
Weiterentwicklungen an der Optischen Pinzette

Diplomarbeit

**zum Erlangen des Grades eines
Diplom-Physikers**

**vorgelegt von
Christoph Kleimann**

Universität Bielefeld

Fachbereich Physik

Januar 2008

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Bielefeld, den 02.01.2008

(Christoph Kleimann)

Gutachter

1. Prof. Dr. Dario Anselmetti
2. Prof. Dr. Markus Sauer

eingereicht am 02.01.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Theoretische Grundlagen	8
2.1	Ursprung der Optischen Falle	8
2.2	Lambda-DNA	10
2.2.1	Das Worm Like Chain-Modell	12
2.2.2	Strecken von dsDNA	13
2.3	Interkalation	15
2.4	Fluoreszenz	17
2.5	Peltier-Effekt	19
3	Materialien und Methoden	20
3.1	Messaufbau	20
3.2	Die alte Flüssigkeitszelle	24
3.3	Bau einer neuen Flüssigkeitszelle	24
3.3.1	Herstellung von PDMS-Schichten	25
3.3.2	Rahmen der Flüssigkeitszelle	27
3.4	Biotinylierung von λ -DNA	28
3.5	Interkalatoren	28
3.5.1	YOYO-1 und YOYO-1	28
3.5.2	Triostin A	29
3.5.3	AzoTANDEM	30
3.5.4	Triostin-Varianten A-T und G-C	32
3.6	Das LabView Programm	32
4	Messergebnisse und Auswertung	35
4.1	Temperaturabhängigkeit des Streckens	35
4.2	Messung in z-Richtung	38
4.3	Messung mit Interkalatoren	41
4.3.1	YOYO-1	41
4.3.2	YO-1	45
4.3.3	Triostin A	47
4.3.4	AzoTANDEM	52
4.3.5	A-T und G-C	53

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	6
5 Zusammenfassung und Ausblick	55
Literatur	57
Danksagung	58

1 Einleitung

Eine Optische Pinzette dient als Instrument, um kleine dielektrische Partikel wie Moleküle oder Kügelchen im μm -Bereich zu manipulieren. Hierbei wird ein Laserstrahl stark fokussiert. Teilchen, die in die Nähe des Strahls gelangen, erfahren eine Kraft in Richtung des Intensitätsgradienten, so daß sie in einer optischen Falle nahe des Brennpunkts gefangen werden.

Auf diese Weise kann man die Teilchen einfangen und durch Verschieben der Umgebung relativ zur Falle präzise bewegen, gerade so wie man größere Teilchen mit einer Pinzette fassen und manipulieren kann. Mit der Umgebung ist hier eine Flüssigkeitszelle gemeint. Diese enthält eine Flüssigkeit, in der die zu untersuchenden Objekte und Substanzen suspendiert sind.

Weiterhin dient die Optische Pinzette als Sensor für die Kraft, die auf ein gefangenes Teilchen wirkt. Es lässt sich also Kraftspektroskopie betreiben, wobei die hohe Kraftauflösung es ermöglicht, Kräfte im pN-Bereich zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit geht es zunächst um die Entwicklung einer neuen Flüssigkeitszelle. Gegenüber der alten Zelle aus [1] sollen neue Anforderungen erfüllt werden. So soll dieses neue Bauteil aufklappbar sein, um nachträglich Änderungen vornehmen oder Einzelteile austauschen zu können. Außerdem soll es möglich sein, mit Hilfe von Peltier-Elementen die Flüssigkeit abzukühlen bzw. zu erhitzen, um das in [2] untersuchte Strecken von λ -DNA bei verschiedenen Temperaturen durchführen zu können.

Eine neuartige Methode der Kraftmessung mit dem vom gefangenen Objekt rückgestreuten Licht soll beschrieben und getestet werden. Ein großer Vorteil dieses Aufbaus ist die Möglichkeit, in allen drei Raumrichtungen Kräfte zu untersuchen, die auf ein Teilchen wirken. Mittels der bisherigen Detektion über eine Quadrantendiode war dies nicht möglich.

Weiterhin soll die Möglichkeit der Kraftspektroskopie ausgenutzt werden, um das Verhalten von gestreckter λ -DNA im Komplex mit verschiedenen Interkalatoren zu charakterisieren. Neben den bekannten Stoffen YO-PRO-1, YOYO-1 und Triostin A sollen auch drei völlig neue, auf Triostin basierende Varianten untersucht werden, die in der Arbeitsgruppe Organische Chemie III der Universität Bielefeld hergestellt wurden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Ursprung der Optischen Falle

Die Effekte, die letztlich zur Entwicklung der ersten optischen Falle führten, wurden zuerst 1970 von Arthur Ashkin entdeckt [3]. Er benutzte einen Laserstrahl mit Gaußschem Strahlprofil und beobachtete dessen Wirkung auf suspendierte Latexkügelchen der Größe einiger μm . Dabei stellte er fest, daß die Kügelchen nicht nur durch den Strahlungsdruck in Strahlrichtung beschleunigt wurden, sie erfuhren auch eine Kraft zum Mittelpunkt des Strahls hin.

Den Grund dafür kann man sich leicht durch geometrische Optik verdeutlichen.

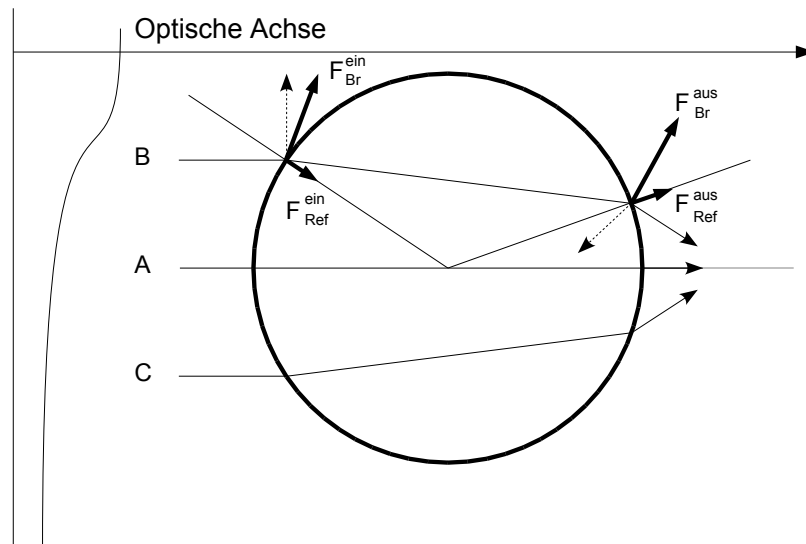


Abbildung 1: Ursprung von Streukraft und Gradientenkraft in geometrischer Optik

Abbildung 1 zeigt ein Kügelchen und den Verlauf dreier exemplarischer Strahlen eines Gaußschen Strahlenbündels. Strahl A trifft beim Übergang vom umgebenden Medium zum Kügelchen senkrecht auf dessen Oberfläche auf, ebenso beim Austritt aus dem Kügelchen. Er wird nicht gebrochen. Die Strahlen B und C hingegen werden gebrochen, und zwar zur Achse der Kugel hin, wenn der Brechungsindex n des Kügelchens größer ist als der des Mediums. Dies ist ein Kriterium für das Funktionieren einer optischen Falle.

$$n_{\text{Objekt}} > n_{\text{Medium}} \quad (1)$$

Wegen der Impulserhaltung erfährt das Kügelchen Kräfte $F_{\text{Br}}^{\text{ein}}$ und $F_{\text{Br}}^{\text{aus}}$, da sich

Richtung bzw. Impuls der Photonen bei der Lichtbrechung ändert. Auch wird an der Oberfläche stets ein Teil des Lichtes reflektiert und dadurch ebenfalls ein Impuls übertragen, wodurch die Kräfte $F_{\text{Ref}}^{\text{ein}}$ und $F_{\text{Ref}}^{\text{aus}}$ zustande kommen. Alle einzelnen Strahlen erzeugen so Kraftkomponenten in Richtung des Laserstrahls, die netto als Streukraft zusammengefasst werden. Diese Streukraft treibt das Objekt in Strahlrichtung vorwärts. Die Strahlen B und C erzeugen aber noch andere Komponenten, senkrecht zur optischen Achse. Dabei zeigen die Kräfte, die durch B entstehen, zur Mitte des Strahls hin, die durch C erzeugten davon weg. Aufgrund des Gaußschen Profils überwiegen aber in der Summe die Kräfte zur optischen Achse hin. Man nennt die Kraft, die aus diesen Komponenten resultiert, eine Gradientenkraft. Sie bewirkt in diesem Fall schon einmal eine zweidimensionale Falle, nämlich in der Ebene senkrecht zur optischen Achse.

Will man nun ein Objekt dreidimensional fangen, so bietet sich die simple Methode aus [4] an. Mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur NA fokussiert man einen Laserstrahl möglichst stark, um so auch entlang der optischen Achse einen Intensitätsgradienten zu erschaffen.

$$NA = r/f = n_{\text{Medium}} \cdot \sin\theta \quad (2)$$

r bezeichnet den Radius der Apertur, f die Brennweite und θ den Öffnungswinkel. Genau genommen induziert der Laser Dipole in dem dielektrischen Partikel. Durch Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld des Lasers werden Gradientenkräfte F_{Grad} hervorrufen, die ein Kügelchen in der Nähe in Richtung des Intensitätsgradienten, also zum Fokus des Lasers hin, beschleunigen. Außerdem wirken durch Impulsübertrag Streukräfte an dem Teilchen.

Abbildung 2 veranschaulicht die Funktion solch einer dreidimensionalen Falle wiederum durch geometrische Optik. Diese einfache Beschreibung gilt für Teilchen im Mie-Regime, d.h für Teilchen, deren Durchmesser deutlich größer als die Laserwellenlänge λ ist ($2r \gg \lambda$). Wenn der Strahl stark genug fokussiert wird, dann ist die Komponente von F_{Grad} in Strahlrichtung größer als die Streukraft, und es stellt sich ein stabiler Zustand ein. Das Teilchen wird dort gefangen, wo sich alle Kräfte zu Null addieren. Dieser Punkt liegt vom Brennpunkt aus gesehen etwas weiter in Strahlrichtung.

Dagegen ist für Objekte im Rayleigh-Regime ($2r < 0,2\lambda$) eine wellenoptische Beschreibung nötig. Das Teilchen wird als Punktdipol aufgefasst [5]. Die Streukraft F_{Streu} kommt durch die Absorption und Emission von Photonen durch den Dipol zustande und die Gradientenkraft F_{Grad} durch Wechselwirkung mit dem E-Feld des Laserstrahls. Beide können in dieser Näherung getrennt angegeben werden.

$$F_{\text{Streu}} = \frac{I_0}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 n_{\text{Medium}} \quad (3)$$

$$F_{\text{Grad}} = -\frac{n_{\text{Medium}}}{2} \alpha \nabla E^2 = -\frac{n_{\text{Medium}}^3 r^3}{2} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla E^2 \quad (4)$$

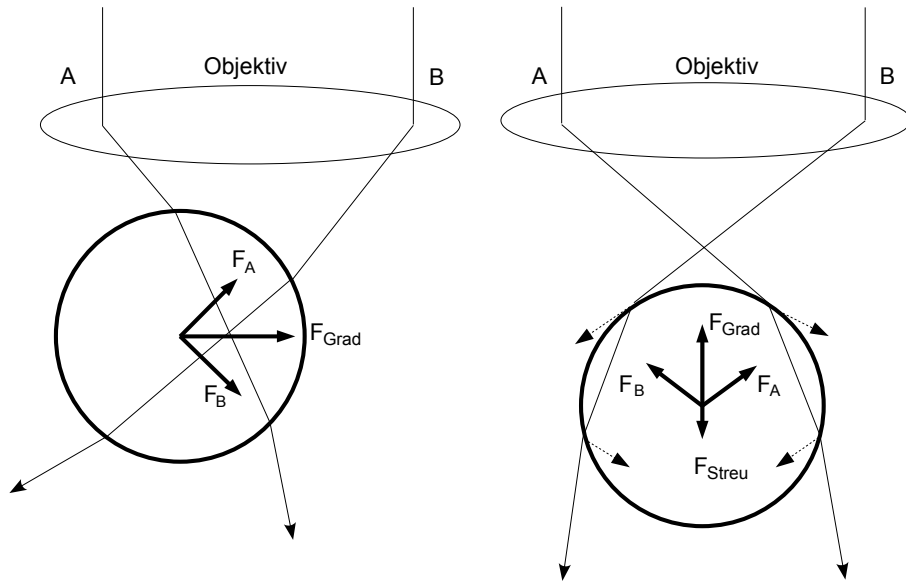


Abbildung 2: Wirkungsweise der dreidimensionalen Falle für Objekte im Mie-Bereich: links ein radial ausgelenktes, rechts ein axial ausgelenktes Kügelchen

Dabei ist I_0 die Intensität des Lichtes, $m = n_{\text{Objekt}}/n_{\text{Medium}}$ der effektive Brechungsindex, E die elektrische Feldstärke und α die Polarisierbarkeit des Teilchens. Um ein Teilchen stabil zu fangen, muss die Gradientenkraft alle anderen wirkenden Kräfte überwiegen. Insbesondere muss sie also größer als die Streukraft sein.

$$\frac{F_{\text{Grad}}}{F_{\text{Streu}}} \geq 1 \quad (5)$$

Ein gefangenes Teilchen befindet sich in einem harmonischen Potential. In einer Raumrichtung lässt sich das Fallenpotential $V(x)$ daher wie ein harmonischer Oszillator beschreiben.

$$V(x) = 0,5 \cdot k \cdot x^2 \quad (6)$$

k ist hier die Federkonstante. Wird das Teilchen nun durch eine Kraft F ausgelenkt, so verhält es sich also linear zu dieser wie bei einer Feder.

$$F = -\frac{dV}{dx} = -k \cdot x \quad (7)$$

2.2 Lambda-DNA

Desoxyribonukleinsäure (DNA) kommt in allen Lebewesen als Träger der Erbinformationen vor und ist somit eines der wichtigsten Biomoleküle. Ihre Struktur

wurde von Watson und Crick entschlüsselt [6]. Bei der DNA handelt es sich um ein Polymer aus Einzelteilen, die Nucleotide genannt werden. Jedes Nucleotid besteht aus einer Phosphatgruppe, einem Zuckermolekül (der 2-Desoxyribose) und einer Base. Als Basen kommen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) in Frage. Desoxyribose und Phosphatgruppe bilden durch Veresterung einen Nucleotidstrang, das Rückgrat der DNA. Unter physiologi-

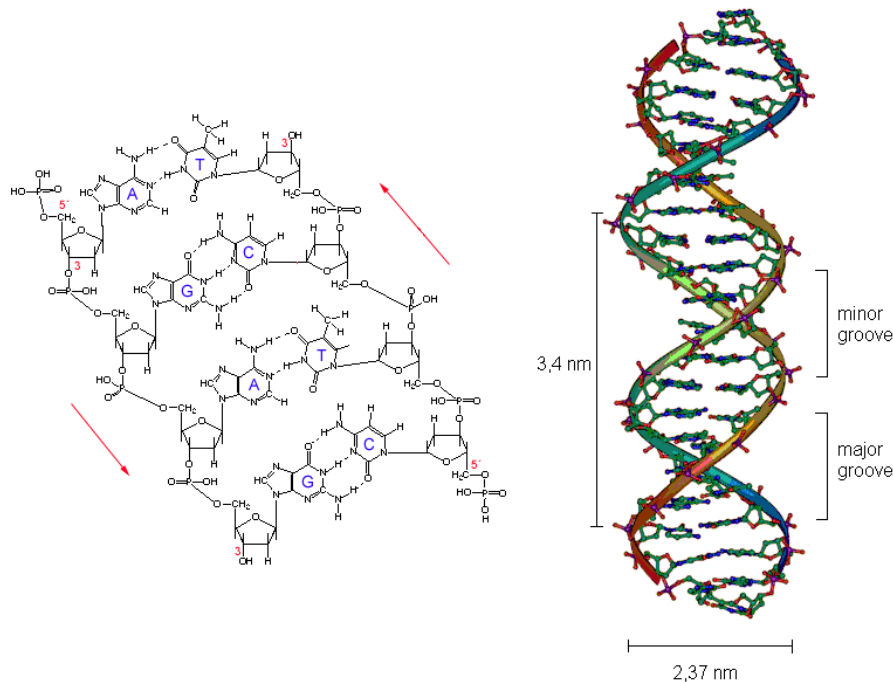


Abbildung 3: links: Ausschnitt aus der Strukturformel einer dsDNA, rechts: doppelhelikale Struktur der B-DNA (aus [7])

schen Bedingungen liegt DNA in Form einer rechtshändigen B-Doppelhelix vor (B-DNA). Dies bedeutet, dass zwei DNA-Stränge antiparallel verlaufen und sich um eine gemeinsame Achse winden. Es ergibt sich eine doppelsträngige DNA (dsDNA). Stabilisiert wird diese Struktur hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen und π -Stapelungen zwischen den Basen. Die Kombinationen sind aber nicht beliebig, es kommen nur Bindungen zwischen A und T (zwei Wasserstoffbrücken) sowie zwischen G und C (drei Wasserstoffbrücken) vor, sodaß die beiden Stränge komplementär sind. Die Reihenfolge der Basen definiert die spezifischen genetischen Informationen eines Lebewesens, das Erbgut.

Ein wichtiges Merkmal der helikalen Struktur ist das abwechselnde Auftreten einer großen und einer kleinen Furche (major- und minor-groove), welche als Bindungsstellen für an DNA bindende Liganden dienen können. Die Aromaten der Basen stehen in einem Winkel von 89° zur Achse der Helix und die Basenpaare haben einen Abstand von 0,34 nm voneinander. Alle 10,4 Basenpaare ist

eine komplette Windung vollzogen. Der Durchmesser der Doppelhelix beträgt 2,37 nm.

Bei λ -DNA handelt es sich um DNA, die dem E. coli Virus entnommen wird. Sie ist 48502 Basenpaare lang, so dass λ -DNA bei voller Streckung eine Gesamtlänge von 16,49 μm erreicht. Diese wird Konturlänge L_0 genannt. λ -DNA besteht etwa zur Hälfte aus AT-Basenpaaren.

2.2.1 Das Worm Like Chain-Modell

Befindet sich DNA in einem wässrigen Medium, so liegt sie im Normalfall nicht voll ausgestreckt vor, sondern als statistisches Knäuel, da jedes System stets den Zustand maximaler Entropie anstrebt. Um die DNA zu strecken, muss Arbeit verrichtet werden. Bis zu einer Distanz der beiden Moleküleenden, die der Konturlänge der DNA entspricht, befindet sie sich im entropischen Kraftbereich. Das Verhalten des Knäuels kann hierfür durch mehrere Modelle beschrieben werden, z.B durch das Freely Jointed Chain-Modell oder das Freely Rotating Chain-Modell (FRC). Am besten wird dsDNA aber durch das Worm-Like-

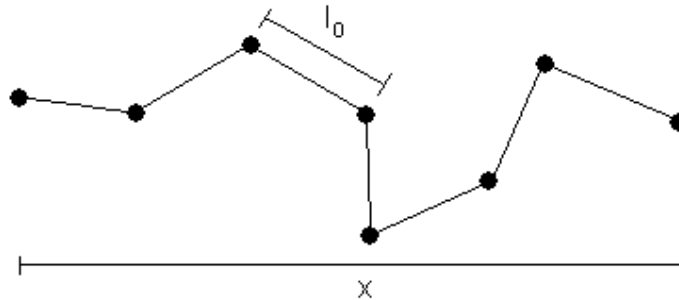


Abbildung 4: FRC-Modell eines Polymers nach Kratky et al. Im WLC-Modell lässt man die Segmentlänge l_0 gegen Null gehen.

Chain (WLC)-Modell beschrieben. Man beschreibt ein Polymer als Kette von N unabhängigen Gliedern der Länge l_0 , die Bindungswinkel sind dabei beliebig. Beim WLC-Modell unterteilt man die Kette nun in immer kürzere Segmente, betrachtet also den Grenzwert $l_0 \rightarrow 0$. Der Zusammenhang zwischen der End-End-Distanz x und der dafür aufzuwendenden Kraft F kann durch die WLC-Gleichung (8) ausgedrückt werden.

$$F = \frac{k_B T}{P} \left[\frac{1}{4(1 - x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right] \quad (8)$$

P ist die Persistenzlänge, die charakteristische Länge der Winkelkorrelation der Segmente. Anschaulich ist sie ein Maß dafür, auf welcher Länge ein Kettenabschnitt makroskopisch gerade erscheint. Innerhalb der Persistenzlänge lässt sich die DNA daher als starr ansehen.

2.2.2 Strecken von dsDNA

Im Bereich der entropischen Kräfte verhält sich DNA elastisch wie eine Feder. Um neue Erkenntnisse über die strukturellen Eigenheiten eines solchen Moleküls zu gewinnen, muss es aber über diesen Kraftbereich hinaus gestreckt werden.

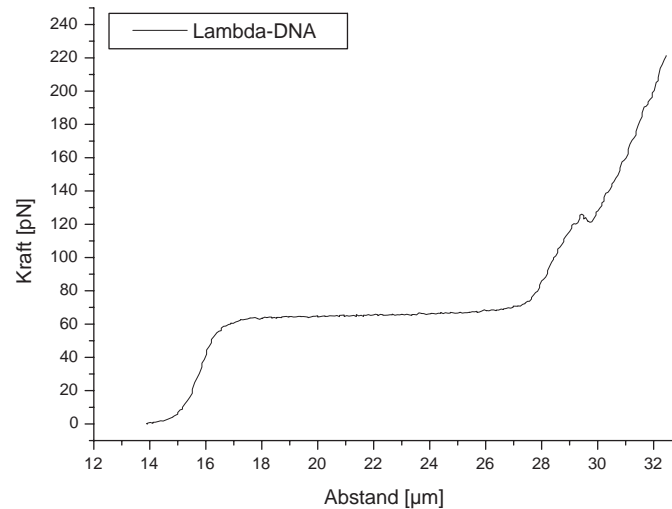


Abbildung 5: typische Kraft-Ausdehnungskurve von λ -DNA

Betrachtet man eine typische Ausdehnungskurve wie in Abb. 5, so sieht man, dass das Verhalten bis etwa 20 pN mit dem WLC-Modell erklärt werden kann. Wie in [2] beschrieben, findet bei höheren Kräften jedoch ein struktureller Übergang innerhalb der λ -DNA statt, der in der Kurve als Plateau bei etwa 65 pN auftritt. Auf einer Strecke von ca. 12 μm steigt die Kraft beim Strecken der DNA kaum an. Danach beginnt ein erneuter steiler Kraftzuwachs. In manchen Messungen beobachtet man dann noch einen zweiten, sehr kurzen Bereich, in dem die Kraft gleich bleibt. Relaxiert man das Molekül im oder nach dem ersten Plateau, so beobachtet man eine Hysterese. Die Kraft sinkt im Plateau während der Relaxierung unter 65 pN. Erst wenn die End-End Distanz der DNA in etwa auf die ursprüngliche Konturlänge abgesunken ist, läuft die Kurve wieder mit der Streckungskurve zusammen.

Im Bereich von 20 bis 50 pN lässt sich der Verlauf erklären, wenn man annimmt, dass hier die chemischen Bindungen gedehnt werden. Das Verhalten der DNA im Plateau und darüber hinaus ist noch nicht endgültig geklärt.

Smith et al. [8] schlugen ein Modell vor, nach dem die DNA im Plateau einen Übergang von der B-DNA zu einer S-DNA (stretched DNA) vollzieht. Während des Übergangs findet eine Entwindung der DNA statt und der Basenpaarabstand steigt. Die Basenpaare bleiben aber bestehen, es sei denn es existieren

Strangbrüche. An diesen brechen die Basenpaare nach und nach auf. Bei der Relaxierung findet wiederum ein Übergang zurück zur B-DNA statt, wobei die aufgebrochenen Basenpaare langsam rekombinieren. Bei Kräften bis 120 pN hält nur noch ein einzelner Strang die DNA zusammen, daher verhält sich die dsDNA hier wie ssDNA (single stranded DNA). Oberhalb dieser Kräfte verhalten sich die beiden jedoch unterschiedlich, was das Modell nicht erklären kann. Weiterhin kann das Modell weder Länge und Höhe des Kraftplateaus noch die Existenz des zweiten Plateaus erklären.

Ein weiteres Modell zur Erklärung ist später in [9] vorgestellt worden. Bloomfield et al. beschreiben den Vorgang beim Überstrecken als „kraftinduziertes Schmelzen“ der Doppelhelix. Es bilden sich ab Beginn des Kraftplateaus nach

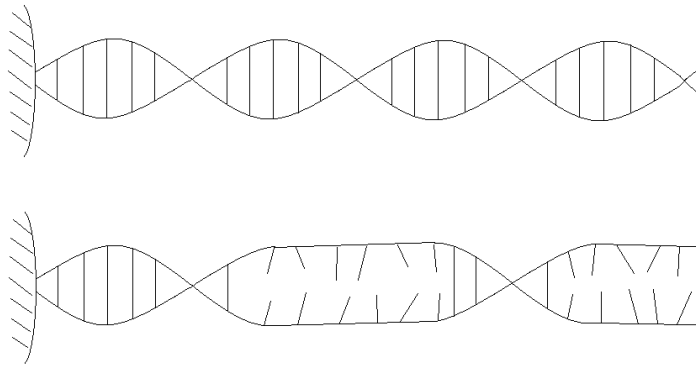


Abbildung 6: Nach dem Modell des Kraft-induzierten Schmelzens bilden sich beim Strecken über den entropischen Kraftbereich hinaus (unten) Domänen, in denen die Basenpaare aufgeschmolzen sind. Die DNA wird dadurch entwunden.

und nach nichthelikale Domänen aus, in denen die Bindungen zwischen den Basenpaaren aufgebrochen sind. Ein starkes Indiz dafür ist die Tatsache, dass bei einer DNA, welche nur aus GC-Basenpaaren besteht, das Überstreckungsplateau etwa 50% höher liegt als bei einer DNA aus AT-Paaren. Da Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft sind, besitzt dieses Basenpaar eine 50% höhere Enthalpie als AT mit zwei Basenpaaren. Durch das Entwinden erhöht sich die Konturlänge der DNA, sodass die Kraft in diesem Längenbereich kaum ansteigt. Sind auch die letzten verbliebenen helikalen Domänen geschmolzen, so steigt die Kraft wiederum steil an. Die Hysterese erklärt sich dadurch, dass einige geschmolzene Domänen zurückbleiben, da die Zeit zur Rekombination aller Bereiche nicht ausreicht.

Die beiden Modelle wurden dann in [2] überprüft, worauf einige neue Erkenntnisse folgten.

- Das Entwinden, welches zur Längenzunahme und damit zur Ausbildung des Plateaus führt, wird allein durch Strangbrüche in der DNA ermöglicht. Diese kann sich dann um die Einfachbindungen am noch intakten Strang

drehen. Solche Brüche sind in beinahe jedem DNA-Molekül vorhanden.

- Streckt und relaxiert man ein DNA-Molekül mehrmals, so sieht die Relaxierungskurve immer fast identisch aus. Zwei verschiedene Moleküle zeigen jedoch meist unterschiedliche Größen und Längen der Hysterese. Dies lässt auf einen Zusammenhang mit den Einzelstrangbrüchen schließen, da sich beide Moleküle nur durch deren Anzahl und Lage unterscheiden.
- Stoppt man während des Streckens im Plateau, so bleibt die Kraft zeitlich konstant. Hält man jedoch während des Relaxierens an, so steigt die Kraft in diskreten Schritten. Das Ansteigen selbst bedeutet, dass geschmolzene Bereiche wieder rekombinieren. Hätte man aber lediglich dissoziierte Basenpaare wie in dem Modell von Bloomfield, so ließe sich die Ratenabhängigkeit des Anstiegs nicht erklären. Die getrennten Basenpaare wären räumlich kaum getrennt und würden ratenunabhängig wieder zueinander finden, wie bei einem Reißverschluß. Eine wahrscheinlichere Ursache für die Hysterese ist daher, dass an den Strangbrüchen Einzelstränge abschmelzen. Die Ratenabhängigkeit könnte also von verschiedenen langen abgeschmolzenen Einzelsträngen liegen, die sich in der Flüssigkeit weit vom anderen Strang entfernen und sogar verknäulen können.

2.3 Interkalation

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Wechselwirkung von Liganden mit einem DNA-Molekül, das als Rezeptor fungiert. Dazu gehören die kovalente Bindung (Bindungsenergie ca. 220-930 kJ/mol) und das Binden in der großen oder kleinen Furche der Helix (groove binding). Letzteres wird stabilisiert durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen.

Wir betrachten hier allerdings hauptsächlich eine weitere Möglichkeit, die Interkalation. Interkalatoren sind Moleküle, welche sich zwischen benachbarte Basenpaare der dsDNA legen. Elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA leiten das Anbinden meist ein. Die interkalierenden Molekülteile sind meist flache Ringsysteme (Aromaten), deren annähernd keilartige Form rein intuitiv bereits vorteilhaft für die Interkalation erscheint (Schlüssel-Schloß-Prinzip). Tatsächlich wird die stabile Anbindung durch eine Reihe schwacher, nichtkovalenter Kräfte ermöglicht, die kurz charakterisiert werden sollen. Die Werte für die Bindungsenergien stammen aus [10].

- π -Stapelung: Hierunter versteht man die Überlappungen von Orbitalen der konjugierten π -Systeme von aromatischen Molekülen oder Molekülteilen. Dies tritt auf, wenn die Aromaten übereinander liegen (oder „gestapelt sind“). Die Teilung der Elektronen ist energetisch günstiger für das Gesamtsystem.
- Van-der-Waals-Kräfte (0,4-4 kJ/mol): Die Aussage, dass ein Atom ungeladen ist (Ladung der Elektronen und des Kerns heben sich auf) ist nur im zeitlichen Mittel richtig, da die Elektronen ja keinen festen Platz haben,

sondern innerhalb eines gewissen Bereichs (Orbitals) eine von Null verschiedene Aufenthaltswahrscheinlichkeit haben [11]. Dies ermöglicht die Entstehung von momentanen Dipolmomenten in Atomen bzw. Molekülen, durch die in einem benachbarten Atom wiederum ein Dipolmoment induziert werden kann. Zwischen den beiden Atomen entsteht so eine anziehende Wechselwirkung mit dem van-der-Waals-Potential $V_{\text{vdW}} \propto r^{-6}$. Das gesamte Potential zwischen den beiden Atomen muss aber noch um einen empirisch gefundenen, abstoßenden Teil erweitert werden. Man erhält das Lennard-Jones-Potential $V(r)$.

$$V(r) = \frac{b}{r^{12}} - \frac{a}{r^6} \quad (9)$$

- Wasserstoffbrückenbindungen (12-30 kJ/mol): Dies ist eine Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen oder Teilen eines Makromoleküls, die jeweils über ein stark elektronegatives Atom verfügen (meist O, N oder F). Ein Wasserstoffatom muss an dieses Atom kovalent angebunden sein. Das gemeinsame Elektronenpaar wird stärker vom elektronegativeren Atom angezogen, so dass das Wasserstoffatom eine positive Partialladung trägt. Es bilden sich also Dipole, deren elektrostatische Kräfte zu einer Ausrichtung und gegenseitigen Anziehung führen.
- Hydrophobe Wechselwirkung (bis 40 kJ/mol): Unpolare Stoffe sind schlecht in polaren Flüssigkeiten wie Wasser löslich. Die Wassermoleküle bilden Clathrat-Käfige um die unpolaren Moleküle, was aber die Ordnung des Wassers erhöht, also entropisch ungünstig ist [12]. Daher neigen die unpolaren Stoffe zur Aggregatbildung, wodurch weniger Gesamtoberfläche mit der Flüssigkeit in Kontakt ist und die Entropie des Systems erhöht wird.

In vielen Fällen binden nicht interkalierende Molekülteile zusätzlich in der großen oder kleinen Furche. Notwendig für die Bindung ist stets, dass DNA und Liganden bezüglich der räumlichen Verteilung elektrostatischer Ladungen und hydrophober bzw. hydrophiler Bereiche zusammenpassen. Die Liganden und Teile des Rezeptors sind jedoch meist so flexibel, dass sie durch Konformationsänderungen in eine vorteilhafte Struktur übergehen können.

Infolge der Interkalation eines Liganden-Moleküls erhöht sich die Konturlänge der DNA um 0,34 nm [13], da die Basenpaare durch den Interkalator auseinandergedrückt werden. Dabei kann jedoch nicht jede Bindungsstelle besetzt werden (Ausschlußprinzip [14]). Zwischen zwei Interkalatoren muss immer mindestens ein Basenpaar unbesetzt bleiben.

Befinden sich nun Liganden (I) in einer gewissen Konzentration in der Umgebung des Rezeptors (R), so werden nicht zwangsläufig alle Bindungsstellen mit der Zeit abgesättigt. Vielmehr handelt es sich bei der Bildung eines Ligand-DNA-Komplexes (IR) um einen dynamischen Prozess aus Assoziation und Dissoziation. Nach dem Massenwirkungsgesetz stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein, charakterisiert durch die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation

K_D (10).

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{[I] \cdot [R]}{[IR]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (10)$$

$[I]$, $[R]$ und $[IR]$ sind dabei die Konzentrationen der Liganden, der Rezeptoren und des Komplexes aus beiden in einer Lösung, k_{on} und k_{off} sind die Übergangsraten der Reaktion $I + R \rightleftharpoons IR$. Je höher die Konzentration der Liganden ist, desto mehr sind also auch im Mittel an die Rezeptoren angebunden.

Möchte man die Bindungseigenheiten eines Komplexes aus Interkalatoren und DNA untersuchen, so kann man das Massenwirkungsgesetz (10) wie in [14] modifizieren.

$$K_A = \frac{[\text{besetzte Interkalationsstellen}]}{[\text{unbesetzte Interkalationsstellen}][\text{freie Interkalatoren}]} \quad (11)$$

Die eckigen Klammern drücken auch hier die jeweiligen Konzentrationen aus. Die Anzahl besetzter Interkalationsstellen N lässt sich aus der Längenzunahme berechnen. Sie lässt sich durch $N = \frac{L-L_0}{a}$ ersetzen, wobei L_0 die ursprüngliche und L die Konturlänge nach der Interkalation bezeichnet. a steht für die Längenzunahme pro interkaliertem Molekül. Damit lässt sich Gleichung (11) umformen zu Gleichung (12).

$$K_A = \frac{\left(\frac{L-L_0}{a}\right) [DNA]}{\left(\left(\frac{[DNA]B}{n}\right) - \left(\frac{L-L_0}{a}\right) [DNA]\right) \left(I_0 - \left(\frac{L-L_0}{a}\right) [DNA]\right)} \quad (12)$$

I_0 ist die totale Konzentration an Interkalatoren, B die Anzahl Basenpaare der DNA und n die Ausschlusszahl. Sie drückt aus, dass maximal jede n -te Interkalationsstelle besetzt werden kann und hängt von dem jeweiligen Interkalator ab.

Bei nur einem DNA-Molekül ist die Angabe einer Konzentration nicht zweckmäßig. Man kann aber davon ausgehen, dass nur ein kleiner Bruchteil der Interkalatoren im Flüssigkeitskanal überhaupt an der Interkalation beteiligt ist. Daher lässt die Konzentration freier Interkalatoren näherungsweise mit der totalen Konzentration gleichsetzen. Kürzt man außerdem $[DNA]$, so erhält man Gleichung (13).

$$K_A = \frac{\frac{L-L_0}{a}}{\left(\left(\frac{B}{n}\right) - \left(\frac{L-L_0}{a}\right)\right) I_0} \quad (13)$$

2.4 Fluoreszenz

Da mit YO-1 und YOYO-1 zwei fluoreszente Farbstoffe benutzt werden, lohnt es sich, das Prinzip der Fluoreszenz kurz zu schildern.

Fluoreszenz ist wie auch die verwandte Phosphoreszenz ein Prozess, der auftritt, wenn Atome oder Moleküle von Fluorophoren aus einem angeregten Energiezustand unter Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehren. Veranschaulicht wird dies traditionell durch ein Jablonski-Diagramm wie in Abb. 7. Fluoreszenz findet zwischen Singulett Zuständen statt. Diese zeichnen sich

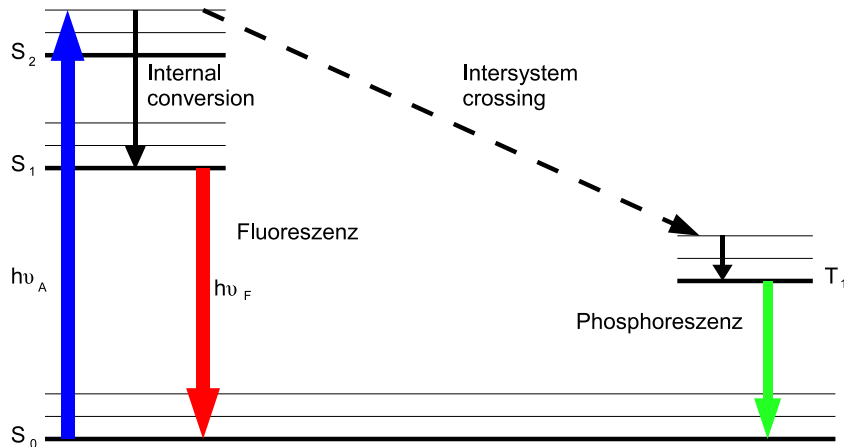


Abbildung 7: Das Jablonski-Diagramm zeigt die Übergänge, die infolge der Anregung von Molekülen in Fluorophoren auftreten können.

durch antiparallele Spins der Elektronen aus. Aus dem Grundzustand S_0 kann ein Fluorophormolekül durch Absorption eines Photons der passenden Energie $h\nu_A$ in einen höheren Singulettzustand angeregt werden. Von dort aus gelangen angeregte Elektronen durch strahlungslose Prozesse (internal conversion) auf das Niveau des ersten angeregten Singulettzustands S_1 herab. Alternativ ist bei einigen Substanzen auch ein Übergang (intersystem crossing) zum ersten angeregten Triplettzustand T_1 möglich, in dem die Elektronenspins parallel sind. Vom Zustand S_1 ist ein Übergang zum Grundzustand unter Emission eines Photons der Energie $h\nu_F$ möglich, wobei man von Fluoreszenz spricht. Die Energie der emittierten Photonen ist dabei kleiner als die der absorbierten (Stokesche Regel). Findet dieser Übergang hingegen vom ersten Triplettzustand zum Grundzustand statt, so nennt man dies Phosphoreszenz. Die Lebensdauer der Fluoreszenz, also die Zeit die ein Elektron im Mittel im ersten angeregten Zustand vor der Emission verbleibt, ist sehr kurz. Sie liegt in der Größenordnung von 10^{-8} Sekunden. Die Lebensdauer der Phosphoreszenz ist deutlich höher. Sie kann zwischen 10^{-3} und 10^2 Sekunden liegen. Daher können phosphoreszierende Farbstoffe nach der Anregung noch recht lange leuchten.

Eine Kenngröße für die Effektivität eines fluoreszenten Farbstoffes ist die Quantenausbeute Q . Sie ist definiert als die Anzahl der absorbierten Photonen durch die Anzahl der emittierten. Es gilt also $Q \leq 1$. Die Anregung erfolgt normalerweise nicht nur bei einer scharfen Bande im Absorptionsspektrum, sondern

ist in einem gewissen Wellenlängen-, bzw. Energiebereich möglich. Die Verteilung besitzt jedoch oft ein deutliches Maximum, an das die Wellenlänge der zur Anregung benutzten Lichtquelle möglichst nah herankommen sollte.

2.5 Peltier-Effekt

Betrachten wir abwechselnd angeordnete Blöcke zweier Metalle, deren Leitungsbander auf unterschiedlichen Energieniveaus liegen, und die durch ebenfalls metallische Kontakte verbunden sind. Leitet man einen elektrischen Strom durch

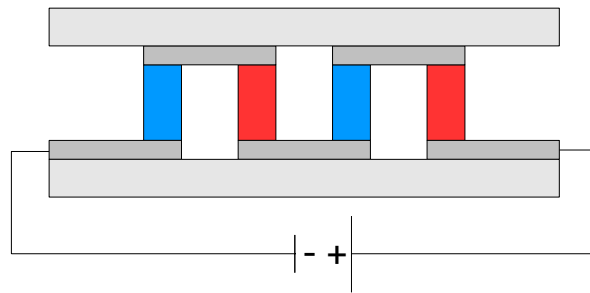


Abbildung 8: Zum Peltier-Effekt: Zwei Metalle (rot bzw. blau) in abwechselnder Reihenfolge, verbunden durch Kontakte (dunkelgrau)

die Kontakte, so wird an der einen Kontaktstelle Wärme aufgenommen, damit ein Elektron in das energetisch höher gelegene Leitungsband des Nachbarblocks gelangen kann. Der Metallkontakt wird bei dem Vorgang also abgekühlt. An der anderen Kontaktstelle wird Wärme abgegeben, während das Elektron auf ein tieferes Energieniveau fällt, das Metall wird erhitzt. So entsteht durch den angelegten Strom eine Temperaturdifferenz zwischen den Metallkontakten beider Seiten. Dies bezeichnet man als Peltier-Effekt.

Ein Bauteil, das diesen Effekt ausnutzt ist das Peltier-Element. Neben der oben beschriebene Anordnung besteht es noch aus zwei Keramikplatten, die zur elektrischen Isolation auf den Metallkontakten aufgeklebt sind. Optimalerweise sollten die verwendeten Metalle gute elektrische, aber schlechte thermische Leiter sein. Dies erreicht man am besten durch den Einsatz von dotierten Halbleitern. Wie tief man die kalte Seite abkühlen kann, hängt im Wesentlichen davon ab, wie schnell die auf der warmen Seite entstehende Wärme abgeführt wird. Warme und kalte Seite lassen sich durch Umpolung leicht vertauschen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Messaufbau

In dieser Arbeit werden beide Optischen Pinzetten (kurz OP) benutzt, die in der Arbeitsgruppe vorhanden sind. Beide basieren auf einem „Axiovert 100“ Mikroskop, das auf einem schwingungsgedämpften Tisch („Melles Griot“) aufgeschraubt ist. Nachfolgend wird der Aufbau der neueren Pinzette beschrieben. Abb. 9 zeigt eine Skizze des Aufbaus.

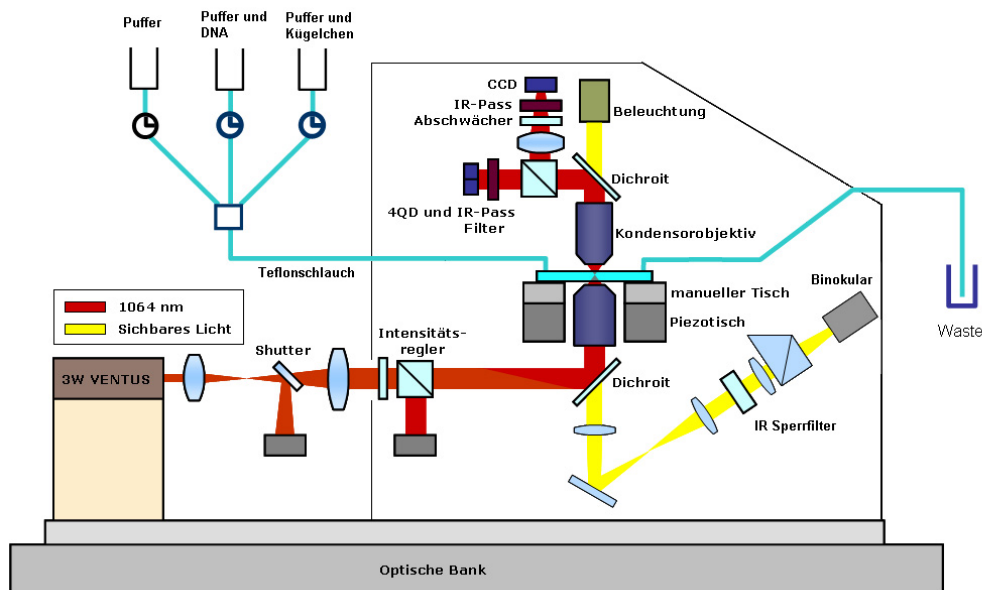


Abbildung 9: Schematische Zeichnung des Versuchsaufbaus der neueren Optischen Pinzette in D1-258

Ein Nd:YAG-Laser („Quantum - mpc6000“) liefert infrarotes Licht für die optische Falle. Er emittiert kontinuierlich (cw) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1064\text{nm}$. Der Strahl wird aufgeweitet, mit einem dichroiden Spiegel auf ein Objektiv geleitet und dann von diesem fokussiert, sodaß der Brennpunkt innerhalb der Flüssigkeitszelle liegt. Anschließend wird er durch ein zweites Kondensatorobjektiv wieder defokussiert und durch einen zweiten Dichroit auf eine 4-Quadrantendiode gelenkt. Wird ein gefangenes Kügelchen durch eine äußere Krafteinwirkung etwas aus der Falle ausgelenkt, so verschiebt sich der Strahlkegel in gleichem Maße. Diese Verschiebung wird von der Quadrantendiode als Spannungsdifferenz gemessen und kann vom PC in ein Kraftsignal umgerechnet werden. Da wie bereits erwähnt auch zwischen Kraft und Auslenkung ein linearer Zusammenhang besteht, lässt sich das von der Quadrantendiode gemessene Spannungssignal einfach durch Multiplikation mit dem passenden Faktor in die Kraft umrechnen, welche die Auslenkung hervorgerufen hat.

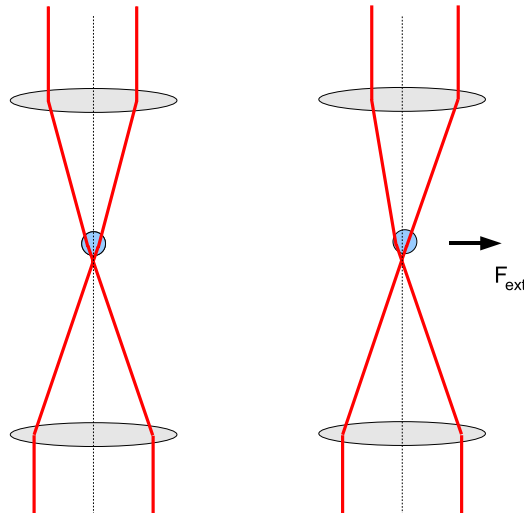


Abbildung 10: Eine externe Kraft F_{ext} auf das Kugelchen bewirkt eine Strahlverschiebung (rechtes Bild), die vom Quadrantendetektor als Spannungsdifferenz gemessen werden kann

Beide Objektive sind begrenzt in der Höhe verstellbar. Mit einer Lampe wird sichtbares Licht in umgekehrter Richtung durch die Objektive geschickt, damit der interessante Bereich der Flüssigkeitszelle über das Binokular beobachtet werden kann. Das Bild kann auch über eine CCD-Kamera ausgelesen und an einem Fernseher oder PC dargestellt werden. Die Zelle ist auf einem Justagetisch befestigt, der wiederum auf einen Piezotisch („Piezosysteme Jena“) aufgesetzt ist. Der Justagetisch lässt sich mit zwei Verstellerschrauben in x- bzw in y-Richtung verschieben. Wesentlich feiner ist die Bewegung des Piezotisches, der vom PC über das LabView-Programm angesteuert werden kann. Auf diese beiden Arten kann die komplette Zelle relativ zur optischen Falle bewegt werden. Über zwei Teflonschläuche für Zu- und Ablauf wird die Flüssigkeitszelle mit mehreren Spritzen verbunden, die als Flüssigkeitsbehälter dienen. An der Zulaufseite befinden sich im Normalfall ein Gefäß, das nur PBS-Puffer enthält, eines mit λ -DNA Lösung und eines mit Polystyrenkügelchen, ebenfalls in Pufferlösung. Dieser Puffer besteht aus einer Tablette PBS (phosphate buffered saline, „Fluka Chemie GmbH“), die in 200 ml entsalztem Wasser (MilliQ) gelöst wird. Zusätzlich wird der Lösung 1 mM¹ EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, „Sigma-Aldrich“) zugefügt, da diese Kationen bindet, die für die Funktion vieler Enzyme essentiell sind. So kann die Vermehrung von Bakterien verhindert werden. Auf der anderen Seite des Aufbaus befindet sich lediglich ein Auffanggefäß für die durchgelaufene Flüssigkeit. Alle Gefäße sind über Ventile verschließbar. Der Fluß durch die Zelle wird ohne zusätzliche Maßnahmen nur durch hydro-

¹Die Einheit [M] bezeichnet die Molarität oder Stoffmengenkonzentration und wird hier ankürzend für [mol/l] verwendet

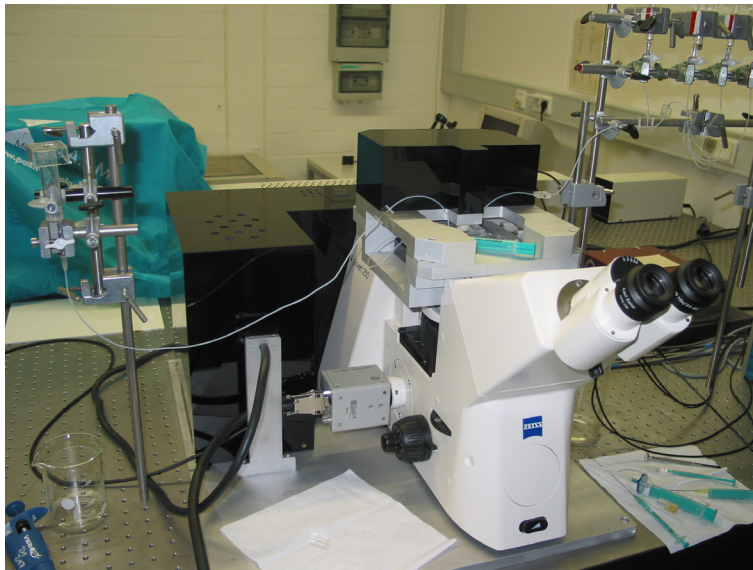


Abbildung 11: Foto des Aufbaus der neueren OP

statischen Druck erzeugt, da die Zulaufgefäße höher liegen als die Zelle und diese wiederum höher als das Ablaufgefäß.

Der Aufbau der älteren Optischen Pinzette ist ähnlich, unterscheidet sich aber in einigen Punkten. So gibt es hier kein oberes Objektiv, welches präzise zum

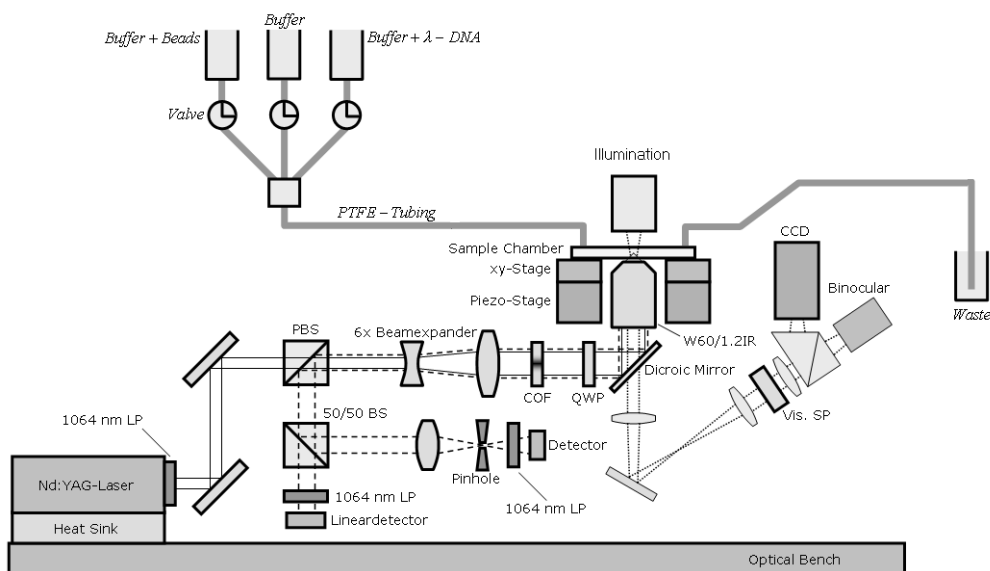


Abbildung 12: schematischer Aufbau der älteren OP in D1-211

unteren ausgerichtet werden müsste. Die Auslenkung eines gefangenen Objektes und damit die wirkende Kraft wird hier mit Hilfe des rückgestreuten Laserlichtes gemessen. Außerdem lässt sich der Piezotisch dieses Aufbaus mit geringeren Geschwindigkeiten ab 100 nm/s bewegen, und zwar nicht nur in x- und y-Richtung, sondern in begrenztem Maße auch in z-Richtung, also in der Höhe. Dies ermöglicht die Durchführung von Messungen in z-Richtung, welche mit der neueren Pinzette nicht möglich sind.

Entscheidend hierfür ist ein neuartiges Detektionssystem. Der linear polarisierte Laserstrahl passiert einen long-pass (LP)-Filter, einen polarisierenden Strahlteiler (polarising beam splitter - PBS) und anschließend eine Lambda/4-Platte (QWP). Diese wandelt das Licht in rechtszirkular polarisiertes um. Durch das Fallenobjektiv trifft das Licht nun auf das gefangene Teilchen, wobei die Zirkularität des rückgestreuten Anteils umgedreht wird. Beim erneuten Passieren der Lambda/4-Platte wird das Licht wieder linear polarisiert, jedoch mit einer nun um 90° gedrehten Polarisationsrichtung. Dies ermöglicht es, das rückgestreute Licht durch den polarisierenden Strahlteiler nahezu komplett auszulenken. Durch einen Strahlteiler (50/50 BS) wird die Hälfte des Lichtes ausgelenkt, um Kräfte in x- und y-Richtung detektieren zu können. Der Detektor erzeugt ein signal proportional zur lateralen Auslenkung des Strahls. Die andere Hälfte wird genutzt, um Kräfte in z-Richtung messen zu können.

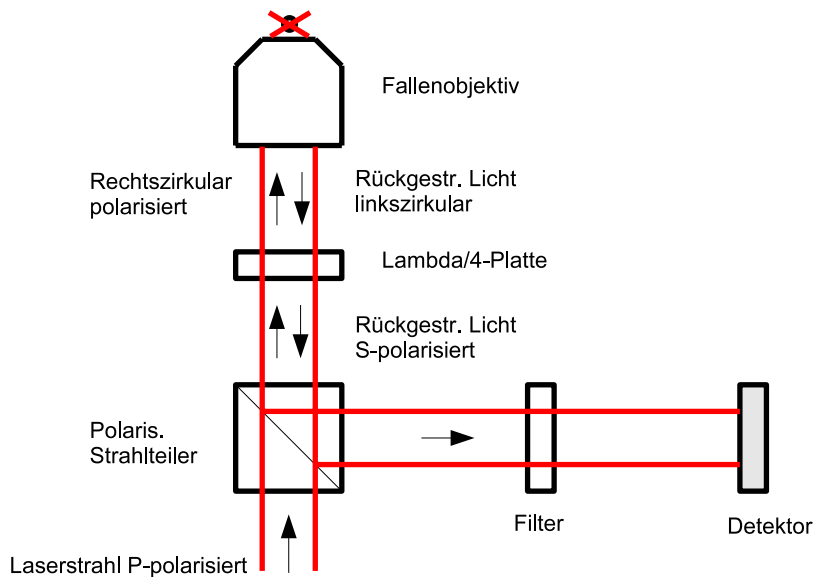


Abbildung 13: Prinzip der Auslenkung des rückgestreuten Lichts

Wird ein Objekt durch eine äußere Kraft ein wenig nach unten bzw. oben aus der Falle ausgelenkt, so verkleinert bzw. vergrößert sich der Winkel des Strahlkegels des rückgestreuten Lichtes gegenüber dem Strahlkegel, wenn keine äußere Kraft

wirkt. Es trifft also weniger bzw. mehr Licht auf das Fallenobjektiv und daher erreicht letztlich auch weniger bzw. mehr Licht den Lineardetektor. Da das räumliche Filtern mittels eines Pinholes nicht ausreicht, um rückgestreutes Licht zu unterdrücken, welches nicht vom gefangenen Kügelchen kommt, wird hier eine neue Art von räumlichem Filter eingeführt. Diese „Obstruktion“ (COF), die einfach aus einer dünnen Goldschicht besteht, müssen sowohl einfallender wie auch rückgestreuter Strahl passieren, wobei der Mittelteil des Strahls ausgefiltert wird. Liegt der Ursprung des rückgestreuten Lichts jenseits der Falle auf der optischen Achse, so konvergiert es nach Durchtritt durch das Objektiv. Lag der Ursprung hingegen näher, so divergiert es. Konvergente Strahlen werden aufgrund ihres verringerten Durchmessers komplett durch die Obstruktion ausgefiltert. Vom divergenten Licht bleibt ein Teil im Strahlengang, jedoch mit einer sehr geringen Intensität. Das vom Kügelchen rückgestreute Licht wird natürlich auch von dem Filter beeinflusst, der Strahlkegel ist aber so breit, dass nicht alles ausgefiltert wird. Gleiches gilt für das ursprüngliche Laserlicht auf dem Hinweg, sodass letztlich die Stärke der Falle etwas abnimmt. Es sind aber gerade die achsenfernen Teile des Strahlenbündels, welche den größten Teil zur Gradientenkraft beisteuern.

3.2 Die alte Flüssigkeitszelle

Der wichtigste Teil der bereits in [1] beschriebenen Flüssigkeitszellen ist der Flüssigkeitskanal. Dieser wird einfach in zwei Lagen Parafilm („Pechiney Plastic Packaging“) geschnitten, die zwischen zwei 160 μm dicke Deckgläschen gelegt und verbacken werden. Solange der Parafilm warm und somit weich ist, wird außerdem eine Mikropipette längs in den Kanal gelegt. Diese Pipette basiert auf einer Glaskapillare von 0,15 mm Durchmesser („Garner Glass Co.“), deren Ende mit Hilfe eines Pipettenziehgerätes („Sutter Instrument Co.“ - Model P2000) zu einer Spitze mit etwa 1,5 μm Durchmesser gezogen wird. Im oberen Deckgläschen sind zuvor zwei kleine Löcher für Zu-, und Ablauf gefräst worden. Über die Löcher werden zwei Blöcke aus Plexiglas geklebt, in die je ein 1,6 mm großes Loch gebohrt ist, damit Teflonschläuche („Bohlender GmbH“) des gleichen Außendurchmessers hineinpassen. Diese Schläuche werden dann mit dem Flüssigkeitssystem verbunden. Das ganze wird auf einem Gestell aus Deckgläsern befestigt, damit die Zelle im Aufbau festgeklemmt werden kann. Um mit der Mikropipette Kügelchen ansaugen zu können, wird über das Ende der Pipette, die aus der Zelle herausragt, ein dickeres Glasröhrchen gesteckt und verklebt. Nun lässt sich ein weicher Silikonschlauch darüber stülpen, der mit einer Spritze samt Kanüle verbunden ist.

3.3 Bau einer neuen Flüssigkeitszelle

Innerhalb der Arbeit sollte versucht werden, eine neuartige Flüssigkeitszelle zu entwerfen. Diese soll den Vorteil haben, nicht verklebt werden zu müssen, damit man nachträglich Teile austauschen oder herausnehmen kann.

3.3.1 Herstellung von PDMS-Schichten

Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein Polymer auf Siliziumbasis, welches farblos und optisch transparent ist. Im Normalzustand handelt es sich um eine zähflüssige Substanz. Wird das PDMS jedoch mit einer Flüssigkeit vermischt, die als Vernetzer (Linker) dient, so wird es innerhalb einiger Tage, bzw. bei Temperaturen um 80°C innerhalb ca. einer Stunde gummiartig fest. In diesem Zustand klebt es gut reversibel an festen Stoffen, vor allem an anderen PDMS-Schichten, Glas und Plexiglas. Je niedriger die Linkerkonzentration in der Mischung ist, umso klebriger wird das PDMS letztlich. Standard ist eine Mischung aus 10 Massenanteilen Basispolymer und einem Teil Linker.

Aufgrund der Tatsache, dass PDMS dicht an Glas anhaftet, sich aber trotzdem noch leicht abziehen lässt, bietet es sich als Material für eine aufklappbare Flüssigkeitszelle geradezu an. Anstelle des Parafilms in der alten Zelle sollen nun also zwei Schichten PDMS hergestellt werden, die einen Kanal enthalten und in die eine Mikropipette von $150\ \mu\text{m}$ Durchmesser eingelegt werden kann. Will man bestimmte Strukturen auf einer PDMS-Schicht haben, so benötigt man ein passendes Negativ, welches dann mit dem Polymer übergossen wird, bevor es aushärtet. Ein erstes Problem zeigte sich bei der Überlegung über sinnvolle Schichtdicken. Da das untere Mikroskopobjektiv nicht beliebig weit hochfahrbar ist, darf die untere PDMS-Lage nur etwa $170\ \mu\text{m}$ dick sein, muss aber auch eine Vertiefung für die Mikropipette enthalten, damit diese in passender Höhe in der Zelle liegt. Unterhalb dieser Vertiefung sollte also nur eine $20\ \mu\text{m}$ dünne Schicht übrig bleiben.

Damit die Pipette später möglichst genau und somit dicht in die Vertiefung passt, sollte diese ihrer Form möglichst gut angepasst sein. Daher liegt es nahe, als Negativ ein Glasröhrchen zu nehmen, aus dem eben diese Pipetten auch gezogen werden. Problematisch ist nun, das Röhrchen auf einer möglichst glatten Oberfläche zu befestigen, sonst würde das PDMS dazwischen fließen. Erfolg brachte letztlich folgende Methode. Man nimmt als Unterlage einen Objektträger und klebt die Kapillare darauf fest. Da normaler Kleber sich aber nicht so gleichmässig verteilt, trägt man SU-8(5) Photolack per Spincoating auf dem Objektträger auf. Bei 2000 rpm für 30 Sekunden, wird die Lackschicht wenige μm dick. Das Röhrchen wird nun einfach aufgelegt und man lässt den Lack durch Erhitzen festwerden.

Wichtig ist als nächstes die Frage, wie man die passende Schichtdicke erreicht. Ein erster Versuch, das PDMS ebenfalls mit Spincoating aufzutragen, zeigte sich als zu unzuverlässig. Die dabei erreichte Schichtdicke hängt nicht nur von der Umdrehungszahl, sondern auch von Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit ab [15], und so konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Auch funktioniert es nicht, den Objektträger in eine Petrischale zu legen und diese mit einer passenden Menge PDMS zu füllen, sodass sich die entsprechende Füllhöhe ergeben würde. Aufgrund seiner zähen Konsistenz verteilt sich das Polymer nicht gleichmässig über dem Objektträger, die Schichtdicke ist hierfür zu gering. Es bleibt die Methode, eine größere Menge PDMS auf dem Glasträger aufzubringen und dann ein zweites Gläschen darauf festzuklammern, wobei die

Dicke von $170\ \mu\text{m}$ durch passende Abstandshalter zwischen den Gläsern erreicht wird. Da eine derart dünne Schicht beim ersten Lösen vom Glas recht leicht reissen kann, stellte es sich als vorteilhaft heraus, beide Objektträger zu silanisieren. Hierbei wird der Objektträger zusammen mit einer kleinen Menge einer Silanverbindung ((Tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl)trichorosilane, „ABCR GmbH & Co. KG“) in einen Exsikkator gestellt, in dem daraufhin ein Vakuum erzeugt wird. Das Silan verdampft im Vakuum und setzt sich auf der Glasoberfläche ab. Dadurch verringert sich die Fähigkeit des Glases, an das PDMS zu binden, spürbar. Das Ergebnis der Prozedur ist eine Vertiefung, die beinahe genau der Form einer Glaskapillare entspricht. Der Durchmesser des Röhrchens ist ein wenig größer als die Tiefe der Schicht, jedoch ist das PDMS aufgrund seiner Flexibilität trotzdem dicht, wenn es zusammengedrückt wird.

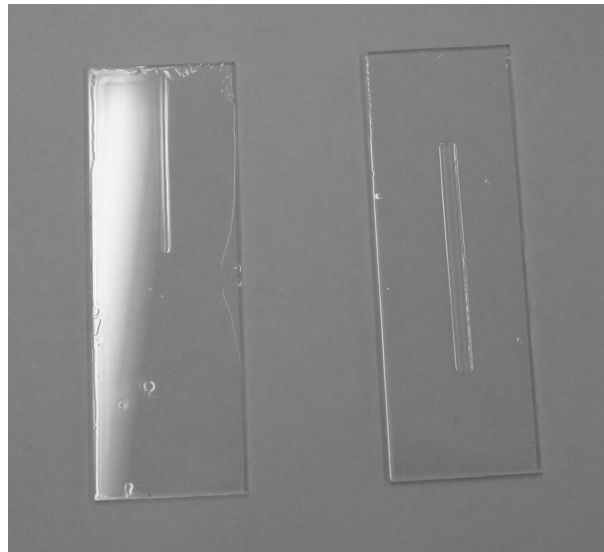


Abbildung 14: Negative, die später mit PDMS „abgegossen“ werden; links für die untere PDMS-Schicht, rechts für die obere

Für die obere Lage ist deutlich mehr Platz vorhanden. So erschien eine Dicke von etwa $500\ \mu\text{m}$ sinnvoll. Der Flüssigkeitskanal soll höher als $170\ \mu\text{m}$ sein. Im unteren PDMS wird dafür einfach eine Fläche von $4\ \text{cm} \times 1,5\ \text{mm}$ herausgeschnitten. In der oberen Schicht soll jedoch die Umgebung des Bereichs, in

den später die Schläuche für Zulauf und Ablauf hineinragen, nicht ausgeschnitten werden. Man möchte also zunächst eine Vertiefung in Form des Kanals, die nicht durch die komplette Schicht reicht. Dies kann man erreichen, indem man wiederum ein passendes Negativ erstellt. Um eine entsprechende Erhebung auf einem Objektträger zu erhalten, schneidet man beispielsweise ein $140\ \mu\text{m}$ dickes Deckgläschen mit einem herkömmlichen Glasschneider zurecht und klebt es ähnlich wie das Glasröhrchen mit einer dünnen, gleichmässigen Lackschicht auf.

Da das PDMS jedoch den Strahlengang des Lasers stören würde, muss in der Mitte der Schicht doch ein Teil des Kanals von 2 cm Länge komplett ausgeschnitten werden. Weiterhin benötigt man noch zwei Deckgläschen. Auf ein $24\ \text{mm} \times 60\ \text{mm}$ großes Gläschen werden die beiden PDMS-Schichten aufgelegt, sodaß der Kanal mittig auf dem Glas verläuft. Das zweite Deckgläschen wird auf $24\ \text{mm} \times 30\ \text{mm}$ angepasst und auf die obere Lage gelegt, sodaß der Einschnitt abgedeckt ist.

3.3.2 Rahmen der Flüssigkeitszelle

Da die einzelnen Komponenten der neuen Flüssigkeitszelle nicht verklebt werden sollen, muss man sie zusammendrücken, damit PDMS und Glasschichten dicht aufeinander liegen. Zu diesem Zweck wurde ein Rahmen aus einer

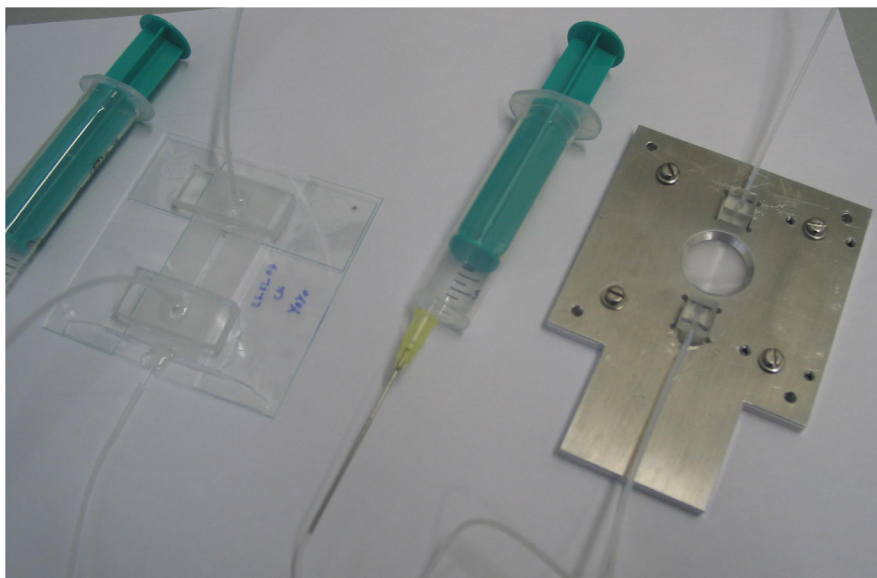


Abbildung 15: Bild einer Flüssigkeitszelle des alten Typs (links) und der neuen Zelle (rechts)

Aluminium-Legierung anfertigen lassen, der entsprechende Vertiefungen für die Zelle enthält. Der Rahmen besteht aus zwei Teilen, die aufeinandergeschraubt werden. Je eine große Öffnung liegt in der Mitte beider Teile, damit der Laser ungehindert passieren kann. In diesem Bereich finden die Messungen statt. Daneben befinden sich zwei kleine Öffnungen für die Teflonschläuche. An der Seite ist eine weitere Öffnung für ein 1,5 mm durchmessendes Glasröhrchen, mit dem die Mikropipette verklebt wird. Außen wird dann ein Schlauch auf das Röhrchen aufgestülpt und mit einer Spritze verbunden, um den Druck der Pipette regeln zu können.

3.4 Biotinylierung von λ -DNA

Die λ -DNA, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, wird prinzipiell in der Arbeitsgruppe selbst biotinyliert. Die zugrunde liegende Versuchsvorschrift dazu ist recht simpel und soll im Folgenden kurz beschrieben werden. Die DNA (von „Promega Corp.“) liegt zunächst als Plasmid, also ringförmig vor. Um die Ringe aufzubrechen, wird sie etwa 5 Minuten bei 50°C erhitzt. Die DNA liegt jetzt als Strang vor, jedoch gibt es an beiden Enden je 12 überstehende einzelne Basen. Um die fehlenden Nukleotide aufzufüllen, werden sie in Form der Triphosphate dATP, dGTP und dTTP („Amersham Biosciences Ltd.“) zugegeben, das dCTP („Gibco BRL - Invitrogen Corp.“) ist hingegen biotinyliert. Das Anknüpfen an die DNA-Stränge geschieht durch Hinzufügen einer Untereinheit der DNA-Polymerase von *E. coli* namens Klenow-Fragment („New England Biolabs Inc.“). Dies geschieht optimalerweise unter physiologischen Bedingungen, daher wird die gesamte Lösung 2 Stunden lang auf 37°C temperiert. Die DNA besitzt nun an beiden Enden Biotinmoleküle, sie ist also biotinyliert. Jedoch muss die Lösung noch gründlich gefiltert werden, um sie von Überresten an Nukleotiden und Klenow-Fragmenten, sowie sonstigen Verunreinigungen zu trennen. Dazu wird die Lösung in spezielle Filter („Amicon Micron - Millipore Corp.“) gegeben, die in kleine Kunststoffgefäße („Eppis“) eingesetzt werden, und dann mehrmals zentrifugiert. Dabei gelangen die Verunreinigungen durch den Filter, nur die DNA-Moleküle sind zu groß und bleiben hängen. Damit die DNA nicht austrocknet, wird vor jedem Zentrifugationsvorgang PBS-Puffer zugesetzt. Nach 6 Durchgängen sind die Verunreinigungen gut genug ausgewaschen. Nun wird der Filter umgedreht und in ein neues Gefäß gegeben. Anschließend wird wieder Puffer zugegeben und zentrifugiert, um die DNA vom Filter zu trennen.

3.5 Interkalatoren

3.5.1 YO-1 und YOYO-1

Beliebte Liganden sind Farbstoffmoleküle, welche durch Anregung mit Licht der passenden Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden können. In dieser Arbeit wird beispielsweise der Cyanin-Farbstoff oxazole yellow (YO-PRO-1, „Invitrogen“) verwendet. Außerdem wird YOYO-1 benutzt, ein Dimer von YO-1. YOYO-1 (ausgeschrieben: 1,1'-(4,4,7,7-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylene)-

bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro- (benzo-1,3-oxazole)-2-methylidene]-quinolinium tetraiodide) besitzt zwei Ringsysteme, die beide interkalieren können und wird daher als Bisinterkalator bezeichnet.

YO und YOYO gehören zur Verbindungsklasse der Polyene. Diese zeichnen sich durch abwechselnd auftretende Einzel- und Doppelbindungen aus, welche ein konjugiertes π -System im anregbaren (chromophoren) Teil des Farbstoffmoleküls bilden. Das bedeutet, dass die π -Molekülorbitale delokalisiert sind, wodurch der Abstand zwischen dem niedrigsten unbesetzten (LUMO) und dem höchsten besetzten (HOMO) Molekülorbital gering ist. Daher können die Elektronen mit relativ energiearmem Licht (im sichtbaren Bereich) zum Übergang in ein höheres Orbital angeregt werden. Die Energie wird kurze Zeit später in Form von Photonenemission (Fluoreszenz) und/oder strahlungslosen Prozessen abgegeben. YOYO ist ein beliebter Fluoreszenzmarker für DNA, da die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs etwa 1000fach höher ist als die des freien. Es besitzt außerdem eine sehr niedrige Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-12} M$. Im Komplex mit DNA liegt für YO wie auch für YOYO das Absorptionsmaximum bei $\lambda=489$ nm und das Emissionsmaximum bei $\lambda=509$ nm [16].

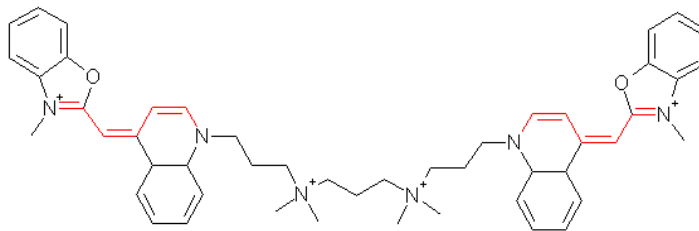


Abbildung 16: Strukturformel von YOYO-1. Die beiden Ringsysteme interkalieren mit der DNA, während der Mittelteil sich in die kleine Furche legt. Rot eingefärbt sind die konjugierten π -Systeme in den chromophoren Teilen.

3.5.2 Triostin A

Bei Triostin handelt es sich um ein Antibiotikum, welches aus Streptomyces-Bakterien gewonnen wird [19]. Es besteht aus 8 Aminosäuren, die einen Depsipeptid-Ring bilden (Abb. 18). Auf der Molekülaußenseite stehen sich zwei Quinoxalin-Ringe gegenüber, die an DNA interkalieren, wobei diese teilweise entwunden wird. Die Ringe sind annähernd senkrecht zum Depsipeptid ausgerichtet, sodass das Molekül die Form einer Klammer annimmt (siehe Abb. 18, rechtes Bild). Neben der Interkalation stabilisieren van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA und dem Peptid-Rückgrat die Komplexbildung. Wasserstoffbrücken, die sich speziell zwischen den Alanin-Residuen des Depsipeptid-Rings und Guanin ausbilden, sorgen dafür, dass Triostin bevorzugt an G-C-Paaren interkaliert. Die Dissoziationskonstante liegt für Triostin A in der Größenordnung $K_D \approx 10^{-6} M$ [20].



Abbildung 17: Dreidimensionale Struktur eines DNA-YOYO-Komplexes mit dem Programm VMD [17], anhand von Daten aus [18] erstellt. YOYO ist grau dargestellt, die beiden DNA-Stränge rot bzw. grün. Durch die Darstellung der Van-der-Waals-Radien der Atome in den Strängen (VDW-Darstellung) wird deutlich, dass die Interkalation in der kleinen Furche stattfindet.

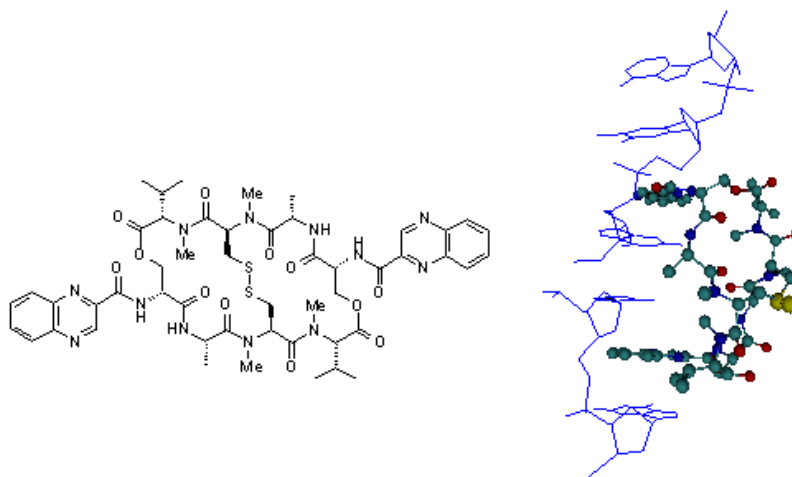


Abbildung 18: links: Strukturformel von Triostin A, rechts: dreidimensionale Struktur eines Triostin-DNA-Komplexes [18].

3.5.3 AzoTANDEM

TANDEM (genauer: des-N-Tetramethyl-Triostin A) ist eine Variante von Triostin A, bei der die Methylgruppen am Depsipeptid-Ring durch Wasserstoffatome ersetzt worden sind. In der Arbeitsgruppe Organische Chemie III an der Universität Bielefeld wurde dieser Stoff weiter modifiziert. Das Ergebnis

ist die Variante AzoTANDEM (Abb. 19), bei der die Disulfidbrücke durch eine Azobenzene-Gruppe ausgetauscht worden ist.

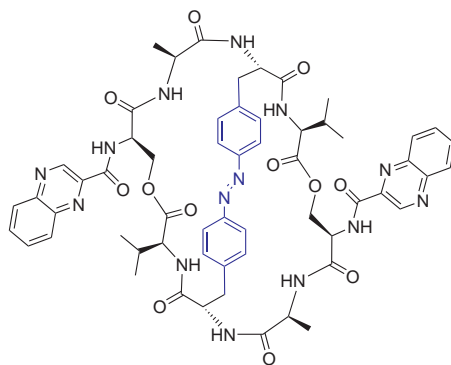


Abbildung 19: Strukturformel von AzoTANDEM: Blau hervorgehoben ist das Azobenzene, welches die Disulfidbrücke im Triostin ersetzt.

Das Interessante an diesem neuen Interkalator ist die Tatsache, dass in Azobenzenen reversible Photoisomerisation auftritt, was im Folgenden erklärt wird. In Azo-Farbstoffen wie Azobenzenen hat die Anregung durch Licht andere Auswirkungen als beispielsweise bei YOYO. Die Anregung von Elektronen in ein höheres Molekülorbital findet hier aufgrund der hohen Energiedifferenz im Normalfall nicht statt. Statt dessen kann das Azobenzene durch Bestrahlung mit Licht der passenden Wellenlänge seine räumliche Konfiguration vom *cis*- zum *trans*-Isomer und umgekehrt ändern (siehe Abb. 20), es lässt sich also „photoschalten“. Dieser Übergang kann nur an Doppelbindungen stattfinden, in diesem Fall diejenige in der Mitte des Moleküls. Betrachtet man die Doppelbindung als Grenze, so bedeutet *cis*, dass beide Ringe auf der gleichen Seite dieser Grenze liegen. Bei *trans* liegen sie entsprechend auf verschiedenen Seiten. Die Anregungsenergie wird nun darauf verwendet, die Doppelbindung kurzzeitig in zwei freie Radikale aufzulösen, damit sich das Molekül in die jeweils andere Konformation drehen kann. Anders ausgedrückt sind beide Zustände durch eine Energiebarriere getrennt, die durch die Energieaufnahme infolge der Anregung überwunden werden kann. Es ist nicht selbstverständlich, dass das Azobenzene auch nach dem Einbau in eine andere Struktur wie z.B. AzoTANDEM noch als Photoschalter fungiert. Dies muss erst getestet werden.

Bei normalem Weißlicht liegt ein Teil der Azobenzengruppen als *cis*-Azobenzene vor, der größere Teil jedoch als *trans*-Azobenzene. Der Grund dafür ist, dass der *cis*-Zustand etwas weniger stabil ist, so dass die Moleküle bei Raumtemperatur von selbst in *trans* zurück relaxieren können. Anders gesagt, die Energiebarriere, die jeweils überwunden werden muss, ist offenbar nicht in beiden Richtungen gleich groß. Werden die Farbstoffmoleküle jedoch mit Licht der Wellenlänge 360 nm bestrahlt, so geht der Großteil der Moleküle in *cis* über, bei 420 nm hingegen in *trans*.

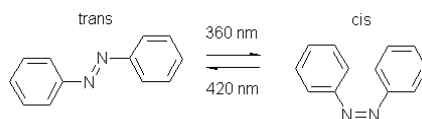


Abbildung 20: Azobenzene lässt sich durch Bestrahlung mit Licht der passenden Wellenlänge zwischen *cis* und *trans* hin- und herschalten.

3.5.4 Triostin-Varianten A-T und G-C

Ebenfalls wurden von der Arbeitsgruppe Org. Chemie III zwei weitere synthetisierte Varianten von Triostin A zur Verfügung gestellt, deren Eignung als Interkalator noch nicht nachgewiesen ist. Die Idee hinter diesen Varianten ist die Frage, ob sich die Purin-, und Pyrimidinbasen, welche in der DNA vorkommen auch als interkalierende Gruppen eignen. Die A-T-Variante ist durch

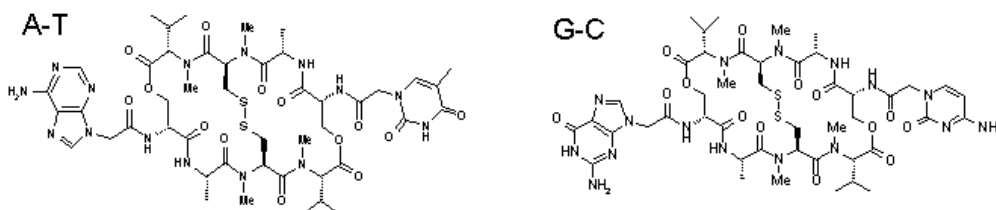


Abbildung 21: Die Triostin Varianten A-T und G-C basieren auf einer Ersetzung der Quinoxalin-Ringe durch die in DNA vorkommenden Purin-, bzw Pyrimidinbasen.

die Ersetzung der beiden Quinoxalin-Gruppen durch eine Adenin- und eine Thymin-Base entstanden. Die G-C-Variante besitzt hingegen nun Guanin- und Cytosin-Gruppen.

3.6 Das LabView Programm

LabView („National Instruments“) ist ein Programm, welches die Erstellung von Steuerprogrammen erleichtert. Jedes mit LabView erzeugte Programm, Virtuelles Instrument (VI) genannt, besteht aus zwei Fenstern. Im so genannten Blockdiagramm (Abb. 22) lässt sich das gewünschte Programm mit einer Art Baukastensystem zusammensetzen. So ist es zum Beispiel möglich, extern an den Computer angeschlossene Geräte auszulesen, die Daten weiterzuverarbeiten und schließlich darzustellen und zu speichern. Andererseits können angeschlossene Geräte auch angesteuert werden. Jedes Bedien-, oder Anzeigeelement hat im zweiten Fenster, dem Frontpanel (Abb. 23), eine Entsprechung, welche den Schaltflächen eines echten Messinstruments gleicht. So erscheinen Bedienele-

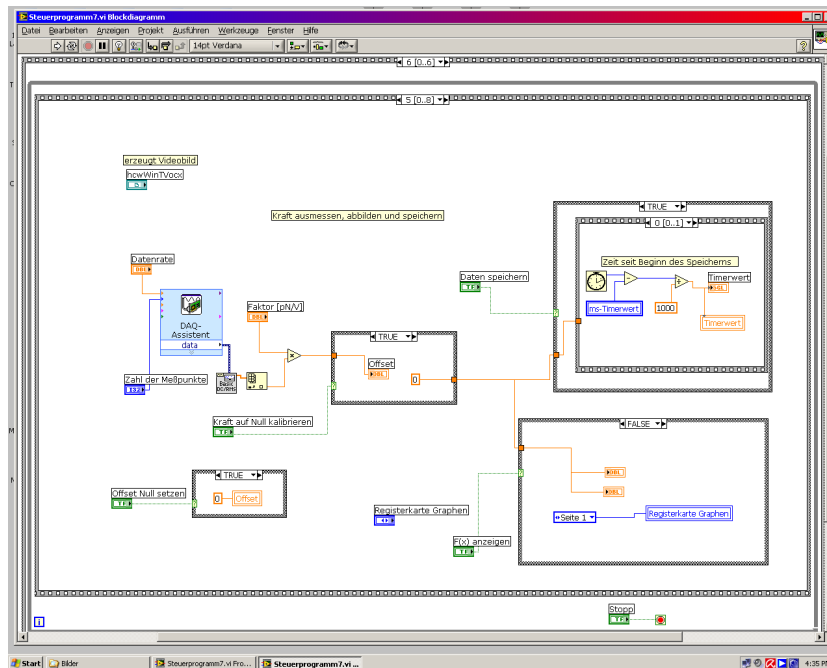


Abbildung 22: Das Blockdiagramm eines LabView-VI's ermöglicht das Programmieren mit Hilfe von vorgefertigten Elementen, wie ein Baukasten.

mente aus dem Blockdiagramm oft als Schalter oder Dreh-, und Schieberegler, Anzeigeelemente werden durch Füllstände oder Diagramme dargestellt, usw.

Für die neue Optische Pinzette war bereits ein rudimentäres LabView Programm vorhanden, welches im Rahmen der Arbeit erweitert und komfortabler gestaltet wurde. Über das VI lässt sich der Piezotisch ansteuern. Dies erfolgt über zwei Schieber für die x-, und y-Richtung. Die Geschwindigkeit der Bewegung lässt sich von 0,61 bis 2000 μm einstellen. Die einzelnen Aktionen laufen in einer Schrittfolge ab, die durch Rahmenstrukturen vorgegeben wird. Insgesamt läuft das Programm auf Endlosschleife, bis eine Bedingung, hier das Drücken eines Aus-Schalters, erfüllt ist. In jedem Durchlauf wird zum Beispiel die aktuelle Auslenkung des Piezotisches ausgelesen und bei Bedarf eine neue Soll-Position übermittelt. Auch wird das Spannungssignal ausgelesen, welches von der Quadrantendiode übermittelt wird, und mit einem einstellbaren Faktor multipliziert, um den entsprechenden Kraftwert zu erhalten. Das zeitliche Kraftsignal wird dann mit zwei Diagrammen dargestellt, wobei das obere eine kleinere Zeitspanne umfasst. Um den richtigen Umrechnungsfaktor zu finden, muss die Kraft kalibriert werden. Am einfachsten geht dies über die „drag force“ Methode. Hierbei wird ein Kügelchen in der Falle gefangen und die Kraft auf Null gesetzt. Nun bewegt man den Piezotisch mit einer bestimmten Geschwindigkeit. Über die Formel für die Stokes'sche Reibung (14) lässt sich die Kraft

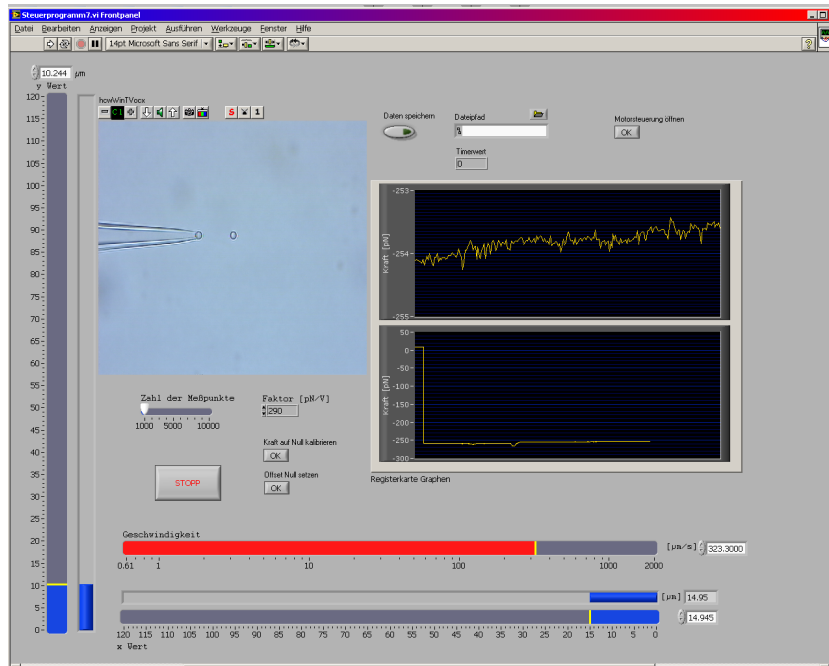


Abbildung 23: Frontpanel des LabView-Programms der Optischen Pinzette

berechnen, die dabei auf das Objekt wirken muss.

$$F = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (14)$$

Ursprünglich wurde die Ansteuerung des oberen Objektivs über ein zweites VI geregelt. Auch konnte darüber die Quadrantendiode bewegt werden, um das Kraftsignal auf Null zu setzen. Dieses Motorsteuerungsprogramm wurde in das eigentliche Steuerungsprogramm integriert. Da das Nullsetzen der Kraft mittels Bewegung der Diode recht umständlich ist, wurde eine Größe, der Offset, eingeführt, der von dem ausgelesenen Kraftsignal abgezogen wird. Über die Schaltfläche „Kraft auf Null setzen“ kann nun einfach der aktuelle Kraftwert in den Offset geschrieben werden. Weiterhin wurde es ermöglicht, dass das Videobild der im Mikroskop eingebrachten Kamera in LabView eingelesen und dargestellt wird. Auch lassen sich Bilder und kurze Videosequenzen speichern. Wird der Schalter „Daten speichern“ gedrückt, so werden nachfolgend in jedem Programmdurchlauf der Kraftwert, X-Wert und die Zeit seit Beginn des Speicherns in eine Textdatei geschrieben, um die Daten später weiterverarbeiten zu können. Eine automatisierte Kraftmessung, wie sie mit dem Programm der älteren OP möglich ist, ist noch im Entwicklungsstadium.

4 Messergebnisse und Auswertung

4.1 Temperaturabhängigkeit des Streckens

Der Standardvorgang beim Strecken einer λ -DNA zwischen zwei Polystyren-Kügelchen soll zunächst beschrieben werden. Puffer-Lösung mit Streptavidin-beschichteten Kügelchen von $3,28 \mu\text{m}$ Durchmesser („G. Kisker GbR“) wird in die Zelle geleitet. Eines davon wird gefangen und mit der Mikropipette im Kanal angesaugt. Ein zweites gefangenes verbleibt in der optischen Falle. Leitet man nun Pufferlösung mit λ -DNA ein, so kann man anhand eines charakteristischen Sprungs im Kraftsignal ein Anbinden an das gefangene Kügelchen feststellen. Dieses wird durch die Bindung zwischen dem Streptavidin am Kügelchen und dem Biotin an der DNA ermöglicht. Das im Strom der Flüssigkeit ausgestreckte DNA-Molekül zieht an dem Teilchen und bewirkt so eine um ca. 10 pN höhere Kraft auf dieses. Würde man jetzt die Ventile der Flüssigkeitsbehälter zudrehen, um den Fluss durch die Zelle zu unterbrechen, so würde das DNA-Molekül zurückschnellen und mit großer Wahrscheinlichkeit auch mit dem anderen Ende an das Kügelchen in der Falle binden. Daher lässt man die Ventile offen, während man die Pipette samt dem zweiten Kügelchen langsam annähert. Bei einem Abstand von $10\text{-}15 \mu\text{m}$ ist ein Anbinden zu erwarten. Durch vorsichtiges

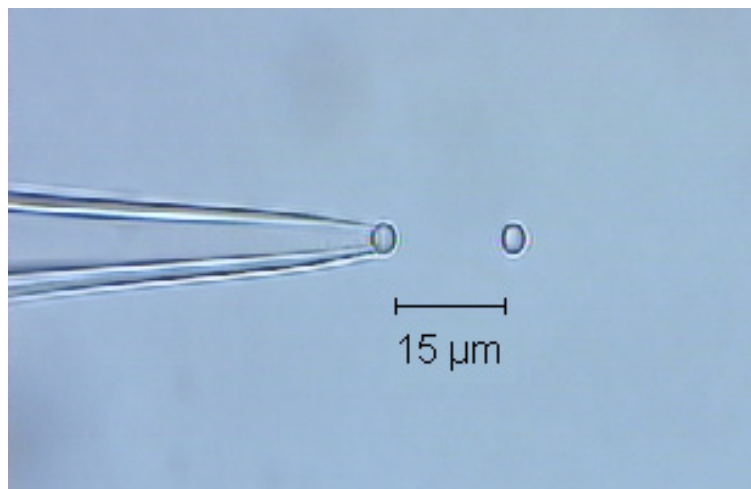


Abbildung 24: Videobild, das ein an der Mikropipette (links) angesaugtes und ein gefangenes Kügelchen zeigt.

Hin-, und Herfahren der Pipette kann man dies überprüfen. Zwar bewirkt die Bewegung der Pipette auf jeden Fall eine Veränderung der Strömung im Bereich der Falle und somit eine leichte Veränderung der angezeigten Kraft, diese Veränderungen sind jedoch klein im Vergleich zu den auftretenden Kräften beim Strecken der DNA, wenn diese tatsächlich an beiden Kugeln angebunden hat.

Leider gelang es bisher noch nicht, die neue Flüssigkeitszelle vollständig abzudichten. Problematisch sind die Stellen, an denen die Flüssigkeit in den Kanal

ein- bzw. aus ihm austritt. An diesen Stellen treffen PDMS und Metall aufeinander und werden lediglich durch die Klebrigkeit des PDMS und den Druck durch das Zusammenschrauben der beiden Teile des Rahmens zusammengehalten. Dies reicht offenbar nicht aus, um ein Austreten von Flüssigkeit zu verhindern. In Messungen resultiert darin, dass auch bei geschlossenen Ventilen eine Kraft auf das gefangene Teilchen wirkt. Außerdem gelangen leichter störende Luftblasen in die Zelle, was Messungen erheblich beeinträchtigt oder gar unmöglich macht.

Da der einzige Vorteil der Benutzung von PDMS die reversible Bindung ist, die ein Verkleben der Zelle unnötig machen sollte, wurde beschlossen, diese zunächst durch den bewährten Parafilm zu ersetzen. Ein Flüssigkeitskanal ähnlich dem einer älteren Flüssigkeitszelle aus 2 Lagen Parafilm wurde zwischen Deckgläsern verbacken. Analog zum Aufbau der alten Zelle wurden die Teflonschläuche für Zu- und Ablauf in Plexiglasblöcke gesteckt und mit der Glasoberfläche verklebt. Die Abmessungen wurden dabei gerade so groß gewählt, dass diese Zelle ebenfalls dicht in den Aluminiumrahmen eingesetzt werden kann.

Auf diese Weise sollte wenigstens die Möglichkeit der Einstellung verschiedener Temperaturen während der Messung bestehen bleiben. Für die folgende Messung wurden zwei Peltier-Elemente in Reihe geschaltet und auf den Rahmen aufgelegt. Ein in der Mechanikwerkstatt gebauter Wasserkühlkörper wird auf die Elemente aufgesetzt und mit dem Rahmen verschraubt. Dies zeigte sich als völlig ausreichend, um die Wärme abzuleiten, die auf der warmen Seite der Peltier-Elemente entsteht. Das Streckexperiment kann nun auf oben beschriebene Weise durchgeführt werden.

Abb. 25 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung. Die angegebenen Temperaturen entsprechen der Temperatur des oberen Deckgläschens der Zelle. Diese wurde mit einem Thermometer mit Oberflächenfühler gemessen. Die Temperatur wird allein über die Stromstärke eingestellt, mit der die Peltier-Elemente betrieben werden. Innerhalb der Flüssigkeitszelle sollte die Veränderung im Vergleich zur Raumtemperatur aufgrund der schlechten Wärmeleitfähigkeit des Glases noch etwas schwächer sein.

Nach [9] sollte die Höhe des Überstreckungsplateaus mit steigender Temperatur absinken, im Falle einer Abkühlung also steigen. Dies erscheint einleuchtend, da die Stabilität der Doppelhelix temperaturabhängig ist. Ein solcher Zusammenhang konnte aber bisher nicht bestätigt werden. Die Höhe des Plateaus war meist nur geringfügig von der bei Raumtemperatur verschieden. Eine eindeutige Tendenz zu höheren Überstreckungskräften bei tieferen Temperaturen konnte auch nicht festgestellt werden. Bei der in Abb. 25 gezeigten Messung fiel die Plateauhöhe sogar zunächst ab, stieg dann aber im Verlaufe des Abkühlens wieder etwas an. Ein großes Problem bei der Messung bereitete die thermische Ausdehnung in der Zelle. Im Laufe der Abkühlung bewegte sich die Mikropipette allmählich zur optischen Falle hin, sodass der Abstand ständig nachgeregelt werden musste. Die Werte auf der X-Achse entsprechen daher nicht dem Abstand der Kügelchen. Der Abstand, bei dem der Kraftanstieg jeweils begann, veränderte sich jedoch kaum merklich. Die X-Werte wurden bewusst nicht ver-

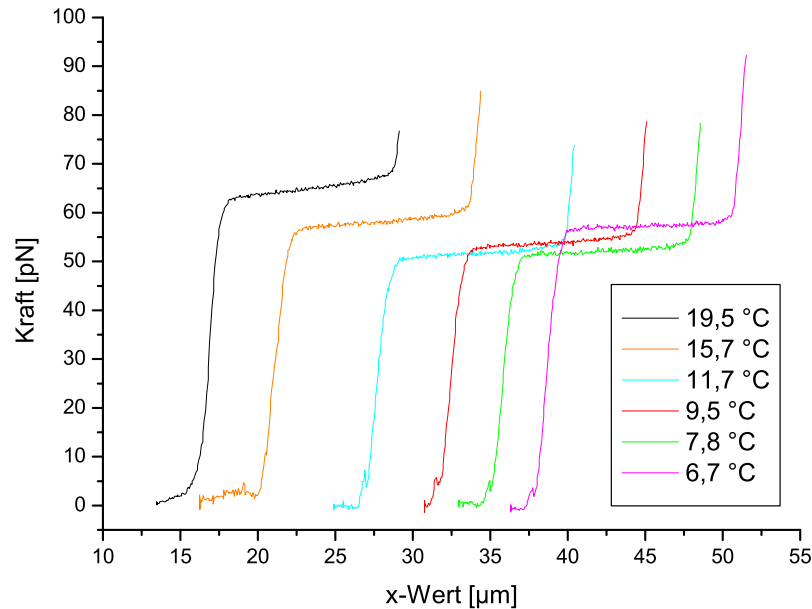


Abbildung 25: Strecken von λ -DNA unter Abkühlung durch Peltier-Elemente. Die angegebene Temperatur ist die gemessene Oberflächentemperatur des Glases an der Oberseite des Flüssigkeitskanals

schoben, um diesen Effekt zu verdeutlichen.

In Abb. 26 ist die Abhängigkeit der Hysterese von der Temperatur gezeigt. Der linke Graph zeigt das Strecken und Relaxieren bei einer abgekühlten DNA (Glastemperatur $9,5^{\circ}\text{C}$). Für die linke Kurve wurden die Peltier-Elemente umgepolt, um die Flüssigkeitszelle zu beheizen, anstatt sie abzukühlen. Diese Möglichkeit ist ein großer Vorteil der Benutzung von Peltier-Elementen. Während die Relaxierungshysterese bei der Abkühlung offensichtlich völlig verschwunden ist, ist sie bei einer Erwärmung deutlich stärker ausgeprägt als normal. Dieses Ergebnis ist leicht mit der Temperaturabhängigkeit der Stabilität der Doppelhelix zu erklären. Offensichtlich erleichtert eine höhere Umgebungstemperatur das Aufschmelzen der Basenpaare und begünstigt damit das Auftreten einer Hysterese.

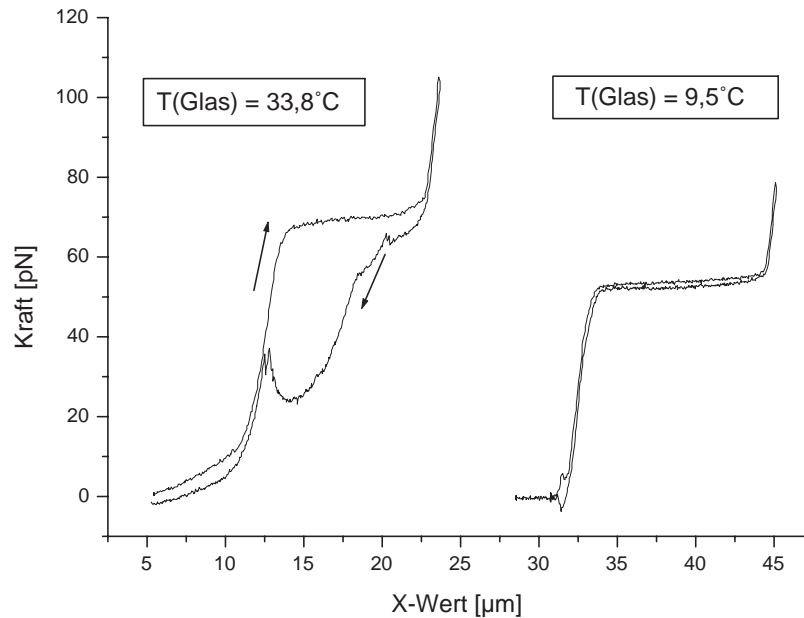


Abbildung 26: Hysterese der λ -DNA bei einer Temperatur über (links) und unter (rechts) Raumtemperatur

4.2 Messung in z-Richtung

Die bereits beschriebene neue Methode der Kraftmessung mit rückgestreutem Licht soll als nächstes getestet werden. Da der Piezotisch der älteren optischen Pinzette eine Verschiebung in alle drei Raumrichtungen gestattet, soll als Beispielmessung das Strecken von λ -DNA in z-Richtung, also entlang der optischen Achse dienen. Dies bietet sich an, da auch das Strecken auf diese Weise eine Neuheit darstellt.

Zunächst werden zwei Kügelchen gefangen, in analoger Weise wie zuvor beschrieben. Daraufhin wird die Pipette derart verschoben, dass das Kügelchen in der Falle sich genau unter dem anderen befindet (siehe Abb. 27). Nun kann die Messung starten. Um den gesamten interessanten Bereich der Kraftkurve aufnehmen zu können, muss man jedoch bedenken, dass sich der Abstand der Kügelchen durch Ansteuerung des Piezotisches lediglich um $20 \mu\text{m}$ vergrößern lässt. Daher muss man das Objektiv (und damit die Falle) manuell absenken, bis man sich kurz vor dem ersten Kraftanstieg befindet. Anschließend wird der Piezotisch von $z = 20 \mu\text{m}$ auf $z = 0 \mu\text{m}$ gefahren, um die End-End-Distanz zu erhöhen. Die aufgenommenen Werte für die Position in z-Richtung entsprechen daher nicht dem Abstand der beiden Kügelchen. Zum Vergleich mit einer bekannten, in x-Richtung aufgenommenen Kraftkurve muss man die Skala der

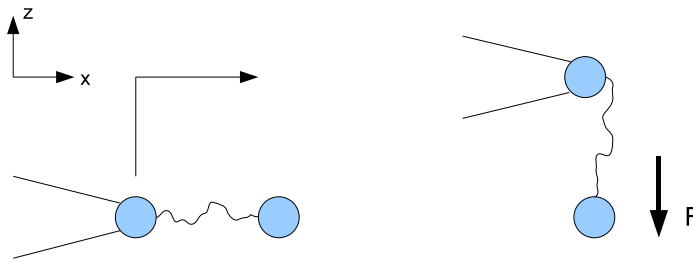


Abbildung 27: λ -DNA wird zwischen zwei Kugeln immobilisiert (links). Dann wird das an der Mikropipette angesaugte über jenes in der Falle bewegt und die DNA kann in z-Richtung gestreckt werden.

z-Werte also umdrehen und dann so verschieben, dass der Kraftanstieg bei etwa $16 \mu\text{m}$ Abstand beginnt.

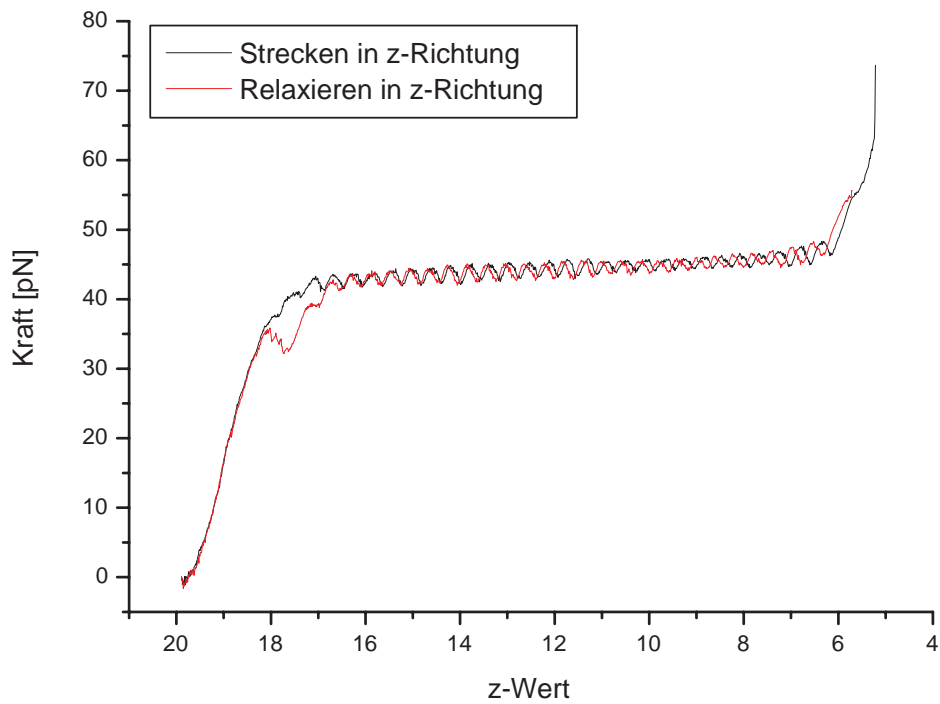


Abbildung 28: Exemplarische Messung: λ -DNA wurde in z-Richtung bis über das Kraftplateau hinaus gestreckt. Der z-Wert entspricht nicht der End-End-Distanz in z-Richtung (siehe Text).

Abbildung 28 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung. Der Kurvenverlauf ist qualitativ genau so wie erwartet. Auffallend sind aber zwei Dinge.

Das typische Plateau beim Strecken von DNA ist vorhanden und zieht sich über einen Bereich von etwa $12 \mu\text{m}$ hin, was ein normaler Wert ist. Der Kraftwert in der Mitte des Plateaus liegt etwa bei 44 pN und ist somit zu klein. Zu erwarten wäre ein Wert um 64 pN . Möglicherweise müssen Messungen mit dieser Methode stets um einen bestimmten Faktor multipliziert werden. Dies ist aber kein schwerwiegendes Problem, da die Kraft-Ausdehnungskurve von λ -DNA gut bekannt ist. Man kann die bekannte Höhe des Kraftplateaus quasi nutzen, um die DNA als Kraftnormale zu nutzen.

Zweitens wird die gesamte Kurve von einer schwingungsartigen Störung überlagert. Diese Störung ist zu Beginn, vor dem ersten Kraftanstieg, am höchsten und lässt dann ein wenig nach. Sie ist jedoch über den gesamten Bereich der Kurve klar zu sehen. Ursache sind möglicherweise Intensitätsschwankungen des Lasers oder von der Pipette und dem angesaugten Kügelchen rückgestreutes Licht. Eine derartige Störung lässt sich auch beobachten, wenn sich ein gefangenes Kügelchen in der Nähe einer Grenzfläche befindet, zum Beispiel knapp über dem Boden der Flüssigkeitszelle, wie in Abb. 29. Man muss berücksichtigen,

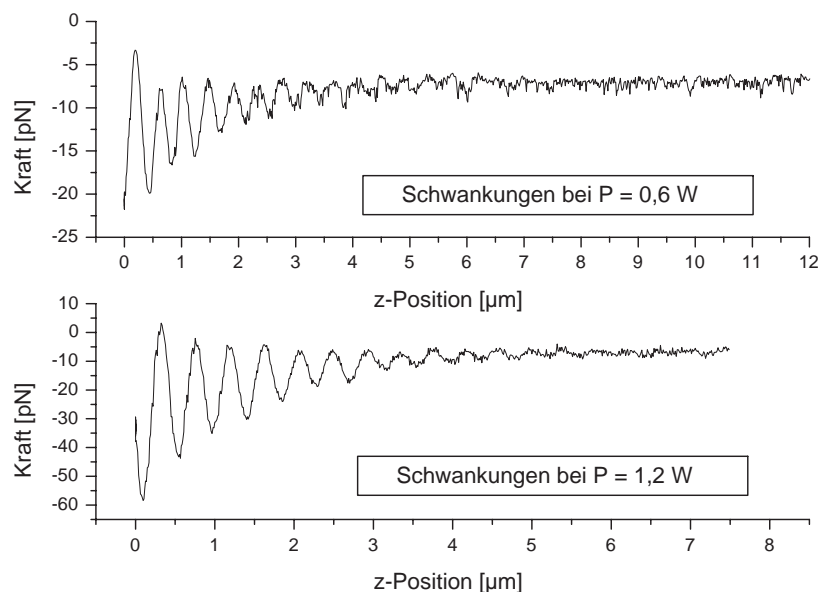


Abbildung 29: Kraft, die auf ein Kügelchen wirkt, welches vom Boden der Zelle aus in z-Richtung angehoben wird in Abhängigkeit von der Höhe (z-Position)

dass bei diesem Prinzip der Kraftmessung keine Verschiebung des Strahlkegels gemessen wird, wie dies bei gewöhnlichen Messungen der Fall wäre. Statt dessen handelt es sich hier um eine reine Intensitätsmessung, daher wirken sich Inten-

sitätsschwankungen bei dieser Methode stärker aus als bei Messungen mit einem Quadrantendetektor. Die stärkere Schwankung in Abb. 29 bei der höheren Laserleistung von $P=1,2$ W ist ein Indiz für die Intensitätsschwankungen als Ursache. Die Größe der Störung im Rahmen des Streckexperiments liegt bei etwa 3 pN und ist somit in einem überschaubaren Rahmen.

4.3 Messung mit Interkalatoren

Das Strecken einer zwischen zwei Polystyren-Kügelchen immobilisierten λ -DNA soll durch die Zugabe von Interkalatoren zur DNA modifiziert werden. Dazu wird ein viertes Gefäß in das Flüssigkeitssystem integriert, welches Pufferlösung mit der gewünschten Konzentration des Interkalators enthält. Nun führt man zunächst das normale Strecken durch, anschließend wird Interkalator in die Zelle gegeben und das Strecken am selben DNA-Molekül erneut ausgeführt.

4.3.1 YOYO-1

Zunächst betrachten wir den Einfluß von YOYO auf das Streckungsverhalten der DNA. Man erkennt einige Unterschiede im Kurvenverlauf. So beginnt der Kraftanstieg später als bei reiner DNA, und das charakteristische Kraftplateau verschwindet mit zunehmender Konzentration von YOYO in der Lösung immer mehr, wie in Abb. 30 zu sehen ist.

Auch stellt man beim Relaxieren des gestreckten Moleküls eine Hysterese fest (Abb. 31). Zwar existiert wie schon erwähnt auch bei reiner DNA eine Relaxierungshysterese, jedoch erstreckt sich diese nicht über das gesamte Plateau. Sie taucht erst ab einem bestimmten Punkt auf (wahrscheinlich abhängig von der Lage von Strangbrüchen) und verschwindet wenn der Abstand wieder etwa auf die Konturlänge abgesunken ist. Ist YOYO jedoch angebunden, so zeigt sich die Hysterese im gesamten Bereich vom Beginn des Relaxierens bis zu einem Abstand auf dem die Kraft wieder annähernd Null erreicht. Die durch Interkalatoren ausgelöste Hysterese wird später am Beispiel des Triostin näher untersucht.

Die Ursache für das Verschwinden des Kraftplateaus ist bisher noch ungeklärt. Beide Kurven (die von λ -DNA mit und ohne angebundenen Interkalatoren) verlaufen unterhalb des exponentiellen Kraftanstiegs, der zu erwarten wäre, wenn die Doppelhelix völlig starr in ihrer Form bestehen würde. In beiden Fällen erfolgt aber eine Erhöhung der Konturlänge, wodurch weniger Kraft vonnöten ist, um die DNA auf einen bestimmten Abstand zu strecken. Ohne Liganden tritt dies erst ab einer Kraft oberhalb von 50 pN auf. Die Erhöhung des Basenpaarabstandes erfolgt dann vermutlich durch ein Entwinden der DNA an Einzelstrangbrüchen. Sind jedoch Interkalatoren angebunden, so ist die Konturlänge bereits von vornherein erhöht, was den verspäteten Anstieg erklärt. Die Erhöhung des Abstandes der Basenpaare erfolgt hier offenbar gleichmässiger, was in einem deutlich konstanteren Anstieg resultiert.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zusammen gefasst, die sich aus Abb. 30 ge-

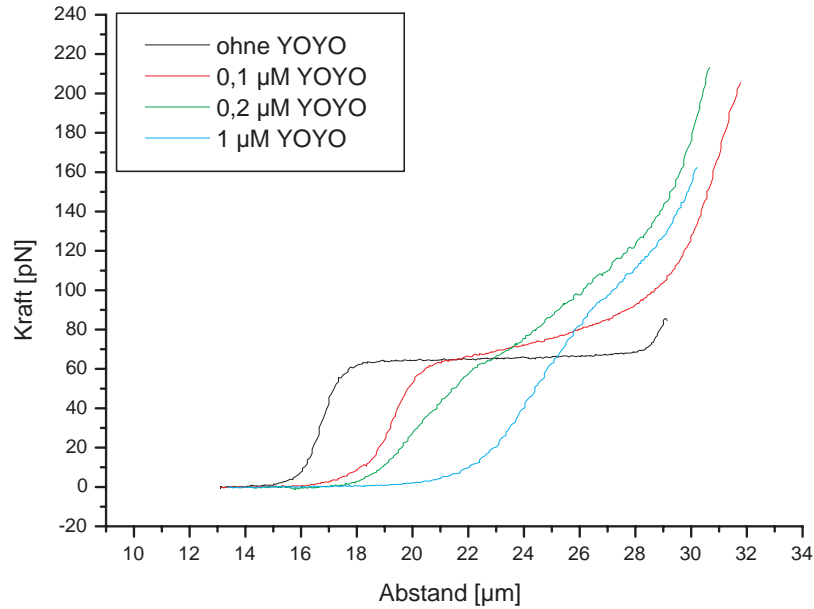


Abbildung 30: Das Strecken von λ -DNA wurde unter dem Einfluß von YOYO in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

Konzentration [μM]	P [nm]	L_0 [μm]	Anz geb. Mol.
0,1	33,03	19,16	3926
0,2	53,59	19,74	4779
1	24,85	23,46	10250

Tabelle 1: Ergebnisse der WLC-Fits für die YOYO Messungen

winnen lassen. Persistenzlänge P und Konturlänge L_0 ergeben sich jeweils aus einem Fit mit der WLC-Gleichung (8). Die Anzahl der Interkalatormoleküle, die an die DNA bei einer Messung angebunden haben, lässt sich ebenfalls konkret berechnen. Wie bereits erwähnt, erhöht sich die Konturlänge pro besetzter Interkalationsstelle um 0,34 nm, bei Bisinterkalatoren wie YOYO also um 0,68 nm pro interkaliertem Molekül. Die Anzahl gebundener Moleküle berechnet sich dementsprechend nach

$$\frac{L_0 - 16,49\mu\text{m}}{0,68\text{nm}} \quad (15)$$

Dies gilt nur unter der Annahme, dass alle angebundenen Moleküle auch bisinterkaliert sind. Ist die Konzentration der Liganden so hoch, dass mehr Bindungsstellen der DNA abgesättigt werden könnten als vorhanden sind, so wäre

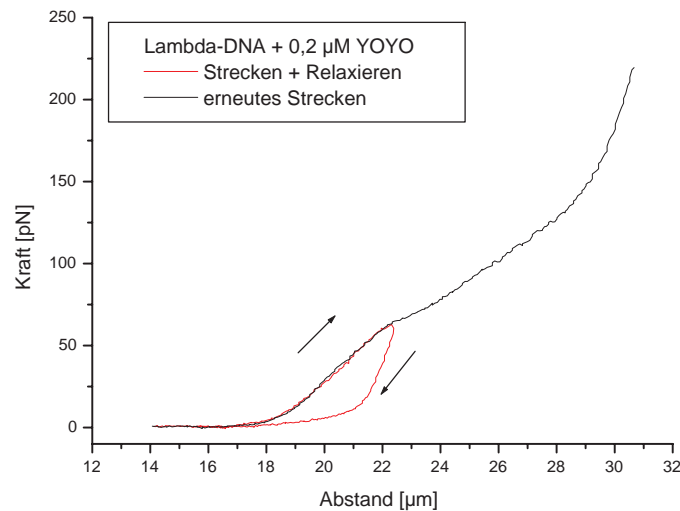


Abbildung 31: Strecken von DNA, an welche YOYO-1 interkaliert hat. Um den Hysterese-Effekt aufzunehmen, wurde die DNA gestreckt, wieder relaxiert (rote Kurve) und dann erneut gestreckt (schwarz).

es auch möglich, dass einige Moleküle aus mangelndem Platz lediglich monointerkalieren. Bei den hier untersuchten Konzentrationen bis $1 \mu\text{M}$ ist dies jedoch offenbar noch nicht der Fall.

Ein interessanter Effekt lässt sich beobachten, wenn man den an die DNA angeordneten Farbstoff zur Fluoreszenz anregt, während die DNA gestreckt wird. Man streckt das gefangene Molekül und wartet das Absinken der Kraft ab. Hat die Kraft nun einen konstanten Wert erreicht, so wird eine in den Strahlengang integrierte Dampfampe eingeschaltet, welche die Fluoreszenz des Farbstoffes anregt. Man beobachtet daraufhin einen Anstieg der Kraft um einige pN.

Dieser Effekt ist jedoch nicht zufriedenstellend reproduzierbar. Bisweilen tritt er gar nicht auf, zudem ist der Anstieg der Kraft nicht immer gleich schnell und stark. Vereinzelt zeigte sich ein sehr schneller Anstieg um etwa 10 pN innerhalb weniger Sekunden. Meistens jedoch stieg die Kraft sehr viel langsamer an, sodaß für den gleichen Kraftanstieg etwa 30 Sekunden benötigt wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, das das Verhalten stark davon abhängt, wieviele YOYO-Moleküle interkaliert haben. Schwieriger zu erklären ist das Verhalten nach erneuten Abschalten der Dampfampe. Einige wenige Male war hierbei ein Absinken der Kraft auf den ursprünglichen Wert zu sehen, meistens blieb sie jedoch auf dem erreichten Wert und stieg nach erneutem Anregen der Fluoreszenz weiter an (siehe Abbildung 32).

Lässt man das Anregungslicht lange genug an, so beobachtet man ein sprunghaftes Absinken der Kraft in mehreren Schritten (Abb. 33). Dies dürfte auf

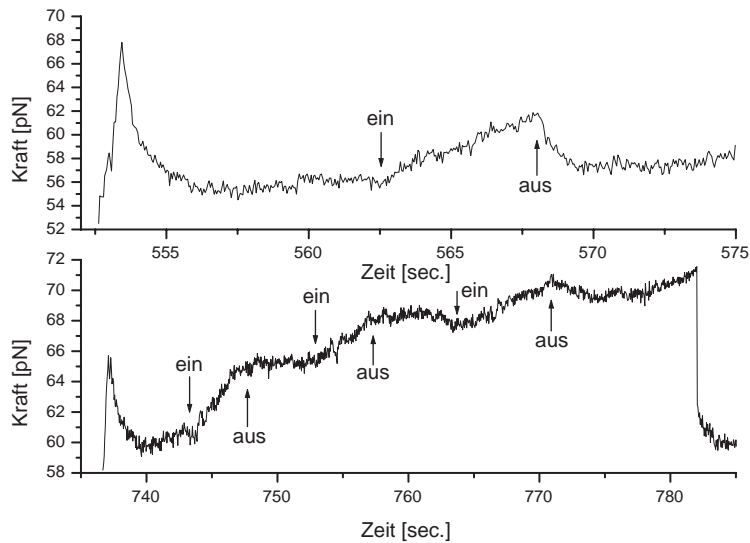


Abbildung 32: Resultate zweier Messungen: DNA mit YOYO wird auf einen bestimmten Abstand gestreckt. Nach Absinken der Kraft auf einen konstanten Wert wird eine Dampfplatte im Wechsel ein-, und ausgeschaltet (mit Pfeilen markiert), um die Fluoreszenz anzuregen.

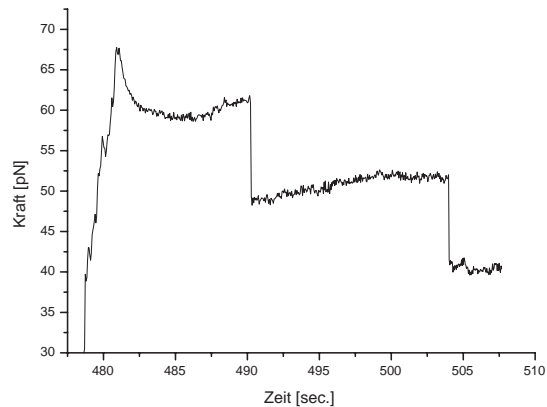


Abbildung 33: Wird an DNA interkaliertes YOYO längere Zeit zur Fluoreszenz angeregt, so beobachtet man ein schrittweises Absinken der Kraft.

das Auftreten von Einzelstrangbrüchen zurückzuführen sein. Nach [21] führt das Anregen der Fluoreszenz bei interkaliertem YOYO führt zu solchen Strangbrüchen („photocleavage“).

4.3.2 YO-1

Kraftkurven von DNA mit interkaliertem YO-1 sehen denen von DNA mit YO-YO sehr ähnlich. Der verspätete Kraftanstieg, der Ausdruck einer erhöhten Konturlänge ist, ist auch hier zu sehen (Abb. 34). Ebenso ist bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ kein Plateau mehr vorhanden. Ein deutlicher Unterschied wird ersichtlich, wenn man das gestreckte Molekül relaxiert. Im Gegensatz zu den YO-Kurven ist hier überhaupt keine Hysterese erkennbar.

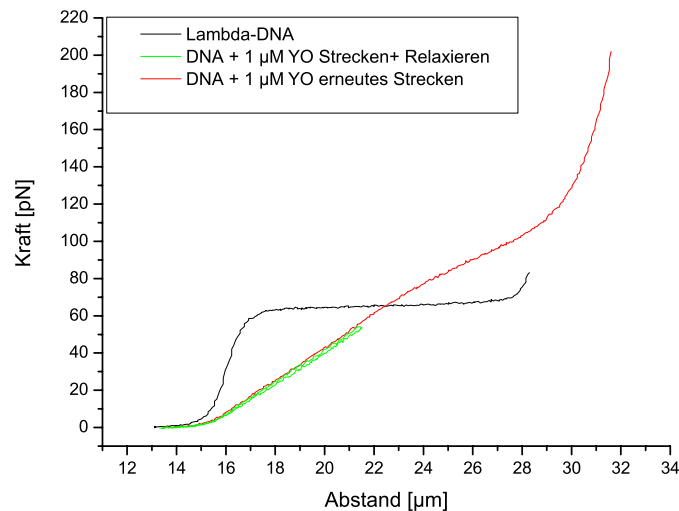


Abbildung 34: λ -DNA wurde mit $1 \mu\text{M}$ YO gestreckt und relaxiert (grüne Kurve) und erneut gestreckt (rote Kurve)

Als nächstes wurde die Fluoreszenz von YO-1 analog zu YOYO untersucht, in der Hoffnung, dass sich bei YO, welches ein normaler Interkalator ist, ein Unterschied zum Bisinterkalator YOYO zeigen würde. Dies wäre ein Indiz dafür, dass die klammerartige Form von YOYO mit der Ursache des Effektes zu tun hat. Tatsächlich ist aber ein identisches Verhalten zu sehen. Man beobachtet auch hier einen Kraftanstieg bei Einschalten der Dampfampe und das gleiche, nicht eindeutige Verhalten nach erneutem Abschalten dieser (Abb.35).

Über den Mechanismus, der dem hier gezeigten Verhalten von DNA-YO-, und DNA-YOYO-Komplexen zugrunde liegt, können derzeit nur Vermutungen angestellt werden. Eine Konformationsänderung der Fluorophormoleküle wie z.B. ein *cis-trans*-Übergang ist recht unwahrscheinlich, weil sich die Anregung der Farbstoffe wie in Kapitel 3 beschrieben lediglich in einem Elektronenübergang zu höheren Molekülorbitalen äußert. Daher konnte auch kein Unterschied zwischen dem Fluoreszenzverhalten bei YO und YOYO beobachtet werden. Ein YOYO-Molekül hat in dieser Situation den gleichen Einfluß wie zwei YO-Moleküle, da seine beiden chromophoren Gruppen unabhängig voneinander

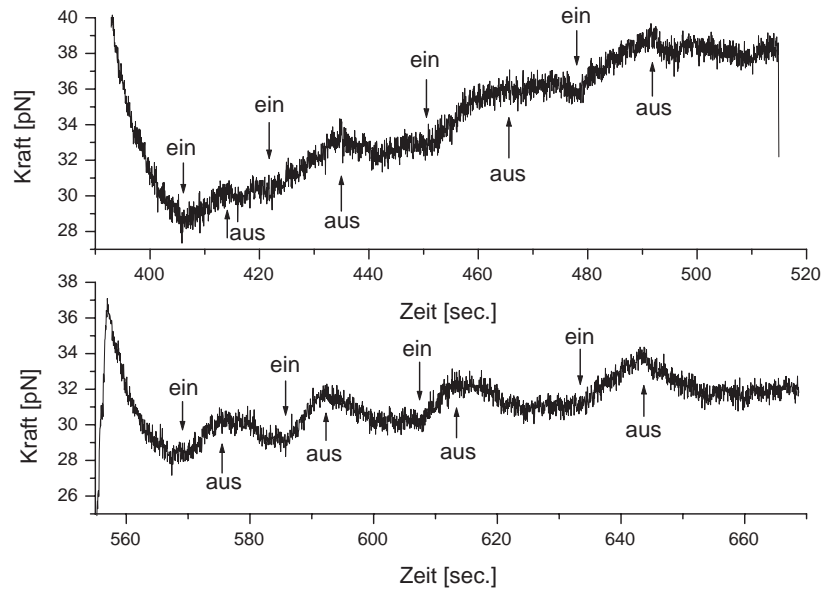


Abbildung 35: Verhalten von DNA mit YO bei Anregung der Fluoreszenz. Auch hier zeigt sich ein unterschiedliches Verhalten nach Abschalten des Anregungslichts, dargestellt durch zwei exemplarische Messungen.

agieren. Da nicht die gesamte durch die Anregung aufgenommene Energie als Fluoreszenzlicht wieder abgegeben wird, kann man davon ausgehen, dass ein Teil davon auf die DNA übergeht. Durch eine solche Energieaufnahme könnten strukturelle Änderungen in der DNA induziert werden, die sich makroskopisch in einem Kraftanstieg bemerkbar machen. Möglich wäre beispielsweise, dass ein Teil der interkalierten YOYO-Moleküle durch solche Konformationsänderungen herausgedrängt werden. Dadurch würde die durch das YOYO erhöhte Konturlänge wieder absinken. Die DNA würde sich also wieder etwas zusammenziehen, wodurch die benötigte Haltekraft ansteigen würde. Wegen des unterschiedlichen Verhaltens nach Abschalten des Anregungslichtes ist es schwer zu erklären, was danach geschieht. Die DNA muss nicht zwangsläufig in ihre alte Konformation zurückkehren. Das in einigen Messungen beobachtete Absinken der Kraft auf den alten Wert würde dafür sprechen, dass neue Moleküle interkalieren.

Abstrakt formuliert wird hier eine Art makromolekularer Farbstoff (das DNA-Molekül) studiert, der über viele lichtensitive Domänen (jeder angebundene Interkalator) verfügt. Daher ist es wohl nicht verwunderlich, dass sich das System recht komplex und unkontrolliert verhält.

4.3.3 Triostin A

Da Triostin wie YOYO ein Bisinterkalator ist, erwartet man einen vergleichbaren Einfluß auf die DNA. Und tatsächlich zeigen sich auch hier die gleichen Merkmale:

- Das spätere Ansteigen der Kraft
- Das Verschwinden des Kraftplateaus bei zunehmender Konzentration
- Eine Krafthysterese beim Relaxieren im gesamten Längenbereich

Die letztgenannte Hysterese ist bemerkenswerterweise noch stärker ausgeprägt als bei YOYO. In Abb. 36 sind wiederum die Kraft-Ausdehnungskurven bei verschiedenen Interkalatorkonzentrationen aufgetragen.

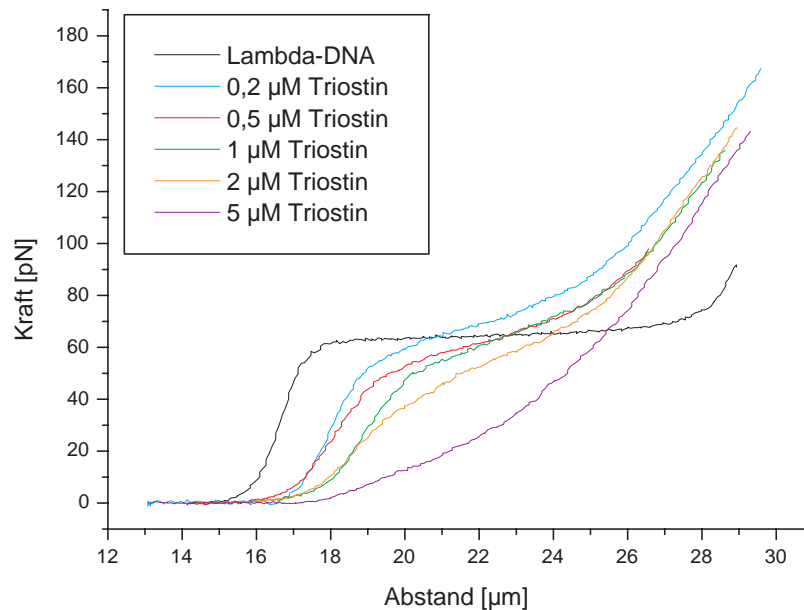


Abbildung 36: Streckungskurven bei unterschiedlichen Triostin Konzentrationen

Die Kurven werden im Bereich bis 10 pN wie bei YOYO mit der WLC-Gleichung gefittet, die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Zu sehen ist wiederum, dass die Konturlänge tendenziell mit steigender Konzentration größer wird. Die Persistenzlänge P schwankt jedoch erheblich. Da diese Länge damit zusammenhängt, wie steil die Kurve im entropischen Kraftbereich ansteigt, wäre zu erwarten, dass sie mit steigender Konzentration abnimmt. Wie steil die Kurve zu Beginn ansteigt, ist leider auch bei gleichen Konzentrationen oft von Messung zu Messung unterschiedlich, demzufolge ist diese Größe

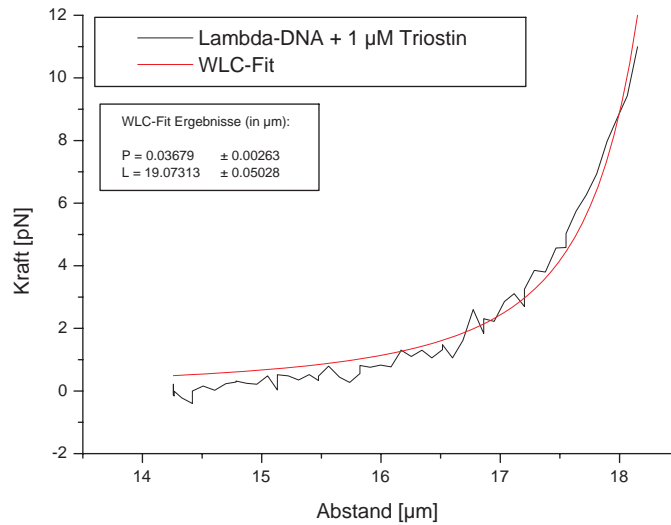


Abbildung 37: Exemplarischer Fit einer Kraftkurve mit der Worm-like chain Gleichung

Konzentration [μM]	P [nm]	L_0 [μm]	Anz. geb. Mol.
0,2	178,45	17,73	1824
0,5	54,74	18,07	2324
1	36,79	19,07	3794
2	40,15	18,89	3529
5	29,52	20,64	6103
20	264,52	21,44	7279

Tabelle 2: Ergebnisse der WLC-Fits für die Triostin Messungen

recht störungsanfällig. Daher müssen die Werte für P bei $0,2 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ als Messfehler angesehen werden.

Aus den Längenzunahmen durch die Interkalation lässt sich mit Gleichung (13) ein Wert für die Assoziationskonstante bestimmen. Nach der Anzahl besetzter Interkalationsstellen N an dem DNA-Molekül umgestellt ergibt sich

$$N = \frac{\frac{B}{n} K_A}{K_A + \frac{1}{I_0}} \quad (16)$$

Daher wird in Abb. 38 N gegen die Interkalatorkonzentration I_0 in der Umgebung aufgetragen und mit Gleichung (16) gefittet. In [19] ist ein Komplex aus DNA und Triostin untersucht worden. Dabei ergab sich, dass durch die Interkalation von Triostin 5 Interkalationsstellen blockiert werden (zwei sind durch die

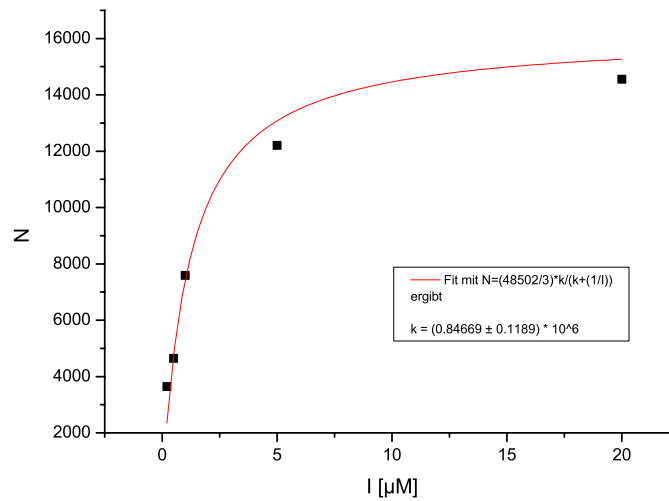


Abbildung 38: Die Anzahl besetzter Interkalationstellen N nähert sich bei steigender Konzentration an Interkalatoren I_0 dem theoretischen Maximalwert an.

beiden Quinoxalin-Ringe belegt, drei weitere werden durch die klammerartige Form des Moleküls eingeschlossen). Berücksichtigt man noch das Ausschlussprinzip, dann blockiert also im Durchschnitt jedes Triostinmolekül 6 Bindungsstellen, was einer Ausschlußzahl von $n = 3$ entspricht. Zu erwarten ist, dass die Anzahl der besetzten Interkalationsstellen mit steigender Konzentration zunimmt, bis sie ihren Maximalwert N_{\max} erreicht. Dieser liegt bei der Basenpaaranzahl B der λ -DNA geteilt durch die Ausschlußzahl, also bei

$$N_{\max} = \frac{B}{n} \approx 16167. \quad (17)$$

Dieser Maximalwert kann in der Realität nicht erreicht werden, da die Interkalatoren nicht zwangsläufig so dicht wie möglich aneinander anbinden. Binden z.B. zwei Triostinmoleküle in einem Abstand von drei Basenpaaren, so reicht der Zwischenraum nicht für die Interkalation eines weiteren aus. Es werden also normalerweise nicht alle Interkalationsstellen ausgenutzt. Dies sollte aber in der Messung erst spürbar werden, wenn die Triostinkonzentration so hoch ist, dass sich annähernd eine Sättigung der Bindungsstellen ergeben müsste. Der Verlauf des Fits zeigt, dass sich N asymptotisch einem Wert annähert, der in etwa bei dem theoretischen N_{\max} liegt. Das Experiment ist also mit der Theorie konsistent. Der Fit nach der Assoziationskonstante als Parameter ergibt $K_A = (0,85 \pm 0,12) \cdot 10^6$ mol/l, bzw. $K_D = \frac{1}{K_A} = 1,18 \cdot 10^{-6}$ l/mol. In [20] sind für die Assoziationskonstante je nach DNA-Typ Werte von $0,43 \cdot 10^6$ M bis $1,13 \cdot 10^6$ M angegeben. Die ermittelte Konstante stimmt also mit diesen Ergebnissen sehr gut überein.

Um die Hysterese näher zu untersuchen, nimmt man das Strecken und Relaxieren bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten auf. So beobachtet man, dass die Kraftkurve bei schnellerem Ziehen stärker ansteigt. Beim Relaxieren laufen die Kurven wieder zusammen. Jedoch ist die unter der Kurve eingeschlossene Fläche sogar bei der geringsten Geschwindigkeit sehr groß. Die Krafthysterese

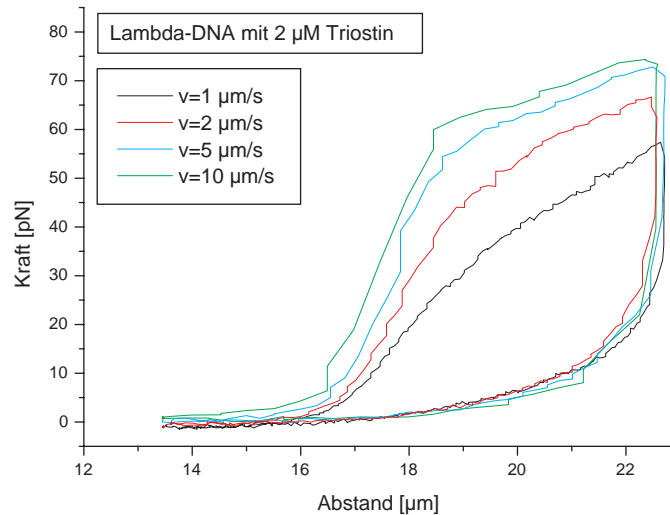


Abbildung 39: Hysterese-Effekte bei verschiedenen Geschwindigkeiten

manifestiert sich auch im zeitlichen Verlauf der Haltekraft bei konstantem Abstand. In Abb. 40 wurde die DNA gestreckt bis etwa 80 pN auf das gefangene Kügelchen wirkten, dann gestoppt und der zeitliche Kraftverlauf aufgenommen. Es zeigt sich ein exponentieller Abfall, bis auf einen Wert unter der Hälfte der ursprünglichen Kraft. Auch dieses Verhalten ist sehr ähnlich wie bei YOYO. Charakterisieren kann man diesen Kraftabfall, indem man eine Zeitkonstante τ einführt. Diese sei die Zeit, nach der die Kraft auf das $1/e$ fache der Differenz aus Maximalwert und Endwert abgefallen ist. Die Zeitkonstante lag bei unterschiedlichen Messungen zwischen 0,5 und 2,2 Sekunden.

Es liegt die Vermutung nah, dass die Erklärung für die Hysterese speziell mit der Eigenschaft als Bisinterkalator zu tun hat. Monointerkalatoren wie YO zeigen meist überhaupt keine Hysterese. In [2] wurden Messungen an den Bisinterkalatoren Daunomycin und YOYO durchgeführt und daraufhin eine Theorie für die Hysterese unter Interkalatoreinfluss aufgestellt: Aufgrund des völlig anderen Verhaltens als bei der „normalen“ Hysterese von reiner λ -DNA muss hier ein anderer Mechanismus zugrunde liegen. Der untersuchte Komplex befindet sich beim Strecken bzw. Relaxieren in einem Nicht-Gleichgewichtszustand. Denkt man sich die DNA als aus kleinen Segmenten zusammengesetzt, so werden diese Segmente infolge der Kraft beim Strecken verlängert. In die Segmente können

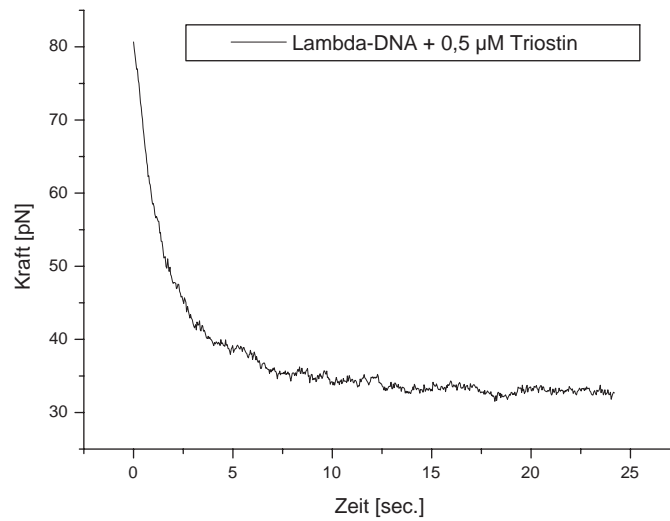


Abbildung 40: Stoppt man das Strecken und hält den Abstand konstant, so fällt die Kraft exponentiell ab.

nun zusätzliche Moleküle interkalieren, was die Kraft reduziert, die benötigt wird, um die DNA auf einer bestimmten Länge zu halten. Für die bei YOYO ausgeprägtere Hysterese gegenüber Daunomycin wird hier die Theorie aufgestellt, dass dies mit der klammerartigen Form des YOYO zusammenhängt. Möglicherweise werden YOYO-Moleküle infolge der Vergrößerung des Basenpaarabstandes beim Strecken aufgrund von Verformungen der DNA herausgedrängt. Sie nehmen dabei einen Teil der Verformungsarbeit auf, was die deutlich höhere Kraft beim Strecken gegenüber dem Relaxieren erklären könnte. Da auch Triostin im Komplex mit DNA die Form einer Klammer annimmt, lässt sich diese These unterstützen. Die noch stärker ausgeprägte Hysterese hängt womöglich damit zusammen, dass hier das interkalierende Molekül einen größeren Abschnitt der DNA umklammert als bei YOYO.

4.3.4 AzoTANDEM

Bei AzoTANDEM zeigte sich im Verlaufe der Messungen, dass es noch einige Probleme mit der Löslichkeit des Stoffes gibt. Da es nicht wasserlöslich ist, war die vorliegende Probe wie auch Triostin in PBS-Puffer mit 2 % DMSO gelöst. Jedoch scheint die Löslichkeit trotzdem nicht optimal zu sein. Man merkt dies während der Messungen, da bei Einleiten der Lösung in die Flüssigkeitszelle oft größere zusammenhängende Gebilde zu sehen sind. Dabei handelt es sich vermutlich um Klumpen des Interkalators. Dies stört oft die Messungen, da sich, vor allem bei Konzentrationen über $1 \mu\text{M}$ größere Gebilde an dem gefangenen Kügelchen oder der Mikropipette (Abb. 41) anhängen können.

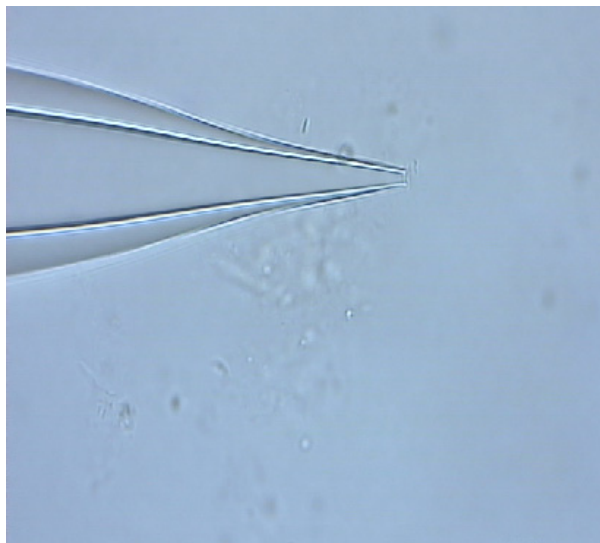


Abbildung 41: Bei hohen Konzentrationen (hier $20 \mu\text{M}$) sieht man starke Verunreinigungen in der AzoTANDEM-Lösung. Dies sind wahrscheinlich zusammenhängende Geflechte des Interkalators

Trotz dieser erschwerenden Umstände kann man Messungen durchführen. AzoTANDEM hat einen Einfluß auf das Streckverhalten der DNA. Konzentrationen ab $0,2 \mu\text{M}$ wurden untersucht, ein Unterschied ist hier bei steigender Konzentration aber kaum vorhanden, was wohl auf die schlechte Löslichkeit des Stoffes zurückzuführen ist. Der linke Graph in Abb. 42 zeigt die Kurve für $5 \mu\text{M}$. Eine erhöhte Steigung des Kraftplateaus war bei allen Messungen zu sehen, was dafür spricht, das AzoTANDEM grundsätzlich an die DNA bindet. Ob tatsächlich auch Interkalation stattfindet, lässt sich aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit sagen. Auf der abgebildeten Kurve ist ein verspäteter Anstieg und damit eine Zunahme der Konturlänge erkennbar, wie dies bei Interkalation stets der Fall ist. Bei den meisten anderen Kurven ist dies aber nicht festzustellen gewesen, bzw. nur minimal.

Für eine Interkalation spricht aber auch, dass die Hysterese gegenüber der von reiner λ -DNA verändert wird. Sie sieht bei allen Messungen ähnlich wie in Abb.

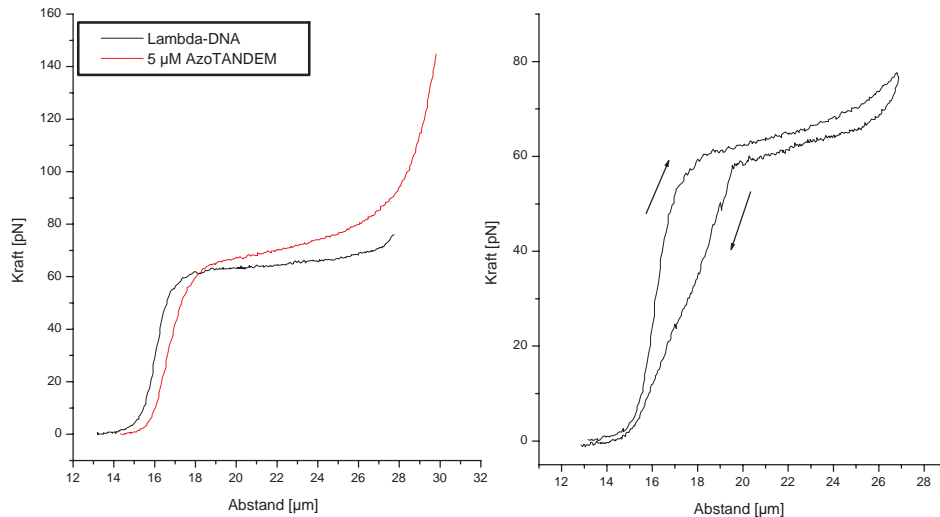


Abbildung 42: links: Strecken von λ -DNA und λ -DNA mit $5 \mu\text{M}$ AzoTANDEM, rechts: Hysterese bei AzoTANDEM

42 rechts aus. Die Kurve verläuft zunächst parallel zu der Streckungskurve aber etwas nach unten versetzt. Ab einem gewissen Abstand wird die Hysterese dann stärker. Erst wenn die Kraft auf Null abgesunken ist läuft die Relaxierkurve wieder mit der Streckungskurve zusammen. Wahrscheinlich ist dieses Verhalten eine Mischung aus der normalen DNA-Hysterese und der Hysterese, die auch durch YOYO oder Triostin ausgelöst wird. Eine leichte Abweichung ist beim gesamten Relaxieren vorhanden, nur längst nicht so stark wie bei Triostin. Ab einem Punkt jenseits der Mitte des Plateaus könnte dann die normale Hysterese zusätzlich eingestzt haben, was das plötzliche Absacken erklären würde.

4.3.5 A-T und G-C

Die Ergebnisse der Messungen dieser beiden Triostin Varianten lassen sich recht schnell zusammenfassen. In Abb. 43 sind Kurven für das Strecken von λ -DNA mit je $0,2 \mu\text{M}$ der beiden Varianten zu sehen. Der Kraftverlauf ist mit dem Verlauf ohne Zugabe von Liganden (schwarze Kurven) identisch. Das gleiche Ergebnis erbrachten auch Messungen mit höheren Konzentrationen. Es muss also davon ausgegangen werden, dass beide überhaupt nicht an DNA anbinden, weder durch Interkalation noch auf andere Weise.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Herstellung völlig neuer Interkalatoren nicht so einfach aus dem Handgelenk erfolgen kann. Bei den A-T und G-C Varianten wurden die interkalierenden Molekülteile ausgetauscht, was natürlich

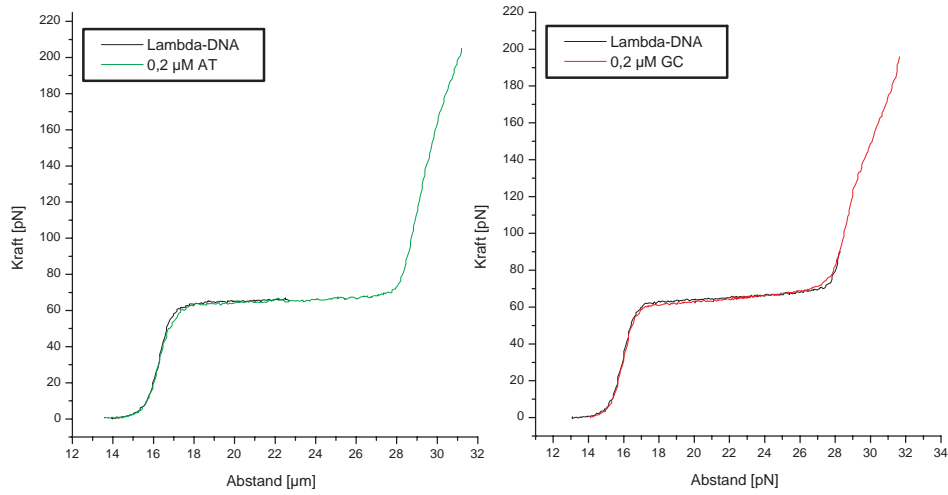


Abbildung 43: Die Triostin Varianten A-T (links) und G-C (rechts) zeigen keinerlei Einfluß auf das Streckungsverhalten der λ -DNA.

einen extremen Eingriff darstellt. Aber selbst der Austausch von Gruppen, die nicht zum interkalierenden Teil gehören, kann wie im Beispiel des AzoTANDEM zu deutlichen Änderungen im Verhalten führen und die Fähigkeit der Interkalation beeinträchtigen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurde eine neue Flüssigkeitszelle gebaut, die auf der Benutzung von PDMS basieren sollte, um nicht darauf angewiesen zu sein, die einzelnen Teile irreversibel zu verkleben. Leider zeigte sich, dass diese trotz des Drucks durch das Zusammenpressen mittels des Aluminium-Rahmens nicht völlig dicht zu kriegen ist. Dies war vorher nicht abzusehen und kann in der Experimentalphysik natürlich immer passieren. Um die neue Zelle trotzdem noch sinnvoll zu nutzen, wurde dazu übergegangen, anstelle der PDMS-Bestandteile auf einen Flüssigkeitskanal aus Parafilm zurückzugreifen und alles zu verkleben. Der Alu-Rahmen wurde dazu genutzt um die ganze Zelle mit Hilfe von Peltier-Elementen zu heizen, bzw. abzukühlen. Dabei zeigte sich eine Veränderung des Streckungsverhaltens der DNA. Der erwartete Zusammenhang zwischen Temperatur und Höhe des Kraftplateaus ließ sich aber nicht feststellen. Lediglich die Hysterese änderte sich qualitativ wie zu erwarten war. Um einen genauen Temperaturwert der Umgebung der DNA angeben zu können, müsste in Zukunft ein entsprechender Sensor in die Zelle eingebaut werden. Das Auftreten der thermischen Ausdehnungen ist jedoch ein größeres Problem.

Ein von Dr. Andy Sischka entwickelter neuer Mechanismus zur Kraftmessung mit rückgestreutem Licht wurde anhand von Messungen in z-Richtung getestet. Es zeigt sich, dass Messungen damit problemlos möglich sind, obwohl der angezeigte Kraftwert nicht der Realität entspricht. Eine Umrechnung mit Hilfe der bekannten Überstreckungskurve der λ -DNA sollte dieses Problem aber lösen können. Störungen durch Intensitätsschwankungen des Lasers sind in einem überschaubaren Bereich von etwa 3 pN. Der Aufbau der älteren Optischen Pinzette wird momentan bereits benutzt, um das Ziehen von DNA durch eine Nanopore zu untersuchen.

Weiterhin wurde Kraftspektroskopie an einzelnen DNA-Molekülen durchgeführt, um den Einfluß verschiedener Interkalatoren auf das Strecken von λ -DNA zu untersuchen. Insbesondere wurden neue Varianten von Triostin A auf ihre Eigenschaften untersucht.

Triostin A zeigte ein qualitativ ähnliches Verhalten wie bei YOYO. Die sogar noch stärker ausgeprägte Hysterese ist ein Indiz für einen Zusammenhang mit der klammerartigen Form, die beide Interkalatoren annehmen. Aus den Kraftkurven konnte auf die Anzahl angebundener Liganden geschlossen werden, was wiederum eine Bestimmung der Assoziationskonstante von Triostin zu λ -DNA erlaubt. Es konnte also gezeigt werden, dass sich die Kraftspektroskopie mit der Optischen Pinzette gut dazu eignet, das Bindungsverhalten von Ligand-DNA-Komplexen zu untersuchen.

Bei YOYO und YO zeigte sich ein ungewöhnlicher Kraftanstieg, wenn während des Streckens die interkalierten Moleküle zur Fluoreszenz angeregt wurden. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass durch Energieübertrag hervorgerufene Strukturänderungen der DNA für diesen Effekt verantwortlich sind. Eine Strukturänderung der Fluorophore ist eher unwahrscheinlich, da die Anregung hier nach einem andern Prinzip abläuft als z.B bei Azo-Farbstoffen.

Mit AzoTANDEM stand eine neu entwickelte Variante von Triostin A zur Untersuchung. Aufgrund der integrierten Azobenzene-Gruppe besteht die Möglichkeit, dass AzoTANDEM ein Photoschalter ist. Diese Eigenschaft konnte jedoch bisher noch nicht zufriedenstellend untersucht werden, da offenbar noch nicht das passende Lösungsmittel für den Stoff gefunden ist. Trotzdem konnte bereits gezeigt werden, dass AzoTANDEM zumindest in irgendeiner Form an die DNA anbindet. Ist ein passendes Lösungsmittel gefunden, so sollten Kraft-Auslenkungskurven aufgenommen werden, bei denen mit Licht der passenden Wellenlänge der Großteil der Moleküle in *cis* bzw. in *trans* vorliegt. Ein Unterschied im Kraftverlauf könnte dann die Eignung als Photoschalter beweisen. Der denkbare Idealfall wäre wohl, dass nur eines der beiden Isomere interkaliert. Dann könnte man die Interkalation quasi an- und abstellen.

Die beiden anderen auf Triostin basierenden Varianten G-C und A-T beruhen zwar auf einer interessanten Idee, allerdings zeigte sich bei beiden keinerlei Wechselwirkung mit der DNA.

Literatur

- [1] Andy Sischka. Aufbau einer Optischen Pinzette. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2002.
- [2] Andy Sischka. *Kraftspektroskopie und Einzelmoleküldetektion mit der Optischen Pinzette*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2005.
- [3] Arthur Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *physical review letters*, 24, 1970.
- [4] Arthur Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11, 1986.
- [5] Karel Svoboda and Steven M. Block. Biological applications of optical forces. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23, 1994.
- [6] James D. Watson and Francis H. C. Crick. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [7] Eintrag in der Wikipedia (<http://www.wikipedia.de>).
- [8] Steven B. Smith, Yujia Cui, and Carlos Bustamante. Overstretching b-dna: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded dna molecules. *Science*, 271:795–799, 1996.
- [9] Ioulia Rouzina and Victor A. Bloomfield. Force-induced melting of the dna double helix. *Biophysical journal*, 80:882–893, 2001.
- [10] 2004. Vorlesung Biophysik 1.
- [11] Gerd Wedler. *Lehrbuch der physikalischen Chemie*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 5th edition, 2004.
- [12] Peter Atkins and Julio de Paula. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, 7th edition, 2002.
- [13] L. S. Lerman. Acridine mutagens and dna structure. *J. of Cellular and Comp. Physiol.*, 64, 1964.
- [14] Joseph E. Coury, Lori McFail-Isom, Loren Dean Williams, and Lawrence A. Bottomley. A novel assay for drug-dna binding mode, affinity and exclusion number: Scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:12283–12286, 1996.
- [15] Stefan Gerken. Chip-integrierte Peristaltikpumpe für Mikrofluidiksysteme. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2006.
- [16] Hays S. Rye, Stephen Yue, David E. Wemmer, Mark A. Quesada, Richard P. Haugland, Richard A. Mathies, and Alexander N. Glazer. Stable

- fluorescent complexes of double-stranded dna with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Research*, 20:2803–2812, 1992.
- [17] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14:33–38, 1996.
- [18] Eintrag in der Protein Data Base (<http://www.pdb.org>).
- [19] A. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, and A. Rich. The molecular structure of a dna-triostin a complex. *Science*, 225, 1984.
- [20] Jeremy S. Lee and Michael J. Waring. Bifunctional intercalation and sequence specificity in the binding of quinomycin and triostin antibiotics to deoxyribonucleic acid. *Biochem. Journal*, 173:115–128, 1977.
- [21] Björn Akerman and Eimer Tuite. Single- and double-strand photocleavage of dna by yo, yoyo and toto. *Nucleic Acids Research*, 24:1080–1090, 1996.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei Prof. Anselmetti für die Gelegenheit bedanken, eine Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften“ zu schreiben, sowie bei Prof. Sauer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt natürlich Dr. Andy Sischka, der meine Arbeit betreut hat und der mit seiner enormen Erfahrung an der Optischen Pinzette stets mit Rat und Tat zur Stelle war.

Dr. Katja Tönsing und Dominik Greif danke ich für die Hilfe bei gelegentlichen chemischen Fragen.

Dr. Jan Regtmeier stand mir bei vielen kleinen Problemen des wissenschaftlichen Alltags zur Seite, wofür auch ihm Dank gebührt.

Dem Rest unserer Arbeitsgruppe danke ich für die im Allgemeinen stets gute Arbeitsatmosphäre und Stimmung.

Bei der Arbeitsgruppe Organische Chemie III, insbesondere Katarina Gauß und Katrin Wollschlaeger, bedanke ich mich für die Bereitstellung der Proben ihrer Triostin-Varianten.

Martina Everwand danke ich *en retour* für die angenehme Büroatmosphäre. Viel Glück im weiteren Studium!

Und zu guter letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung im vergangenen Jahr. Insbesondere Ulf Struckmeier hat mir durch Korrekturlesen des chemisch relevanten Teils sehr geholfen.