
Ionentransport durch planare Lipiddoppelschichten

Vergleich von Valinomycin und Biotin-
Valinomycin in planaren Lipidmembranen

- Diplomarbeit -

von

Thomas Sattig

Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

angefertigt am
Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz



Mainz, den 31. März 2009

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. W. Knoll und Dr. Ingo Köper am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz in der Zeit vom 1. August 2008 bis 31. März 2009 angefertigt. Ich bestätige mit meiner Unterschrift, nur die mir erlaubten Hilfsmittel und die angegebenen Quellen für meine Arbeit verwendet zu haben.

Thomas Sattig

*„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will“
(Galileo Galilei)*

Danksagung

Ich danke Dr. Ingo Köper und Prof. W. Knoll für die Betreuung, Unterstützung und die Möglichkeit meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz machen zu können.

Durch die Hilfe und Anregungen meiner Kollegen/Innen Ann, Julia, Marei, Indriati, Thet und Slavoj ist vieles leichter, einfacher und angenehmer während meiner Diplomarbeit verlaufen, daher gebührt Ihnen mein besonderer Dank.

Dem AK Winterhalter an der IU Bremen, danke ich für den Einblick und die geduldige Anleitung für die ersten Schritte in die Welt der BLMs.

Martin Textor danke ich für die geniale Idee mit Autolt und für seine unendliche Geduld mit mir als Praktikumsbetreuer.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der elektrotechnischen und der feinmechanischen Abteilung für ihre Hilfe beim Bau des „high frequency generators“. Besonders möchte ich mich bei Herrn Dirk Richter für seine Ratschläge und Hilfestellung bei der Konstruktion danken.

Zuletzt bedanke ich mich sehr herzlich bei meiner Familie und meiner Freundin, die mir während meines Studium und meiner Diplomarbeit in jeder Hinsicht immer mit ihrer vollen Unterstützung zur Seite gestanden haben.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	I
Danksagung.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Motivation.....	1
2 Einleitung.....	4
2.1 Biologische Membran.....	4
2.2 Modellmembransysteme.....	7
2.2.1 Vesikel/Liposomen.....	7
2.2.2 Planare Lipidmembranen (black lipid membranes; BLM).....	8
2.2.3 nanoBLMs.....	9
2.2.4 Festkörperunterstützte Lipidmembranen (sBLMs).....	10
2.2.5 Festkörperunterstützte Lipidmembranen mit Spacer (tBLMs).....	11
2.3 Valinomycin (Ionencarrier).....	12
2.4 Valinomycin mit Biotinanker.....	13
3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
4 Material.....	16
4.1 Verwendete Chemikalien.....	16
4.2 Verwendete Geräte und Software.....	16
4.3 Herstellung von Lösungen.....	17
5 Methoden.....	18
5.1 Die Patch-Clamp-Technik.....	18
5.2 Der Versuchsaufbau für ein BLM-Experiment.....	18
5.3 Die Elektroden.....	20
5.4 Die Messapparatur (BLM-Küvette).....	21
5.5 Zusammenbau der BLM-Küvette.....	21
5.6 Pulse-Software-Einstellungen.....	22
5.6.1 PGF-Protokolle Kapazitätsmessung.....	23
5.6.2 PGF-Protokoll Leitfähigkeitsmessungen.....	26
5.6.3 Weitere PGF-Protokolle.....	28
5.7 Das BLM-Experiment.....	32
5.8 Zugabe des Ionencarriers.....	35
5.9 Automatisierter Export der Messdaten (ASCII-Files).....	36
5.10 Analyse der Messdaten in Excel.....	37
5.10.1 Makros für die Kapazitätsmessungen.....	38
5.10.2 Makros für die Leitfähigkeitsmessungen.....	40

5.11 Der „high frequency generator“	43
5.12 Erzeugung von μm -Löchern in PTFE-Folien.....	46
6 Ergebnisse und Diskussion	48
6.1 Funktion des „high frequency generator“.....	48
6.2 Kinetikmessungen von Valinomycin und Biotin-Valinomycin.....	52
6.2.1 Kapazitätskinetiken.....	53
6.2.2 Leitfähigkeitskinetiken.....	59
7 Zusammenfassung	64
8 Literatur	65
Anhang	68
Anhang A: Script AutoIt (geschrieben von Martin Textor).....	68
Anhang B: Makros VBA-Scripte.....	71
Anhang C: Abbildungsverzeichnis.....	86
Anhang D: Daten-DVDs.....	89

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
A/D	Analog/Digital
bidest.	zweifach destilliert
BLM	engl. black lipid membrane (= planare Lipidmembran)
D/A	Digital/Analog
<i>D</i> -Hyiv	<i>D</i> -Hydroxyisovalerat
DNA	engl. desoxyribonucleinacid
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-phosphatidylcholin
DPhyPC	1,2-Diphythanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Diplamitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-phosphatidylcholin
DPTL	2,3-di-O-phytanyl- <i>sn</i> -glycerol-1-tetraethylenglycol-D,L- α -liponsäureesterlipid
<i>D</i> -Val	<i>D</i> -Valin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
<i>L</i> -Lac	<i>L</i> -Lactat
<i>L</i> -Val	<i>L</i> -Valin
MPIP	Max-Planck-Institut für Polymerforschung
PGF	engl. pulse generator file
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNA	engl. ribonucleinacid
sBLM	engl. supported bilayer lipid membrane
SPR	engl. surface plasmon resonance
Tab.	Tabelle
tBLM	engl. tethered bilayer lipid membrane
Vgl.	Vergleiche
z. B.	zum Beispiel

1 Motivation

Jede biologische Zelle, sei sie pflanzlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprungs, besitzt ein Inneres und eine äußere, extrazelluläre Umgebung. Diese beiden Bereiche werden durch eine Zellmembran, die sogenannte Plasmamembran, getrennt. Die Zellmembran besteht hauptsächlich aus verschiedenen Lipiden und bildet eine Barriere für die meisten Moleküle und Ionen. Membranproteine, wie z. B. Membranporen und Ionencarrier können Moleküle oder Ionen über diese Barriere hinweg bewegen. Somit kann ein Austausch von chemischen Stoffen stattfinden, der das Leben einer Zelle erst ermöglicht. Einige Membranproteine können hierbei sehr gezielt eine einzige Art von Molekül oder Ion erkennen und dieses durch die Zellmembran transportieren.

Die Selektivität der Membranproteine für spezielle Moleküle ist Vorbild zur Entwicklung von Sensoren (Biosensoren), in denen solche Membranproteine zur Erkennung von Molekülen bzw. Ionen eingesetzt werden.

Nur innerhalb einer Membran zeigen Membranproteine ihre native Konformation und sind somit aktiv. Daher können Membranproteine nur in einer Membran analysiert werden.

Entsprechende Membransysteme in denen Membranproteine untersucht werden können, sind seit längerer Zeit bekannt. Leider erfüllen sie noch nicht alle Voraussetzungen, um in Sensoren Verwendung zu finden. Es bedarf somit noch weiterer Forschung zur Verbesserung von Biosensoren.

Als Schnittpunkt von Natur- und Ingenieurwissenschaften stellt die Erforschung der Biosensortechnologien eine Möglichkeit dar, in Zukunft Proben (z. B. Blut) auf der Größe eines Mikrochips (*Lab-on-Chip*) schnell, günstig und umfassend qualitativ und quantitativ zu analysieren [1]. Der besondere Vorteil dieser Technologie liegt hierbei auf der parallelen Analyse von kleinen Probenmengen mit geringen Platzbedarf und ohne Verwendung aufwändiger Apparaturen. Ein Beispielschema für einen möglichen Biosensorchip (Arrayanordnung) ist in Abb.1 gezeigt. In vielen kleinen Membranfläche könnten verschiedene Membranproteine zur stochastischen Analyse einer Probe eingesetzt werden. Die stochastische Analyse des Transmembranstroms, der durch bzw. mit Hilfe des Membranprotein in Form von Ionen fließt, erfolgt auf kleinen Halbleiterchips, auf denen die kleinen Membran-

1 Motivation

flächen platziert sind. Anhand des Transmembranstroms könnten Rückschlüsse auf die Qualität und Quantität der zu untersuchenden Moleküle gezogen werden. Einige Versuche zeigen, dass Membranproteine sogar als Biosensoren zur Sequenzierung von DNA- bzw. RNA-Molekülen eingesetzt werden können [2].

Dieses Verfahren könnte die DNA-Sequenzierung eines menschlichen Genoms zur alltäglichen Routineanalyse werden lassen.

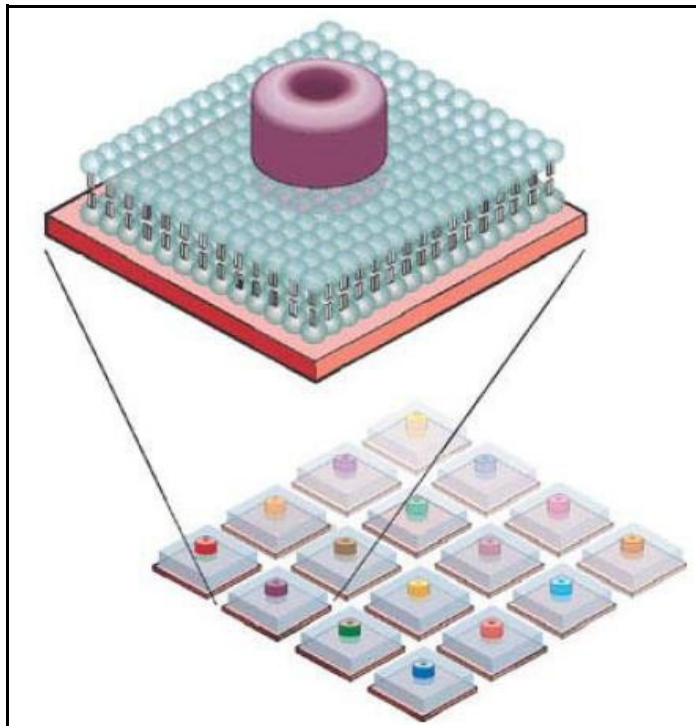


Abbildung 1: Schema: Lab-on-Chip-Biosensor [3]

In der Entwicklung von Biosensoranwendungen hat der Arbeitskreis Materialforschung des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung in Mainz unter anderem den Fokus auf das Membransystem der festkörperunterstützten Lipidmembranen (tBLMs) gerichtet. Dessen Funktion konnte mehrfach mit verschiedenen Membranproteinen gezeigt werden [4,5]. Weitere Anwendungsmöglichkeiten für Biosensoren liegt in der Modifizierung von Membranproteinen.

Daher wurde das Depsipeptid Valinomycin mit einer leicht veränderten Struktur im Vergleich zur natürlichen Zusammensetzung synthetisiert. Valinomycin ist ein Ionencarrier, der sehr selektiv Kaliumionen über eine Lipidmembran transportieren kann [6]. Das hergestellte Valinomycin trägt ein Biotinmolekül, das an ein substituiertes L-Lysin abge-

1 Motivation

bunden ist.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich der Ionentransport von natürlichem Valinomycin im Vergleich zu Valinomycin mit Biotinanker (Biotin-Valinomycin) verhält. In der Theorie könnte durch die Zugabe von Streptavidin, ein Protein, welches hervorragend an Biotin bindet [7], der Ionenfluss durch Blockierung des Ionencarriers manipuliert werden. Ein manipulierbarer Ionencarrier wäre in einer Biosensoranwendung zur Bestimmung der K^+ -Ionenkonzentration einsetzbar. Als Testsystem sollen dazu planare Lipidmembranen dienen.

2 Einleitung

2.1 Biologische Membran

Die Zelle bildet die kleinste lebende Einheit. Ihr Überleben ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren. Zwei dieser Faktoren sind die Energiegewinnung und die Fähigkeit, Moleküle zu speichern bzw. zu metabolisieren. Beide Faktoren hängen im Wesentlichen von der Unterteilung der Zelle in funktionelle Bereiche ab (Abb.2).

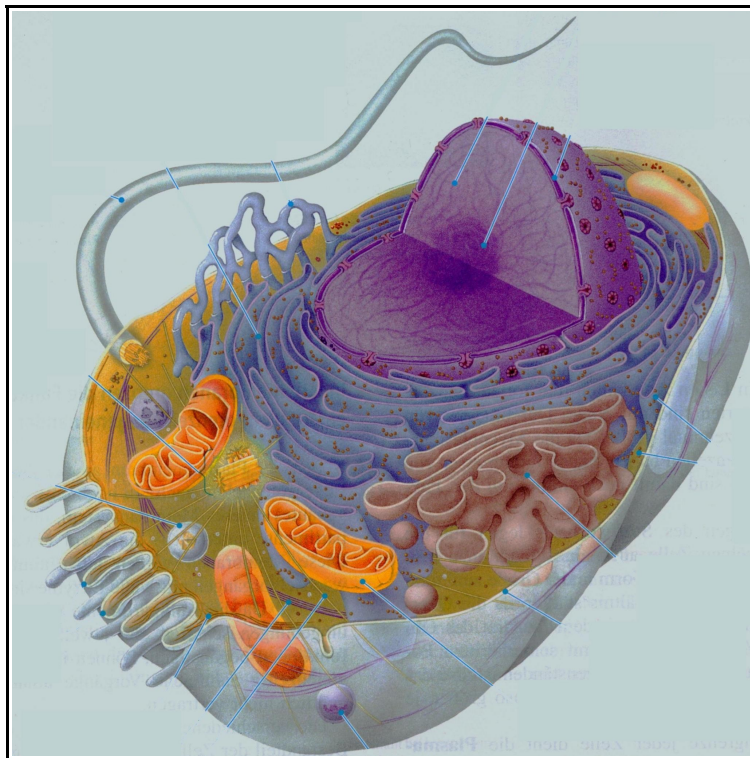


Abbildung 2: Beispiel: tierische Zelle mit Kompartimenten; gelb = Mitochondrien; violett = Zellkern; blau = glattes und raues Endoplasmatisches Reticulum; grau = Golgi-Apparat; hellblau = Vesikeleinschlüsse [8]

Die Trennung der Zelle in einzelne Kompartimente wird durch Membranen gewährleistet. Ihre Existenz macht die Energiegewinnung durch Konzentrationsgradienten und die Speicherung bzw. Verstoffwechslung von Molekülen, die zum Aufbau und Leben der Zelle benötigt werden, erst möglich.

Die Zellmembran besteht aus einer Vielzahl von Lipiden. Diese Lipide ordnen sich je nach

2 Einleitung

Kopfgruppe und Kettenlänge in wässrigem Medium in einem Aggregationsprozess (self-assembly) selbständig zu doppellagigen Lipidschichten oder Mizellen zusammen. Dieser Prozess kann nur stattfinden, weil sich die hydrophoben Bereiche der Lipide vom umgebenden, polaren, wässrigen Medium abwenden und zu hydrophoben Lipidbereichen andere Lipidmoleküle hin orientieren. Die hydrophilen Bereiche der Lipide ordnen sich bei diesem Prozess den polaren Wassermolekülen zu.

Durch den self-assembly Prozess werden stabile Membranen mit erstaunlichen Eigenschaften gebildet. Mit einer Dicke der Lipiddoppelschicht von wenigen Nanometern (6-10nm [10]) besitzen sie eine hohe Elastizität und sind als Barriere undurchlässig für polare oder große Moleküle und Ionen (Vgl. Overton's Gesetze zur Membranpermeabilität). Die laterale Beweglichkeit der einzelnen Membranlipide innerhalb einer Monoschicht mit bis zu 10^{-8} - 10^{-7} cm²/s zeigt die hohe Fluidität einer Lipidmembran [9]. Die transversale Beweglichkeit, d. h. der Wechsel von Lipiden zwischen den einzelnen Monoschichten einer Lipiddoppelschicht, bewegt sich hingegen in einer Größenordnung von Stunden bzw. Tagen [10]. Die Lipide, welche in den biologischen Membranen der meisten Organismen gefunden werden, gliedern sich im Wesentlichen in drei Hauptgruppen: Sphingolipide, Glycerophospholipide und Steroide [11].

Neben diesen Hauptgruppen gibt es aber noch eine große Zahl an spezifischen Lipiden verschiedener Organismen. Diese können als Energiespeicher dienen oder in Signal- bzw. Stoffwechselprozesse eingebunden sein.

Aber nicht nur durch die verschiedenen Lipide besteht eine hohe Bandbreite unterschiedlicher Plasmamembranen. Durch evolutionäre Anpassungen haben sich sehr verschiedene Zellmembranstrukturen entwickelt. Je nach dem, bei welchem Organismus (tierisch, pflanzlich oder bakteriell) man die Membran betrachtet, zeigen sich immense Unterschiede in der jeweiligen Membranarchitektur.

Mit der Zellmembran sind häufig Membranproteine assoziiert (periphere Membranproteine, Proteine mit oder ohne GPI[Glykosylphosphatidylinositol]-Anker) oder direkt in sie inkooperiert (integrale Membranproteine). Die Membranproteine gewährleisten den Stoffaustausch mit der Umgebung der Zelle, katalysieren Reaktionen oder sind an der Struktur der Membran beteiligt. Das Fluid-Mosaik-Modell der Plasmamembran wurde 1972 durch Singer und Nicolson [12] vorgeschlagen (Abb.3).

2 Einleitung

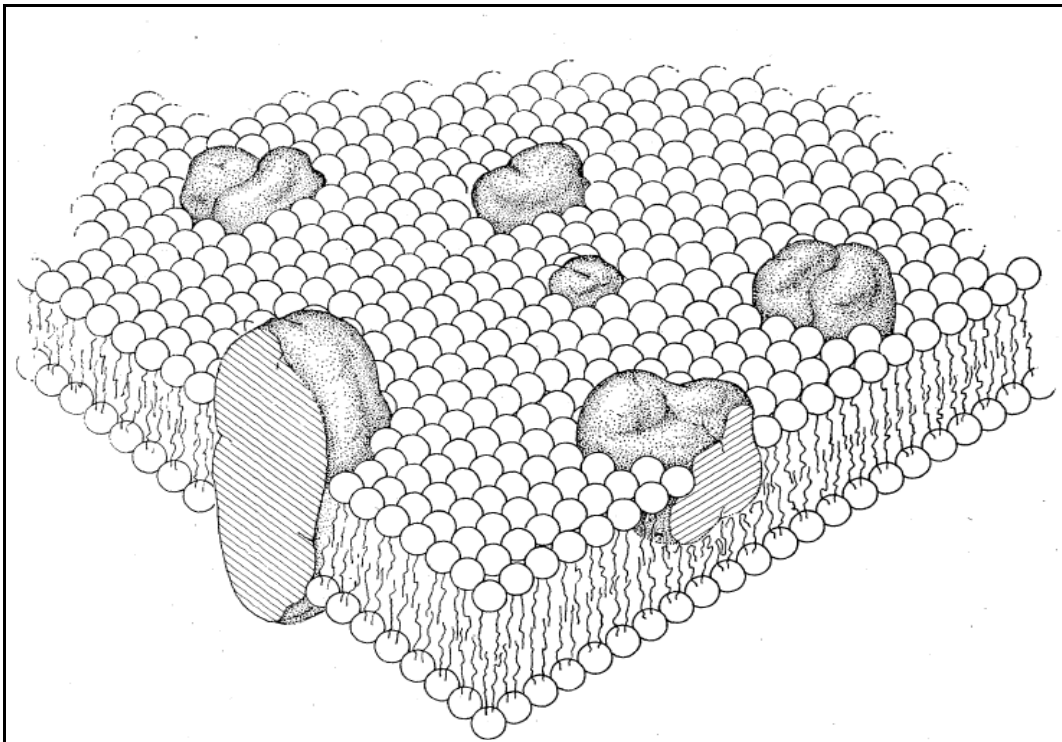


Abbildung 3: Fluid-Mosaik-Modell; Membranstruktur mit peripheren und integralen Proteinen nach Singer und Nicolson (1972) [12]

Es verdeutlicht die Zusammensetzung der Plasmamembran aus Lipiden und Proteinen. Proteine stellen einen großen Teil der biologischen Membran dar. Etwa 1/3 der menschlichen Gene kodieren Proteine, welche mit der Membran verknüpft sind [13]. Eine eukaryotische Membran besteht zu etwa 50% aus Proteinen [11]. Viele therapeutisch-wirksame Medikamente zielen in ihrer Wirkung auf Membranproteine ab. Somit spielen Membranproteine eine zentrale Rolle in unserem Metabolismus.

In jedem Fall ist die Zellmembran in ihrem Aufbau und durch die Wechselwirkung mit vielen Membranproteinen eine komplexe Struktur. Um diese Struktur zu verstehen, ist es notwendig, einfache Modellsysteme einer biologischen Membran zu entwickeln. Erst mit Hilfe dieser Modellsysteme kann die Funktion der Membran und ihrer assoziierten Proteine verstanden werden.

2 Einleitung

2.2 Modellmembransysteme

Momentan stehen verschiedene Modellmembransysteme zur Untersuchung von Membranproteinen und zum Verständnis der Membranstruktur zur Verfügung. Jedes System hat seine Vor- und Nachteile, die jeweils ihre Anwendung für verschiedene Versuche festlegen. Keines der nachfolgenden Systeme ist universell einsetzbar oder genügt zur Zeit allen Ansprüchen, die an Membransysteme für Biosensoranwendungen gestellt werden.

2.2.1 Vesikel/Liposomen

Als Vesikel bezeichnet man kugelförmige Lipidformationen. Ihr inneres Volumen ist von einer oder mehreren (multilamellar) Lipiddoppelschicht(en) umgeben (Abb.4). Der Durchmesser der Vesikel kann von 20 nm bis 100 μm reichen. Durch das Extrudieren von Vesikeln kann eine ungefähr einheitliche Vesikelgröße erreicht werden. Vesikel sind dadurch leicht herstellbar. Ihr Nachteil besteht darin, dass ihr inneres Volumen für Messungen nicht leicht zugänglich bzw. dieses Volumen begrenzt ist. Mit elektrischen oder optischen Methoden ist es möglich, Messungen mit Membranproteinen in Vesikeln durchzuführen. Leider sind Vesikel aufgrund ihrer Struktur im Vergleich mit den anderen Membransystemen nicht besonders stabil und ihre Lebensdauer ist kurz (Stunden bis Tage).

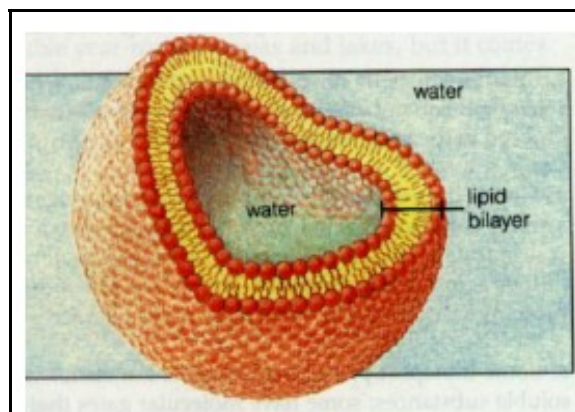


Abbildung 4: Lipidvesikel Aufbau [19]

2 Einleitung

2.2.2 Planare Lipidmembranen (black lipid membranes; BLM)

Planare Lipidmembranen wurden erstmals 1962 von Mueller und Rudin [15] beschrieben. Nach ihrer Methode wird eine planare Lipidmembran mit Hilfe eines Pinsels über eine Teflonmembran gespreitet, in der sich ein Loch mit einem Durchmesser zwischen 100 μm und 1 mm befindet. Die Lipide werden vor der Spreitung in n-Decan gelöst und direkt über dem Loch aufgebracht. Die Apparatur kann auf beiden Seiten mit Flüssigkeit befüllt werden. Nach einiger Zeit dünnt der aufgetragene Lipidfilm zu einer planaren Lipidmembran aus. Der hohe Anteil an n-Decan in der BLM beeinflusst dabei die Eigenschaften der Lipidmembran [16].

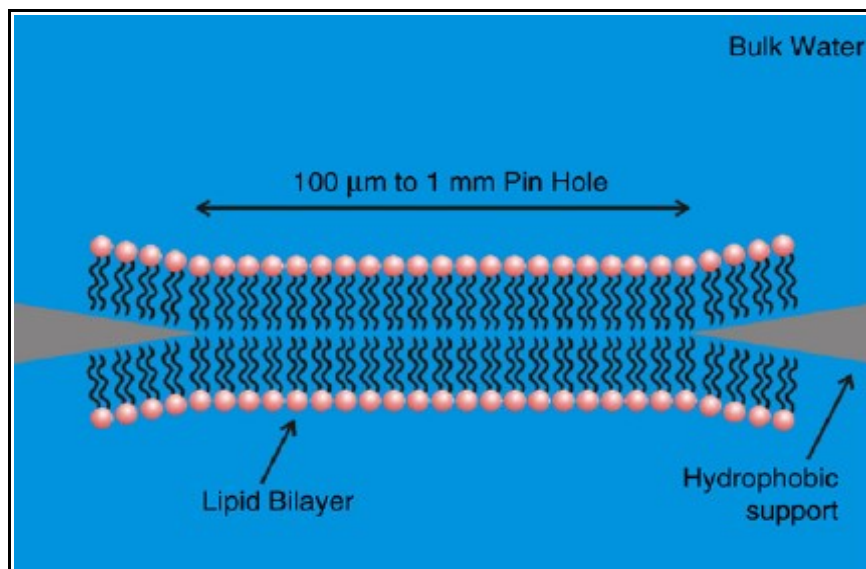


Abbildung 5: BLM Aufbau; blau = umgebendes Wasser; graue Dreiecke = Randbereiche des Supports [14]

Der Name **black lipid membrane** (BLM) bezieht sich auf die Eigenschaft, dass sich bei Betrachtung unter einem Mikroskop bei ihrer Entstehung der vielfarbige Lipidfilm sehr schnell in einen schwarzen Film umwandelt. Dieser Eindruck wird durch Interferenzeffekte des Lichts an der nur wenige nanometerdicken Lipidmembran hervorgerufen. Neben der optischen Möglichkeit, die Entstehung einer planaren Lipidmembran zu verfolgen, kann dies auch anhand der Messung der Kapazität verfolgt werden. Die Bildung einer sehr dünnen Lipidmembran resultiert in einem starken Anstieg der Kapazität. Eine Schema einer BLM ist in Abb.5 zu sehen.

2 Einleitung

Neben der bereits beschriebenen Methode von Mueller und Rudin konnte sich eine weitere Methode zur Bildung von planaren Lipidmembranen durchsetzen. Diese geht auf Montal und Mueller [17] zurück, sie formten ebenfalls über Löchern zwischen zwei Apparaturhälften planare Lipidmembranen. Dennoch ist die Art der Membranherstellung verschieden. Eine dünne Teflonmembran (PTFE), in der sich das Loch befindet, über welches später die Lipidmembran gespannt werden soll, wird mit Hexadecan behandelt, anschließend in die Apparatur eingebaut und die Apparatur mit Puffer befüllt. Danach werden die Lipide auf der Pufferoberfläche gespreitet und durch Manipulation des Flüssigkeitsspiegels eine BLM generiert. Diese BLMs weisen zwei entscheidende Vorteile auf. Zum einen können so asymmetrische planare Lipidmembranen erzeugt werden und zum anderen besitzen diese Membranen einen deutlich kleineren Lösungsmittelanteil. Dennoch ist bei dieser Methode Hexadecan als Lösungsmittel in den Randbereichen der Lipidmembran vorhanden. Ohne das Lösungsmittel wäre keine Lipidmembran machbar [18].

Der Vorteil von BLMs gegenüber den anderen Modellmembransystemen besteht in ihrem sehr hohen Widerstand bis hin zum Gigaohm (GigaOhm-Widerstand). Durch diesen sind elektrische Leitfähigkeitsmessungen mit Patch-Clamp-Verstärkern möglich. Des Weiteren sind beide Seiten der Lipidmembran für Messungen zugänglich und können manipuliert werden. Die größte Schwäche liegt in ihrer Instabilität und kurzen Lebensdauer (maximal 1-2 Tage), so dass sie nur in Laboranwendungen genutzt werden können.

2.2.3 nanoBLMs

Seit einigen Jahren wird in der Entwicklung von Biosensoren die Anwendung zur Einzelmolekülanalyse immer gezielter vorangetrieben. Hierbei werden Techniken gesucht mit deren Hilfe einzelne Moleküle detektiert werden können [20,21,39].

Um die Stabilität von BLMs zu verbessern und Einzelkanalmessungen von Membranporen zu ermöglichen, wurden in jüngster Vergangenheit BLMs über Poren mit nur wenigen Nanometern im Durchmesser gespannt. Diese BLMs wurden über geschossene Löcher (Focused-Ion-Beam) im Nanometerbereich in Siliziumnitrit-Chips per Vesikelfusion erzeugt [22]. Auf diese Weise hergestellte nanoBLMs ermöglichen die Leitfähigkeitsmessung per

2 Einleitung

Patch-Clamp-Methode von einzelnen Membranporen. Trotz ihrer guten elektrischen Eigenschaften können diese BLMs nur in Laboranwendungen verwendet werden. Sie könnten aber in Zukunft die bestehende BLM-Technik ersetzen.

2.2.4 Festkörperunterstützte Lipidmembranen (sBLMs)

Festkörperunterstützte Lipidmembranen sind hinsichtlich der Haltbarkeit eine Verbesserung zu BLMs, da durch den Kontakt zu einem Festkörper ihre Stabilität erhöht ist. Bei sBLMs wird eine Lipiddoppelschicht z. B. durch Langmuir-Blodgett-Transfer auf einen Festkörper (Metall, Halbleiter, Nicht-Halbleiter, Polymer) übertragen [14]. Ebenso kann durch Selbstorganisation oder Vesikelfusion auf dem Festkörper eine planare Lipidmembran erzeugt werden. sBLMs lassen sich leicht mit Methoden wie Röntgen- oder Neutronenreflektometrie, Plasmonenresonanzspektroskopie, Rasterkraftmikroskopie und Ellipsometrie untersuchen. Die Fluidität der sBLMs ist durch ihre Bindung an den Festkörper stark eingeschränkt. Außerdem besteht zwischen der Lipidmembran und dem Festkörper nur ein geringes Flüssigkeitsreservoir, was elektrische Messungen an Membranproteinen nur bedingt ermöglicht (Abb.6) und den Membranproteinen nur wenig Platz unter der Membran zur Verfügung stellt. Dadurch wird der Einbau vieler großer Proteine erschwert oder sogar verhindert.

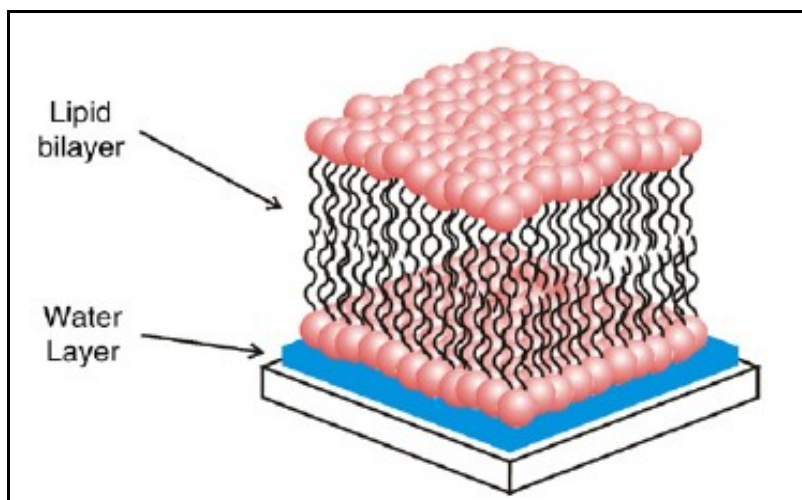


Abbildung 6: sBLM Aufbau; weiße Lage = Festkörper; blaue Lage = Wasserschicht; Lipidbilayer [14]

2 Einleitung

2.2.5 Festkörperunterstützte Lipidmembranen mit Spacer (tBLMs)

Dieses Membransystem bezieht seinen Namen aus dem Aufbau des Monolayers, der über einen Ethylenglykolspacer mit Thiol- oder Silananker an einen Festkörper angebunden ist. Als Festkörpersubstrat dient in den meisten Fällen Gold. An diese Oberfläche werden in einem self-assembly-Prozess die Lipide angelagert, die neben einer hydrophoben Lipideinheit auch aus einem hydrophilen Ethylenglykoltether und einem Thiolanker oder einem Silananker bestehen (Abb.7). Ein typisches Lipidmolekül ist 2,3-di-O-phytanyl-*sn*-glycerol-1-tetraethylenglycol-*D,L*- α -liponsäureesterlipid (DPTL). Ist der Monolayer an das Goldsubstrat gebunden, wird über einen zweiten Schritt per *Rapid solvent exchange* oder über Vesikelfusion der Lipidbilayer vervollständigt [23].

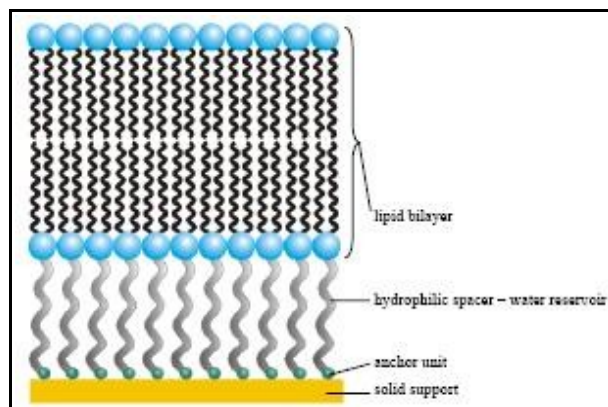


Abbildung 7: tBLM Aufbau; gelbe Lage = Festkörper (Gold); Thiolspacer mit Lipid bilden den Bilayer [23]

Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass durch den größeren Abstand des Bilayers vom unterstützenden Festkörper ein größeres Reservoir an Flüssigkeit unter der Lipidmembran vorhanden ist. Gleichzeitig ist die Stabilität durch den Festkörper gegeben und größere Membranproteine können in diese Membran eingebaut werden. Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie lassen sich Informationen über die Kapazität und den Widerstand dieses Membransystems gewinnen. Parallel dazu können mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) Informationen über die Dicke der Membran gewonnen werden. Der Nachteil dieser Membran besteht in der hohen Anfälligkeit an Defekten in der Membranoberfläche. Diese Defekte korrelieren mit der großen Membran-

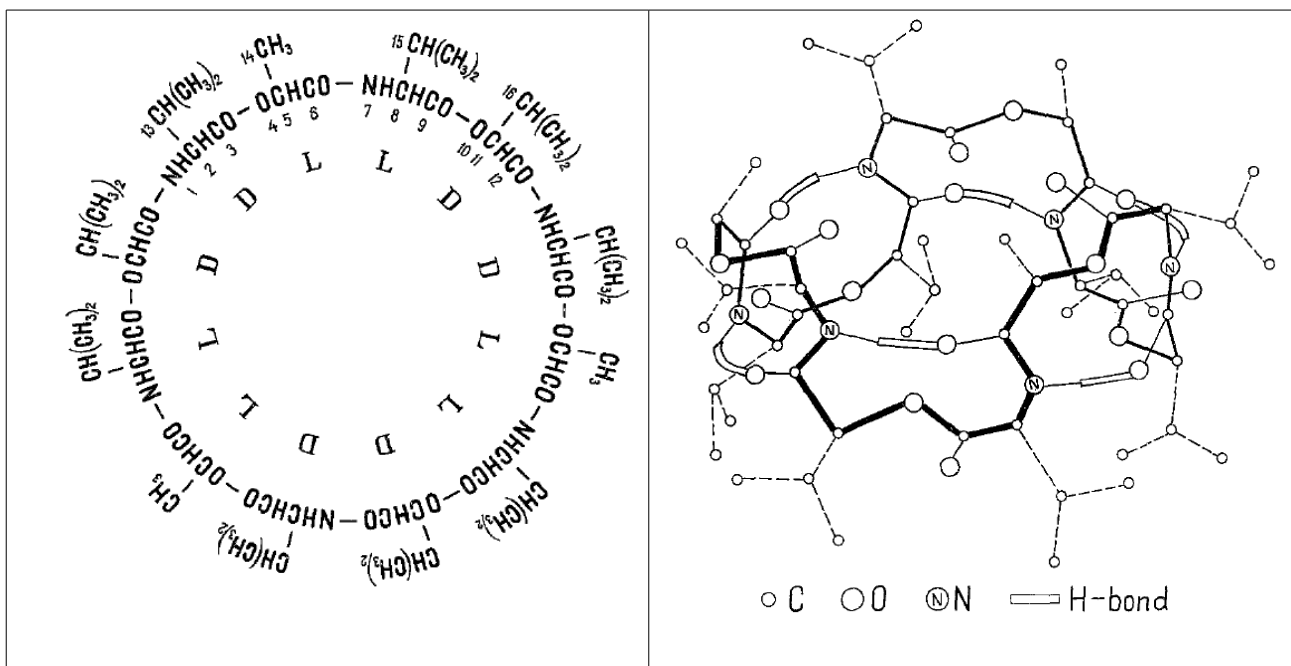
2 Einleitung

fläche, über die per Impedanzspektroskopie gemessen wird. Dadurch lassen sich zur Zeit nur Widerstände bis zu $10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ erzielen, wohingegen Widerstände bei BLM Versuchen im Giga- Ω -Bereich liegen [4,5].

2.3 Valinomycin (Ionencarrier)

Valinomycin ist ein Cyclododeca-Depsipeptid, das 1955 erstmals von Brockman und Schmidt-Kastner aus *Streptomyces fulvissimus* isoliert wurde. Es zählt zu den Makrolid-Antibiotika und besteht aus einer sich dreimal wiederholenden Aminosäuresequenz aus *L*-Lactat, *L*-Valin, *D*-Hydroxyisovalerat und *D*-Valin (Vgl. Tab.1).

Tabelle 1: Struktur von Valinomycin vorgeschlagen von Shemyakin M. et al. (1969) [24]



Seine Fähigkeit, Kaliumionen 2000 mal stärker zu binden als andere Alkaliionen (z. B. Natriumionen), hat es zu einem der am besten untersuchten Ionencarrier gemacht [6,9]. Das Alkaliion wird durch sechs freie Carbonyl-Gruppen hexahedral in der Mitte des Valinomycinrings komplexiert. Valinomycin ist in Wasser unlöslich, kann aber in Ethanol in Lösung gebracht werden. Ein Valinomycinmolekül, das ein K^+ -Ion komplexiert, ist in Abb.8 dargestellt.

2 Einleitung

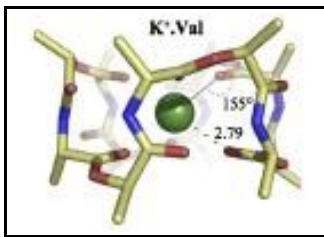


Abbildung 8:
Valinomycin mit
komplexiertem K^+ -Ion
[25]

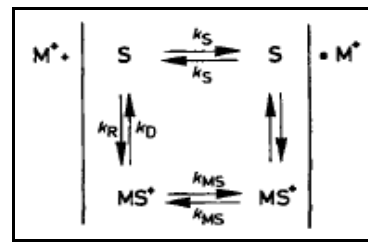


Abbildung 9:
Mechanismus des
Iontentransports durch
einen Carrier [9]

Durch de Levie wurde 1975 [26] ein erster Mechanismus zur Funktion von Valinomycin vorgeschlagen. Der Mechanismus für den Ionencarrier ist bis heute nicht genau verstanden und wird kontrovers diskutiert [27]. Ein Modell des Ionentransportmechanismus ist in Abb.9 gezeigt. Das Ion (M^+) bindet an den Ionencarrier (S), und wird von der einen Seite auf die andere Seite der Membran transportiert. Hierbei werden noch Zustände von komplexiertem Ion mit dem Ionencarrier (MS^+) auf beiden Seiten der Membran angenommen. Der gesamte Transportprozess lässt sich unter der Annahme von verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten beschreiben [9].

2.4 Valinomycin mit Biotinanker

Durch den Austausch der Aminosäure *L*-Valin durch *L*-Lysin konnte Julia Braunagel (MPIP Mainz) ein Valinomycinderivat synthetisieren. Ausgehend von Lysin-Valinomycin wurde ein Biotinmolekül über eine Peptidbindung mit $c((-L\text{-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac})_2(-L\text{-Lys-D-Hyiv-D-Val-L-Lac}))$ zu Biotin-Valinomycin umgesetzt (Abb.Fehler: Referenz nicht gefunden). Es kann ebenfalls in Ethanol gelöst werden.

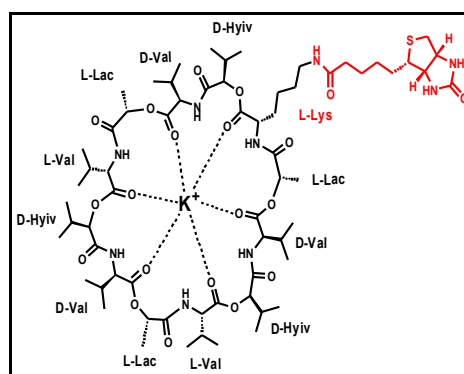


Abbildung 10: Biotin-Valinomycin; Biotin ist rot markiert

3 Zielsetzung dieser Arbeit

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgehend von dem neu synthetisierten Biotin-Valinomycin soll der Vergleich zu natürlichem Valinomycin hinsichtlich seiner Eigenschaften als Ionencarrier gezogen werden. Dabei soll festgestellt werden, ob das Biotin-Valinomycinmolekül durch die Zugabe von Streptavidin in seiner Fähigkeit als Ionencarrier ähnlich einem Schalter „an“ bzw. „aus“ geschaltet werden kann. Der Idee liegt zugrunde, dass die Biotin-Valinomycinmoleküle durch Streptavidin auf einer Seite der Modellmembran fixiert (vernetzt) werden können und damit der Transport der Ionen durch den Carrier gesenkt werden kann (Abb.11).

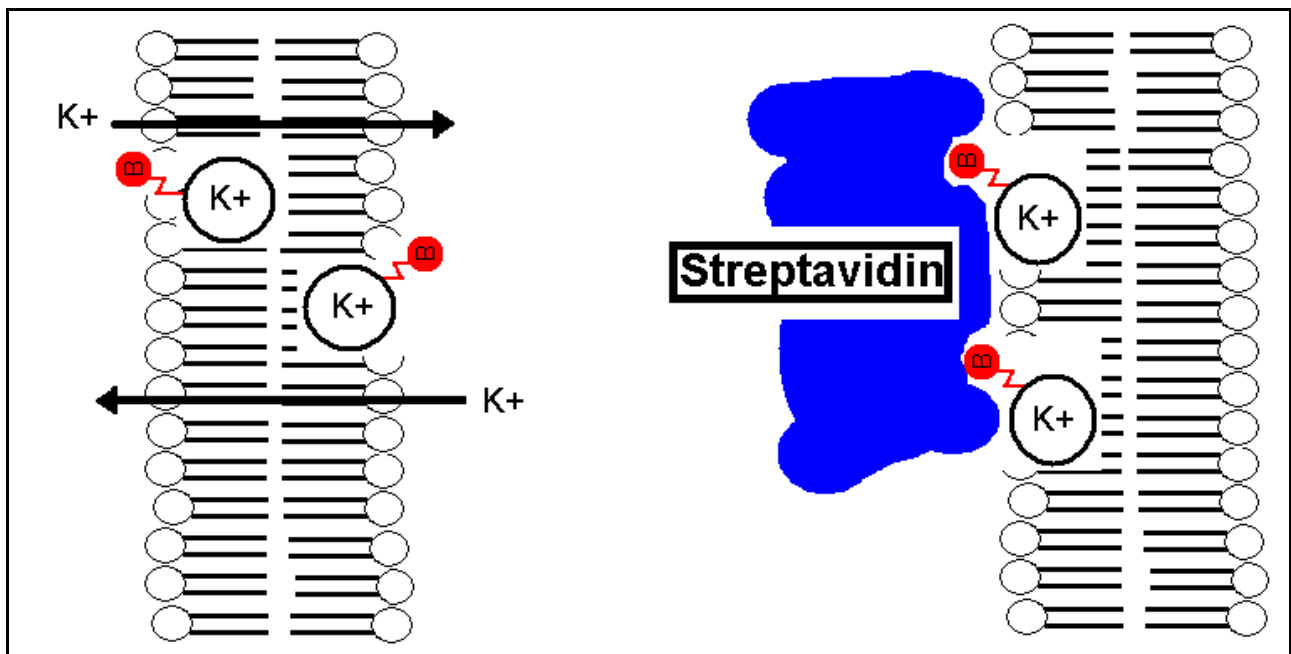


Abbildung 11: Manipulation des Ionentransports von Biotin-Valinomycin durch Streptavidin; links = Lipidbilayer der von Biotin-Valinomycin durchwandert wird; rechts = Streptavidin blockiert zwei Biotin-Valinomycinmoleküle

Der Vergleich zwischen Valinomycin und Biotin-Valinomycin erfolgt durch Messung der Leitfähigkeit der Ionencarrier in Form von Kinetiken.

Um die Experimente mit planaren Lipidmembranen durchführen zu können, muss ein kompletter Versuchsaufbau für BLM-Experimente am Max-Planck-Institut für Polymerforschung aufgebaut werden. Der Aufbau dieses Systems ist Teil dieser Arbeit. Für den Versuchsaufbau zur Herstellung von planaren Lipidmembranen müssen verschiedene Teilprobleme gelöst werden. Zuerst muss die Abschirmung des Versuchs hergestellt und

3 Zielsetzung dieser Arbeit

montiert werden. Die Software des Verstärkers und die Datenanalyse müssen für Ionencarrierkinetiken weitgehend automatisiert werden. Hierzu sind selbst geschriebene Computerprogramme notwendig. Des Weiteren wird eine Apparatur benötigt, die für die BLM-Versuche kreisrunde Löcher im Durchmesser von 50-100 μm in Teflonfolien brennt. Abschließend soll aufbauend auf dem funktionsfähigen Versuchsaufbau ein Vergleich der Ionencarrier Valinomycin und Biotin-Valinomycin gezogen werden.

Planare Lipidmembranen eignen sich für den angestrebten Vergleich der Ionencarrier besonders, da durch den hohen elektrischen Widerstand der Lipidmembran selbst kleine elektrische Signale eines Ionentransports durch den Ionencarrier detektiert werden können. Außerdem ist durch die Methode nach Montal und Mueller eine Möglichkeit vorhanden, reproduzierbare Membranen zu schaffen, die sehr schnell erzeugt werden können.

4 Material

4.1 Verwendete Chemikalien:

- Aceton (Fisher Scientific, Schwerte)
- Bayer Silicon Paste (Bayer, Leverkusen)
- Biotin-Valinomycin (Julia Braunagel, MPIP Mainz)
- 1,2-Diphytanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine [DPhyPC]
Art.-NR. 850356 (AvantiPolar Lipids, Alabaster, US)
- Ethanol absolut, Chromasolv (Sigma-Aldrich, München)
- KCl (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- bidest. Wasser (Millipore, Billerica, US)
- n-Hexadecan (Sigma-Aldrich, München)
- n-Pentan (Merck, Darmstadt)
- Valinomycin, powder 10 mg (Fluka, Sigma-Aldrich, München)

4.2 Verwendete Geräte und Software:

- Ag/AgCl Elektroden, EP 2 (World Precision Instruments, Berlin)
- Analysewaage Mettler Toledo AX205 (Mettler Toledo GmbH, Giessen)
- Autolt-Software (www.autolt.com, Stand 8.3.09)
- Axioskop 50 mit AxioCam Colour, Software: AxioVision 2.0.5.3 (Zeiss, Offenbach)
- Eppendorfpipette 5000 µL, 1000 µL, 100 µL, 10 µL (Eppendorf, Hamburg)
- Irfanview Version 4.2
- Microsoft Excel 2002, SP3, deutsch (Microsoft Corporation, US)
- Hamiltonspritze 1000 µL, 100 µL, 5 µL gastight (VWR, Darmstadt)
- HEKA EPC10 Verstärker mit Pulse 8.4 (HEKA Elektronik Dr. Schulz, Lambrecht-Pfalz)
- Hochfrequenzgenerator BD10AS (ETP, North Ravenwood, US)

4 Material

- Mobile Leselampe, LED-Lenser, Zweibrüder optoelectronics (Conrad Elektronik, Mainz)
- Parafilm Pechiney (VWR, Darmstadt)
- Polytetrafluorethylen (PTFE)-Folie, FP301200 (goodfellow, Huntington, England)
- Teflonband (VWR, Darmstadt)
- Waage Mettler Toledo PG503-S (Mettler Toledo GmbH, Giessen)

4.3 Herstellung von Lösungen:

- 0,1 M KCl-Lösung:
1 L- Ansatz: Es wurden 7,455 g KCl eingewogen und mit 1 L bidest.-Wasser aufgefüllt.
- 1%ige (v/v) Hexadecanlösung in Pentan:
In einen Rundkolben wurden 5 mL Pentan gefüllt und mit 50 µL Hexadecan gemischt. Der Rundkolben wurde mit Teflonband und Parafilm zusätzlich verschlossen, um der Verdunstung von Pentan vorzubeugen.
- 5 mg/mL DPhyPC in Pentan:
In einem 5 mL Rundkolben wurden 25 mg DPhyPC eingewogen und mit 5 mL Pentan aufgefüllt. Der Rundkolben wurde mit Teflonband und Parafilm zusätzlich verschlossen, um der Verdunstung von Pentan vorzubeugen.
- 3 M KCl-Lösung:
100 mL-Ansatz: Es wurden 22,36 g KCl eingewogen und mit 100 mL bidest.-Wasser aufgefüllt.
- Von Valinomycin und Biotin-Valinomycin wurde jeweils eine 1 mg/mL-Lösung in Ethanol hergestellt.

5 Methoden

5.1 Die Patch-Clamp-Technik

Seit der Untersuchung von E. Neher und B. Sakmann (1976) an Acetylcholinrezeptoren von Froschmuskelfasern [28] ist die Methode der Patch-Clamp-Technik stetig weiterentwickelt worden. Das eigentliche Anwendungsgebiet liegt in der gezielten Charakterisierung von einzelnen Membrankanälen in Zellen. Um die Ströme von Membrankanälen zu messen, bedarf es einer sensitiven elektronischen Verstärkertechnologie, um physiologische Ströme im pA-Bereich mit hoher Zeitauflösung messen zu können. Diese Messungen sind nur möglich, wenn ein sehr hoher Widerstand (Gigaseal) das Hintergrundrauschen bei der elektrischen Messung minimiert.

In Patch-Clamp-Experimenten wird dieser Gigaseal mit der zu untersuchenden Zelle über sehr feine, saubere Borosilikatglaspipetten hergestellt, um physiologische Stromsignale der Zelle abzuleiten [29].

In einem Experiment mit planaren Lipidmembranen bildet die Membran den Gigaseal zwischen zwei Kammerhälften einer Messapparatur. Mit zwei Elektroden (Silber/Silberchlorid) anstelle der Messpipette können Ströme durch Membranproteine bzw. Ionencarrier, die in die planaren Lipidmembranen eingebaut sind, detektiert werden.

5.2 Der Versuchsaufbau für ein BLM-Experiment

Als Patch-Clamp-Verstärker diente der HEKA EPC10. Dieser ist über eine PCI-Steckkarte mit einem handelsüblichen PC verbunden. Durch die Software Pulse wird der Verstärker angesteuert. Der Verstärker besitzt einen kleinen Vorverstärker, welcher über ein Kabel mit der Haupteinheit verbunden ist. Der Vorverstärker bestimmt das Stromsignal in einem Experiment aus dem Kompensationsstrom der Arbeitselektrode mithilfe eines Rückkopplungswiderstands. Der vereinfachte Schaltkreis des Vorverstärkers für Voltage-Clamp-Experimente ist in Abb.12 dargestellt.

5 Methoden

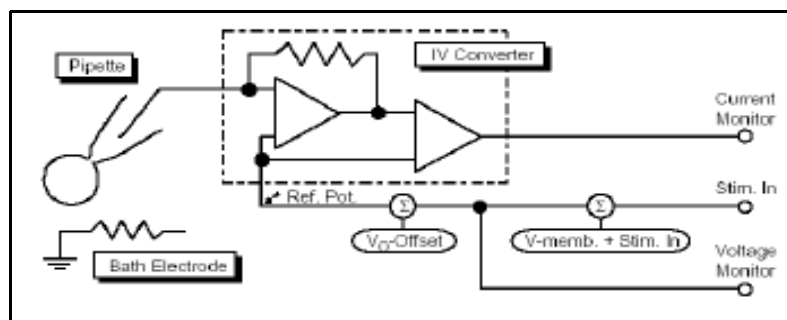


Abbildung 12: Schaltkreis Voltage-Clamp-Methode des HEKA EPC10 Verstärkers [30]

Am Vorverstärker wird normalerweise die Glaspipette des Patch-Clamp-Versuchs angebracht und über einen zweiten Anschluss (Erdungsanschluss) die Probenlösung geerdet. Die Haupteinheit besteht aus einem digitalen A/D- und D/A-Wandler, der Signalverarbeitungshardware und Anschlüssen für analogen bzw. digitalen In- bzw. Output von Signalen.

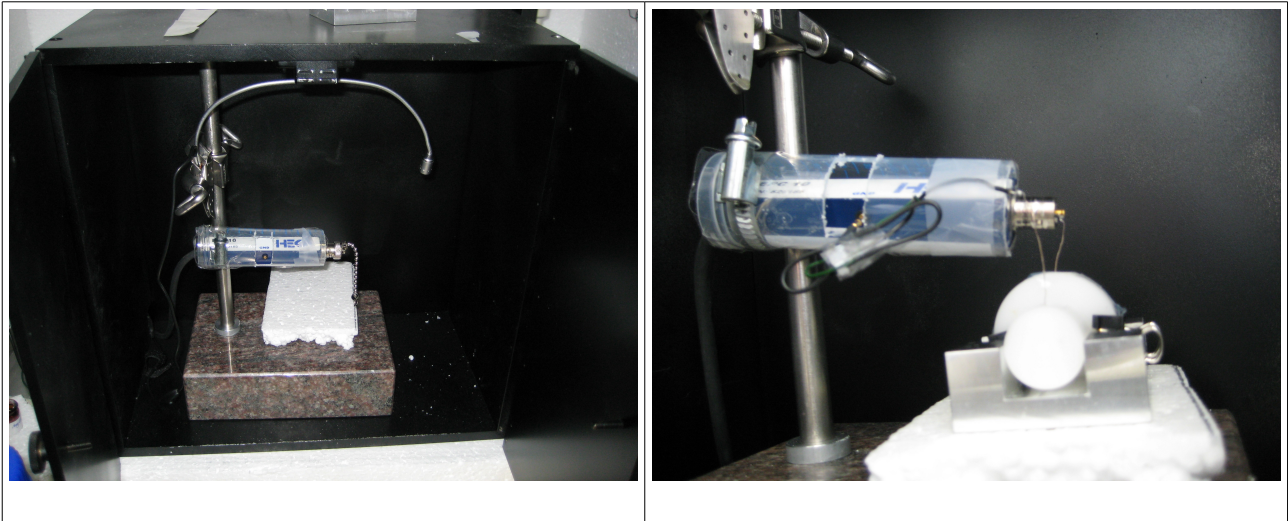
Das Hintergrundrauschen stellt das größte Problem während eines BLM-Experiments dar. Um Störungen des Patch-Clamp-Verstärkers durch andere elektrische Geräte zu vermindern, wurde eine Abschirmung des Versuchs in Form eines Faraday'schen Käfig benötigt. Innerhalb dieser Abschirmung fand das Experiment ohne die Anwesenheit weiterer Störquellen statt. Um zusätzliche Störungen durch Schwingungen vom Versuchsaufbau fernzuhalten, wurde der gesamte Versuch auf einem schwingungsgedämpften Tisch mit sehr schwerer Arbeitsplatte (Marmor) aufgebaut. Auf dieser Arbeitsplatte wurde ein großer Faradaykäfig montiert. Eine zusätzliche Isolation des großen Faradaykäfigs durch Schaumstoff bzw. Styropor wurde zum Schutz des Versuch vor akustischen Störsignalen angebracht. In das Innere des großen Faradaykäfigs wurde ein kleinerer Faradaykäfig gestellt, in diesem fanden die Messungen an planaren Lipidmembranen statt. Die Kombination von zwei ineinander geschachtelten Faradaykäfigen soll das Hintergrundrauschen sehr stark reduzieren. Beide Käfige wurden separat voneinander geerdet. Dies konnte direkt über die Gehäuse- bzw. den Erdungseingang der Haupteinheit des Verstärkers realisiert werden.

Das Innere des kleineren Faradaykäfigs wurde mit einem Stativ, welches in einem kleinen Marmorblock befestigt war, versehen. An diesem Stativ wurde der Vorverstärker befestigt und eine kleine, batteriebetriebene Lampe angebracht (Tab.2). Diese Lampe ist für das

5 Methoden

genau Arbeiten im dunklen Inneren der Faradaykäfige mit der Messapparatur (Vgl. 5.7 Das BLM-Experiment), wie im nachfolgenden Text deutlich wird, unentbehrlich.

Tabelle 2: Versuchsaufbau: links = kleiner Faradaykäfig mit Vorverstärker; rechts = Vorverstärker mit Elektroden und Küvette



5.3 Die Elektroden

Die Elektroden bestanden aus einem Silberdraht, an dessen Ende ein Silber/Silberchlorid gesintertes Pellet (2 mm x 4 mm) hing. Um die Elektroden in den beiden Anschlüssen des Vorverstärkers zu befestigen, mussten diese mit den entsprechenden Steckern verlötet werden.

Die Arbeitselektrode wurde hierbei mit einem handelsüblichen BNC-Stecker (Goldpin) durch Lötzinn verbunden. Die Erdungselektrode konnte aufgrund des kleineren Anschlusses im Vorverstärker nur mit einem 0,5 mm dicken Goldstecker versehen werden. Um die Entfernung zwischen Probenkopf und der Messapparatur zu überbrücken, musste die Erdungselektrode mit einem ca. 10 cm langen, isolierten Drahtstück verlängert werden. Dieses Drahtstück wurde auf der einen Seite mit dem 0,5 mm Pin und auf der anderen Seite mit dem Ende der Erdungselektrode verlötet. Diese Elektrode wird mit dem Erdungsanschluss des Vorverstärkers verbunden.

Die Elektroden wurden, wenn sie nicht im Experiment benutzt wurden, in 3 M KCl-Lösung miteinander „kurzgeschlossen“ und somit auf gleichem Potential aufbewahrt. Vor bzw. nach jedem Experiment wurden die Elektroden gründlich mit bidest.-Wasser gereinigt.

5 Methoden

5.4 Die Messapparatur (BLM-Küvette)

Die Apparatur, in der die planare Lipidmembran nach der Methode von Montal und Mueller erzeugt wurde, besteht aus zwei zylinderförmigen Kammern. Beide Kammernhälften ergeben zusammengefügt die eigentliche BLM-Küvette (Abb.13). Jede Kammer fasst für sich ein Volumen von ca. 3 mL Flüssigkeit und besteht aus Delrin. Delrin (Polyoxymethylen, POM) besitzt eine Resistenz gegen die meisten organischen Lösungsmittel (Reinigung), ist stabil und lässt sich gut mechanisch bearbeiten. Die Kammern sind zueinander spiegelsymmetrisch und besitzen an ihrer Oberseite jeweils eine Aussparung, durch die die Küvette mit Flüssigkeit befüllt wurde. Jeweils an ihrem Ende verfügen die Kammern über eine größere zylinderförmige Scheibe, die die Kontaktfläche zur Teflonfolie darstellt.

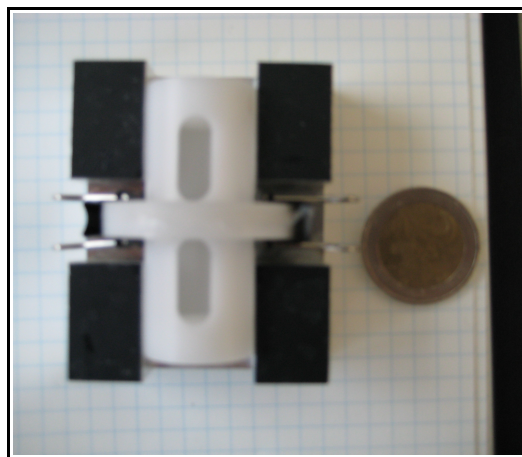


Abbildung 13: BLM-Küvette

5.5 Zusammenbau der BLM-Küvette:

Auf die Kontaktflächen wurde, um beide Kammernhälften beim Zusammenfügen abzudichten, Bayer Silicon Paste dünn aufgebracht. Beim Auftragen der Siliconpaste wurden 200 μ L Pipettenspitzen verwendet, um die Siliconpaste gleichmäßig über die Kontaktfläche zu verteilen.

Zwischen die behandelten Kontaktflächen wurde für die Messung eine kleine Teflonmembran (ca. 4x4 cm PTFE-Folie, 25 μ m) mit einem 110 μ m großen Loch geklemmt

5 Methoden

(Abb.14). Dabei wurde das Loch ungefähr mittig auf den Kontaktflächen platziert. Damit beide Kammern nicht voneinander gelöst werden können, wurden diese mit zwei Klammern seitlich befestigt und in einer Aluminiumhalterung platziert. Die verwendete PTFE-Folie wurde aus Zeitgründen durch die Arbeitsgruppe von Prof. M. Winterhalter an der International University Bremen angefertigt und zur Durchführung der Ionencarrierkinetiken zur Verfügung gestellt. Nach der Konstruktion des „high frequency generators“ (Vgl. Kapitel 5.11) können in Zukunft diese PTFE-Folien am Max-Planck-Institut für Polymerforschung hergestellt werden.

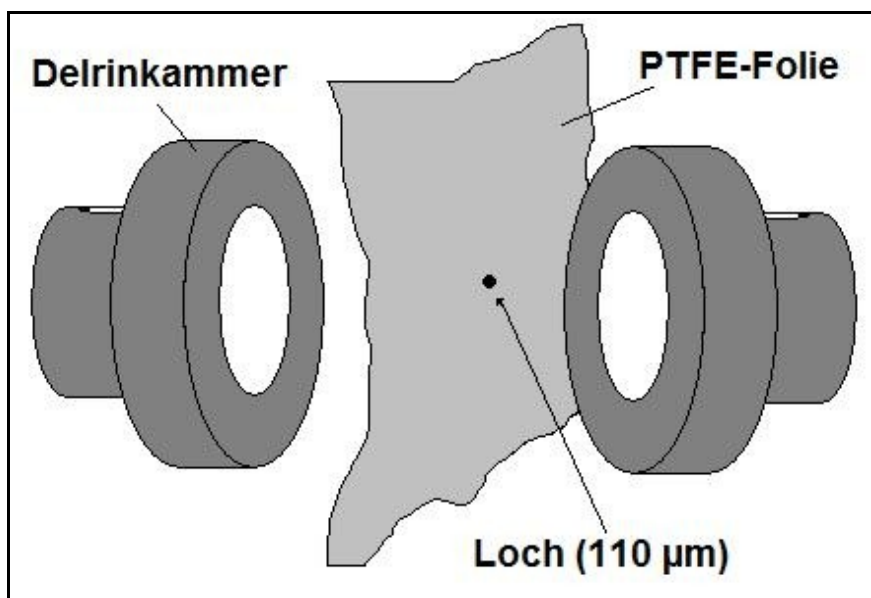


Abbildung 14: Schema: Zusammenbau der BLM-Küvette

5.6 Pulse-Software-Einstellungen:

Die Software Pulse wurde in der Version 8.4 verwendet. Über Pulse ist der Verstärker mit Hilfe eines PC-Systems steuerbar. Die Software Pulse ist die Vorgängersoftware von Patchmaster, welche aktuell von HEKA Elektronik vertrieben wird. Für die Messung von Ionencarriern in planaren Lipidmembranen sind die meisten der in Pulse integrierten Einstellungen, wie z. B. die C-Slow und C-Fast-Korrekturen nicht sinnvoll einsetzbar. Alle Kinetikmessungen wurden in Pulse im OnCell-Modus durchgeführt. Für die Datenfilterung wurden als Filter 1 die Besselfiltereinstellung bei 10 kHz und bei Filter 2 die Besselfiltereinstellung bei 0,5 kHz gewählt. Die Cursor des Oszilloskopfensters wurden so eingestellt,

5 Methoden

dass in der Online-Analyse die Kapazitätswerte des rechteckigen Antwortsignals ausgegeben wurden. Durch programmierbare „pulse generator files“ (PGFs) lässt sich die Spannung der Arbeitselektrode je nach Versuchsanforderung automatisch verändern. Durch die zeitliche Verkettung von mehreren PGFs lassen sich automatisierte Messungen für Kinetikexperimente aufnehmen.

5.6.1 PGF-Protokolle Kapazitätsmessung

Für die Messung der Kapazität wurden zwei verschiedene PGF-Protokolle geschrieben, die zur Ermittlung der Kapazität ein „Sägezahn“-Spannungsprotokoll verwenden. Das Sägezahnmuster bezieht seinen Namen durch die optische Darstellung der Spannungsänderung an der Arbeitselektrode über die Zeit, welches ein Muster ähnlich dem eines Sägeblattes aufweist (Abb.15). Die Spannungsänderung wird dabei so gewählt, dass die Steigung der Spannung $(dV/dt)^{-1}$ gegen die Zeit 1 beträgt. Dies hat zur Folge, dass die Gleichung $C = I * (dV/dt)^{-1}$, welche die Kapazität beschreibt, zu $C = I$ wird. Dadurch kann die Kapazität direkt aus der rechteckigen Stromantwort auf dem Oszilloskopfenster abgelesen bzw. gespeichert werden.

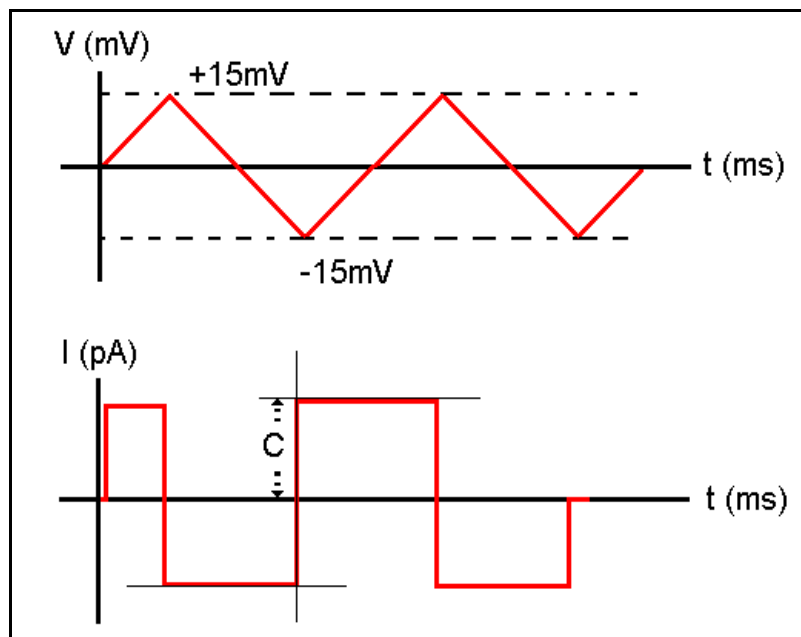


Abbildung 15: Schema zur Kapazitätsbestimmung (C): oben = Sägezahnspannungsprofil; unten = rechteckige Stromantwort

5 Methoden

Das „C-Check“-PGF:

Das „C-Check“-PGF diente für die zeitlich nahezu unbegrenzte Ausgabe eines Sägezahnspannungsprofils (Abb.16). Hierzu wurde die „No of Sweeps“-Einstellung im PGF-Editor mit maximal 32767 Sweeps (ein Sweep entspricht einem Messdurchlauf) eingestellt. Das Sample-Interval wurde mit 50 μ s (20 kHz) festgesetzt. Für das Sägezahnspannungsprofil wurde ein konstantes Segment und fünf weitere Rampen-Segmente selektiert. Das konstante Segment hielt die Spannung 5 ms lang bei 0 mV. Das erste Rampensegment erhöhte die Spannung über 15 s auf 15 mV. Das nachfolgende Rampensegment senkte die Spannung über 30 ms auf -15 mV ab. Die anschließenden beiden Segmente erhöhten bzw. senkten die Spannung in 30 ms auf +15 mV bzw. -15 mV, bevor das letzte Segment die Spannung in 15 ms wieder auf 0 mV zurücksetzte. Der Trigger wurde mit 2 ms ins erste, konstante Segment gesetzt. Der Zeitpunkt der Datenspeicherung wurde durch den Trigger bestimmt. Die Datenspeicherung wurde auf „*write disabled*“ gesetzt. Ohne das Setzen eines Triggers kann ein PGF nicht gestartet werden. Die Daten werden aber aufgrund des „*write disabled*“-Befehls nicht gespeichert.

5 Methoden

The screenshot shows the Pulse Generator software interface for a protocol named "C-Check". The main sequence is "C-Check" with steps: 1 C-Save, 2 IV, 3 Ramp, 4 steps, 5 C-Check, 6 ZapPulse. The "Timing" section shows 32767 sweeps, 0.00 s interval, and 50.0 μs sample interval. The "Chain" section shows a linked sequence of NIL. The "Leak" section shows a leak size of 0.25 and a holding potential of -120 mV. The "Segments" table is as follows:

Segment Class	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Constant	Constant	Ramp	Ramp	Ramp	Ramp	Ramp
Voltage [mV]	V-membr.	15	-15	15	-15	V-membr.
Duration [ms]	5.00	15.00	30.00	30.00	30.00	15.00
Delta V-Factor	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Delta V-Incr. [mV]	0	0	0	0	0	0
Delta t-Factor	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Delta t-Incr. [ms]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

The "AD / DA Channels" section shows 2 channels (2/1) and "Not Triggered". The "Pulse Length" section shows a total of 2500 pts (125.0 ms) and 2460 pts (123.0 ms) stored. The "Triggers" section shows 1 trigger with a start time of 2.00 ms and a length of 0.10 ms. The "V-membrane" section shows a V-membr. (disp) of 0.0 mV and a Post Sweep Increment of 0.0 mV. A waveform graph at the bottom left shows a sawtooth pattern with a dashed horizontal line at the baseline.

Abbildung 16: "C-Check"-PGF

Das „C-Save“-PGF:

Das „C-Save“-PGF wurde zum Speichern von jeweils 10 Sweeps eines Sägezahnspannungsprofils eingesetzt (Abb.17). Die gespeicherten Daten bildeten den Ausgangspunkt für die Kapazitätskinetik. Die Zahl der Sweeps in „No of Sweeps“ wurde auf 10 eingestellt. Das Sample-Interval wurde bei 50 μs (20 kHz) festgelegt. Die Anordnung des Triggers wurde, wie bereits beim „C-Check“-PGF beschrieben, gewählt. Zusätzlich wurde die Speicherung aktiviert („write enabled“) und das PGF-Protokoll über die Chain-Funktion mit dem „IV-Ramp“-PGF verlinkt. Hierzu wurde die Wartezeit („Linked Wait“) auf 125 ms gesetzt. Diese Verlinkung ermöglichte eine automatisierte Datenaufnahme von mehreren PGF-Protokollen und deren zeitliche Steuerung.

5 Methoden

The screenshot shows the Pulse Generator software interface for a file named 'test'. The main sequence is 'C-Save', followed by 'IV', 'Ramp', 'steps', 'C-Check', and 'ZapPulse'. The 'Timing' section is set to 'No wait before 1. Sweep' with 10 sweeps, a 0.00 s interval, and a 50.0 μs sample interval. The 'Chain' section is linked to 'IV' with a 125 ms wait and 1 repeat. The 'Leak' section is set to 0.25 leak size, -120 mV holding, and 100 μs delay. The 'Segments' table is as follows:

Segment Class	#1	#2	#3	#4	#5	#6	
Constant							
Voltage [mV]	V-membr.	15	-15	15	-15	V-membr.	---
Duration [ms]	5.00	15.00	30.00	30.00	30.00	15.00	---
Delta V-Factor	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	---
Delta V-Incr. [mV]	0	0	0	0	0	0	---
Delta t-Factor	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	---
Delta t-Incr. [ms]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	---

The 'AD / DA Channels' section shows 2 channels (2/1) and 'Not Triggered'. The 'Pulse Length' section shows 2500 pts total and 2460 pts stored. The 'Triggers' section shows 1 trigger with a 2.00 ms start and 0.10 ms length. The 'V-membrane' section shows 0.0 mV displacement and 0.0 mV post-sweep increment. A graph at the bottom shows a sawtooth waveform with a red line and a green dashed line.

Abbildung 17: "C-Save"-PGF

5.6.2 PGF-Protokoll Leitfähigkeitsmessungen

Das „IV-Ramp“-PGF:

Das „IV-Ramp“-PGF nimmt die Werte zur Berechnung der Leitfähigkeit auf. Für die Berechnung wurde eine Veränderung der Strom-Spannungs-Kennlinie über die Zeit zu Grunde gelegt (Abb.18). Für eine Strom-Spannungs-Kennlinie (I-U-Kennlinie) waren Spannungswerte notwendig, welche den entsprechenden Stromwerten zugeordnet wurden. Diese Strom- und Spannungswerte wurden durch die „IV-Rampe“ gemessen. Dies erfolgte durch das Anlegen von 13 Spannungsschritten von je 25 mV zwischen -150 mV und +150 mV. Die Stromantwort auf den jeweiligen Spannungsschritt wurde über 20 ms aufgenommen. Aus diesen Werten wurde in der Datenanalyse ein Datenpunkt der

5 Methoden

Leitfähigkeitskinetik errechnet. Das PGF bestand aus 13 Sweeps, welche bei einem Sample-Interval von 400 μs (2,5 kHz) aufgenommen wurden. Die Datenspeicherung wurde aktiviert („write enabled“). Jeder Sweep bestand aus drei konstanten Segmenten. Im ersten Segment wurde die Spannung für 10 ms bei 0 mV gehalten. Im zweiten Segment wurde die Spannung beim ersten Sweep auf -150 mV gesetzt und bei jedem nachfolgenden Sweep durch die „Delta V-Incr.“-Option um 25 mV erhöht. Das letzte Segment hielt für 10 ms die Spannung bei 0 mV. Der Trigger startete die Datenaufnahme nach 5 ms im ersten Segment. Das „IV-Ramp“-PGF wurde mit dem „Ramp“-PGF mit 50 ms Wartezeit verknüpft. Der „Filter Factor“ betrug 833 Hz.

Pulse Generator File: test

Pool: 1 C-Save, 2 **IV**, 3 Ramp, 4 steps, 5 C-Check, 6 ZapPulse

Sequence: **IV** (LIST, COPY, MOVE, LINKED, DELETE)

Timing: Wait before 1. Sweep, No of Sweeps: 13, Sweep Interval: 0.00 s, Sample Interval: 400. μs (2.50kHz), Build DA-Template

Chain: Linked Sequence: Ramp, Linked Wait: 50.0 ms, Repeats / Wait: 1 / 0.00 s, Filter Factor: 3.0 (833. Hz), Checking, EXECUTE

Leak: Leak Size: 0.10, Leak Holding: -120 mV, Leak Delay: -100. μs , No of Leaks: 0, Leak Alternate, Alt Leak Average

Segments	#1	#2	#3
Segment Class	Constant	Constant	Constant
Voltage [mV]	V-membr.	-150	V-membr.
Duration [ms]	10.00	20.00	10.00
Delta V-Factor	1.00	1.00	1.00
Delta V-Incr. [mV]	0	25	0
Delta t-Factor	1.00	1.00	1.00
Delta t-Incr. [ms]	0.00	0.00	0.00

AD / DA Channels: Channels: 2 (2/1), Trace 1: Default A, Trace 2: Default V, Not Triggered

Pulse Length: Total: 100 pts (40.00 ms), Stored: 87 pts (34.80 ms)

Triggers: 1 #1 (+) #2 (*) #3 (x), DA channel: Default, Seg./ Start [ms]: 1 | 5.00, Length [ms]: 2.50, Voltage [mV]: off, Rep./ Cycle [ms]: 1 | 0.00

V-membrane: V-memb. (disp) [mV]: 0.0, Post Sweep Increment [mV]: 0.0

Abbildung 18: "IV-Ramp"-PGF

5 Methoden

5.6.3 Weitere PGF-Protokolle:

Das „Ramp“-PGF:

Das „Ramp“-PGF diente zur Abbildung der I-U-Kennlinie während einer Kinetikmessung auf dem Schirm des Oszilloskopfensters und zur Einstellung der Spannung bei +100 mV zwischen den einzelnen Messungen (Abb.19). Die Daten der „Ramp“-PGF wurden zwar ebenso wie die der „C-Save“- und „IV-Ramp“-PGFs aufgenommen, später aber nicht ausgewertet. Das „Ramp“-PGF besteht aus einem Sweep mit einem Sample-Interval von 400 μ s (2,5 kHz). Die Segmente des PGFs setzten sich aus zwei konstanten Segmenten zu Beginn, mit zwei anschließenden Rampensegmenten und einem abschließenden konstanten Segment, zusammen. Die Spannung an der Arbeitselektrode wurde dabei zuerst 10 ms auf 0 mV gehalten und danach für 2 ms auf -150 mV herabgesetzt. Die beiden Rampensegmente hoben jeweils über 150 ms die Spannung zuerst auf 0 mV, später auf +150 mV an. Das letzte Segment setzte 10 ms lang die Spannung auf 0 mV bevor die Spannung auf +100 mV für 299 s festgelegt wurde. Das „Ramp“-PGF war nach 299 s Wartezeit mit dem „Steps“-PGF verknüpft. Der Trigger startete die Datenaufnahme nach 2 ms im ersten Segment.

5 Methoden

Segments	#1	#2	#3	#4	#5
Segment Class	Constant	Constant	Ramp	Ramp	Constant
Voltage [mV]	V-membr.	-150	0	150	V-membr.
Duration [ms]	10.00	2.00	150.00	150.00	10.00
Delta V-Factor	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Delta V-Incr. [mV]	0	0	0	0	0
Delta t-Factor	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Delta t-Incr. [ms]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

The screenshot also shows a graph of a ramp pulse, a 'Pulse Length' table, and a 'Triggers' table. The 'Pulse Length' table is as follows:

Pulse Length	Total	Stored
	805 pts	792 pts
	322.0 ms	316.8 ms

The 'Triggers' table is as follows:

Triggers	#1 (+)	#2 (*)	#3 (x)
DA channel	Default	---	---
Seg./ Start [ms]	1 5.00	---	---
Length [ms]	0.10	---	---
Voltage [mV]	off	---	---
Rep./ Cycle [ms]	1 0.00	---	---

Additional parameters shown include: AD / DA Channels (2 (2/1)), Channels (2 (2/1)), Trace 1 (Default, A), Trace 2 (Default, V), Voltage Clamp (Increase, dV/dt * Factor, No G-Update, Write Enabled, Absolute Stimul, Rel X Seg 4, Rel Y Seg 4), and V-membrane (V-memb. (disp) [mV] 0.0, V-membrane [mV] 100.0).

Abbildung 19: "Ramp"-PGF

Das „Steps“-PGF:

Dieses PGF ergänzt den zeitlichen Ablauf von „C-Save“- , „IV-Ramp“- und „Ramp“-PGF. Es bildet einen zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Kinetikmessungen und senkte die Spannung der Arbeitselektrode von +100 mV auf 0 mV ab (Abb.21). Die Spannung von +100 mV soll für einen Potentialunterschied zwischen den Elektroden sorgen, damit der Ionencarrier in die Membran schneller inkoooperiert. Das Sample-Interval lag bei 1,88 ms (532 Hz). Die Speicherung der Daten wurde deaktiviert. Die drei konstanten Segmente des „steps“-PGFs, setzten die Spannung für 5,4 ms auf 0 mV. Danach wurde die Spannung für 978 ms auf +100 mV gesetzt und zuletzt wieder für 5,4 ms auf 0 mV gebracht. Der Trigger startete nach 5 ms im ersten Segment. Das „steps“-PGF war nach 1 s Wartezeit mit dem „C-Save“-PGF verknüpft.

5 Methoden

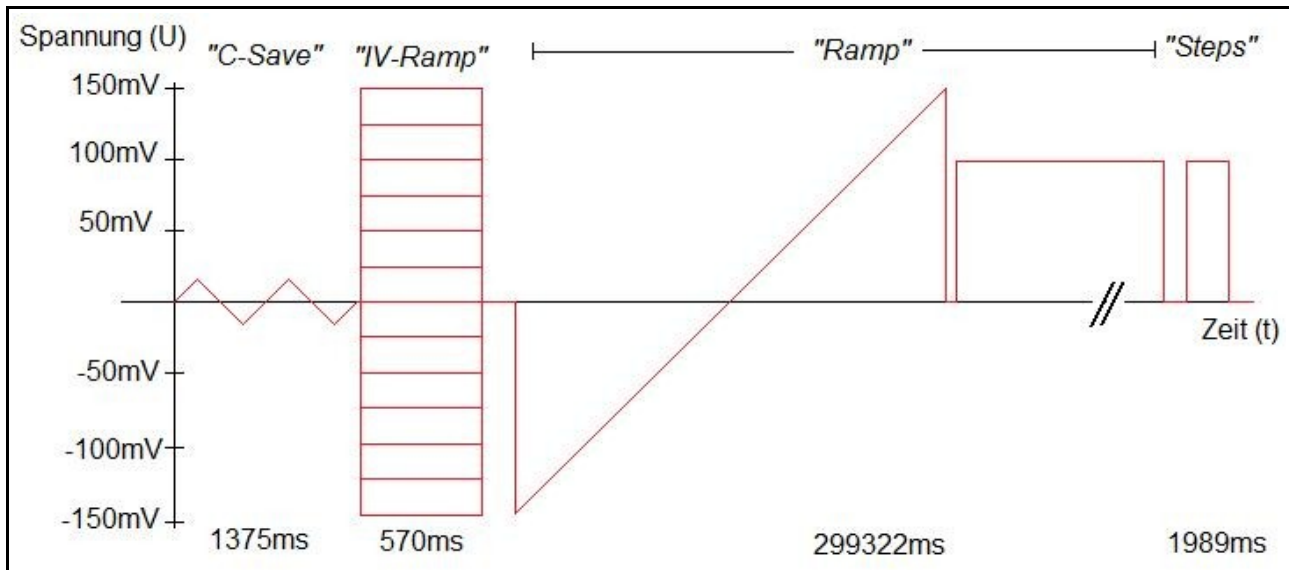


Abbildung 20: Spannung der Arbeitselektrode gegen die Zeit bei der Abfolge der PGFs: „C-Save“, „IV-Ramp“, „Ramp“ und „Steps“

Somit war der Ablauf der PGFs nach dem Start der Messung (Drücken des „C-Save“-Shortcuts im Oszilloskopfenster) wie folgt zusammen: Zuerst war 1375 ms das „C-Save“-PGF aktiv, danach 570 ms lang das „IV-Ramp“-PGF. Im Anschluss daran lief ~299,3 s lang das „Ramp“-PGF und zuletzt ~1,9 s lang das „Steps“-PGF. Somit ergab sich eine Gesamtdauer zwischen den Messungen von 303,25 s (= 0,084 h)(Vgl. Abb.20).

5 Methoden

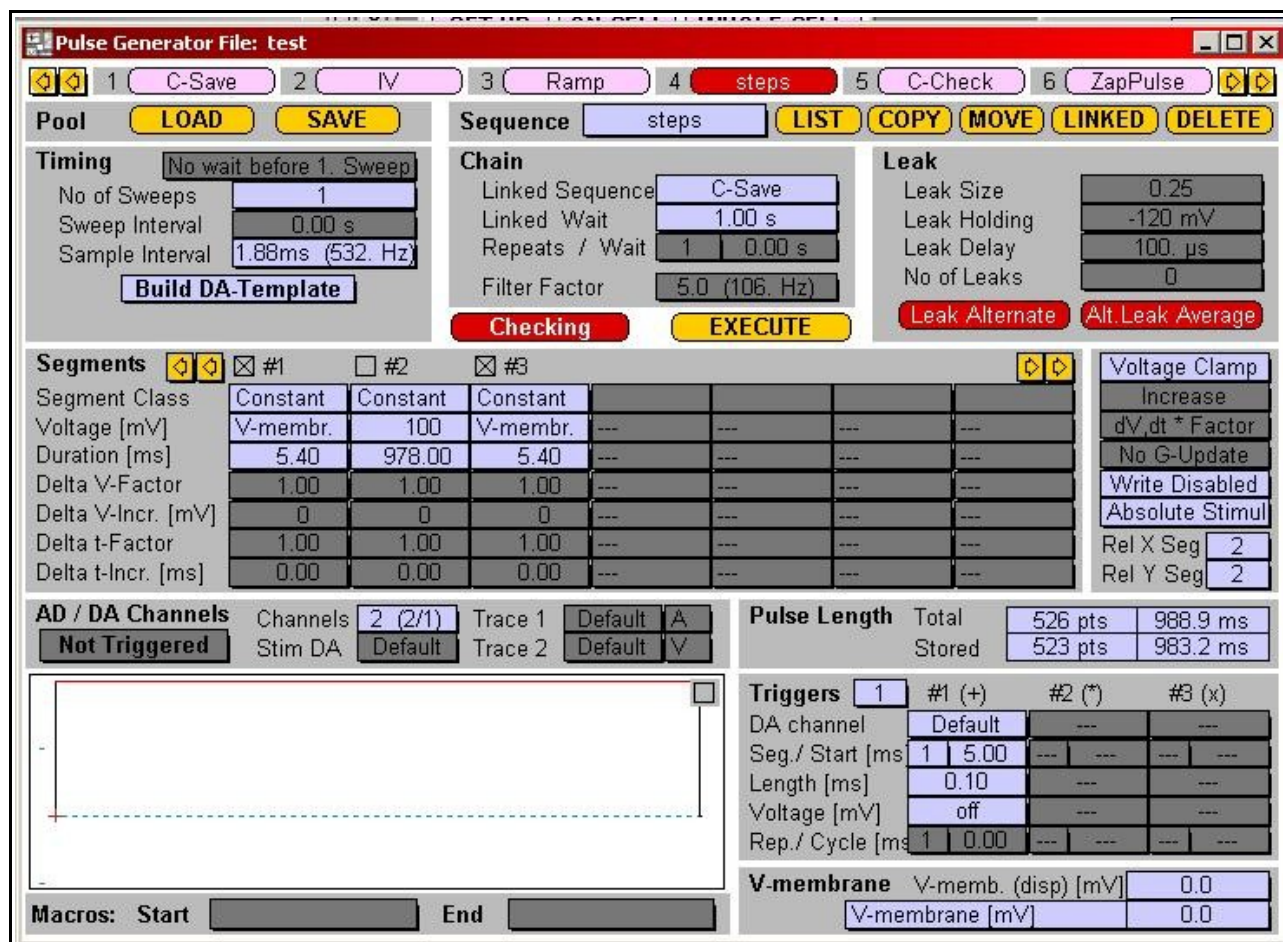


Abbildung 21: "Steps"-PGF

Das „Zappuls“-PGF:

Der Zappuls ist ein kurzes Protokoll, das die Spannung der Arbeitselektrode für 5 ms auf 1 V Spannung setzt. Der Zappuls diente als Nachweis für planare Lipidmembranen. Diese platzen bei 1 V Spannung. Wenn nach dem Zappuls die Leitfähigkeit des reinen Lochs nicht auf dem Oszilloskop zu sehen war, lag vor der Anwendung des Zappulses keine BLM vor. Dies kann durch dicke Lipidblasen vorkommen, die das Loch blockieren.

Das PGF bestand aus einem Sweep mit einem Sample-Interval von 50 μ s (20 kHz). Das erste Segment hielt für 5 ms die Spannung auf 0 mV. Darauf folgte ein weiteres konstantes Segment mit 5 ms und 1000 mV, welches durch ein abschließendes Segment mit 5 ms bei 0 mV beendet wurde. Die Speicherung der Daten war eingeschaltet. Der Trigger startete nach 2 ms im ersten Segment.

5 Methoden

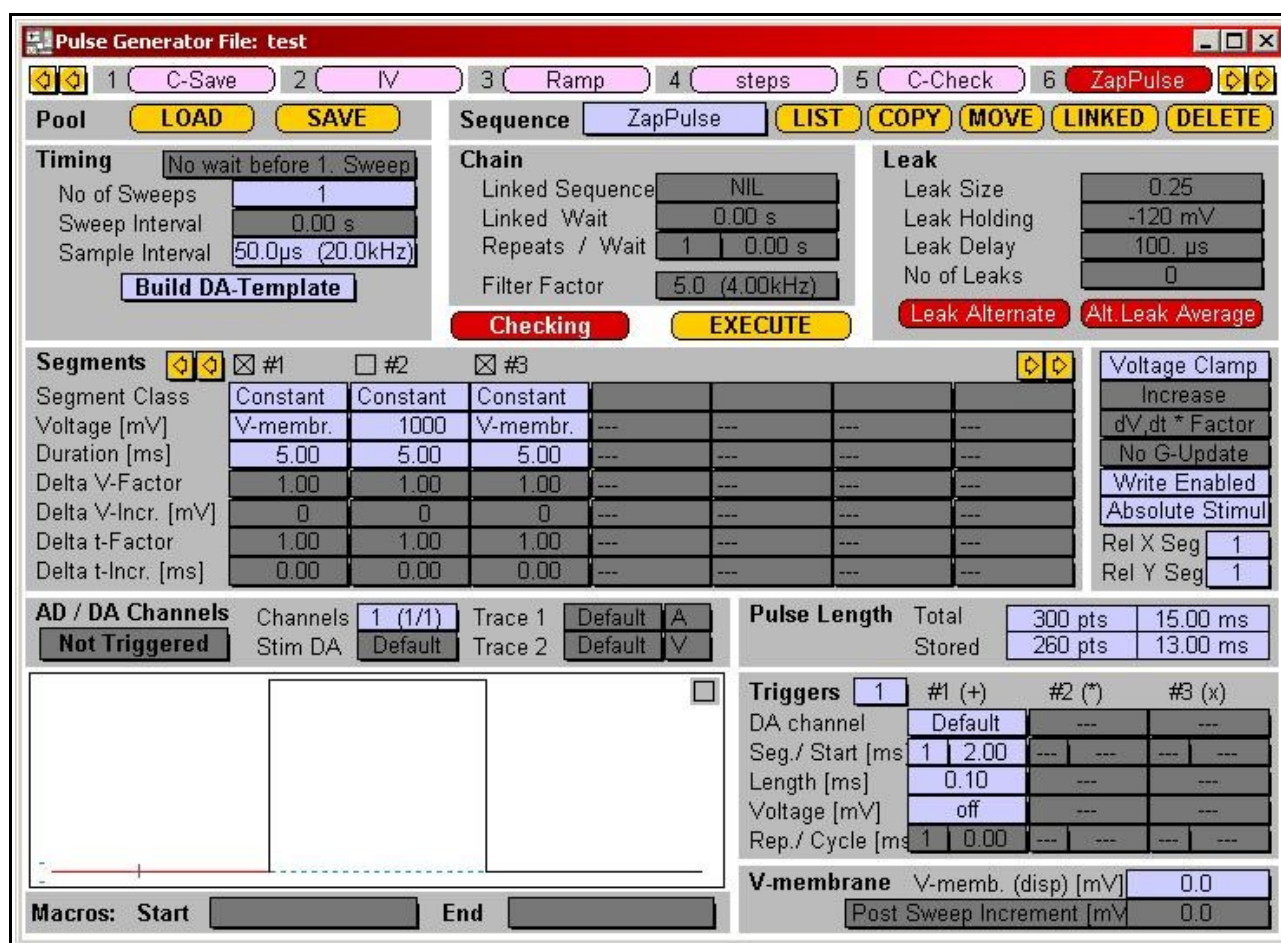


Abbildung 22: "Zappuls"-PGF

5.7 Das BLM-Experiment

Für ein BLM-Experiment wurde die BLM-Küvette, wie unter Kapitel 5.5 „Zusammenbau der BLM-Küvette“ beschrieben, montiert. Anschließend wurden die beiden Küvettenkammern je zweimal mit Aceton, zweimal mit Ethanol und abschließend gründlich unter fließendem bidest.-Wasser gespült. Danach wurde die Küvette unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Küvette wurde im Gegenlicht einer kleinen Lampe (innerer Faradaykäfig) so gedreht, dass das Loch in der PTFE-Folie gut zu erkennen war. Mit einer Hamiltonspritze wurden danach 1,5 µL einer 1%igen Hexadecan in Pentan-Lösung direkt auf das Loch pipettiert. Nachdem das Pentan (ca. 5 min) verdampft war, wurde die Küvette gewendet, so dass nun auf der anderen Seite der PTFE-Folie das Loch mit 1,5 µL einer 1%igen Hexadecan in Pentan-Lösung behandelt werden konnte. Nachdem das Pentan wiederum vollständig ver-

5 Methoden

dampft war, wurde die Küvette in die Halterung gestellt und jede Kammer der Küvette mit 2,5 mL einer 0,1 M KCl-Lösung befüllt. Im Anschluss daran wurde über einen Testpuls (3 mV, 5 ms) bei einem Gain von 0,005 mV/pA beobachtet, ob im Oszilloskopfenster des Verstärkers eine Stromantwort auf den Testpuls erfolgte. War ein Stromsignal zu erkennen, konnte der Versuch fortgesetzt werden. Ohne Stromsignal auf den Testpuls musste das Loch blockiert sein. Mit Hilfe einer 1 mL Eppendorfpipette wurde zur Befreiung des Lochs etwas KCl-Lösung aus einer der Kammern aufgezogen und mit etwas Druck gegen das Loch gespritzt. Nach dieser Behandlung konnte durch die Stromantwort auf dem Oszilloskop die Reinigung des Loches festgestellt werden. In seltenen Fällen konnte das Loch nicht gereinigt werden, so dass die Küvette, wie oben beschrieben, mit Aceton, Ethanol und bidest.-Wasser nochmals gereinigt und neu mit Hexadecan-Lösung behandelt werden musste.

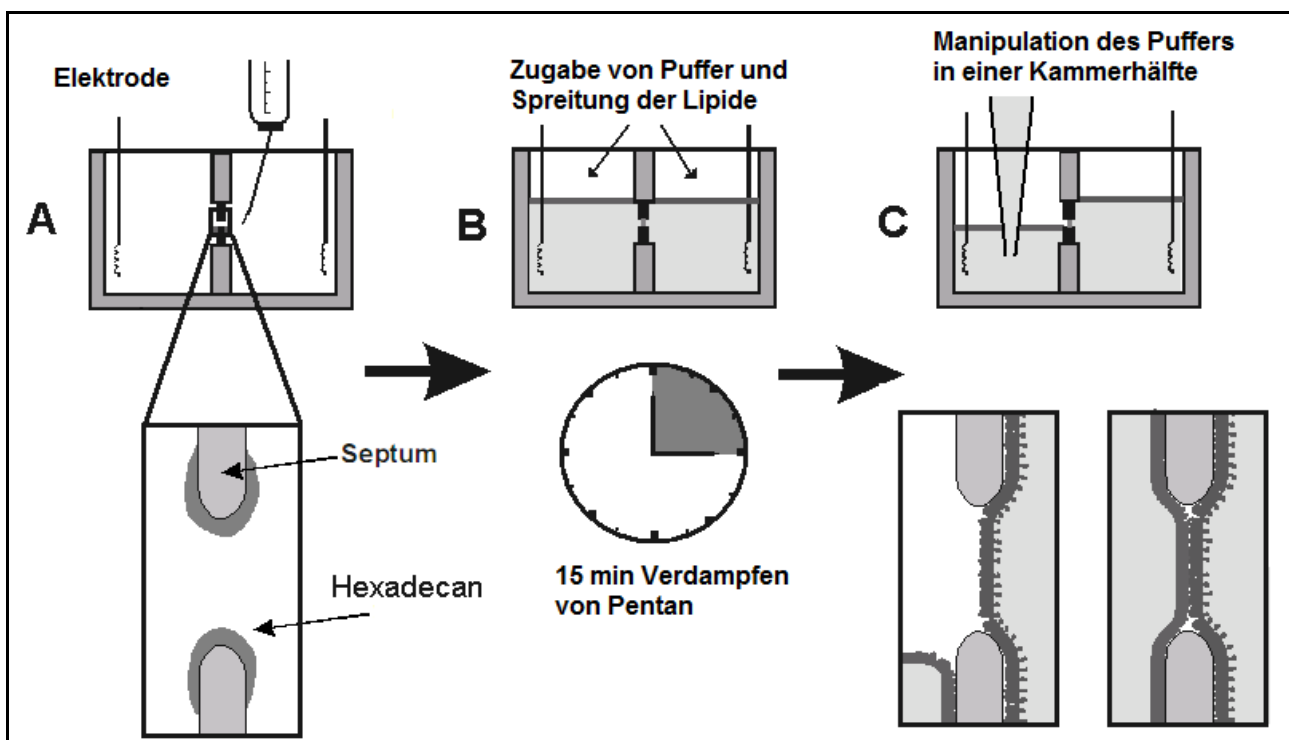


Abbildung 23: Schema zur Bildung von BLMs: A = Auftragen von Hexadecan auf das Loch; B = Füllen der Kammern mit Puffer und Spreitung der Lipide; C = Nach 15 min beginnt die Präparation einer BLM

Bei durchlässigem Loch wurde der Testpuls beendet und durch die „Auto“-Funktion die „Liquid Junction“-Korrektur der Elektroden durchgeführt. Die „Liquid-Junction“-Korrektur setzt durch eine Potentialkorrektur beide Elektroden auf das gleiche Potential (= 0 mV).

5 Methoden

Direkt im Anschluss daran wurden je 2,5 μL einer 5 mg/mL DPhyPC in Pentan-Lösung auf die Flüssigkeitsoberfläche der beiden Kammern der Küvette aufgetragen. Nach einer 15-minütigen Evaporationsphase des Pentans konnte das Generieren einer BLM beginnen (Abb.23). Das Lipid DPhyPC wurde für die BLM-Experimente aufgrund seiner Stabilität und pH-Toleranz ausgewählt [31].

Zur Präparation der BLM wurde die „Store“-Funktion deaktiviert und das PGF-Protokoll „C-Check“ gestartet. Mit einer 1 mL Pipette wurde der Flüssigkeitsspiegel einer Küvettenkammer bis unterhalb der Höhe des Lochs abgesenkt. Das Oszilloskop zeigte nun als Stromantwort auf das Sägezahnmuster der Kapazitätsmessung einen etwas kleineren rechteckigen Verlauf, parallel zur Zeitachse, was durch die Kapazität der PTFE-Folie hervorgerufen wird. Die Flüssigkeit wurde nun langsam aus der Pipette zurück in die Küvette gedrückt und das Stromsignal am Oszilloskop verfolgt. Das typische rechteckige Stromsignal im Oszilloskopfenster deutete an, dass eine BLM gebildet wurde. Gleichzeitig listete die Online-Analyse die Kapazitätsmesswerte auf. Bei Werten von 150-160 pF war eine BLM erzeugt worden. Im Anschluss an die Formierung der BLM wurde die Qualität der BLM überprüft.

Dieser Qualitätstest startete durch das Drücken des „Break“-Knopfes im Oszilloskopfenster, was das „C-Check“-PGF-Protokoll beendete. Anschließend wurde das „C-Check“-Protokoll neu gestartet und ca. 300-400 Kapazitätswerte aufgenommen, bevor das „C-Check“-Protokoll erneut beendet wurde. Die Kapazitätswerte wurden nun im Online-Analyse-Fenster gegen die Zeit aufgetragen. Anhand des Verlaufs der Kapazitäten wurde eine Qualitätseinstufung der Lipidmembran vorgenommen. Es wurden nur solche Membranen akzeptiert, deren Kapazitätswerte einen stabilen d. h. linearen Verlauf über die Zeit (300-400 Messpunkte) aufwiesen. Weiterhin wurden die Membranen erst 10 s lang auf 100 mV und danach weitere 10 s lang auf 200 mV Spannung gesetzt, um ihre Stabilität zu testen. Abschließend wurden weitere 300-400 Kapazitätswerte aufgenommen und die BLM-Stabilität über die Zeit ein zweites Mal bewertet.

Hatte eine Lipidmembran den Testansprüchen genügt, wurde der „Store“-Knopf aktiviert und mit dem Start des „C-Save“-Makros mit der Aufnahme von 10 Kapazitätsmesspunkten und einer Leitfähigkeitsmessung alle 5 min begonnen, die für die spätere Kinetik als Messpunkt dienen. Der Qualitätstest beruht auf Erfahrungswerten im Umgang mit planaren

5 Methoden

Lipidmembranen und wurde als Kriterium zur Stabilität einer BLM herangezogen. Dennoch platzten einige BLMs während der Messung, obwohl sie den Qualitätstest bestanden hatten.

Für alle Experimente wurde als „Baseline“ die Kapazität der PTFE-Folie bestimmt, da diese einen eigenen Kapazitätswert aufgrund ihrer geringen Dicke von 25 µm besitzt. Die gemessene Gesamtkapazität (C_G) setzt sich somit aus der Kapazität der BLM (C_{BLM}) und der Kapazität der PTFE-Folie (C_{PTFE}) nach der Gleichung: $C_G = C_{BLM} + C_{PTFE}$ zusammen.

Der Kapazitätswert C_{PTFE} musste von jedem Kapazitätswert der Kinetikdaten C_G abgezogen werden, um den realen C_{BLM} -Wert zu bestimmen. Bei einer Füllung von 2,5 mL mit 0,1 M KCl-Lösung hat die BLM-Küvette eine Kapazität von 79 pF. Experimentell wurde dieser Wert durch eine PTFE-Folie ohne Loch, welche in die BLM-Küvette eingespannt wurde, durch das „C-Check“-PGF ermittelt. Unter der Annahme, dass die PTFE-Folie mit der umgebenden ionischen Flüssigkeit einen Plattenkondensator bildet, ist der Kapazitätswert der PTFE-Folie nach der Gleichung $C = \epsilon_0 * \epsilon * A/d$ direkt von der Fläche abhängig. Die Fläche wiederum korreliert mit der Füllhöhe der BLM-Küvette. Somit variiert der Kapazitätswert der PTFE-Folie mit dem Volumen an ionischer Flüssigkeit in beiden Kammern der BLM-Küvette. Berechnet man mit der Kondensatorgleichung den Kapazitätswert der PTFE-Folie, erhält man einen Wert von 103 pF. Der Unterschied zwischen errechnetem und gemessenem Kapazitätswert lässt sich damit begründen, dass die Kondensatorgleichung nur eine Näherung zur Beschreibung der Kapazität der PTFE-Folie darstellt.

5.8 Zugabe des Ionencarriers

Konnte eine geeignete BLM erzeugt werden, wurde zum Start der Kinetik der Ionencarrier in die Kammerhälfte der Erdungselektrode der BLM-Küvette hinzu gegeben. In dem 2,5 mL Volumen einer Kammer sollte immer eine Endkonzentration von 2,24 nmol/L an Ionencarriermolekülen erreicht werden. Hierzu wurde für die Kontrollexperimente 2,5 µL reines Ethanol zugegeben. Für die Experimente mit Ionencarrier wurden immer 2,5 µL der 1 mg/mL Lösung an Valinomycin (Molekulargewicht: 1111,32 g/mol) oder 3,15 µL der 1 mg/mL Biotin-Valinomycin (Molekulargewicht: 1405 g/mol) Lösung zugegeben. Die

5 Methoden

Konzentration an Valinomycin betrug in der BLM-Küvette 1 µg/mL.

5.9 Automatisierter Export der Messdaten (ASCII-Files)

Nach der Beendigung einer Kinetik mussten die gewonnen Messdaten als ASCII-Daten exportiert werden. Dies kann manuell durch Export der einzelnen Dateien im Datenbaum der Pulsesoftware erfolgen. Der manuelle Datenexport ist allerdings bei 600-900 Dateien sehr zeitaufwendig und wenig anspruchsvoll. Durch die Software Pulse lässt sich dieser Prozess nicht automatisieren.

Durch die Idee des Praktikanten Martin Textor konnte ein Programm für den automatisierten Datenexport gefunden werden. Das Programm Autolt (www.autoitscript.com, Stand 8.3.09) ist ein Freeware-Tool zur Programmierung von Scriptprogrammen. Diese Scriptprogramme ermöglichen eine automatisierte Bedienung der Windows-Benutzeroberfläche, indem sie Tastaturbefehle, Mausbewegungen oder auch Manipulationen von Windows-Fenstern simulieren. Die Programmiersprache ist Basic, die Syntax durch eine übersichtliche Online-Dokumentation eingängig. Die geschriebenen Scripte lassen sich durch Konvertierung in eine exe-Datei direkt ausführen. Durch ein von Martin Textor geschriebenes Script (Vgl. Anhang A) können in wenigen Minuten beliebig viele Messdaten in ASCII-Files automatisch exportiert werden, welche wiederum in Excel oder jedem anderen Datenverarbeitungsprogramm analysiert werden können.

Nach dem Start des Scriptes über die „blm_data_expot.au3“-Verknüpfung erfragt das Programm die Anzahl der zu exportierenden Sweeps. Nach der Eingabe erfolgt in der nächsten Dialogbox die Abfrage, mit welchem Sweep der Export begonnen werden soll. Danach beginnt ein fünfsekündiger Countdown, bevor das Programm mit dem Export der Daten beginnt. Für den Abbruch des Programms wurde die „Escape“-Taste festgelegt. Die Daten werden nun in das in Pulse festgelegte Zielverzeichnis exportiert. Am Ende zeigt das Nachrichtenfenster „BLM Data Export - Done!“ die erfolgreiche Speicherung der ASCII-Daten an. Die ASCII-Daten sind aufsteigend durchnummeriert, was zur späteren Analyse mit Excel-VBA-Makros notwendig ist.

5.10 Analyse der Messdaten in Excel

Für die Analyse der Messdaten wurden sowohl für die Kapazitätswerte als auch für die Leitfähigkeitswerte je zwei Makros in „Visual Basic for Applications“ geschrieben. „Visual Basic for Applications“ (VBA) ist eine Basic basierende Scriptsprache die in Excel implementiert ist. Durch VBA lassen sich häufig wiederkehrende Befehle und Funktionen in Excel Datenbanken routinemäßig durch den Computer ausführen. Für diese Arbeit mussten die zuvor exportierten Dateien in Excel wieder importiert und anschließend analysiert werden. Da für jede der 600-900 Dateien einer Kinetikmessung dieser Prozess wiederholt werden musste, war die zeitnahe Auswertung der Daten nur durch programmierte Makros zu bewältigen. Alle zur Datenanalyse erstellten Makros sind auf die Verwendung auf den PC-Systemen des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung und auf die spezielle Analyse der Daten des HEKA EPC10 Verstärkers ausgelegt und optimiert. Somit ist die Übertragbarkeit ohne VBA-Kenntnisse auf andere Rechnersysteme bzw. Excelversionen mit dem Programmcode nicht möglich. Der Programmcode der Makros ist minimal kommentiert und entspricht nicht den gängigen Standards zur Kommentierung von Programmen. Des Weiteren ist die Nomenklatur der Variablen alphabetisch nach ihrer Verwendung im jeweiligen Makro erfolgt und ist nicht, wie allgemein üblich, nach der Eigenschaft der Variablen benannt. Der VBA-Code der einzelnen Makros ist im Anhang dieser Arbeit angefügt (Anhang B).

Die ASCII-Dateien einer ganzen Kinetikmessung sind durch das Exportmakro fortlaufend nummeriert. Die erste ASCII-Datei wird dabei mit der Nummer 1 versehen. Die Datenstruktur der ASCII-Dateien ist wie folgt angelegt: ASCII-Datei Nummer 1 enthält eine Kapazitätsmessung (*C-Save*). ASCII-Datei Nummer 2 enthält eine Leitfähigkeitsmessung (*IV-Ramp*) und ASCII-Datei Nummer 3 enthält eine zusätzliche Messung (*Ramp*), damit der Benutzer im Verlauf der Kinetik den Einbau des Ionencarriers im Oszilloskopfenster durch eine Rampe verfolgen kann. Diese Datei wird aber nicht ausgewertet. Ab Dateinummer 4 wiederholt sich diese Abfolge. Somit liefern immer drei aufeinander folgende ASCII-Dateien die Werte für einen Datenpunkt in der Kapazitäts- bzw. Leitfähigkeitskinetik. Diese Datenstruktur zu kennen, ist notwendig, um die Funktionsweise der nachfolgenden Makros verstehen zu können.

5 Methoden

5.10.1 Makros für die Kapazitätsmessungen

Beschreibung der Funktion:

Bei der Kapazitätsmessung müssen jeweils zehn mal 2459 Datenpunkte über je 0,1229 s pro ASCII-Datei ausgewertet werden. Die Daten liegen getrennt durch Kopfzeilen in zwei Spalten der ASCII-Datei vor. Zuerst lädt das Makro die ASCII-Datei ein und sortiert die zehn Datenreihen zur Übersicht nebeneinander in Spalten. Aus den zehn Spalten wird in einer elften Spalte der Mittelwert der Messpunkte gebildet. Dies hat den Vorteil, dass dadurch periodisch auftretende Störsignale (z. B. 50 Hz Rauschen) herausgemittelt werden. Aus den gebildeten Mittelwerten wird nun die Kapazität errechnet. Dies wird durch Selektion zweier Bereiche des Kapazitätssignals erreicht. Zuerst wird aus dem typischen rechteckigen Messsignal ein Zeitintervall, welches das Minimum (0,04935-0,0781 s) beschreibt, herausgenommen. Über dieses Zeitintervall wird nun der Mittelwert der Messpunkte gebildet. Ebenso wird ein Zeitintervall mit dem Maximum (0,01945-0,04815 s) des Messsignals gemittelt. Aus der Addition der beiden Kapazitätsmittelwerte dividiert durch zwei errechnet sich die eigentliche Kapazität. Abschließend wird der Kapazitätswert nur auf die Einheit $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ umgerechnet. Die Normierung bezieht sich auf die Fläche des Lochs, über das die BLM gespannt wurde (hier: 110 μm). Dieser Prozess wurde für jeden Kapazitätsdatei wiederholt und die Werte von 42 Dateien mit Kapazitätswerten in einem zusammenfassenden Tabellenblatt pro Arbeitsblatt („Mean C-Save“) aufgelistet. Aufgrund der Menge der Datenpunkte ist die Anzahl an Dateien mit Kapazitätswerten pro Excelarbeitsblatt (=Mappe) auf 42 beschränkt. Zur Auswertung einer ganzen Kapazitätskinetik werden somit mehrere Excelarbeitsblätter benötigt. Das Makro regelt die Anlage und die Speicherung der Arbeitsblätter. Nach der Auswertung aller Dateien bricht das Makro automatisch ab („Laufzeitfehler 1004“, d. h. es sind keine weiteren Daten zum Einlesen vorhanden). Damit auch das letzte erstellte Arbeitsblatt noch ausgewertet wird, muss ein zweites Makro (C-Save Auswertung Mean) benutzt werden.

Im Anschluss daran müssen alle Kapazitätswerte in eine Exceltabelle eingeordnet werden. Dazu muss in einem Tabellenblatt eine Spalte für die Zeit und eine Spalte für die Kapazitätswerte angelegt werden. Die Zeitwerte ergeben sich aus der Intervalldauer der einzelnen Messungen der Kinetik, wobei die Zeit zwischen zwei Kinetikmessungen immer genau 0,084 h ist.

5 Methoden

Die Kapazitätswerte müssen aus den jeweiligen Arbeitsblättern in die entsprechende Spalte kopiert werden. Letztendlich kann dann aus der Zeitspalte und der Spalte mit den Kapazitätswerten ein X-Y-Diagramm erstellt werden, was die Datenauswertung abschließt.

Beispiel zur Funktion des Makros „C_Save_Auswertung“ und „C_Save_Auswertung_Mean“:

Nach einer Kinetikmessung liegen 600 Dateien vor. Die Dateien sind nummeriert von 1-600 und müssen unter der Ordnerstruktur „D:\Messdaten HEKA EPC10\ThomasEXDATA\“ zum Einlesen durch das Makro abgelegt werden. Jede dritte Datei beinhaltet Kapazitätswerte. Das Makro hat den Speicherort der Dateien bereits in seinem Code enthalten. Soll der Einleseort der Dateien verändert werden, muss dies im Code des Makros angepasst werden.

In einer geöffneten Exceltabelle wird nun im Reiter „Extras“ die Option „Makro“ ausgewählt und im auftauchenden Drop-Down-Menü die Option „Makros...“ und dort das Makro „Personal.XLS!C_Save_Auswertung“ ausgewählt. Durch das Drücken des „Ausführen“-Knopfes ist das Makro aktiv. Ein neu geöffnetes Fenster erfragt nun den Speicherort der Dateien, d. h. den Namen des Ordners, in dem die Dateien abgelegt sind. Anschließend erfragt das Programm den gewünschten Speichernamen, unter dem die ausgewerteten Daten abgelegt werden. Hier kann jeder beliebige Name eingegeben werden. Im letzten Fenster werden die Anzahl der Sweeps benötigt. Hier muss man die Zahl der höchsten Datei eingeben, die noch Kapazitätswerte enthält. Dies sei in diesem Beispiel Datei „598“. Nach der Eingabe dieses Wertes erfolgt die Bestätigung durch den „Ok“-Knopf. Das Makro startet danach den Einlese- und Auswertevorgang der Dateien. Solange das Makro läuft, kann keine andere Operation auf dem PC ausgeführt werden. Nach 42 eingelesenen Dateien mit Kapazitätswerten teilt das Programm dem Benutzer mit, ob die eingelesenen Dateien ausgewertet werden sollen. Auf „Ja“ bestätigt man die Auswertung, „Nein“ bricht den Einlesevorgang ab. Nach der Auswertung der Daten gibt ein neues Fenster die Information an den Benutzer aus, dass die Datenmenge zu groß für ein Datenblatt ist und ein neues Datenblatt erstellt werden muss. Der „Ok“-Button führt zu einem Eingabefenster in dem der Dateinamen für das neue Datenblatt eingegeben wird. Nach der Eingabe wird das alte Datenblatt geschlossen und gespeichert. Der Datenaufnahmevergung wird in einem neuen Datenblatt fortgeführt.

5 Methoden

Dieser Prozess endet, sobald keine Dateien mehr zum Einlesen zur Verfügung stehen. Dies wird durch die Fehlermeldung „Laufzeitfehler 1004“ signalisiert. Nach dem Beenden der Fehlermeldung wird, wie bereits beschrieben, ein zweites Makro mit dem Namen „C_Save_Auswertung_Mean“ aufgerufen. Dieses Makro analysiert die Daten des letzten Arbeitsblattes, das vor der Fehlermeldung erstellt wurde. Damit das Makro korrekt arbeitet, muss das letzte Datenblatt geöffnet bleiben. Durch das Ausführen dieses Makros erfolgt die Frage nach dem kleinsten und dem größten Sweep der auszuwertenden Arbeitsmappe.

Diese Zahlen sind die Zahlen im Namen des ersten (hier: CSave 1-505) bzw. letzten (CSave 1-601) erstellten Tabellenblattes. Es müssten somit die Zahlen 505 für den kleinsten und 601 für den größten Sweep eingegeben werden. Das Makro beendet sich nach der Datenanalyse selbstständig. Aus den einzelnen, abgespeicherten Arbeitsblättern müssen nun, wie bereits beschrieben, die Kapazitätswerte in ein Tabellenblatt manuell einkopiert werden. Dazu befinden sich die errechneten Kapazitätswerte auf dem letzten Tabellenblatt „Mean C-Save“ in der Spalte „Capacity ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)“ in jedem Excelarbeitsblatt aufgelistet. Alle ausgewerteten Arbeitsblätter sind in einem durch den Programmcode festgelegten Ordnerstruktur „D:\Messdaten HEKA EPC10\Ausgewertete Daten\“ gespeichert und können von dort geladen werden.

5.10.2 Makros für die Leitfähigkeitsmessungen

Beschreibung der Funktion:

Zur Bestimmung der Leitfähigkeit der Ionencarriermoleküle müssen die ASCII-Dateien der *IV-Ramp* durch das Makro „IV_Ramp_Auswertung“ ausgewertet werden. Hierzu werden je 13 Sweeps (Sweep = Messwertreihe), die jeweils durch Kopfzeilen getrennt sind, in der ASCII-Datei in ein Exceltabellenblatt eines Arbeitsblattes automatisch eingelesen. Für jeden Sweep werden 86 Messpunkte über je 0,034 s in 13 Spalten nebeneinander angeordnet. Von 0,0104 s bis 0,024 s wird nun der Mittelwert der Stromwerte für jeden der 13 Sweeps gebildet und der jeweiligen angelegten Spannung des Sweeps zugeordnet (-150 mV bis +150 mV). Die daraus resultierende I-U-Kennlinie wird für jede der 150 IV-Rampen pro Exceldatenblatt auf dem Tabellenblatt „Mean IV“ zusammengefasst.

5 Methoden

Zwischen den Spannungswerten -50 mV bis +50 mV zeigt die Kennlinie einen linearen Verlauf. Über diesen Bereich wird für jede Kennlinie separat die Steigung bestimmt, was über die Beziehung $G=I/U$ der Leitfähigkeit entspricht (Abb.24) [36]. Die Kennlinie einer planaren Lipidmembran ist abhängig von den verwendeten Lipiden. Die Änderung in der Steigung der Kennlinie beruht allerdings auf der Inkooperation des Ionencarriers und des damit verbundenen Anstiegs der Leitfähigkeit (Abb.25).

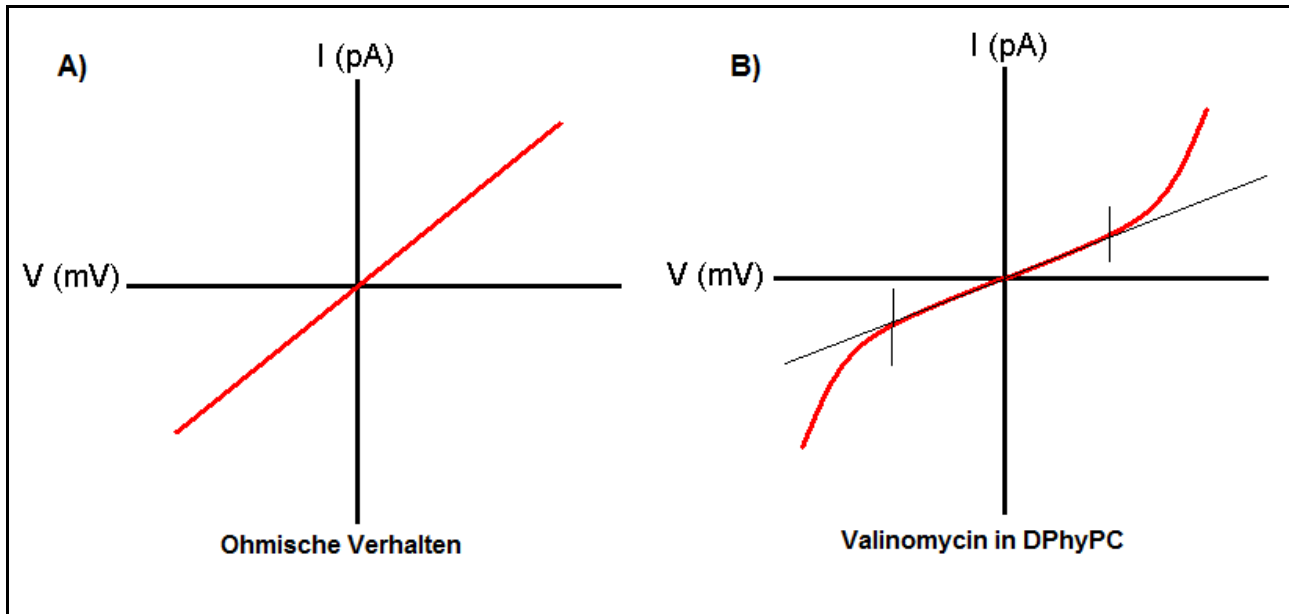


Abbildung 24: Strom-Spannungskennlinie; A = Ohmische Verhalten; B = Valinomycin in DPhyPC (senkrechte Linien markieren den linearen Bereich der I-U-Kennlinie)

Die Leitfähigkeit muss auf die Fläche des Lochs im PTFE-Film normiert und in die Einheit $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ umgerechnet werden. Die Leitfähigkeitsdaten aller ASCII-Dateien sind analog zu den Kapazitätswerten über mehrere Excelarbeitsblätter verteilt und müssen final in einem einzigen Tabellenblatt zusammengebracht werden. Werden die Leitfähigkeitswerte gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich eine Kinetik.

5 Methoden

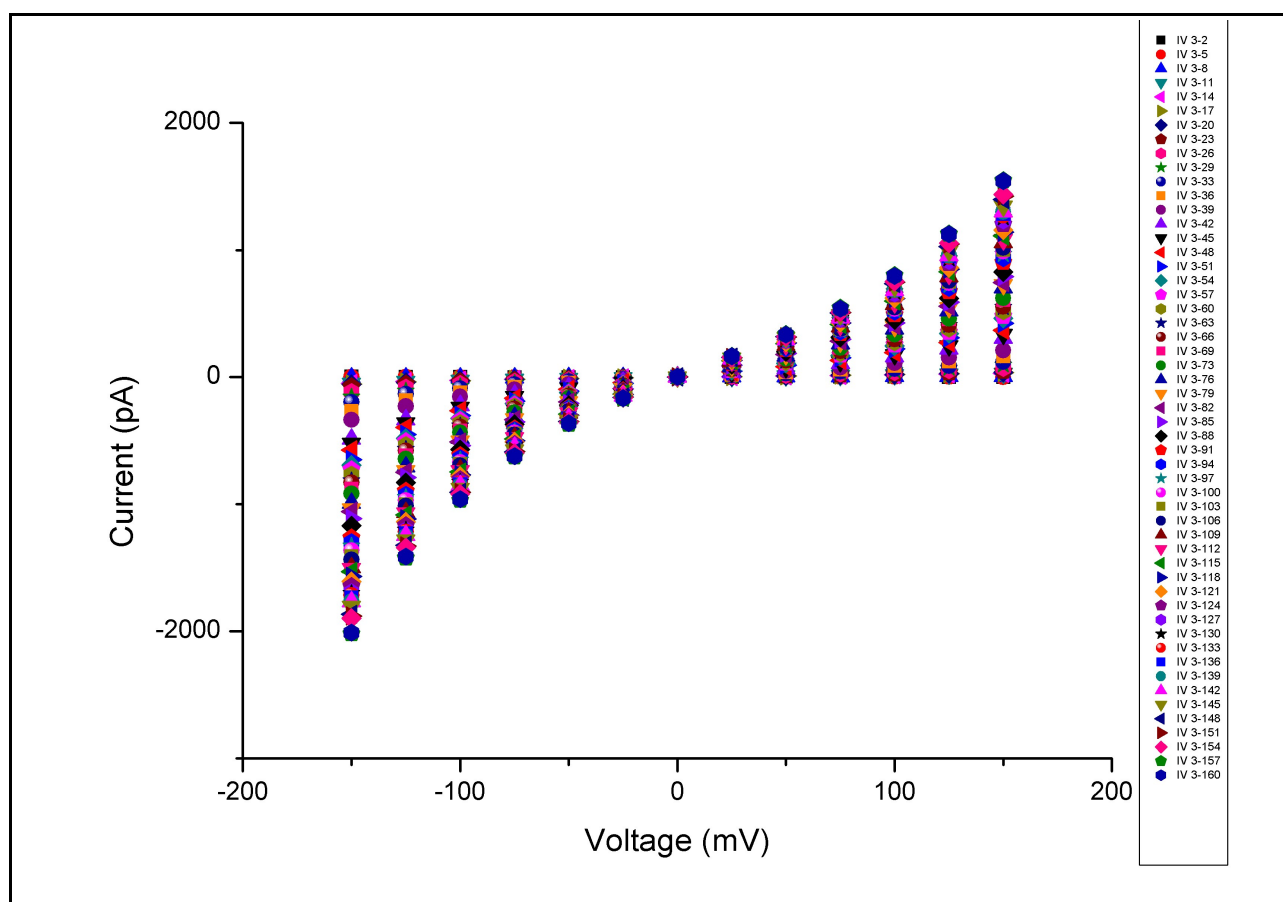


Abbildung 25: Veränderung der IV-Rampen nach der Zugabe von Valinomycin

Beispiel zur Funktion des Makros „IV_Ramp_Auswertung“ und „IV_Ramp_Auswertung_Mean“:

Wie im obigen Beispiel der Kapazitätsmessung festgelegt, beträgt die Anzahl der gesamten Dateien einer Kinetik 600. Die ersten Daten der Leitfähigkeit sind in Datei Nummer 2 enthalten. Von Datei 2 an ist in jeder dritten Datei eine weitere Leitfähigkeitsmessung gespeichert. Analog zum Kapazitätsmakro wird das Leitfähigkeitsmakro „Personal.XLS! IV_Ramp_Auswertung“ aufgerufen, wobei zuerst der Speicherort (nur der Ordner), der neue Dateiname und die Zahl der Sweeps angegeben werden müssen. Die Anzahl der Sweeps, welche in der zweiten Dialogbox erfragt werden, beträgt in diesem Fall 599 (Datei, die die letzten Leitfähigkeitswerte der Kinetik enthält). Danach beginnt die automatische Analyse der Leitfähigkeitsdaten. Nach 50 eingelesenen Leitfähigkeitsdateien ist das Arbeitsblatt maximal befüllt. Das Programm teilt dies über eine Dialogbox mit und gibt die Option an ein neues Arbeitsblatt zu öffnen, in das die weiteren ASCII-Dateien eingelesen werden können. Hierzu muss ein neuer Name für das Arbeitsblatt

5 Methoden

eingegeben werden. Die Speicherung des alten Arbeitsblattes übernimmt das Makro automatisch. Stehen keine ASCII-Dateien mehr zum Einlesen zur Verfügung bricht das Programm mit dem „Laufzeitfehler 1004“ ab. Nach der Beendigung der Fehlermeldung muss wiederum analog wie bei der Kapazitätsdatenauswertung ein weiteres Makro das letzte Arbeitsblatt bearbeiten. Dieses Makro kann durch Auswahl von „IV_Ramp_Auswertung_Mean“ ausgeführt werden. In einem Dialog müssen wiederum die kleinsten und die größten Sweeps eingegeben werden. Im Beispiel sind dies als kleinster Wert 452 (Zahl von Tabellenblatt „IV 1-**452**“) und als größter Wert 602 (Zahl von Tabellenblatt „IV 1-**602**“). Das Makro „IV_Ramp_Auswertung_Mean“ beendet sich nach der Datenauswertung selbstständig. Die Leitfähigkeitsdaten müssen auf einem Tabellenblatt manuell zusammengetragen und gegen die Zeit aufgetragen werden, um die Auswertung abzuschließen. Alle ausgewerteten Arbeitsblätter befinden sich unter „D:\Messdaten HEKA EPC10\Ausgewertete Daten“ und können von dort geladen werden.

5.11 Der „high frequency generator“

Einleitung:

Die Schwierigkeit bei BLM-Experimenten besteht darin, dass Löcher in der Größe zwischen 50 und 100 μm Durchmesser mit möglichst kreisrunder Form und rundem Randbereich in eine Polytetrafluorethylene(PTFE)-Folie gebrannt werden müssen. Zu Beginn der BLM-Experimente nach der Methode von Montal und Mueller wurden noch Apparaturen mit Löchern eines Durchmessers von bis zu 1 cm [17] verwendet. Eine Verbesserung der Membranstabilität konnte damit erreicht werden, dass kleinere Lochdurchmesser für BLM-Experimente eingesetzt wurden. So konnten durch einen erhitzten Platindraht Löcher mit einem Durchmesser von 200-300 μm in eine 12,5 μm dicke PTFE-Folie gebrannt werden [16], wobei die Form der Löcher in den PTFE-Folien nicht immer einen kreisrunden Durchmesser aufweisen konnte. Die Qualität der Löcher für BLM-Versuche ist eng mit dem Durchmesser und der Beschaffenheit des Lochs verknüpft. Ausgehend von Literaturquellen [32,33] können Löcher mit einem Durchmesser zwischen 50 bis 100 μm mithilfe eines elektrischen Pulses in eine PTFE-Folie eingebrannt werden. Da die Methode einfach und leicht zu realisieren ist, wurde in dieser Arbeit eine Maschine

5 Methoden

entwickelt, welche es möglich macht, Löcher mit einem Durchmesser von 50 – 100 µm durch elektrische Pulse in 25 µm dicke PTFE- Folie zu schießen.

Der Geräteaufbau:

Das Gerät besteht aus einer Plexiglasbox (24 cm x 21 cm x 64 cm) mit einer durchgehenden Wandstärke von 1,95 cm (Abb.26). Die Plexiglasbox ist durch eine kleine Klappe zugänglich.

In dieser Plexiglasbox wurde ein kommerziell erhältlicher „high frequency generator“ (Electro-technic products) und eine bewegliche mechanische Einheit, welche den Abstand von der Spitze des Hochfrequenzgenerators und der PTFE-Folie kontrolliert, eingebaut. Der Generator befindet sich auf einer Achse mit der mechanischen Einheit. Das mechanische Element besteht aus einem Zahnrad der Größe Modul 1 und bewegt einen passenden Kolben. Auf dem Kolben ist ein Schlitten montiert, auf dessen Oberseite die PTFE-Folie in einer Halterung fixiert werden kann. Die Herausforderung bei der Konstruktion bestand darin, das Innere der Plexiglasbox frei von metallischen Elementen zu halten. Denn letztendlich soll im Inneren der Plexiglasbox ein Hochspannungsblitz von bis zu 50.000 V zwischen der Generatorspitze und einer nur wenigen Millimeter entfernten Gegenspitze erzeugt werden, der nicht durch metallische Bauteile abgelenkt werden darf. Dadurch sind alle Bauteile im Inneren der Plexiglasbox mit Ausnahme der Gegenspitze aus Delrin oder anderen Kunststoffen.

Durch eine elektrische Schaltung, die außen am Plexiglasgehäuse angebracht ist, wird die Zeitdauer des elektrischen Pulses, welcher vom Generator erzeugt wird, kontrolliert. Durch die hohen Spannungen des elektrischen Pulses muss die Schaltung besonders isoliert werden, um resistent gegen auftretende, induzierte Ströme des Hochspannungsblitzes zu sein. Mittels eines Kontaktelements wird die Sicherheit des Benutzers garantiert, damit der Generator nur bei geschlossener Plexiglasbox betrieben werden kann. Der Strom zum Betrieb des Gerätes wird über einen normalen EU-Stecker (230 V) bezogen.

5 Methoden

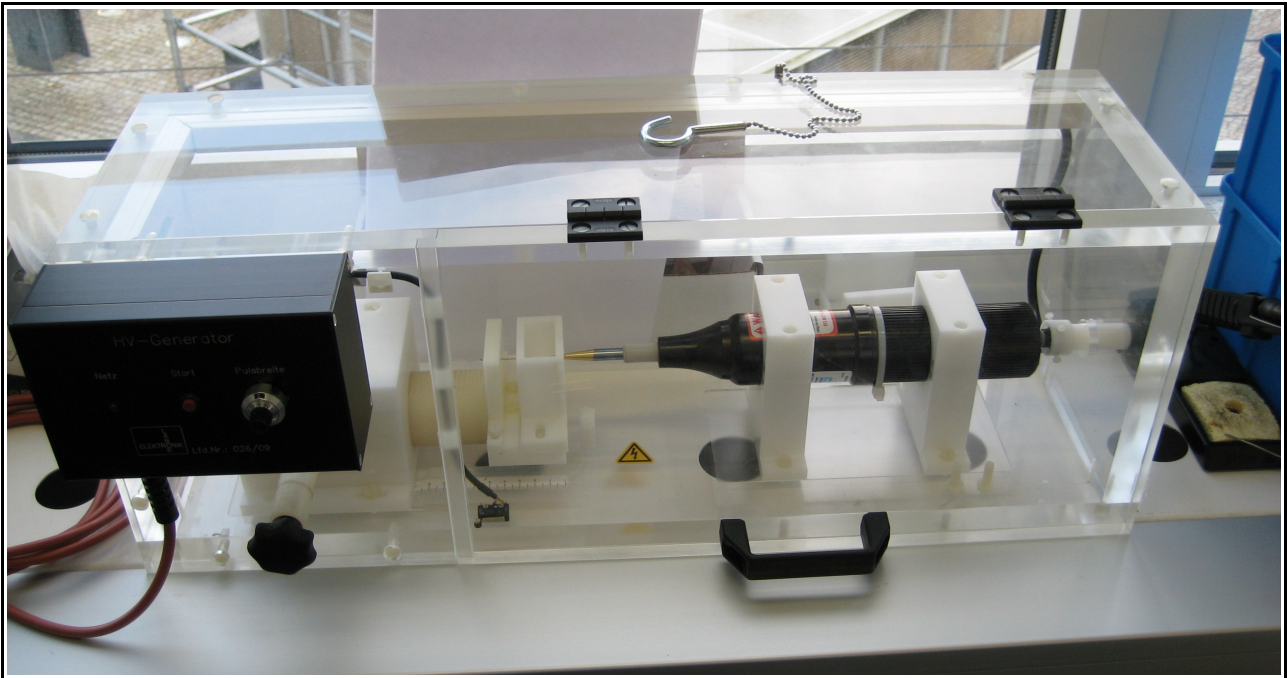


Abbildung 26: "high frequency generator"

Die Geräteparameter:

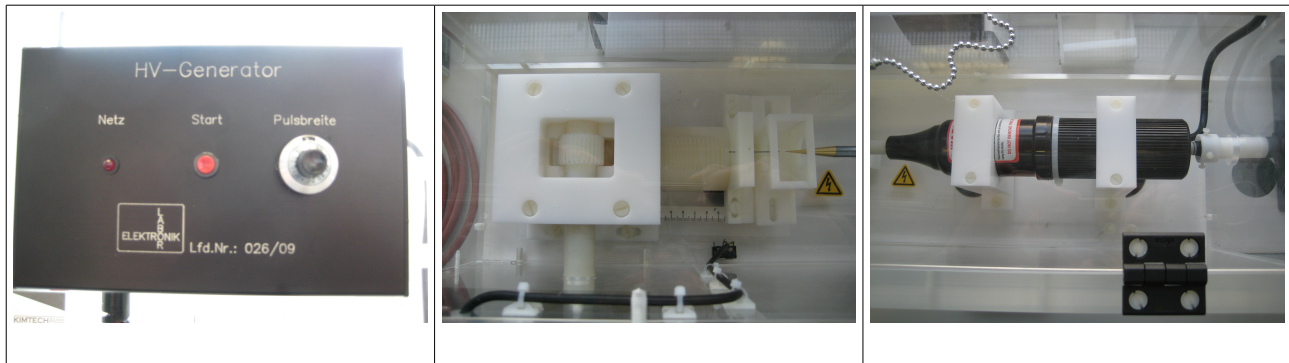
Die maximale Pulsdauer des Hochspannungsblitzes liegt bei 12 s. Durch eine Skala lässt sich die Pulsdauer in 30 Intervallen zwischen 0,4-12 s regulieren.

Mit Hilfe des mechanischen Elements lassen sich mehrere Zentimeter Abstand zwischen Generatorspitze und Gegenspitze bringen. Der Abstand der Spitzen zueinander wird anhand einer Skala auf dem Boden der Plexiglasbox gemessen. Hierfür wird die Position durch die Vorderkante des bewegliche Schlittens des mechanischen Elements gemessen und anhand der aufgebrachten Skala am Boden der Plexiglasbox abgelesen. Dabei bedeutet 0 cm Abstand auf der Skala, dass zwischen der Spitze des Generators und der Gegenspitze immer noch ein Abstand von 3 mm (je 1,5 mm Spitze zu Teflonfolie) besteht. Somit ist ein direktes Zusammentreffen der beiden Spitzen beim Verwenden der Skala auf der PTFE-Folie ausgeschlossen. Die einzelnen Teile des „high frequency generators“ sind in Tab.3 zu sehen.

5 Methoden

Tabelle 3: Parameter des "high frequency generators";

links = Konsole zur Einstellung der Pulsdauer; mitte = mechanisches Element mit Schlitten; rechts = „high frequency generator“ mit Spannungskontrolle



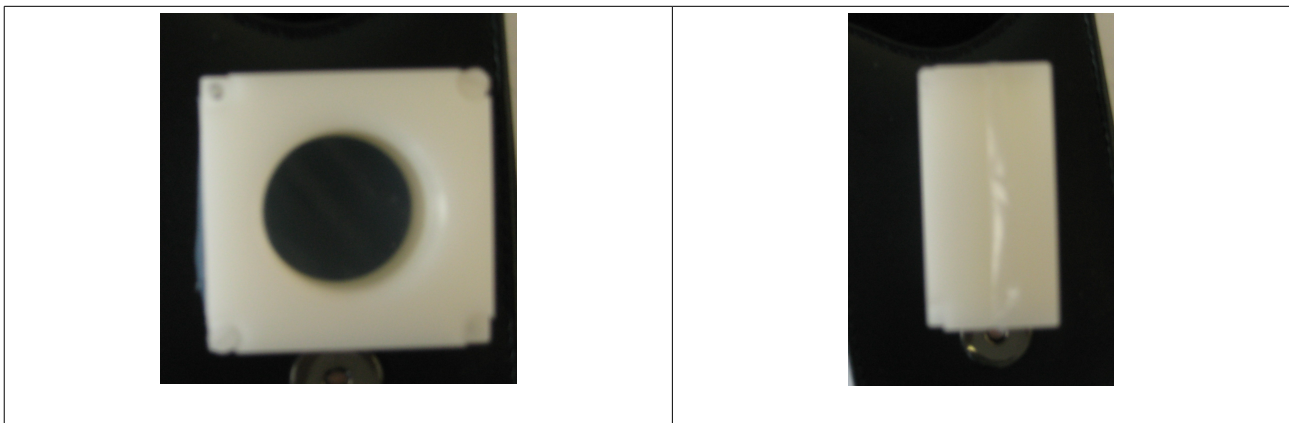
Des Weiteren ist die Spannung des Generators von außen zwischen 10.000-50.000 V regelbar, kann aber aufgrund einer fehlenden Skala nicht genau eingestellt werden.

Das Gerät wurde zusammen mit der feinmechanischen und elektrotechnischen Werkstatt des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung geplant und gebaut.

5.12 Erzeugung von μm -Löchern in PTFE-Folien:

Das Einbringen der PTFE-Folien in die Plexiglasbox erfolgte durch eine passende Halterung (4x4 cm). In diese Halterung wurden die ca. 4x4 cm großen PTFE-Folien-Stücke eingespannt und anschließend zwischen Generatorspitze und Gegenspitze fixiert (Tab.4).

Tabelle 4: PTFE-Folien Halterung; links = Seitenansicht; rechts = Aufsicht



5 Methoden

Beim Auftreffen des Hochspannungsblitzes mit 10 s Pulsdauer, bei 0 cm Abstand der Spitzen (bezogen auf die angebrachte Skala) und bei 50.000 V Spannung konnte die PTFE-Folie durchbrannt werden. Bei dieser Einstellung befanden sich die Enden der Generatorspitze und der Gegenspitze in einem Abstand von nur 3 mm. Die Nähe der beiden Spitzen verhinderte die Aufspaltung bzw. Auffächerung des elektrischen Blitzes, was normalerweise mehrere Löcher in der PTFE-Folie zurücklassen würde.

Die beschossenen PTFE-Folien wurden zur Bestimmung des Durchmessers mikroskopiert und mit Hilfe einer Mikroskopkamera fotografiert. Hierzu wurden die PTFE-Folien aus der Halterung genommen und auf einem normalen Objektglaträger mit kleinen Klebestreifen festgeklebt.

Die Durchmesser der Löcher in den PTFE-Folien wurden mit Hilfe von Referenzbildern (Fotografien von einem skalierten Objektträger) bestimmt. Auf diesem Objektglaträger sind parallele Linien in einem Abstand von 100 μm zu sehen. Anhand der Anzahl der Pixel, die den Abstand von 100 μm wiedergeben, wurde der Lochdurchmesser ausgerechnet. Die Referenzbilder wurden von Slavoj Kresak am MPIP Mainz aufgenommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Durchmesser in Pixeln wurde durch das frei erhältliche Programm Irfanview ermittelt.

6 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in zwei Teile. Im ersten Teil wird die Funktion des konstruierten „high frequency generators“ beschrieben und diskutiert. Dieses Gerät ist notwendig, um die Methode von Montal und Mueller zur Herstellung von planaren Lipidmembranen umzusetzen und ermöglicht zukünftige Experimente mit planaren Lipidmembranen. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der Kinetikmessungen von Valinomycin und Biotin-Valinomycin gezeigt. Diese verdeutlichen, dass ein funktionierendes System zur automatisierten Messung von Ionencarriern in planaren Lipidmembranen aufgebaut werden konnte. Die zur Auswertung der Daten geschriebenen Makros sind im Methodenteil beschrieben und im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

6.1 Funktion des „high frequency generator“

Der „high frequency generator“ wurde so konstruiert, dass mit drei verfügbaren Parametern (Abstand der Generatorspitze, Zeitdauer des elektrischen Pulses und Spannung des Generators) Löcher in der Größe von 50 – 100 μm in Teflonfolien gebrannt werden können. Zusätzlich sollte die freie Einstellung der Parameter dazu dienen, Löcher mit definierter Größe (z. B. 50 μm) gezielt in die PTFE-Folie zu brennen.

Dies musste nach der Fertigstellung des Gerätes validiert werden. Dazu wurden zuerst die Parametereinstellungen ermittelt, mit denen Löcher zufälliger Größe in die Teflonfolie eingebrannt werden konnten. Um Löcher in der PTFE-Folie zu generieren, war eine elektrische Pulsdauer von mindestens 10 s nötig. Des weiteren war ein geringer Abstand notwendig (<1 cm), um die Auffächerung des elektrischen Pulses zu verhindern. Die Aufspaltung des elektrischen Pulses führt zu mehreren Löchern in den PTFE-Folien, was für BLM-Experimente ungeeignet ist.

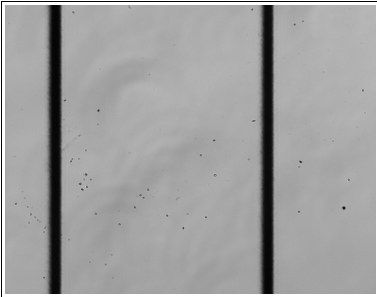
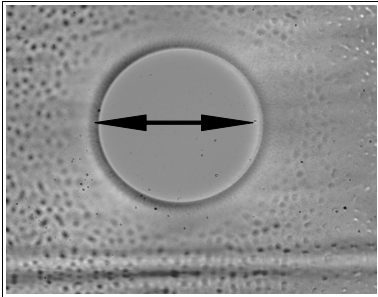
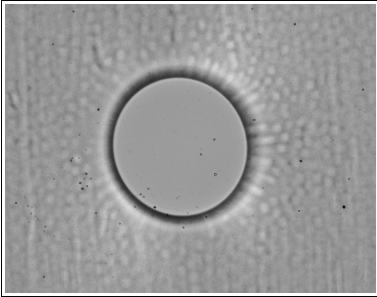
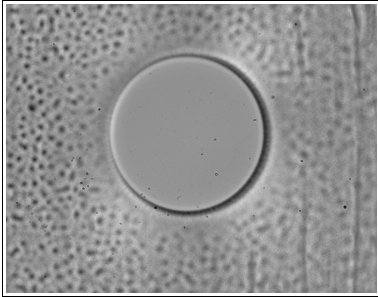
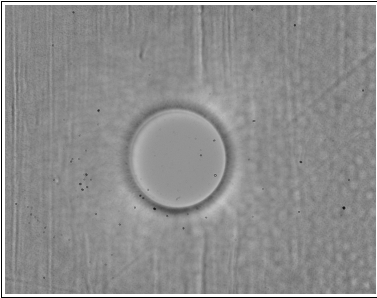
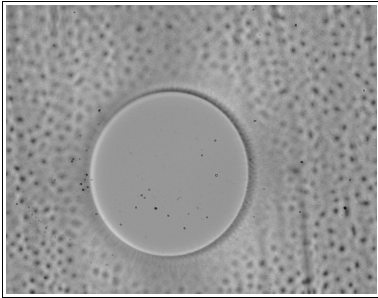
Wie die Tabellen 5 und 6 zeigen, variierte der Lochdurchmesser bei den gegebenen Parametereinstellungen erheblich. Die Lochdurchmesser bei einer Serie von fünf Teflonfolien mit einem Abstand auf der Skala von 0 cm, einer elektrischen Pulsdauer von 10 s und einer Generatorspannung von 50.000 V lagen zwischen 44,1 und 76,5 μm . Der Durchmesser ist somit nur bedingt mit den drei einstellbaren Parameter kontrollierbar.

6 Ergebnisse und Diskussion

Die Abweichung vom errechneten Mittelwert des Lochdurchmesser von $66\ \mu\text{m}$ beträgt 20%. Die Ursache hierfür konnte während des Auftreffens des elektrischen Pulses auf die Teflonfolie mit bloßem Auge beobachtet werden. Es war deutlich sichtbar, sobald ein Loch in die Folie gebrannt wurde. Dieser Zeitpunkt war bei jedem der fünf gezeigten PTFE-Folien verschieden.

Tabelle 5: Mikroskopaufnahme von fünf μm -Löcher in PTFE-Folien (alle Bilder 500-fache Vergrößerung)

A: Referenz; B-F: Löcher mit verschiedenen Durchmessern; Pulsdauer: 10 s, Abstand: 0 cm, Spannung 50.000 V; Die Pixel wurden mit IrfanView ausgemessen

	
(A) Abstand = $100\ \mu\text{m}$ (743 Pixel)	(B) Durchmesser (schwarzer Pfeil) $\sim 76,5\ \mu\text{m}$ (568 Pixel)
	
(C) Durchmesser $\sim 63,1\ \mu\text{m}$ (469 Pixel)	(D) Durchmesser $\sim 72,4\ \mu\text{m}$ (538 Pixel)
	
(E) Durchmesser $\sim 44,1\ \mu\text{m}$ (328 Pixel)	(F) Durchmesser $\sim 73,9\ \mu\text{m}$ (549 Pixel)

6 Ergebnisse und Diskussion

Je nachdem, wie schnell die Folie durchbrannt wurde, vergrößerte sich der Durchmesser der beschossenen PTFE-Folie. Gleichzeitig war trotz des geringen Abstands zwischen der Generatorspitze und der Gegenspitze (real 3 mm) die Fluktuation des elektrischen Pulses auf der Oberfläche der PTFE-Folie erheblich. Diese Fluktuation beeinflusst wahrscheinlich die Konzentration der Energie des elektrischen Pulses auf einen Punkt der PTFE-Folie. Dies führt vermutlich zur unterschiedlichen Zeitdauer bis zum Erreichen eines Lochs in der PTFE-Folie.

Tabelle 6: Auswertung der Lochdurchmesser in fünf PTFE-Folien mit gleichen Parametereinstellungen (Vgl. Tab.5)

Bild	B	C	D	E	F	durchschnittlicher Durchmesser (µm)	Standardabweichung (µm)
Lochdurchmesser (µm)	76,5	63,1	72,4	44,1	73,9	66	13,2

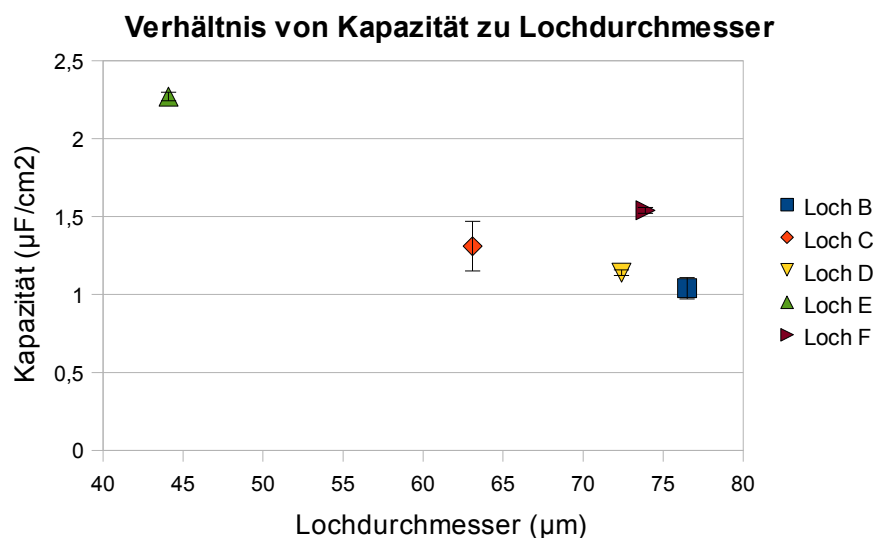
Unter diesen Voraussetzungen ist es sehr unwahrscheinlich, die Einstellung der Parameter so zu justieren, dass Löcher mit definiertem Durchmesser zu erzielen sind. Im besten Fall kann die Fehlergenauigkeit, mit der ein bestimmter Lochdurchmesser erzeugt wird, verringert werden. Diese Ziel kann aber im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden.

Für jede der behandelten Folien wurden je fünf planare Lipidmembranen erzeugt und die Kapazität bestimmt. Diese Kapazitätswerte der BLMs gibt die Tab.7 wieder.

6 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Kapazitätswerte von je 5 BLMs pro behandelte PTFE-Folie (B-F)

Messung	Loch B ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	Loch C ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	Loch D ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	Loch E ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	Loch F ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)
1	1,15	1,12	1,12	2,24	1,55
2	1,06	1,19	1,17	2,3	1,55
3	0,96	1,24	1,16	2,27	1,57
4	1,02	1,24	1,12	2,3	1,53
5	0,99	0,87	1,15	2,24	1,52
Mittelwert	1,04	1,31	1,14	2,27	1,54
Standard- abweichung	0,07	0,13	0,02	0,03	0,02
Prozentuale Abweichung	6,60%	12,20%	1,60%	1,20%	1,16%



Die Kapazitätswerte liegen für die Löcher B und D, die jeweils über 70 μm Lochdurchmesser haben, innerhalb des normalen Kapazitätsintervalls. Loch F, welches ebenfalls mehr als 70 μm im Durchmesser misst, liegt mit mehr als 1,5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ deutlich außerhalb der normalen Kapazitätswerten. Die Löcher C und E, deren Durchmesser kleiner als 70 μm ist, liegen in ihren Kapazitätswerten ebenso deutlich über den Literatur- und Erfahrungswerten. Betrachtet man die Grafik in Tab.7 kann man einen Trend in der Zunahme der Kapazität pro Fläche mit sinkenden Lochdurchmesser ausmachen.

Einen Trend, wie er in Tab.7 zu sehen ist, würde man allerdings nicht erwarten. Vielmehr

6 Ergebnisse und Diskussion

sollte die Kapazität in etwa konstant sein, gleichgültig welcher Lochdurchmesser vorliegt. Ob dieser Trend durch weitere Versuche belegt oder widerlegt werden kann, ist im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr festzustellen. Dennoch deutet die höhere Kapazität bei geringerem Lochdurchmesser auf eine größere Fläche der Lipidmembran hin. Man kann vermuten, dass bei kleinen Lochdurchmesser die Stabilität der Lipidmembran erhöht ist und somit eine größere Membranfläche ausgebildet wird. Wäre diese Vermutung zutreffend, dann sind kleine Lochdurchmesser für BLM-Versuche besser geeignet, um größere (bzw. stabilere) Lipidmembranen zu erhalten. Dieser Zusammenhang könnte mit Hilfe eines Mikroskops näher untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte ein Gerät zur Herstellung von μm -Löchern in PTFE-Folien geplant, gebaut und getestet werden. Die Löcher entsprechen in ihrer Beschaffenheit, Form und ihrem Durchmesser denen, wie sie von Van Gelder et al. [33] beschrieben wurden. Wie gezeigt werden konnte, können mit den beschossenen Folien planare Lipidmembranen erzeugt werden. Das Gerät ist somit ein wichtiger Teil des Versuchsaufbaus, der zur Präparation von planaren Lipidmembranen notwendig ist.

6.2 Kinetikmessungen von Valinomycin und Biotin-Valinomycin:

Einleitung:

Kinetikmessungen können zum Vergleich der beiden Ionencarrier Valinomycin und Biotin-Valinomycin herangezogen werden. Grundsätzlich bestehen dafür zwei Möglichkeiten: Zum Einen kann der Ionencarrier in die Lipidlösung aus der eine BLM generiert wird, gegeben werden oder in die wässrige Phase nach der Herstellung einer BLM pipettiert werden. Damit eine deutliche Abgrenzung zwischen einer BLM und einer BLM mit integriertem Ionencarrier aufgezeigt werden kann, wurde in den vorgenommenen Experimenten die zweite Variante der Zugabe des Ionencarriers in die wässrige Phase gewählt. Da in diesen Experimenten nur elektrische Messungen zur Untersuchung der planaren Lipidmembran herangezogen werden können, war diese Abgrenzung besonders wichtig. So wird zuerst eine stabile BLM erzeugt und im Anschluss daran die Integration des Ionencarriers verfolgt. Damit ist erstens eindeutig die Existenz einer BLM durch definierte elektrische Eigenschaften (Kapazität) belegbar und zweitens die Leitfähigkeit

6 Ergebnisse und Diskussion

des Ionencarrier über die Zeit verfolgbar. Bei der Integration erwartet man, dass mit der Zeit nahezu alle Ionencarriermoleküle in die BLM inkooperieren (In der Membran lösen sich ~50.000 Carriermoleküle im Vergleich zu einem gelösten Molekül in der wässrigen Phase [9]). Die komplette Integration der Ionencarriermoleküle sollte in einer Kinetik durch eine Plateauphase der Leitfähigkeit markiert sein. Der Transport der Ionen durch den Carrier und somit die Leitfähigkeit hängt dann nur noch von der Transportfähigkeit des Ionencarriers ab. Die Transportfähigkeit setzt sich aus vielen einzelnen Prozessen zusammen, die das Carriermodell von de Levie [26] zu beschreiben versucht. Da nach Hladky [27] dieses Modell nicht ausreichend den Mechanismus von Valinomycin beschreibt, dient die Plateauphase einer Leitfähigkeitskinetik des Ionencarriers zur Beschreibung seiner Transportfähigkeit. Erwartungsgemäß sollten verschiedene Valinomycinderivate in ihren Kinetiken unterschiedliche Plateauphasen ausbilden. Durch jeweils drei Kinetiken sollte eine ausreichende Aussage zur Plateaubildung der verwendeten Ionencarrier möglich sein und damit ein vergleichende Aussage getroffen werden können. Für den Vergleich sind die übereinstimmenden Versuchsbedingungen für Valinomycin und Biotin-Valinomycin in ihrer Konzentration, der verwendeten PTFE-Folie und der Ionenlösung unumgängliche Voraussetzung. Diese Voraussetzungen sind für die nachfolgenden Experimente gegeben.

6.2.1 Kapazitätskinetiken:

Die Kapazität (C) liefert ein Qualitätsmerkmal der planaren Lipidmembranen. Die Kapazität ist durch die Beziehung $C = \epsilon_0 * \epsilon * A / d$ mit der Fläche der Lipidmembran verknüpft ($\epsilon_0 = 8,85 * 10^{-12} \text{ CV}^{-1} \text{ m}^{-1}$ [elektrische Feldkonstante]; ϵ = Dielektrizitätskonstante der Membran [näherungsweise $\epsilon = 2,1$ für einen Kohlenwasserstoff]) [9,10]. Demnach ist die Kapazität direkt proportional zur Fläche, wenn d und ϵ als konstant angenommen werden können.

Die Fläche wiederum ist durch den Durchmesser des Loches innerhalb der PTFE-Folie gegeben. Anhand dieses Loches kann ein Erwartungswert für die Membrankapazität errechnet werden. Innerhalb dieses Erwartungswertes sollte die Membrankapazität einer BLM liegen. Bei einem Lochdurchmesser von 110 μm in der verwendeten PTFE-Folie liegt der Erwartungswert, mit den Annahmen von $\epsilon = 2,1$ und $d_{\text{DPhyPC}} = 5 \text{ nm}$ (nicht vollständig

6 Ergebnisse und Diskussion

gestreckte DPhyPC-Moleküle [38]), bei $0,37 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Es sei darauf hingewiesen, dass sich dieser Wert nur auf Schätzungen bezüglich der Gleichungsparameter bezieht. In der Literatur wird eine Kapazität mit der Annahme von 4 nm Dicke (Eilecithin) und $\epsilon = 2$ mit $0,44 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ errechnet [10]. Benz et al. berichten von $0,745 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für BLMs nach der Methode von Montal und Mueller, unter der Verwendung von 1 M RbCl-Lösung und Glycerolmonooleate als Lipidlösung [16]. Nach ihrer Erkenntnis steigt die Kapazität mit der Kürze der Lipidmoleküle und mit der Anzahl an Doppelbindungen innerhalb der Lipidkette an. Nach Montal und Mueller liegt die Kapazität einer BLM bei $0,9\text{-}1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [17].

Ein Literaturwert für die Kapazität von normalen Zellmembranen wird mit $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ angegeben [10]. Der Unterschied zwischen den Kapazitätswerten der Zellmembran und den errechneten Kapazitätswerten für einen Lecithinbilayer, liegt nach der Meinung von Adam et al. [10] in der höheren dielektrischen Materialkonstante der Zellmembranen, welche durch viele integrierte Membranproteine deutlich größer ist als der Wert $\epsilon = 2$ für reine Kohlenwasserstoffe.

Die Membrankapazität während eines Kinetikexperiments soll zum Einen die Existenz der planaren Lipidmembran belegen und zum Zweiten in etwa konstant über den Zeitraum der Kinetikmessung sein. Dadurch kann eine stabile Membranfläche angenommen werden.

Bei allen durchgeführten Kapazitätskinetiken lagen die Kapazitätswerte zwischen $0,65\text{-}1,05 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Diese Werte stimmen in etwa mit der Größenordnung der errechneten und den Kapazitätswerten in der Literatur überein. Einen Überblick über die Kapazitätswerte von Lipidmembranen nach der Methode von Montal und Mueller gibt Tab.8 wieder.

Der Unterschied der errechneten ($0,37 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) und real gemessenen ($0,65\text{-}1,05 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) Kapazitätswerte kann durch die Art der verwendeten Lipide (DPhyPC) und der damit verbundenen Änderung von ϵ begründet werden.

Aufgrund fehlender optischer Kontrollen (z. B. durch ein Mikroskop) kann nicht festgestellt werden, ob eine Krümmung der Lipidmembran, hervorgerufen durch die hydrostatischen Druckunterschiede zwischen beiden Kammern, erfolgte. Die Krümmung der Lipidmembran kann eine deutlich Veränderung der Kapazitätswerte hervorrufen [16]. Dies ist aber sehr unwahrscheinlich. Die Krümmung der Lipidmembran und andere Faktoren die Einfluss auf die Fläche der Lipidmembran haben, werden im nachfolgenden bei der Diskussion der Kapazitätskinetiken nochmals behandelt.

6 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Kapazitätswerte für BLMs nach Montal und Mueller

Autor	Lochdurchmesser (µm)	Kapazität gemessen (µF/cm ²)	Kapazität errechnet (µF/cm ²)	Versuchsbedingungen	Annahmen bei der Berechnung
Benz et al. (1975)	200-300	0,75	0,75	Glycerolmonooleate, 1 M RbCl	-
Montal u. Mueller (1972)	1000	0,9-1	fehlt	Verschiedene z. B. Egg Lecithin	-
Adam et al. (2003)	fehlt	fehlt	0,44	Lecithin	D = 4 nm, ε = 2,1
Eigene Werte	110	0,65-1,05	0,37	DPhyPC, 0,1 M KCl	D = 5 nm, ε = 2,1
Adam et al. (2003)	fehlt	1	fehlt	natürliche Zellmembran	-
Benz, Janko (1976)	200-300	0,7	fehlt	DOPC ^{##}	-
Nikolelis, Krull (1992)	320	0,9	fehlt	Egg Lecithin (24 h stabil)	-
Baba et al. (1999)	100-250	0,6-0,7	fehlt	DPhyPC, 0,1M KCl	-
Ebihara et al. (1979)	Fehlt	0,63	Fehlt	DPPC [#] , 1 M KCl	

DPPC[#] = Dipalmitoylphosphatidylcholin; DOPC^{##} = Dioleoylphosphatidylcholin

Außer durch die Kapazitätswerte kann auch durch die Betrachtung der Leitfähigkeitswerte belegt werden, dass die Lipidmembran ohne Defekte das Loch in der PTFE-Folie überspannt. Die Leitfähigkeitswerte der planaren Lipidmembranen liegen in allen Kinetiken zwischen 0,5-2 pS/cm². Dies entspricht einem Widerstand von 0,5-2 TΩ*cm², was einem sehr guten Isolator gleichkommt. Verschiedene Autoren beschreiben die Widerstände von planaren Lipidmembranen je nach Versuchsbedingungen mit 1-100 MΩ*cm² [17,35]. Der Widerstand der Lipidmembran ist von den verwendeten Lipiden abhängig, deren Eigenschaften die Permeabilität der Membran beeinflussen.

Die Wirkung von Ethanol auf die planaren Lipidmembranen wurde getestet, indem ein Volumen von 2,5 µL als Kontrolle in die Erdungsküvette gegeben wurde. Die Kapazitätskinetiken der Kontrolle sind in Abb.27 aufgeführt. Es zeigt sich, dass die Kapazität der

6 Ergebnisse und Diskussion

jeweiligen BLM ($\diamond, \blacktriangleright$) ca. 2,5 h nach dem Beginn der Kinetikmessung einen konstanten Wert erreicht. Dieser Wert wird bis zum Ende der Kapazitätsmessung beibehalten. Daraus kann man erkennen, dass die BLM über die jeweilige Versuchsdauer besteht. Der Zeitpunkt der Zugabe von Ethanol ist grafisch durch den Zeitpunkt 0 h gekennzeichnet, entspricht also dem Schnittpunkt der X-Y-Achse in Abb.27. Im Nachfolgenden kennzeichnet dieser Zeitpunkt immer die Zugabe des jeweiligen Ionencarriers.

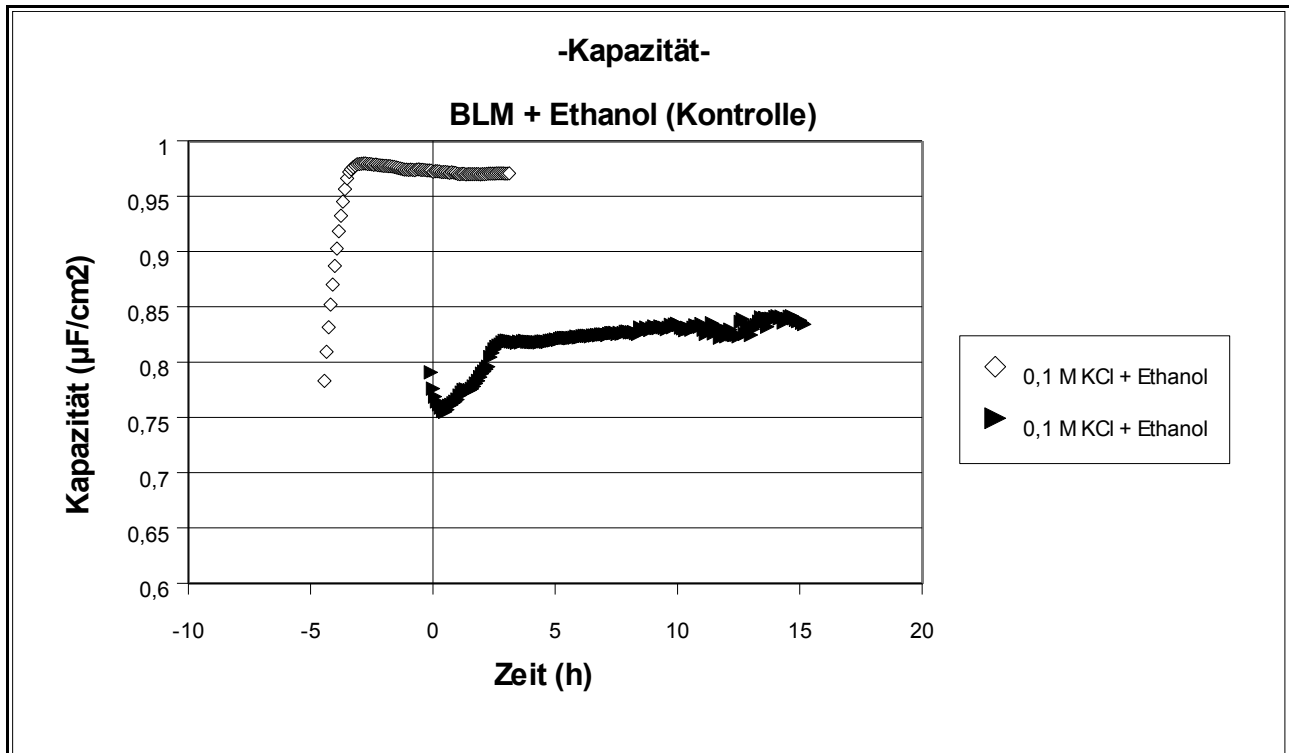


Abbildung 27: Kapazitätskinetik von Ethanol; 0 h = Zeitpunkt der Zugabe von Ethanol

Die Schwankungen der Kapazität zu Beginn (<2,5 h) der Messung sind nur spekulativ damit zu begründen, dass die Membranfläche der BLM gewissen Fluktuationen unterliegt. Die Ursache für die Fluktuationen können in einer Beugung der Membran oder im Ausdünnen des Lipidfilmes hin zum Rand des Loches in der PTFE-Folie bzw. über die Versuchsdauer hinweg liegen. Durch diese Prozesse würde sich in beiden Fällen die Membranfläche verändern, was eine Schwankung in der Kapazität zur Folge hat. Ohne optische Kontrolle kann aber keine genau Aussage über die Variation der Kapazitätswerte getroffen werden. Die Kapazitätswerte bleiben nach den Schwankungen zu Beginn relativ konstant, was beweist, dass die Menge an Ethanol (0,1 %) in der Küvette keinen Einfluss auf die BLM hat. Allein die Kontrollversuche belegen, dass eine BLM über mehrere

6 Ergebnisse und Diskussion

Stunden (hier: 15 h) stabil bestehen kann. Im Verlauf der Experimente konnten BLMs mit einer Haltbarkeit von bis zu 22 h generiert werden. Alle Membranen wurden manuell durch das Anlegen von 100 mV Spannungsschritten zerstört. Hierbei zerplatzen die meisten Lipidmembranen bei Werten zwischen 300-500 mV. Diese Werte entsprechen den Literaturwerten (411 ± 42 mV) [36].

Es wurde innerhalb dieser Arbeit nicht getestet, wie lange eine BLM in diesem Versuchsaufbau stabil bleiben kann. Die lange Lebensdauer trifft sicherlich nur auf eine geringe Anzahl an BLMs zu, betrachtet man die Vielzahl an erzeugten Lipidmembranen. Nur etwa jede 10.-15. Lipidmembran weist eine vergleichbar hohe Lebensdauer auf.

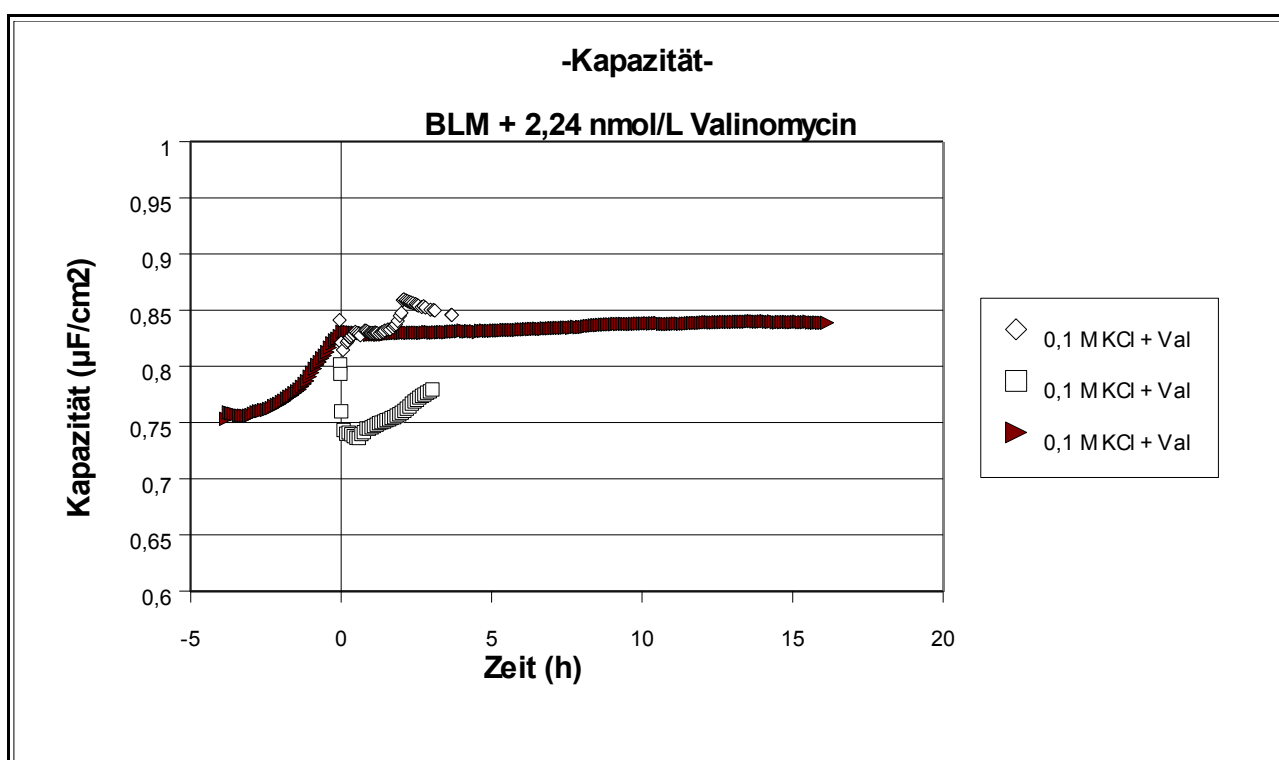


Abbildung 28: Kapazitätskinetik von Valinomycin; 0 h = Zeitpunkt der Zugabe von Valinomycin

In Abb.28 sind die Kapazitätskinetiken von drei verschiedenen BLMs mit Valinomycin zu sehen. Die Messungen (\diamond , \square) dauern weniger als 5 h und zeigen sehr starke Schwankungen in den Kapazitätswerten. Dennoch liegen die Werte in einem Intervall zwischen 0,7 bis 0,9 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, was für eine BLM spricht. Die vermuteten Ursachen für die Schwankungen der Kapazität wurden bereits erläutert. Die Veränderung der Kapazität korreliert nicht mit dem Einbau des Ionencarrier, was durch Abb.28 belegt werden kann. Die rot markierte Langzeitkinetik (\blacktriangleright) steigt vor der Zugabe von Valinomycin (-5 bis 0 h)

6 Ergebnisse und Diskussion

an. Nach der Zugabe von Valinomycin ist die Kapazität über 15 h sehr konstant. Des Weiteren sinkt die Messung (□) in ihrer Kinetik nach der Zugabe von Valinomycin stark ab, um nach ca. 1 h wieder anzusteigen.

In Abb.29 sind die Kapazitätswerte für die Biotin-Valinomycin-Kinetiken abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Kinetiken für (□) vor der Zugabe von Biotin-Valinomycin sehr stark ansteigt. Ein ähnliches Verhalten zeigt bereits eine Kinetik mit natürlichem Valinomycin (►, Abb.28). Nach der Zugabe von Biotin-Valinomycin fällt die Kapazität dieser Kinetik leicht ab. Die Kinetik (◇) zeigt nach dem Beginn der Messung einen leichten Anstieg, der bis nach der Zugabe von Biotin-Valinomycin anhält, am Ende sinkt sie leicht ab. Dennoch bleibt insgesamt die Kapazität auf etwa gleichem Niveau. Die Kinetik (►) fällt von Beginn an ab und erreicht einen Kapazitätswert von $0,65 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ am Ende. Zusammenfassend kann man sagen, dass kein Trend aus dem Verlauf aller drei Kinetiken erkannt werden kann. Die Kapazitätswerte jeder BLM, auch im Bezug auf die Kapazitätswerte der Kontrolle und der Kapazitätswerte von Valinomycin, ist für sich sehr verschieden.

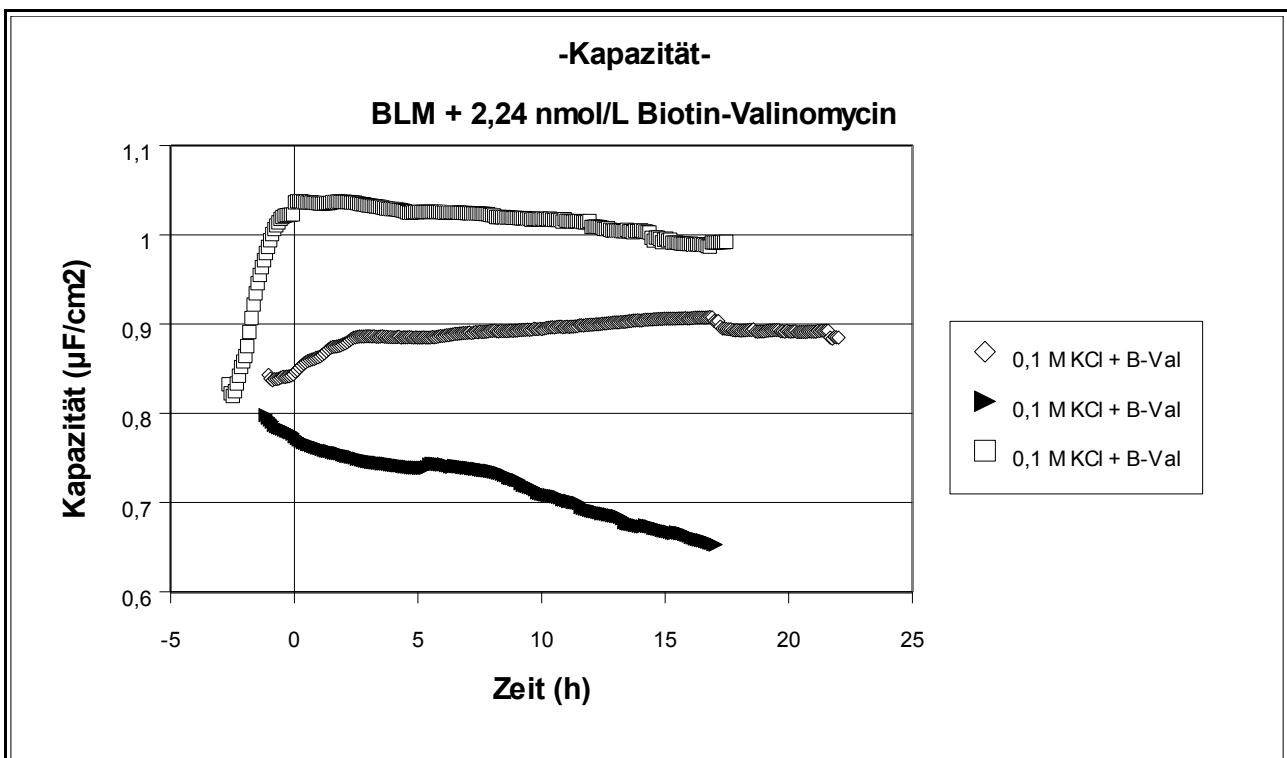


Abbildung 29: Kapazitätskinetik von Biotin-Valinomycin; 0 h = Zeitpunkt der Zugabe von Biotin-Valinomycin

6 Ergebnisse und Diskussion

Es ist sehr schwer, eine Ursache für die Kapazitätsschwankungen auszumachen. Letztendlich wäre dies nur durch optische Beobachtung möglich. Der bestehende Versuchsaufbau müsste für die Verwendung eines Mikroskops für weiterführende Experimente sehr stark verändert werden. Die Küvette müsste so gestaltet werden, dass das Loch in der PTFE-Folie, über welches später die BLM gespannt wird, optisch fokussiert werden kann. Zusätzlich müsste der innere Faradaykäfig des Versuchsaufbaus für die Aufnahme des Mikroskops umgebaut werden. Zur Zeit sind die Kapazitätswerte trotz Schwankung ausreichend stabil, so dass mit Hilfe von BLMs die Ionencarrier über die Zeit hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit bewertet werden können.

6.2.2 Leitfähigkeitskinetiken:

Die Leitfähigkeit (G) wird zur Beschreibung des Ionen-transportes durch Valinomycin bzw. Biotin-Valinomycin herangezogen. Die Leitfähigkeit aufgetragen gegen die Zeit führt zu einer Kinetik, welche nach der Zugabe des Ionencarriers eine exponentielle Zunahme aufweist. Nach der exponentiellen Phase wird eine Plateauphase erreicht. Der Leitfähigkeitswert bei welchem die Plateauphase erreicht wird, dient zum Vergleich der Ionencarrier.

In Abb.30 ist das Kontrollexperiment aufgeführt. Zum Zeitpunkt 0 h wurde Ethanol zur planaren Lipidmembran hinzu gegeben. Ethanol zeigt keinerlei Auswirkung auf die Leitfähigkeit der BLM. Die Leitfähigkeit der Kontrollmessung liegt bei beiden

Kinetiken (\blacktriangleright , \diamond) im Bereich von 0,5-2 pS/cm². Um dieses Intervall schwanken die Leitfähigkeitswerte einer reinen Lipidmembran. Eine exakte Bestimmung der Grundleitfähigkeit ist aufgrund des Hintergrundrauschens, welches das Stromsignal des Verstärkers beeinflusst, nicht möglich. In der Literatur werden Werte für entsprechende Lipidmembranen mit 3,2 nS/cm² berichtet [31,36].

6 Ergebnisse und Diskussion

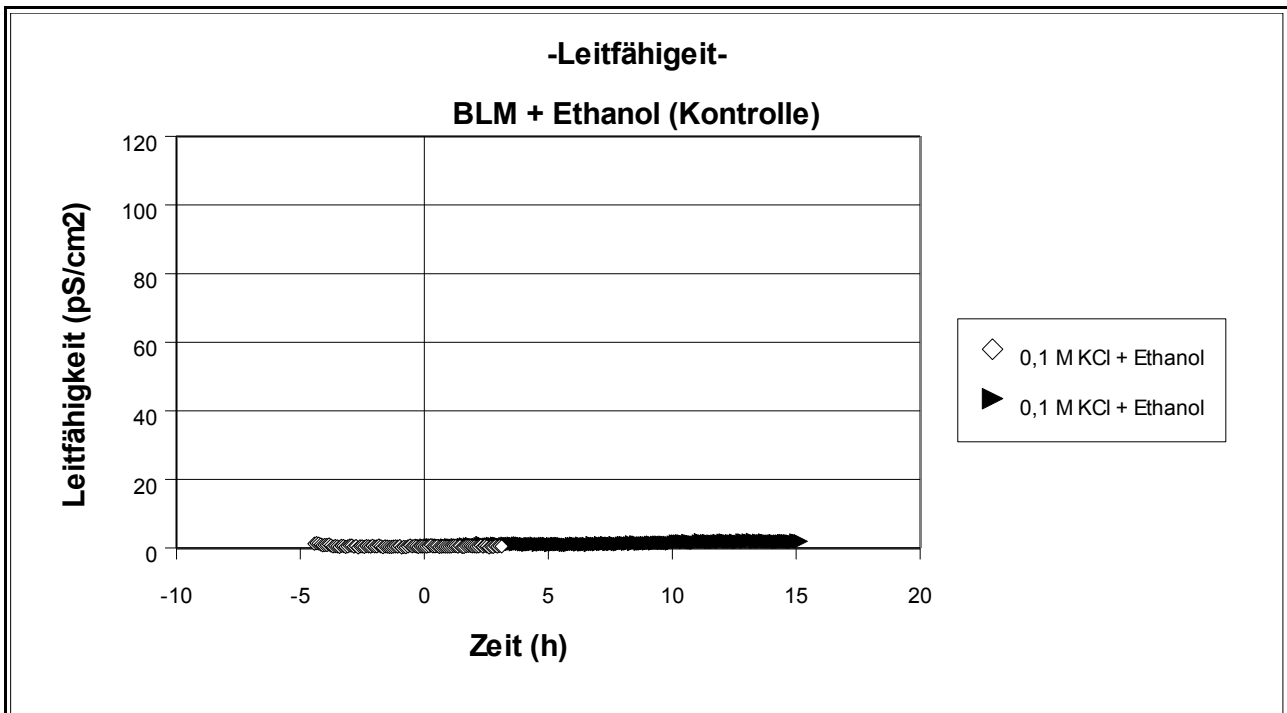


Abbildung 30: Leitfähigkeitskinetik Kontrolle; 0 h = Zeitpunkt der Zugabe von Ethanol

Die nachfolgenden Abb. 31 und 32 zeigen die Leitfähigkeitskinetiken von Valinomycin. In Abb.31 ist die Dauer der Kinetiken nicht länger als 4 h, wohingegen in Abb.32 die Kinetik bis zu 15 h lang ist. Dieser Unterschied beruht darin, dass die Kinetiken mit 4 h Dauer gemessen wurden, als automatisierte Messungen durch den Verstärker, aufgrund von fehlenden Verknüpfungen der einzelnen PGFs, noch nicht durchführbar waren. Die Kinetiken mussten manuell gemessen werden. Die Kinetiken mit der längeren Zeitdauer wurden nach der Implementierung der Verknüpfung aufgenommen, wodurch deutlich längere Kinetiken erstellt werden konnten.

Die Kinetiken in Abb. 31 zeigen nach der Zugabe von Valinomycin (◇,□) einen Anstieg der Leitfähigkeit.

6 Ergebnisse und Diskussion

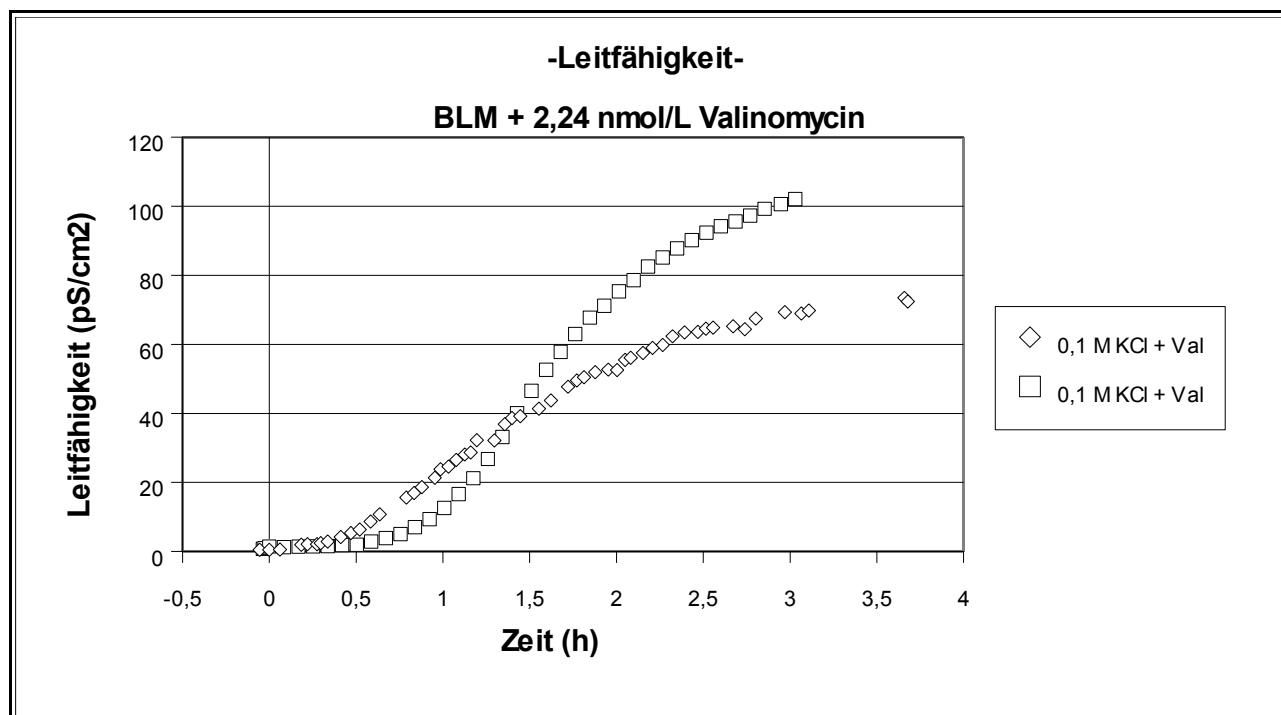


Abbildung 31: Leitfähigkeitskinetik von Valinomycin; 0 h = Zeitpunkt der Zugabe von Valinomycin

Der Anstieg der Kinetik (\square) verläuft exponentiell und endet mit dem Beginn einer Plateauphase (100 pS/cm^2). Dieser Kurvenverlauf entspricht den Erwartungen, die für das Verhalten eines Ionencarrier in einer BLM bereits beschrieben wurden. Ebenso schließt die Kinetik (\diamond) nach einem exponentiellem Anstieg mit einer Plateauphase (75 pS/cm^2) ab. Somit unterscheiden sich die Leitfähigkeitswerte um ca. 25 pS/cm^2 in der Bildung einer Plateauphase. Dieser Unterschied ist damit zu erklären, dass jede Membran geringfügige Unterschiede in ihrer Fläche aufweist. Die Fläche, in die der Ionencarrier inkoooperieren kann, trägt dazu bei wie viele Ionencarriermoleküle ihren Beitrag zur maximalen Leitfähigkeit beisteuern können. Bei einer kleineren Fläche können zwangsläufig weniger Ionencarrier K^+ -Ionen über die Membran transportieren. Die Kapazität der beiden Kinetiken in Abb.31 unterscheidet sich um ca. $0,1 \text{ }\mu\text{F/cm}^2$, was einen kleinen Flächenunterschied signalisiert. Vergleicht man nun die Kinetiken aus Abb.31 mit der Kinetik (\blacktriangleright) in Abb.32, erkennt man eine Plateau bei 100 pS/cm^2 . Diese Kinetik zeigt im Bereich von -5 h bis 0 h sehr gut den niedrigen Leitfähigkeitswert der reinen Lipidmembran. Ab dem Zeitpunkt 0 h , bei dem die Zugabe von Valinomycin erfolgt ist, beginnt der exponentielle Anstieg der Leitfähigkeit. Ab ca. 4 h geht die Kinetik in eine Plateauphase über, wie sie

6 Ergebnisse und Diskussion

bereits durch die Kinetiken in Abb.31 angedeutet wird. Somit kann festgehalten werden, dass Valinomycin unter den gegebenen Bedingungen eine Plateauphase je nach Fläche bei ca. 100 pS/cm² erreicht und sich daher deutlich von den Kontrollwerten von 0,5-2 pS/cm² abhebt.

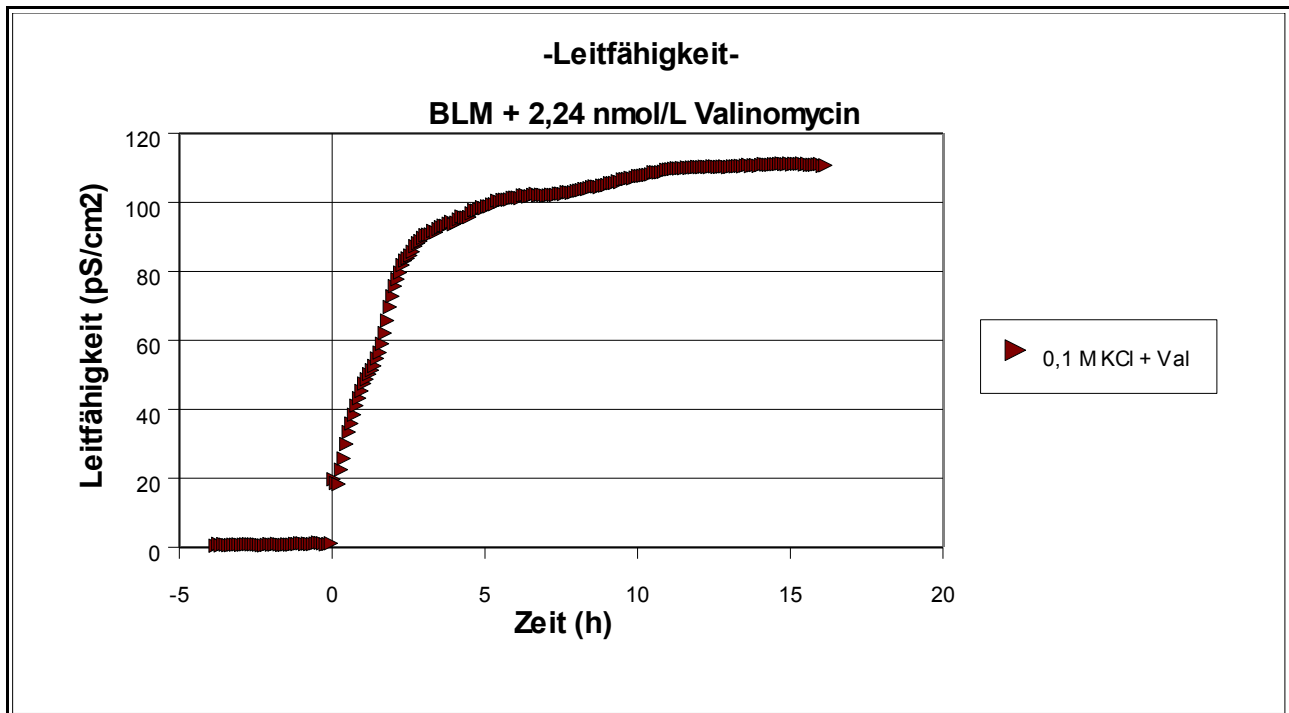


Abbildung 32: Leitfähigkeitskinetik von Valinomycin; 0 h = Zeitpunkt der Zugabe von Valinomycin

In Abb.33 sind drei Kinetiken von Biotin-Valinomycin aufgetragen. Die Leitfähigkeit aller drei Kinetiken bewegt sich zwischen 0,5-2 pS/cm² und liegt damit im Bereich der Kontrolle. Es kann somit keine Leitfähigkeitsänderung durch Biotin-Valinomycin im Vergleich zur reinen Lipidmembran detektiert werden.

6 Ergebnisse und Diskussion

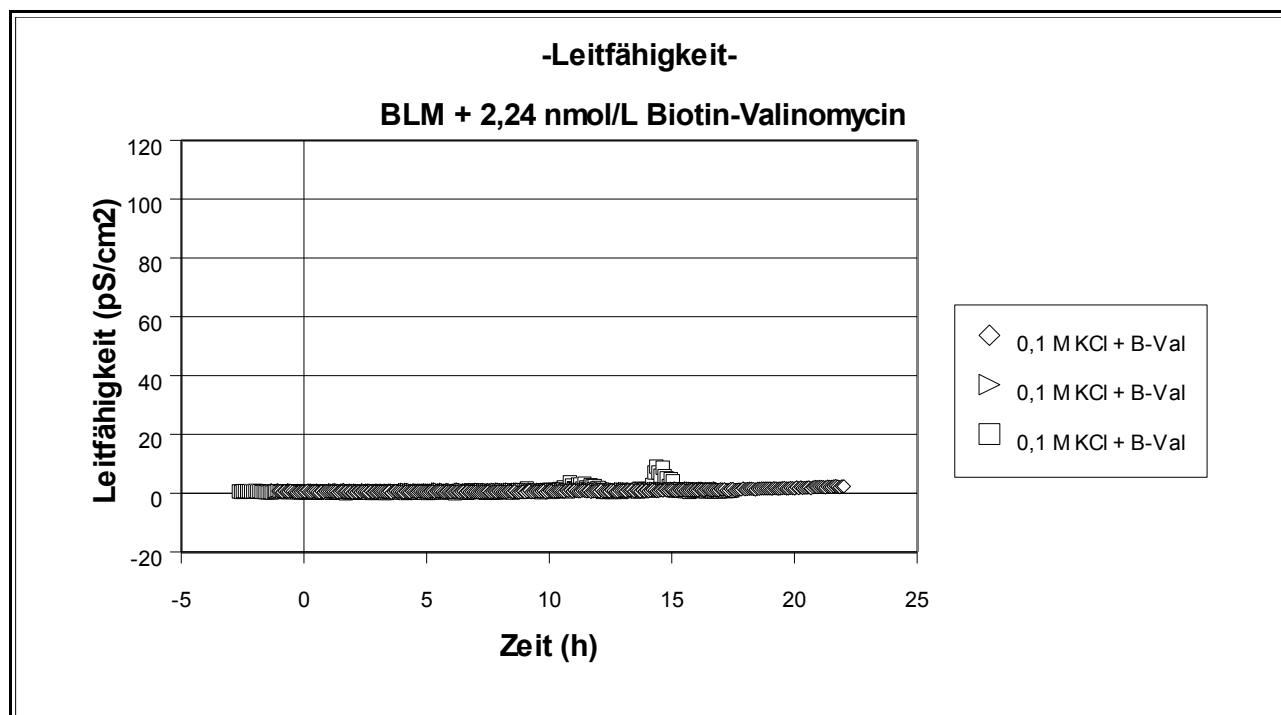


Abbildung 33: Leitfähigkeitskinetiken von Biotin-Valinomycin; 0 h = Zeitpunkt der Zugabe von Biotin-Valinomycin

Dies deutet daraufhin, dass mit Biotin markiertes Valinomycin nicht in die Membran integriert ist oder nach der Integration keinen Ionentransport über die Membran ermöglicht. Dadurch ist die Zugabe von Streptavidin zur Veränderung des Ionentransports nicht sinnvoll. Die Auswirkung von Streptavidin kann mit dieser Methode aufgrund des fehlenden Ionentransports durch Biotin-Valinomycin nicht gemessen werden. Biotin-Valinomycin ist durch die fehlende Transportfähigkeit nicht geeignet, um in Biosensorenanwendungen verwendet zu werden. Es sei noch erwähnt, dass SPR-Messungen durch Julia Braunagel die Integration von Biotin-Valinomycin in tBLMs belegen konnten. Allerdings kann auch im System der tBLMs keinerlei Ionentransport durch Biotin-Valinomycin gemessen werden. Ein Grund hierfür ist die starke Hydrophilie des Biotinmoleküls. Es löst sich zu gut in Wasser, um durch hydrophobe Lipide „wandern“ zu können. Es scheint sich vielmehr an der Phasengrenze Wasser-Membran anzulagern. Einen zusammenfassenden Vergleich der Leitfähigkeitswerte von Valinomycin, Biotin-Valinomycin und der Kontrolle gibt Tab.9.

6 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Zusammenfassung der Leitfähigkeitskinetiken von Valinomycin, Biotin-Valinomycin und der Kontrolle

Ionencarrier	Valinomycin	Biotin-Valinomycin	Kontrolle
Leitfähigkeit (Plateauphase)	75-100 pS/cm ²	<2 pS/cm ²	<2 pS/cm ²
Anzahl der Kinetikmessungen	3	3	2

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte ein Versuchsaufbau für planare Lipidmembranen aufgebaut werden. Es konnten planare Lipidmembranen hergestellt werden, deren Eigenschaften mit den Werten in der Literatur übereinstimmen.

Des Weiteren wurde eine Gerät entwickelt, das Löcher in PTFE-Folien brennen kann. Diese Folien dienen als Grundlage zur Herstellung von planaren Lipidmembranen. Wie gezeigt werden konnte, lassen sich damit Löcher mit einem Durchmesser zwischen 45 und 80 µm Lochdurchmesser herstellen und über diesen Löchern BLMs formieren.

Die Inkooperation von Valinomycin und Biotin-Valinomycin konnte in Kinetiken verfolgt werden. Die Kinetikmessungen waren nur durch die selbst geschriebenen Programme in Pulse, sowie VBA mess- und analysierbar.

Die ausgewerteten Kinetiken beweisen, dass Biotin-Valinomycin innerhalb der Messempfindlichkeit des Verstärkers keine Ionen über planare Lipidmembranen transportieren konnte. Die Eingangs dieser Arbeit erhoffte Anwendung als Biosensor kann somit nicht realisiert werden. Die Bindung von Streptavidin an das Biotin-Valinomycin konnte mit dieser Methode nicht ermittelt werden und bedarf weitergehender Untersuchungen.

Der Versuchsaufbau für BLMs steht nun für Experimente mit Ionencarriern bzw. Membranproteinen zur Verfügung. Durch seine weitgehende Automatisierung für Ionencarrier können in Zukunft routinemäßige Untersuchungen an Valinomycinderivaten durchgeführt werden.

8 Literatur

- [1] Lee T.M.H. (2008) *Over-the-counter biosensors: Past, present and future*. Sensors 2008 8:5535-5559
- [2] Branton D., et al. (2008) *The potential and challenges of nanopore sequencing*. Nature Biotechnology 26:1146-1153
- [3] Bayley, H. and Cremer, P. (2001) *Stochastic sensors inspired by biology*. Nature 413:226-30
- [4] Vockenroth I.K., Atanasova P.P., Jenkins .A.T.A and Köper I. (2008) *Incorporation of α -Hemolysin in different tethered bilayer lipid membrane architectures*. Langmuir 24(2):496-502
- [5] Vockenroth I.K., Atanasova P.P., Long J.R., Jenkins .A.T.A, Knoll W. and Köper I. (2007) *Functional incorporation of the pore forming segment of AChRM2 into tethered bilayer lipid membrane*. Biochimica et Biophysica Acta 1768:1114-1120
- [6] Läuger P. (1972) *Carrier-mediated ion transport*. Science 178:24-30
- [7] Weber P.C., Ohlendorf D.H., Wendoloski J.J. and Selemme F.R. (1989) *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*. Science 243:85-88
- [8] Campbell N.A. and Reece J.B. (2004) *Biologie* Spektrum Akademischer Verlag 6.Auflage
- [9] Läuger P. (1985) *Mechanismen des biologischen Ionentransports – Carrier, Kanäle und Poren in künstlichen Lipidmembranen* Angewandte Chemie 97:939-959
- [10] Adam G., Läuger P. and Stark G. (2003) *Physikalische Chemie und Biophysik* Springer Verlag, 4. Auflage
- [11] Voet D., Voet J.G. and Pratt C.W. (2002) *Lehrbuch der Biochemie* Wiley-VCH
- [12] Singer S.J. And Nicolson G.L. (1972) *The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membranes*. Science 175:720-731
- [13] Wallin E. and von Heijne G. (1998) *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archean and eukaryotic organisms*. Protein Science 7:1029-1038
- [14] Castellana E.T. and Cremer P.S. (2006) *Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design*. Surface Science Reports 61:429-444

8 Literatur

- [15] Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T. and Wescott W.C. (1962) *Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system* Nature 194:979-980
- [16] Benz R., Fröhlich O., Läuger P., and Montal M. (1975) *Electrical capacity of black lipid bilayers made from monolayers* Biochimica et Biophysica Acta 394:323-334
- [17] Montal M. und Mueller P., (1972) *Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.* Proc. Nat. Acad. Sci. Vol 69 12:3561-3566
- [18] White S.H., Petersen D.C., Simon S., and Yafuso M. (1976) *Formation of planar bilayer membranes from lipid monolayers.* Biophysical Journal 16:481-489
- [19] Schäfer C., Vorlesungsunterlagen *Nanobiotechnologie Biomembranen Teil 2*, Zentrum für Nanobiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien.
- [20] Tiefenauer L. and Ros R. (2002) *Biointerface analysis on a molecular level. New tools for biosensor research.* Colloids and Surfaces Biointerfaces 23:95-114
- [21] Xiaojun H. et al. (2007) *Nanopore arrays for stable and functional free-standing lipid bilayers.* Advanced Materials 19:4466-4470
- [22] Kresak S. et al (2009) unpublished
- [23] Vockenroth I. (2007) *Investigations of tethered bilayer lipid membranes for their use in biosensing devices* PhD-thesis University of Bath
- [24] Shemyakin M. et al. (1969) *Cyclodepsipeptides as chemical tools for studying ionic transport through membranes.* Journal Membrane Biology 1:402-430
- [25] Varma S., Dubravko S. and Rempe S.B. (2008) *K⁺/Na⁺ Selectivity in K channels and valinomycin: Over-coordination versus cavity-size constrains.* Journal of Molecular Biology 376:13-22
- [26] De Levie R. (1975) *Transport of ions of one kind through thin membranes* Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 58:203-216
- [27] Hladky S.B. (1992) *Kinetic analysis of lipid soluble ions and carriers* Quarterly Reviews of Biophysics 25:459-475
- [28] Neher E. and Sakmann B. (1976) *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers.* Nature 260:799-802
- [29] Numberger M. and Draguhn A. (1996) *Patch-Clamp-Technik* Spektrum Verlag
- [30] HEKA Manual EPC10, S.59, Dr. Schulz Elektronik

8 Literatur

- [31] Gutknecht J. (1987) *Proton/hydroxide conductance through phospholipid bilayer membranes: effects of phytanic acid* Biochemica et Biophysica Acta 898:97-108
- [32] Hanyu Y., Yamada T. and Matsumoto G. (1998) *Simultaneous measurement of spectroscopic and physiological signals from a planar bilayer system: Detecting voltage-dependent movement of a membrane-incorporated peptide.* Biochemistry 37:15376-15382
- [33] van Gelder P., Dumas F. and Winterhalter M. (1999) *Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes* Biophysical Chemistry 85:153-167
- [34] Janko K. and Benz R. (1977) *Properties of lipid bilayer membranes made from lipids containing phytanic acid.* Biochemica et Biophysica Acta 470:8-16
- [35] Nikolelis D.P. and Krull U.J. (1992) *Reliable and facile method for preparation of solventless bilayer lipid membranes for electroanalytical investigations* Talanta 39:1045-1049
- [36] Baba T. et al. (1999) *Formation and characterization of planar lipid bilayer membranes from synthetic phytanyl-chained glycolipids.* Biochemica et Biophysica Acta 1421:91-102
- [37] Ebihara L., Hall J.E., MacDonald R.C., McIntosh T.J. and Simon S.A. (1979) *Effect of benzyl alcohol on lipid bilayers* Biophysical Journal 28:185-196
- [38] McGillivray D.J. et al. (2007) *Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes* Biointerphases 2:21-33
- [39] Steinem C. and Janshoff A. (2006) *Transport across artificial membranes – an analytical perspective* Analytical and Bioanalytical Chemistry 385:433-451

Anhang

Anhang A: Script Autolt (geschrieben von Martin Textor):

```
#####  
;  
; Script for automated BLM data export by Martin Textor, February 2009, using  
AutoIt.  
; For more information on AutoIt visit http://www.autoitscript.com  
;  
; Convert the script (".au3"-file) to a stand-alone ".exe"-file with  
aut2exe.exe.  
; Before starting the export, please make sure that the first sweep to be  
exported is selected in Pulse.  
;  
;#####  
;-----  
-----  
; Prompt asking the user to give the total number of sweeps.  
; The number of sweeps is needed to determin, when the script has to stop.  
;-----  
-----  
$sweeps = InputBox("BLM Data Export", "Please type in the total number of  
sweeps.")  
;-----  
-----  
; Prompt asking the user to give the number of the first sweep to be exported.  
This is for the case that  
; the user has canceled the script previously and only wants to export the not  
yet exportet sweeps.  
;-----  
-----  
$begin = InputBox("BLM Data Export", "Please type in the number of the sweep  
being exported first.", "1")  
;-----  
-----
```

Anhang

```
; Setting the hotkey to quit the script with Escape-button if necessary.
;-----
-----
HotKeySet("{ESCAPE}", "ExitScript")
    If @error = 1 Then
        Exit
    Else

;-----
-----
; Message box announcing the start of the script and giving its estimated
duration.
;-----
-----
        For $i = 5 to 1 Step -1
            MsgBox(0, "BLM Data Export", "Export starting in "& $i &
seconds!" & @CRLF & "Estimated time: "& Round ($sweeps/3*2/60, 1) &
minutes." , 1)
        Next

;-----
-----
; Activation of the Window (called "Replay") listing the experiments and sweeps
in Pulse.
;-----
-----
        WinActivate ( "Pulse", "Replay" )
        Sleep ( 500 )
        Send("{ENTER}")
        Sleep ( 500 )

;-----
-----
; Pressing "x" for export, giving the number of the current sweep, pressing
Enter to save the
; ASCII-File and pressing down arrow to select the next sweep. Repeating this
commands until the
; script reaches the last sweep.
; Furthermore it will be checked, if the sweep is a c-save, IV or ramp and
```

Anhang

```
adequate waiting
; times are maintained (Exporting the c-save takes a bit longer).
;-----
-----
      For $i = $begin to $sweeps Step +1
          Send("x")
              Sleep ( 100 )
          Send($i)
              Sleep ( 100 )
          Send("{ENTER}")
              Sleep ( 200 )
          If Mod (($i-1), 3) <= 0 Then
              Sleep ( 1100 )
          ElseIf Mod (($i-2), 3) <= 0 Then
              Sleep ( 200 )
          Else
              Sleep ( 200 )
          EndIf
          Send("{DOWN}")
              Sleep ( 100 )
      Next

;-----
-----
; Notification of the end of the script.
;-----
-----
          MsgBox(0,"BLM Data Export - Done!", "All "& $sweeps &" sweeps
exported!")
      EndIf
Func ExitScript()
    Exit
EndFunc
```

Anhang

Anhang B: Makros VBA-Scripte

C_Save_Auswertung:

```
Option Explicit
```

```
Sub C_Save_Auswertung()
```

```
Dim a As Integer, b As Integer, C As String, d As Integer, e As String, f As Integer, g As Integer, h As Integer, i As Integer  
Dim j As Integer, k As Integer, l As Integer, m As String, n As String, o As String, p As Integer, q As Integer, r As Integer  
Dim t As Integer, u As Integer, v As Integer, w As Integer, x As Integer, y As Integer, aa As Integer, ab As Integer, ac As Integer, ad As Integer
```

```
C = InputBox("Ordnername (Speicherort) eingeben")  
o = InputBox("Neuen Dateinamen eingeben!")  
r = InputBox("Dateinamen (ohne .ASC, muss eine ganze Zahl sein) des hoechsten CSave-Sweeps eingeben")
```

```
b = 0
```

```
f = 1
```

```
i = 4
```

```
d = 1
```

```
p = 126 / 3
```

```
q = (r + 2)
```

```
a = q / 3
```

```
x = 1
```

```
v = 1
```

```
Workbooks.Add
```

```
ActiveWorkbook.SaveAs ("D:\Messdaten HEKA EPC10\Ausgewertete Daten\" & C & "\" & o)
```

```
ActiveWorkbook.Sheets.Add
```

```
Worksheets(1).Name = ("CSave 1-") & d
```

```
If a > p Then
```

```
    a = p
```

```
    GoTo Top1
```

```
ElseIf a > b Then
```

```
Top1:    Do While a > b
```

```
        j = -4
```

```
        m = ""
```

```
        h = 1
```

Anhang

```
k = 0
l = 1

e = ("D:\Messdaten HEKA EPC10\ThomasEXDATA\" & C & "\" & d &
".Asc")

Worksheets(("CSave 1-" & d).Select

With ActiveSheet.QueryTables.Add(Connection:= _
"TEXT;" & e, Destination:=Range("A1")) _      'Einladen
der Ascii-Files

.FieldsNames = True
.RowNumbers = False
.FillAdjacentFormulas = False
.PreserveFormatting = True
.RefreshOnFileOpen = False
.RefreshStyle = xlInsertDeleteCells
.SavePassword = False
.SaveData = True
.AdjustColumnWidth = True
.RefreshPeriod = 0
.TextFilePromptOnRefresh = False
.TextFilePlatform = 850
.TextFileStartRow = 1
.TextFileParseType = xlFixedWidth
.TextFileTextQualifier = xlTextQualifierDoubleQuote
.TextFileConsecutiveDelimiter = False
.TextFileTabDelimiter = True
.TextFileSemicolonDelimiter = False
.TextFileCommaDelimiter = False
.TextFileSpaceDelimiter = False
.TextFileColumnDataTypes = Array(1, 1, 1)
.TextFileFixedColumnWidths = Array(13, 15)
.TextFileDecimalSeparator = "."
.TextFileThousandsSeparator = " "
.TextFileTrailingMinusNumbers = True
.Refresh BackgroundQuery:=False

Worksheets("CSave 1-" & d).Activate
'Zeit in Spalte E
Range("E3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Zeit (s)"
Range("E4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-4]"
Range("E4").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range("E4:E2462"),
Type:=xlFillDefault
Range("E4:E2462").Select
Selection.NumberFormat = "General"

While h < 11
```


Anhang

'Sweeps 1-10 in Spalte F-O

Select Case 1

Case Is = 1

m = "F"

Case Is = 2

m = "G"

Case Is = 3

m = "H"

Case Is = 4

m = "I"

Case Is = 5

m = "J"

Case Is = 6

m = "K"

Case Is = 7

m = "L"

Case Is = 8

m = "M"

Case Is = 9

m = "N"

Case Is = 10

m = "O"

End Select

Worksheets("CSave 1-" & d).Activate
Range(m & "2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Sweep " &

h

Range(m & "3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Trace1

(pF) "

Range(m & "4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=R[" & k &

"]C[" & j & "]"*10^12"

Range(m & "4").Select
Selection.AutoFill

Destination:=Range(m & "4:" & m & "2462")

Range("P3").Select

'Mittelwert Spalte P

ActiveCell.FormulaR1C1 =

"Mittelwert"

Range("P4").Select

ActiveCell.FormulaR1C1 =

"=AVERAGE(RC[-10]:RC[-1])"

Range("P4").Select

Selection.AutoFill

Destination:=Range("P4:P2462"), Type:=xlFillDefault

h = h + 1

j = j - 1

k = k + 2463

l = l + 1

Wend

Anhang

```

        End With
        f = f + 1
        d = d + 3
        Sheets(1).Select                                'Arbeitsblaetter
sortieren
        ActiveWorkbook.Sheets.Add
        Sheets(1).Select
        Worksheets(1).Name = ("CSave 1-" & d
        Sheets(1).Select
        Sheets(1).Move After:=Sheets(f)

        b = b + 1

Loop

Top2:          If (MsgBox("Graphische Auswertung ja/nein", 4) = vbYes)
Then          'Mittelwerte einfuegen und Zeit

                Worksheets("CSave 1-" & d).Select
                Worksheets("CSave 1-" & d).Name = ("Mean C-Save")

                Range("A3").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = "time (s)"
                Range("A4").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = "'CSave 1-" & x & "'!RC[4]"
                Range("A4").Select
                Selection.AutoFill Destination:=Range("A4:A2462"),
Type:=xlFillDefault

                w = 2

                Do

                    With Worksheets("Mean C-Save")
                    .Select
                    .Cells(1, w).Select
                    ActiveCell.Value = "CSave 1-" & x
                    .Cells(3, w).Select
                    ActiveCell.Value = "Kapazitaet (pF)"
                    .Cells(4, w).Select
                    .Range(Cells(4, w), Cells(2462, w)) = "'CSave
1-" & x & "'!P4"

                    End With

                    v = v + 1
                    w = w + 1
                    x = x + 3

                Loop Until v > p

                aa = 4
                y = w
                With Worksheets("Mean C-Save")

                    .Select
                    .Cells(3, w).Select
```

Anhang

```
                .Range(Cells(aa, y), Cells(aa, (y + 41))) =
"=AVERAGE(R[987]C[-42]:R[1562]C[-42])"
                .Range(Cells((aa + 1), y), Cells((aa + 1),
(y + 41))) = "=AVERAGE(R[389]C[-42]:R[963]C[-42])"

                End With

                Range("AY8").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = "Flaeche d. Lochs"
                Range("AY9").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 =
"=((0.011/2)^2)*3.14159"
                Range("AS8").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert Kapazitaet
0,05-0,07s"
                Range("AR4").Select
                Range(Selection,
Selection.End(xlToRight)).Select
                Selection.Copy
                Range("AS9").Select
                Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues,
Operation:=xlNone, SkipBlanks _
                :=False, Transpose:=True
                Range("AT8").Select
                Application.CutCopyMode = False
                ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert Kapazitaet
0,01945-0,04815s"
                Range("AR5").Select
                Range(Selection,
Selection.End(xlToRight)).Select
                Selection.Copy
                Range("AT9").Select
                Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues,
Operation:=xlNone, SkipBlanks _
                :=False, Transpose:=True
                Range("AU8").Select
                Application.CutCopyMode = False
                ActiveCell.FormulaR1C1 = "Capacity (µF/cm2)"
                Range("AU9").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = "=((RC[-1]-RC[-2])*(-
1))/2)/1000000/R9C51"
                Range("AU9").Select
                Selection.AutoFill
                Destination:=Range("AU9:AU50")

                Else: GoTo Top3
                End If

Top3:                If (MsgBox("Weitere Datenblaetter noetig? (Nur bei mehr als 126
Blaetter (Sweeps) pro Arbeitsmappe!", 4) = vbYes) Then

                MsgBox ("Datenmenge zu gross fuer eine Arbeitsmappe! Neues
Datenblatt muss erstellt werden.")
                n = InputBox("Bitte Dateinamen fuer neue Arbeitsmappe
eingeben!")
```

Anhang

```
        ActiveWorkbook.Activate
        ActiveWorkbook.Close
        Workbooks.Add
        ActiveWorkbook.SaveAs ("D:\Messdaten HEKA EPC10\Ausgewertete
Daten\" & C & "\" & n)
        p = p + (126 / 3)
        a = a + 42
        f = 1
        ActiveWorkbook.Sheets.Add
        Worksheets(1).Name = ("CSave 1-") & d
        ActiveWorkbook.Activate
        GoTo Top1
        End If
    End If

End Sub
```

C_Save_Auswertung_Mean:

```
Option Explicit
Sub C_Save_Auswertung_Mean()
Dim a As Integer, b As Integer, w As Integer, x As Integer, y As Integer, z As
Integer, t As Integer, C As Integer, d As Integer, aa As Integer, g As Integer

'Range("A1").Select

'With Worksheets("CSave")
    '.Select
    '.Cells(5, 7).Select
'End With
w = 2
x = InputBox("Bitte niedrigsten Sweep der Arbeitsmappe eingeben") '
Veraenderbar (Erster Sweep der Arbeitsmappe)
C = InputBox("Bitte höchsten Sweep der Arbeitsmappe eingeben") 'Veränderbar!

b = x 'Veraenderbar(Erster Sweep der Arbeitsmappe)
d = 42 - ((C - x) / 3)
a = ((C - x) / 3)
g = a

With Worksheets("CSave 1-" & C)
    .Select
    .Name = ("Mean C-Save")
End With

        Worksheets("Mean C-Save").Select
        Range("A3").Select
```

Anhang

```
ActiveCell.FormulaR1C1 = "time (s)"
Range("A4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "'CSave 1-" & x & "'!RC[4]"
Range("A4").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range("A4:A2462"),
Type:=xlFillDefault

Do

With Worksheets("Mean C-Save")
    .Select
    .Cells(1, w).Select
    ActiveCell.Value = "CSave1-" & b
    .Cells(3, w).Select
    ActiveCell.Value = "Kapazitaet (pF)"
    .Cells(4, w).Select
    .Range(Cells(4, w), Cells(2462, w)) = "'CSave
1-" & x & "'!P4"
End With
d = d + 1
x = x + 3
w = w + 1
b = b + 3
Loop Until d > 40

z = 4

With Worksheets("Mean C-Save")
    .Select
    .Cells(3, w).Select
    .Range(Cells(z, (a + 2)), Cells(z, (a + (a +
1)))) = "=AVERAGE(R[987]C[" & -a & "]:R[1562]C[" & -a & "])"
    .Range(Cells((z + 1), (a + 2)), Cells((z +
1), (a + (a + 41)))) = "=AVERAGE(R[389]C[" & -a & "]:R[963]C[" & -a & "])"
End With

Range("AY8").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Flaeche d. Lochs"
Range("AY9").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=((0.011/2)^2)*3.14159"
Range("AS8").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert Kapazitaet 0,05-0,07s"
Range(Cells(z, (a + 2)), Cells(z, (a + (a + 1)))).Select
'Range(Selection, Selection.End(xlToRight)).Select
Selection.Copy
Range("AS9").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues, Operation:=xlNone, SkipBlanks _
:=False, Transpose:=True
Range("AT8").Select
Application.CutCopyMode = False
```

Anhang

```
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert Kapazitaet 0,01945-0,04815s"
Range(Cells((z + 1), (a + 2)), Cells((z + 1), (a + (a + 41))))).Select
Range(Selection, Selection.End(xlToRight)).Select
Selection.Copy
Range("AT9").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues, Operation:=xlNone, SkipBlanks _
:=False, Transpose:=True
Range("AU8").Select
Application.CutCopyMode = False
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Capacity (µF/cm2)"
Range("AU9").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=((RC[-1]-RC[-2])*(-1))/2)/1000000/R9C51"
Range("AU9").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range("AU9:AU" & (g + 8))
```

End Sub

IV_Ramp_Auswertung:

Option Explicit

Sub IV_Ramp_Auswertung()

```
Dim a As Integer, b As Integer, C As String, d As Integer, e As String, f As
Integer, g As Integer, h As Integer, i As Integer
Dim j As Integer, k As Integer, l As Integer, m As String, n As String, o As
String, p As Integer, q As Integer, r As Integer
Dim t As Integer, u As Integer, v As Integer, w As Integer, x As Integer, y As
Integer, aa As Integer, ab As Integer, ac As Integer, ad As Integer
Dim ae As Integer, af As Integer, ag As Integer, ah As Integer, ai As Integer,
aj As Integer, ak As Integer, al As Integer, am As String, an As Integer
```

```
C = InputBox("Ordnername (Speicherort) eingeben")
o = InputBox("Neuen Dateinamen eingeben!")
r = InputBox("Dateinamen (ohne .ASC, muss eine ganze Zahl sein) des hoechsten
IV-Sweeps eingeben")
b = 0
f = 1
i = 4
d = 2
p = 150 / 3
q = (r + 2)
a = q / 3
x = 1
v = 1
ai = 50
aj = 2
```

Anhang

```
Workbooks.Add
ActiveWorkbook.SaveAs ("D:\Messdaten HEKA EPC10\Ausgewertete Daten\" & C &
"\ " & o)
ActiveWorkbook.Sheets.Add
Worksheets(1).Name = ("IV 1-") & d

If a > p Then

    a = p
    GoTo Top1

ElseIf a > b Then

Top1:      Do While a > b

                j = -4
                m = ""
                h = 1
                k = 0
                l = 1
                ac = -150
                ad = 19

                e = ("D:\Messdaten HEKA EPC10\ThomasEXDATA\" & C & "\ " & d &
".Asc")

                Worksheets(("IV 1-") & d).Select

                With ActiveSheet.QueryTables.Add(Connection:= _
                "TEXT;" & e, Destination:=Range("A1"))
                der Ascii-Files
                'Einladen

                .FieldNames = True
                .RowNumbers = False
                .FillAdjacentFormulas = False
                .PreserveFormatting = True
                .RefreshOnFileOpen = False
                .RefreshStyle = xlInsertDeleteCells
                .SavePassword = False
                .SaveData = True
                .AdjustColumnWidth = True
                .RefreshPeriod = 0
                .TextFilePromptOnRefresh = False
                .TextFilePlatform = 850
                .TextFileStartRow = 1
                .TextFileParseType = xlFixedWidth
                .TextFileTextQualifier = xlTextQualifierDoubleQuote
                .TextFileConsecutiveDelimiter = False
                .TextFileTabDelimiter = True
                .TextFileSemicolonDelimiter = False
                .TextFileCommaDelimiter = False
                .TextFileSpaceDelimiter = False
                .TextFileColumnDataTypes = Array(1, 1, 1)
                .TextFileFixedColumnWidths = Array(13, 15)
```

Anhang

```
.TextFileDecimalSeparator = "."
.TextFileThousandsSeparator = " "
.TextFileTrailingMinusNumbers = True
.Refresh BackgroundQuery:=False

Worksheets("IV 1-" & d).Activate
'Zeit in Spalte E
Range("E3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Zeit (s)"
Range("E4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-4]"
Range("E4").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range("E4:E89"),
Type:=xlFillDefault
Range("E4:E89").Select
Selection.NumberFormat = "General"

While h < 14
'Sweeps 1-10 in Spalte F-R

Select Case 1

Case Is = 1
m = "F"
Case Is = 2
m = "G"
Case Is = 3
m = "H"
Case Is = 4
m = "I"
Case Is = 5
m = "J"
Case Is = 6
m = "K"
Case Is = 7
m = "L"
Case Is = 8
m = "M"
Case Is = 9
m = "N"
Case Is = 10
m = "O"
Case Is = 11
m = "P"
Case Is = 12
m = "Q"
Case Is = 13
m = "R"
End Select

Worksheets("IV 1-" & d).Activate
Range(m & "2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Sweep " &
h
Range(m & "3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Tracel
```


Anhang

```
(pA) "
Range(m & "4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=R[" & k &
"]C[" & j & "]"*10^12"
Range(m & "4").Select
Selection.AutoFill
Destination:=Range(m & "4:" & m & "89")
Worksheets("IV 1-" &
d).Range(Cells(5, ad), Cells(5, ad)) = ac
    h = h + 1
    j = j - 1
    k = k + 90
    l = l + 1
    ac = ac + 25
    ad = ad + 1
Wend
End With
With Worksheets("IV 1-" & d)
    .Select
    Range("S3").Select
'Mittelwert Spalte S
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert je Sweep von Spalte
F-R ( je Zeile 29-64) "
    .Cells(3, 19).Select
    .Range(Cells(4, 19), Cells(4, (19 + 12))) =
"=AVERAGE(R[25]C[-13]:R[60]C[-13]) "
End With
f = f + 1
d = d + 3
Sheets(1).Select 'Arbeitsblaetter
sortieren
ActiveWorkbook.Sheets.Add
Sheets(1).Select
Worksheets(1).Name = ("IV 1-" & d
Sheets(1).Select
Sheets(1).Move After:=Sheets(f)
b = b + 1
Loop
Top2: If (MsgBox("Graphische Auswertung ja/nein", 4) = vbYes) Then
'Mittelwerte einfügen und Zeit
Worksheets("IV 1-" & d).Select
Worksheets("IV 1-" & d).Name = ("Mean IV")
af = 1
ag = 1
```

Anhang

```
ae = 4
ah = -150
```

```
While ag < 14
```

```
    With Worksheets("Mean IV")
        .Select
        .Range(Cells(ae, 1), Cells(ae, 1)) = af
        .Range(Cells(ae, 2), Cells(ae, 2)) = ah
    End With
    ag = ag + 1
    af = af + 1
    ae = ae + 1
    ah = ah + 25
```

```
Wend
```

```
ak = 3
While ai > 0
```

```
    With Worksheets("Mean IV")
```

```
        .Select
        .Range(Cells(1, ak), Cells(1, ak)) = "IV 1-" &
aj
        .Range(Cells(2, ak), Cells(2, ak)) = "Mean
Current"
```

```
    End With
```

```
        Sheets("IV 1-" & aj).Select
        Range("S4").Select
        Range(Selection,
Selection.End(xlToRight)).Select
        Selection.Copy
        ActiveWindow.ScrollWorkbookTabs Position:=xlLast
        Sheets("Mean IV").Select
        Range(Cells(4, ak), Cells(4, ak)).Select
        Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues,
Operation:=xlNone, SkipBlanks _
        :=False, Transpose:=True
```

```
    With Worksheets("Mean IV")
```

```
        .Range(Cells(18, ak), Cells(18, ak)).Select
        ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SLOPE(R[-10]C:R[-
6]C,R8C2:R12C2) "
        .Range(Cells(19, ak), Cells(19, ak)).Select
        ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RSQ(R[-11]C:R[-
7]C,R8C2:R12C2) "
```

Anhang

```
.Range("B20:B20") = "time (h)"
.Range("B21:B21") = "Conductance (µS/cm2)"
.Range(Cells(21, ak), Cells(21, ak)).Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=R[-3]C/
(( (0.011/2)^2)*3.14159)/1000"

End With

With Worksheets("Mean IV")
.Range("B18:B18").Value = "Steigung +50 mV bis -50
mV"
.Range("B19:B19").Value = "Bestimmtheitsmass d.
Steigung"
End With

aj = aj + 3
ak = ak + 1
al = al + 1
ai = ai - 1
Wend

Else: GoTo Top3
End If

Top3:      If (MsgBox("Weitere Datenblaetter noetig? (Nur bei mehr als 150
Blaetter (Sweeps) pro Arbeitsmappe!)", 4) = vbYes) Then

MsgBox ("Datenmenge zu gross fuer eine Arbeitsmappe! Neues
Datenblatt muss erstellt werden.")
n = InputBox("Bitte Dateinamen fuer neue Arbeitsmappe
eingeben!")

ActiveWorkbook.Activate
ActiveWorkbook.Close
Workbooks.Add
ActiveWorkbook.SaveAs ("D:\Messdaten HEKA EPC10\Ausgewertete
Daten\" & C & "\" & n)
p = p + (150 / 3)
a = a + 50
f = 1
ai = 50
ActiveWorkbook.Sheets.Add
Worksheets(1).Name = ("IV 1-") & d
ActiveWorkbook.Activate
GoTo Top1
End If

End If

End Sub
```

Anhang

IV_Ramp_Auswertung_Mean:

Option Explicit

Sub IV_Ramp_Auswertung_Mean()

Dim ae As Integer, af As Integer, ag As Integer, ah As Integer, ai As Integer,
aj As Integer, ak As Integer, d As Integer, a As Integer, b As Integer

a = InputBox("Bitte niedrigsten Sweep des Arbeitsblattes angeben!")

d = InputBox("Bitte höchsten Sweep des Arbeitsblattes angeben!")

ai = 150 / 3

aj = a

b = 50 - ((d - a) / 3)

If b > 0 Then

ai = ai - b

GoTo Top1

Else

GoTo Top1

End If

Top1:

Worksheets("IV 1-" & d).Select

Worksheets("IV 1-" & d).Name = ("Mean IV")

af = 1

ag = 1

ae = 4

ah = -150

While ag < 14

With Worksheets("Mean IV")

.Select

.Range(Cells(ae, 1), Cells(ae, 1)) = af

.Range(Cells(ae, 2), Cells(ae, 2)) = ah

End With

ag = ag + 1

af = af + 1

ae = ae + 1

ah = ah + 25

Wend

ak = 3

While ai > 0

With Worksheets("Mean IV")

Anhang

```
.Select
.Range(Cells(1, ak), Cells(1, ak)) = "IV 1-" &
aj
.Range(Cells(2, ak), Cells(2, ak)) = "Mean
Current"

End With

Sheets("IV 1-" & aj).Select
Range("S4").Select
Range(Selection,
Selection.End(xlToRight)).Select
Selection.Copy
ActiveWindow.ScrollWorkbookTabs Position:=xlLast
Sheets("Mean IV").Select
Range(Cells(4, ak), Cells(4, ak)).Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues,
Operation:=xlNone, SkipBlanks _
:=False, Transpose:=True

With Worksheets("Mean IV")

.Range(Cells(18, ak), Cells(18, ak)).Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SLOPE(R[-10]C:R[-
6]C,R8C2:R12C2) "

.Range(Cells(19, ak), Cells(19, ak)).Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RSQ(R[-11]C:R[-
7]C,R8C2:R12C2) "

.Range("B20:B20") = "time (h)"
.Range("B21:B21") = "Conductance (µS/cm2)"
.Range(Cells(21, ak), Cells(21, ak)).Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=R[-3]C/
(((0.011/2)^2)*3.14159)/1000"

End With

With Worksheets("Mean IV")
.Range("B18:B18").Value = "Steigung +50 mV bis -50
mV"
.Range("B19:B19").Value = "Bestimmtheitsmass d.
Steigung"

End With

aj = aj + 3
ak = ak + 1

ai = ai - 1
Wend

End Sub
```

Anhang C: Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema: Lab-on-Chip-Biosensor.....	2
Abbildung 2: Beispiel: tierische Zelle mit Kompartimenten.....	4
Abbildung 3: Fluid-Mosaik-Modell.....	6
Abbildung 4: Lipidvesikel Aufbau.....	7
Abbildung 5: BLM Aufbau.....	8
Abbildung 6: sBLM Aufbau.....	10
Abbildung 7: tBLM Aufbau.....	11
Abbildung 8: Valinomycin mit komplexiertem K ⁺ -Ion.....	13
Abbildung 9: Mechanismus des Ionentransports durch einen Carrier.....	13
Abbildung 10: Biotin-Valinomycin.....	13
Abbildung 11: Manipulation des Ionentransports von Biotin-Valinomycin durch Streptavidin.....	14
Abbildung 12: Schaltkreis Voltage-Clamp-Methode des HEKA EPC10 Verstärkers.....	19
Abbildung 13: BLM-Küvette.....	21
Abbildung 14: Schema: Zusammenbau der BLM-Küvette.....	22
Abbildung 15: Schema zur Kapazitätsbestimmung (C).....	23
Abbildung 16: "C-Check"-PGF.....	25
Abbildung 17: "C-Save"-PGF.....	26
Abbildung 18: "IV-Ramp"-PGF.....	27
Abbildung 19: "Ramp"-PGF.....	29
Abbildung 20: Spannung der Arbeitselektrode gegen die Zeit bei der Abfolge der PGFs.....	30
Abbildung 21: "Steps"-PGF.....	31
Abbildung 22: "Zappuls"-PGF.....	32
Abbildung 23: Schema zur Bildung von BLMs.....	33
Abbildung 24: Strom-Spannungskennlinie.....	41
Abbildung 25: Veränderung der IV-Rampen nach der Zugabe von Valinomycin.....	42
Abbildung 26: "high frequency generator".....	45
Abbildung 27: Kapazitätskinetik von Ethanol.....	56
Abbildung 28: Kapazitätskinetik von Valinomycin.....	57
Abbildung 29: Kapazitätskinetik von Biotin-Valinomycin.....	58
Abbildung 30: Leitfähigkeitskinetik Kontrolle.....	60
Abbildung 31: Leitfähigkeitskinetik von Valinomycin.....	61
Abbildung 32: Leitfähigkeitskinetik von Valinomycin.....	62
Abbildung 33: Leitfähigkeitskinetiken von Biotin-Valinomycin.....	63

Anhang D: Daten-DVDs

