

Fortgeschrittenenpraktikum – Vorbereitung

Dynamische Vorgänge in Lipidmembranen

Erik Streb*, Martin Kavalár†

26. September 2007

Betreuer: Herr Dr. Otto

1 Einführung

In diesem Versuch sollen mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie Lipidmembranen, die im wesentlichen aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) bestehen, untersucht werden. Dazu wird in die Probe ein sogenanntes Reportermolekül eingebaut. Aus der Polarisierung und der Anisotropie des Fluoreszenzspektrums in Abhängigkeit der Temperatur können dann Rückschlüsse auf die Dynamik in den Lipidmembranen gezogen werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Übergangsdipolmoment

Das Übergangsdipolmoment zwischen zwei Zuständen Ψ_i und Ψ_f ist definiert als:

$$\langle \Psi_f | \vec{D} | \Psi_i \rangle \quad (1)$$

\vec{D} ist dabei der Dipoloperator. Das Übergangsdipolmoment gibt den Erwartungswert eines elektrischen Übergangs zwischen den Zuständen Ψ_i und Ψ_f an.

*E-Mail: mail@erikstreb.de

†E-Mail: kavalár@gmail.com

2.2 π - π^* -Übergang

Regt man π -Elektronen an, so erfolgt ein Übergang in ein antibindendes π^* -Orbital, wo diese entweder einen Singulett- oder Triplettzustand besetzen können. Der Übergang zwischen diesen beiden Zuständen ist auf Grund der Auswahlregel $\Delta S = 0$ verboten.

2.3 Born-Oppenheimer-Näherung

In der Born-Oppenheimer-Näherung wird die Kernbewegung von der Elektronenbewegung separiert. Dies ist insofern gerechtfertigt, da die Elektronen auf Grund ihrer im Vergleich zum Kern größeren kinetischen Energie diesen als fest sehen. Dies hat zur Folge, dass die Wellenfunktion als Produktansatz aus elektronischem und Kernanteil geschrieben werden kann.

2.4 Franck-Condon-Faktoren, Franck-Condon-Prinzip und Stokes-Shift

Das Franck-Condon-Prinzip besagt, dass ein elektronischer Übergang in einem Molekül so schnell stattfindet, dass der Kernabstand während des Übergangs unverändert bleibt. Bei der Darstellung in einem Energie-Diagramm kommt dies durch einen „vertikalen“ Übergang zum Ausdruck. Die Wahrscheinlichkeit des elektronischen Übergangs wird durch die Franck-Condon-Faktoren gegeben:

$$FC(\nu_i, \nu_f) = \left| \int \Psi_{\text{vib}}(\nu_i) \Psi_{\text{vib}}(\nu_f) d^3r \right|^2 \quad (2)$$

Die Franck-Condon-Faktoren können in guter Näherung mit dem harmonischen Oszillator berechnet werden. Die Lebensdauer des angeregten Moleküls ist groß im Vergleich zu einer molekularen Schwingung. Daher relaxiert das Molekül z.B. durch Stöße mit anderen Molekülen in den tiefsten Vibrationszustand im elektronisch angeregten System. Bei der Emission in den Grundzustand wird ein Photon emittiert. Im Endeffekt sind die Emissionsvorgänge also zu längeren Wellenlängen hin verschoben, was als Stokes-Shift bezeichnet wird.

2.5 Fluoreszenz, Phosphoreszenz

Bei der Fluoreszenz erfolgt die Emission direkt nach der Absorption (10^{-8} s), bei der Phosphoreszenz hingegen kann eine größere Zeitspanne zwischen Absorption und Emission liegen.

2.6 Strahlungslose Desaktivierungsprozesse

Die durch Absorption eines Photons eingestrahlte Energie kann auch durch strahlungslose Prozesse wieder abgegeben werden:

- **Interkombinationsübergang:** Hierbei wird ein Singulett- in einen Triplettzustand überführt. Da hierbei die Auswahlregel $\Delta S = 0$ verletzt wird ist dieser Vorgang sehr unwahrscheinlich.

- **Einfluss des Lösungsmittels:** Da die benutzten Lösungsmittel polar sind, kommt es durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu einer Energieverschiebung des Fluoreszenzspektrums.
- **Quenching:** Mit Quenching werden in diesem Fall folgende Prozesse gemeint: Beim Stoßquenching gibt das angeregte Molekül seine Energie an den Quencher ab und relaxiert in den Grundzustand. Beim statischen Quenching wird der angeregte Zustand durch Komplexbildung relaxiert.

2.7 Quantenausbeute

Die Quantenausbeute ist ein Maß der Ausnutzung der eingestrahnten Photonen:

$$\Phi = \frac{\text{Fluoreszenzrate}}{\text{Absorptionsrate}} = \frac{k_f}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_q} \quad (3)$$

Dabei stellen $k_f, k_{ic}, k_{isc}, k_q$ die Übergangsraten für Floreszenz, innere Umwandlung, Interkombinationsübergang und Quenching dar.

2.8 Fluoreszenz-Lebensdauer

Die Fluoreszenz-Lebensdauer ist die mittlere Lebensdauer eines Moleküls im angeregten Zustand, bevor die Fluoreszenz erfolgt. Diese ergibt sich aus dem Zerfallsgesetz:

$$N(t) = N_0 e^{-k_f t} \quad (4)$$

N_0 ist dabei die Anzahl der Moleküle im angeregtem Zustand. Man definiert die Zeit in der die Anzahl der angeregten Moleküle auf N_0/e zurückgegangen ist als Fluoreszenz-Lebensdauer τ_f . Damit ergibt sich sofort die Beziehung: $\tau_f = 1/k_f$. Betrachtet man hingegen die wirkliche Lebensdauer τ der angeregten Moleküle so müssen die strahlungslosen Prozesse mit einbezogen werden:

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_q} \quad (5)$$

Daraus ergibt sich wiederum sofort: $\tau = \tau_f \Phi$

2.9 Anisotropie

Analog zum Absorptions-Übergangsdipolmoment A , das die Absorption elektromagnetischer Strahlung beschreibt, charakterisiert das Emissions-Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_E$ die Emission der Fluoreszenz. Damit ist sowohl Emission als auch Absorption richtungsabhängig. Zur quantitativen Beschreibung definiert man die Anisotropie

$$R(t) = \frac{I_{||}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (6)$$

Dabei bezeichnen I_{\parallel} und I_{\perp} die Komponenten der Fluoreszenz-Intensität parallel und senkrecht zur Einfallsebene der Strahlung. Für große Zeiten t wird das System gegen einen isotropen Zustand r_{∞} konvergieren, daher ist die Anisotropie $R(t)$ zeitabhängig. Die Wahrscheinlichkeit das vom System elektromagnetische Strahlung absorbiert wird $P(\theta, \varphi)$ ist proportional zu $(\vec{\mu}_a \vec{E})^2$, damit also abhängig vom $\cos^2 \theta$, wenn θ der Winkel zwischen $\vec{\mu}_a$ und \vec{E} ist. Geht man von einer statistischen Verteilung der Moleküle und der Annahme das fast alle Moleküle senkrecht zur Polarisationsrichtung des Lichtes stehen aus, so wird die Menge der Übergangsdipolmomente mit einem festen Winkel θ zur Polarisationsachse durch eine Kegelfläche repräsentiert. Daraus ergibt sich folgender anistropen Ausdruck für den Anteil angeregter Moleküle:

$$P(\theta, \varphi) d\theta d\varphi = \frac{1}{2\pi} \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\varphi \quad (7)$$

Setzt man $R(t=0) = R_0$ so findet man wegen $P \propto I$ folgenden Zusammenhang zwischen Anisotropie und Öffnungswinkel θ des oben beschriebenen Kegels:

$$\frac{R_{\infty}}{R_0} = \left[\frac{\cos \theta (1 + \cos \theta)}{2} \right]^2 \quad (8)$$

2.10 Rotationsdiffusion

Rotieren die Moleküle langsam im Vergleich zur Lebensdauer des angeregten Zustandes, so kann diese vernachlässigt werden. Ist die Rotationsgeschwindigkeit hingegen in der gleichen Größenordnung wie die Lebensdauer des angeregten Zustandes, so ändern sich die Orientierung des Moleküls und damit auch des Übergangsdipolmoments μ_e . Somit hat die Rotationsdiffusion Einfluss auf die Anisotropie. Quantitativ sieht die Rotationsdiffusion D wie folgt aus:

$$D = \frac{1 - \frac{R_{\infty}}{R_0}}{6\Phi} \quad (9)$$

D ist hier die Rotationsdiffusionskonstante und Φ die Rotationskorrelationszeit analog zur Fluoreszenz-Lebensdauer. Mit Hilfe der Stokesschen Reibung ergibt sich eine Beziehung zwischen Rotationsdiffusionskonstante und Mikroviskosität η , welche die Viskosität in der Umgebung der Probe beschreibt.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta V_h} \quad (10)$$

V_h ist hierbei das hydratisierte Molekülvolumen.

2.11 Temperaturabhängigkeit von $R(T)$, van 't Hoff-Enthalpie

Der Umwandlungsgrad θ einer zweiphasigen Lösung ist definiert als:

$$\theta(T) = \frac{M_2}{M_1 + M_2} \quad (11)$$

Die Arrhenius-Gleichung beschreibt die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K für diese Reaktion:

$$K(T) = \frac{M_2}{M_1} = K_0 e^{-\delta H/RT} \quad (12)$$

Aus der Steigung des Umwandlungsgrades $d\theta/dT$ kann die van 't Hoff-Enthalpie berechnet werden:

$$\frac{d\theta}{dT} = \frac{\delta H}{4RT^2} \quad (13)$$

3 Die zu untersuchende Probe

Da Lipidmembranen alleine keine Fluoreszenz zeigen, ist es notwendig einen „Marker“ in diese einzubauen. Dazu wird im Versuch die hydrophobe Fluoreszenzsonde DPH in das hydrophobe Innere des DMPC-Vesikels eingelagert. Da die DPH-Moleküle keine Fluoreszenz zeigen, stören sie die Versuchsdurchführung nicht. Bei 23° findet ein Phasenübergang in den Lipidmolekülen statt, der durch eine schnellere Richtungsverteilung der DPH-Moleküle oberhalb der Übergangstemperatur angezeigt wird.