

Fortgeschrittenenpraktikum – Auswertung

Dynamische Vorgänge in Lipidmembranen

Erik Streb*, Martin Kavalár†

5. November 2007

Betreuer: Herr Dr. Otto

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	2
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Übergangsdipolmoment	2
2.2	Born-Oppenheimer-Näherung	2
2.3	Franck-Condon-Faktoren, Franck-Condon-Prinzip und Stokes-Shift	2
2.4	Fluoreszenz, Phosphoreszenz	3
2.5	Strahlungslose Desaktivierungsprozesse	3
2.6	Quantenausbeute	3
2.7	Fluoreszenz-Lebensdauer	4
2.8	Anisotropie	4
2.9	Rotationsdiffusion	5
2.10	Temperaturabhängigkeit von $R(T)$, van 't Hoff-Enthalpie	5
3	Die zu untersuchende Probe	5
4	Durchführung	6
4.1	Gleichlichtmessung	6
4.2	Zeitaufgelöste Messung	6

*E-Mail: mail@erikstreb.de

†E-Mail: kavalara@gmail.com

5 Auswertung	7
5.1 Herstellen der Lösung	7
5.2 Bestimmung der Quantenausbeute	7
5.3 Bestimmung der Schwingungsparameter	8
5.4 Gleichlicht-Fluoreszenzdepolarisation	10
5.5 Zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation von DPH in DMPC-Vesikeln . . .	13
5.6 Diskussion	15

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:

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

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

2.2 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.

2.3 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.

2.4 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.

2.5 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.

2.6 Quantenausbeute

Die Quantenausbeute ist ein Maß der Ausnutzung der eingestrahlten Photonen:

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

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

2.7 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: $\tau = \tau_f \Phi$

2.8 Anisotropie

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

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

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 $(\boldsymbol{\mu}_a \mathbf{E})^2$, damit also abhängig vom $\cos^2 \theta$, wenn θ der Winkel zwischen $\boldsymbol{\mu}_a$ und \mathbf{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 anistropischer 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:

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

2.9 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.

2.10 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 °C findet ein Phasenübergang in den Lipidmolekülen statt, der durch eine schnellere Richtungsverteilung der DPH-Moleküle oberhalb der Übergangstemperatur angezeigt wird.

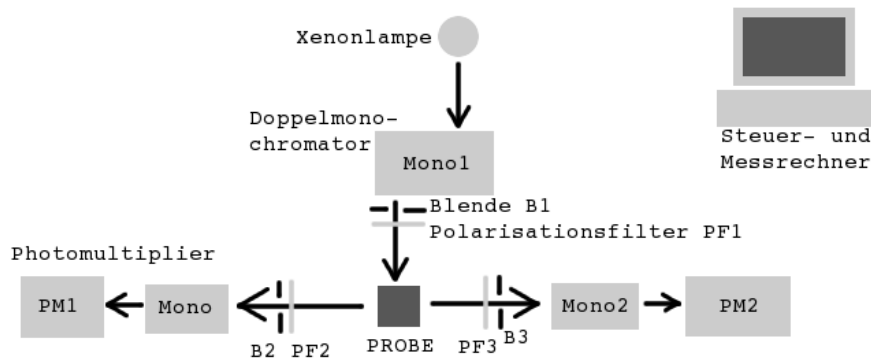


Abbildung 1: Skizze des Versuchsaufbaus zur Gleichlichtmessung.

4 Durchführung

4.1 Gleichlichtmessung

Mit dem in Abbildung 1 schematisch dargestellten Aufbau wurden die Gleichlichtmessungen durchgeführt. Als erstes haben wir das Absorptions- und Emissionsspektrum der Probe A (Vesikellösung) bei einer Verstärkerempfindlichkeit von $1\mu\text{A}$ und das Emissionsspektrum der Probe B (Reiner Puffer) bei 10nA aufgenommen. Dazu haben wir nur den rechten Arm (Photomultiplier PM2) benutzt. Blende B1 und B3 waren ganz geöffnet und der Polarisationsfilter PF1 horizontal eingestellt, so dass an PF3 keine Trennung nach Polarisierungsrichtungen stattfinden konnte.

Als nächstes haben wir die Gleichlichtdepolarisation bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Dazu wurden zunächst alle Blenden auf halbe Öffnung gestellt, um einen möglichst guten Kompromiss zwischen hoher Intensität und reiner linearer Polarisierung zu finden. Dies war nötig, da die Fokussieroptik einen kegelförmigen Strahlengang erzeugt. Zur Messung waren PF1 und PF3 vertikal, PF2 horizontal eingestellt. So wurden die Intensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} gleichzeitig gemessen.

Zwischen den Messungen musste immer wieder überprüft werden, ob die Arme PM1 und PM2 die gleiche Gesamtintensität sehen. Dazu wurde PF1 wieder horizontal (s. o.) eingestellt, die Intensitäten verglichen und ggf. an den Blenden B2 und B3 nachjustiert. Da die Intensitäten teilweise fluktuierten, wurden von uns als Messwerte die Mittelwerte von je zwei oder drei Anzeigewerten aufgenommen.

4.2 Zeitaufgelöste Messung

- Photomultiplier PM
- Constant-Fraction-Discriminator CFD (vermindert Puls-Jitter)
- Time-to-Pulse-Height-Converter TPHC

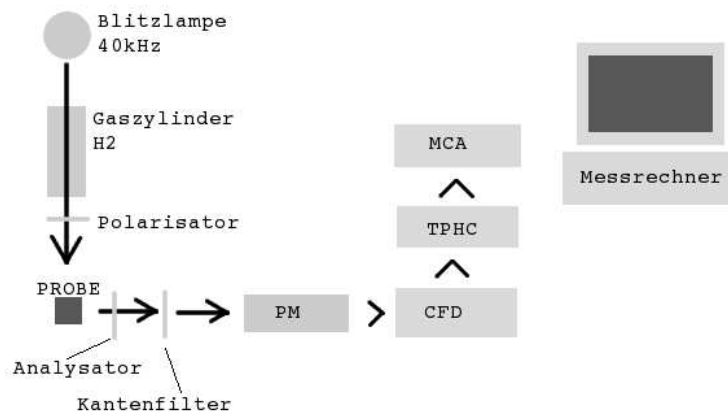


Abbildung 2: Skizze des Versuchsaufbaus zur zeitaufgelösten Messung.

- Multichannel-Analysator MCA (ordnet Pulshöhen bzw. Zeiten entsprechende Kanäle zu)

Bei der zeitaufgelösten Messung wird ein prinzipiell vergleichbarer Aufbau verwendet (siehe Abbildung 2). Allerdings werden die Intensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} nicht zugleich, sondern nacheinander in zwei Messungen mit dem selben Photomultiplier-Arm aufgenommen. Auch hier sind einige Vorbereitungen nötig: Zunächst haben wir den Gesamtintensitätsunterschied zwischen den Analysatorstellungen für I_{\parallel} und I_{\perp} zur späteren Korrektur gemessen. Dann haben wir über die Einstellung verschiedener Verzögerungszeiten (Delay) die Eichung des Multikanal-Analysators (MCA) von Kanälen zu Nanosekunden festgestellt.

Wir haben so I_{\parallel} und I_{\perp} bei drei verschiedenen Temperaturen gemessen. Dabei triggert die Blitzlampe die Messung, die also tausendfach wiederholt wird. Im MCA bilden sich so Count für Count die Intensitätskurven für die ersten knapp 20 ns nach der Anregung, die am Computer ausgewertet wurden.

5 Auswertung

5.1 Herstellen der Lösung

Man erhält 1 mMol DPH-Lösung in THF, wenn man 23 mg DPH in 100 ml Puffer gibt. Einfacher ist es wahrscheinlich eine konzentrierte Lösung herzustellen und diese dann zu verdünnen, z. B. 100 ml einer Lösung mit 2,3 g/Mol von DPH herzustellen und davon dann 1 ml in 99 ml THF aufzulösen. So umgeht man das Abwiegen im mg-Bereich.

5.2 Bestimmung der Quantenausbeute

Wir haben die Intensitäten der aufgenommenen Spektren (Abbildungen 4 und 5) aufsummiert und daraus die Quantenausbeute wie in (14) berechnet. Das Emissionsspektrum

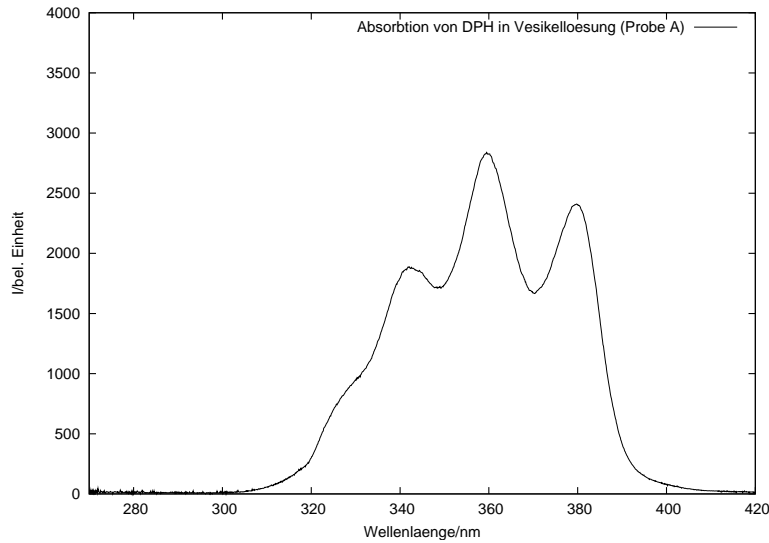


Abbildung 3: Absorptionsspektrum von DPH in Vesikellösung. (A) (Abstrakte Einheiten über Wellenlänge).

von DPH in reinem Puffer (Probe B) haben wir dabei um den Verstärkungsfaktor $\frac{10 \text{ nA}}{1 \mu\text{A}}$ korrigiert.

$$\frac{\Phi_{\text{Probe B}}}{\Phi_{\text{Probe A}}} = \frac{\int_{\text{Spektrum}} I_{em,B}(\nu) d\nu}{\int_{\text{Spektrum}} I_{em,A}(\nu) d\nu} \simeq 3,55 \cdot 10^{-3} \quad (14)$$

Außerdem haben wir noch die Intensitäten der drei sichtbaren Spitzen aufsummiert und daraus ebenfalls die Quantenausbeute berechnet, was einen Wert von $3,12 \cdot 10^{-3}$ ergab. Diese Werte bestätigen, dass die Fluoreszenz von DPH in Wasser um ein Faktor 100 geringer ist und deshalb kaum zur Gesamtfluoreszenz beiträgt.

Zwischen Absorption und Emission (Abbildungen 3 und 4) ist sehr schön die erwartete Wellenlängenverschiebung und die „Spiegelung“ des Spektrums zu sehen. Ferner fällt sofort auf, dass die Emission im Puffer deutlich schwächer als in der Vesikellösung ist.

Wir können also fortan davon ausgehen, dass die Emission des DPH im Puffer keine nennenswerte Störung zur Messung der Dynamik in Lipidmembranen beiträgt.

5.3 Bestimmung der Schwingungsparameter

Aus den Spektren in der Lipid-/Vesikellösung bestimmten wir die Lagen der drei Hauptspitzen (Fehler aus Spitzenbreite), die in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Mittels der Gleichung

$$n\hbar\omega = E_n - E_0 \Leftrightarrow \omega = 2\pi c \frac{\frac{1}{\lambda_n} - \frac{1}{\lambda_0}}{n} \quad (15)$$

bestimmt man die Frequenz ω , indem man die Spitzenpositionen über die Indizes aufträgt. Die Steigungen in Abbildung 6 bestimmt dann ω , woraus wir wiederum die Null-

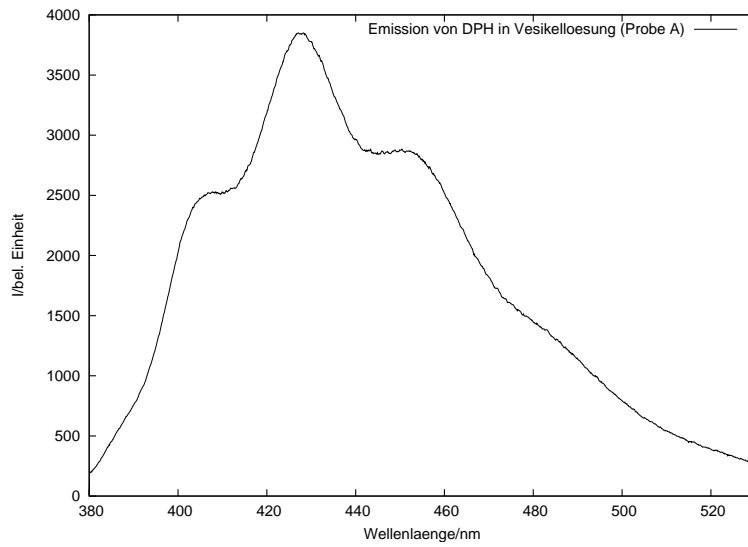


Abbildung 4: Emissionsspektrum von DPH in Vesikellösung. (A) (Abstrakte Einheiten über Wellenlänge).

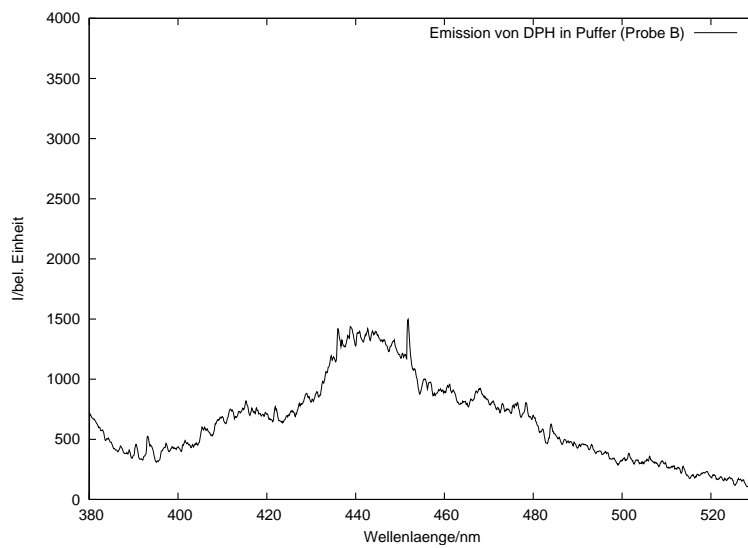


Abbildung 5: Emissionsspektrum von DPH in reinem Puffer. (B) (Abstrakte Einheiten über Wellenlänge).

	Spitze 1	Spitze 2	Spitze 3
Absorption (nm)	342 ± 5	360 ± 8	380 ± 7
Absorption (cm ⁻¹)	29240 ± 412	27778 ± 610	26316 ± 434
Emission (nm)	407 ± 11	427 ± 11	451 ± 15
Emission (cm ⁻¹)	24570 ± 650	23419 ± 552	22173 ± 734

Tabelle 1: Spitzen der Anregungs- und Fluoreszenzlinien von DPH in DMPC.

Fluoreszenz	Anregung
<i>Steigung</i> = 1195 ± 32	<i>Steigung</i> = 1462
$\omega = (2,25 \pm 0,06)10^{14}$ Hz	$\omega = 2,7510^{14}$ Hz
$x_0 = (4,85 \pm 0,06)10^{-12}$ m	$x_0 = 4,3810^{-12}$ m
$k = (1011 \pm 27) \frac{\text{N}}{\text{m}}$	$k = 1513 \frac{\text{N}}{\text{m}}$

Tabelle 2: Aus den Spektren errechnete Parameter.

punktsschwingung $x_0 = \sqrt{\frac{\hbar}{m_c \omega}}$ und die Kraftkonstante $k = m_c \omega^2$ berechnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Aus den Lagen von $\lambda_{\max} \simeq 360$ nm und $\lambda_{00} \simeq 388$ nm (Abbildung 7) findet man dann die Nullagendifferenz der Potentiale und somit den Kernabstand im Molekül, siehe folgende Gleichung (16).

$$\Delta x = \sqrt{\frac{2hc}{k} \left(\frac{1}{\lambda_{\max}} - \frac{1}{\lambda_{00}} \right)} \simeq 8,88 \cdot 10^{-12} \text{ m} \quad (16)$$

5.4 Gleichlicht-Fluoreszenzdepolarisation

Um die van 't Hoff-Enthalpie zu ermitteln wird die Anisotropie $R(T)$ über der Temperatur aufgetragen. Man erhält eine Stufenfunktion, siehe Abbildung (8), dessen idealerweise waagerechten Anteile angepasst werden. M_1 ergibt sich als Abstand der Werte von der unteren, M_2 als Abstand von der oben durch die Anpassung erhaltene Gerade. Aus

$$\Theta = \frac{M_2}{M_1 + M_2} \quad (17)$$

ergibt sich dann der Umwandlungsgrad Θ für den Phasenübergang im Lipid. Der Kurvenverlauf $\Theta(T)$ läßt sich mit einer Gleichgewichtsreaktion interpretieren, aus der sich die Steigung

$$\left(\frac{d\Theta}{dT} \right)_{T_u} = \frac{\delta H}{4RT^2} \quad (18)$$

ergibt. Dazu wird der Umwandlungsgrad über der Temperatur aufgetragen. Aus dem halben Umwandlungsgrad $\Theta_{1/2}$ konnte die Umwandlungstemperatur zu $T_u = 22,2 \pm 0,5$ °C bestimmt werden. Die Steigung an dieser Stelle ergibt sich aus der Anpassung in Abbildung 9 zu $\left(\frac{d\Theta}{dT} \right)_{T_u} = 0,597$. Das Maß für die Steilheit des Überganges ist die van 't

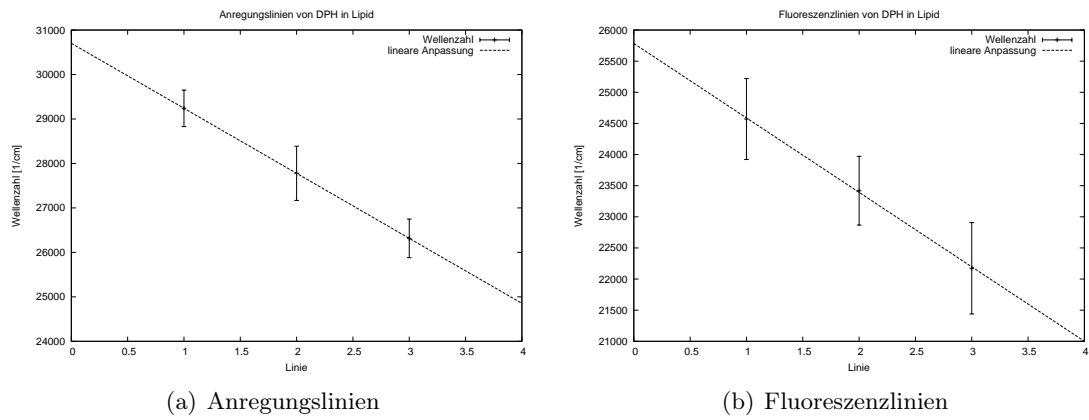


Abbildung 6: DPH in Lipid.

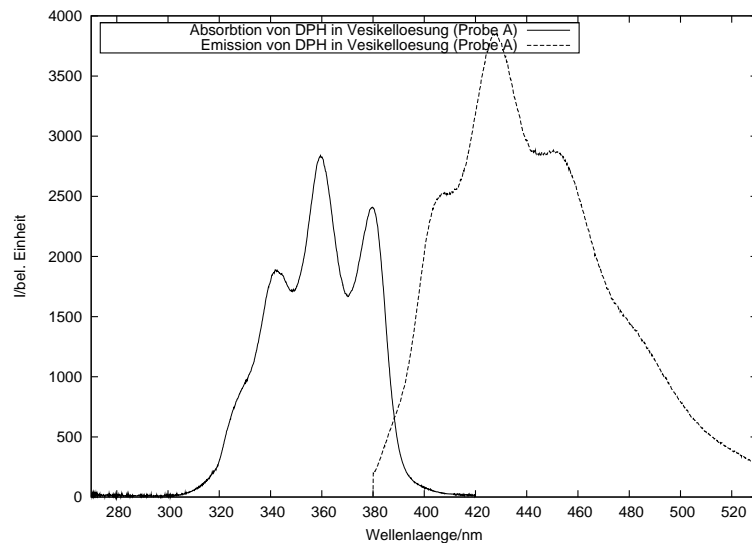


Abbildung 7: Spektren von DPH in DMPC.

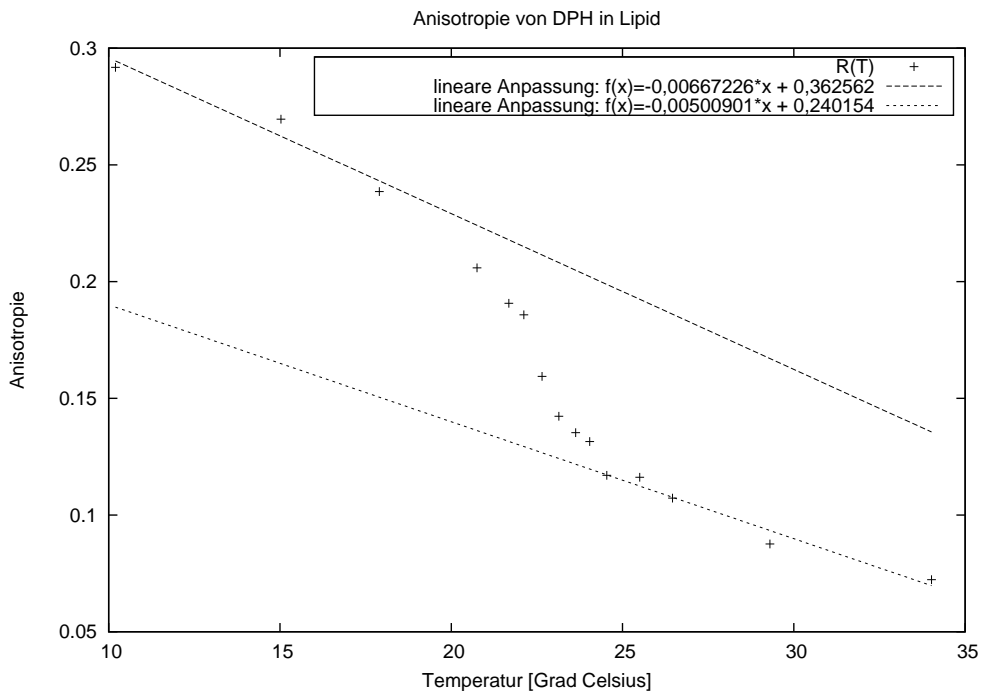


Abbildung 8: Anisotropie von DPH in DMPC.

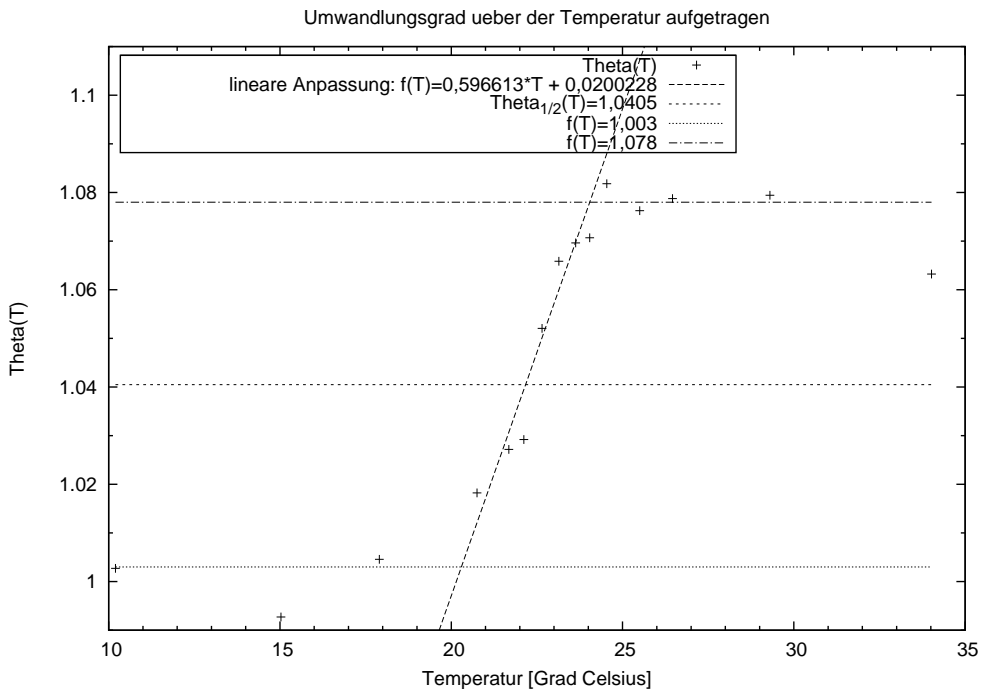


Abbildung 9: Umwandlungsgrad über der Temperatur aufgetragen.

Temperatur T	10,12 °C	22,62 °C	34,53 °C
Ausgangsanisotropie R_0	0,33890	0,3312	0,3061
Grenzanisotropie R_∞	$0,2583 \pm 0,0003$	$0,1255 \pm 0,0002$	$0,02139 \pm 0,0002$
Anisotropiemittelwert $\langle R \rangle$	$0,2801 \pm 0,0004$	$0,1696 \pm 0,0003$	$0,06976 \pm 0,0002$
Lebenszeit τ [ns]	$8,83 \pm 0,03$	$8,30 \pm 0,03$	$7,35 \pm 0,02$
Rot.korrelationszeit Φ_{rot}	$3,271 \pm 0,05$	$2,26 \pm 0,01$	$1,504 \pm 0,005$

Tabelle 3: Ermittelte Werte bei verschiedenen Temperaturen.

Hoff-Enthalpie, die den Wert

$$\delta H = \left(\frac{d\Theta}{dT} \right)_{T_u} \cdot 4RT^2 = (1731 \pm 287) \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \quad (19)$$

annahm. Wobei für die allgemeine Gaskonstante R , der Wert $R = 8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ benutzt wurde. Die kalorimetrische Enthalpie beträgt laut des Praktikums skripts $H_{\text{th}} = 30 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$. Der von uns erhaltene Wert liegt um zwei Größenordnungen höher, woraus folgt, dass sich laut unserer Messung die Anisotropie viel schneller ändert als wenn man den kalorischen Wert für die van 't Hoff-Enthalpie zugrunde legt.

5.5 Zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation von DPH in DMPC-Vesikeln

Die Fluoreszenz und die Anisotropie-Kurven – als Funktionen $S(t)$ und $R(t)$ – wurden bei den Temperaturen von 10,12 °C, 22,62 °C und 34,53 °C gemessen. Mit einem Computerprogramm wurden die Messergebnisse ausgewertet. Es ergaben sich die folgenden Werte für die Anisotropien R_0 , R_∞ , $\langle R \rangle$, die Lifetime τ und die Rotationskorrelationszeit Φ_{rot} für drei Temperaturen, die in Tabelle 3 eingetragen sind.

Aus diesen Werten lassen sich Rotationsdiffusionskonstante:

$$D = \frac{1 - \frac{R_\infty}{R_0}}{6\Phi}$$

und Mikroviskosität:

$$\eta = \frac{k_B T}{6DV_{\text{ef}}}$$

berechnen. Hierbei ist $k_B = 1,380710^{-23} \text{ J K}^{-1}$ die Boltzmannkonstante, T die Temperatur in Kelvin und $V_{\text{ef}} = (1,63 \pm 0,34)10^{-22} \text{ cm}^3$ ein gemittelter Literaturwert, der das effektive Volumen zusammen mit einem Formfaktor beschreibt. Außerdem lässt sich aus dem Verhältnis von $R(t)$ in Null und Unendlich der Öffnungswinkel des Kegels im einfachen „Wobbling-in-Cone“-Modell mit folgender Gleichung berechnen:

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

$$: \Theta_c = \arccos \left(\sqrt{\frac{1}{4} + 2\sqrt{\frac{R_\infty}{R_0}}} - \frac{1}{2} \right)$$

Temperatur T	10,12 °C	22,62 °C	34,53 °C
D [ps ⁻¹]	12,1 ± 0,4	45,8 ± 2	103,0 ± 3
η [Pas10 ⁻²]	33 ± 2	22,6 ± 0,9	15,0 ± 0,2
Θ_c [°]	24,1 ± 0,1	44,2 ± 0,4	68 ± 3

Tabelle 4: Berechnete Größen.

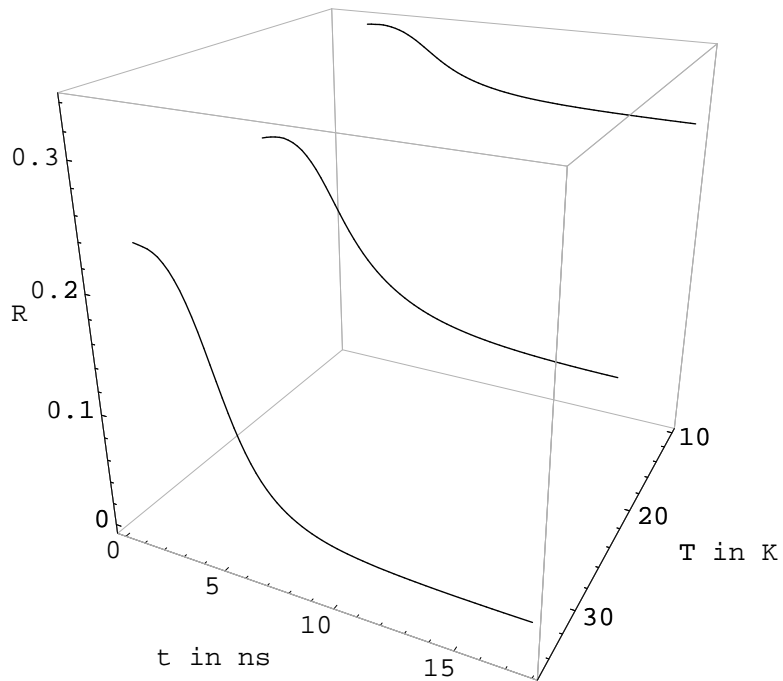


Abbildung 10: Anisotropie nach Anregung bei verschiedenen Temperaturen.

T	10,12 °C	22,62 °C	34,53 °C
$\langle R \rangle_{\text{Puls}}$	$0,280 \pm 0,004$	$0,170 \pm 0,003$	$0,070 \pm 0,002$
$R_{\text{Gleichlicht}}$	$0,292 \pm 0,015$	$0,159 \pm 0,008$	$0,072 \pm 0,004$

Tabelle 5: Vergleich der mittleren Anisotropie mit den Werten aus der Gleichlichtanordnung.

In Tabelle 4 sind die berechneten Werte für die drei Größen wiedergegeben.

Die zeitaufgelöste Messung zeigt deutlich (Abbildung 10), dass die Marker sich bei höherer Temperatur schneller isotrop verteilen. Daraus folgt, dass sie sich entsprechend freier bewegen können.

Durch Vergleich der aus der Gleichlichtfluoreszenz-Messung ermittelten Anisotropiewerte mit denen vom Programm berechneten aus der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung von $\langle R \rangle$ gibt einem an, wie gut die benutzten Instrumente sind. Diese scheinen bei unserem Versuch (Tabelle 5) gut justiert gewesen zu sein, da eine Übereinstimmung im Fehlerintervall festgestellt werden konnte. Dabei wurde als Fehler für die Fluoreszenz-Anisotropie R eine Schwankung um 5% angenommen und die Werte um die Temperaturen extrapoliert.

5.6 Diskussion

Trotz der geringen Anzahl an Messpunkten lassen sich deutlich folgende Eigenschaften von Lipidmembranen beobachten:

Wie erwartet führt die Erhöhung der Temperatur zu einer Abnahme der Mikroviskosität. Dies hat ganz anschaulich kleinere Rotationskorrelationszeiten zur Folge, ferner nimmt die Anisotropie rasch ab. Der Wobble-Winkel nimmt aufgrund der größeren Beweglichkeit natürlich zu. Die Abnahme der Lebenszeit τ erklären wir uns mit der temperaturabhängigen Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeiten.