

../allgemeine_Bilder/HUlogo.png

**LEBENSWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT
INSTITUT FÜR BIOLOGIE**

Protokoll

Fachkurs: Zell- und Membranbiophysik

Versuch: Excimerenbildung von Pyren in Phospholipidmembranen

Betreuer: Dr. Thomas Korte, Dr. Peter Müller

Jan Piotraschke (piotrasj@hu-berlin.de)

Katja Frenzel (katjafrenzel@gmx.net)

Berlin, der 02. Juli 2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

NOTE: Einleitung länger machen -> 1-2 Seiten!

Der vorliegende Versuch untersucht die konzentrations- bzw. temperaturabhängige Excimerbildung von Pyren in Ei-PC (Eilecithin) und DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) Vesikeln.

Anschließend werden die verschiedenen Lateraldiffusionskoeffizienten von Pyren errechnet.

NOTE: Pyren (seine Besonderheiten: etc.etc.) ermöglicht eine Excimerenbildung basierend auf den Grundlagen

Der Versuch benutzt die Methode der Fluoreszenzmessung. Fluoreszenz kann i.a. bei einem delokalisierten π -System auftreten, indem ein Chromophor durch die elektrische Komponente einer elektromagnetischen Strahlung vom S_0 Grundenergiezustand ausgehend angeregt wird und nach einer gewissen Zeit der S_1 Zustand sich mit Strahlung wieder auf den Grundzustand relaxiert.

2 Material und Methoden

Eine detaillierte Beschreibung der Grundlagen, Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung ist dem Skript ? zu entnehmen.

NOTE: Beschreibung der Grundlagen aus dem Skript einfach übernehmen, so der Doktor
Die Messungen der Temperaturabhängigkeit der Excimerenbildung von Pyren in DPPC mit Cholesterol (siehe Skript Teil B (iii)) wurde nicht gemacht.

3 Ergebnisse

3.1 Anregungs- und Emissionsspektrum von Pyren

Ein Anregungs- und Emissionsspektrum von Pyren in Ei-PC Vesikeln wurde für das Verhältnis 1:50 (Pyren:Ei-PC) bei der Temperatur $T = 25^\circ\text{C}$ aufgenommen und in Abb. ?? dargestellt.

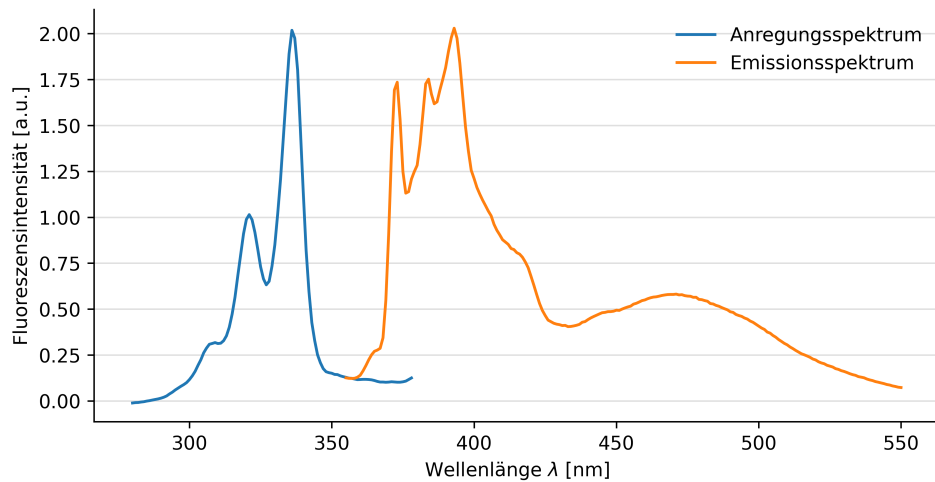


Abbildung 1: Anregungs- und Emissionsspektrum von Pyren; Verhältnis 1:50 (Pyren:Ei-PC); $T = 25^\circ\text{C}$, Versorgungsspannung Fluoreszenzspektrometer $U = 550\text{V}$

3.2 Fluoreszenzintensitäten des Monomers und des Excimers

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Monomere ($\lambda = 393\text{nm}$) und Excimere ($\lambda = 470\text{nm}$) von der Pyrenkonzentration und von der Temperatur untersucht.

Am Gerät 3 wurden die Messungen von Pyren in Ei-PC und am Gerät 4 die Messungen von Pyren in DPPC aufgenommen.

3.2.1 Fluoreszenzintensität als Funktion der Pyrenkonzentration

In der Abb. ?? sind die pyrenkonzentrationabhängigen Fluoreszenzintensität dargestellt. Die Messpunkte bei $\lambda = 393\text{nm}$ und bei $\lambda = 470\text{nm}$ wurden anschließend in Abb. ?? zusammengetragen.

3 Ergebnisse

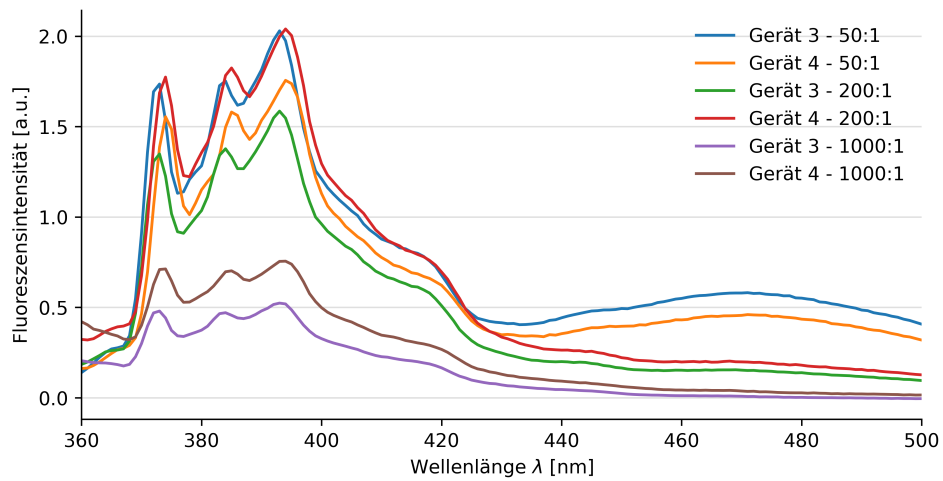


Abbildung 2: Fluoreszenzintensität Spektrum von verschiedenen Ei-PC:Pyren-Verhältnissen

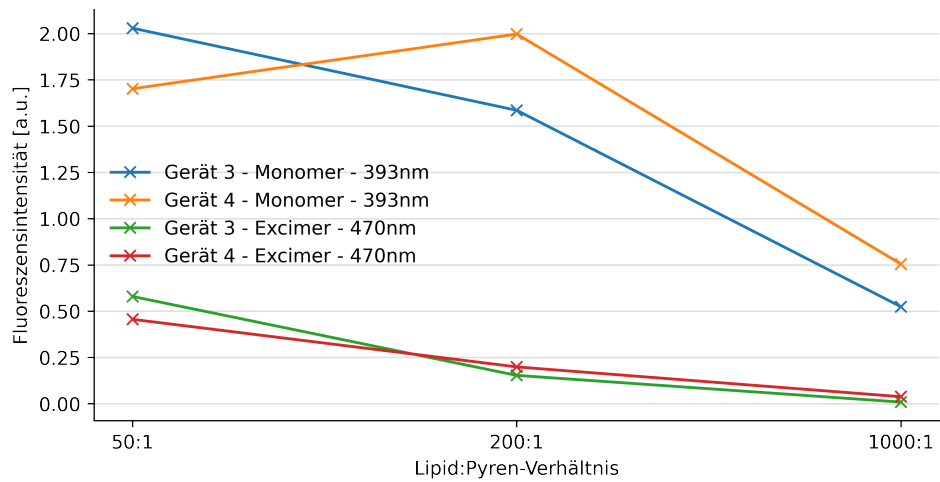


Abbildung 3: Fluoreszenzintensität als Funktion des Ei-PC:Pyren-Verhältnis

3.2.2 Fluoreszenzintensität als Funktion der Temperatur

Analog zum Verfahren aus dem Kapitel ?? wurden die Fluoreszenzmessdaten (bei Erhöhung der Temperatur im Messsystem) bestimmt und in den Abb. ?? und Abb. ?? dargestellt.

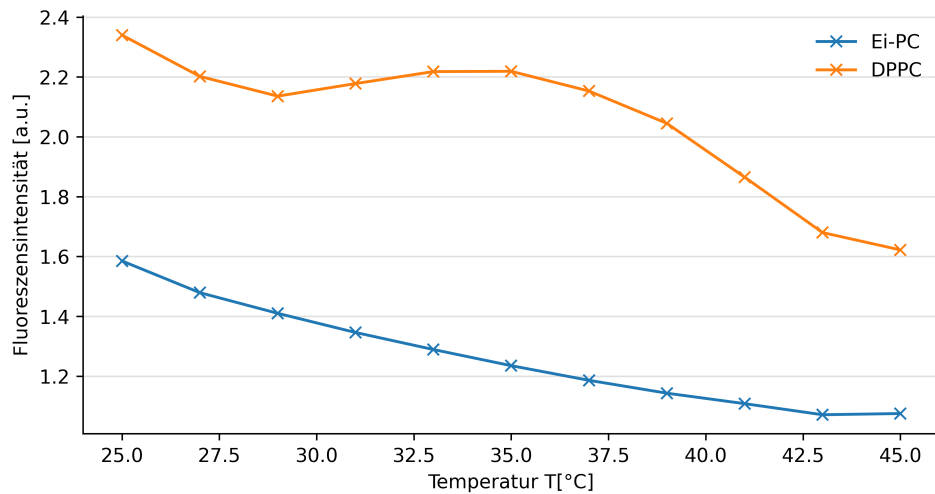


Abbildung 4: Pyren in Ei-PC bzw. DPPC Vesikeln; Fluoreszenzintensität des Monomer als Funktion der Temperatur

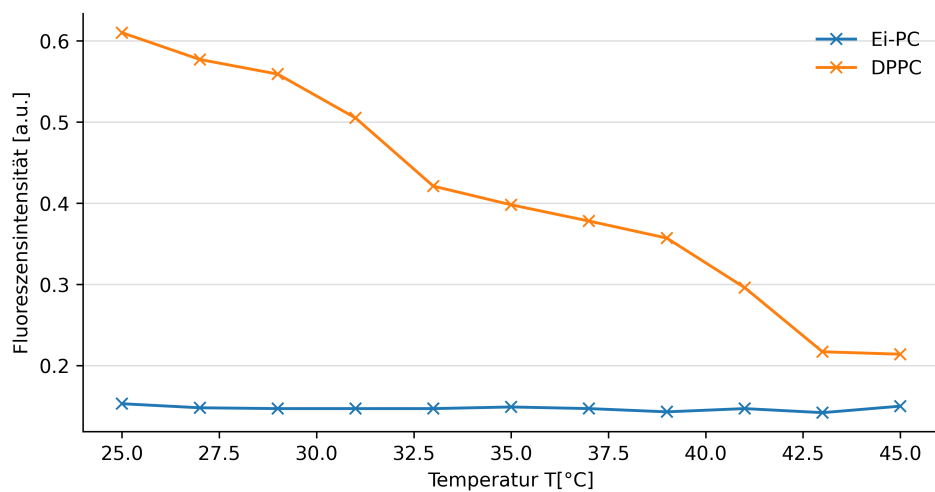


Abbildung 5: Pyren in Ei-PC bzw. DPPC Vesikeln; Fluoreszenzintensität des Excimer als Funktion der Temperatur

3.3 Verhältnis Intensitäten Excimer:Monomer

Folgend aus Kapitel ?? wurde das Verhältnis von Excimer (Abb. ??) zu Monomer (Abb. ??) berechnet und in Abb. ?? geplottet.

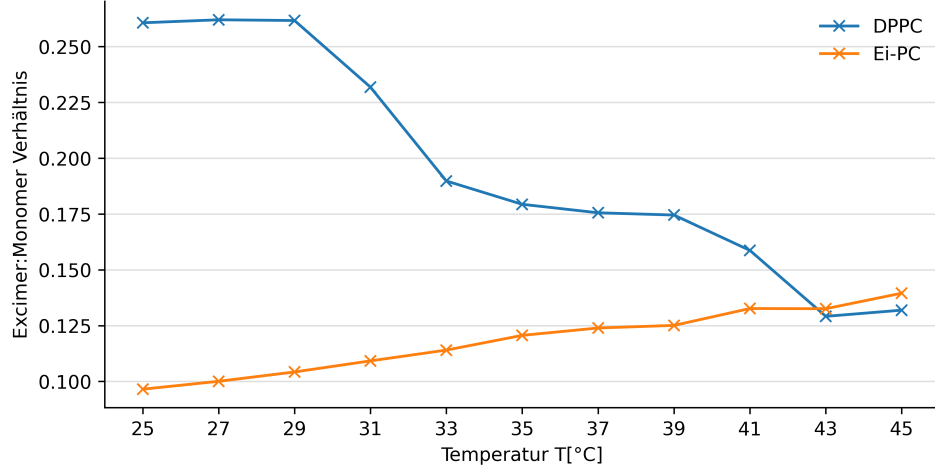


Abbildung 6: Verhältnis Intensitäten Excimer:Monomer für Pyren in Ei-PC bzw. DPPC; Messung der Temperaturabhängigkeit

3.4 Lateraldiffusionskoeffizienten

Die Berechnung der temperaturabhängigen Lateraldiffusionskoeffizienten D_{diff} erfolgte analog zum Skript Seite 20 ? :

Aufbauend auf der Annahme einer D_{diff} als Konzept einer Diffusion auf einem 2D Lipidgitter, wurde die Sprunghaftigkeit ν_i der Fluorophore von einem Gitterknotenpunkt zum Nächsten über die Formel ??

$$\nu_i = \langle n_s \rangle = \frac{I'}{I\kappa} \frac{1}{\tau_0} \frac{k_f}{k_{f'}} \quad (1)$$

mit der Formel ??

$$\langle n_s \rangle = \frac{2}{\pi X_{py}} \ln \frac{2}{X_{py}} \quad (2)$$

zur Berücksichtigung der mittleren Sprungszahl zwischen zwei Kollisionen $\langle n_s \rangle$ hinzugezogen.

D_{diff} wurde anschließend über Formel ?? berechnet.

$$D_{diff} = \frac{1}{4} \nu_i \lambda^2 \quad (3)$$

3 Ergebnisse

Es gilt, dass die durchschnittliche Distanz im Lipidgitter $\lambda = 0.8\text{nm}$, die Proportionalitätskonstante $\kappa = 0.5$ und das Verhältnis der Fluoreszenzübergangsrate des Monomers bzw. Excimers $\frac{k_f}{k_{f'}} = 0.1$ beträgt.

Formel ?? und ?? wurden anschließend mit den Parametern in die Formel ?? eingesetzt und entsprechend gekürzt.

Die temperaturabhängigen Fluoreszenzlebenszeiten des Excimers τ_0 wurden dem Skript

Tabelle 1: Fluoreszenzlebenszeiten τ_0 des Pyren-Excimers; temperaturabhängig

T[°C]	τ_0 [ns]
25	130
35	115
45	100

entnommen.

Die Berechnung von D_{diff} abhängig des molaren Anteils von Pyren X_{py} und des in ?? berechneten Excimer:Monomer Verhältnissen (welche $\frac{I'}{I}$ entsprechen) erfolgte durch die gewonnene Formel ??

$$D_{diff} = 0.1 \frac{1}{\pi X_{py}} \ln \left(\frac{2}{X_{py}} \right) \frac{I'}{I} \frac{1}{\tau_0} \cdot 0.64\text{nm}^2 \quad (4)$$

X_{py} für die Messdaten zu Ei-PC und DPPC betrugen $X_{py} = 5 \cdot 10^{-3}$ Die jeweiligen Ergebnisse sind in der Tabelle ?? dargestellt.

Tabelle 2: errechnete Diffusionskoeffizienten D_{diff} von Pyren für ausgewählte Temperaturen

T[°C]	D_{diff} [m^2s^{-1}]	
	Ei-PC	DPPC
25	1,81E-11	1,15E-10
35	2,56E-11	8,45E-11
45	3,41E-11	5,23E-11

4 Diskussion

In Abb. ?? bei DPPC sieht man 2 Übergänge. Einen bei $T = 35^\circ\text{C}$ und einen bei $T = 43^\circ\text{C}$. Der Erste kann ein Artefakt sein bzw. vielleicht kann man darin auch die Ripple Phase $P_{\beta'}$ sehen. Eine engmaschigere Messreihe würde für Klarheit sorgen.

Ein Vergleich der temperaturabhängigen Fluoreszenzintensitäten von Pyren in DPPC (Abb. ??) mit Pyren in Ei-PC (Abb. ??) zeigt auf, dass sich bei DPPC die Fluoreszenzintensität des Excimerpeaks bei $\lambda = 470\text{nm}$ mit zunehmender Temperatur abnimmt, während bei Ei-PC die Fluoreszenzintensität des Excimerpeaks konstant bleibt.

Ei-PC besitzt gegenüber DPPC(16:0) über ungesättigte Fettsäuren mit cis-Bindungen, die eine Störung der Anordnung der Lipide in der Membran darstellen. Ei-PC verbleibt deswegen bei den Experimentbedingungen im flüssig-kristallinen Zustand L_α . DPPC befindet sich bei $T = 25^\circ\text{C}$ in der $L_{\beta'}$ Phase und wandelt sich ab circa $T = 43^\circ\text{C}$ in L_α um, was man indirekt aus der Abb. ?? herauslesen kann.

DPPC(16:0) besteht aus gesättigten Acylketten, worin Pyren wohl nicht richtig Platz findet. Dies deutet auf ein Clustering von Pyren bei DPPC in $L_{\beta'}$ hin, wodurch sich die bei geringeren Temperaturen höheren Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu dem Ei-PC / Pyren System erklären.

Für eine eindeutige Aussage bezüglich der Phasenumwandlung ist die Technik des vorliegenden Experiment als alleinstehende Methode weniger geeignet. Die möglichen Phasenumwandlungspunkte für DPPC von $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ und von $P_{\beta'} \rightarrow L_\alpha$ stimmen aber annähernd mit den Literaturwerten von 36°C ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) und 41.3°C ($P_{\beta'} \rightarrow L_\alpha$) überein ?.

Eine Einordnung der errechneten D_{diff} von Pyren (Tabelle ??) in die allgemeine Literatur erweist sich als schwer, da in keinem Buch beziehungsweise Paper entsprechende Versuche mit D_{diff} Daten gefunden wurden. Die Größenordnung von D_{diff} bezüglich Pyren in Ei-PC stimmt aber annähernd mit ähnlichen Versuchen überein. ?

Das Verhältnis Excimer zu Monomer wird durch die Beweglichkeit und Konzentrationen bestimmt. ?

Die Fluoreszenzlebenszeiten des Excimers τ_0 (Tab. ??) nehmen bei steigender Temperatur wohl deshalb ab, da sich die Diffusionsrate durch Zunahme der Membranfluidität erhöht.

Die Technik des Versuchs ist nicht für *flip-flop* Prozesse geeignet, da der empfindliche

4 Diskussion

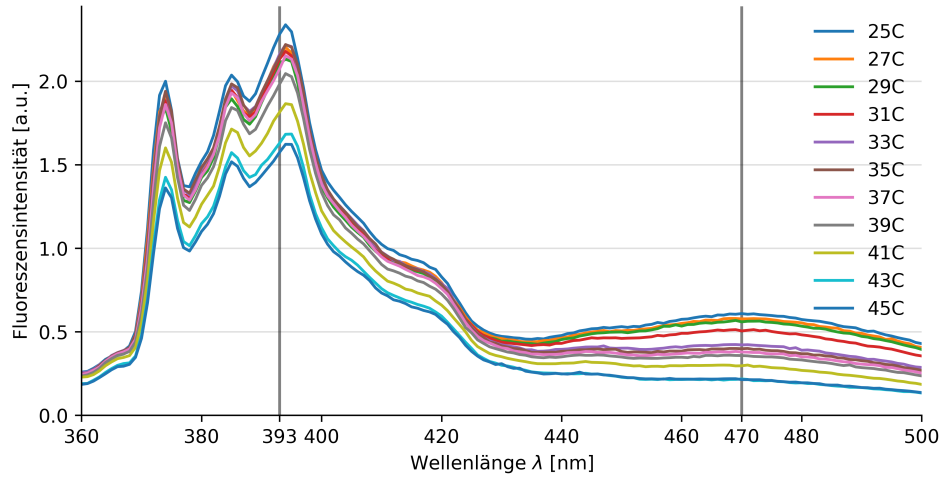


Abbildung 7: Fluoreszenzintensität Spektrum von Pyren in DPPC; temperaturabhängig

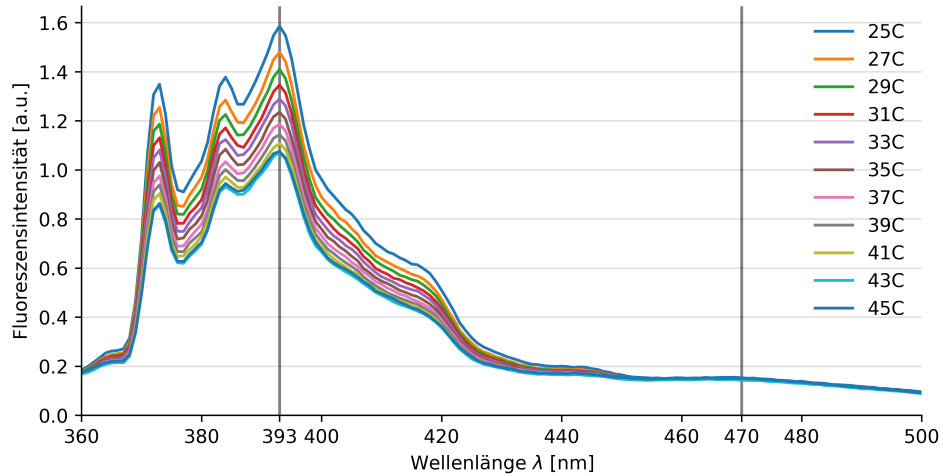


Abbildung 8: Fluoreszenzintensität Spektrum von Pyren in Ei-PC; temperaturabhängig

Frequenzbereich der Fluoreszenzmessung von circa 10^{-10} bis 10^{-7} s nicht den Frequenzbereich eines Lipid *flip-flop* Prozess von oft mehr als 1min abdecken kann.

Zur Berechnung von D_{diff} bedarf es Fluoreszenzlebenszeiten τ_0 , die durch das Skript gestellt wurden. Unter welchen Bedingungen diese gewonnen wurden, wurde nicht erwähnt. Deshalb sind die in der Tabelle ?? dargestellten D_{diff} kritisch zu betrachten. Membranproteine, die sich in realen System befinden, können u.a. ein Hindernis für die

4 Diskussion

Lateral diffusion D_{diff} von Lipiden darstellen und D_{diff} nahe der Proteine beschränken. Außerdem verändern Proteine die Packungsdichte der Lipide, wodurch kleinere Lipid-domaine entstehen. Die im Versuch gemessenen D_{diff} sind somit eher nur quantitativer Natur.

Wichtig festzuhalten ist, dass bei den Messungen im Kapitel ?? nicht exakt bei den angeforderten Temperaturmesspunkten gemessen wurde. Dies liegt im Problem der genauen Einstellbarkeit der Temperatur des Messsystem, da die eingestellte Temperatur selten wirklich erreicht wurde. Deshalb wurde so verfahren, dass, wenn keine Temperaturveränderung nach 2min mehr gemessen wurde, die jeweilige Messung erfolgte, auch wenn bis dahin nicht die eingestellte neue Temperatur erreicht wurde. Dadurch entstand auch ein Fehler, dass nunmehr die Daten nicht zu den angegebenen τ_0 Messwerten aus der Tabelle ?? passen, wodurch sich die Berechnung von D_{diff} weiter verfälscht.