



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) Lipidvesikeln.

Anschließend werden die verschiedenen Lateraldiffusionskoeffizienten von Pyren errechnet.

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

Der Versuch benutzt die Methode der Fluoreszenzmessung anhand des Fluorophors Pyren. 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 Abgabe von Strahlung und Wärme wieder auf den Grundzustand relaxiert.

Pyren ist in der Membranspektroskopie ein häufig verwendeter Fluorophore. Angeregte Monomere von Pyren können durch Kollisionswechselwirkung mit einem nicht angeregten Pyrenmonomer ein angeregtes Dimer bilden, welches Excimer genannt wird. Jenes Excimer besitzt eine geringere Energie, weshalb seine Fluoreszenzemission im Vergleich zum angeregten Monomer zu höheren Wellenlängen verschoben ist.

Die Bildung des Excimers ist abhängig von der Pyrenkonzentration innerhalb der Lipidmembran und der Beweglichkeit der Membran. Dadurch kann die Lateraldiffusion innerhalb der Membran analysiert werden, indem man

Es wird erwartet, dass bei höherer Temperatur auch ein größeres Excimersignal auftritt, da angeregte Monomere durch die erhöhte Membranbeweglichkeit öfters Kollisionen mit unangeregten Monomeren hat.

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. Das Anregungsmaximum wurde bei $\lambda = 336\text{nm}$ und ein globales Emissionsmaximum bei $\lambda = 393\text{nm}$ festgestellt. Beim verwendeten Pyren:Lipid Verhältnis von 1:50 wurde ein signifikanter Excimerenpeak bei $\lambda = 470\text{nm}$ gemessen.

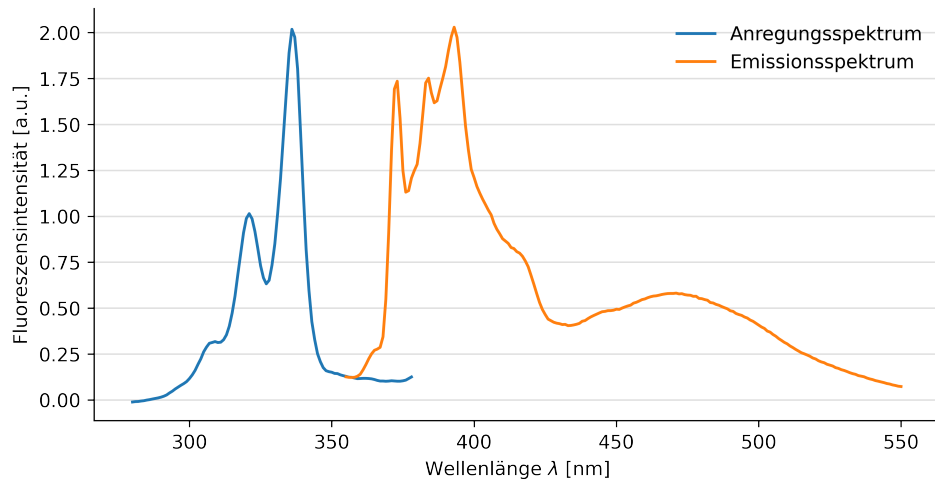


Abbildung 1: Anregungs- und Emissionsspektrum von Pyren; Verhältnis 1:50 (Pyren:Ei-PC); $T = 25^\circ\text{C}$, Versorgungsspannung Fluoreszenzspektrometer $U = 550\text{V}$

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.

3.2.1 Fluoreszenzintensität als Funktion der Pyrenkonzentration

In der Abb. ?? und ?? sind die pyrenkonzentrationabhängigen Fluoreszenzintensität dargestellt.

3 Ergebnisse

Die Messpunkte bei $\lambda = 393\text{nm}$ und bei $\lambda = 470\text{nm}$ wurden anschließend in Abb. ?? zusammengetragen.

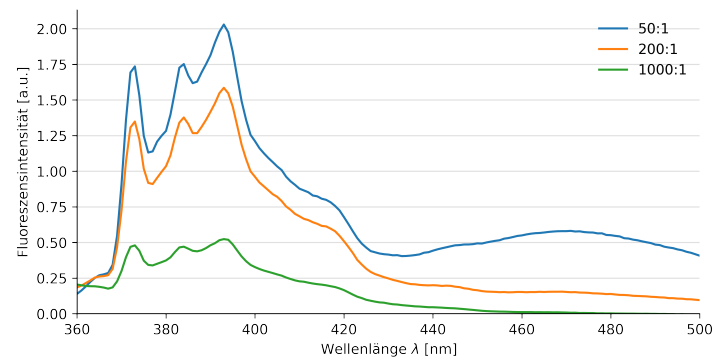


Abbildung 2: Fluoreszenzintensität Spektrum
von verschiedenen Ei-PC:Pyren-
Verhältnissen am Gerät 3

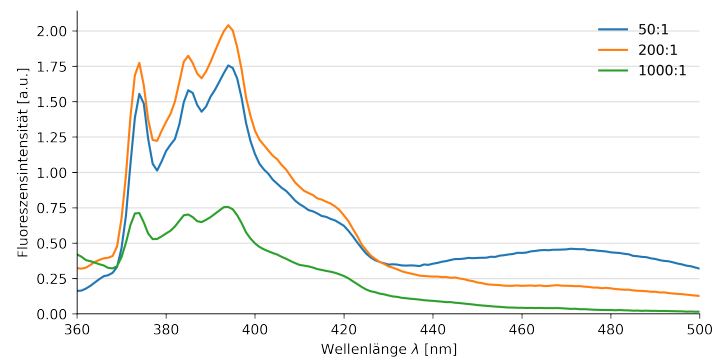


Abbildung 3: Fluoreszenzintensität Spektrum
von verschiedenen Ei-PC:Pyren-
Verhältnissen am Gerät 4

An den Graphen ist gut erkennbar, dass es bei ein Ei-PC:Pyren-Verhältnis von 50:1 einen klar erkennbaren Signalpeak für das Exicemer bei $\lambda = 470\text{nm}$ gibt, während jener

3 Ergebnisse

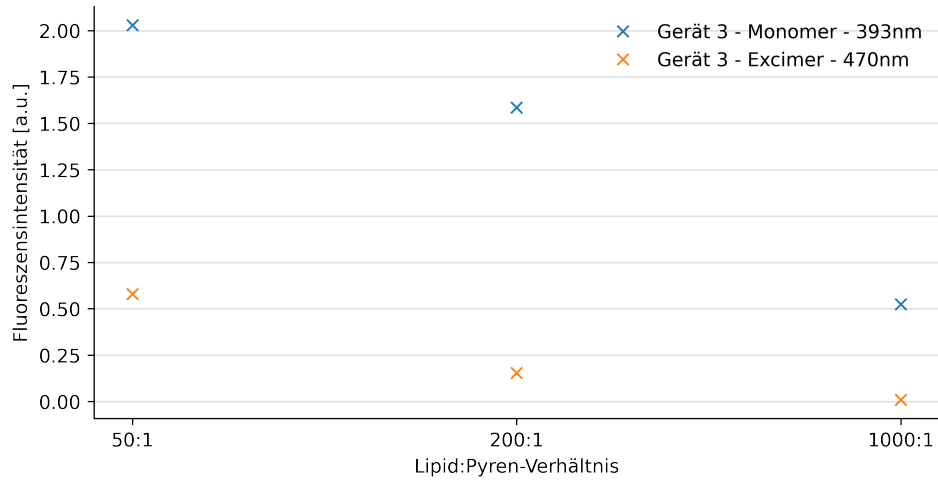


Abbildung 4: Fluoreszenzintensität als Funktion des Ei-PC:Pyren-Verhältnis am Gerät 3

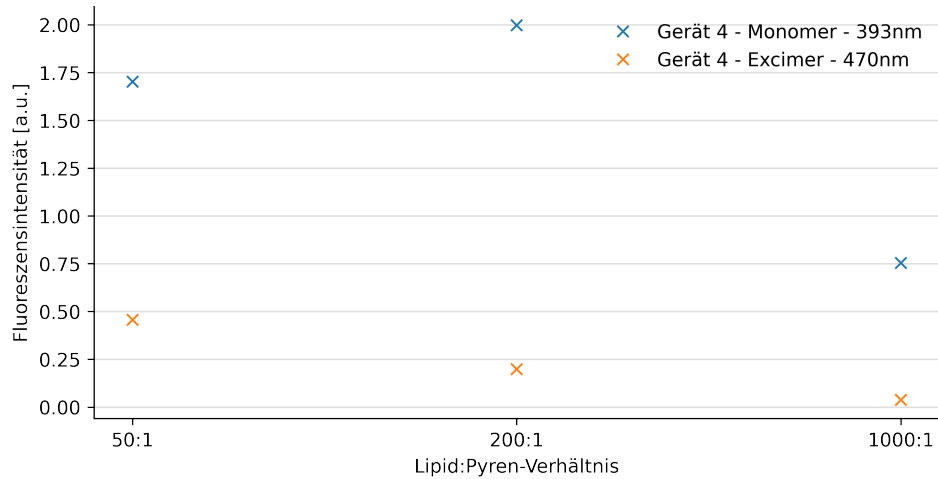


Abbildung 5: Fluoreszenzintensität als Funktion des Ei-PC:Pyren-Verhältnis am Gerät 4

Signalpeak bei einer Verdünnung von 1000:1 auf Grund seines Messwertes nicht mehr aussagekräftig ist.

Das Monomer-Signal $\lambda = 393nm$ war in den Experimenten immer größer als das Excimer-Signal.

Am Gerät 4 (??) ist erkennbar, dass die Signale im Messbereich um die Wellenlänge des Monomers bei dem Verhältnis von 200:1 stärker sind, als beim Verhältnis 50:1. Dies

stellt einen Unterschied zur Messung des Gerät 3 dar (??), wo die 50:1 Verdünnung höhere Messwerte lieferte, und bedarf eine Messwiederholung.

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

3.3 Verhältnis Intensitäten Excimer:Monomer bei variabler Temperatur

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

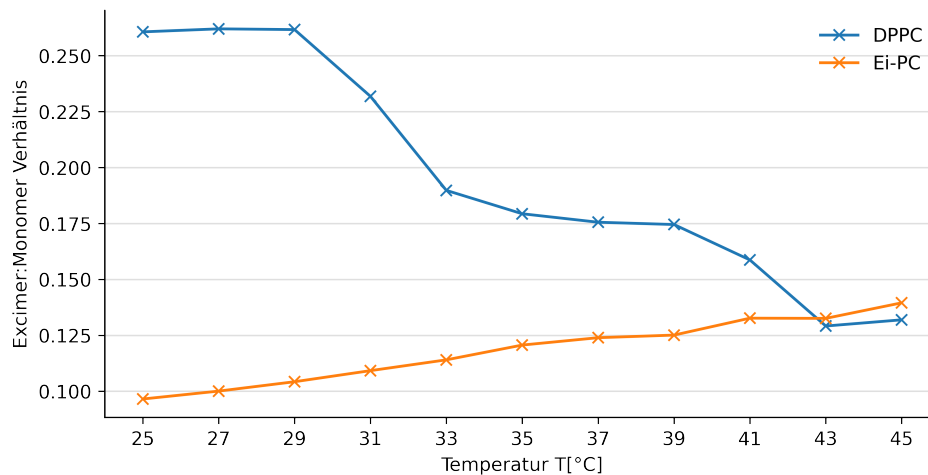


Abbildung 6: Verhältnis Intensitäten Excimer:Monomer für Pyren in Ei-PC bzw. DPPC; Messung der Temperaturabhängigkeit

3.4 Lateraldiffusionskoeffizienten

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

3 Ergebnisse

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.

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

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

ToDo: "Das Grundprinzip der Pyrenmessungen wurde nirgends erklärt. Was wäre die Erwartung, was war die Beobachtung. Wie lässt sich diese erklären."

Pyren versinkt komplett in der Membran und kann sich clustern. Bei einer Anregung (.. etc. ..)

Es wurde erwartet, dass bei höherer Temperatur auch ein größeres Excimersignal auftritt. In der Abb. ?? und ?? bzw. ?? (siehe Anhang) ist erkennlich, dass bei DPPC Vesikeln das Excimersignal im Trend abfällt, während er bei Ei-PC Vesikeln konstant bleibt und in Relation zum Monomer Signal sogar ansteigt (??)

In Abb. ?? bei DPPC sieht man 2 Übergänge. Einen bei $T = 35^\circ C$ und einen bei $T = 43^\circ C$. 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 $\lambda = 470nm$ 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 $T = 25^\circ C$ in der $L_{\beta'}$ Phase und wandelt sich ab circa $T = 43^\circ C$ 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 vor-

4 Diskussion

liegenden 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 ?.

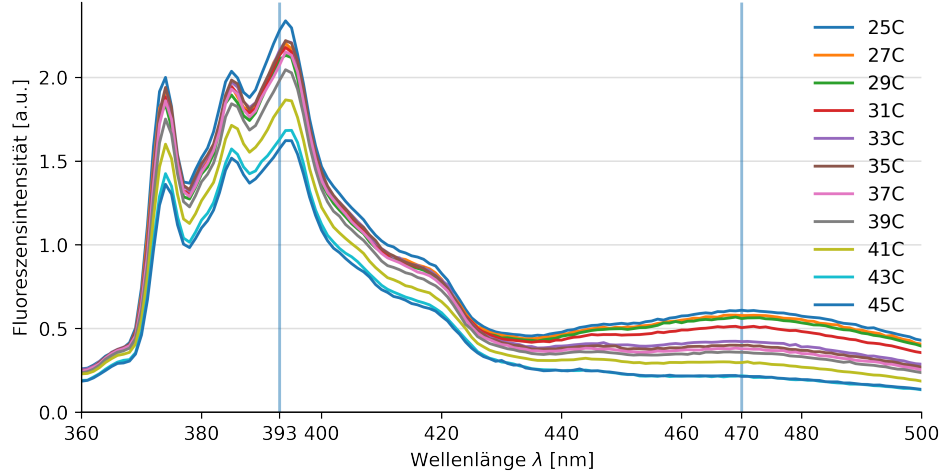


Abbildung 7: Fluoreszenzintensität Spektrum von Pyren in DPPC; temperaturabhängig

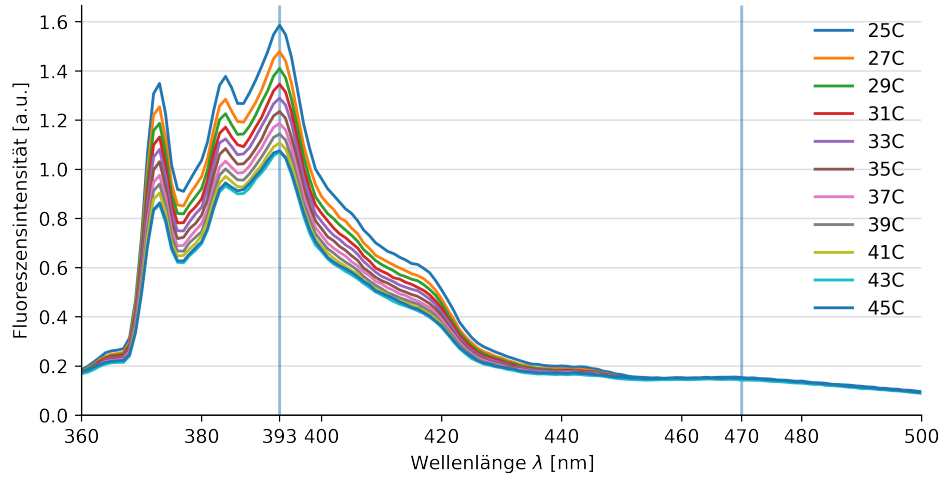


Abbildung 8: Fluoreszenzintensität Spektrum von Pyren in Ei-PC; temperaturabhängig

Eine Einordnung der errechneten D_{diff} von Pyren (Tabelle ??) in die allgemeine Lite-

4 Diskussion

ratur 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 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 Lateraldiffusion 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.

5 Anhang

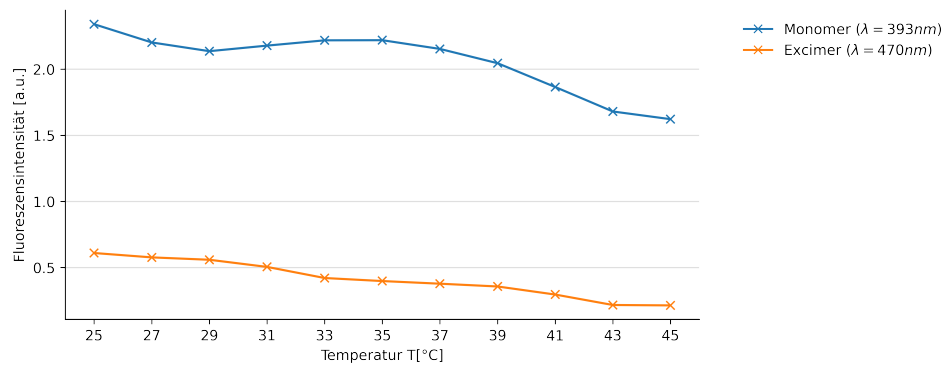


Abbildung 9: Pyren in DPPC Vesikeln; Fluoreszenzintensität als Funktion der Temperatur

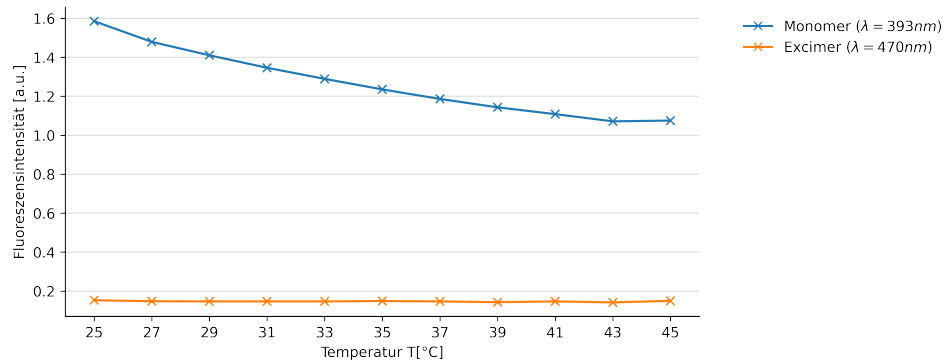


Abbildung 10: Pyren in Ei-PC Vesikeln; Fluoreszenzintensität als Funktion der Temperatur