

1 Einleitung

In diesem Versuch werden Ionenkanäle in planaren Lipidmembranen untersucht. Hierbei wird der Wirkmechanismus des Antibiotikums Gramicidin A untersucht. In einer biologischen Zelle gelangen durch die entstandenen Kanäle Kationen durch die Zellmembran. Die Zelle stirbt aufgrund der Zerstörung ihres elektrochemischen Gradients [1].

Gramicidin beschreibt eine Gruppe Antibiotika. Dieses ist kommerziell unter dem Namen Angidin®, Mycolog®, Topsym®, Neospiron® verfügbar.

2 Theoretische Grundlagen

Die chemischen Grundlagen werden hier nicht genau behandelt. Gramicidin A1 besitzt die Summenformel $C_{99}H_{140}N_{20}O_{17}$. Es kann in der Natur von im Boden lebenden Bakterien beobachtet, aber auch synthetisch hergestellt werden. Mehrere Strukturen sind möglich, wobei Gramicidin A die häufigste ist. Gramicidin S besitzt eine zyklische Struktur und damit einen anderen Wirkmechanismus. In diesem Experiment wird lediglich die Variante A verwendet.

2.1 Wirkmechanismus

Es existieren verschiedene Modelle, die beschreiben, wie Gramicidin A in die Zellmembran integriert wird, die in Abbildung 1 gelistet sind. Auf die Einzelheiten wird nicht im Detail eingegangen.

- A: Barrel Stave model, Hydrophobe, helixförmige Monomere bilden Poren in der Zellmembran.
- B: Toroidal Wormhole model, Porenformation nahe phosphatidylethanolamine, oder phosphatidylserine Membranen.
- C: Carpet model Teppich-(engl. carpet-)ähnliche Anlagerung auf Membran.
- D: Detergent similar model, Bi- und Mizellen bilden Flächen auf der Membran, durch deren Amphiphilie wird die Membran durchlässig.
- E: In-plane diffusion model, Verdünnung der Lipidschicht.

2.2 Ionentransport

Eine Membran trennt zwei Bereiche einer wässrigen Lösung. Um sie zu überwinden, muss ein Ion eine Energie E aufbringen. Die Wahrscheinlichkeit k , eines Ions mit der Temperatur T , diese während einer Zeiteinheit zu überwinden ist der Ratenkoeffizient

$$k = k_0 e^{-\frac{E}{k_B T}}, \quad (1)$$

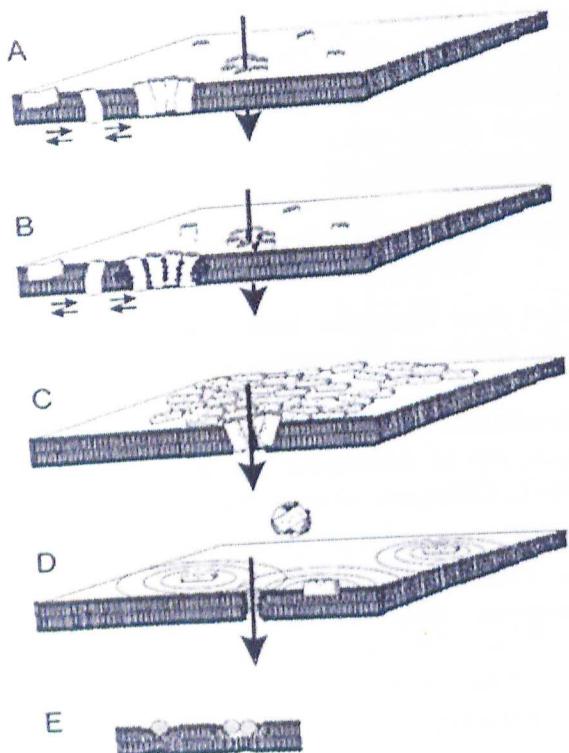


Abbildung 1: Verschiedene Modelle zur Erklärung der Zerstörung einer Bakterienzelle mittels Peptid-Antibiotika [1].

o.L.

Übrigens, hier leicht nach bzw. benennt (A) ... , (E) nochmals sodass man das Bild ohne lin und her blättern versteht!

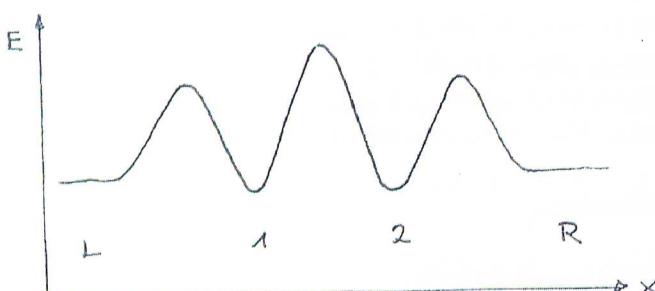


Abbildung 2: Schema eines Potentials einer Pore [1]. ✓

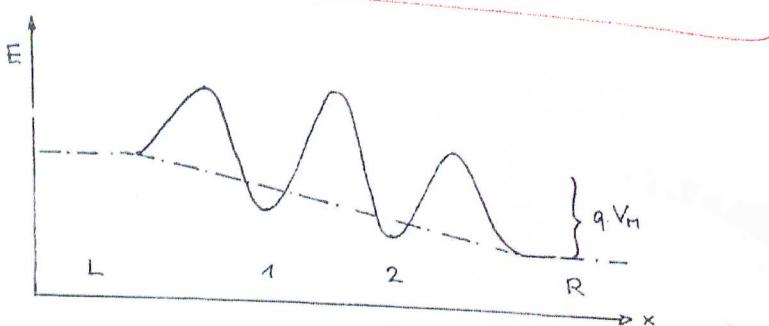


Abbildung 3: Schema des Potentials einer Pore mit angelegter Spannung [1]

mit der Boltzmannkonstante k_B . Das Potential einer Membran lässt sich wie in Abbildung 2 vorstellen. Die Ionen können in der Membran Bindungen eingehen, daher entstehen weitere Minima.

Die Gleichung 1 wird auf den Fall des Experiments erweitert. Durch die angelegte Spannung V_m wird das Potential asymmetrisch, wie in Abbildung 3 gezeigt. Es wird die Quasistationaritätsnäherung verwendet. Die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals ist damit

$$\Lambda = \frac{k_A}{k_D} \cdot \frac{c}{k_A^{-1} + k^{-1} + k_D^{-1}} \cdot \frac{q^2}{k_B T}. \quad (2)$$

Mit der Ladung q der Ionen und den Ratenkoeffizienten k_A , k_D und k der Membran. Hieraus ergeben sich die Zusammenhänge der makroskopisch messbaren Größen

$$I_M = \lambda_M \cdot V_m \quad (3)$$

und

$$\lambda_m = \Lambda \cdot N_p. \quad (4)$$

Hierbei ist I_M der gemessene Gesamtstrom durch die Membran und λ_M deren Leitfähigkeit.

oder

2.2.1 Einzelkanalentstehung

Nur Dimere des Gramicidin A führen zu einer Bildung von Ionenkanälen. Im Gleichgewicht werden Dimere gebildet und vernichtet. Dies führt zu einer variierenden Anzahl an Poren in der Membran und somit zu einer Fluktuation der Leitfähigkeit. Bei einer geringen Konzentration sind nur einzelne Kanäle vorhanden, daher ist die Quantisierung des Stromes I_M deutlich erkennbar.

Die Dimerisation kann durch die Gleichung



beschrieben werden. k_d ist hier die Rate der Dissoziation und k_r die der Entstehung der Dimere, G_1 entspricht den Monomeren, G_2 den Dimeren. Die Dissoziation folgt einem exponentiellen Zerfallsgesetz, die der Entstehungreaktion ist linear zum Quadrat der

*lach aufschalt
des Cg., daher
bitte Kreisende
formulieren.*

Konzentration. Aus dem Verlauf des Stromes über die Zeit lässt sich die Zerfallsrate bestimmen.

2.2.2 Mehrkanalentstehung

Bei hohen Konzentrationen sind einzelne Kanäle nicht mehr ohne weiteres zu beobachten. Es gibt jedoch ein Rauschen in der Strommessung. Dies entstammt dem Öffnen und Schließen von Kanälen. Die Reaktionsgleichung ergibt sich als

$$\frac{dG_2}{dt} = -k_d \cdot G_2 + k_r \cdot G_1^2. \quad (6)$$

Woraus folgt:

$$\frac{G_2}{G_1^2} = \frac{k_r}{k_d}. \quad (7)$$

Die Gesamtzahl der Moleküle ist

$$G = G_1 + 2 \cdot G_2. \quad (8)$$

Dieser Prozess kann beobachtet werden, wenn das Gleichgewicht, zum Beispiel mit einem elektrischen Feld, oder Temperaturänderung, gestört wird. Auch spontane Änderungen der Teilchenzahl sind im Rauschen erkennbar.

Die Relaxationszeit ergibt sich aus Gleichungen 6 und 7, zusammen mit 4 (mit $G_2 = N_P$) als

$$\tau^{-1} = k_d + 4 \cdot k_r \cdot G_1 = k_d + 4 \sqrt{\frac{k_d \cdot k_r}{\Lambda} \cdot \lambda_M}. \quad (9)$$

Deutlich zu erkennen ist die inverse wurzelförmige Abhängigkeit zur Leitfähigkeit.

2.2.3 Autokorrelationsfunktion

Eine Autokorrelationsfunktion beschreibt die Korrelation eines Signals mit sich selbst zu einem früherem Zeitpunkt. Bei einem stochastischen Prozess, wie der Entstehung und Schließung von Kanälen, ist das Zeitprofil der Korrelationsfunktion gleich der Relaxation des Gleichgewichts [1]. Diese ist in Gleichung 9 beschrieben.

Betrachtet man ein Signal $x(t)$, welches den Erwartungswert 0 hat, wie das Rauschen des Stroms, so erwartet man, dass der Erwartungswert

$$\langle x(t) \cdot x(t+T) \rangle = 0 \quad (10)$$

für $T \rightarrow \infty$, sowie

$$\langle x(t) \cdot x(t+T) \rangle = \langle x^2 \rangle \quad (11)$$

für $T = 0$ ist.

Die Lebensdauer eines Kanals $\frac{1}{k_d}$ definiert somit die Relaxationszeit. Es genügt also die Korrelationsfunktion zu analysieren. Die einzelnen Kanäle müssen nicht beobachtet werden und das Rauschen ist reduziert.

oder / und
zu einem
späteren
Zeitpkt.

0,7.

3.2 Erzeugung der Lipid-Doppelschicht und Messung der Membran-Kapazität

Die Kuvette soll in die Apparatur eingesetzt und die Lipidlösung mit einem Teflonstäbchen auf das gereinigte Loch aufgetragen werden, wobei darauf geachtet werden sollte, dass auf das Lipid keine Luftblasen gibt. Dann soll einige Minuten gewartet werden, damit die Lipide eine Doppelschicht trocknet. Die Schicht wird dabei mit einer Lampe im Abstand von 30 cm beleuchtet. Am Anfang sollten in der Reflexion Newtonsche Ringe sichtbar sein. Wenn dies nicht der Fall ist, soll mit einem Teflonstäbchen etwas von der Schicht entfernt werden. Im getrockneten Zustand sollte die Schicht im Objektiv schwarz erscheinen, da es an der Vorder- und Rückseite der Schicht reflektierte Licht destruktiv interferiert. Außerdem sollten im getrockneten Zustand einer Erhöhung der Membran-Kapazität feststellbar sein. Dabei kann die Membran als Plattenkondensator angenommen werden. Die Kapazität C ist dabei eine Funktion der Dicke d und der Fläche A der Membran

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d}. \quad (12)$$

1

Die experimentelle Bestimmung der Kapazität erfolgt über die Messung des Relaxationszeit τ des Membranstroms I_C . Die Entladung erfolgt exponentiell gemäß der Formel

$$I_C(t) = -\frac{U_0}{R_C} \cdot e^{\frac{t}{\tau}} = -I_0 \cdot e^{\frac{t}{R_C C}}, \quad (13)$$

wobei R_C den reellen Widerstand des Kondensators bezeichnet. Der Entladungsvorgang findet immer dann statt, wenn die Rechteckspannung umschwenkt. Die Spannung U_0 entspricht dann der doppelten Spannungsamplitude der Spannungsquelle. Es folgt, dass sich die Kapazität berechnen lässt über:

$$C = \frac{\tau}{R_C}. \quad (14)$$

Als spezifische Kapazität pro Fläche C_S soll ebenfalls bestimmt werden:

$$C_S = \frac{C}{A}. \quad (15)$$

Sobald die Membran trocken ist, wird in beide Hälften der Kuvette die KCl Lösung eingefüllt.

Naja, so habt ihr das nicht gemacht!

3.3 Messung einzelner Ionenkanäle

Die Widerstände werden in diesem Versuchsteil gleich gelassen, aber statt der Wechselspannung wird nun an der Membran eine Gleichspannung von 50 mV verwendet. Es soll eine kleine Menge Gramicidin A hinzugefügt und dabei der Membranstrom aufgezeichnet werden. Da der Strom sprunghaft mit der Anzahl der Kanäle steigen sollte, kann durch Differenzbildung an einer Stufe der Strom durch einen einzigen Kanal bestimmt werden. Wenn dieser Strom bekannt ist, kann man folglich immer sehen, wenn ein neuer

Kanal entsteht oder zerfällt.

Damit kann nun ein Histogramm der Kanal-Lebenszeiten erzeugt werden. Unter der Exponentialverteilung kann damit die mittlere Lebendauer eines Kanals und der Ratenkoeffizient für den Zerfall von Gramicidin A bestimmt werden.

3.4 Messung multipler Ionenkanäle

Nun soll die Konzentration von Gramicidin A erhöht werden, sodass viele Ionenkanäle entstehen. Mithilfe der gegebenen Analyse-Software wird der Membranstrom histogrammiert. Daraus sollen die Stufenhöhen und deren Mittelwerte bestimmt werden, was durch Messung der Position der Peaks und der dazugehörigen Stromdifferenz erfolgt.

in einem Histogramm verarbeitet

3.5 Noise-Analyse und Autokorrelationsfunktion

Nun soll eine solche Menge von Gramicidin A hinzugefügt werden, dass man mehrere Ionenkanäle erhält, die Grundlinie nicht mehr sichtbar ist und keine Stufen im Strom mehr enthalten sind. Der Mittelwert der Stromfluktuation sollte konstant bleiben, da sonst die Gleichungen für die Autokorrelation nicht gültig wären. Nun soll eine Analyse mit der Autokorrelationsfunktion durchgeführt werden und mit den Ergebnissen von dem Lebenszeit-Histogramm aus der Einzelkanalmessung verglichen werden, indem auch hier der Kanalstrom und die Kanal-Lebenszeit bestimmt werden.

verfälscht wird

3.6 Weitere Fragen

4 Quellen

1. Vorbereitungsmappe
2. pharmawiki.ch (16.11.2014)

1 Aufgabe 1: Vorbereitung der Lipidmembran

Zuerst mussten wir die „Black Lipid Membrane“ (BLM) erzeugen, was in etwa so gemacht wurde, wie in der Versuchsvorbereitung in Kapitel 3.1 beschrieben. Die beiden Hälften der Küvette bestanden bei unserem Aufbau aus einem äußeren Gefäß und einem inneren Gefäß, das in dieses hineingestellt wurde. Das innere Gefäß hatte ein herausragendes Röhrchen, an dessen Ende eine Öffnung war, mit dem es mit dem äußeren Gefäß verbunden war. Die Gefäße wurden mit einer Elektrolytlösung gefüllt, sodass diese in ihnen auf gleicher Höhe war. Eine Kamera wurde auf die Öffnung des Röhrchens gerichtet und eine Lampe so ausgerichtet, dass am äußeren Rand das Röhrchens eine kreisrunde Reflexion zu sehen war. Das Kamerabild der Öffnung sah dann wie in Abbildung 1 dargestellt aus.

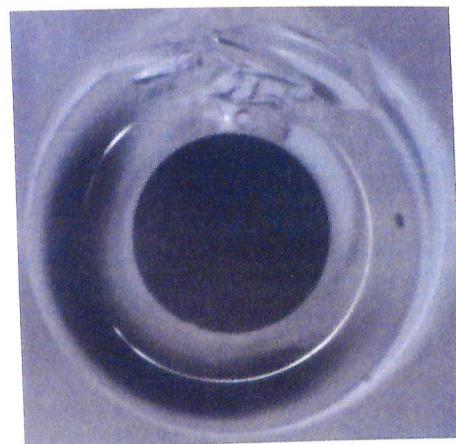


Abbildung 1: „Loch“ ohne Lipidschicht. Es befindet sich am Ende eines Röhrchens, dass den inneren und äußeren Teil der Küvette verbindet. Es erscheint schwarz, da daran kein Licht reflektiert wird. Die Kreisrunde Reflexion am Rand indiziert, dass die Lichtquelle richtig eingestellt ist, um Newtonsche Ringe beim Anbringen einer Lipidschicht zu sehen. Die folgenden Bilder der Lipidschicht sind so ausgeschnitten, dass der äußere Rand nicht mehr sichtbar ist und man nur den inneren Rand des Lochs sieht.

Mit einem Teflonstäbchen wurde dann in der Elektrolytlösung eine Lipidschicht auf der Öffnung angebracht. Durch Abstreifen mit dem Teflonstäbchen und Durchröhren der Lösung wurde sie ausgedünnt, bis zuerst ~~N~~ Newtonsche Ringe sichtbar wurden und sich anschließend darin eine Lipid-Doppelschicht herausbildete, die BLM. Ein Bild von einer sich ausbreitenden BLM ist in Abbildung 2 zu sehen.

Für die erste Aufgabe war es wichtig, die Fläche der BLM zu kennen. Dazu haben wir ein Screenshot von der ausgebildeten BLM gemacht, wie sie in der Aufgabe verwendet wurde. Die Flächenbestimmung ist in Abbildung 3 dargestellt und beschrieben. Wir erhielten daraus eine Membranfläche von

$$A = 0,35 \text{ mm}^2. \quad (1)$$

Beide Teile der Küvette enthielten jeweils eine Elektrode. An die Elektroden wurde nun eine Rechteckspannung mit einer Frequenz von 100 Hz angelegt. Bei jedem Umpolen der



Abbildung 2: „Loch“ mit angebrachter Lipidschicht. Sie ist schon dünn genug, dass man Newtonsche Ringe sieht, da die Dicke im Bereich der Wellenlänge ist. Am unteren Rand ist als schwarzer Fleck die BLM zu sehen, die sich gerade herausbildet und in der Lipidschicht ausbreitet. Sie ist nun noch dünner, sodass es zu keiner Interferenz zu Newtonschen Ringen mehr kommt, weshalb sie schwarz erscheint.

Cut!

Rechteckspannung entlud sich die Membran wie ein Plattenkondensator exponentiell, bis die Spannung gegen Null ging. Die Frequenz war klein genug, dass sich die Membran fast vollständig entladen konnte, bevor es wieder zu einem Umpolen kam.

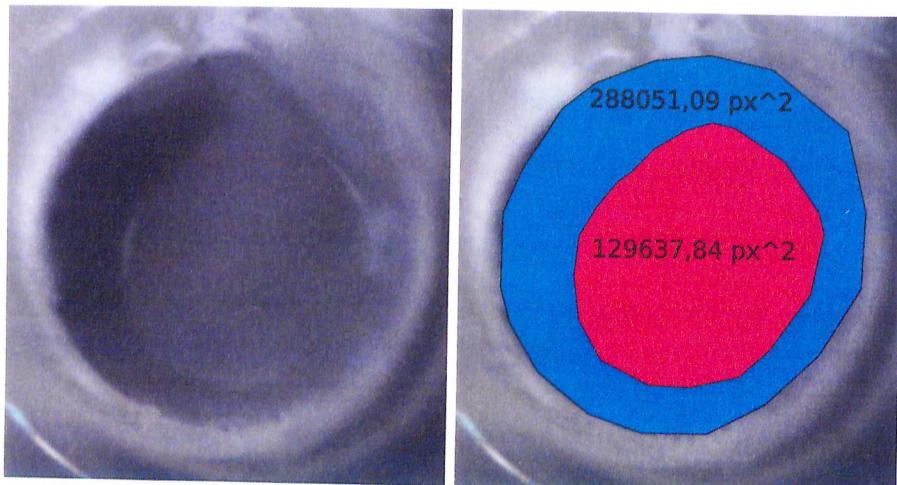


Abbildung 3: Links ist eine vollständig ausgebildete BLM innerhalb des Lochs zu sehen. Es ist bekannt, dass das Loch einen Durchmesser von 1 mm. Durch Verhältnisbildung kann damit die Fläche der BLM bestimmt werden. Die Flächen auf dem Bilden hätten durch Bestimmung der Durchmesser abgeschätzt werden können. Da die BLM jedoch nicht kreisförmig ist, haben wir die beiden relativen Fläche bestimmt, indem wir in dem Vektorgrafik-Programm „Inkscape“ jeweils um den Rand des Lochs und um die BLM Polygonpfade gelegt haben und die darin eingeschlossenen Flächen berechnen lassen haben. Die so berechneten relativen Flächen sind rechts zu sehen. Daraus folgt, dass die BLM etwa 45% des Lochs bedeckt, was bei einem Lochdurchmesser von 1 mm einer Fläche von 0.35 mm^2 entspricht.

OK

Auf dem Oszilloskop war sichtbar, dass die Spannungsamplitude 10 V betrug. Wir haben nun am Oszilloskop abgelesen, nach welcher Zeitspanne die Spannung auf

$$\frac{U_0}{e} = \frac{10 \text{ V}}{e} \approx 3,7 \text{ V} \quad (2)$$

abfiel. Das ist die Relaxationszeit und die Betrag bei uns ungefähr

$$\tau \approx 60 \mu\text{s}. \quad (3)$$

Damit kann nun mit dem Widerstand $R_C = 100 \text{ k}\Omega$ über Gleichung (14) aus der Vorbereitung die Kapazität der BLM bestimmen: e

$$C = \frac{\tau}{R_C} = \frac{60 \mu\text{s}}{100 \text{ k}\Omega} = 0,6 \text{ nF}. \quad (4)$$

Mit der Membranfläche aus (1) erhält man die spezifische Kapazität der Membran:

$$C_{spez} = \frac{C}{A} = \frac{0,6 \text{ nF}}{0,0035 \text{ cm}^2} \approx 0,17 \mu\text{F}/\text{cm}^2. \quad (5)$$

Laut der Vorbereitungsmappe 1 liegt die spezifische Kapazität der Membran normalerweise zwischen $0,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und $0,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die von uns gemessene spezifische Kapazität ist damit um einen Faktor 1.8 kleiner als die in der Vorbereitungsmappe angegebene untere Grenze. Eine solche Abweichung ist jedoch nicht überraschend, da die Fläche der BLM nur grob abgeschätzt wurde und die Relaxationszeit am Oszilloskop nur ungefähr abgelesen werden konnte, sodass alle eingehenden experimentellen Parameter mit großen Fehler behaftet sind. Zummindest befindet sich die von uns bestimmte Kapazität in der richtigen Größenordnung und bietet eine gute Abschätzung.

OK

Außerdem erhält man mit einer angenommenen relativen Permittivität der Membran von $\epsilon_r = 2$ 1, unter Verwendung von Gleichung (12) aus der Vorbereitung die Membrandicke

$$d = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{C} = 8,854 \cdot 10^{-12} \frac{\text{F}}{\text{m}} \cdot 2 \cdot \frac{0,35 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2}{0,6 \text{ nF}} \approx 10,33 \text{ nm}. \quad (6)$$

Diese Membrandicke ist durchaus vorstellbar, da sie sich in der Größenordnung von Molekülen befindet und um einen Faktor 40 kleiner ist als die Wellenlänge des sichtbaren Lichts, weshalb sie schwarz erscheint, statt Newtonsche Ringe zu bilden.

Die Durchbruchspannung $U_{Durchbruch}$ der BLM wurde bestimmt, indem eine externe Gleichspannung angelegt wurde und kontinuierlich erhöht wurde, bis die BLM platzte, wozu sie gleichzeitig mit der Kamera beobachtet wurde. Das Platzen der BLM geschah plötzlich, weshalb wir sie nur ungefähr bestimmen konnten. Wir erhielten:

$$U_{Durchbruch} = (237 \pm 5) \text{ mV}. \quad (7)$$

Damit folgt das maximale E-Feld, unter der Annahme eines Plattenkondensators:

$$E_{max} = \frac{U}{d} = \frac{237 \text{ mV}}{10,33 \text{ nm}} \approx 23 \frac{\text{kV}}{\text{m}}. \quad (8)$$

OK

Da bei der Bestimmung der Durchbruchsspannung die BLM geplatzt ist, musste die Widerstandsmessung an einer neuen BLM durchgeführt werden. Nach Erzeugen der BLM wurde eine externe Gleichspannung von $U_{ext} = 50 \text{ mV}$ angelegt. Zur Widerstandsbestimmung wurde die an der Membran abfallende Spannung bestimmt, die nach der Verstärkung

$$U_{BLM, amplified} = 10 \text{ V} \quad (9)$$

betrug. Es gilt

$$R_{BLM} = \frac{U_{ext}}{I_{gemessen}} = \frac{U_{ext}}{I_{gemessen}}. \quad (10)$$

Der Strom am Serienwiderstand I_S gleich dem Strom an der BLM sein, daher gilt

$$I_S = \frac{U_S}{R_S} = \frac{U_{ext} - U_{BLM}}{R_S} = \frac{U_{BLM}}{R_{BLM}} \quad (11)$$

$$\Rightarrow R_{BLM} = \frac{U_{BLM} \cdot R_S}{U_{ext} - U_{BLM}} \quad (12)$$

$$U_{mess} = U_e \cdot 200$$

$$U_e = I_x \cdot R_m$$

$$U_{mess} = I \cdot R_m \cdot 200 \quad \text{generiert}$$

$$I_x = \frac{U_{mess}}{R_m \cdot 200} = \frac{U_{mess}}{R_x}$$

$$R_x = \frac{(R_m \cdot 200) \cdot U_{mess}}{U_{mess}}$$

$$R_m = 500 \text{ M}\Omega$$

2 Aufgabe 2: Messung einzelner Ionenkanäle

Diese Aufgabe wurde erneut mit einer neuen BLM durchgeführt, da die in dem vorherigen Versuch verwendete BLM schnell geplatzt war. Die Empfindlichkeit und Instabilität der BLM war allgemein ein ständiges Problem bei unseren Versuchen. An die Elektroden wurde eine Gleichspannung von 50 mV angelegt und es wurden etwa 1 ml der Gramicidin A Lösung mit einer Konzentration von $4 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$ mit einer Spritze hinzugefügt. Mithilfe eines in *Labview* programmierten Analyse-Programms wurde der Stromfluss über die Zeit aufgezeichnet, wie in Abbildung 4a zu sehen ist. Zu erwarten war, dass sich dadurch einzelne Kanäle in der Membran bilden. Dadurch sollten Stufen in dem Strom zu sehen sein, was in Abbildung 4a eindeutig nicht der Fall ist. Daher haben wir mit dem Analyseprogramm auch kein ordentliches Histogramm der Ströme erhalten, wie in Abbildung 4b zu sehen ist. Der Grund ist wahrscheinlich, dass unsere Konzentration von Gramicidin A bereits zu groß war und wir versehentlich bereits eine Multikanalmessung durchgeführt haben. Um unsere Vermutung zu bestätigen, haben für unsere Daten eine Analyse mit der Autokorrelationsfunktion machen lassen, wie es später auch in Aufgabe 3 gemacht wurde. Da bekamen wir dann, wie bei einer Mehrkanalmessung zu erwarten ist, einen exponentiellen Abfall, was in Abbildung 4c zu sehen ist. Die Autokorrelation wird hier nicht weiter untersucht, da diese in Aufgabe 3 behandelt werden wird.

In diesem Aufgabenteil geht es um die Untersuchung einer Einkanalmessung und da wir bei unserem Versuch offensichtlich keine erhalten haben, verwenden wir im folgenden die Daten von der Gruppe 24 eines vergangenen Semesters. Diese hatte ebenfalls an einer BLM bei einer geringen Konzentration von Gramicidin A den Stromfluss gemessen. Der Stromfluss über die Zeit und das Histogramm der Ströme, dass man mit dem Analyseprogramm erhält, sind in Abbildung 5 dargestellt.

Aus dem Histogramm haben wir den Strom am Maximum des Peaks abgelesen und gegen die Anzahl der zum Peak gehörigen Anzahl der Gramicidin A Kanäle graphisch aufgetragen. Dabei haben wir angenommen, dass der Strom von einem zum nächsten Peak immer durch einen zusätzlichen Gramicidin A Kanal zustandekommt. Um den Einkanalstrom zu bestimmen, haben wir mit der „curve_fit“-Funktion des *scipy* Moduls für Python 2 die Steigung eines linearen Fits durch die Punkte bestimmt. Dies in Abbildung 7 zu sehen. Damit erhielten wir den Strom durch einen einzelnen Gramicidin A Kanal:

$$I_{Einkanal} = (1,670 \pm 0,003) \text{ pA.} \quad (13)$$

OK

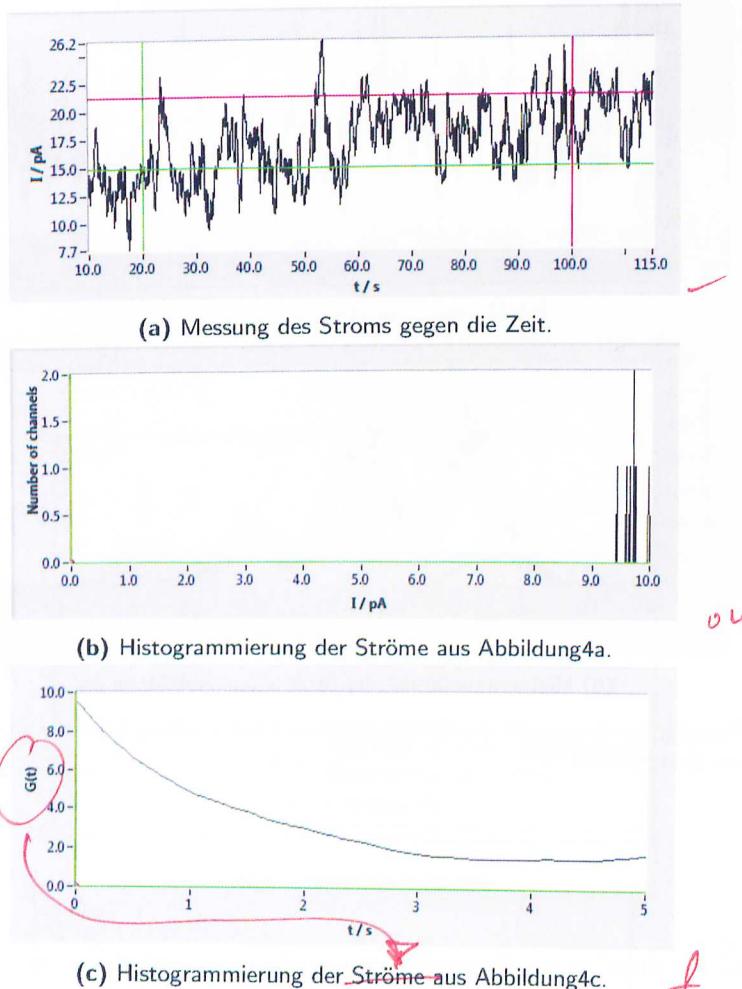


Abbildung 4: Unsere Messung des Stroms an einer Lipidmembran bei einer geringen Konzentration von Gramicidin A.

Tabelle 1: Abgelesene Positionen der erkennbaren Maxima in Abbildung 5b

Kanäle	Strom (pA)
1	2,8
2	4,4
3	6,1
4	7,8

3 Aufgabe 3: Messung multipler Ionenkanäle

Die gesamte Spritze wurde entleert; es befanden sich 1 ml Gramicidin A in der Lösung. Unter diesen Bedingungen war es noch schwieriger eine stabile Lipidschicht aufzubauen. Sie platzte meist nach kurzer Zeit, insbesondere nach Anlegen einer Spannung, sodass die Messung nur in einem Intervall von einer Minute erfolgen konnte.

Welche Konzentration?

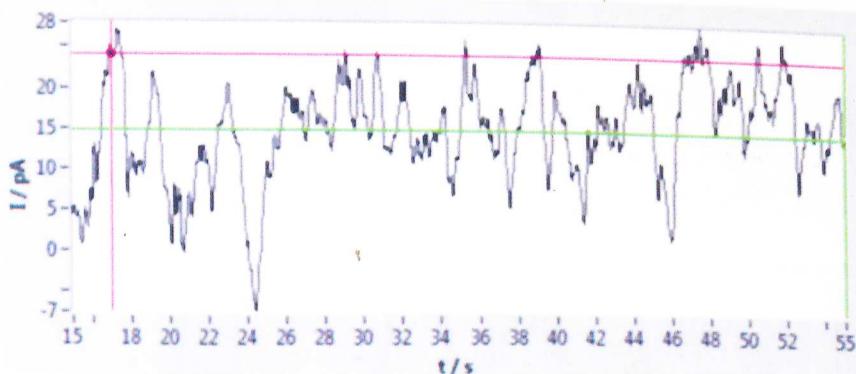


Abbildung 8: Strom durch eine Lipidmembran bei einer hohen Konzentration von Gramicidin A

Es ist ein Rauschen zu erkennen, das dem Öffnen und Schließen der Kanäle entspricht. Dieses ist in Abbildung 8 gezeigt. In Aufgabe 2 sind bereits mehrere Kanäle beobachtet worden, daher sieht dieses Bild ähnlich aus. Der Strom ist hier nicht mit absolutem Wert angegeben. Einzelne Kanäle lassen sich hier nicht erkennen. Die durchschnittliche Lebensdauer der Kanäle lässt sich durch die Autokorrelationsfunktion, wie in der Vorbereitung besprochen, bestimmen. Die Lebensdauer ist die Dauer, in der sie auf einen Wert von $\frac{1}{e}$ mal dem Anfangswert abfällt. In Abbildung 9 ist die Autokorrelation gezeigt. Dieses Diagramm wurde mit dem Labview-Programm erzeugt. Aus dem Screenshot wurde eine mittlere Lebensdauer von

$$\tau = 580 \mu\text{s} \quad (14)$$

bestimmt.

Mittels eines python-Skriptes wurde das Histogramm in Abbildung 10 erstellt. Da die Messung über kurze Zeit verlief, sind nicht genug Daten vorhanden, um viele Maxima sicher und eindeutig zu identifizieren.

Erkennbar sind ein hohes Maximum und rechts davon zwei kleinere. Jedes Maximum entspricht einer Anzahl an geöffneten Kanälen. Da der Strom nur quantifiziert durch sie fließt, entstehen Maxima, an denen die Werte für den Strom bevorzugt sind. Als nulltes Maximum wird das höchste Maximum bezeichnet, die rechts werden mit positivem, links mit negativem Vorzeichen versehen und nummeriert. Der zugehörige Strom wurde am Histogramm abgeschätzt (Fit-by-Eye) und ist in Tabelle 2 gelistet. Mittels des Internetwerkzeugs Wolframalpha [3] wurde eine lineare Regression mit dem Argument "linear fit 0,14,1,37,2,63" durchgeführt. Die Steigung entspricht dem Strom eines einzelnen Kanals.

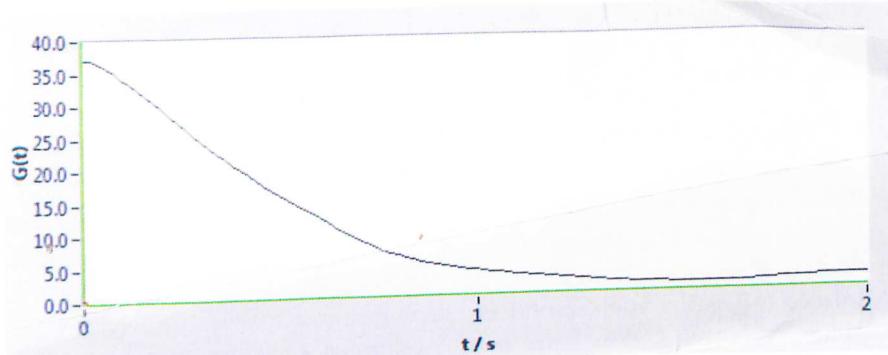
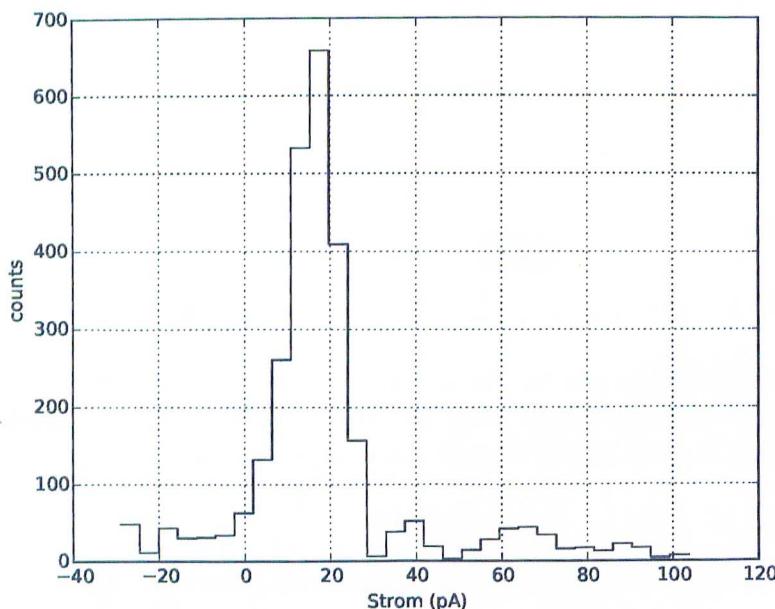


Abbildung 9: Autokorrelationsfunktion der Messungen aus Abbildung 8

Tabelle 2: Positionen der erkennbaren Maxima in Abbildung 10

Maximum (#)	Position (Pixel)	Strom (pA)
0	313	14
1	404	37
2	508	63

$$I_{Einkanal} = 24,5 \text{ pA.} \quad \text{Viel zu groß!} \quad (15)$$



Besse Rührung
 Notwendig!
 Viel zu groß unter der
 Beobachtung, dass einzelne
 Kanäle Ströme von ~6 pA
 liefern!

Abbildung 10: Histogrammierung der Ströme

4 Aufgabe 4: Weitere Fragen

4.1 Vergleich der Methoden

Das Ergebnis für den Einkanalstrom aus Aufgabe 3, Gleichung 15, weicht um mehr als einen Faktor 10 von dem aus Aufgabe 2 ab. Dies bedeutet, dass die Leitfähigkeit eines Kanals mit steigender Kanalzahl zunimmt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Maxima nur um Rauschen handelt. Aufgrund der kurzen Messung waren sie nur schwer erkennbar. Ein Einkanalstrom von nur wenigen Picoampère ließ sich bei einer solch kurzen Messung nicht auflösen. Die Fähigkeit von Histogrammen, bei einer Messung mehrerer Kanäle, den Einzelkanalstrom zu bestimmen konnte hier nicht geprüft werden.

Auch die Lebenserwartung der Kanäle wichen stark voneinander ab. Aus Aufgabe 2, Gleichung 3, stammte das Ergebnis

$$\tau \approx 60 \mu\text{s.} \quad (16)$$

Die Zeit aus Gleichung 14 der Mehrkanalmessung war eine Größenordnung größer mit

$$\tau \approx 580 \mu\text{s.} \quad (17)$$

Die Lebensdauer eines Kanals erhöhte sich mit der Konzentration des Gramicidin A.

4.2 Einzelkanalleitfähigkeit

Aus dem Strom eines einzelnen Kanals $I_{Einkanal}$ aus Gleichung 13 und der Spannung an der Membran $U_{BLM} = 10\text{V}$ ließ sich die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals berechnen.

$$\Lambda = 0,167 \text{ pS} \quad (18)$$

4.3 Ratenkoeffizient

Aus Formel 9 der Vorbereitung

$$\tau^{-1} = k_d + 4 \sqrt{\frac{k_d \cdot k_r}{\Lambda}} \cdot \lambda_M \quad (19)$$

können die Ratenkoeffizienten k_r und k_d , für die Assoziation bzw. Dimerisation, bestimmt werden. Für einen einzelnen Kanal kürzt sich die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals mit der Gesamtleitfähigkeit. Obige Formel vereinfacht sich zu

$$\tau_{Einkanal}^{-1} = k_d + 4 \sqrt{k_d \cdot k_r}. \quad (20)$$

Hier wird das Ergebnis aus der Einkanalmessung, Gleichung 3, verwendet.

$$\tau_{Einkanal} \approx 60 \mu\text{s.} \quad (21)$$

Aus Gleichung 20 folgt

$$k_r = \frac{\left(\frac{1}{\tau_{Einkanal}} - k_d\right)^2}{4} \quad (22)$$

Hiermit lässt sich Gleichung 19 nach k_d auflösen. $\Lambda = 0,167 \text{ pS}$ war aus Gleichung 18 bekannt. $\tau_{Mehrkanal}$ wurde Gleichung 14 entnommen. Es fehlte die Leitfähigkeit der gesamten Membran λ_M , welche aus dem absoluten Strom durch die Membran, sowie die abfallende Spannung, berechnet wird. Diese wurden für die Mehrkanalmessung nicht notiert.

4.4 Partikelstrom

Aus dem Strom, der durch einen Kanal fließt kann man auf die Anzahl der Partikel schließen, die die Membran passieren. Jedes Kaliumion besitzt eine Elementarladung von $e = 1,60 \cdot 10^{-19} \text{ As}$ [2].

Mit dem Einkanalstrom aus Aufgabe 2 folgte ein Teilchenstrom J von

$$J = 10,4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}. \quad (23)$$

Mit dem Ergebnis aus dem Histogramm in Aufgabe 3 (Gleichung 15) folgt

$$J = 153 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}. \quad (24)$$

Mögliche Gründe der Abweichung wurden im Abschnitt „Vergleich der Methoden“ diskutiert.

1 μl in 99999 μl

Grund: 1 $\frac{\text{mol}}{\text{ml}}$ (Ethanol) $1 \cdot 10^{-5}$ in H_2O

$M_{\text{Grund}} = ? \frac{\text{mol}}{\text{ml}} \quad n = ?$

Korrektur

Black Lipid Membrane (BLM)

Michel Rausch, Michael Eliachevitch

22. Dezember 2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	2
2 Theoretische Grundlagen	2
2.1 Wirkmechanismus	2
2.2 Ionentransport	2
2.2.1 Einzelkanalentstehung	4
2.2.2 Mehrkanalentstehung	5
2.2.3 Autokorrelationsfunktion	5
3 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung	6
3.1 Versuchsaufbau und Vorbereitung der Lösungen	6
3.2 Erzeugung der Lidid-Doppelschicht und Messung der Membran-Kapazität	7
3.3 Messung einzelner Ionenkanäle	7
3.4 Messung multipler Ionenkanäle	8
3.5 Noise-Analyse und Autokorrelationsfunktion	8
3.6 Weitere Fragen	8
4 Quellen	8

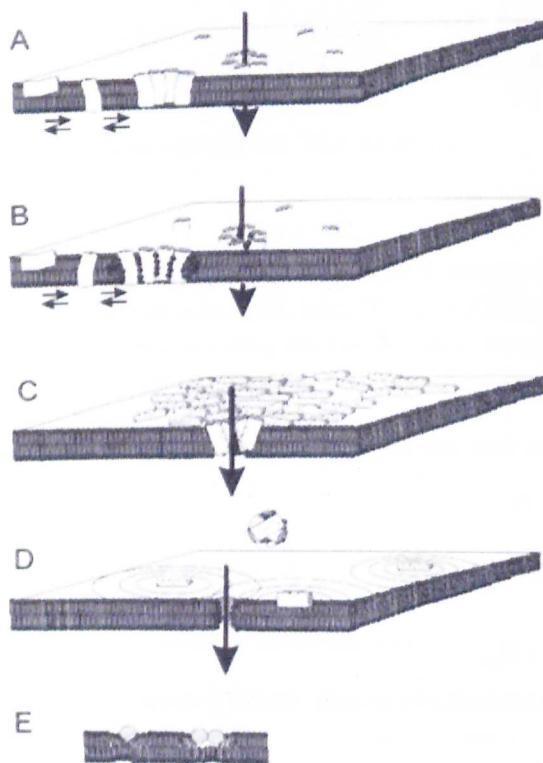


Abbildung 1: Verschiedene Modelle zur Erklärung der Zerstörung einer Bakterienzelle mittels Peptid-Antibiotika [1].

A: Barrel Stave model, Hydrophobe, helixförmige Monomere bilden Poren in der Zellmembran. B: Toroidal Wormhole model, Porenformation nahe phosphatidylethanolamin; oder phosphatidylserin Membranen. C: Carpet model Teppich-(engl. carpet)-ähnliche Anlagerung auf Membran. D: Detergent similar model, Bi- und Mizellen bilden Flächen auf der Membran, durch deren Amphiphilie wird die Membran durchlässig. E: In-plane diffusion model, Verdünnung der Lipidschicht.

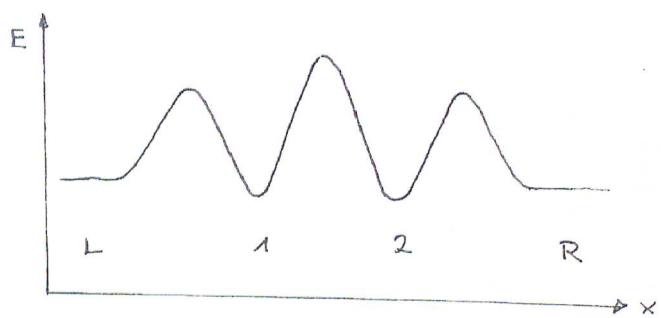


Abbildung 2: Schema eines Potentials einer Pore [1]

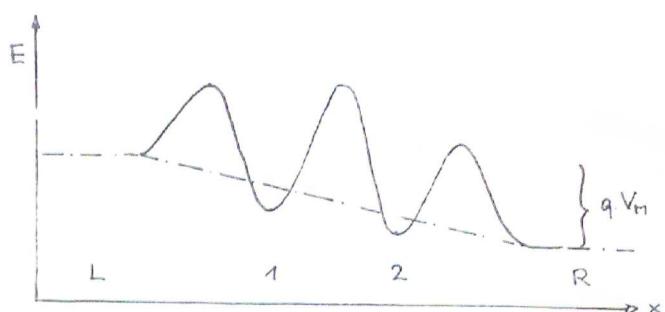


Abbildung 3: Schema des Potentials einer Pore mit angelegter Spannung [1]

$$I_M = \lambda_M \cdot V_m \quad (3)$$

und

$$\lambda_m = \Lambda \cdot N_p. \quad (4)$$

Hierbei ist I_M der gemessene Gesamtstrom durch die Membran und λ_M deren Leitfähigkeit.

2.2.1 Einzelkanalentstehung

*Schr
umstellen
alleine
nichts
nicht*

Nur Dimere des Gramicidin A führen zu einer Bildung von Ionenkanälen. Es werden Dimere gebildet und vernichtet, auch im Gleichgewicht. Dies führt zu einer variierenden Anzahl an Poren in der Membran und somit zu einer Fluktuation der Leitfähigkeit. Bei einer geringen Konzentration sind nur einzelne Kanäle vorhanden, daher ist die Quantisierung des Stromes I_M deutlich erkennbar.

Die Dimerasation kann durch die Gleichung,



beschrieben werden. k_d ist hier die Rate der Dissoziation und k_r die der Entstehung der Dimere, G_1 entspricht den Monomeren, G_2 den Dimeren. Die Dissoziation folgt einem exponentiellen Zerfallsgesetz, die der Entstehungsreaktion ist linear zum Quadrat der Konzentration. Aus dem Verlauf des Stromes über die Zeit lässt sich die Zerfallsrate bestimmen.

3.2 Erzeugung der Lipid-Doppelschicht und Messung der Membran-Kapazität

Die Küvette wird in die Apparatur eingesetzt und in beide Hälften wird die KCl Lösung eingefüllt.

Die Lipidlösung wird mit einem Teflonstäbchen auf das gereinigte Loch aufgetragen, wobei darauf geachtet werden sollte, dass es keine Luftblasen gibt. Dann soll einige Minuten gewartet werden, damit die Lipid-Doppelschicht trocknet. Die Schicht wird dabei mit einer Lampe im Abstand von 30 cm beleuchtet. Am Anfang sollten in der Reflexion Newtonsche Ringe sichtbar sein. Wenn das nicht der Fall ist, soll mit einem Teflonstäbchen etwas von der Schicht entfernt werden. Im getrockneten Zustand sollte die Schicht im Objektiv schwarz erscheinen, da es an das an der Vorder- und Rückseite der Schicht reflektierte Licht destruktiv interferiert. Außerdem sollten im getrockneten Zustand einer Erhöhung der Membran-Kapazität feststellbar sein. Dabei kann die Membran als Plattenkondensator angenommen werden. Die Kapazität C ist dabei eine Funktion der Dicke d und der Fläche A der Membran

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d}. \quad (12)$$

1

Die experimentelle Bestimmung der Kapazität erfolgt über die Messung des Relaxationszeit τ des Membranstroms I_C . Die Entladung erfolgt exponentiell gemäß der Formel

$$I_C(t) = -\frac{U_0}{R_C} \cdot e^{\frac{t}{\tau}} = -I_0 \cdot e^{\frac{t}{R_C C}}, \quad (13)$$

wobei R_C den reellen Widerstand des Kondensators bezeichnet. Der Entladevorgang findet immer dann statt, wenn die Rechteckspannung umschwenkt. Die Spannung U_0 entspricht dann der doppelten Spannungsamplitude der Spannungsquelle. Es folgt, dass sich die Kapazität berechnen lässt über:

$$C = \frac{\tau}{R_C}. \quad (14)$$

Als spezifische Kapazität pro Fläche C_S soll ebenfalls bestimmt werden:

$$C_S = \frac{C}{A}. \quad (15)$$

(... ? ...)

3.3 Messung einzelner Ionenkanäle

Die Widerstände werden in diesem Versuchsteil gleich gelassen, aber statt der Wechselspannung wird nun an der Membran eine Gleichspannung von 50 mV verwendet. Es soll eine kleine Menge Gramicidin A hinzugefügt und dabei der Membranstrom aufgezeichnet werden. Da der Strom sprunghaft mit der Anzahl der Kanäle steigen sollte, kann durch Differenzbildung an einer Stufe der Strom durch einen einzigen Kanal bestimmt werden. Wenn dieser Strom bekannt ist, kann man folglich immer sehen, wenn ein neuer

Kanal entsteht oder zerfällt.

Damit kann nun ein Histogramm der Kanal-Lebenszeiten erzeugt werden. Unter der Exponentialverteilung kann damit die mittlere Lebensdauer eines Kanals und der Ratekoeffizient für den Zerfall von Gramicidin A bestimmt werden.

3.4 Messung multipler Ionenkanäle

Nun soll die Konzentration von Gramicidin A erhöht werden, sodass viele Ionenkanäle entstehen. Mithilfe der gegebenen Analyse-Software wird der Membranstrom histogrammiert. Daraus sollen die Stufenhöhen und deren Mittelwerte bestimmt werden, was durch Messung der Position der Peaks und der dazugehörigen Stromdifferenz erfolgt.

3.5 Noise-Analyse und Autokorrelationsfunktion

Nun soll eine solche Menge von Gramicidin A hinzugefügt werden, dass man mehrere Ionenkanäle erhält, sodass die Grundlinie nicht mehr sichtbar ist und keine Stufen im Strom mehr enthalten sind. Der Mittelwert der Stromfluktuation sollte konstant bleiben, da sonst die Gleichungen für die Autokorrelation nicht gültig wären. Nun soll eine Analyse mit der Autokorrelationsfunktion durchgeführt werden und mit den Ergebnissen von dem Lebenszeit-Histogramm aus der Einzelkanalmessung verglichen werden, indem auch hier der Kanalstrom und die Kanal-Lebenszeit bestimmt werden.

3.6 Weitere Fragen

4 Quellen

1. Vorbereitungsmappe
2. pharmawiki.ch (16.11.2014)

1 Aufgabe 1: Vorbereitung der Lipidmembran

Zuerst mussten wir die „Black Lipid Membrane“ (BLM) erzeugen, was in etwa so gemacht wurde, wie in der Versuchsvorbereitung in Kapitel 3.1 beschrieben. Die beiden inneren Gefäß, das in dieses hineingestellt wurde. Das innere Gefäß hatte ein herausverbinden war. Die Gefäße wurden mit einer 0,5 M KCl-Lösung befüllt, sodass diese in ihnen auf gleicher Höhe war. Eine Kamera wurde auf die Öffnung des Röhrchens gerichtet und eine Lampe so ausgerichtet, dass am äußeren Rand das Röhrchen eine kreisrunde Reflexion zu sehen war. Das Kamerabild der Öffnung sah dann wie in Abbildung 1 dargestellt aus.

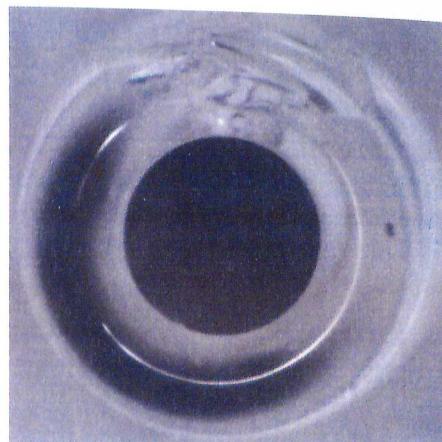


Abbildung 1: „Loch“ ohne Lipidschicht. Es befindet sich am Ende eines Röhrchens, dass den inneren und äußeren Teil der Küvette verbindet. Es erscheint schwarz, da daran kein Licht reflektiert wird. Die Kreisrunde Reflexion am Rand indiziert, dass die Lichtquelle richtig eingestellt ist, um Newtonsche Ringe beim Anbringen einer Lipidschicht zu sehen. Die folgenden Bilder der Lipidschicht sind so ausgeschnitten, dass der äußere Rand nicht mehr sichtbar ist und man nur den inneren Rand des Lochs sieht.

Mit einem Teflonstäbchen wurde dann in der Elektrolytlösung eine Lipidschicht auf der Öffnung angebracht. Durch Abstreifen mit dem Teflonstäbchen und Durchröhren der Lösung wurde sie ausgedünnt, bis zuerst Newtonsche Ringe sichtbar wurden und sich anschließend darin eine Lipid-Doppelschicht herausbildete, die BLM. Ein Bild von einer sich ausbreitenden BLM ist in Abbildung 2 zu sehen.

Für die erste Aufgabe war es wichtig, die Fläche der BLM zu kennen. Dazu haben wir ein Screenshot von der ausgebildeten BLM gemacht, wie sie in der Aufgabe verwendet wurde. Die Flächenbestimmung ist in Abbildung 3 dargestellt und beschrieben. Wir erhielten daraus eine Membranfläche von

$$A = 0,35 \text{ mm}^2. \quad (1)$$

Beide Teile der Küvette enthielten jeweils eine Elektrode. An die Elektroden wurde nun eine Rechteckspannung mit einer Frequenz von 100 Hz angelegt. Bei jedem Umpolen der

Damit folgt das maximale E-Feld, unter der Annahme eines Plattenkondensators:

$$E_{\max} = \frac{U}{d} = \frac{237 \text{ mV}}{10,33 \text{ nm}} \approx 23 \frac{\text{kV}}{\text{m}}. \quad (8)$$

Da bei der Bestimmung der Durchbruchspannung die BLM geplatzt ist, musste die Widerstandsmessung an einer neuen BLM durchgeführt werden. Nach Erzeugen der BLM wurde eine externe Gleichspannung von $U_{GEN} = 50 \text{ mV}$ angelegt. Nun wurde der Widerstand der $R_u = 500 \text{ M}\Omega$ verwendet. Zur Widerstandsbestimmung der Membran wurde die an der Membran abfallende Spannung bestimmt, die nach der Verstärkung

$$\text{U}_{BLM,\text{amplified}} = 10 \text{ V} \quad (9)$$

betrug. Mit einem Verstärkungsfaktor von 200 erhalten wir also

$$U_{BLM} = \frac{U_{BLM,\text{amplified}}}{\text{Verstärkung}} = \frac{10 \text{ V}}{200} = 50 \text{ mV}. \quad (10)$$

Damit können wir nun den Widerstand der Membran bestimmen:

$$\begin{aligned} R_x &= \frac{(R_u \cdot \text{Verstärkung}) \cdot U_{GEN}}{U_{BLM}} \\ &= \frac{(500 \text{ M}\Omega \cdot 200) \cdot 50 \text{ mV}}{50 \text{ mV}} \quad | \cancel{F} \\ &= 10^{11} \Omega. \quad \cancel{F} \end{aligned} \quad (11)$$

Nun!

Dieser ist Erwartungsgemäß beim Abhandensein von Ionenkanälen extrem groß, sodass praktisch kein Strom durch die Lipidmembran fließt.

3 Aufgabe 3: Messung multipler Ionenkanäle

Die Spritze wurde vollständig entleert. Unter diesen Bedingungen war es noch schwieriger eine stabile Lipidschicht aufzubauen. Sie platzte meist nach kurzer Zeit, insbesondere nach Anlegen einer Spannung, sodass die Messung nur in einem Intervall von einer Minute erfolgen konnte.

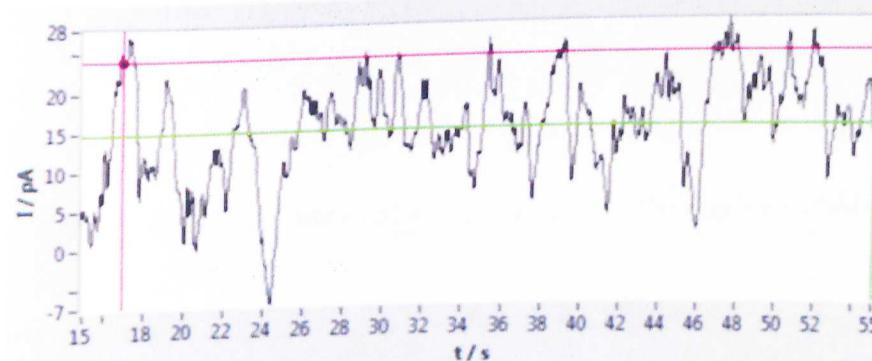


Abbildung 7: Strom durch eine Lipidmembran bei einer hohen Konzentration von Gramicidin A

Es ist ein Rauschen zu erkennen, das dem Öffnen und Schließen der Kanäle entspricht. Dieses ist in Abbildung 7 gezeigt. In Aufgabe 2 sind bereits mehrere Kanäle beobachtet worden, daher sieht dieses Bild ähnlich aus. Der Strom ist hier nicht mit absolutem Wert angegeben. Einzelne Kanäle lassen sich hier nicht erkennen. Die durchschnittliche Lebensdauer der Kanäle lässt sich durch die Autokorrelationsfunktion, wie in der Vorbereitung besprochen, bestimmen. Die Lebensdauer ist die Dauer, in der sie auf einen Wert von $\frac{1}{e}$ mal dem Anfangswert abfällt. In Abbildung 8 ist die Autokorrelation gezeigt. Dieses Diagramm wurde mit dem Labview-Programm erzeugt. Aus dem Screenshot wurde eine mittlere Lebensdauer von

$$\tau = 580 \mu\text{s} \quad (13)$$

bestimmt. Mittels eines python-Skriptes wurde das Histogramm in Abbildung 9 erstellt. Da die Messung über kurze Zeit verlief, sind nicht genug Daten vorhanden, um mehrere Maxima sicher und eindeutig zu identifizieren.

Die Position des erkennbaren großen Maximums wurde mit einem Gaußfit zwischen den Strömen 10 und 22 pA ermittelt bei

$$(15,728 \pm 0,006) \text{ pA.} \quad (14)$$

Für das Nebenmaximum ergab der Fit zwischen 22 und 26 pA eine Position von

$$(23,254 \pm 0,008) \text{ pA.} \quad (15)$$

Es sind keine weiteren Maxima erkennbar. Rechnet man unter der Annahme, dass es

Das ist
keine
Quantitative
Ausage!

Wichtig ist
welche Menge
also Volumen
mit welchen
Konzentration