

Biophysikpraktikum

Versuch:

Fluorimetrische Bestimmung des Membranpotentials an Vesikeln

I Ziel des Versuches:

Die Bedeutung von chemischen Ionengradienten und selektivem Membrantransport für die Erzeugung von elektrischen Potentialdifferenzen über biologischen Membranen, wird anhand einfacher Modellsysteme verdeutlicht.

II Aufgabenstellung:

Phospholipidvesikel mit definierter Innenkonzentration von Kaliumchlorid werden mit Hilfe der Ultraschallmethode hergestellt. Durch Zugabe von Kaliumchlorid zu den Vesikeln wird ein chemischer Ionengradient erzeugt, der, nach Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit durch Valinomycin, zu einer zusätzlichen elektrischen Potentialdifferenz, dem sogenannten Membranpotential, führt. Das Membranpotential wird mit elektrosensitiven Fluoreszenzfarbstoffen für unterschiedlich hohe Ionengradienten gemessen. Die Höhe des elektrischen Potentials soll mit der Nernstgleichung berechnet werden.

III Literatur:

- [1] Biophysik, Hrsg. v. Walter Hoppe, Wolfgang Lohmann, Hubert Markl, u. a., 2., neu bearb. Aufl. 1982, Springer, Berlin.
- [2] Physikalische Chemie und Biophysik, Hrsg. v. Gerold Adam, Peter Läger, Günther Stark, 4. überarb. u. erw. Aufl. 2003, Springer, Berlin.
- [3] Principles of Fluorescence Spectroscopy, Hrsg. v. Joseph R. Lakowicz, 1983, Plenum Press, New York.
- [4] Molecular Biology of the Cell, Hrsg. v. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis et al., 4. Auflage, 2002, Taylor & Francis.

IV Notwendige Vorkenntnisse:

Vorlesung Grundlagen der Biophysik oder Biophysik I, Absorptions- Fluoreszenzspektroskopie.

V Grundlagen zum Versuch:

Die Gewinnung und Speicherung von Energie wird von allen lebenden Organismen für die Verrichtung von zellulärer Arbeit, wie z. B. Transport, Strukturbildung, Wachstum u. a., benötigt. Da diese Prozesse für das Überleben von Organismen von fundamentaler Bedeutung sind, haben sich im Laufe der Evolution einige grundlegende Mechanismen zur Energiegewinnung und -speicherung entwickelt, die optimal an die Umwelt angepasst sind und in allen Lebewesen Anwendung finden, vom einfachen Einzeller bis hin zu hochkomplexen pflanzlichen und tierischen Organismen.

Eine zentrale Rolle bei der Energiegewinnung und -nutzung spielen elektrochemische Ionengradienten, die sich vornehmlich aus Protonen sowie Kalium- und Natriumsalzen zusammensetzen.

Konzentrationsgradienten über biologischen Membranen werden durch aktive Transportprozesse erzeugt, in der Regel durch Ionenpumpen, die unter Verbrauch von Energie einen Transport entgegen dem eigenen Konzentrationsgradienten ("bergauf"-Transport) bewirken. Häufig kommt es dabei auch zu einer Ladungstrennung, so dass gleichzeitig eine elektrische Potentialdifferenz entsteht, das sogenannte Membranpotential.

Ein klassisches Beispiel ist die Natrium-Kalium-ATPase, die unter ATP-Verbrauch 2 Kaliumionen in die Zelle und 3 Natriumionen aus der Zelle transportiert.

Durch dieses Transportungleichgewicht entsteht ein Überschuss an positiver Ladung außerhalb der Zelle, so dass das resultierende Membranpotential außen positiv ist.

Gleichzeitig entstehen 2 Konzentrationsgradienten über der Plasmamembran: ein einwärts gerichteter Natriumgradient (Konzentrationsüberschuss außerhalb der Zelle) und ein außwärts gerichteter Kaliumgradient (Konzentrationsüberschuss innerhalb der Zelle).

Beide Gradienten stellen treibende Kräfte dar, die zum Transport von Ionen genutzt werden können: der chemische Gradient treibt diffusiven Transport an und das elektrische Feld Transport durch Migration.

Zur Beschreibung dieser verschiedenen Transportarten, werden im Folgenden die Flussgleichungen dafür hergeleitet (Fluss = Anzahl von Teilchen die pro Zeiteinheit eine Fläche A passieren).

Migration

Bei dieser Art des Transportes werden einzelne Partikel betrachtet, die durch Einwirkung einer externen Kraft X mit einer Geschwindigkeit v bewegt werden. Da die Partikel sich in Lösungsmittel befinden tritt durch Wechselwirkung der Partikel mit den Lösungsmittelmolekülen gleichzeitig eine Reibungskraft X_f auf, die proportional der Geschwindigkeit der Partikel ist. Es gilt:

$$X_f = -fv \quad (1)$$

mit f als Reibungskoeffizient (Dim $f = \text{N s m}^{-1}$). Die Summe der Kräfte, die auf das Partikel wirken ist also:

$$X + X_f = X - fv \quad (2)$$

Nach der Bewegungsgleichung von Newton ist die Summe aller Kräfte, die auf ein Partikel wirken:

$$\sum X_i = m \cdot \frac{dv}{dt} \quad (3)$$

mit $m =$ Masse des Partikels. Damit ergibt sich:

$$m \cdot \frac{dv}{dt} = X - fv \quad (4)$$

Für den stationären Fall, wenn also die Beschleunigung null ist und die Partikel sich mit konstanter (stationärer) Geschwindigkeit v_s bewegen ergibt sich:

$$X - fv_s = 0 \quad (5)$$

Nach Umstellen erhalten wir:

$$v_s = \frac{1}{f} X = BX \quad (6)$$

Der neue Koeffizient B wird mechanische Mobilität genannt.

Zur Beschreibung des Migrationsflusses nehmen wir den stationären Fall an ($v = v_s$) und betrachten ein Volumenelement mit der Grundfläche A und der Kantenlänge $v_s \cdot \Delta t$ (Abb. 1). In diesem Volumenelement befindet sich eine bestimmte Menge Partikel dn , die gegeben ist als:

$$dn = A \cdot v_s \cdot \Delta t \cdot N \quad (7)$$

mit $N = \text{Partikel/m}^3$.

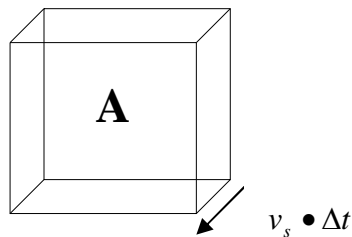


Abbildung 1: Schema eines Volumenelementes mit der Grundfläche A und der Kantenlänge $v_s \cdot \Delta t$.

Alle Partikel dn in diesem Volumenelement bewegen sich mit der Geschwindigkeit v_s und passieren nach Δt die Grundfläche A. Der Migrationsfluss ist also gegeben als:

$$J = \frac{dn}{\Delta t \cdot A} \quad (8)$$

Einsetzen von (7) in (8) ergibt:

$$J = v_s \cdot N \quad (9)$$

Einsetzen von (6) in (9) ergibt:

$$J = N \cdot B \cdot X \quad (10)$$

In biologischen und chemischen Systemen wird häufig mit molaren Konzentrationen gerechnet. Multiplikation beider Seiten von Gleichung 10 mit N_A (Avogadrozahl = $6 \cdot 10^{23}$ Partikel / mol) ergibt den molaren Fluss:

$$J_{N_A} = C \cdot B \cdot X \quad (11)$$

mit C = Konzentration in mol/l.

Diffusion

Bei dieser Art von Transport wird eine Partikelmenge betrachtet, deren Transportrate vom Konzentrationsgradienten der Partikelmenge abhängt. Die Partikel führen eine irreguläre und zufällige Bewegung aus, die auf thermischer Bewegung beruht. Daraus folgt, dass die Partikel immer vom Ort hoher Konzentration zum Ort niedriger Konzentration wandern und dass dies auch für die Lösungsmittelmoleküle gilt. Die Beziehung zwischen beiden Flüssen ist gegeben als:

$$J_{\text{Partikel}} = -J_{\text{Lösungsmittel}} \quad (12)$$

Da diese beiden Flüsse sich nur im Vorzeichen unterscheiden, genügt die Beschreibung des Partikelflusses. Adolf Fick untersuchte den Transport durch Diffusion und formulierte 1856 das 1. Fick'sche Gesetz zur Beschreibung des Diffusionsflusses:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (13)$$

mit D = Diffusionskoeffizient (Dim D = $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) und x = Ort. Der Fluss ist also abhängig vom Konzentrationsgradienten ($\frac{\partial C}{\partial x}$) und einem stoffspezifischen Koeffizienten D .

Um die treibende Kraft für Diffusion zu beschreiben, führen wir einige Umformungen von Gleichung (13) durch, um den diffusiven Fluss, so wie den Migrationsfluss, über eine Kraft X zu beschreiben. Dazu wird die rechte Seite der Gleichung mit $\frac{B}{C} \cdot \frac{C}{B} (=1)$ multipliziert und wir erhalten:

$$J = C \cdot B \cdot \left(-\frac{D}{B} \cdot \frac{\partial \ln C}{\partial x} \right) \quad (14)$$

In Analogie zu Gleichung (11) erhalten wir den Ausdruck in der Klammer als treibende Kraft X_{diff} für Diffusion:

$$X_{\text{diff}} = -\frac{D}{B} \cdot \frac{\partial \ln C}{\partial x} \quad (15)$$

Mit Einstein's Relation:

$$D = kTB \quad (16)$$

(k = Boltzmannkonstante = $1,3804 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$, T = absolute Temperatur) und Multiplikation der rechten Seite von Gleichung (15) mit $\frac{N_A}{N_A}$ erhalten wir:

$$X_{diff} = -\frac{1}{N_A} \cdot \frac{\partial}{\partial x} (RT \ln C) \quad (17)$$

($R = N_A k$ = allgemeine Gaskonstante = $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Der Ausdruck in der Klammer ist analog zum chemischen Potential μ :

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C \quad (18)$$

Das chemische Potential unter Standardbedingungen μ_0 ist konstant, so dass der Ausdruck in der Klammer von Gleichung (17) durch μ ersetzt werden kann. Für den Diffusionsfluss erhalten wir dann die Gleichung:

$$J = B \cdot C \cdot \frac{1}{N_A} \left(-\frac{\partial \mu}{\partial x} \right) \quad (19)$$

mit $b = \frac{B}{N_A}$ molare mechanische Mobilität erhalten wir:

$$J = b \cdot C \cdot \left(-\frac{\partial \mu}{\partial x} \right) \quad (20)$$

Der Gradient des chemischen Potentials, repräsentiert durch den Konzentrationsgradienten, ist also die treibende Kraft für Diffusion.

Aus Vollständigkeitsgründen sie noch erwähnt, dass sich aus der Massenerhaltung folgende Beziehung ergibt:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\partial J}{\partial x} \quad (21)$$

daraus folgt:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2. \text{ Fick'sches Gesetz}) \quad (22)$$

Das 2. Fick'sche Gesetz gibt also den Zusammenhang zwischen der zeitlichen Konzentrationsänderung und der lokalen Flussänderung wieder.

Elektrodifffusion

In realen biologischen Systemen wirken oft mehrere Kräfte gleichzeitig auf ein Partikel. Häufig sind dies der Konzentrationsgradient der Partikel (Diffusion) und eine externe Kraft, ein elektrisches Feld (Migration). Zur Beschreibung dieser Elektrodifffusion werden die Flussgleichungen für Diffusion (13) und Migration (11) zur sogenannten "Smoluchowski-Gleichung" gekoppelt:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} + BCX \quad (23)$$

Für das elektrische Feld gilt:

$$E = -\frac{\partial \Psi}{\partial x} \quad (24)$$

mit ψ = elektrisches Potential. Da das elektrische Feld nur mit geladenen Partikeln wechselwirkt können wir für die externe Kraft schreiben:

$$X = -zq_e \frac{\partial \Psi}{\partial x} \quad (25)$$

mit z = Valenz der Partikel und q_e = Elementarladung = $1,602 \cdot 10^{-19}$ Coulomb. Durch Einsetzen von Gleichung (25) in Gleichung (23) und Ersetzen von D durch Einstein's Relation erhalten wir:

$$J = -u \frac{kT}{zq_e} \cdot \frac{\partial C}{\partial x} - uC \frac{\partial \Psi}{\partial x} \quad (26)$$

mit $u = z q_e B$ = elektrische Mobilität. Multiplikation der rechten Seite von Gleichung (26) mit $\frac{N_A}{N_A}$ ergibt:

$$J = -\frac{u}{zF} \cdot C \cdot \left(RT \frac{\partial \ln C}{\partial x} + \frac{\partial \Psi}{\partial x} \right) \quad (27)$$

mit $F = q_e \cdot N_A$ = Faradaykonstante = 96492 Coulomb/Äquivalent. Der Ausdruck $\frac{u}{zF}$ lässt

sich zur molaren mechanischen Mobilität b kürzen, so dass wir für die Elektrodifffusion wieder eine Flussgleichung in Analogie zur Migrationsgleichung erhalten, bei der der Ausdruck in der Klammer der treibenden Kraft für den Transport entspricht. Dieser Ausdruck ist analog dem elektrochemischen Potential $\bar{\mu}$:

$$\bar{\mu} = \bar{\mu}_0 + RT \ln C + zF\Psi \quad (28)$$

Mit $\bar{\mu}_0$ = elektrochemisches Potential unter Standardbedingungen = konstant kann der Ausdruck in der Klammer in Gleichung (27) durch das elektrochemische Potential $\bar{\mu}$ ersetzt werden und wir erhalten:

$$J = -b \cdot C \cdot \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial x} \quad (\text{Nernst-Planck-Gleichung}) \quad (29)$$

Die treibende Kraft für Elektrodifffusion ist also durch den Gradienten des elektrochemischen Potentials gegeben, das sich aus dem chemischen ($RT \ln C$) und dem elektrischen Potential ($zF\psi$) zusammensetzt.

Zur Vereinfachung betrachten wir den Transport durch Elektrodifffusion unter Gleichgewichtsbedingungen, für die gilt $J = 0$ und $\frac{\partial C}{\partial t} = 0$. In diesem Fall sind das chemische und das elektrische Potential im Gleichgewicht:

$$\frac{kT}{zq_e} \cdot \frac{\partial C}{\partial x} = -C \frac{\partial \Psi}{\partial x} \quad (30)$$

Multiplikation von Gleichung (30) mit $1/C$ und dx , sowie Integration in den Grenzen ψ_{Innen} und $\psi_{\text{Außen}}$ und C_{Innen} und $C_{\text{Außen}}$ (Innen und Außen entspricht der Innen- und Außenseite der Membran) ergibt:

$$-\frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{C_i}{C_a} = \Psi_i - \Psi_a \quad (\text{Nernst-Gleichung}) \quad (31)$$

Die Nernst-Gleichung gibt an, wie groß ein chemisches Potential sein muss um ein bestimmtes elektrisches Potential zu halten.

In lebenden biologischen Systemen kommt der Gleichgewichtsfall allerdings nicht vor, obwohl man zur Beschreibung von Transportvorgängen manchmal Gleichgewichtsannahmen macht. In lebenden Systemen liegen Fließgleichgewichtsbedingungen vor ($J \neq 0 = \text{konstant}$; $\frac{\partial C}{\partial t} = 0$) Für das elektrochemische Potential unter Fließgleichgewichtsbedingungen gilt:

$$\Psi_i - \Psi_a = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{\sum P_K C_K^i + \sum P_A C_A^a}{\sum P_A C_K^a + \sum P_A C_{Ai}^a} \quad \text{Goldmann-Gleichung} \quad (32)$$

A und K steht für Anion und Kation, a und i steht für Innen und Außen. P gibt die Permeabilität der Membran für Anionen oder Kationen an. Bei der Goldmann-Gleichung, die auch Hodgkin-Katz-Gleichung genannt wird, wird also auch der Nettotransport berücksichtigt, indem die unterschiedliche Permeabilität der Membran für die verschiedenen Ionen mit einbezogen wird.

VI Versuchsdurchführung

Benötigte Chemikalien und Geräte

Es wird empfohlen, während der Versuchsdurchführung einen **Laborkittel** zu tragen.
Während der Messungen **müssen Handschuhe getragen werden**.

MOPS: (4-Morpholinpropansulfonsäure)	(Puffer)	50mM, mit 1mM KCl, pH 6,5	
KCl:		1M	
Oxonol:	(Fluoreszenzfarbstoff)	1mM in DMSO (Dimethylsulfoxid)	
Valinomycin:		10mM in DMSO	Giftig!
CCCP (Carbonyl cyanide 3- chlorophenylhydrazone)		10mM in DMSO	Giftig!
Asolectin:	(Lipide)		
Entionisiertes Wasser			

Spatel

Analysenwaage

Becherglas (100ml), Messzylinder (50ml), Flasche (50ml)

Ultraschallgerät Sonopuls m. Sonde TT13 (Titanteller), Stativ, Gehörschutzstopfen, Kurzzeitwecker

Tischzentrifuge SIGMA m. Rotor 12159, 2 Zentrifugenbecher 50ml m. Ständer

Glaspipette 20ml, Gummiball

Fluorimeter SHIMADZU

2 Messküvetten m. Rührstäbchen

Thermostat

Mini-Magnetrührer

autom. Pipetten, Pipettenspitzen

Druckluft

Herstellen der Vesikel

Wiegen Sie 0,15g Asolectin in ein 100ml-Becherglas ein.

Messen Sie mittels Messzylinder 50ml MOPS-Puffer ab und geben Sie diesen zum Asolectin dazu.

1. Beschallen:

Zur Herstellung der Vesikel (Suspendieren der Lipide) wird das Asolectin-Gemisch mittels Ultraschallsonde beschallt. Dazu wird das Becherglas am Stativ so befestigt, dass die Sonde möglichst weit in das Gemisch ragt, jedoch nicht das Becherglas berührt.

Einstellungen am Ultraschallgerät: -Dauer: 15min
-Zyklus: 50%
-Power: 70%

Achtung: Ultraschallsonde während des Betriebes **nie berühren!** Immer **Gehörschutz tragen!**

Es empfiehlt sich, während des Beschallens den Raum zu verlassen. Es kann währenddessen die Zentrifuge vorbereitet werden.

2. Zentrifugation

Das Vesikel-Gemisch wird in einen Zentrifugenbecher gegeben (mit Deckel auswiegen) und in den Rotor gestellt.

Auf Gegengewicht in zweitem Becher achten!

Einstellungen an der Zentrifuge: -Rotor: 12159
-Dauer: 15min
-Temperatur: 26°C
-Drehzahl: 10.000g

Achtung: Auf fest verschlossene; außen trockene Zentrifugenbecher achten, Rotordeckel durch Verschrauben schließen!

Während des Zentrifugierens können die Einstellungen am Fluorimeter vorgenommen werden und die weiterhin benötigten Geräte vorbereitet werden.

Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand mit den Vesikeln mittels Glaspipette und Gummiball vorsichtig abgezogen und in ein verschließbares Gefäß gefüllt. Beim Herausnehmen und Öffnen des Zentrifugenbeckers ist darauf zu achten, dass sich die Vesikel nicht wieder mit den Lipid-Konglomeraten und Titanpartikeln vom Becherrand mischen.

Messung des Membranpotentials

Mit den so gereinigten Vesikeln werden Gleichgewichtspotentiale für Kaliumionen erzeugt und mit Hilfe eines elektrosensitiven Fluoreszenzfarbstoffes gemessen. Hierzu werden unterschiedlich hohe Kaliumkonzentrationsgradienten über der Vesikelmembran eingestellt. Zuerst wird das elektrische Potential ohne Veränderung der Kaliumleitfähigkeit gemessen, anschließend dann durch Zugabe einer Kaliumionophore mit erhöhter Kaliumleitfähigkeit.

Im Vorversuch wird zuerst die Erzeugung des Potentials ohne den Kaliumionophor Valinomycin gemessen.

Messung:

Nehmen Sie zuerst folgende **Einstellungen am Fluorimeter** vor:

2-D-Zeitmessung

Messzeit:	660sec
Anregungswellenlänge (Ex)	599nm
Emissionswellenlänge (Em)	634nm
Aquisitionsrate:	0,5sec
Detektor-Empfindlichkeit	niedrig

Während der Messung wird die Probe mittels **externem Rührer** gerührt und mit einem **Thermostaten** auf 26°C temperiert (Kühlung zuschalten).

Pipettieren Sie nun die Reagenzien nach folgendem Schema in die Küvette:

Vorsicht: Arbeiten Sie **mit Handschuhen!**

Vorversuch:

Lösung	Volumen
Vesikel	1798 µl
MOPS-Puffer	160 µl

Stellen Sie nun die Küvette in die Messkammer und starten Sie die Messung.

zügig ->	Oxonol	1 µl
	KCl 1M	40 µl

Potentialaufbau abwarten

CCCP	1 µl
------	------

Durch Zugabe des Protonophores CCCP, soll das elektrische Potential wieder abgebaut werden. Geben Sie eine Erklärung dafür.

In der 2. Versuchsserie sollen unterschiedlich hohe Gleichgewichtspotentiale eingestellt werden. Dazu werden die einzelnen Lösungen wie folgt pipettiert:

Versuchsreihe:

Lösung	Volumen
Vesikel	1798 μ l
MOPS-Puffer	variabel (s.u.)

Stellen Sie nun die Küvette in die Messkammer und starten Sie die Messung.

	Oxonol	1 μ l
	Valinomycin	1 μ l
zünftig ->	KCl 1M	variabel (s.u.)

Fluoreszenzänderung ablesen

Variieren Sie das Volumen von KCl in einem Konzentrationsbereich von 5mM bis 80mM Endkonzentration. Gleichen sie das fehlende Volumen durch Puffer aus:

MOPS	KCl
195 μ l	4 μ l
189 μ l	10 μ l
179 μ l	20 μ l
159 μ l	40 μ l
119 μ l	80 μ l
39	160

Messen Sie die Fluoreszenzänderung vor und nach Kaliumzugabe und tragen Sie diesen Wert gegen die Kaliumkonzentration auf. Berechnen Sie das elektrische Potential mit der Nernstgleichung und tragen Sie dieses ebenfalls gegen die Kaliumkonzentration auf (Welche Auftragung wählt man sinnigerweise?).