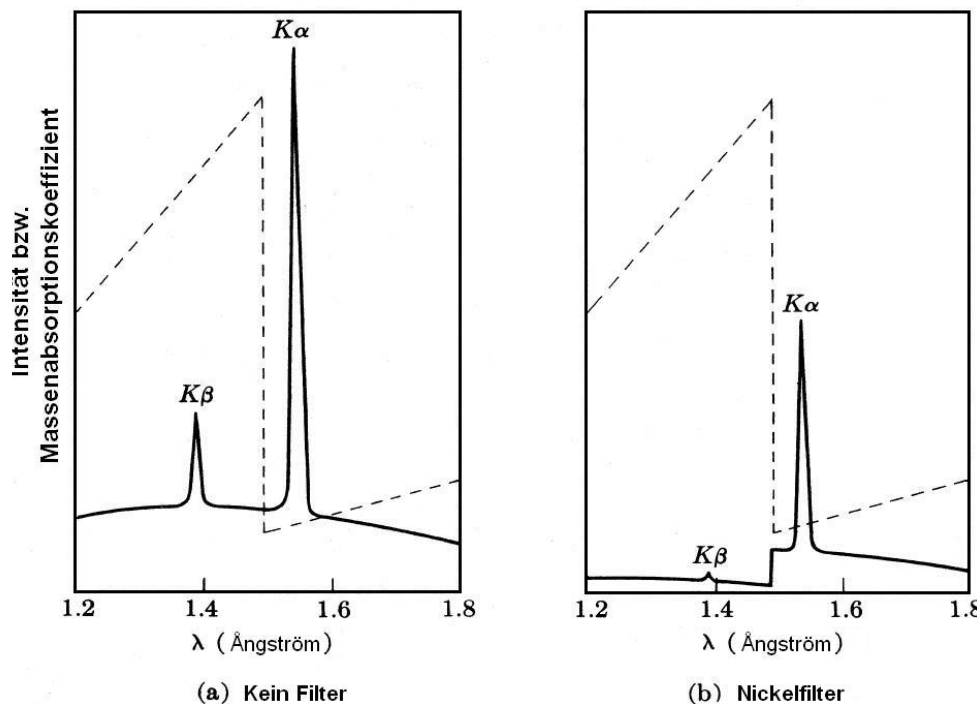


Abbildung 2.13: Prinzip des Nickelfilters zur Abschwächung der $K\beta$ -Strahlung: (a) Röntgenspektrum einer Kupferanode (durchgehende Linie) ohne Filter und (b) mit Nickelfilter. Die gestrichelte Linie ist der Absorptionskoeffizient von Nickel (modifizierte Abbildung aus „Physikalisches Praktikum für Fortgeschrittene“, Technische Universität Darmstadt).

kompensieren.

Die verwendeten Si-Wafer wurden zuvor 30 min bei 90 °C in einer Lösung aus 98 %-iger Schwefelsäure und 30 %-igem Wasserstoffperoxid (70:30, v/v) gereinigt und anschließend mit ausreichend destilliertem Wasser gespült.

Der Spin-Coater besteht aus einer rotierenden Scheibe, welche ein Probenplättchen axial ansaugt und zur Rotation bringt. Ein vorgereinigter Wafer wird auf dem Spin-Coater zentriert und nach Pipettieren von ca. 100 μL Lösungsmittel für ca. 1 min mit 3000 Umdrehungen/min rotiert. Die überschüssige Lösung wird dadurch vom Wafer geschleudert und nimmt mögliche Verunreinigungen mit sich. Die Reinigung der Wafer wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurde der trockene Si-Wafer mit 100 μL der Probenlösung komplett benetzt und für 20 s bei 800 Umdrehungen/min aufgeschleudert. Die noch feuchte Probe wurde zum Entfernen des restlichen Lösungsmittels über Nacht im Lyophilisator gefriergetrocknet. Dieses Verfahren produzierte relativ glatte Oberflächen mit 19 bis 26 Schichten.⁶⁴

2.8 Steady-state Fluoreszenzanisotropie

Die Fluoreszenzspektroskopie macht sich die Eigenschaft zunutze, dass viele Moleküle bei Lichtbestrahlung eine ganz spezifische frequenzabhängige Lichtemission zeigen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Fluoreszenz (F) und Phosphoreszenz (P). Dies wird allgemein als Photolumineszenz bezeichnet. Die Moleküle besitzen diskrete Energieniveaus, deren Besetzung durch die Boltzmannverteilung gegeben ist. Die Energieniveaus lassen sich weiter in Schwingungs- und Rotationsniveaus unterteilen.

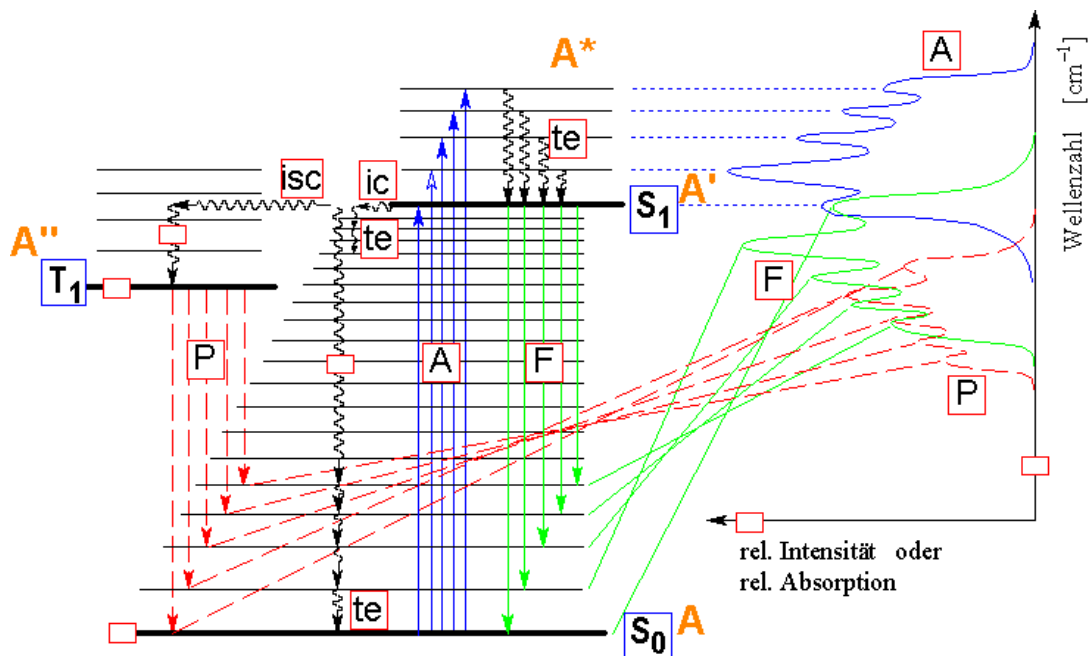


Abbildung 2.14: Jablonski-Termschema: [A] Energieabsorption, [F] Fluoreszenz, [P] Phosphoreszenz, [S_0] Grundzustand, [S_1] erster angeregter Zustand, [T_1] Triplett-Zustand, [te] thermische Equilibrierung, [ic] innere Umwandlung, [isc] Interkombination, [blaue Kurve] Absorptionsspektrum, [grüne Kurve] Fluoreszenzspektrum

Bei Raumtemperatur befinden sich die Moleküle hauptsächlich im Grundzustand S_0 . Wird Licht entsprechend der Wellenlänge eingestrahlt, die vom Molekül absorbiert werden kann, so vermag es innerhalb von weniger als 10^{-15} s in einen angeregten Zustand überzugehen. Nach dem Franck-Condon-Prinzip verläuft der intensivste Übergang nach der Anregung durch Lichtabsorption zwischen zwei elektronischen Zuständen vom Schwingungszustand ($v = 0$) des Grundniveaus (Singulettzustand,

S_0) zum Schwingungszustand ($v = n$) des angeregten Niveaus (S_n), bei dem der Bindungsabstand des Grundniveaus unverändert bleibt. Einen Teil seiner aufgenommenen Energie kann das Molekül durch Schwingungsrelaxation (te) abgeben bis es auf das niedrigste Schwingungsniveau des angeregten Singulettzustands gelangt. Bei einer genügend starken Überlappung zweier elektronischer Zustände kann eine interne Umwandlung aus einem angeregten Zustand in einen angeregten Zustand des darunter liegenden elektronischen Niveaus stattfinden (z.B. von S_2 zu S_1). Anschliessend relaxiert es wiederum in das niedrigste Schwingungsniveau des angeregten Singulettzustands. Der Prozess der inneren Umwandlung (internal conversion, ic) vollzieht sich in ca. 10^{-12} s. Eine weitere Energieabgabe kann nun über die Emission eines Photons (Fluoreszenz, F), Interkombinationsübergänge (intersystem crossing, isc)⁶⁵ oder strahlungslose Zerfälle wie z. B. Energietransfer auf andere Moleküle (Fluoreszenzquenching),⁴⁶ weitere innere Umwandlung (ic)⁶⁵ oder chemische Reaktionen,⁴⁶ stattfinden. Diese Prozesse konkurrieren mit der Fluoreszenz und schwächen diese ab. Zum sogenannten Interkombinationsübergang kann es kommen, wenn das angeregte Singulettniveau S_1 (antiparallele Spins) mit dem angeregten Triplettniveau T_1 (parallele Spins) überlappt, wobei unter Spinumkehr ein Übergang von S_1 nach T_1 stattfindet. Nach Schwingungsrelaxationen zum niedrigsten Schwingungsniveau kann das Elektron dann unter Phosphoreszenz (P) in den Grundzustand zurückkehren. Die Phosphoreszenz beansprucht wegen der S_1 - T_1 -Übergänge mehr Zeit und ist im Gegensatz zur Fluoreszenz noch nach Abschalten der Anregung messbar. Fluoreszenz wird in 10^{-10} – 10^{-6} s ab der Anregung des Elektrons beobachtet, sodass interne Umwandlungen abgeschlossen sind und damit Übergänge meist vom ersten angeregten Zustand S_1 zum Grundzustand S_0 vorliegen. Da die Lebensdauer der Fluoreszenz mit ca. 10^{-8} s relativ lang gegenüber molekularen Bewegungen ist, können aus der Messung der Fluoreszenz sowohl Informationen über strukturelle und dynamische Eigenschaften der angeregten Moleküle erhalten werden als auch über deren Umgebung.

Messungen der Fluoreszenz liefern Informationen über die relative Winkeländerung des Fluorophors zwischen der Zeit der Absorption und der Emission. In Flüssigkeiten rotieren Fluorophore in $5 \cdot 10^{-11}$ – 10^{-10} s, somit kann das Molekül viele Male während der Lebensdauer des angeregten Zustands rotieren und damit wird die Orientierung der polarisierten Emission willkürlich. Fluorophore in nicht viskosen Flüssigkeiten zeigen damit eine Anisotropie nahe Null. Die Bewegung der Fluoro-

phore kann durch umliegende Moleküle verringert werden, sodass die zu messende Anisotropie auch Informationen über die Beweglichkeit der umgebenen Moleküle enthält.

Um die Anisotropie messen zu können, ist es notwendig, die Probe mit linear polarisiertem Licht anzuregen. Dazu wird ein Polarisator in den Anregungsstrahl positioniert, der um 90° gekippt werden kann. Ein weiterer Polarisator - der Analysator - zwischen Probe und Detektor analysiert die Fluoreszenzpolarisation, indem die Intensität gemessen wird, die der Analysator bei paralleler (I_{\parallel}) und senkrechter (I_{\perp}) Stellung zum ersten Polarisator durchlässt. Diese Intensitäten werden benutzt, um die Anisotropie r , die das Ausmaß der Polarisation beschreibt,

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.79)$$

zu berechnen. Die Anisotropie ist unabhängig von der eingestrahnten Intensität, da die Differenz der polarisierten Intensitäten ($D_P = I_{\parallel} - I_{\perp}$) auf die Gesamtintensität ($I_{\parallel} + 2I_{\perp}$) normiert wird. D_P wird als Maß für den Grad der Polarisierung des Emissionslichts verwendet. Werden die Fluorophore während der Zeit zwischen Absorption und Emission nicht in ihrer Rotation behindert, so ist $D_P = 0$. Das andere Extrem $D_P = 1$ bedeutet, dass der Fluorophor in der gleichen Ausrichtung wie zum Zeitpunkt der Absorption emittiert. Da die Empfindlichkeit reeller Detektoren von der Orientierung des polarisierten Lichts abhängt, kann Gleichung 2.79 nicht unmodifiziert benutzt werden. Um dies zu berücksichtigen, werden die Variablen S_V bzw. S_H für die vertikale bzw. horizontale Empfindlichkeit des Detektors eingeführt. Die eigentlich detektierte Intensität I_{VV} bzw. I_{HV} ist dann

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \quad \text{bzw.} \quad (2.80)$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp} \quad , \quad (2.81)$$

wobei k für die polarisationsunabhängige Abschwächung der Emission und I_{\parallel} bzw. I_{\perp} für die einfallende Intensität stehen. Die Indizes V für Vertikal und H für Horizontal repräsentieren dabei die Stellung des ersten und zweiten Polarisators zur Ebene, welche durch die Quelle, die Probe und den Detektor aufgespannt wird. Werden die so erhaltenen Gleichungen 2.80 und 2.81 in Gleichung 2.79 eingesetzt, so wird nach einfacher Umformung und Definition eines Faktors $G = S_V/S_H$ die gängige

Gleichung der Anisotropie erhalten

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2.82)$$

Der Faktor G wird einfach bestimmt, indem horizontal polarisiertes Licht einstrahlt und sowohl die horizontale als auch die vertikale Intensität bestimmt wird. Die beiden Intensitäten I_{HH} und I_{HV} unterscheiden sich dabei nur durch den G -Faktor, da das elektrische Feld gleichmäßig verteilt ist (Abbildung 2.15):

$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} \quad (2.83)$$

Häufig wird in der Literatur neben der Anisotropie auch die Polarisation P

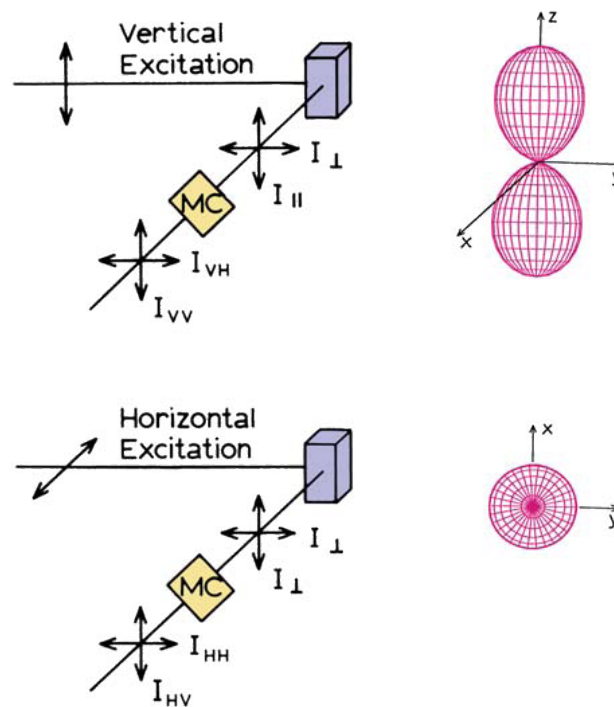


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der Polarisationsrichtungen ⁴⁶

verwendet:

$$P = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + GI_{\perp}} \quad (2.84)$$

Beide Größen enthalten die gleiche Information und können einfach ineinander über-

führt werden:

$$P = \frac{3r}{2+r} \quad (2.85)$$

$$r = \frac{2P}{3-P} \quad (2.86)$$

Die Messergebnisse spiegeln lediglich die Veränderungen in den Bereichen der Membran wider, in denen das Fluorophor vorliegt. Als Fluorophor wurde TMA-DPH verwendet, das in geringer Konzentration in der Membran zu keiner Veränderung der Membranstruktur führt (Strukturformel siehe Abbildung 2.16).⁴⁵ TMA-DPH lagert sich bei Hinzugabe einer Vesikellösung sofort in die äußere Lipidschicht ein.⁶⁶ Die Probe wurde kurz vor der Messung mit TMA-DPH versetzt, da TMA-DPH über längere Zeit in wässriger Lösung instabil ist.⁶⁷ Aufgrund der positiven Ladung liegt TMA-DPH in der Membran überwiegend in der Nähe der Phospholipidkopfgruppe im inneren lipophilen Bereich der Fettsäureketten vor und ist mit den hydrophilen Kopfgruppen verankert.⁴⁴ Somit ist der polare Teil von TMA-DPH an der Grenzflächenregion der Membran verankert und der Übergangsdipol daher nahezu parallel zu den Ketten der Lipide ausgerichtet.⁶⁶ Die Anregungs- und Emissionswellenlänge wurde zu 362 nm bzw. 432 nm bestimmt. Die optische Dichte der Probe bei der Anregungswellenlänge war vernachlässigbar. Die steady-state Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spektrometer des Typs K2 von der Firma ISS (ISS Inc., Champaign, Urbana, IL) durchgeführt.

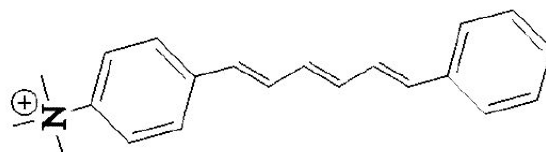


Abbildung 2.16: Strukturformel von TMA-DPH

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Thermodynamische Analyse des thermotropen Phasenverhaltens von PLFE im Vergleich zu DPPC

3.1.1 Berechnung der adiabatischen Kompressibilität aus der Ultraschall- und Dichtemessung

Die strukturellen Änderungen der Phasenumwandlungen führen zu Veränderungen in den thermodynamischen Parametern, die die Lipide beschreiben. Da die Ultraschallmessung die direkte Bestimmung der temperaturabhängigen adiabatischen Kompressibilität ermöglicht, kann die temperaturabhängige Phasenumwandlung von Lipiden über eine Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit nachgewiesen werden. Die Ultraschallgeschwindigkeit u wird durch die Generierung von stehenden Wellen bei einer Resonanzfrequenz f_n in einem Resonator mit der Resonatorlänge D und einer festgelegten Ordnungsnummer n detektiert. Daher folgt aus Gleichung 2.13 und 2.14

$$u = \frac{2Df_n}{n} \quad . \quad (3.1)$$

Weiterhin wird die Geschwindigkeitszahl $[u]$ nach Messen der Ultraschallgeschwindigkeit der Probenlösung u und des Lösungsmittels u_0 bestimmt und dann in Ab-

hängigkeit von der Temperatur aufgetragen (Abbildung 3.1)

$$[u] = \frac{u - u_0}{u_0 c_M} \quad . \quad (3.2)$$

Bei c_M handelt es sich hierbei um die Massenkonzentration. Es ist meist sinnvoller, die Geschwindigkeitszahl $[u]$ zu betrachten als den Absolutwert der Geschwindigkeit u , da $[u]$ eine relative Änderung pro Maßeinheit der Konzentration ist. Die Ultraschallmessungen an DPPC-Dispersion (Abbildung 3.1) zeigen eine leichte Geschwindigkeitsabnahme bis ca. 33 °C, die mit der Phasenumwandlung aus der $L_{\beta'}$ -Phase in die $P_{\beta'}$ -Phase übereinstimmt. Die rigide Membran wird durch die Neigung der Lipide und dem größeren Anteil an *gauche*-Isomeren weicher, sodass sie flexibler wird und die Schallwellen nicht mehr so leicht weitergeben, womit die Schallgeschwindigkeit absinkt.⁶⁸ Weiterhin kann eine sehr deutliche Abnahme der Ultraschallgeschwindigkeit bei ca. 40,5 °C beobachtet werden, die der Phasenumwandlung aus der $P_{\beta'}$ -Phase in die L_{α} -Phase entspricht. Die Lipide in der fluiden Phase sind weniger stark miteinander gekoppelt, besitzen eine höhere Beweglichkeit und die Ketten besitzen eine große Zahl an *gauche*-Isomeren, sodass die Lipide noch flexibler gegenüber Druckänderungen sind, wodurch die Schallgeschwindigkeit weiter absinkt.⁶⁸

Im Gegensatz zum DPPC ändert sich die Schallgeschwindigkeit des PLFEs nur geringfügig mit der Temperatur. Trotzdem ist eine Änderung der Schallgeschwindigkeit bei ~ 43 °C zu erkennen, die wahrscheinlich einem Phasenübergang entspricht (Abbildung 3.2). Obwohl der Phasenübergang im Vergleich zu DPPC nur sehr schwach ausgeprägt ist, lässt sich eine ähnlicher Trend beobachten, d. h. die Umwandlung von einer rigiden Phase in eine fluidere Phase mit zunehmender Temperatur (Abbildung 3.1). Mit Hilfe der Dichtemessung konnte für die PLFE-Probe kein Phasenübergang nachgewiesen werden, da die Änderung der Dichte für die Sensitivität des Densitometers zu gering war (Abbildung 3.3) bzw. die Dichteänderung bei der Phasenumwandlung extrem klein ist ($\Delta\rho < 10^{-3}$ g/cm⁻³). Der Vergleich mit DPPC zeigt jedoch, dass sich die Hauptumwandlung anhand der Dichteänderung eindeutig nachweisen lässt. In Abbildung 3.3 ist für DPPC deutlich die Umwandlung von der $P_{\beta'}$ -Phase in die L_{α} -Phase bei ~ 41 °C zu erkennen. Wie zu erwarten ist bei beiden Proben ein Absinken der Dichte mit der Temperatur zu erkennen. Die Lipide bewe-

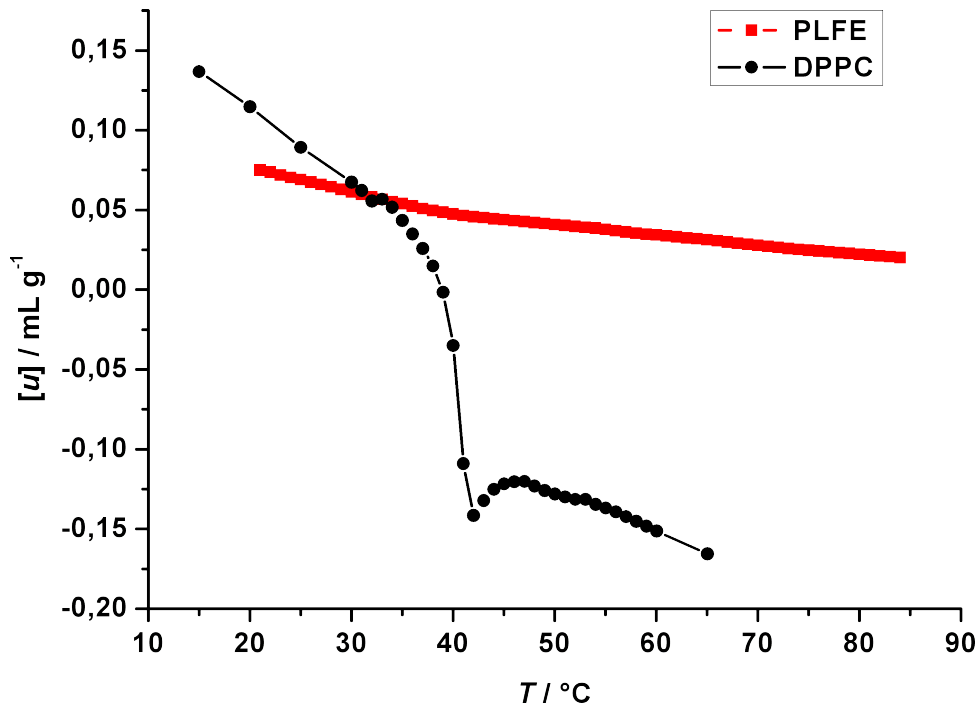


Abbildung 3.1: Beispielhafte Messung der Ultraschallgeschwindigkeitszahl in Abhängigkeit von der Temperatur an DPPC und PLFE

gen sich stärker und nehmen mehr Raum in Anspruch, was zu einer Reduzierung der Dichte führt.

Die Dichtemessungen der Probenlösung ρ und des Lösungsmittels ρ_0 (hier immer Wasser) ermöglichen die Berechnung des partiellen spezifischen Volumens der Lipide nach Gleichung 2.12 unter der Voraussetzung, dass die Lipide stark verdünnt sind

$$\nu^0 = \left(\frac{\partial \nu}{\partial n} \right) \cong \frac{1}{\rho_0} - \frac{\rho - \rho_0}{\rho_0 c_M} \quad (3.3)$$

Hierbei wurde durch die Molmasse des Lipids geteilt, was dazu führt, dass die Stoffmengenkonzentration c (mol/L) zur Massenkonzentration c_M (g/L) wird. DPPC zeigte sowohl bei der Dichtemessung (Abbildung 3.3) als auch beim partiellen spezifischen Volumen eine sprunghafte Änderung bei 41 °C, welche auf die Konformationsänderungen der Acylketten des Lipids zurückzuführen ist (Abbildung 3.4). PLFE wies dagegen keine signifikante Änderung auf, weder in der Dichte noch im partiellen spezifischen Volumen. Letzteres gibt an, welches Volumen jedem Molekül zur Verfügung steht. Durch die steigende Temperatur und Konformationsänderungen

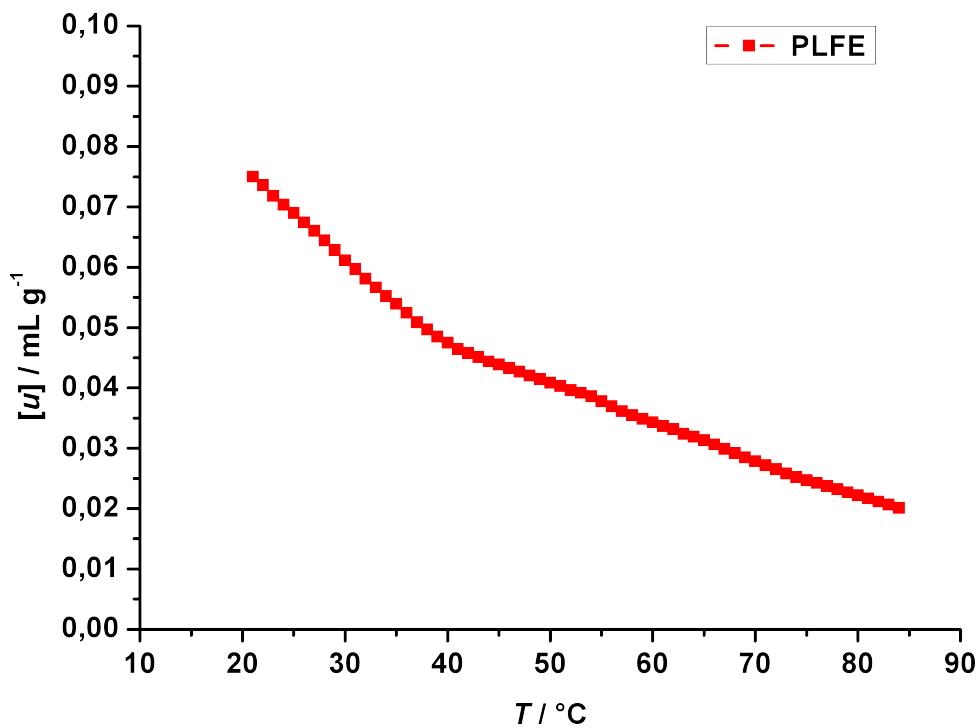


Abbildung 3.2: Beispiel einer Ultraschallmessung von PLFE mit Änderung der Steigung am Phasenübergang bei $\sim 43\text{ }^{\circ}\text{C}$

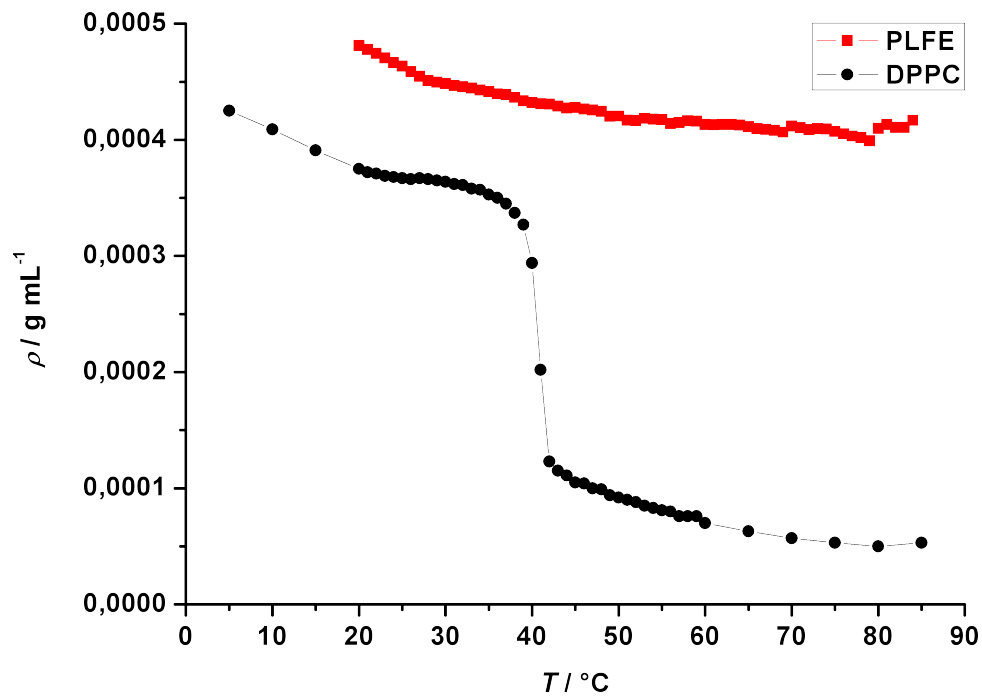


Abbildung 3.3: Temperaturabhängigkeit der Dichte ρ von DPPC und PLFE

(Zunahme an *gauche*-Isomeren und Kinken) nehmen die Lipide immer mehr Raum ein; folglich nimmt das partielle Volumen zu und die Dichte mit der Temperatur ab. Die Lage des Phasenübergangs aus der Dichtemessung stimmt mit dem aus der Ultraschallmessung gut überein. Da für die meisten Substanzen der Beitrag der Kompressibilität zur Geschwindigkeitszahl $[u]$ mehr als zweimal größer ist als der der Dichte, kann bei PLFE der Phasenübergang in der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitszahl beobachtet werden.⁴⁹

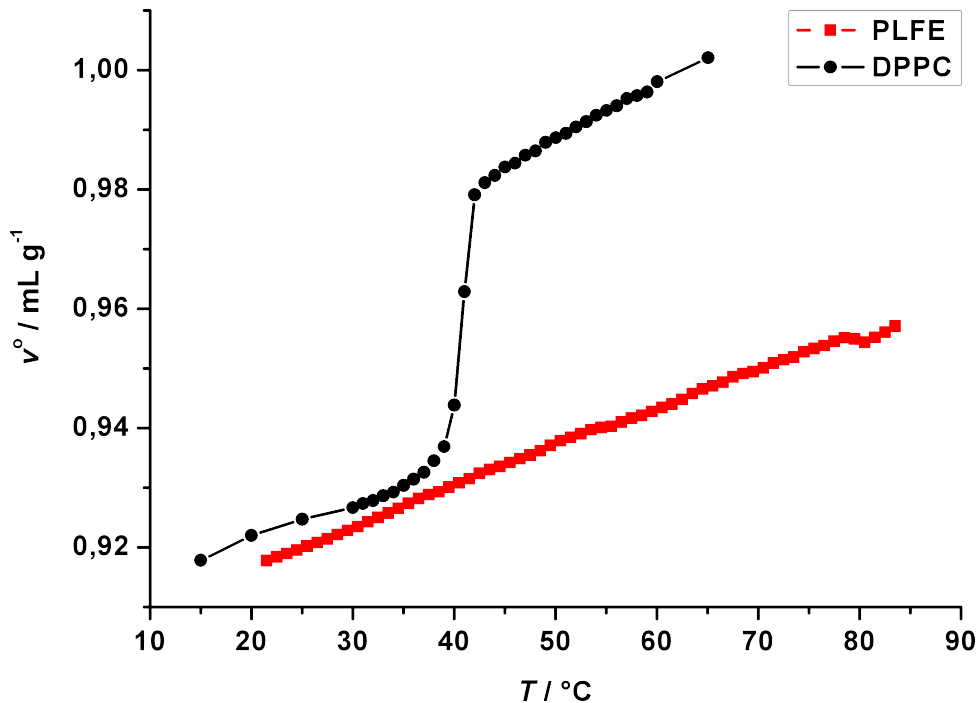


Abbildung 3.4: Partielles spezifisches Volumen von DPPC und PLFE

Die propagierende Ultraschallwelle hängt nach Gleichung 2.23 von der Dichte ρ und dem adiabatischen Kompressibilitätskoeffizienten β_S des Mediums ab. In Kombination mit der Dichtemessung kann der Kompressibilitätskoeffizient für Wasser ermittelt werden.

$$\beta_{S,0} = \frac{1}{u_0^2 \rho_0} \quad . \quad (3.4)$$

Unter Annahme der Additivität aller Komponenten des Systems lässt sich die partielle spezifische adiabatische Kompressibilität κ_S^0 des Lipids berechnen. Sie ist ge-

geben durch

$$\kappa_S^0 = \left(\frac{\partial \kappa_S}{\partial n} \right) = \left(\frac{\partial \nu^0}{\partial p} \right)_S \cong \beta_{S,0} \left(2(\nu^0 - [u]) - \frac{1}{\rho_0} \right) . \quad (3.5)$$

Die partielle spezifische adiabatische Kompressibilität κ_S^0 ist direkt mit dem partiellen spezifischen adiabatischen Kompressibilitätskoeffizienten β_S^{lipid} des Lipids durch das partielle spezifische Volumen ν^0 des Lipids verknüpft:

$$\kappa_S^0 = \nu^0 \beta_S^{\text{lipid}} . \quad (3.6)$$

DPPC zeigt im Verlauf der adiabatischen Kompressibilität einen Phasenübergang bei etwa $40,5^\circ\text{C}$ (Abbildung 3.5), der mit den zuvor ermittelten Hauptphasenübergangstemperaturen gut übereinstimmt. Die adiabatische Kompressibilität bei PLFE besitzt eine Änderung in der Steigung bei $\sim 39,5^\circ\text{C}$, was auf einen Phasenübergang bei dieser Temperatur hindeutet (Abbildung 3.6). Die Übergangstemperatur der adiabatischen Kompressibilität stimmt in etwa ($\Delta T = 3,5^\circ\text{C}$) mit der Phasenübergangstemperatur, die durch die Ultraschallmessung bestimmt wurde, überein. Im Vergleich zu PLFE liegt die Kompressibilität von DPPC nach dem Hauptübergang um das 1,5-fache über der Kompressibilität von PLFE. PLFE ist also bei höheren Temperaturen viel steifer.

3.1.2 Bestimmung der isothermen Kompressibilität mittels Ultraschallmessung, DSC und PPC

Die DSC-Messung ist in der Lage, die Rate der Energieabsorption durch die Probe, die proportional zur spezifischen Wärme der Probe verläuft, zu messen, da die spezifische Wärme bei jeder Temperatur die Menge der thermischen Energie ist, die benötigt wird, um die Temperatur der Probe um ein gewisses Maß zu ändern. Jeder Übergang, der mit einer Änderung der spezifischen Wärme einhergeht, produziert eine Diskontinuität im Leistungssignal, d. h. er ist mit einer endothermen oder exothermen Enthalpieänderung verbunden.⁶⁹ Aus der DSC-Messung resultiert die Wärmekapazität bei konstantem Druck, aus der die partielle spezifische Wärmekapazität

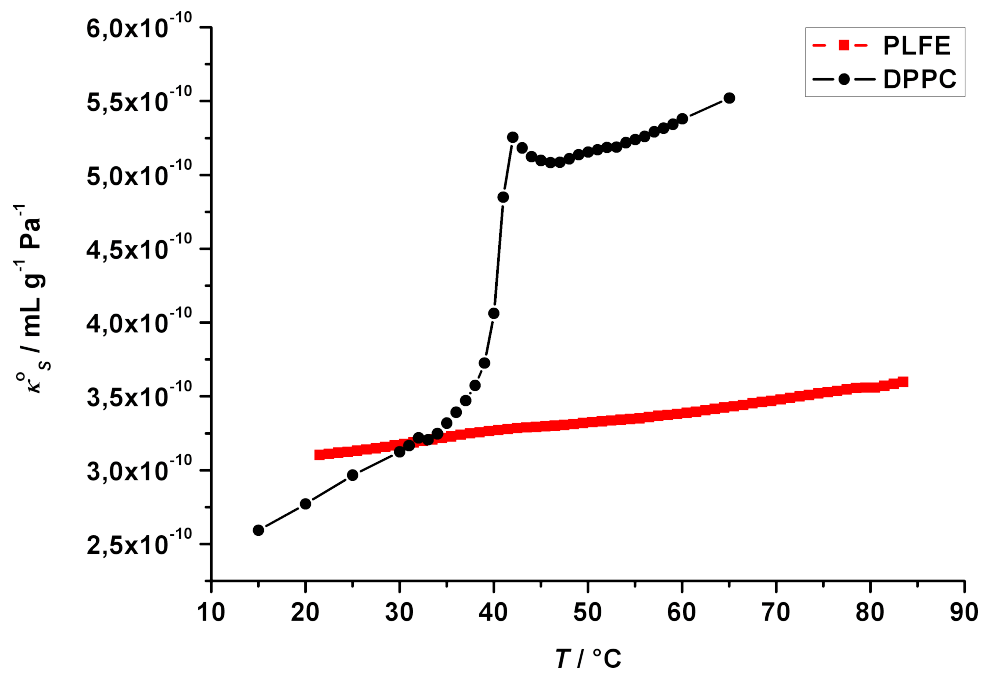


Abbildung 3.5: Spezifische adiabatische Kompressibilität von PLFE und DPPC in Abhängigkeit von der Temperatur

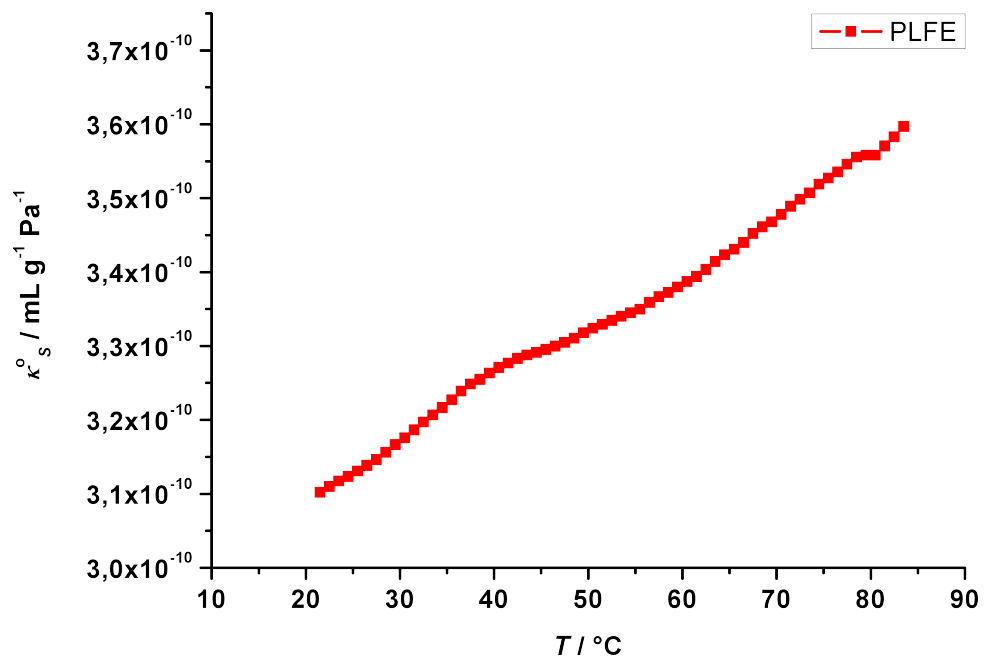


Abbildung 3.6: Spezifische adiabatische Kompressibilität von PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur

berechnet werden kann

$$c_p^0 = \frac{\Delta C_p}{m} + \frac{\nu^0}{\nu_0^0} c_{p,0} \quad , \quad (3.7)$$

wobei m der Masse des Lipids entspricht. Sowohl bei DPPC als auch bei PLFE kann ein endothermer Übergang beobachtet werden (Abbildung 3.7 und 3.8). Dies liegt darin begründet, dass die Lipide unter Aufnahme von Wärme in eine für die jeweilige Temperatur günstigere Konformation übergehen. Beim Übergang muss nicht zwangsläufig Wärme aufgenommen werden; so wurde bei PLFE beim ersten DSC-Scan ein exothermer Übergang bei $78,5^\circ\text{C}$ beobachtet, der mit einem Übergang in eine kubische Phase in Verbindung gebracht wurde.^{41,57} Dieses Verhalten konnte mit der vorliegenden PLFE-Probe nicht beobachtet werden. Nach Nagel existiert

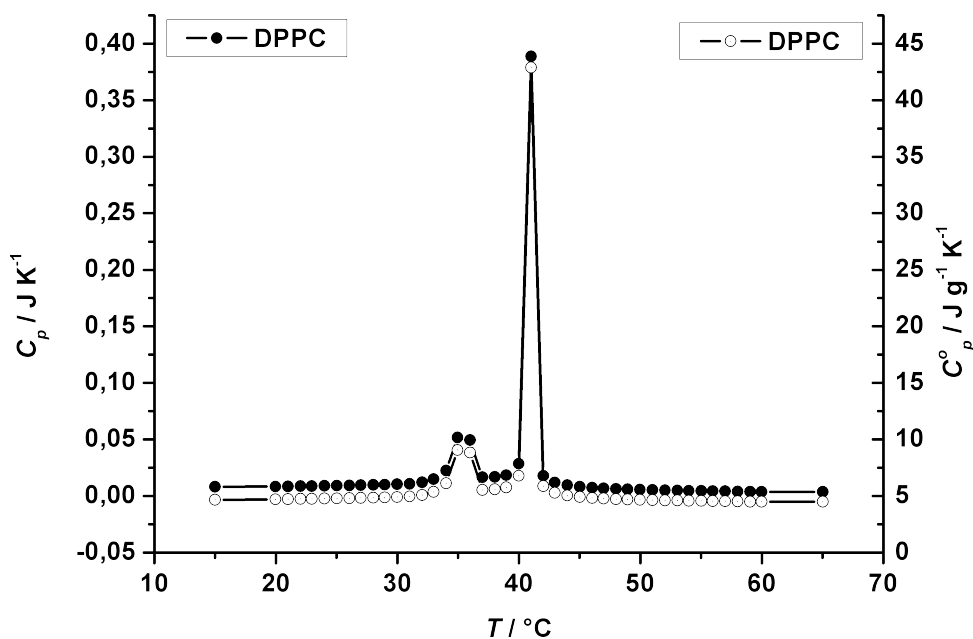


Abbildung 3.7: Wärmekapazität direkt aus der DSC-Messung (ΔC_p) sowie die berechnete partielle spezifische Wärmekapazität (c_p^0) von DPPC in Abhängigkeit von der Temperatur (berechnet nach Gleichung 3.7)

nur dann eine deutliche Anomalie der thermodynamischen Funktionen, wenn die intermolekularen Interaktionen die Lipide zu einem kooperativen Verhalten zwingen.⁷⁰ Lipide, die eine *gauche*-Konformation annehmen, benötigen den entsprechenden Raum, der bei starken intermolekularen Interaktionen nur bereitgestellt werden kann, wenn die Nachbarlipide ebenfalls ihre Konformation ändern. Sind die inter-

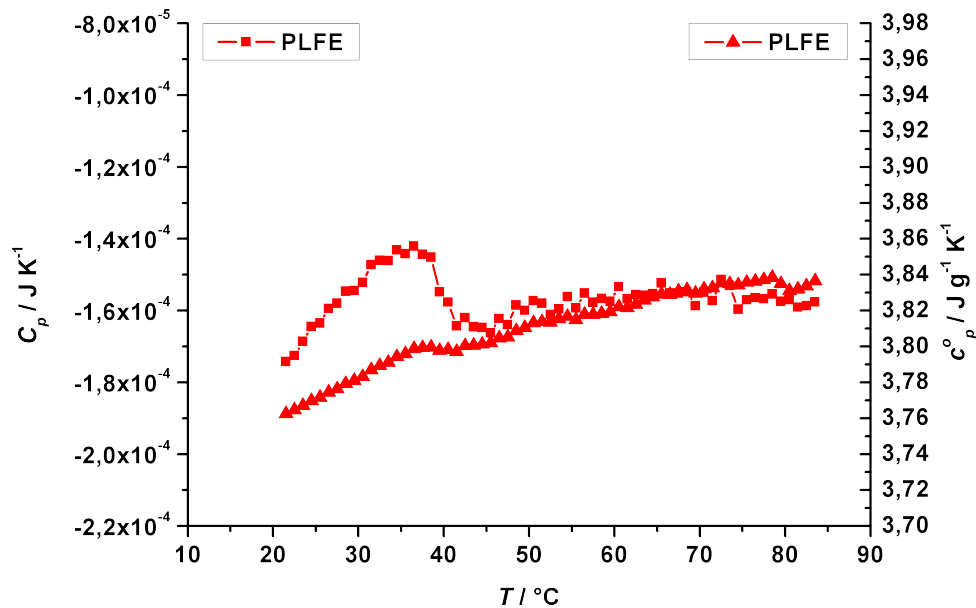


Abbildung 3.8: Wärmekapazität direkt aus der DSC-Messung (ΔC_p) sowie die berechnete partielle spezifische Wärmekapazität (c_p^0) von PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur

molekularen Interaktionen abgeschwächt, so wird auch das kooperative Verhalten schwächer, was zu mehr graduellen Änderungen der thermodynamischen Funktionen führt.

Die Wärmekapazität von DPPC zeigt in Abhängigkeit von der Temperatur ein kleines Maximum (Vorübergang) bei $35,2^\circ\text{C}$ und ein deutliches Maximum (Hauptübergang) bei 41°C (Abbildung 3.7). Der DSC-Peak ist im Vergleich zu der PLFE-Messung sehr schmal und weist damit auf ein starkes kooperatives Verhalten der Lipide beim Phasenübergang hin. Demgegenüber liegt das Maximum der DSC-Kurve für PLFE bei $\sim 35,5^\circ\text{C}$ und ist stark verbreitert. Das kooperative Verhalten ist schwach ausgeprägt. Die starke Verbreiterung deutet auf einen Phasenkoexistenzbereich hin, in dem der Übergang von lamellar nach lamellar mehr oder weniger stetig verläuft (Abbildung 3.8).⁴¹

Die nach Gleichung 2.27 berechnete Enthalpieänderung ΔH von PLFE von $\sim 6,2\text{ kJ/mol}$ liegt im gleichen Bereich ($\sim 3,8\text{ kJ/mol}$ bei $T = 44^\circ\text{C}$) wie bei den Archaeen, die bei einer Temperatur von 78°C gewachsen sind.⁴¹ Die Enthalpieänderung ΔH für den Hauptübergang von DPPC von $\sim 33,6\text{ kJ/mol}$ weicht nur gering von Werten aus anderen Publikationen (35 kJ/mol) ab und ist damit fünf mal größer als bei PLFE.⁴⁰ Zur Berechnung der Enthalpieänderung wurde ein

von MicroCal bereit gestelltes Script für Origin 7 benutzt und dabei eine kubische Funktion als Basislinie durch die Messung gelegt. Ein guter Fit der Kurve konnte mit einer Zweizustandsfunktion (MN-2State-Function) erhalten werden, die die Annahme eines Phasenkoexistenzbereichs unterstützt. Dieses Verhalten könnte aus der Beschaffenheit des verwendeten PLFEs herrühren, da PLFE aus GDNT und GDGT besteht.

PPC wird verwendet, um den Wärmefluss durch Anwendung von kleinen Druckänderungen (Drucksprünge von 3 – 5 bar) an Probe und Referenzlösung zu messen. Dabei wird die Proben- und Referenzzelle bei gleicher Temperatur im Kalorimeter gehalten. Der Wärmefluss, der bei Konformationsänderungen auftritt, ist direkt mit dem thermischen Expansionskoeffizienten α verbunden. Die PPC-Messungen können in den gleichen Zellen wie die DSC-Messungen durchgeführt werden.

Analog zu der DSC-Messung ist bei dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten von DPPC ein deutlicher Peak bei 41 °C zu erkennen (Abbildung 3.9). Im Vergleich dazu ist bei PLFE das Maximum erneut nur schwach bei ~ 32 °C ausgeprägt (Abbildung 3.9). Die relative Volumenänderung $\Delta V/V$, berechnet nach Gleichung 3.1, zeigt ein ähnliches Verhalten.

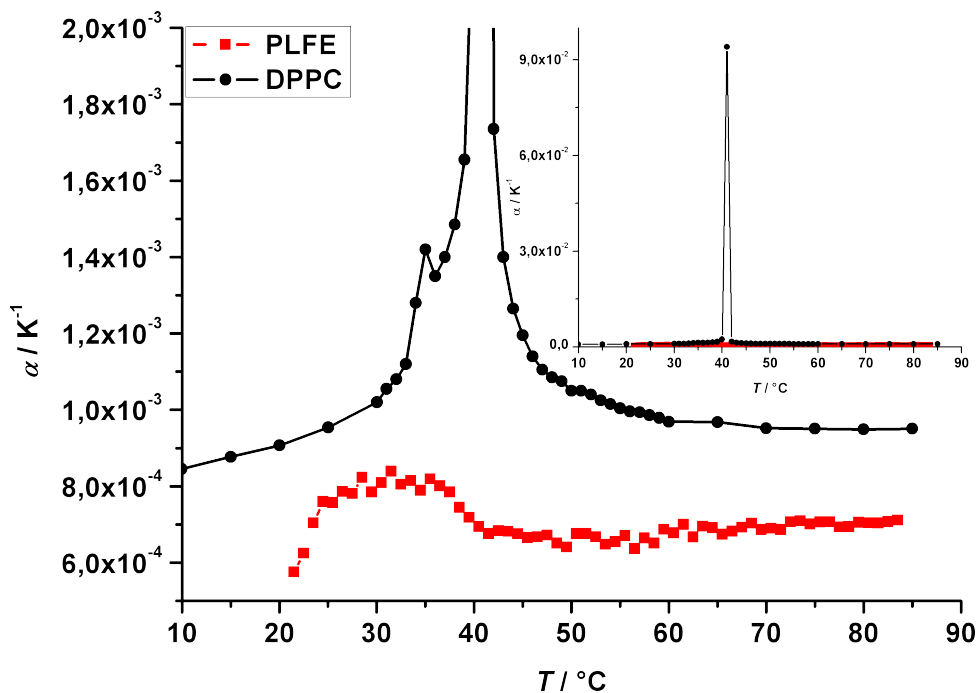


Abbildung 3.9: Thermischer Ausdehnungskoeffizient α von DPPC und PLFE

chung 2.35, beläuft sich bei PLFE auf $\sim 0,39\%$ und rührt wahrscheinlich von der Volumenänderung in den Ketten und/oder den Kopfgruppen her (im Vergleich DPPC ($\Delta V/V \approx 4\%$).^{71,72} Werden die Ergebnisse der XRR-Messung mit herangezogen (vgl. Kapitel 3.2.2), so sind es die Kopfgruppen, die den wesentlichen Beitrag zu der Volumenänderung liefern. Demgegenüber wurde bei PLFE-MLVs (multilamellare Vesikel) aus Zellen, die bei 78°C wuchsen, eine Volumenänderung von $0,10 - 0,14\%$ bei $T = 41^\circ\text{C}$ gemessen.⁴¹ Der Unterschied liegt in den verschiedenen Wachstumstemperaturen, der Vesikelgröße und den inhärenten Schwankungen bei der Präparation der biologischen Proben begründet. Die relative Volumenänderung wurde mit Hilfe des von MicroCal für Origin 7 geschriebenen Skripts berechnet, wobei die Integrationsgrenzen aus der DSC-Messung bestimmt wurden. Es wurden Messungen an Wasser zur Korrektur der Lipid/Wassermessung durchgeführt und eine Basislinie unterhalb der so erhaltenen Kurve abgezogen, bevor die Fläche unter der Kurve bestimmt wurde.

Der thermische Ausdehnungskoeffizient lässt sich auch aus der Dichtemessung berechnen (Abbildung 3.10), die jedoch kein eindeutiges Bild der Änderung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten von PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur liefert. Diese Diskrepanz ist in der Sensitivität der benutzten Messverfahren begründet. Die Schwankungen des thermischen Ausdehnungskoeffizienten aus der Dichtemessung lagen um die der Messwerte aus der PPC-Messung, sodass der Verlauf in grober Näherung ähnlich ist. Das Signal-Rauschverhältnis ist aber in der PPC-Messung deutlich besser. Dies lässt sich anhand der Messungen von DPPC verifizieren (Abbildung 3.11). Die aus den kalorimetrischen Messungen ermittelten Größen α und ΔC_p ermöglichen nun die Berechnung der partiellen spezifischen isothermen Kompressibilität κ_T^0 , die definiert ist als

$$\kappa_T^0 = \kappa_S^0 + \frac{T\alpha_0^2}{\rho_0 c_{p,0}} \left(2 \frac{\alpha^0 \nu^0}{\alpha_0} - \frac{c_p^0}{\rho_0 c_{p,0}} \right) . \quad (3.8)$$

Analog zur adiabatischen Kompressibilität (Gleichung 3.6) ist die isotherme Kompressibilität über die Kompressibilität des Lipids definiert:

$$\kappa_T^0 = \nu^0 \beta_T^{\text{lipid}} . \quad (3.9)$$

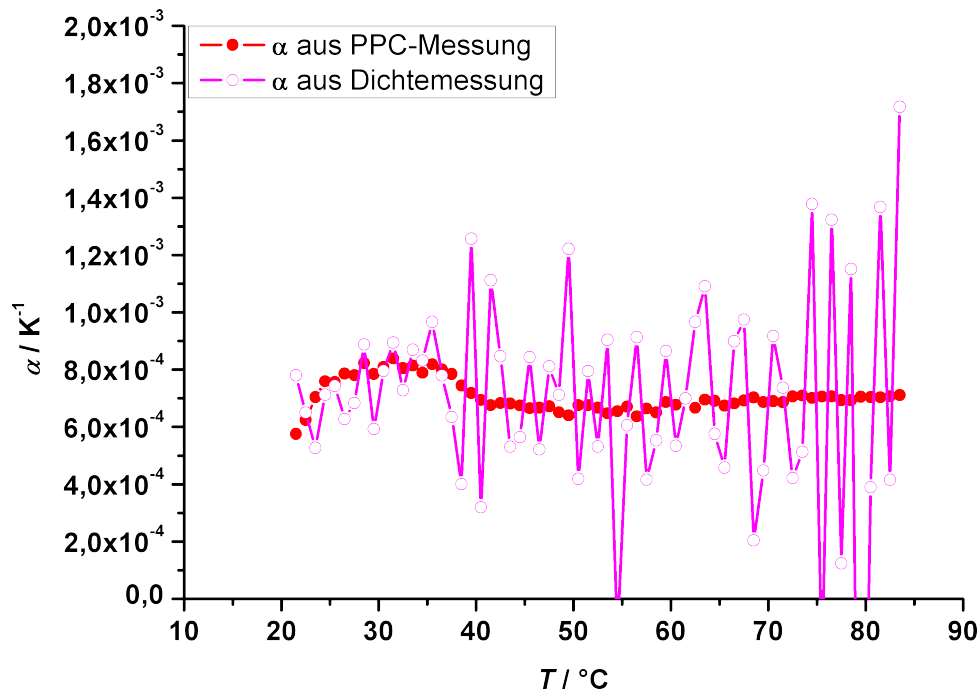


Abbildung 3.10: Thermischer Ausdehnungskoeffizient α von PLFE, berechnet aus der PPC-Messung bzw. der Dichtemessung

PLFE weist in der isothermen und adiabatischen Kompressibilität einen ähnlichen Verlauf mit der Temperatur auf. Bei beiden ist nur eine schwache Änderung im linearen Verlauf um $T \approx 38^{\circ}\text{C}$ ($\kappa_T^0 = 36,9^{\circ}\text{C}$ bzw. $\kappa_S^0 = 39,5^{\circ}\text{C}$) zu erkennen (Abbildung 3.6 und 3.13). Der Unterschied zwischen der isothermen und adiabatischen Kompressibilität ist bei wässrigen Lösungen nur gering, da Wasser für $c_{p,0}$ große Werte annimmt und für α_0 kleine. ^{49,73}

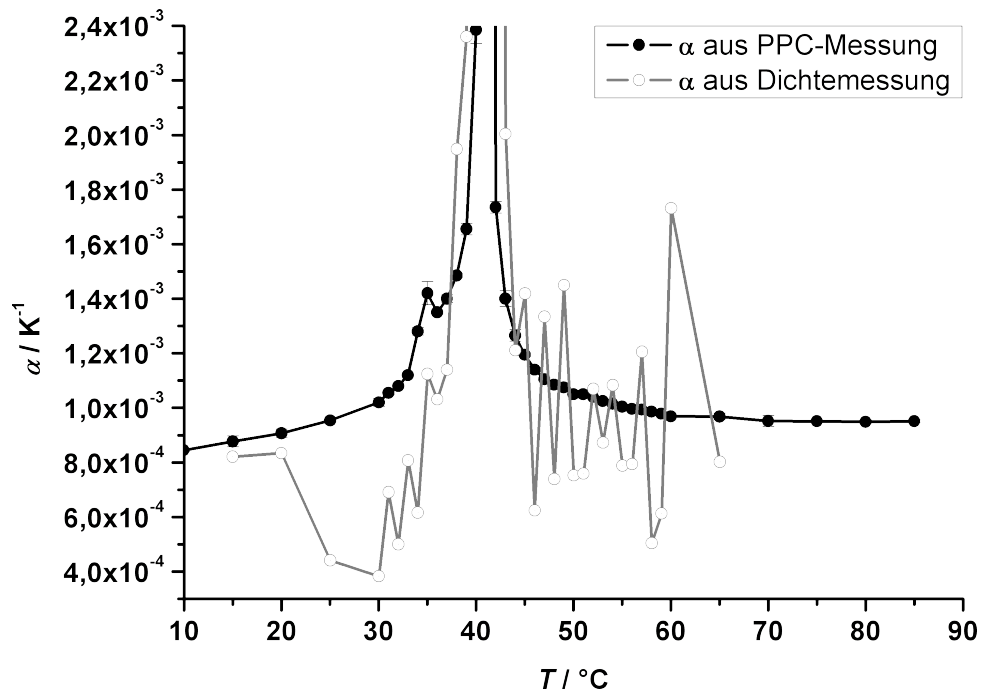


Abbildung 3.11: Thermischer Ausdehnungskoeffizient α von DPPC, berechnet aus der PPC-Messung bzw. der Dichtemessung

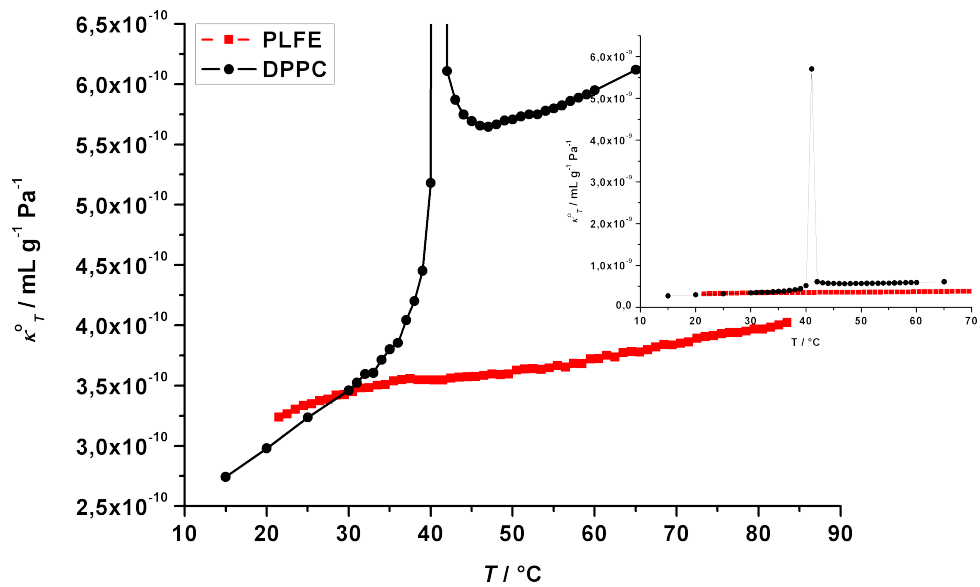


Abbildung 3.12: Partielle spezifische isotherme Kompressibilität von DPPC und PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur

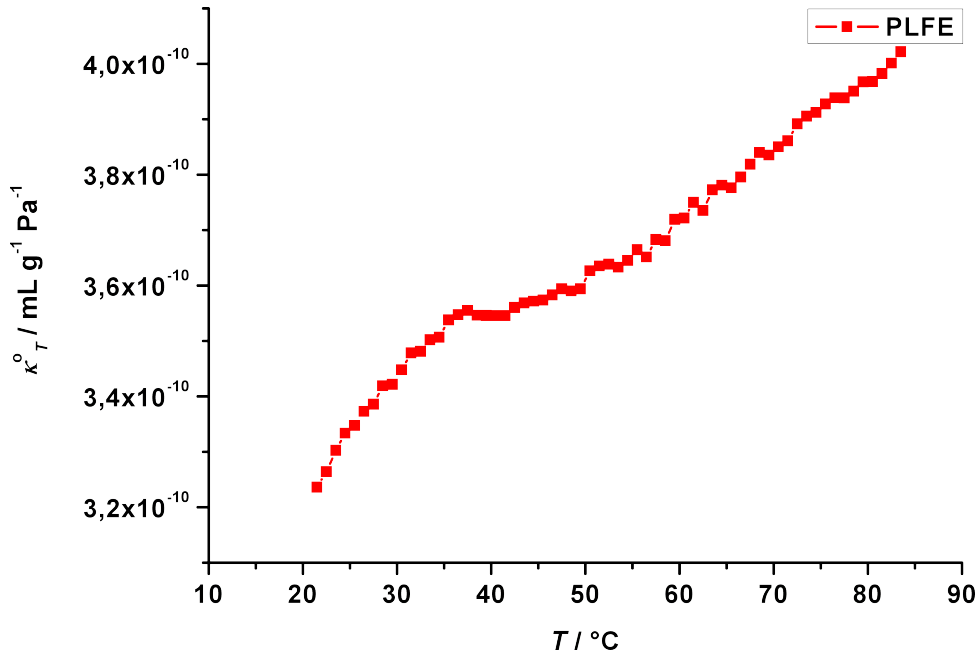


Abbildung 3.13: Partielle spezifische isotherme Kompressibilität von PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur

3.1.3 Ermittlung von Fluktuationsparametern

Die Phasenumwandlungen von Lipiden gehen mit einer diskontinuierlichen Änderung der physikalischen Eigenschaften, wie z.B. der molaren Entropie, dem molaren Volumen, dem isobaren Ausdehnungskoeffizienten oder der molaren Wärme, einher, wenn es sich um eine Phasenumwandlung erster Art handelt. Bei einer Phasenumwandlung zweiter Art hingegen würden sich diese Größen als stetig erweisen und ihre Ableitungen als diskontinuierlich (Abbildung 3.14).⁷⁴ Das System wird während eines Phasenübergangs zweiter Ordnung von Fluktuationen dominiert.

Aus den vorherigen kalorimetrischen Messungen mit der Bestimmung der isothermen Kompressibilitätskoeffizienten β_T ist es nun möglich, die mittleren Volumenfluktuationen

$$\langle \Delta V^2 \rangle = RTK_T = RT\kappa_T^0 M \quad (3.10)$$

und daraus die relativen Volumenfluktuationen zu berechnen

$$\sqrt{\frac{\langle \Delta V \rangle^2}{V^2}} = \sqrt{\frac{RT\beta_T^{\text{lipid}}}{\nu^0 M}} \quad (3.11)$$

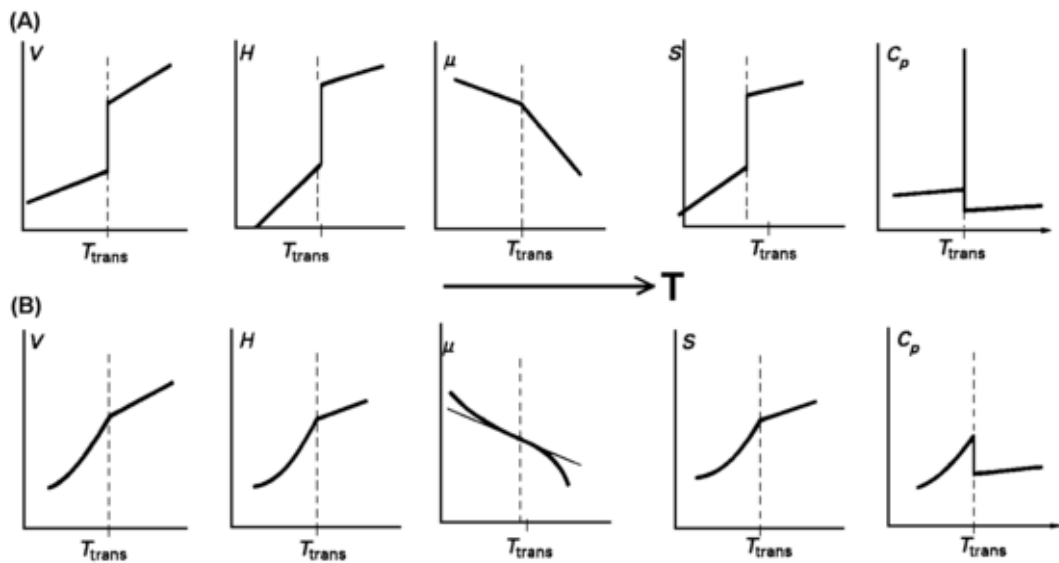


Abbildung 3.14: Überblick über Änderungen thermodynamischer Größen bei A) Phasenübergängen erster Ordnung B) Phasenübergängen zweiter Ordnung ⁷⁵

Das Verhalten der relativen Volumenfluktuationen ist analog zu der thermischen Kompressibilität (Abbildung 3.15 und 3.16). Die Fluktuationen in PLFE sind sehr gering und stimmen mit den Beobachtungen von ungewöhnlich geringen und temperaturunempfindlichen Protonenpermeabilitäten überein. ^{27,76,77} Der Phasenübergang von PLFE bei $T \approx 40^\circ\text{C}$ verhält sich primär wie ein Phasenübergang erster Ordnung, da das bei einem Phasenübergang zweiter Ordnung zu erwartende kritische Verhalten (Divergenz von κ_T , α) nicht beobachtet werden konnte.

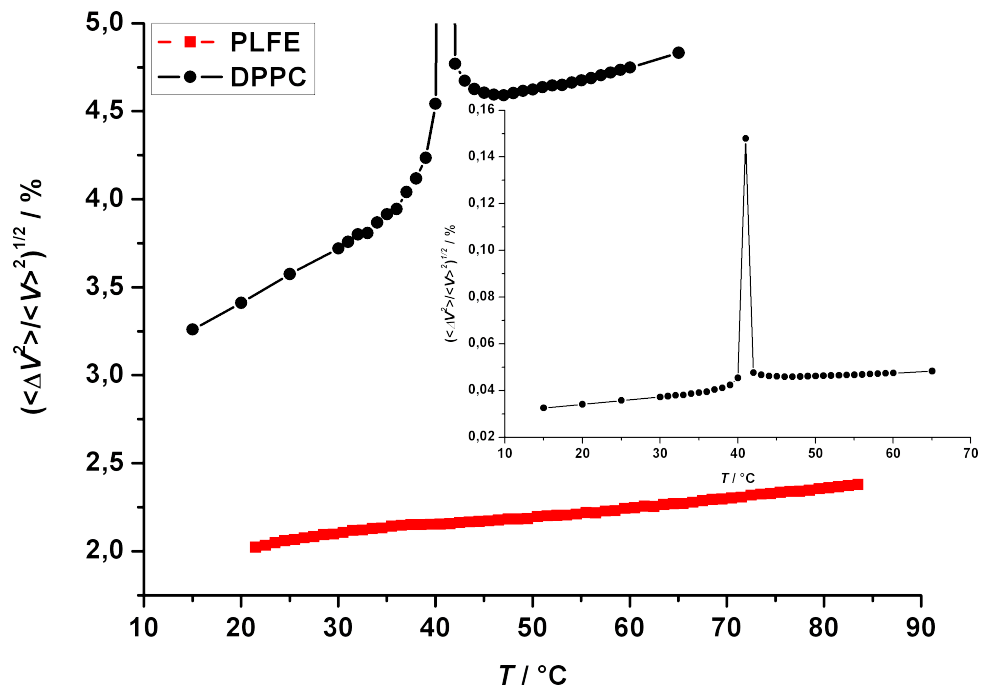


Abbildung 3.15: Volumenfluktuationen von DPPC und PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur

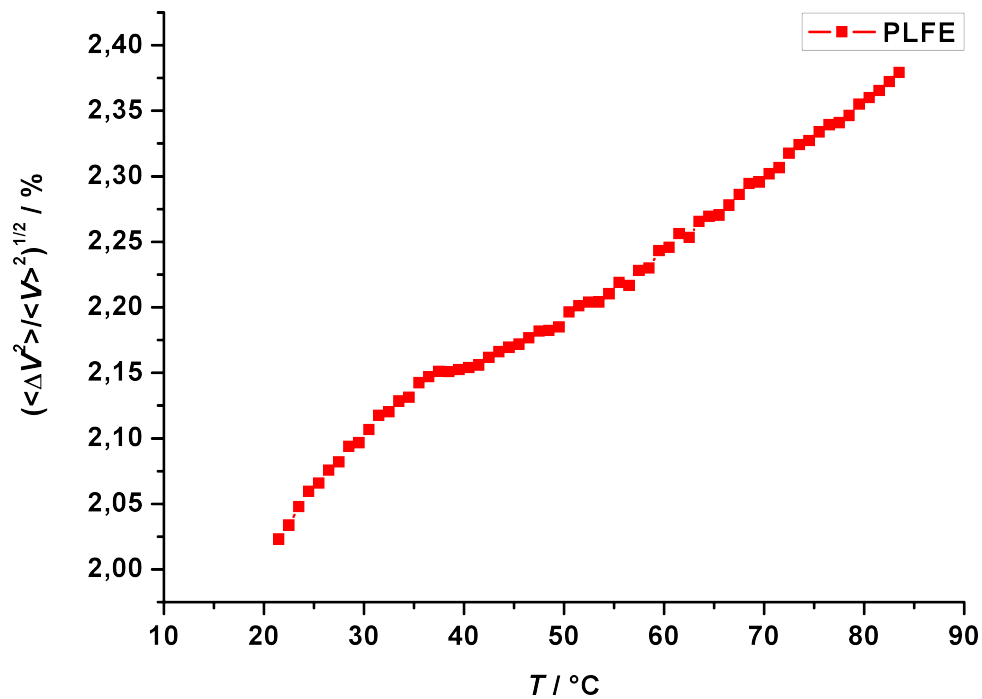


Abbildung 3.16: Volumenfluktuationen von PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur

3.2 Strukturelle Charakterisierung der festkörperunterstützten PLFE-Membran in Abhängigkeit von der Temperatur

3.2.1 Bestimmung der Membranschichtdicke mittels AFM

Um sich ein Bild von den festkörperunterstützten PLFE-Membranen auf den Si-Wafern zu machen, wurden AFM-Messungen durchgeführt. In Abbildung 3.17 ist die Oberfläche eines präparierten Si-Wafers für die XRR-Messung zu sehen. Die Probe wies Löcher auf (schwarz dargestellt), die vermutlich durch das abrupte Abkühlen der Probe nach der Messung in der XRR-Kammer entstanden sind. Diese Löcher ermöglichten die Ermittlung der Gesamtschichtdicke der PLFE-Membran an unterschiedlichen Punkten der Probe. Des Weiteren konnten einzelne Stufen ausgemessen werden, die auf die Schichtdicke einer einzelnen Lipidschicht schließen lassen. Im Mittel ergab die AFM-Messung die Schichtdicke einer PLFE-Membranschicht von 4,99 nm, was im Einklang mit der ermittelten Schichtdicke einer PLFE-Membranschicht von 5,58 nm bei $T = 50^\circ\text{C}$ aus der XRR-Messung steht (Abbildung 3.17). Die Gesamtzahl der Lipidstapel auf der Waferoberfläche beläuft sich an der dicksten Stelle auf ~ 37 . Die Probe hatte eine geschlossene Oberfläche mit einer abnehmenden Zahl an Schichten zum Rand hin. Messungen an unterschiedlichen Stellen ergaben im Mittel eine Schichtdicke von 126 nm, was einer Schichtanzahl von 25 ± 2 entspricht.

3.2.2 Bestimmung der Membranschichtdicke und des temperaturabhängigen Phasenverhaltens mittels XRR

Die XRR-Messungen geben einen Einblick in die Strukturänderungen der Lipide in Abhängigkeit von der Temperatur durch Ermittlung der Dicken und Elektronendichten der einzelnen Schichten. Die Gesamtschichtdicke der festkörperunterstützten PLFE-Membran (Wasser + Lipid) wurde als Mittelwert der Peakmaxima aus den Reflektionskurven berechnet. In Abbildung 3.18 ist beispielhaft eine Reflektionskurve dargestellt. Die äquidistanten Braggreflexe lassen auf eine lamel-

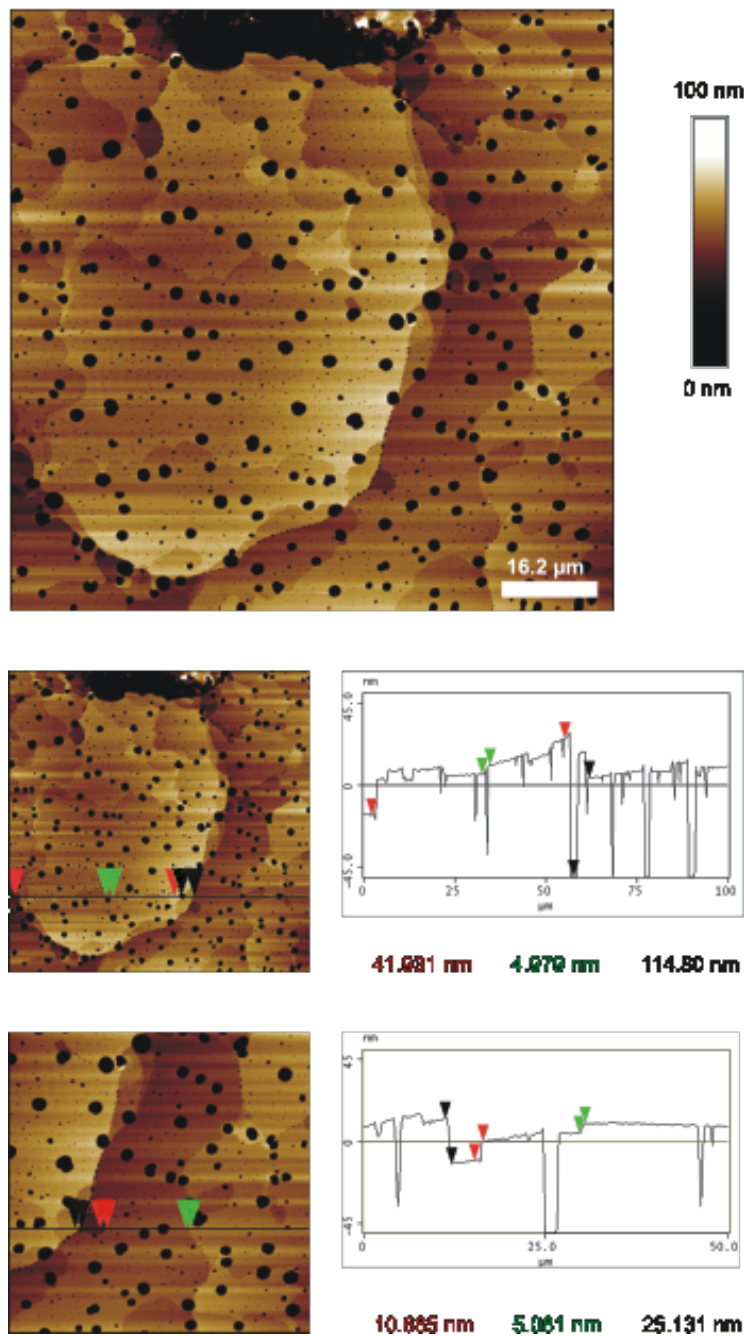


Abbildung 3.17: Oben: AFM-Aufnahme der PLFE-Lipidschicht nach der Messung mit der XRR eines maximalen Scanbereichs von $100 \text{ nm} \times 100 \text{ nm}$ in Falschfarbendarstellung. Die Farbskala entspricht einer Gesamthöhe von 100 nm ; Mitte: Analyse eines Höhenprofils (schwarze Linie im Bild). Die Werte entsprechen der Höhendifferenz der markierten Punkte; Unten: vergrößerter Ausschnitt mit Höhenanalyse

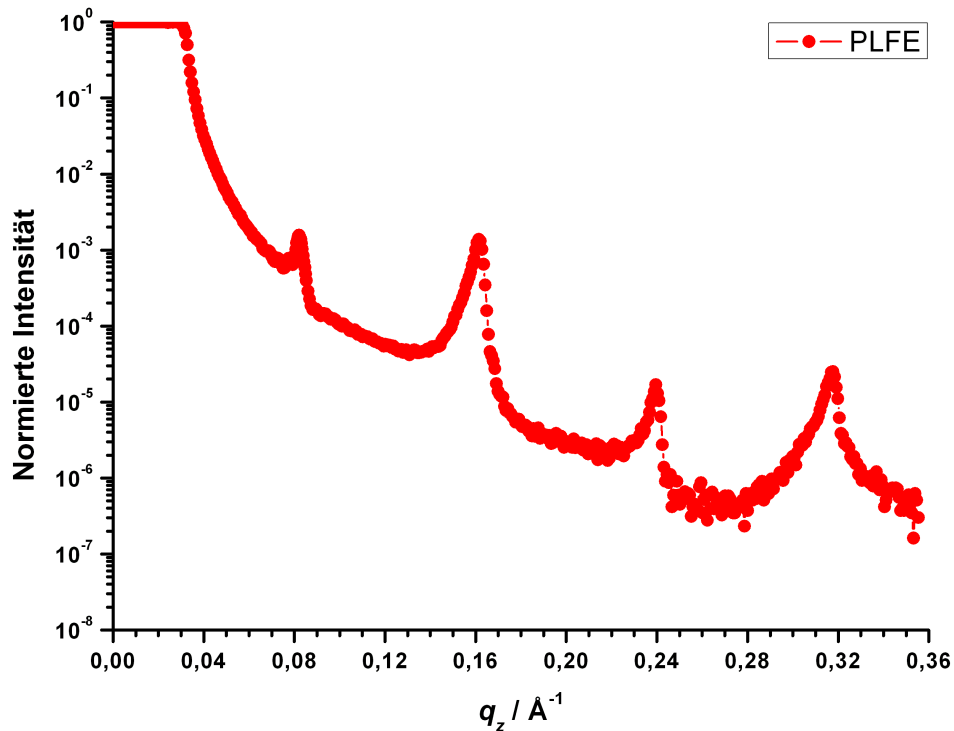


Abbildung 3.18: Reflektionskurve von PLFE mit äquidistanten Braggreflexen bei $54,9^\circ\text{C}$ und 100% Hydratation

lare Struktur schließen, die durchweg bei allen Messungen beobachtet wurde. Die Reflektionskurven in Abbildung 3.19 zeigt eine Aufspaltung der Braggreflexe, was auf eine Koexistenz zweier lamellarer Phasen deutet. Diese Aufspaltung zeichnete sich meist erst bei höheren Temperaturen deutlich ab. Die Gesamtschichtdicke d_g der untersuchten Proben zeigt für PLFE durchweg den gleichen Temperaturverlauf (Abbildung 3.23). Mit Zunahme der Temperatur bis $65 \pm 5^\circ\text{C}$ nahm sie ab, um dann bei höherer Temperatur wieder anzusteigen. Die große Differenz der Anfangswerte der Kurven scheint sich auf unterschiedlich starke Hydratationen der Lipide zurückführen zu lassen. In Abbildung 3.20 ist der Hydratationsverlauf in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Graphik zeigt, wie sich die Schichtdicke nach anfänglicher Erhöhung wieder verringert. Eine hydrationsbedingte Konformationsänderung der Lipide könnte ein Grund für dieses Verhalten sein, die dazu führt, dass weniger Wasser zwischen den Schichten eingelagert wird. Im Vergleich dazu ist das Hydratationsverhalten von DPPC in Abbildung 3.21 zu sehen, das ein kontinuierliches Anschwellen der Gesamtschichtdicke bis zur Sättigung zeigt. Die

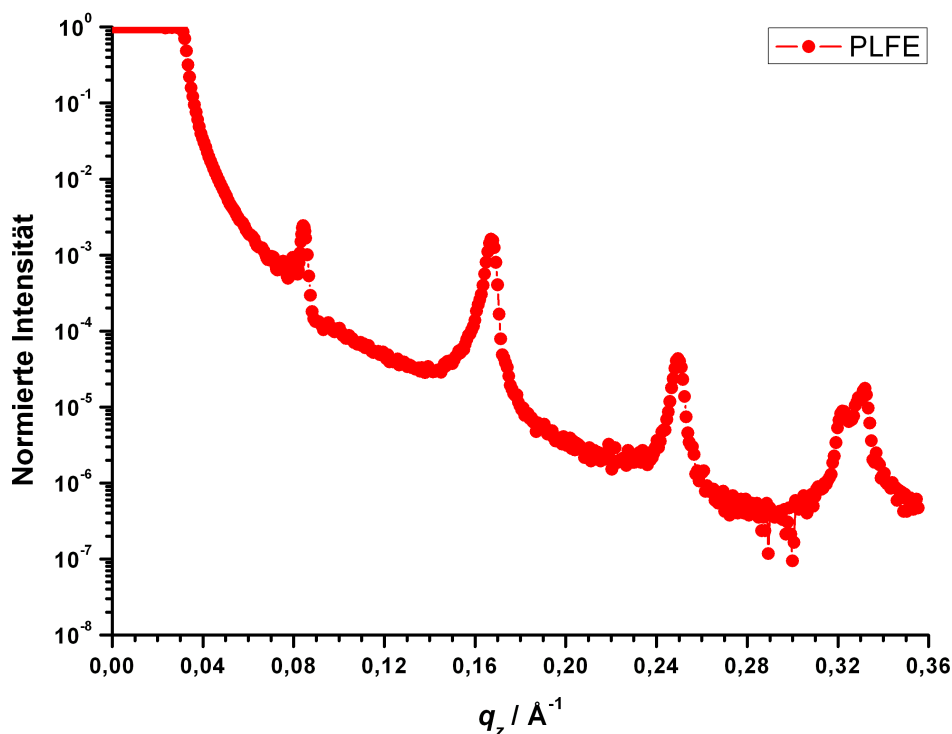


Abbildung 3.19: Deutliche Aufspaltung des Braggreflexes von PLFE bei $65,1^\circ\text{C}$ und 100% Hydratation bei hohen q_z -Werten

Lipidmembran war nach ca. 36 Stunden voll hydratisiert. DPPC zeigt sein bekanntes Verhalten bezüglich der Temperaturabhängigkeit der lamellaren Schichtdicke d_g ($d_g = d_{\text{Lipid}} + d_{\text{Wasser}}$) mit einer Vorumwandlung bei $\sim 35^\circ\text{C}$ und einen Hauptübergang bei $\sim 41^\circ\text{C}$ (Abbildung 3.22). Die Phasenübergangstemperaturen stimmen mit der Literatur gut überein, so wurde von Tenchov et al. Übergangstemperaturen von $\sim 34^\circ\text{C}$ bzw. $\sim 41^\circ\text{C}$ gemessen.⁷⁸ Es ist möglich, die zahlreichen durchgeführten temperaturabhängigen PLFE-Messungen anhand des Anfangsverhaltens in eine Gruppe mit großer Anfangsschichtdicke ($121 \pm 5 \text{\AA}$), die einen steilen Kurvenverlauf zeigt und eine Gruppe mit kleinerer Anfangsschichtdicke ($94 \pm 4 \text{\AA}$) mit einem flacheren Kurvenverlauf zu unterteilen. Allen Messungen ist gemein, dass sie bei einer Temperatur von $67,6 \pm 3^\circ\text{C}$ ein Minimum der Gesamtschichtdicke ($77 \pm 6 \text{\AA}$) aufweisen und dass sich bei höheren Temperaturen die Gesamtschichtdicke wieder erhöht (bei $T = 85 \pm 5^\circ\text{C}$ auf $d_g = 89 \pm 5 \text{\AA}$). Es zeigt sich also, dass sich die Messungen prinzipiell nur in der Deutlichkeit ihres temperaturabhängigen Kurvenverlaufs un-

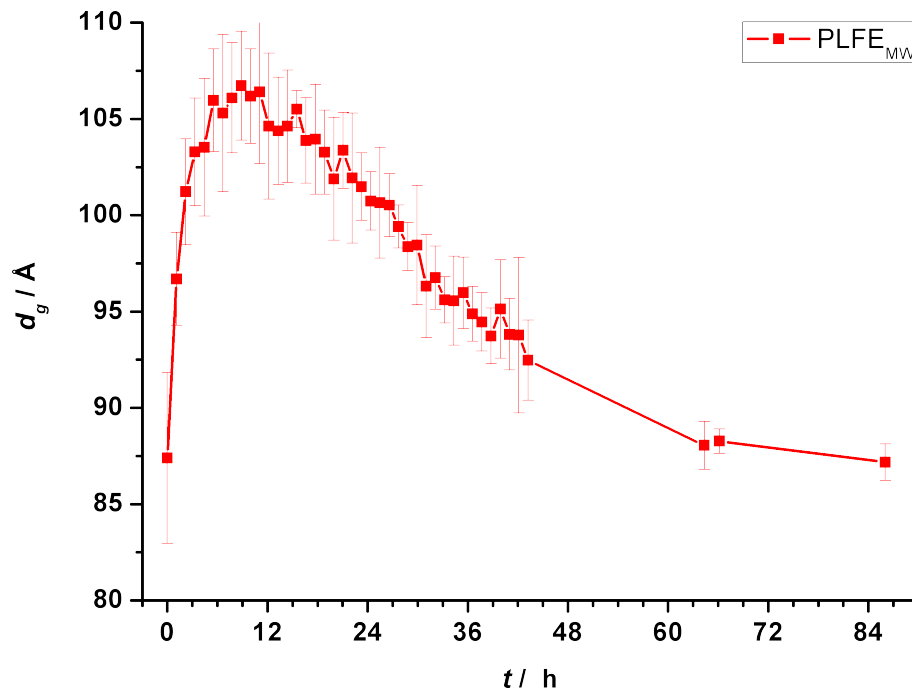


Abbildung 3.20: Zeitliche Entwicklung der Gesamtschichtdicke d_g des PLFE-Lipidfilms in der Probenkammer bei $T = 24,0^\circ\text{C}$ und 100% Luftfeuchte durch Hydratation des Lipidfilms

terscheiden, was wahrscheinlich auf kinetische Effekte bei der Hydratation der Probe zurückzuführen ist.

Da die PLFE-Lipide die gesamte Membran durchspannen,^{37,79} lassen sich die Membranschichten als Schicht aus Kopfgruppe/Kette/Kopfgruppe (Lipid) und Wasser interpretieren, die sich wiederholen. Für die Berechnung des Elektronendichteprofiles wurde weiterhin eine Wasserschicht sowohl auf der Lipidprobe als auch direkt über dem Si-Wafer mit Parratt angenommen (siehe Kapitel 2.7 Abbildung 2.12). Dieser Aufbau der Schichten ergab bei den Fits die beste Übereinstimmung mit den XRR-Messungen. Die Ergebnisse der erhaltenen Daten sind in Abbildung 3.24 zu sehen. Es war nicht möglich, die Messungen bei Temperaturen unter 50°C mit Parratt sinnvoll auszuwerten, da die Schichten bei geringer Temperatur nur ungenügend korrelierten. Dies lässt sich an den gering ausgeprägten und verbreiterten Braggreflexen erkennen (siehe Abbildung 4.1 im Anhang).

Das Absinken und wieder Ansteigen der Gesamtschichtdicke (Lipidschicht + an-

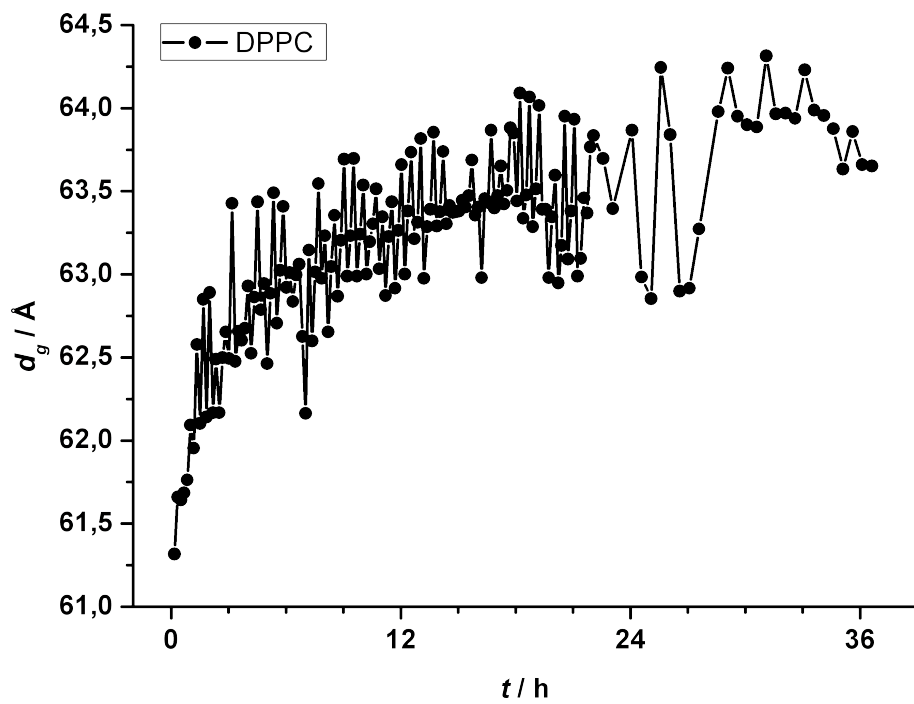


Abbildung 3.21: Zeitliche Entwicklung der Gesamtschichtdicke d_g des DPPC-Lipidfilms in der Probenkammer bei $T = 27,6^\circ\text{C}$ und 100% Luftfeuchte durch Hydratation des Lipidfilms

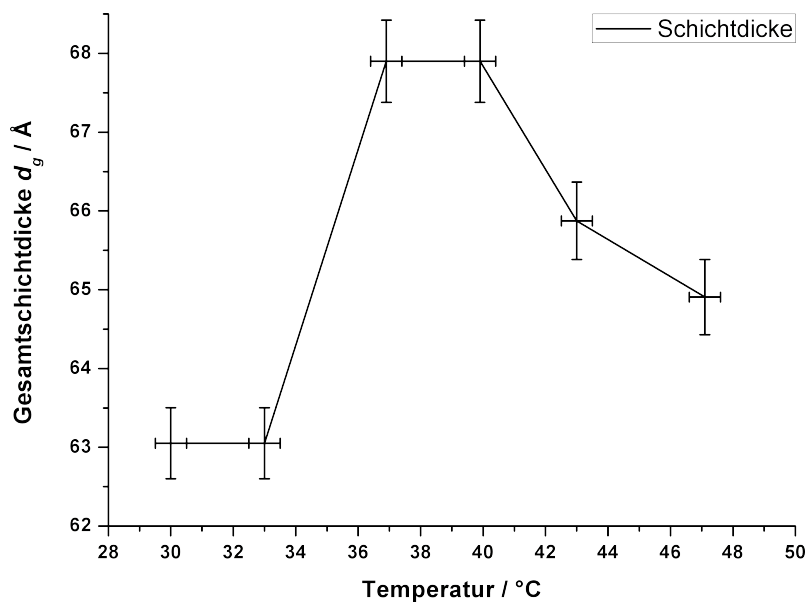


Abbildung 3.22: Temperaturabhängige Änderung der Gesamtschichtdicke d_g (lamellare Wiederholungseinheit) des DPPC-Lipidfilms

grenzende Wasserschicht) mit steigender Temperatur, das sich aus der Berechnung der Braggreflexe ergibt, findet sich auch in den aus Parratt erhaltenen Daten für die

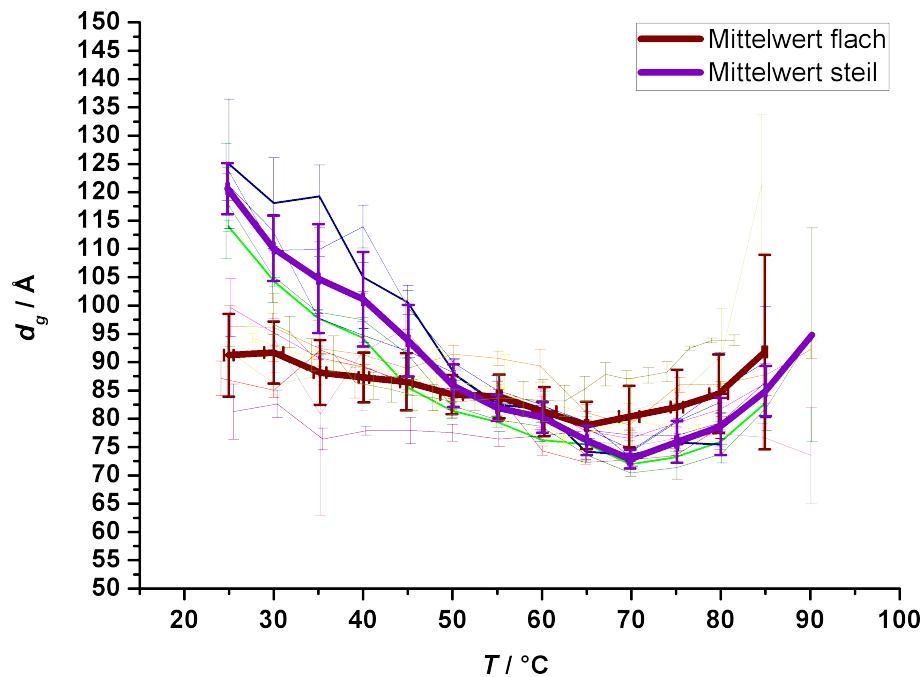


Abbildung 3.23: Temperaturabhängige Änderung der Gesamtschichtdicke d_g (lamellare Wiederholungseinheit) des PLFE-Lipidfilms mit Mittelwerten der beiden Gruppen von unterschiedlich Hydratisierten Lipidfilmen. In rot bis gelb Messungen der flacheren und in grün bis blau Messungen der steileren Gruppe

Lipid + Wasserschicht wieder (Abbildung 3.25). Wird der Kurvenverlauf für das sich zwischen den Lipiden befindliche Wasser mit dem Kurvenverlauf des reinen Lipids verglichen (Abbildung 3.25), so zeigt sich, dass der Verlauf der Gesamtschichtdicke mit steigender Temperatur durch das Verhalten des zwischen den Schichten eingelagerten Wassers dominiert wird. Die Dicke des reinen Lipids nimmt im Gegensatz zur beobachteten Abnahme von $\sim 11,5\%$ der Gesamtschichtdicke sogar bis $\sim 70^\circ\text{C}$ leicht zu ($\sim 4,9\%$) und ist damit im Verlauf genau gegensätzlich zu dem Verlauf der Gesamtschicht.

Wird die Lipidschicht noch weiter in Kopfgruppe und Kettenregion unterteilt, wird erkennbar, dass die Dicke der Kettenregion über den Temperaturverlauf hinweg leicht sinkt (maximale Änderung $\sim 9,3\%$). Die temperaturbedingte Zunahme der Lipidschicht ist demzufolge im Wesentlichen durch das der Kopfgruppe gegeben (maximale Änderung $\sim 18,8\%$), die den schon erwähnten gegensätzlichen Verlauf zur Gesamtschichtdicke zeigt (Abbildung 3.26). Die Ketten können nur beschränkt

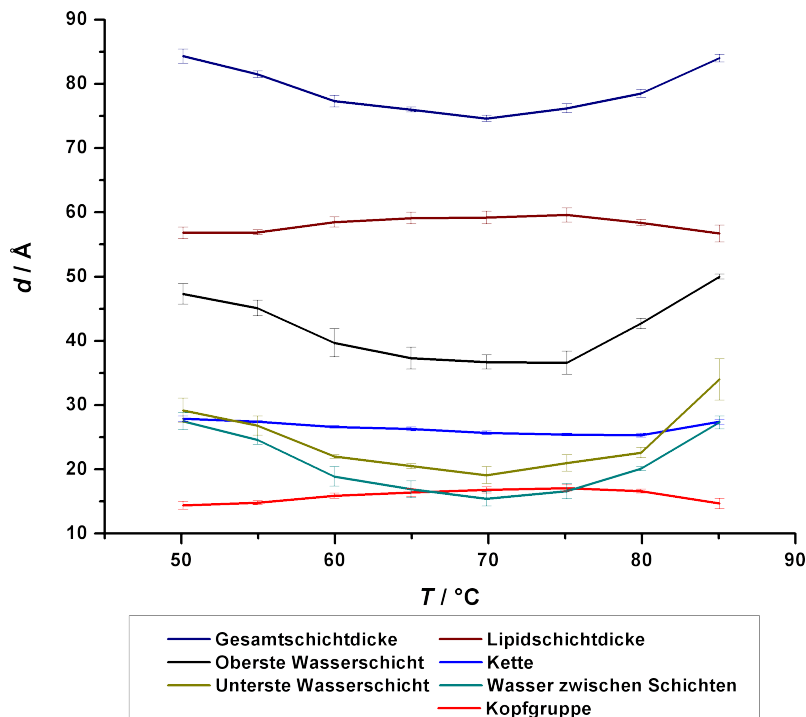


Abbildung 3.24: Temperaturabhängige Änderung der Schichtdicken sämtlicher in Parratt angenommenen Schichten für PLFE-Membranen bei 100% Hydratation

gauche-Konformation annehmen, was zu einer Verkürzung der Kettenlänge führt. Die Kopfgruppen hingegen schwellen mit der Temperatur, wahrscheinlich durch zunehmende Hydratation, an.

Letztendlich ist es möglich, zusätzlich die Elektronendichte der einzelnen Schichten zu betrachten. Bei den Fits mit Parratt wurde durchgehend eine Elektronendichte von $9,475 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ für Wasser angenommen. Das Verhalten der Elektronendichte ist in Abhängigkeit von der Temperatur für die Kopfgruppe und Kettenregion der PLFE-Membran in Abbildung 3.27 dargestellt. Eine wesentliche Änderung der Elektronendichte der Ketten mit der Temperatur ist nicht zu beobachten, nur ein leichtes Absinken bei Erhöhung der Temperatur. Die Elektronendichte der Kopfgruppen nimmt bis $\sim 70 \text{ °C}$ leicht ab, um dann bei $\sim 70 \text{ °C}$ um 4,2% anzusteigen. Die Elektronendichte spiegelt den Raumbedarf der betrachteten Regionen wider, somit kann aus den Daten auch eine Aussage über Änderungen der lateralen Packung gemacht werden. Die Dicke der Kettenregion nimmt mit der Temperatur ab; gleichzeitig verringert sich die Elektronendichte der Kettenregion, d. h. das Volumen der

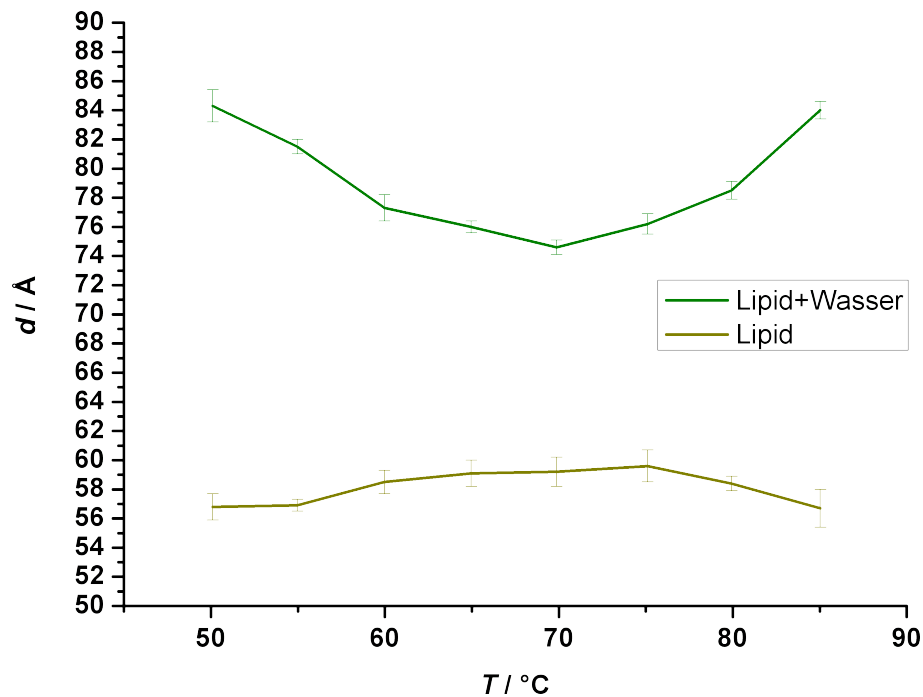


Abbildung 3.25: Temperaturabhängige Änderung der Schichtdicke des reinen PLFE-Lipids (Kopfgruppe-Kette-Kopfgruppe) im Vergleich zu der Schichtdicke des Lipids mit Wasser (lamellare Wiederholungseinheit)

Ketten nimmt zu. Dieses Verhalten ist nur möglich, wenn sich die laterale Packung verringert. Die Kettenregion verbreitert sich also bei der Verkürzung der Ketten bis ca. 75°C . Danach nehmen sowohl die Dicke als auch das Volumen zu und es kann keine Aussage über das Verhalten der lateralen Packung gemacht werden. Bei der Kopfgruppenregion geht eine Volumenänderung mit einer Änderung der Schichtdicke einher; beide nehmen bis $70 - 75^\circ\text{C}$ zu, um dann wieder abzunehmen, sodass auch hier die Volumenzunahme allein von der Dickenzunahme herrühren und keine Angabe über die laterale Packung getroffen werden kann.

Die Präparation der festkörperunterstützten PLFE-Membranen mittels Spin-Coating produzierte gleichmäßige Schichten. Die aus den Kiessig-Oszillationen bestimmte Anzahl von Schichten beläuft sich auf 18 ± 2 , welche in der Berechnung mit Parratt gut übereinstimmen. Die Gesamtschichtdicke der Membranstapel wird bei der Messung über die beleuchtete Fläche gemittelt, beinhaltet also auch Randbereiche ohne Lipid, sodass die erhaltene Anzahl aus der AFM-Messung von 25 ± 2 nicht unrealistisch ist.

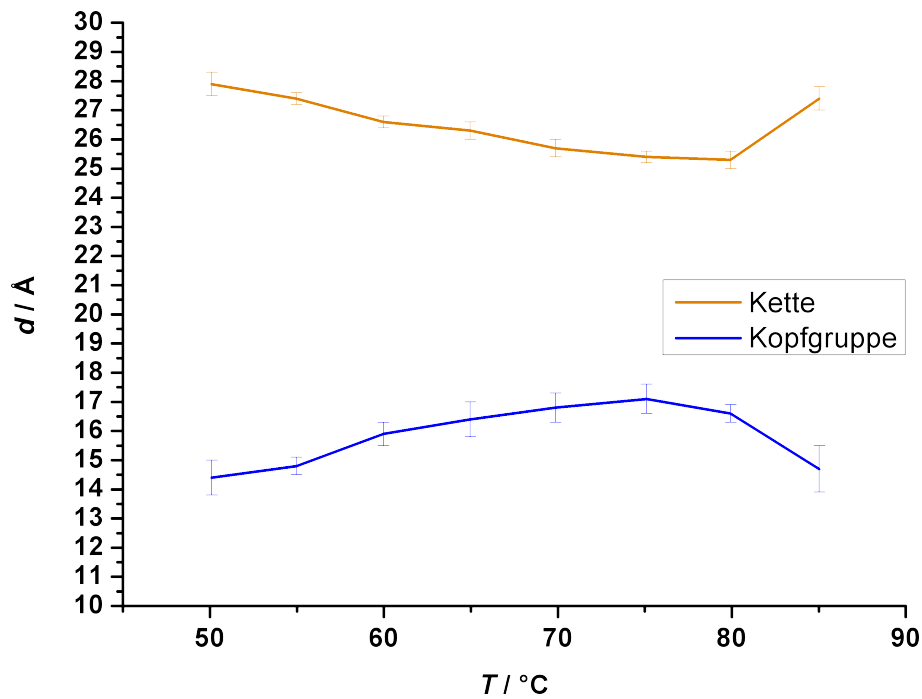


Abbildung 3.26: Temperaturabhängige Änderung der Schichtdicke der Kopfgruppe und Kettenregion von PLFE

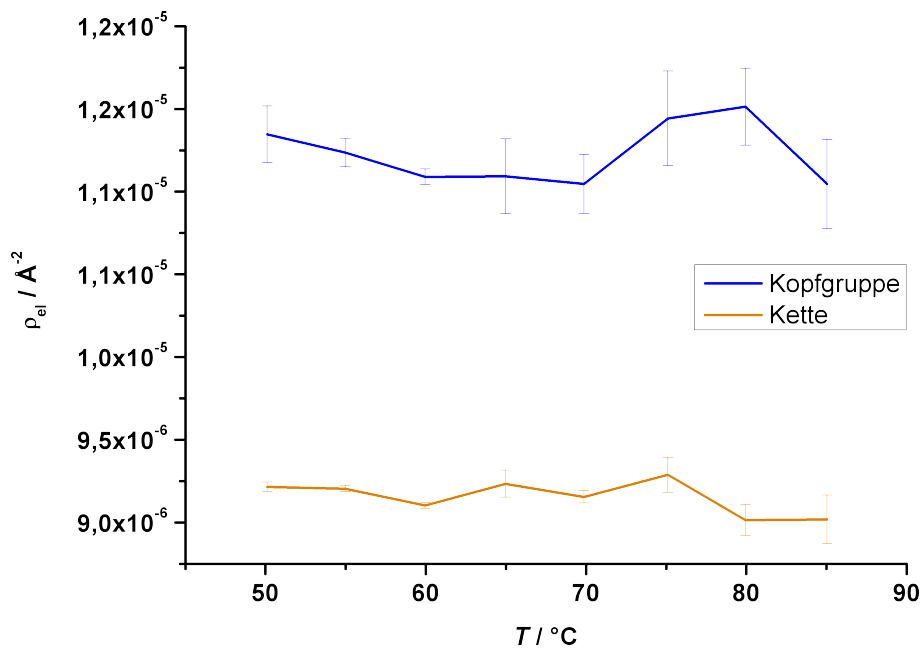


Abbildung 3.27: Temperaturabhängige Änderung der mit Parratt berechneten Elektronendichte der Kopfgruppe und Kette von PLFE

3.3 Bestimmung der Fluidität von PLFE-Membranen aus Fluoreszenzanisotropiemessungen

Die Beweglichkeit der Lipide kann über die Fluoreszenzanisotropie gemessen werden. Die Lipide sind in der fluiden Phase besonders beweglich und somit gibt die Fluoreszenzanisotropie auch Auskunft über Phasenübergänge. Die Fluoreszenzanisotropiemessung zeigt bei DPPC den Hauptphasenübergang bei $40,7^\circ\text{C}$ (Abbildung 3.28) und eine Vorumwandlung bei etwa $33,1^\circ\text{C}$. Als Kriterium für die Bestimmung der

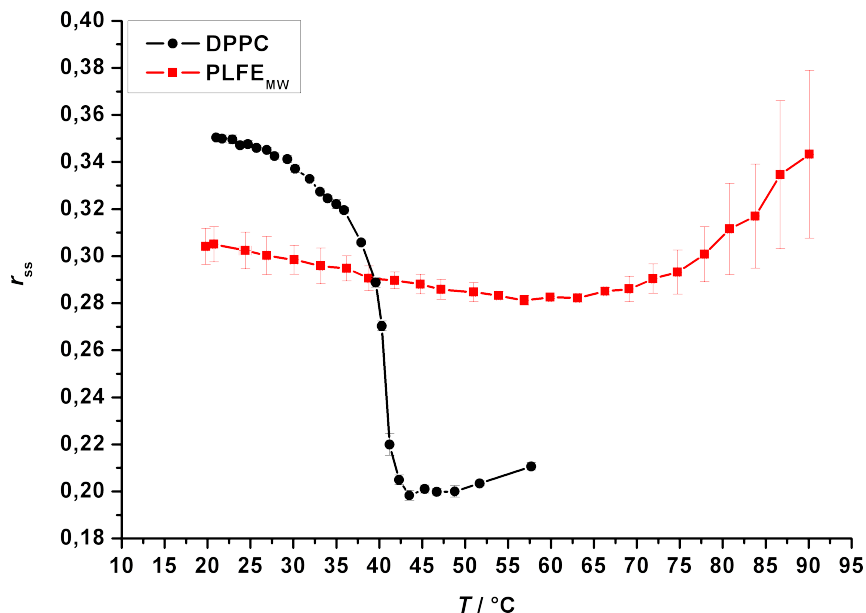


Abbildung 3.28: Statische Fluoreszenzanisotropie von DPPC und PLFE

Phasenumwandlungen wurden die Wendestellen der Fluoreszenzanisotropiemessung verwendet. Der starke Unterschied zwischen Anfangswert (0,35) und Endwert (0,21) bei DPPC liegt an der Zunahme der Beweglichkeit der Lipide beim Übergang von der $P_{\beta'}$ -Phase in die fluide L_{α} -Phase. Im Vergleich dazu ist bei PLFE kaum eine drastische Veränderung im Phasenübergangsbereich bei $30 - 40^\circ\text{C}$ zu beobachten. Die Beweglichkeit der Fluorophore scheint kontinuierlich mit der Temperatur leicht anzusteigen bis zu einer Temperatur von $\sim 60^\circ\text{C}$, um dann wieder abzunehmen. Die Anisotropiemessung spiegelt die Rigidität der PLFE-Membranen wider, die sich kontinuierlich nur wenig mit der Temperatur ändert. Die höchste Beweglichkeit mit

größter Koformationsunordnung liegt in dem Temperaturbereich, in dem die Zellen ursprünglich gewachsen sind (65 °C). Ein hieraus abzuleitender Phasenübergang läge bei $\sim 37,4$ °C. Das Fehlen einer deutlichen Änderung der statischen Fluoreszenzanisotropie in den PLFE-Messungen weist auf das Ausbleiben einer abrupten Änderung in der Dynamik hin. Die Anisotropie spiegelt prinzipiell das freie Volumen für die Fluorophore wider und damit auch das der umgebenden Lipidmoleküle. Kahn et al. detektierten mit Perylen eine abrupte Änderung der Anisotropie in der Nähe von ~ 48 °C und vermuteten als Grund eine lokale Strukturänderung des PLFE-Kohlenwasserstoffkerns.⁸⁰ Eine bessere Übereinstimmung liegt mit den Messungen von Kao et al. vor.⁸¹ Die PLFE-Liposomen erschienen dort sehr steif im Bereich von 15 – 48 °C und die laterale Beweglichkeit der mit Perylen markierten Phosphatidylcholine in PLFE-Liposomen erhöhte sich bei Temperaturen > 48 °C. Die Resultate implizierten eine Erhöhung der Fluidität der PLFE-Liposomen bei Temperaturen > 58 °C. Die gemessene Änderung könnte ein Anzeichen für die Adaption von *Sulfolobus acidocaldarius* bei hohen Temperaturen sein.

Kapitel 4

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Techniken verwendet, um ein tieferes Verständnis des Phasenverhaltens der Plasmamembran von *Sulfolobus acidocaldarius* im Temperaturbereich von 25 – 85 °C zu erhalten. Bei den Untersuchungen wurde das Augenmerk auf die Hauptkomponente der Plasmamembran von *Sulfolobus acidocaldarius*, das sogenannte PLFE, welches von Professor P. L. Chong bereitgestellt wurde, gerichtet. Die Ergebnisse wurden mit Messungen an DPPC verglichen, da es ein gut untersuchtes Modellsystem darstellt. Als Messmethoden wurden Dichte-, Ultraschall-, Fluoreszenzanisotropiemessungen, Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC), dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) und Röntgen-Reflektometrie eingesetzt.

Mit Hilfe des Spin-Coating-Verfahrens war es möglich, relativ gleichmäßige und reproduzierbare Schichten der Lipide auf Siliziumwafer aufzutragen. Die AFM-Messungen bestätigten, dass durch das Spin-Coating eine zusammenhängende Lipidschicht entsteht, die über den gesamten Wafer betrachtet gleichmäßig aufgetragen war. Die gemessenen Schichtdicken lagen bei ~ 5 nm für eine PLFE-Lipidschicht mit einer maximalen Gesamtzahl übereinander liegenden Schichten von ~ 25 . Im Vergleich dazu lieferten die Kiessig-Oszillationen aus den Röntgenreflektionskurven einen Mittelwert von 18 ± 2 Schichten mit einer Lipidschichtdicke von $5,7 \pm 0,1$ nm. Die mit Lipid beschichteten Wafer wurden in einer Kammer bei 100% Luftfeuchte nach vollständiger Hydratation mit Hilfe der Röntgenreflektometrie untersucht. Die Röntgenreflektometrie ermöglichte einen Einblick in die strukturellen Eigenschaften der Lipide und über das Auftreten von Phasenübergängen. Dazu wurden

die Röntgenreflektionskurven mit Parratt32 gefittet, um die einzelnen strukturellen Parameter des Systems zu erhalten. Im Gegensatz zu der sprunghaften Änderung bei $\sim 34^\circ\text{C}$ und $\sim 41^\circ\text{C}$ der Lipiddicke beim DPPC, konnte für PLFE nur eine geringe Änderung mit der Temperaturabhängigkeit von der Lipiddicke verzeichnet werden. Unter Zuhilfenahme von Parratt konnten weitere Erkenntnisse über Schichtdicken und Elektronendichten der einzelnen Schichten des PLFE-Membranstacks gewonnen werden. Die Gesamtschichtdicke der Membranstacks von PLFE auf dem Si-Wafer nahm zwischen 65 und 70°C um ca. 26% ab (Minimum bei $\sim 7,7$ nm). Dies rührte von der Abnahme der Wasserschichten zwischen den Membranstacks her, welche sich um ca. 64% verringerten. Dieses Verhalten konnte auch nicht durch eine Zunahme der Lipidschichtdicke von ca. 5% kompensiert werden. Die Länge der Kohlenwasserstoffketten verkürzte sich durch Konformationsänderung um ca. 9%, die Kopfgruppe aber vergrößerte sich um ca. 19%. Die Elektronendichte der Ketten nahm nur unwesentlich mit der Temperatur ab, während sich die Elektronendichte der Kopfgruppen ab einer Temperatur von $\sim 70^\circ\text{C}$ um 4% erhöhte. Die Elektronendichte der Kopfgruppen erhöhte sich ab einer Temperatur von $\sim 70^\circ\text{C}$ um 4%, während die Elektronendichte der Ketten nur unwesentlich mit der Temperatur abnahm. Mit dieser Abnahme ging eine Erniedrigung der Kettendicke einher, sodass eine laterale Verbreiterung der Kettenregion bis $\sim 70^\circ\text{C}$ vorherrschen muss.

Um das temperaturabhängige Verhalten der Kopfgruppen von PLFE zu studieren, wurden Fluoreszenzanisotropiemessungen mit dem Farbstoff TMA-DPH durchgeführt, da sich TMA-DPH vorzugsweise in die Kopfgruppenregion der Lipide einlagert. Die Messungen zeigten für PLFE, dass die Anisotropie bei einer Temperatur von $\sim 60^\circ\text{C}$ bzw. bei DPPC von $\sim 41^\circ\text{C}$ am kleinsten war. Demnach ist die Beweglichkeit des Fluorophors und damit der Kopfgruppen der Lipide bei dieser Temperatur am größten. Wie zu erwarten zeigte diese Messung bei DPPC durch die sprunghafte Änderung der Werte einen Phasenübergang von der $P_{\beta'}$ -Phase in die L_{α} -Phase. Dagegen ist bei PLFE lediglich eine kontinuierliche Änderung im Phasenübergangsbereich von $30 - 43^\circ\text{C}$ festzustellen.

Es wurde keine abrupte Änderung im Temperaturverlauf der Dichte bei PLFE festgestellt. Die Dichte fällt kontinuierlich mit steigender Temperatur. Im Gegensatz dazu wurde bei DPPC ein Sprung bei $\sim 41^\circ\text{C}$ im Kurvenverlauf beobachtet. Das berechnete partielle Volumen verhielt sich entsprechend und zeigte eine Diskontinuität bei $\sim 41^\circ\text{C}$ für DPPC und einen fast linearen Verlauf von $\nu(T)$ für

PLFE. Die Ultraschallmessungen ergaben für PLFE eine Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit bei $\sim 43^\circ\text{C}$, bei DDPC konnte ansatzweise den Vorübergang bei $\sim 34^\circ\text{C}$ und deutlich der Hauptübergang bei $\sim 41^\circ\text{C}$ beobachtet werden.

Die Ultraschallmessungen ermöglichten es durch die Kombination mit der Dichtemessung, die adiabatische Kompressibilität zu bestimmen. Wiederum ist eine sprunghafte Änderung bei DPPC bei $\sim 41^\circ\text{C}$ zu verzeichnen. PLFE hingegen zeigt einen fast linearen Verlauf mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei $\sim 43^\circ\text{C}$.

Mit Hilfe der DSC und PPC konnte weiterhin die Wärmekapazität und der thermische Ausdehnungskoeffizient der Systeme vermessen werden. DPPC besitzt in beiden Größen ein Maximum bei $\sim 41^\circ\text{C}$. PLFE zeigte gegenüber DPPC sowohl in der Wärmekapazität bei $\sim 34^\circ\text{C}$ als auch im thermischen Ausdehnungskoeffizienten bei $\sim 33^\circ\text{C}$ nur ein schwaches Maximum. Die sich daraus ergebende thermische Kompressibilität war, bis auf eine Änderung bei $\sim 35^\circ\text{C}$, linear ansteigend.

Schlussendlich konnte die relative Volumenfluktuationen der Lipidsysteme aus der isothermen Kompressibilität berechnet werden. Sie weisen ein ähnliches Temperaturabhängiges Verhalten auf wie die thermische Kompressibilität. Die geringe Volumenfluktuationen sind nicht verwunderlich, da Fluktuationen hoher Amplitude die Permeabilität der Membran signifikant erhöhen würden und damit die Membrantigrität der Archaeomembran bei den hohen Wachstumstemperaturen von *Sulfolobus acidocaldarius*, zerstören würde.

Werden die Ergebnisse von PLFE zusammenfassend betrachtet, so ergibt sich das Bild eines steifen Membranlipids, das sich bei Temperaturveränderungen nur wenig verändert. Im Temperaturbereich um $\sim 40^\circ\text{C}$ vollzieht sich eine mehr oder weniger kontinuierliche Phasenumwandlung, die sich jedoch nur in einigen strukturellen, dynamischen und thermodynamischen Parametern widerspiegelt.

Literaturverzeichnis

- [1] Woese, C. R., and G. E. Fox, 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5088–5090. <http://www.pnas.org/content/74/11/5088.full.pdf>.
- [2] Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, 2004. Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH, 4 edition.
- [3] Zuber, H., 1979. Thermophile Bakterien. *Chemie in unserer Zeit* 13:165–175.
- [4] Brock, T. D., 1985. Life at High Temperatures. *Science* 230:132–138. <http://dx.doi.org/10.1126/science.230.4722.132>.
- [5] Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly, and R. L. Weiss, 1972. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol* 84:54–68.
- [6] Shivvers, D. W., and T. D. Brock, 1973. Oxidation of elemental sulfur by Sulfolobus acidocaldarius. *J Bacteriol* 114:706–710.
- [7] Brock, T. D., 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag. <http://digital.library.wisc.edu/1711.dl/Science.BrockTher>.
- [8] Robb, F. T., G. Antranikian, D. W. Grogan, and A. J. M. Driessen, 2008. Thermophiles: Biology and Technology at High Temperatures. CRC Press, 1 edition. ISBN-10: 0849392144.
- [9] Luzzati, V., A. Gambacorta, M. DeRosa, and A. Gulik, 1987. Polar lipids of thermophilic prokaryotic organisms: chemical and physical structure. *Annu Rev*

- Biophys Biophys Chem* 16:25–47. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bb.16.060187.000325>.
- [10] Weiss, R. L., 1974. Subunit cell wall of *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Bacteriol* 118:275–284.
- [11] Choquet, C. G., G. B. Patel, T. J. Beveridge, and G. D. Sprott, 1994. Stability of pressure-extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:375–384.
- [12] Gambacorta, A., A. Gliozzi, and M. D. Rosa, 1995. Archaeal lipids and their biotechnological applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:116–131.
- [13] Lipowsky, R., and E. Sackmann, editors, 1995. Structure and Dynamics of Membranes: I. From Cells to Vesicles / II. Generic and Specific Interactions, volume 8. North-Holland.
- [14] Singer, S. J., and G. L. Nicolson, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731. <http://dx.doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- [15] kunst.uni stuttgart, 2008. Membrane. Internet. http://www.kunst.uni-stuttgart.de/architektur/diplws99/Lebensform_Zelle/Diplom_Lebensform_Zelle_MenschlicheZelle.htm.
- [16] Winter, R., A. Gabke, C. Czeslik, and P. Pfeifer, 1999. Power-law fluctuations in phase-separated lipid membranes. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 60:7354–7359.
- [17] Gambacorta, A., A. Trincone, J. P. Nicolas, L. Lama, and M. D. Rosa, 1994. Unique Features of Lipids in Archaea. *Systematic and Applied Microbiology* 16:518–527.
- [18] Patel, G. B., and G. D. Sprott, 2006. Archaeal Membrane Lipids. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-26:1–9.
- [19] Jacquemet, A., J. Barbeua, L. Lemiègrea, and T. Benvegna, 2009. Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications. *Biochimie* 91:1–7.

- [20] Nishihara, M., H. Morii, K. Matsuno, M. Ohga, K. O. Stetter, and Y. Koga, 2002. Structural analysis by reductive cleavage with LiAlH₄ of an allyl ether choline-phospholipid, archaetidylcholine, from the hyperthermophilic methanarchaeon *Methanopyrus kandleri*. *Archaea* 1:123–131.
- [21] Rosa, M. D., S. D. Rosa, A. Gambacorta, and J. D. Bu'Lock, 1980. Structure of calditol, a new branched-chain nonitol, and of the derived tetraether lipids in thermoacidophile archaebacteria of the *Caldariella* group. *Phytochemistry* 19:249–254.
- [22] Rosa, M. D., A. Gambacorta, and B. Nicolaus, 1980. Regularity of isoprenoid biosynthesis in the ether lipid of archaebacteria. *Phytochemistry* 19:791–793.
- [23] Rosa, M. D., E. Esposito, A. Gambacorta, B. Nicolaus, and J. D. Bu'Lock, 1980. Effects of temperature on ether lipid composition of *Caldariella Acidophila*. *Phytochemistry* 19:827–831.
- [24] Rosa, M. D., A. Gambacorta, B. Nicolaus, S. Sodano, and J. D. Bu'Lock, 1980. Structural regularities in tetraether lipids of *Caldariella* and their biosynthetic and phyletic implications. *Phytochemistry* 19:833–836.
- [25] Gliozzi, A., R. Rolandi, M. D. Rosa, and A. Gambacorta, 1983. Monolayer black membranes from bipolar lipids of archaebacteria and their temperature-induced structural changes. *J Membr Biol* 75:45–56.
- [26] Gliozzi, A., G. Paoli, M. D. Rosa, and A. Gambacorta, 1983. Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic Archaebacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 735:234–242.
- [27] Elferink, M. G., J. G. de Wit, A. J. Driessen, and W. N. Konings, 1994. Stability and proton-permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids. *Biochim Biophys Acta* 1193:247–254.
- [28] Relini, A., D. Cassinadri, Q. Fan, A. Gulik, Z. Mirghani, M. D. Rosa, and A. Gliozzi, 1996. Effect of physical constraints on the mechanisms of membrane fusion: bolaform lipid vesicles as model systems. *Biophys J* 71:1789–1795. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79379-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79379-7).

- [29] van de Vossenberg, J. L., A. J. Driessen, and W. N. Konings, 1998. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* 2:163–170.
- [30] Komatsu, H., and P. L. Chong, 1998. Low permeability of liposomal membranes composed of bipolar tetraether lipids from thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemistry* 37:107–115. <http://dx.doi.org/10.1021/bi972163e>.
- [31] Albers, S. V., J. L. van de Vossenberg, A. J. Driessen, and W. N. Konings, 2000. Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. *Front Biosci* 5:D813–D820.
- [32] Bagatolli, L., E. Gratton, T. K. Khan, and P. L. Chong, 2000. Two-photon fluorescence microscopy studies of bipolar tetraether giant liposomes from thermoacidophilic archaeobacteria *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biophysical Journal* 79:416–425.
- [33] Langworthy, T. A., and J. L. Pond, 1986. Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* 7:253–257.
- [34] Rosa, M. D., A. Gambacorta, and A. Gliozzi, 1986. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological Reviews* 50:70–80.
- [35] Kates, M., 1992. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochem Soc Symp* 58:51–72. <http://symposia.biochemistry.org/bssymp/toc.htm>.
- [36] Langworthy, T. A., W. R. Mayberry, and P. F. Smith, 1974. Long-chain glycerol diether and polyol dialkyl glycerol triether lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* 119:106–116. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=245579&blobtype=pdf>.
- [37] Lo, S. L., and E. L. Chang, 1990. Purification and characterization of a liposomal-forming tetraether lipid fraction. *Biochem Biophys Res Commun* 167:238–243.

- [38] Rosa, M. D., and A. Gambacorta, 1988. The lipids of archaebacteria. *Prog Lipid Res* 27:153–175.
- [39] Melchior, D. L., 1982. Lipid phase transitions and regulation of membrane fluidity in prokaryotes. *Current Topics in Membranes and Transport* 17:263–316.
- [40] Winter, R., and F. Noll, 1998. Methoden der Biophysikalischen Chemie. Teubner Studienbücher.
- [41] Chong, P. L.-G., R. Ravindra, M. Khurana, V. English, and R. Winter, 2005. Pressure perturbation and differential scanning calorimetric studies of bipolar tetraether liposomes derived from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biophysical Journal* 89:1841–1849. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.063933>.
- [42] Elferink, M. G., J. G. de Wit, R. Demel, A. J. Driessen, and W. N. Konings, 1992. Functional reconstitution of membrane proteins in monolayer liposomes from bipolar lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem* 267:1375–1381.
- [43] MacDonald, R. C., R. I. MacDonald, B. P. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, and L. R. Hu, 1991. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1061:297–303.
- [44] Prendergast, F. G., R. P. Haugland, and P. J. Callahan, 1981. 1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers. *Biochemistry* 20:7333–7338.
- [45] Lentz, B. R., 1989. Membrane "fluidity" detected by diphenylhexatriene probes. *Chem Phys Lipids* 50:171–190.
- [46] Lakowicz, J. R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science, third edition edition.
- [47] DMA 5000 Messgeräte für Dichte, relative Dichte und Konzentration. Anton-Paar-Str. 20 A-8054 Graz. http://www.anton-paar.com/ap/servlet/ap.dl.File/dl/46A959014C0A73FAC1256DD50051424F/B26IP02-C_de.pdf.

- [48] Eggers, F., and T. Funck, 1973. Ultrasonic measurements with milliliter liquid samples in the 0.5-100 MHz range. *Review of Scientific Instruments* 44:969–977.
- [49] Sarvazyan, A. P., 1991. Ultrasonic velocimetry of biological compounds. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 20:321–342. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bb.20.060191.001541>.
- [50] Kaatze, U., B. O’Driscoll, E. Hanke, M. Jäger, and V. Buckin, 2006. Ultrasonic calorimetry of membranes. *Pharm Technol Eur* 47:1–5.
- [51] Mabrey, S., and J. M. Sturtevant, 1976. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:3862–3866.
- [52] Zlatanova, J., S. M. Lindsay, and S. H. Leuba, 2000. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol* 74:37–61.
- [53] West, P., and A. Ross. An Introduction to Atomic Force Microscopy Modes. Pacific Nanotechnology, Inc., 3350 Scott Blvd Nr. 29 .Santa Clara, CA 95054.
- [54] Hawkes, P. W., 2005. Advances in Imaging and Electron Physics, volume 135. Academic Press.
- [55] Binnig, Quate, and Gerber, 1986. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56:930–933.
- [56] Morris, V. J., A. R. Kirby, and A. P. Gunning, 1999. Atomic Force Microscopy for Biologists. Imperial College Press.
- [57] Khurana, M., 2006. X-ray Reflectivity Studies of Solid Supported Model Biomembranes. Ph.D. thesis, Universität Dortmund.
- [58] Salditt, T., C. Li, A. Spaar, and U. Mennicke, 2002. X-ray reflectivity of solid-supported, multilamellar membranes. *The European Physical Journal E* 7:105–116.
- [59] Tolan, M., 1998. X-ray Scattering from Soft-matter Thin Films: Materials Science and Basic Research. Springer-Verlag.

- [60] Born, M., and E. Wolf, 2003. Principles of Optics. Cambridge University Press, seventh edition.
- [61] Kiessig, H., 1931. Irntterferenz von Röntgenstrahlen an dünnen Schichten. *Annalen der Physik* 10:769–788.
- [62] Parratt, L. G., 1954. Surface Studies of Solids by Total Reflection X-Rays. *Physical Review* 95:359–369.
- [63] Katsaras, J., and M. J. Watson, 2000. Sample cell capable of 100diffraction of aligned lipid multibilayers. *Review of Scientific Instruments* 71:1737–1739. <http://link.aip.org/link/?RSINAK/71/1737/1>.
- [64] Mennicke, U., and T. Salditt, 2002. Preparation of Solid-Supported Lipid Bilayers by Spin-Coating. *Langmuir* 18:8172–8177. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la025863f>.
- [65] Rendell, D., 1987. Fluorescence and Phosphorescence spectroscopy. John Wiley & Sons.
- [66] Lentz, B. R., 1993. Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 64:99–116.
- [67] Kuhry, J.-G., G. Duportail, C. Bronner, and G. Laustriat, 1985. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene. *Biochimica et Biophysica Acta* 845:60–67.
- [68] Kharakoz, D. P., A. Colotto, K. Loher, and P. Laggner, 1993. Fluid-gel interphase line tension and density fluctuations in dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles: an ultrasonic study. *J Phys Chem* 97:9844–9851.
- [69] Privalov, P. L., 1980. Scanning Microcalorimeters for Studying Macromolecules. *Pure and Applied Chemistry* 52:479–497. <http://media.iupac.org/publications/pac/1980/pdf/5202x0479.pdf>.
- [70] Nagle, J. F., 1976. Theory of lipid monolayer and bilayer phase transitions: effect of headgroup interactions. *J Membr Biol* 27:233–250.

- [71] Nagle, J. F., and D. A. Wilkinson, 1978. Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions. *Biophys J* 23:159–175. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85441-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85441-1).
- [72] Melchior, D. L., F. J. Scavitto, and J. M. Steim, 1980. Dilatometry of dipalmitoyllecithin-cholesterol bilayers. *Biochemistry* 19:4828–4834.
- [73] Schrader, W., H. Ebel, P. Grabitz, E. Hanke, T. Heimburg, M. Hoeckel, M. Kahle, F. Wente, and U. Kaatze, 2002. Compressibility of Lipid Mixtures Studied by Calorimetry and Ultrasonic Velocity Measurements. *J Phys Chem B* 106:6581–6586.
- [74] Kluge, G., and G. Neugebauer, 1994. Grundlagen der Thermodynamik. Spektrum Akademischer Verlag.
- [75] Braunschweig, T. U. Phasenübergang. Internet. http://www.pci.tu-bs.de/aggericke/PC1/Kap_IV/Phasen_Ordnung.htm.
- [76] Kanichay, R., L. T. Boni, P. H. Cooke, T. K. Khan, and P. L.-G. Chong, 2003. Calcium-induced aggregation of archaeal bipolar tetraether liposomes derived from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Archaea* 1:175–183.
- [77] Chang, E. L., 1994. Unusual thermal stability of liposomes made from bipolar tetraether lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 202:673–679. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1994.1983>.
- [78] Tenchov, B. G., L. J. Lis, and P. J. Quinn, 1987. Mechanism and kinetics of the subtransition in hydrated L-dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 897:143–151.
- [79] Gulik, A., V. Luzzati, M. D. Rosa, and A. Gambacorta, 1985. Structure and polymorphism of bipolar isopranyl ether lipids from archaebacteria. *J Mol Biol* 182:131–149.
- [80] Khan, T. K., and P. L. Chong, 2000. Studies of archaebacterial bipolar tetraether liposomes by perylene fluorescence. *Biophysical Journal* 78:1390–1399. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1300737&blobtype=pdf>.

-
- [81] Kao, Y. L., E. L. Chang, and P. L. Chong, 1992. Unusual pressure dependence of the lateral motion of pyrene-labeled phosphatidylcholine in bipolar lipid vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 188:1241–1246. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91364-V](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(92)91364-V).

LITERATURVERZEICHNIS

Anhang

Röntgen-Reflektometrie-Daten an PLFE

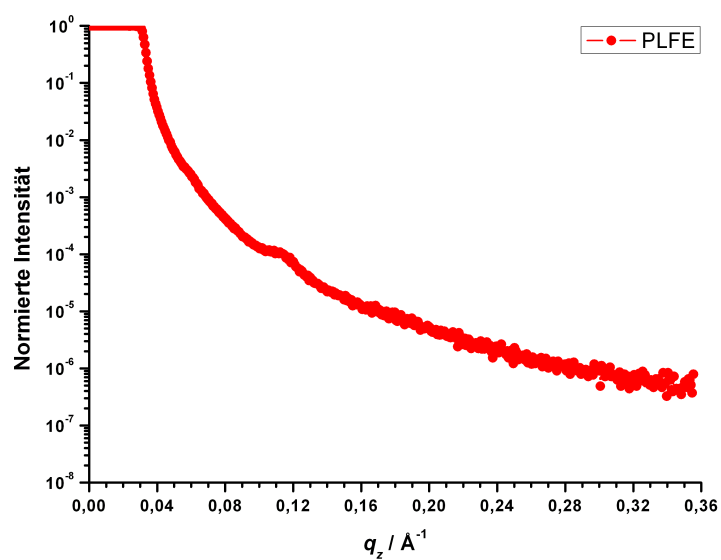


Abbildung 4.1: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 24,9°C kurz nach dem Einlegen in die Messzelle

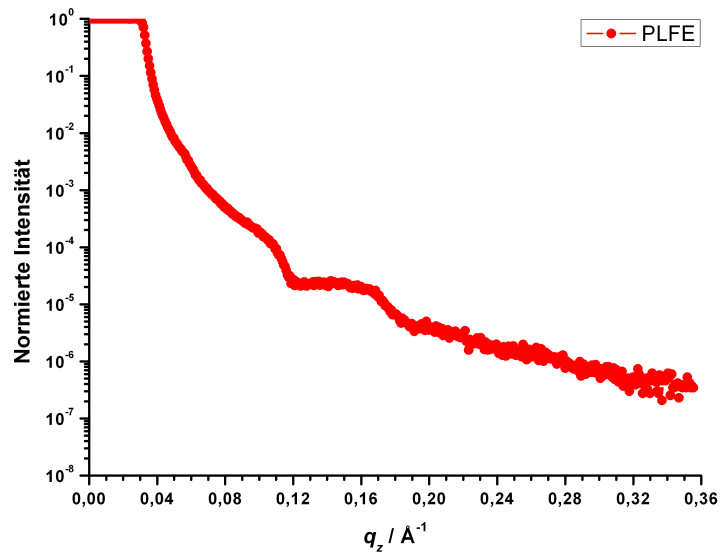


Abbildung 4.2: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 25,0°C nach Hydratation

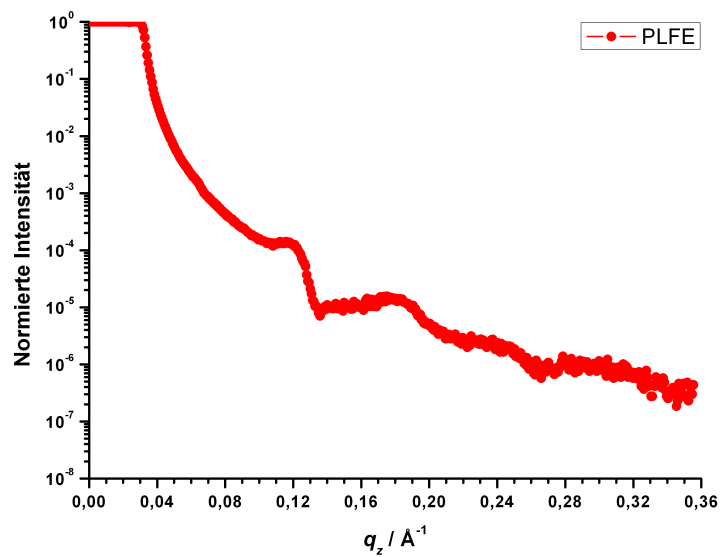


Abbildung 4.3: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 30,1°C

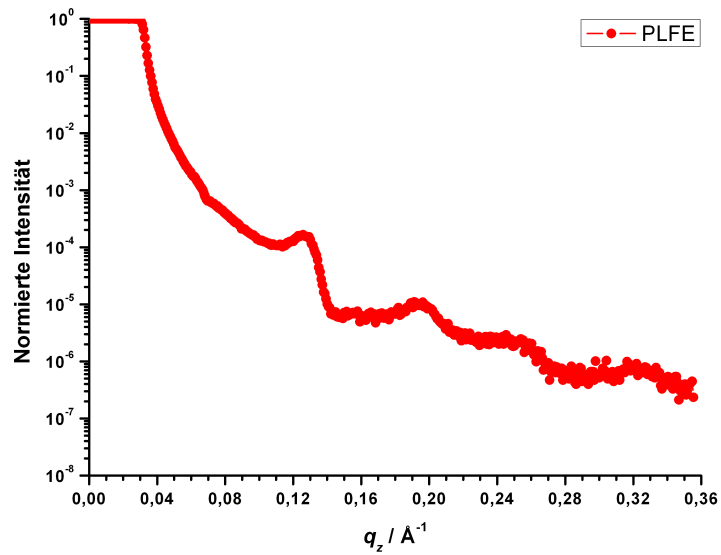


Abbildung 4.4: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 34,9°C

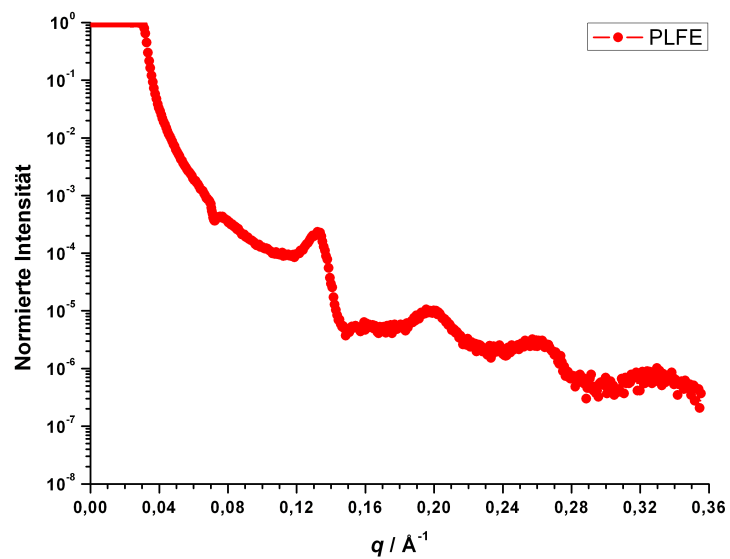


Abbildung 4.5: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 39,9°C

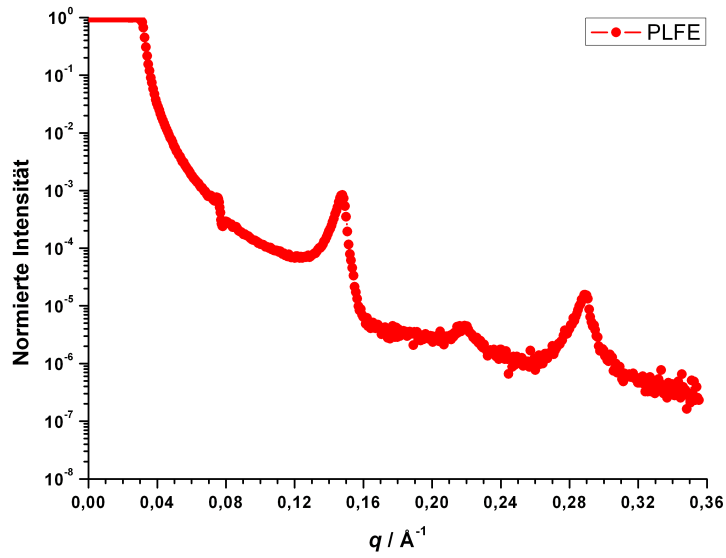


Abbildung 4.6: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 45,1°C

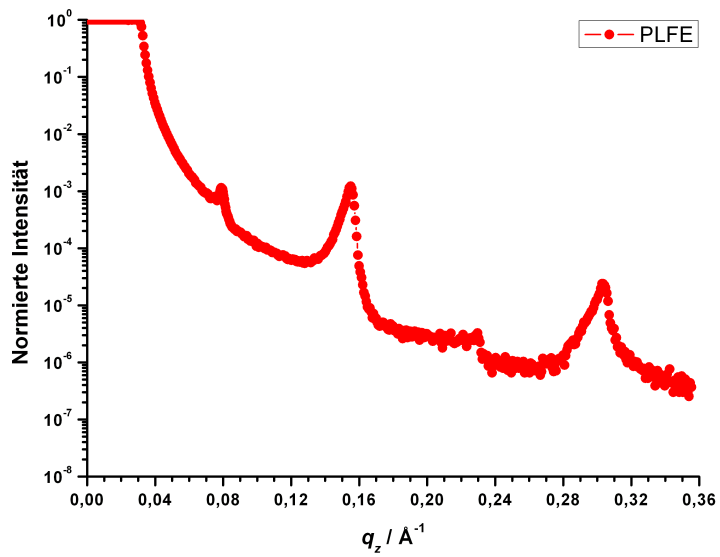


Abbildung 4.7: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 49,9°C

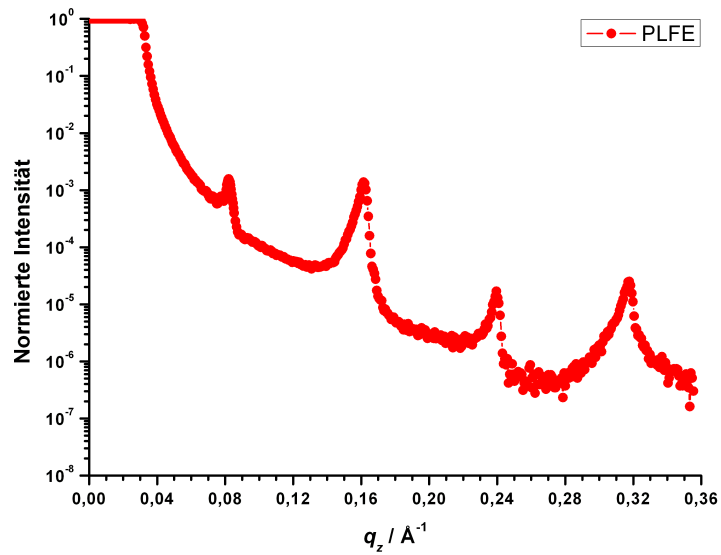


Abbildung 4.8: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 54,9°C

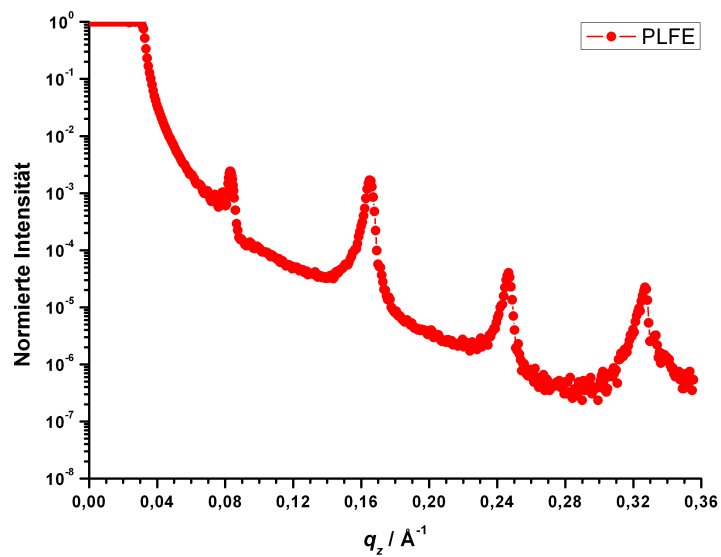


Abbildung 4.9: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 60,0°C

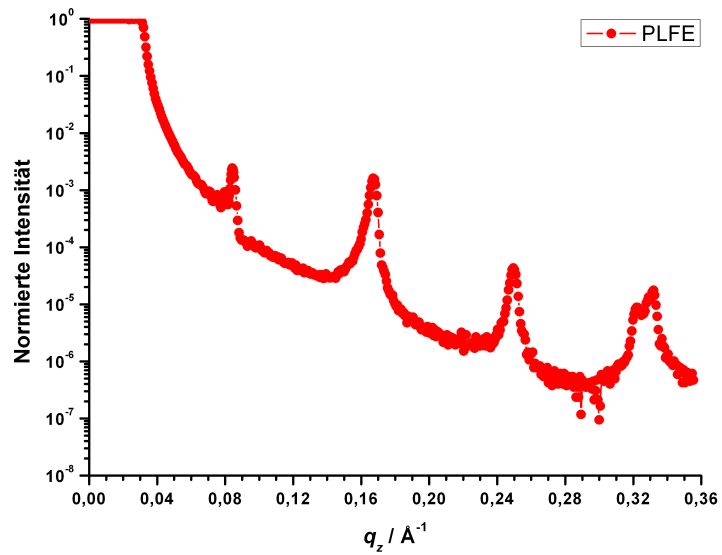


Abbildung 4.10: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 65,1°C

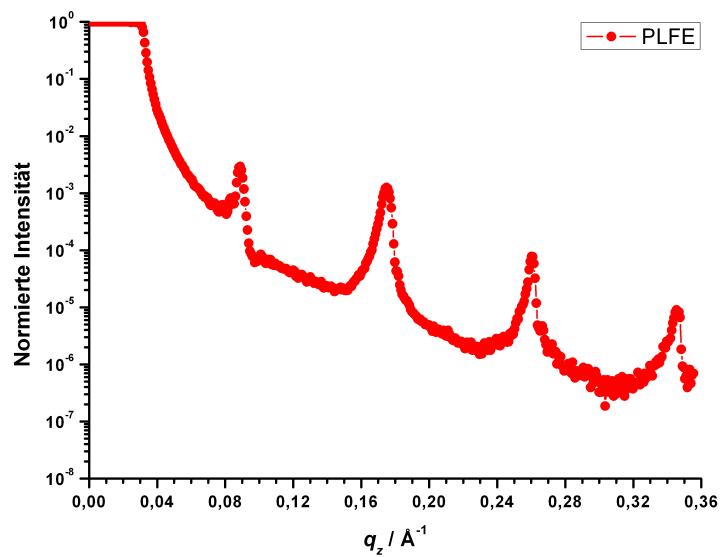


Abbildung 4.11: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 69,9°C

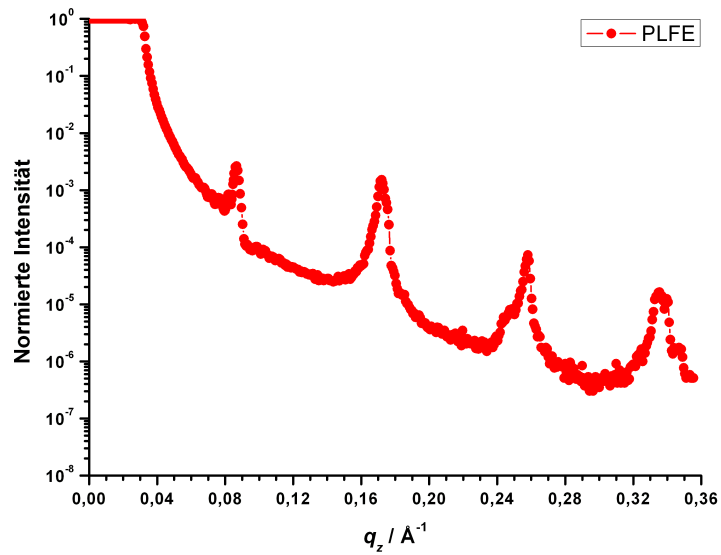


Abbildung 4.12: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 74,9°C

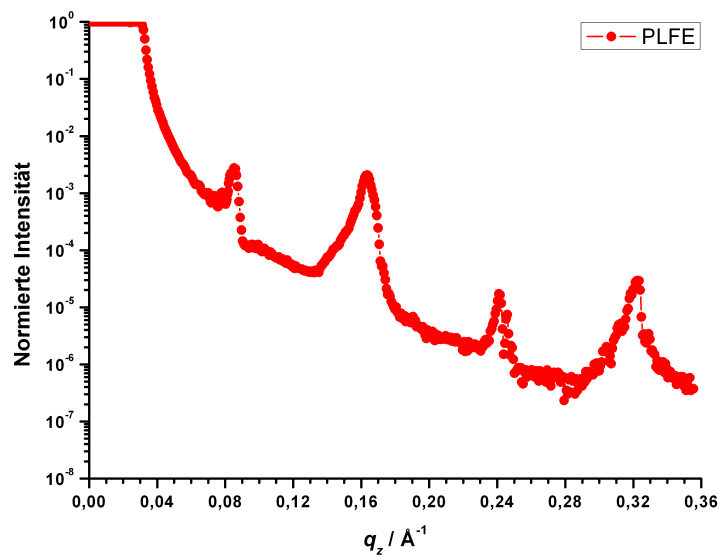


Abbildung 4.13: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 80,0°C

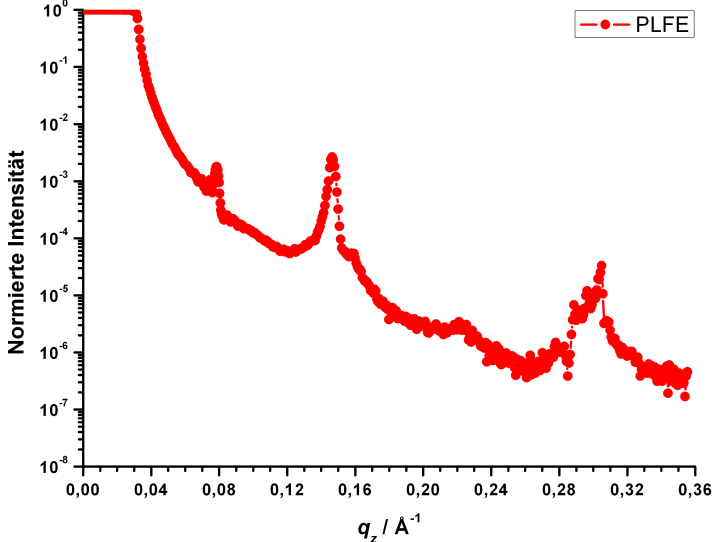


Abbildung 4.14: Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 85,0°C

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|---|
| a | Beschleunigung |
| \mathbf{a}_j | Basisvektoren des reellen Raums |
| A | Querschnittsfläche |
| A_0 | Schwingungsamplitude |
| AFM | Rasterkraftmikroskopie |
| \mathbf{b}_i | Basisvektoren des reziproken Gitters |
| c | Konzentration |
| c_M | Massenkonzentration des Lipids |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius |
| C_p | Wärmekapazität |
| d | Dicke der Gesamtschicht bzw. Netzebenenabstand |
| d_g | Dicke der Gesamtschicht (Lipid + Wasser) |
| D | Abstand zwischen Sender und Empfänger im Ultraschallresonator |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPPC | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycerophosphatidylcholin |
| DSC | dynamische Differenzkalorimetrie |
| $\mathbf{E}(\mathbf{r})$ | elektrische Feldstärke |
| E_0 | maximale Amplitude |
| f | Eigenfrequenz des Systems |
| f_0 | Resonanzfrequenz |
| F_R | rücktreibende Kraft |
| G | Punkt im reziproken Gitter |

| | |
|----------------|--|
| GDGT | Glycerol-dialkyl-glyceryl tetraether |
| GDNT | Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraether |
| h | Heizrate |
| H | Enthalpie |
| Hz | Hertz |
| I | Intensität |
| I_0 | einfallende Intensität |
| J | Joule |
| k | Federkonstante |
| k | polarisationsunabhängige Abschwächung der Emission |
| \mathbf{k}_i | einfallender Wellenvektor |
| \mathbf{k}_f | gestreuter Wellenvektor |
| keV | kiloelektronenvolt |
| K | Kelvin |
| K_S | adiabatische Kompressibilität |
| K_T | isotherme Kompressibilität |
| L_α | flüssigkristalline Phase |
| $L_{\beta'}$ | Gelphase |
| L_c | Sub-Gelphase |
| LUV | große unilamellare Vesikel |
| m | Leergewicht des U-Rohrs |
| m_i | ganzzahliges Vielfaches |
| m_U | Gesamtmasse des U-Rohrs |
| mg | Milligramm |
| mL | Milliliter |
| mV | Millivolt |
| MLV | multilamellare Vesikel |
| n | ganzzahliges Vielfaches |
| n | Brechungsindex |
| n_j | Brechungsindex der Schicht mit Index j |

| | |
|------------------------|--|
| $n(r)$ | ortsabhängige Brechzahl |
| min | Minute |
| nm | Nanometer |
| ns | Nanosekunde |
| N | Laufindex der Schichten im Parratt-Modell |
| N | Newton |
| p | Druck |
| pm | Pikometer |
| P | Heizleistung |
| $P_{\beta'}$ | Gelphase mit welliger Überstruktur |
| PET | Polyethylenterephthalat |
| PLFE | Polar Lipid Fraction E |
| PPC | Druck-Perturbations-Kalorimetrie |
| \mathbf{q} | Streuvektor |
| $q_{z,\text{Kiessig}}$ | Streuvektor der Kiessig-Oszillation senkrecht zur Oberfläche |
| Q_{rev} | Wärmemenge für reversible Prozesse |
| r_{\perp} | Fresnelkoeffizient der senkrecht reflektierten Strahlung |
| r_{\parallel} | Fresnelkoeffizient der parallel reflektierten Strahlung |
| r_0 | maximale Anisotropie |
| r_{el} | Elektronenradius |
| R | DSC-Referenzzelle |
| R_f | Intensität der reflektierten Röntgenstrahlung |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| s | Sekunde |
| $s(x)$ | räumliche Verschiebung bzw. Auslenkung |
| S | DSC-Probenzelle |
| S | Entropie |
| S_H | horizontale Empfindlichkeit |
| S_V | vertikale Empfindlichkeit |
| t | Zeit |
| t_{\perp} | Fresnelkoeffizient der senkrecht transmittierten Strahlung |

| | |
|--------------------------|---|
| t_{\parallel} | Fresnelkoeffizient der parallel transmittierten Strahlung |
| T | Temperatur |
| T | Schwingungsdauer |
| T_0 | Anfangstemperatur |
| T_m | Temperatur der Phasenumwandlung |
| TMA-DPH | 1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl- 1,3,5-hexatrien-P-toluolsulfonat |
| u | Schallgeschwindigkeit |
| V | Volumen |
| V^0 | partielles molares Volumen einer Lipidlösung |
| ν_0 | partielles spezifisches Volumen |
| x | Auslenkung |
| X | Verhältnis der transmittierten und reflektierten Amplitude |
| XRR | Röntgenreflektometrie |
| z | zurückgelegter Weg im Medium |
| Å | Ångström |
| α | Expansionskoeffizient |
| β | Absorptionsterm bzw. Imaginärteil des Brechungsindex |
| β | Kompressibilitätskoeffizient |
| δ | Dispersionsterm bzw. Realteil des Brechungsindex |
| δ_{ij} | Kronecker Delta |
| κ_S | spezifische adiabatische Kompressibilität |
| κ_T | spezifische isotherme Kompressibilität |
| λ | Wellenlänge |
| λ_{Basis} | Basiswellenlänge im Ultraschallresonator |
| μ | Absorptionskoeffizient |
| μm | Mikrometer |
| μL | Mikroliter |
| ρ | Dichte |
| ρ_0 | Dichte des Lösungsmittels |
| ρ_{el} | Elektronendichte |

| | |
|---------------------------|--|
| τ | Fluoreszenzlebensdauer |
| ω_0 | Kreisfrequenz des harmonischen Oszillators |
| θ_c | kritischer Winkel |
| θ_i | Einfallswinkel |
| θ_f | Ausfallswinkel |
| θ_{Kiessig} | Winkel der Kiessig-Oszillation |
| Δ | Änderung bzw. Differenz einer Größe |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Evolutionärer Verlauf des Lebens | 1 |
| 1.2 | Lebensraum von thermophilen Bakterien | 2 |
| 1.3 | Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht und peripheren sowie integralen Proteinen | 4 |
| 1.4 | Struktur der Archaeenmembran | 5 |
| 1.5 | Struktur von PLFE | 7 |
| 1.6 | Struktur von DPPC | 8 |
| 1.7 | Schematische Darstellung der thermotropen lamellaren Phasen von DPPC | 9 |
| 2.1 | Dichtemessgerät mit U-Rohr | 14 |
| 2.2 | Schematische Darstellung des Hohlraumresonators mit stehenden Wellen | 16 |
| 2.3 | Bildung von stehenden Wellen durch Reflektion und Interferenz im Resonator | 17 |
| 2.4 | Longitudinale Welle und Auslenkung der Moleküle aus der Gleichgewichtsposition im betrachteten Volumenelement | 18 |
| 2.5 | Schematischer Aufbau einer DSC-Apparatur | 21 |
| 2.6 | Schematischer Aufbau und Wirkungsweise eines Rasterkraftmikroskops | 24 |
| 2.7 | AFM-Spitze eines Cantilevers | 25 |
| 2.8 | Modifizierter schematischer Aufbau des Röntgendiffraktometers . . . | 26 |
| 2.9 | Schematische Darstellung zur Herleitung der Bragg-Gleichung | 27 |

| | | |
|------|---|----|
| 2.10 | Modifiziertes Schema des reziproken Raums | 29 |
| 2.11 | Normierte Reflektionskurve von DPPC im logarithmischen Maßstab | 32 |
| 2.12 | Stapel von Schichten mit verschiedenen Brechungsindizes und der reflektierten und transmittierten Strahlung an deren Grenzschichten | 35 |
| 2.13 | Prinzip des Nickelfilters zur Abschwächung der K_β -Strahlung | 37 |
| 2.14 | Jablonski-Termschema | 38 |
| 2.15 | Schematische Darstellung der Polarisationsrichtungen | 41 |
| 2.16 | Strukturformel von TMA-DPH | 42 |
| 3.1 | Ultraschallgeschwindigkeitszahl von DPPC und PLFE | 45 |
| 3.2 | Ultraschallmessung von PLFE | 46 |
| 3.3 | Temperaturabhängigkeit der Dichte ρ von DPPC und PLFE | 46 |
| 3.4 | Partielles spezifisches Volumen von DPPC und PLFE | 47 |
| 3.5 | Spezifische adiabatische Kompressibilität von PLFE und DPPC | 49 |
| 3.6 | Spezifische adiabatische Kompressibilität von PLFE | 49 |
| 3.7 | Wärmekapazität von DPPC aus der DSC-Messung | 50 |
| 3.8 | Wärmekapazität von PLFE aus der DSC-Messung | 51 |
| 3.9 | Thermischer Ausdehnungskoeffizient von DPPC und PLFE | 52 |
| 3.10 | Thermischer Ausdehnungskoeffizient α von PLFE aus der Dichte- und PPC-Messung | 54 |
| 3.11 | Thermischer Ausdehnungskoeffizient α von DPPC aus der Dichte- und PPC-Messung | 55 |
| 3.12 | Partielle spezifische isotherme Kompressibilität von DPPC und PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur | 55 |
| 3.13 | Partielle spezifische isotherme Kompressibilität von PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur | 56 |
| 3.14 | Überblick über Änderungen thermodynamischer Größen bei A) Phasenübergängen erster Ordnung B) Phasenübergängen zweiter Ordnung ⁷⁵ | 57 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.15 | Volumenfluktuationen von DPPC und PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur | 58 |
| 3.16 | Volumenfluktuationen von PLFE in Abhängigkeit von der Temperatur | 58 |
| 3.17 | AFM-Aufnahme | 60 |
| 3.18 | Reflektionskurve von PLFE mit äquidistanten Braggreflexen bei 54,9 °C und 100% Hydratation | 61 |
| 3.19 | Deutliche Aufspaltung des Braggreflexes von PLFE bei 65,1 °C und 100% Hydratation bei hohen q_z -Werten | 62 |
| 3.20 | Zeitliche Entwicklung der Gesamtschichtdicke d_g des PLFE-Lipidfilms in der Probenkammer | 63 |
| 3.21 | Zeitliche Entwicklung der Gesamtschichtdicke d_g des DPPC-Lipidfilms in der Probenkammer | 64 |
| 3.22 | Temperaturabhängige Änderung der Gesamtschichtdicke d_g des DPPC-Lipidfilms | 64 |
| 3.23 | Temperaturabhängige Änderung der Gesamtschichtdicke des PLFE-Lipidfilms | 65 |
| 3.24 | Temperaturabhängige Änderung der Schichtdicken sämtlicher in Parratt angenommenen Schichten | 66 |
| 3.25 | Temperaturabhängige Änderung der Schichtdicke des reinen PLFE-Lipids | 67 |
| 3.26 | Temperaturabhängige Änderung der Schichtdicke der Kopfgruppe und Kettenregion von PLFE | 68 |
| 3.27 | Temperaturabhängige Änderung der mit Parratt berechneten Elektronendichte der Kopfgruppe und Kette von PLFE | 68 |
| 3.28 | Statische Fluoreszenzanisotropie von DPPC und PLFE | 69 |
| 4.1 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 24,9°C kurz nach dem Einlegen in die Messzelle | I |
| 4.2 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 25,0°C nach Hydratation | II |
| 4.3 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 30,1°C | II |

| | | |
|------|--|------|
| 4.4 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 34,9°C | III |
| 4.5 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 39,9°C | III |
| 4.6 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 45,1°C | IV |
| 4.7 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 49,9°C | IV |
| 4.8 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 54,9°C | V |
| 4.9 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 60,0°C | V |
| 4.10 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 65,1°C | VI |
| 4.11 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 69,9°C | VI |
| 4.12 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 74,9°C | VII |
| 4.13 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 80,0°C | VII |
| 4.14 | Normierte Reflektionskurve von PLFE bei 85,0°C | VIII |

Danksagung

Herr Prof. Dr. Roland Winter, vielen herzlichen Dank für die Möglichkeit dieser Promotion, Ihr Vertrauen und die stete Bereitschaft, mir mit hilfreichen Diskussionen zur Seite zu stehen. Des Weiteren danke ich Ihnen dafür, dass Sie mir die Gelegenheit gaben, mehrere Messaufenthalte wahrzunehmen und als Besucher an anderen Arbeitsgruppen und Konferenzen teilzunehmen.

Herr Prof. Dr. Alfons Geiger, danke, dass Sie das Zweitgutachten übernommen haben.

Herr Prof. Chong, ohne die Arbeit Ihres Arbeitskreises zur Gewinnung der Lipide wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die Bereitstellung der Archaeonlipide.

Herr Dr. Claus Czeslik, danke für die Heranführung an die Röntgenreflektometrie und dass ich mich bei Fragen stets an dich wenden konnte.

Herr Dr. Roland Krívanek, danke für die Unterstützung und zahlreichen Diskussionen über die Ultraschall-, Dichte-, DSC- und PPC-Messungen.

Frau Dr. Lally Mitra, danke für die Einführung und die Unterstützung bei den DSC- und PPC-Messungen.

Herr Dr. Vytautas Smirnovas, ich danke dir sowohl für die Zeit, die du dir genommen hast, mit mir die AFM-Messungen durchzuführen und diese auch auszuwerten, als auch für die Diskussionen über die Ultraschall- und Dichtemessungen. Danke auch für die freundschaftliche Aufnahme in unserem gemeinsamen Büro.

XX

Frau Dr. Shuang Zhao, danke für die gute Atmosphäre im Büro und die Brocken chinesisch, die du mir beigebracht hast (xièxiēnǐ).

Herr Dr. Horstmann, die Pfade der Bürokratie sind manchmal sehr verschlungen. Vielen Dank für die Führung durch das Gewirr von Formularen.

Es ist immer von Vorteil jemanden zu kennen, der weiß, wo man die erforderlichen Utensilien findet oder wen man danach fragen kann. Danke, dass Sie mich an Ihrem Wissen teilnehmen ließen, **Herr Saskovic**.

Frau Dr. Katrin Weise, **Herrn Christoph Jeworrek** und **Frau Michaela Wegener**, danke ich für die Verbesserungsvorschläge und Korrekturen an dieser Arbeit.

Herr Dipl.-Phys. Klaus Giewekemeyer vom Institut für Röntgenphysik der Universität Göttingen, danke für deine Bemühungen, gemeinsam mit Christoph Jeworrek und mir bei unserem Besuch an deiner Universität ein Computerprogramm zur Auswertung der Röntgenreflektometrie-Messungen an Lipid-Multischichten zu entwickeln. Die dabei entwickelten Ansätze waren sehr hilfreich für die spätere Auswertung.

Herr Langner und **Herr Maserski** von der Mechanik- bzw. Elektronik-Werkstatt der Fakultät Chemie, danke für die Unterstützung bei Reparaturen und die Anfertigungen der Gerätschaften.

Mein Dank gilt auch den leitenden Wissenschaftlern der Beamline 18 ID - BIO-CAT bei der APS, CHICAGO, USA, die uns während unseres Messaufenthalts tatkräftig zur Seite standen. Im Zusammenhang damit möchte ich mich bei **Frau Dr. Christina Krywka** und **Herrn Dr. Vytautas Smirnovas** für die gute Zeit während dieses sehr lehrreichen und interessanten Aufenthalts bedanken.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Winter, **Andrea Kreusel**, **Kirsten Skodzik**, **Dr. Rajesh Mishra**, **Maximilian Andrews**, **Dr. Stefan Grudzielanek**, **Andrea Gohlke**, **Dr. Ralf**

Jansen, Suman Jha, Dr. Nadeem Javid, Dr. Monika Khurana, Dr. Julia Kraineva, Dr. Chiara Nicolini, Dr. Linus Okoro, Dr. Nagarajan Perisamy, Dr. Ewa Powalska, Matthias Pühse, Diana Radovan, Christian Reichhart, Daniel Sellin, Dr. Gurpreet Singh, Dr. Nikolai Smolin, Dr. Karsten Vogtt, Yong Zhai für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt gilt mein Dank **meiner Familie** und im Besonderen meiner Frau **Silke Voß** für die Unterstützung während der Zeit meines Studiums und Anfertigung dieser Arbeit. Silke, du hast mir in jeder Krisensituation beigestanden; ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig verfasst, in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung vorgelegt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle Stellen im Text, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht.