

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Experimentalphysik – E14

Kraftspektroskopie mit Nanoporen

Stephan Paul Dominik Renner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Alejandro Ibarra

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Friedrich C. Simmel
2. Univ.-Prof. Dr. Ulrich Gerland,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 19.09.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 25.10.2011 angenommen.

Kraftspektroskopie mit Nanoporen

Stephan Paul Dominik Renner



München 2011

Kraftspektroskopie mit Nanoporen

Stephan Paul Dominik Renner

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München
München

vorgelegt von
Stephan Paul Dominik Renner
aus München

München, den 19.9.2011

Erstgutachter: Prof Dr. Friedrich C. Simmel

Zweitgutachter: Prof Dr. Ulrich Gerland

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Zusammenfassung | xiii |
| 1 Das erste Kapitel | 1 |
| 1.1 Einleitung | 1 |
| 1.2 DNA-Translokationsexperimente | 6 |
| 1.3 Nanoporen-Kraftspektroskopie | 10 |
| 1.4 Nanoporen aus Festkörpern | 13 |
| 1.5 Protein-Nanoporen | 14 |
| 1.6 Mechanismus der Porenbildung | 16 |
| 1.7 Lipidmembranen | 18 |
| 1.8 Thermodynamische Stabilität von DNA Sekundärstrukturen | 23 |
| 1.9 Phänomenologisches Modell der Translokation | 26 |
| 1.10 Mesoskopisches Modell | 31 |
| 1.11 Berechnung der Energielandschaften | 34 |
| 1.12 Konstante Kraft und lineare Spannungsrampen | 36 |
| 1.13 Vergleich der Modelle | 39 |
| 1.14 Rauschen bei NFS | 40 |
| 1.15 Statistische Methoden | 42 |
| 2 Material und Methoden | 45 |
| 2.1 Aufbau des Messplatzes | 45 |
| 2.1.1 Droplet Interface Bilayer Setup (DIB) und Mikroskopaufbau | 45 |
| 2.1.2 Messkammer und Temperaturkontrolle | 50 |
| 2.1.3 Regelkreis für das Einfangen von DNA | 52 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.2 | Fangen von DNA mit der Ankertechnik | 54 |
| 2.3 | Probenpräparation - RNA | 56 |
| 2.4 | Protokoll zur Herstellung der Membran | 58 |
| 2.5 | Analysesoftware | 58 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion | 63 |
| 3.1 | Spannungskontrollierte Inkorporation von einzelnen Nanoporen | 63 |
| 3.1.1 | Spannungsabhängigkeit der α -HL Inkorporationsrate | 64 |
| 3.1.2 | Salz- und pH-Abhängigkeit der α -HL Inkorporationsrate | 69 |
| 3.1.3 | Spannungsabhängigkeit der Inkorporationsrate von MspA | 70 |
| 3.1.4 | Zusammenfassung der Spannungsabhängigkeit der Inkorporationsraten | 71 |
| 3.1.5 | Pulsprotokoll für die kontrollierte Inkorporation | 72 |
| 3.2 | Translokation eines DNA-Hairpins und eines G-Quadruplexes | 73 |
| 3.2.1 | Translokation eines DNA-Hairpins mit konstanter Spannung | 73 |
| 3.2.2 | Messungen mit Spannungsrampen | 75 |
| 3.3 | Sequenzspezifische Stabilität von DNA-Hairpins | 80 |
| 3.4 | DNA-Hairpin und G-Quadruplex im α -HL Vorhof | 90 |
| 3.5 | Translokation in Vorwärts- und Rückwärts-Richtung | 95 |
| 3.6 | Sequenzspezifische Stabilität von DNA-Hairpins bei Translokationen von trans nach cis | 97 |
| 4 | Ausblick | 101 |
| 4.1 | Aptamer-Target-Bindung | 101 |
| 4.2 | Nanoporen aus DNA-Origami | 104 |
| 4.3 | NFS an RNA Strukturen | 108 |
| 4.4 | Experimente mit chipbasierten Plattformen | 110 |
| A | Schaltpläne für die Hardware | 115 |
| B | Software | 119 |
| C | Sequenzen der verwendeten DNA | 125 |
| D | Qualität der α-HL Poren | 127 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Poren in der Natur und Biotechnologie | 2 |
| 1.2 | Konzept NFS | 4 |
| 1.3 | Standardaufbau eines Nanoporenexperiments | 7 |
| 1.4 | Ankerteknik | 12 |
| 1.5 | MspA und α -HL im Querschnitt | 15 |
| 1.6 | Poren Bildungsmechanismus | 17 |
| 1.7 | Montal Mueller Technik | 19 |
| 1.8 | Lipidmembran auf Glas-Chip | 20 |
| 1.9 | Droplet Interface Bilayer | 21 |
| 1.10 | Translokation als einstufiger Prozess | 26 |
| 1.11 | Translokationsdauer bei Konstantspannungsexperimenten | 30 |
| 1.12 | Vorgehensweise Mesoskopisches Modell | 33 |
| 1.13 | Energielandschaften ausgewählter Hairpins | 35 |
| 1.14 | Kraftrampen und konstante Spannungen | 37 |
| 1.15 | Einfluss der Membranfläche auf das elektrische Rauschen | 41 |
| 1.16 | Integrierte Histogramme und gleitender Mittelwert | 43 |
| 2.1 | Schematische Darstellung des Aufbaus | 47 |
| 2.2 | Regelkreis Heizung | 51 |
| 2.3 | Einfluss der Filters bei Fangen von DNA | 53 |
| 2.4 | Ankerteknik | 55 |
| 2.5 | RNA Gel | 57 |
| 2.6 | Schema Datenanalyse | 61 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.1 | Pulsrampen zur Messung der Inkorporationswahrscheinlichkeit | 65 |
| 3.2 | pH Abhängigkeit der Inkorporation | 68 |
| 3.3 | Inkorporationswahrscheinlichkeit MspA | 70 |
| 3.4 | Kontrollierte Inkorporation durch Spannungspulse | 72 |
| 3.5 | Translokation eines Hairpins bei konstanter Spannung | 74 |
| 3.6 | NFS mit Spannungsrampen | 76 |
| 3.7 | Vergleich der Stabilität eines Hairpins mit der eines G-Quadruplexes | 78 |
| 3.8 | DNA Schmelzkurven | 81 |
| 3.9 | NFS Daten von AT6GC6 und GC6AT6 | 83 |
| 3.10 | Kritische Translokationsspannungen von AT6GC6 und GC6AT6 | 84 |
| 3.11 | Energielandschaften ausgewählter Hairpins | 85 |
| 3.12 | Energielandschaft mit angelegter Kraft | 86 |
| 3.13 | Translokationsdauer bei verschiedenen Rampengeschwindigkeiten | 87 |
| 3.14 | Vergleich mesoskopisches Modell und Experiment 1 | 89 |
| 3.15 | Größenvergleich α -HL und DNA | 90 |
| 3.16 | Hairpin-Anker und Quadruplex-Anker | 92 |
| 3.17 | Einfluss des Quadruplex-Ankers bei verschiedenen Hairpins | 93 |
| 3.18 | Einfluss der Translokationsrichtung | 96 |
| 3.19 | Daten und Vorhersagen bei Translokation in Rückwärts-Richtung | 98 |
| 3.20 | verwendete DNA-Hairpins | 99 |
| 4.1 | NFS Experimente mit Aptamer und Target | 102 |
| 4.2 | Stabilität des ATP Aptamers | 103 |
| 4.3 | Schema Origami Nanopore | 105 |
| 4.4 | Messung Origami Nanopore | 107 |
| 4.5 | Vergleich DNA und RNA | 109 |
| 4.6 | Zugabe von Lösungsmitteln in die Membran | 110 |
| 4.7 | NFS mit Nanion Chip | 112 |
| 4.8 | Translokation von zwei Hairpins | 113 |
| A.1 | Schaltplan Aufbau | 117 |
| A.2 | Schaltplan Optokoppler | 118 |

| | | |
|-----|---|-----|
| B.1 | Klassendiagramm | 120 |
| B.2 | automatische Detektion normaler Translokationen 1 | 121 |
| B.3 | automatische Detektion normaler Translokationen 2 | 122 |
| B.4 | automatische Detektion normaler Translokationen 3 | 123 |
| D.1 | Qualität der α -HL Poren 1 | 127 |
| D.2 | Qualität der α -HL Poren 2 | 128 |
| D.3 | Qualität der α -HL Poren 3 | 128 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|-----|
| 3.1 | Werte für τ_0 und V_β für α -HL und MspA bei verschiedenen Bedingungen. . | 71 |
| C.1 | Verwendete DNA Sequenzen | 125 |

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde, unter anderem, die Translokation von DNA-Hairpins durch eine alpha-hemolysin (aHL) Nanopore in einer Lipidmembran untersucht. Dafür wurde zunächst ein neuartiger Messaufbau entwickelt, bei welchem eine äußerst stabile Lipidmembran zwischen zwei mikroskopisch kleinen Wassertröpfchen, in einem Lipid-Öl-Bad, hergestellt wird (DIP, droplet interface bilayer). Dadurch konnte ein minimales Probenvolumen, bei einer äußerst stabilen Membran und geringem Rauschen, erreicht werden. Mit diesem Aufbau wurde entdeckt, dass die Inkorporationsrate von aHL und MspA exponentiell mit der angelegten Spannung steigt. Durch diesen Effekt kann die Inkorporation einer einzelnen Pore, über die angelegte Spannung, kontrolliert werden.

Die Translokation von DNA Molekülen durch einzelne Poren konnte, anhand der Blockade des Ionenstromflusses, detektiert werden. Gleichzeitig wurde die elektrophoretische Kraft, auf die geladene DNA, durch die angelegte Spannung kontrolliert. Da doppelsträngige DNA nicht durch die Engstelle in der Pore passt, werden DNA-Hairpins während der Translokation entfaltet. Mit der Nanoporenkraftspektroskopie (NFS) kann die spannungsabhängige Dauer dieser Entfaltung gemessen werden. In einer ersten Studie konnte gezeigt werden, dass ein DNA-Hairpin aus zehn Basenpaaren deutlich instabiler ist, als ein G-Quadruplex aus acht Basen.

In weiteren Untersuchungen wurden zwei DNA-Hairpins miteinander verglichen, welche dieselbe thermodynamische Stabilität besitzen, aber eine um den Faktor hundert unterschiedliche Translokationsdauer aufweisen. Mit Hilfe von Thermodynamischen Tabellen konnte die Energielandschaft der Hairpins berechnet werden, und dieser Unterschied durch das mesoskopische Modell erklärt werden. Durch die Einführung einer Anker-Technik konnten NFS Messungen auch in Rückwärts-Richtung durchgeführt werden, ohne den Einfluss des Vorhofs der aHL-Pore. Durch die Messung der Stabilität von 11 verschiedenen DNA-Hairpins, konnten die Vorhersagen der Translokationsdauer durch das mesoskopische Modell bestätigt werden, und die dafür nötigen Fitparameter ermittelt werden. Dieses Modell kann nun für die Vorhersage der Stabilität beliebiger DNA-Hairpins verwendet werden, was eine wichtige Grundlage für weitere Experimente, mit komplizierteren DNA-Strukturen und Aptameren, darstellt.

Kapitel 1

Das erste Kapitel

1.1 Einleitung

Die kleinsten Einheiten des Lebens sind die Zellen. Jeder Organismus ist aus diesen Bausteinen aufgebaut. Zellen haben ihren eigenen Stoffwechsel und können sich teilen und vermehren. Für diese herausragenden Fähigkeiten ist es unabdingbar, dass eine Zelle von der Außenwelt getrennt ist und kontrolliert Nährstoffe aufnehmen kann. Diese komplexe Aufgabe wird durch die Zellmembran und die darin eingebetteten Proteine bewältigt. Die Zellmembran verhindert, dass Stoffe aus der Zelle entweichen oder in die Zelle eindringen können. Durch die Proteine in der Membran wird der gesteuerte Transport ermöglicht. Die Abgrenzung wird dabei durch die hydrophobe Schicht in der Membran erreicht, welche insbesondere von geladenen oder großen Molekülen schlecht durchdrungen werden kann.

Wenn diese Wand z.B. durch kleine Löcher geschädigt wird, können Ionen unkontrolliert aus der Zelle heraus oder in die Zelle hinein diffundieren und die Homöostase der Zelle kann so weit gestört werden, dass die Zelle stirbt. Dieses Prinzip nutzen viele Bakterien, um sich einen Vorteil gegenüber Nahrungskonkurrenten zu verschaffen. Dafür produzieren und sekretieren sie Poren bildende Toxine[10], welche Feinde und Konkurrenten in der Umgebung schaden oder abtöten. Auch ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems, das Komplementsystem, bildet gezielt Löcher in den Zellmembranen der attackierten Zellen. Proteinporen werden von Zellen allerdings nicht nur als “biologische Waffen“ eingesetzt, sie dienen beispielsweise auch dem kontrollierten und spezifischen Transport von Nährstoffen Proteinen, Ionen, Wasser und anderen Molekülen oder auch der Signalleitung und Signalverarbeitung in Nervenzellen[68].

Poren sind für die Bio- und Nanotechnologie von großer Bedeutung. Über Poren können beispielsweise Signale in Form von elektrischen Impulsen oder Licht[6] in lebende Zellen induziert werden (vgl. Abb.1.1 g), was im Gegensatz zu chemischen Signalen um ein Vielfaches schneller ist.

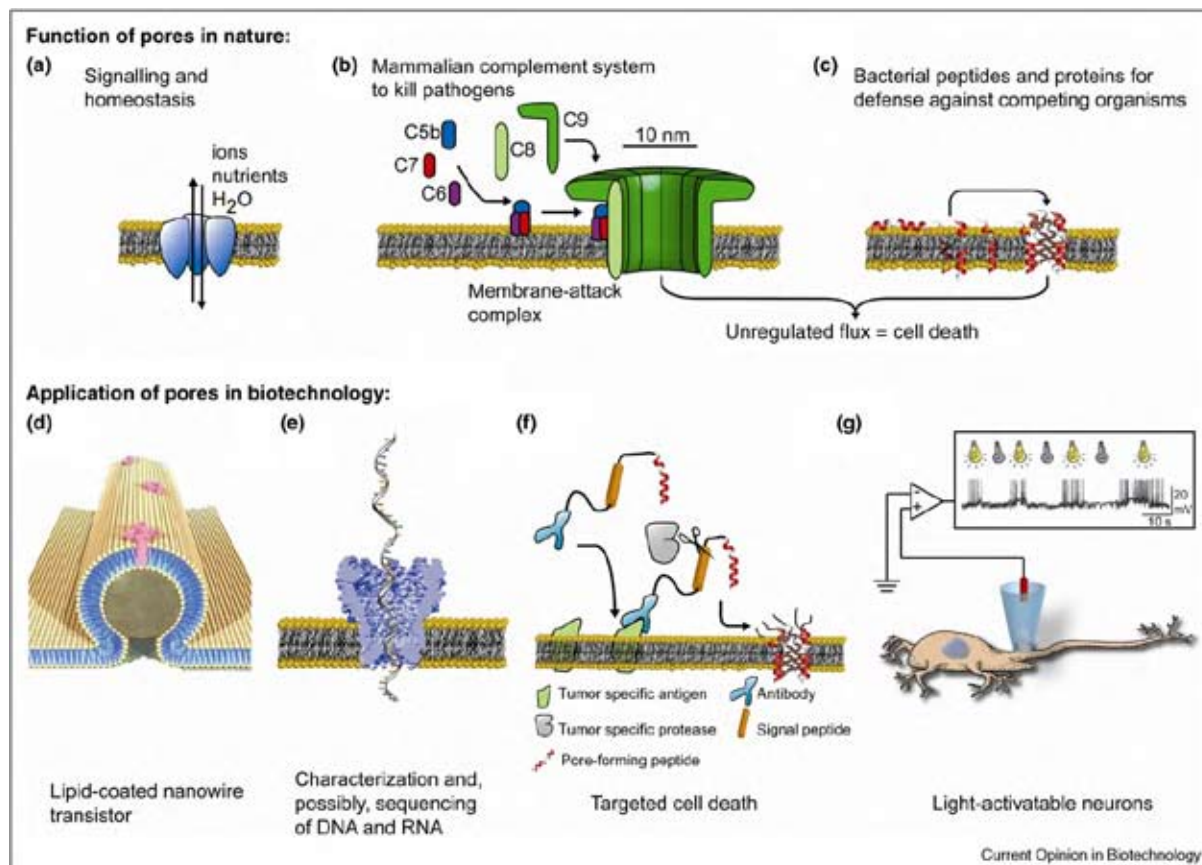


Abbildung 1.1: Die natürliche Aufgabe von Poren in der Zellmembran beinhaltet den Austausch von Signalen und den kontrollierten Stofftransport zur Aufrechterhaltung der Homöostase (a). Ebenso werden Poren als biologische Waffen eingesetzt, welche Löcher in die Zellmembranen der Zielzellen erzeugen und damit einen unkontrollierten Ionenfluss auslösen und somit die Zelle töten (b & c). Poren können aber beispielsweise auch dazu verwendet werden um elektrische Signale in chemische umzuwandeln (d), Moleküle zu detektieren und analysieren (e), neue Wirkstoffe zu entwickeln (f) oder um Lichtgesteuerte Reaktionen in Zellen auszulösen (g). (Abbildung übernommen aus[68].)

Eine andere sehr interessante Anwendung macht sich die toxische Wirkung von Poren zu Nutze, indem versucht wird Poren gezielt zur Tötung von Krebszellen zu nutzen. In der Krebstherapie werden dringend hoch spezifische Wirkstoffe benötigt, was durch eine Kaskade von zellspezifischen Einzelschritten zur Aktivierung des Wirkstoffs erreicht werden

könnte. In Abb. 1.1 f) ist ein Beispiel für solch eine Kaskade dargestellt: Ein Poren bildendes Protein wird über einen Antikörper gezielt an eine Tumorzelle angebunden. In einem zweiten Schritt wird eine toxische Pore direkt auf der Zelle durch eine tumorspezifische Protease aktiviert. Durch solche Mechanismen könnten wirkungsvolle und nebenwirkungsarme Medikamente gegen verschiedene Krankheiten entwickelt werden.

Poren können auch sehr gut als Sensoren für einzelne Moleküle verwendet werden. Dabei stehen im Wesentlichen zwei Detektionsverfahren zur Verfügung. Zum Einen können fluoreszierende Stoffe, welche durch die Pore translokieren, optisch detektiert werden. Durch die Verwendung einer Kamera kann solch eine Messung sehr einfach parallelisiert werden[56, 74]. Zum Anderen kann der Ionen-Stromfluss durch eine Pore elektrisch gemessen werden. Dieser kann sich verändern, wenn beispielsweise Proteine an die Pore anbinden oder DNA durch die Pore transloziert wird. Die Messung des elektrischen Stromflusses bietet dabei die Möglichkeit, eine Veränderung der Leitfähigkeit einer Pore mit hoher zeitlicher Auflösung zu messen. Es gibt verschiedene Ursachen für die Änderung der Leitfähigkeit von Poren, welche für die Sensorik genutzt werden können. Eine Veränderung der Leitfähigkeit kann beispielsweise durch eine Veränderung des pH Werts, das Anbinden von Liganden, Veränderungen in der Lipidkomposition, mechanische Spannungen oder elektrische Impulse hervorgerufen werden. Eine andere Ursache für eine Veränderung des Leitwerts einer Pore kann die Translokation eines Moleküls sein, wodurch der Ionenfluss behindert wird (vgl. Abb.1.1 e). Diese Methode ist im Prinzip ein molekularer “Coulter-Counter“ mit welchem nicht nur einzelne Moleküle[45, 65, 114, 37] mit einer hohen Zeitauflösung detektiert werden können, sondern auch einzelne Polymere wie DNA[76] oder PEG[98] nach ihrer Länge unterschieden werden können. Es wurde auch gezeigt, dass unterschiedliche Basen der DNA einen charakteristischen verbleibenden Stromfluss haben wenn sie in der Pore sind. Anhand dieses Stromflusses können Homopolymere aus verschiedenen Basen unterschieden werden[78]. Durch diese Erkenntnisse motiviert wurde intensiv an einer möglichen Sequenzierung von DNA während der Translokation durch eine Nanopore geforscht[1, 22, 32, 9, 111, 15, 20, 24, 121, 75]. Durch große technische Fortschritte ist es in den letzten Jahren gelungen, den Preis für die Sequenzierung eines kompletten menschlichen Genoms um ein Vielfaches zu verringern und es wächst die Hoffnung, bald eine komplette Sequenzierung für \$1000 durchführen zu können. In dem daraus entstehenden Massenmarkt könnte die Sequenzierung mit Nanoporen ein kosteneffizientes Mittel sein, allerdings gibt es noch viele technische Herausforderungen und letztlich ist es fraglich, welche Methode für die Sequenzierung am kosteneffizientesten ist[9].

Parallel zu der Forschung an der Sequenzierung wurden auch vielversprechende andere Experimente mit Nanoporen durchgeführt. Beispielsweise konnte DNA innerhalb einer Pore gefangen werden und durch Variation der angelegten Spannung eine Kraft auf die negativ geladene DNA ausgeübt werden[72]. Dadurch können Kraftspektroskopische Messungen an DNA-Hairpins durchgeführt werden. In Abb. 1.2 ist eine α -HL Pore zusammen mit einem

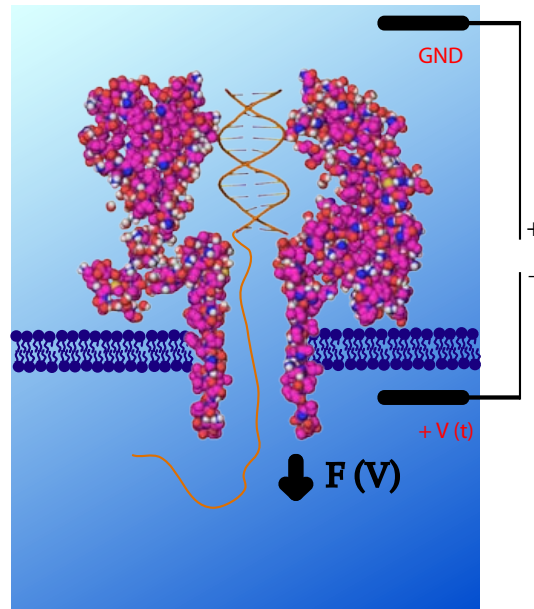


Abbildung 1.2: Bei der Nanoporen Kraftspektroskopie (NFS) wird über eine angelegte Spannung eine elektrophoretische Kraft auf die negative DNA innerhalb der Pore ausgeübt. Im Bild ist zu erkennen, dass der doppelsträngige Teil der DNA nicht durch die Pore passt. Die DNA wird durch die angelegte Kraft während der Translokation entfaltet. Aus der Kraft welche für die Entfaltung nötig ist können Rückschlüsse auf die Stabilität der DNA Sekundärstruktur gezogen werden. Dies ist unter anderem bei Aptameren interessant, welche eine funktionale DNA Sekundärstruktur bilden und dadurch an andere Moleküle oder Proteine binden können und deren Funktion beeinflussen können. Diese Aptamere können beispielsweise als Wirkstoffe in der Pharmaindustrie[87] und zum Nachweis spezieller Stoffe (z.B. Kokain[54]) verwendet werden[51]. In dieser Abbildung ist ein DNA-Duplex dargestellt. In den meisten Messungen wurden DNA-Hairpins verwendet.

DNA-Duplex dargestellt. Diese Pore ist gerade groß genug, dass einzelsträngige DNA translokieren kann. Der doppelsträngige Teil des Hairpins muss dagegen erst entfaltet werden, was durch thermische Fluktuationen spontan geschehen kann[141] und durch Angelegen einer Kraft zusätzlich beschleunigt wird. Durch statistische Mittelung der Entfaltungsdauer über mehrere hundert Einzelmolekül-Versuche bei verschiedenen starker Kraft können Rückschlüsse auf die Stabilität der Sekundärstruktur und deren natürliche Entfaltungsdauer

in Lösung getroffen werden. Da es sich hierbei um ein Einzelmolekül-Experiment handelt, können auch Eigenschaften gemessen werden, welche in Ensemble-Messungen herausgemittelt werden. Dies ist insbesondere interessant für Hairpins, die eine funktionelle Struktur besitzen, wie z.B. Aptamere. Diese Aptamere können beispielsweise als Wirkstoffe in der Pharmaindustrie[87] und zum Nachweis spezieller Stoffe verwendet werden[51]. So ist es bereits gelungen, die Anwesenheit von Kokain mit einem Kokain binden Aptamer in einem Nanoporenexperiment nachzuweisen[54].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, mit der rauscharme und zeitlich hochaufgelöste Kraftspektroskopiemessungen an DNA-Hairpins weitgehend automatisiert und mit einer hohen Erfolgsquote durchgeführt werden können. Zudem wird nur ein sehr kleines Probenvolumen von etwa $5 \mu\text{l}$ benötigt, wodurch das System auch für teure oder schwer zugängliche Analyten geeignet ist. Mit Hilfe dieses Systems wurde die Stabilität verschiedener DNA-Hairpins und anderen DNA Motiven, wie z.B. DNA G-Quadruplexen, untersucht. Ebenso wurde eine Möglichkeit gefunden den Einbau von Poren effizient durch das Anlegen einer Spannung zu steuern. Diese Methode erleichtert die Herstellung einzelner Poren deutlich. Ebenso wurde in Zusammenarbeit mit einer theoretischen Forschungsgruppe ein Modell zur Berechnung der Translokationsdauer von DNA-Hairpins etabliert und experimentell überprüft.

1.2 DNA-Translokationsexperimente

Für Experimente mit Nanoporen wird eine sensitive Elektronik benötigt, mit der sehr kleine Ionenströme von wenigen Pikoampere gemessen werden können. Außerdem wird ein experimenteller Aufbau benötigt, mit welchem gezielt einzelne Nanoporen in einer Lipidmembran erzeugt werden können. Die Technik mit der Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle oder Membranporen gemessen werden können, wurde 1976 von Neher und Sakman entwickelt[85], für die sie 1991 den Nobelpreis erhielten. Das Messprinzip für Nanoporen Translokationsexperimente, der Coulter-Counter, wurde bereits 1953 von Wallace Coulter patentiert[130] und durch die Firma Beckmann Coulter kommerzialisiert. Bei diesem Verfahren wird eine Suspension von kleinen Partikeln oder Zellen in wässriger Lösung durch ein enges Loch gepumpt und gleichzeitig ein Ionenstromfluss durch Anlegen einer Spannung induziert. Die Stromstärke des Ionenflusses wird reduziert, wenn sich ein zu detektierendes Partikel innerhalb des Lochs befindet, was elektrisch detektiert werden kann (vgl. Abb.1.3). 1994 gelang es erstmals, mit dieser Methode die Translokation von einzelnen Polyethylenglycol (PEG) Molekülen zu messen[12]. Bei diesem Experiment wurde die Nanopore durch das porenbildende Protein Alamethicin erzeugt. Motiviert von diesen Ergebnissen wurde auch daran gearbeitet künstliche Nanoporen herzustellen. Die Schwierigkeit dabei ist, die Poren so eng herzustellen, dass einzelne Molekülen gerade noch hindurch passen. Dies gelang erstmals 2001[61]. Biologische Nanoporen haben dagegen den Vorteil einer genau definierten Struktur auf atomarer Skala und wurden deshalb in dieser Arbeit verwendet.

Die Entdeckung der am meisten benutzten Pore alpha-hemolysin (α -HL) geht auf die Entdeckung von *Staphylococcus aureus* als menschlichen Krankheitserreger zurück[13]. Mitte der 1960er wurde hochreines α -HL erstmals isoliert und es wurden mittels Elektronenmikroskopie kleine ringförmige Strukturen auf Zellen entdeckt, welche zuvor mit α -HL inkubiert wurden. 1972 vermuteten Mayer et al. dass zunächst wasserlösliche Proteine durch eine Konformationsänderung Poren in einer lipophilen Membran bilden können[73], und es wurde klar, dass die toxische Wirkung von α -HL von der Bildung von kleinen Löchern in den attackierten Zellen ausgeht. Daraufhin war α -HL als einfach zu handhabendes Protein für die Poration von Zellmembranen bekannt.

Bei der ersten Realisierung eines molekularen Coulter-Counters wurde die Pore durch Alamethicin gebildet, das den Nachteil gegenüber α -HL hat, dass es ein spannungsabhängiger Ionenkanal ist, welcher nicht über einen längeren Zeitraum in einem offenen Zustand bleibt[147]. Noch bevor die Kristallstruktur von α -HL 1996 veröffentlicht wurde[110], wur-

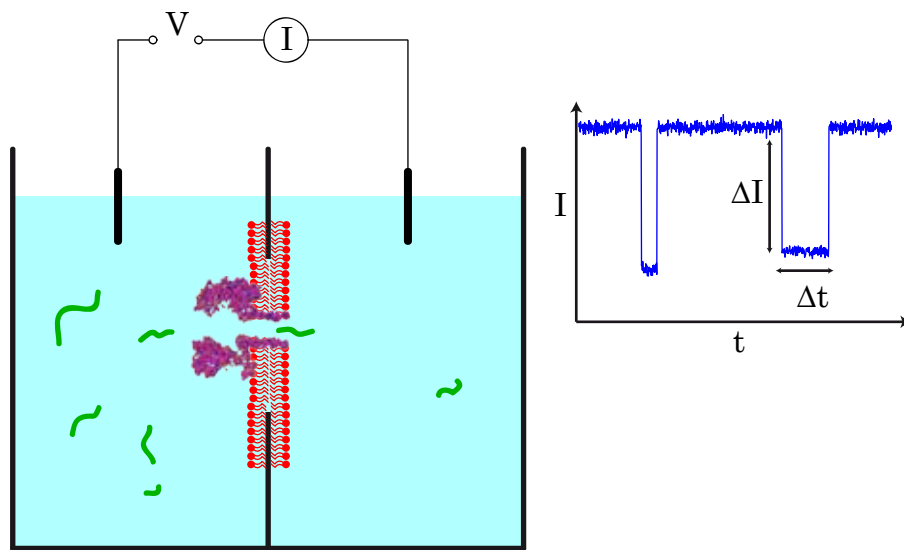


Abbildung 1.3: Bei Nanoporenexperimenten werden immer zwei getrennte Kompartimente durch eine Pore in einer Lipidmembran miteinander verbunden, so dass ein Ionenfluss und damit elektrischer Stromfluss von der einen auf die andere Seite ermöglicht wird. Mit einem Patch-Clamp-Verstärker kann eine Membranspannung angelegt werden und der dadurch verursachte Stromfluss durch die Pore gemessen werden (rechts). Dieser Stromfluss wird teilweise blockiert, wenn Partikel durch die Pore wandern. Anhand der Dauer und Tiefe dieser Blockaden können Rückschlüsse auf die Form und Größe der translokierenden Partikel gezogen werden.

den Kasianowicz et al. darüber informiert, dass der Durchmesser der Pore für die Translokation von einzelsträngiger DNA (ssDNA) geeignet ist. Daraufhin wurde ebenfalls 1996 das erste DNA Translokationsexperiment durchgeführt[53], und die Autoren erkannten bereits, dass es mit dieser Methode prinzipiell möglich sein müsste DNA zu sequenzieren. Dadurch motiviert gab es viele Experimente, in denen die Unterschiede zwischen verschiedenen Basen von RNA[1] und DNA[78] untersucht wurden und der Einfluss der angelegten Kraft[41] und der Länge der DNA[79] studiert wurden. In allen diesen Experimenten wurde nun α -HL verwendet, da diese Proteine gut gelagert und transportiert werden können, die Poren sich einfach inkorporieren lassen und die Poren kaum bis gar nicht zwischen offenen und geschlossenen Konformationen umschalten (gating)[4]. Obwohl basenspezifische Unterschiede bei der DNA Translokation gemessen wurden, ließen die ersten Publikationen auch Zweifel aufkommen, ob mit dieser Technik jemals einzelne Basen aufgelöst werden können. Zum Einen beträgt der Unterschied in der Leitfähigkeit zwischen Purin und Pyrimidinbasen nur etwa 100 Ionen pro Mikrosekunde (bei 100 mV) und die Verweildauer einer Base innerhalb der Pore beträgt lediglich einige Mikrosekunden, sodass das Signal vom Rauschen überdeckt wird[22]. Zum anderen ist die Geometrie von α -HL nicht optimal, um einzelne Basen auflösen zu können, denn es befinden sich stets etwa 10 bis 12 Nukleotide innerhalb der Stammregion der Pore. Diese beeinflussen den Stromfluss gemeinsam[79, 135, 103]. Folglich wurde vorgeschlagen das Signal-zu-Rauschen Verhältnis weiter zu verbessern oder die Translokationsgeschwindigkeit zu verringern und gleichzeitig die Geometrie der Pore zu verbessern. Hagan Bayley gelang es, einen Cyclodextrin-Ring in einer modifizierten α -HL Pore zu verankern[38], wodurch eine noch engere Stelle innerhalb der Pore geschaffen wurde. Damit wurde es möglich einzelne Basen zu identifizieren[20], da dadurch erstens der Unterschied in der Leitfähigkeit der Pore mit einer der verschiedenen Base innerhalb des Cyclodextrin Rings vergrößert wurde und zweitens die Verweildauer einer einzelnen Base innerhalb des Rings auf 2 – 10 ms verlängert wurde. Allerdings wurden in diesem Experiment die Nukleotide nicht als Polymerkette durch die Pore translokiert, sondern einzeln, sodass die Reihenfolge der Basen nicht rekonstruiert werden konnte. Von den Autoren wurde deshalb vorgeschlagen, dass eine Exonuklease auf der Pore fixiert werden könnte, welche eine zu sequenzierende DNA Basenweise hydrolysiert sodass die Reihenfolge der translokierten Nukleotide erhalten bleibt.

Mit einer anderen Strategie gelang es 2010 erstmals, eine 5 Basen lange DNA mit Hilfe einer modifizierten MspA Pore[18] zu sequenzieren[24]. Dabei wurde ein Verfahren verwendet, welches die zu entschlüsselnde DNA durch ein zyklisches Verfahren so modifiziert, dass

jedes Nukleotid der originalen DNA durch ein 17 Basen langes Stück DNA ersetzt wird. Dabei gibt es vier verschiedene 17 Basen lange Stücke und für jede Base der ursprünglichen DNA wird das zugehörige 17 Basen lange Stück in die neue DNA eingebaut. Die entstehende DNA enthält also 17 mal so viele Basen wie die ursprüngliche DNA und ist aus einer Abfolge von vier verschiedenen Blöcken mit je 17 Basen aufgebaut, wobei jeder Block genau einer Base der ursprünglichen DNA entspricht[111]. Alle vier Blöcke enthielten einen identischen 14 Basen langen Teil, an welchen eine komplementäre DNA angelagert wurde und bei der Translokation wieder abgelöst wurde. Dadurch wurden die verbleibenden drei Basen (pro Block) für einige Millisekunden in der Pore gehalten, und eine unterschiedliche Leitfähigkeit konnte gemessen werden.

Die Möglichkeit jede einzelne Base einer DNA in eine bestimmte Sequenz zu übersetzen wird auch bei anderen Methoden der Sequenzierung benutzt. Ob sich diese Methoden allerdings eignen, um ein komplettes menschliches Genom mit 6×10^9 Basen kostengünstig zu sequenzieren, bleibt abzuwarten[15].

1.3 Nanoporen-Kraftspektroskopie

Unabhängig von dem Ziel DNA zu sequenzieren gibt es noch viele andere Anwendungsmöglichkeiten für Nanoporen. Beispielsweise wurde eine 8 Basenpaare lange ssDNA kovalent an die Öffnung des Vorhofs einer α -HL Pore angebunden, so dass diese frei in den Vorhof ragt[44]. Das Anbinden einer komplementären DNA kann mit dieser Pore mit hoher Zeitauflösung elektrisch detektiert werden und somit die Kinetik den An- und Abbindens untersucht werden.

In einem anderen Experiment wurden kurze DNA-Hairpins durch Anlegen einer Spannung in den Vorhof der Pore gezogen, was durch die Reduktion der Leitfähigkeit detektiert werden kann[135]. Da doppelsträngige DNA größer ist als der Durchmesser der Stammregion von α -HL, wird das Hairpin erst nach einer gewissen Zeit durch thermische Fluktuationen entfaltet und anschließend durch den Stamm der Pore translokiert. Dadurch konnte die Entfaltungskinetik von verschiedenen Hairpins untersucht werden.

Bei dieser Technik dauert eine Messung immer so lange, bis das Hairpin thermisch entfaltet wird. Wegen der statistischen Verteilung dieses Prozesses ist es nötig, mehrere hundert Entfaltungsereignisse zu messen, um Aussagen über die Kinetik treffen zu können. Die Lebenszeit einer Pore ist in der Regel auf einige Stunden beschränkt und somit eignet sich die Technik nur für Sekundärstrukturen, welche innerhalb von wenigen Sekunden thermisch entfaltet werden. Wenn dagegen ein Ende des DNA-Hairpins mit einer längeren einzelsträngigen DNA Sequenz verlängert wird, kann eine Kraft auf die DNA-Sekundärstruktur ausgeübt werden, so dass diese schneller als im thermischen Gleichgewicht entfaltet wird. Dadurch können auch stabilere Strukturen untersucht werden, und auf deren Verhalten ohne angelegte Kraft, durch Extrapolation, geschlossen werden. Prinzipiell gibt es hierfür zwei verschiedene Methoden: Zum Einen kann eine konstante Spannung angelegt werden und die Translokationsdauer gemessen werden. Zum Anderen kann die Spannung, und somit die angelegte Kraft, angepasst werden sobald das verlängerte Ende der DNA in der Pore ist[72]. Wenn eine konstante Spannung angelegt wird, ist die Häufigkeit mit der DNA in die Pore gelangt exponentiell von der Spannung abhängig[77], und somit ist dieses Verfahren für sehr kleine Spannungen wenig geeignet. Auf der anderen Seite erhöht eine hohe Spannung das Risiko, dass die Membran elektroporiert wird und gänzlich zerreißt[119]. Daher ist es günstig, eine konstante Spannung in einem Bereich anzulegen, in dem keine Elektroporation auftritt und gleichzeitig die Translokationshäufigkeit hoch genug ist. Sobald die Anwesenheit eines DNA Moleküls in der Pore detektiert wird, kann ein auto-

matisierter Regelkreis dazu verwendet werden, die Spannung in wenigen μs wie gewünscht einzustellen. Hierbei kann beispielsweise wieder eine konstante Spannung gewählt werden oder die Spannung linear von einem niedrigen Wert zu einem hohen erhöht werden. Durch diese Technik kann auch die spannungsabhängige Stabilität von sehr schwachen oder sehr starken DNA-Hairpins gemessen werden. Da schwache Hairpins innerhalb von einigen μs translokiert werden, ist es wünschenswert, die Spannung sehr schnell nach Eintritt der DNA in die Pore regeln zu können. Dies erfordert allerdings eine schnelle Elektronik und einen rauscharmen Versuchsaufbau. Durch die Verwendung eines "Streptavidin-Ankers" an der DNA Struktur kann dieses Problem umgangen werden[84, 65]. Der Anker verhindert die vollständige Translokation und hält die DNA in der Pore (vgl. Abb.3.4), sodass die DNA auf der trans-Seite eine Sekundärstruktur bilden kann. Wird nun nach einiger Zeit die Spannung umgepolt, so wird diese Sekundärstruktur aufgebrochen und die dafür benötigte Zeit kann gemessen werden. Dieses Prinzip kann auch mit mehreren Nanoporen gleichzeitig verwendet werden[123]. Mit kraftspektroskopischen Messungen kann generell die Stabilität einer Struktur in Abhängigkeit der angelegten Spannung gemessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dieser Technik die Stabilität von G-Quadruplex Strukturen[96] und DNA- und RNA-Hairpins untersucht. Das Translokationsverhalten der DNA-Hairpins konnte durch die Form der Energielandschaft während des Entfaltens erklärt werden[94].

In anderen Studien wurde auch die Translokation von Proteinen untersucht[81, 113]. Allerdings variiert bei Proteinen die angelegte Kraft mit der Ladung der Aminosäuren welche sich innerhalb der Pore befinden. Bei DNA oder RNA dagegen ist das Rückgrat des Polymers gleichmäßig geladen und die elektrostatische Kraft somit nicht abhängig von der Sequenz des Polymers.

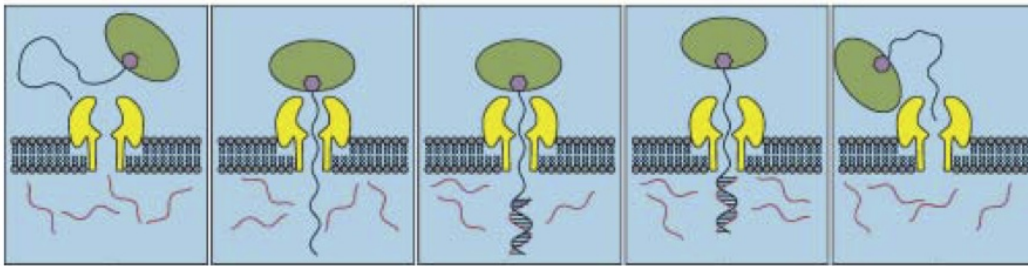


Abbildung 1.4: Als Anker wird eine Struktur an die DNA angehängt welche nicht durch die Pore translokieren kann. Dafür kann beispielsweise Streptavidin an eine mit Biotin modifizierte DNA angebunden werden. Während des Experiments wird eine konstante Spannung angelegt durch welche die DNA bis zu der Ankerstruktur in die Pore gezogen werden kann. Anschließend kann auf der trans-Seite eine Sekundärstruktur gebildet werden (Mitte). Nach einiger Zeit kann die Spannung invertiert werden und dadurch die Kraft gemessen werden welche nötig ist die Sekundärstruktur auf der trans-Seite aufzubrechen. (Abbildung übernommen aus:[84])

1.4 Nanoporen aus Festkörpern

Parallel zu den Untersuchungen mit biologischen Nanoporen wurden auch Nanoporen in Festkörpern[118], meist Si_3N_4 oder SiO_2 [45] als Plattform für Messungen verwendet[35]. Diese Poren sind stabiler als biologische Membranen und können mit verschiedenen Durchmesser hergestellt[23] sowie chemisch modifiziert werden[140]. Demgegenüber ist deren aufwendiger Fertigungsprozess ein Nachteil gegenüber Proteinporen. Ebenfalls ist es nicht möglich diese Poren auf atomarer Ebene identisch herzustellen, wie es bei Proteinporen der Fall ist. Dadurch müssen alle Messungen im Kontext der individuellen Porengeometrie interpretiert werden. Die Translokation von DNA durch eine Festkörperpore konnte bereits 2003 erstmals nachgewiesen werden[60]. Ebenfalls wurde die elektrophoretische Kraft auf DNA innerhalb der Pore mit Hilfe einer optischen Pinzette[2] gemessen[55]. Darüber hinaus konnte eine Festkörperpore mit einer Lipidmembran beschichtet werden und damit die Diffusion von Proteinen beobachtet werden, welche an der Lipidmembran verankert wurden[151]. Es konnten auch zwei Poren in Serie geschaltet werden[90], und es können Nanoporen auch in Arrays für eine hochgradige Parallelisierung hergestellt werden[111]. Trotz dieser beachtlichen Ergebnisse ist nicht davon auszugehen, dass Kraftspektroskopie-Messungen an DNA Sekundärstrukturen zeitnah mit Festkörperporen durchgeführt werden können. Aus diesem Grund wurde auch schon eine α -HL Pore in eine Festkörperpore inkorporiert um die Präzision von biologischen Poren mit der Stabilität von Festkörperporen zu kombinieren[39].

1.5 Protein-Nanoporen

Zum ersten Mal wurde die Translokation von einzelnen Molekülen durch Alamethicin-Nanoporen gemessen[12]. Da sich Alamethicin sehr schnell öffnen und schließen kann (gating) wurde es aber nur selten als Nanopore verwendet. Alamethicin wird von dem Pilz *Trichoderma viride* sezerniert und ist mit ≈ 2 kDa pro Monomer ein vergleichsweise kleines Poren bildendes Protein[147]. Es kann abhängig von der angelegten Spannung aus mehreren Monomeren verschieden große Poren bilden[109].

Die meisten Nanoporen-Experimente wurden bislang mit α -HL durchgeführt[45]. Ein α -HL Monomer hat ein Molekulargewicht von 33,2 kDa und wird von dem Bakterium *Staphylococcus aureus* sezerniert[110]. In der Literatur wurde zwar berichtet, dass eine α -HL Pore auch aus sechs Monomeren mit Hilfe eines Raster-Kraft-Mikroskops (AFM) abgebildet wurde[21, 138], durch Kristallstrukturanalyse wurde allerdings bestätigt, dass eine Pore aber durch sieben Monomere gebildet wird. In einer anderen Studie wurde versucht, diese Stöchiometrie durch Modifikationen der Proteine zu verändern, allerdings konnten ausschließlich Poren aus sieben Monomeren inkorporiert werden[40]. Die Pore hat an der engsten Stelle einen Durchmesser von 1,4 nm[110] und somit ist es möglich, dass einzelsträngige DNA durch die Pore translokieren kann, aber keine doppelsträngige. Die gebildeten Poren waren in unseren Experimenten in der Regel über mehrere Stunden stabil und zeigten selten Gating-Verhalten. Um die Pore an individuelle Bedürfnisse anzupassen, wurde sie vielfach modifiziert. Es wurde beispielsweise DNA angebunden, um die Kinetik der Bildung von DNA Duplexen zu untersuchen[44] oder um eine α -HL Pore in eine Festkörperpore zu ziehen[39]. Ebenso wurde die Pore so modifiziert, dass damit Vertreter der Stoffgruppe der Laste detektieren zu können, zu welchen auch Senfgas gehört[148]. Darüber hinaus gab es Modifikationen, um die Translokationsdauer von DNA zu verlängern[97], einen Cyclodextrinring innerhalb der Pore zu verankern[5] oder um den Kanal so zu verändern, dass einzelne Basen identifiziert werden können[115, 117, 116]. Diese zahlreichen und erfolgreichen Experimente zeigen, dass auch biologische Poren an individuelle Bedürfnisse angepasst werden können.

Ebenfalls wurden Translokationsexperimente mit einer modifizierten MspA Pore durchgeführt, da sich bei dem Wildtyp dieser Pore zahlreiche negativ geladenen Aminosäuren an der Engstelle befinden, wodurch ein Eindringen der ebenfalls negativ geladenen DNA in die Engstelle verhindert wird[18]. MspA bildet Oktamere aus Proteinen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa[67, 112]. Mit dieser Pore war es erstmals möglich, ein kurzes

DNA-Molekül zu sequenzieren[24]. Die MspA Pore besitzt im Gegensatz zu α -HL nur eine sehr kurze Engstelle (vgl. Abb.1.5). Bei α -HL gleicht die Engstelle eher einem Kanal und es befinden sich immer mehrere Nukleotide gleichzeitig innerhalb dieser Stammregion. Alle Nukleotide in dieser Stammregion beeinflussen gemeinsam den Stromfluss, wodurch die Identifizierung einzelner Nukleotide erschwert wird. MspA ist ein Porin des Bakteriums

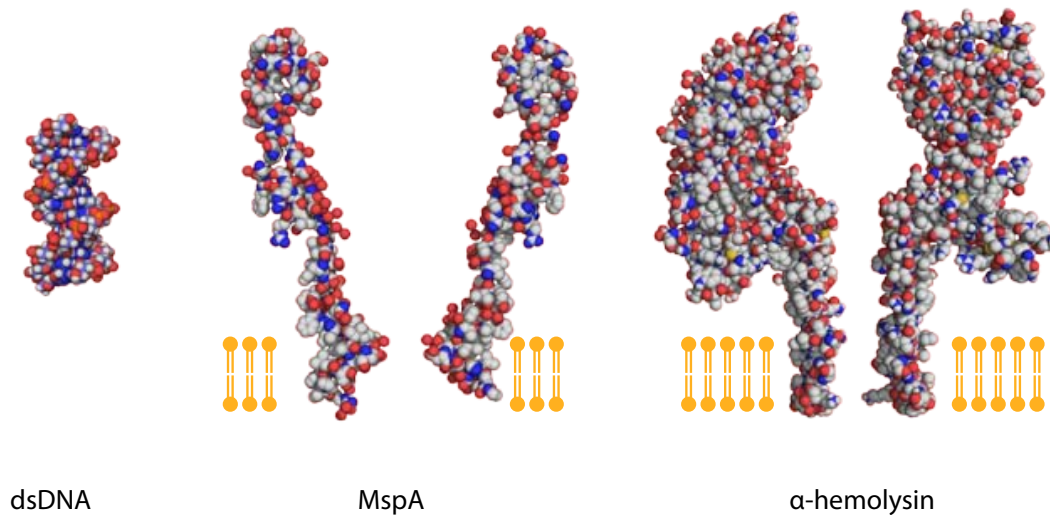


Abbildung 1.5: Der Querschnitt durch die Poren zeigt die sehr kurze Engstelle (≈ 1 nm lang) der MspA Pore im Vergleich zu der meist verwendeten α -HL Pore (≈ 4 nm lang). Da die Leitfähigkeit im Wesentlichen durch die engste Stelle bestimmt wird, können mit der MspA Pore einzelne Basen leichter anhand des verbleibenden Stromflusses unterschieden werden da im Gegensatz zu α -HL nicht gleichzeitig mehrere Basen den Stromfluss durch die Engstelle beeinflussen[18]. Durch das gezielte Entfernen der negativen Ladungen an der Engstelle wurde die Translokation von DNA ermöglicht und es gelang erstmals eine kurze DNA zu sequenzieren[24]. Allerdings existieren auch modifizierte α -HL Poren mit einer oder zwei Engstellen, wobei auch berichtet wurde, dass zwei Engstellen besser geeignet sind um einzelne Basen zu identifizieren als eine[117]. Der Größenvergleich mit doppelsträngiger DNA zeigt, dass diese für eine Translokation zu groß ist und entfaltet werden muss.

Mycobacterium smegmatis und dient als Transmembranprotein in der äußeren Membran dem kontrollierten Stoffaustausch.

Ebenfalls wurden Translokationsexperimente mit einem Toxin des Bakteriums *Aeromonas hydrophila*, das Aerolysin, durchgeführt. Hierbei wurde die Translokation von α -helikalen Proteinen durch die α -HL Pore und die Aerolysinpore verglichen[113]. In einer weiteren Studie wurde die Translokation von nativ ungefalteten Proteinen untersucht[89]. Des weiteren wurde eine OmpG Pore modifiziert, um Gating zu verringern. Zusätzlich

wurde ein Cyclodextrin-Ring in die Pore eingebaut und damit die Translokation von ADP untersucht[19].

1.6 Mechanismus der Porenbildung

Die biologische Aufgabe von α -HL besteht darin, kleine Löcher in die Zellwand von fremden Bakterien zu bohren und diese dadurch abzutöten. Durch die Sekretion dieses Toxins verschafft sich das Bakterium einen Vorteil gegenüber Konkurrenten um Nährstoffe. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, muss das porenbildende Protein zunächst in wässriger Lösung zu der Zielzelle diffundieren und sich dort in die hydrophobe Zellmembran inkorporieren. Zuerst befindet sich das Protein also in einem wasserlöslichen Zustand bevor es an die Membranoberfläche der Zielzelle anbindet[86, 59]. Auf der Membran oligomerisieren sich die α -HL Monomere zu Heptameren, und bilden die sogenannte Präpore[137]. In einem letzten Schritt wird durch eine Konformationsänderung die Stammregion des Kanals durch die Membran geklappt und somit die fertige Pore gebildet[10]. In unseren Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Porenbildung sehr stark von der Proteinkonzentration abhängig ist. Wenn bei niedrigen Konzentrationen kaum Inkorporationen beobachtet wurden, so war die Inkorporationsrate bei einer leicht höheren Konzentration um ein vielfaches erhöht. Dieses Verhalten kann durch die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Heptameren erklärt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich sieben Monomere gleichzeitig treffen ist bei einer geringen Proteinkonzentrationen verschwindend gering. Für Konzentrationen über einem Schwellwert ist diese Wahrscheinlichkeit dagegen sehr hoch.

Die Bildungsmechanismen von unterschiedlichen Poren sind sehr vielfältig. Bei Gramicidin wird eine Pore beispielsweise aus zwei Monomeren gebildet welche jeweils die Dicke einer halben Lipidmembran haben. Die Monomere werden in beide Hälften der Lipid-Doppelschicht eingelagert und bilden eine Pore, sobald sich zwei Monomere von den beiden Seiten treffen[147]. Bei Alamethicin können unterschiedlich große Poren aus einer verschiedenen Anzahl an Monomeren gebildet werden[147]. Die Bildung der Poren ist dabei abhängig von der Höhe des elektrischen Potentials über der Membran.

Für Experimente mit Nanoporen ist es wichtig, die Inkorporation kontrollieren zu können, da in der Regel die Experimente an einzelnen Poren durchgeführt werden. Die offensichtlichste Methode für die Kontrolle ist natürlich die Konzentration der Proteine. In den meisten Experimenten werden die Proteine in einer niedrigen Konzentration zugegeben. Nach der ersten erfolgreichen Inkorporation werden die überschüssigen Proteine

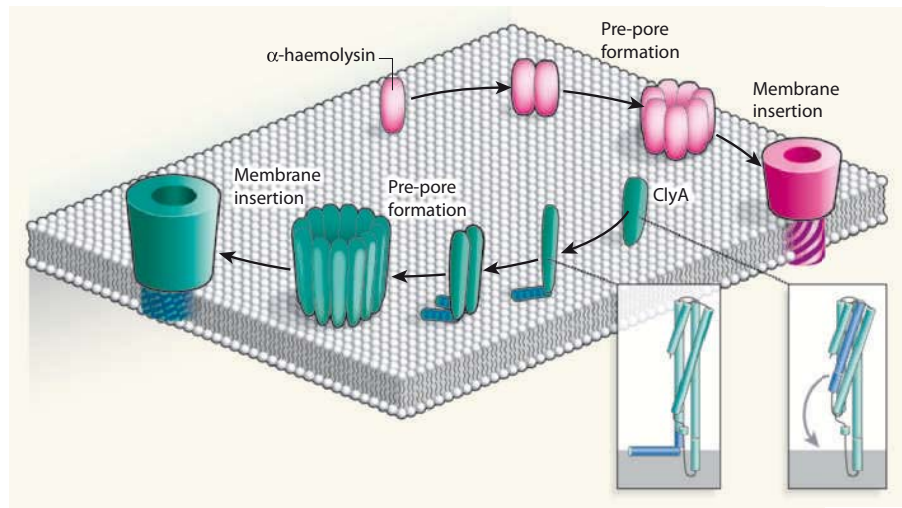


Abbildung 1.6: Die α -HL Pore wird aus sieben Monomeren gebildet welche sich an der Membran zunächst aneinander lagern. Erst im letzten Schritt wird die Stammregion, welche hauptsächlich aus β -Faltblatt Strukturen besteht, durch die Membran geklappt und somit die Pore geöffnet. Bei der ClyA Pore besteht die Transmembranregion dagegen aus α -Helices welche mehrere Konformationsänderungen während der Inkorporation durchführen können. (Abbildung übernommen aus [10])

durch intensives Spülen entfernt. Da die Inkorporationsrate von α -HL empfindlich von der Konzentration abhängt muss eine sehr geringe Protein-Konzentration verwendet werden, wodurch es lange dauern kann bis die erste Pore inkorporiert wird[1]. Diese Methode ist für eine Parallelisierung der Experimente nicht optimal geeignet, da ein Spülvorgang technisch aufwendiger ist als nur die Zugabe von Lösungen. Eine mögliche Lösung könnte die Zugabe von amphiphilen Stoffen nach der ersten Inkorporation bieten. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch die Inkorporation von α -HL effektiv gestoppt werden kann[93]. Aber auch diese Methode ist für parallele Chipaufbauten problematisch, welche über ein gemeinsames cis-Kompartiment und getrennte trans-Kompartimente verfügen[3]. Es konnte gezeigt werden, dass α -HL Poren auch direkt mit einem Agarose-Stempel in einer Membran inkorporiert werden können[42]. Diese Methode scheint allerdings ebenfalls technisch sehr aufwendig zu sein. In dieser Arbeit wird ein anderer Ansatz vorgestellt, bei dem die Inkorporation der Pore durch das Anlegen eines Membranpotentials gesteuert wird.

1.7 Lipidmembranen

Für alle Nanoporenexperimente mit biologischen Poren wird eine möglichst stabile Lipidmembran benötigt, welche zwei Kompartimente voneinander trennt. Beide Kompartimente sind mit Elektrolytflüssigkeit gefüllt und nur durch die Pore miteinander verbunden. Der Ionenstrom durch diese enge Verbindung wird über Elektroden in den Kompartimenten mit einem sehr sensitiven Patch-Clamp-Verstärker gemessen (vgl. Abb.1.3). Zur Herstellung einer Membran wird meist eine der folgenden Methoden verwendet:

- Mueller Rudin Technik (Painting)
- Montal Mueller Technik (vgl. Abb.1.7)
- Vesikelfusion (vgl. Abb.1.8)
- DIB (droplet interface bilayer; vgl. Abb.1.9)

Bei allen Methoden ist das Ziel, eine möglichst stabile Lipidmembran mit möglichst kleinem Durchmesser und möglichst kleinen Reservoirs für die Elektrolytflüssigkeit zu erlangen. Dadurch wird eine lange Messzeit mit geringem Rauschen (vgl. Abschnitt 1.14) unter Verwendung von wenig Material erreicht.

Das “Painten“ ist die älteste Methode für die Herstellung künstlicher Membranen und wurde 1963 entwickelt[82]. Die Membran wird hierbei über einem Loch in einem möglichst dünnen und hydrophobem Material erzeugt (z.B. eine Folie aus PTFE (Teflon)). Auf den Rand der Apertur wird zunächst ein Lipid-Öl Gemisch aufgebracht, welches anschließend mit einem Pinsel möglichst dünn über die Apertur gestrichen wird, sodass sich eine Lipidmembran bildet. Mit dieser weit verbreiteten Methode können Membranen mit einem minimalen Durchmesser von etwa $20\ \mu\text{m}$ hergestellt werden[78], bei einem Probenvolumen von etwa $70\ \mu\text{l}$.

Bei der Montal Mueller Technik wird die Membran durch Heben und Senken des Flüssigkeitsspiegels erzeugt[80]. Dabei lagern sich die zwei Lipid-Einzelschichten auf der Wasseroberfläche zu einer Lipid-Doppelschicht aneinander (vgl. Abb.1.7). Diese Methode kann automatisiert werden[129] und die entstehenden Membranen haben einen geringen Anteil an Lösungsmitteln. Die Größe der Membran und das verwendete Probenvolumen entsprechen etwa den Dimensionen von Membranen, welche durch das “painting“ Verfahren hergestellt werden.

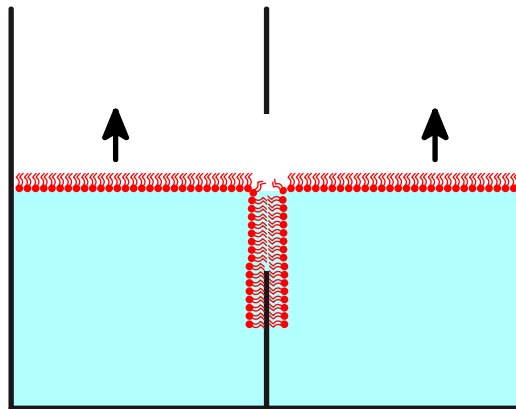


Abbildung 1.7: Bei der Membranherstellung mit der Methode von Montal und Mueller werden zunächst Lipide der Elektrolytflüssigkeit zugegeben, welche sich auf Grund des hydrophoben Effekts zu Lipideinfachschichten an der Wasseroberfläche organisieren. Durch gleichzeitiges Anheben des Wasserspiegels auf beiden Seiten der Apertur wird eine vollständige Lipidmembran gebildet. Die Apertur muss dafür aus einem hydrophoben Material bestehen. In der Regel wird dafür eine sehr dünne PTFE (Teflon)-Folie verwendet, in welche durch Funkenschlag ein schmales Loch gebrannt wird. Die so entstandene Membran ist somit theoretisch frei von Lösungsmitteln. Praktisch wird, in der Regel, allerdings vor der Membranbildung ein Lipid-Öl Gemisch auf die Apertur aufgebracht, wodurch Lösungsmittelreste in der Membran nicht ausgeschlossen werden können. In der Tat können in diesen Membranen auch α -HL Poren inkorporiert werden, was in Lösungsmittelfreien Membranen nur sehr schlecht funktioniert. Lösungsmittelfreie Membranen sind den natürlichen Membranen ähnlicher, und gelten deshalb häufig als angestrebtes Ziel. Alternativ zu dieser Methode, kann die Membran auch mit einem Pinsel über die Apertur gestrichen werden. Der Pinsel wird dazu in eine Lipid-Lösungsmittel Mischung getunkt und über die Apertur bewegt. Mit beiden Techniken ist es allerdings schwierig sehr kleine Membranen für rauscharme Messungen herzustellen.

Eine weitere Methode für die Herstellung von Lipidmembranen ist die Vesikelfusion über einer Apertur. Die Apertur wird dafür in einen hydrophilen Material hergestellt, da-

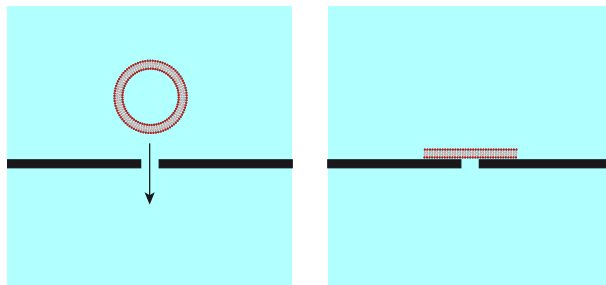


Abbildung 1.8: Sehr kleine und dadurch rauscharme Lipidmembranen können durch Vesikelfusion über einer hydrophilen Apertur hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter anderem auch Experimente mit dem Port-A-Patch System der Firma Nanion durchgeführt. Dabei wird eine Vesikel-Suspension mittels Unterdruck durch ein dünnes Loch in einem Glasplättchen gesaugt. Sobald ein Vesikel die Apertur berührt platzt es und es versiegelt die Apertur durch eine Lipidmembran. Die Vesikel werden durch “electroswelling“ hergestellt[25] und enthalten keine Lösungsmittel, wodurch die Inkorporation von α -HL stark erschwert wird.

mit die polaren Kopfgruppen der Lipide möglichst fest über der Apertur am Trägermaterial angebunden werden. Kommerziell ist so ein System beispielsweise von der Firma Nanion erhältlich[29, 126]. Bei diesem System wird eine Vesikel-Suspension mit Unterdruck solange durch die Apertur gepumpt bis ein Vesikel an der Apertur platzt und diese mit einer Lipidmembran versiegelt (vgl. Abb.1.8). Dadurch können sehr kleine Membranen mit einem Durchmesser von $5 \mu\text{m}$ und einem Probenvolumen von $5 \mu\text{l}$ hergestellt werden. Die Vesikel hierfür können durch die electroswelling Methode[25] sehr einfach in großer Zahl hergestellt werden und problemlos über mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Diese Lipidmembranen unterscheiden sich von allen anderen Methoden dadurch, dass sie kein Lösungsmittel enthalten, was die Inkorporierung von Poren, insbesondere von α -HL, erschwert oder ganz verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden viele Versuche dazu durchgeführt und eine Möglichkeit gefunden der Membran nachträglich Lösungsmittel zuzuführen (vgl. Abschnitt 4.4).

Für die meisten Messungen in dieser Arbeit wurde die Membran zwischen zwei wässrigen Tröpfchen in einem Lipid-Öl Gemisch hergestellt[43, 49] (DIB; droplet interface bilayer). Hierzu werden zwei bewegliche Elektroden in ein Lipid-Öl Gemisch getaucht und jeweils ein Tropfen mit Elektrolytflüssigkeit daran geheftet (vgl. Abb.1.9). An der Wasser-Öl Grenzfläche bildet sich daraufhin schnell eine geordnete Schicht aus Lipiden. Wenn

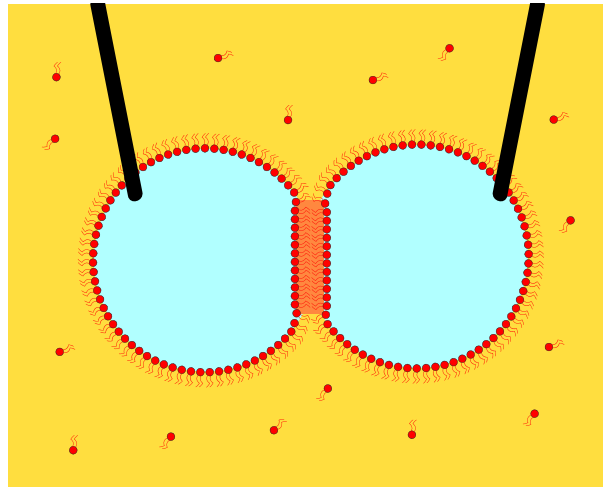


Abbildung 1.9: Die meisten Experimente für diese Arbeit wurden mit einem “droplet interface bilayer“ (DIB) Aufbau durchgeführt. Bei dieser Technik werden zwei wässrige Tröpfchen direkt an Elektroden (schwarz) pipettiert welche sich in einem Lipid-Öl Bad (gelb) befinden. An der hydrophilen/hydrophoben Grenzfläche bilden sich Lipid-Einzelschichten welche eine vollständige Membran ausbilden sobald die Tröpfchen aneinander gedrückt werden. Die dabei entstehende Membran ist sehr langlebig und kann sehr klein - und damit rauscharm - hergestellt werden. Außerdem können die Tröpfchen innerhalb weniger Sekunden auseinander und wieder zusammen bewegt werden und dadurch eine neue Membran gebildet werden. Dabei werden alle zuvor inkorporierten Poren zerstört und es können neue Poren inkorporiert werden. Da kein Kontakt zur umgebenden Luft besteht kann auch mit sehr kleinen Probenvolumina ($< 1 \mu\text{l}$) gearbeitet werden, ohne dass diese verdunsten können.

die beiden Tröpfchen aneinander gedrückt werden treffen die Lipidschichten aneinander und bilden eine Lipid-Doppelschicht, also eine Lipidmembran. Mit diesem Verfahren können Lipidmembranen mit einem Durchmesser von ca. $20\ \mu\text{m}$ hergestellt werden bei einem Probenvolumen von weniger als $1\ \mu\text{l}$. Allerdings wird für die Herstellung der Lösungen ein Probenvolumen von etwa $4\ \mu\text{l}$ benötigt. Mit diesem Verfahren hergestellte Membranen sind in der Regel über mehrere Stunden stabil und ihre Größe ist klein genug für rauscharme Messungen. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die Tröpfchen auseinander und wieder zusammen bewegen zu können, wodurch eine neue Membran gebildet wird, welche keine Poren enthält. Dies ist insbesondere dann hilfreich, wenn Messungen an einzelnen Poren durchgeführt werden sollen, denn es kommt häufig vor, dass mehrere Poren gleichzeitig inkorporiert werden. Für dieses Entfernen aller Poren aus der Membran werden nur wenige Sekunden benötigt.

Es gibt auch zahlreiche Überlegungen, um die Herstellung der Membran weiter zu optimieren. Beispielsweise wurde an neuen Methoden geforscht, bei denen die Membran ebenfalls aus zwei Lipid-Einzelschichten mittels Mikrofluidik automatisiert hergestellt werden kann[69, 33]. Desweiteren gibt es interessante Überlegungen, die Stabilität der Lipidmembranen zu verbessern, beispielsweise durch Verwendung eines Hydrogels anstelle der Elektrolytlösung[52]. Für die Messungen in dieser Arbeit hat sich jedoch der DIB Aufbau bewährt und es war nicht nötig, weitere Verbesserungen zu untersuchen.

1.8 Thermodynamische Stabilität von DNA Sekundärstrukturen

Die Aufklärung der Struktur der DNA als Trägersubstanz des Erbguts gelang 1953 James Watson und Francis Crick[142]. Sie fanden heraus, dass die DNA eine Doppelhelix bildet, in der die komplementären Basen sich gegenüber liegen. Stabilisiert wird diese Bindung durch die Stapelwechselwirkung[149]. Bei steigender Temperatur werden die Basenpaare aufgebrochen und die DNA beginnt zu “schmelzen“[141]. Zunächst werden nur vereinzelt Basenpaare kurzzeitig geöffnet bis schließlich bei hohen Temperaturen alle Basenpaare aufgebrochen sind. Da dieser Prozess reversibel ist, können auch wieder neue Basenpaare gebildet werden, allerdings ist es dafür nötig, dass die komplementären DNA Stränge nicht durch Diffusion räumlich getrennt werden. Um dieses Problem zu umgehen wurden im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich DNA-Hairpins untersucht. Durch die kovalenten Bindungen zwischen den einzelnen Basen werden die komplementären Sequenzen immer in räumlicher Nähe zueinander gehalten. Ebenfalls werden durch die Verwendung von Hairpins stöchiometrische Probleme vermieden.

Das Schmelzen eines DNA-Hairpins kann als einstufiger Prozess betrachtet werden. Dabei gilt allgemein:

$$\Delta G = \Delta G^0 + k_B T \ln \frac{[B]}{[A]}, \quad (1.1)$$

wobei $[B]$ die Konzentration der geöffneten, und $[A]$ der gefalteten Hairpins ist. Im thermodynamischen Gleichgewicht gilt $\Delta G = 0$, und somit:

$$\Delta G^0 = -k_B T \ln \frac{[B]}{[A]}, \quad (1.2)$$

beziehungsweise:

$$K_D(T) = \frac{c(\text{geschmolzen})}{c(\text{kondensiert})} = \exp\left(-\frac{\Delta G^0(T)}{k_B T}\right). \quad (1.3)$$

Dabei ist die Dissoziationskonstante K_D das Verhältnis zwischen geschmolzenen und kondensierten Molekülen.

Da es im englischen Sprachgebrauch so üblich ist, wird der Begriff der freien Energie an Stelle der freien Enthalpie verwendet. Da die Änderung des Volumens bei den betrachteten Prozessen klein ist, unterscheiden sich freie Energie und Enthalpie nur wenig. Ebenso wird im Folgenden die übliche Notation ΔG an Stelle von ΔG^0 verwendet. Um die freie

Energie einer doppelsträngigen DNA Sequenz zu berechnen kann als erste Näherung angenommen werden, dass längere Sequenzen stabiler sind, also ein größeres ΔG besitzen, als kurze Sequenzen. Zusätzlich sind G-C Basenpaare stabiler als A-T Basenpaare. Verlässliche Vorhersagen über die Stabilität von DNA und RNA Duplexen wurden allerdings erst durch die Verwendung eines “nearest-neighbor“ Modells und der Analyse von vielen Schmelzkurven erreicht. Dabei wurden thermodynamische Tabellen erstellt mit deren Hilfe die Energie und Entropie und somit auch die Energie von beliebigen DNA Sequenzen bei verschiedenen Salzkonzentrationen berechnet werden können[100]. Diese Tabellen wurden von einigen verschiedenen Autoren, mit leicht variierenden Parametern, erstellt[88]. Ebenso gibt es Programme, welche unter Verwendung dieser Tabellen, die Stabilität von beliebigen DNA Duplexen vorhersagen können[133, 131, 132]. Des Weiteren wurden Parameter für häufig auftretende strukturelle Motive, wie z.B. interne “mismatches“ oder “dangling ends“ ermittelt[102]. Mit Hilfe dieser Tabellen kann nicht nur die Stabilität des gesamten Duplexes vorausgesagt werden, sondern es kann auch die Energielandschaft für das Entfalten einer doppelsträngigen DNA während der Translokation abgeschätzt werden. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu benutzt um die kraftabhängige Stabilität von DNA-Hairpins vorauszusagen und mittels Experiment zu überprüfen.

Die Dissoziationskonstante gibt allerdings nur die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Molekül in einem gefaltetem Zustand vorliegt. Durch thermische Fluktuationen kann sich dieser Zustand allerdings sehr schnell ändern. Dieser dynamische Prozess kann nicht mit einfachen Schmelzexperimenten untersucht werden, da die Fluktuationen der einzelnen Moleküle sich in einem Ensemble gegenseitig auslöschen. Für die Untersuchung dieser Prozesse sind unter anderem Nanoporenexperimente geeignet, da jeweils nur ein einziges Molekül untersucht wird. Die Dynamik von DNA-Hairpins wird durch die Raten k_{off} und k_{on} beschrieben, welche ein Maß für die Geschwindigkeit des Öffnen eines Hairpins bzw. der Neubildung sind. Dabei gilt für intramolekulare Bindungen der Zusammenhang:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{k_B T}\right) \quad (1.4)$$

Die mittlere Lebensdauer einer Bindung ist dabei:

$$\tau_{off} = \frac{1}{k_{off}} \quad (1.5)$$

Bei intermolekularen Prozessen hängt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Bindung gebildet werden kann natürlich wesentlich von der Konzentration der Reaktionspartner ab. Da im Rahmen dieser Arbeit fast ausschließlich intramolekulare Bindungen untersucht wurden,

wird nicht näher auf die Konzentrationsabhängigkeit eingegangen und es gilt für die mittlere Dauer der Ausbildung einer Bindung:

$$\tau_{on} = \frac{1}{k_{on}}. \quad (1.6)$$

Erwähnt sei noch, dass alle Raten abhängig von der Temperatur sind.

1.9 Phänomenologisches Modell der Translokation

Als einfachste Näherung kann die Translokation eines DNA-Hairpins als ein einstufiger Prozess aufgefasst werden (vgl. Abb.1.10). Bei diesem Prozess nullter Ordnung gibt es nur zwei Zustände: im ersten Zustand befindet sich das DNA-Hairpin noch komplett gefaltet innerhalb der Pore. Im zweiten Zustand ist das Hairpin vollständig geöffnet und komplett durch die Pore translokiert. Die Rückreaktion, also dass ein geöffnetes Hairpin rückwärts

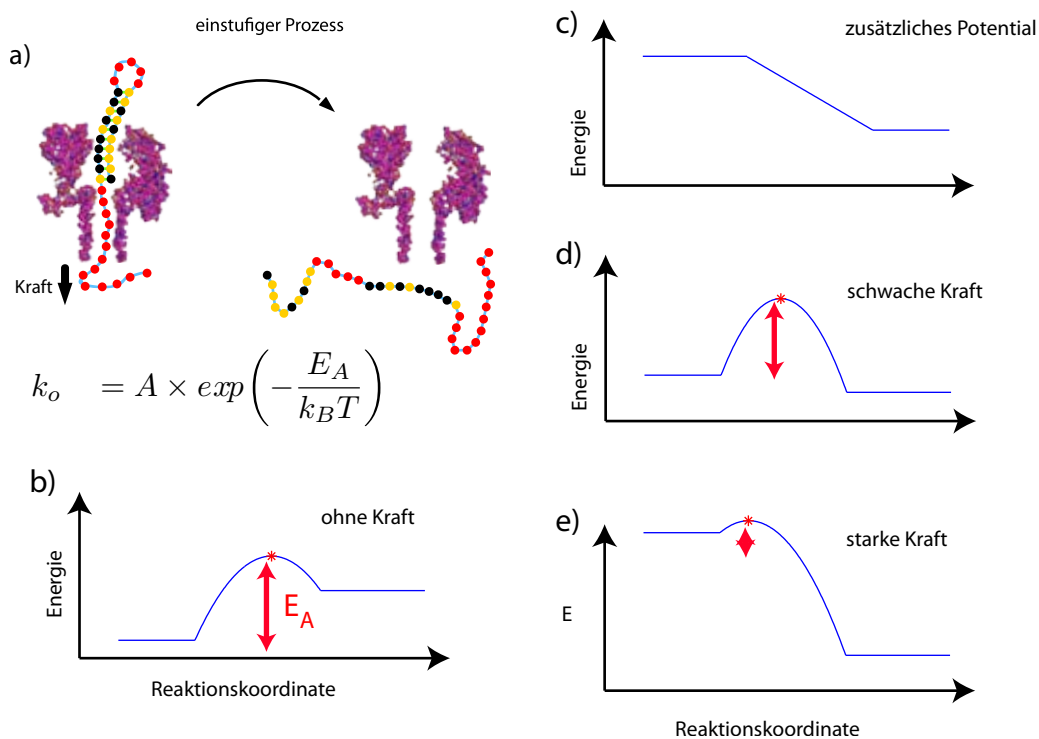


Abbildung 1.10: Als einfachstes Modell sehr viele Prozesse, insbesondere der Entfaltung und Translokation eines DNA-Hairpins, kann angenommen werden, dass der Entfaltungsprozess in einem Schritt geschieht (a). Die Energielandschaft dazu ist in b) dargestellt. Durch die angelegte Kraft wird die Energie $\Delta E = F \cdot x$ zugeführt (c). Dadurch entsteht eine veränderte Energielandschaft (d und e). Die Geschwindigkeit des Translokationsprozesses wird durch die Höhe der Aktivierungsenergie (roter Doppelpfeil) bestimmt, wobei die Position des Maximums bei Anlegen einer Kraft verschoben werden kann (roter Stern). Wenn diese Verschiebung nicht berücksichtigt wird kann die Spannungsabhängige Veränderung der Translokationsgeschwindigkeit durch die Arrhenius-Gleichung, bzw. die Theorie von Kramers [57] beschrieben werden. Auch wenn nur eine sehr geringe Kraft angelegt wird, so wird die Reaktion irgendwann spontan ablaufen. Eine höhere Kraft beschleunigt diesen Prozess.

durch die Pore translokiert wird und sich wieder faltet, ist so unwahrscheinlich, dass sie nicht berücksichtigt wird. Bei dieser Annahme gibt es keine stabilen Zwischenzustände und die Energielandschaft dieses Prozesses besitzt nur eine Energiebarriere. Es wird angenommen, dass das Öffnen des Hairpins und die Translokation entlang einer eindimensionalen Reaktionskoordinate erfolgt. Bei einer Bewegung des Moleküls entlang dieser Reaktionskoordinate werden alle nötigen Schritte für die Translokation nacheinander durchgeführt. Diese könnten beispielsweise das Öffnen von einzelnen Basenpaaren, Rotationen der DNA oder Bewegungen innerhalb der Pore sein. Welche Schritte dies im einzelnen sind ist für das Modell unbedeutend. Wichtig ist nur, dass es eine zu überwindende Energiebarriere gibt und keine stabilen Zwischenzustände. Dem DNA-Hairpin wird auf dem Weg entlang der Reaktionskoordinate durch Anlegen einer Kraft konstant Energie zugeführt. Durch die Energiezufuhr wird die Höhe der Energiebarriere um den Betrag $\Delta E = F \cdot d$ verringert, wobei d der Abstand zwischen dem stabilen Zustand und dem Maximum der Energiebarriere ist, und F die angelegte Kraft. Dadurch kann die Energiebarriere leichter überwunden werden und die Reaktion wird beschleunigt. Es gab viele Studien über die theoretische Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit. Zunächst wurde von Arrhenius der Zusammenhang

$$k_{off} = A \times \exp\left(-\frac{E_A}{k_B T}\right) \quad (1.7)$$

gefunden, wobei der Frequenzfaktor A ein Maß für die Häufigkeit ist, mit welcher versucht wird, die Aktivierungsbarriere zu überschreiten. In der Kramers Theorie [57] wurde dieser Frequenzfaktor näher untersucht. Dabei wurde angenommen, dass das System in dem Energieminimum des gebundenen Zustands oszilliert und durch thermische Fluktuationen die Energiebarriere überschreiten kann. Dabei spielt die Dämpfung des System eine entscheidende Rolle. Später beschrieb Bell mit Hilfe dieser Theorie das Verhalten von chemischen Bindungen wenn eine externe Kraft angelegt wird[11]. Detailliert wurde das Verhalten der Raten bei Kraftspektroskopie dann von Evans und Ritchie beschrieben[28]. Dabei wird die Höhe der Aktivierungsbarriere E_A um den Betrag $F \cdot d$ verringert:

$$k_{off} = A \times \exp\left(-\frac{E_A - F \cdot d}{k_B T}\right). \quad (1.8)$$

Der Frequenzfaktor A wird dabei durch einen Fit bestimmt. Im Fall von Nanoporen hängt die Kraft von der angelegten Spannung ab:

$$k_{off}(V) = A \times \exp\left(-\frac{E_A - \alpha V Q_{eff}}{k_B T}\right) = k_0 \times \exp\left(\frac{V}{V_\beta}\right) \quad (1.9)$$

Während der Translokation wird die elektrische Energie $E = \alpha V Q_{eff}$ zugeführt. Q_{eff} ist die effektive Ladung der DNA. Diese hängt von der Abschirmung der Ladungen im Rückgrat der DNA durch Kationen in der Lösung ab. Der Parameter α gibt den Abstand des gebundenen Zustands von der Energiebarriere an und liegt zwischen 0 und 1. Wenn das Maximum der Energiebarriere mittig zwischen den beiden Zuständen liegt gilt $\alpha = 1/2$. Alle Parameter lassen sich zu den beiden freien Parametern $k_0 := A \times \exp(-E_B/k_B T)$ und $V_\beta := k_B T / \alpha V Q_{eff}$ vereinfachen. Die mittlere Dauer einer Translokation ist gegeben durch:

$$\tau(V) = \frac{1}{k_{off}(V)} \quad (1.10)$$

An dieser Stelle sei erwähnt, dass mit komplizierteren Modellen die Translokation natürlich besser beschrieben werden kann. Es kann beispielsweise berücksichtigt werden, dass sich die Position der Energiebarriere bei Anlegen einer Kraft verschieben kann (dargestellt in Abb.1.10)[27]. Außerdem kann angenommen werden, dass die Translokation in mehreren Schritten geschieht[71]. Ebenso könnten experimentelle Daten vermutlich perfekt durch eine Energielandschaft mit sehr vielen möglichen Zwischenschritten und somit vielen freien Parametern gefittet werden. Allerdings müsste dann die Aussagekraft dieser Parameter in Frage gestellt werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit ausschließlich zwei Fitparameter verwendet: Der Parameter V_β ist ein Maß dafür, welche Kraft durch Anlegen einer Spannung auf die DNA ausgeübt wird, und k_0 ist ein individueller Parameter welcher sich für jedes Hairpin unterscheidet und die spontane Öffnungswahrscheinlichkeit des DNA-Hairpins misst. In späteren Abschnitten wird auch dieser Parameter als globale Variable verwendet und ist dann für alle möglichen DNA-Hairpins gleich. Die Einbeziehung der Energielandschaften bei der Entfaltung von DNA-Hairpins macht es möglich die Translokation von verschiedenen Hairpins mit einem universellen Parameterpaar V_β und k_0 zu beschreiben. Dadurch wird es möglich die Translokationsdauer beliebiger Hairpins vorherzusagen.

Durch das phänomenologische Modell werden unendlich schnelle Translokationen vorhergesagt, was natürlich in der Realität nicht zutreffen kann. Bei Anlegen einer hohen Spannung spielt die Stabilität der Sekundärstruktur keine Rolle mehr, und die Translokationsdauer ist gleich für DNA-Hairpins und unstrukturierte DNA. In diesem Bereich ist die Entfaltung des Hairpins nicht mehr ratenlimitierend und das Modell nicht mehr gültig. Das zeigt, dass die Entfaltung von DNA-Hairpins nur bei einer langen Translokationsdauer als Poisson-Prozess aufgefasst werden kann, da bei einer kurzen Translokationsdauer andere

Prozesse auftreten. Diese Problematik ist in allen Translokationsexperimenten mit konstanten Spannungen deutlich zu erkennen und die Grenze ab welchem Punkt das Modell nun gilt, ist nicht immer klar erkennbar. Daher ist es schwierig, einen Bereich festzulegen, in dem das Modell an die Daten gefittet werden kann. In Abb. 1.11 sind die Ergebnisse eines solchen Experiments mit konstanter Spannung dargestellt. Das Histogramm weist ein Maximum bei einer Translokationsdauer von 3 ms auf und die Verteilung der beobachteten Translokationen fällt ab diesem Maximum ungefähr exponentiell zu höheren Spannungen ab. Bei einer kürzeren Translokationsdauer wurden dagegen sehr wenige Translokationen beobachtet, obwohl es gemäß des phänomenologischen Modells mehr werden müssten. Die erwartete Translokationsdauer einer einzelsträngigen DNA liegt in etwa bei $\tau = 100 \mu\text{s}$ [78] und kann somit nicht alleinige Ursache dafür sein, dass sehr wenige Translokationen mit $\tau < 3 \text{ ms}$ beobachtet wurden. Dadurch wird deutlich, dass das phänomenologische Modell die physikalischen Prozesse, zumindest bei kurzer Translokationsdauer, nicht besonders gut beschreibt. Der exponentielle Abfall der Anzahl der beobachteten Translokationen bei längeren Translokationszeiten wird dagegen ganz gut durch das Modell beschrieben. Dennoch stellt sich die Frage, ab welcher Translokationsdauer das Modell gilt, bzw. ab welcher Translokationsdauer die Daten für den Fit verwendet werden können. Wenn beispielsweise alle Translokationen rechts des Maximums berücksichtigt werden so muss entweder die Gesamtzahl der Experimente ignoriert werden oder es kommt zu einer starken Abweichung. Die Ursache für diese Abweichung liegt wahrscheinlich darin, dass der Translokationsprozess durch einen einzigen Schritt modelliert wird. Im mesoskopischen Modell (vgl. Abschnitt 1.10) wird dagegen davon ausgegangen, dass die DNA basenweise translokiert wird. Dabei kann sich die DNA vorwärts und rückwärts in der Pore bewegen. Wenn der gesamte Translokationsprozess deutlich länger als die einzelnen Schritte dauert, können die einzelnen Schritte zu einem Schritt vereinfacht werden, da die Translokation in diesem Fall im adiabatischen Limit verläuft. Falls die Translokationsdauer in der Größenordnung der Dauer der einzelnen Schritte liegt ist diese Bedingung nicht mehr erfüllt.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass das Problem bei der Verwendung von langsamen Spannungsrampen im allgemeinen ignoriert wird da hierbei die Translokationsdauer mehrere Millisekunden dauert. Außerdem ist die Messgröße bei diesen Experimenten die Spannung, bei der eine Translokation erfolgt. Diese Spannung verändert sich innerhalb von einigen Millisekunden nur geringfügig bei langsamen Rampen.

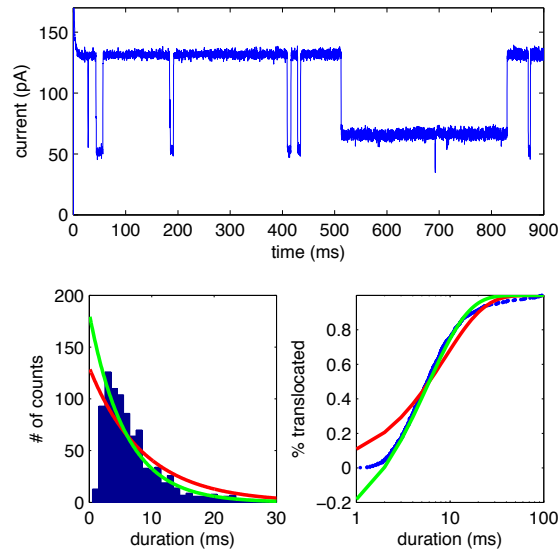


Abbildung 1.11: Translokationen bei konstanter Spannung. Im Stromverlauf (oben) sind einige kurze Blockaden und eine lange zu erkennen. Die lange Blockade weist einen höheren Reststrom auf und wird einem DNA-Hairpin (T50-HP) zugeordnet bei welchem das Hairpin verkehrt herum im Vorhof der Pore steckt und nicht translokiert wird. Die Verteilung der Translokationsdauer der tiefen Blockaden ist in den Histogrammen dargestellt zusammen mit Fits unter Verwendung des Phänomenologischen Modells. Es wurden nur die Daten rechts des Maximums (bei 3 ms) mit einer exponentiell abfallenden Funktion einmal mit Erhaltung der Gesamtanzahl der Experimente (rot) und ohne (grün) gefittet. Die ermittelten Zeitkonstanten waren $\tau = 5,8$ ms (grün) und $\tau = 8,7$ ms (rot). Das Phänomenologische Modell besitzt keine Gültigkeit für kurze Translokationen, denn es werden durch das Modell zahlreiche unendlich kurze Translokationen vorhergesagt. Ab welcher Translokationsdauer das Modell nun Gültigkeit besitzt ist unklar und die häufig verwendete Eingrenzung des Datenbereichs für den Fit durch die Position des Maximums[78] des normalen Histogramms erscheint willkürlich. Dabei muss für eine gute Reproduktion der Daten (grüne Kurve) zusätzlich noch die Gesamtanzahl der Experimente ignoriert werden, wodurch aber eigentlich nicht mehr das Modell als Basis für den Fit verwendet wird sondern eher eine beliebige Exponentialfunktion gefittet wird welche zufälligerweise die Daten reproduziert. Es könnte sein, dass die Abweichungen auftreten wenn die Dauer der Einzelschritte der basenweise erfolgenden Translokation in die Zeitskala der gesamten Translokation kommt.

1.10 Mesoskopisches Modell

DNA Sekundärstrukturen werden gebildet, da dadurch ein Zustand der minimalen freien Energie erreicht wird. Der Faltungsprozess wird dabei durch die Energielandschaft, beziehungsweise dem Weg in das Energieminimum bestimmt. Es gab bereits zahlreiche Untersuchungen, in denen die Energielandschaft von DNA-Hairpins[146], eines G-Quadruplexes[150] oder von Proteinen[91] mit Hilfe von optischen Fallen oder eines AFMs (atomic force microscope) untersucht wurde[64, 105]. Diese Methoden bieten den Vorteil, dass zusätzlich zu der angelegten Kraft auch noch eine Distanz gemessen werden kann, was bei der Verwendung von Nanoporenexperimenten nur in Ausnahmefällen und begrenzt möglich ist[62, 48]. Nanoporen bieten dagegen unter anderem die Möglichkeit Kraft-Rampen Experimente tausendfach zu wiederholen und somit eine gute Statistik zu erlangen. Bei der Translokation eines Hairpins wird dieses aus dem Zustand der geringsten freien Energie in einen entfalteten Zustand gebracht. Wie schnell dies geschehen kann und welche Kraft dafür nötig ist, wird nicht nur durch die totale Differenz der freien Energie zwischen diesen Zuständen bestimmt, sondern maßgeblich durch die Steilheit der Energielandschaft und Anzahl der möglichen Zwischenschritte, welche während des Entfaltungsprozesses durchlaufen werden müssen[94]. Mit dem mesoskopische Modell wird die Form der Energielandschaft berücksichtigt um die Translokationsdauer von Hairpins vorherzusagen. In dieser Arbeit wurde die Translokationsdauer von Prof. Ulrich Gerland zusammen mit Severin Schink und Karen Alim berechnet und mit den experimentellen Daten des Autors verglichen.

Bei dem mesoskopischen Modell wird davon ausgegangen, dass sich die DNA basenweise vorwärts und rückwärts durch die Pore bewegt. Wenn das Hairpin einen Schritt vorwärts macht, muss dafür ein Basenpaar geöffnet werden. Bei einem Rückwärtsschritt kann dagegen ein neues Basenpaar gebildet werden. Die Bewegung der DNA ist langsam gegenüber dem Öffnen und Ausbilden von einzelnen Basenpaaren. Deshalb ist ein Schritt in die Rückwärts-Richtung energetisch favorisiert. Dieses Ungleichgewicht wird durch Anlegen einer Spannung zu Gunsten eines Vorwärts-Schritts verändert, da bei einem Vorwärtsschritt eine Base und somit ein Ladungsträger auf die Trans Seite gebracht wird. Jeder Schritt wird als einstufiger Prozess durch das phänomenologische Modell beschrieben und es ergibt sich analog zu Gleichung 1.9 unter Berücksichtigung des Asymmetriefaktors α die Rate für einen Schritt in die Vorwärts-Richtung von Position N nach $N + 1$:

$$k_+(m) = k_0 \times \exp\left(-\frac{\alpha\Delta(m+1)}{k_B T}\right) \quad (1.11)$$

und analog für einen Schritt in die Rückwärts-Richtung von Position $N + 1$ nach N :

$$k_-(m) = k_0 \times \exp\left(+\frac{(1-\alpha)\Delta(m)}{k_B T}\right) \quad (1.12)$$

Wobei $\Delta(m) = \mathcal{F}(m) - \mathcal{F}(m - 1)$ der Unterschied der Energie zwischen den Zuständen m und $m - 1$ ist. Daraus ergibt sich:

$$\frac{k_-(m+1)}{k_+(m)} = \exp\left(\frac{\Delta(m+1)}{k_B T}\right) \quad (1.13)$$

Der Energieunterschied Δ kann für alle Schritte individuell verschieden sein, da beispielsweise AT-Basenpaare weniger stabil sind als GC-Basenpaare. Ebenso wird bei der Berechnung der Energielandschaft die angelegte Spannung und effektive Ladung der DNA Q_{eff} berücksichtigt (vgl. Abschnitt 1.11). Die Parameter k_0 , Q_{eff} und α sind DNA spezifische Parameter, welche nicht von der Sequenz der DNA beeinflusst werden. Durch den Asymmetriefaktor α wird die Position des Energiemaximums der Aktivierungsenergie berücksichtigt. Im Falle $\alpha = 0,5$ liegt dieses Maximum mittig zwischen den beiden Zuständen. Bei Messungen mit Wechselspannung wurde bereits $\alpha = 0,6$ gefunden[58]. Dieser Wert wurde für die Berechnung der Translokationsdauer verwendet. Auch die beiden anderen Parameter, k_0 und Q_{eff} , sind für alle beliebigen DNA Sequenzen identisch und wurden durch einen globalen Fit festgelegt. Mit den spannungsabhängigen Raten für die einzelnen Schritte kann die Dauer der kompletten Translokation numerisch berechnet werden. Dies wird ausführlich von Schink et. al. beschrieben[104]. In Abb. 1.12 ist die Vorgehensweise schematisch dargestellt.

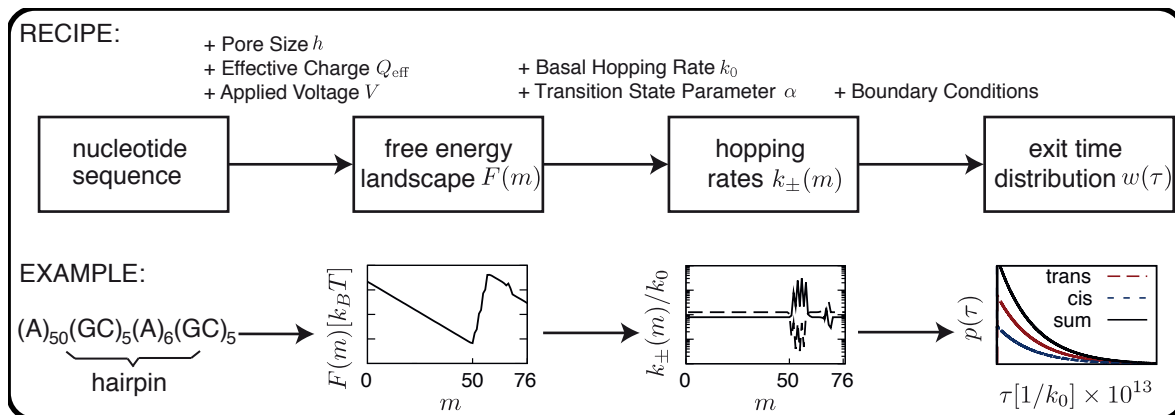


Abbildung 1.12: Bei Verwendung des Mesoskopischen Modells wird zunächst die Energielandschaft der Entfaltung der speziellen Sekundärstruktur berechnet. Hierzu stehen wohlbekannte Thermodynamische Tabellen zur Verfügung. Durch eine angelegte Spannung V wird diese Energielandschaft verkippt, abhängig von der effektiven Ladung Q_{eff} der DNA. Daraus werden die Übergangsraten berechnet, wobei die basale Translokationsrate k_0 und die Position des Übergangszustands durch den Faktor α eingehen. Aus den Übergangsraten kann die erwartete Gesamtdauer der Translokation numerisch berechnet werden. (Abbildung übernommen aus: [104])

1.11 Berechnung der Energielandschaften

Die Energielandschaft bei Nanoporenexperimenten wird durch die freie Energie der Basenpaare und das elektrostatische Potential bestimmt. Die strukturelle freie Energie kann für beliebige DNA Sequenzen anhand von thermodynamischen Tabellen berechnet werden und es stehen verschiedene Programme dafür zur Verfügung[36]. Als Randbedingung wird angenommen, dass die DNA auf beiden Seiten der Pore beliebige Sekundärstrukturen bilden kann. Basenpaarbildung zwischen Basen auf der Trans- und der Cis-Seite sind natürlich ausgeschlossen, sowie Basenpaarbildung innerhalb der Pore. Es wird angenommen, dass sich immer 8 Basen innerhalb der Pore befinden[94], was der Anzahl der Basen innerhalb der Stammregion entspricht. Die für diese Arbeit untersuchten DNA-Hairpins haben eine Stamm-Länge von maximal 12 Basenpaaren, und somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass auf beiden Seiten der Pore gleichzeitig eine Sekundärstruktur gebildet werden kann.

Falls verschiedene Sekundärstrukturen möglich sind, werden alle möglichen Konfigurationen berücksichtigt. Für das elektrostatische Potential wird für jedes translokierte Nukleotid ein Energiebeitrag von $V \cdot Q_{eff}$ zu der freien Energie addiert. Wenn also bei einer DNA mit N Basen Gesamtlänge die ersten m Basen in der Pore sind, bzw. translokiert wurden ergibt sich die freie Energie $\mathcal{F}(m)$:

$$\mathcal{F}(m) = \Delta G_{1,N-m} + \Delta G_{N-m+h,N} + (m - h) \times Q_{eff}V \quad (1.14)$$

mit der freien Energie der noch nicht translokierten Basen $\Delta G_{1,N-m}$ und der freien Energie der bereits vollständig translokierten Basen $\Delta G_{N-m+h,N}$, bei einer Porenlänge von h Basen. In Abbildung 1.13 ist die Energielandschaft von zwei DNA-Hairpins bei Anlegen von verschiedenen Spannungen dargestellt.

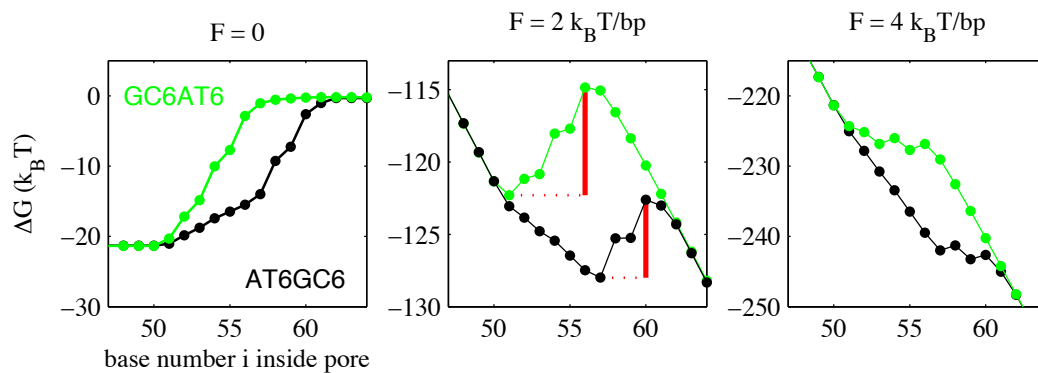


Abbildung 1.13: Die Energielandschaften der Translokation ohne das Anlegen einer Spannung wurde mit Thermodynamischen Tabellen für zwei Hairpins berechnet. Das AT6GC6 Hairpin verfügt über sechs AT Basenpaare gefolgt von sechs GC Basenpaaren. Bei GC6AT6 ist die Reihenfolge umgekehrt. Beide Hairpins besitzen dieselbe thermodynamische Stabilität, allerdings unterscheidet sich die Form der Energielandschaften. Der Entfaltungsprozess beginnt wenn die 50ste Base in die Pore gelangt. Sobald sich die 62ste Base in der Pore befindet ist das Hairpin komplett entfaltet und wird vollständig translokiert. Durch das Anlegen einer Spannung wird der Energieunterschied für einen Schritt nach rechts verringert und somit dieser Schritt kinetisch wahrscheinlicher. Gleichzeitig wird ein Schritt in die andere Richtung unwahrscheinlicher. Bei einer mittleren angelegten Kraft ergibt sich für GC6AT6 eine höhere Energiebarriere (roter Balken) als für AT6GC6. Deshalb translokiert AT6GC6 deutlich schneller als GC6AT6. Solch ein Verhalten kann durch das Phänomenologische Modell nicht erklärt oder vorhergesagt werden.

1.12 Konstante Kraft und lineare Spannungsrampen

Bei den ersten kraftspektroskopischen Messungen mit Nanoporen wurde eine konstante Spannung angelegt und die Dauer der Translokationen untersucht. Diese Methode hat drei Nachteile: Erstens gibt es Probleme bei der Datenanalyse, wenn das phänomenologische Modell verwendet wird (vgl. Abschnitt:1.9). Zweitens ist der verwendbare Spannungsbereich stark eingeschränkt. Wenn eine zu niedrige Spannung angelegt wird, ist die Translokationsrate sehr gering. Wenn dagegen eine zu hohe Spannung angelegt wird, so wird die Membran elektroporiert und zerstört. Drittens ist die Analyse der Daten schwierig, da es viele Events gibt, welche nicht zu Translokationen gehören und somit eine nichttriviale Filterung der Daten nötig ist[83]. Diese Events werden kurzen DNA-Poren Interaktionen zugeordnet, bei denen die DNA nur für kurze Zeit an die Pore oder in den Vorhof gezogen wird, aber die Pore nicht transloziert und schnell wieder wegdiffundiert[53]. Insbesondere wenn die Translokationsdauer der DNA kurz ist, lassen sich die Events nicht mehr eindeutig zuordnen. Wenn die DNA dagegen bei einer dynamischen Kraftspektroskopie für lange Zeit (mehrere ms) in der Pore bei einer niedrigen Spannung (etwa $50mV$) gehalten werden kann, so kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich um korrekt in der Pore gefangene DNA handelt. Eine gute Übereinstimmung von Experimenten mit Spannungsrampen und Experimenten mit konstanter Spannung konnte belegt werden[72]. Dabei ist die Analyse der Rampenexperimente eindeutig (vgl. Abb.3.6). Bei diesen Experimenten wird nach dem Einfangen der DNA eine lineare Spannungsrampe angelegt. Für das Untersuchen einer unbekanntes DNA-Sekundärstruktur bietet es sich an, eine lineare Spannungsrampe zu verwenden, da es die Translokationsdauer zunächst nicht bekannt ist und bei Spannungsrampen immer ein weiter Bereich untersucht wird. Wenn bei einem Experiment mit einer konstanten Spannung eine zu niedrige Spannung angelegt wird, so ist die Lebenszeit der Sekundärstruktur sehr lange und die Dauer des Experiments entsprechend. Wenn eine zu hohe Spannung angelegt wird, so transloziert die DNA sehr schnell und kann nur schwer detektiert werden. Bei der Verwendung von Spannungsrampen kann die Translokationsdauer für konstante Spannungen in einen kontinuierlichen Spannungsbereich berechnet werden. Ebenso kann die Hypothese des adiabatischen Limes durch zwei Messungen mit unterschiedlichen Rampengeschwindigkeiten verifiziert werden[26]. Hierbei muss die Relaxationsdauer des Hairpins viel kürzer sein als die Translokationsdauer. Bei Verwendung einer sehr schnellen Rampengeschwindigkeit könnte es passieren, dass der ratenlimitierende Prozess mit maximaler Geschwindigkeit abläuft. Die Verwendung noch schnellerer Rampen hätte dann keinen Einfluss mehr auf die Translokationsdauer.

Ebenso könnte es Prozesse geben, welche nicht durch die angelegte Spannung beschleunigt werden. Diese würden dann bei hohen Spannungen die Translokationsgeschwindigkeit begrenzen. Dies kann durch die Verwendung von verschiedenen Rampengeschwindigkeiten leicht überprüft werden. Wenn die Translokation im adiabatischen Limit verläuft kann aus einem einzigen Rampenexperiment die Translokationsdauer in einem kontinuierlichen Spannungsbereich bestimmt werden mit:

$$\tau(V) = \frac{\int_V^\infty V' dV'}{\dot{V} p(V)} \quad (1.15)$$

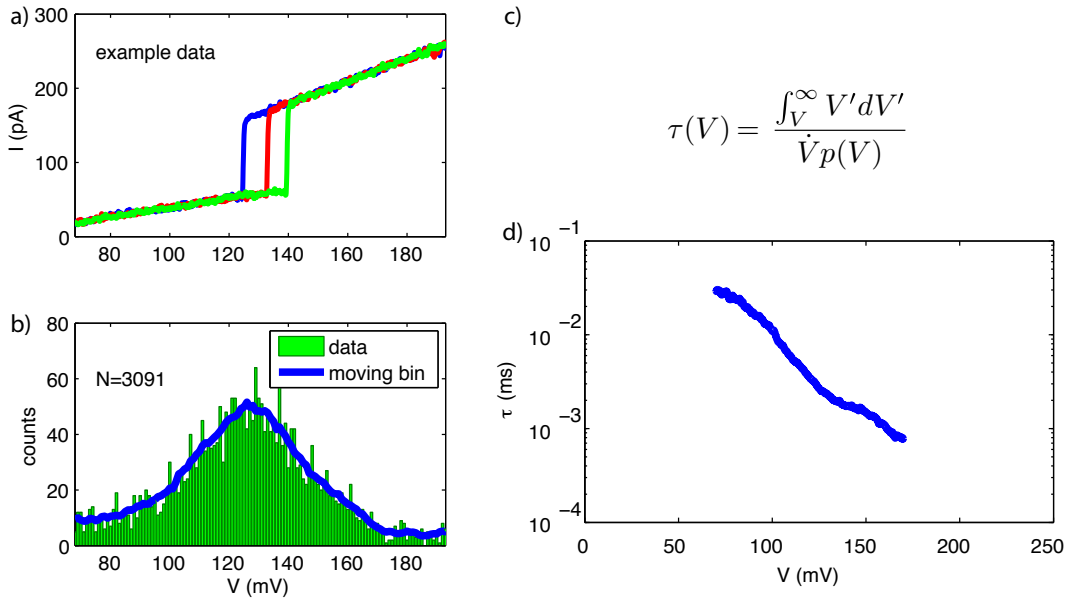


Abbildung 1.14: Bei der Analyse von Experimenten mit Krafttrampen werden zunächst die Spannungen der einzelnen Translokationsereignisse ermittelt (a) und in ein Histogramm eingetragen (b). Durch Verwendung der Formel (c, [26]) kann die Translokationsdauer berechnet werden welche in Messungen mit konstanten Spannungen erhalten werden würde (d). Die Verwendung von Spannungsrampen bietet zahlreiche Vorteile gegenüber Experimenten mit konstanter Spannung (siehe Text). Diese Messung wurde mit dem AT6GC6 Hairpin durchgeführt.

Wenn die dadurch ermittelten Translokationsdauern bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Rampengeschwindigkeiten identisch sind, so kann davon ausgegangen werden, dass die Translokation adiabatisch verläuft[26]. Die Verwendung von Spannungsrampen bietet also einige Vorteile gegenüber Experimenten mit konstanten Spannungen:

- Mit einer einzigen Messung wird ein breiter Spannungsbereich untersucht.

- Es kann geprüft werden ob die Translokation im adiabatischen Limes verläuft.
- Durch die lange Verweilzeit der DNA in der Pore treten keine “bumping“ Events auf.
- Eine hohe Zeitauflösung wird nicht benötigt.
- Bei unbekanntem Strukturen kann einfach ein breiter Spannungsbereich untersucht werden.
- Geringere Probleme bei der Interpretation der Daten mit dem phänomenologischen Modell.

1.13 Vergleich der Modelle

Im phänomenologischen Modell wird die Translokation so einfach wie möglich, mit einem einzigen Schritt, angenommen. Trotz dieser Vereinfachung werden zumindest langsame Translokationen dadurch gut beschrieben (vgl. Abschnitt 1.9). Um die Daten besser durch ein Modell zu beschreiben wurde das phänomenologische Modell auf zwei Schritte erweitert[71]. Bei diesem Modell wird zuerst das Hairpin in einem Schritt geöffnet und die DNA anschließend in einem zweiten Schritt translokiert. Dabei ist vor der Translokation ein erneutes Schließen des Hairpins möglich. In einer anderen Studie wurde eine Verformung der Energielandschaft durch Anlegen einer Kraft berücksichtigt[27]. Bei beiden Studien konnten die Daten besser beschrieben werden als mit dem phänomenologischen Modell alleine. Trotz dieser Fortschritte können aber auch mit diesen Modellen nur sehr eingeschränkte Vorhersagen über unbekannte DNA-Strukturen gemacht werden.

Mit Hilfe von Molekulardynamik Simulationen könnten zwar prinzipiell Vorhersagen für unbekannte Strukturen gemacht werden, allerdings wird die mögliche Zeitspanne der Simulation, durch die, zur Verfügung stehende Rechenleistung, stark begrenzt[143]. Deshalb wurden Molekulardynamik Simulationen bislang nur eingesetzt um Teilaspekte der Translokationsdauer besser zu verstehen. Beispielsweise wurde dadurch die Abhängigkeit der Translokationsdauer von der Orientierung der DNA untersucht[70].

Eine sehr gute Vorhersage der Translokationsdauer, bei gleichzeitig überschaubarem Rechenaufwand, bietet das mesoskopische Modell. Da für DNA-Hairpins gute thermodynamische Tabellen zur Verfügung stehen, kann die sequenzspezifische Energielandschaft leicht berechnet werden. Mit Hilfe des mesoskopischen Modells kann dadurch das Translokationsverhalten beliebiger DNA Strukturen vorhergesagt werden. Dabei werden nur zwei universelle Parameter und die wohlbekanntesten thermodynamischen Tabellen benötigt. Ebenso wird durch das mesoskopische Modell auch der Bereich hoher Spannungen korrekt vorhergesagt. In diesem Bereich spielt das Öffnen der Hairpins nur noch eine geringe Rolle und DNA-Hairpins translokieren ähnlich wie einzelsträngige DNA.

1.14 Rauschen bei NFS

Bei Patch-Clamp-Messungen wird der Ionenfluss durch einzelne Ionenkanäle elektrisch gemessen. Für Translokationsexperimente beträgt dieser Ionenstrom etwa 100 Picoampere, wobei der Strom von der angelegten Spannung, der Leitfähigkeit des Elektrolyten und der Pore selbst abhängt. Ströme in dieser Größenordnung können leicht durch elektromagnetische Impulse und Wellen in Leitungen induziert werden und die eigentliche Messung überlagern. Deshalb ist es unerlässlich die Patch-Clamp-Versuche in einem Faraday-Käfig durchzuführen. Um die Schirmung zu optimieren ist eine Spektrumanalyse sehr hilfreich, denn Rauschen, welches von anderen Geräten induziert wird, besitzt in der Regel ein charakteristisches Spektrum und kann anhand der Maxima in einer Spektrumanalyse identifiziert werden. Häufig tritt beispielsweise ein 50 Hz Rauschen aufgrund einer Masse-schleife auf oder ein Rauschen mit einer Frequenz von mehreren kHz, verursacht durch TFT-Computermonitore. Am einfachsten können diese Quellen mit Hilfe einer Echtzeit-Spektrumanalyse ausfindig gemacht werden. Um Massenschleifen und Spannungspulse durch andere Geräte zu verringern wurden für diese Arbeit alle Ein und Ausgänge des verwendeten Patch-Clamp-Verstärkers optisch abgekoppelt (vgl. Abb.A.1).

Aber selbst wenn der Versuchsaufbau optimal abgeschirmt ist, kann elektrisches Rauschen die Messungen stark beeinflussen. Dieses Rauschen hängt von dem verwendeten Aufbau ab und ist in der Regel stärker bei höheren Frequenzen. Dieses Rauschen kann effektiv durch die Verwendung eines Tiefpass-Filters reduziert werden. Allerdings wird dadurch die zeitliche Auflösung der Messung reduziert, was insbesondere bei Translokationsexperimenten mit konstanten Spannungen problematisch ist, da hierbei oftmals sehr schnelle Translokationen untersucht werden sollen. Also ist es grundsätzlich nötig, den Messaufbau so zu optimieren, dass das aufbauspezifische Rauschen klein genug ist für die angestrebte Messung. Es gibt verschiedene und gut untersuchte Ursachen für Rauschen[124], allerdings war im Rahmen dieser Arbeit alleine die Größe bzw. die Kapazität der Lipidmembran die dominante Quelle für Rauschen. Dieses kapazitive Rauschen wird durch Schwankungen der angelegten Spannung verursacht, welche direkt einen Stromfluss in die Kapazität der Membran und des Aufbaus erzeugen. Die Kapazität der Lipidmembran wird durch deren Aufbau erzeugt, welcher einem Plattenkondensator ähnelt. Der Plattenabstand entspricht der Membrandicke ($d \approx 4$ nm) und die Plattenfläche entspricht der Membranfläche. Die Kapazität ist deshalb linear von der Membranfläche abhängig ($C = \epsilon_0 \epsilon_r A/d$) und beträgt etwa $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, was $\epsilon_r \approx 5$ entspricht[82]. In Abbildung 1.15 wird der Zusammenhang

zwischen der Membranfläche zwischen den Tröpfchen und dem Rauschen dargestellt. Je

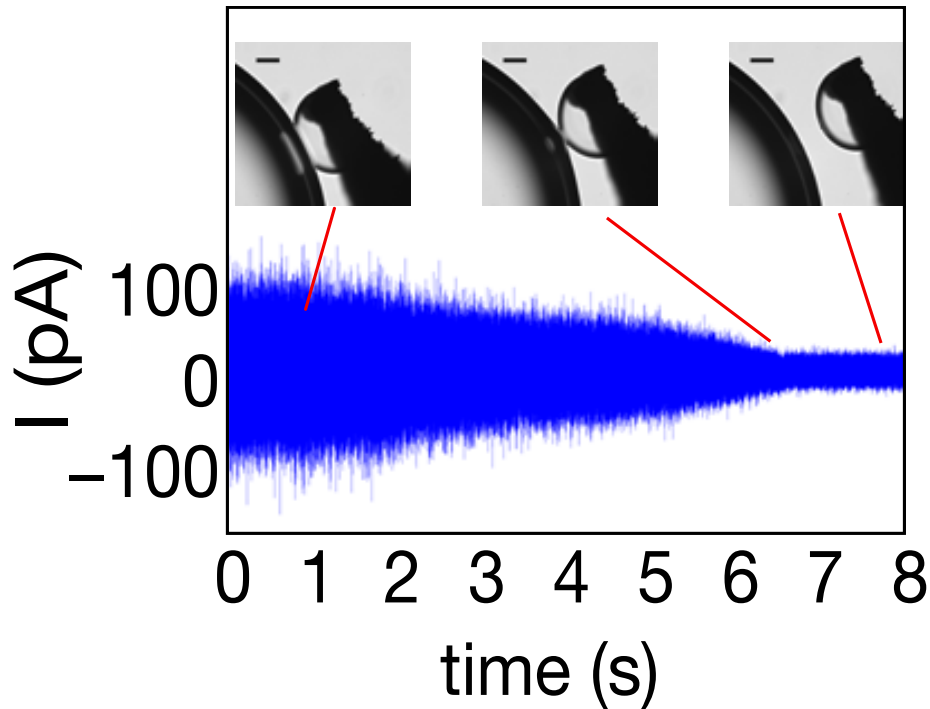


Abbildung 1.15: Der Stromfluss wurde aufgenommen während die Tröpfchen auseinander gezogen wurden. Dabei verringert sich die Membranfläche kontinuierlich bis die Tröpfchen komplett von einander getrennt sind. Dabei kann die Größe der Membran anhand des hellen Scheins nahe der Kontaktfläche abgeschätzt werden. Um den Effekt zu verdeutlichen wurde gezielt eine große Membran hergestellt (Skala der Mikroskopbilder: $50 \mu\text{m}$). Bei dem verwendeten Aufbau wurde starkes Rauschen bei einem Membrandurchmesser größer als etwa $20 \mu\text{m}$ beobachtet. Bei kleineren Membranen war der Einfluss der Membrankapazität vernachlässigbar. Durch die Verwendung eines kleinen Tröpfchens konnte das Rauschen soweit reduziert werden, dass die zeitliche Auflösung ausreichend hoch gewählt werden konnte um DNA mittels eines schnellen Regelkreises in der Pore zu fangen.

kleiner die Membranfläche ist, desto geringer ist die Intensität des Rauschens. Wenn die Tröpfchen komplett voneinander getrennt werden, reduziert sich das Rauschen auf einen aufbaubedingten Wert. Eine Minimierung der Membranfläche kann durch die Verwendung von möglichst kleinen Tröpfchen erreicht werden. Die Kapazität des Aufbaus kann durch Verwendung von möglichst kurzen Kabeln und Elektroden minimiert werden.

1.15 Statistische Methoden

Mit Nanoporen-Experimenten können sehr schwache Unterschiede in der Stabilität von Strukturen gemessen werden. Es ist beispielsweise möglich, bei kurzen DNA-Hairpins den Einfluss einzelner Basenpaare zu detektieren (vgl. Abschnitt 3.6). In diesem Bereich spielen thermische Fluktuationen eine entscheidende Rolle und somit unterliegen die Messergebnisse bei Nanoporenexperimenten einer breiten statistischen Streuung. Um gültige Aussagen treffen zu können, müssen deshalb viele Moleküle einer Spezies unter denselben Bedingungen untersucht werden und die Daten anschließend statistisch analysiert werden. Bei der Datenanalyse werden dann die Parameter eines Modells bei einem Fit solange variiert, bis die größte Übereinstimmung mit dem Experiment erreicht wird. Wenn beispielsweise ein Wert aus 5000 Messungen bestimmt werden soll, welcher normalverteilt ist (z.B. der Stromfluss durch eine Nanopore während einer Translokation), so können die Werte in einem Histogramm (vgl. Abb.1.16,a) dargestellt werden, und eine Gauß-Kurve mit der Methode der kleinsten Quadrate (least squares fit) angepasst werden. Bei der Erstellung des Histogramms werden die einzelnen Datenpunkte verschiedenen Klassen zugeteilt (binning) und in Balken dargestellt. Durch diesen Prozess wird der Informationsgehalt der Daten reduziert. Wenn nur wenige Datenpunkte zur Verfügung stehen kann durch das Histogramm die tatsächliche Verteilung manchmal nicht mehr korrekt dargestellt werden. In Abb. 1.16 sind verschiedene Histogramme dargestellt. Für die linke Spalte wurden 5000 Datenpunkte zufällig generiert und durch ein normales Histogramm (oben), ein integriertes Histogramm (Mitte) und einen gleitenden Mittelwert (unten) dargestellt. Die Daten in der rechten Spalte haben dieselbe Verteilung, aber es wurden nur 50 Datenpunkte verwendet. Mit dem normalen Histogramm wird bei wenigen Datenpunkten der Häufungspunkt bei $x = 0$ nicht mehr korrekt dargestellt. Dieses Problem kann durch die Verwendung eines gleitenden Mittelwerts umgangen werden, allerdings werden dabei alle Datenpunkte öfters berücksichtigt und die tatsächliche Anzahl der Daten ist nicht mehr klar ersichtlich. In Abb. 1.16 wurde eine Breite des gleitenden Mittelwerts von $\Delta x = 2$ und eine Schrittweite von 0,1 gewählt. Also wird jeder Datenpunkt zwanzig mal berücksichtigt. Die integrierten Histogramme enthalten alle Informationen über die Lage des Häufungspunkts und der Gesamtzahl der Experimente. Deshalb wurden sie für diese Arbeit häufig verwendet. Unabhängig von der grafischen Darstellung der Daten sind integrierte Histogrammen für einen Fit mit der Methode der kleinsten Quadrate sinnvoll, da keine Informationen durch das Einteilen der Daten in Klassen verloren gehen.

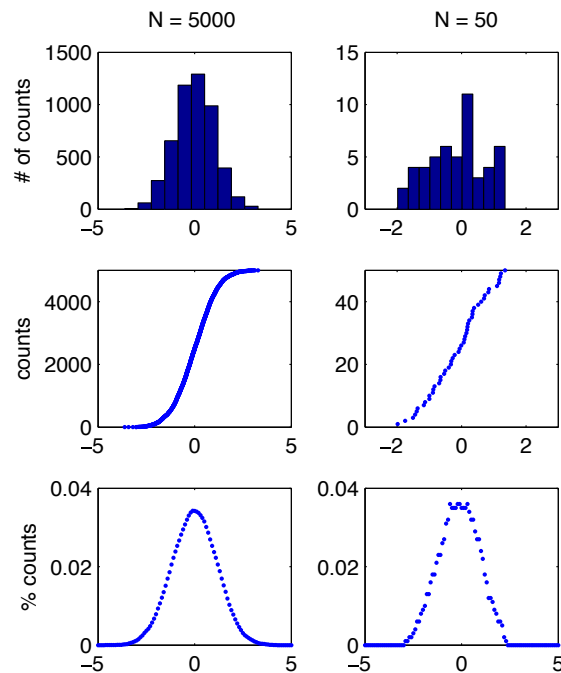


Abbildung 1.16: Es wurden 5000 Zufallswerte für die linke Spalte generiert und 50 für die rechte. Die Werte sind Gauß-verteilt mit einem Maximum bei 0 und einer Standardabweichung von 1. Bei vielen Werten (links) kann die Verteilung in dem normalen Histogramm (oben), dem integrierten Histogramm (Mitte) und dem gleitenden Mittel (unten) gut erkannt werden. Bei wenigen Werten dagegen (rechts) wird die Verteilung nur ungenügend durch das normale Histogramm dargestellt und bei der Darstellung durch ein gleitendes Mittel wird das Maximum durch die Breite des Mittels verbreitert. Bei dem integrierten Histogramm dagegen kann sowohl die gesamte Anzahl der Datenpunkte als auch die Position des Maximums der Verteilung am Wendepunkt leicht identifiziert werden. Auch die statistische Breite kann einfach beurteilt werden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit häufig integrierte Histogramme verwendet, obwohl diese Darstellung weniger verbreitet ist. Angemerkt sei noch, dass die Qualität der Daten bei integrierten Histogrammen nicht durch die Einteilung der Datenpunkte in Klassen reduziert wird und sich somit diese Darstellung besser für Fits mit der Methode der kleinsten Quadrate eignet.

Eine andere Methode der Datenanalyse bietet der Maximum-Likelihood-Estimate (MLE). Hierbei werden zunächst zufällige Werte für die Fitparameter angenommen und damit die erwartete Verteilung der Messergebnisse berechnet. Für jeden gemessenen Datenpunkt wird aus dieser Verteilung die Wahrscheinlichkeit ermittelt, genau diesen Datenpunkt zu messen. Aus allen Datenpunkten wird eine Gesamtwahrscheinlichkeit für das ganze Experiment bestimmt. Diese wird durch Variation der Fitparameter maximiert, um dadurch die wahrscheinlichsten Werte der Fitparameter zu erhalten. Bei dieser Methode geht keine Information durch Einteilen der Daten in Klassen verloren. Außerdem wird die Abweichung der Datenpunkte vom Modell mit der richtigen Wahrscheinlichkeit gewichtet. Wenn beispielsweise die Translokationsdauer einer DNA bestimmt wird, so ist eine Abweichung von einer Millisekunde bei einer langen Translokationsdauer von 100 Millisekunden nicht unwahrscheinlich. Es ist aber dagegen ziemlich unwahrscheinlich, dass dieselbe Abweichung bei einer Translokation auftritt welche nur $200 \mu\text{s}$ dauert. Ebenso kann bei Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode eine asymmetrische Verteilung von Wahrscheinlichkeiten berücksichtigt werden. Bei der Messung der Translokationsdauer eines DNA-Hairpins bei einer konstanten Spannung wurde beispielsweise gefunden, dass die wahrscheinlichste Translokationsdauer 3 ms beträgt (vgl. Abb.1.11). Eine Translokationsdauer von 2 ms wurde in dieser Messung sehr viel seltener beobachtet, als eine Translokationsdauer von 4 ms. Bei Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate würden Abweichungen in beide Richtungen gleich behandelt werden. Diese Probleme können durch die Maximum-Likelihood-Methode umgangen werden. Dafür traten bei dieser Methode Probleme auf, wenn die Daten einer gewissen Vorauswahl unterzogen wurden. Wenn beispielsweise bei einer Messung der Translokationsdauer die maximale Messzeit aus technischen Gründen begrenzt wird, so müssen auch die Daten in die Berechnung mit einbezogen werden, bei welchen die Translokation länger als die maximale Messzeit gedauert hat. Ein anderes Problem tritt auf, wenn eine NFS Messung von statistischem Gating der Pore überlagert wird. In diesem Fall kann es sinnvoller sein die Methode der kleinsten Quadrate zu verwenden, da diese einfacher auf begrenzte Teilmengen der Messdaten angewendet werden kann. Somit können beispielsweise ausschließlich die Daten im Bereich des Häufungspunkts berücksichtigt werden, da hier durch die große Anzahl der Datenpunkte der störende Einfluss von Artefakten geringer ist. Also muss bei der Datenanalyse immer überlegt werden, ob die MLE-Methode anwendbar ist, oder ob mit der Methode der kleinsten Quadrate gefittet werden muss. Bei unseren Messungen unterschieden sich die Ergebnisse in der Regel nur geringfügig.

Kapitel 2

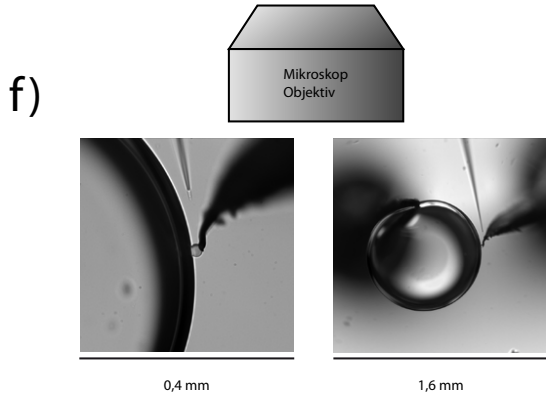
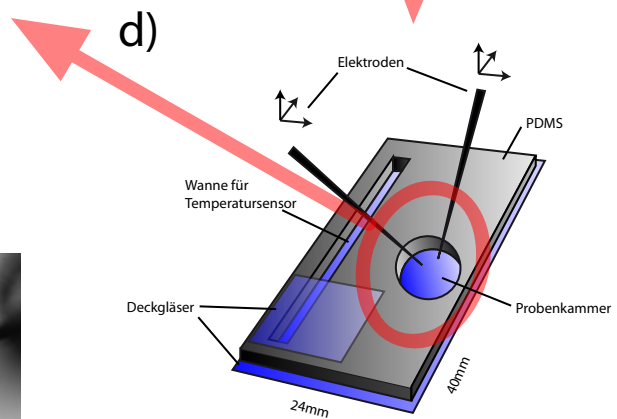
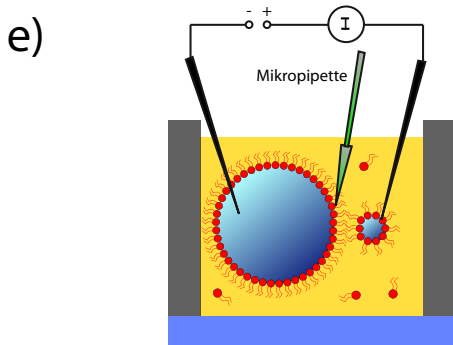
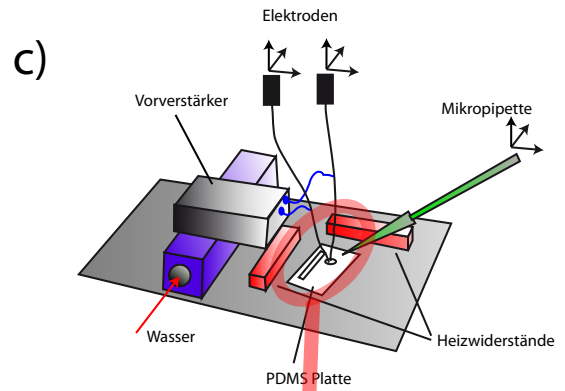
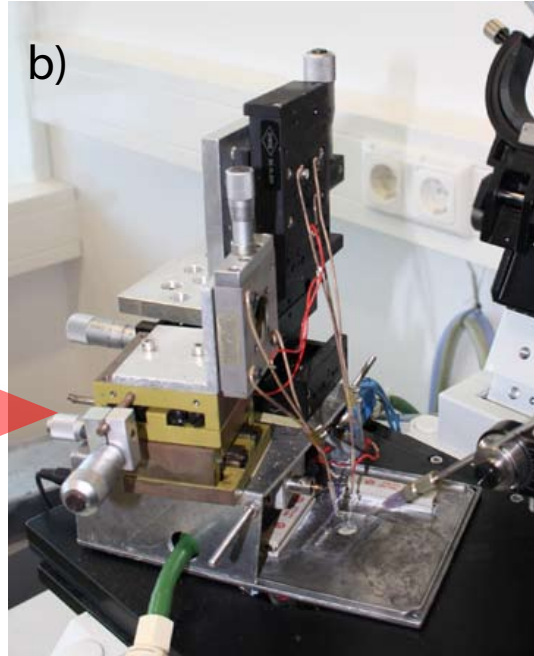
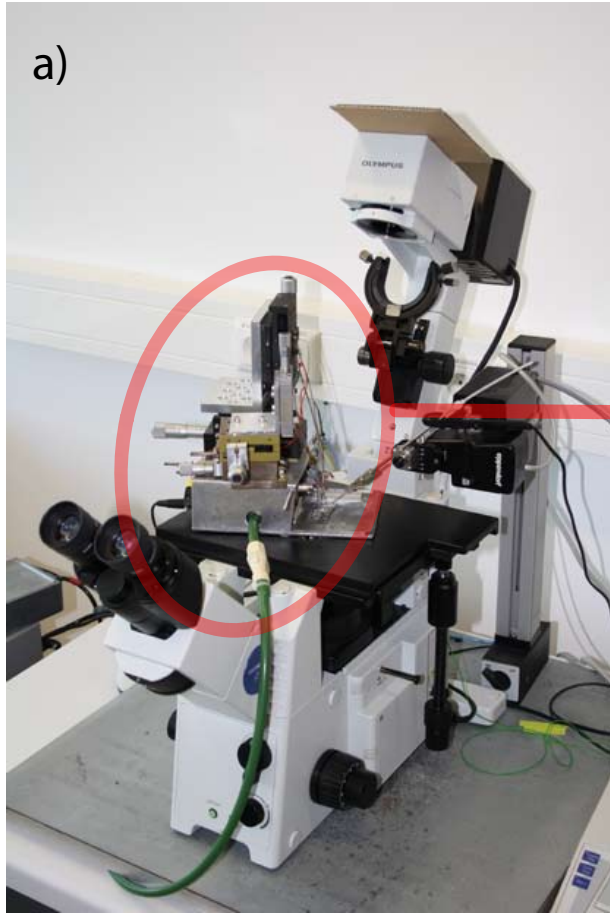
Material und Methoden

2.1 Aufbau des Messplatzes

2.1.1 Droplet Interface Bilayer Setup (DIB) und Mikroskopaufbau

Für die Messungen mit Nanoporen wurde ein neuartiger Aufbau als Plattform entwickelt. Dabei wurden folgende Ziele umgesetzt:

- Kleine Membranfläche für geringes Rauschen
- Große Stabilität der Membran
- Kontrollierbarkeit der Temperatur
- Hohe Automatisierbarkeit
- Geringes Probenvolumen
- Gute Schirmung durch Faradayschen Käfig



0,4 mm

1,6 mm

Abbildung 2.1: Das Foto a) zeigt den Messaufbau mit geöffnetem Faraday-Käfig auf einem invertierten Mikroskop. Rechts im Bild ist der Positionierer für die Mikropipette zu erkennen und mittig der grüne Schlauch für das Kühlwasser, welches den Faraday-Käfig kühlt. Abbildung b) zeigt eine Nahaufnahme und in c) ist eine schematische Darstellung dazu abgebildet. Die Lipidmembran wird in einer Probenkammer auf einer PDMS Platte hergestellt. Die PDMS Platte kann einfach ausgetauscht und gereinigt werden und verfügt über eine Wanne für den Temperatursensor. Dieser befindet sich dadurch ohne direkten elektrischen Kontakt möglichst nahe an dem Lipid-Öl Bad für den DIB, um die Temperatur möglichst exakt messen zu können. Aufnahmen durch das Mikroskop (f) zeigen den tatsächlichen Größenunterschied der beiden Tröpfchen, welcher in schematischen Abbildungen (e) nicht maßstabsgetreu übernommen wurde. Auf dem linken Foto (f) ist ein Teil des großen Tröpfchens, und das kleine Tröpfchen an einer Elektrode, und die Mikropipette zu erkennen. Auf dem rechten Foto ist auch das ganze große Tröpfchen zu erkennen.

Für die Realisierung wurde die Idee des “droplet interface bilayer“ (DIB) verwendet. Dabei wird die Membran nicht an einer Apertur hergestellt, sondern an der Kontaktfläche zwischen zwei wässrigen Tröpfchen in einem Lipid-Öl Gemisch[69, 33, 43]. Um eine hohe zeitliche Auflösung zu erreichen, musste die Membranfläche im Vergleich zu den früheren Arbeiten deutlich reduziert werden, um dadurch das elektrische Rauschen zu verringern. Bei unterschiedlich großen Tröpfchen ist die Membran etwas kleiner als das kleine Tröpfchen (vgl. Abb.2.1), also bestimmt die Tröpfchengröße die Fläche der Membran und somit das Rauschen. Ein möglichst kleines Tröpfchenvolumen wurde durch direktes pipettieren der Elektrolytflüssigkeit an die Elektroden mittels einer Mikropipette (Eppendorf Femtotip 2) erreicht. Dadurch konnte ein Membrandurchmesser von etwa 25 μm erreicht werden. Bei Verwendung eines 10 kHz Bessel Filters betrug die Intensität des Rauschens weniger als 3 pA RMS. Auch bei Verwendung von höheren Filterfrequenzen war das Rauschen gering genug um DNA in der Pore fangen zu können. Der verwendete Patch-Clamp-Verstärker (HEKA EPC 9) verfügt über zwei Filterstufen, wobei die erste Stufe mit einem Besselfilter 4. Ordnung nur eine Vorfilterung ermöglicht, und die zweite Filterstufe (Besselfilter 8. Ordnung) bis maximal 10 kHz einstellbar ist. Während der Krafttrampen ist eine hohe zeitliche Auflösung nicht nötig und es wurde die zweite Filterstufe für die Datenaufzeichnung verwendet. Für das Fangen von DNA mittels externer Elektronik wurde dagegen ein externer Besselfilter (Kron-Hite 3381) verwendet und die Filterfrequenz in der Regel auf 25 kHz eingestellt. Bessel-Filter eignen sich besonders für die Übertragung von rechteckigen Signalen, wie z.B. Translokationsereignisse, da sie dieselbe Gruppenlaufzeit für alle Frequenzen im Durchgangsbereich aufweisen.

Die porenbildenden Proteine wurden nach Ausbilden der Membran in das größere Tröpfchen injiziert, möglichst nahe an der Membran, um die Proteinkonzentration lokal für kurze Zeit zu erhöhen. Nach kurzer Zeit verteilten sich die porenbildenden Proteine gleichmäßig in dem großen Tröpfchen und ihre Konzentration sank soweit ab, dass keine Poren mehr gebildet wurden. Durch das große Tröpfchen wurden zusätzlich leichte Bewegungen der Elektroden ausgeglichen, da die Membran die Tröpfchen wie durch einen Klebstoff zusammenhält. Außerdem wurde durch das Flüssigkeitsreservoir des großen Tröpfchens (einige Nanoliter) die langsam verdunstende Flüssigkeit in dem kleinen Tröpfchen (einige Pikoliter) über die Membran nachgefüllt. Die somit hergestellten Lipidmembranen waren in der Regel über viele Stunden stabil und wurden erst zerstört, wenn durch Verdunsten der Flüssigkeit oder durch andere Einflüsse die Tröpfchen auseinander gerissen wurden. Durch gelegentliches mechanisches Nachjustieren der Elektroden ließ sich dieses Problem gut ver-

meiden und die Tröpfchen wurden in der Regel erst nachts separiert wenn die Elektroden nicht mehr nachjustiert wurden. Häufig aber war die Stabilität der Proteinpore der limitierende Faktor für die Dauer der Messungen. Als sehr hilfreich hat sich die Möglichkeit bewährt, die Membran innerhalb von wenigen Sekunden neu bilden zu können, falls sich mehrere Poren oder schlechte Poren in die Membran inkorporiert haben. Dabei wurden die Tröpfchen durch Bewegen der Elektroden auseinander gezogen und die Membran durch Aneinanderdrücken der Tröpfchen neu gebildet. Es gibt allerdings auch Aspekte welche in anderen Messaufbauten günstiger sind:

- Geringerer Leckstrom
- Austauschbarkeit der Flüssigkeiten
- Einfachere Bedienbarkeit
- Bei größeren Probenvolumina können Konzentrationen exakter eingestellt werden

Für die durchgeführten Experimente spielten diese Argumente allerdings nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu der Zuverlässigkeit des DIB Aufbaus.

2.1.2 Messkammer und Temperaturkontrolle

Die Experimente wurden in einer Messkammer auf einer PDMS-Platte durchgeführt (vgl. Abb.2.1) welche einfach hergestellt und ausgetauscht werden kann und leicht im Ultraschallbad zu reinigen ist. Es wurden mehrere PDMS-Platten im Wechsel verwendet, um Zeit bei der Reinigung zu sparen. Zur Herstellung der PDMS-Platte wurden ca. 7 g PDMS (Sylgard Silicone Elastomer, Dow Corning) mit 1 g Aushärtemittel (curing Agent, Dow Corning) in einer Petrischale aus Plastik vermischt und anschließend über Nacht bei 80°C ausgehärtet. Das PDMS kann dann als gummiartige Platte aus der Petrischale entnommen, und mit einem Skalpell zugeschnitten werden. Die Probenkammer wurde mit einem Locher ausgestanzt. In einem Plasmaofen wurden die Oberflächen des zugeschnittenen PDMS und zweier Deckgläser aktiviert und die PDMS-Platte wie in Abb. 2.1 aufeinander gelegt. Bei einem erneuten Aushärten über Nacht bei 80°C wurde das PDMS fest mit dem Glas verbunden. Auf der PDMS-Platte befindet sich neben der eigentlichen Probenkammer, in welche die Elektroden eingetaucht werden, noch eine Wanne welche einen Pt100 Temperatursensor aufnehmen kann und ebenfalls mit Hexadekan gefüllt werden kann. Durch die räumliche Nähe des Temperatursensors kann die Temperatur in der Probenkammer genau gemessen werden, ohne dass mögliche Verschmutzungen durch den Temperatursensor die Experimente beeinflussen könnten. Die Temperatur wurde über ein temperierbares Wasserbad und zwei steuerbare Heizwiderstände geregelt. Zur Temperierung wurde Wasser durch ein Metallrohr gepumpt welches einen thermischen Kontakt mit dem Faradayschen Käfig hat. Damit wurde die Temperatur in der Probenkammer auf wenige Grad unter der Solltemperatur gebracht. Die Leistung der Heizwiderstände wurde durch einen PID Regler geregelt, welcher in LabView programmiert wurde. Die Software steuert einen Leistungstransistor an (vgl. Abb.2.2 und A.1; Shutter) durch welchen eine feste Spannung an die Heizwiderstände angelegt wird. Durch die Dauer der angelegten Spannung wird die Heizleistung geregelt.

Die Messung der Temperaturkontrolle innerhalb des Faradayschen Käfigs erzeugt elektromagnetische Strahlung, welche sich mit den Messergebnissen überlagert. Deshalb wurden Patch-Clamp-Messungen und Temperaturmessungen bzw. Heizen nicht gleichzeitig durchgeführt, sondern alle paar Sekunden abwechselnd. Während den Patch-Clamp-Messungen wurden alle Kabel des Pt100 Sensors und der Heizwiderstände, welche in den Faradayschen Käfig führen, durch ein Relais (vgl. Abb.2.2 und A.1; Relais) mit der Signalmasse (GND) verbunden um störende elektrische Signale zu verhindern. Die PID Regelung der Heizleistung wurde so programmiert, dass in diesen Unterbrechungen die Heizung aus-

geschaltet wird. Da während der Heizzyklen eine rauscharme Messung nicht möglich ist verringert sich die für die Messung zur Verfügung stehende Zeit um die Dauer der Heizzyklen. Durch das geringe Probenvolumen in dem kleinen Tröpfchen wäre es allerdings ohnehin ungünstig, eine Spannung mit konstanter Polarität über einen längeren Zeitraum anzulegen, da der Ionenfluss durch die Nanopore die Ionenkonzentration in dem kleinen Volumen signifikant verändern kann. Deshalb wurde während der Heizzyklen die Spannung invertiert um den Netto-Ionenfluss möglichst auszugleichen. Also stellt die Verkürzung der Messzeit durch die Heizzyklen keinen relevanten Nachteil dar.

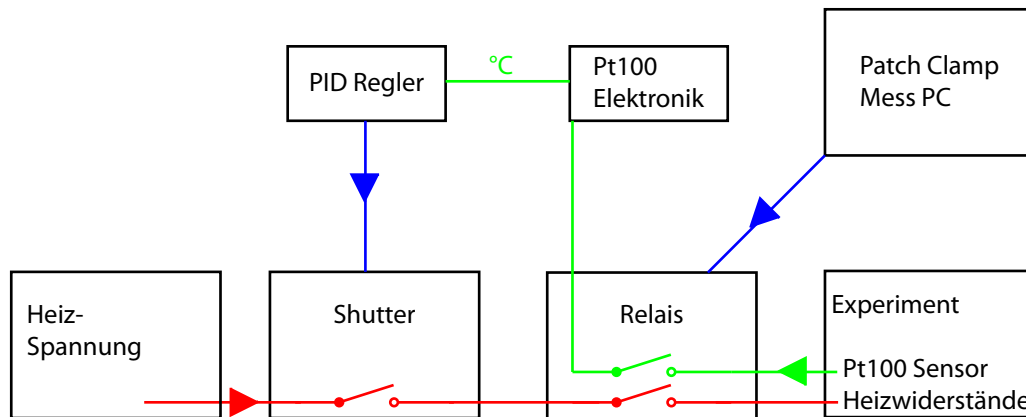


Abbildung 2.2: Der Faraday-Käfig wurde konstant über ein temperiertes Wasserbad gekühlt. Die gleichzeitige Zufuhr von Wärme über Heizwiderstände wurde durch einen PID Regler gesteuert. Dabei wurde die Heizleistung durch die Dauer von Strompulsen durch die Heizwiderstände kontrolliert. Durch den PID Regler wurde über den Shutter der Heizstrom ein- bzw. ausgeschaltet. Als Eingangssignal für den PID Regler wurde die Temperatur des Experiments mit einem Pt100 Sensor gemessen. Da sowohl die Messung der Temperatur als auch der Stromfluss durch die Heizwiderstände eine starke Quelle für elektrisches Rauschen sind, wurde während der Messung die Temperaturkontrolle unterbrochen und die Kabel des Pt100 Sensors und der Heizwiderstände mittels eines Relais auf Massepotential geschaltet. Während einer Messung wurde mehrmals pro Minute zwischen Heiz- und Messzyklen gewechselt. Dafür wurde das LabView Programm des Computers für die PID Regelung mit dem Messprogramm des Patch-Clamp-Verstärkers synchronisiert. Während der Heizzyklen wurde die Membranspannung invertiert um Veränderungen der Ionenkonzentration des kleinen Tröpfchens zu verringern.

2.1.3 Regelkreis für das Einfangen von DNA

Um einzelne DNA Moleküle in einer α -HL Pore zu fangen, muss die Spannung während der Translokation geregelt werden. Da die Translokationsdauer von einzelsträngiger DNA 100 – 300 μ s beträgt[53], wird dazu ein schneller elektronischer Regelkreis benötigt. Als Eingangssignal für den Regelkreis dient dazu die Stromstärke, welche bei Anlegen einer konstanten Spannung durch die Pore fließt. Sobald DNA in die Pore gelangt wird der Stromfluss sprunghaft reduziert und die Elektronik kann auf das Unterschreiten eines Schwellwerts reagieren. Zur Realisierung wurde eine Schaltung entwickelt, welche mittels eines Komparators das Unterschreiten eines Schwellwerts detektiert und ein Triggersignal an den Patch-Clamp-Verstärker ausgibt, welcher daraufhin ein vorher definiertes Spannungsprotokoll startet. Für die Latenzzeit, welche zwischen Eintritt der DNA und Änderung der Spannung verstreicht, waren im Wesentlichen die Latenzzeiten des externen Bessel-Filters und die Reaktionszeit des Patch-Clamp-Verstärkers auf den Trigger-Input relevant. Die Filterfrequenz des externen Tiefpass-Bessel-Filters wurde so eingestellt, dass das Rauschen gerade gering genug war, um eine DNA Translokation eindeutig mittels eines Schwellwerts erkennen zu können. In Abb. 2.3 ist der Eintritt eines DNA Strangs in die Pore mit einer Filterfrequenz von 30 kHz bzw. 5 kHz dargestellt. Bei der Messung mit einem 5 kHz Filter ist der Eintritt der DNA klar erkennbar. Allerdings ist der Einfluss des Filters unter anderem dadurch erkennbar, dass die Flanke nicht mehr senkrecht ist. Zusätzlich wird das Signal durch den Filter bei 5 kHz Filterfrequenz um etwa 250 μ s verzögert, was dazu führen kann, dass die DNA bereits vollständig translokiert wurde, bevor die Spannung verändert werden kann. Bei der Messung mit 30 kHz Filterfrequenz (oben) ist das Rauschen noch gering genug um einen Schwellwert zu definieren zu können. Bei dieser Einstellung des Filters beträgt die Latenzzeit des Filters etwa 40 μ s und die Flanken sind senkrecht bei Eintritt der DNA. Allerdings verläuft im gezeigten Beispiel der Eintritt der DNA über einen Zwischenschritt mit einer Leitfähigkeit, welche bei dieser Einstellung des Filters von der kompletten Blockade schwer mittels Schwellwert zu trennen ist. Während dieses Zwischenschritts wurde die DNA vermutlich in dem Vorhof der Pore gehalten, bis das einzelsträngige Ende der DNA in die Pore gelangt ist. In solch einem Fall würde die Elektronik von einer Translokation ausgehen und die Spannung absenken bevor die DNA richtig in der Pore gefangen ist. Die DNA würde dann vermutlich von der Pore weg diffundieren. In der Tat gelang das Einfangen der DNA nur bei etwa einem Drittel der Spannungsrampen. Eine schnelle Reaktionszeit ist andererseits aber für kurzlebige Events dringend nötig. Dieses Problem kann beispielsweise mit der Ankertechnik (vgl. Abschnitt 2.2) umgangen werden.

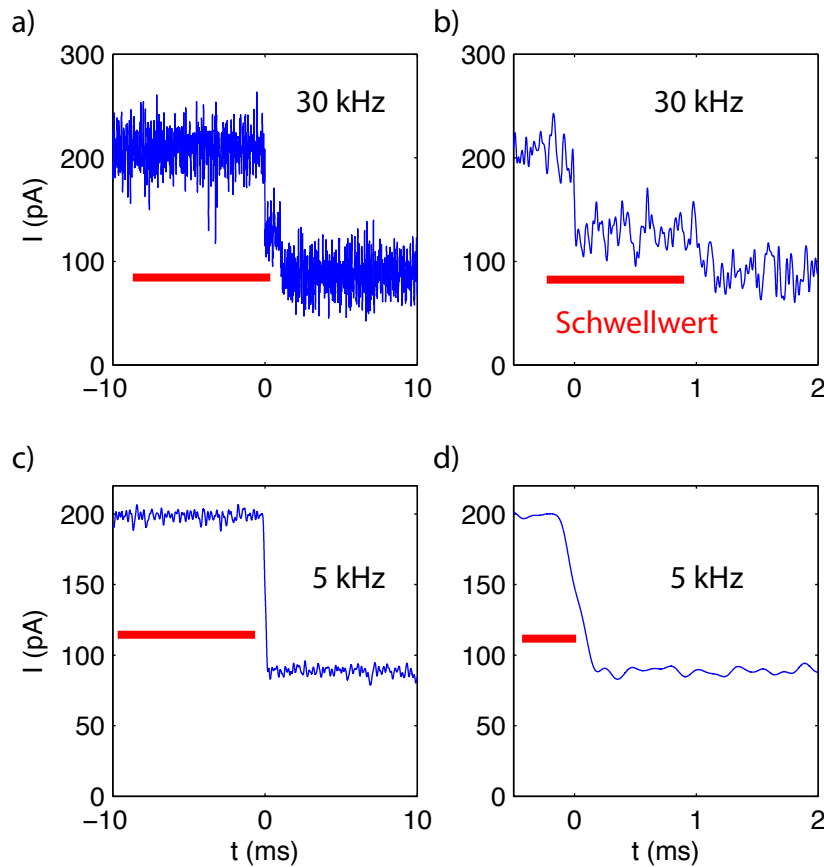


Abbildung 2.3: Der Eintritt von DNA in die Pore wurde mit 30 kHz (oben) und 5 kHz (unten) Filterfrequenz aufgenommen, wobei jeweils ein 20 ms Zeitfenster (links) und ein 2,5 ms Zeitfenster (rechts) abgebildet sind. Da nicht gleichzeitig bei verschiedenen Filterfrequenzen gemessen werden konnte handelt es sich um unterschiedliche Events. Durch Verwenden einer niedrigen Filterfrequenz wird das Rauschen deutlich verringert. Dafür ist die Flanke bei Eintritt der DNA nicht mehr senkrecht (d). Zusätzlich wird das Signal bei 5 kHz Filterfrequenz um etwa $250 \mu\text{s}$ innerhalb des Filters verzögert, wodurch es vorkommen kann, dass die DNA bereits vollständig translokiert wurde, bevor die Elektronik auf das Signal reagieren kann. Häufig vollzieht sich der Eintritt der DNA über eine Stufe (oben), welche durch einen kurzen Aufenthalt der DNA im Vorhof der Pore erklärt werden kann, bevor die DNA in die Stammregion einfädelt. Für das Fangen der DNA wird üblicherweise ein Schwellwert festgesetzt. Sobald der Strom unter diesen Wert fällt, wird eine Spannungsrampe gestartet. Bei Verwendung einer hohen Filterfrequenz ist es häufig schwierig, den Schwellwert (rot) so einzustellen, dass die Spannungsrampe erst dann startet, wenn sich die DNA in der Stammregion befindet und durch den hohen Rauschpegel nicht schon vorher.

2.2 Fangen von DNA mit der Ankertechnik

Mit Hilfe der Ankertechnik können einzelne DNA Moleküle ohne einen Regelkreis in der Pore gefangen werden. Nach Ausführung eines speziellen Pulsprotokolls befindet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein DNA Molekül in der Pore und es kann direkt eine Spannungsrampe gestartet werden. Dabei kann die Filterfrequenz eines Tiefpassfilters auf 1 kHz gesenkt werden ohne dass dadurch die Qualität der Messung beeinträchtigt wird. Für dieses Verfahren ist es also nicht nötig einen rauscharmen Patch-Clamp-Aufbau zu verwenden.

Für diese Technik wird die DNA aus vier Segmenten aufgebaut: eine stabile Ankersequenz, die zu untersuchende Sekundärstruktur, eine Verbindung zwischen diesen Strukturen (z.B. (dT)₅₀) und eine weitere einzelsträngige Sequenz an dem zweiten Ende der zu untersuchenden Sekundärstruktur (z.B. (dT)₅₀). Als Ankerstruktur kann beispielsweise Streptavidin über eine Biotin Modifizierung angebracht werden oder einfach eine stabile DNA Sekundärstruktur verwendet werden, z.B. ein G-Quadruplex oder ein stabiles Hairpin (vgl. Abb.2.4). Bei dem Pulsprotokoll zum Fangen der DNA wird zunächst eine konstante Spannung für kurze Zeit angelegt, wobei Höhe und Dauer so gewählt werden, dass mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit ein DNA Molekül in die Pore gelangt und die zu untersuchende Sekundärstruktur aufgebrochen wird. Gleichzeitig darf die Höhe und Dauer der angelegten Spannung nicht ausreichen um die Ankerstruktur aufzubrechen und die DNA vollständig zu translokieren. Nach Ausführung des Protokolls befindet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine DNA innerhalb der Pore und es kann nach einer kurzen Wartezeit für die Neubildung der zu untersuchenden Sekundärstruktur eine Spannungsrampe gestartet werden. Typischerweise werden zum Fangen der DNA etwa 120 mV für 200 ms angelegt. Das Spannungsprotokoll zum Fangen der DNA kann auch durch die Verwendung von mehreren Pulsen optimiert werden (vgl. Abb.4.7), denn häufig wird die DNA nur in den Vorhof der Pore gezogen und kann auf Grund der komplizierten Struktur nicht mit dem einzelsträngigen Ende in die Stammregion der Pore einfädeln. Durch kurzzeitiges Reduzieren der Spannung entkommt die DNA in diesen Fällen aus der Pore und kann mit einem zweiten Spannungspuls erneut gefangen werden. Wenn die DNA dagegen korrekt gefangen wurde, verbleibt sie in der Pore auch wenn das Potential kurzzeitig reduziert wird. Typischerweise wird das Potential für 10 ms auf 20 mV gesenkt. Durch die Verwendung eines effizienten Protokolls zum Fangen der DNA kann eine Zuverlässigkeit der Methode von fast 100% erreicht werden, wodurch die Anzahl der nötigen Messungen und somit die Messzeit verkürzt wird.

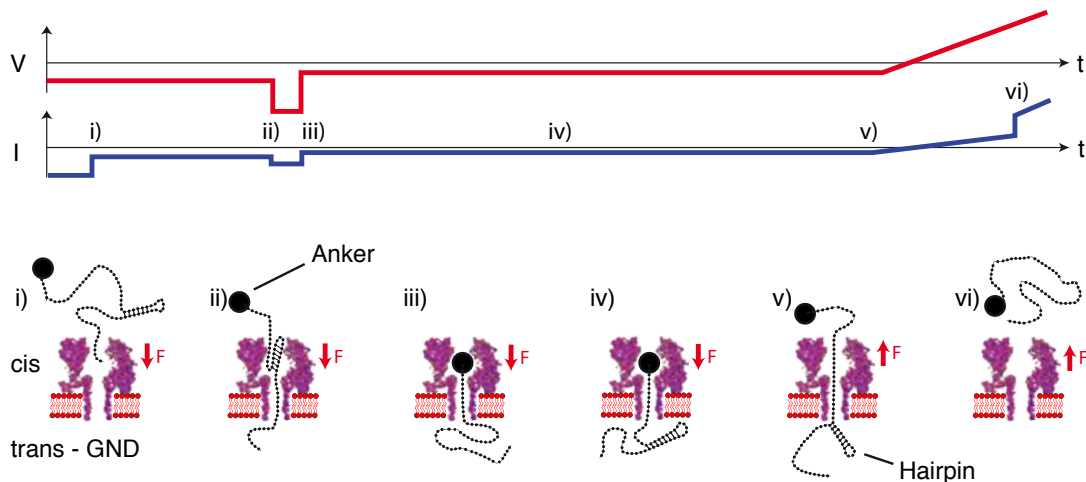


Abbildung 2.4: Bei der Ankertechnik wird an die zu analysierende DNA-Struktur (Hairpin) eine stabile Anker-Struktur angehängt, welche nicht durch die Pore translokiert werden kann. Bei Anlegen einer cis-negativen Spannung wird ein DNA Molekül in die Pore gezogen (i). Bei dieser Technik ist es nicht nötig, auf das Eindringen der DNA in die Pore reagieren zu können, da innerhalb einer kurzen Wartezeit fast immer ein DNA Molekül in die Pore eintritt und auf Grund des Ankers nicht vollständig translokiert werden kann. Das zu untersuchende Hairpin kann unter Umständen so stabil sein, dass es nicht geöffnet und translokiert wird (ii). In diesem Fall wird bei einer Analyse der Daten lediglich das Entkommen der DNA aus der Pore gemessen. Häufig wird dies bereits während des Experiments beobachtet und es kann durch einen kurzen Spannungspuls das Hairpin geöffnet werden und auf die trans-Seite translokiert werden (iii). Der Anker verhindert dabei eine vollständige Translokation. Nach einigen Millisekunden wird die Sekundärstruktur auf der trans-Seite erneut gebildet (iv). Nun kann in einer Spannungsrampe die Richtung der angelegten Kraft graduell umgekehrt (v) und die Spannung gemessen werden, bei der die Sekundärstruktur erneut aufbricht und die DNA auf der cis-Seite die Pore verlässt (vi). Diese Technik ist sehr zuverlässig, benötigt keine rauscharmen Messaufbauten und ist einfach durchzuführen.

2.3 Probenpräparation - RNA

RNA wurde durch Transkription eines DNA Templats mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase hergestellt (Ambion MEGAshortscript). Im Wesentlichen wurden dabei die Anweisungen des Herstellers befolgt. Die Transkription wurde vier Stunden bei 37°C durchgeführt und anschließend das DNA Templat durch eine DNase (Ambion MEGAshortscript) abgebaut. Dann folgten fünf Phenol-Chloroform-Extraktionen. Der Hersteller empfiehlt lediglich drei, jedoch war die Bande der RNA bei nur drei Extraktionen sehr breit (vgl. Abb.2.5, Probe: MG*). Eine zusätzliche Filterung der Probe mit einem Zentrifugalfilter (Millipore, 30 kDa) ergab keine weitere Verbesserung. Durch Normierung der Intensität der Banden (Sybr Gold) auf die Intensität der Leiter (Low Molecular Weight DNA Ladder, NEB; 1 μ g pro Bahn) konnte die produzierte Menge abgeschätzt werden. Durch vorherige Inkubation der Probe mit RNase konnte ausgeschlossen werden, dass DNA Reste sich in der Probe befanden. Als Promoter wurde die Sequenz CCCTATAGTGAGTCGTATTA an das 3' Ende angehängt. Vor der Transkription wurde eine zu dem Promoter komplementäre DNA zugegeben. Also war nur die Promoterregion doppelsträngig. Als einzelsträngige Sequenz sollte zunächst analog zu den Versuchen mit DNA eine poly(U) Sequenz verwendet werden. Bei Verwendung eines entsprechenden DNA Templats wurde allerdings keine RNA produziert. Mit der DNA Sequenz poly(CAGT) funktionierte die Transkription dagegen problemlos.

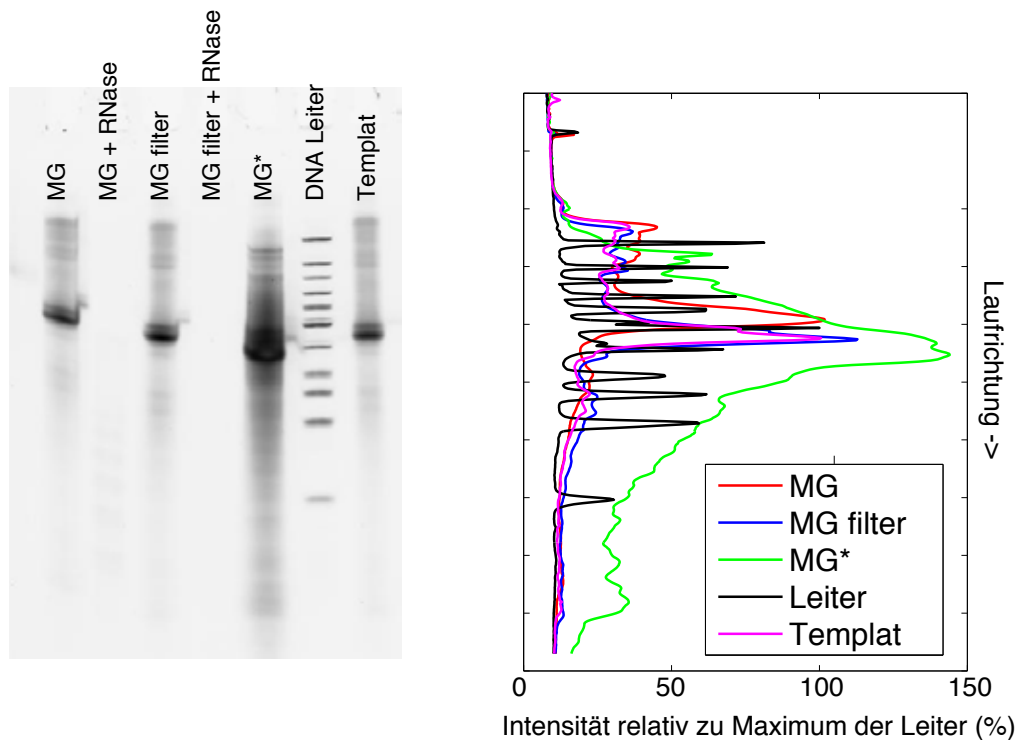


Abbildung 2.5: RNA wurde durch Transkription mit der T7 RNA-Polymerase hergestellt. Die Intensitäten der Bahnen des nativen PAGE Gels wurden zur quantitativen Analyse auf die maximale Intensität der Leiter normiert. Durch vorherige Inkubation der Probe mit RNase konnte die Probe hinsichtlich Verunreinigungen durch DNA untersucht werden. Das am Ende der Transkription durch DNase abgebaute Templat und die überschüssigen rNTPs und Enzyme wurden durch fünfmalige Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. Die vom Hersteller des Enzym-Kits vorgeschlagene dreimalige Extraktion war nicht ausreichend, um eine scharfe Bande zu bekommen (vgl. Probe MG*, grüne Kurve im Intensitäts-Histogramm). Eine weitere Filterung der Probe mit einem Zentrifugalfilter verbesserte das Ergebnis nicht. Die für NFS verwendete Probe (MG) zeigt eine scharfe Bande mit einer Laufweite welche zwischen 150 und 200 Basenpaaren der DNA-Leiter und im Bereich des Templats liegt. Bei dieser Probe waren nach Zugabe von RNase im Gel keine Banden mehr sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass sich keine Rückstände des DNA-Templats in der Probe befanden welche erst nach Abbau der RNA im Gel zu erkennen sind.

2.4 Protokoll zur Herstellung der Membran

Für Standard-Translokationsexperimente wurden jeweils zwei Mikropipetten (Eppendorf Femtotip 2) verwendet, von denen eine mit 5 μl Elektrolytflüssigkeit (1 M KCl; 20mM TRIS, pH=8,0; 2 mM EDTA) und der zu analysierenden DNA gefüllt wurde und die zweite zusätzlich noch 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ α -HL (List Laboratories) enthielt. Die DNA wurde vor Verwendung für 5 min. auf 95°C erwärmt und anschließend innerhalb weniger Sekunden auf Raumtemperatur abgekühlt, um Duplexbildung zu verhindern. Um bei den kleinen verwendeten Volumina Fehler in der Salzkonzentration durch Verdunsten der Flüssigkeit oder durch Ungenauigkeiten der Pipetten zu vermeiden wurde die DNA Lösung zunächst ohne Salz erhitzt und anschließend 1:1 mit einer 2 M KCl Lösung vermischt. Für die α -HL enthaltende Lösung wurde die Proteinlösung nach dem Aufheizen zu der DNA Lösung gegeben und anschließend 1:1 mit der Elektrolytlösung vermischt. Durch diese Vorgehensweise konnten Schwankungen der gemessenen Leitwerte von α -HL bei verschiedenen Experimenten auf Grund von ungenauen Salzkonzentrationen fast vollständig eliminiert werden.

2.5 Analysesoftware

Für die Auswertung der Daten wurde ein spezielles Programm in Matlab programmiert, welches die Messdaten importiert, analysiert und anschließend alle Daten eines Experiments in einem definierten Datenobjekt speichert. Die objektorientierte Programmierung erlaubt dabei eine genaue Definition der Datenstruktur und der Analysemethoden ebenso wie eine einfache Möglichkeit der Erweiterung und Anpassung des Programms. Dabei wurden folgende Ziele realisiert:

- Schnelle und weitgehend automatisierte Datenanalyse
- Geringe Fehlerquote
- Automatische und organisierte Speicherung der Daten
- Speicherung aller relevanten Parameter
- Erweiterungsfähigkeit der Software
- Einfache Vergleichbarkeit von verschiedenen Messungen

Während einer Messung wurde in der Regel die Stabilität einer DNA Sekundärstruktur mit mehreren verschieden steilen linearen Spannungsrampen gemessen. Ein Experiment umfasst dabei jeweils die Messungen mit derselben Steigung der Spannungsrampe, also mehrere hundert einzelne Stromkurven. Während der Datenanalyse werden für jedes Experiment dieselben Schritte nacheinander durchgeführt. Zunächst müssen alle Stromkurven eines Experiments aus der Software des Patch-Clamp-Verstärkers (Patchmaster) im Matlab-spezifischen Binärcode exportiert werden. Dann werden in Matlab in einer grafischen Benutzeroberfläche folgende experimentsspezifische Daten des Experiments abgefragt:

- Temperatur des Experiments
- Name der verwendeten DNA
- Pfad und Dateiname der exportierten Daten
- Pfad und Dateiname der Original-Daten
- Startspannung, Endspannung und Dauer der Spannungsrampe
- ggf. Parameter des gesamten Pulsprotokolls (falls nicht nur die Spannungsrampe exportiert wurde)
- Kommentare

Diese Daten werden zusammen mit Uhrzeit und Datum automatisch in dem erzeugten Datenobjekt gespeichert. Das Programm importiert daraufhin automatisch die Daten, wandelt sie in ein günstigeres Format um, kontrolliert, ob die eingegebenen Parameter des Pulsprotokolls zu den Daten passen und sucht automatisch die Stellen, an welchen die DNA die Pore translokiert hat. Anschließend werden zur Positiv- und Negativkontrolle zufällig ausgewählte Spannungsrampen mit und ohne identifizierten Translokationen angezeigt, damit kontrolliert werden kann, ob das automatisierte Auffinden der Translokationen bei dem jeweiligen Experiment gut funktioniert hat. Speziell bei sehr instabilen Sekundärstrukturen geschieht die Translokation schon bei kleinen Spannungen, bei welchen der Unterschied zwischen offener und geschlossener Pore nicht sehr deutlich ist und durch starkes Rauschen Fehldetektionen auftreten können. In solch einem Fall ist es möglich, verschiedene Parameter für die automatische Detektion anzupassen. Anschließend wird automatisch ein Histogramm über die Translokationsspannungen erstellt und die Verteilung mit Formel 3.9

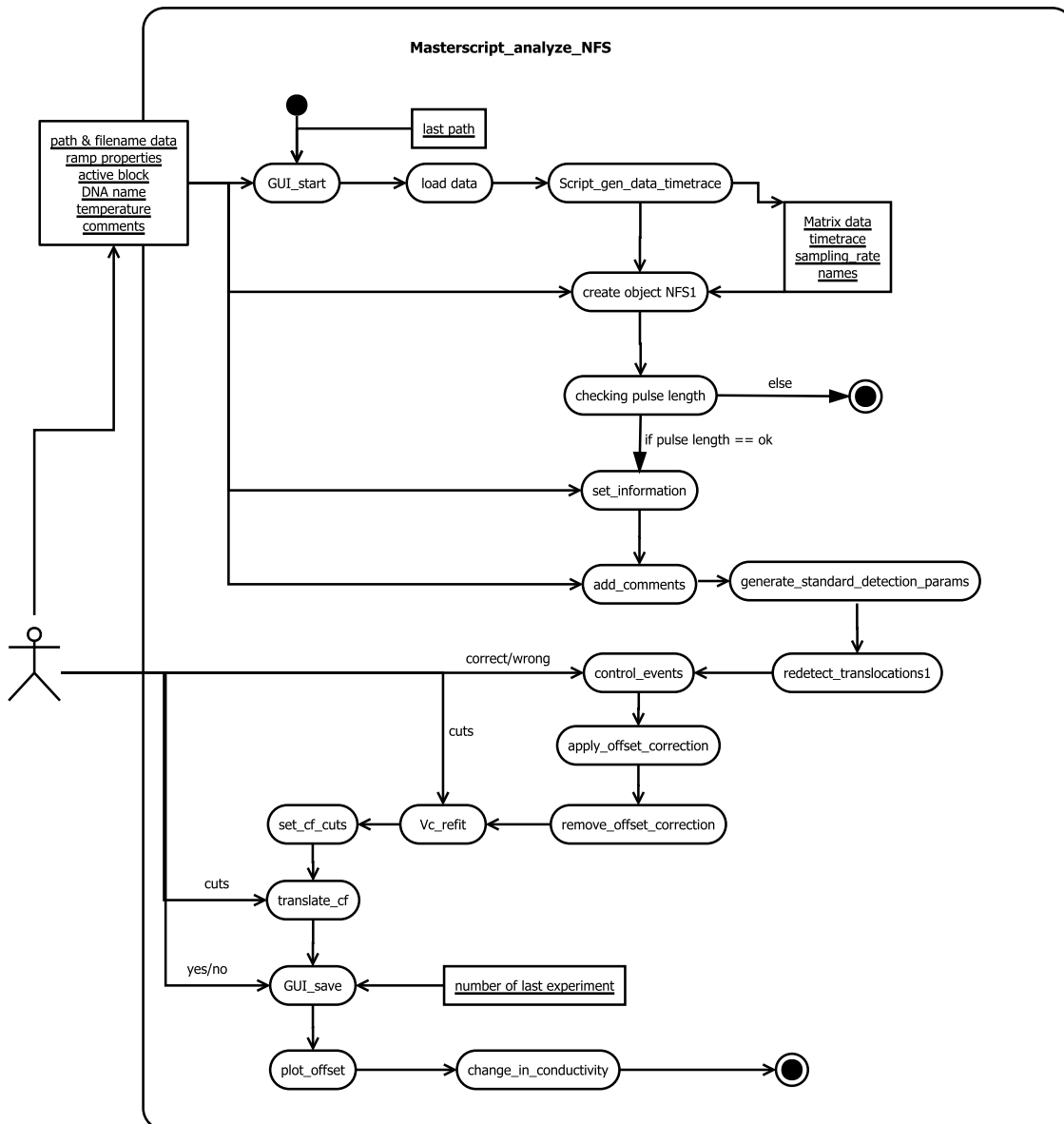


Abbildung 2.6: Bei der Analyse werden zunächst über eine grafische Benutzeroberfläche wichtige Daten abgefragt (GUI_start). Dazu gehören beispielsweise der Pfad der Datei mit den Originaldaten, der Name der verwendeten DNA oder die Temperatur während des Experiments. Anschließend werden automatisch die Daten importiert und modifiziert und eine neue Instanz der Klasse NFS1 mit fortlaufender Nummer und Zeitstempel erzeugt. Ebenfalls wird die Eingabe der Daten durch den Benutzer auf Unstimmigkeiten geprüft und die Translokationen automatisch detektiert (vgl. Abschnitt B). Der Benutzer hat dann die Möglichkeit, die Qualität der automatischen Detektion anhand von zufällig ausgewählten Rampen zu kontrollieren (control_events). Anschließend wird die wahrscheinlichste Translokationsdauer bestimmt und die Translokationsdauer bei konstanten Spannungen berechnet (translate_cf). Bei diesen Schritten hat der Benutzer die Möglichkeit, den zu analysierenden Spannungsbereich einzugrenzen. Anschließend wird automatisch eine PDF-Datei mit einer kurzen Zusammenfassung der Ergebnisse erzeugt und die Daten gespeichert. Die Ergebnisse und Rohdaten werden dabei separat gespeichert, da die Daten der Stromkurven sehr speicherintensiv sind und für spätere Analysen nur selten benötigt werden. Dadurch können die Ergebnisse schnell geöffnet und verwendet werden oder leicht auf einem Notebook gespeichert werden.

gefittet. Der Benutzer hat hierbei die Möglichkeit, den Spannungsbereich für den Fit einzuschränken. Danach wird unter Verwendung von Formel 3.12 die spannungsabhängige Translokationsdauer errechnet, wobei der Benutzer wieder die Möglichkeit hat den Datenraum einzuschränken. Zuletzt wird dem Experiment eine eindeutige Nummer zugewiesen, eine PDF Datei mit allen relevanten Graphen und Parametern erstellt und alle Daten an einem festgelegten Ort gespeichert. Spätere Änderungen sind nur mit definierten Methoden möglich und werden protokolliert. Die Daten werden in zwei Dateien aufgeteilt, wobei eine Datei die Original-Sromkurven enthält, welche einen hohen Speicherbedarf haben und für spätere Analysen in der Regel nicht mehr benötigt werden. Die zweite Datei enthält alle wichtigen Parameter für weitere Analysen und Vergleiche von verschiedenen Experimenten und kann auf Grund der geringen Dateigröße von weniger als 1 MB schnell geöffnet und leicht auf ein Notebook kopiert werden. Mit diesem optimierten Analyseprogramm können Standardexperimente innerhalb von wenigen Minuten ausgewertet werden. Darüber hinaus können Experimente schnell und einfach miteinander verglichen werden und durch die automatisierte Speicherung aller Daten werden alle Schritte und Parameter während der Analyse protokolliert und können somit leicht nachvollzogen werden.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Spannungskontrollierte Inkorporation von einzelnen Nanoporen

Für kraftspektroskopische Messungen ist es meist nötig, einzelne Nanoporen zu verwenden damit sich der Stromfluss von mehreren Poren nicht überlagern kann. Um einzelne Poren zu inkorporieren wird in der Regel eine geringe Menge α -HL nach Bilden der Membran zugegeben und sobald sich eine Pore gebildet hat schnell durch Spülen wieder entfernt[53]. Diese Methode eignet sich nicht bei der Verwendung eines DIB Aufbaus, da dabei das Spülen eines Kompartiments unmöglich ist. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Inkorporation von weiteren Poren alternativ auch durch die Zugabe von fluorinierten Amphiphilen effizient gestoppt werden kann[93]. Ebenso wurde gezeigt, dass α -HL auch durch einen mechanischen Kontakt einer proteingetränkten Agarosespitze in eine Lipidmembran “gestempelt“ werden kann[42]. Diese Methoden sind für Experimente mit dem DIB-Aufbau nicht geeignet, da die Flüssigkeit der Tröpfchen nicht ausgetauscht und auch nur in sehr begrenztem Maße Lösung hinzugegeben werden kann. Für diese Arbeit wurde die Eigenschaft genutzt, dass die Inkorporationsrate von α -HL stark von der angelegten Spannung abhängt und die Inkorporation somit einfach durch die angelegte Spannung gesteuert werden kann. Dieser Effekt wurde auch quantitativ untersucht[95] und kann unabhängig von dem verwendeten Aufbau und zusätzlich zu den anderen Methoden benutzt werden. Insbesondere muss weder die verwendete Hardware noch die verwendeten Chemikalien verändert werden, da lediglich ein spezielles Spannungsprotokoll verwendet wird.

3.1.1 Spannungsabhängigkeit der α -HL Inkorporationsrate

Zunächst wurde die Inkorporationsrate mit dem DIB-Aufbau gemessen. Dazu wurde eines der Tröpfchen mit einer α -HL Lösung befüllt und daraufhin kurze Spannungspulse mit ansteigender Amplitude angelegt, bis eine Pore gebildet wurde (vgl. Abb.3.1). Nach 25 Pulsen hatte sich in 21% der Experimente mindestens eine Pore gebildet. Nach 50 Pulsen würden bei einer konstanten Inkorporationsrate in $21\% + (100\% - 21\%) \cdot 21\% = 38\%$ der Experimente Poren erwartet werden, es waren allerdings in 96% der Fälle mindestens eine Pore vorhanden. Dies zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für die Porenbildung ansteigt. Dies könnte entweder daran liegen, dass die angelegte Spannung bei den späteren Pulsen höher ist oder aber es könnte ein anderer Prozess beteiligt sein, welcher die Porenbildung erst nach einer gewissen Zeit beschleunigt. Als Kontrolle wurde in einem zweiten Versuch die Spannung zwischen zwei Pulsen nicht nur um 2 mV sondern um 10 mV erhöht. In diesem Versuch waren bereits nach 5 Pulsen in 15% der Experimente eine Pore vorhanden und nach 10 Pulsen schon in 81% der Fälle. Da in diesem Versuch bei sonst gleichen Bedingungen eine deutlich höhere Inkorporationsrate gemessen wurde, muss die angelegte Spannung einen Einfluss auf Porenbildung haben.

Das verwendete Spannungsprotokoll ist in Abb. 3.1 a) skizziert. Für den ersten Versuch (Typ 1) wurde nach Ausbilden der Membran ein 158 mV Puls für 20 ms angelegt. Anschließend wurden für 300 ms die Spannung ausgeschaltet (0 mV) damit sich durch Elektroporation entstandene Löcher in der Membran wieder schließen können. Anschließend wurde bei 50 mV für 50 ms der Widerstand der Membran gemessen. Wenn noch keine Pore vorhanden war wurde die Prozedur wiederholt und dabei der erste Spannungspuls um 2 mV erhöht. Wenn die Widerstandsmessung die Anwesenheit einer Pore zeigte, so wurde eine Strom-Spannungs-Kennlinie gemessen. Für die weitere Analyse wurden nur Messungen verwendet welche eine korrekte Kennlinie für eine einzelne α -HL Pore zeigten. Nach Messung der Strom-Spannungs-Kennlinie wurde eine neue Membran gebildet und das Experiment wiederholt. Das zweite Experiment (Typ 2) verlief analog, allerdings wurde hierbei die Pulsspannung um jeweils 10 mV erhöht, beginnend von 180 mV. Damit die experimentellen Bedingungen bei beiden Versuchen gleich ist wurden die Messungen von Typ 1 und Typ 2 jeweils abwechselnd hintereinander durchgeführt. Um eine komplette Ruptur der Membran durch zu hohe Spannungen zu verhindern wurden die Experimente auf eine Maximalspannung von 300 mV begrenzt. Diese Maximalspannung wurde allerdings nur selten erreicht, da in fast allen Experimenten bereits vorher die erste Pore gebildet wurde.

Abb.3.1 b) & c) zeigt die Verteilung der ersten Inkorporationen, zusammen mit der

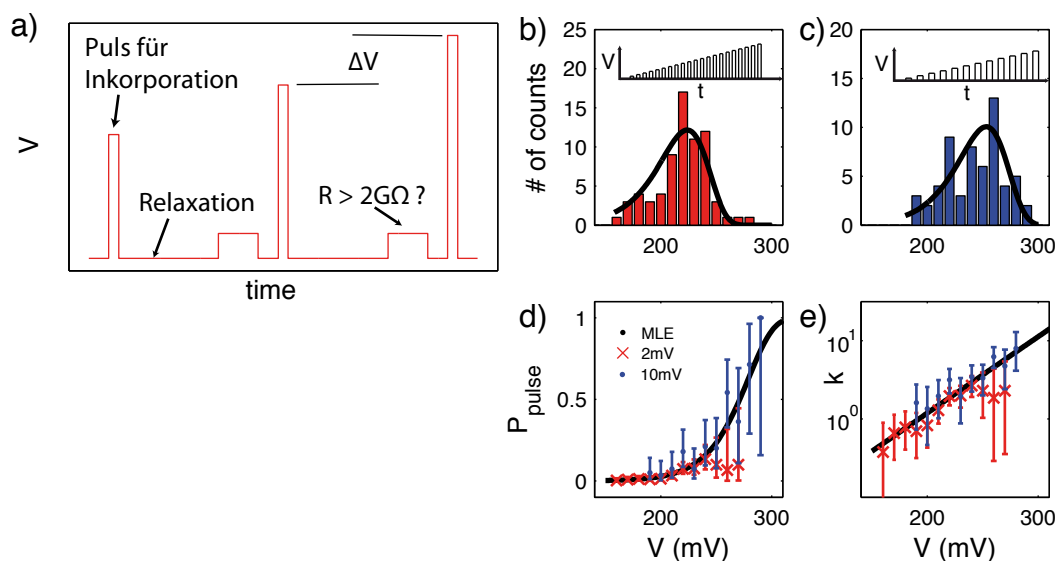


Abbildung 3.1: In a) ist das verwendete Spannungsprotokoll dargestellt: Nach einem kurzen Spannungspuls wurde die Spannung auf 0 mV gesenkt, damit sich durch Elektroporation entstandene Löcher in der Membran wieder schließen können. Zur Messung des Widerstands folgte ein 50 mV Puls. Wurde ein größerer Widerstand als $2 \text{ G}\Omega$ gemessen, befand sich noch keine Pore in der Membran und es wurde ein weiterer Spannungspuls mit einer um ΔV erhöhten Spannung appliziert, so lange bis sich eine Pore gebildet hatte. Die Histogramme in Abbildung b) und c) zeigen, wie viele Poren bei welcher Spannung gebildet wurden. Dabei wurde die Spannung zwischen zwei Pulsen um $\Delta V = 2 \text{ mV}$ (b) bzw. um $\Delta V = 10 \text{ mV}$ (c) erhöht. In den Histogrammen repräsentiert ein Balken die Anzahl der Inkorporationen pro 10 mV und somit steht ein Balken für 5 Spannungspulse in b) und einem Spannungspuls in c). Die maximale Inkorporationswahrscheinlichkeit wurde in beiden Experimenten etwa bei dem achten Balken erreicht, also nach ca. 40 Pulsen bei b), bzw. 8 Pulsen bei c). Wenn die Spannung keinen Einfluss auf die Inkorporation hätte, so müsste der Peak bei beiden Experimenten nach der selben Anzahl der Pulse, also derselben Messzeit, liegen. Als Modell wurde Inkorporation als einstufiger Prozess aufgefasst, bei welchem die Aktivierungsenergie durch die angelegte Spannung gesenkt werden kann und somit die Inkorporationsrate gemäß $k(V) = k_0 \cdot \exp(V/V_\beta)$ berechnet werden kann. Durch einen gemeinsamen MLE Fit an beide Experimente wurden k_0 und V_β bestimmt und die erwartete Verteilung als schwarze Linie in (b-e) eingezeichnet. Ebenfalls wurde die Inkorporationswahrscheinlichkeit für die einzelnen Pulse berechnet (d) und daraus die Porenbildungsrate $k(V)$ bestimmt (e). Die Raten sind für beide Experimente identisch und es kann analog zu Abschnitt 1.12 davon ausgegangen werden, dass die Porenbildung während eines Pulses adiabatisch erfolgt. Alle Fehlerbalken beziehen sich auf ein 95% Konfidenzintervall.

theoretisch erwarteten Kurve, wenn von einem exponentiellen Anstieg der Inkorporationsrate, $k(V) = k_0 \cdot \exp(V/V_\beta)$, ausgegangen wird. Diese Annahme entspricht einem thermisch aktivierbarem Prozess nullter Ordnung und die Daten werden gut durch das phänomenologische Modell reproduziert. Da die Histogramme die Inkorporation der ersten Pore zeigen, steigen sie zunächst nahezu exponentiell mit Ansteigen der Spannung an und fallen nach einem Maximum wieder ab, da es extrem unwahrscheinlich ist, dass auch nach vielen Pulsen noch keine Pore inkorporiert wurde und es somit wenige Experimente gab bei welchen überhaupt hohen Spannungen angelegt wurden. Für die theoretische Verteilung wurden die für beide Experimente gleichen Parameter k_0 und V_β unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode bestimmt. Dazu wurde Formel 3.4 verwendet, welche aus der Annahme resultiert, dass die Inkorporationsrate exponentiell mit der angelegten Spannung steigt:

$$k(V) = k_0 \times \exp(V/V_\beta) \quad (3.1)$$

Zusammen mit $\tau_0 = k_0^{-1}$ ergibt sich daraus die mittlere Wartezeit für den Einbau einer Pore:

$$\tau(V) = 1/k(V) = \tau_0 \cdot \exp(-V/V_\beta) \quad (3.2)$$

Demnach ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Pore innerhalb eines Pulses mit Dauer t_p und Spannung V inkorporiert wird:

$$P_{inc}(t_p; V) = 1 - e^{-t_p/\tau(V)} \quad (3.3)$$

Bei der Verwendung von Pulsrampen beträgt die Spannung in dem j -ten Puls $V_j = V_0 + j\Delta V$. Die Wahrscheinlichkeit, dass während des N -ten Puls die erste Inkorporation stattfindet ist demnach:

$$P(N) = (1 - e^{-t_p/\tau(V_N)}) \times \prod_{j=1}^{N-1} e^{-t_p/\tau(V_j)}, \quad (3.4)$$

also die Wahrscheinlichkeit, dass in dem N -ten Puls eine Pore inkorporiert wird multipliziert mit der Wahrscheinlichkeit, dass in den Pulsen davor keine Pore inkorporiert wurde. Diese Verteilung ist in Abb.3.1 b) & c) in schwarz für die mittels Maximum-Likelihood-Methode bestimmten Parameter $\tau_0 = 5611 \pm 481$ s und $V_\beta = 22,3 \pm 0,2$ mV. Für die Bestimmung der Parameter wurden alle Datenpunkte aus beiden Experimenten (Typ 1 und Typ 2) benutzt. Zusätzlich wurde für jeden Balken der Histogramme die Inkorporationswahrscheinlichkeit berechnet aus der Höhe des Balkens geteilt durch die Anzahl der

Messungen, bei denen die entsprechende Spannung angelegt wurde. Die Ergebnisse sind in Abb.3.1 d) für beide Experimente zusammen mit der theoretischen Kurve unter Verwendung der obigen Parameter dargestellt. Ebenso wurde aus diesen Daten $k(V)$ unter Verwendung von Gleichung 3.2 und 3.3 bestimmt und mit der theoretischen Verteilung in Abb.3.1 e) dargestellt. Obwohl die Fehlerbalken bei hohen Spannungen aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten sehr groß sind, stimmt die theoretische Kurve sehr gut mit den Messwerten überein. Der für $V_\beta = 22,3 \text{ mV} \approx 0,9 k_B T/e$ bestimmte Wert ist in einem Bereich, welcher auf einen thermisch aktivierbaren Prozess hindeutet. Ebenso wurden Messungen mit unterschiedlicher Polarität durchgeführt (es werden keine Daten gezeigt) und eine starke Abhängigkeit von der Polarität gefunden. In einem Experiment wurden Spannungspulse mit jeweils alternierender Polarität angelegt. Eine Porenbildung wurde ausschließlich bei Pulsen mit einem positiven Potential auf der cis-Seite beobachtet.

Um auszuschließen, dass die gefundene Spannungsabhängigkeit der Inkorporationsrate durch den DIB Aufbau hervorgerufen wird, wurden auch mit einem klassischen Aufbau Experimente dazu durchgeführt. Die Lipidmembran wurde dabei mit der Technik von Montal und Mueller hergestellt. In diesen Experimenten wurde die Spannung kontinuierlich von 0 mV in 2 s auf 200 mV gesteigert und anschließend dieselbe Rampe mit invertierter Spannung angelegt. Bei kontinuierlichen Spannungsrampen sollte auf Grund der Elektroporation die angelegte Spannung nicht zu hoch gewählt werden. Bei kurzen Spannungspulsen kann dagegen nach jedem Puls für eine gewisse Zeit die Spannung ausgeschaltet werden um entstandene Löcher in der Membran sich wieder schließen zu lassen. Demgegenüber sind Spannungsrampen bei der verwendeten Patch-Clamp-Software leichter zu implementieren, und wurden deshalb für dieses Experiment verwendet.

Auch mit dem klassischen Aufbau wurde die Spannungs- und Polaritätsabhängigkeit der Inkorporationsrate beobachtet. Die erste Pore wurde aber nur selten innerhalb der ersten Minuten gebildet, vermutlich da die Präporenbildung (vgl. Abschnitt 1.6) noch nicht abgeschlossen war. Nach erfolgreicher Porenbildung wurde die Membran zerstört und eine neue Membran gebildet in α -HL freier Lösung gebildet. Danach wurde wieder eine α -HL Konzentration von 5 – 6 nM eingestellt und das Experiment wiederholt. Da hierbei Spannungsrampen an Stelle von Spannungspulsen verwendet wurden, muss Gleichung 3.4 auf den Fall von kontinuierlichen Spannungsrampen angepasst werden. Die Spannung wird hierbei linear erhöht:

$$V(t) = \dot{v} \cdot t \tag{3.5}$$

Und es ergibt sich aus Gleichung 3.4, welche für Pulsrampen gilt, für den Fall von linearen Spannungsrampen:

$$P_{Rampe}(V) = \frac{1}{\dot{v}\tau_0} \exp \left[\frac{V}{V_\beta} - \frac{V_\beta}{\dot{v}\tau_0} \left(\exp \left(\frac{V}{V_\beta} \right) - 1 \right) \right] \quad (3.6)$$

Diese Gleichung wurde auch schon im Kontext von Nanoporenkraftspektroskopie mit Spannungsrampen verwendet[72] und in [95] hergeleitet.

Aufgrund des größeren technischen Aufwands wurden die Experimente mit dem klassischen Aufbau nicht so häufig wiederholt wie bei den Messungen mit dem DIB-Aufbau und es wurde für die Analyse die kumulative Verteilung:

$$P_{kumulativ}(V) = \mathcal{N} \int_0^V P_{Rampe}(V') dV' \quad (3.7)$$

mit einem geeigneten Normalisierungsfaktor \mathcal{N} , mit der Methode der kleinsten Quadrate[127] an die kumulativen Histogramme gefittet (vgl. Abb.3.2). Bei allen Expe-

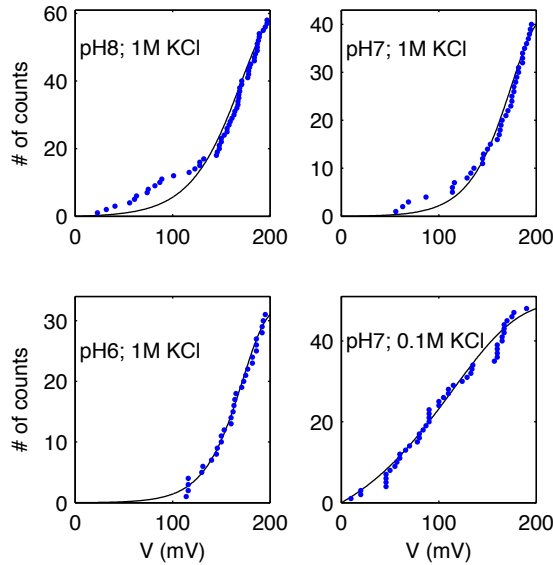


Abbildung 3.2: Die integrierten Histogramme zeigen die Anzahl der beobachteten Inkorporationen bei Experimenten mit linearen Spannungsrampen bei verschiedenen Salzkonzentrationen und pH-Werten. Abgesehen von der Messung mit niedriger Salzkonzentration ist auch hier die gesteigerte Inkorporationsrate bei höheren Spannungen deutlich zu erkennen. Die Daten wurden unter Verwendung von Formel 3.11 gefittet (schwarze Linien) und die Ergebnisse in Tabelle 3.1 aufgelistet. Alle Daten wurden mit einem klassischen Membran Aufbau gemessen (vgl. Abb.1.7).

perimenten mit 1M KCl ist der exponentielle Anstieg der Inkorporationswahrscheinlichkeit deutlich erkennbar. Allerdings gab es bei den Messungen mit pH= 8 und pH= 7 auch einige Inkorporationen bei einer Spannung von $V < 110$ mV, welche theoretisch nicht erwartet werden. Wir vermuten, dass hierbei die experimentellen Bedingungen nicht optimal für die Messung des Effekts geeignet waren oder nicht immer exakt gleich waren. Beispielsweise könnte die für die Präporenbildung benötigte Zeit das Ergebnis verfälschen oder Schwankungen in der α -HL Konzentration, welche nicht immer exakt eingestellt werden konnten. Deshalb wurden für die Werte von τ_0 und V_β in Tabelle 3.1 nur Inkorporationen ab einer Spannung von 110 mV berücksichtigt. Wenn alle Inkorporationen berücksichtigt werden (ebenfalls in Tabelle 3.1 angegeben), ist die Übereinstimmung von Modell und Experiment nicht ganz so gut.

3.1.2 Salz- und pH-Abhängigkeit der α -HL Inkorporationsrate

Mit dem klassischen Aufbau ist die spannungsabhängige Erhöhung der Inkorporationsrate bei einer hohen Salzkonzentration von 1M KCl bei allen pH Werten vergleichbar mit dem Experimenten mit dem DIB Aufbau (vgl. Tabelle 3.1). Der ermittelte Wert für V_β liegt bei etwa 20-30 mV. Bei einer niedrigen Salzkonzentration dagegen wurde eine gleichmäßige Verteilung der Inkorporationen beobachtet. Die Inkorporationsrate hing in diesem Fall nicht von dem angelegten Membranpotential ab. Generell ist die Inkorporationsrate abhängig von der Anzahl der gebildeten Präporen und der Wahrscheinlichkeit, dass eine von diesen geöffnet wird. Beide Faktoren könnten durch die Salzkonzentration und den pH Wert beeinflusst werden, da dadurch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren des Proteins verändert werden können. Die Anzahl der gebildeten Präporen ist natürlich auch von anderen Parametern wie der Proteinkonzentration, der Größe der Membran oder der Lipidkomposition abhängig und es wurde versucht diese Parameter möglichst konstant zu halten. Bei den Experimenten mit dem DIB-Aufbau vermuten wir, dass die Präporen bereits an der Lipid-Einzelschicht um die Tröpfchen gebildet sind und nur noch geöffnet werden müssen. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass mit hohen Spannungspulsen die ersten Inkorporationen bereits wenige Millisekunden nach Membranbildung induziert werden konnten. Ohne angelegtes Potential konnten dagegen keine Inkorporationen beobachtet werden. Folglich sind die Präporen vermutlich ständig präsent aber werden erst bei Anlegen einer Spannung geöffnet. Somit ist das Öffnen der Poren[137] der ratenlimitierende Faktor. Bei einer niedrigen Salzkonzentration dagegen wurden zahlreiche, nicht spannungsbeeinflusste Porenöffnungen beobachtet. Also wurden

die Präporen spontan geöffnet.

3.1.3 Spannungsabhängigkeit der Inkorporationsrate von MspA

Die Spannungsabhängigkeit der Inkorporationsrate von MspA wurde ebenfalls mit dem DIB-Aufbau untersucht. Hierbei wurden $\approx 10\mu\text{g/ml}$ MspA auf der cis-Seite zugegeben und nach Ausbildung einer Lipidmembran ein Spannungsrampenprotokoll angelegt, welches in Abb.3.3 dargestellt ist. Ebenfalls wurde nach der ersten Inkorporation eine Strom-Spannungskurve gemessen und festgestellt, bei welcher Spannung die Pore inkorporiert wurde. Anschließend wurde eine neue Membran hergestellt und die Messung wiederholt. In 174 von 346 Experimenten wurden Poren mit einer Leitfähigkeit von 2,4 nS und geringem Rauschen inkorporiert. Dieser Leitwert wird in der Literatur einzelnen MspA Poren zugeordnet[112]. Auch für MspA wurde, mit 68% der Inkorporationen während cis-negativen Spannungen, eine Polaritätsabhängigkeit beobachtet, allerdings mit umgekehrtem Vorzeichen im Vergleich zu $\alpha\text{-HL}$. In Abb.3.3 wurden nur die Inkorporationen während cis-negativen Spannungen verwendet. Der Anstieg der Inkorporationswahrscheinlichkeit mit steigender Spannung ist deutlich zu erkennen und die Daten können gut mit dem Modell einer exponentiell ansteigenden Inkorporationsrate gefittet werden (schwarze Linie unter Verwendung von Gleichung 3.6 & 3.11). Für MspA wurden die Parameter $\tau_0 \approx 10^7$ s und $V_\beta \approx 10$ mV gefunden, was einer noch größeren Spannungsabhängigkeit entspricht als bei $\alpha\text{-HL}$ mit $V_\beta \approx 20$ mV.

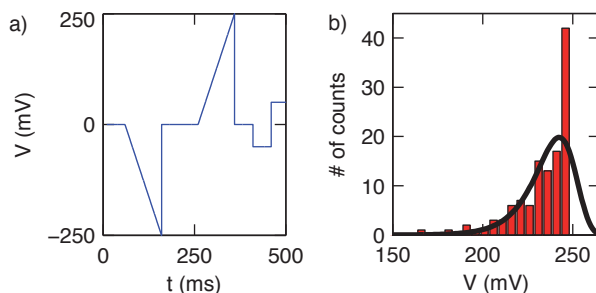


Abbildung 3.3: In diesem Experiment wurden Spannungsrampen (a) zwischen ± 250 mV angelegt um MspA zu inkorporieren. Das Histogramm (b) zeigt bei welchen Spannungen die Inkorporationen beobachtet wurden, zusammen mit der erwarteten Verteilung unter der Annahme, dass die Inkorporationsrate durch $k(V) = k_0 \cdot \exp(V/V_\beta)$ beschrieben werden kann.

3.1.4 Zusammenfassung der Spannungsabhängigkeit der Inkorporationsraten

Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Werte für τ_0 sind stark von der Proteinkonzentration abhängig und somit nur bei den drei Experimenten mit dem klassischen Membranaufbau und der hohen Salzkonzentration vergleichbar. Hier liegen alle Werte innerhalb einer Größenordnung und die schon früher gefundene pH Abhängigkeit wurde bestätigt[31]. Bei der Messung mit der niedrigen Salzkonzentration ist die Verteilung nicht exponentiell von der Spannung abhängig und deshalb ist das Modell welches für den Fit benutzt wurde in diesem Fall nicht gültig. Somit ist der ermittelte Wert für V_β bedeutungslos. Trotzdem wurden die Werte, der Vollständigkeit halber, angegeben.

Die Werte für V_β dagegen sind unabhängig von der Proteinkonzentration und unterscheiden sich für alle α -HL Messungen kaum (1M KCl). Auch bei der Messung mit MspA liegt die Spannungsabhängigkeit in demselben Bereich von $V_\beta \approx 10 - 25$ mV. Wenn eine Elementarladung bei einer angelegten Spannung von 25 mV auf die andere Seite der Membran gebracht wird, so entspricht dies einer Energieänderung von $1 k_B T$. Also könnte das Anlegen einer Spannung das Öffnen der Präpore durch den Energiegewinn begünstigen, wenn geladene Aminosäuren auf die andere Seite der Membran gebracht werden. Die dabei gewonnene Energie könnte auch thermisch aufgebracht werden. Auch wenn es sehr interessant wäre, diese These durch weitere Experimente zu prüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt der spannungsabhängigen Inkorporationswahrscheinlichkeit nicht näher untersucht sondern gezielt dazu verwendet, um mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einzelne Poren in die Membran zu inkorporieren.

Tabelle 3.1: Werte für τ_0 und V_β für α -HL und MspA bei verschiedenen Bedingungen.

| | | τ_0 | V_β | cis-positive |
|--------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|--------------|
| α -HL | pH 8; 1M KCl; DIB | 4510 ± 313 | 23.2 ± 0.2 | 100% |
| | pH 8; 1M KCl; $V > 110$ mV | 2600 ± 423 | 18.6 ± 0.3 | |
| | pH 7; 1M KCl; $V > 110$ mV | 1534 ± 460 | 20.0 ± 0.6 | |
| | pH 6; 1M KCl | 383 ± 77 | 23.4 ± 0.6 | 89% |
| | pH 7; 0.1M KCl | 3.7 ± 0.2 | 66.9 ± 1.6 | 88% |
| | pH 8; 1M KCl; alle Daten | 87 ± 14 | 30.1 ± 0.9 | 98.3% |
| | pH 7; 1M KCl; alle Daten | 256 ± 63 | 25.4 ± 0.9 | 68% |
| MspA | pH 8; 1M KCl; | $(8.1 \pm 2.2) \times 10^7$ | 10.2 ± 0.1 | 68% |

3.1.5 Pulsprotokoll für die kontrollierte Inkorporation

Es ist zwar möglich, kraftspektroskopische Messungen auch mit mehreren Poren durchzuführen[123], aber dennoch werden die meisten Messungen mit einzelnen Poren durchgeführt. Häufig aber werden nach dem Öffnen einer Pore noch weitere Poren inkorporieren. Als äußerst hilfreich hat sich ein Protokoll erwiesen, bei welchem nach der Zugabe von α -HL so lange Spannungspulse appliziert werden, bis eine Pore inkorporiert wurde und danach die Spannung abgeschaltet wird, bis die Proteinaktivität durch Verdünnung zum Erliegen gekommen ist. Zur Demonstration wurden in einem Experiment mit dem DIB-Aufbau bei konstanter Proteinaktivität einige Spannungspulse (300 mV; 20 ms) appliziert bis eine Pore inkorporiert wurde. Anschließend wurde die Leitfähigkeit der Membran mit niedrigen Spannungen fünf Minuten lang gemessen (vgl. Abb.3.4). In 10 von 10 Experimenten dieser Art wurde eine Pore innerhalb von einer Minute gebildet und nach den fünf folgenden Minuten ohne Spannungspulse war in jedem der Experiment noch genau eine Pore präsent. Dieses Experiment zeigt, dass die Inkorporation von α -HL durch Verwenden eines geeigneten Spannungsprotokolls gezielt gesteuert werden kann. Da auch bei MspA die Inkorporationswahrscheinlichkeit von der angelegten Spannung abhängt, ist diese Methode auch mit MspA und vielleicht auch für andere Poren anwendbar.

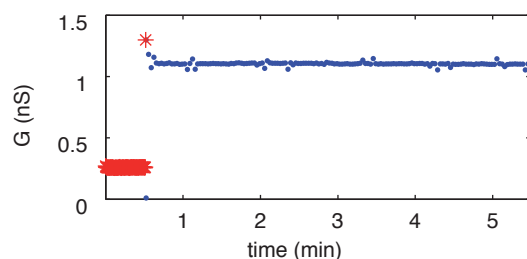


Abbildung 3.4: Kontrollierte Inkorporation von α -HL durch Spannungspulse. Zunächst wurden kurze 300 mV Pulse angelegt bis eine einzelne Pore inkorporiert wurde (rote Sterne). Danach wurde die Leitfähigkeit der Pore durch kurze 20 mV Pulse für 5 Minuten gemessen. Es wurden 10 Experimente dieser Art durchgeführt, wobei jedes mal eine einzelne Pore in kurzer Zeit durch Spannungspulse inkorporiert werden konnte und in keinem Fall eine zweite Pore innerhalb der folgenden 5 Minuten ohne Spannungspulse inkorporiert wurde. Vergleichbare Pulsprotokolle ermöglichten die Messung an einzelnen Poren bei Kraftspektroskopie Experimenten mit dem DIB-Aufbau.

3.2 Translokation eines DNA-Hairpins und eines G-Quadruplexes

3.2.1 Translokation eines DNA-Hairpins mit konstanter Spannung

Als erster Test des neuen Aufbaus wurden ähnliche Messungen durchgeführt wie in [83] beschrieben. Bei diesem Versuch wurde ein DNA-Hairpin durch Anlegen einer konstanten Spannung translokiert. In Abbildung 3.5 ist eine typische Messung dargestellt. Wenn ein DNA Molekül die Pore translokiert, wird deren Leitfähigkeit mehr als 70% verringert[78]. Blockaden, bei welchen der Strom um einen geringeren Betrag reduziert wurde, wurden nicht für die weitere Auswertung herangezogen, da in diesen Fällen vermutlich ein DNA Molekül nur gegen die Pore gestoßen ist und nicht translokiert wurde. Für jede Blockade in diesem Experiment wurde die Dauer und Tiefe gemessen und ein Histogramm über die Blockadedauer von mehr als 3000 einzelnen Blockaden erstellt. Zuvor wurden die Blockaden der abprallenden DNA aussortiert, welche den Stromfluss nicht tief genug blockieren. Ebenfalls wurde ein integriertes Histogramm mit logarithmischer x-Achse erstellt, da es dadurch möglich ist, auch die Verteilung der länger andauernden Blockaden zu beurteilen. Das normale Histogramm zeigt ein Maximum bei $\tau_{max} = 360 \mu s$ und einen exponentiellen Abfall für die Häufigkeit länger dauernder Translokationen. Bei Verwenden des phänomenologischen Modells müsste das Maximum des Histogramms bei 0 ms, also bei unendlich schnellen Translokationen liegen was offensichtlich nicht korrekt sein kann. Durch das phänomenologische Modell können nur die Translokationen korrekt beschrieben werden welche deutlich länger dauern als eine minimale nötige Translokationsdauer. Deshalb zeigen sowohl das integrierte, als auch das normale Histogramm deutliche Abweichungen für kürzere Events mit $t_d \lesssim 500 \mu s$. Für den Fit wurde die kumulative Verteilung mit $P_{kumulativ} = 1 - \exp(-t/\tau)$ verwendet und $\tau = 1 \text{ ms}$ bestimmt, was mit früheren Messungen übereinstimmt[78]. Bei dem Fit wurde die gesamte Anzahl der Experimente berücksichtigt. Das Phänomenologische Modell beruht unter anderem auf der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit des Öffnens und somit der Translokation konstant ist, also, dass sich ein Hairpin, welches sich schon längere Zeit in der Pore befindet, immer noch in demselben Zustand befindet wie kurz nach dem Eintritt in die Pore. Die Translokationswahrscheinlichkeit wird also analog zu radioaktivem Zerfall behandelt. Die Tatsache, dass die Daten und die theoretisch ermittelte Verteilung gut übereinstimmen, zeigt, dass diese Annahme gerechtfertigt ist, zumindest für die Verteilung der lange andauernden Translokationen.

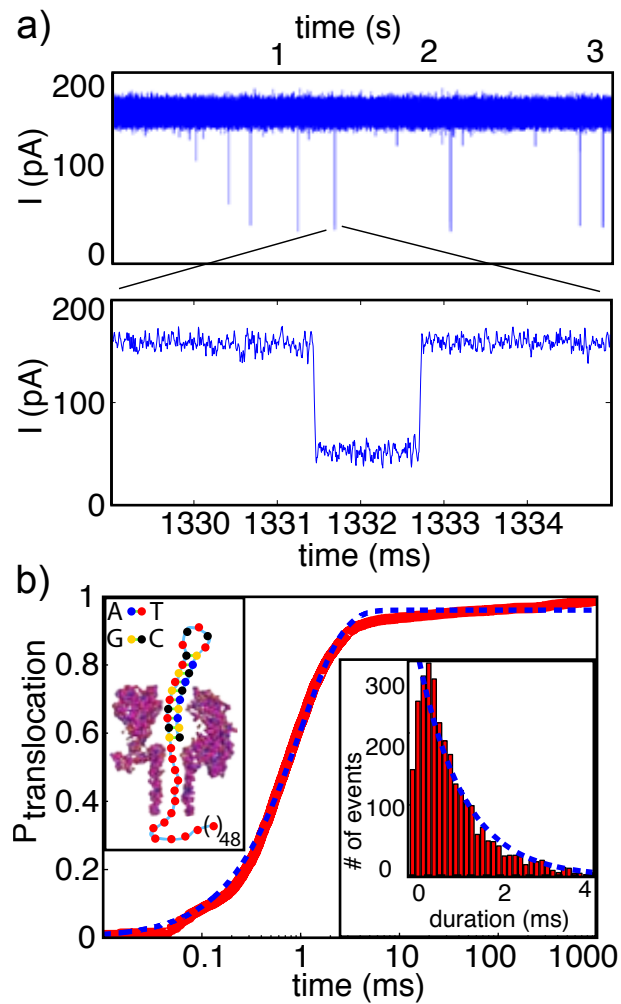


Abbildung 3.5: In a) ist eine repräsentative Stromkurve für die Translokation von DNA-Hairpins dargestellt. Für die einzelnen Translokationen wurde jeweils die Dauer bestimmt und ein integriertes Histogramm (b) aus über 3000 einzelnen Translokationen erstellt. Ebenso wurde ein normales Histogramm erstellt und die Translokationsdauer mit dem Phänomenologischen Modell gefittet ($\tau = 1$ ms).

3.2.2 Messungen mit Spannungsrampen

Wie im Kapitel 1.12 diskutiert, hat die Verwendung von Spannungsrampen zwar den Nachteil, dass die DNA zuerst in der Pore gefangen werden muss, allerdings kann anschließend sehr einfach eine (fast) beliebige Kraft an die DNA angelegt werden. Dadurch können sowohl sehr instabile als auch sehr stabile Strukturen untersucht werden. Zunächst wurde dasselbe Hairpin wie im vorangegangenen Abschnitt verwendet und nach Einfangen eines DNA Moleküls die Spannung kontinuierlich in 20 ms von 40 mV auf 240 mV erhöht und gleichzeitig der Stromfluss gemessen (vgl. Abb.3.6). Sobald die DNA sich nicht mehr in der Pore befindet, steigt die Leitfähigkeit der Pore sprunghaft an. Nach mehreren hundert Versuchen wurden die Spannungswerte der einzelnen Translokationen in einem Histogramm dargestellt. Als einfachstes Modell wird wieder das phänomenologische Modell verwendet, bei welchem die Dauer einer Translokation exponentiell von der angelegten Spannung abhängt:

$$\tau_{translokation}(V) = \tau_0 \exp\left(-\frac{V}{V_\beta}\right) \quad (3.8)$$

Bei dieser Annahme kann die Verteilung der Translokationen in Spannungsrampenexperimenten analog zu der Inkorporationswahrscheinlichkeit der Proteinporen in Abschnitt 3.1.1 berechnet werden und entspricht Gleichung 3.6:

$$P_{Rampe}(V) = \frac{1}{\dot{v}\tau_0} \exp\left[\frac{V}{V_\beta} - \frac{V_\beta}{\dot{v}\tau_0} \left(\exp\left(\frac{V}{V_\beta}\right) - 1\right)\right] \quad (3.9)$$

Im Gegensatz zu der Messung bei einer einzigen, konstanten Spannung, können mit einem Spannungsrampenexperiment die beiden Parameter V_β und τ_0 bestimmt werden, und somit das Verhalten des Hairpins bei beliebigen Spannungen vorhergesagt werden. Bei einem Fit der Daten unter Verwendung von Gleichung 3.9 wurden keine einheitlichen Parameter V_β und τ_0 für verschiedene Rampengeschwindigkeiten gefunden. Deshalb wurde das Verhalten der wahrscheinlichsten Translokationsspannung bei verschiedenen Rampengeschwindigkeiten untersucht. Es ergibt sich folgender Zusammenhang[72]:

$$V_c = V_\beta \ln\left(\frac{\dot{v}\tau_0}{V_\beta}\right) \quad (3.10)$$

In Abb.3.7 sind die Daten aus jeweils fünf Messungen für zwei verschiedene Strukturen dargestellt. Zunächst wurden Spannungsrampenexperimente an dem im vorherigen Abschnitt benutzten Hairpin durchgeführt. Dabei wurden die Rampengeschwindigkeiten

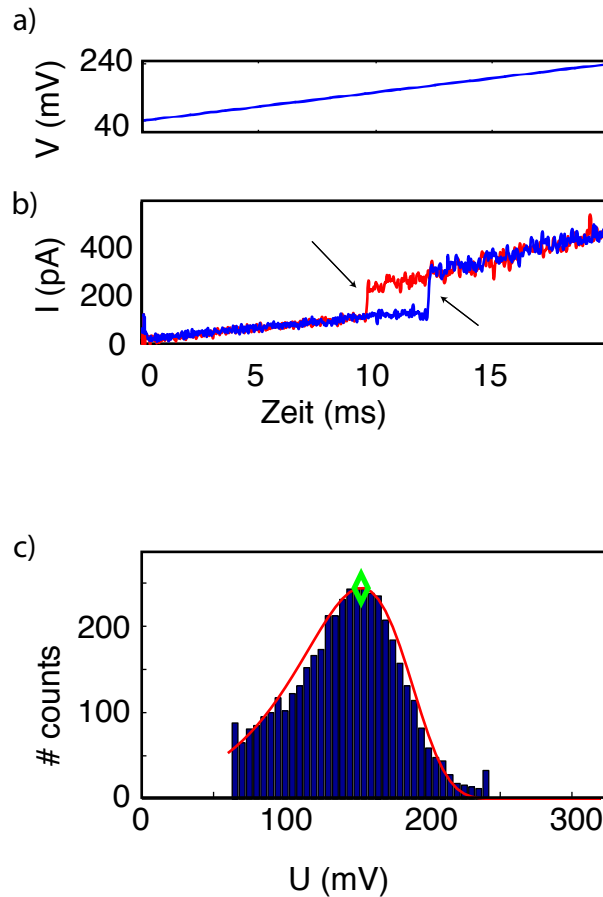


Abbildung 3.6: Unmittelbar nach Einfangen eines DNA Moleküls mit Hilfe der externen Elektronik wurde eine Spannungsrampe gestartet. Während der Rampe wurde die Spannung linear mit einer konstanten Rampengeschwindigkeit von 50 mV bis 240 mV erhöht (a) und gleichzeitig der Stromfluss durch die Pore gemessen. In b) sind zwei Messungen exemplarisch dargestellt. Sobald die DNA transloziert wird ändert sich der Leitwert der Pore sprunghaft (Pfeile). Die Werte der Spannungen bei welchen die DNA-Hairpins vollständig aufgebrochen und transloziert wurden sind in dem Histogramm c) dargestellt zusammen mit einem Fit der Verteilung gemäß Gleichung 3.9 (rote Linie) und der Position des Maximums (grüne Raute).

2, 5, 10, 20 und 40 V/s verwendet. Anschließend wurden Experimente mit einem Thrombinbindenden Aptamer durchgeführt, welches einen G-Quadruplex bildet[66]. Für diese Experimente musste die Rampengeschwindigkeit aufgrund der viel höheren Stabilität des G-Quadruplexes deutlich verringert werden, und es wurden 1/20, 1/8, 1/4, 1/2, und 1 V/s verwendet. Für die individuellen Fits aller einzelnen Experimente wurden kumulative Histogramme verwendet da bei dieser Methode keine Information durch die Einteilung der Daten in Klassen verloren geht. Entsprechend wurde eine kumulative Version von Gleichung 3.9 verwendet gemäß:

$$P_{kumulativ}(V) = \mathcal{N} \int_{V_0}^V P_{Rampe}(V') dV' \quad (3.11)$$

Aus den Fits für jede Rampengeschwindigkeit wurden die Positionen der Maxima bestimmt und gegen die logarithmische Rampengeschwindigkeit aufgetragen (vgl. Abb.3.7). Wie aus Formel 3.10 erwartet, liegen diese Werte von den Daten des Hairpins und des Quadruplexes jeweils auf einer Geraden, welche nahezu parallel verlaufen. Bei Verwendung einer semilogarithmischen Darstellung, entspricht die Steigung der Geraden dem Wert für V_β , da $V_c = V_\beta \cdot \ln(\tau_0 \dot{v}/V_\beta) = V_\beta \cdot \ln(\dot{v}) + const.$ Diese Steigung ist ein Maß für die effektive Ladung der DNA bzw. der Kraft welche durch Anlegen einer Spannung generiert wird. Da bei beiden Strukturen die Kraft auf die Einfädelsequenz wirkt, ist auch davon auszugehen, dass dieselbe Kraft generiert wird, also die Geraden parallel sind. Aus dem Fit gemäß Formel 3.10 ergibt sich $V_\beta = 27,1 \pm 0,7$ mV für den G-Quadruplex und $V_\beta = 19,0 \pm 1,8$ mV für das Hairpin. Dieser Unterschied könnte aufgrund der Einfachheit bzw. des Fehlers des Modells zustande kommen. Da für das Modell $Q_{eff} = k_B T / V_\beta$ verwendet wurde, lässt sich damit die effektive Ladung der DNA mit ca. 1 – 1,3 Elementarladungen angeben. Wenn angenommen wird, dass sich 12 Basen innerhalb der Pore befinden[79, 135, 103], so errechnet sich daraus eine effektive Ladung einer einzelnen Base zu etwa $0,1e$ was in Anwesenheit von Gegenionen durchaus sein könnte. Dieser Wert wurde auch in anderen Studien gemessen[72, 103]. In einer anderen Studie wurde doppelsträngige DNA mit einer optischen Falle in einer Festkörper-Nanopore gehalten, und die Kraft gemessen, welche das elektrische Feld innerhalb der Pore auf die DNA ausübt. Hierbei wurde eine effektive Ladung von $0,5 e$ pro Basenpaar gemessen[55]. Demnach sollte bei Experimenten mit α -HL und einzelsträngiger DNA eine Ladung von $\approx 0,25 e$ pro Base gemessen werden. Allerdings tritt, insbesondere bei Festkörper-Nanoporen, Elektroosmose auf[30]. Da die Wände einer dieser Poren geladen sind, sammeln sich dort Gegenionen an. Sobald eine Spannung angelegt wird, werden diese Gegenionen bewegt und verursachen einen hydro-

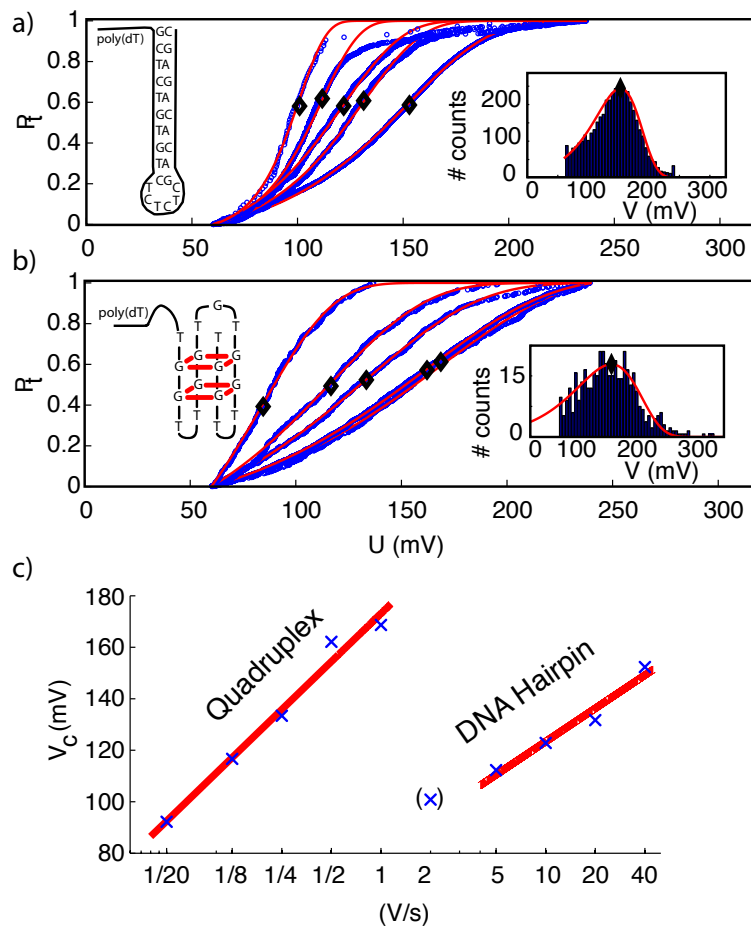


Abbildung 3.7: In a) sind kumulative Histogramme über die Entfaltungsspannungen eines Hairpins bei verschiedenen Rampengeschwindigkeiten (von links nach rechts: 2, 5, 10, 20 und 40 V s^{-1}) dargestellt. Die Daten wurden mit Gleichung 3.9 (rote Linie) gefittet. Die Position der Wendepunkte (schwarze Rauten) entspricht der Position des Maximums in einem normalen Histogramm (eines exemplarisch dargestellt). Ebenso wurden Experimente mit einem G-Quadruplex durchgeführt (b, Rampengeschwindigkeiten von links nach rechts: 1/20, 1/8, 1/4, 1/2 und 1 V s^{-1}). Die Positionen der Wendepunkte (bzw. Maxima) wurde in c) dargestellt und mit Gleichung 3.10 gefittet. Die Messung des Hairpins mit 2 V s^{-1} wurde für den Fit nicht berücksichtigt, da nur etwa 100 Translokationen beobachtet werden konnten. Klar zu sehen ist, dass bei einer gleichen Rampengeschwindigkeit das DNA-Hairpin bereits bei einer viel niedrigeren Spannung aufbricht und somit deutlich weniger stabil ist als der G-Quadruplex.

dynamischen Fluss innerhalb der Pore, welcher wiederum eine Kraft auf DNA-Moleküle in der Pore ausübt. Die effektive Ladung wird nicht direkt gemessen wird, sondern aus dem Fitparameter V_β bestimmt. Dieser Fitparameter berücksichtigt allerdings alle Faktoren,

welche die Kraft in Abhängigkeit der angelegtem Spannung beeinflussen. Somit könnten beispielsweise auch Elektroosmose oder Wechselwirkungen zwischen der DNA und der Pore diesen Parameter beeinflussen. Bei Experimenten, in welchen die Translokationsrichtung umgekehrt wird (vgl. Abschnitt 3.6), wird ebenfalls eine stark abweichende effektive Ladung gemessen, was zeigt, dass viele Faktoren diese Messung beeinflussen können. Die Gerade des G-Quadruplexes liegt deutlich höher als die Gerade des DNA-Hairpins, was zeigt, dass der G-Quadruplex viel stabiler ist als das Hairpin. Bei derselben Rampengeschwindigkeit würde der G-Quadruplex erst bei einer viel höheren Spannung aufbrechen. Beispielsweise würde bei 1 V/s das Hairpin bei etwa 80 mV aufbrechen, wohingegen der G-Quadruplex erst bei etwa 160 mV aufbricht. Dies zeigt sich auch in den extrapolierten Werten für die Translokationsdauer ohne angelegte Kraft, $\tau_0 = 1 \pm 0,3$ s für das Hairpin bzw. $\tau_0 = 16 \pm 1,9$ s für den G-Quadruplex. Dieser Parameter ist ein Maß dafür, wie lange der Translokationsprozess ohne eine extern angelegte Kraft dauern würde. In Realität würde die DNA innerhalb dieser Zeit allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die cis-Seite entweichen [7, 144]. Sehr ähnliche Entfaltungszeiten für ein vergleichbares DNA-Hairpin wurde auch von einer anderen Gruppe gemessen [72]. Ebenfalls wurde bereits die Translokationszeit eines G-Quadruplexes ohne eine Einfädelsequenz mit 15s gemessen [107], was sehr gut mit den von uns gemessenen τ_0 übereinstimmt. Ohne eine Einfädelsequenz sollte die Kraft auf den G-Quadruplex viel geringer sein und somit die Translokationsdauer unabhängig von der angelegten Spannung sein. Durch dieses Experiment wurde gezeigt, dass der DIB-Aufbau für kraftspektroskopische Messungen gut geeignet ist. Außerdem wurde gezeigt, dass ein G-Quadruplex bei Translokationsexperimenten kinetisch deutlich stabiler ist als ein Hairpin mit einer vergleichbaren thermodynamischen Stabilität. Dies könnte aufgrund der ähnlichen Geometrie einer Polymerase im Vergleich zu einer Nanopore einer der Gründe sein warum G-Quadruplex Strukturen die Replikation der Telomere hemmen [47].

3.3 Sequenzspezifische Stabilität von DNA-Hairpins

Um die Stabilität von DNA und RNA Duplexen und Hairpins vorhersagen zu können wurden in vielen Studien thermodynamische Tabellen [100, 108, 102, 101, 120, 16, 34] generiert und Computerprogramme [153, 133, 131, 132] entwickelt, mit deren Hilfe die sequenzspezifische thermodynamische Stabilität und die Schmelztemperatur einer beliebigen Sekundärstruktur ermittelt werden kann. Für Nanoporenexperimente sind diese Vorhersagen allerdings wenig aussagekräftig, da hierbei nur das durchschnittliche Verhalten der DNA im Ensemble betrachtet wird. Die bei Nanoporenexperimenten untersuchten DNA-Hairpins befinden sich bei den verwendeten Temperaturen in einem gefalteten Zustand. Dennoch kann der gefaltete Zustand für eine kurze Dauer durch thermische Fluktuationen geöffnet werden. Diese thermischen Fluktuationen sind abhängig von der Energielandschaft und bestimmen das Translokationsverhalten bei Nanoporenexperimenten. Bei der Bestimmung der Stabilität mit den oben genannten Programmen sind diese Fluktuationen aber nicht vorhersagbar, da diese nur Aussagen über die Stabilität des Ensembles treffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei DNA-Hairpins verglichen, deren thermodynamische Stabilität nahezu identisch ist, aber deren Translokationsdauer sich um mehr als einen Faktor 10 unterscheidet. Eines der Hairpins bildet in der Stammregion zuerst sechs GC-Basenpaare und anschließend sechs AT-Basenpaare (GC6AT6) und das andere bildet zuerst sechs AT-Basenpaare und dann sechs GC-Basenpaare (AT6GC6) (vgl. Abb.3.10).

GC6AT6 : $(dT)_{50}$ – GCGCGCATATATTTTTTTTTTATATATGCGCGC

AT6GC6 : $(dT)_{50}$ – ATATATGCGCGCTTTTTTTTTTGCGCGCATATAT

Zunächst wurde in einem Schmelzexperiment eine leicht höhere Schmelztemperatur von 84.6°C für AT6GC6 gemessen, im Vergleich zu 81.7°C für GC6AT6 (vgl. Abb.3.8). Daraufhin wurden Nanoporenexperimenten mit Spannungsrampen zwischen 0,1 V/s und 40 V/s durchgeführt, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben (vgl. Abb.3.9). Die Spannung der maximalen Translokationswahrscheinlichkeit V_c wurde jeweils durch einen Fit von Formel 3.10 und 3.11 an die jeweiligen kumulativen Histogramme bestimmt. Für die Darstellung In Abbildung Abb.3.9 wurden normale Histogramme und Histogramme mit einem gleitenden Mittelwert (vgl. Abschnitt 1.15) verwendet.

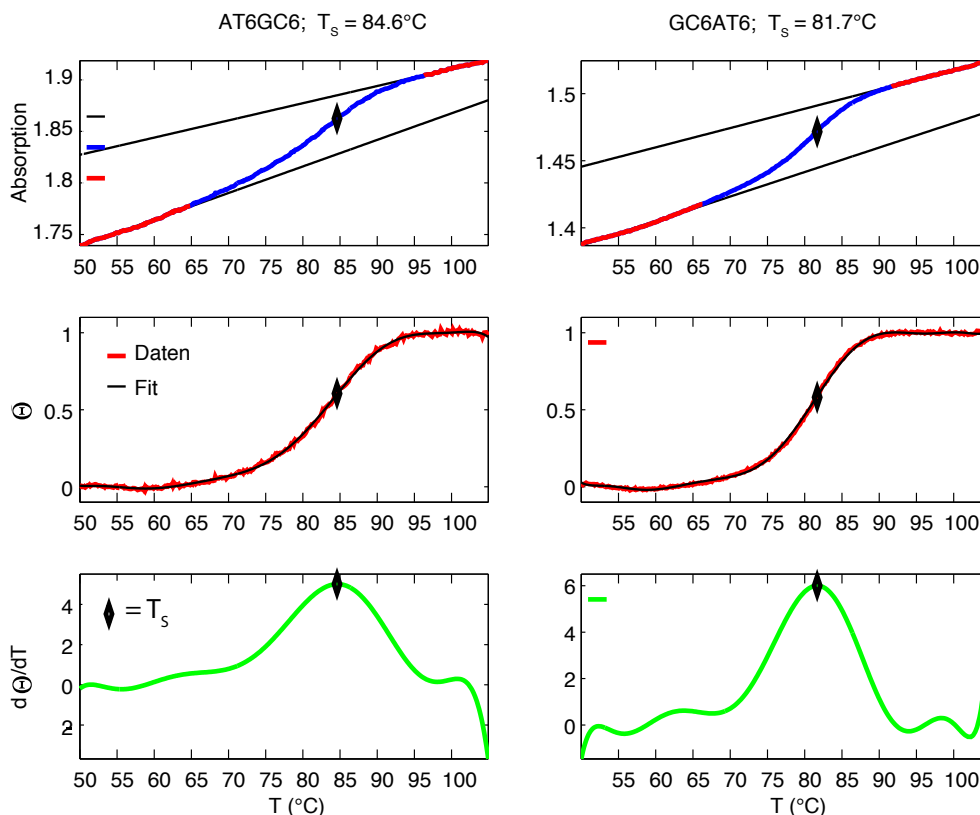


Abbildung 3.8: Durch Messung des Schmelzpunkts wird die thermodynamische Stabilität von zwei DNA-Hairpins verglichen. Das eine Hairpin (AT6GC6) bildet in der Stammregion erst einen Block mit 6-AT Basenpaaren aus, gefolgt von einem Block mit 6-GC Basenpaaren. Bei dem anderen Hairpin (GC6AT6) ist die Reihenfolge der Blöcke vertauscht. In den Schmelzexperimenten wurde die Absorption der DNA Probe bei 260 nm gemessen während die Temperatur von 50°C bis 95°C über 200 Minuten erhöht wurde (oben). Da die Absorption ungefähr linear mit der Temperatur ansteigt, wurde der Kurvenverlauf zu Beginn und Ende mit einer linearen Funktion gefittet (rote Bereiche), wobei diese Fits die maximale und minimale mögliche Absorption definieren und die Absorption darauf normiert wurde (Mitte). Dies entspricht der Fraktion der ungebildeten Basenpaare $\Theta = c(\text{offen}) / (c(\text{offen}) + c(\text{geschlossen}))$ [141]. Der Wendepunkt der Kurve (bzw. das Maximum der Ableitung (unten)) liegt beim Schmelzpunkt der DNA und wurde durch den Fit eines Polynoms hohen Grades (schwarze Linie) ermittelt. Die somit ermittelten Schmelztemperaturen zeigen, dass AT6GC6 geringfügig stabiler ist als GC6AT6.

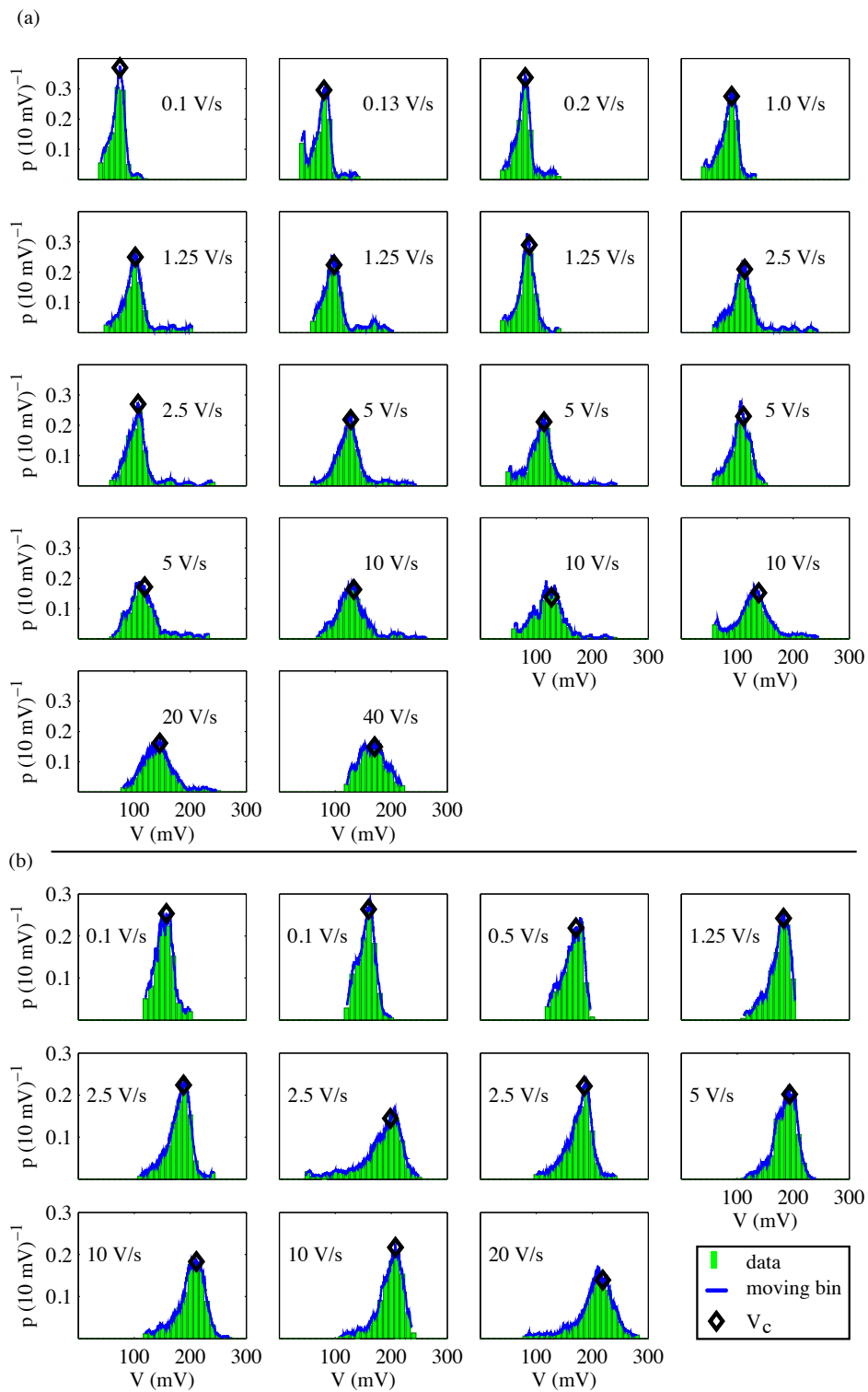


Abbildung 3.9: Histogramme über die Translokationsspannungen der Hairpins AT6GC6 (a) und GC6AT6 (b) bei verschiedenen Rampengeschwindigkeiten. Die blaue Linie wurde durch ein gleitendes Mittel erhalten und entspricht der Wahrscheinlichkeit, eine Translokation innerhalb eines 10 mV Intervalls zu beobachten. Die Maxima der Histogramme (V_c) wurden durch schwarze Rauten gekennzeichnet.

Bei Vergleich beider Hairpins ist zu erkennen, dass bei gleichen Rampengeschwindigkeiten für die Translokation von GC6AT6 immer eine deutlich höhere Spannung benötigt wird als für AT6GC6 (vgl. Abb.3.10). Ein Fit an beide Datensätze mit Formel 3.10 ergab $\tau_0 = (1,1 \pm 0,5) \times 10^5 s$ für AT6GC6 und $\tau_0 = (14 \pm 3) \times 10^5 s$ für GC6AT6. Also wird AT6GC6 etwa zehn mal schneller durch die Pore translokiert als GC6AT6, obwohl AT6GC6 eine leicht höhere Schmelztemperatur besitzt und somit thermodynamisch etwas stabiler ist.

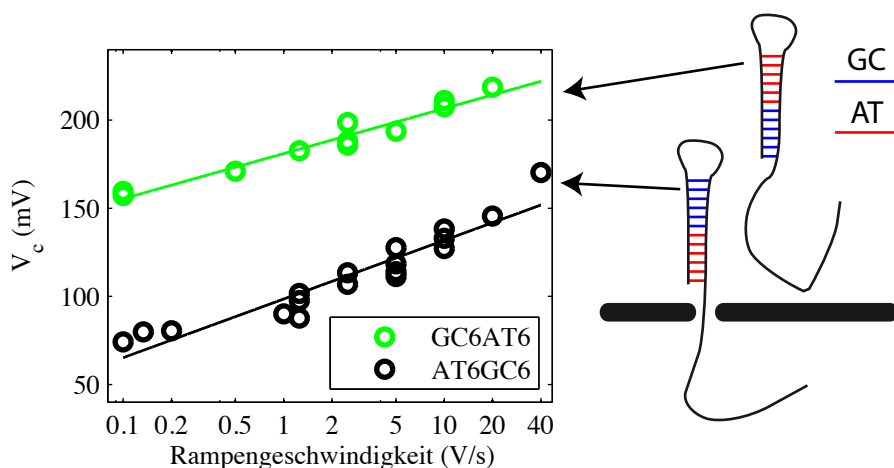


Abbildung 3.10: Das Phänomenologische Modell sagt vorher, dass die kritische Translokationsspannung V_c linear mit der logarithmischen Rampengeschwindigkeit zunimmt. Durch einen Fit (durchgezogene Linien) kann die Öffnungsdauer in Abwesenheit einer Spannung extrapoliert werden. Klar zu erkennen ist, dass bei gleicher Rampengeschwindigkeit das AT6GC6 Hairpin bei einer viel niedrigeren Spannung translokiert wird als das GC6AT6 Hairpin, obwohl beide Hairpins thermodynamisch gleich stabil sind.

Dieses zunächst kontraintuitive Verhalten kann durch die Form der Energielandschaften der Hairpins erklärt werden. Im mesoskopischen Modell wird angenommen, dass die Bewegung der DNA relativ zur Pore der ratenlimitierende Schritt während der Translokation ist. Dabei befinden sich die einzelnen Basenpaare des Hairpins zu jeder Zeit im thermodynamischen Gleichgewicht. Das thermisch getriebene Öffnen und Schließen der einzelnen Basenpaare geschieht schnell, im Vergleich zu der Bewegung der DNA relativ zur Pore. Es gelten nur die Einschränkungen, welche durch die Porengeometrie vorgegeben sind, also keine Basenpaare innerhalb der Pore und keine Basenpaare zwischen DNA Abschnitten

welche sich auf der cis-Seite befindet mit DNA Stücken welche sich auf der trans-Seite befinden. Die freie Energie kann deshalb für jede Position der DNA in der Pore mit den existierenden thermodynamischen Tabellen berechnet werden. Da beide DNA-Hairpins eine 50 Basen lange Einfädelsequenz haben, bleibt die freie Energie während der Translokation konstant, bis die fünfzigste Base in die Pore gelangt. Wenn die einundfünfzigste Base in die Pore gelangt kann das erste Basenpaar nicht mehr gebildet werden und somit steigt die freie Energie an, bis bei $\Delta G = 0$ alle Basen des Hairpins geöffnet sind und die DNA vollständig translokiert wird. Für jeden Schritt wurde die freie Energie für beide Hairpins wie in Abschnitt 1.11 berechnet und in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Form der Energie-

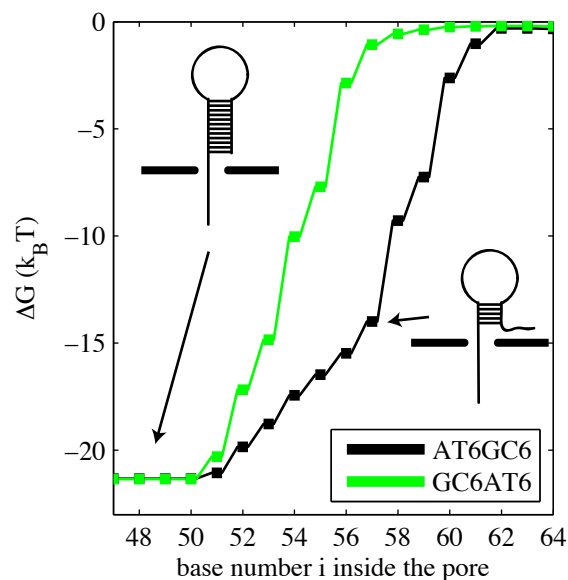


Abbildung 3.11: Die Energielandschaft in Abhängigkeit der Position der DNA innerhalb der Pore wurde durch Verwendung thermodynamischer Tabellen berechnet werden. Sobald die einundfünfzigste Base in die Pore eintritt muss ein Basenpaar geöffnet werden, was Energie kostet. Das letzte Basenpaar wird geöffnet wenn die zweiundsechzigste Base in die Pore gelangt. Daraufhin wird das Hairpin vollständig translokiert. Da GC-Basenpaare stabiler sind als AT-Basenpaare ist die Energielandschaft für GC6AT6 zuerst steil und wird dann flach. Bei AT6GC6 ist es umgekehrt und für das Öffnen der letzten GC-Basenpaare wird nur wenig Energie benötigt, da das Öffnen der letzten Basenpaare die Entropie stark erhöht weil das Hairpin dabei komplett geöffnet wird und die DNA sich frei bewegen kann. Deshalb müssen bei AT6GC6 weniger hohe Schritte überwunden werden, wodurch die schnellere Translokation erklärt werden kann.

landschaft kann grob dadurch beschrieben werden, dass GC Basenpaare stabiler sind als AT Basenpaare. Zusätzlich ist die Änderung der freien Energie bei Aufbrechen der letzten

Basenpaare geringer, da der Entropiegewinn beim Öffnen der letzten Base am größten ist. Dies ist dadurch zu erklären, dass viel mehr Konformationen der DNA nach Öffnen des letzten Basenpaares möglich sind. Damit ergeben sich für die Hairpins je zwei Bereiche in der Energielandschaft: Ein steiler, wenn die GC Basenpaare geöffnet werden und ein flacher, in welchem die AT Basenpaare geöffnet werden. Der steilere Bereich erstreckt sich für GC6AT6 über sechs Basenpaare und für AT6GC6 nur über einen kürzeren Bereich aufgrund des Entropiegewinns bei Öffnen der letzten Basenpaare. Deshalb wird AT6GC6 auch bei einer viel geringeren Spannung translokiert, denn das Öffnen des steilen Bereichs bestimmt die Dauer der Translokation. In Abbildung 3.12 ist die Energielandschaft bei ei-

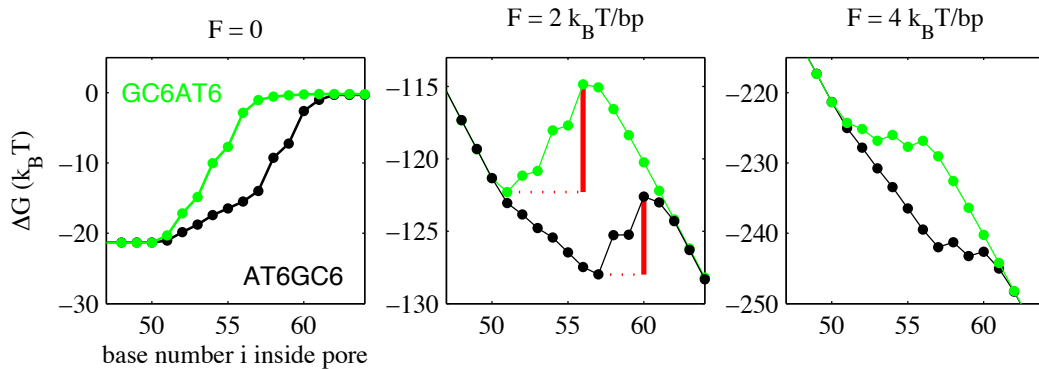


Abbildung 3.12: Die Energielandschaft ohne angelegte Kraft (links) wird durch Anlegen einer Kraft verzerrt und die Energiebarriere (rot) für die Translokation wird dadurch geringer (mitte). Die Energiebarriere ist für GC6AT6 höher als für AT6GC6, wodurch die höhere Stabilität dieser Struktur erklärt werden kann. Bei Anlegen einer starken Kraft verschwindet die Energiebarriere vollständig und beide Strukturen können wie einzelsträngige DNA translokiert werden.

ner angelegten Kraft dargestellt. Der steile Bereich bildet die Aktivierungsenergie, welche bei der Translokation aufgebracht werden muss. Um die experimentellen Daten mit dem theoretischen Modell vergleichen zu können, ist es günstig, aus den Rampenexperimenten die Translokationsdauer bei konstanten Spannungen zu berechnen. Dazu wird angenommen, dass Translokationsdauer ausschließlich von der angelegten Spannung abhängt. Es darf keine explizite Zeitabhängigkeit geben. Bei dieser Annahme besitzt die DNA kein ‘‘Gedächtnis‘‘ und befindet sich immer in demselben Zustand, solange sie in der Pore ist. Aus einem Spannungsrampenexperiment kann unter dieser Voraussetzung die Translokationsdauer bei einer konstanten Spannung errechnet werden[26, 92]:

$$\tau(V) = \frac{\int_V^\infty p(V')V'dV'}{\dot{V}p(V)} \quad (3.12)$$

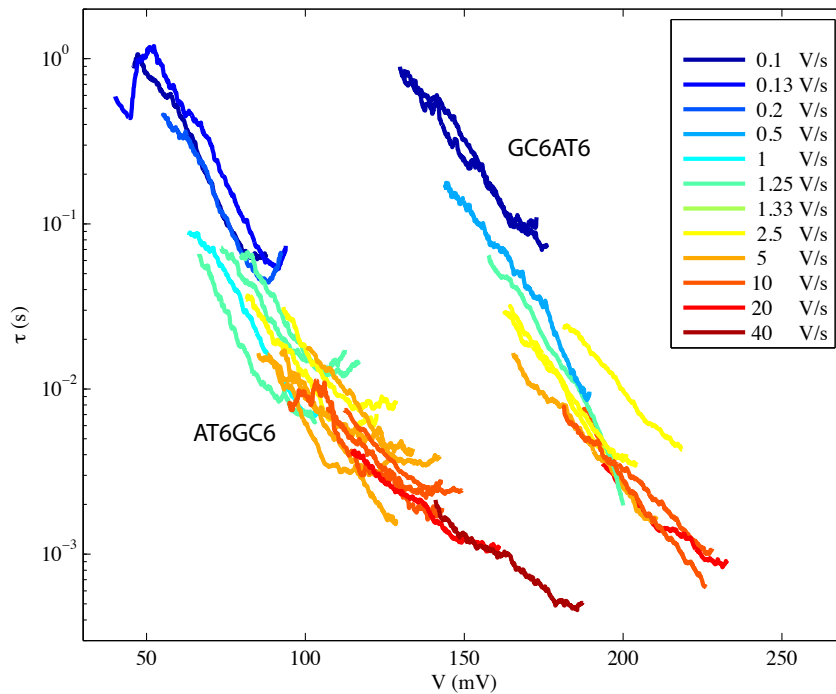


Abbildung 3.13: Durch Verwendung von Formel 3.12 wurde aus den Rampenexperimenten die Translokationsdauer der Hairpins bei einer konstanten Kraft berechnet. Für verschiedene Rampengeschwindigkeiten fallen die Kurven auf eine für das Hairpin universelle Kurve. Wenn die Experimente nicht im adiabatischen Limit durchgeführt werden, so würde erwartet werden, dass dies nicht der Fall ist. Das phänomenologische Modell sagt voraus, dass diese Kurve in der gewählten semilogarithmischen Darstellung entlang einer Geraden verläuft. Allerdings erscheint es einleuchtend, dass die Translokationsdauer bei hohen Spannungen nicht unendlich kurz sein kann, und in der Tat knickt die Kurve für AT6GC6 unterhalb von 1 ms leicht ab. Dieses Verhalten kann durch das mesoskopische Modell beschrieben werden. Klar zu sehen ist, dass die Translokationsdauer für GC6AT6 deutlich länger ist als für AT6GC6.

In Abbildung 3.13 sind die entsprechenden Kurven für die Translokationsdauer für AT6GC6 und GC6AT6 dargestellt. Wenn die Kurven von verschiedenen Rampengeschwindigkeiten nicht auf eine gemeinsame Kurve fallen würden, müsste davon ausgegangen werden, dass die oben gemachte Annahme nicht erfüllt ist. Bei den gezeigten Messungen kann davon ausgegangen, dass diese Bedingung erfüllt ist. Die Translokationsdauer der beiden Strukturen ist klar voneinander getrennt, und GC6AT6 ist wie erwartet deutlich stabiler als AT6GC6. Außerdem ist zu erkennen, dass die Kurve für AT6GC6 bei einer kurzen Translokationsdauer gekrümmt ist, was darauf hindeutet, dass ein einfaches phänomenologische Modell die Translokation nicht vollständig beschreiben würde, denn bei diesem Modell müsste die Translokationsdauer auf einer Geraden liegen. Es ist allerdings auch anzunehmen, dass bei großer angelegter Spannung und einer sehr kurzen Translokationsdauer die Öffnung des Hairpins nicht mehr der ratenlimitierende Schritt ist und die Translokation wie bei ssDNA verläuft. Auch in diesem Fall ist natürlich eine unendlich kurze Translokationsdauer nicht möglich.

In Abbildung 3.14 sind die gemessenen Daten und die mit dem mesoskopischen Modell berechnete Translokationsdauer dargestellt. Zusätzlich zu AT6GC6 und GC6AT6 wurden auch die Strukturen GC12 und AT12 untersucht:

GC12 : $(dT)_{50} - \underline{GCGCGCGCGCGCTTTTTTTTTTGGCGCGCGCGCGC}$

AT12 : $(dT)_{50} - \underline{ATATATATATATTTTTTTTTTTATATATATATAT}$

Als Parameter für die Berechnung wurde $k_0 = 10^6$ /s bestimmt. Ein ähnlicher Wert wurde auch bei Messung der Translokationsdauer von einzelsträngiger DNA gefunden[79]. Die effektive Ladung wurde als $Q_{eff} = 0,4e$ angenommen, was zwar deutlich höher ist als in vorangegangenen Studien[71, 136], aber nötig war, um die experimentellen Daten möglichst gut zu reproduzieren. Der Wert der effektiven Ladung kann allerdings auch als allgemeiner Fitparameter aufgefasst werden, der auch durch die Porengeometrie beeinflusst werden kann. Wie erwartet sagt das mesoskopische Modell für GC12 eine langsamere Translokation als für GC6AT6 voraus. Im Experiment konnten dagegen kein Unterschied gemessen werden. Diese Abweichungen zwischen Experiment und Theorie können vermutlich auf einen stabilisierenden Effekt des α -HL-Vorhofs zurück geführt werden. Es gibt auch Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Translokationsrichtung auf die Translokationsdauer[83, 70]. In Abschnitt 3.6 wird gezeigt, dass Theorie und Experiment sehr viel besser übereinstimmen, wenn die Translokation in Rückwärts-Richtung, also ohne den Einfluss des Vorhofs, durchgeführt wird.

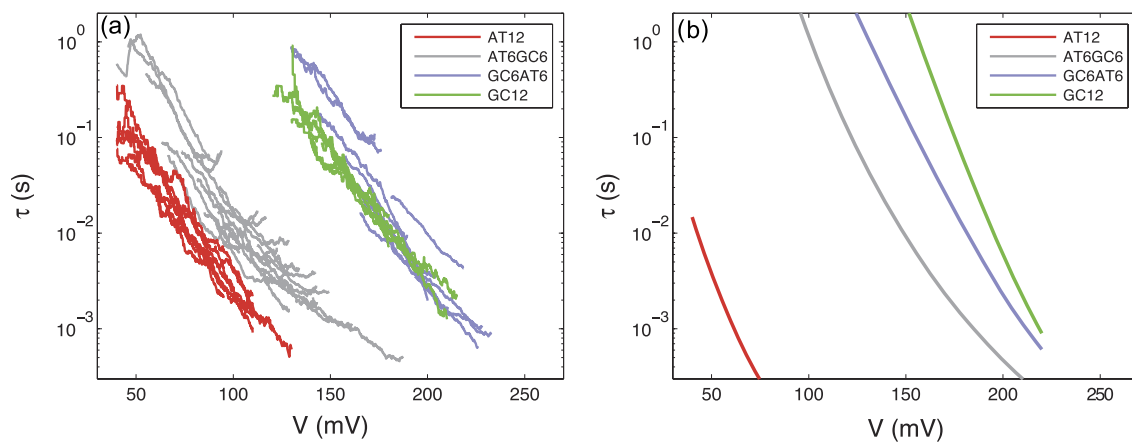


Abbildung 3.14: Die gemessene Translokationsdauer der vier Hairpins ist in a) dargestellt, zusammen mit den Erwartungen des mesoskopischen Modells in b). Wie erwartet ist die Translokationsdauer für AT12 am kürzesten und für GC6AT6 länger als für AT6GC6. Für GC12 sagt das mesoskopische Modell eine langsamere Translokation als für GC6AT6 voraus, wohingegen im Experiment kein Unterschied messbar war. Dieses Verhalten könnte durch den geometrischen Effekt des Vorhofs der α -HL Pore verursacht werden. In der Tat ist die Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie sehr viel besser bei Translokationen in die Rückwärts-Richtung, also ohne den Einfluss des Vorhofs (s.u.).

3.4 DNA-Hairpin und G-Quadruplex im α -HL Vorhof

Bei Translokationen von DNA-Hairpins in Vorwärts-Richtung ist davon auszugehen, dass die Entfaltung des Hairpins innerhalb des Vorhofs geschieht, da sogar ein G-Quadruplex aus vier parallelen DNA Strängen in den Vorhof passt[106]. Allerdings ist der Vorhof von α -HL nicht deutlich größer als doppelsträngige DNA (vgl. Abb.3.15) und somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Geometrie des Vorhofs auch die Entfaltung des Hairpins beeinflusst, was auch schon in anderen Studien gezeigt wurde[83]. Um Messungen in Rückwärts-

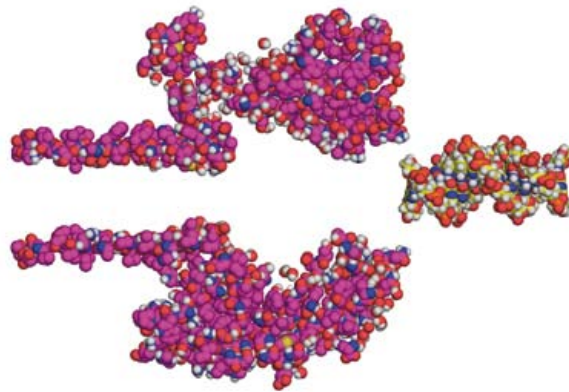


Abbildung 3.15: Ein Größenvergleich zwischen der α -HL Pore und doppelsträngiger DNA zeigt, dass der Vorhof aufgrund seiner Größe die Struktur der DNA stabilisieren könnte.

Richtung durchzuführen kann einfach die Spannung umgepolt werden. Allerdings ist dann die Frequenz geringer, mit welcher DNA in die Pore gelangt als in Vorwärts-Richtung[41]. Der Vorhof der Pore könnte durch seine Geometrie das Einfädeln der DNA in die Stammregion begünstigen. Dies kann durch Anlegen einer höheren Spannung kompensiert werden, was allerdings zusätzlich zu einer Beschleunigung der Translokation führt. Dadurch wird es aber schwieriger, DNA mittels einer externen Elektronik in der Pore zu fangen, besonders dann, wenn instabile DNA-Hairpins untersucht werden sollen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine Technik weiterentwickelt, bei welcher eine stabile Struktur an die DNA angehängt wird, um eine komplette Translokation unmöglich zu machen, da diese Struktur wie ein Anker in der Pore hängenbleibt (vgl. Abschnitt 2.2). Diese Technik hat wesentliche Vorteile gegenüber der normalen Kraftspektroskopie:

- Die Messungen können ohne den Einfluss des Vorhofs durchgeführt werden
- Es ist keine Elektronik zum Fangen der DNA nötig

- Es können auch sehr schwache Strukturen untersucht werden
- Es ist kein rauscharmer Messaufbau nötig

Bei der Verwendung von Spannungsrampen wird durch die zeitliche Auflösung die Genauigkeit begrenzt, mit welcher die individuellen Translokationsspannungen bestimmt werden können. Wenn beispielsweise eine Spannungsrampe mit 5 V/s und ein 2 kHz Filter verwendet wird, so kann die Spannung, bei welcher die DNA translokiert wurde noch auf $\approx 2,5$ mV genau bestimmt werden. Diese Auflösung reicht aus, um selbst schwache Strukturen zu untersuchen. Gleichzeitig wird bei der Verwendung eines 2 kHz Filters das Rauschen sehr stark unterdrückt. Die zeitliche Auflösung bei Verwendung eines 2 kHz Filters würde allerdings nicht ausreichen, um schwache Strukturen mit einer externen Elektronik effektiv zu fangen, da die Zeitverzögerung der Signale innerhalb des Filters zu groß wäre. Bei Verwendung eines Ankers funktioniert das Fangen der DNA dagegen automatisch ohne externe Elektronik.

Als Anker wurde entweder ein G-Quadruplex oder ein sehr stabiles Hairpin verwendet da diese Methode einfacher und kostengünstiger ist als ein Avidin-Anker, welcher an biotinierte DNA angebunden wird und bereits früher verwendet wurde[41]. Ein G-Quadruplex ist eigentlich als Anker ideal, da er aus nur 15 Basen gebildet wird[14] und viel stabiler als ein Hairpin ist[96]. Allerdings interagiert der G-Quadruplex mit dem engen Vorhof von α -HL, sodass bei typischen Rampengeschwindigkeiten eine Spannung von bis zu 50 mV benötigt wird damit der G-Quadruplex den Vorhof verlässt. Dies beeinflusst allerdings nur das Translokationsverhalten von sehr schwachen Hairpins. Beispielsweise wird ein aus 6 AT Basenpaare bestehendes Hairpin bei einer niedrigen Spannung entfaltet, welche nicht ausreicht, um einen G-Quadruplex aus dem Vorhof der Pore zu treiben (vgl. Abb.3.17). Bei einer Messung mit solch einem unstabilen Hairpin ist die Verweildauer eines G-Quadruplexes im Vorhof deutlich länger als die Entfaltungsdauer des Hairpins und folglich kann die Entfaltungsdauer nicht gemessen werden. Um trotzdem Kraftspektroskopie mit sehr unstabilen Hairpins durchführen zu können, kann der G-Quadruplex Anker auch durch ein stabiles Hairpin ersetzt werden (z.B. 12 GC Basenpaare). DNA-Hairpins bleiben nicht im Vorhof stecken und können in Abwesenheit einer angelegten Spannung innerhalb von etwa 10 ms aus dem Vorhof diffundieren[70]. Wenn eine Spannung von 10 mV angelegt wird, beträgt die Verweildauer eines Hairpins mit einer (dA)₅₀ Einfädelsequenz nur wenige Millisekunden[139].

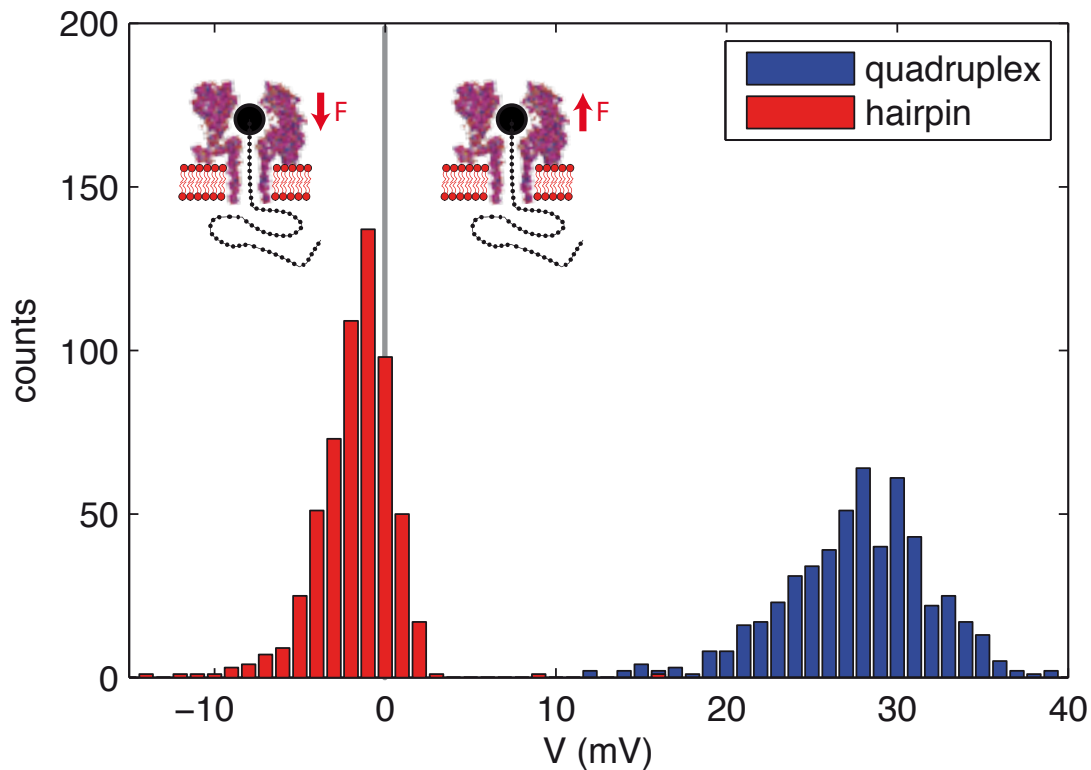


Abbildung 3.16: Bei diesem Experiment wurde ein Hairpin-Anker bzw. ein G-Quadruplex-Anker an eine 50 Basen lange und Sekundärstruktur freie DNA angehängt. Durch Anlegen einer negativen Spannung wurde eine DNA von der cis-Seite aus in die Pore gezogen. Die Spannung wurde daraufhin kontinuierlich erniedrigt, bis die DNA aus der Pore entkam. Die Verteilung dieser Spannungen ist in dem Histogramm dargestellt. Bei 0 mV wird die Richtung der Kraft umgekehrt und die DNA wird aus der Pore gestoßen. Während die DNA mit dem Hairpin-Anker bereits bei negativen Spannungen durch thermische Fluktuationen aus der Pore entkommt, wird für den G-Quadruplex eine Spannung von einigen mV benötigt um diesen aus der Pore zu treiben. Bei NFS-Messungen von sehr schwachen Hairpins könnte also ein G-Quadruplex-Anker noch bei einer niedrigen Spannung in der Pore stecken bleiben, obwohl das Hairpin bereits geöffnet werden würde.

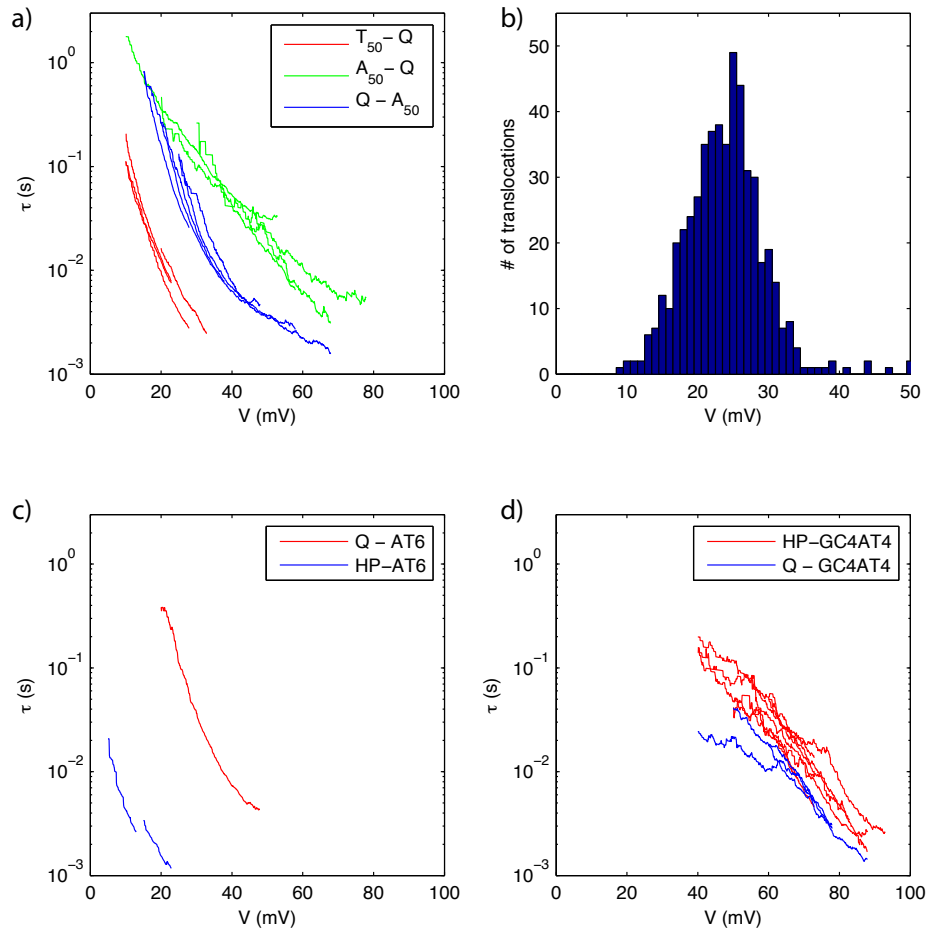


Abbildung 3.17: In a) ist die Verweildauer eines G-Quadruplex-Ankers mit verschiedenen angehängten unstrukturierten DNA Sequenzen dargestellt, und in b) ein repräsentatives Histogramm einer Messung mit der $T_{50}-Q$ Sequenz bei einer Rampengeschwindigkeit von 1 V/s. Der G-Quadruplex-Anker kann bis zu einer Spannung von 60 mV für mehrere Millisekunden in der Pore stecken bleiben und dadurch die eigentliche Messung beeinflussen. In c) ist eine Messung mit einem sehr schwachen Hairpin dargestellt. Der Einfluss des G-Quadruplexes ist dabei deutlich zu erkennen, während ein Einfluss bei einer stabileren Struktur (d) nicht zu erkennen ist.

Aus Messungen, welche im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind lässt sich abschätzen, dass die Verweildauer für Hairpins mit einer $(dT)_{50}$ Einfädelsequenz noch geringer ist (vgl. Abb.3.17) was auch zu erwarten ist, da bei der Translokation von homopolymeren $(dA)_N$ die längste Translokationsdauer aufweist[78]. Dies kann dadurch erklärt werden, dass $\text{poly}(dA)$ auf sich selbst falten kann. Ebenfalls ist die Verweildauer eines G-Quadruplexes mit einer $(dA)_{50}$ Einfädelsequenz um ein vielfaches länger als die desselben G-Quadruplexes mit einer $(dT)_{50}$ Einfädelsequenz (vgl. Abb.3.17). Die Translokationsdauer eines GC4AT4 Hairpins wurde mit einem G-Quadruplex und mit einem stabilen Hairpin als Anker gemessen. Da sich diese nur unwesentlich voneinander unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass der Effekt des G-Quadruplexes nur bei Hairpins eine Rolle spielt, welche langsamer transloziert werden als ein GC4AT4 Hairpin.

3.5 Translokation in Vorwärts- und Rückwärts-Richtung

DNA kann sowohl in Vorwärts-Richtung, also von cis nach trans durch die α -HL Pore translokiert werden als auch in Rückwärts-Richtung. Da die α -HL Pore nicht symmetrisch bezüglich ihrer Orientierung innerhalb der Membran ist, ergeben sich Unterschiede im Translokationsverhalten der DNA. Beispielsweise wird bei gleicher DNA Konzentration und invertierter Spannung die DNA häufiger in Vorwärts-Richtung translokiert[41]. Aber auch die Translokationsdauer von DNA-Hairpins wird stark von der Translokationsrichtung beeinflusst. In Abb.3.18 ist die Translokationsdauer eines 12-GC Basenpaare enthaltenden Hairpins dargestellt. Eindeutig ist die Translokationsdauer in Rückwärts-Richtung deutlich kürzer als in Vorwärts-Richtung. Da der Unterschied mehr als zwei Größenordnungen beträgt, konnte die Translokationsdauer nicht bei gleichen Spannungen gemessen werden. Ebenfalls ist zu erkennen, dass die Kurven für die Rückwärts-Richtung steiler verlaufen, was im Rahmen der Theorie einer stärker ankoppelnden Kraft, bzw. einer höheren effektiven Ladung zugeschrieben wird. Falls die effektive Ladung der DNA so stark von der Polarität abhängt, wäre ebenfalls davon auszugehen dass sie auch von der Höhe der angelegten Spannung beeinflusst wird. Dabei würde die angelegte Kraft nicht mehr linear von der angelegten Spannung abhängen. Zahlreiche Messungen, in einem Spannungsbereich zwischen 10 und 110 mV, wurden durch ein Modell mit einer konstanten Ladung der DNA korrekt vorhergesagt. Deshalb gehen wir nicht davon aus dass die effektive Ladung der DNA von der angelegten Spannung oder Polarität abhängt. Vielmehr vermuten wir, dass ein Hairpin bei einer Translokation in Vorwärts-Richtung durch die enge Geometrie des Vorhofs sterisch stabilisiert wird. Ein Größenvergleich zwischen doppelsträngiger DNA und der α -HL Pore (vgl. Abb.3.15) lassen diese Annahme plausibel erscheinen. Des Weiteren ist in Abb.3.18 der Einfluss einer zweiten Verlängerung des Hairpins dargestellt (dangling ends). Dieselbe Geometrie ergibt sich für Translokationsexperimente in Rückwärts-Richtung bei der Verwendung einer Anker-Technik (vgl. Abschnitt 3.4) denn dabei wird das Hairpin nicht nur an einem Ende um die Einfädelsequenz verlängert, sondern auch an dem anderen Ende um die Ankersequenz. Offensichtlich ist die Translokationsdauer kürzer, wenn beide Enden des Hairpins verlängert werden. Gemäß [83] ist es möglich, dass ein Hairpin mit nur einem freien Ende sich bei Translokationen in Rückwärts-Richtung verklemmen kann und, dass die Translokation dadurch verlangsamt werden kann. Interessanterweise wurde dieser Effekt in Vorwärts-Richtung nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Da die Anker-

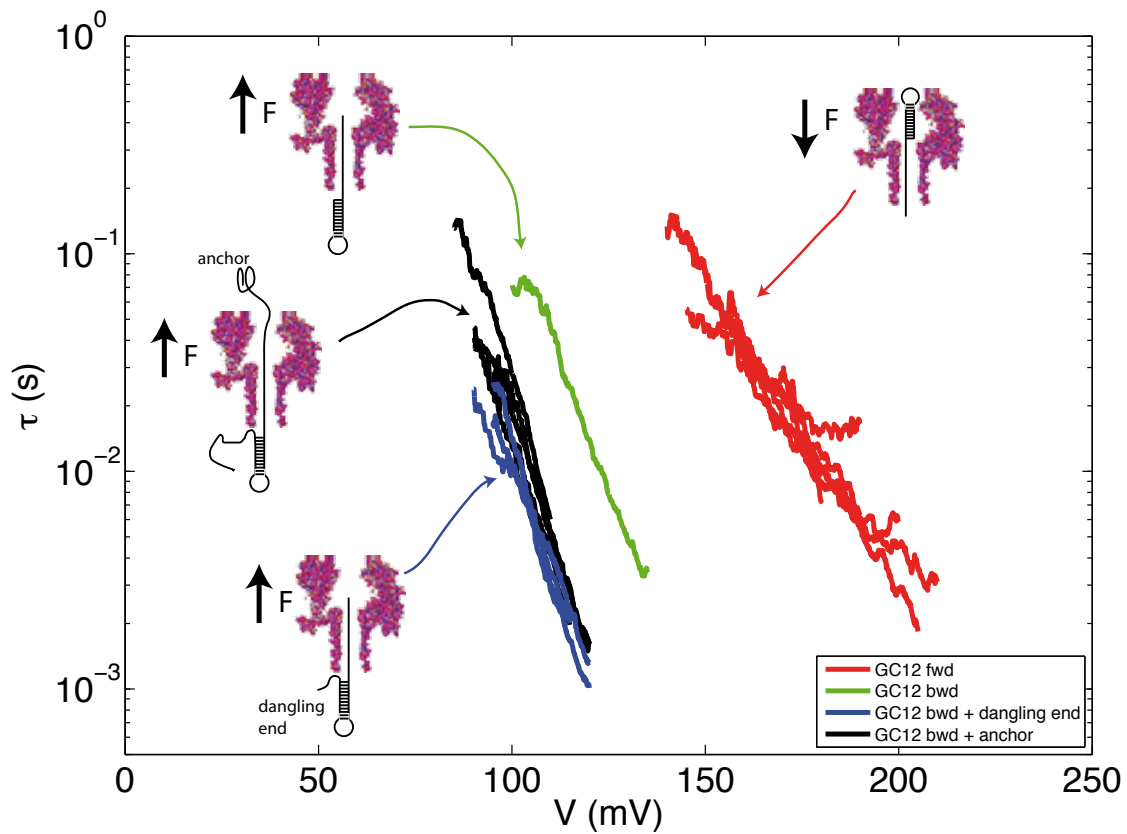


Abbildung 3.18: Die Translokationsdauer eines DNA-Hairpin (GC12) wurde in Vorwärts-Richtung mit verschiedenen Spannungsrampen gemessen (rot). Ebenso wurde die Translokationsdauer in Rückwärts-Richtung mit Hilfe der externen Elektronik gemessen (grün). Ebenfalls wurde das Hairpin um sechs Thymin Basen verlängert (GC12-T6) um den Einfluss eines “dangling ends“ zu untersuchen (blau). In der Tat wurde die Translokationsdauer dadurch verkürzt. Die Translokation wurde auch mit der Ankertechnik untersucht (schwarz, Q-GC12). Dabei wurde, wie erwartet, kein Unterschied zu der Translokationsdauer mit “dangling end“ gefunden.

technik die Experimente deutlich erleichtert, wurde dieser geometrische Effekt nicht weiter untersucht. Außerdem war es Ziel dieser Arbeit, die geometrischen Effekte möglichst zu eliminieren, da diese von der Theorie nicht berücksichtigt werden.

3.6 Sequenzspezifische Stabilität von DNA-Hairpins bei Translokationen von trans nach cis

Da die in Abschnitt 1.10 vorgestellte Theorie das Translokationsverhalten ausgewählter DNA-Hairpins in Vorwärts-Richtung nur unzureichend erklärt (vgl. Abschnitt 3.3), wurden weitere Experimente in Rückwärts-Richtung unter Verwendung der Anker Technik durchgeführt und mit der Theorie verglichen. Insgesamt wurde das Translokationsverhalten von 11 verschiedenen DNA-Hairpins untersucht (vgl. Abb. 3.20). Die untersuchten Hairpins verfügten über 6 – 12 Basenpaare mit einer thermodynamischen Stabilität zwischen 3, 5 und 42, 5 $k_B T$. Die Hairpins enthielten teilweise nur AT Basenpaare oder nur GC Basenpaare oder eine Mischung. Ebenfalls wurde die Sequenz für vier Hairpins zufällig erstellt und ein Hairpin enthielt ein ungepaartes Basenpaar. Alle Strukturen sind in Abb. 3.20 dargestellt. Es wurde jeweils die spannungsabhängige Translokationsdauer unter Verwendung verschiedener Spannungsrampen und Formel 3.12 gemessen. Bei allen Hairpins war die ermittelte Translokationsdauer für konstante Spannungen unabhängig von der Rampengeschwindigkeit, und somit die adiabatische Annahme erfüllt. Aus den Daten der fünf stabilsten Hairpins wurden die gemeinsamen Werte für $Q_{eff} = 0,82 e$ und $k_0 = 1,2 \times 10^5 /s$ durch einen globalen Fit unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt. Mit diesen Werten wurde die Translokationsdauer aller Hairpins im mesoskopischen Modell errechnet (vgl. Abschnitt 1.10) und zusammen mit den gemessenen Werten in Abb. 3.19 dargestellt. Zusätzlich wurde die Translokationsdauer für DNA ohne Sekundärstruktur berechnet und mit Literaturwerten verglichen [58, 83, 70]. Der individuelle Kurvenverlauf ist ausschließlich durch die Energielandschaft bestimmt, da die beiden Fitparameter Q_{eff} und k_0 für alle Kurven identisch sind. Theorie und Experiment stimmen für alle Strukturen qualitativ und im Wesentlichen auch quantitativ überein. Bei einigen Strukturen gibt es allerdings geringe Abweichungen, welche etwas außerhalb der statistischen Streuung der Daten liegen. Ursache hierfür könnten Ungenauigkeiten bei der Vorhersage der Energielandschaft oder eine eventuell auftretende, kinetisch begünstigte Fehlfaltung der Hairpins nach der ersten Translokation sein. Interessanterweise wird auch die Translokation von einzelsträn-

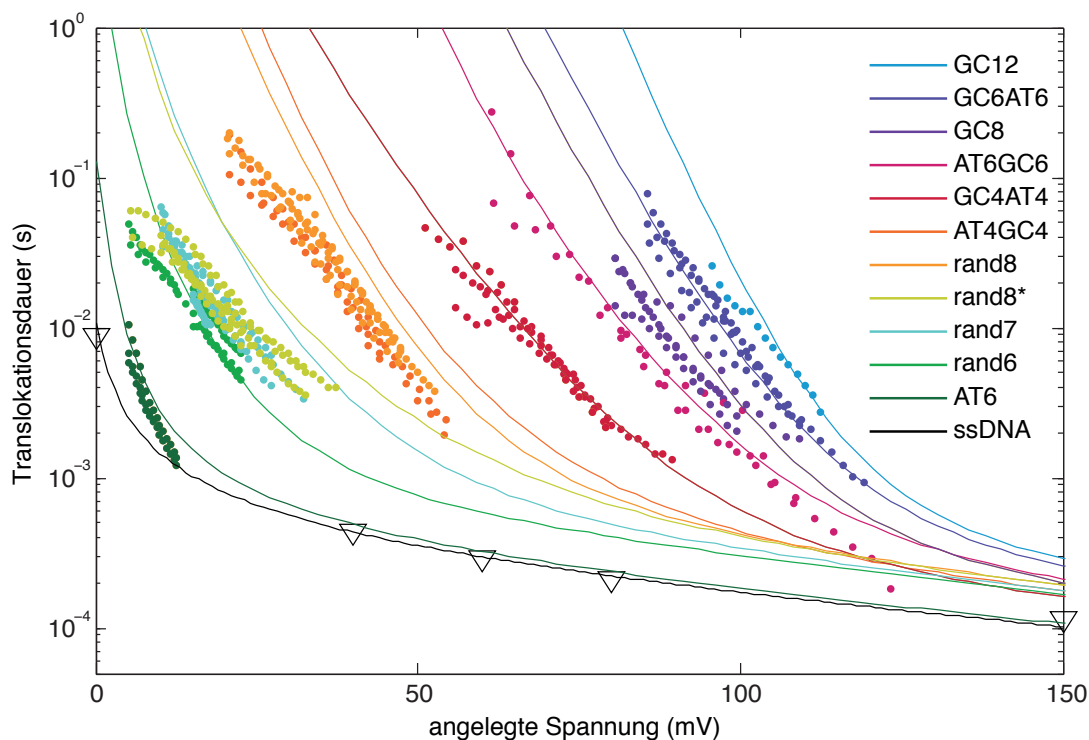


Abbildung 3.19: Mit Hilfe der Ankertechnik wurde die Translokationsdauer von 11 DNA-Hairpin Strukturen (vgl. Abb.3.20) bei verschiedenen Rampengeschwindigkeiten ($\approx 0,5 - 2$ V/s) gemessen (farbige Punkte). Die Energielandschaften aller Hairpins wurde berechnet und mit Hilfe des mesoskopischen Modells die Translokationsdauer vorhergesagt (durchgezogene Linien). Die gute Übereinstimmung zwischen den Experimenten und berechneten Kurven zeigt, dass das Modell gut geeignet ist, um die Translokationsdauer von beliebigen DNA-Hairpins vorherzusagen. Ebenso stimmen die Vorhersagen auch für die Translokationsdauer von unstrukturierter DNA.

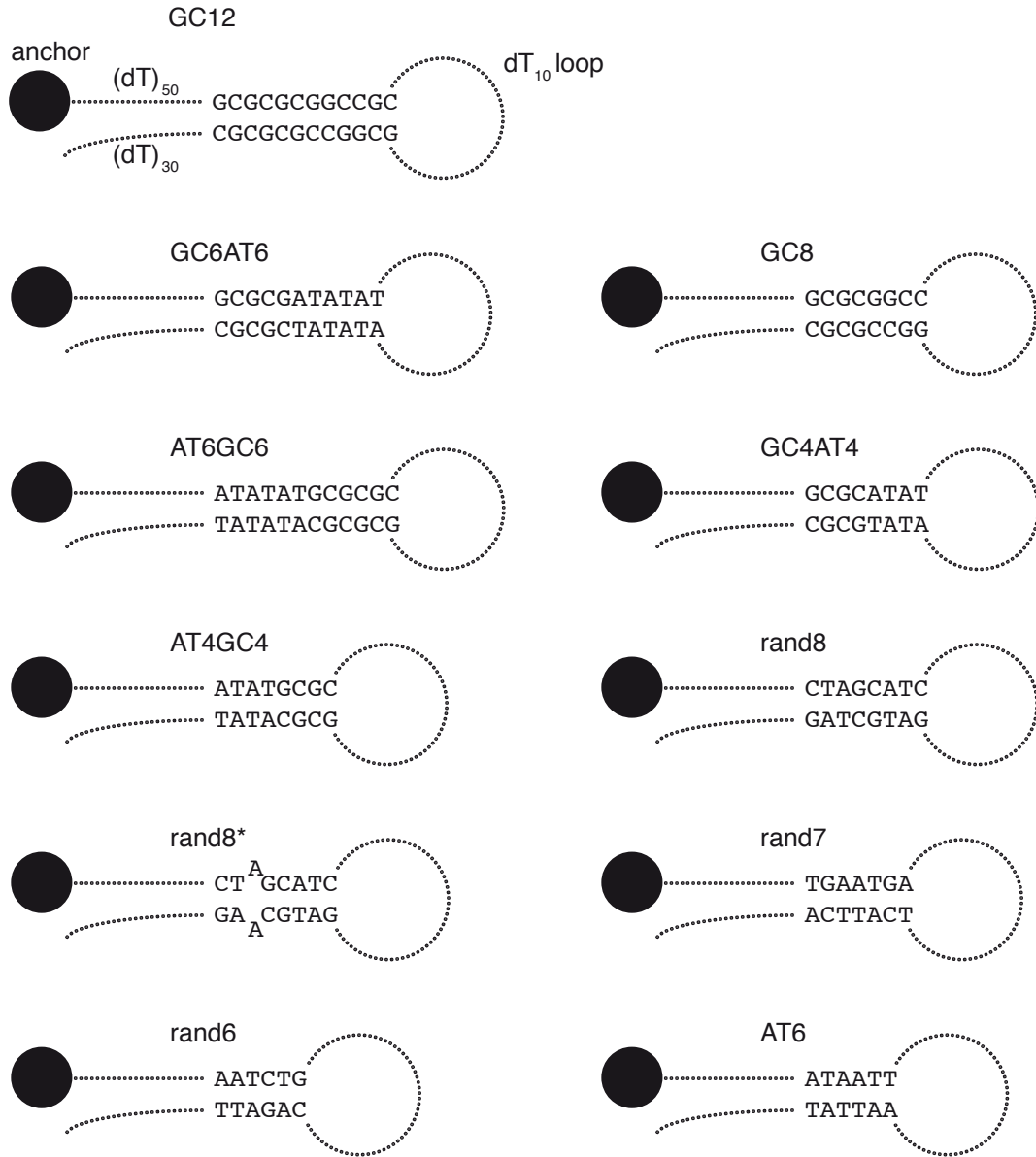


Abbildung 3.20: Die Übersicht zeigt die Vielfalt der untersuchten DNA-Hairpins. Es wurden unterschiedlich lange, unterschiedlich strukturierte sowie zufällig ausgewählte Hairpins untersucht. Ebenso reicht das Verhältnis von AT Basenpaaren zu GC Basenpaaren von 0% bis 100% .

giger DNA durch das mesoskopische Modell unter Verwendung derselben Fitparameter korrekt vorhergesagt. Der ermittelte Wert für k_0 stimmt mit früher gemessenen Werten überein[79]. Der gemessene Wert für die effektive Ladung der DNA ist dagegen deutlich höher als erwartet[103, 71, 94, 152]. Allerdings wurden bisher fast alle Translokationsexperimente in Vorwärts-Richtung durchgeführt. Hierbei ist die Translokationsdauer durch den Einfluss der Geometrie des Vorhofs um etwa zwei Größenordnungen langsamer als bei Translokationen in die Rückwärts-Richtung (vgl. Abschnitt 3.5). Auch die Steilheit der Kurven unterscheiden sich deutlich, wobei der Parameter der effektiven Ladung im Wesentlichen die Steilheit der Kurven beschreibt. Somit ist es nicht verwunderlich, dass die Werte der effektiven Ladung in Vorwärts- und Rückwärts-Richtung nicht übereinstimmen. Da der Einfluss des Vorhofs durch eine andere Wahl der effektiven Ladung kompensiert werden kann, sollte dieser Parameter eher als ein genereller Fitparameter aufgefasst werden. Dieser berücksichtigt nicht nur die tatsächliche effektive Ladung der DNA, sondern beinhaltet auch Wechselwirkungen zwischen DNA und Pore. Natürlich wäre es wünschenswert diese Wechselwirkungen entweder experimentell zu eliminieren, oder genau zu kennen, damit sie in der Theorie berücksichtigt werden können. Auf Grund der guten Übereinstimmung zwischen unseren Messungen und der Theorie gehen wir allerdings davon aus, dass Wechselwirkungen zwischen DNA und Pore für Translokationen in Rückwärts-Richtung eher gering und somit vernachlässigbar sind.

Die Stabilität von DNA-Hairpins wurde bislang in zahlreichen Nanoporenexperimenten untersucht[135, 134, 145, 72, 71, 27, 26, 136]. In keiner Studie gelang es, ein theoretisches Modell zu etablieren, mit welchem die Translokationsdauer vorhergesagt werden kann. Wir haben mit dieser Arbeit gezeigt, dass der starke Einfluss des Vorhofs, bei Translokationen in Rückwärts-Richtung, eliminiert wird. Mit Hilfe des mesoskopischen Modells, ist es dann möglich, die Translokationsdauer von beliebigen DNA-Hairpins vorauszusagen. Die Erkenntnis, dass bei Translokationen in Rückwärts-Richtung nur die Form der Energielandschaft die Translokationsdauer bestimmt, ist grundlegend für alle weiteren kraftspektroskopische Messungen an komplizierteren Systemen.

Kapitel 4

Ausblick

4.1 Aptamer-Target-Bindung

Eine mögliche kommerzielle Anwendung für die Nanoporen Kraftspektroskopie könnte die Analyse von Proben mit Hilfe von Aptameren oder die Untersuchung von Aptameren selbst bieten. Hierfür stehen bereits zahlreiche Aptamere zur Verfügung [87, 122] und seit kurzem gibt es sogar ein zugelassenes Medikament auf Basis von Aptameren (Pegaptanib). Die Untersuchung neuer Aptamere wird also zunehmend wichtiger. In ersten NFS Experimenten mit dem ATP-bindenden Aptamer [46] wurden nach der Zugabe von ATP viele Translokationen beobachtet, welche deutlich länger dauerten als Translokationen in Abwesenheit von ATP. Für das Experiment wurde die Ankertechnik verwendet und das zu analysierende Hairpin durch das Aptamer ersetzt. Abbildung 4.1 zeigt die Verteilung der Translokationsspannungen bei einem Rampenexperiment. Das linke Maximum wurde ebenfalls bei Experimenten ohne die Zugabe von ATP beobachtet, wohingegen das rechte Maximum erst nach Zugabe von ATP auftrat. Vermutlich wird die Aptamerstruktur durch das Anbinden von ATP gestärkt und die Translokationen des rechten Maximums können Aptameren zugeordnet werden, welche ATP gebunden haben. Da die Maxima gut voneinander getrennt sind können die Populationen getrennt analysiert werden. Die daraus ermittelte Translokationsdauer ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Stabilität des ATP-Aptamers alleine entspricht etwa der Stabilität eines Hairpins mit sechs Basenpaaren, was zu erwarten ist, da das ATP Aptamer etwa sieben Basenpaare bilden kann, wobei zwischen den Basenpaaren auch drei ungepaarte Basen liegen (berechnet mit Nupack.org). Die Translokationsdauer ist deutlich länger für Aptamere, welche ATP gebunden haben.

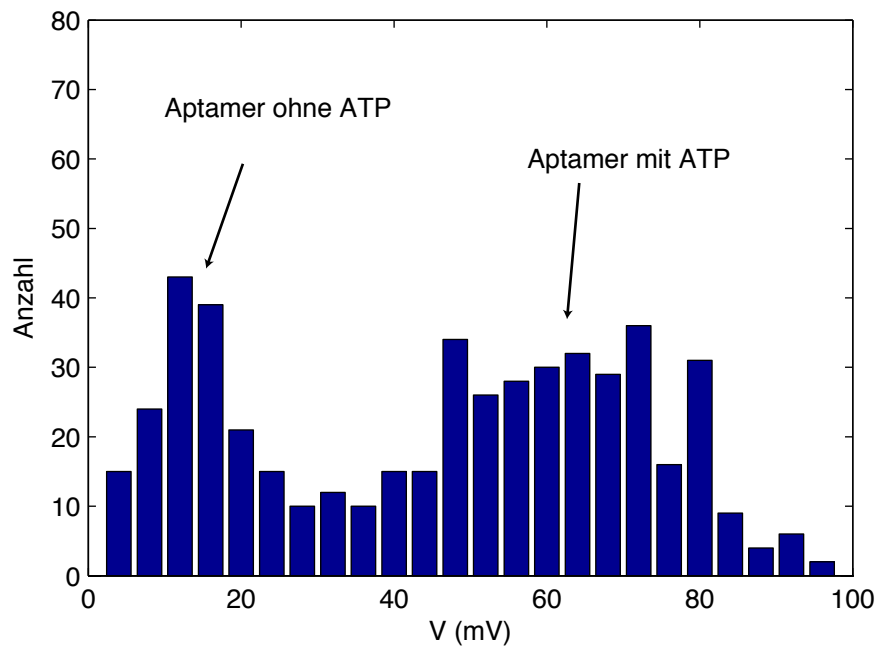


Abbildung 4.1: Ohne die Zugabe von ATP wird nur der linke Peak bei einer NFS Messung mit dem ATP bindenden Aptamer gemessen. Nach Zugabe von ATP treten vermehrt auch Translokationen mit einer viel höheren Stabilität auf (rechter Peak). Vermutlich stammen die Translokationsereignisse des rechten Peaks von Aptameren welche ATP gebunden haben. Da die Peaks von einander getrennt sind, können die Populationen getrennt und individuell ausgewertet werden.

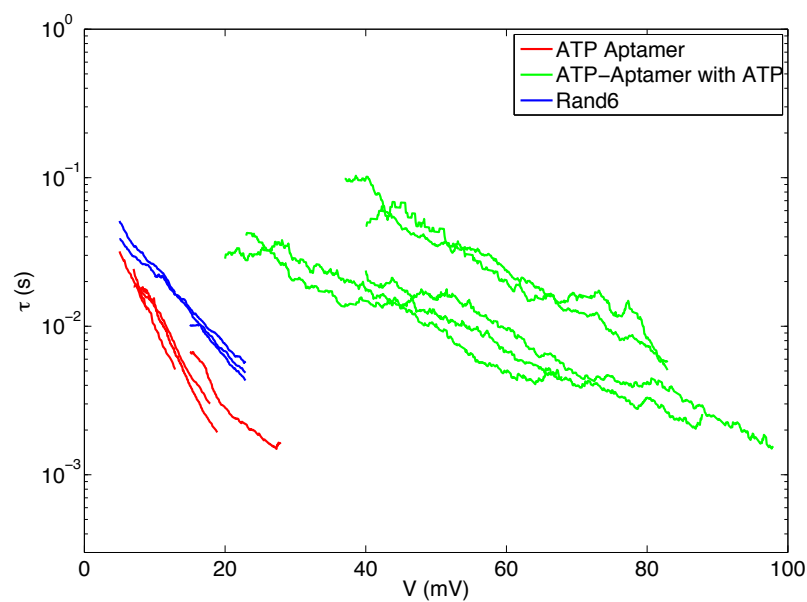


Abbildung 4.2: Wenn die Transformation aus Gleichung 3.12 auf beide Peaks aus Abbildung 4.1 separat angewendet wird, kann die Translokationsdauer des Aptamers mit angebundene ATP und des Aptamers alleine ermittelt werden. Die Daten für das Aptamer alleine (linker Peak) stimmen mit Messungen überein, bei denen kein ATP zugegeben wurde (Daten nicht gezeigt). Die Translokationsdauer des Aptamers ohne ATP entspricht etwa der Translokationsdauer eines DNA-Hairpins, welches sechs Basenpaare bildet (Rand6). Eine Stabilität in dieser Größenordnung wurde auch erwartet.

4.2 Nanoporen aus DNA-Origami

Als Vorteil der Festkörper-Nanoporen wird häufig angeführt, dass diese in verschiedenen Formen hergestellt werden können und sie somit individuell an die Bedürfnisse angepasst werden können. Diese Eigenschaft ist natürlich auch für biologische Poren wünschenswert und es gab bereits zahlreiche erfolgreiche Modifikationen von biologischen Nanoporen [97, 5, 115, 117, 116, 18, 19, 44]. Hierbei wurden allerdings immer bestehende Poren geringfügig modifiziert um sie den individuellen Bedürfnissen anzupassen. Eine sehr interessante und vielversprechende Methode, für die Herstellung von nanoskopischen Objekten, bietet DNA-Origami [99]. Durch die Konstruktion einer Nanopore auf Basis von DNA-Origami könnten sehr vielfältige und funktional modifizierte Poren schnell und einfach entwickelt werden, da es bereits Computerprogramme für das Sequenzdesign gibt [125]. Da DNA negativ geladen ist, müssen vermutlich Strategien entwickelt werden um die Poren in einer hydrophoben Lipidmembran dauerhaft verankern zu können. Hierbei könnten DNA Strängen helfen, welche mit Cholesterol oder anderen lipophilen Stoffen modifiziert wurden. In ersten Patch-Clamp-Versuchen mit den in Abbildung 4.3 gezeigten DNA-Origami-Poren wurden bereits Veränderungen der Leitfähigkeit der Lipidmembran beobachtet, welche auf die temporäre Bildung von Poren hindeuten. Die Leitfähigkeit der Poren kann etwa durch die Geometrie abgeschätzt werden. Im inneren des $l \approx 40$ nm langen sechs-Helix-Bündels befindet sich ein Kanal mit einem Radius $r \approx 1$ nm, welcher mit 1 M KCl gefüllt ist, mit einer Leitfähigkeit von $\sigma_{KCl} \approx 120$ mS/cm. Daraus kann die Leitfähigkeit des Kanals mit $\sigma = \sigma_{KCl} \cdot r^2 \pi / d \approx 1$ nS abgeschätzt werden. Damit wäre ein Stromfluss von $I \approx 120$ pA bei der angelegten Spannung von $V = 120$ mV zu erwarten, was gut zu den Experimenten passt.

In weiteren Experimenten könnte eine reproduzierbare Inkorporation dieser Poren erreicht werden. Anschließend könnten diese Poren einfach modifiziert werden, beispielsweise durch ein Aptamer welches sich in der Pore befindet. Das Binden des Analyten müsste dann durch eine Veränderung der Leitfähigkeit detektierbar sein.

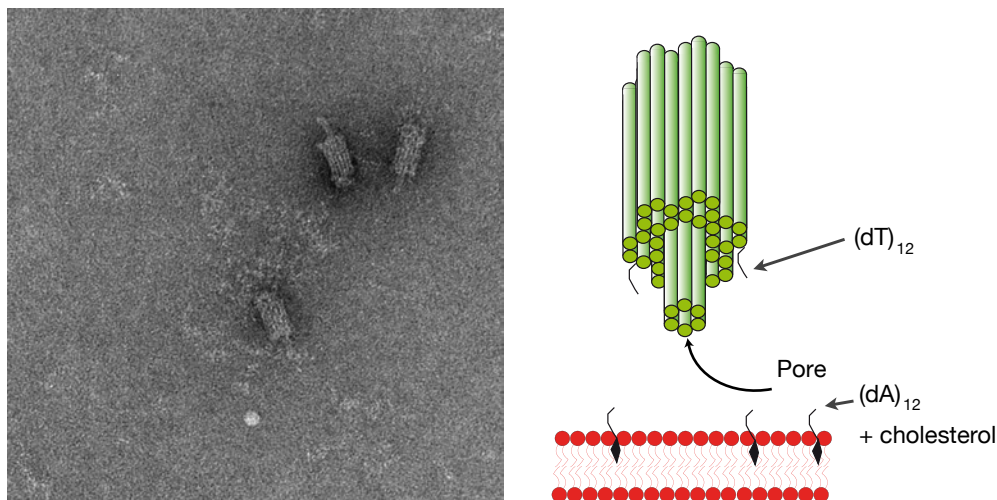


Abbildung 4.3: Als Vorteil der Festkörper Nanoporen wird häufig angeführt, dass diese in verschiedenen Formen hergestellt werden und somit individuell angepasst werden können. Durch die Konstruktion einer Nanopore auf Basis von DNA-Origami könnte dieses Ziel viel einfacher und effizienter erreicht werden. Es könnten auch sehr einfach funktionale Modifikationen an verschiedenen Stellen angebracht werden. Das Bild (rechts) zeigt schematisch die Strategie unserer ersten Experimente in diese Richtung. Die konstruierte Pore besteht aus mehreren sechs-Helix-Bündeln, von denen eines verlängert wurde um die eigentliche Pore durch die Lipidmembran zu bilden (Anzahl der Bündel und Größenverhältnisse für Schema verändert). Mit Hilfe von kuren DNA-Strängen, welche mit Cholesterol modifiziert wurden, soll die Origami-Pore fest in der Lipidmembran verankert werden. Das TEM (Transmissionselektronenmikroskop) Bild zeigt drei gefaltete Origami-Poren.

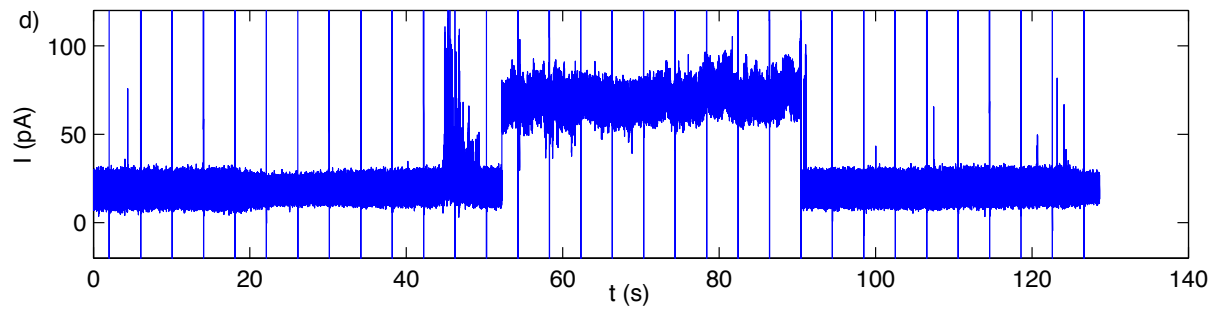
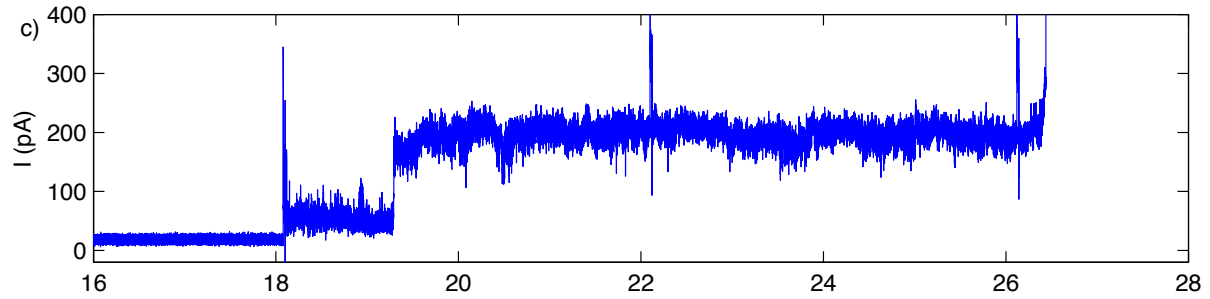
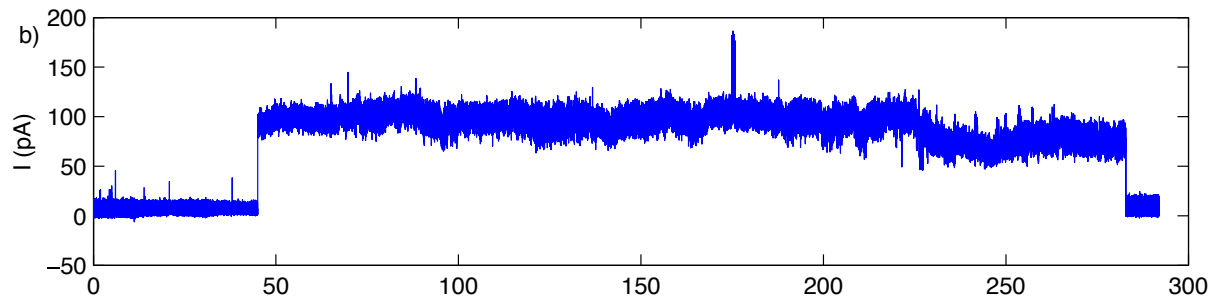
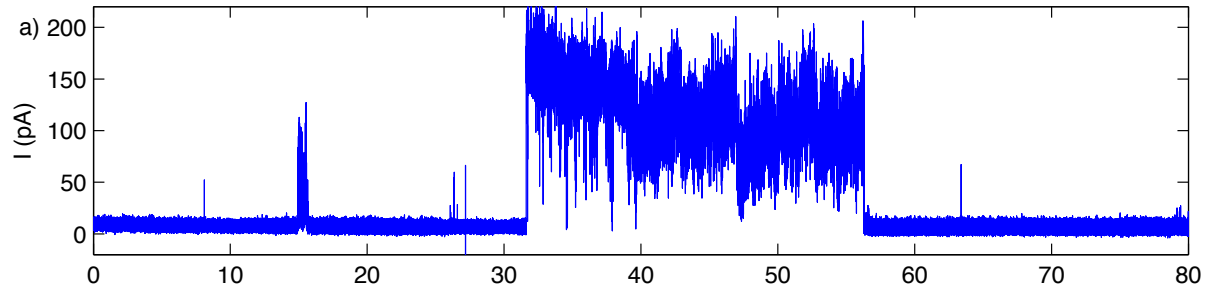


Abbildung 4.4: In ersten Messungen mit Origami Nanoporen wurden Änderungen im Stromverlauf beobachtet welche durch den Einbau von Poren erklärt werden können. In a), b) und d) ist eine sprunghafte Änderung der Leitfähigkeit zu erkennen. Nach einigen Sekunden fällt der Stromfluss wieder zurück auf den ursprünglichen Wert. Es ist davon auszugehen, dass es sich um ein einziges Loch in der Membran handelt, da die Änderung in einem Schritt geschehen, also quantisiert, ist. Bei der Elektroporation einer Membran können solche Änderungen ebenfalls beobachtet werden, allerdings haben diese eine Dauer von nur wenigen Millisekunden. Die Leitfähigkeit von etwa 100 pA könnte durch eine Pore der Größe eines sechs-Helix-Bündels verursacht worden sein. In d) wurden zu einer konstanten Spannung kurze Spannungspulse (senkrechte Striche) angelegt.

4.3 NFS an RNA Strukturen

Es gibt wenige Beispiele von Nanoporenexperimenten, welche mit RNA durchgeführt wurden[50, 63, 17, 53], obwohl sich Nanoporen durchaus für die Untersuchung von RNA Sekundärstrukturen eignen (vgl. Abb.4.5). In ersten Experimenten wurde beispielsweise ein 9 Basenpaare langes RNA-Hairpin mit einer 40 Basen langen Einfädelsequenz durch Transkription hergestellt. Erste Kraftspektroskopie Versuche wurden in Vorwärts-Richtung durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass die Translokationsdauer dieses 9 Basenpaare langen RNA-Hairpins etwa zehnmal so lange dauert, wie die Translokation eines 12 Basenpaar langen DNA-Hairpins, obwohl die Experimente mit RNA bei einer höheren Temperatur durchgeführt wurden.

Interessant wäre es, einige Versuche in Rückwärts-Richtung durchzuführen um die Parameter k_0 und Q_{eff} von RNA zu erhalten und mit den Werten der DNA zu vergleichen. Ebenso gibt es eine Vielzahl an RNA Aptameren, welche mit Nanoporen untersucht werden könnten. Ein interessantes Aptamer ist beispielsweise das Malachitgrün-bindende Aptamer[8]. Dieses Aptamer ermöglicht, durch Anbinden, die Fluoreszenz von Malachitgrün. Als erstes NFS-Experiment wurde dieses Aptamer hergestellt und Kraftspektroskopisch untersucht. Leider konnte eine Änderung der Translokationsdauer in Anwesenheit von Malachitgrün in ersten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Diese Versuche wurden allerdings nur in die Vorwärts-Richtung durchgeführt. Bei Kraftspektroskopie in Rückwärts-Richtung werden durch den wegfallenden Einfluss des Vorhofs generell kleinere Kräfte benötigt und es ist vorstellbar, dass dabei die Bindung des Aptamers an das Target gemessen werden kann.

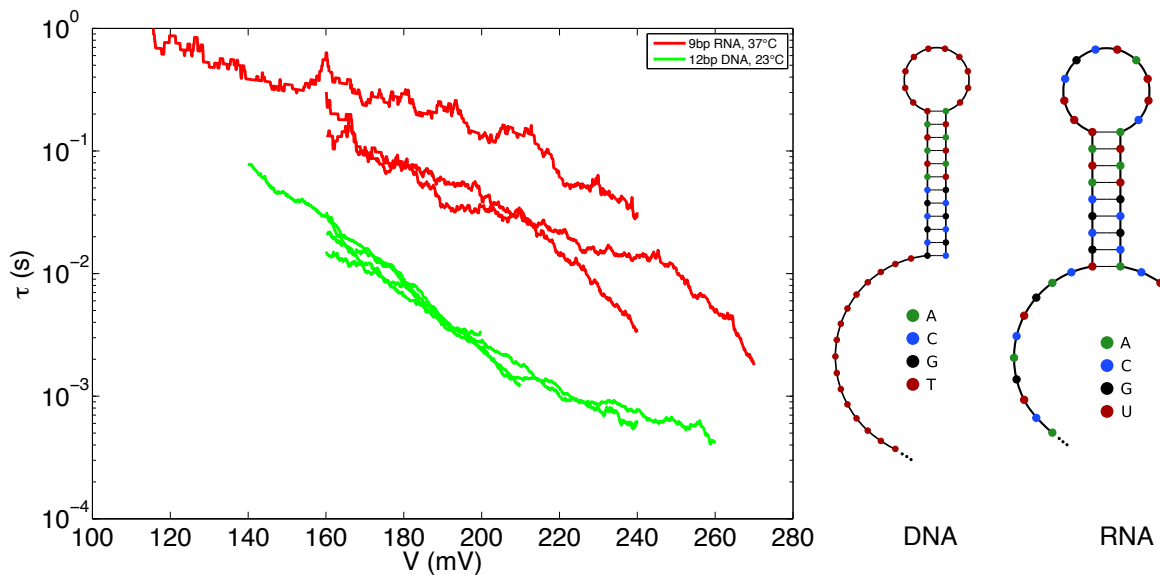


Abbildung 4.5: In ersten Experimenten mit RNA wurde in Vorwärts-Richtung eine sehr hohe Stabilität gefunden. Es wurde eine um den Faktor 50 längere Translokationsdauer im Vergleich zu einem DNA-Hairpin (GC6AT6) gemessen, obwohl das RNA-Hairpin kürzer ist und das Experiment bei einer höheren Temperatur ausgeführt wurde. Die Faltungsenergie ist für RNA im allgemeinen höher und wird auch so in thermodynamischen Tabellen angegeben. Die effektive Ladung zwischen DNA und RNA unterscheidet sich vermutlich wenig, da der Kurvenverlauf von DNA und RNA parallel ist. Also könnte RNA ein niedrigeres k_0 besitzen. Dies zu untersuchen wäre sehr interessant und könnte durch wenige Experimente in Rückwärts-Richtung erreicht werden. Die Darstellung der Hairpins wurde mit NUPACK[133] erzeugt.

4.4 Experimente mit chipbasierten Plattformen

In Zusammenarbeit mit der Nanion Technologies GmbH[126] konnte im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden, dass Kraftspektroskopie-Experimente auch auf einer chipbasierten Plattform durchgeführt werden können. Hierbei wird eine Lipidmembran durch Ruptur eines Vesikels (GUV, giant unilamellar vesicle) über einem dünnen Loch in einer Glasplatte erzeugt[109]. Durch den Herstellungsprozess der GUVs mittels der electrosweeling Methode[25] befinden sich keine Lösungsmittel in der Lipidmembran, im Gegensatz zu den DIB Membranen. In zahlreichen Versuchen wurde gezeigt, dass α -HL in Lösungsmittelfreien Lipidmembranen nicht in ausreichender Reproduzierbarkeit inkorporiert werden kann. Häufig wurde zwar Kanalaktivität beobachtet, allerdings wurde nur äußerst selten eine über mehrere Sekunden andauernde konstante Leitfähigkeit beobachtet. Durch die zusätzliche Zugabe von Lösungsmitteln (Hexadekan oder Oktan) in Form von mikroskopisch kleinen Tröpfchen konnte der Lipidmembran Lösungsmittel zugeführt (vgl. Abb.4.6) werden und es wurden zahlreiche stabile Inkorporationen von α -HL beobachtet. Im Rah-

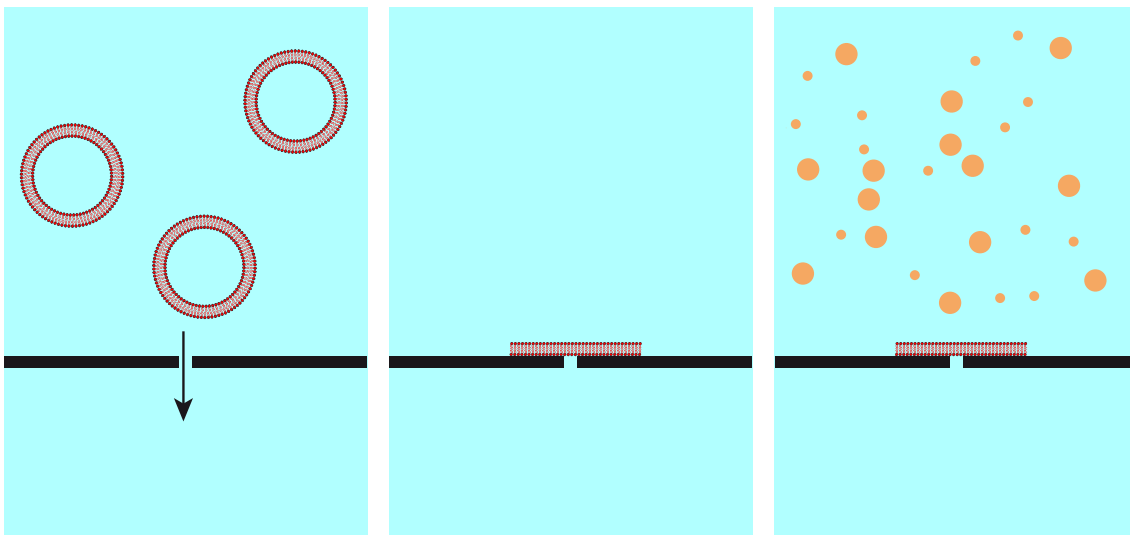


Abbildung 4.6: In vielen Experimenten wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von Lösungsmitteln in der Membran für die Inkorporation von α -HL essentiell ist (es werden keine Daten dazu gezeigt). Da bei Verwendung des chipbasierten Systems von Nanion die Membran durch Ruptur von Vesikeln hergestellt wird, muss das Lösungsmittel nachträglich in Form von mikroskopisch kleinen Öltröpfchen zugeführt werden. Dadurch konnte α -HL auf dem Chip inkorporiert werden und erste NFS Experimente durchgeführt werden. Bei natürlichen Membranen wird die Inkorporation von α -HL auch durch Oberflächenproteine beeinflusst. Besonders gut inkorporiert sich α -HL interessanterweise in rote Blutkörperchen von Hasenblut[31].

men einer Bachelorarbeit von Karl-Philipp Kunze konnten durch ein weiterentwickeltes Protokoll einzelne α -HL Poren auf dem Chip inkorporiert werden und Kraftspektroskopiemessungen als Demonstrationsversuche durchgeführt werden (vgl. Abb.4.7). Unter anderem wurde dabei die Translokationsdauer von mehr als 1200 GC6AT6 Hairpins mit Verwendung der Ankertechnik und einer Spannungsrampe von 1 V/s gemessen. Wie erwartet, wurde dieselbe Translokationsdauer wie mit dem DIB-Aufbau gemessen. Durch diesen Erfolg motiviert könnten weitere Messungen mit dem Chip-basierten Systems durchgeführt werden, da dieses System einige Vorzüge gegenüber dem bisher verwendeten DIB Aufbau bietet:

- Leicht zu erlernende Handhabung
- Zeitersparnis durch die Verwendung eines Einwegprodukts
- Möglichkeit der Automatisierung
- Möglichkeit der Parallelisierung
- Verbessertes Signal zu Rauschen Verhältnis
- Kein Leckstrom durch das Lipid-Öl Bad
- Austauschbarkeit der Elektrolytflüssigkeit

Dadurch könnten interessante Experimente durchgeführt werden, welche mit dem DIB Aufbau nicht möglich sind. Beispielsweise könnte durch das Fehlen des Leckstroms eine Sequenzabhängige Restleitfähigkeit der Pore gemessen werden. Dabei müsste beispielsweise zwischen einer poly(dT) und einer poly(dC) Sequenz unterschieden werden können. Dadurch könnten verschiedene Positionen der DNA innerhalb der Pore detektiert werden (vgl. Abb.4.8), was wiederum die Analyse von komplexeren Strukturen, wie beispielsweise Ribozymen ermöglichen würde. Des weiteren könnte eine chipbasierte Plattform hinsichtlich kommerziellen Interessen etabliert werden. Interessante Anwendungen könnten hierbei die Untersuchung von Aptameren oder eventuell auch DNA Sequenzierung sein.

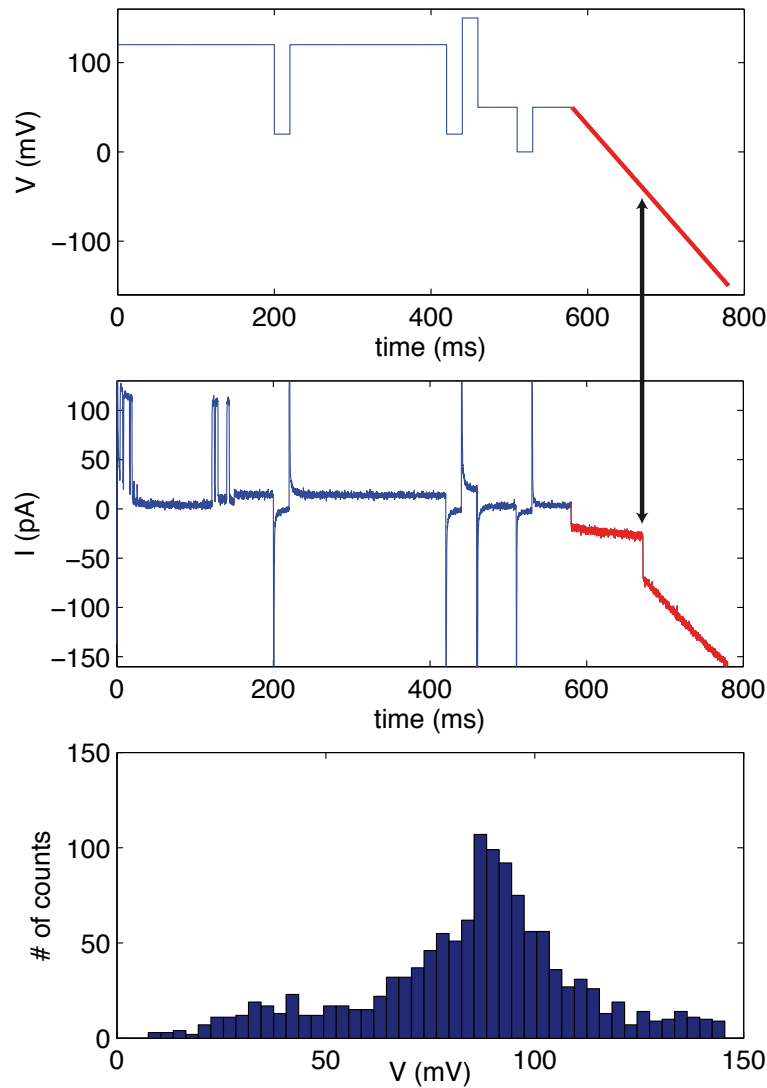


Abbildung 4.7: In ersten Experimenten konnte Kraftspektroskopie mit Hilfe der Anker-technik mit dem Chip durchgeführt werden. Das Spannungsprotokoll (oben) enthielt zwei 120 mV Pulse für das Einfangen der DNA, gefolgt von einem höheren Puls, um das Hairpin (GC6AT6) zu öffnen und auf die Trans-Seite zu bringen. Nach einer kurzen Zeit für die Neubildung des Hairpins wurde die Spannung kurz auf 0 mV gesenkt um die DNA Moleküle entkommen zu lassen bei welchen das Öffnen der Hairpins durch den hohen Spannungspuls nicht funktioniert hat. Um zu kontrollieren, ob die DNA sich noch in der Pore befindet und somit die Spannung zum Öffnen des Hairpins ausreichend war, wurde die Spannung erneut erhöht und anschließend die Rampe (rot) gestartet. Der Stromverlauf (Mitte) zeigt klar den Austritt der DNA (Pfeil) und die Translokationsspannung kann ermittelt werden (Pfeil). Das Histogramm über mehr als 1000 ermittelte Translokationsspannungen stimmt mit Messungen mit dem DIB Aufbau überein.

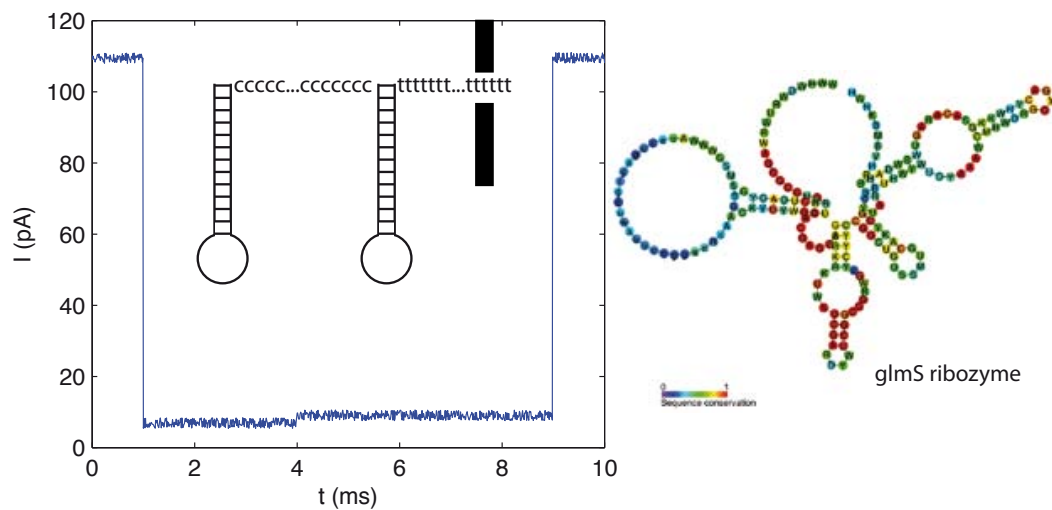


Abbildung 4.8: Die Eigenschaft, dass unterschiedliche Nukleotide den Stromfluss unterschiedlich stark reduzieren ist nicht nur für die Sequenzierung interessant. Es bietet sich dadurch auch die Möglichkeit, die Position der DNA innerhalb der Pore zu messen. Bei einer konstanten Spannung müsste der Stromfluss bei der Translokation eine Stufe aufweisen, wenn eine Struktur mit zwei Hairpins und einer poly(dC) Sequenz dazwischen und einer poly(dT) Einfädelsequenz verwendet wird. Dieses Konzept könnte bei der Untersuchung von komplizierteren Strukturen von großem Nutzen sein. Für diese Messungen ist es von Vorteil, einen Chipaufbau mit einem niedrigen Leckstrom zu verwenden. (Bildquelle GlmS ribozyme: [128])

Anhang A

Schaltpläne für die Hardware

Für den Aufbau mussten zahlreiche Geräte miteinander verbunden und synchronisiert werden. Gleichzeitig musste dafür Sorge getragen werden, dass keine Masseschleifen oder elektromagnetische Strahlung die Messungen beeinflussen. Dies wurde größtenteils durch die Verwendung von Optokopplern erreicht. Der Aufbau umfasst folgende Geräte, welche nicht direkt mit dem eigentlichen Experiment in Kontakt stehen und diese beeinflussen:

- Wasserbad für die Kühlung des Faraday-Käfigs. (Verursacht mechanische Schwingungen)
- Mikroskop mit Beleuchtung und Kamera. (wird während der Messung ausgeschaltet)
- Roboterarm mit Mikropipette. (wird während der Messung ausgeschaltet)

Alle anderen Geräte und deren Verbindungen sind in Abbildung A.1 dargestellt. Ein Schaltplan des verwendeten Optokopplers ist in A.2 dargestellt.

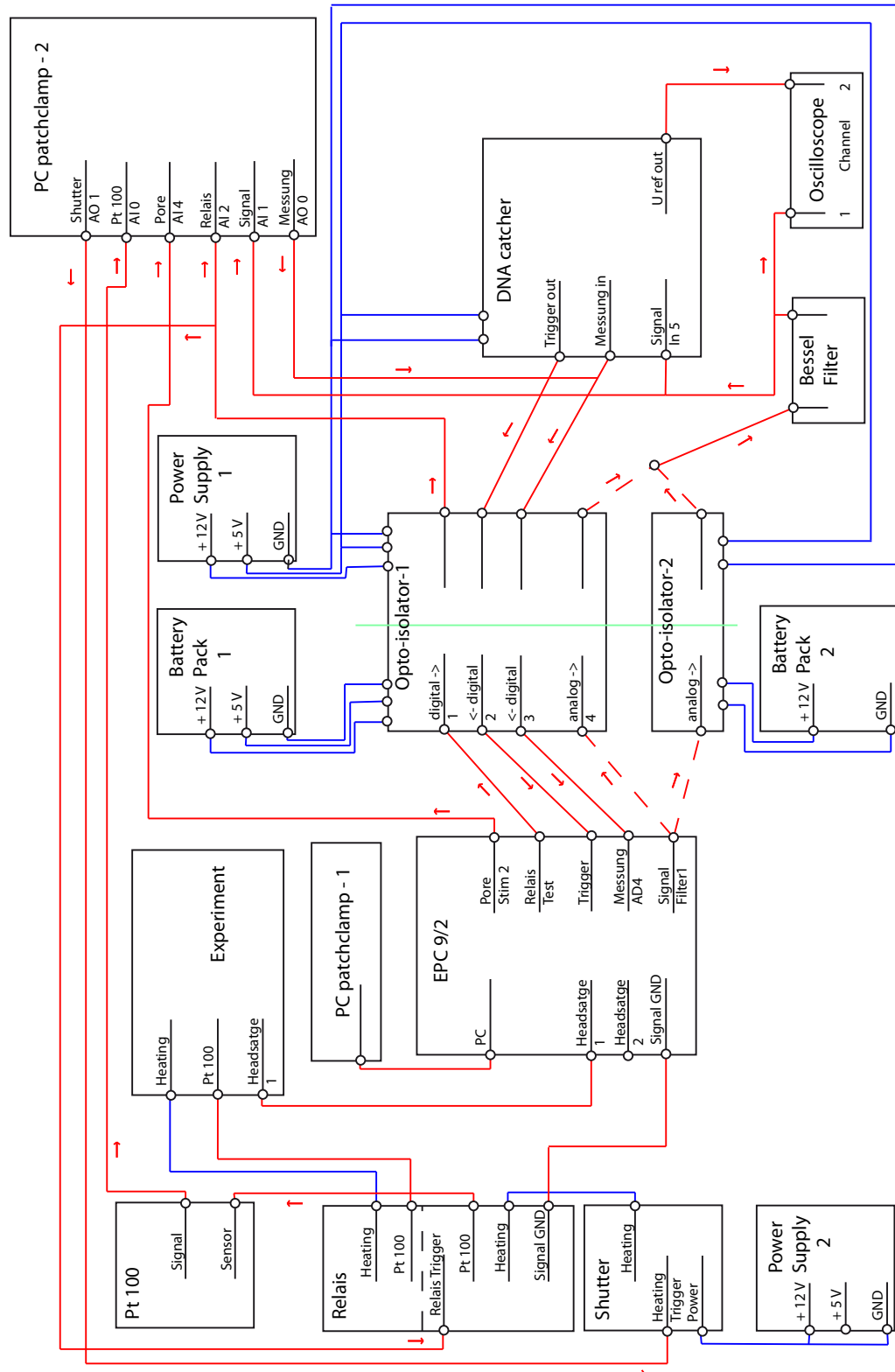


Abbildung A.1: Alle Datenleitungen sind in rot dargestellt und der Informationsfluss mit Pfeilen gekennzeichnet. Leitungen für die Stromversorgung sind in blau dargestellt. Alle Geräte ohne blaue Leitungen verfügen über eine eigene 220 V Stromversorgung (bis auf "Experiment"). Das Experiment besitzt drei Anschlüsse für Headstage, Temperaturmessung und Heizung, wobei die letzten beiden Anschlüsse während der Messung kurzzeitig über das Relais auf Massepotential gelegt wurden, um dadurch verursachtes Rauschen zu vermeiden. Der Patch-Clamp-Verstärker und zugehörige PC wurden von allen anderen Geräten über die Optokoppler abgetrennt, wobei die Stromversorgung der Optokoppler auf der Seite des Patch-Clamp-Verstärkers durch Akkus erfolgte und somit keine Störungen erzeugte. Die Leitung "Pore Stim 2" ist als einzige nicht optisch abgekoppelt und wurde während sensitiven Experimenten abgesteckt. Diese Leitung ermöglicht es, über das Patch-Clamp Programm direkt Informationen an den zweiten PC zu senden und wurde häufig dazu verwendet, den erfolgreichen Einbau einer Pore oder Störungen während des Experiments akustisch zu signalisieren. Der Bessel-Filter, das Oszilloskop und der "DNA catcher" werden bei Verwendung der Ankertechnik nicht benötigt. Ebenso wird der zweite Optokoppler nur benötigt, wenn DNA bei einer Translokation in die Rückwärts-Richtung mit Hilfe der externen Elektronik gefangen werden soll. Die Temperatur wurde durch den zweiten PC mit Hilfe eines in LabView programmierten PID Regelkreises gesteuert. Die Heizleistung wurde über die Dauer von Strompulsen durch die Heizwiderstände mit Hilfe des Shutter geregelt. Diese Standardkombination der Geräte wurde für die Messung der Inkorporationswahrscheinlichkeiten und für Spektrumsanalysen leicht modifiziert.

Analoger Optokoppler mit HCNR201

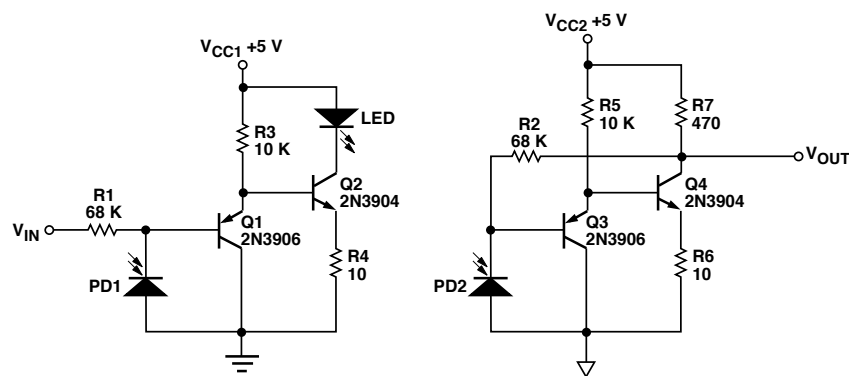


Abbildung A.2: Um den Patch-Clamp-Verstärker von externen Rauschquellen abzutrennen wurden analoge und digitale Optokoppler verwendet. Das Schaltbild zeigt den verwendeten analogen Optokoppler, welcher eine Bandbreite von fast 1 MHz hat. Als digitale Optokoppler wurden der IC 6N137 verwendet.

Anhang B

Software

Zur Analyse der Daten wurde eine spezielle Software in Matlab entwickelt. Dadurch konnte eine schnelle, einfache und standardisierte Analyse der Daten erreicht werden. Außerdem wurden die Daten automatisch in einem definierten Format gespeichert, was die spätere Analyse und den Vergleich zwischen verschiedenen Experimenten erleichtert. Durch objektorientierte Programmierung konnten alle Methoden und Datentypen exakt definiert werden. Eine Übersicht über die verwendeten Klassen ist in Abbildung B.1 gegeben. Die Prozedur der Auswertung eines Experiments ist in Abschnitt 2.5 erläutert. Die dabei erwähnte automatische Detektion der Translokationen wird in Abbildung B.2, B.3 und B.4 vorgestellt.

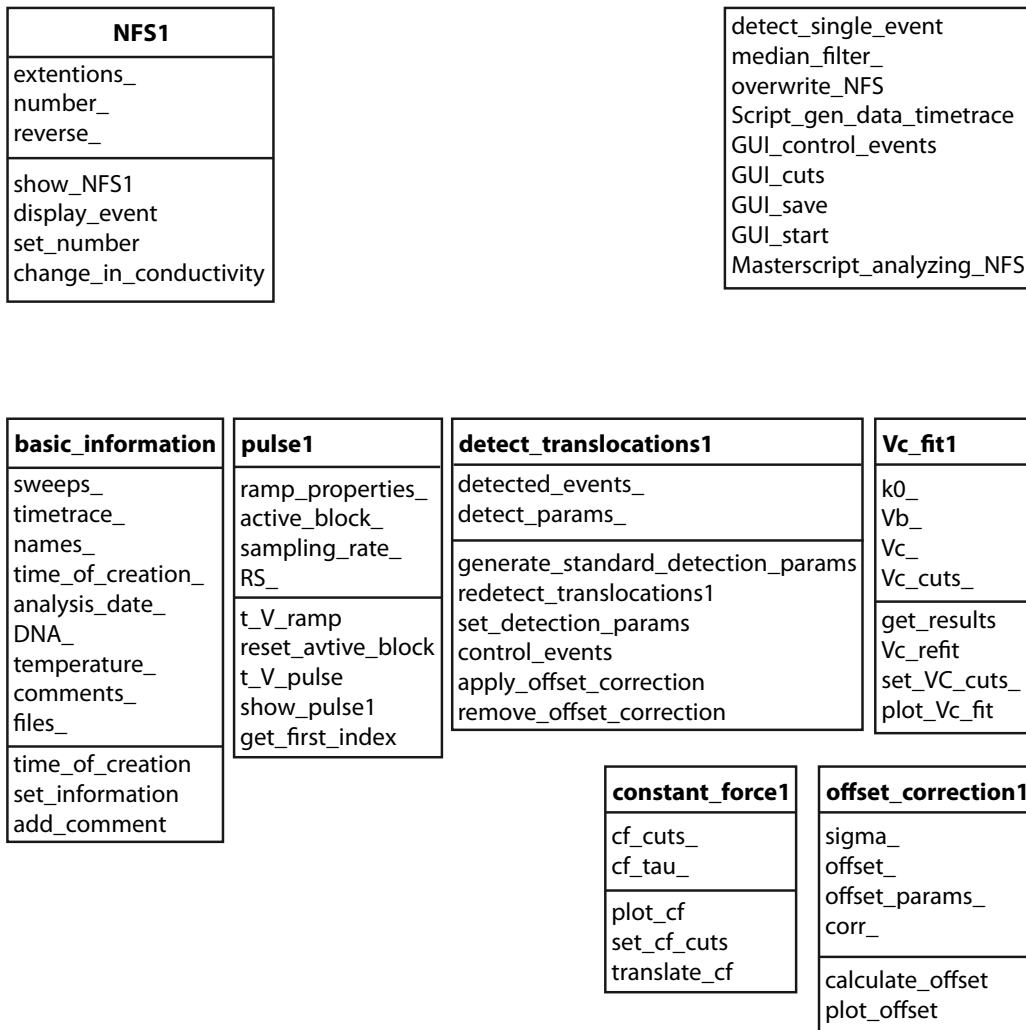


Abbildung B.1: Für die Analyse wurden sechs Basis-Klassen und die Superklasse NFS1 verwendet. Für jedes Experiment wurde eine Instanz dieser Klasse erzeugt, wodurch die Speicherung der Daten fest definiert wurde. In diesem Klassendiagramm ist der Name der Klasse jeweils fettgedruckt. Darunter aufgelistet sind die jeweiligen Attribute und darunter die Methoden. Einige Funktionen sind keiner Klasse zugeordnet und oben rechts aufgelistet.

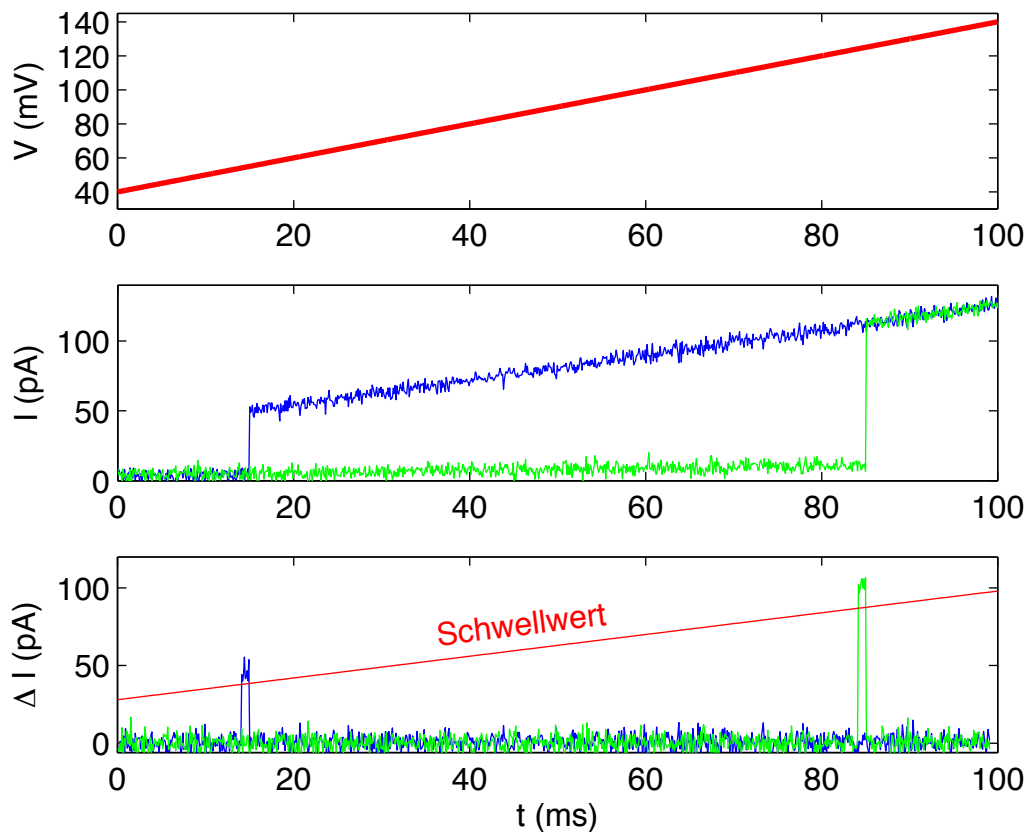


Abbildung B.2: Zunächst wurden die Krafttrampen-Experimente mit Hilfe der externen Elektronik durchgeführt. Da DNA bei niedrigen Spannungen schnell aus der Pore entkommen kann, wurden die Spannungsrampen in der Regel bei 40 mV gestartet. Die typische Translokationsspannung liegt bei diesen Experimenten durch den Einfluss des Vorhofs bei höheren Spannungen und die Translokation kann als Stufe in der Stromkurve einfach detektiert werden. Hierzu wurden die Messdaten numerisch abgeleitet (unten) und Punkte identifiziert welche über einem spannungsabhängigen Schwellwert lagen. Exemplarisch wurden zwei Translokationsereignisse (grün und blau) simuliert. Diese Methode ist sehr schnell, aber nicht für Translokationen bei niedrigen Spannungen geeignet, da hier der Schwellwert alleine durch das Rauschen überschritten wird. Die Verwendung der Ableitung der Daten eliminierte den Stromfluss durch das Lipid-Öl Bad, welcher sich im Verlauf eines Experiments deutlich verändern konnte.

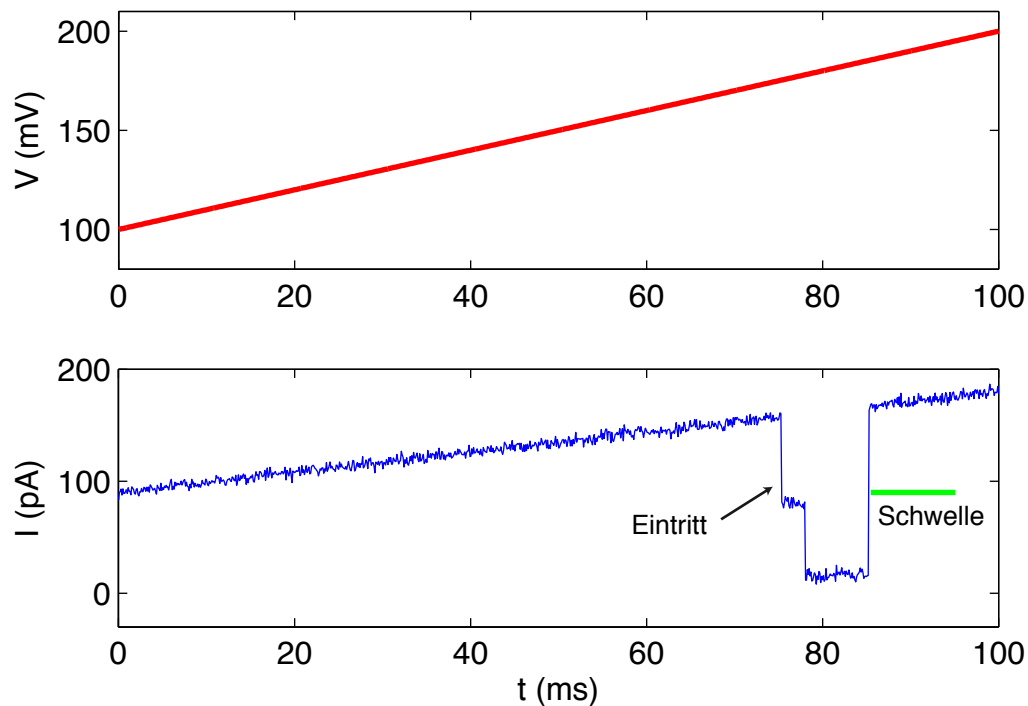


Abbildung B.3: Häufig traten Translokationen bei höheren Spannungen auf, bei denen die DNA sich nicht von Beginn der Rampe an in der Pore befand. Diese Translokationen mussten von dem Analyseprogramm erkannt werden. Da der Eintritt der DNA auch häufig über Stufen erfolgt, wurde nach der Detektion der Translokation (vgl. Abb.B.2) als einfaches Kriterium ein Schwellwert bestimmt welcher exakt zwischen dem Stromniveau vor und nach der Translokation lag. Wenn es vor der eigentlichen Translokation einen Stromwert oberhalb der Schwelle gab wurde die Messkurve verworfen. Erstaunlicherweise funktionierte dieses Kriterium sehr gut, da die Translokationsdauer bei hohen Spannungen in der Regel sehr kurz ist und bei niedrigen Spannungen nur sehr selten eine DNA während der Rampe in die Pore gelangte. (Daten simuliert).

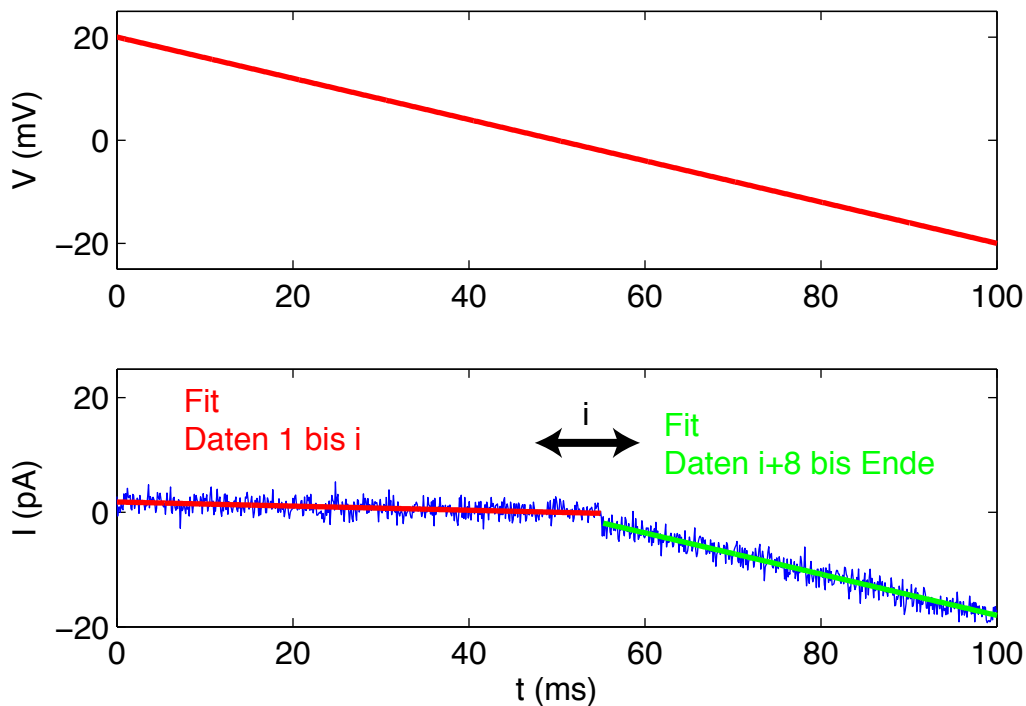


Abbildung B.4: Durch Verwendung der Ankertechnik traten die Translokationen vermehrt auch bei niedrigen Spannungen auf und die normale Methode der Detektion musste erweitert werden. Dafür wurden die Daten von Beginn der Rampe bis zu einem Punkt “i” linear gefittet. Ebenso von dem Datenpunkt “i+8” bis zum Ende der Rampe. Wenn die Standardabweichung für beide Fits minimal ist, liegt der Punkt “i” bei der Translokation. Da diese Methode sehr rechenintensiv und somit langsam ist, wurde zunächst bei höheren Spannungen mit der vorher beschriebenen Methode nach einer Translokation gesucht. Falls keine Translokation gefunden wurde, wurde der Spannungsbereich von ± 20 mV näher untersucht. Zunächst wurde der Punkt “i” in einem groben Raster bewegt, welches immer weiter verfeinert wurde um möglichst schnell die Translokation zu finden. Falls keine DNA gefangen wurde, wurde mit dieser Methode ein Punkt mit besonders starkem Rauschen identifiziert. Diese Messungen wurden durch den Vergleich der Steigung des Stroms vor und nach der vermeintlichen Translokation aussortiert. Auf Grund der Leitfähigkeit des Lipid-Öl Bads gab es zusätzlich einen exponentiell abklingenden Stromverlauf, welcher die Messung überlagert. Wenn die Rampe erst nach einigen Millisekunden den Spannungsbereich von ± 20 mV erreichte, war dieser Effekt in der Regel schon abgeklungen. In manchen Experimenten war dieser Effekt allerdings so stark, dass für den Fit jeweils ein Polynom zweiten Grades verwendet werden musste. (Daten simuliert)

Anhang C

Sequenzen der verwendeten DNA

In Tabelle C.1 sind die DNA Sequenzen aufgelistet welche in dieser Arbeit erwähnt werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden für einen G-Quadruplex häufig die Abkürzung “Q“ verwendet, wenn er bei der verwendeten Sequenz als Anker dient (*GTTGGTGTGGTTGG*). Ebenso wurde die Abkürzung “GC12“ für eine Ankersequenz aus einem stabilen Hairpin gewählt (*GGCGCCGCGGCCTTTTGGCCGCGGCGCC*). Alle DNA Sequenzen beginnen mit dem 5' Ende.

Tabelle C.1: Verwendete DNA Sequenzen

| Name | Sequenz |
|----------------|--|
| T50-HP | (dT) ₅₀ - <u>GCTCTGTGTCTCTCTCGACACAGAGC</u> |
| T50-Q | (dT) ₅₀ - <u>GTTGGTGTGGTTGG</u> |
| A50-Q | (dA) ₅₀ - <u>GTTGGTGTGGTTGG</u> |
| Q-A50 | <u>GTTGGTGTGGTTGG</u> - (dA) ₅₀ |
| Q-C50 | <u>GTTGGTGTGGTTGG</u> - (dC) ₅₀ |
| Q-T50 | <u>GTTGGTGTGGTTGG</u> - (dT) ₅₀ |
| AT6GC6 | (dT) ₅₀ - <u>TATATATGCGCGCTTTTTTTTTTGGCGGCATATAT</u> |
| GC6AT6 | (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCATATATTTTTTTTTATATATGCGCGC</u> |
| GC6AT6-T6 | (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCATATATTTTTTTTTATATATGCGCGC TTTTT</u> |
| GC12 | (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCGCGCGCTTTTTTTTTTGGCGCGCGCGC</u> |
| GC12-T6 | (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCGCGCGCTTTTTTTTTTGGCGCGCGCGC TTTTT</u> |
| AT12 | (dT) ₅₀ - <u>ATATATATATTTTTTTTTATATATATATAT</u> |
| GC12rand | (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCGCGCGCTTTTTTTTTTGGCGCGCGCGC</u> |
| Q-GC4AT4 | Q - (dT) ₅₀ - <u>GCGCATATTTTTTTTTATATGCGC</u> - (dT) ₃₀ |
| Q-GC8 | Q - (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCGCTTTTTTTTTGGCGCGC</u> - (dT) ₃₀ |
| Q-GC12 | Q - (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCGCGCGCTTTTTTTTTGGCGCGCGCGC</u> - (dT) ₃₀ |
| Q-GC6AT6 | Q - (dT) ₅₀ - <u>GCGCGCATATATTTTTTTTTATATATGCGCGC</u> - (dT) ₃₀ |
| Q-AT6 | Q - (dT) ₅₀ - <u>ATAATTTTTTTTTTAAATTAT</u> - (dT) ₂₉ |
| Q-AT8 | Q - (dT) ₅₀ - <u>ATATAATTTTTTTTTTAAATTATAT</u> - (dT) ₃₀ |
| Q-AT16 | Q - (dT) ₅₀ - <u>ATATAATTATATAATTTTTTTTTTAAATTATATAATTATAT</u> - (dT) ₂₉ |
| GC12-AT6 | <u>GCGCGCGCGCGCTTTTTGGCGCGCGCGC</u> - (dT) ₅₀ - <u>ATAATTTTTTTTTTAAATTAT</u> - (dT) ₂₉ |
| GC12-GC4AT4 | GC12(s.o.) - (dT) ₅₀ - <u>GCGCATATTTTTTTTTATATGCGC</u> - (dT) ₃₀ |
| GC12-AT4GC4 | GC12(s.o.) - (dT) ₅₀ - <u>ATATGCGCTTTTTTTTTGCGCATAT</u> - (dT) ₃₀ |
| Q-AT4GC4 | Q - (dT) ₅₀ - <u>ATATGCGCTTTTTTTTTGCGCATAT</u> - (dT) ₃₀ |
| rand6 | GC12(s.o.) - (dT) ₅₀ - <u>AATCTGTTTTTTTTTCAGATT</u> - (dT) ₃₀ |
| rand7 | GC12(s.o.) - (dT) ₅₀ - <u>TGAATGATTTTTTTTTTCATTCA</u> - (dT) ₃₀ |
| rand8 | GC12(s.o.) - (dT) ₅₀ - <u>CTAGCATCTTTTTTTTTGATGCTAG</u> - (dT) ₃₀ |
| rand8* | GC12(s.o.) - (dT) ₅₀ - <u>CTAGCATCTTTTTTTTTGATGCAAG</u> - (dT) ₃₀ |
| ATP | GC12(s.o.) - (dT) ₅₀ - <u>CCTGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG</u> - (dT) ₃₀ |
| RNA HP Templat | <u>AGTGCGCATATGAATAGCGAAATATGCG</u> - d(CAGT) ₁₀ - <u>CCCTATAGTGAGTCGTATTA</u> |
| MG Templat | <u>GGATCCATTCTGCTCTCGCCAGTCGGGATCC</u> - d(CAGT) ₁₀ - <u>CCCTATAGTGAGTCGTATTA</u> |

Anhang D

Qualität der α -HL Poren

Der große Vorteil von Proteinporen ist ihre fest definierte Struktur im Vergleich zu Poren in Festkörpern. Jedoch unterliegen die Proteine auch Abbauprozessen und zeigen gelegentlich abweichendes Verhalten. Ebenso ist es möglich, dass die Proteinprobe verunreinigt ist und deshalb andere Poren gebildet werden. Bei Verwendung des DIB-Aufbaus sind Poren mit einem falschen Verhalten nicht sehr problematisch, denn die Membran kann innerhalb weniger Sekunden neu geformt werden und durch die spannungsgesteuerte Inkorporation kann schnell eine neue Pore hergestellt werden.

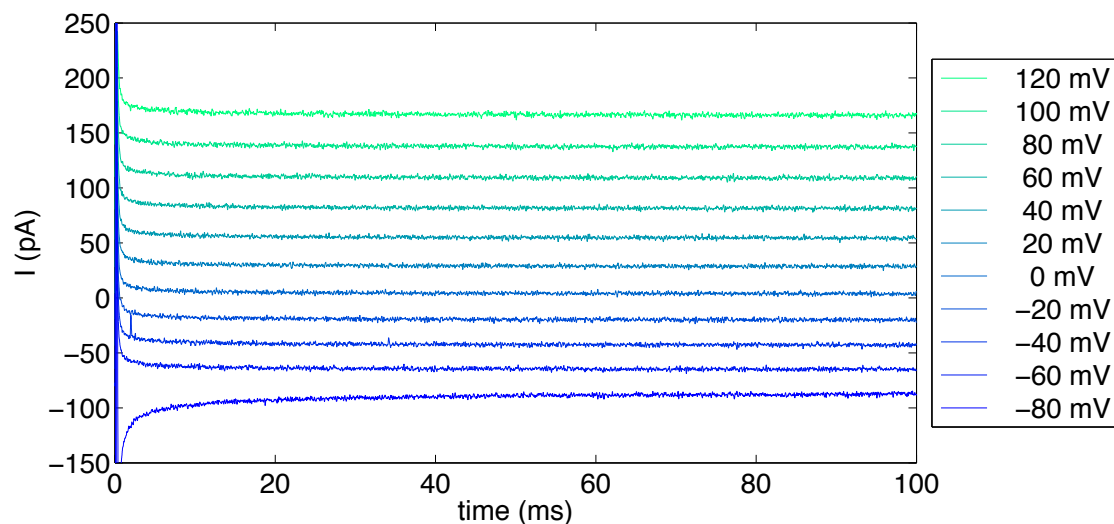


Abbildung D.1: Der Stromfluss durch eine Pore wurde bei verschiedenen Spannungen gemessen. Eine für NFS geeignete Pore zeigt ein geringes Rauschen und einen konstanten Stromfluss.

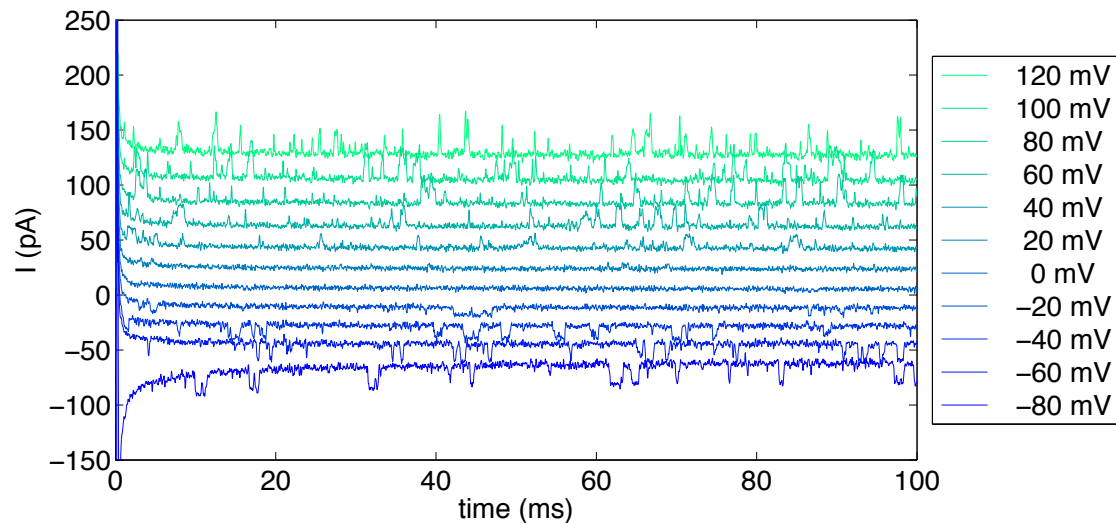


Abbildung D.2: Hier wurde der Strom durch eine Pore gemessen welche nicht für NFS geeignet ist. Ein ähnliches Verhalten kann bei etwa 10% der Poren beobachtet werden und ist abhängig von der Bezugsquelle der Proteine.

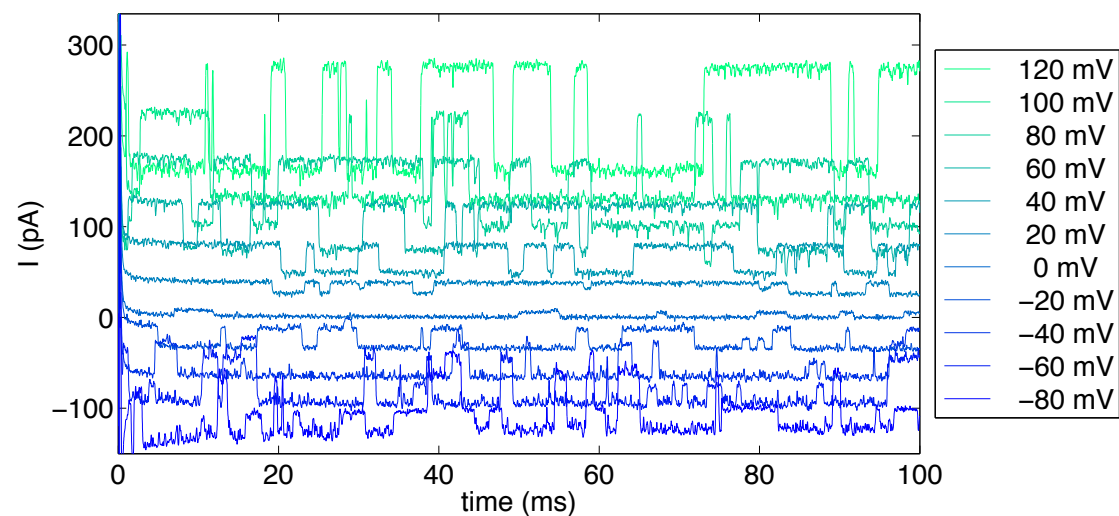


Abbildung D.3: Ein schnelles Schalten zwischen zwei unterschiedlichen Niveaus der Leitfähigkeit tritt selten auf. Dieses Schalten scheint dabei von der angelegten Spannung abzuhängen. Bei der Verwendung von lösungsmittelfreien Membranen wurde dieses Verhalten häufig beobachtet.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Akeson, D. Branton, J.J. Kasianowicz, E. Brandin und D.W. Deamer, *Biophysical Journal* **77** (1999), 3227.
- [2] A. Ashkin, J. Dziedzic, J. Bjorkholm und S. Chu, *Opt Lett* **11** (1986), 288.
- [3] G. Baaken, M. Sondermann, C. Schlemmer, J. Ruehe und J.C. Behrends, *Lab Chip* **8** (2008), 938.
- [4] G. Bainbridge, I. Gokce und J. Lakey, *Febs Lett* **431** (1998), 305.
- [5] A. Banerjee, E. Mikhailova, S. Cheley, L.Q. Gu, M. Montoya, Y. Nagaoka, E. Gouaux und H. Bayley, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (2010), 8165.
- [6] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner und R. Kramer, *Nat Neurosci* **7** (2004), 1381.
- [7] M. Bates, M. Burns und A. Meller, *Biophysical Journal* **84** (2003), 2366.
- [8] C. Baugh, D. Grate und C. Wilson, *J Mol Biol* **301** (2000), 117.
- [9] H. Bayley, *Curr Opin Chem Biol* **10** (2006), 628.
- [10] H. Bayley, *Nature* **459** (2009), 651.
- [11] G. BELL, *Science* **200** (1978), 618.
- [12] S.M. Bezrukov, I. Vodyanoy und V.A. Parsegian, *Nature* **370** (1994), 279.
- [13] S. Bhakdi und J. Tranumjensen, *Microbiol Rev* **55** (1991), 733.
- [14] L. Bock, L. Griffin, J. Latham, E. Vermaas und J. Toole, *Nature* **355** (1992), 564.

- [15] D. Branton, D.W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S.A. Benner, T. Butler, M.D. Ventura, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, S.B. Jovanovich, P.S. Krstic, S. Lindsay, X.S. Ling, C.H. Mastrangelo, A. Meller, J.S. Oliver, Y.V. Pershin, J.M. Ramsey, R. Riehn, G.V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin und J.A. Schloss, *Nat Biotechnol* **26** (2008), 1146.
- [16] K. Breslauer, R. Frank, H. Blocker und L. Marky, *P Natl Acad Sci Usa* **83** (1986), 3746.
- [17] T. Butler, J. Gundlach und M. Troll, *Biophysical Journal* **90** (2006), 190.
- [18] T.Z. Butler, M. Pavlenok, I.M. Derrington, M. Niederweis und J.H. Gundlach, *P Natl Acad Sci Usa* **105** (2008), 20647.
- [19] M. Chen, S. Khalid, M.S.P. Sansom und H. Bayley, *P Natl Acad Sci Usa* **105** (2008), 6272.
- [20] J. Clarke, H.C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid und H. Bayley, *Nature Nanotechnology* **4** (2009), 265.
- [21] D. Czajkowsky, S. Sheng und Z. Shao, *J Mol Biol* **276** (1998), 325.
- [22] D. Deamer und M. Akeson, *Trends in Biotechnology* **18** (2000), 147.
- [23] C. Dekker, *Nature Nanotechnology* **2** (2007), 209.
- [24] I.M. Derrington, T.Z. Butler, M.D. Collins, E. Manrao, M. Pavlenok, M. Niederweis und J.H. Gundlach, *P Natl Acad Sci Usa* **107** (2010), 16060.
- [25] D. Dimitrov und M. Angelova, *Bioelectroch Bioener* **19** (1988), 323.
- [26] O.K. Dudko, G. Hummer und A. Szabo, *P Natl Acad Sci Usa* **105** (2008), 15755.
- [27] O.K. Dudko, J. Mathe, A. Szabo, A. Meller und G. Hummer, *Biophysical Journal* **92** (2007), 4188.
- [28] E. Evans und K. Ritchie, *Biophysical Journal* **72** (1997), 1541.
- [29] N. Fertig, R. Blick und J. Behrends, *Biophysical Journal* **82** (2002), 3056.
- [30] M. Firnkes, D. Pedone, J. Knezevic, M. Döblinger und U. Rant, *Nano Lett* **10** (2010), 2162.

- [31] S. Forti und G. Menestrina, *Eur J Biochem* **181** (1989), 767.
- [32] C.P. Fredlake, D.G. Hert, E.R. Mardis und A.E. Barron, *Electrophoresis* **27** (2006), 3689.
- [33] K. Funakoshi, H. Suzuki und S. Takeuchi, *Anal Chem* **78** (2006), 8169.
- [34] O. Gotoh und Y. Tagashira, *Biopolymers* **20** (1981), 1033.
- [35] J. Griffiths, *Anal Chem* **80** (2008), 23.
- [36] A.R. Gruber, R. Lorenz, S.H. Bernhart, R. Neuboock und I.L. Hofacker, *Nucleic Acids Research* **36** (2008), W70.
- [37] L. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley und H. Bayley, *Nature* **398** (1999), 686.
- [38] L. Gu, S. Cheley und H. Bayley, *Science* **291** (2001), 636.
- [39] A.R. Hall, A. Scott, D. Rotem, K.K. Mehta, H. Bayley und C. Dekker, *Nature Nanotechnology* **5** (2010), 874.
- [40] A.F. Hammerstein, L. Jayasinghe und H. Bayley, *J Biol Chem* **286** (2011), 14324.
- [41] S.E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson und J.J. Kasianowicz, *Phys. Rev. Lett.* **85** (2000), 3057.
- [42] M. Holden und H. Bayley, *J Am Chem Soc* **127** (2005), 6502.
- [43] M.A. Holden, D. Needham und H. Bayley, *J Am Chem Soc* **129** (2007), 8650.
- [44] S. Howorka, L. Movileanu, O. Braha und H. Bayley, *P Natl Acad Sci Usa* **98** (2001), 12996.
- [45] S. Howorka und Z. Siwy, *Chem Soc Rev* **38** (2009), 2360.
- [46] D. Huizenga und J. Szostak, *Biochemistry-Us* **34** (1995), 656.
- [47] J.L. Huppert, *Chem Soc Rev* **37** (2008), 1375.
- [48] N. Hurt, H. Wang, M. Akeson und K.R. Lieberman, *J Am Chem Soc* **131** (2009), 3772.

- [49] W.L. Hwang, M.A. Holden, S. White und H. Bayley, *J Am Chem Soc* **129** (2007), 11854.
- [50] D. Japrun, M. Henricus, Q. Li, G. Maglia und H. Bayley, *Biophysical Journal* **98** (2010), 1856.
- [51] S. Jayasena, *Clin Chem* **45** (1999), 1628.
- [52] T. Jeon, N. Malmstadt und J. Schmidt, *J Am Chem Soc* **128** (2006), 42.
- [53] J.J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton und D.W. Deamer, *P Natl Acad Sci Usa* **93** (1996), 13770.
- [54] R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, M. Takinoue, S. Yoshizawa und S. Takeuchi, *J Am Chem Soc* **133** (2011), 8474.
- [55] U.F. Keyser, B.N. Koeleman, S. van Dorp, D. Krapf, R.M.M. Smeets, S.G. Lemay, N.H. Dekker und C. Dekker, *Nat Phys* **2** (2006), 473.
- [56] A. Kleefen, D. Pedone, C. Grunwald, R. Wei, M. Firnkens, G. Abstreiter, U. Rant und R. Tampé, *Nano Lett* **10** (2010), 5080.
- [57] H. Kramers, *Physica* **7** (1940), 284.
- [58] D.K. Lathrop, E.N. Ervin, G.A. Barrall, M.G. Keehan, R. Kawano, M.A. Krupka, H.S. White und A.H. Hibbs, *J Am Chem Soc* **132** (2010), 1878.
- [59] C. Lesieur, B. VecseySemjen, L. Abrami, M. Fivaz und F. van der Goot, *Mol Membr Biol* **14** (1997), 45.
- [60] J. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin und J. Golovchenko, *Nat Mater* **2** (2003), 611.
- [61] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. Aziz und J. Golovchenko, *Nature* **412** (2001), 166.
- [62] K.R. Lieberman, G.M. Cherf, M.J. Doody, F. Olasagasti, Y. Kolodji und M. Akeson, *J Am Chem Soc* **132** (2010), 17961.
- [63] J. Lin, A. Kolomeisky und A. Meller, *Phys. Rev. Lett.* **104** (2010), 158101.

- [64] S. Lynch, H. Baker, S. Byker, D. Zhou und K. Sinniah, *Chem. Eur. J.* **15** (2009), 8113.
- [65] L. Ma und S.L. Cockroft, *ChemBioChem* **11** (2010), 25.
- [66] R. Macaya, P. Schultze, F. Smith, J. Roe und J. Feigon, *P Natl Acad Sci Usa* **90** (1993), 3745.
- [67] M. Mahfoud, S. Sukumaran, P. Hulsmann, K. Grieger und M. Niederweis, *J Biol Chem* **281** (2006), 5908.
- [68] S. Majd, E.C. Yusko, Y.N. Billeh, M.X. Macrae, J. Yang und M. Mayer, *Current Opinion in Biotechnology* **21** (2010), 439.
- [69] N. Malmstadt, M.A. Nash, R.F. Purnell und J.J. Schmidt, *Nano Lett* **6** (2006), 1961.
- [70] J. Mathe, A. Aksimentiev, D. Nelson, K. Schulten und A. Meller, *P Natl Acad Sci Usa* **102** (2005), 12377.
- [71] J. Mathé, A. Arinstein, Y. Rabin und A. Meller, *Europhys. Lett.* **73** (2007), 128.
- [72] J. Mathe, H. Visram, V. Viasnoff, Y. Rabin und A. Meller, *Biophysical Journal* **87** (2004), 3205.
- [73] M. Mayer, *P Natl Acad Sci Usa* **69** (1972), 2954.
- [74] B. McNally, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng und A. Meller, *Nano Lett* **10** (2010), 2237.
- [75] B. McNally, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng und A. Meller, *Nano Lett* **10** (2010), 2237.
- [76] A. Meller, *J Phys-Condens Mat* **15** (2003), R581.
- [77] A. Meller und D. Branton, *Electrophoresis* **23** (2002), 2583.
- [78] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko und D. Branton, *P Natl Acad Sci Usa* **97** (2000), 1079.
- [79] A. Meller, L. Nivon und D. Branton, *Phys. Rev. Lett.* **86** (2001), 3435.
- [80] M. Montal und P. Mueller, *P Natl Acad Sci Usa* **69** (1972), 3561.

- [81] L. Movileanu, *Trends in Biotechnology* **27** (2009), 333.
- [82] P. Mueller, W. Wescott, D. Rudin und H. Tien, *J Phys Chem-Us* **67** (1963), 534.
- [83] J. Muzard, M. Martinho, J. Mathé, U. Bockelmann und V. Viasnoff, *Biophysical Journal* **98** (2010), 2170.
- [84] J. Nakane, M. Wiggin und A. Marziali, *Biophysical Journal* **87** (2004), 615.
- [85] E. Neher und B. Sakmann, *Nature* **260** (1976), 799.
- [86] V. Nguyen und Y. Kamio, *J Biochem* **136** (2004), 563.
- [87] S.M. Nimjee, C.P. Rusconi und B.A. Sullenger, *Annu. Rev. Med.* **56** (2005), 555.
- [88] A. Panjkovich, *Bioinformatics* **21** (2004), 711.
- [89] M. Pastoriza-Gallego, L. Rabah, G. Gibrat, B. Thiebot, F.G. van der Goot, L. Auvray, J.M. Betton und J. Pelta, *J Am Chem Soc* **133** (2011), 2923.
- [90] D. Pedone, M. Langecker, A.M. Muenzer, R. Wei, R.D. Nagel und U. Rant, *J Phys-Condens Mat* **22** (2010), 454115.
- [91] E.M. Puchner und H.E. Gaub, *Curr Opin Struc Biol* **19** (2009), 605.
- [92] M. Raible, M. Evstigneev, P. Reimann, F. Bartels und R. Ros, *J Biotechnol* **112** (2004), 13.
- [93] P. Raychaudhuri, Q. Li, A. Mason, E. Mikhailova, A.J. Heron und H. Bayley, *Biochemistry-Us* **50** (2011), 1599.
- [94] S. Renner, A. Bessonov, U. Gerland und F.C. Simmel, *J Phys-Condens Mat* **22** (2010), 454119.
- [95] S. Renner, A. Bessonov und F.C. Simmel, *Appl. Phys. Lett.* **98** (2011), 083701.
- [96] S. Renner, S. Geltinger und F.C. Simmel, *Small* **6** (2010), 190.
- [97] M. Rincon-Restrepo, E. Milthallova, H. Bayley und G. Maglia, *Nano Lett* **11** (2011), 746.
- [98] J.W.F. Robertson, C.G. Rodrigues, V.M. Stanford, K.A. Rubinson, O.V. Krasilnikov und J.J. Kasianowicz, *P Natl Acad Sci Usa* **104** (2007), 8207.

- [99] P.W.K. Rothmund, *Nature* **440** (2006), 297.
- [100] J. SantaLucia, *P Natl Acad Sci Usa* **95** (1998), 1460.
- [101] J. SantaLucia, H. Allawi und A. Seneviratne, *Biochemistry-Us* **35** (1996), 3555.
- [102] J. SantaLucia und D. Hicks, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33** (2004), 415.
- [103] A. Sauer-Budge, J. Nyamwanda, D. Lubensky und D. Branton, *Phys. Rev. Lett.* **90** (2003), 238101.
- [104] S. Schink, K. Alim, S. Renner, V. Arnaut, F.C. Simmel und U. Gerland. *zur Veröffentlichung eingereicht*, (2011).
- [105] M. Schlierf und M. Rief, *Biophysical Journal* **90** (2006), L33.
- [106] J.W. Shim und L.Q. Gu, *J Phys Chem B* **112** (2008), 8354.
- [107] J.W. Shim, Q. Tan und L.Q. Gu, *Nucleic Acids Research* **37** (2009), 972.
- [108] I. Smirnov und R. Shafer, *Biochemistry-Us* **39** (2000), 1462.
- [109] M. Sondermann, M. George, N. Fertig und J. Behrends, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758** (2006), 545.
- [110] L. Song, M.R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley und J.E. Gouaux, *Science* **274** (1996), 1859.
- [111] G.V. Soni und A. Meller, *Clin Chem* **53** (2007), 1996.
- [112] C. Stahl, S. Kubetzko, I. Kaps, S. Seeber, H. Engelhardt und M. Niederweis, *Mol Microbiol* **40** (2001), 451.
- [113] R. Stefureac, Y.T. Long, H.B. Kraatz, P. Howard und J.S. Lee, *Biochemistry-Us* **45** (2006), 9172.
- [114] R.I. Stefureac und J.S. Lee, *Small* **4** (2008), 1646.
- [115] D. Stoddart, A.J. Heron, J. Klingelhofer, E. Mikhailova, G. Maglia und H. Bayley, *Nano Lett* **10** (2010), 3633.
- [116] D. Stoddart, A.J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia und H. Bayley, *P Natl Acad Sci Usa* **106** (2009), 7702.

- [117] D. Stoddart, G. Maglia, E. Mikhailova, A.J. Heron und H. Bayley, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2009), n/a.
- [118] A. Storm, J. Chen, X. Ling, H. Zandbergen und C. Dekker, *Nat Mater* **2** (2003), 537.
- [119] I. Sugar und E. Neumann, *Biophys Chem* **19** (1984), 211.
- [120] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Yoneyama und K. Honda, *Nucleic Acids Research* **24** (1996), 4501.
- [121] W. Timp, U.M. Mirsaidov, D. Wang, J. Comer, A. Aksimentiev und G. Timp, *Ieee T Nanotechnol* **9** (2010), 281.
- [122] S. Tombelli, A. Minunni und A. Mascini, *Biosens Bioelectron* **20** (2005), 2424.
- [123] C. Tropini und A. Marziali, *Biophysical Journal* **92** (2007), 1632.
- [124] J.D. Uram, K. Ke und M. Mayer, *Acs Nano* **2** (2008), 857.
- [125] <http://cadnano.org/>, (Sep 2011).
- [126] <http://de.nanion.de>, (Sep 2011).
- [127] http://de.wikipedia.org/wiki/Least_Square, (Sep 2011).
- [128] http://en.wikipedia.org/wiki/GlmS_glucosamine-6-phosphate_activated_ribozyme, (Sep 2011).
- [129] <http://heka.com/physio/equipment/ionovation/ionovationCompact.html>, (Sep 2011).
- [130] <http://https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/company/about-us/our-history/wallace-h-coulter/index.htm>, (Sep 2011).
- [131] <http://mfold.rna.albany.edu/>, (Sep 2011).
- [132] <http://protein.bio.puc.cl/cardex/servers/dnaMATE/index.html>, (Sep 2011).
- [133] <http://www.nupack.org/>, (Sep 2011).
- [134] W. Vercoetere, S. Winters-Hilt, V. DeGuzman, D. Deamer, S. Ridino, J. Rodgers, H. Olsen, A. Marziali und M. Akeson, *Nucleic Acids Research* **31** (2003), 1311.

- [135] W. Vercootere, S. Winters-Hilt, H. Olsen, D. Deamer, D. Haussler und M. Akeson, *Nat Biotechnol* **19** (2001), 248.
- [136] V. Viasnoff, N. Chiaruttini und U. Bockelmann, *Eur Biophys J Biophys* **38** (2009), 263.
- [137] B. Walker, O. Braha, S. Cheley und H. Bayley, *Chemistry & Biology* **2** (1995), 99.
- [138] B. Walker, M. Krishnasastri, L. Zorn und H. Bayley, *J Biol Chem* **267** (1992), 21782.
- [139] M. Wanunu, B. Chakrabarti, J. Mathé, D.R. Nelson und A. Meller, *Phys. Rev. E* **77** (2008), 5.
- [140] M. Wanunu und A. Meller, *Nano Lett* **7** (2007), 1580.
- [141] R. Wartell und A. Benight, *Phys Rep* **126** (1985), 67.
- [142] J. Watson und F. Crick, *Nature* **171** (1953), 737.
- [143] D.B. Wells, V. Abramkina und A. Aksimentiev, *J. Chem. Phys.* **127** (2007), 125101.
- [144] M. Wiggin, C. Tropini, V. Tabard-Cossa, N.N. Jetha und A. Marziali, *Biophysical Journal* **95** (2008), 5317.
- [145] S. Winters-Hilt, W. Vercootere, V. DeGuzman, D. Deamer, M. Akeson und D. Haussler, *Biophysical Journal* **84** (2003), 967.
- [146] M. Woodside, W. Behnke-Parks, K. Larizadeh, K. Travers, D. Herschlag und S. Block, *P Natl Acad Sci Usa* **103** (2006), 6190.
- [147] G. Woolley und B. Wallace, *J Membrane Biol* **129** (1992), 109.
- [148] H.C. Wu und H. Bayley, *J Am Chem Soc* **130** (2008), 6813.
- [149] P. Yakovchuk, *Nucleic Acids Research* **34** (2006), 564.
- [150] Z. Yu, J.D. Schonhoft, S. Dhakal, R. Bajracharya, R. Hegde, S. Basu und H. Mao, *J Am Chem Soc* **131** (2009), 1876.
- [151] E.C. Yusko, J.M. Johnson, S. Majd, P. Prangko, R.C. Rollings, J. Li, J. Yang und M. Mayer, *Nature Nanotechnology* (2011), 1.

[152] J. Zhang und B. Shklovskii, *Phys. Rev. E* **75** (2007), 021906.

[153] M. Zuker, *Nucleic Acids Research* **31** (2003), 3406.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- Fritz Simmel, für die Ermöglichung dieser Arbeit. Danke dafür, dass Du mir alle nötigen Freiheiten gelassen hast, und mich gleichzeitig immer mit vielen guten Ideen und Antworten unterstützt hast. Wenn ich mich noch einmal entscheiden müsste, würde ich sofort wieder eine Doktorarbeit an Deinem Lehrstuhl machen.
- Ulrich Gerland, für die produktive Zusammenarbeit, und Übernahme der Zweitkorrektur.
- Allen Mitarbeitern des LS Simmel und der Firma Nanion, welche mich immer unterstützt haben und stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| Name | Stephan Paul Dominik Renner |
| Geburtsdatum | 29. März 1981 |
| Geburtsort | München |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |
| Familienstand | Ledig |

Schulbildung

| | |
|-----------|---|
| 1987-1989 | Carl-Steinmeier-Volksschule, Riemerling |
| 1989-1991 | Ostpreußen-Grundschule, München |
| 1991-2000 | Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München |

Zivildienst

| | |
|-----------|----------------------------------|
| 2000-2001 | Bayerisches Rotes Kreuz, München |
|-----------|----------------------------------|

Hochschulbildung

| | |
|-----------|---|
| 2001-2007 | Studium der Physik an der LMU, München |
| 2007 | Erwerb des Diploms |
| 2007-2011 | Promotion an der TU München, Lehrstuhl für Physik E14, Bioelektronik |