

Praktikum moderne Physik

Versuch

Jens Schäfer
Jan van der Linden

schaferjens92@gmail.com
jan.vdlinden95@gmail.com

Durchgeführt am: Datum

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Theoretische Grundlagen | 1 |
| 1.1 | Ziel des Experiments | 1 |
| 1.2 | Black Lipid Membran Methode | 1 |
| 1.3 | Gramicidin A | 2 |
| 1.4 | Generierung der Membran | 2 |
| 1.5 | Einzelkanal Messungen | 3 |
| 1.6 | Multikanal Messungen | 3 |
| 1.7 | Weitere Analysen | 3 |
| 1.8 | Gaußsche Fehlerfortpflanzung | 3 |
| 2 | Versuchsablauf | 5 |
| 2.1 | Lipid membrane preparation | 5 |
| 2.2 | Measurement of single channels | 5 |
| 2.3 | Measurement of multiple channels | 5 |
| 2.4 | Further questions | 6 |
| 3 | Versuchsauswertung Teil 1 | 7 |
| 3.1 | Auftragen der Membran | 7 |
| 3.2 | Membranfläche | 7 |
| 3.3 | Kapazität | 8 |
| 3.4 | Dicke | 9 |
| 3.5 | spezifische Kapazität | 9 |
| 3.6 | Durchbruchspannung, maximales E-Feld, Aufnahmeequalität | 9 |
| 3.7 | Widerstand | 10 |
| 4 | Versuchsauswertung Teil 2 | 11 |
| 4.1 | Stromfluss durch einen einzelnen Kanal | 11 |
| 4.2 | Einzelkanal-Leitfähigkeit | 13 |
| 4.3 | Kanalöffnungszeit - Einzelkanalvermessung | 13 |
| 4.4 | Kanalöffnungszeit - Multikanalvermessung | 13 |

1. Theoretische Grundlagen

1.1 Ziel des Experiments

In diesem Experiment soll anhand eines Modells untersucht werden, wie ein Antibiotikum auf eine Zellmembran wirkt. Dazu wird ein Präparat einer Lipid Doppelmembran angefertigt und einem Antibiotikum (Gramicidin A) ausgesetzt. Durch das Antibiotikum werden Ionenkanäle in der Membran gebildet und somit Kationenfluss ermöglicht. Für eine Zelle bedeutet dies, dass ihr Potential zusammenbricht und sie stirbt.

Hier soll die Generierung einer solchen Membran beobachtet werden und das Entstehen sowie die Beschaffenheiten der Ionenkanäle näher untersucht werden.

1.2 Black Lipid Membran Methode

Bei der Black Lipid Membran Methode ist eine speziell geformte Küvette aus PTFE Herzstück des Aufbaus. Zwei Tanks werden durch eine Trennwand abgeschirmt die eine kleine, kreisrunde Öffnung mit abgerundeten, weichen Kanten beinhaltet. Eine Wand der Küvette beinhaltet ein Fenster wodurch die Öffnung beobachtet werden kann. In dieser Öffnung werden die Peptide aufgetragen. Sie bilden einen geschlossenen, zunächst undurchdringlichen Film. Die beiden Tanks werden mit Elektrolüten gefüllt und Ag/AgCl-Elektroden ausgestattet. Durch die Zerstörung der Lipidschicht kann nun ein elektrischer Strom die Barriere überwinden und gemessen werden 1.1.

Die Natur der Lipide gibt vor, dass sie sich innerhalb einer Grenzschicht parallel anordnen.

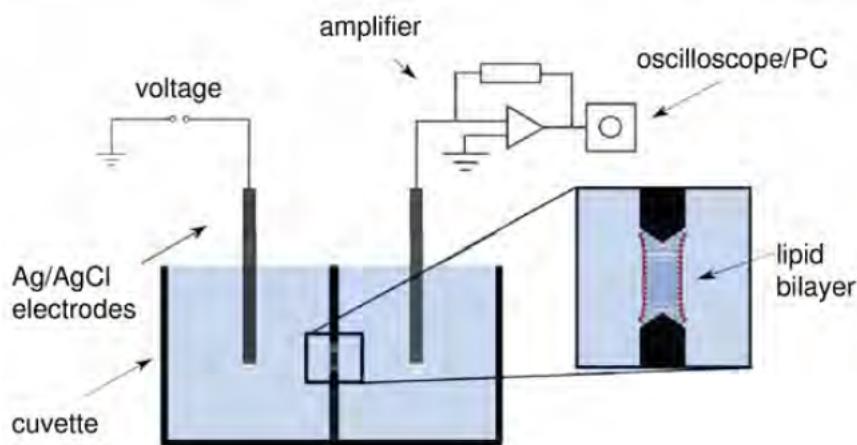


Abbildung 1.1: Experimenteller Aufbau

Dabei zeigen in wässriger Lösung die hydrophilen Köpfe nach außen, nach innen gerichtet

sind die hydrophoben Fettsäureketten, die sich mit den Fettsäuren der gegenüberliegenden Grenzschicht anziehen. So bauen die Lipide eine Kette mit einer gewissen Oberflächenspannung auf und trennen die Tanks dicht ab 1.2. Die Dicke wird somit ziemlich gut konstant gehalten und die Doppelschicht besitzt isolierende Eigenschaften. Daher kann man die Trennlinie in guter Näherung als Plattenkondensator ansehen.

Die Dicke der Leptidschicht kann anhand ihrer optischen Eigenschaften eingeordnet werden.

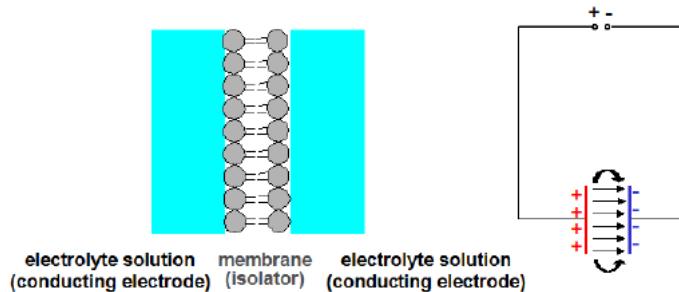


Abbildung 1.2: Lipid-Doppelschicht

Eine weiße Schicht hat eine Dicke d gegenüber der Wellenlänge $\lambda \ll d$, bei $\lambda \approx d$ zeichnen sich newtonsche Ringe ab und für $\lambda \gg d$ erscheint die Oberfläche schwarz. Die Membran wird bei sehr geringer Dicke bevorzugt untersucht um die Kondensatornäherung bestmöglich zu erfüllen, daher der auch die Namensgebung.

1.3 Gramicidin A

Gramicidin A ist ein Peptid-Antibiotikum. Diese bestehen in der Regel aus 10 bis 50 Aminosäuren und können mit Zellmembranen interagieren.

Im Körper werden Peptid-Antibiotika selbst generiert und werden benutzt, um infizierte Zellen zu zerstören. Um dies zu bewerkstelligen integrieren sie sich in die Zellmembran und ermöglichen es somit auf verschiedenen Wegen, Ionen in die Zelle einzudringen. Bei Gramicidin A geschieht dies durch die Bildung von Kanälen in der Membran. Diese haben Durchmesser von etwa 3 – 4 Å. Durch den Fluss von Kationen in die Zelle wird damit ihr elektrochemisches Gleichgewicht gestört und sie stirbt ab.

In diesem Experiment wird die Penetration der Zelle durch die Lipid Doppelmembran simuliert; nachdem sich die Membran gebildet hat, ist kein Stromfluss mehr durch die Elektroden möglich. Nach Zugabe von Gramicidin A können in der Membran Kanäle gebildet werden, welche Stromfluss ermöglichen. Dies ist gleichbedeutend mit einer erfolgreichen Bekämpfung und Zerstörung einer infizierten Zelle im Körper mittels eines Peptid-Antibiotikums.

1.4 Generierung der Membran

Als erster Versuchsschritt soll eine Membran generiert werden. Dazu wird eine geringe Menge an Glycerol Monooleat in Tetradecan auf die Öffnung gebracht. Dadurch wird eine Lipide Doppelmembran generiert. Dies soll optisch beobachtet werden; die Farbe der Membran verändert sich, je nach Dicke bis sie komplett schwarz wird.

Für die fertige Membran kann die Leitfähigkeit sowie die Kapazität und die Dicke bestimmt werden.

Die Leitfähigkeit G kann über den gemessenen Strom durch die Membran und die angelegte Spannung bestimmt werden über $G = \frac{I}{U}$.

Um die Kapazität zu bestimmen kann angenommen werden, dass die Doppelmembran sich

im Stromkreislauf wie ein Plattenkondensator verhält. Daher ist der übliche Zusammenhang für einen Plattenkondensator gültig:

$$C = \epsilon_0 \epsilon_m \frac{A}{d} \quad (1.1)$$

1.5 Einzelkanal Messungen

Gibt man nur sehr geringe Mengen Gramicidin A in die Lösung so bilden sich auch nur sehr wenige Kanäle in der Membran. Dies wird durch einen quantisierten Stromverlauf sichtbar womit die Anzahl der aktiven Kanäle und auch der Stromfluss pro Kanal bestimmbar sind. Ebenso kann durch die Aufnahme eines Stromhistogramms die Lebensdauer eines Kanals bestimmt werden.

Desweitern gilt zu überprüfen, ob das Ohmsche Gesetz hier erfüllt ist:

$$I_M = \lambda_M \cdot V_M$$

mit I_M dem Strom und λ_M der Leitfähigkeit durch die Membran, sowie V_M die Potentialdifferenz der beiden Elektrolyte auf beiden Seiten der Membran.

1.6 Multikanal Messungen

Erhöht man die Konzentration des Gramicidin A so öffnen und schließen sich viel mehr Kanäle und eine Vermessung der einzelnen Kanäle ist nicht mehr möglich. Jedoch besteht die Möglichkeit Aussagen über das Öffnen und Schließen der Kanäle, also die Lebenszeit durch eine Autokorrelationsfunktion zu treffen.

Dazu soll ein Stromhistogramm aufgenommen werden und über Autokorrelation verglichen werden. Dazu verschiebt man den Verlauf des Histogramms in der Zeit und summiert das Produkt der ursprünglichen und der verschobenen Verteilung binweise auf. Ein hoher ist somit gleichzusetzen mit einer hohen Korrelation der Werte. Der Autokorrelationswert AC einer Funktion $f(t)$ bei einer Verschiebung um t' berechnet sich beispielsweise durch

$$AC = \sum_t f(t) * f(t - t')$$

Hier ist für die Strommessung ein exponentieller Abfall des Autokorrelationswertes mit der Zeitverschiebung zu erwarten, da mit steigender Zeittypendifferenz die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass ein Kanal zu beiden Seiten geöffnet ist. Ist ein Kanal zu beiden verglichenen Zeiten geöffnet, so trägt dieser zur Korrelation bei. Die mittlere Lebenszeit τ eines Kanals wird sich demnach als Zerfallskonstante im exponentiellen Abfall widerspiegeln:

$$AC(t') \sim \exp\left(-\frac{t'}{\tau}\right)$$

1.7 Weitere Analysen

1.8 Gaußsche Fehlerfortpflanzung

Berechnet sich eine Größe A aus mehreren Größen x_i welche eine statistische Unsicherheit σ_i besitzen, so propagiert die Unsicherheit der x_i weiter zu einer Unsicherheit σ_A in A . Diese Fehlerpropagation wird durch die Gaußsche Fehlerfortpflanzung ausgedrückt:

$$\sigma_A = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\partial A}{\partial x_i} \cdot \sigma_i \right)^2} \quad (1.2)$$

2. Versuchsablauf

Der Versuchsablauf orientiert sich an der Lösung der im BLM-Dokument unter “2. Questions and to dos“ aufgelisteten Fragestellungen

2.1 Lipid membrane preparation

Preparation einer Lipid-Doppelschicht mit Glycerol-monooleate in Tetradecanelektrische und optische darstellung der Lipid-Doppelschicht

Bestimmen der Membrankapazität, der spezifischen Membrankapazität und der Membran-dicke

Bestimmen des Membranwiderstandes

Bestimmen der Schwellspannung und des maximalen E-Feldes

2.2 Measurement of single channels

Ändern der Leitfähigkeit für Gleichstrom mittels kleiner Gramicidin A-konzentrationen

Bestimmen des Stromes und der mittleren Lebensdauer eines Channels mittels des Stromhistogrammes

Überprüfen des ohmschen Gesetzes mit einem einzelnen Channel

2.3 Measurement of multiple channels

Darstellen der Channelformierung mit einer hohen Gramicidin A-konzentration

Bestimmen des Stromes eines einzelnen Channels mittels des Stromhistogrammes

Bestimmen des Stromes eines einzelnen Channels und der mittleren Öffnungsduer eines Channels mittels der analyse der autokorrelationsfunktion des Stromrauschens

2.4 Further questions

Gegenüberstellen der verschiedenen methoden und der Resultate

den check ich nich

Darstellen der Leitfähigkeit einzelner Channels von Gramicidin A kanälen

Berechnung des Partikelflusses (=Ionen/Sekunde) durch einen Gramicidin A-kanal

3. Versuchsauswertung Teil 1

3.1 Auftragen der Membran

Um die BLM zu Präparieren wurde mit einem Teflonstab ein dünner Film der Peptidschicht auf die Kapilare aufgetragen. Die anfangs dicke Schicht wird durch sanftes abstreifen, klopfen oder rühren verjüngt. Durch die Kamera kann dabei die Ausprägung der newtonschen Ringe beobachten werden. In Abbildung 3.1 ist Kapilare mit unterschiedlich dicken Lipidmembranen zu sehen. Links ist die Membran dick genug, um Licht hindurch zu lassen, sie erscheint durchsichtig. Die mittlere ist im Bereich der Wellenlängen von sichtbarem Licht und bildet damit newtonsche Ringe aus. Bei der dritten Aufnahme ist die Membran im Begriff sich auszudünnen, man erkennt die Lichtunterdrückung rechtsseitig und damit die Schwarzfärbung.

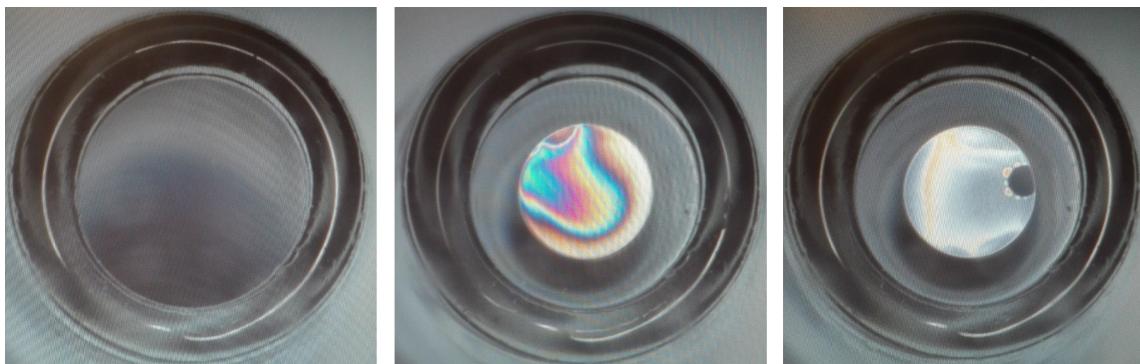
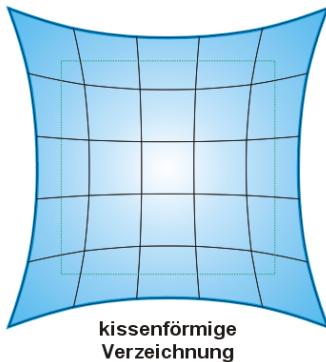


Abbildung 3.1: Lichtdurchlässige Membran (l), Newtonsche Ringe (m), BLM (r)

3.2 Membranfläche

Um die Fläche der Membran zu bestimmen wurden die Kameraaufnahmen untersucht. Relevant für die untersuchten Prozesse ist nur jener dünne und schwarze Anteil der Membran. Hierzu dient die Aufnahme 3.3. Bei der Untersuchung der Verhältnisse aus Pixel/Millimeter für den Kapilaraußen/ und -innendurchmesser fällt auf, dass das Verhältniss mit zunehmendem Abstand von der optischen Achse zunimmt. Dieser Effekt ist der Krümmung der Linse verschuldet und wird in der Optik als kissenförmige Verzeichnung bezeichnet **??**. Da die Verzeichnung allerdings exponentiell mit dem Abstand zur Bildmitte zunimmt und die Verhältnisse zwischen Außen- und Innenwand nur 5,6% (3.1) betragen, können im inneren der Kapillare lineare Verhältnisse vorausgesetzt werden, insbesondere da die BLM recht zentriert in der Kapillare auftreten. Um den Fehler minimal zu halten, rechnet man mit dem Verhältnis des Innendurchmessers um den BLM-Durchmesser zu bestimmen. Die Zahlen sind in Tabelle 3.1 eingetragen.



[<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0a/Verzeichnung3.png>]

Abbildung 3.2: Kissenförmige Verzeichnung durch die Krümmung der Linse

| | Außen | Innen | BLM |
|---------------------------|---------|---------|-------------------|
| \varnothing (Pixel) | 2085 | 1465 | 441 |
| \varnothing (Milimeter) | 1,55 | 1,15 | $\approx 0,346$ |
| p/mm | 1345,16 | 1273,91 | $\approx 1273,91$ |
| Verhältniss Außen: | 1345,16 | | |
| Verhältniss Innen: | | 1273,91 | |
| Differenz: | 71,3 | | = 5,59% |

Tabelle 3.1: Vermessung von Kapilare und BLM

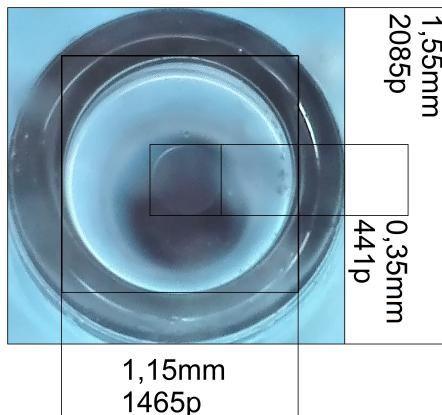


Abbildung 3.3: Vermessung von Kapilare und BLM

3.3 Kapazität

Bei der Messung der Kapazität wird eine Rechteckspannung von $U_{C0} = 5 \text{ mV}$ mit $f = 50 \text{ Hz}$ an die Elektroden angelegt. Dabei wird ein Widerstand $R_1 = 100 \text{ k}\Omega$ in Reihe geschalten und die Spannung über der Membran aufgezeichnet. Abbildung 3.4 zeigt die zugehörige Oszilloskopaufnahme, auf der man die Analogie zum Kondensator verifizieren kann. Eingezeichnet wurde die Peakspannung von $U_0 = 7,5 \text{ V}$ und die geometrisch konstruierte Strecke von 53 Pixel, die der charakteristischen Zeit τ entspricht, während der die Spannung auf $U_0/e \approx 2,8$ abfällt. Daraus lässt sich die Zeit Tau bestimmen und die

Kapazität berechnen:

$$\tau = \frac{53}{1250} \cdot 1/50 \text{ s} = 0,84 \text{ ms}$$

$$C = \tau/R_1 = 0,84 \text{ ms} \cdot 100 \text{ k}\Omega = 8,4 \text{ nF}$$

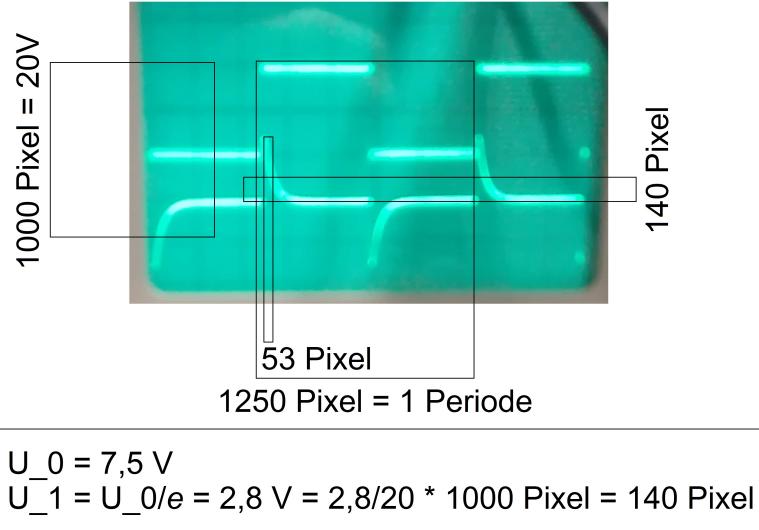


Abbildung 3.4: Oszilloskopaufnahme der Entladung der Membran über eine Wechselspannung

3.4 Dicke

Die Dicke der Membran bekommt man aus der Analogie zum Plattenkondensator:

$$d = \epsilon_0 \epsilon_M \frac{A}{C}$$

$$= 8,85 \cdot 10^{-12} \frac{\text{C}}{\text{Vm}} \cdot 2\pi \left(\frac{0,346 \cdot 10^{-3} \text{ m}}{2} \right)^2 \cdot 8,4 \cdot 10^{-9} \text{ F}$$

$$= 0,196 \text{ nm} \ll \lambda$$

Hierbei wurde die Membran aus Abbildung 3.3 untersucht, deren Fläche und Kapazität oben bereits berechnet wurde.

3.5 spezifische Kapazität

$$C_{SPEZ} = C/A = 0,09 \frac{\text{F}}{\text{m}^2}$$

3.6 Durchbruchspannung, maximales E-Feld, Aufnahmegerät

Aufgrund der schwierigen Bedingungen die an das Labor gestellt werden um eine BLM stabil zu halten, war es vor Ort nicht möglich, alle Messungen durchzuführen. Auch die Aufnahme Abbildung 3.4 konnte in Eile nicht mit höherer Qualität durchgeführt werden, bevor die BLM zerstört.

Um die Durchbruchspannung zu bestimmen, hätte man auf eine BLM eine Wechselspannung von zunehmender Stärke angelegt und den Wert für den Durchbruch bestimmt. Das maximale elektrische Feld im Kondensator hätte sich zu $E_{Max} = U_{Durchbruch}/d$ berechnet.

3.7 Widerstand

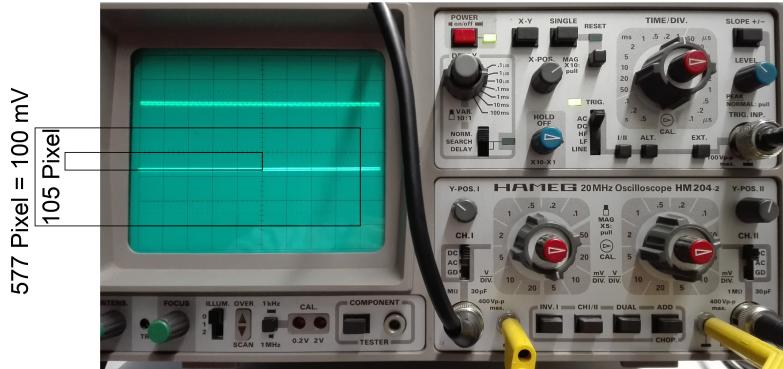


Abbildung 3.5: Widerstandsmessung

Um den Widerstand der Membran zu messen, wurde eine Gleichspannung von $U_0 = 15 \text{ mV}$ angelegt und der Spannungsabfall U_M über der Membran gemessen 3.5. Mit geschalten waren der Verstärker $V=200$ und der Vorwiderstand $R_x = 500\text{M}\Omega$

$$U_M = \frac{105}{577} \cdot 100 \text{ mV} = 2,7 \text{ mV}$$

$$R_M = R_x V U_0 / U_M$$

$$R_M = 82,4 \text{ G}\Omega$$

4. Versuchsauswertung Teil 2

Im zweiten Teil des Versuchs sollte der Effekt des Antibiotikums Gramicidin A auf die BLM untersucht werden. Da die Generierung einer stabilem BLM jedoch nicht möglich war wird für die folgende Auswertung auf einen Beispieldatensatz der Messungen zurückgegriffen.

4.1 Stromfluss durch einen einzelnen Kanal

Bei einer niedrigen Konzentration an Gramicidin A im Elektrolyt bilden sich in der Membran nur wenige Kanäle, daher ist die Quantisierung des Ionenstroms durch den Kanal gut erkennbar. In Abbildung 4.1 ist ein Ausschnitt der Messung des Stroms I über der Zeit dargestellt.

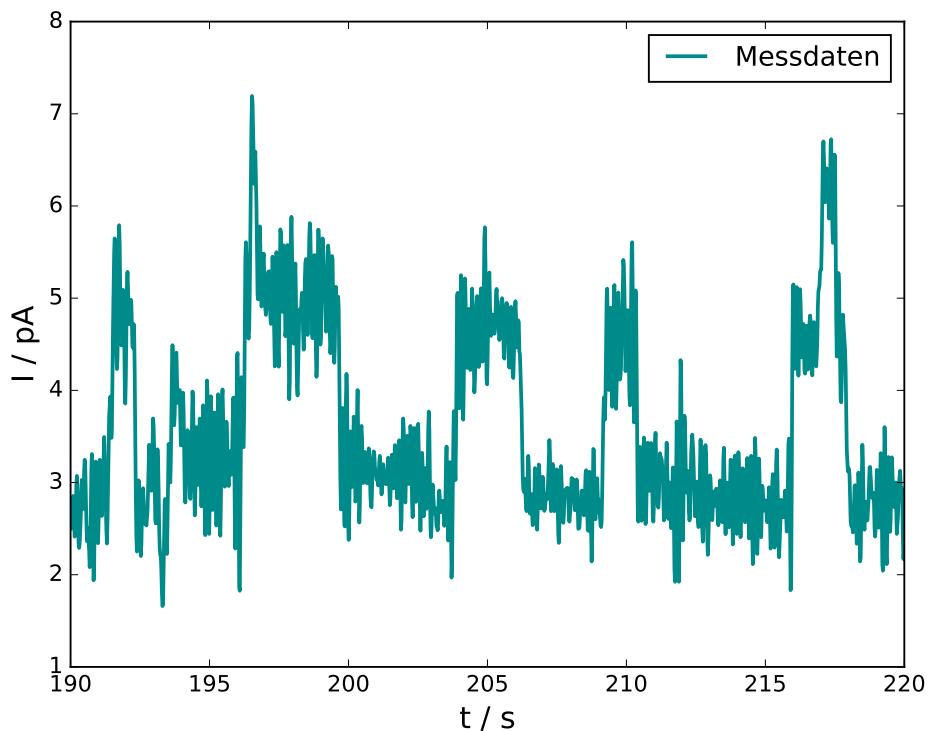


Abbildung 4.1: Ausschnitt der Messungen des Durchflusstroms über der Zeit. Zu erkennen sind niedrige und hohe Plateaus, wobei die niedrigen einem Grundstrom von etwa 3 pA entsprechen. Die hohen Plateaus entsprechen der Öffnung eines einzelnen Kanals wodurch etwa 2 pA zusätzlich fließen. Bei $t = 218\text{ s}$ sind für kurze Zeit zwei Kanäle geöffnet, der Strom beträgt dort etwa 7 pA.

Insgesamt wurden über 500 s mit einer Frequenz von 50 Hz Strommessungen durchgeführt. Für eine genauere Auswertung des Stromflusses durch einen einzelnen Kanal wurden die

Stromwerten in Abbildung 4.2 histogrammiert um die Mittelwerte des Grundstroms, sowie der ersten und zweiten Anregung zu bestimmen.

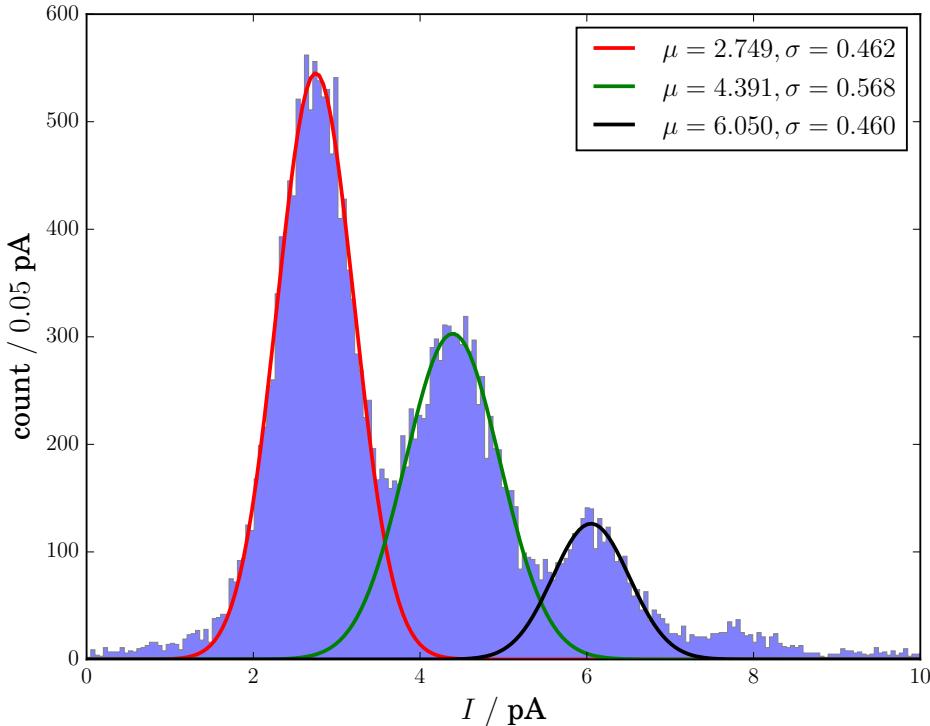


Abbildung 4.2: Histogrammierung der Stromwerte. Zu sehen sind drei ausgebildete Peaks. Der erste entspricht dem Grundstrom, der zweite entspricht einer Öffnung von einem einzelnen Kanal, der dritte entspricht der Öffnung von zwei Kanälen zur gleichen Zeit. Bei etwa 8 pA ist ein weiterer verlaufener Peak zu sehen, der zur Auswertung jedoch nicht beachtet wurde. Für jeden Peak wurde ein Fit an eine Gaußfunktion durchgeführt und der Mittelwert μ sowie die Standardabweichung σ dargestellt.

Tabelle 4.1: Angepasste Stromwerte

| | |
|-------------------|----------------------|
| Grundstrom I_0 | (2.75 ± 0.46) pA |
| ein Kanal I_1 | (4.39 ± 0.57) pA |
| zwei Kanäle I_2 | (6.05 ± 0.46) pA |

Der Einzelkanalstrom berechnet sich somit aus der Differenz zweier benachbarter Peaks:

$$I_{Kanal} = \frac{I_1 - I_0}{2} + \frac{I_2 - I_1}{2} = 1.65 \text{ pA}$$

Da die Kanalströme fluktuieren und die Messung der Ströme nur beschränkt genau möglich ist haben die Peaks in Abbildung 4.2 eine Breite, charakterisiert durch die Standardabweichungen σ . Diese Messunsicherheiten pflanzen sich statistisch in I_{Kanal} fort. Mit Gaußscher Fehlerfortpflanzung (vgl. Gleichung 1.2) berechnet sich somit für I_{Kanal} eine statistische Unsicherheit von $\sigma_{Kanal} = 0.33$ pA.

4.2 Einzelkanal-Leitfähigkeit

Durch die Berechnung des Einzelkanal-Stroms I_{Kanal} ist es nun möglich, die Leitfähigkeit λ eines Kanals zu bestimmen

$$\lambda = \frac{I_{Kanal}}{U_{Gen}}$$

Für eine Generatorenspannung von 50 mV erhält man $\lambda = 33,0 \text{ pS}$.

Da für die Generatorenspannung keine statistische Schwankung bekannt ist, propagiert allein die Unsicherheit in I_{Kanal} in λ . Mit Gaußscher Fehlerfortpflanzung (vgl. Gleichung 1.2) ergibt dies $\sigma_\lambda = 6.6 \text{ pS}$.

4.3 Kanalöffnungszeit - Einzelkanalvermessung

4.4 Kanalöffnungszeit - Multikanalvermessung

Durch die Zugabe einer höheren Konzentration Gramicidin A zum Elektrolyt bilden sich mehr Kanäle an der Membran. Damit sind zu jeder Zeit mehrere Kanäle offen und es kann keine Analyse der Öffnungs- und Schließzeiten der einzelnen Kanäle anhand des $I - t$ -Diagramms durchgeführt werden. In Abbildung 4.3 ist der Stromverlauf über der Zeit aufgetragen.

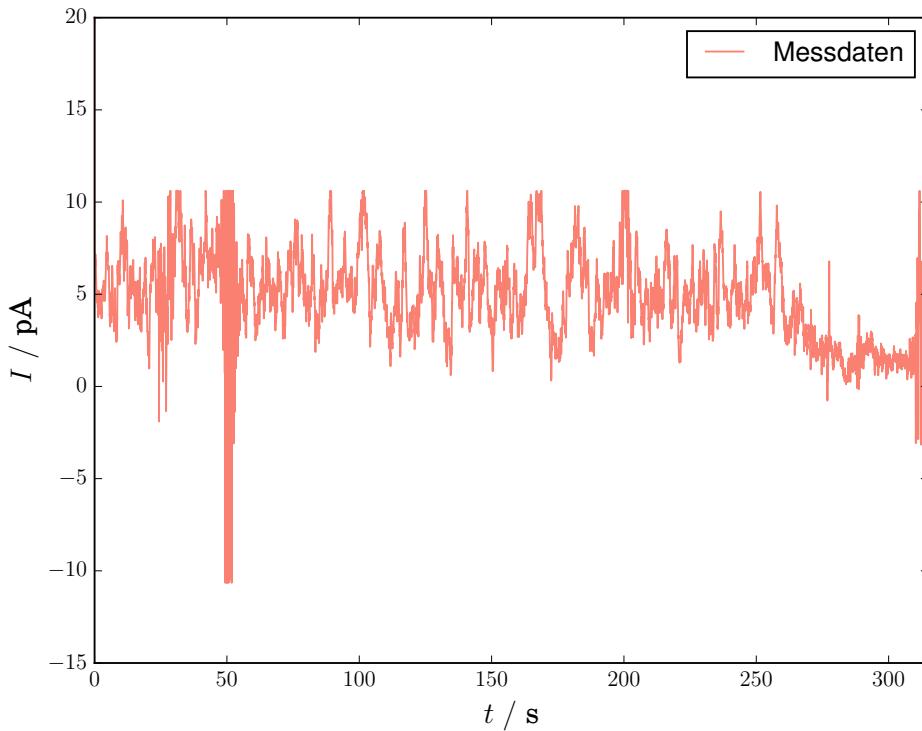


Abbildung 4.3: Stromverlauf der Multikanalmessung. Gemessen wurde ein Zeitraum von 320 s mit einer Frequenz von 50 Hz. Bis $t = 250$ s ist der Verlauf relativ gleichmäßig; der Strom scheint einen gleichmäßigen Mittelwert von etwa 5 pA zu haben, was bedeutet, dass zu jedem Zeitpunkt im Mittel gleich viele Kanäle geöffnet sind. Die Schwankungen im diesen Mittelwert entsprechen dem zufälligen Öffnen und Schließen von Kanälen.

Aufgrund von starken Ausreißern am Anfang und einem Abfall des Strom-Mittelwerts am Ende wurde für die weitere Analyse nur der Bereich von 60 s bis 250 s verwendet. In diesem Intervall ist der Mittelwert relativ konstant $\mu = 5.362 \text{ pA}$. Um die Autokorrelation

durchzuführen wurde der Mittelwert von jedem der Werte abgezogen. In Abbildung 4.4 ist der Verlauf der Autokorrelationsfunktion für Zeitverschiebungen von 0 s bis 4 s dargestellt. Für höhere Zeiten beginnt die Autokorrelation zu fluktuieren, daher wurde nur dieser Bereich für die Auswertung berücksichtigt.

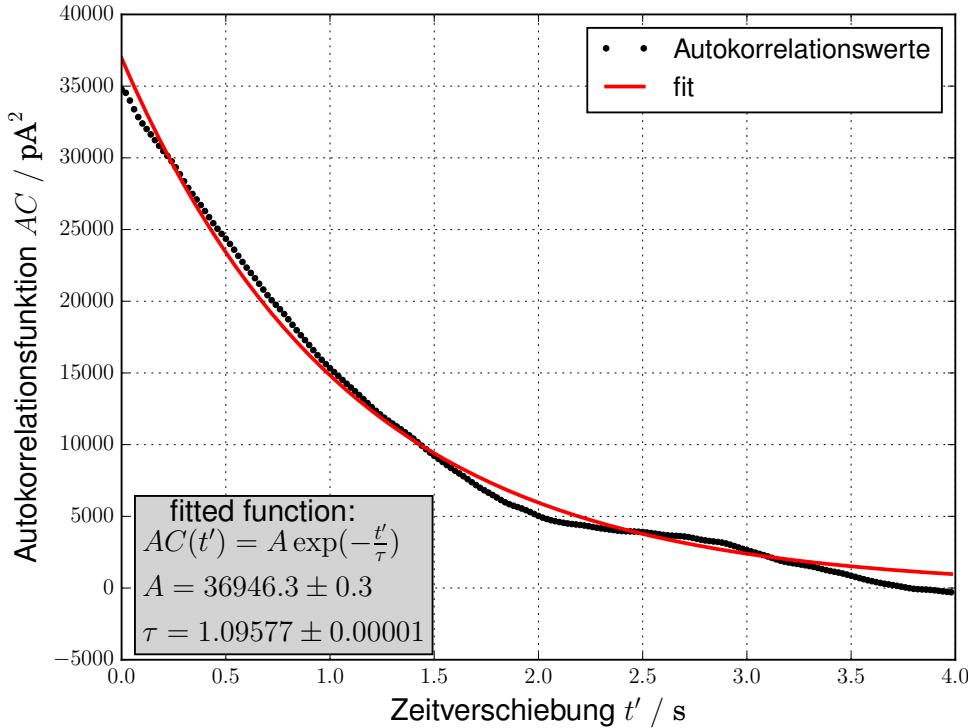


Abbildung 4.4: Autokorrelationsfunktion und exponentieller Fit.