

## B10: Dynamische Vorgänge in Lipidmembranen

### 1. Übersicht zum Thema und Ziele

Die Fluoreszenz ist eine sehr empfindliche Methode, um kleinste Mengen (Nanomol) von Molekülen nachzuweisen. In der Biophysik werden neben intrinsischen Fluorophoren (wie z.B. die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin) auch fluoreszierende Reporter-moleküle verwendet. Mit solchen Reporter-molekülen läßt sich:

- aus der Form der Spektren der pH-Wert und die Polarität der Mikroumgebung messen;
- aus der Fluoreszenz-anisotropie die Mikroviskosität und der Bewegungsraum bestimmen;
- über die Energietransfermessung der Abstand zu einem anderen Molekül (Akzeptor) ermitteln.

Ziel dieses Versuchs ist es:

- Gleichlicht- und zeitaufgelöste Fluoreszenz als Methode kennenzulernen;
- den Einfluß der Umgebung auf Form, Lage und Intensität der Emissions- und Anregungsspektren des Reporter-moleküls zu studieren;
- mit Hilfe von Gleichlicht- und zeitaufgelöster Fluoreszenz-anisotropie die Dynamik von Lipidmembranen bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen. Damit lassen sich Aussagen über deren Mikroviskosität, Ordnungszustand sowie Temperatur, van't Hoff-Enthalpie und Kooperativität des Lipid-Phasenübergangs bestimmen;
- rechnergestützte Auswertung zeitaufgelöster Fluoreszenz- und Anisotropiekurven durchzuführen.

### 2. Theoretische Grundlagen

Durch Anregung mit einem Nanosekunden-Puls von linear polarisiertem Licht wird aus einer isotropen Verteilung von unangeregten Übergangsdipolmomenten eine anisotrope Verteilung von angeregten emittierenden Übergangsdipolmomenten kreiert (Photo-selektion). Die Fluoreszenz ist entsprechend stark polarisiert. Die extrem anisotrope Anfangsverteilung entspricht nicht der Gleichgewichtsverteilung und relaxiert folglich durch Rota-

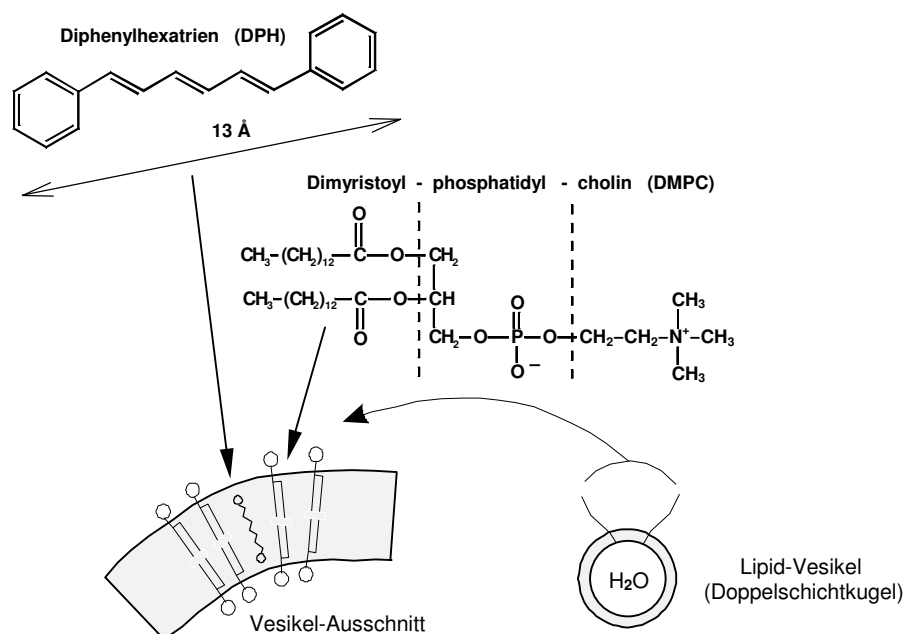


Fig. 1

tionsdiffusion. Dies führt zu einer Depolarisation der Fluoreszenz. Je nachdem, ob die Gleichgewichtsverteilung isotrop oder noch eine Restanisotropie besitzt, strebt für lange Zeiten die Polarisation gegen null oder gegen einen von null verschiedenen Endwert. Die Relaxationszeiten und Endwerte geben Auskunft über Beweglichkeit und Ordnung der Fluorophore.

Im Versuch wird die hydrophobe Fluoreszenzsonde DPH (Diphenylhexatrien, Struktur siehe Figur 1) verwendet, die sich in das hydrophobe Innere der DMPC-Vesikel einlagert (DMPC, Dimyristoylphosphatidylcholin, Struktur siehe Figur 1). Die noch im H<sub>2</sub>O verbliebenen DPH-Moleküle fluoreszieren so schwach (Quenching auf weniger als 1/200 in H<sub>2</sub>O), daß ihre Fluoreszenz nicht ins Gewicht fällt. Bei etwa 23 °C findet in den DMPC-Vesikeln eine Ordnung/Unordnung-Umwandlung der Lipidmoleküle statt, die von einem Gelzustand bei niedriger Temperatur in einen flüssig-kristallinen Zustand übergehen. Die fluoreszierende Sonde DPH zeigt diesen Übergang an, indem ihre Richtungsverteilung oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur schneller und mit einer größeren Amplitude in die isotrope Verteilung relaxiert.

Zur Versuchsvorbereitung sind insbesondere die folgenden Literaturstellen geeignet (Zitate siehe 6). Es genügt, die Begriffe und Definitionen jeweils mit Hilfe einer Skizze oder einer Formel erläutern zu können:

[1], S. 45-52, oder [5], S. 1-12, ergänzend [6], S. 461-467, ergänzend [7], S. 7109-7111.

Definitionen: Übergangsdipolmoment,  $\pi - \pi^*$ -Übergang, Born-Oppenheimer-Näherung, Franck-Condon-Faktoren, Absorption, Emission, Fluoreszenz, strahlungsloser Prozeß, Quenching, Strahlungslebensdauer, Quantenausbeute, Rotationsdiffusion, Anisotropie.

Gesetze, Regeln: Franck-Condon-Prinzip, Stokes-Verschiebung, Ratsenschema, Versuchsanordnung für eine polarisierte Fluoreszenzmessung, Übergangsdipolmomentverteilung unmittelbar nach einer polarisierten Blitzanregung und für  $t \rightarrow \infty$ , Diffusionsgleichung.

Die nötigen Formeln für die Auswertung finden Sie insbesondere in den Literaturzitierten [6] und [7].

### 3. Meßaufgaben (dabei 4. beachten!)

#### 3.1 Machen Sie von den verwendeten Meßapparaturen

- Gleichlichtfluoreszenz
- Zeitaufgelöste Fluoreszenz

schematische Skizzen, und geben Sie je eine kurze (ca. 1 Seite) Beschreibung des Meßprinzips und der Funktion.

#### 3.2 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität

In 2 Eppendorf-Gefäße a) mit 1 ml Vesikel- Lösung, b) mit 1 ml reinem Puffer werden je 8 µl von 1 mM DPH in THF-Lösung gegeben (Diphenylhexatrien in Tetrahydrofuran).

Messen Sie in Quarzküvetten 4×10 mm von der Probe a das Anregungsspektrum (ex) ( $\lambda_{\text{ex}} = 270-420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ ) sowie von a und b das Emissionsspektrum (em) ( $\lambda_{\text{em}} = 380-530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ). Achtung, unbedingt Meßbereiche der Anzeigeinstrumente notieren! Heben Sie die Proben a und b für weitere Messungen auf.

#### 3.3 Gleichlicht-Fluoreszenzdepolarisation

Verwenden Sie die Vesikel-Probe von Versuch 3.2 (DPH in DMPC-Vesikel in Phosphatpuffer).

Messen Sie die Fluoreszenzanisotropie der Probe bei den Temperaturen ca. 10°, 15°, 18°, 21°, 22°, 22.5°, 23°, 23.5°, 24°, 24.5°, 25°, 26°, 27°, 30°, 35°C (Anregungspolarisation horizontal: Beide Meßgeräte für PM-Ausgänge auf gleichen Wert bringen, Anregungspolarisation vertikal: Werte ablesen). Berechnen von

$$R = (I_V - I_H)/S \quad S = (I_V + 2I_H).$$

Hinweis: Blenden für Anregung und Emission auf je 1/2 Intensität abblenden (warum?).

### 3.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation von DPH in DMPC-Vesikeln.

Verwenden Sie die Vesikelprobe der Versuche 3.2 und 3.3. Messen Sie Fluoreszenz (S(t))- und Anisotropie (R(t))-Kurven der Probe bei T = 10, 23, 35°C. Die Messung erfolgt nur mit dem rechten Emissionsarm bei vertikaler Anregungspolarisation. Zur Eichung muß bei horizontal polarisierter Anregung je 1 min lang die Zählrate mit horizontaler und vertikaler Emissionspolarisation gemessen werden (->  $G = N_{\text{par}}/N_{\text{senkr}}$ ). Außerdem ist Zeiteichung der Kanäle mit Hilfe der Verzögerungsleitung erforderlich.

Achtung: Vor jedem Öffnen des Deckels unbedingt Photomultiplier abschalten!

## 4. Hinweise zur Technik und Versuchsdurchführung (Wichtig!)

Als Forschungsapparaturen sind die Geräte nicht gegen Fehlbedienung geschützt.

### 4.1 Fluoreszenzlebensdauer- Apparatur

- Unbedingt vor jedem Öffnen des Deckels die PM-Spannung abschalten
- PM-Spannungen nicht höher als 1000V!
- Lampe mit 500 mbar H<sub>2</sub>-Gas füllen und mit der Spannung nicht höher als 7 kV gehen.

### 4.2 Gleichlicht- Fluoreszenzapparatur

- High Voltage ADJUST Knöpfe nicht höher als 650 drehen (entspricht 1300 V PM-Spannung). Bei Benutzung des Referenz-PM auf Kanal 2 nur bis maximal 450 gehen (= 900 V);
- RANGE-Knöpfe nur im Bereich von 3 µA aufwärts benutzen; bei OVERLOAD-Lampe (rot) RESET Knopf drücken und Intensität mit PM-Spannung herunterbringen.
- Zum Spektrenfahren wird das Gerät über das Menue des Programm „MESS“ des PC-Rechners gesteuert. Anfangswellenlänge für Scan per Hand einstellen, dann Schalter auf „remote“. Zeiger der Instrumente dürfen nicht an den Anschlag gehen ( $I(\text{PM1}) < I(\text{PM2})$ ). Vergessen Sie nicht, außer den geforderten Parametern auch die Stellungen der Photomultipliernetzgeräte sowie die Temperatur zu notieren. Wichtig ist auch Zeitkonstante, Spaltbreite und Scangeschwindigkeit richtig aufeinander anzupassen.
- Für den Versuch 3.3 wird zur Temperaturmessung der Thermoelmentdraht direkt in die offene Küvette getaucht, bis die Temperatur erreicht ist (vor der Messung herausnehmen!).
- Zur Anisotropiemessung werden beide Fluoreszenzarme benutzt (-HV2 auf OUT und Sign. 2 auf IN stecken). Alle Spalthöhen auf 1. Raste, alle Blenden erst ganz öffnen, dann jeweils auf halbe Intensität abblenden. Meßprogramm auf (0)=Test. Anregungspolarisator horizontal, mit RANGE, PM2- Spannung (grob) und Spaltöffnung (fein) Intensitäten abgleichen (PM1 vertikal, PM2 horizontal). Dann Anregungspolarisation vertikal und Zahlen für Kanal 1 und Kanal 2 notieren (3 stellig), R nach Formel  $R = (I_V - I_H)/(I_V + 2I_H)$  berechnen.

- Beim Versuch 3.2 erst die Vesikelprobe messen und bei der Messung des DPH in einem Puffer nur den RANGE Knopf verstellen und notieren!

## 5. Aufgaben und Auswertung

5.1 Wie würden Sie 100 ml einer 1 millimolaren Lösung von DPH ( $M = 232,3 \text{ g/Mol}$ ) in THF herstellen?

5.2 (zu 3.1) Schematische Skizzen und eine kurze Beschreibung der verwendeten Meßapparaturen (Meßprinzip und Funktion, max. 1 Seite)

5.3 (zu 3.2) Abschätzen des Verhältnisses der Quantenausbeute  $\Phi(k_r, k_{nr}, \text{DPH in H}_2\text{O}) / \Phi(k_r, k_{nr}, \text{DPH in Lipid})$ . Bestimmen Sie aus den strukturierten Spektren (DPH in Lipid) die zugehörigen Schwingungsfrequenzen (in  $\text{cm}^{-1}$ ) im Grundzustand und im angeregtem Zustand. Berechnen Sie mit  $x_0^2 = \hbar / (m \omega)$ ,  $k = m \omega^2$ ,  $m \approx m_C$  aus den Spektren die Kraftkonstante  $k$ , die Nullpunktsschwingung  $x_0$ . Die Nulllagendifferenz  $\Delta x$  der Potentialkurven hängt in harmonischer Näherung mit dem Energieabstand  $E_{\text{max}} - E_{00} = \hbar \omega = k \Delta x^2 / 2$  zusammen.

5.4 (zu 3.3) Auftragen  $R(T)$  über  $T$ , Auftragen des Umwandlungsgrades

$$\Theta = M_2 / (M_1 + M_2) \quad (1)$$

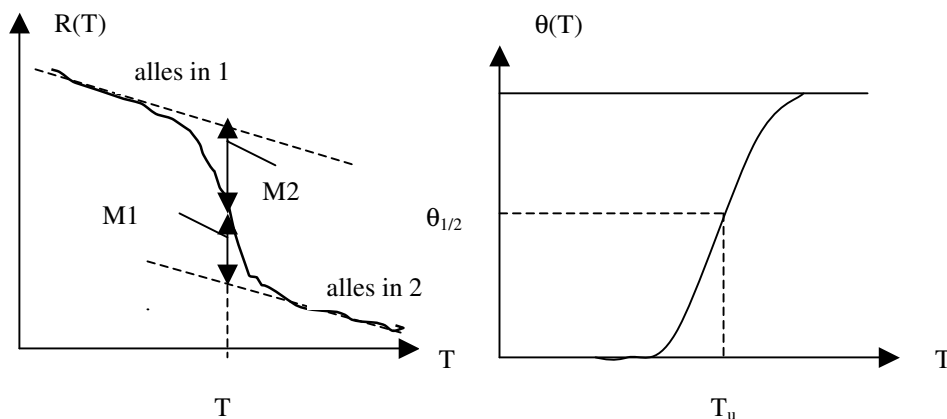
für den Phasenübergang im Lipid.

Der Kurvenverlauf  $\Theta(T)$  läßt sich mit einer Gleichgewichtsreaktion interpretieren:



mit der Gleichgewichtskonstanten

$$K = M_2 / M_1 = K_0^* \exp(-\delta H / RT) \quad (3)$$



Aus der Steigung  $(d\Theta/dT)$  kann man die van't Hoff-Enthalpie berechnen. Aus (1) und (4) folgt:

$$(d\Theta/dT)_{T_u} = \delta H / 4RT^2 \quad (4)$$

Es ergibt sich eine sehr hohe van't Hoff-Enthalpie im Vergleich zur kalorimetrischen  $H_{\text{th}} = 30 \text{ kJ/Mol}$ . Warum?

5.5 (zu 3.5) Vergleichen Sie die vom Programm berechneten  $\langle R \rangle$  mit den Werten von  $R$  aus Versuch 3.3. Berechnen Sie aus den Rotationskorrelationszeiten  $\phi_{\text{rot}}$  die Mikroviskositäten in  $\text{Pa s}$ . Berechnen Sie aus dem Verhältnis  $R_0/R_\infty$  die Öffnung des Kegelwinkels für das einfache Wobbling-in-Cone Modell bei den 3 Temperaturen.

5.6 Diskutieren Sie die Temperaturabhängigkeiten von Lifetime  $\tau$ , Rotationskorrelationszeit  $\phi_{\text{rot}}$ ,  $R_{\infty}$ , und  $\eta$  (siehe Lit [6] )

## 6. Literatur

Diese Literatúrauszüge sind im Praktikumsordner in der Literatursammlung zum FP in der FB-Bibliothek zu finden.

- [1] H.-J. Galla: Spektroskopische Methoden der Biochemie, Kap. 5, Fluoreszenz, S. 45-70.
- [2] Joseph R. Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic, 1999. (modern, sehr detailliert, zum Nachschlagen und Vertiefen)
- [3] Cantor, Schimmel: Biophys. Chem., Bd. 2, Kap. 8.2. S. 433-448, S. 454-463.
- [4] Grell: Membrane Spectroscopy, Springer, Kap.: J. Yguarabide, M.C. Foster: Fluorescence Spectroscopy of Biological Membranes, S. 199-269, (Chem. Bibliothek BO 380-21).
- [5] Methods in Life Science, Elsevier Scientific Publishers, Kap. A.G. Lee: Membrane Studies using Fluorescence Spectroscopy, S. B422 /1 bis /43.
- [6] Methods in Enzym. Vol. 172, 1989, Academic Press (26). M.P. Heyn: Order and Viscosity of Membranes: Analysis by Time Resolved Fluorescence Depolarisation, S. 462-471.
- [7] M.P. Heyn et al., Biochem, 20, 7109-7115, 1981. Calorimetric and Fluorescence Depolarisation Studies on the Lipid Phase Transition of Bacteriorhodopsin-Dimyristoylphosphatidyl-cholin Vesicles.