

**KRAFTSPEKTROSKOPIE UND  
EINZELMOLEKÜLDETEKTION MIT DER  
OPTISCHEN PINZETTE**

*Dissertation*

zum Erlangen des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

angefertigt von

Andy Sischka

aus Bielefeld

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

November 2005

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Literatur verwendet habe.  
Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.

Bielefeld, den 25. November 2005

(Andy Sischka)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Markus Sauer

Diese Arbeit wurde eingereicht am 29. November 2005.

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>3</b>
<b><u>1 GRUNDLAGEN</u></b>	<b>5</b>
1.1 DIE OPTISCHE FALLE	5
1.2 BROWNSCHE BEWEGUNG EINES TEILCHENS IM HARMONISCHEN POTENTIAL	12
1.3 DNA	13
1.4 DIE ENTROPISCHE ELASTIZITÄT UND DAS WORM LIKE CHAIN-MODELL	16
1.5 ÜBERSTRECKEN EINER DSDNA	19
1.6 LIGAND-DNA WECHSELWIRKUNGEN	29
1.6.1 BINDUNG IN DER HAUPT- ODER NEBENFURCHE	30
1.6.2 INTERKALATION	32
1.7 MOLEKULARE ERKENNUNG	37
1.7.1 IGM-ANTI-IGM	38
1.7.2 PROTEIN-TYROSIN-KINASE SYK	39
1.8 THERMODYNAMIK UND KINETIK DER MOLEKULAREN BINDUNGEN	41
1.9 FLUORESZENZ	45
<b><u>2 EXPERIMENTELLER AUFBAU</u></b>	<b>47</b>
2.1 AUFBAU DER POSITIONS- UND KRAFTMESSUNG	55
2.2 KALIBRIERUNG DER OPTISCHEN FALLE	59
2.3 OPERATIONSMODEN DER OPTISCHEN PINZETTE	65
2.4 PROBENPRÄPARATION	67
2.4.1 LAMBDA-DNA	67
2.4.2 POLYPEPTID UND TYROSIN-KINASE	68
2.4.3 ANTI-IGM UND DT-40 B-ZELLEN	69
<b><u>3 ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG</u></b>	<b>70</b>
3.1 TEILCHEN IM PHOTONISCHEN POTENTIAL	71
3.2 KRAFTSPEKTROSKOPIE	75
3.2.1 PEPTID-KINASE WECHSELWIRKUNG	75
3.2.2 IGM-ANTI-IGM WECHSELWIRKUNG AUF LEBENDEN B-ZELLEN	77
3.3 DNA-FRAGMENTE	81

---

<b>3.4</b>	<b>LAMBDA-DNA</b>	<b>85</b>
3.4.1	DAS SCHMELZEN DER DNA	95
<b>3.5</b>	<b>GROOVE BINDER</b>	<b>101</b>
3.5.1	DISTAMYCIN-A	101
3.5.2	AC-[LARL] <sub>3</sub> -NH-LINKER	103
3.5.3	AMINOACRIDIZINIUMCHLORID	104
<b>3.6</b>	<b>INTERKALATOREN</b>	<b>105</b>
3.6.1	ETHIDIUMBROMID UND YO-1	105
3.6.2	DIAZONIAPENTAPHENDIBROMID	107
<b>3.7</b>	<b>HYSTERESEEFFEKTE BEI DAUNOMYCIN UND YOYO-1</b>	<b>107</b>
<b>3.8</b>	<b>FLUORESZENZ VON YOYO-1</b>	<b>114</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>119</b>
<hr/>		
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>121</b>
<hr/>		
	<b>GLOSSAR</b>	<b>131</b>
<hr/>		
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>134</b>
<hr/>		
	<b>ANHANG</b>	<b>135</b>
<hr/>		
	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>135</b>
	<b>KONFERENZBEITRÄGE</b>	<b>135</b>

## Einleitung

Sowohl die Untersuchung der Elastizität kettenförmiger Polymere, die Charakterisierung der Bindung kleiner Moleküle, wie beispielsweise Peptide und Proteine, an eine DNA, als auch Kraftmessungen zwischen Liganden und Rezeptoren in oder auf den verschiedensten biologischen Systemen, unter anderem mit der Zielsetzung, Kinetik, Gleichgewichtszustände, strukturelle Charakteristika oder Details der Energielandschaft der Bindungen zu beschreiben - sie alle verlangen nach äußerst sensitiven Kraftmeßmethoden.

Die beiden prominentesten Techniken sind hierbei die AFM Kraftspektroskopie und die Optischen Pinzette, die parallel zu ihrer überragenden Krafterlösung auch weit in den Bereich der höheren Kräfte des AFMs vordringen kann.

Das Prinzip der Optischen Pinzette basiert auf einem stark fokussierten Laserstrahl, der es ermöglicht, eine dreidimensionale Optische Falle - oder auch *Photonisches Potential* - zu generieren. Darin können Objekte der Größe einzelner Atome bis hin zu mehreren Dutzend Mikrometern gefangen werden.

Das gezielte Fangen und Bewegen von Objekten mit Hilfe der Optischen Falle stellt nur eine Facette der Möglichkeiten dieses Systems dar. Weitaus verfeinerter sind die Mittel, das gefangene Objekt als einen Sensor für äußere Kräfte in dessen unmittelbarer Umgebung zu benutzen. Hierbei können die Auslenkungen des Objektes - welches bei den meisten biophysikalisch relevanten Untersuchungen ein transparentes Kügelchen ist - in eine Kraft übersetzt werden.

Im Gegensatz zum AFM, bei dem für Kraftmessungen biochemisch präparierte Oberflächen benötigt werden, kann sich bei der Optischen Pinzette beispielsweise dem zu untersuchenden Objekt von mehreren Seiten beliebig angenähert werden, da das gefangene Objekt frei im Raum bewegt werden kann.

Die gezielte biochemische Präparation des gefangenen Objektes eröffnet außerdem die Möglichkeit, die zu charakterisierenden Systeme, wie Makromoleküle oder Proteine, selektiv zu immobilisieren, und diese dann gezielt in Kontakt zu bringen mit weiteren zu untersuchenden Molekülen.

In dieser Arbeit werden lokale Viskositätsmessungen in Gegenwart von Grenzflächen durchgeführt. Eine weitere Fragestellung ist die Messung von Kräften an intrazellulären Systemen der Signalweiterleitung, sowie das noch relativ unerforschte Gebiet der Kraftspektroskopie der Optischen Pinzette an lebenden Zellen. Vorrangigste Untersuchungsgebiete sind jedoch die mechanischen Eigenschaften von doppelsträngigen DNA Molekülen (in Abhängigkeit von äußeren Parametern) und die Veränderung der Charakteristika in Abhängigkeit von schwach oder unspezifisch bindenden Liganden. Unterschiedlichste Bindungsmoden konnten identifiziert und differenziert werden, und quantitative Aspekte der

Elastizität jener Komplexe beschrieben werden. Die bislang nahezu kaum charakterisierte Kinetik der Bindungen jener Liganden an dsDNA stellte ein weiteres Untersuchungsgebiet dar. Dies ermöglichte wiederum Rückschlüsse auf konformative und zeitliche Änderungen der Bindung von Liganden an DNA.

# 1 Grundlagen

Im ersten Kapitel werden die theoretischen Grundlagen dargelegt, ausgehend vom Prinzip einer Optischen Falle und dem Verhalten von darin gefangenen Objekten, speziell deren Brownscher Bewegung. Danach wird auf die Struktur der doppelsträngigen DNA eingegangen und ihre elastischen Eigenschaften unter Einwirkungen äußerer Kräfte beschrieben, die zur Auswertung der in dieser Arbeit aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven herangezogen wurden. Die Eigenschaften der an DNA bindenden Liganden werden an geeigneter Stelle im dritten Kapitel diskutiert.

Da einige der hier verwendeten, an DNA bindende Moleküle als Fluoreszenzmarker ihre Verwendung finden, werden kurz die Grundlagen der Fluoreszenz dargestellt.

Einen abschließenden Teil der Arbeit bildet die Untersuchung der molekularen Erkennung am Beispiel von Ligand-Rezeptor Systemen mittels Kraftspektroskopie, zwischen immobilisierten Rezeptoren auf funktionalisierten Oberflächen, als auch auf lebenden Zellen.

## 1.1 Die Optische Falle

Die Basis der Optischen Falle (auch Photonisches Potential genannt) bildet in dieser Arbeit ein stark fokussierter Laserstrahl, der in erster Näherung eine Gaußsche Intensitätsverteilung aufweist. Beispielsweise durch geeignete Wahl der Resonatoren eines Lasers kann aus den möglichen transversalen Feldverteilungen (Moden) innerhalb des Lasers diejenige mit Gaußschen Strahlprofil selektiert werden. Diese, als TEM<sub>00</sub> Grundmode bezeichnete elektromagnetische Welle, kann als Kugelwelle mit imaginärem Wellenzentrum angesehen werden [Eichler 1998].

Das Zentrum einer Kugelwelle - beschrieben durch

$$E(x, y, z, t) = \frac{A}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} \exp \left\{ -i \left[ k \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} - \omega t \right] \right\}, \quad (1.1)$$

wobei  $A / \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$  die Amplitude der Feldstärke ist - kann beliebig gewählt werden und sogar im Komplexen liegen:

$$z \rightarrow z + iz_R = q. \quad (1.2)$$

Wird ausschließlich der z-achsnahe (paraxiale) Bereich betrachtet ( $\sqrt{x^2 + y^2} = r \ll |q|$ ), dann nimmt (1.1) durch (1.2) folgende Gestalt an:

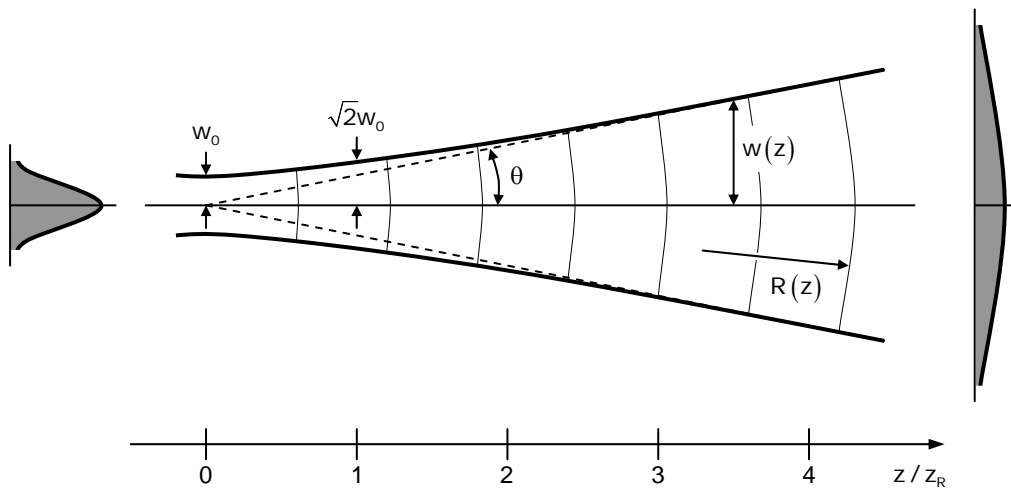
$$E(r, q, t) \approx \frac{B}{q} \exp\left[-i \frac{kr^2}{2q}\right] \exp[i(\omega t - kz)]$$

mit:  $B = A \cdot \exp[kz_R]$

und:  $\frac{1}{q} = \frac{1}{R(z)} - i \frac{2}{kw(z)}$ .

Zusammengefaßt gilt nun für die Feldverteilung eines Gaußschen Strahles

$$E(r, z, t) \approx \frac{B}{q} \exp\left[-\left(\frac{r}{w(z)}\right)^2\right] \exp\left[-i \frac{kr^2}{2R(z)}\right] \exp[i(\omega t - kz)]. \quad (1.3)$$



**Abbildung 1:** Die Parameter eines Gaußschen Strahles.

Aus (1.3) ergeben sich folgende Parameter, dargestellt in Abbildung 1:

Strahltaile:  $w_0 = \sqrt{\frac{2z_R}{k}} = \sqrt{\frac{\lambda z_R}{\pi}}$

Rayleighlänge:  $z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$

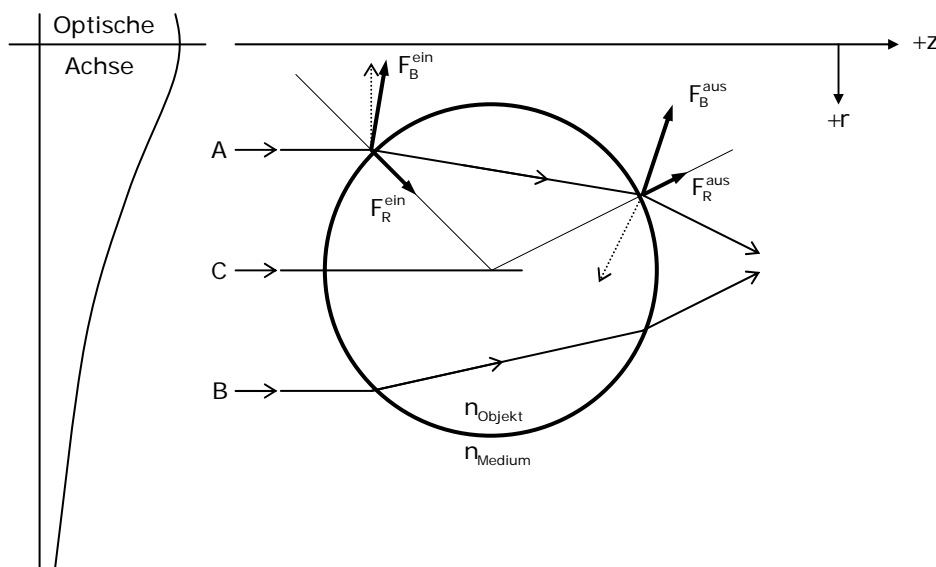
Krümmungsradius:  $R(z) = z + \frac{z_R^2}{z}$



Fleckgröße:  $w(z) = w_0 \sqrt{1 + (z/z_R)^2}$

Halber Öffnungswinkel:  $\theta = \frac{\lambda}{\pi w_0}$ .

In einem ersten Versuch benutzte Arthur Ashkin einen auf  $12,4 \mu\text{m}$  Durchmesser fokussierten  $\text{TEM}_{00}$  Laserstrahl, um auf suspendierte Latexkügelchen zu zielen, deren Brechungsindex größer war, als der des sie umgebenden Mediums [Ashkin 1970]. Die Kügelchen bewegten sich einerseits aufgrund des Strahlungsdruckes in Richtung des Laserstrahles. Es ließ sich jedoch auch die Komponente einer Kraft beobachten, die die Kügelchen zur optischen Achse hin zog, und somit in Richtung der höchsten Strahlungsintensität. Der Ursprung dieser radialen Kraft kann anhand von Abbildung 2 leicht erklärt werden:



**Abbildung 2:** Der Ursprung der radialen Kraft, welche ein transparentes Objekt mit einem höheren Brechungsindex als das umgebende Medium zur optischen Achse hin zieht. Nach [Ashkin 1970].

Das Kügelchen mit einem Brechungsindex  $n_{\text{Objekt}} > n_{\text{Medium}}$  befindet sich neben der optischen Achse, aber noch im Bereich der Strahltaile des fokussierten Strahles, dort wo die Wellenfronten annähernd eben sind und die drei exemplarischen Strahlen A, B und C parallel verlaufen.

Der Strahl A wird beim Eintritt und Austritt aus dem Kügelchen gebrochen und bewirkt aufgrund des Zweiten Newtonschen Axioms einen Impulsübertrag auf das Kügelchen, der

durch die Kräfte  $F_B^{\text{ein}}$  und  $F_B^{\text{aus}}$  beschrieben wird, die sowohl Komponenten in -r als auch in +z Richtung besitzen.

Neben der Brechung spielt auch die Teilreflexion beim Ein- und Austritt des Strahles eine Rolle: Die teilreflektierten Strahlen (gestrichelte Pfeile) bewirken kleinere Kräfte  $F_R^{\text{ein}}$  und  $F_R^{\text{aus}}$ . Die radiale Komponente von  $F_B^{\text{ein}}$  und  $F_B^{\text{aus}}$  ist wesentlich größer als die von  $F_R^{\text{ein}}$  und  $F_R^{\text{aus}}$ . Alle Kräfte haben Komponenten in +z Richtung, die das Kügelchen somit in Richtung des Laserstrahles beschleunigen.

Weiterhin ergeben sich beim vergleichsweise schwächeren Strahl B zum einen Reflexionskräfte, die das Kügelchen in +z Richtung beschleunigen, als auch Brechungskräfte, die es jetzt aber in +r Richtung treiben, allerdings ist deren Betrag geringer als der radiale Betrag der Kräfte, die der Strahl A hervorruft. Der Strahl C hingegen ruft nur Reflexionskräfte in +z Richtung hervor. Netto ergeben sich also zwei Arten von Kräften: Jene Komponenten der Kräfte in +z Richtung, die vor allem von den Reflexionskräften her rühren – sie werden als Streukräfte bezeichnet. Des weiteren ergibt sich eine Nettokraft in -r Richtung also in Richtung des Gradienten der Strahlungsintensität – diese betragsmäßig stärkeren Kräfte rühren vor allem von den Kräften, die aus der Lichtbrechung resultieren und werden als Gradientenkräfte bezeichnet. Es sind diejenigen, die das Kügelchen in Richtung der höchsten Lichtintensität ziehen. Im vorliegenden Fall erhält man somit eine zweidimensionale Optische Falle, mit einem Fallenpotential in radialer Richtung.

Um eine dreidimensionale Falle zu erzeugen, können entweder zwei gegeneinandergerichtete Strahlen verwandt werden, in der sich die Streukräfte gegenseitig kompensieren, oder ein Strahl kann entgegen der Schwerkraft ausgerichtet werden. Im letzteren Fall stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der nach oben gerichteten Streukraft und der Gravitationskraft ein, so dass sich das Kügelchen oberhalb der Strahltaile befindet.

Die eleganteste Umsetzung einer dreidimensionalen Falle wurde in [Ashkin 1986] beschrieben. Der Fortschritt hierbei war die Erzeugung einer zusätzlichen axialen Gradientenkraft. Diese wurde hervorgerufen durch einen Intensitätsgradienten auf der optischen Achse, der eine Kraft erzeugt, die stärker ist als die parallel zur optischen Achse zeigende Komponente der Streukraft. Die Idee hierbei war, einen einzigen Laserstrahl möglichst stark zu fokussieren (single-beam gradient force trap), also den Strahl extrem konvergieren zu lassen. Dazu benötigt es eine Linse - besser noch, ein Mikroskopobjektiv - mit einer hohen numerischen Apertur (NA):

$$NA = n_{\text{Medium}} \cdot \sin \theta = r / f ,$$

wobei r der Radius der Apertur des Objektivs und f dessen Brennweite ist.

Die auftretenden Kräfte in der Optischen Falle lassen sich auf zwei verschiedene Art und Weisen beschreiben, je nachdem, ob Objekte gefangen werden, die dem Mie- oder dem Rayleigh-Regime unterliegen.

Beim letztgenannten gilt für das Verhältnis von Größe des Partikels  $2r$  zur verwendeten Wellenlänge  $\lambda$  des Lasers:  $2r < 0,2 \cdot \lambda$ . Die wellenoptische Beschreibung sieht nun ebenfalls die Existenz der beiden Komponenten Streu- und Gradientenkraft vor [Svoboda 1994; Ashkin 1986]. Für den Fall, daß das elektromagnetische Feld im Bereich des als Punktdipol betrachteten Rayleighobjektes homogen ist, wirkt zum einen eine Streukraft

$$F_{\text{Streu}} = n_{\text{Medium}} \frac{|\langle \vec{S} \rangle| \sigma}{c} = \frac{I \cdot n_{\text{Medium}}}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (1.4)$$

in Richtung des Lichtes und zum anderen eine Gradientenkraft in Richtung der höchsten Lichtintensität (hierbei muß jedoch davon ausgegangen werden, daß das elektromagnetische Feld im Bereich des Rayleighobjektes nicht mehr homogen ist):

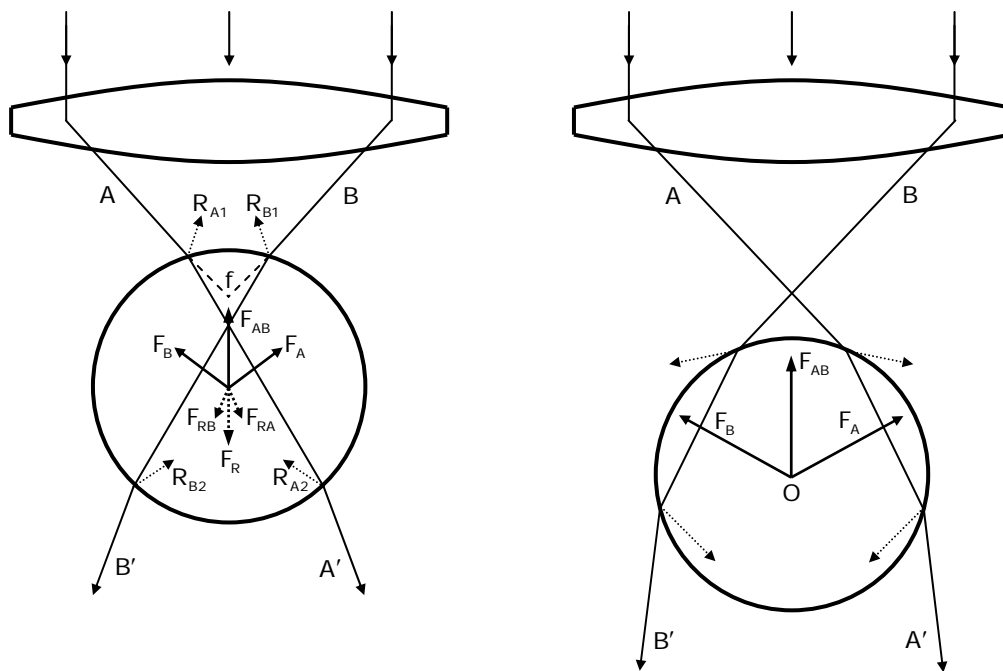
$$\vec{F}_{\text{Grad}} = -\frac{n_{\text{Medium}}}{2} \alpha \nabla \langle E^2 \rangle = -\frac{r^3 n_{\text{Medium}}^3}{2} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 - 2} \right) \nabla \langle E^2 \rangle. \quad (1.5)$$

Hierbei ist  $|\langle \vec{S} \rangle|$  der Betrag des zeitlichen Mittelwertes des Poyntingvektors,  $\sigma$  der Streuquerschnitt des Rayleighpartikels,  $I$  die Lichtintensität,  $m = n_{\text{Objekt}} / n_{\text{Medium}}$  der effektive Brechungsindex,  $\alpha$  die Polarisierbarkeit des Partikels und  $\langle E^2 \rangle$  der zeitliche Mittelwert des Quadrats des elektrischen Feldes der Welle.

Als Bedingung, daß ein Objekt in der Optischen Falle gefangen wird, muß zum einen gelten, daß  $F_{\text{Grad}} / F_{\text{Streu}} \geq 1$  ist, im speziellen sollte jedoch dieses Verhältnis wesentlich größer als 1 sein: Ist das Verhältnis beispielsweise mindestens 3, dann ist das Stabilitätskriterium für alle Objekte im Rayleighbereich mit der Größe  $2r \leq 95 \text{ nm}$  erfüllt. Das bedeutet jedoch nicht, daß Objekte mit  $2r > 95 \text{ nm} \Leftrightarrow F_{\text{Grad}} / F_{\text{Streu}} < 3$  nicht mehr stabil im Fokus gefangen würden; in diesem Fall verlassen lediglich die Formeln (1.4) und (1.5) ihren Rayleigh-Gültigkeitsbereich.

Eine hinreichende Bedingung für eine stabile Optische Falle wäre ein Boltzmannfaktor von  $\exp[-U/k_B T] \ll 1$ , wobei  $U = n_{\text{Medium}} \alpha E^2 / 2$  das Potential der Gradientenkraft ist [Ashkin 1986; Visscher 1992]. Dies bedeutet nichts anderes, als daß die Zeit in der das Objekt von außerhalb in die Falle gezogen wird, größer sein muß, als die Zeit in der das Objekt durch Diffusion infolge Brownscher Bewegung die Falle wieder verlassen kann.

Anders als für den Rayleigh-Bereich, ist die Wirkungsweise einer dreidimensionalen Optischen Falle im Mie-Bereich ( $2r \gg \lambda$ ) wiederum durch geometrische Optik leicht zu beschreiben [Ashkin 1986; Ashkin 1992]:



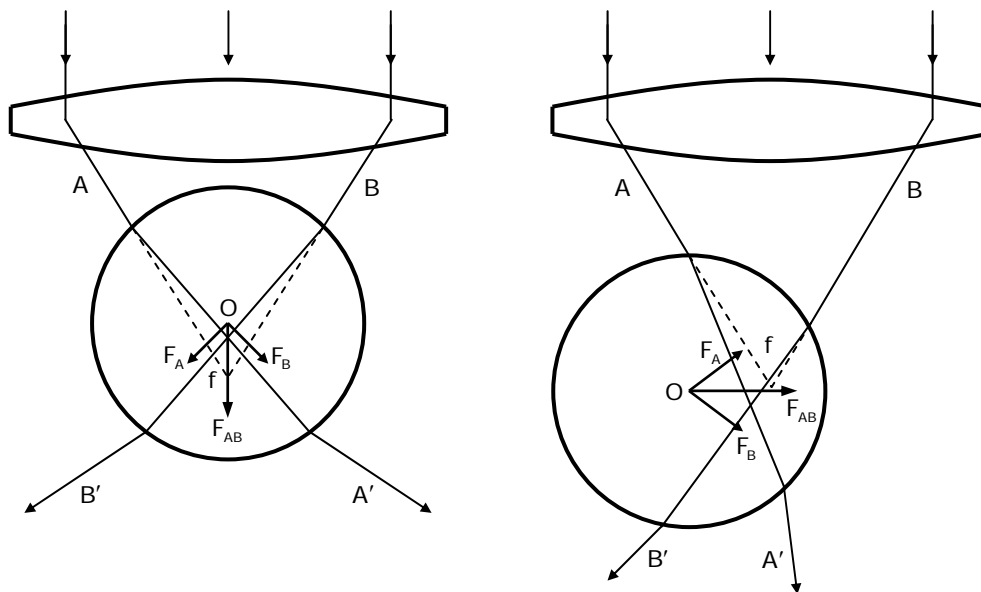
**Abbildung 3:** Geometrische Beschreibung der Streu- und Gradientenkräfte der Optischen Falle.

Die stark konvergenten exemplarischen Strahlen A und B in Abbildung 3 werden (analog zur Abbildung 2) beim Ein- und Austritt aus dem Kugelchen gebrochen. Infolge der geänderten Richtung der Strahlen A' und B' wird ein Teil von deren Impuls auf das Kugelchen übertragen und ruft dort die Kräfte  $F_A$  und  $F_B$  hervor. Die resultierende Kraft  $F_{AB}$  zeigt in Richtung der optischen Achse und bildet somit eine Gradientenkraft, die das Kugelchen in der Nähe des geometrischen Fokus  $f$  des Objektivs festhält, und der Streukraft  $F_R$  entgegengerichtet ist. Diese Netto-Streukraft, die bestrebt ist das Kugelchen in Richtung des Lichtes wegzustoßen, wird hervorgerufen durch Reflexionen an der Oberfläche des Kugelchens beim Ein- und Austritt der Strahlen - dargestellt als reflektierte Strahlen  $R_{A1}$ ,  $R_{B1}$ ,  $R_{A2}$  und  $R_{B2}$ .

Obwohl in Abbildung 3 sich das Kugelchen im linken Bild innerhalb und im rechten Bild außerhalb des geometrischen Fokus befindet, wirken in beiden Fällen Gradientenkräfte, die zum Fokus hin gerichtet sind. Aber die Gradientenkraft  $F_{AB}$  im rechten Bild ist betragsmäßig stärker, da die Lichtstrahlen beim Durchgang durch das Kugelchen einer stärkeren Brechung unterliegen und somit der Impulsübertrag größer ist.

Ein stabiler axialer Gleichgewichtszustand stellt sich ein, sobald die Gradientenkraft gleich der entgegengesetzten Streukraft ist. Wirken auf das Kügelchen noch zusätzliche äußere Kräfte, so findet man ein Gleichgewicht vor, sobald die Vektorsumme aller Kräfte null ist.

Anhand Abbildung 4 läßt sich verdeutlichen, daß sich auch radial ein stabiler Gleichgewichtszustand einstellen muß, und ebenfalls, sobald das Kügelchen weiter in Richtung Objektiv ausgelenkt wird:



**Abbildung 4:** Gradientenkräfte im Falle eines weit in Richtung Objektiv (links) und eines radial ausgelenkten Kügelchens (rechts).

Im linken Bild ist zu erkennen, daß die Gradientenkraft auf das Kügelchen genau dann in Strahlrichtung zeigt, falls dieses über den Gleichgewichtszustand hinaus in Richtung Objektiv ausgelenkt wird. Im rechten Bild wird das Kügelchen vom Gleichgewichtszustand aus senkrecht zur optischen Achse ausgelenkt. Die vom Impuls des Lichtes übertragene, radial gerichtete Kraft ist bestrebt, es wieder auf die optische Achse zu ziehen.

Der Mittelpunkt eines in der optischen Falle gefangenen Kügelchens ist im Vergleich zum geometrischen Brennpunkt des Objektivs immer ein wenig in +z Richtung verschoben, da im Vergleich zur axialen Gradientenkraft die betragsmäßig geringere z-Komponente der Streukraft es in diese Richtung schiebt.

Theoretische Überlegungen [Ashkin 1992] und auch Experiment haben gezeigt, daß stabile Einzelstrahlfallen für Teilchen im Mie-Regime vor allem dann erreicht werden, wenn der effektive Brechungsindex  $m = n_{\text{Objekt}} / n_{\text{Medium}}$  mindestens 1,2 beträgt. Weiterhin sollte der

Konvergenzwinkel  $\theta$  des fokussierten Strahles mindestens  $70^\circ$  betragen, um vor allem biologische Objekte gut fangen zu können, denn deren effektiver Brechungsindex ist in vielen Fällen nur ein wenig größer als 1.

Bei zu kleinen Konvergenzwinkeln ( $\theta \sim 30^\circ$ ) dominiert schließlich die Streukraft über die axiale Gradientenkraft, und eine stabile dreidimensionale Einzelstrahl Falle ist nicht mehr zu erzeugen.

## 1.2 Brownsche Bewegung eines Teilchens im harmonischen Potential

Das Potential  $V(x)$  der Optischen Falle in einer Dimension läßt sich als Potential eines harmonischen Oszillators mit  $V(x) = 0,5 \cdot k \cdot x^2$  beschreiben;  $k$  ist hierbei die Federkonstante. Die rückstellende Kraft im Potential beträgt  $F = -dV/dx = -k \cdot x$ . Ein Teilchen mit der Masse  $m$  schwingt dann mit einer Eigenfrequenz von  $f_0 = (k/m)^{0,5} \cdot (2\pi)^{-1}$ .

Ist ein Partikel im Potential gefangen, befindet sich die Falle samt Partikel in einem Medium mit dem Reibungskoeffizient  $\gamma = 6\pi\eta r$  (mit dem Radius  $r$  des Partikels und der Viskosität  $\eta$  des Mediums) und wird zudem eine zeitabhängige äußere Kraft  $F(t)$  betrachtet, dann ergibt sich folgende Bewegungsgleichung für das Partikel [Svoboda 1994]:

$$\gamma \frac{dx}{dt} + k \cdot x = F(t). \quad (1.6)$$

Diese sogenannte Langevin-Gleichung enthält in deren einfachster Form eine äußere Kraft  $F(t)$ , die sich in der Brownschen Bewegung von freien Teilchen manifestiert.

Um nun die Kraftkonstante der Optischen Falle zu bestimmen, kann die Langevin-Gleichung zunächst mit der Einstein-Stokes Gleichung  $D = k_B T / \gamma$  umgestellt werden. Hierbei ist  $D$  die Diffusionskonstante,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur. Gleichung (1.6) nimmt daraufhin folgende Gestalt an [Pampaloni]:

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{k}{\gamma} x + \sqrt{2D}\zeta. \quad (1.7)$$

Hier ist  $\zeta$  eine Gaußsche stochastische Variable mit dem zeitlichen Mittelwert  $\langle \zeta(t) \rangle = 0$  und der Varianz  $\langle \zeta(t) \cdot \zeta(t') \rangle = \delta(t - t')$ .

Neben der Langevin-Gleichung (1.6) kann ebenfalls die Fokker-Planck Gleichung herangezogen werden, um die Kraftkonstante zu ermitteln. Letztgenannte Gleichung beschreibt die

Wahrscheinlichkeit, ein Teilchen zur Zeit  $t$  am Ort  $x$  vorzufinden. Mit Hilfe der Autokorrelationsmessung kann daraufhin die Federkonstante  $k$  bestimmt werden.

Ein anderer Weg die Kraftkonstante zu ermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit gegangen. Dazu wird zunächst Gleichung (1.7) fouriertransformiert. Man erhält die Fourieramplitude

$$\tilde{x}(\omega) = \frac{\sqrt{2D}}{i\omega + k/\gamma}$$

und hieraus das Lorentz-Spektrum

$$S(\omega) = \frac{2D}{\omega^2 + (k/\gamma)^2},$$

welches mit  $\omega_c = k/\gamma \Leftrightarrow f_c = k/2\pi\gamma$  und der Einstein-Stokes Gleichung umgeschrieben werden kann:

$$S(f) = \frac{k_B T}{2\pi^2 \gamma (f^2 + f_c^2)}. \quad (1.8)$$

Diese Gleichung enthält die Eckfrequenz (corner frequency)  $f_c$ , mit der die Kraftkonstante

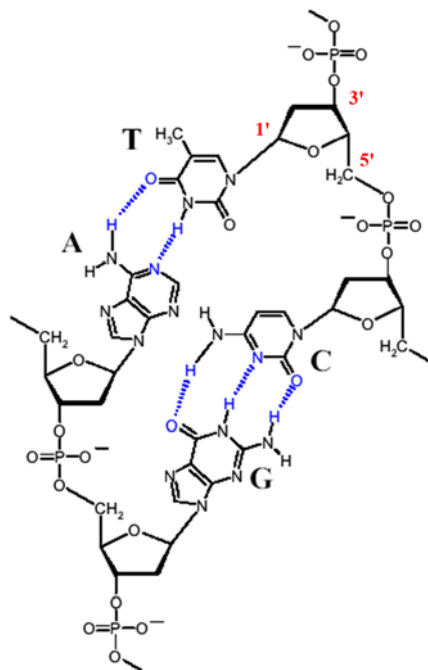
$$k = 2\pi\gamma f_c \quad (1.9)$$

ermittelt werden kann - unter Zuhilfenahme des einfach zu ermittelnden Stokesschen Reibungskoeffizienten  $\gamma$ .

Um die Eckfrequenz zu bestimmen, wird das Frequenzspektrum (Rauschspektrum) eines gefangenen Objektes aufgenommen. Im Spektrum wird die Rauschamplitude [ $V^2\text{Hz}^{-1}$ ] (Spektrale Leistungsdichte) in Abhängigkeit der Frequenz [Hz] aufgetragen und das Lorentz-Spektrum (1.8) angefitet.

### 1.3 DNA

Das bekannteste in der Natur vorkommende Polymermolekül ist die DNA (Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure). Sie ist ein Polymer aus Nukleotiden, wobei ein Nukleotid aus einem Zuckermolekül besteht, der 2-Desoxyribose, die am 5'-C-Atom mit einer Phosphatgruppe verestert ist und am 1'-C-Atom eine Bindung zum N-Atom einer Base aufweist (Abbildung 5); [Sanger 1984; Stryer 1999; Nelson 2001].



**Abbildung 5:** Ausschnitt aus der Struktur einer doppelsträngigen DNA (dsDNA), die aus zwei antiparallelen, komplementären Polymersträngen gebildet ist. Die äußeren Bereiche bilden das Rückgrat aus alternierenden Desoxyribose- und Phosphatgruppen. Dazwischen liegen die Watson-Crick Basenpaare A-T (Adenin-Thymin) oder G-C (Guanin-Cytosin) mit ihren jeweiligen Wasserstoffbrückenbindungen (blau). Quelle: [www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC\\_II](http://www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC_II)

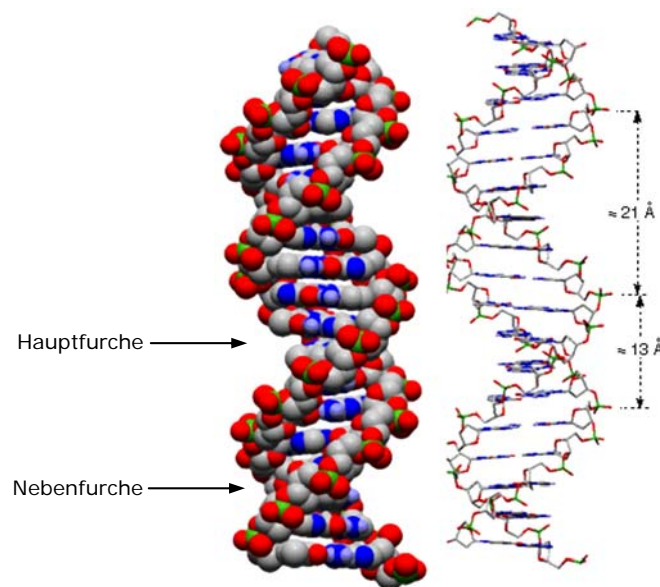
Die vier Basen sind zum einen die Purinderivate Adenin (A) und Guanin (G), sowie die Pyrimidinderivate Thymin (T) und Cytosin (C). Wird die OH-Gruppe am 3' Ende der Desoxyribose mit einer Hydroxylgruppe der Phosphatgruppe eines weiteren Nukleotids verestert, so kann schrittweise ein Nukleotidstrang gebildet werden - eine einzelsträngige DNA (ssDNA - single stranded DNA). Zwei Ketten von antiparallelen Nukleotidsträngen, der eine in 5'-3' und der andere in 3'-5' Richtung, um eine gemeinsame Achse gewunden, ergeben dann eine doppelsträngige DNA (dsDNA), eine Doppelhelix. Die Zucker-Phosphatreste bilden hierbei das außen liegende Rückgrat der dsDNA. Die Nukleotidstränge werden zusammengehalten durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen, wobei A nur mit T über zwei, und G nur mit C über drei Wasserstoffbrücken verknüpft ist - es bilden sich sogenannte Watson-Crick Basenpaare aus. Folglich sind beide Nukleotidstränge komplementär zueinander.

Weiterhin wird die dsDNA durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Aromaten benachbarter Basenpaare stabilisiert (Basenstapelwechselwirkungen). Die negative Ladung der Phosphatgruppen wird zudem *in vivo* und *in vitro* durch eine Schicht



von Wassermolekülen, sowie durch Ionen (in vivo vor allem durch zweiwertige Kationen) abgeschirmt.

Die unter physiologischen Bedingungen (Ionenstärke, pH Wert, Temperatur) vorkommende Form der dsDNA ist die rechtshändige B-Doppelhelix (B-DNA). Bei dieser Konformation stehen die Aromaten der Basen fast senkrecht ( $89^\circ$ ) zur Achse der Doppelhelix. Benachbarte Basenpaare haben einen Abstand von 0,34 nm zueinander und sind um  $35,9^\circ$  gegeneinander verdreht, so daß die Helix eine Periodizität von 10,4 Basenpaaren (bp) besitzt, und somit eine  $10_1$ -Helix darstellt. Der Durchmesser der Helix beträgt 2,37 nm.



**Abbildung 6:** Kalotten- und Stabmodell einer B-DNA Doppelhelix. Zu erkennen sind die Haupt- und Nebenfurche (major- und minor-groove), die als Bindungsstellen für kleine Moleküle (Liganden) dienen können. Quelle: [www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC\\_II](http://www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC_II)

Eine wichtige sterische Eigenschaft der B-DNA (auch Watson-Crick Helix genannt) ist die Ausbildung einer großen und einer kleinen Furche (Haupt- und Nebenfurche; major- und minor-groove), die beide eine funktionelle Bedeutung für die DNA haben: Sie dienen als potentielle Bindungsstellen für DNA bindende Agenzien, da in den Furchen Donor- und Akzeptorgruppen für mögliche Wasserstoffbrücken sitzen, über die Liganden an die DNA binden können (Kapitel 1.6).

## 1.4 Die entropische Elastizität und das Worm Like Chain-Modell

Man findet eine hinreichend lange DNA (einige Mikrometer oder länger) in wäßriger Lösung so gut wie nie in der Form eines sauber ausgestreckten Makromoleküls vor, ebensowenig wie ein im Wasser schwimmendes Seil. Statt dessen bilden Makromolekül und Lösungsmittel ein System, welches die größtmögliche Entropie annimmt. In diesem Falle liegt die DNA in einer Konformation vor, die als Statistisches Knäuel bezeichnet wird.

Hat man es erst einmal geschafft, beide Enden der DNA "in die Hand zu bekommen" - und bereits das ist ein kleiner, aber entscheidender Teil der vorliegenden Arbeit - so würde ein Auseinanderziehen der Enden eine Reduzierung der Entropie ergeben, die einher geht mit der Aufwendung von Energie. Arbeit muß also am System verrichtet werden, um eine gewünschte End-End-Distanz des Moleküls zu erreichen.

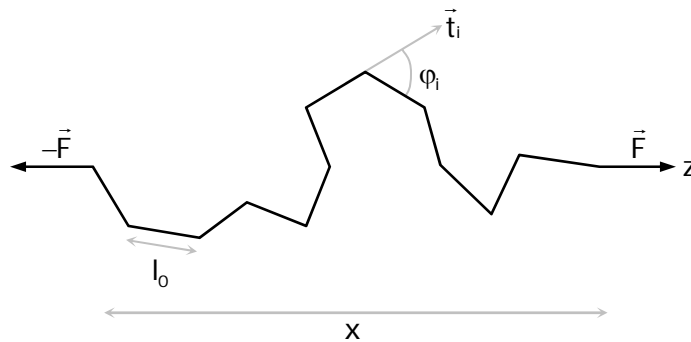
Bei voller Ausdehnung des Moleküls - dessen intrinsische Elastizität vernachlässigt - entspricht dann die End-End Distanz genau der Konturlänge  $L_0$ .

Im Falle einer dsDNA im allgemeinen und einer in dieser Arbeit verwendeten Lambda-DNA mit einer Konturlänge von  $16,4 \mu\text{m}$  im speziellen, liegen die rein entropischen Kräfte im Bereich bis  $10 \text{ pN}$  [Bustamante 1994], vorausgesetzt das Knäuel hat sich nicht verknotet. Oberhalb davon wird das elastische Verhalten einer DNA mehr und mehr von der Enthalpie bestimmt.

Das durch die entropischen Kräfte bestimmte Verhalten von Polymerknäueln kann durch folgende Modelle beschrieben werden [Flory 1969]:

- Das Freely Jointed Chain (FJC)-Modell: Eine Markov-Kette aus  $N$  gleich langen, starren, unabhängigen Gliedern der Länge  $l_0$  wird betrachtet, deren Bindungswinkel beliebig sein können. Die Kette vollführt einen sogenannten Random-Walk.
- Das Freely Rotating Chain (FRC)-Modell: Wie das FJC-Modell, mit der Einschränkung, daß nur bevorzugte und feste Bindungswinkel zugelassen werden.
- Das Worm Like Chain (WLC)-Modell: Ähnlich dem FRC-Modell mit der Bedingung  $l_0 \rightarrow 0$ .  
Das WLC-Modell ist am besten geeignet für die Beschreibung von dsDNA, also relativ steifen Polymeren. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die WLC-Formel verwendet.

Zur Beschreibung des Worm Like Chain-Modells wird zunächst eine Polymerkette betrachtet, die zudem keine Verdrillung aufweisen soll - dargestellt durch das Kratky-Porod-Modell [Kratky 1949; Cantor 1980; Strick 2000a] (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Das Kratky-Porod-Modell besteht aus einer Kette von  $N$  frei rotierenden Segmenten der Länge  $l_0$ . Jedem Segment wird ein Orientierungsvektor  $\vec{t}_i$  zugeordnet, der mit dem darauffolgenden Segment einen Winkel  $\varphi_i$  bildet. Die  $z$ -Achse läuft entlang der Ziehrichtung der externen Kraft  $\vec{F}$ .  $x$  ist die charakteristische Größe eines Polymerknäuels in wässriger Lösung.

Die Kette aus  $N$  Segmenten des Kratky-Porod-Modells besitzt die folgende Energie  $E_{\text{KP}}$ , die sich aus der Summe der Biegeenergien aller Segmente ergibt:

$$E_{\text{KP}} = -\frac{\kappa}{l_0} \sum_{i=2}^N \vec{t}_i \vec{t}_{i-1} = -\frac{\kappa}{l_0} \sum_{i=2}^N \cos \varphi_i. \quad (1.10)$$

$\kappa$  ist hierbei die Biegesteifigkeit. Die Winkelkorrelation nimmt mit zunehmendem Abstand zwischen den Segmenten gemäß

$$\langle \vec{t}_i \vec{t}_j \rangle = \exp \left[ -\frac{l_0 |i-j|}{\xi} \right]$$

ab. Die charakteristische Länge der Winkelkorrelation

$$\xi = \frac{\kappa}{k_B T}$$

wird auch als Persistenzlänge bezeichnet. Die mittlere quadratische End-End-Distanz  $x$  der Kette beträgt

$$\langle x^2 \rangle = \left( l_0 \sum_{i=1}^N \vec{t}_i \right)^2 \approx 2N l_0 \xi = 2L_0 \xi. \quad (1.11)$$

Wirkt eine äußere Kraft auf beide Enden des Polymers ein (siehe Abbildung 7), so verrichtet die Kraft entlang der z-Achse die Arbeit

$$W = -\vec{F} \cdot \vec{x} = -F l_0 \sum_{i=1}^N t_{iz} = -F l_0 \sum_{i=1}^N \cos \Phi_i, \quad (1.12)$$

wobei  $t_{iz}$  die Komponente des Vektors  $\vec{t}_i$  in z-Richtung und  $\Phi_i$  der Winkel zwischen  $\vec{t}_i$  und der z-Achse ist. Die Gesamtenergie des Systems erhält man einfach durch Addition von (1.10) und (1.12):

$$E_{\text{KP}} = -\frac{\kappa}{l_0} \sum_{i=2}^N \cos \varphi_i - F l_0 \sum_{i=1}^N \cos \Phi_i. \quad (1.13)$$

Gleichung (1.13) ist nur für kleine Kräfte analytisch lösbar, aber eine mögliche Näherung ergibt sich auf Basis des Worm Like Chain-Modells, bei dem man  $l_0 \rightarrow 0$  streben läßt. Die Folge davon ist, daß man von diskreten Vektoren  $\vec{t}_i$  zu einem kontinuierlichen Tangentenvektor  $\vec{t} = \partial \vec{r} / \partial s$  übergeht, wobei  $\vec{r}(s)$  die Raumkurve des Polymers darstellt.

Für den Fall, daß Kraft und Dehnung des Polymers immer in z-Richtung verlaufen, wird aus (1.13) in der WLC-Näherung [Marko 1995a]:

$$\frac{E_{\text{WLC}}}{k_B T} = \frac{\xi}{2} \int_0^{L_0} ds \left( \frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right)^2 - F \int_0^{L_0} ds \cdot \cos \Phi(s), \quad (1.14)$$

wobei für die Biegesteifigkeit  $\kappa = \partial \vec{t} / \partial s = \partial^2 \vec{r} / \partial s^2$  gilt.

Bei großen Kräften nähert sich die Ausdehnung des Polymers der Konturlänge an, und  $\vec{t}$  fluktuiert nur noch schwach um die z-Achse. In einem solchen Fall können die  $t_z$ -Fluktuationen als quadratische Funktion der  $t_x$ - und  $t_y$ -Komponenten beschrieben werden:

$$t_z = 1 - \vec{t}_\perp^2 / 2 + O(\vec{t}_\perp^4),$$

mit  $\vec{t}_\perp = [t_x, t_y]$  und  $|\vec{t}| = 1$ .

Nach Fouriertransformation von  $\vec{t}_\perp$  ( $\vec{t}_\perp \rightarrow \vec{t}_\perp(\vec{q})$ ) kann eine Gaußsche Näherung für (1.14) angegeben werden [Marko 1995b]:

$$\frac{E_{\text{WLC}}}{k_B T} = -F L_0 + \frac{1}{2} \int d\vec{q} \frac{\xi \vec{q}^2 + F}{2\pi} |\vec{t}_\perp|^2.$$

Für der Mittelwert von  $\vec{t}_\perp^2$  und die End-End Distanz  $x$  des Polymers gelten weiterhin:

$$\begin{aligned} \langle \bar{t}_\perp^2 \rangle &= \frac{1}{2\pi} \int d\bar{q} \langle |\bar{t}_\perp(\bar{q})|^2 \rangle = \frac{1}{\pi} \int d\bar{q} \frac{1}{\xi \bar{q}^2 + F} = \frac{1}{\sqrt{F\xi}} \\ \Rightarrow \frac{x}{L_0} = \bar{t} \cdot \bar{z} &= 1 - \langle \bar{t}_\perp^2 \rangle / 2 = 1 - \frac{1}{\sqrt{4F\xi}}. \end{aligned}$$

Die aufzuwendende Kraft, ein Polymer auf die End-End-Distanz  $x$  auszustrecken, kann somit durch folgende Interpolationsformel ausgedrückt werden [Bustamante 1994; Marko 1995a]:

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left[ \frac{1}{4(1 - x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right], \quad (1.15)$$

die im weiteren Verlauf der Arbeit als "WLC Gleichung" bezeichnet wird.

Die WLC-Gleichung (1.15) hat die Eigenschaft, das Kraft-Ausdehnungsverhalten von Polymeren bei  $x \rightarrow 0$  und  $x \rightarrow L_0$  sehr gut zu beschreiben, sie soll jedoch bei  $x/L_0 \approx 0,5$  mehr als 10% von dem tatsächlichen Verhalten abweichen [Bustamante 1994]. Unter anderem aus diesem Grund erweiterte Bouchiat et al. [Bouchiat 1999] die WLC-Gleichung um ein Polynom siebten Grades in  $x/L_0$  zu einem "extended"-WLC-Modell:

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left[ \frac{1}{4(1 - x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} + \sum_{i=2}^{i=7} a_i \left( \frac{x}{L_0} \right)^i \right]. \quad (1.16)$$

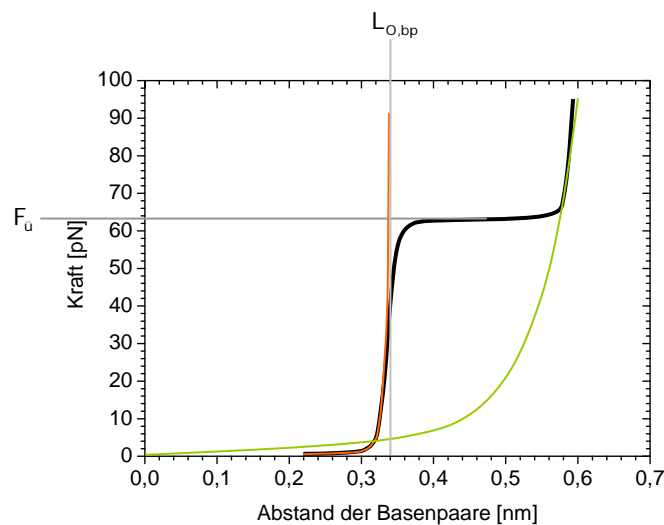
Die Kraft-Distanzkurven der vorliegenden Arbeit wurden sowohl mit der WLC-Gleichung, als auch mit dem Extended WLC Modell angefitet, um Persistenz- und Konturlängen zu bestimmen. Hierbei stellte sich heraus, daß sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Kraft- und Längenbereichen in denen das WLC-Modell und das "extended"-WLC-Modell angefitet wurde (0 bis 10 pN bzw. 1,0 bis 22  $\mu\text{m}$ ), die Ergebnisse beider Modelle um weniger als 2% voneinander unterschieden. Die Abweichung der WLC-Fits im Vergleich zu den Meßdaten im Bereich um  $x/L_0 \approx 0,5$  von mehr als 10% konnte in dieser Form nicht bestätigt werden. Insofern wurde für die meisten in dieser Arbeit gemachten Fits das WLC Modell nach Gleichung (1.15) verwendet.

## 1.5 Überstrecken einer dsDNA

Um einen tieferen Einblick in die intramolekularen Kräfte oder in mögliche strukturelle Übergänge eines Makromoleküls zu erhalten, muß es über den Kraftbereich der rein entropischen Kräfte hinaus gestreckt werden.

In ersten Versuchen dieser speziellen Einzelmolekülmechanik mittels AFM [Rief 1997] und Optischer Pinzette [Kellermayer 1997] wurde Titin, ein Muskelprotein mit einer periodischen Multidomänenstruktur verwendet. In der Kraft-Ausdehnungskurve ergab sich ein charakteristisches Sägezahnmuster, das als kraftinduzierte Denaturierung der Domänen interpretiert wurde.

Versuche, DNA über die entropischen Kräfte hinaus zu strecken, wurden zunächst ebenfalls mit AFM Techniken gemacht [Lee 1994]. Optische Pinzetten, die zwar im Vergleich zum AFM eine weitaus geringere maximale Kraft erreichen können, aber dafür eine um so höhere Kraftauflösung besitzen, stellten sich als hervorragendes Werkzeug bei der Untersuchung der elastischen Eigenschaften von DNA heraus. Erste Versuche mit dsDNA zeigten, daß im Bereich der entropischen Kräfte sich dieses Makromolekül annähernd wie eine elastische Feder verhält - dieser Bereich kann durch die verschiedenen theoretischen Modelle (siehe vorhergehendes Kapitel) und in Abhängigkeit der berücksichtigten Parameter gut beschrieben werden [Bustamante 1994; Wenner 2002]. Bei höheren Kräften tritt jedoch ein hochkooperativer struktureller Übergang ein [Smith 1996; Cluzel 1996], welcher sich als Kraftplateau manifestiert.



**Abbildung 8:** Typische Kraft-Ausdehnungskurve (schwarze Kurve) einer dsDNA. Die Länge des dsDNA Stranges (das Produkt aus dem Abstand und der Anzahl der vorhandenen Basenpaare) ist hierbei als Basenpaarabstand angegeben. Die orange Kurve ist das WLC-Modell, das gut den entropischen Kraftbereich beschreibt, und welches die Konturlänge  $L_{0,bp}$  in Einheiten des Basenpaarabstandes liefert. Die grüne Kurve ist die Kraft-Ausdehnungskurve einer ssDNA [Rouzina 2001a].  $F_{\ddot{u}}$  ist die benötigte Kraft, um die Mitte des Kraftplateaus (ca. 0,47 nm Basenpaarabstand) zu erreichen.

Abbildung 8 zeigt ein typisches Kraft-Ausdehnungsdiagramm beim Ausstrecken einer dsDNA unter physiologischen Bedingungen. Die Kraft-Dehnungskurve kann unter veränderten äußeren Bedingungen stark von dem aufgezeigten Verlauf abweichen, doch darauf soll erst später eingegangen werden.

Die Kurve zeigt bei kleinen Kräften bis etwa 20...30 pN das durch das WLC-Modell (orange Kurve in Abbildung 8) beschreibbare elastische Verhalten infolge der auftretenden entropischen Kräfte. Die Ausdehnung der DNA nähert sich hierbei asymptotisch der Konturlänge an, die jedoch im Modell erst bei einer unendlich hohen Kraft erreicht würde. Die Konturlänge pro Basenpaar ( $L_{0, bp}$ ) entspricht hierbei einem Abstand der Basenpaare von 0,34 nm, dementsprechend besitzt die DNA eine Konturlänge von 0,34 nm multipliziert mit der Anzahl der Basenpaare.

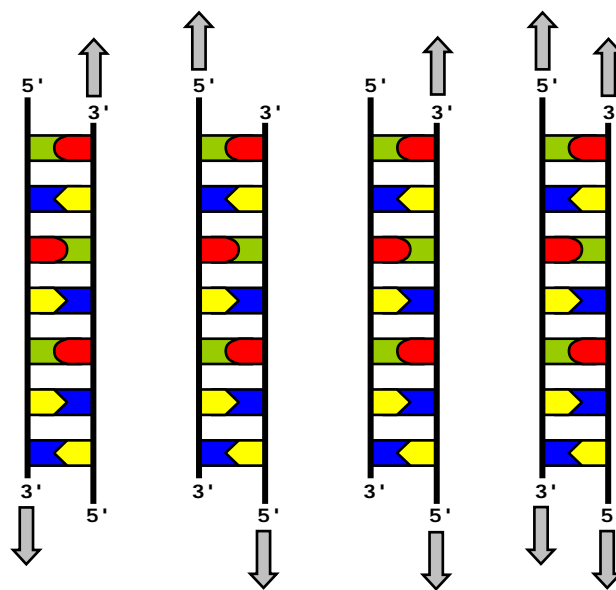
Bei Kräften von 20 bis etwa 50 pN kann der Verlauf nicht mehr exakt mit dem WLC-Modell beschrieben werden. Die Vermutung liegt nahe, daß in diesem Kraftbereich bereits die chemischen Bindungen leicht gedehnt werden, was zu einer zusätzlichen Längenzunahme führt. Das ermöglicht der DNA, sich über ihre eigentliche Konturlänge hinaus zu dehnen. Im (extended) WLC-Modell kann diesem Verhalten Rechnung getragen werden, indem ein enthalpischer Term eingefügt wird:  $x/L_0$  wird durch  $x/L_0 - F/K_0$  ersetzt, wobei  $K_0$  das Young-Elastizitätsmodul darstellt [Odijk 1995]. Ein WLC-Fit ergibt unter physiologischen Bedingungen eine Konturlänge von 0,34 nm pro Basenpaar und eine Persistenzlänge von  $\cong 50$  nm [Williams 2001b]. Der Fit mit einem "extended"-WLC-Modell oder einem WLC-Modell mit berücksichtigtem Young-Elastizitätsmodul (einem "extensible"-WLC-Modell) ergibt nahezu identische Persistenz- und Konturlängen, und im letzteren Falle ein Elastizitätsmodul zwischen 1200 pN [Wenner 2002] und 1500 pN [Husale 2002].

Bei der Auswertung der in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigte sich jedoch, daß diese Erweiterung zu keiner präziseren Bestimmung der Persistenz- und der Konturlängen führten.

Steigen die Kräfte bis über 60 pN an, so geht die Kraft in ein Plateau über, in dem die dsDNA bis auf etwa das 1,7-fache ihrer ursprünglichen Länge gestreckt werden kann. Die Kraft steigt während dessen nur um wenige pN an. Die Kraft  $F_{\bar{u}}$  (auch Überstreckungskraft, oder "overstretching force" genannt) soll hierbei als die charakteristische Kraft im Überstreckungsplateau angesehen werden. Sie ist erreicht, wenn die DNA auf das 1,35-fache ihrer Konturlänge gestreckt wird. Am Ende des Überstreckungsplateaus hat die DNA schließlich eine Länge erreicht, die einem Basenabstand von 0,58 nm entspricht [Smith 1996; Rouzina 2001a].

Die grüne Kurve in Abbildung 8 stellt das elastische Verhalten einer ssDNA dar. Deren Verlauf kann sehr gut mit dem "extensible"-FJC-Modell beschrieben werden, aus dem eine Persistenzlänge von 0,75 nm, eine Konturlänge pro Basenpaar von 0,56 nm und ein Young-Elastizitätsmodul von 800 pN erhalten werden kann [Smith 1996].

Bei Kräften von über 65 pN haben die Kraftkurven von ssDNA und dsDNA zunächst einen ähnlichen Verlauf, was zur naiven Behauptung führen könnte, die dsDNA habe beim Ausstrecken nun einen Phasenübergang hin zu einer ssDNA vollführt. Dies wäre nur insofern richtig, falls alle Basenpaare aufgebrochen sind und die Kraft nur an einem Strang der doppelsträngigen DNA angreift - dies entspricht dem zweiten Bild von rechts in Abbildung 9.

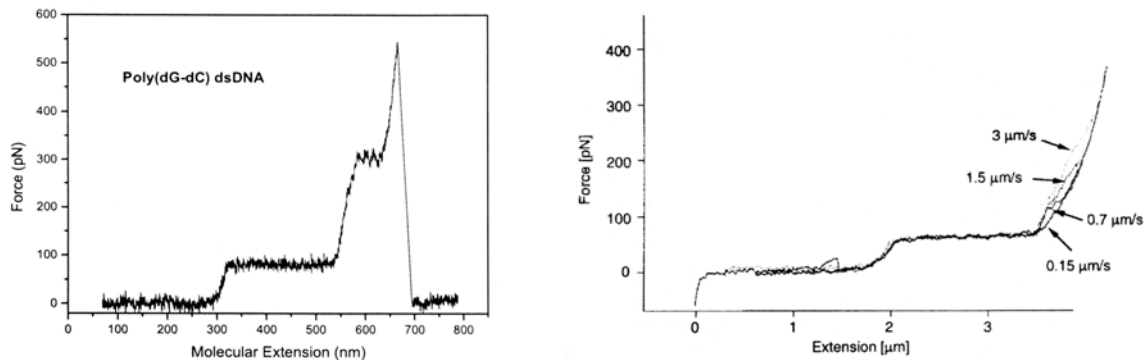


**Abbildung 9:** Die vier Möglichkeiten, an einem dsDNA Strang zu ziehen [Lebrun 1996], wobei die Kraft parallel zur Helixachse zeigt. Die Zugkraft kann entweder am 3'- oder am 5'-Ende (Terminus) des Rückgrates angreifen, wobei 3' und 5' für die Positionen des C-Atoms am Zuckerring des Nukleotids stehen (siehe Abbildung 5).

Bei Kräften zwischen 90 und 120 pN ist der Anstieg der Kraftkurve der dsDNA (die Diskussion, ob in diesem Falle tatsächlich immer noch eine doppelsträngige DNA vorliegt, wird im späteren Verlauf dieses Kapitels fortgesetzt) wesentlich steiler, als bei einer ssDNA. Werden schließlich Kräfte im Bereich von 120 bis 300 pN erreicht (dies hängt vor allem von der relativen Anzahl von AT oder GC Basenpaaren ab [Rief 1999; Eckel 2003], siehe Abbildung 10 links) tritt ein weiterer Übergang auf, der sich als schwächer ausgeprägtes Kraftplateau bemerkbar macht (siehe auch Kapitel 3.4.1). Dessen Höhe und Längenbe-



reich, und zuweilen auch die Neigung dieses zweiten Plateaus sind zudem deutlich von der Geschwindigkeit abhängig, mit der am DNA Strang gezogen wird [Clausen 2000] (siehe Abbildung 10 rechts).



**Abbildung 10:** Kraft-Ausdehnungskurve einer dsDNA bestehend aus ausschließlich GC-Basenpaaren (linkes Bild; aus [Eckel 2003]). Das Überstreckungsplateau ist bei dieser reinen Poly(dG-dC) DNA zu Kräften um die 75 pN verschoben. Die Ziehgeschwindigkeit betrug  $1\mu\text{m/s}$ . Im rechten Bild ist die Kraftkurve einer "Lambda-BstE II digest DNA" (dsDNA Fragment mit einem Verhältnis von AT zu GC Basenpaaren von ziemlich genau 1:1; aus [Clausen 2000]) dargestellt. Verschiedene Ziehgeschwindigkeiten lassen die Kraft variieren, die benötigt wird, um das zweite Plateau zu erreichen, oder bewirken ein komplettes Verschwinden dieses Plateaus (bei  $0,15\mu\text{m/s}$ ). Beide Kurven sind das Ergebnis der Messungen mit einem AFM.

Die in Abbildung 10 gezeigten Kraftkurven ergaben sich aus Messungen, bei denen die DNA auf einer Goldoberfläche immobilisiert wurde. Hierbei haftete das Molekül allein durch elektrostatische Kräfte auf der Oberfläche. Der Oberfläche wurde eine AFM Spitze angenähert, und durch wiederholtes Andrücken wurde versucht, ein Ende einer DNA an der Spitze allein durch elektrostatische Wechselwirkungen aufzupicken. Bei dieser Form des Experiments war es unmöglich zu entscheiden, auf welche der vier Arten (entsprechend Abbildung 9) an der DNA gezogen wurde. Als Folge dessen variierte auch die Kraft um einige Dutzend pN, die nötig war, um das zweite Plateau zu erreichen. Die Lage des ersten Plateaus blieb jedoch im Rahmen der Meßgenauigkeit immer konstant.

Nach dem Erreichen des zweiten Plateaus entsprach die Kraft-Ausdehnungskurve ziemlich exakt der einer ssDNA.

Die erste Erklärung für das Entstehen eines Plateaus bei etwa 65 pN (bei einer DNA, die zur Hälfte aus AT Basenpaaren besteht) wurde parallel zu den Messungen von Bustamante

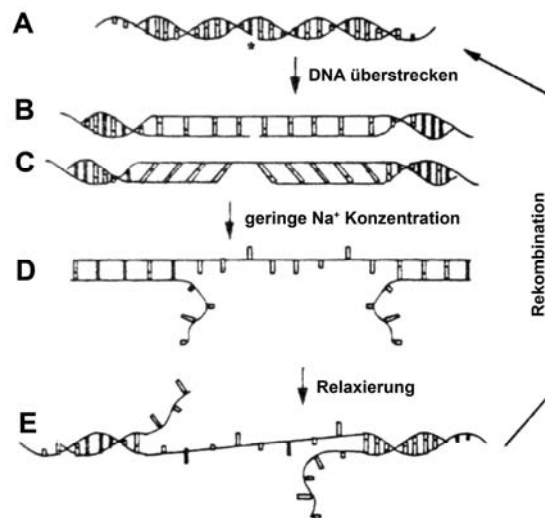
et al. unter anderen auch von eben dieser Gruppe geliefert [Smith 1996]. Die DNA wurde hierbei in 3'-3' Richtung gestreckt (Abbildung 9 links).

Folgende Ergebnisse wurden als Basis für eine Erklärung des Plateaus herangezogen:

- Über einen Längenbereich, vom 1,1- bis etwa 1,7-fachen der Konturlänge der dsDNA steigt die Kraft nur um das 1,05-fache an.
- Relaxiert die gestreckte DNA, so nimmt die Kraftkurve im Bereich des Plateaus einen anderen Verlauf: Bei dem 1,4-fachen der Konturlänge fällt die Kraft auf etwa 40 pN ab, und verbleibt unter kleineren Schwankungen so lange in dem Bereich, bis die DNA das 0,9-fache ihrer Konturlänge erreicht hat. Ab diesem Punkt läuft die Relaxierungskurve wieder exakt auf der ursprünglichen Kraftkurve.
- Der obige beschriebene Hystereseeffekt ist um so stärker ausgeprägt, je geringer die Kationenkonzentration des umgebenden Mediums ist. Erst bei sehr hohen Konzentrationen (ab etwa 1 M Na<sup>+</sup>) tritt dieser Effekt nicht mehr auf.
- Die Relaxierungskurve kann bei verschiedenen dsDNAs einen sehr unterschiedlichen Verlauf nehmen (stärkerer Abfall in der Kraft, Einsetzen der Hysterese bei höheren oder niedrigeren Vielfachen der Konturlänge). Bei derselben dsDNA ist selbst nach mehrmaligem Strecken immer der nahezu identische Verlauf zu verzeichnen.
- Lässt man die DNA einen Komplex mit bestimmten Crosslinkern eingehen, die das DNA Rückgrat sterisch kaum verändern, wie z.B. Psoralen, so wird das Plateau so gut wie nicht beeinflusst, wohl aber die Konturlänge.

Hierauf basierend, wurde folgendes Modell ins Feld geführt (Abbildung 11) [Smith 1996; Cluzel 1996]:

- Das Überstreckungsplateau bei etwa 65 pN ist Ausdruck eines intramolekularen Überganges von der B-DNA Form in eine S-DNA Form ("stretched DNA") - eine überstreckte Form der dsDNA, in der jedoch die Basenpaare als solche bestehen bleiben.
- Dieser Übergang ist kooperativ, was heißt, es entstehen S-DNA Regionen innerhalb der B-DNA, die bei steigender oder sinkender Kraft an ihren Rändern wachsen oder sich zurückbilden. Das ist energetisch vorteilhafter, als die Neubildung von S-Regionen.



**Abbildung 11:** Das Modell von Bustamante et al., welches den Übergang von der B- in die S-DNA beschreibt [Smith 1996]. Eine dsDNA mit einem Strangbruch (Stern in A) wird überstreckt. Bei einer bestimmten Kraft geht die DNA teilweise in eine S-Form über: Die DNA entwindet sich und der Basenabstand wird vergrößert (B), oder zusätzlich neigen sich die Basenpaare vom Punkt des Strangbruchs weg (C). Bei geringer Ionenkonzentration (D) "schmilzt" ein Strang vom Bruch ausgehend nach beiden Seiten ab. Wenn die DNA relaxiert wird (E) findet der Übergang zurück zur B-DNA statt, wohingegen die freien Stränge nur langsam rekombinieren (Übergang zu Bild A), was die Hysterese hervorruft.

- Während des Überganges zur S-DNA wird die Doppelhelix entwunden und der Basenpaarabstand nimmt von 0,34 auf 0,58 nm zu. Denkbar ist auch ein Neigen der Basenpaare weg von möglichen Strangbrüchen (Abbildung 11 C).
- Strangbrüche führen dazu, daß sich ein Strang vom Punkt des Bruches aus nach beiden Richtungen auftrennt (Abbildung 11 D). Die Basenpaare brechen hierbei auf. Verstärkt wird dieser Effekt durch eine geringe Ionenkonzentration, oder durch das Halten des Moleküls unter Spannung über eine längere Zeit.
- Das Abtrennen eines Stranges hat die Folge, daß bei höheren Kräften nur noch ein Einzelstrang die beiden doppelsträngigen Seiten der DNA zusammenhält. Dies erklärt, warum bei Kräften bis 120 pN die erhaltene Kraftkurve ähnlich der einer ssDNA ist.

- Bei Relaxierung brauchen die voneinander getrennten Stränge der Doppelhelix eine gewisse Zeit (Sekunden bis Minuten) um wieder zu rekombinieren. Dieser Effekt ist die Ursache der auftretenden Hysterese (Übergang von D über E nach A in Abbildung 11).

Das Modell kann den unterschiedlichen Verlauf der Kraftkurve von ds- und ssDNA oberhalb von 120 pN ebensowenig erklären, wie die Existenz des zweiten Plateaus (siehe Abbildung 10) erklären.

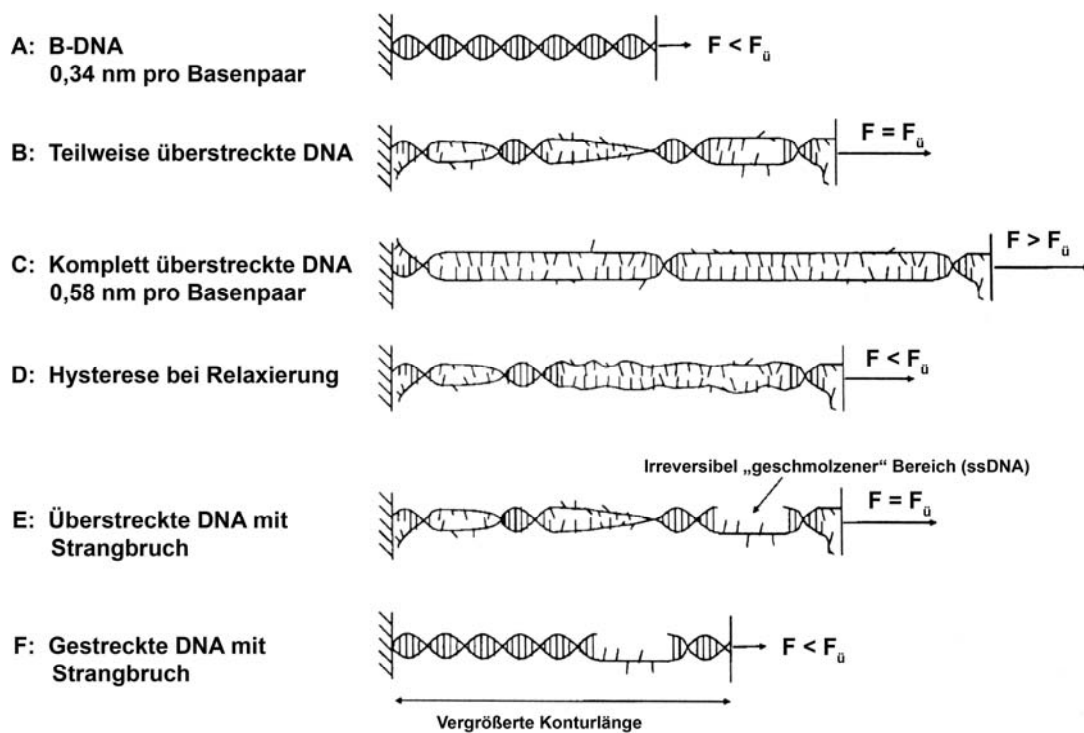
Die Annahme im Modell, daß die Basenpaare nicht schmelzen (dissoziieren), wohl aber ihren Abstand zum jeweiligen Nachbarn vergrößern, reichte aus um die Existenz des Überstreckungsplateaus zu erklären [Lebrun 1996; Kosikov 1999], nicht jedoch den Betrag der Kraft oder die Länge des Plateaus.

Weiterführende Ziehexperimente mit dsDNA erbrachten folgende Ergebnisse:

- Es gibt keinen Unterschied in der Länge des Plateaus oder im Betrag der Überstreckungskraft wenn zum einen die dsDNA an beiden 3' Enden gezogen wird [Williams 2001a] (also an gegenüberliegenden Strängen der DNA: Abbildung 9 links) oder an ein und demselben Strang [Williams 2001b] (in dem Falle in 3'-5' Richtung: Abbildung 9 zweites Bild von rechts).
- Zwischen pH Wert 4 bis 9 bleibt die Überstreckungskraft bis auf 2 pN konstant. Sinkt der pH Wert merklich unter 4 oder steigt er über 9, sinkt die Überstreckungskraft deutlich um mehr als 10 pN. Zudem bekommt das Plateau zunehmend einen positiven Gradienten [Williams 2001a].
- Die Tatsache, daß eine dsDNA bestehend aus ausschließlich GC Basenpaaren ein Überstreckungsplateau hat, welches etwa 50% höher liegt (bei ca. 75 pN), als das Plateau einer dsDNA bestehend aus ausschließlich AT Basenpaaren (bei ca. 50 pN), legt den Verdacht nahe, das aufbrechende Basenpaare die Ursache für das Überstreckungsplateau sind. Die Enthalpie der GC Basenpaare ist um 50% höher als die der AT Basenpaare, da GC über drei und AT Basenpaare über zwei Wasserstoffbrücken verbunden sind. Wird eine DNA von einem Ende her wie ein Reißverschluß aufgeribbelt, so ist dazu bei GC ebenfalls eine 50% höhere Kraft als bei AT Basenpaaren notwendig [Rouzina 2001a].
- Der Übergang einer B-DNA in eine etwaige S-DNA Form wäre temperaturunabhängig, da in diese Fall nur die enthalpischen Bindungen restrukturiert werden müßten. Es zeigt sich jedoch eine starke Temperaturabhängigkeit der Höhe des Überstreckungsplateaus (69 pN bei 11°C und ziemlich genau 50 pN bei 50°C) [Williams 2001b].

- Die Überstreckungskraft fällt bei sinkender Ionenkonzentration des umgebenden Mediums ab (bei 3 mM auf 52 pN), gleichzeitig steigt die Persistenzlänge an (bei 3 mM auf 68 nm). Das wird darauf zurückgeführt, daß mit sinkender Konzentration der Ionen die negative Ladung des Phosphatrückgrates weniger gut abgeschirmt werden kann. Die stärkere Nettoladung sorgt für eine "Versteifung" des Rückgrates, sowie für eine stärkere Abstoßung der Ladungen untereinander, was es leichter macht, die DNA zu überstrecken [Wenner 2002].

Im Modell von Bloomfield et al. wird beim Überstrecken einer B-DNA kein Übergang zu einer S-Form postuliert, sondern ein kraftinduziertes "Schmelzen" (Abbildung 12) [Williams 2001a; Rouzina 2001a; Rouzina 2001b]:



**Abbildung 12:** Das Modell des kraftinduzierten Schmelzens der dsDNA von Bloomfield et al. (Grafik aus [Williams 2002]). Bei geringen Kräften bleibt die helikale Form der DNA bestehen (A). Infolge der Überstreckung bilden sich nicht-helikale Domänen mit "aufgeschmolzenen" Basenpaaren (B), die mit zunehmender Überstreckung weiter an Ausdehnung gewinnen (C). Die Rekombinierung der Basenpaare bei Relaxierung (D) ist entscheidend für das Auftreten einer Hysterese. Strangbrüche sollen die Ursache dafür sein, daß nach Überstreckung (E) ein irreversibel geschmolzener Bereich verbleibt, der für eine effektiv vergrößerte Konturlänge verantwortlich ist (F).

- Während die dsDNA überstreckt wird, findet eine Dissoziation der beiden Stränge statt. Ein Großteil der Basenpaare bricht hierbei auf. Dies geschieht jedoch in einem Quasi-Gleichgewichtsprozeß, innerhalb dessen keine meßbare Ratenabhängigkeit zu erkennen ist.
- Die DNA kann als eindimensionales System aufgefaßt werden, welches Domänen besitzt, in denen die Basenpaare aufgebrochen worden sind, während in anderen Domänen die Bindungen noch intakt sind. Hier findet ebenfalls ein kooperativer Übergang zwischen den Phasen statt, wenn die Kraft erhöht oder verringert wird, was bedeutet, daß die Domänen bevorzugt in ihrer Größe wachsen oder schrumpfen, anstatt sich neu auszubilden. Weniger an beiden Rändern der dsDNA, sondern bevorzugt in deren Innern sollen neue, aufgeschmolzene Domänen entstehen (Abbildung 12 B).
- Die durchschnittliche Größe der geschmolzenen Domänen beim Erreichen der Überstreckungskraft beträgt nur etwa 100 Basenpaare.
- Oberhalb von 65 pN tritt ein Nicht-Gleichgewichtsprozeß ein, welcher beinhaltet, daß die wenigen kurzen noch verbliebenen dsDNA Domänen nun ebenfalls aufschmelzen. In dessen Folge steigt die Kraft am Ende des Überstreckungsplateaus mit zunehmender Dehnung der DNA wieder stark an (Abbildung 12 C). Hierbei ist es die Enthalpie des Aufbrechens der beiden Einzelstränge ( $\approx 9$  kcal/mol im Durchschnitt pro Basenpaar), die unter anderem den Betrag der Kraft diktiert. Wie für jeden Nicht-Gleichgewichtsprozeß gilt auch hier eine Ratenabhängigkeit, also eine Abhängigkeit der Kraft von der Geschwindigkeit, mit der das Molekül gesteckt wird [Evans 1997].
- Nicht ausschließlich die an den Strangbrüchen abgeschmolzenen Einzelstränge, sondern vor allem die Rekombinierung der Basenpaare in den Domänen soll den zeitbestimmenden Faktor bei der Relaxierung darstellen (Abbildung 12 D): Man geht dabei von Werten zwischen 3 und 3000 Basenpaaren pro Sekunde aus. Weiterhin müssen die Basenpaare der geschmolzenen Domänen in der richtigen Sequenz rekombinieren. Dies, und die Vermutung, daß einige der Domänen noch längere Zeit in einer nicht-helikalen Form verbleiben, erklärt die geringeren Kräfte, die beim Relaxieren auftreten.
- Obwohl in einer dsDNA fast immer ein oder mehrere Strangbrüche zu finden sind, kann dies unter bestimmten Bedingungen (starke Überstreckung, geringe Ionenkonzentration) zu irreversibel geschmolzenen Domänen führen, die zu einer erhöhten Konturlänge führen (Abbildung 12 E und F) [Williams 2002].

Eine notwendige Bedingung für die Gültigkeit dieses Modells im allgemeinen und für die angegebenen Kräfte im speziellen ist, daß sich die dsDNA beim Strecken frei entwinden kann (die B-DNA ist eine Helix - eine rechtshändige "Schraube" mit einer Windung pro 10 Basenpaare), es also keine Torsionskräfte geben darf, die dieses Abwickeln behindern. Diese soll laut Bustamante et al. [Rouzina 2001a] immer der Fall sein, denn das Kügelchen, welches in der Optischen Falle gefangen ist, und an das ein Ende der DNA biochemisch gekoppelt wurde, kann sich frei in der Falle drehen. Für den Fall, das Kügelchen könne nicht frei rotieren, wäre es der DNA immer noch möglich, sich zu entwinden, aber nur dann, wenn die DNA an mindestens einem Ende eines Stranges nicht fixiert ist, oder wenn mindestens ein Strangbruch vorhanden wäre (siehe auch Kapitel 3.4).

## 1.6 Ligand-DNA Wechselwirkungen

Eine DNA kann ein Wirtsmolekül für DNA-bindende Agenzien, sogenannte Liganden, sein. Die zugrundeliegende Bindung zwischen solchen Effektormolekülen - beispielsweise Aromaten, Peptide oder Proteine - beruht auf schwachen, nichtkovalenten Wechselwirkungen [Waring 1991]. Die hierbei auftretenden Bindungsenergien sind etwa eine Größenordnung schwächer als die der kovalenten Bindungen. Dennoch sind die (im übrigen reversiblen) Bindungen von Liganden an eine DNA von großer Bedeutung, ist es doch die Anzahl der Liganden und Wechselwirkungen, die in der Summe zu einer hohen Bindungsenergie führt.

Folgende nichtkovalente Wechselwirkungen spielen hierbei eine entscheidende Rolle:

- Wasserstoffbrückenbindungen [Reddy 2001]; basierend auf dem Austausch von Protonen zwischen Protonendonatoren (z. B: OH- oder NH<sub>2</sub>-Gruppe) und Protonenakzeptoren (die Elemente in einer Verbindung, die noch freie Valenzelektronen besitzen). Die H-Brückenbindung ist die Summe aus quantenmechanischer Absenkung der Nullpunktsenergie des Protons und einer elektrostatischen Anziehung zwischen den geladenen Molekülgruppen [Gerthsen 1993].
- Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen unterschiedlich geladenen Ionen (ionische Bindungen) oder funktionellen Gruppen von Molekülen [Reddy 2001].
- Van-der-Waals-Wechselwirkungen: Durch zeitliche Schwankungen in der Verteilungsdichte der Elektronen im Molekül entsteht ein temporäres Dipolmoment, welches im Nachbarmolekül ein antiparalleles Dipolmoment induziert. Das Ergebnis sind schwache Bindungsenergien mit einer  $r^{-6}$  Abhängigkeit [Gerthsen 1993].

- Der entropische Effekt der Verdrängung von Wassermolekülen: In der Folge einer entstandenen (nicht notwendigerweise kovalenten) Bindung, werden Wassermoleküle verdrängt, die zuvor eine Art Käfig um beide Reaktionspartner gebildet hatten. Diese nun freien Moleküle können durch Neuorientierung ihrerseits neue Wasserstoffbrücken ausbilden.

Die eben genannten Wechselwirkungen sind die Grundlage folgender spezifischer oder unspezifischer Bindungsarten zwischen einer DNA und einem Liganden. Die in dieser Arbeit untersuchten Liganden verhalten sich nach einem oder mehreren der folgenden Bindungsmodi.

### 1.6.1 Bindung in der Haupt- oder Nebenfurche

Die Bindung in die Haupt- und Nebenfurche wird auch als "major groove binding" und "minor groove binding" bezeichnet. Die Bindung kleiner, meistens positiv geladener Moleküle erfolgt vor allem in einem ersten Schritt über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Rückgrat der dsDNA [Niidome 1996; Reddy 2001]. Van der Waals Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen können sich in einem zweiten, zeitlich kurz darauffolgenden Schritt ausbilden.

Die folgenden beiden groove binder wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

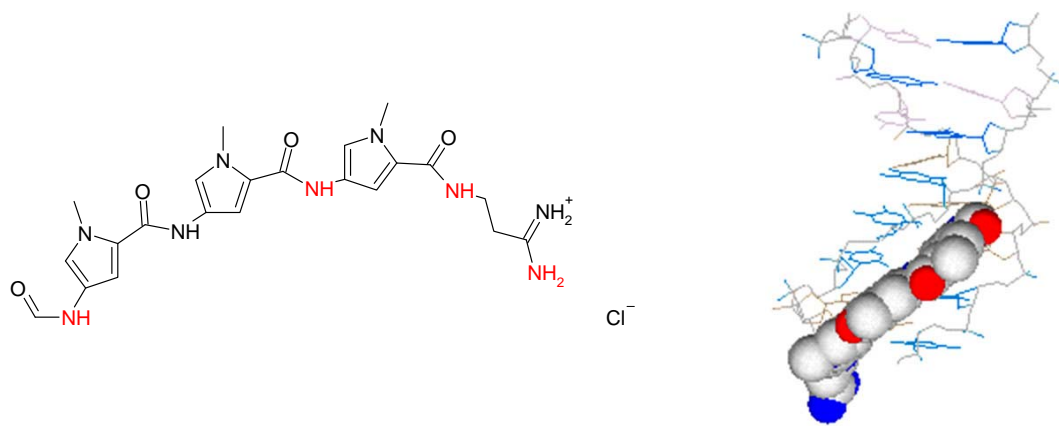
#### Distamycin-A

Die genaue Bezeichnung lautet Distamycin-A-Hydrochlorid. Dieser minor groove binder ist ein Polyamid, welches seine Anwendung hauptsächlich in der Krebstherapie findet [Bailly 1998]. Es wird vermutet, daß dessen zytostatische Wirkung auf einer induzierten Dekondensation der Chromosomen beruht [Turner 1996].

Das wichtigste Merkmal der Bindung von Distamycin ist (neben einer elektrostatischen und der van der Waals Wechselwirkung mit dem Rückgrat der DNA) die Ausbildung von vier gegabelten Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen (rot gekennzeichnet im linken Bild von Abbildung 13) und den Akzeptoren in Adenin und Thymin. An der Bindung sind demnach auch nur maximal vier Basenpaare beteiligt [Coll 1987]. Jede gegabelte Wasserstoffbrücke trägt mit etwa 2 kcal/mol zur Bindungsenthalpie bei.

Die starke Präferenz für AT reiche Abschnitte der DNA [Bielawski 2001] zeigt sich in der Bindungsenthalpie, die bei AT-Regionen um bis zu 5,6 kcal/mol pro Molekül höher ist, als für GC-Regionen. Da besonders die kleine Furche stark hydratisiert ist, werden bei der Bindung von Distamycin außerdem Wassermoleküle freigesetzt. Dieser Umstand führt zu einer positiven Bindungsentropie [Carell 2000].





**Abbildung 13:** Strukturformel von Distamycin-A (linkes Bild) [Baliga 2000]. Zwischen den rot gekennzeichneten Amidgruppen und den Adenin- und Thymin Basen bilden sich gegabelte Wasserstoffbrücken aus [Coll 1987], die charakteristisch für das Binden des Distamycins in der kleinen Furche sind (rechtes Bild; Quelle: [http://www.bi.a.u-tokyo.ac.jp/images/DNA\\_DISTAMYCIN.gif](http://www.bi.a.u-tokyo.ac.jp/images/DNA_DISTAMYCIN.gif)). Das Molekül folgt dank seiner halbmondförmigen Struktur der Krümmung der Helix, während es sich in die kleine Furche "schmiegt".

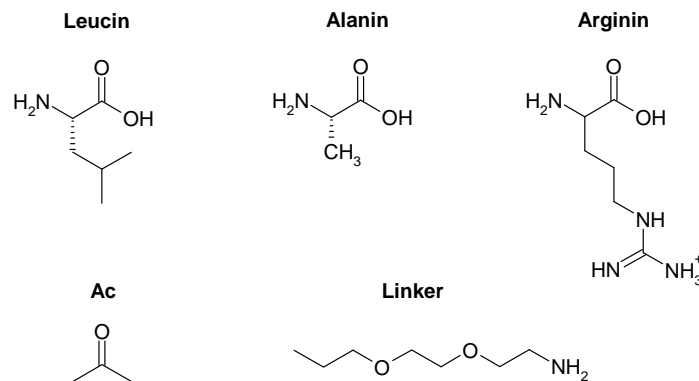
Die Konzentration an freien Distamycinmolekülen in der unmittelbaren Umgebung der DNA entscheidet darüber, ob ein 1:1 Bindungstyp vorliegt (hierbei bindet wie eben besprochen ein Molekül an maximal vier Basenpaare) oder ein 2:1 Bindungstyp. Beim letztgenannten Typ liegen zwei Distamycinmoleküle dicht nebeneinander in der kleinen Furche, wobei von fast allen Adenin- oder Thyminbasen Wasserstoffbrücken zu beiden Molekülen reichen [Pelton 1989]. NMR Untersuchungen haben außerdem gezeigt, daß Distamycin bei beiden Bindungstypen die Breite der kleinen Furche verändert. Der 2:1 Modus vergrößert sie von 0,94 auf 1,36 nm, während der 1:1 Modus die Furche auf 0,7 nm kontrahieren läßt [Olsen 2003].

### Ac-[LARL]<sub>3</sub>-NH-Linker

Ähnlich wie Distamycin in puncto Struktur und Wechselwirkung ist das synthetische, helikale Peptid "Ac-[Leucin-Alanin-Arginin-Leucin]<sub>3</sub>-NH-Linker", das eine Alphahelix-Struktur formt [Wilking 2001]. Dieses alpha-helikale Peptid ist ein Polymer in Form einer "Rechtsschraube" analog zur Doppelhelix, es besteht jedoch aus den Peptid- und den Linker-Untereinheiten die in Abbildung 14 dargestellt sind.

Von dem alpha-helikalen Peptid wird angenommen, daß es über seine positiv geladenen Arginin Einheiten mit dem Rückgrat der DNA sequenzunspezifisch wechselwirken kann. Kraftspektroskopische Untersuchungen bestätigten nicht nur die Bindung dieses Peptids an

die dsDNA, sondern gaben einen ersten Hinweis auf einen Bindungsmodus, der sich sowohl definitiv vom Interkalator, als auch höchstwahrscheinlich vom minor groove binder unterscheidet [Eckel 2003] - die Bindung in der großen Furche wurde daher in Betracht gezogen. Analogien zu sequenzspezifisch bindenden, aber sehr ähnlich aufgebauten Peptiden, legten ebenfalls diese Vermutung nahe [Niidome 1996].



**Abbildung 14:** Die synthetischen Peptide, welche die Bausteine des alpha-helikalen Peptids darstellen.

### 1.6.2 Interkalation

Dieser Bindungsmodus ist dadurch gekennzeichnet, daß sich kleine, flache, aromatische Moleküle wie ein Keil zwischen benachbarte Basenpaare der DNA legen. Die planaren aromatischen Ringe gehen dabei von der Waals Wechselwirkungen mit den sie umgebenden Basen ein. Entscheidend sind hierbei Interaktionen zwischen den  $\pi$ -Orbitalen der Aromaten der Basenpaare und den Interkalatoren. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Gruppen des Interkalators und dem Rückgrat der DNA stabilisieren den Komplex zusätzlich. Die Bindungskinetik beginnt auch hier, wie bei groove bindern, mit der elektrostatischen Wechselwirkung, und erst in einem zweiten Schritt findet die eigentliche Interkalation statt [Graves 2000; Reha 2002].

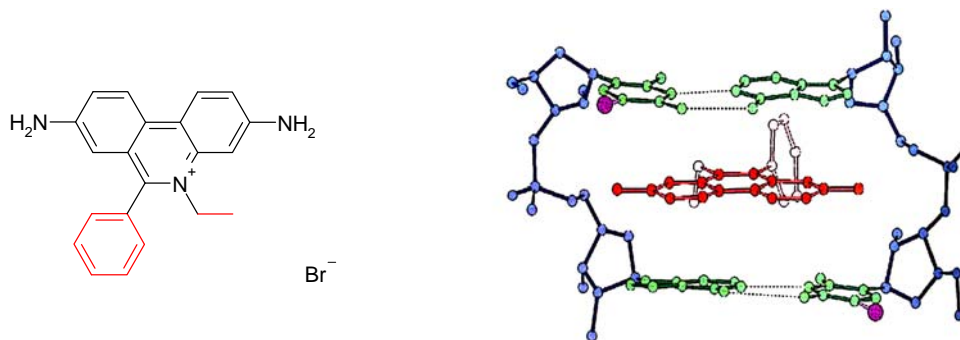
Die DNA läßt sich mit Interkalatoren sättigen, allerdings wird nur maximal jeder zweite Platz zwischen benachbarten Basenpaaren besetzt. Durch das Interkalieren zwischen zwei Basenpaaren vergrößert sich deren Abstand immer von 0,34 auf 0,68 nm [Coury 1996]. Durch diese Aufweitung wird der DNA-Strang in der unmittelbaren Umgebung des Interkalators entwunden und verzerrt [Carell 2000]. Dies hat zum Beispiel einen mittelbaren Einfluß auf die Struktur der Nukleosome [McMurray 1991] - eine Vorstufe auf dem Weg zur Ausformung der Chromosomen.

Etliche Interkalatoren sind deshalb heute gebräuchliche Chemotherapeutika in der Krebstherapie [Baguley 1991], denn ihre zytostatische Wirkung entfalten sie, indem sie die DNA

Replikation und auch die Topoisomerase II bei ihrer Arbeit behindern. Diese besteht darin, die DNA in ihrer superspiralisierten Form innerhalb der Chromosomen zu entspiralisieren und eine Folge dieser fehlerhaften Entwindung sind schließlich Strangbrüche [Braná 2001]. Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Interkalatoren vorgestellt:

### Ethidiumbromid

Dieser organische Farbstoff, der als Fluoreszenzmarker von DNA eingesetzt wird, interkaliert sequenzunspezifisch und entwindet dabei die Doppelhelix um  $26^\circ$  [Wang 1974]. Eine zusätzliche Hydratisierung des Ethidiumbromid-DNA Komplexes findet nicht statt, im Gegensatz zu vielen anderen Interkalatoren [Qu 2001].



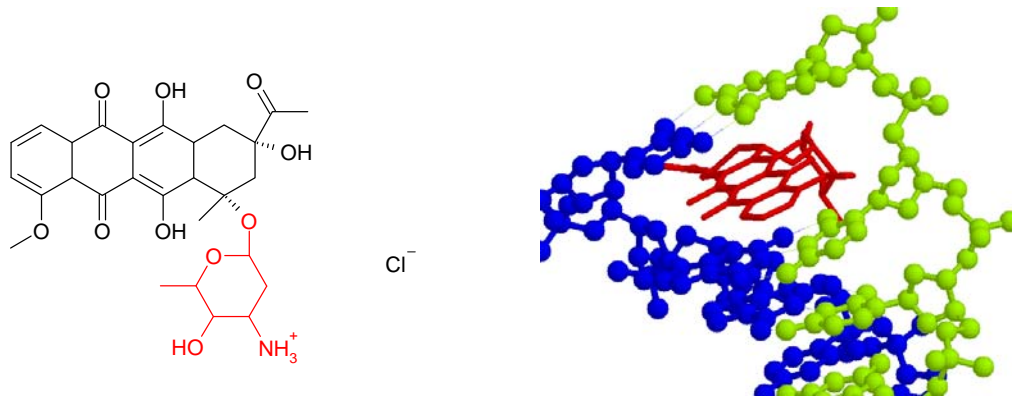
**Abbildung 15:** Strukturformel von Ethidiumbromid (links). Die rot gekennzeichneten Gruppen stehen fast senkrecht auf dem planaren Aromatengerüst (schwarz) und zeigen immer in Richtung der kleinen Furche [Reha 2002] - in der dreidimensionalen Darstellung im rechten Bild gut zu erkennen. Zu sehen ist die Position von Ethidiumbromid (rot) zwischen zwei Basenpaaren (grün) und dem DNA Rückgrat (blau). Quelle: <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1999/0095/html>

### Daunomycin

Eines der am weitestverbreiteten Antitumormedikamente ist das Anthracyclinantibiotikum Daunomycin, auch Daunorubicin genannt [Hortobagyi 1997]. Dessen Wirkung beruht vor allem darauf, DNA-Transkription und Replikation zu behindern [Chen 1996]. Es wird vermutet, daß die Ursache darin zu finden ist, daß Daunomycin die Stabilität der Basenpaare in seiner unmittelbaren Umgebung erhöht. Ein Indiz dafür ist die erhöhte Schmelztemperatur des Daunomycin-dsDNA-Komplexes [Remeta 1993].

Daunomycin besteht einerseits aus einem planaren Tetracyclingerüst (die vier nebeneinanderliegenden Aromaten in der Strukturformel von Abbildung 16), welches bei der

Interkalation fast komplett zwischen den Basenpaaren liegt und sich durch van der Waals Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken stabilisiert. Daunomycin interkaliert dabei bevorzugt in GC-reichen Regionen [Reha 2002]. Zusätzlich ragt der Aminozuckerrest (links in Abbildung 16 rot gekennzeichnet) in die kleine Furche, und verstärkt mittels Wasserstoffbrücken und elektrostatischer Wechselwirkung die Bindung des Daunomycins [Wang 1987]. Ebenfalls einen entscheidenden Beitrag für die Stabilität der Bindung hat die Hydratisierung des Komplexes [Qu 2001].



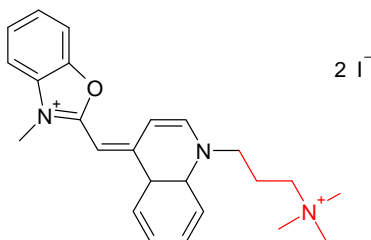
**Abbildung 16:** Links: Die Strukturformel von Daunomycin (genauer gesagt: Daunomycinchlorid). Der im Vergleich zum Tetracyclingerüst geneigte Aminozucker (rot) zeigt während der Interkalation in die kleine Furche und erhöht die Stabilität der Daunomycin-dsDNA-Komplexes (rechtes Bild: die beiden Stränge der DNA sind grün und blau eingefärbt).

Während der Interkalation von Daunomycin entwindet sich die DNA um etwa 8° [Carell 2000].

### YO-1

YO-1 wird hauptsächlich als Fluoreszenzmarker für dsDNA verwendet [Galzer 1992]. Das ausgedehnte heterozyklische Ringsystem von YO-1 (exakt : "4-[(3-Methyl-2(3H)-benz-oxazolidin)methyl]-1-[3-(trimethylammonium)propyl]-chinolinium-diiodid") interkaliert, während die Seitenkette (in Abbildung 17 rot gekennzeichnet) sich durch elektrostatische Wechselwirkungen in die kleine Furche legt.

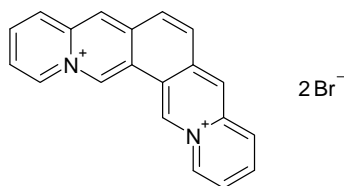
Bei sehr hoher Konzentration kann YO-1 zusätzlich in der großen Furche binden [Larsson 1994].



**Abbildung 17:** Die Strukturformel von YO-1 Diiodid. Die rot gekennzeichnete Seitenkette wechselwirkt mit der kleinen Furche der DNA.

### Diazoniapentaphendibromid

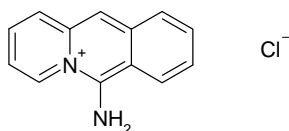
Das Quinoliziniumsalz "12a,14a-Diazoniapentaphendibromid" ist ein Interkalator, der bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht die DNA irreversibel beschädigt. Potentielle Anwendung finden solche Substanzen in der photodynamischen Chemotherapie. Diazoniapentaphendibromid bindet bevorzugt an GC-reiche Regionen [Viola 2003].



**Abbildung 18:** Die Strukturformel des vollkommen planaren Diazoniapentaphendibromids.

### Aminoacridiziniumchlorid

Spektrophotometrische und spektrofluorimetrische Titrations, sowie Untersuchungen bezüglich des linearen Dichroismus haben gezeigt, daß "6-Aminoacridiziniumchlorid", ebenso wie das in der Struktur identische 6-Aminoacridizinium-bromid, ein reiner Interkalator ist [Ihmels 2003].

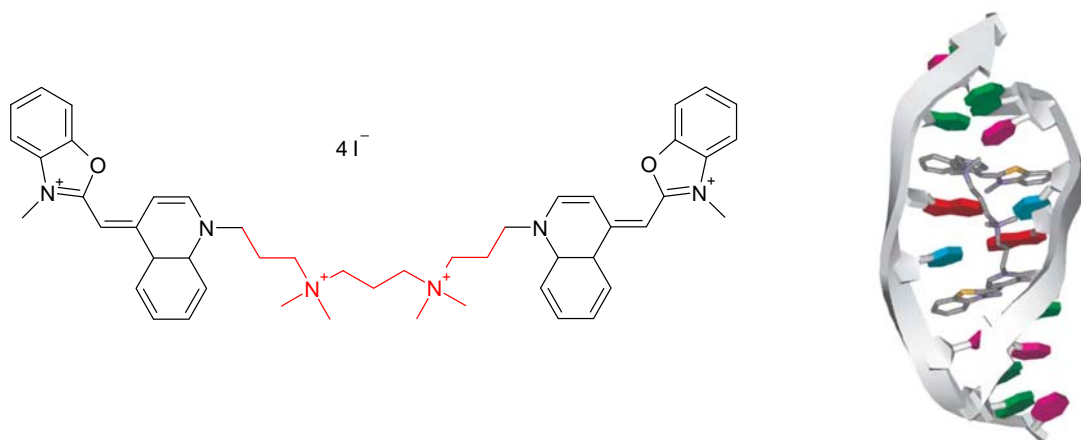


**Abbildung 19:** 6-Aminoacridiziniumchlorid besitzt ein vollständig planares Ringsystem.

Obwohl Aminoacridiziniumchlorid leicht bevorzugt an GC-Regionen bindet, ist seine Fluoreszenzausbeute bei der Bindung an AT-Regionen 15-fach höher, als bei Bindung an GC-Regionen. Es wird vermutet, daß Fluoreszenzquenching infolge eines Elektronentransfers von Aminoacridizinium zum Guanin nach der Anregung stattfindet.

### YOYO-1

YOYO-1 Tetraiodid ist ein Dimer des YO-1 Diiodids. Infolgedessen kann YOYO-1 mit seinen nunmehr zwei heterozyklischen Ringsystemen zweifach interkalieren; es gehört daher zur Gruppe der Bisinterkalatoren.



**Abbildung 20:** Links: Strukturformel von YOYO-1 Tetraiodid. Die rot gekennzeichnete Kette (ein aliphatisches Diamin) liegt während der Interkalation in der kleinen Furche und verbindet die beiden Ringsysteme, die an zwei Stellen interkalieren. Das rechte Bild zeigt ein Stabmodell von YOYO-1 während es in eine dsDNA interkaliert und so zwei Basenpaare zwischen seinen beiden Ringsystemen einschließt.

YOYO-1 hat eine extrem hohe Bindungskonstante (bzw. eine sehr geringe Dissoziationskonstante von  $K_D = 10^{-12}$  M [Larsson 1994]). Ein Grund für diese hohe "Bindungsfreudigkeit" sind je zwei positiv geladene Amino- und Iminogruppen, die für eine hohe elektrostatische Anziehung zwischen YOYO und dem negativ geladenen Rückgrat der DNA sorgen.

Eine Anwendung findet YOYO-1 ebenfalls in der Fluoreszenzmarkierung von dsDNA. Dessen Besonderheit ist die um bis zu 480-fach erhöhte Fluoreszenzausbeute (integriert über das gesamte Emissionsspektrum), wenn freie YOYO-Moleküle an DNA binden [Gurrieri 1996].

Ebenso wie YO-1 kann auch YOYO-1 bei erhöhter Konzentration zusätzlich in der Hauptfurche der DNA binden [Larsson 1994].

## 1.7 Molekulare Erkennung

Einige Interkalatoren und groove binder können, wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt, eine Präferenz für AT- oder GC-reiche Abschnitte einer DNA haben. Distamycin-A besitzt beispielsweise die stärkste Präferenz für einen Sequenzabschnitt bestehend aus vier AT Basenpaaren. Eine noch höhere Spezifität für bestimmte Abschnitte im Gen (Motive) zu erkennen, wäre zum Beispiel mehrere Distamycinmoleküle über Spacer aneinanderzureihen, und auf diese Weise Motive mit bis zu 16 AT-Basenpaaren gezielt anzusteuern [Carell 2000]. Auch ist eine Synthese von Hybridmolekülen, bestehend aus groove bindern und Interkalatoren denkbar.

Der Übergang zu komplexeren Molekülen und damit einhergehend zu spezifischerer molekularer Erkennung ist fließend. Dennoch fußt auch die vielschichtigste molekulare Erkennung zwischen einem Liganden und beispielsweise einem Protein auf einfachen Prinzipien: Zum einen muß eine sterische Komplementarität von Ligand und Bindungsstelle gegeben sein. Anders ausgedrückt, der Ligand muß in Form, Größe und relativer Ausrichtung zur Bindungsstelle passen wie "der Schlüssel zum Schloß". Zum anderen muß eine Komplementarität der Oberflächeneigenschaften vorhanden sein. Das elektrostatische Ladungsmuster und die räumliche Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Bereiche sowohl auf der Oberfläche des Liganden, als auch auf der Bindungsstelle des Proteins müssen zueinander passen. Die Konfiguration eines Liganden wird im allgemeinen einzig und allein durch dessen strukturellen Aufbau festgelegt. Oft ist die Flexibilität des Liganden jedoch so hoch, daß dieser in verschiedenen Konfigurationen vorliegen kann. Auch ist ein Protein meistens nicht völlig starr: Domänen können verschoben werden oder Seitenketten von Aminosäuren können sich drehen. Konformationsänderungen ergeben sich hingegen meist aus einfachen strukturellen Modifikationen, beispielsweise dem Drehen einer Untereinheit um eine Einfachbindung. Ligand und Protein rasten somit in den meisten Fällen nicht einfach ineinander ein, sondern passen sich beim Bindevorgang dynamisch an.

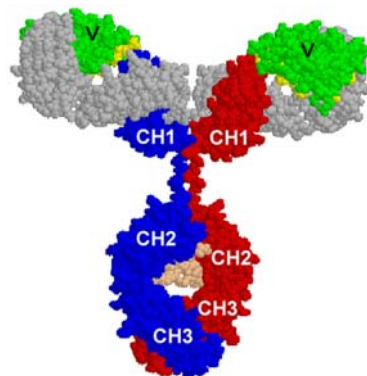
Ebenso wie bei der Interkalation und dem Binden in die Haupt- oder Nebenfurche sind die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor reversibel. Sie sind die Summe schwacher Interaktionen, wie Wasserstoffbrücken, elektrostatische und van der Waals-, sowie hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen.

Ein Musterbeispiel an spezifischer Erkennung findet sich im Immunsystem wieder. Dessen Funktion besteht darin, eine ungeheure Vielfalt ( $> 10^6$ ) an körperfremden Substanzen (Antigene) in einem ersten Schritt zu erkennen, während körpereigene Substanzen nicht angegriffen werden dürfen. Das Erkennen von Antigenen übernehmen Antikörper, spezielle Proteine, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden. Diese binden spezifisch an definierte Stellen von Antigenen (Epitope), um diese zunächst für das Immunsystem zu

markieren. In einem zweiten Schritt kann beispielsweise das Immunsystem Proteine freisetzen, die gegen die Antigene gerichtet sind, oder Makrophagen (Fresszellen) nehmen sich der markierten Antigene an.

### 1.7.1 IgM-Anti-IgM

In Abbildung 21 ist das Modell eines speziellen Immunoglobulins, des IgGs dargestellt.



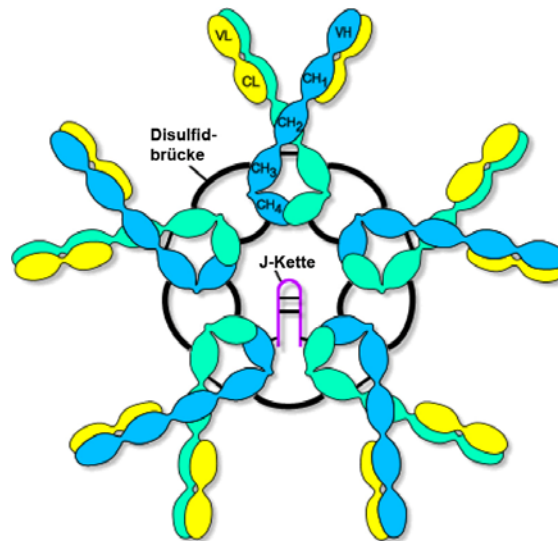
**Abbildung 21:** Ein Immunoglobulin (hier ein IgG) besteht aus vier Polypeptiden (Ketten aus Aminosäuren). Dies sind zum einen die zwei identischen schweren Ketten (blau und rot - bestehend aus je drei Domänen CH1 bis CH3). Des Weiteren finden sich je zwei identische leichte Ketten bestehend aus zwei Domänen (grau und gelb, sowie die V Domäne in grün dargestellt). Beide Ketten werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten. Quelle: [http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/QuestionsAnswers/\\_UK/PosterIGH/imagesIgH.html](http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/QuestionsAnswers/_UK/PosterIGH/imagesIgH.html)

Die Domänen der schweren Kette sind bei allen IgGs nahezu identisch. Die beiden endständigen, mit V gekennzeichneten Domänen besitzen die größte Variabilität; sie sind die "Schlüssel" des Antikörpers, welche das Antigen erkennen und daran binden.

Eine weitere Einteilung in verschiedene Immunoglobulinklassen wird aufgrund der unterschiedlichen Struktur der schweren Kette und ihrer Funktion vorgenommen [Stryer 1999]: IgGs bestehen, wie eben gezeigt aus drei Domänen der Klasse  $\gamma$ , sie können Blutgefäße durchdringen, und sie bilden die "zweite Welle" der Immunabwehr. IgDs bestehen aus drei Domänen der Klasse  $\delta$ , und sind wahrscheinlich ein Marker für B-Zellen (Produzenten löslicher Antikörper). IgE bestehen aus vier Domänen der Klasse  $\epsilon$  und übernehmen die Abwehr von Parasiten. Das IgA besteht aus drei Domänen der Klasse  $\alpha$ , es liegt aber meistens in Form eines Dimers vor: Zwei IgAs binden mit ihren "Füßen" über eine sogenannte J-Kette (Junction-Kette) aneinander. Sie treten vor allem in äußeren Sekreten



eines Lebewesens auf und übernehmen die Abwehr von viralen und bakteriellen Antigenen. Die fünfte und letzte Gruppe sind die IgMs. Als erster Schritt der Immunabwehr werden sie von B-Zellen produziert, wandern daraufhin vom Inneren der Zelle an die Membran und bilden dort membranständige IgMs. In Lösung hingegen bilden IgMs (die aus vier Domänen der Klasse  $\mu$  bestehen) ein Pentamer. Bedingt durch ihre Größe können IgM-Pentamere unter anderem die Blutbahn nicht verlassen.



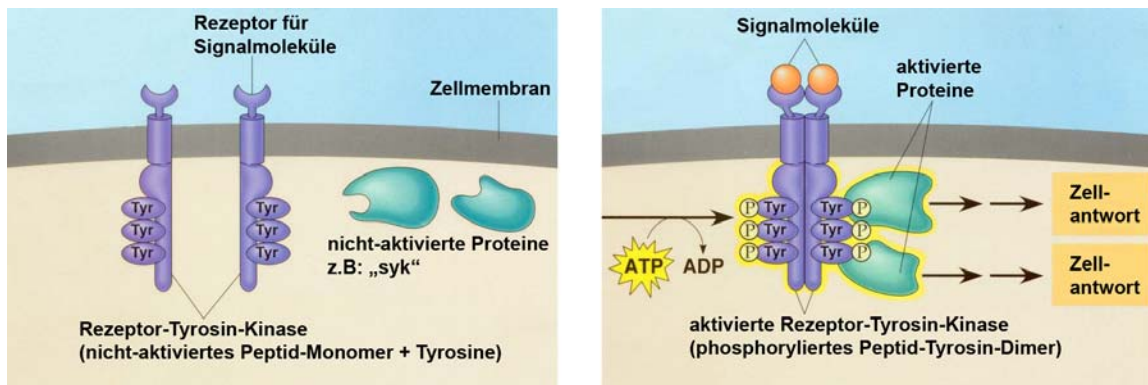
**Abbildung 22:** Ein IgM liegt in Lösung als Pentamer vor. Die IgM-Monomere werden hierbei durch eine einzige J-Kette und je zwei Disulfidbrücken mit ihren Nachbarn verbunden. Das IgM-Pentamer hat eine dreidimensionale, blütenkelchartige Struktur, bei der die Monomere wie Blütenblätter nach oben, und die J-Kette wie ein Stengel nach unten ragt. Quelle: <http://www.alerchek.com/IgM.htm>

Eine einfache Möglichkeit, membranständige IgMs in hoher Anzahl herzustellen, besteht darin, die IgMs einer Spezies X in die Blutbahn einer Spezies Y zu injizieren. Das Immunsystem von Y interpretiert das X-IgM als Antigen, und daraufhin bilden die B-Zellen ein IgM, das den Eindringling markiert. Dieses Y-IgM ist somit ein hochselektiver Antikörper, welcher nur gegen das X-IgM-Antigen wirkt. Das Y-IgM wird deshalb auch als "Anti-IgM" bezeichnet. Die exakte Bezeichnung des Y-Antikörpers lautet dann "Y-Anti-X-IgM".

### 1.7.2 Protein-Tyrosin-Kinase Syk

Ein weiteres Beispiel an spezifischer Bindung findet sich im Netzwerk der intrazellulären Signalweiterleitung, die die Grundlage ist für Zellwachstum, Differenzierung und Stoffwech-

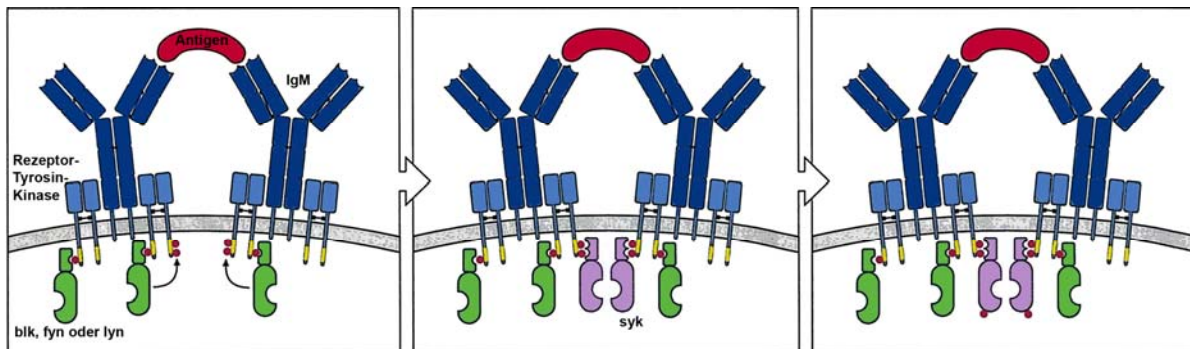
sel; und einer der ersten entscheidenden Knoten im Netzwerk ist hierbei die Protein-Tyrosin-Kinase (PTK). Man kann die PTKs einteilen in rezeptorartige und nicht-rezeptorartige PTKs. Die meisten Tyrosin-Kinase-Rezeptoren haben eine ähnliche Gestalt und Funktion wie sie in Abbildung 23 beschrieben ist.



**Abbildung 23:** Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase liegt im unaktivierten Zustand als nicht-phosphoryliertes Monomer zum Teil in der Zellmembran. Die Rezeptoren ragen aus der Zelle heraus, die Peptidmonomere mit den Tyrosingruppen ins Zellinnere hinein (linkes Bild). Signalmoleküle bewirken eine Dimerisation, und in deren Folge eine Phosphorylierung des Dimers. Daraufhin können Proteine (zu denen auch nicht-rezeptorartige PTKs zählen) an die phosphorylierten Tyrosingruppen binden, worauf die nun aktivierten Proteine weitere Schritte in der Signalkette starten können. Quelle: <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2003/lect06.htm>

Syk ist so eine nicht-rezeptorartige PTK. Man findet sie in B-Zellen als Teil eines intrazellularen Signalweges, der als Folge einer Reaktion auf ein Antigen aktiviert wird: In einer B-Zelle sind gleich vier Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) mit einem membranständigen IgM verknüpft (siehe Abbildung 24). Infolge der molekularen Erkennung bindet ein Antigen an gleich zwei IgM-RTKs. Die RTK jedes der beiden IgM-RTK-Komplexe wird daraufhin zweifach phosphoryliert (durch rezeptorassoziierte Tyrosin-Kinasen mit Namen "blk", "fyn" oder "lyn", und mit Hilfe von ATP). Als Folge der Phosphorylierung der Tyrosine werden diese nun von syk als Bindungspartner erkannt. Syk bindet nun an die phosphorylierten Tyrosine, bleibt aber immer noch inaktiv in Bezug auf den weiteren Signalweg. Um aktiviert zu werden, muß das gebundene syk seinerseits phosphoryliert werden um nun eine Vielzahl anderer Signalketten anschalten zu können [Janeway 1999].

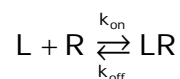
In dieser Arbeit wird die Bindung des syk an die diphosphorylierte Tyrosingruppen des Polypeptids mit Kraftspektroskopie untersucht, so wie es in der Mitte von Abbildung 24 dargestellt ist.



**Abbildung 24:** Links: Die Bindung eines Antigens an zwei IgMs auf einer B-Zelle bewirkt eine Aktivierung der rezeptorassoziierten Tyrosinkinase blk, fyn oder lyn. Diese diphosphorylieren (ein roter Punkt entspricht einer Phosphatgruppe) daraufhin die Tyrosine (gelb) an den Peptiden der RTK. Die PTK syk kann daraufhin an den Rezeptor andocken (Mitte). Eine zusätzliche Phosphorylierung des syk (rechts) bewirkt dessen weitere Aktivierung für einen nachfolgenden Signalprozeß. Aus [Janeway 1999].

## 1.8 Thermodynamik und Kinetik der molekularen Bindungen

Die schwachen Bindungskräfte zwischen einem Liganden (L) und einem Rezeptor (R) ermöglichen deren reversible Bindungen aufgrund reversibler Reaktionswege, nämlich der Assoziation zu einem Komplex (LR) und der Dissoziation. Diese Gleichgewichtsreaktion kann durch folgendes Reaktionsschema beschrieben werden:



Das Massenwirkungsgesetz ergibt damit für die Dissoziationsgleichgewichtskonstante  $K_D$ :  $K_D = [L] \cdot [R] / [LR] = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ , wobei [L], [R] und [LR] die jeweiligen freien Konzentration des Liganden, des Rezeptors und des gebildeten Komplexes in einer Lösung angeben. Die Geschwindigkeitskonstante beim Binden und beim Dissoziieren der Bindung wird als  $k_{\text{on}}$  (in  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und  $k_{\text{off}}$  (in  $\text{s}^{-1}$ ) bezeichnet, wobei  $K_D$  (in M) infolge der Temperaturabhängigkeit von Assoziation und Dissoziation ebenfalls temperaturabhängig ist. Der Kehrwert von  $K_D$  ist die Assoziationskonstante  $K_A$ , und der Kehrwert der Off-Rate entspricht der mittleren Lebensdauer des Komplexes.

Im Gleichgewichtszustand, sowie bei konstanter Temperatur und Druck, hängt das Verhältnis zwischen dem Komplex und den beiden Bindungspartnern von der Freien Stan-

Standardreaktionsenthalpie  $\Delta G^\ominus$  ab, die durch die Gibbs'sche Fundamentalgleichung gegeben ist (nach [Guthold 2001]):

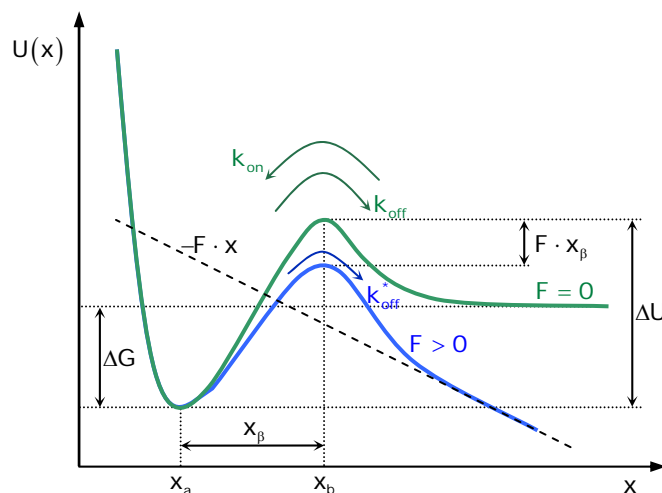
$$\Delta G^\ominus = \Delta H^\ominus - T \cdot \Delta S^\ominus = k_B N_A T \cdot \ln(K_D).$$

$N_A$  ist hierbei die Avogadro-Konstante,  $\Delta H^\ominus$  die Standardreaktionsenthalpie und  $\Delta S^\ominus$  die Standardreaktionsentropie.

Die Dissoziation des Komplexes kann gemäß der Rattentheorie als ein Überwinden einer Potentialbarriere der Höhe  $\Delta U$ , die zwischen dem metastabilen und dem vollständig dissoziierten Komplex liegt, beschrieben werden [Arrhenius 1889; Guthold 2001]:

$$k_{\text{off}} = \nu \cdot e^{-\frac{\Delta U}{k_B T}}.$$

Hierbei ist  $\nu$  ein Faktor, der in einem schmalen Temperaturbereich als konstant angesehen werden kann [Schwesinger 2000]. Das Überwinden der Potentialbarriere kann somit als eine Folge des Auftretens thermischer Fluktuationen angesehen werden.



**Abbildung 25:** Energielandschaft eines metastabilen Komplexes. Die Reaktionskoordinate gibt die Position des gebundenen, metastabilen Komplexes bei  $x_a$  und die Position der Potentialbarriere bei  $x_b$  an. Die freie Enthalpie  $\Delta G$  entspricht der Differenz zwischen freiem und gebundenen Zustand. Die Off-Rate ist von der freien Aktivierungsenergie  $\Delta U$  und der Temperatur abhängig. Durch eine äußere Kraft (die im Punkt  $x_a = 0$  ist und ein Potential  $U_f = Fx$  erzeugt) wird die Potentialbarriere um den Wert  $Fx_\beta$  reduziert (blaue Kurve) und eine neue Off-Rate  $k_{\text{off}}^*$  hervorgerufen.

Wirkt eine äußere, konstante Kraft  $F$  an dem gebundenen System in Richtung des ungebundenen Zustandes (entlang der Reaktionskoordinate), so wird das Potential dahingehend verschoben, daß die Aktivierungsenergie nur noch  $\Delta U - F \cdot x_\beta$  beträgt, wobei  $x_\beta$  der Abstand zwischen dem Potentialminimum des metastabilen Zustandes und dem Maximum der Potentialbarriere ist. Infolgedessen gilt für die veränderte Off-Rate des Systems nun [Kramers 1940]:

$$k_{\text{off}}^* = v^* \cdot e^{-\frac{\Delta U - F \cdot x_\beta}{k_B T}} = k_{\text{off}} \cdot e^{\frac{F \cdot x_\beta}{k_B T}}.$$

Bei kraftspektroskopischen Messungen wird an dem zu untersuchenden System eine äußere Kraft angelegt, die jedoch nicht konstant ist, sondern linear mit der Zeit ansteigt. Grund hierfür ist, daß beispielsweise bei AFM-Kraftspektroskopie der zu untersuchende Komplex zwischen einer Oberfläche und einer Probenspitze an einem Ausleger (Cantilever) mit konstanter Geschwindigkeit  $v$  weggezogen wird. Weitau seltener wurde Kraftspektroskopie bisher an Optischen Pinzetten durchgeführt, aber auch hier wird das zu untersuchende System beispielsweise zwischen zwei Kügelchen immobilisiert und in der Folge das in der optischen Falle gefangene Kügelchen mit einer konstanten Geschwindigkeit vom fixierten zweiten Kügelchen weggezogen.

In beiden Fällen bewirkt die Federkonstante  $k$  (des Cantilevers oder der optischen Falle), daß sich nach dem Hookschen Gesetz ( $F = k \cdot x$ ) die Kraft zeitlich linear, gemäß  $dF / dt = k \cdot v$  ansteigt. Die tatsächliche Federkonstante  $k_{\text{eff}}$  des Gesamtsystems aus Komplex + optischer Falle setzt sich jedoch aus eben der Federkonstante der optischen Falle und der Elastizität des Komplexes zusammen. Häufig muß sogar noch die Elastizität des "Untergrundes" mit berücksichtigt werden, wenn sich beispielsweise der Komplex auf einer Zellmembran befindet. Schlußendlich steigt die Kraft somit langsamer an, nämlich mit  $dF / dt = k_{\text{eff}} \cdot v$ . Das Produkt  $r = k_{\text{eff}} \cdot v \Leftrightarrow F = r \cdot t$  wird als "loading rate" des Systems bezeichnet.

Die Wahrscheinlichkeit  $p$ , den Komplex zur Zeit  $t$  noch im gebundenen Zustand vorzufinden, ist [Evans 1997; Guthold 2001]:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_{\text{off}}^*(F) \cdot p(t). \quad (1.17)$$

$k_{\text{off}}^*$  ist somit nicht nur kraft-, sondern auch zeitabhängig. Die Dissoziationswahrscheinlichkeit  $P$  (mit  $P(t)dt = P(F)dF$ ) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Komplex unter Einwirkung einer ansteigenden äußeren Kraft dissoziiert:

$$P(F) = \frac{k_{\text{off}}^*(F)}{r} \cdot \exp\left[-\frac{1}{r} \int_0^F dF' \cdot k_{\text{off}}^*(F')\right].$$

Das Maximum dieser Wahrscheinlichkeitsverteilung entspricht dann der wahrscheinlichsten Kraft  $\bar{F}$ , bei der der Komplex dissoziiert (oder anders ausgedrückt, bei der die Bindung des Komplexes durchreißt) [Evans 1997]:

$$\bar{F} = \frac{k_B T}{x_\beta} \cdot \ln \frac{r x_\beta}{k_{\text{off}} k_B T}. \quad (1.18)$$

Die wahrscheinlichste Abrißkraft läßt sich am besten durch Auftragen aller Abrißkräfte in einem Histogramm ermitteln - nach einer genügend hohen Anzahl von Kraftmessungen am gleichen System. Das Maximum im Histogramm entspricht dann der wahrscheinlichsten Abrißkraft. Deren logarithmische Abhängigkeit von der loading rate ermöglicht es, die Off-Rate zu bestimmen. Das ist die Aufgabe der dynamischen Kraftspektroskopie: Hierzu wird bei verschiedenen loading rates (die sich wenn möglich über mehrere Größenordnungen verteilen sollten) die jeweilige  $\bar{F}(r)$  ermittelt, und die Ergebnisse werden in einem Diagramm halblogarithmisch aufgetragen. Nach (1.18) sollten alle Wertepaare auf einer Geraden liegen. Deren Steigung korreliert mit der charakteristischen Reaktionslänge  $x_\beta$ , und durch lineare Regression läßt sich bei  $\bar{F}(r) = 0$  diejenige loading rate bestimmen, mit der dann mit (1.18) die Off-Rate ermittelt werden kann [Schwesinger 2000]. Dieses Prinzip hat allerdings nur dann seine Gültigkeit, wenn von einer einzelnen, scharf begrenzten Barriere im Potentialverlauf ausgegangen werden kann.

In einer Energielandschaft mit mehreren Potentialbarrieren können intermediäre gebundene Zustände in den jeweiligen lokalen Minima bestehen. Somit existieren auch verschiedene Übergangszustände bis hin zum vollständig dissoziierten Zustand. Eine Beschreibung dieses Systems erfordert deshalb die Berücksichtigung verschiedener Off-Raten zwischen diesen intermediären Zuständen [Strunz 2000].

Man kann leicht zeigen, daß je nach dem Betrag der äußeren Kraft das Potentialgebirge mehr oder weniger stark geneigt wird: Falls beispielsweise in Abbildung 25 noch eine zweite höhere Potentialbarriere vorhanden wäre (die dann unter Umständen entscheidend für die Dissoziation des Komplexes ist), dann kann diese durch eine genügend hohe Kraft so stark reduziert werden, daß diese geringer als die erste Barriere wird, und somit bei der Dissoziation nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. In der halblogarithmischen Darstellung von Abrißkraft und loading rate macht sich dies durch Bereiche mit unterschiedlicher Steigung bemerkbar die ihrerseits unter anderem eine Folge verschiedener Off-Raten und charakteristischer Reaktionslängen zwischen den Zuständen sind [Merkel 1999; Baumgarth 2005]. Eine eindeutige Zuordnung der jeweiligen Off-Raten ist aber ohne weiteres nicht

möglich, da auch On-Raten zwischen den intermediären Zuständen berücksichtigt werden müssen [Strunz 2000].

Neuere Ergebnisse in der Kraftspektroskopie [Nguyen 2003; Raible 2004; Baumgarth 2005] erzwangen eine Überprüfung der Annahmen, die als Grundlage für die Theorie von Evans und Ritchie (Gleichung (1.18); [Evans 1997]) dienen. Da ist zum einen die Bedingung, daß  $dF/dt = k_{\text{eff}} \cdot v$  für alle Geschwindigkeiten einen konstanten Anstieg der Kraft in Abhängigkeit der momentanen Auslenkung  $s = v \cdot t$  beim gleichen System vorsieht. Dies wurde in mehreren Messungen bestätigt [Raible 2004; Raible 2005].

Die zweite Bedingung (Gleichung (1.17)) wurde ebenfalls in neuesten Experimenten bestätigt [Raible 2005]. In jener Arbeit wird weiterhin davon ausgegangen, daß die kraftabhängige Off-Rate  $k_{\text{off}}^*$  statistischen Variationen unterliegt. Diese könnten ihre Ursache in unterschiedlichen sterischen Anordnungen des Komplexes haben, so daß die äußere Kraft in Bezug auf eine beliebig gewählte "Molekülachse" nicht immer in deren gleiche Richtung zeigt. Variationen der unmittelbaren Umgebung des zu untersuchenden Komplexes infolge von Lösungsmittelinhomogenitäten können ebenfalls als Ursache angesehen werden. Konformationsänderung, durch das Experiment nichtauflösbare, unspezifische Bindungen, sowie nichtauflösbare, kurz aufeinanderfolgende Dissoziationsprozesse infolge mehrerer kleinerer Potentialbarrieren wären ebenfalls denkbar.

Es wird zudem angenommen [Raible 2005], daß die Off-Rate  $k_{\text{off}}$  als konstant angesehen werden kann. Statt dessen wird von einer Dispersion der effektiven Dissoziationslänge  $x_{\beta}$  ausgegangen; die Dispersion kann jedoch mit (1.18) und der Auftragung von  $\bar{F}(r)$  gegenüber  $\ln(r)$  nicht bestimmt werden. Dennoch bleibt (1.18) bei der Berechnung von  $x_{\beta}$  weiterhin gültig.

## 1.9 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man im allgemeinen die Fähigkeit von Atomen oder Molekülen elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge, oder eines Wellenlängenbereiches aufzunehmen, und nach einer gewissen Zeit wieder als elektromagnetische Strahlung abzugeben. Die emittierte Strahlung ist dabei höchstens so kurzwellig, wie die absorbierte (Stokessche Regel). Ausnahmen gibt es auch hier, falls a) die "Zusatzenergie" entweder aus dem thermischen Vorrat des Fluorophors stammt, falls b) die Absorption einen Übergang höherer Energie auslöst, der ansonsten verboten wäre, oder falls c) eine Zweiphotonenabsorption stattfand. Die Emission erfolgt meist nach weniger als  $10^{-8}$  Sekunden nach der Absorption, anderenfalls spricht man von Phosphoreszenz [Gerthsen 1993].

Als Ursache für den Energieverlust zwischen Absorption und Emission kann als thermische Dissipation angesehen werden, beispielsweise infolge eines gaskinetischen Stoßes. Bei vollständiger thermischer Dissipation spricht man von Fluoreszenzlöschung ("quenching"), die zudem mit steigender Temperatur im allgemeinen zunimmt. Auch kann der Fluorophor seine Energie an benachbarte Moleküle über den Förster Transfer abgeben.

Weiterhin kann ein Farbstoffmolekül so stark verändert werden, daß keine Absorption oder Emission mehr stattfinden kann. Dies geschieht meist durch Ionisierung oder Reaktionen mit freien Radikalen - Sauerstoff beispielsweise. Die Zerstörung des Fluorophors wird als "bleaching" bezeichnet.

Quantenmechanisch läßt sich die Fluoreszenz so erklären, daß sich vor der Anregung das Molekül oder Atom im Singulett Grundzustand  $S_0$  befindet, bei dem beide Elektronen eine antiparallele Spinanordnung besitzen. Durch Absorption geht der Fluorophor in den ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) oder in einen höheren ( $S_i$ ,  $i \geq 2$ ) über. Aus diesen höheren Zuständen kann das Molekül dann durch interne Konversion strahlungslos in den ersten angeregten Zustand, und von dem aus unter Emission eines Photons wieder in den Grundzustand zurückkehren.

Über sogenannte Interkombination kann der Fluorophor strahlungslos von  $S_1$  in einen Triplettzustand  $T_1$  übergehen, bei dem die Elektronen zu einem Gesamtspin von eins koppeln. Über Phosphoreszenz geht der Fluorophor daraufhin von  $T_1$  in den  $S_0$ -Zustand über [Winter 1998].

Der wichtigste, in dieser Arbeit verwendete Fluorophor ist YOYO-1, der ein Absorptionsmaximum bei 489 nm und ein Emissionsmaximum bei 509 nm besitzt [Rye 1992]. Zwei Faktoren bewirken, daß YOYO prädestiniert ist für die Fluoreszenzmarkierung von dsDNA: Zum einen ist es die hohe Bindungskonstante, und zum anderen die bis zu 480-fach erhöhte Fluoreszenzausbeute des YOYOs (integriert über das gesamte Spektrum), wenn es an dsDNA gebunden hat. Wird nur das Emissionsmaximum betrachtet, dann erhöht sich an diesem Punkt die Fluoreszenzausbeute sogar um das 3200-fache [Rye 1992].

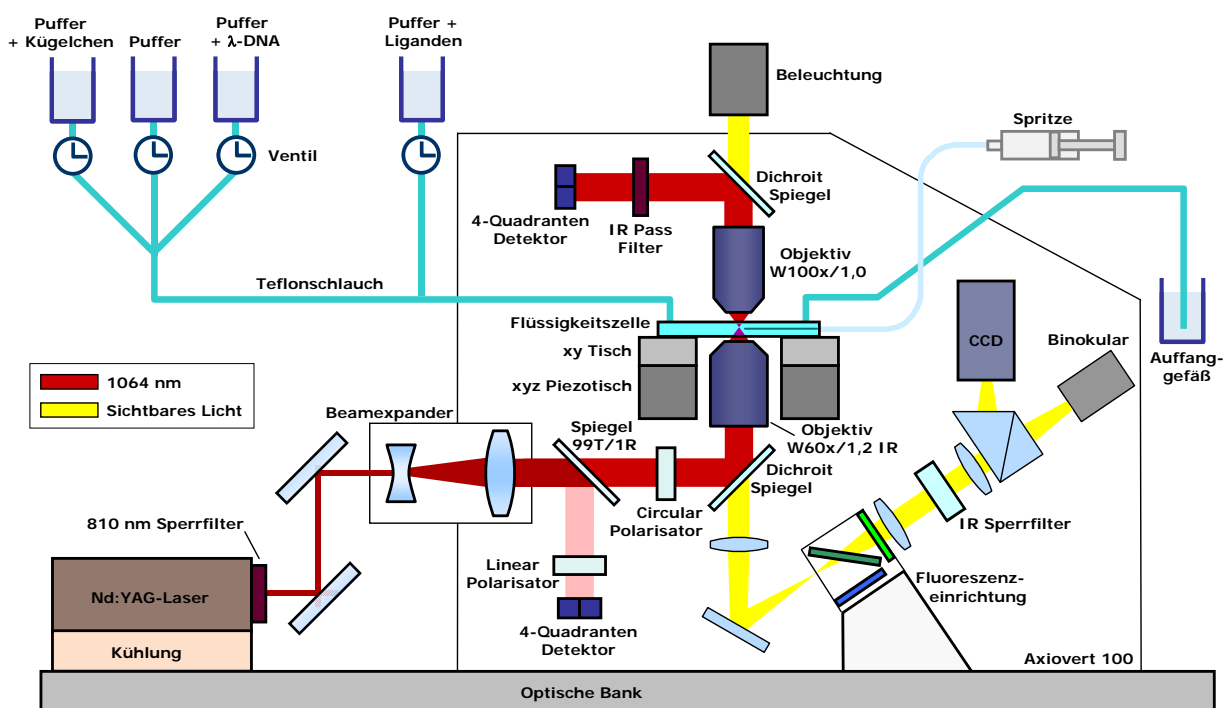
Ursache für stark erhöhte Quantenausbeute beim Binden von YOYO-1 im speziellen, und Interkalatoren im allgemeinen, ist zum einen der geringe Energieabstand zwischen dem Grundzustand der  $\pi$ -Elektronen (HOMO) in den Aromatenringen und dem ersten angeregten Zustand (LUMO) im Interkalator. Infolge der Interkalation ändert sich die elektronische Struktur der Aromaten (da deren  $\pi$ -Elektronen mit denen der Aromatenringe der Basen wechselwirken) und somit das Emissions- und Absorptionsverhalten [Lakowicz 1999].

Intensive Anregung des gebundenen YOYOs erhöht über einen längeren Zeitraum die Gefahr von Strangbrüchen [Gurrieri 1996]. Die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol als Freieradikal-Fänger kann diesen Effekt reduzieren.



## 2 Experimenteller Aufbau

Dieses Kapitel beschreibt den experimentellen Auf- und Ausbau der optischen Pinzette auf einem inversen Mikroskop, sowie die Technik der Kraftmessung und der Kraftkalibrierung. Die Präparation von Lambda-DNA, von B-Zellen und entsprechender Immunglobuline, sowie der Polypeptide und der Tyrosin-Kinase wird erläutert. Den letzten Unterpunkt bildet ein kurzer Überblick über die jeweils angewandten Operationsmoden der Optischen Pinzette.



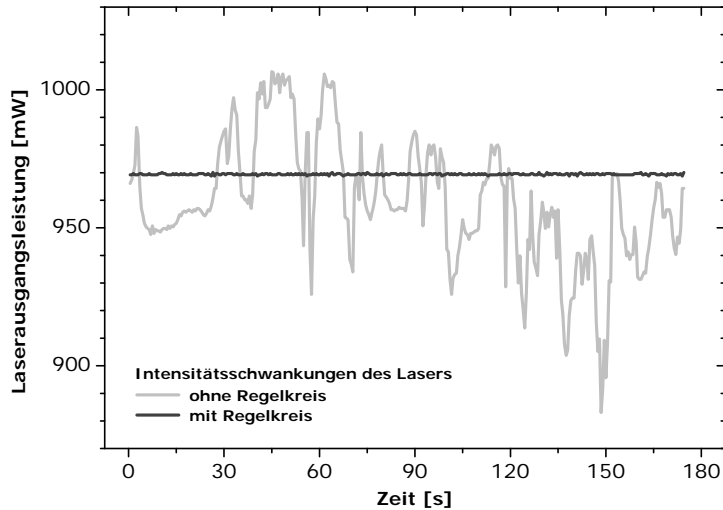
**Abbildung 26:** Der schematische Aufbau der Optischen Pinzette.

Die mechanische Basis der Optischen Pinzette bildet das "Axiovert 100" von Zeiss, ein inverses Mikroskop, das auf eine schwingungsgedämpfte Optische Bank (VH-3660W-OPT von "Newport") montiert wurde.

Der diodengepumpte Nd:YAG Laser (LCS-DTL-322 von "Laser 2000") im cw-Betrieb emittiert zu mehr als 99% linear polarisiertes, infrarotes Licht mit 1064 nm im TEM<sub>00</sub> Modus. Der Strahlquerschnitt<sup>1</sup> 2w beträgt 1,5 mm, und die Strahldivergenz liegt bei  $\theta = 1,3$  Bogenminuten. Die Laserausgangsleistung kann über ein Steuergerät in Schritten bis auf

<sup>1</sup> Der halbe Strahlquerschnitt entspricht dem Abstand  $a$  von der optischen Achse, bei dem das elektromagnetische Feld auf  $1/e$  des Maximums abgefallen ist. Da die Intensität  $I$  quadratisch von der Feldstärke abhängt, beträgt somit bei  $a$  die Intensität nur noch  $1/e^2 = 13,5\%$  [Kneubühl 1999].

1 Watt erhöht werden. Das Steuergerät regelt zwar aktiv die Temperatur des Nd:YAG Kristalls und der beiden Laserdioden, es erhält jedoch keine Rückmeldung über die tatsächlich emittierte Leistung. Dies führt vor allem in der Aufwärmphase des Lasers zu erheblichen Leistungsschwankungen, die zudem beim Erreichen der Betriebstemperatur kaum abnehmen. Die Anforderung an eine stabile Ausgangsleistung konnte nicht durch einen internen Umbau des Lasers erfüllt werden. Statt dessen wurde eine aktive Leistungskorrektur im Zuge des Ausbaus der Optischen Pinzette installiert. Hierbei übernimmt die 4-Quadrantendiode (die Untere in Abbildung 26) unter anderem die Aufgabe einer Photozelle, mit der die momentane Leistung gemessen wird. Über einen, im Rahmen dieser Arbeit neu eingebauten Regelkreis im LabView Programm (das später in Kapitel 2.3 beschrieben wird) wird die Laserausgangsleistung auf einen gewünschten Wert eingestellt und auch permanent konstant gehalten: Die Stellgröße im Regelkreis ist hierbei die Spannung, die der Regelkreis ausgibt, und die an den RS-232 Eingang des Lasersteuergerätes an zwei Pins angelegt wird. Die Laserleistung hängt linear von der angelegten Spannung (zwischen null und 2,4 V) ab. Der Regelkreis ermöglicht außerdem, daß nun die Laserleistung bis auf 1,3 Watt erhöht werden kann, was aber nicht in Betracht gezogen wird, da es sich negativ auf die Lebensdauer des Lasers auswirken kann. Wie sich bei Betriebstemperatur die Laserausgangsleistung ohne und mit Regelkreis im Laufe der Zeit verändert zeigt Abbildung 27.



**Abbildung 27:** Der Regelkreis reduziert die Schwankungen der Laserleistung auf 0,15 %.

Die Betriebstemperatur des Lasers soll laut Herstellerangaben  $45^{\circ}\text{C}$  nicht überschreiten. Er war deshalb ursprünglich mit Kühlblock und Lüfter ausgestattet. Beide wurden jedoch demontiert, da die Säulen, auf denen der Kühlblock ruhte, viel zu instabil waren und der Lüfter zudem störende Schwingungen auf den Laser übertrug. Statt dessen wurde nur ein flacher, massiver Kupferblock als passive Kühlung eingesetzt. Die Lasertemperatur stieg

mit dieser Kühlung auf nicht mehr als 37°C, und die Aufwärmzeit betrug etwa 90 Minuten. Die meisten der in dieser Arbeit präsentierten Messungen und Ergebnisse wurden mit dieser Form der Kühlung durchgeführt. Im Rahmen eines späteren, kleineren Umbaus der Optischen Pinzette wurde dieser Kühlblock durch einen doppelt so hohen, aber hohlen Kupferblock mit Kühlrippen ersetzt. Diese, wiederum passive Kühlung ermöglicht nun eine kürzere Aufwärmzeit von etwa 60 Minuten und eine Betriebstemperatur von maximal 34°C, was die Intensitätsschwankungen und das Weiße Rauschen per se schon etwas reduziert - und zwar bereits bei deaktiviertem Regelkreis.



**Abbildung 28:** Schneller auf Temperatur: Der neue Kühlblock.

Fest mit dem Kühlblock und dem Lasergehäuse verbunden ist ein RG 850-Filter, der bei 810 nm eine Transmission von weniger als 0,2 % hat, aber bei 1064 nm noch mehr als 98 % hindurchläßt. Der Filter soll das Pumplicht der Laserdiode von 810 nm abblocken, das immerhin noch mit einer Leistung von bis zu 200 mW aus dem Laser austritt.

Zwei plane Umlenkspiegel (10D20-ER.2 von "Newport") mit einer Reflektivität von je 95 % sind an justierbaren Halterungen an einer massiven Säule angebracht, und lenken den Laserstrahl auf die Höhe einer Öffnung in der Rückseite des Mikroskops, die ursprünglich als Epifluoreszenzeingang gedacht war. Eine Verkleidung, die vom vorderen Teil des Lasers, über beide Umlenkspiegel bis zum Epifluoreszenzeingang reicht, verhindert störende Luftströmungen, die den Laserstrahl zwar nur um einige Bogensekunden ablenken würden, was sich aber bei Kraftmessungen durchaus als störend herausstellt. Eine weitere Verkleidung in Form eines Kanals am vorderen Ende des Kühlblocks lenkt aufsteigende warme Luft am Kühlblock vom Laserstrahl weg und hält sie auch noch von der großen Verkleidung fern.

Der Beamexpander (Strahlaufweiter) wurde direkt in den Epifluoreszenzeingang eingebaut. Für die meisten im Rahmen dieser Arbeit gemachten Messungen wurde ein 10-fach Beamexpander mit variabler Strahldivergenz verwendet (S6A SS 107 von "Sill Optics") [Sischka 2003]. In der Folge einer erneuten Justage hat sich herausgestellt, daß durch einen 6-fach Beamexpander (S6A SS 106 von "Sill Optics") zwar mehr Leistung in die

Optische Falle gelangt, dafür aber aus zunächst unbekanntem Gründen die Schwankungen im Kraftsignal weitaus stärker und störender waren (siehe weiter unten im Kapitel). Der mit dem 10-fach Beamexpander auf 15 mm aufgeweitete Strahl wird durch einen dichroitischen Spiegel (TFP1064nm56° von "Laseroptik") nach oben abgelenkt. Der Dichroit hat bei 1064 nm eine Reflektivität von mehr als 96 %, läßt aber sichtbares Licht zu mehr als 80% hindurch. Im Zuge eines kleineren Umbaus wurde der Regelkreis mitsamt des 6-fach Beamexpanders installiert. Dies erforderte eine Leistungsmessung für den Regelkreis, die den ursprünglichen Lichtweg kaum beeinflußt. Hierzu wurde zwischen Beamexpander und Dichroit ein 0,9 mm dünner Spiegel eingesetzt (NIR 5R/95T von "AHF Analysetechnik"), der tatsächlich nur 1 % des Laserstrahles der gewünschten Polarisationsrichtung reflektiert. Jener Teil des Laserlichtes, der senkrecht dazu polarisiert ist, wird jedoch zu 10 % reflektiert. Dieser Anteil muß daher wiederum ausgefiltert werden, und das übernimmt ein Linearpolarisator (#3-26106 von "LOT Oriel") um wiederum einen zu mindestens 99% linear polarisierten Strahl zu erhalten. Das Licht fällt daraufhin auf eine 4-Quadrantendiode (SD 380-23-21-051 von "Silicon Detector Corp.") und das Summensignal aller vier Quadranten wird dann über einen Impedanzverstärker (Selbstbau der Uni Bielefeld) in ein Spannungssignal linear zu Intensität des Laserstrahles umgewandelt. Die 4-Quadrantendiode hatte ursprünglich die Aufgabe, die räumlichen Intensitätsschwankungen innerhalb des Strahlprofils zu messen, aber diese Variationen erwiesen sich als marginal im Vergleich zur Gesamtintensitätsschwankung.

Ein Zirkularpolarisator (OFR-RM-1/4-1064 von "Laser 2000") wurde in den Strahlengang eingesetzt (nachdem der 6-fach Beamexpander installiert wurde), da ansonsten das Strahlprofil an der oberen der beiden 4-Quadrantendioden (siehe Kapitel 2.1) ellipsenförmig verzerrt war, und zwar zeigte die große Halbachse der Ellipse parallel zur Polarisationsrichtung (die Ellipse hatte ein Seitenverhältnis von etwa 4:3): Dies bedeutet, daß in der Optischen Falle gefangene Objekte (und ganz besonders die Polystyrolkugeln mit einigen Mikrometern Durchmesser) das linear polarisierte Licht nicht isotrop vorwärts reflektieren, streuen und beugen (wohl aber das zirkular polarisierte Licht), was natürlich der Normalfall ist! Beim 10-fach Beamexpander ist der Effekt des ellipsenförmigen Strahlprofils hingegen nicht meßbar.

Beim 10-fach Beamexpander fällt der auf  $2w = 15$  mm aufgeweitete Strahl in die rückwärtige Apertur des 60x Wasserimmersionsobjektives (UPL-APO60W/IR von "Olympus") mit einer Numerischen Apertur von 1,2 und einer Apertur von  $2r = 8,5$  mm. Das Objektiv hat bei 1064 nm eine Transmission von etwa 62% (interpolierter Wert aus dem Datenblatt von "Olympus"). Nach [Siegmann 1986] gilt für das Verhältnis von transmittierter Leistung durch eine Apertur zur Gesamtleistung:

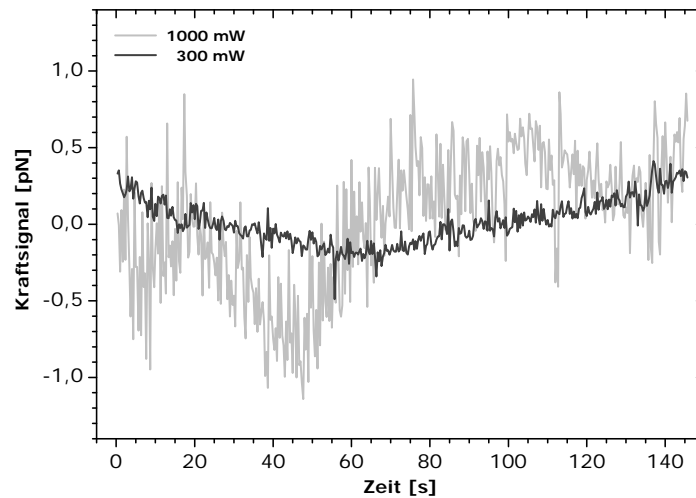
$$\frac{P_{\text{trans}}}{P} = 1 - \exp\left[-\frac{2r^2}{w^2}\right].$$

Bei einer "vom Strahlprofil ausgefüllten" Apertur ( $r = w$ ) werden noch 86,47 % an Leistung hindurchgelassen. Mit dem 10-fach Beamexpander beträgt die transmittierte Leistung nur noch 47,4 % der Gesamtleistung, beim 6-fach Beamexpander sind es 83,2 %. Nach [Ashkin 1992] soll es empfehlenswert sein, die Strahlquerschnitt so zu wählen, daß dieser die 1,5-fache Größe der Apertur hat, nur dann würden Objekte in der Optischen Falle mit der größtmöglichen Stabilität gefangen.

Der eigentliche Sinn der Strahlaufweitung läßt sich deutlich an Abbildung 3 erkennen: Nur wenn die gesamte Apertur des Objektivs vom Laserstrahl ausgenutzt wird, lassen sich genügend große Konvergenzwinkel des fokussierten Strahles erreichen, die eine möglichst stabile Falle erzeugen. Entscheidend für die Stabilität sind letztendlich vor allem diejenigen Strahlen, die unter einem großen Winkel zu Optischen Achse in das gefangene Objekt eintreten, somit möglichst stark gebrochen werden und einen hohen Impulsübertrag auf das Objekt bewirken. Infolge des Gaußschen Profils sind die Randstrahlen deutlich schwächer als diejenigen nahe der Optischen Achse. Eine zu große Strahlaufweitung würde zwar bis zu einem gewissen Grad die Intensität der Randstrahlen erhöhen, aber die insgesamt weniger durch die Apertur eintretende Leistung verringert zusehends die Stabilität der Falle. Im umgekehrten Fall kann durch eine zu geringe Strahlaufweitung kaum noch merklich die transmittierte Leistung erhöht werden, statt dessen wird das Strahlprofil so weit zusammengeschoben, daß vom Rand des Strahlprofils kaum noch Leistung zu erwarten ist. Daher der beste Kompromiß bei der 1,5-fachen "Überfüllung" der Apertur.

Die 10-fache Strahlaufweitung (= 1,76-fache Überfüllung) erwies sich in zwei Punkten als lange Zeit optimal: Die Schwankungen innerhalb des Strahlprofils und auch die Gesamtintensitätsschwankungen machten sich etwas weniger bemerkbar, als bei kleineren Aufweitungen (wie mehrere Experimente zeigten). Das hat vermutlich die Ursache darin, daß in den Außenbereichen des Strahlprofils die Schwankungen anteilmäßig am stärksten waren, aber die hohe Aufweitung sorgte dafür, daß eben so die Außenbereiche des Strahles an der Apertur ausgeblendet wurden. Zweitens waren kleine Justageungenauigkeiten weitaus weniger störend, denn das aufgeweitete Strahlprofil fällt in Bezug auf die Apertur zum Rand hin flacher ab. Es fallen somit radiale Bewegungen des Strahles (oder kleine Justageungenauigkeiten) in Bezug auf die Optische Achse des Objektivs weitaus weniger ins Gewicht.

Die 6-fache Strahlaufweitung sorgte für eine deutlich höher Gesamtkraft der Optischen Falle (siehe Abbildung 34 in Kapitel 2.2). Es zeigte sich sogar, daß diese nur 1,06-fache Überfüllung ganz im Gegensatz zu Ashkins Behauptungen [Ashkin 1992] das Optimum war. Die Schwankungen im Strahlprofil schlugen nun aber stärker zu Buche, ließen sich jedoch infolge der Leistungsstabilisierung deutlich reduzieren. Außerdem muß nun wegen der insgesamt höheren Gesamtkraft der Optischen Falle die Ausgangsleistung des Lasers nur noch etwa die Hälfte der ursprünglichen Leistung betragen, falls man dieselbe Kraft erreichen möchte, was eine niedrigere Betriebstemperatur ermöglicht, aber vor allem geringere Leistungsschwankungen zur Folge hat (siehe Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Schwankungen im Kraftsignal eines gefangenen Polystyrolkügelchens, auf das keine äußere Kraft wirkt. Jeder Meßpunkt entstand durch arithmetische Mittelung von Daten, die während 340 ms aufgezeichnet werden. Auf diese Weise sind die Schwankungen im Kraftsignal, welche aus der Brownschen Bewegung des Teilchens im Potential herrühren, kaum mehr aufzulösen. Was jedoch deutlich zu Tage tritt sind einzig und allein diejenigen Schwankungen, die auf Fluktuationen des Laserstrahls zurückzuführen sind. Die Daten wurden bei 6-facher Strahlaufweitung mit aktiviertem Regelkreis aufgezeichnet.

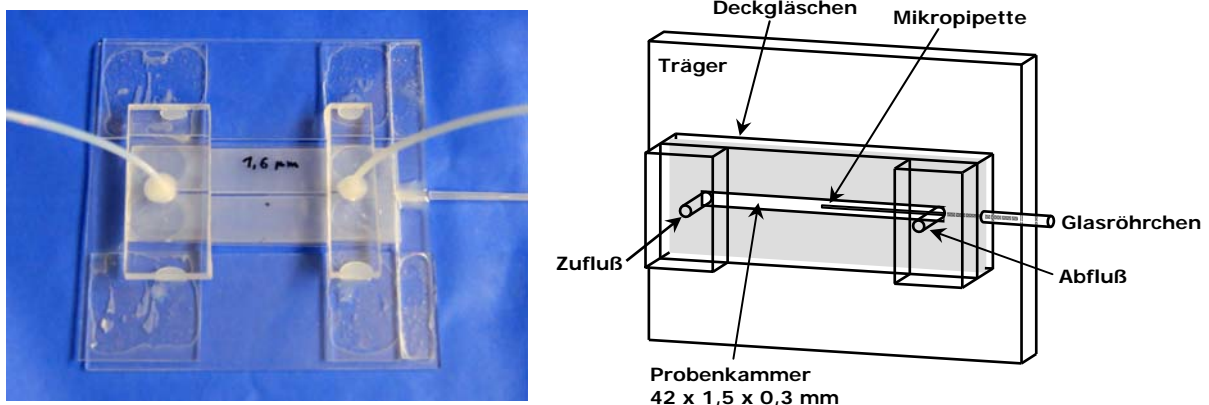
Berücksichtigt man die Leistungsverluste auf dem gesamten Lichtweg des Laserstrahles bis zum Punkt der Optischen Falle, dann gelangen dort schätzungsweise noch 34 % der ursprünglichen Leistung an (31,6 % Verlust bis vor das Objektiv, 16,8 % an der Apertur, 38 % im Objektiv und ca. 2 % an den Glas-Wasser Grenzflächen in der Flüssigkeitszelle).

Die Flüssigkeitszelle, in der ausnahmslos alle Messungen stattfinden, hat einen Boden, der aus einem nur 0,14 mm dünnen Deckgläschen (60 x 24 mm) besteht. Zusammen mit dem Arbeitsabstand des Wasserimmersionsobjektivs von 300  $\mu\text{m}$  ist es möglich, ausreichend tief im Innern der Flüssigkeitszelle Messungen durchzuführen. Man läuft somit nicht Gefahr, zu dicht an den Boden oder die Decke der Probenkammer zu gelangen, wo sich die lokalen Viskositätseigenschaften der Flüssigkeit [Svoboda 1994; Pralle 1998] auch störend bemerkbar machen könnten.

Die Decke der Flüssigkeitszelle besteht ebenfalls aus einem 0,14 mm dünnen Deckgläschen, in das zwei Löcher von je 1 mm hineingefräst wurden. Zwischen beiden Deckgläschen liegen zwei Lagen von "Parafilm" - einer Art Wachspapier mit einer Dicke von 0,15 mm - in die ein Kanal (42 x 1,5 mm) eingeschnitten ist. Zwischen beide Parafilme wird eine Mikropipette (innerer Durchmesser 80  $\mu\text{m}$ , äußerer Durchmesser 150  $\mu\text{m}$ ) gelegt, mit

einer am Pipettenziehgerät gezogenen Spitze von etwa 1,3 bis 1,8  $\mu\text{m}$  Durchmesser. An der Spitze können beliebige unbeschichtete oder auch funktionalisierte Polystyrolkugeln durch Unterdruck festgehalten werden. Um Zellen mit einer Größe von 10 bis 30  $\mu\text{m}$  festzusaugen, wurden Pipetten mit einer Spitze von etwa 6  $\mu\text{m}$  Durchmesser gezogen. Die Mikropipette ragt entlang der Achse des Kanals in den selbigen bis zur Mitte hinein, und seitlich zudem etwas aus dem Parafilm und den Deckgläschen heraus. Dort wird ein Glasröhrchen mit 1 mm Durchmesser darübergestülpt und mit Epoxidharz verklebt. Daran kann ein flexibler Silikonschlauch mit einer Spritze angeschlossen werden, um den Druck in der Mikropipette variieren zu können und somit Kügelchen oder Zellen festzuhalten oder gezielt wieder von der Spitze zu lösen.

Beide Deckgläschen, Parafilm und die Mikropipette werden unter Hitze fest miteinander "verbacken" und bilden so eine Probenkammer mit Zu- und Abfluß. Diese bereits fertige Flüssigkeitszelle wird auf einen Träger bestehend aus vier Objektträgern geklebt, der seinerseits fest auf das Mikroskop aufgeschraubt werden kann. Zwei durchbohrte Plexiglasblöcke werden über den Zu- und Abfluß geklebt, um ihrerseits zwei Teflonschläuche (innerer Durchmesser 0,3 mm, äußerer Durchmesser 1,6 mm) aufzunehmen, die mit dem Flüssigkeitssystem verbunden werden.



**Abbildung 30:** Die Flüssigkeitszelle besteht aus einer Probenkammer, in die eine Mikropipette hineinragt, deren Spitze einen Durchmesser von 1,6  $\mu\text{m}$  hat.

Die Flüssigkeitszelle wird nach jeder Messung je nach Verschmutzung entweder mit destilliertem Wasser, oder zusätzlich mit Ethanol und 1 M NaOH durchgespült, um Bakterien, untersuchte Zellen oder Reste von biologischem Belag zu entfernen.

Die Flüssigkeitszufuhr besteht aus vier Vorratsgefäßen (gewöhnliche Spritzen) mit Ventilen, welche beim Schließen oder Öffnen die Flüssigkeit nicht verdrängen, und dadurch keine störenden Erschütterungen auf die Probenkammer und Objekte in der Optischen Falle übertragen. Das Auffanggefäß ist ebenfalls eine Spritze, die höhenverstellbar gelagert ist.

So kann auf diese Weise sehr präzise die Strömungsgeschwindigkeit eingestellt werden, denn die gesamte Flüssigkeitszufuhr basiert nur auf hydrostatischem Druck, ist somit äußerst störungsunanfällig und erzeugt im Betrieb keine meßbaren Erschütterungen.

Um die Flüssigkeitszelle relativ zur Optischen Falle zu positionieren, oder in der Falle gefangene Objekte relativ zur Probenkammer oder zur Spitze der Pipette zu bewegen oder um Zellen mit der Falle vom Boden aufzulesen ruht die Flüssigkeitszelle auf einem 8 mm flachen Selbstbau-xy-Verstelltisch, der es ermöglicht Bewegungen mit Submikrometerpräzision über einen Bereich von 4 mm in beide Richtungen zu vollführen.

Um später Kraftmessungen durchführen zu können, muß das Objekt in der Falle relativ zu einem Objekt (am Boden oder an der Spitze der Pipette) mit Nanometerpräzision in alle drei Richtungen bewegt werden können. Des weiteren muß die Flüssigkeitszelle mit exakt definierten Geschwindigkeiten angefahren werden können, was zum einen vor allem bei der Kraftspektroskopie und zum anderen bei der Kalibrierung der Optischen Pinzette unumgänglich ist. Diese Aufgabe übernimmt der Piezotisch (P-517.3CD von "Physik Instrumente"), welcher den xy-Verstelltisch trägt, und der sich um 100  $\mu\text{m}$  in x- und y-, sowie um 20  $\mu\text{m}$  in z-Richtung bewegen läßt. Das Ansteuern des Piezotisches übernimmt ein Controller (E-710 von "Physik Instrumente"), dessen Daten über eine IEEE 488 Schnittstelle und eine GPIB-Karte im Meßrechner ausgelesen werden können, und der auch von dort angesteuert wird. Der Piezotisch ruht in einer massiven u-förmigen Schale, die fest mit dem Mikroskop verschraubt ist. Alle mechanischen Schwingungen, ausgehend vom Laser, vom Mikroskop selbst, bis hin zum Piezotisch und zur Flüssigkeitszelle sind so gering, daß sie bei allen Messungen keine Rolle spielen.

Um fluoreszierende Proben untersuchen oder selektieren zu können, mußte eine komplette Fluoreszenzeinrichtung ihren Platz im Mikroskop finden. Diese besteht zunächst aus einer Quecksilberdampfampe, die ein Breitbandspektrum emittiert, und einer Kondensorlinse. Der Anregungsfilter läßt einen Bereich des Spektrums von 450 bis 490 nm hindurch, der dichroitische Spiegel ist ein Tiefpaß mit einer Kante bei 505 nm, während der Emissionsfilter die Wellenlängen von 515 bis 565 nm selektiert (Filtersatz XF-22 von "Omegaoptics").

Da der Beamexpander bereits in den Epifluoreszenzeingang montiert war, wurde das Anregungslicht in den Strahlengang zwischen dem unteren Umlenkspiegel und den hinteren Feldlinsen, in der Nähe des Zwischenbildes der ersten Feldlinse eingespiegelt (beim Brennpunkt im Strahl des sichtbaren Lichtes in Abbildung 26). Damit das Anregungslicht den nahezu gleichen konvergenten Strahlenverlauf Richtung Objektiv nimmt, wurde die Kondensorlinse daraufhin passend eingestellt. Als Folge wird das Anregungslicht im Objektiv gebündelt und leuchtet nur einen kleinen Bereich um die Optische Falle herum aus, etwa 100  $\mu\text{m}$ . Die gesamte Fluoreszenzeinheit kann übrigens leicht aus dem



Strahlengang herausgezogen und wieder hineingeschoben werden, so daß sie nach einer geringfügigen Justage wieder einsatzbereit ist.

Da ein gefangenes Objekt Infrarotstrahlung zurückstreuen kann, und diese noch zu knapp 4 % durch den dichroitischen Spiegel in den Strahlengang des sichtbaren Lichtes tritt, wurden aus Sicherheitsgründen zwei 3 mm dicke Infrarotsperrfilter (KG 5 von "Schott"), die zusammen nur noch eine Transmission von weniger als  $10^{-10}$  % bei 1064 nm besitzen, mit einer speziellen Halterung vor die obere Tubuslinse gesetzt.

Die CCD-Kamera (DMK 3002-IR/C von "The Imaging Source") gibt ein AV-Signal aus, welches über den S-Videoeingang mit einer Framegrabberkarte (DFG/LC 1 von "The Imaging Source") in den Meßrechner eingelesen werden kann.

## 2.1 Aufbau der Positions- und Kraftmessung

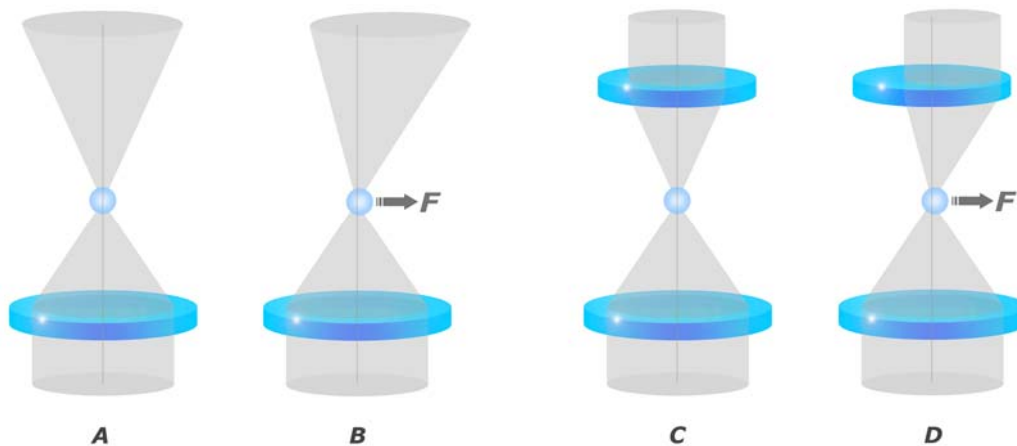
Laut Theorie befindet sich in der Falle gefangenes Objekt in einem harmonischen Potential. Dies bedeutet, daß das Objekt um so weiter aus dem Potentialminimum ausgelenkt wird, je größer die äußere Kraft ist, die am Objekt angreift:  $F = -dV / dx = -k \cdot x$ .

Die Kraft unmittelbar über die Auslenkung des Objektes zu messen (das sei dann unter Positionsmessung zu verstehen), ist daher der direkteste und auch einfachste Weg. Die Ergebnisse und andere Methoden der Kalibrierung werden in Kapitel 2.2 diskutiert.

Die direkte Messung der Auslenkung eines Objektes aus der Optischen Falle kann beispielsweise durch Videoanalyse geschehen. Über das Bild des gefangenen Objektes - einmal zu Beginn, wenn keine äußere Kraft anliegt, und dann, sobald die äußere Kraft wirkt - wird ein Intensitätsprofil gelegt. Über das Maximum des Profils läßt sich der Mittelpunkt des Objektes, und damit auch die Auslenkung sehr präzise bestimmen, bis auf 2 nm [Gutsche 2005]. Dies steht in keinem Widerspruch zu den optischen Auflösungskriterien, denn diese geben nur Bedingungen an, unter denen es möglich ist, zwei räumlich getrennte Objekte eben noch getrennt wahrzunehmen. Bei der Videoanalyse hingegen tritt eine zeitliche Trennung auf. Die Nachteile der Videoanalyse sind der enorme zeitliche und der Rechenaufwand, und die Tatsache, daß somit keine wirkliche Echtzeitmessung der Kraft möglich ist. Auch können veränderte Beleuchtungsbedingungen zwischen zwei Messungen zu Artefakten in der Videoauswertung führen.

Die in dieser Arbeit angewandte Form der Auslenkungsmessung, oder auch Positionsmessung ist eine leichte Abwandlung der Methode, wie sie von Gittes et al. [Gittes 1998] und Yamada et al. [Yamada 2000] vorgeschlagen wurde (in meiner Arbeit wurde die unnötige zusätzliche Linse vor dem Quadrantendetektor weggelassen).

Das Prinzip der Positionsmessung lässt sich am besten verdeutlichen, wenn man zunächst den Verlauf des fokussierten Laserstrahlen betrachtet, bevor und nachdem er das gefangene Objekt - hier ein Kügelchen im Mie-Regime - passiert hat. Mit Hilfe von Abbildung 3 und 4 (um 180° gedreht, wegen des Aufbaus auf dem inversen Mikroskop) erhält man bei einem Kügelchen, auf das keine äußere Kraft wirkt, einen Strahlenverlauf wie in Abbildung 31 A.



**Abbildung 31:** Das von unten ins Objektiv eintretende Licht wird fokussiert und tritt durch das gefangene Kügelchen hindurch. Unter Einwirkung einer äußeren Kraft wird das Kügelchen etwas aus der Falle ausgelenkt und der Strahlkegel kippt zur Seite der Auslenkung (Abbildung B). Ein zweites Objektiv, konfokal über dem ersten, refokussiert den Strahlkegel (Abbildung C). Wirkt nun eine äußere Kraft, dann bewirkt diese eine laterale Abweichung des refokussierten Strahles von der optischen Achse (Abbildung D).

Der fokussierte Laserstrahl wird im gefangenen Kügelchen vor allem gebrochen, aber auch zum Teil gestreut und gebeugt. Der Hauptteil des nach oben austretenden Lichtes (auch als "vorwärtsgestreutes Licht" bezeichnet) bildet wieder einen Strahlkegel, dessen Öffnungswinkel jedoch etwas kleiner ist, als der Öffnungswinkel des ins Kügelchen eintretenden Strahles (siehe auch Abbildung 3). Eine äußere Kraft bewirkt wie in Abbildung 4 ein Kippen des Strahlkegels (Abbildung 31 B). Im Prinzip lässt sich dieses Verkappen bereits mit einem 4-Quadrantendetektor nachweisen, und nicht nur das, es wäre sogar mit bloßem Auge zu erkennen. Da der recht divergente Strahlkegel des vorwärtsgestreuten Lichtes tritt irgendwann aus der Flüssigkeitszelle aus. Beim Übergang von Wasser nach Luft weitet er sich noch stärker auf, oder im schlimmsten Falle kann der Rand des Kegels infolge der Totalreflexion nicht mehr die Flüssigkeitszelle verlassen. Aus diesem Grund wird relativ zum ersten, ein zweites Objektiv konfokal angeordnet (Abbildung 31 C). Dieses muß zum

einen eine fast genau so große NA besitzen, um den gesamten Strahlkegel erfassen zu können, und mit Öl- oder Wasserimmersion arbeiten, um Totalreflexionen zu vermeiden. Die hohe NA ist auch notwendig, um, wie in Abbildung 31 D zu erkennen, den seitlich wegkippenden Strahlkegel ebenfalls noch aufzusammeln zu können.

Oberhalb des zweiten Objektivs erhält man wieder einen parallelen Lichtstrahl (der nun einen etwas kleineren Durchmesser besitzt), wobei der seitlich wegkippende Strahlkegel eine laterale Abweichung des parallelen Lichtstrahles relativ zur optischen Achse hervorruft. Selbst wenn das Kügelchen nur einige Dutzend Nanometer aus der Falle ausgelenkt wird, ist das Verkippen des Strahlkegels und somit die Ablenkung des parallelen Lichtstrahles bereits so groß, daß diese mit bloßem Auge zu erkennen ist.

Eine 4-Quadrantendiode könnte nun in jeder beliebigen Entfernung vom oberen Objektiv platziert werden, um Auslenkungen in x- und y-Richtung weitaus sensibler, und zwar mit einer Genauigkeit von etwa 1 nm zu detektieren.

Das hier verwendete Objektiv (von jetzt an als Kondensator bezeichnet) ist ein 100x Wasserimmersionsobjektiv (Achromat 100/1,0 W von "Zeiss") mit einer NA von 1,0 und einer Apertur von  $2r = 6$  mm. Die Transmission bei 1064 nm beträgt schätzungsweise nur 40 %, was aber immer noch mehr als ausreichend ist. Der größte Vorteil dieses Objektivs ist der hohe Arbeitsabstand von 0,95 mm, der es ermöglicht, Flüssigkeitszellen mit einer Dicke von bis zu 1,25 mm zu benutzen (die hier verwendete ist jedoch nicht höher als 0,55 mm, exklusive des Rahmens).

Der Kondensator ist in einen Hohlzylinder mit Außengewinde eingesetzt, der wiederum in einer Halterung mit Innengewinde läuft, was es einem ermöglicht, den Kondensator unabhängig vom normalen Objektiv (das sich durch die mikroskopeigene Fokussierung ebenfalls in der Höhe verstellen läßt) in der Höhe zu verstellen, um den Fokus des Kondensators mit dem des Objektivs auf den gleichen Punkt zu bringen. Leichte Variationen in der Höhe, infolge unvermeidbarer mechanischer Toleranzen machen sich letztendlich bei der Kraftmessung so gut wie nicht bemerkbar .

Bevor das aus diesem Kondensator austretende, parallele Strahlenbündel auf eine Quadrantendiode fällt, wird der Strahl wieder durch einen dichroitischen Spiegel (auch ein TFP 1064nm56° von "Laseroptik") um 90° umgelenkt. Nur so ist es möglich, gleichzeitig auch sichtbares Licht für die Beleuchtung durch das obere Objektiv nach unten zu schicken.

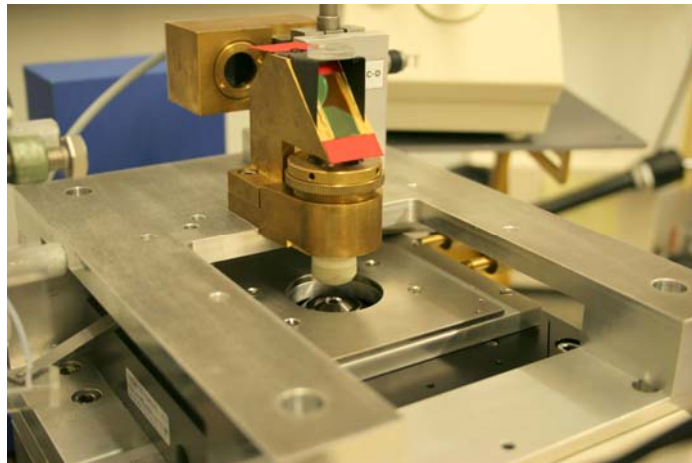
Die Lichtquelle hierfür ist eine Kaltlichtquelle mit einem dahintergesetzten, leichten Blaufilter, die jedoch ein relativ divergentes Strahlenbündel erzeugt. Deshalb befindet sich nach der Lichtquelle, noch knapp oberhalb des Dichroiten eine weitere Sammellinse, die ein fast paralleles Lichtbündel erzeugt. Dieses tritt dann durch den Dichroit in den Kondensator und der fokussiert das Licht in der Nähe - und zwar etwas unterhalb - der Brennebene des unteren Objektivs. Das fokussierte Licht der Beleuchtung sorgt dafür, daß kaum Fresnel Beugungsringe oder Streifen [Gerthsen 1993] an scharf abgebildeten Objekten entstehen.

Trotzdem wird der Bereich um die Optische Falle herum gut und gleichmäßig ausgeleuchtet.

Um keine störenden Schwingungen zu übertragen, ist die Lichtquelle mechanisch vom Mikroskop entkoppelt.

Der 4-Quadrantendetektor (SD 380-23-21-051 von "Silicon Detector Corp.") befindet sich in einem Gehäuse, das in x- und y-Richtung mit Mikrometerschrauben justiert werden kann, um den infraroten Strahl exakt zentrisch auf den Detektor fallen lassen zu können. Vor den Quadrantendetektor wurde ein RG 850 Filter gesetzt, um zu verhindern, daß sichtbares Licht die Messung stört.

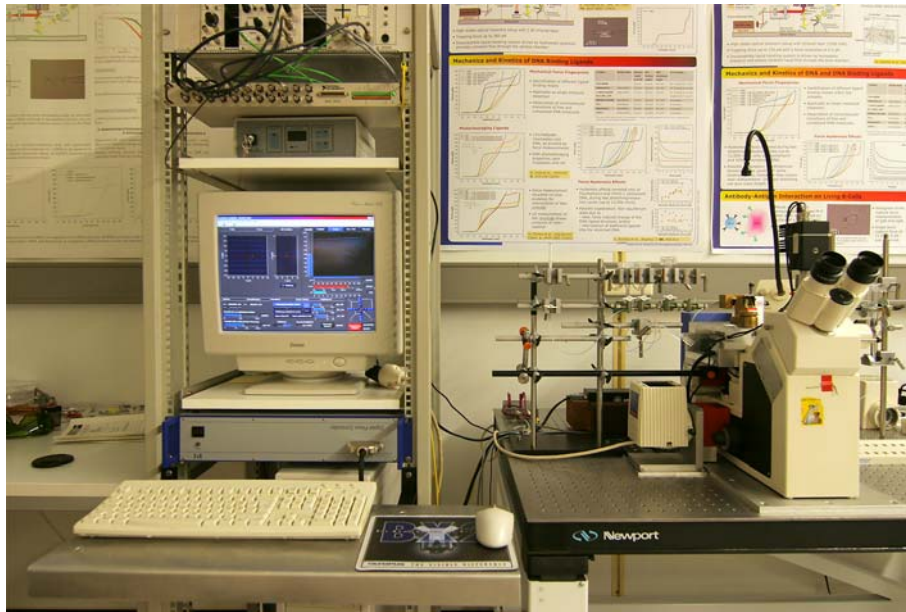
Alle Bauteile, vom Kondensator bis zum Detektor, befinden sich auf einer massiven Aluminiumbrücke, die keine meßbaren Schwingungen vollführt.



**Abbildung 32:** Die Positions- und Kraftmeßeinrichtung.

Die vier Kanäle des Quadrantendetektors werden über vier Impedanzverstärker (OPA-III-Burn Brown) ausgelesen, und die vier Spannungen daraufhin analog in ein  $\Delta x$ - und ein  $\Delta y$ - Spannungssignal (dieses gibt die laterale Abweichung des vorwärtsgestreuten Lichtes auf dem Detektor an) umgewandelt, welches mit 5 kHz tiefpaßgefiltert wird. Beide Spannungen werden dann mit 16 Bit digitalisiert und über eine GPIB I/O Schnittkarte (PCI-6036 E von "National Instruments") in den Meßrechner eingelesen.

Die beiden Spannungssignale, die Werte, die der Piezocontroller liefert, sowie der Regelkreis des Lasers werden in einem selbst erstellten LabView-Programm verarbeitet. Weiterhin kann von dort aus der Piezotisch angesteuert werden, um verschiedene Meßmethoden (siehe Kapitel 2.3) durchführen zu können.



**Abbildung 33:** Der komplette Aufbau der Optischen Pinzette auf dem inversen Mikroskop, mit Flüssigkeitssystem, Meßrechner, Piezocontroller, I/O Schnittstelle und der analogen Signalverarbeitung.

## 2.2 Kalibrierung der Optischen Falle

Um die Optischen Falle zunächst in puncto Stabilität zu Charakterisieren, wird die maximal erreichbare Kraft in Abhängigkeit der Laserleistung bestimmt. Kleine Justageungenauigkeiten, die sich durch einen starken Abfall der maximalen Kraft deutlich bemerkbar machen, können so erkannt und korrigiert werden.

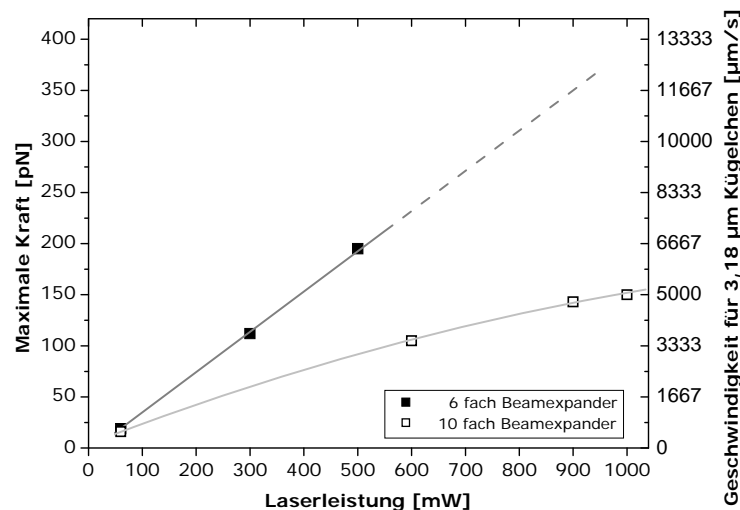
Alle, die dsDNA betreffenden Messungen wurden mit kleinen, funktionalisierten Polystyrolkugeln durchgeführt. Es lag daher nahe, die Charakterisierung und auch alle nachfolgenden Kalibrierungen daran durchzuführen.

Die transparenten Kügelchen (PC-S-3.0 von "Spherotech") haben einen Durchmesser von  $2r = 3,18 \mu\text{m}$  (mit einer Standardabweichung von 20 nm) und sind mit Streptavidin beschichtet (Bindungskapazität 60 pM/mg). Die Stammlösung der Kügelchen (0,5 % w/v) wird in der auch später verwendeten Standard-Pufferlösung (150 mM NaCl und 10 mM Tris/HCl mit pH 8,0) etwa 3000-fach verdünnt und in die Probenkammer geleitet. Ein Kügelchen wird gefangen und die gesamte Flüssigkeitszelle mit Hilfe des Piezotisches relativ zum Kügelchen mit einer konstanten Geschwindigkeit  $v$  bewegt. Das Kügelchen erfährt hierbei eine Stokessche Reibungskraft gemäß

$$F_{\text{Stokes}} = -6\pi\eta r \cdot v.$$

Korrekturen an dieser Gleichung infolge von Grenzflächeneffekten [Svoboda 1994] sind nicht nötig, da sich die Optische Falle etwa 100  $\mu\text{m}$  über dem Boden der Flüssigkeitszelle befindet. Die hier auftretenden Reynoldszahlen sind so gering ( $Re = v \cdot r \cdot \rho / \eta \leq 10^{-6}$  mit  $\eta \cong 10^{-3} \text{ Nsm}^{-1}$  bei 20°C und  $\rho = 1,01 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  für den hier verwendeten Puffer), daß stets laminare Strömungen in der Umgebung des Kügelchens auftraten.

Mit Hilfe derjenigen maximalen Geschwindigkeit des Piezotisches, bei der das Kügelchen durch die Reibung gerade noch nicht aus der Falle gezogen wird, kann die maximale Kraft der Optischen Falle bestimmt werden, in Abhängigkeit von der jeweiligen Laserleistung. In den beiden Ausbaustufen der Optischen Pinzette (mit 10-fach und mit 6-fach Beamexpander) konnten folgende maximale Kräfte ermittelt werden (siehe Abbildung 34):



**Abbildung 34:** Die maximale Kraft der Optischen Falle in Abhängigkeit der Laserleistung und des jeweils installierten Beamexpanders. Bei einem 3,18  $\mu\text{m}$  Kügelchen erzeugt eine Geschwindigkeit von 33,3  $\mu\text{m/s}$  im hier verwendeten Puffer eine Kraft von 1 pN. Der Piezotisch kann sich aber nicht schneller als mit 6600  $\mu\text{m/s}$  bewegen, deshalb sind mit Stokescher Reibung keine Kräfte über 200 pN detektierbar.

Mit dem neuen Beamexpander konnten wesentlich höhere Kräfte erreicht werden. Sie steigen linear mit der Laserleistung an. Da sich jedoch der Piezotisch nicht schneller als mit 6600  $\mu\text{m/s}$  bewegen läßt (der Controller verhindert dies, um nichtlineare Effekte im Geschwindigkeitsprofil des Piezos zu vermeiden), können über die Stokesche Reibung nur Kräfte bis 200 pN detektiert werden. Extrapoliert man die Ergebnisse, dann zeigt sich, daß

mit der Optischen Pinzette durchaus Kräfte bis mindestens 350 pN erreichbar sind. Das läßt dieses Instrument im Vergleich zu anderen Optischen Pinzetten mit äquivalenter Laserleistung [Resnick 2001; McCauley 2005] weiter in den Kraftbereich der AFMs vordringen.

Der nächste, entscheidende Schritt der Kalibrierung besteht darin, das  $\Delta x$ -Spannungssignal in ein Kraftsignal umzuwandeln, denn bei zukünftigen Messungen soll die Kraft in x-Richtung wirken. Hierbei wird die Flüssigkeitszelle mit beispielsweise 333  $\mu\text{m/s}$  abwechselnd in beide Richtungen bewegt. Dabei wirkt alternierend eine Kraft von -10 und +10 pN auf das Kügelchen. Das jeweilige Spannungssignal in Volt muß für die Auswertung in LabView noch in einen Kraftwert umgerechnet werden; der Vorfaktor wird deshalb auf die gewünschten 10 pN angepaßt.

Hierbei zeigte sich zum einen, daß der Vorfaktor von der momentanen Laserleistung abhängt, bei 1000 mW sind es beispielsweise 57 pN/V (bei 300 mW sind es 45 pN/V und bei 50 mW noch 34 pN).

Entscheidend ist jedoch, ob die doppelte (oder beispielsweise die zehnfache) Geschwindigkeit beim Detektor auch eine Verdopplung (oder Verzehnfachung) des Spannungssignals hervorruft. Tests bei verschiedenen Laserleistungen bestätigten dies: Der gesamte, durch Stokesche Reibung zugängliche Kraftbereich bewirkt ein linear abhängiges Spannungssignal und somit eine lineare Kraftantwort.

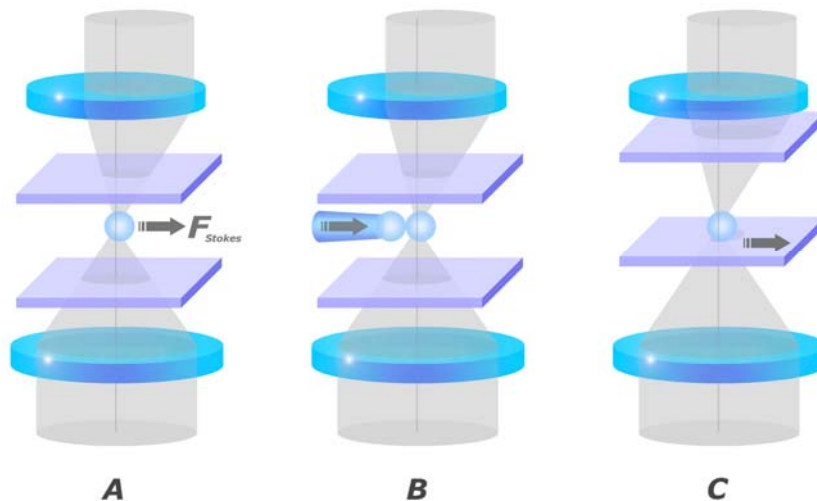
Vor jeder neu beginnenden Messung wird einmal die Geschwindigkeit auf 333  $\mu\text{m/s}$  eingestellt, und der Vorfaktor überprüft. Es stellte sich heraus, daß dieser von Messung zu Messung um nicht mehr als 5 % schwankt. Dies ist um so erstaunlicher, da typischerweise von einer Kalibrationsungenauigkeit von etwa 20 % ausgegangen wird [Florin 1998], zumindest was die Kraftkonstante der Optischen Falle anbetrifft.

Im Prinzip wäre damit schon die Kalibrierung beendet, es könnte gemessen werden. Allerdings möchte man ebenfalls die Kraftkonstante  $k$  der Optischen Falle kennen, um zu bestimmen, wie weit das Kügelchen aus der Falle ausgelenkt wird; sozusagen die Position des Kügelchens relativ zur Falle. Die Auslenkung des Kügelchens zu kennen, ist von entscheidender Wichtigkeit, um die Länge einer gestreckten DNA zu bestimmen (siehe Kapitel 2.3). Und ebenso ist es wichtig zu wissen, ob der Detektor linear auf die Auslenkung anspricht.

Es lag daher nahe, das Kügelchen mit dem Piezotisch lateral aus der Falle herauszuziehen oder zu schieben, und in Abhängigkeit der Auslenkung die Detektorantwort (in diesem Fall das Kraftsignal) zu messen.

Das Kügelchen wurde hierbei auf zwei verschiedenen Arten relativ zur Falle bewegt: Ein zweites Kügelchen, welches sich auf der Pipettenspitze befand, schob das gefangene Kügelchen aus der Falle heraus (dabei mußte exakt die Mitte getroffen werden, um zu

verhindern, daß das gefangene Kügelchen wegkippt - siehe Abbildung 35 B). Bei der zweiten Möglichkeit läßt man ein Kügelchen auf dem Boden der Flüssigkeitszelle adhären, danach bewegt man das Kügelchen in die Mitte der Falle (exakt dahin, wo es sich sonst auch befinden würde) und bewegt ebenfalls die Flüssigkeitszelle seitwärts - so wie in Abbildung 35 C).



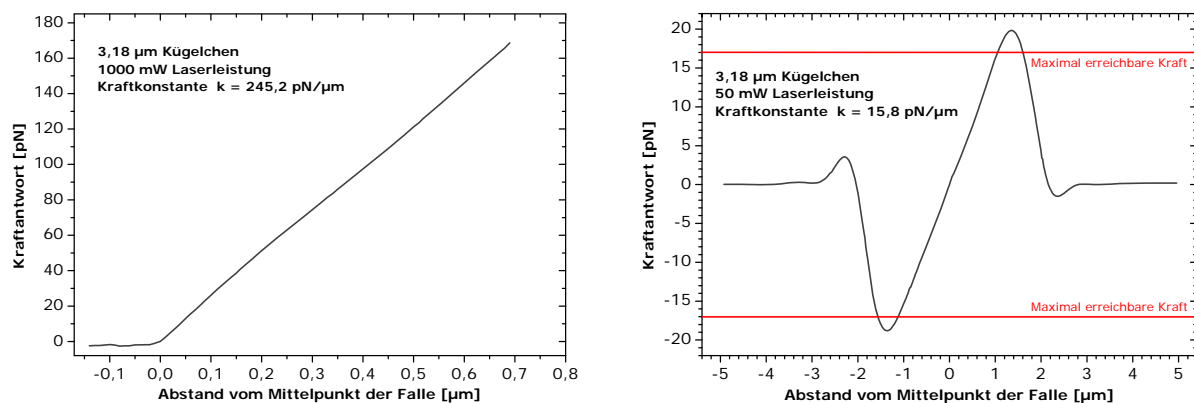
**Abbildung 35:** Das Vorbeiströmen einer Flüssigkeit durch die Flüssigkeitszelle bewirkt infolge der Stokesschen Reibungskraft eine Auslenkung des Kügelchens aus der Falle (Bild A). Dieselbe Auslenkung kann beispielsweise erreicht werden, indem ein zweites Kügelchen an der Pipette das Kügelchen in der Falle herausdrängt (Bild B). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das Kügelchen am Boden der Flüssigkeitszelle zu adhären, und es dann durch die Falle zu ziehen (Bild C).

Die Pipettenmethode ergab eine sehr gute lineare Abhängigkeit der Kraftantwort des Detektors von der Auslenkung des Kügelchens (Abbildung 36 links). Aus der Steigung des Graphen läßt sich unmittelbar die Kraftkonstante ermitteln. Bei höheren Auslenkungen jedoch kippte das Kügelchen seitlich aus der Falle weg, da man es nie ganz exakt von der Seite traf.

Eine Alternativmethode würde darin bestehen, das Kügelchen mit Hilfe eines zweiten Kügelchens aus der Falle zu ziehen. Eine Verbindung zwischen beiden kann analog zur Methode in Kapitel 2.4.2 geschehen. Die Immobilisierung von Liganden und Rezeptoren auf beiden Oberflächen der Kügelchen, sowie die Dissoziation der Bindung zwischen beiden Kügelchen, sobald eine Kraft wirkt, macht diese Methode jedoch nur unnötig aufwendig.



Die Methode des Adhärerens ergibt ebenfalls eine lineare Abhängigkeit (Abbildung 36 rechts). Entscheidend ist hierbei nur der Bereich zwischen dem absoluten Minimum- und Maximumwert. Da man die maximale Kraft der Optischen Falle bei der jeweiligen Leistung bereits vorher ermitteln kann, läßt sich der lineare Bereich exakt eingrenzen. Jenseits dieser Punkte des Graphen ist das Kügelchen bereits so weit von der Falle entfernt, daß der Großteil des Laserstrahles immer weniger beeinflusst wird und der Detektor dies dann irgendwann als nicht mehr vorhandene Kraft interpretiert.



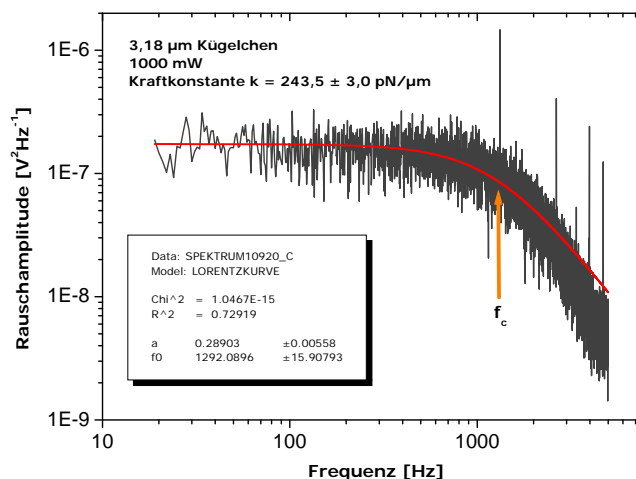
**Abbildung 36:** Das Herausdrängen des Kügelchen aus der Falle durch ein zweites Kügelchen bewirkt eine Detektorantwort, die linear von der Auslenkung abhängt. Hieraus kann direkt die Kraftkonstante der Falle ermittelt werden (linkes Bild). Das Hindurchziehen eines adhärerten Kügelchens durch die Falle ergibt ebenfalls einen linearen Zusammenhang (rechts). Der lineare Bereich wird durch die maximal erreichbare Kraft eingegrenzt. Der Verlauf des Graphen jenseits davon hat daher keine Relevanz bei der Kraftmessung.

Bei größeren Laserleistungen geschieht es häufiger, daß das Kügelchen vom Boden losgerissen und darübergeschleift wird, daher ist diese Methode nur bei kleinen Leistungen anwendbar. Ein kleiner Nachteil besteht zudem darin, daß man das Kügelchen in der exakten lateralen und axialen Position durch die Falle ziehen muß. Kleine Abweichungen könnten zu leicht fehlerbehafteten Kraftkonstanten führen. Einen geringen Einfluß haben ebenfalls Beugungs- und Interferenzeffekte, die zwischen dem Kügelchen und der Oberfläche des Bodens der Flüssigkeitszelle auftreten.

Aus beiden Methoden läßt sich jedoch die Schlußfolgerung ziehen, daß die Linearität zwischen Kraft und Auslenkung ein deutlicher Hinweis auf ein harmonisches Fallenpotential ist, welches durch das Hooksche Gesetz beschrieben werden kann.

Unter der Voraussetzung eines harmonischen Potentials kann das Rauschspektrum und die damit verbundene Eckfrequenz angewendet werden, um ebenfalls die Kraftkonstante zu bestimmen (siehe Kapitel 1.2). Das Anpassen von Gleichung (1.8) an das Rauschspektrum ergibt die Eckfrequenz, und mit Hilfe von Gleichung (1.9) und  $\gamma = 6\pi\eta r$  kann die Kraftkonstante exakt bestimmt werden.

Mit dem 6-fach Beamexpander, bei einer Leistung von 1000 mW ergibt sich folgendes Rauschspektrum:



**Abbildung 37:** Das Rauschspektrum eines gefangenen Kugelchens (gemessen wird die x-Komponente des Rauschens, siehe auch Abbildung 41). Durch Anpassen der Lorentzgleichung (rot) kann die Eckfrequenz ( $f_c = 1292$  Hz) ermittelt werden. Der etwas stärkere Abfall der Rauschamplitude ab 2 kHz ist zurückzuführen auf die einsetzende Wirkung des Tiefpaßfilters.

Die so ermittelte Kraftkonstante kommt mit  $243,5 \pm 3,0$  pN/ $\mu\text{m}$  den  $245$  pN/ $\mu\text{m}$  aus der Messung der Auslenkung erstaunlich nahe.

Beide Methoden wurden auch zur Bestimmung der Kraftkonstanten bei geringeren Leistungen herangezogen. Bei 400 mW beträgt die Kraftkonstante etwa 125 pN/ $\mu\text{m}$ .

Eine leichte Nichtlinearität zwischen der Laserleistung und der Kraftkonstante hat ihre Ursache vor allem in einer schwachen Verformung des Gaußschen Strahlprofils des Lasers, das vor allem ab mittleren Leistungen sichtbar wurde. Hierbei wurde das rotations-symmetrische Profil leicht ellipsenförmig, was im Endeffekt zu einer etwas stärkeren Überfüllung der Apertur des Objektivs führte. Dies machte sich beim 10-fach Beamexpander wesentlich deutlich stärker bemerkbar, als beim 6-fach Beamexpander, wie auch die Messungen der maximalen Haltekraft (Abbildung 34) zeigten.

Das Gros der Messungen wurde bei 1000 mW durchgeführt; Messungen, bei denen keine hohe Haltekraft, statt dessen aber eine höhere Kraftauflösung benötigt wird, wurden häufig bei 400 mW durchgeführt.

Fast alle Messungen mit dem 10-fach Beamexpander (die sind vor allem die Messungen, welche die dsDNA bindenden Liganden betreffen) wurden bei 600 mW durchgeführt. Hierbei ergab sich eine maximale Haltekraft von etwa 105 pN und eine Kraftkonstante von 88 pN/ $\mu\text{m}$  [Sischka 2005].

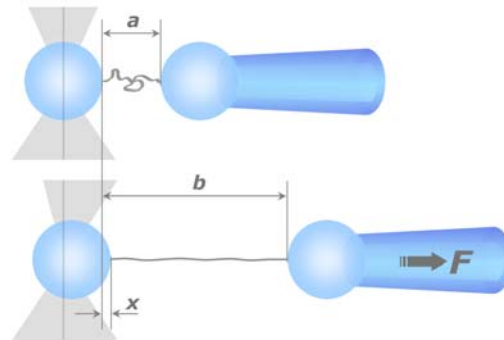
### 2.3 Operationsmoden der Optischen Pinzette

Die Optische Pinzette wird komplett über LabView™ ("National Instruments Inc.") gesteuert. Hierbei werden die Daten des Piezotisches (die momentane x, y und z-Position) und die  $\Delta x$ - und  $\Delta y$ - Spannungssignale des Detektors eingelesen und in eine Kraft umgerechnet. Zudem werden die Daten für die Geschwindigkeiten des Piezotisches, und die Positionen, an die er fahren soll, an den Controller gesandt. Weiterhin beinhaltet das Programm die einmalige Aktivierung des Servo-Loops des Piezos, der dafür sorgt, daß der Piezotisch die einmal angefahrne x,y,z-Position auch beibehält.

Die Spannungssignale des Detektors können in Blöcken eingelesen werden. Die Datenrate beträgt hierbei 388000 Daten pro Sekunden. Durch arithmetisches Mitteln von 1000 bis 100000 Datenpunkten kann zum einen das statistische Rauschen von Laser, Detektor und Elektronik hervorragend unterdrückt, und zum anderen auch die Brownsche Bewegung des gefangenen Objektes (so diese nicht Gegenstand der Untersuchung ist) zu einem gewissen Grade gemittelt werden, was in der Folge zu einer erhöhte Kraftauflösung der Optischen Pinzette führt.

Vor allem das Einlesen der Daten des Detektors bestimmt die Zeit, in der das Programm typischerweise einen kompletten Durchlauf vollführt (dieser dauert maximal 360 ms). Das Senden um Empfangen von Daten zum und vom Controller, sowie der Regelkreis für den Laser nehmen ebenfalls Rechenzeit in Anspruch (etwa 20 ms). Die Spannung, die die Stellgröße des Regelkreises darstellt, wird über die gleiche GPIB-Karte (siehe Kapitel 2.1) ausgegeben, über die auch die Detektordaten eingelesen werden.

Ein einfacher, aber entscheidender Teil des Programms ist die Längenkorrektur, basierend auf der Kraftkonstanten der Optischen Falle. Bei allen DNA-Messungen muß nicht nur die Kraft, sondern auch die dazugehörige End-End-Distanz des Polymers exakt bestimmt werden. Da bei einer externen Kraft  $F$  jedoch auch das Kügelchen ein wenig aus der Falle ausgelenkt wird, muß der vom Piezotisch angegebene Positionswert um  $x = F / k$  reduziert werden (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Die End-End-Distanz eines Polymers soll bestimmt werden, das zwischen zwei Kügelchen immobilisiert ist und auf das keine äußere Kraft wirkt. Da die Position des Kügelchens an der Pipette relativ zum Kügelchen in der Falle über den Positionswert  $a$  des Piezotisches exakt bestimmt werden kann, ist auch die End-End-Distanz bekannt. Wirkt hingegen eine äußere Kraft  $F$ , so wird das Kügelchen um den Faktor  $x = F/k$  aus der Falle ausgelenkt und die Konturlänge des Polymers entspricht nicht mehr dem Positionswert  $b$ , sondern der Differenz aus  $b$  und der Auslenkung  $x$ .

Der Abstand  $a$  zwischen den beiden Kügelchen kann leicht bestimmt werden, wenn man beispielsweise zu Beginn jedes Experimentes sich die Kügelchen gerade berühren läßt, und den Abstand  $a$  über den momentanen Positionswert des Piezotisches auf null eicht.

Auf drei verschiedenen Weisen können Kräfte mit der Optischen Pinzette gemessen werden:

Die Standardmessung der Optischen Pinzette sieht vor, daß zu jedem Längenwert  $L$  mit  $L = b - F/k$  die dazugehörige Kraft gemessen wird. Daraufhin vergrößert der Piezotisch den Abstand  $b$  um einen kleinen Schritt  $\Delta b$  mit  $\Delta b \ll b$ , und nachfolgend werden wiederum Länge und dazugehörige Kraft gemessen. Aus der Zeit, die jeweils für einen solchen Zyklus benötigt wird, und der dazugehörigen Schrittweite kann die wahre Geschwindigkeit bestimmt werden, mit der das Polymer in die Länge gezogen wird. Noch während der Messung werden die Wertepaare in eine Datei geschrieben.

Die Messung stoppt, wenn entweder eine vordefinierte Kraft oder eine vordefinierte Länge erreicht worden ist. Alternativ dazu kann die Schrittweite bei einer gewünschten Länge oder Kraft auf null gesetzt werden, die Messung wird also fortgesetzt, die Länge bleibt jedoch konstant. Oder die Meßrichtung wird umgekehrt und die Länge nimmt wieder ab.

Bei der Kraftspektroskopie wird eine Meßmethode verwandt, bei der zunächst die Kügelchen einen gewissen Abstand voneinander haben. Daraufhin läßt man sie sich

annähern, bis sie sich berühren. Auf Wunsch kann auch ein Anpreßdruck vordefiniert werden. Ist dieser erreicht, kann ebenfalls noch eine Wartezeit eingelegt werden. Es wird eine Geschwindigkeit  $v$  definiert, mit der die beiden Kügelchen sich voneinander entfernen sollen, wobei zeitgleich auch die Kraftmessung beginnt. Hat sich zwischen den beiden Kügelchen (bzw. zwischen dem Liganden auf dem einen, und dem Rezeptor auf dem anderen Kügelchen) eine molekulare Bindung ausgebildet, so wird das Kügelchen in der Falle zwar ausgelenkt, entscheidend ist jedoch einzig und allein die Kraft und die loading rate, die sich entweder aus der Kraftkonstanten und der Geschwindigkeit (siehe Kapitel 1.8) oder aus dem zeitlichen Anstieg der Kraftkurve bestimmen läßt.

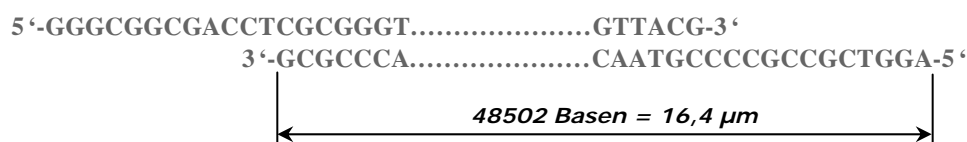
Die Bestimmung der loading rate aus der Kraftkurve ist dann sinnvoll, wenn Kraftmessungen an einer elastischen Oberfläche (beispielsweise an einer Zelle) stattfinden. Die effektive Kraftkonstante kann aus dem Anstieg der Kraftkurve (siehe Kapitel 1.8) bestimmt werden. Mit Hilfe der bekannten Kraftkonstante der Optischen Falle kann daraufhin die "Federkonstante" des Untergrundes ermittelt werden.

Die dritte Meßmethode ist die Force Clamp Messung. Hierbei wird zunächst eine gewünschte Haltekraft  $F$  vordefiniert. Die Länge  $L$  wird daraufhin so lange variiert, bis die gewünschte Kraft erreicht ist. Die Kraft wird ständig konstant gehalten, indem die Länge  $L$  nachgeregelt wird. Interessant ist diese Methode bei Systemen, die ihre mechanischen Eigenschaften im Laufe der Zeit verändern bzw. ein "plastisches" Verhalten zeigen. Dies sind beispielsweise Systeme in einem Nicht-Gleichgewichtszustand (siehe Kapitel 1.5), wie im Falle einer komplett überstreckten dsDNA oder während der Hysterese bei der Relaxierung.

## 2.4 Probenpräparation

### 2.4.1 Lambda-DNA

Die Lambda-Phagen DNA (#D1501 von "Promega Corp."), die 48502 bp besitzt, liegt in Form eines geschlossenen Ringes (Plasmid) vor. 10,24  $\mu$ l der 16 nM DNA Stammlösung werden für fünf Minuten auf 50°C erhitzt. Dabei bricht das Plasmid auf, und es entsteht eine lineare dsDNA (16,4  $\mu$ m Konturlänge) mit 12 einzelnen Basen an beiden Enden:



**Abbildung 39:** Die linearisierte Lambda-DNA besitzt an beiden komplementären 5'-Enden je 12 überstehende Basen ("sticky ends").

Die überstehenden Enden werden nun mit den fehlenden Nukleotiden aufgefüllt. Am Cytosin hingegen ist ein Biotinmolekül kovalent gebunden. Dazu werden 12,5 µl der 0,4 nM Biotin-14-dCTP Lösung (Biotin-14-Desoxycytidintriphosphat von "Gibco BRL - Invitrogen Corp.", das in 100 mM Tris/HCl und 0,1 mM EDTA gelöst ist), sowie je 0,21 µl an 100 mM dATP, dGTP und dTTP ("Amersham Biosciences Ltd.") hinzugegeben. Das biochemische Ankoppeln aller Nukleotide vom 3' Ende beginnend übernimmt eine DNA-Polymerase (Klenow-exo<sup>-</sup> Fragment von "New England Biolabs Inc."). 202 µl der Klenow-Lösung werden ebenfalls hinzugegeben. Sie enthält 180 µl Wasser, 20 µl Puffer (10 mM Tris/HCl, 5 mg MgCl<sub>2</sub> und 7,5 mM Dithiothreitol) und 2 µl Klenow-Fragment (~ 200 units).

Die Lösung wird daraufhin für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Klenow-Polymerase verknüpft an beiden Enden der DNA die 12 freistehenden Nukleotide ausgehend vom 3'-Ende mit ihren jeweiligen Partnern. Am Schluß dieses Prozesses befinden sich am linken 3'-Ende der DNA sechs, und am rechten 3'-Ende vier Biotinmoleküle (vergleiche auch Abbildung 39) - die DNA ist biotinyliert. Über diese Biotinmoleküle kann die DNA später an ein streptavidinbeschichtetes Kügelchen immobilisiert werden.

Danach wird die Lösung fünf Mal mit je 450 µl Standardpuffer verdünnt und durch einen Cellulosefilter mit 1000·g zentrifugiert. Dieser Filter (YM 50 von "Amicon Microcon - Millipore Corp.") hält Moleküle mit einer molaren Masse von mehr als 50000 g/mol (und somit nur die biotinylierte Lambda-DNA) zurück.

Nach dem Zentrifugieren wird die DNA im Standardpuffer (der zuvor entgast, und mit 0,22 µm Filtern ("Qualilab") gereinigt wurde) verdünnt und als 15 pM biotinylierte Lambda-DNA Stammlösung bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.4.2 Polypeptid und Tyrosin-Kinase

Das biotinylierte Polypeptid "Ppep-1" ("Eurogentec") ist Teil der intrazellularen Signaleinheit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (siehe Kapitel 1.7.2). Das Peptid besteht aus 12 Aminosäuren, deren Molmasse je etwa 130 g/mol betragen. Die zwei Tyrosinreste sind bereits phosphoryliert und können somit an die SH2 Domänen der Tyrosin-Kinase syk binden.

Ppep-1 wird in zehnfachem Überschuß (3 pmol) in 1 µl der Stammlösung der Streptavidinkügelchen (siehe Kapitel 2.2) gegeben und die Lösung mindestens eine Stunde bei 6°C inkubiert. Dabei binden Biotinmoleküle an Streptavidin. Daraufhin wird die Suspension mit 1 ml Standardpuffer verdünnt, und bei 1000·g abzentrifugiert. Der Überstand des Puffers und der noch freien Ppep-1-Moleküle wird abpipettiert und die Kügelchen resuspendiert. Ein

solches mit Ppep-1 beschichtetes Kügelchen wird zu Beginn des Kraftspektroskopieexperimentes an der Pipettenspitze festgesaugt.

Die Tyrosin-Kinase syk humanem Ursprungs wurde in der Biochemie I der Universität Bielefeld aufgereinigt [Wienands 1995] und kovalent mit Glutathion-S-Transferase (GST) verknüpft. Syk besitzt eine Molmasse von 27000 g/mol, und GST 26000 g/mol. Um syk-GST an ein zweites Kügelchen zu knüpfen, wurden Kügelchen (Durchmesser 6,7 µm) verwendet, auf deren Oberfläche bereits Glutathion (307,3 g/mol) immobilisiert wurde (GSHP-60-5 von "Spherotech").

Syk-GST wird ebenfalls in zehnfachem Überschuß (3 pmol) in 1 µl der Stammlösung der Glutathionkügelchen gegeben und die Lösung mindestens eine Stunde bei 6°C inkubiert. Hierbei bindet das GST nicht-kovalent an das Glutathion. Die hieraus erhaltene Suspension wird mit 1 ml Standardpuffer verdünnt, und bei 1000·g abzentrifugiert. Der Überstand des Puffers und der noch freien syk-GST Moleküle wird abpipettiert und die Kügelchen resuspendiert. Ein mit syk immobilisiertes Kügelchen im Standardpuffer wird zu Beginn der Messung in der Optischen Falle gefangen.

### 2.4.3 Anti-IgM und DT-40 B-Zellen

Das biotinylierte Maus-Anti-Hühnchen-IgM (ein M-4 Klon von "Southern Biotech") wurde in fünffachem Überschuß (1,5 pmol) in 1 µl der Stammlösung der Streptavidinkügelchen gegeben, und mindestens drei Stunden inkubiert. Danach wird die Suspension mit 1 ml PBS-Puffer (136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit pH 7,4) verdünnt und mit 1000·g abzentrifugiert. Der Puffer und die noch freien IgMs werden abpipettiert und die Kügelchen resuspendiert.

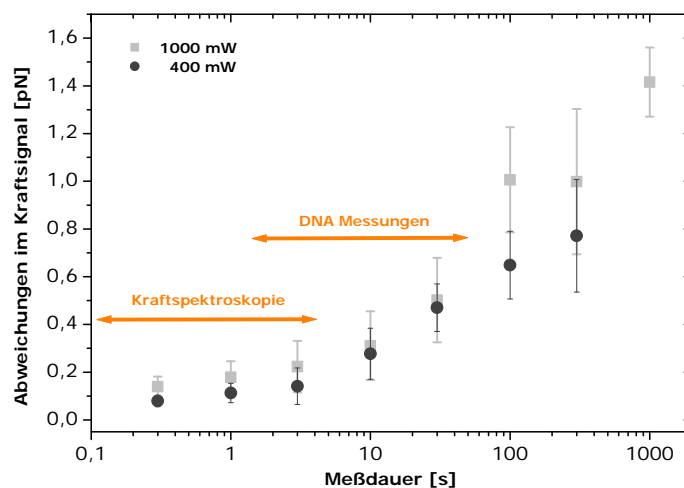
Das so immobilisierte Anti-IgM befindet sich als Pentamer auf der Oberfläche der Kügelchen [Grabbe 2004].

Die Hühnchen-B-Zellen der Zelllinie DT-40 [Sayegh 2000] exprimieren membranständige IgMs, als Folge der Reaktion auf ein Antigen - in diesem Falle das Maus-Anti-Hühnchen-IgM. Die Zellen wurden in "RPMI-1640" Nährlösung [Niiri 2002] bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Lösung wurde angereichert mit 10% hitze-inaktiviertem Kälberserum, 1% hitze-inaktiviertem Hühnchenserum, 10 Einheiten/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

Vor dem Experiment wurden die lebenden B-Zellen bis zu dreimal im PBS-Puffer gewaschen, bei etwa 100·g zentrifugiert und wieder resuspendiert.

### 3 Ergebnisse und Auswertung

Der erste Test des neuen Aufbaus der Optischen Pinzette bestand darin, das Kraftsignal eines gefangenen Kügelchens (Durchmesser  $3,18 \mu\text{m}$ ) über einen langen Zeitraum aufzuzeichnen. Schwankungen im Kraftsignal auf kleinen wie großen Zeitskalen wurden untersucht, um Aussagen über die absolute Kraftauflösung zu treffen. Alle Kraftwerte eines Zeitpunktes  $t_0$  wurden mit Kraftwerten des Zeitpunktes  $t_0 + \Delta t$  verglichen. Die Zeitspanne  $\Delta t$  wurde daraufhin als "Meßzeit" definiert. Leichteste Instabilitäten im mechanischen Aufbau, Schwankungen im Strahlprofil des Lasers und mechanische Driften infolge thermischer Ausdehnung der Meßapparatur lassen die Schwankungen im Kraftsignal im Laufe der Zeit anwachsen. Die Kraftauflösung ist dennoch auf Zeitskalen, die einer realistischen Meßzeit entsprechen deutlich geringer, als beim alten Setup der Optischen Pinzette mit 10-fach Beamexpander und ohne Regelkreis.



**Abbildung 40:** Die absolute Kraftauflösung des neuen Setups der Optischen Pinzette in Abhängigkeit der Meßdauer bei 1000 und 400 mW. Typische Meßdauern bei der Kraftspektroskopie liegen im Bereich vom Bruchteil einer Sekunde bis zu etwa 5 Sekunden, während Kraftmessungen an DNA unter Umständen bis zu einer Minute dauern können.

Die Kraftauflösung ist selbst bei maximaler Leistung während einer Minute selten schlechter als  $0,5 \text{ pN}$ . Hieraus ergibt sich ein Signal/Rausch-Verhältnis (SNR) der Optischen Pinzette von etwa 300 bei 400 mW und ein SNR von mehr als 700 bei voller Leistung. Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse (vor allem Kapitel 3.2, 3.5 und 3.6) wurde mit dem alten Setup gewonnen, bei dem das SNR nur etwa 200 (bei einer Leistung von 600 mW) betrug.

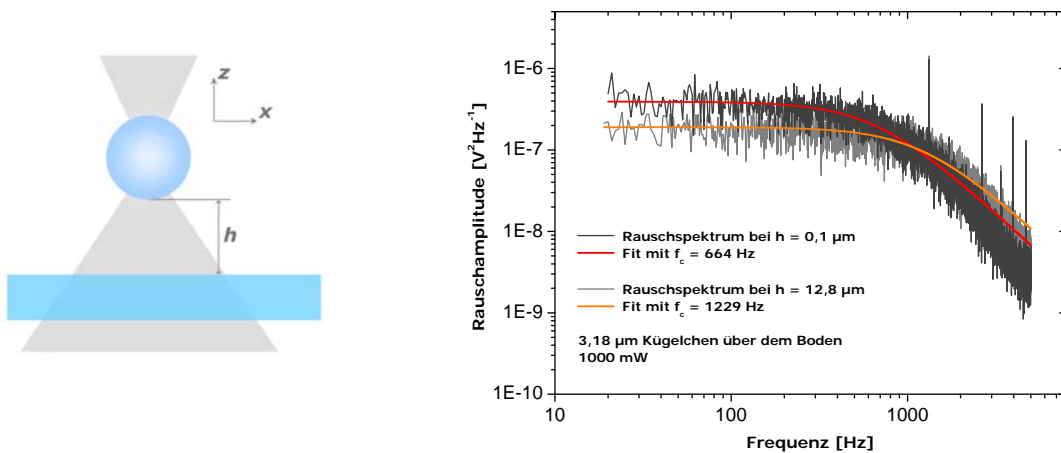


### 3.1 Teilchen im Photonischen Potential

Im Kapitel 1.2 wurde bereits die Brownsche Bewegung eines in der Optischen Falle gefangenen Objektes beschrieben. Strenggenommen gilt die daraus resultierende Gleichung (1.8) aber nur für den Fall einer unendlich ausgedehnten, homogenen Flüssigkeit. In der Realität besteht die Probenkammer nur aus einem schmalen Kanal, der gut 0,25 mm hoch ist. Eine räumlich begrenzte Flüssigkeit bewirkt jedoch eine zunehmende Veränderung in der Diffusionskonstante  $D$ , je mehr man sich dieser Grenze annähert [Pralle 1998]. Ein Kügelchen mit dem Radius  $r$ , welches sich von oben herab dem Boden der Flüssigkeitszelle nähert, wobei die Höhe  $h$  der Abstand vom Boden zur Unterseite des Kügelchens ist, würde die Veränderung der Diffusionskonstante "spüren". Die Diffusionskonstante nimmt dabei folgendermaßen ab [Happel 1965]:

$$\frac{D(h)}{D(h = \infty)} = 1 - \frac{9}{16} \left( \frac{r}{r+h} \right) + \frac{1}{8} \left( \frac{r}{r+h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left( \frac{r}{r+h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left( \frac{r}{r+h} \right)^5 \quad (3.1)$$

Der Stokessche Reibungskoeffizient und somit auch die Stokessche Reibungskraft nehmen ihrerseits analog zu Gleichung (3.1) bei Annäherung an den Boden zu (Faxensches Gesetz [Svoboda 1994]) - und umgekehrt proportional verhält sich die Eckfrequenz (siehe Gleichung (1.9) und (3.2)).

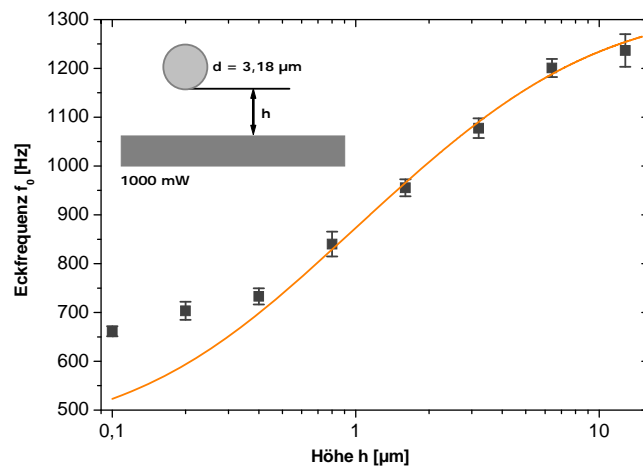


**Abbildung 41:** Ein Kügelchen befindet sich im Abstand  $h$  über dem Boden der Flüssigkeitszelle. Das Rauschspektrum (gemessen wird immer die  $x$ -Komponente des Rauschens) verändert sich dahingehend, daß mit abnehmender Höhe die Eckfrequenz ebenfalls geringer wird.

Im folgenden Diagramm wurden für die verschiedenen Höhen die entsprechenden Eckfrequenzen aufgetragen, und dies mit der Gleichung

$$\frac{f_c(h)}{f_c(h=\infty)} = 1 - \frac{9}{16} \left( \frac{r}{r+h} \right) + \frac{1}{8} \left( \frac{r}{r+h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left( \frac{r}{r+h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left( \frac{r}{r+h} \right)^5 \quad (3.2)$$

angepaßt:



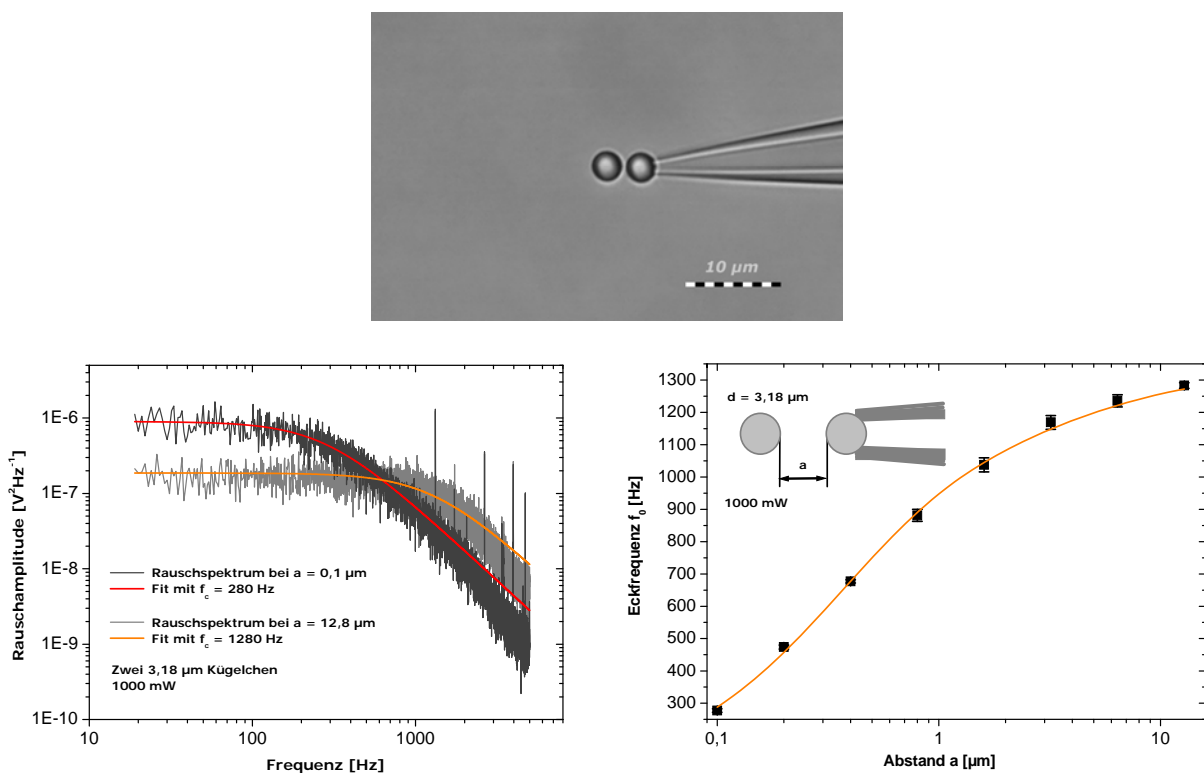
**Abbildung 42:** Die Eckfrequenzen in Abhängigkeit von der Höhe  $h$  über dem Boden der Flüssigkeitszelle. Der Graph entspricht Gleichung (3.2) mit  $f_c(h=\infty) = 1337$  Hz. Die Frequenzen bei  $h = 0,1$  und  $0,2 \mu\text{m}$  wurden vom Fit ausgeschlossen.

Die Gleichung (3.2) läßt sich bis auf sehr kleine Abstände ( $< 0,4 \mu\text{m}$ ) sehr gut bestätigen. Die Abweichungen der Eckfrequenzen bei kleinen Abständen lassen sich sicherlich nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Glasoberfläche und dem mit Streptavidin beschichteten Kugelchen erklären - diese würden zudem eine dämpfende Wirkung hervorrufen, und die Eckfrequenz weiter absenken. Statt dessen könnten, wie auch schon in Kapitel 2.2 angemerkt, Beugungs- und Interferenzeffekte des fokussierten Lasers zwischen dem Boden und dem Kugelchen einen Einfluß auf die Kraftkonstante der Optischen Falle (und deshalb mittelbar auf die Eckfrequenz) haben. Weiterhin muß bedacht werden, daß zwar die Höhe mit Hilfe des Piezotisches sehr exakt angefahren werden kann, jedoch wurde im Videobild das Berühren der Oberfläche vom Kugelchen als eine Veränderung der Schärfe des Kugelchens wahrgenommen, was naturgemäß mit einer leichten Unsicherheit behaftet ist. Eine schwache Drift des Objektivs muß ebenfalls berücksichtigt werden, da dieses bei der Fokussierung mittels eines Getriebes auf- und abgefahren wird.

Die Frage bleibt noch zu klären, warum in Abbildung 37 die Eckfrequenz nicht 1337 Hz betragen hat. Das Kügelchen befand sich bei jener Messung in der Mitte der Flüssigkeitszelle, etwa  $120\ \mu\text{m}$  vom Boden und von der Decke entfernt. Bei dieser Entfernung ist laut Gleichung (3.2) die Eckfrequenz noch 99,26 % von  $f_c(h = \infty)$ . Gleichzeitig muß noch der Effekt der Decke der Flüssigkeitszelle berücksichtigt werden - nochmals 99,26 %. Somit ergibt sich immerhin eine Eckfrequenz von 1317 Hz, anstatt der gemessenen 1292 Hz.

Es wäre zwar sehr leicht, die schwache Abweichung von 1,9 % zwischen dem errechneten und dem gemessenen Wert durch Meßfehler zu erklären, aber ein anderer Effekt spielt eine nicht unerhebliche Rolle. Bei der Messung der Eckfrequenz in der Mitte der Flüssigkeitszelle befand sich auf gleicher Höhe, aber ebenfalls etwa  $100\ \mu\text{m}$  rechts davon die Pipettenspitze. Es lag daher nahe, den Effekt eines Objektes zu untersuchen, daß sich nicht unter- oder oberhalb des Kügelchens, sondern seitlich davon befand.

Hierzu wurde dem Kügelchen in der Falle ein gleiches Kügelchen seitlich angenähert, und wiederum die Eckfrequenzen in Abhängigkeit des Abstandes  $a$  gemessen.



**Abbildung 43:** Oben: Videobild des Versuches. Links: Die Eckfrequenzen in Abhängigkeit des Abstandes  $a$  zu einem zweiten, gleich großen Kügelchen. Im rechten Diagramm wurde die empirische Gleichung (3.3) angepaßt.

Der Abfall der Eckfrequenz mit abnehmendem Abstand ist wesentlich stärker, als von Gleichung (3.2) vorhergesagt. Es gibt daher einen Effekt, der eine Richtungsabhängigkeit der Diffusionskonstanten, und im selben Maße ein Richtungsabhängigkeit der lokalen Viskosität hervorruft.

Gleichung (3.2) kann daher zunächst empirisch an die gewonnenen Meßdaten angepaßt werden, denn die für Abbildung 43 nötige Messung des Abstandes ist wesentlich präziser und weniger störanfällig, als die Messung der Höhe über dem Boden der Flüssigkeitszelle:

$$\frac{f_c(a)}{f_c(a = \infty)} = 1 - \frac{7}{16} \left( \frac{r}{r+h} \right) + \frac{9}{32} \left( \frac{r}{r+h} \right)^3 - \frac{3}{10} \left( \frac{r}{r+h} \right)^4 - \frac{1}{2} \left( \frac{r}{r+h} \right)^5, \quad (3.3)$$

mit  $f_c(h = \infty) = 1337$  Hz.

Die Methode der Bestimmung der Eckfrequenz in Abhängigkeit des Abstandes zu einer "Grenzfläche", die sich seitlich vom Kügelchen befindet kann daher als hochempfindlicher Abstandssensor genutzt werden.

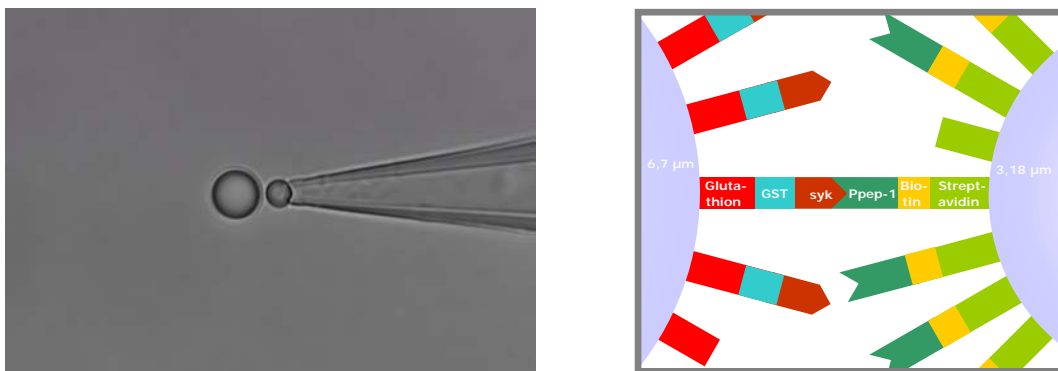
Lokale Viskositätsänderungen können ebenfalls auf diese Weise detektiert werden. Beispielsweise könnte ein Kügelchen an der Pipettenspitze, auf dessen Oberfläche länger-kettige Polymere, oder geladene Molekülgruppen immobilisiert wurden, die lokalviskosen Eigenschaften in seiner unmittelbaren Umgebung verändern. Dies würde zu einer Modifizierung von Gleichung (3.3) führen.

Eine hochinteressante Methode sollte auch die Untersuchung von Suspensionen mit sich führen. Erste Versuche mit nichtadhärenten Kolloiden (monodisperse, polymere Dispersionsteilchen; Lutensol TO8 von "BASF"), die einen Durchmesser von etwa 200 nm und eine Konzentration von etwa 0,2...2 Kolloiden pro  $\mu\text{m}^3$  haben, zeigten folgendes: Beim Einschalten des Lasers füllte sich das gesamte Volumen, welches die Optische Falle ausfüllt, mit diesen Kolloiden ( $\sim 10$  an der Zahl). Nach dem Abschalten des Lasers drifteten alle Teilchen infolge der Brownschen Bewegung wieder voneinander weg. Man könnte nun zum einen das Rauschspektrum dieses Pulks von nichtadhärenten Kolloiden aufzeichnen. Modifikationen der Kolloidoberfläche, die in der Folge beispielsweise zu einer gewissen Adhäsion der Kolloide aneinander führen, würden zu einem zeitlich veränderten Rauschspektrum führen, da die Kolloide in der Falle im Laufe der Zeit mehr und mehr verklumpen. Zudem kann auch die Zeitkonstante dieses Prozesses ermittelt werden. Dies könnte als erster Schritt (in dessen Zuge auch die Stärke der Optischen Falle und die Konzentration der Kolloide in der Falle gezielt variiert werden muß) in Richtung der Bestimmung einer On-Rate für molekulare Bindungen angesehen werden.

## 3.2 Kraftspektroskopie

### 3.2.1 Peptid-Kinase Wechselwirkung

Bei diesem ersten Experiment im Bereich der Kraftspektroskopie wurden zunächst die Stammlösungen der beiden Kügelchen, auf denen zum einen das Ppep-1 und zum anderen die Kinase syk immobilisiert wurde, stark mit PBS-Puffer verdünnt, und gemeinsam in die Flüssigkeitszelle eingeleitet. Zuerst wurde das Ppep-1 Kügelchen in der Falle gefangen und an der Pipette festgesaugt. Das zweite, mit syk beschichtete Kügelchen verblieb in der Optischen Falle. Daraufhin wurde die Flüssigkeitszelle mit PBS-Puffer gespült.

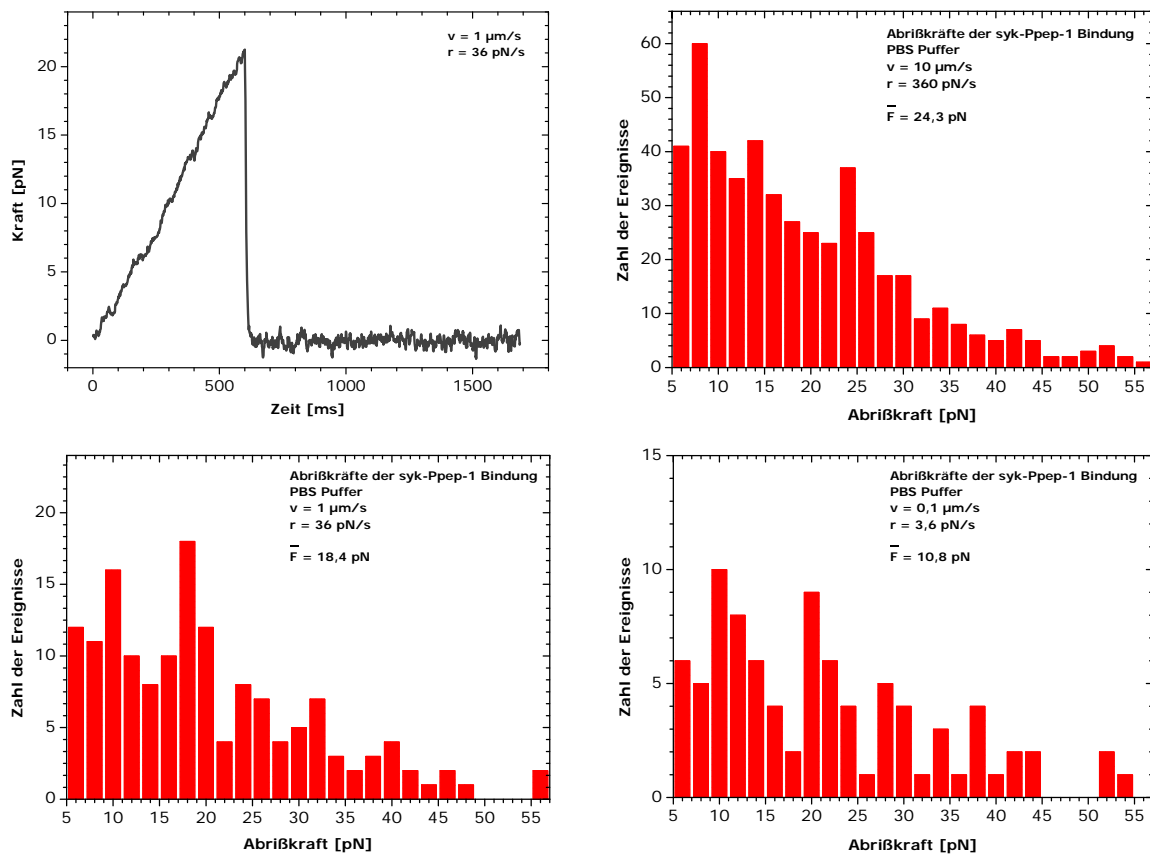


**Abbildung 44:** Videobild des Experimentes. Rechts: "Schlüssel-Schloß Prinzip" der Bindung zwischen dem auf den Kügelchen durch die GST-Glutathionbindung immobilisierten syk und dem am Streptavidin immobilisierten, biotinylierten und phosphorylierten Polypeptid.

Die beiden Kügelchen wurden einander angenähert, bis sich diese berühren, und einen Anpreßdruck von etwa 3 bis 4 pN aufeinander ausübten. Daraufhin wurde die Richtung automatisch umgekehrt, und mit einer vordefinierten Geschwindigkeit von 0,1, 1 und 10 µm/s entfernen sich die Kügelchen voneinander.

In etwa einem von vier Fällen bildete sich eine Bindung zwischen den zwei Kügelchen aus, die infolge der stetig zunehmenden Kraft riß, und eine charakteristische  $F(t)$ -Abrißkurve, so wie in Abbildung 45 oben links hervorrief. Für jede Geschwindigkeit wurden mehrere hundert Abrißkurven ausgewertet und in einem Histogramm dargestellt.

In den  $F(t)$ -Kraftkurven der drei Geschwindigkeiten unterschieden sich zwar die Steigungen (und somit auch die loading rates) jeweils um den Faktor zehn, die daraus errechneten  $F(d)$ -Kurven ( $d$  = Abstand der Kügelchen) lagen im Bereich des linearen Kraftanstieges wie erwartet genau aufeinander. Dies bedeutet, daß  $k_{\text{eff}}$  bei allen drei Messungen identisch war. Die wahrscheinlichen Abrißkräfte ließen sich mit der Theorie von Evans und Ritchie [Evans 1997] somit beschreiben.

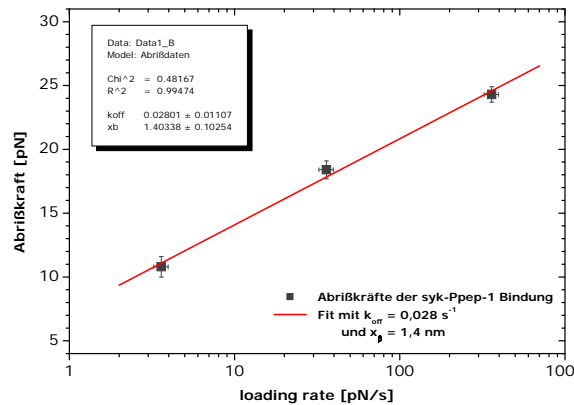


**Abbildung 45:** Oben links: Eine typische Kraftkurve, die das Dissoziieren einer Bindung zwischen den beiden Kügelchen darstellt. Drei Histogramme für die drei Geschwindigkeiten zeigen neben dem "Untergrundrauschen", bestehend aus unspezifischen Bindungen, auch teilweise die spezifische Bindung des syk an das Ppep-1.

Der "Untergrund" im Histogramm besteht eben unspezifischen Bindungen der Oberflächen der Kügelchen aus Wechselwirkungen zwischen syk oder Ppep-1 und der Oberfläche des jeweils anderen Kügelchens. Die Vielzahl der unspezifischen Bindungen resultiert aus der großen Kontaktoberfläche der beiden Kügelchen, die riesig im Vergleich zur Größe eines syk- oder Ppep-1-Moleküls ist. Die unspezifischen Bindungen unterhalb von 5 pN, sowie negative Bindungsereignisse wurden im Histogramm nicht berücksichtigt.

Die spezifischen Bindungen des syk an das Ppep-1 ragen als relativ gut identifizierbare Peaks hervor. Bei  $0,1 \mu\text{m/s}$  war es zunächst schwierig, den entscheidenden Peak zu bestimmen. Da jedoch nach [Evans 1997] die wahrscheinlichste Abrißkraft mit geringerer loading rate  $r$  ebenfalls sinken muß (infolge der Ratenabhängigkeit der Abrißkraft), konnte nur der Peak um  $10,8 \text{ pN}$  derjenige der spezifische Wechselwirkung sein. Vermutlich resultiert der Peak bei etwa  $20,5 \text{ pN}$  aus der Dissoziation der vergleichsweise stärkeren Bindung des GST an das Glutathion.

Im Kraft/loading rate-Diagramm sollten bei logarithmischer Auftragung nach [Evans 1997] die Wertepaare auf einer Geraden liegen, wie es Gleichung (1.18) vorschreibt.



**Abbildung 46:** Die Ratenabhängigkeit der wahrscheinlichsten Abrißkraft der syk-Ppep-1-Bindung. Aus der Steigung der Geraden und dem Schnittpunkt mit der Abszisse lassen sich die charakteristische Reaktionslänge, sowie die Off-Rate bestimmen.

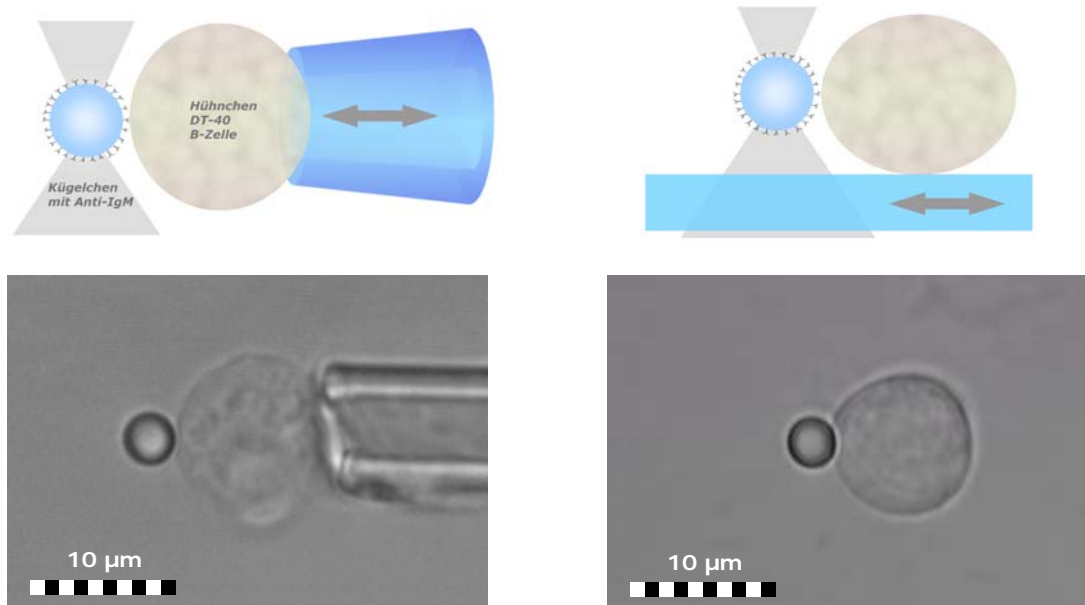
Hieraus ergibt sich  $k_{\text{off}} = 0,028 \text{ s}^{-1}$ , was einer mittleren Lebensdauer des syk-Ppep-1-Komplexes von  $\tau = 36 \text{ s}$  entspricht. Da keine vergleichbaren kraftspektroskopischen Messungen der Kinase syk bekannt sind, fällt ein Vergleich der mittleren Lebensdauer bzw. der charakteristischen Reaktionslänge schwer. Die Reaktionslänge liegt mit ihren  $1,4 \text{ nm}$  jedoch beispielsweise über denen von Protein-DNA Komplexen mit  $x_{\beta} = 0,75 \text{ nm}$  (bei loading rates von weniger als  $11000 \text{ nm/s}$ ) [Bartels 2005], oder etwa den typischen Reaktionslängen der Antigen-Antikörper Wechselwirkung mit  $x_{\beta} \approx 0,4 \text{ nm}$  [Schwesinger 1997].

### 3.2.2 IgM-Anti-IgM Wechselwirkung auf lebenden B-Zellen

Um die Bindung des Maus-Anti-Hühnchen-IgMs (Anti-IgM) an ein membranständiges IgM auf einer DT-40 Hühnchen B-Zelle zu untersuchen, wurde zunächst eine lebende B-Zelle in PBS-Puffer gefangen und an der etwa  $6 \mu\text{m}$  großen Spitze einer Mikropipette festgesaugt. Es hatte sich herausgestellt, daß die optimale Andruckkraft bei etwa  $5 \text{ pN}$  liegen mußte, um das Ausbilden einer IgM-Anti-IgM-Bindung zu erhalten, und gleichzeitig zu verhindern, daß sich zu viele unspezifische Bindungen zwischen dem Kügelchen und der B-Zelle bildeten.

Nach dem Umkehren der Bewegungsrichtung wurden Kügelchen und B-Zelle mit  $1000 \text{ nm/s}$  voneinander getrennt. Die loading rate betrug bei allen Messungen  $45 \pm 5 \text{ pN/s}$  (der Wert wurde, wie im Unterkapitel zuvor, aus den Kraftkurven ermittelt), was bedeutete,

daß die Größe der B-Zelle, die zwischen 8 und 20  $\mu\text{m}$  schwankte, kaum einen Einfluß auf die effektive Federkonstante hatte.



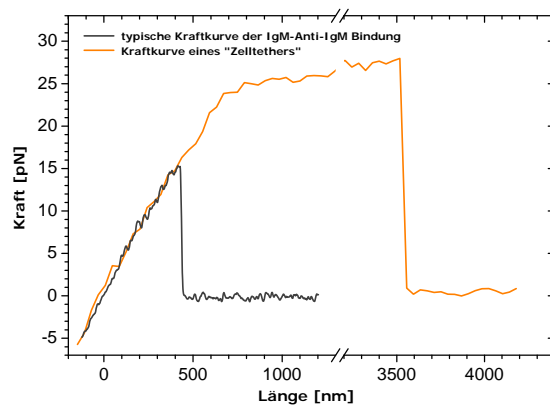
**Abbildung 47:** Links: Eine B-Zelle wird an der Pipette festgesaugt, kann an das Kügelchen herangefahren und wieder von ihm entfernt werden. Rechts: Dasselbe Prinzip bei einer auf dem Boden der Flüssigkeitszelle fest adhären B-Zelle.

Es hat sich herausgestellt, daß eine einmal an der Pipette festgesaugte B-Zelle sich kaum davon lösen ließ. Infolge eines zu starken Unterdruckes wurde teilweise sogar die Zelle in die Pipette hineingesaugt. Es war aus diesem Grund vorteilhaft, die Zellen einige Minuten am Boden der Flüssigkeitszelle adhären zu lassen, und die Messungen an diesen Zellen durchzuführen. Ein weiterer Vorteil bestand auch darin, nacheinander beliebig viele Zellen anzusteuern zu können.

In etwa 30 % der Fälle wurden die Kraftkurven durch den sogenannten "Zelltether" beeinflusst [Dai 1999]. Es handelte sich um eine hochviskose Schicht auf der Oberfläche der Zelle, die bei Kontakt am Kügelchen kleben blieb, und beim Entfernen des Kügelchens dünne "Schläuche" bildete, die sich unter einer nahezu konstanten Kraft (die jedoch mit steigender Ziehgeschwindigkeit ebenfalls anstieg) mit ausdehnten.

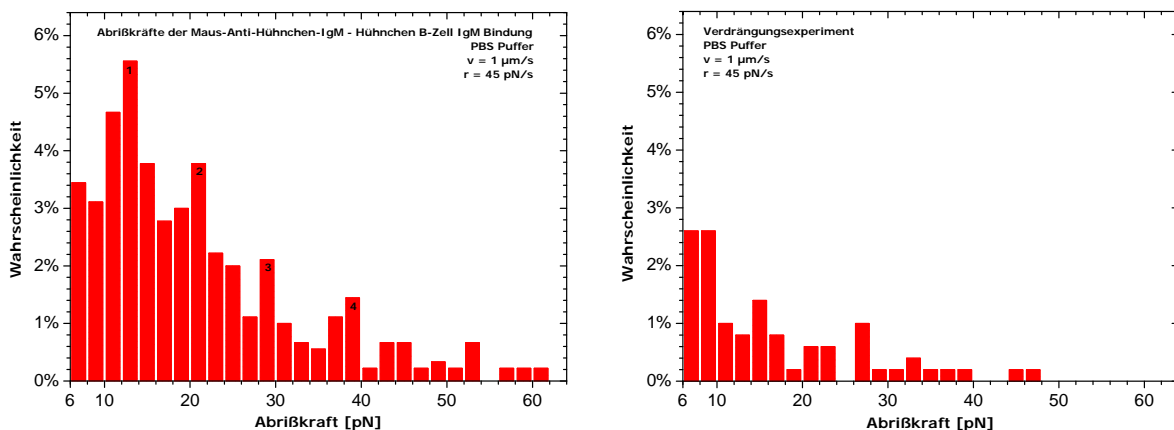
In diesem Fall löste sich das Kügelchen nur ab und zu vom Zelltether, oder es ließen sich an der gleichen Zelle keine sinnvolle Meßergebnisse erhalten.





**Abbildung 48:** Eine typische Kraft/Distanz Kurve, die das Dissoziieren der IgM-Anti-IgM Bindung bei 1000 nm/s zeigt, sowie eine durch den Zelltether negativ beeinflusste Kraftkurve.

Im allgemeinen war es so, daß selbst bei etlichen Messungen an anderen B-Zellen ebenfalls nur selten auswertbaren Abrißereignisse auftraten. Die wenigen erfolgreichen Messungen (etwa 900 an der Zahl) wurden in einem Histogramm ausgewertet.



**Abbildung 49:** Links: Das Histogramm der Abrißkräfte. Peaks bei etwa 12, 21, 29 und 39 pN könnten auf ein Dissoziieren von einer oder einem ganzzahligen Vielfachen einer Bindung hinweisen. Rechts: Das Verdrängungsexperiment, bei dem die IgM auf den B-Zellen mit freien Anti-IgM abgesättigt wurden, bekräftigt die Spezifität der im linken Histogramm gemessenen Abrißkräfte.

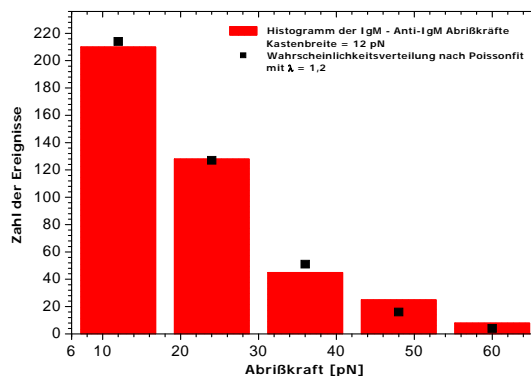
Ein Gaußfit des ersten Peaks ergab eine wahrscheinliche Abrißkraft von  $12,3 \pm 0,3$  pN. Alle weiteren Peaks entstehen durch ein nahezu gleichzeitiges Dissoziieren von einem ganzzahligen Vielfachen einer IgM-Anti-IgM-Bindung. Der Betrag der Abrißkräfte dieser Peaks ist jedoch weniger als das ganzzahlige Vielfache. Wahrscheinlich wirken sich sterische Effekte negativ auf die räumliche Stabilität der Bindungen aus, wenn sich mehr als

eine IgM-Anti-IgM-Bindung zwischen Kügelchen und B-Zelle ausbildet, so daß die benötigte Kraft für eine Dissoziation beider Bindungen geringer ausfällt.

Mit Hilfe der Poissionverteilung

$$p_x = \frac{e^{-\lambda} \cdot \lambda^x}{x!}$$

kann die Wahrscheinlichkeit  $p_x$  bestimmt werden, mit der keine, eine, oder mehrere Bindungen ( $x$  entspricht der Zahl der Bindungen) beim Kontakt des Kügelchens mit der B-Zelle entstehen. Die wahrscheinlichste Anzahl der sich ausbildenden Bindungen wird durch den Parameter  $\lambda$  beschrieben. Um diesen zu bestimmen, muß im Histogramm die Breite der Balken dem Betrag der Abrißkraft des ersten Peaks entsprechen. Dasselbe gilt für den Abstand zueinander. Angesichts der nicht gleichmäßig verteilten Peaks hatte sich dennoch eine Balkenbreite von 12 pN als beste Wahl herausgestellt, anhand derer dann die Poissonverteilung angefitet werden konnte. Für die wahrscheinlichste Zahl der sich ausbildenden Bindungen stellte sich  $\lambda = 1,2$  heraus.



**Abbildung 50:** Das Histogramm aus Abbildung 49 links, in eine Kastenbreite von 12 pN mit ebenfalls 12 pN Abstand zueinander eingeteilt, kann mit einem Poissonfit hinterlegt werden, der eine wahrscheinliche Zahl der sich ausbildenden Bindungen von 1,2 pro Messung ergibt.

Der Wert von 12,3 pN für die Dissoziation einer Bindung bei einer loading rate von 45 pN/s scheint gering, verglichen mit ähnlichen Antikörper-Antigen-Messungen [Dammer 1996; Hinterdorfer 1996; Schwesinger 2000]. Geht man jedoch von einer charakteristischen Reaktionslänge von 0,4 nm aus, so würde sich nach Gleichung (1.18) eine Off-Rate von  $1,3 \text{ s}^{-1}$  ergeben. Mit einer typischen On-Rate von  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für IgMs [Loset 2004] ergibt sich ebenfalls eine vernünftige Dissoziationskonstante von  $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}} = 1,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  [Strandh 1998].

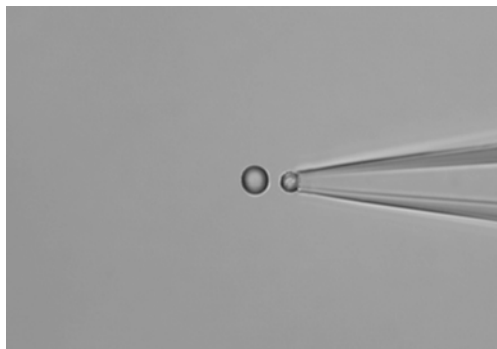
### 3.3 DNA-Fragmente

Im Rahmen einer Kooperation mit der Universität Leipzig [Kremer 2005] wurden die mechanischen Eigenschaften kurzer Fragmente von dsDNA untersucht, die auf Polystyrolkugeln immobilisiert waren. Das Ziel war ein Vergleich der Meßergebnisse der in dieser Arbeit verwendeten Optischen Pinzette mit der Optischen Pinzette in Leipzig, deren Kraftmessung mittels Videoanalyse durchgeführt wird.

Die hierzu benutzten dsDNA-Fragmente wurden in Leipzig per Standard-PCR aus verschiedenen Primern hergestellt. Aus den Oligonukleotiden 5'-Dig-ACGGCCTCAACCTACTACTG-3' und 5'-Bio-GCGATAAGTCGTGTCTTACC-3' wurden 3000 bp und 6000 bp Fragmente synthetisiert, die an einem 5'-Ende mit einem Biotin- und am anderen 5'-Ende mit einem Digoxigeninmolekül versehen waren.

0,3 pmol der DNA-Fragmente wurden zu 1 µl der Stammlösung der Streptavidinkugeln gegeben (DNA Fragmente und freie Bindungsstellen auf den Kugeln lagen somit im Verhältnis 1:1 vor), und die Lösung wurde mindestens eine Stunde bei 6°C inkubiert. Die Fragmente immobilisierten sich in dieser Zeit mit deren Biotin-Enden auf den Kugeln.

Da die Größe der Anti-Dig Kugeln (Durchmesser etwa 2 µm; Kugeln von "Spherotech"; Anti-Dig von "Roche") nicht exakt bekannt, und diese zudem auch etwas ungleichmäßig geformt waren, konnte mit diesen Kugeln die Optische Pinzette nicht kalibriert werden. Zu Beginn des Experiments wurde daher solch ein Kugeln an der Pipettenspitze festgesaugt. Das Streptavidinkugeln (mit etwa 600 immobilisierten DNA Fragmenten auf der Oberfläche) wurde in der Falle gefangen. Die Optische Pinzette wurde jedoch vorher mit unbeschichteten Streptavidinkugeln mittels Stokesscher Reibung kalibriert. Alle Messungen fanden im PBS Puffer (siehe Kapitel 2.4.3) bei etwa 21°C statt.



**Abbildung 51:** Videobild des Experimentes. Die dsDNA-Fragmente befinden sich auf dem in der Falle gefangenen Streptavidinkugeln.

Die DNA-Fragmente (etwa 600 pro Kügelchen) liegen nicht dicht an der Oberfläche an, sondern stehen infolge des negativ geladenen DNA Rückgrates von der Oberfläche des Streptavidinkügelchens teilweise ab. Dies gilt, so lange die Fragmente kurz genug sind (das 3000 bp Fragment hat hierbei eine rechnerische Konturlänge von  $1,02\ \mu\text{m}$ ) und sich noch nicht vollends wie ein statistisches Knäuel (siehe Kapitel 1.4) verhalten, was die folgenden Experimente aber auch zeigten.

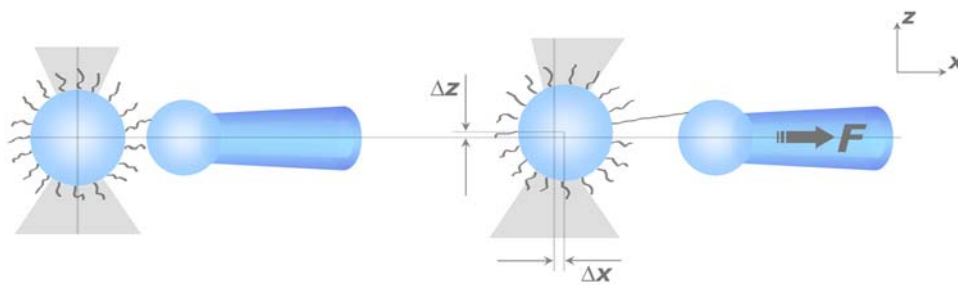
Im ruhenden Puffer (ganz im Gegensatz zu den Experimenten in Kapitel 3.4 bis 3.8) wurde zu Beginn des Versuches das Anti-Dig-Kügelchen seitlich dem Kügelchen in der Falle angenähert. Bei einem Abstand von etwa  $0,6$  bis  $0,8\ \mu\text{m}$  war es innerhalb weniger Sekunden am wahrscheinlichsten, daß ein Digoxigeninmolekül eines einzigen Fragmentes an das Kügelchen an der Pipette anband. Durch noch dichteres Heranfahren würde man nur in einen "Wald" von DNA vorstoßen und eine Vielzahl von Bindungen verursachen.

Beim 6000 bp Fragment mußte sich die Kügelchen auf schätzungsweise  $1,3\ \mu\text{m}$  annähern. Hier war es weitaus schwieriger, exakt eine Bindung zu erhalten. Häufig wurden zu viele, oder lange Zeit keine Bindungsereignisse registriert. Der Versuch, mit Hilfe einer Strömung des Puffers von links nach rechts die DNA in Richtung des Kügelchens an der Pipette zu drängen, war nicht erfolgreich, da das Anti-Dig Kügelchen und die Pipette die Strömung seitlich zu stark ablenkten.

Eine weitere Anforderung bestand darin, die Zugkraft exakt in Richtung der Molekülachse (in x-Richtung) wirken zu lassen. Es mußte verhindert werden, daß das Kügelchen schräg aus der Falle herausgezogen wird. Hierbei mußte entweder die DNA sich genau zwischen beide Stirnseiten der Kügelchen anbinden, was relativ unwahrscheinlich ist. Daher wurde auch die Auslenkung des Kügelchens in der Falle in y-Richtung detektiert, sobald die Kraft  $F$  wirkte, und das Kügelchen an der Pipette in y-Richtung verschoben.

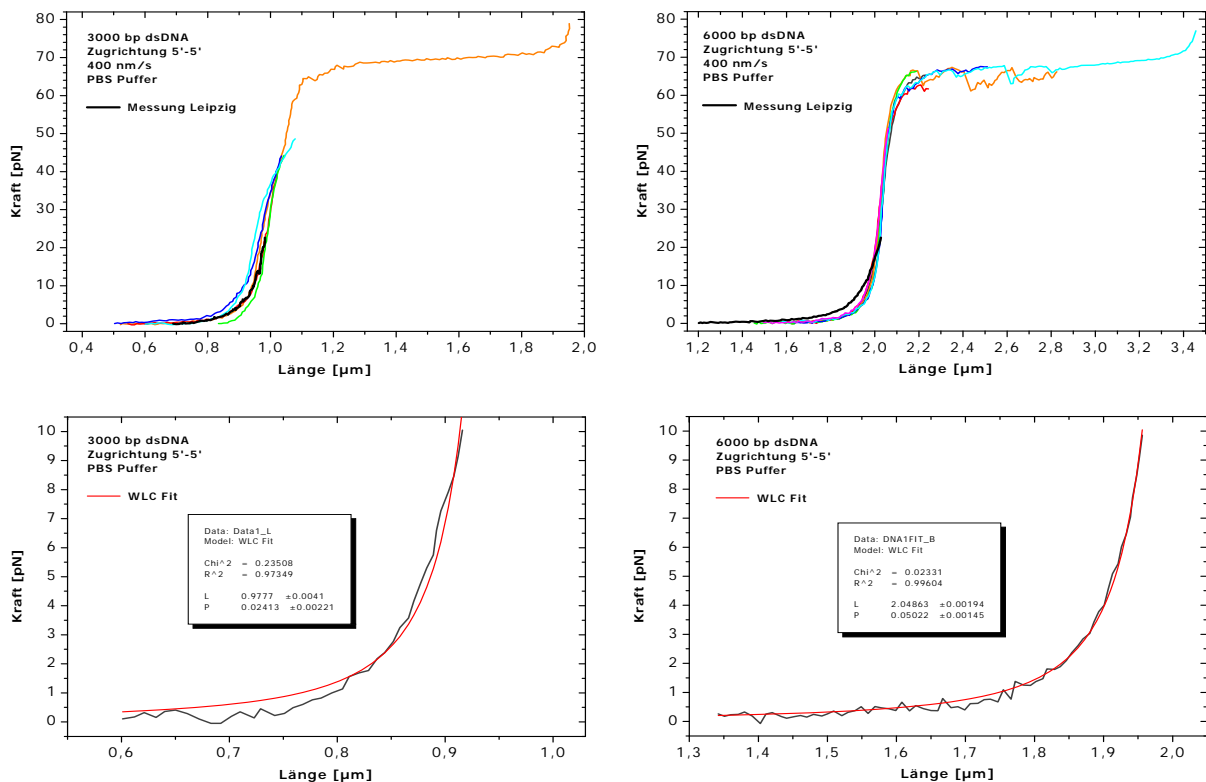
Die Abweichung in z-Richtung, also entlang der optischen Achse, zu detektieren war etwas schwieriger. Angenommen, eine Situation wie in Abbildung 52 liegt vor. Dann wird bei einer äußeren Kraft  $F$  in x-Richtung das Kügelchen auch etwas in +z-Richtung ausgelenkt. Daraufhin wird das Kügelchen an der Pipette vorsichtig in -z-Richtung bewegt, was die Auslenkung  $\Delta x$  und damit das Kraftsignal ein klein wenig sinken läßt. Wird das Kügelchen an der Pipette zu weit in -z-Richtung bewegt, steigt die Auslenkung  $\Delta x$  wieder an. Die Auslenkung  $\Delta z$  kann bei sehr kurzen Fragmenten relativ gut auf null korrigiert werden.

Je länger die DNA Fragmente sind, die zwischen den Kügelchen immobilisiert werden, um so weniger störend macht sich dieser Effekt des schrägen Anbindens bemerkbar. Bei einem längeren Fragment (und ganz besonders bei einer Lambda-DNA mit  $16,4\ \mu\text{m}$  Konturlänge) wird der Winkel zwischen Molekülachse und x-Achse und somit auch die  $\Delta z$  Auslenkung kleiner.



**Abbildung 52:** Bindet ein Molekül nicht exakt zwischen den beiden Stirnseiten beider Kugeln an (linkes Bild), dann würde eine äußere Kraft in x-Richtung das Kügelchen ebenfalls in z-Richtung auslenken. In diesem Falle muß bei angelegter äußerer Kraft das Kügelchen an der Pipette etwas in -z-Richtung verschoben werden, was auch die Auslenkung  $\Delta x$ , und somit das Kraftsignal etwas sinken läßt.

Für die 3000 bp- und 6000 bp-Fragmente konnten nun folgende, auswertbare Kraft-Auslenkungskurven ermittelt werden:



**Abbildung 53:** Kraft-Auslenkungskurven für 3000 bp- (linke Spalte) und 6000 bp-Fragmente (rechte Spalte) bei 400 nm/s Ziehgeschwindigkeit. In der unteren Reihe ist ein WLC Fit für eine exemplarische Messung dargestellt.

Bei den meisten Versuchen ließen sich keine oder zu viele DNA-Fragmente zwischen den beiden Kügelchen immobilisieren. Die erfolgreichen Bindungen rissen jedoch bei höheren Kräften, da nur je eine Biotin-Streptavidin- und Digoxigenin-Anti-Dig-Bindung die Kraft aushalten mußte. Dennoch wurden bei der Messung höhere Kräfte erreicht, als mit dem Versuchsaufbau in Leipzig. Beim dortigen Setup dauerte aufgrund der Videoanalyse die Aufnahme eines Datenpunktes etwa 1 Sekunde, während beim hiesigen Setup die Meßzeit pro Datenpunkt etwa 0,05 Sekunden betrug. Dies ermöglicht eine effektiv höhere Ziehgeschwindigkeit (400 nm/s), und nach Gleichung (1.18) auch eine höhere erreichbare Kraft, bis eine der Bindungen dissoziierte.

Die Meßkurven der 3000 bp-Fragmente ließen sich unterdurchschnittlich reproduzieren, im Normalfall sollten alle Kurven fast exakt übereinanderliegen. Eine Ursache war das oben beschriebene schräge Anbinden der DNA Fragmente an das zweite Kügelchen. Verbunden damit war eine Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Abstandes zwischen den Kügelchen, und somit der exakten Länge des Fragmentes. Zusätzlich zeigte sich oft ein leichtes Abknicken der Kraftkurve bei etwa 40 pN, das bisher noch nicht erklärt werden konnte. Ebenso wenig konnte das etwas erhöhte Kraftplateau bei etwa 70 pN, an Stelle von 63...65 pN unter ähnlichen pH Werten und Salzkonzentrationen, sowie die Breite des Kraftplateaus, das bis  $1,9 \cdot L_0$ , anstatt nur bis  $1,7 \cdot L_0$  reichte [Williams 2001a; Wenner 2002], erklärt werden. Dies könnte immer noch als leichter Meßfehler oder als Folge des schrägen Anbindens begründet werden. Jedenfalls sollte die Lage und die Länge des Plateaus laut [Williams 2001a und Williams 2001b] unabhängig davon sein, ob wie hier am 5'-5'-, am 3'-5'- oder am 3'-3'-Ende (wie in allen anderen DNA Messungen in dieser Arbeit) gezogen wird - auch wenn darüber in Kapitel 3.4 noch wesentlich ausführlicher diskutiert werden muß. Zudem entspricht die NaCl Konzentration im PBS-Puffer mit 137 mM ungefähr der im später verwendeten Standardpuffer mit 150 mM, was keine solch großen Abweichungen bei der Lage des Plateaus und der ermittelten Persistenzlänge hervorrufen kann [Wenner 2002].

Um dennoch die Ergebnisse auswerten zu können, wurden die Meßdaten so normiert, daß bei 40 pN eine Länge des DNA-Fragments von  $1,02 \mu\text{m}$  ( $3000 \text{ bp} \cdot 0,34 \text{ nm/bp}$ ) angenommen wird (weitere Bemerkungen siehe Kapitel 3.4). Der WLC-Fit ergab eine Konturlänge von  $L_0 = 1,00 \pm 0,04 \mu\text{m}$ , und eine Persistenzlänge von  $23 \pm 11 \text{ nm}$  - Werte, die auch die Leipziger Messungen bestätigten [Kegler 2005]. Es hatte sich zudem herausgestellt, daß (wie bei allen noch folgenden WLC-Fits in dieser Arbeit) vor allem der Wert der Persistenzlänge entscheidend davon abhängig ist, bis zu welcher Kraft die WLC-Gleichung angefitet wird. Die sinnvollsten Werte ergeben sich, wenn nur der entropische Kraftbereich bis 10 pN für den Fit herangezogen wird [Bustamante 1994].

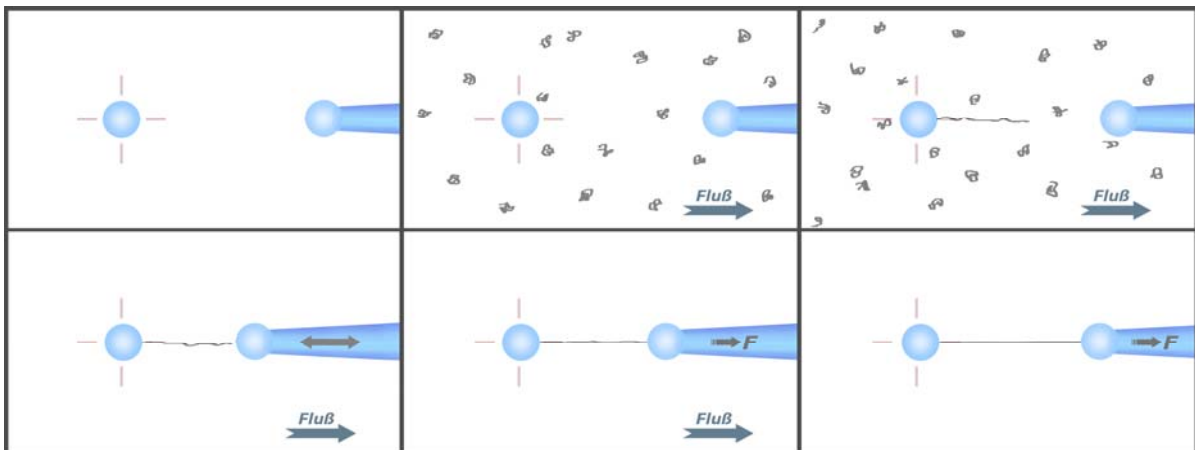
Die Messungen der 6000 bp-Fragmente gestalteten sich als wesentlich unkritischer. Sie waren gut reproduzierbar, bis auf die noch nicht geklärten Fluktuationen der Kraft im Bereich des Plateaus, das jedoch hier wie vorhergesagt um 65 pN auftrat und auch bis  $1,7 \cdot L_0$  reichte. Interessant ist, daß es möglich war, häufiger in einen höheren Kraftbereich vorzudringen, als bei den 3000 bp-Messungen. Die WLC-Fits ergaben eine Konturlänge von  $2,06 \pm 0,03 \mu\text{m}$  und eine Persistenzlänge von  $52 \pm 6 \text{ nm}$ . Die Ergebnisse aus Leipzig bestätigen zwar die Konturlänge mit  $2,09 \mu\text{m}$  relativ gut. Für die Persistenzlängen ergab sich jedoch ein geringer Wert von 21 nm [Kegler 2005]. Diese Diskrepanz ist bisher noch nicht aufgelöst.

Es bleibt die Frage zu klären, inwieweit vor allem die Messungen der 3000 bp-Fragmente, und die geringen Persistenzlängen zu interpretieren sind. Die Messungen der 6000 bp DNA und auch die folgenden Messungen an Lambda-DNA im nächsten Kapitel bestätigen die Persistenzlängen im Bereich von  $46 \pm 6 \text{ nm}$ . Elektrostatische Wechselwirkungen mit anderen, auf dem Kügelchen immobilisierten DNA Molekülen könnten sich bei den 3000 bp weitaus stärker bemerkbar machen. Wie bei Abbildung 52 stehen kürzeste DNA-Fragmente noch annähernd gleichmäßig, aber in Form eines leichte von der Oberfläche ab, ähnlich wie Stacheln eines Kaktus (die Festigkeit der Stacheln einmal ausgenommen). Längere Fragmente würden sich zunehmend verknäulen, und die Oberfläche wie krauses Haar einhüllen.

Es ist nicht auszuschließen, das der im Kapitel 3.1 gesehene Effekt der Veränderung der lokalen Viskosität (als Folge der Abstandsabhängigkeit der Dissoziationskonstante, so wie sie Gleichung (3.3) beschreibt) in unmittelbarer Nähe zu einem zweiten, seitlichen Kügelchen einen mittelbaren Einfluß auf die Persistenzlänge besitzt. Vor allem das kurze DNA-Fragment "spürt" die Grenzflächen beider Kügelchen weitaus stärker, als ein längeres Fragment (und ganz besonders eine Lambda-DNA, die von den Grenzflächen so gut wie nichts mitbekommt). Das kurze Fragment nimmt somit die veränderte Dissoziationskonstante, und in der Folge auch die veränderte Viskosität wahr. Dies hat einen Einfluß auf das DNA-Puffer-System (siehe Kapitel 1.4), und letztendlich auf die Persistenzlänge. Daraus ergaben sich interessante Kombinationen aus DNA-Kraftmessungen und lokalen Viskositätsmessungen.

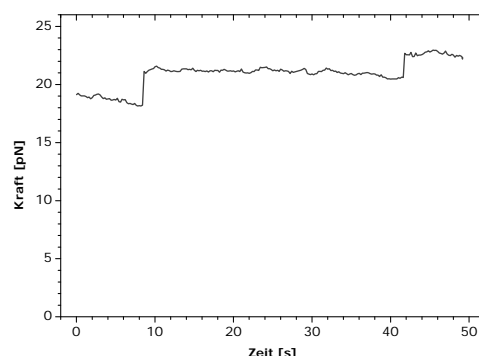
### 3.4 Lambda-DNA

Die  $16,4 \mu\text{m}$  lange, biotinylierte  $\lambda$ -DNA wird zunächst zwischen zwei Streptavidinkügelchen immobilisiert - wie in Abbildung 54 und im Text darunter beschrieben - in Abwandlung der Prozedur von [Smith 1996] und [Wuite 2000].



**Abbildung 54:** Das Immobilisieren einer biotinylierten  $\lambda$ -DNA (von oben links nach unten rechts) zwischen zwei Streptavidinkügelchen. Beschreibung: Siehe Text.

Die Suspension der Streptavidinkügelchen (siehe Kapitel 2.2) wird zunächst in die Flüssigkeitszelle eingeleitet. Ein Kügelchen wird gefangen, zur Pipette bewegt und dort festgesaugt. Ein zweites wird gefangen, welches aber in der Falle verbleibt (Abbildung 54 o. l.). Nun wird Puffer durch die Flüssigkeitszelle geleitet, um die restlichen Kügelchen herauszuspülen. Die Suspension der biotinylierten  $\lambda$ -DNA (siehe Kapitel 2.4.1) wird unter einem konstanten Fluß eingeleitet (Abbildung 54 o. M.). Das Kügelchen erfährt einerseits eine konstante Kraft infolge der Stokesschen Reibung. Die Strömungsgeschwindigkeit kann im Bereich von 0,7 bis 1,4 mm/s variiert werden - dementsprechend beträgt die auf das Kügelchen wirkende Kraft etwa 20 bis 40 pN. Bindet ein DNA Knäuel nun zufällig mit einem Ende an das Kügelchen an, so wird es in der Strömung gestreckt (Abbildung 54 o. r.). Das Kügelchen nimmt dies als leicht erhöhte Kraft wahr, die sich als Sprung im Kraftsignal bemerkbar macht. Abbildung 55 zeigt die allererste, erfolgreiche Detektion des Anbindens.



**Abbildung 55:** Das Anbinden einer DNA an ein Kügelchen in der Strömung ist als Sprung im Kraftsignal sichtbar. Die Zahl der immobilisierten DNA Moleküle kann so exakt bestimmt werden.



Es ist vorteilhaft, zwei oder drei DNA anbinden zu lassen, da sich hin und wieder ein Molekül löst, besonders dann, wenn es zuvor die Bindung nur unspezifisch war. Daraufhin wird die Flüssigkeitszelle wieder mit Puffer gespült, ohne jedoch den Fluß auch nur für einen Moment zu unterbrechen. Sollte dies jedoch geschehen, würde die gestreckte DNA sofort zurückschnellen, und sich fast immer mit dem zweiten Ende an das Kügelchen binden.

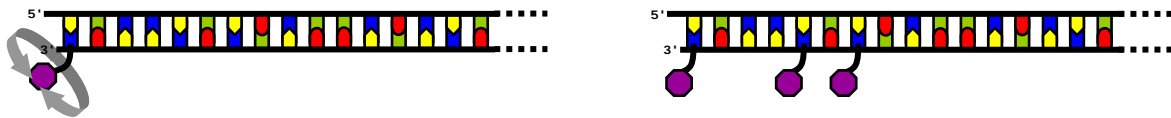
Nun nähert man von stromabwärts das Kügelchen an der Pipette dem freien Ende der DNA an. Selbstverständlich befinden sich an diesem Kügelchen auch eine oder mehrere DNA. Diese haben jedoch keinen Einfluß auf die weitere Immobilisierungsprozedur oder die spätere Messung. Je dichter sich die beiden Kügelchen annähern, um so stärker wirkt sich das zweite Kügelchen und die Pipette als Strömungshindernis für das Kügelchen in der Falle aus. Die DNA erfährt daraufhin eine etwas geringere Kraft infolge der schwächeren Strömung und wird etwas weniger im Fluß ausgestreckt. Dies bewirkt schlußendlich, daß das zweite Ende der DNA am besten eingefangen werden kann, wenn der Abstand der beiden Kügelchen zwischen 9 und 11  $\mu\text{m}$  beträgt. Durch ein wenig Hin- und Herfahren der Pipette kann so meist innerhalb weniger Sekunden das freie Ende der DNA an das zweite Kügelchen immobilisiert werden (Abbildung 54 u. I.). Spätestens hier zeigt sich der Vorteil einer Pipette, die in Richtung des Flusses zeigt. Die beiden Kügelchen, die DNA und die Pipette bilden eine Linie mit dem Fluß, und das Anbinden ist nur eine Frage des Abstandes der beiden Kügelchen. Auch wenn es wesentlich einfacher ist, die Pipette nicht längs, sondern quer in die Flüssigkeitszelle hereinragen zu lassen [Bennink 1999; Wuite 2000; Williams 2001a; Husale 2002], so würde die Pipette dann die Strömung so beeinflussen, so daß die DNA nach oben abgelenkt wird, und das freie Ende des Moleküls weitaus schwerer zu finden ist.

Die Pipette wird daraufhin ein wenig zurückgefahren, so daß eine nicht zu hohe Kraft am Molekül zieht (Abbildung 54 u. M.) um zu überprüfen, ob die Bindung am zweiten Kügelchen etabliert und nicht etwa unspezifisch ist. Erst jetzt kann der Fluß abgestellt und die Messung begonnen werden (Abbildung 54 u. r.).

Eine wichtige Frage kann vor den Messungen beantwortet werden, nämlich ob die Ergebnisse der  $\lambda$ -DNA mit denen der Messung der DNA Fragmente vergleichbar sind - wurde doch bei der  $\lambda$ -DNA beiderseits am 3' Ende, aber bei den Fragmenten am 5' Ende gezogen. Außerdem wurde die  $\lambda$ -DNA an den Enden durch vier und sechs, die Fragmente durch nur je ein Molekül am Kügelchen immobilisiert.

Der erste Punkt betrifft die Immobilisierung. Für den Fall, daß die DNA an mindestens einem Ende mit nur einem Biotin- oder Digoxigeninmolekül über eine Einfachbindung immobilisiert wird, ist es der DNA möglich, um diese eine Bindung frei zu rotieren, und kann somit bei einer Streckung ihre Helix entwinden (siehe Abbildung 56 links). Diese notwendige Rotation wurde zunächst in den Modellen von Bustamante [Smith 1996] und

Bloomfield [Rouzina 2001a] als notwendig erachtet, und auch als Basis für die theoretische Modellierung der DNA Streckung angesehen [Lebrun 1996]. Für den Fall, daß eine intakte DNA mit mehreren Biotinmolekülen immobilisiert wurde, ist es ihr normalerweise nicht möglich, sich frei um diese Bindungen und somit um ihre Achse zu drehen (Abbildung 56 rechts).



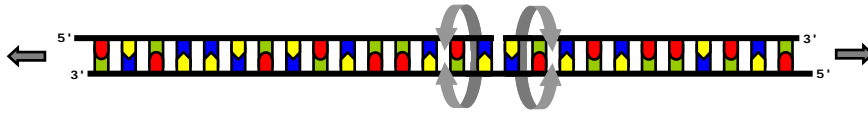
**Abbildung 56:** Eine DNA, an einem Ende mit nur einem Biotin- oder Digoxigeninmolekül verbunden, kann um diese Bindung frei rotieren, und deshalb ihre Helix entwinden (links). Bei mehreren Molekülen an beiden Enden ist die Rotation um deren Bindungsstellen nicht mehr möglich (rechts), und die Helix kann sich nicht entwinden (zwar ist auch im rechten Bild die DNA *entwunden* dargestellt, nur dann wäre eine *Verwindung* halt ebensowenig möglich).

Bei einer Immobilisierung mit mehreren Linkermolekülen an beiden Ende ist keine Entwindung mehr möglich, statt dessen eröffnet dies die Möglichkeit, eine DNA mittels einer Magnetischen Pinzette gezielt zu ver- oder entwinden, indem man ein magnetisches Kügelchen im inhomogenen Magnetfeld rotieren läßt [Strick 1998; Bustamante 2003]. Im Modell von Bloomfield [Rouzina 2001a] wird jedoch behauptet, daß die DNA sich dennoch beim Strecken entwindet, da sich das Kügelchen in der Falle frei drehen kann. Bei allen Experimenten in der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch noch nie die Rotation eines Kügelchens beobachtet werden. Das diese Rotation "übersehen" wurde, ist im Prinzip unmöglich, da manchmal kleinste Schmutzteilchen am Kügelchen in der Falle anhafteten. Die Partikel hätten eine von der DNA erzwungene Rotation des Kügelchens auf jeden Fall noch deutlicher sichtbar gemacht. Eine Kraftkurve einer nicht-entwundenen DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit noch aufgenommen. Diese Kraftkurve würde ein Überstreckungsplateau bei etwa 105 pN besitzen [Bustamante 2003].

Wenn das Kügelchen tatsächlich rotieren sollte, müßte dies hinreichend schnell geschehen, um die gleiche Kraftkurve zu erhalten, wie die einer frei rotierenden DNA. Die  $\lambda$ -DNA müßte in der Zeit, in der sie komplett überstreckt wird, sich 4850 mal um ihre Achse drehen und das Kügelchen somit ebenfalls. Bei den schnellsten Messungen in dieser Arbeit wurde die DNA innerhalb von gut anderthalb Sekunden komplett überstreckt, was mehr als 3200 Umdrehungen pro Sekunde entspricht, und somit völlig ausgeschlossen ist.

Der Grund, weshalb dennoch alle Kraftkurven denen einer entwundenen DNA entsprechen, ist (wie von Bustamante und Bloomfield auch angemerkt), daß fast alle hinreichend langen

DNA-Moleküle mindestens einen Strangbruch besitzen. Hierbei ist eine Bindung auf einer Seite des Rückgrats der DNA zwischen zwei Basenpaaren aufgebrochen. Die DNA kann sich dann aber frei um die Einfachbindungen am anderen Rückgrat drehen:



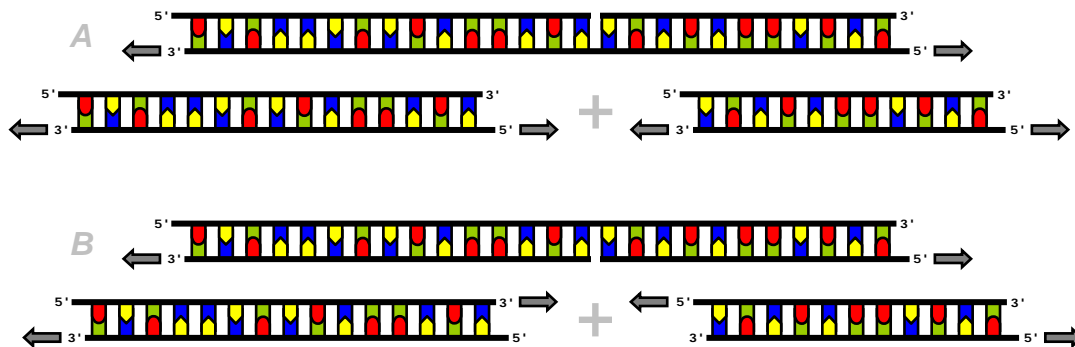
**Abbildung 57:** Eine DNA mit einem oder mehr Strangbrüchen kann sich immer entwinden, egal wie viele Linkermoleküle an einen Terminus angeknüpft wurden, oder ob am 3', am 5', oder an beiden Termini gezogen wird.

Die Strangbrüche können jedoch mit der T4 DNA Ligase repariert werden [Williams 2001b]. In derselben Arbeit wird eine  $\lambda$ -DNA an einem Ende am 5' und am anderen Ende am 3' Terminus mit mehreren Biotinlinkern versehen - was bedeutet, daß effektiv an einem Einzelstrang der DNA gezogen wird (siehe Abbildung 9 zweites Bild von rechts). Deren Behauptung, daß nun die DNA sich trotzdem frei drehen kann ist schlichtweg falsch. Einzig das Kügelchen hätte die Möglichkeit, extrem schnell zu rotieren. Die Meßdauer bis zum Erreichen der kompletten Überstreckung der DNA betrug etwa 12 Sekunden, was etwa 400 Umdrehungen pro Sekunde entspricht. Sollte dies zutreffen, dann bewegt sich der Äquator des Kügelchens (dessen Durchmesser 4,1  $\mu\text{m}$  betrug) mit einer Geschwindigkeit von 5,1 mm/s relativ zur umgebenden Flüssigkeit. Überschlagsmäßig kann davon ausgegangen werden kann, daß die hierbei erzeugte Reibung eine Kraft verursacht, die größenordnungsmäßig gleich der Stokesschen Reibung einer Kugel von gleichem Durchmesser bei gleicher Geschwindigkeit entspricht. Dies würde zu einer Reibungskraft von 197 pN führen. Diese Kraft hätte die sich entwindende DNA (bei einer Dicke von 2,37 nm) als Drehmoment auf das Kügelchen übertragen und somit eine Kraft von 296000 pN aufbringen müssen. Die einzige Erklärung für die Konsistenz jener DNA-Messungen mit anderen Messungen wäre somit die Existenz mindestens eines übriggebliebenen Strangbruches.

Unabhängig der Modelle von Bustamante und Bloomfield weisen molekulardynamische Simulationen [Lebrun 1996; Strick 2000b] einen Unterschied in der Konformation der gestreckten dsDNA auf, je nachdem, ob sie in 3'-3', 5'-5' oder 3'-5' Richtung gestreckt wird. Die gestreckte Form der DNA entspricht dann entweder einer kaum verdrillten oder einer verdrillten, aber in ihrer Breite komprimierten Form einer Helix.

Die Tatsache, daß beispielsweise Bloomfield et al. die gleichen Kraftkurven erhalten hatten, obwohl sie zum einen in 3'-3' [Williams 2001a] und zum anderen in 3'-5' Richtung zogen, [Williams 2001b] hat noch einen anderen Grund, der jedoch in deren Arbeiten nicht erwähnt

wurde, aber von entscheidender Bedeutung für sämtliche dsDNA-Messungen ist: Das Auftreten einer Kraftkurve mit einem Überstreckungsplateau um 65 pN bei einer DNA, die mit mehreren Linkermolekülen an beiden Enden immobilisiert ist, kann als Beleg für das Vorhandensein mindestens eines Strangbruches angesehen werden. Das führt jedoch unweigerlich zu dem Schluß, daß es letztendlich nahezu unbedeutend ist, an welchen Termini die Kraft angreift (Ausnahme: siehe Kapitel 3.4.1).

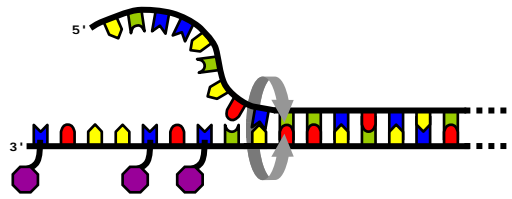


**Abbildung 58:** Eine dsDNA mit einem Strangbruch wird in 3'-5' Richtung gestreckt. Befindet sich der Strangbruch am freien Strang (Bild A), so kann die Streckung als Summe von zwei DNA Streckungen in 3'-5' Richtung angesehen werden. Ist der Strangbruch jedoch am immobilisierten Strang (Bild B), dann würde dies einer kombinierten Streckung in 3'-3' und 5'-5' Richtung entsprechen.

Man kann sich analog zu Abbildung 58 die Situationen ausmalen, wenn mehrere Strangbrüche in einer DNA vorhanden sind - dann wächst die Zahl der möglichen Kombinationen rapide an. Um wirklich entscheiden zu können, auf welche Art und Weise eine dsDNA gestreckt wird, müßten die Zahl der Strangbrüche und deren exakte Position bekannt sein (auch eine unterschiedliche Nähe der Strangbrüche zu den beiden Enden in Bild B vergrößert oder verkleinert beispielsweise den 3'-3' Bereich).

Es gibt jedoch eine Möglichkeit, eine DNA ohne Strangbruch zu entwinden. Obwohl in der Theorie von Bloomfield behauptet wird, daß die DNA beim Überstrecken kaum von den Enden her aufschmilzt, ist dieses Aufschmelzen die einzige Möglichkeit, mit der sich eine DNA entwinden kann, die keine Strangbrüche und beidseitig mehrere Linkermoleküle besitzt.

Hierzu muß von mindestens einem Ende ein Einzelstrang bis über das Basenpaar heraus abschmelzen, an dem das letzte Linkermolekül angebunden ist (siehe Abbildung 59). Die DNA kann dann um die Einfachbindungen desjenigen Stranges des Rückgrates rotieren, an deren Seite die Linkermoleküle sitzen, und zwar dort, wo sich das erste, komplett aufgebrochene Basenpaar befindet.

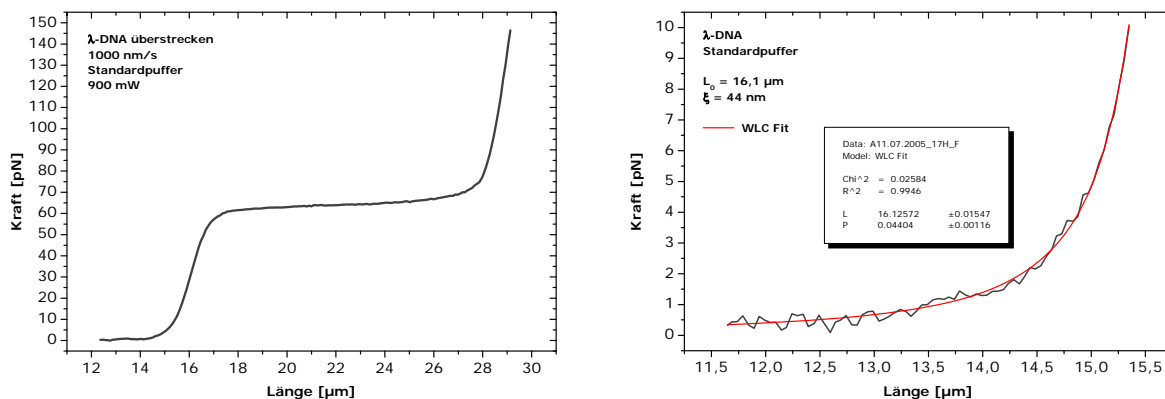


**Abbildung 59:** Eine von einer Seite her aufgeschmolzene DNA kann um den Strang rotieren, an dem sich auch die Linkermoleküle befinden. Sie rotiert dann wie in Abbildung 57 um die Einfachbindungen des Rückgrates - in diesem speziellen Fall um die Bindungen im unteren Strang, wahrscheinlich zwischen der achten (grün) und neunten (gelb) Base von links.

Weiterhin darf der abgeschmolzene Strang beim Entwinden nicht gegen die Oberfläche schlagen, auf der die Linkermoleküle immobilisiert sind. Dies würde zu einer zeitlich verzögerten Entwindung führen, somit zu einer Ratenabhängigkeit und zu einer Kraftkurve, deren Plateau dann zwischen 105 und 65 pN liegen muß.

Diese Variante des Entwindens scheint in Messungen mit DNA ohne Strangbrüchen und mit mehreren Linkermolekülen bisher noch nicht in Erscheinung getreten zu sein. Die DNA hätte sich dann bei den Messungen mit der magnetischen Pinzette [Allemand 1998; Strick 1998; Bustamante 2003] auf diese Art und Weise entwinden können, obwohl jene DNA dort nur an einem Strang an jeder Seite immobilisiert wurde. Dies läßt nur den Schluß zu, daß die Wahrscheinlichkeit für diese Form des Abschmelzens als äußerst gering anzusehen ist - eine mögliche Ausnahme wird in Kapitel 3.4.1 präsentiert.

### Ergebnisse der $\lambda$ -DNA Messungen



**Abbildung 60:** Die Kraftkurve einer  $\lambda$ -DNA, und der WLC Fit im Kraftbereich bis 10 pN.

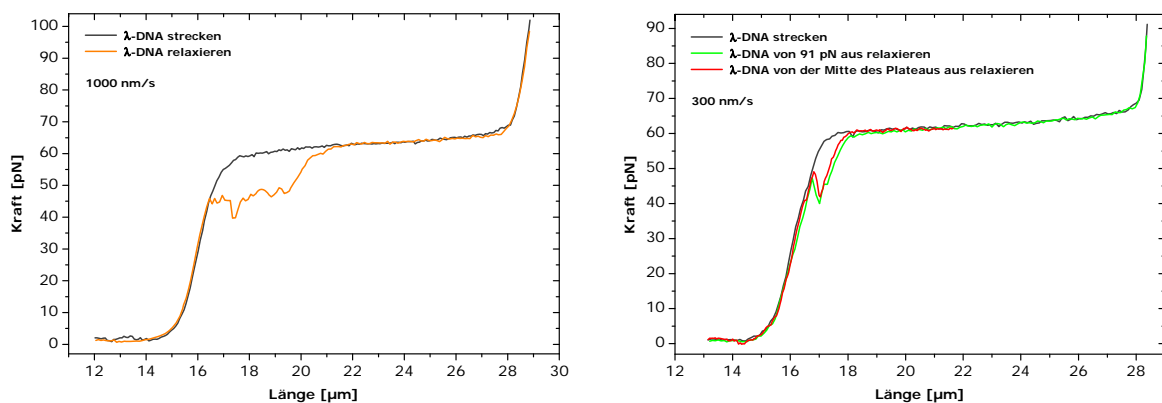
Die Kraftkurve einer  $\lambda$ -DNA im Standardpuffer, aufgenommen mit dem alten Setup der Optischen Pinzette und gestreckt mit einer Geschwindigkeit von 1000 nm/s, zeigt Abbildung 60. Das Überstreckungsplateau liegt bei 64 pN. Ein exemplarischer WLC-Fit (die Daten stammten aus den Messungen mit dem neuen Setup) ergab eine Konturlänge von 16,1  $\mu\text{m}$  und eine Persistenzlänge von 44 nm.

Bei allen aufgenommenen Kraftkurven werden 40 pN bei etwa 16  $\mu\text{m}$  oder weniger erreicht. Die DNA hat dann am zweiten Kügelchen nicht exakt an der Stirnseite angebunden, sondern ein wenig seitlich. Daher kann bei solchen Messungen die Kraftkurve immer auf die passende Länge normiert werden - die  $\lambda$ -DNA dient dann als Langennormal.

Werden die Ergebnisse aller  $\lambda$ -DNA Messungen im Standardpuffer, die mit der Optischen Pinzette durchgeführt wurden, zusammengefaßt, erhält man eine Überstreckungskraft vom  $63 \pm 1$  pN, eine Persistenzlänge von  $46 \pm 6$  nm und eine Konturlänge von  $16,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ .

Die  berstreckungskraft liegt im Rahmen der Werte, die [Williams 2001a] und [Wenner 2002] für gleiche Salzkonzentrationen und pH Werte ermittelt hatten (dies waren 62 pN und 65 pN). Die Konturlänge kommt den theoretischen 16,4  $\mu\text{m}$  sehr nahe, und die Persistenzlänge liegt wiederum im Bereich der WLC Fits von [Wenner 2002], die Werte zwischen 45 und 48 nm errechneten, oder der Ergebnisse von [Tessmer 2003] mit  $46 \pm 2,7$  nm.

Ein wesentlich interessanterer Bereich der DNA Messungen liegt bei der Relaxierungshysterese [Smith 1996; Clausen 2000; Williams 2002; Krautbauer 2002b] wie sie auch Abbildung 61 zeigt.



**Abbildung 61:** Die Hysterese zwischen der Kraftkurve der Streckung und der Relaxierung bei zwei  $\lambda$ -DNA.

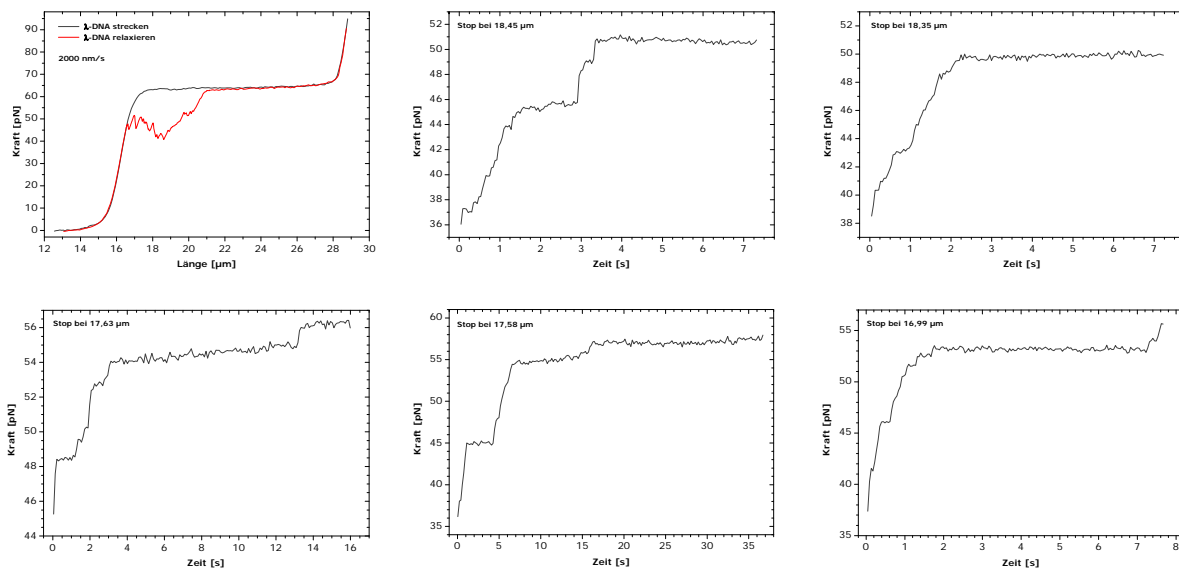
Dort sind die Hysteresen von zwei verschiedenen  $\lambda$ -DNA Molekülen dargestellt. Wie im rechten Bild zu erkennen ist, bildet sich eine fast identische Hysterese bei derselben DNA aus, auch wenn der Startpunkt der Relaxierung (der Beginn des Rückweges der Kraftkurve) verändert wird. Das steht im Gegensatz zu der in [Rouzina 2002] aufgestellten Behauptung, die Hysterese würde stark vom Punkt im Plateau abhängen, von dem aus das Relaxieren beginnt. Die unterschiedliche Größe der Hysterese bei einer zweiten  $\lambda$ -DNA könnte ein deutlicher Hinweis auf die Zahl der Strangbrüche sein. Auch wenn der Längenbereich der Hysterese von  $\lambda$ -DNA zu  $\lambda$ -DNA unterschiedlich ist, die Differenz der Kraft zwischen dem Hin- und Rückweg der Kraftkurve variiert bei ähnlichen Ziehgeschwindigkeiten kaum, und es wurden auch noch keine Hysteresen im Rahmen dieser Arbeit gefunden, deren tiefster Punkt auf dem Rückweg unter 35 pN lag, so lange die Geschwindigkeit nicht über 5000 nm/s stieg. Die Geschwindigkeit von 300 nm/s im rechten Bild von Abbildung 61 sorgen für ein sehr spätes Einsetzen der Hysterese. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf einen Nicht-Gleichgewichtszustand beim Relaxieren.

Das in Kapitel 1.5 beschriebene ratenabhängige Rekombinieren der geschmolzenen Domänen in der Theorie von Bloomfield soll den Großteil des Kraftabfalls beisteuern. Ganz im Gegensatz zur Theorie können nicht allein die Domänen für die Hysterese verantwortlich sein: Zwar könnten sich fast identische Domänen bei derselben  $\lambda$ -DNA ausbilden, nämlich dann, wenn dies durch einen Effekt hervorgerufen wird, der an derselben Stelle im DNA Strang wieder und wieder das Entstehen einer geschmolzenen Domäne induziert (was die fast identische Hysterese bei ein und derselben  $\lambda$ -DNA erklären würde). In jeder anderen  $\lambda$ -DNA tritt dieser Effekt auch auf, nur sorgt er letztendlich für eine andere Hysterese, was bedeutet, daß er an einer anderen Stelle des Stranges, oder zumindest in einer anderen Stärke auftritt. Die Hysteresen zweier  $\lambda$ -DNA sind im allgemeinen verschieden, also stellt sich die Frage, was die zweite von der ersten  $\lambda$ -DNA unterscheidet. Das sind einzig die Anzahl und Positionen der Strangbrüche.

### **Die Rekombinierung der DNA im Bereich der Hysterese**

Es ist unabhängig, ob abgeschmolzene Einzelstränge oder nur rekombinierende Basenpaare in geschmolzenen Domänen für die Hysterese verantwortlich sind - da in die Ziehrichtung und -geschwindigkeit während der Streckung oder Relaxierung der DNA eingegriffen werden kann, ist es möglich, beim Durchfahren der Hysterese die Relaxierung zu stoppen, und sich somit die reine zeitliche Veränderung des Kraftsignals anzuschauen.

Hierbei wird die DNA mit 2000 nm/s gestreckt und relaxiert, um die Ausdehnung der Hysterese zu bestimmen. Daraufhin wird die DNA wieder gestreckt, aber wesentlich schneller relaxiert (mit 5000 nm/s). Man erhält dadurch die Möglichkeit, möglichst schnell in die Hysterese hineinzufahren, zu stoppen und den zeitlichen Verlauf der Kraft genauer zu untersuchen.



**Abbildung 62:** Links oben: Die Hysteresis bei 2000 nm/s. Andere Graphen: Wird die Relaxierung im Kraftbereich der Hysteresis gestoppt, kann der zeitliche Verlauf der Kraft aufgezeichnet werden. Wegen der höheren Geschwindigkeit bei der Relaxierung wird zu Beginn häufig eine etwas tiefere Kraft erreicht. Offensichtlich findet das Rekombinieren der geschmolzenen Domänen bzw. der abgeschmolzenen Einzelstränge vorrangig in diskreten Schritten statt.

Wird bei der Streckung der DNA im Plateau gestoppt, gibt es selbst nach Minuten keine meßbare Veränderung der Kraft. Dies stimmt überein mit den in dieser Arbeit gemachten Messungen mit Geschwindigkeiten zwischen 100 und 12000 nm/s, bei denen immer der identische Kraftverlauf beim Strecken zu beobachten war. Dies würde die Behauptung in der Theorie von Bloomfield unterstützen, daß nur die Rekombinierung der Basen in den geschmolzenen Domänen, nicht aber das Ausbilden solcher Domänen ratenabhängig ist. Dennoch fehlt hierfür eine plausible Erklärung. In der Theorie wird angemerkt, daß die Domänen bevorzugt an beiden Rändern wachsen, anstatt sich neu auszubilden, und daß das Rekombinieren unter Umständen mehrere Sekunden in Anspruch nimmt, da sich die passenden Basen in den geschmolzenen Domänen erst wieder finden müßten. Die Domänen müßten sich dann aber vom Rand aus wieder verkleinern, so als ob man einen Reißverschluß schließt, und die Basen fänden somit ganz automatisch ihren Partner - und zwar ratenunabhängig. Die beiden Einzelstränge in einer geschmolzenen Domäne befinden sich zudem immer in unmittelbarer Nähe zueinander (wegen der Zugkraft an der DNA können sich diese nicht beliebig voneinander entfernen, obwohl beide Stränge negative Oberflächenladungen tragen) und an beiden Enden nimmt der Abstand der Basenpaare, die sich gerade aufgetrennt haben, räumlich nur langsam zu.

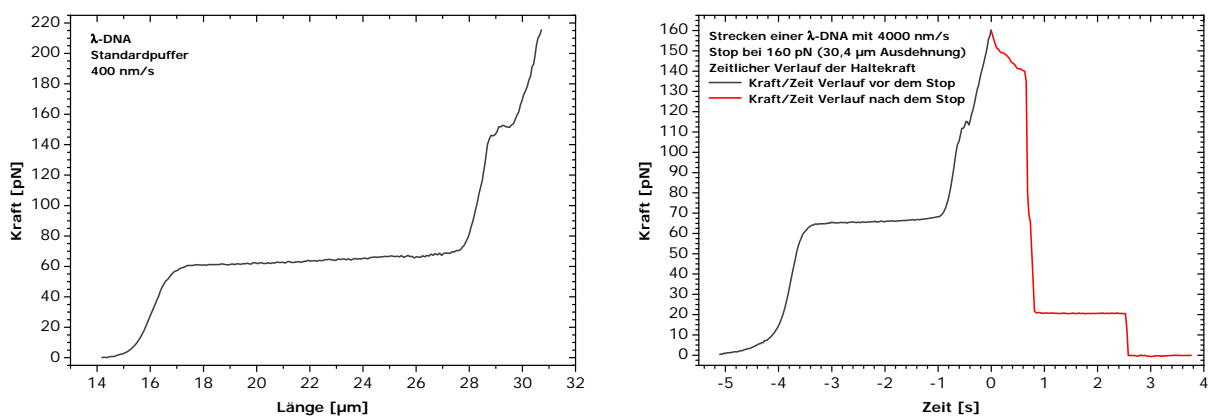


Plausibler erscheint daher eine Erklärung, bei der der zeitbestimmende Faktor in der Tat das Abschmelzen von Einzelsträngen an Strangbrüchen ist. Hierbei ist es durchaus möglich, daß ein abgeschmolzener Strang sich weit von seinem Partner entfernt (ähnlich wie in Abbildung 59), denn sein Ende hängt sozusagen "frei in der Luft". Das Verknäulen des freien Stranges in der Flüssigkeit und die negativen Ladungen auf beiden Strängen begünstigen dies.

Das Abschmelzen von Einzelsträngen mit unterschiedlicher Länge, die sich zudem auch verschieden weit von der noch gestreckten DNA entfernen, lassen das Rekombinieren zeitlich stark variieren. Dies könnte zum einen die verschiedenen hohen Stufen im Kraftsignal in Abbildung 62 erklären, ebenso wie auch die verschiedenen Zeitspannen zwischen den Kraftstufen.

Es fällt in Abbildung 62 auf, daß die Kraft selbst nach Minuten nie das Niveau des Plateaus erreicht, was bedeutet, daß beim Relaxieren immer noch (ab)geschmolzene Bereiche vorhanden sind. Diese waren beim Strecken unter derselben Ausdehnung des Moleküls noch nicht vorhanden.

### 3.4.1 Das Schmelzen der DNA



**Abbildung 63:** Links: Die erste Kraftkurve, die mit einer Optischen Pinzette aufgenommen wurde, welche das zweite Kraftplateau zeigt. Rechts: Eine weitere Kraftkurve in Abhängigkeit von der Zeit. Bei 160 pN (dies entspricht einer Länge von 30,4  $\mu\text{m}$ ) wurde gestoppt, und der zeitliche Abfall der Haltekraft beobachtet.

Bei der Messung der linken Kraftkurve rissen bei 213 pN die Biotin-Streptavidin Bindungen an einem der beiden Kügelchen. Bei weiteren Experimenten waren nur in etwa einem von fünf Fällen Kräfte von über 150 pN zu erreichen. Mehrere Messungen zeigten, daß die Lage und die Größe des zweiten Plateaus (siehe auch Kapitel 1.5) von der Ziehgeschwindigkeit

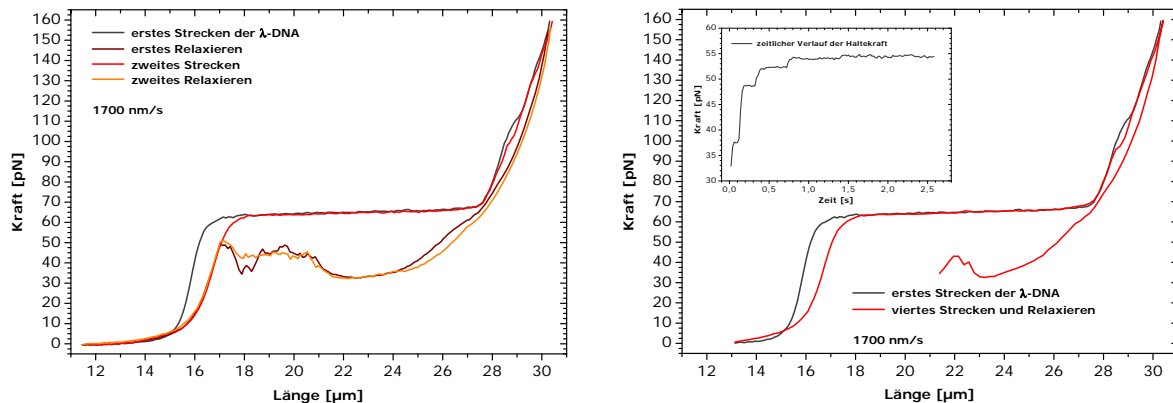
abhing, jedoch keineswegs linear. In allen Fällen lag dieses Plateau zwischen 110 und 180 pN und war manchmal nur schwach ausgeprägt (ähnlich wie in Abbildung 10 rechts, bei den Graphen mit 1,5 und 3  $\mu\text{m/s}$ ).

Die rechte Kraftkurve (hier in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen), bei der das Strecken bei 160 pN gestoppt wurde, zeigte jedoch, daß nach dem kleinen Plateau bei 115 pN die DNA noch nicht in der Form eines Einzelstranges vorlag, so wie es die Theorie von Bustamante und die Überlegungen von Gaub et al. [Clausen 2000] vorhersagten. Eine zwischen zwei Kügelchen immobilisierte ssDNA würde nämlich keine zeitlich veränderte Haltekraft hervorrufen, sondern einfach nur durchreißen. Statt dessen scheint ein Teil der DNA selbst bei 160 pN noch in Form eines Doppelstranges vorzuliegen, bei dem jedoch innerhalb der ersten Sekunde ein Aufschmelzen der Basenpaare stattfindet. Das wesentlich interessantere Ereignis geschieht erst danach. Offensichtlich erreicht der Ort des Aufschmelzen einen Strangbruch, wodurch sich die DNA komplett separiert und je ein Einzelstrang nur noch mit einem Kügelchen verbunden ist. Die beiden ssDNA schnellen nun zurück - vielmehr scheinen sie übereinanderherzugleiten, und kurz darauf - noch bevor sich die beiden freien Enden begegnen - bilden sich einige Basenpaare neu aus, und die Haltekraft beträgt dann noch 20 pN. Eine Überschlagsrechnung zeigte, daß der überlappende Bereich höchstens 35000 Basen lang ist - bei einem Basenabstand einer ssDNA von 0,49 nm bei 20 pN [Smith 1996].

Eine weitere Diskussion zu diesem Thema befindet sich am Ende dieses Kapitels.

Das Strecken über das zweite Plateau hinaus und sofortiges Relaxieren vergrößerte die Hysterese immens (siehe Abbildung 64). Zudem bildete sich während des ersten Steckens eine irreversibel geschmolzene Domäne aus, die die effektive Konturlänge der DNA um etwa 1  $\mu\text{m}$  vergrößerte, was einen veränderten Kraftverlauf bei geringeren Ausdehnungen bei allen weiteren Streckungen zur Folge hatte. Es ist interessant, daß sich dadurch zwar der Startpunkt des ersten Plateaus verschob, aber der Punkt, an dem das Plateau endete (bei etwa 28  $\mu\text{m}$ , ebenso wie bei allen anderen Messungen) blieb konstant. Hat diese Domäne eine Form wie in Abbildung 12 E (als kurzer Einzelstrang inmitten des Doppelstranges), so würde das bedeuten, daß Domänen dieser Form sich bei allen anderen Messungen auch ausbildeten, sich aber beim Relaxieren immer wieder schlossen, da das Kraftplateau zuvor immer bei 28  $\mu\text{m}$  endete. Nur in diesem einen Fall schloß die Domäne sich nicht, und dies geschah auch nach mehreren Streck-Relaxierungsversuchen nicht. Wenn Domänen mit dieser Einzelstrangform sich bildeten, dann wäre das ein Hinweis darauf, daß tatsächlich das Abschmelzen des gegenüberliegenden Einzelstranges bei allen Messungen zuvor stattfand. Sollte hingegen niemals ein Einzelstrang abschmelzen, sondern nur die Basenpaare dissoziieren (was bedeutet, die beiden Einzelstränge liegen parallel nebeneinander - siehe Diskussion am Ende von Kapitel 3.4) so würde dies

bedeuten, daß bei dieser Messung die irreversible Domäne ebenfalls aus zwei Einzelsträngen bestand, denn sonst würde das Plateau ebenfalls nicht bei 28  $\mu\text{m}$  enden. Die Form der irreversiblen Domänen und die Form der "gewöhnlichen" geschmolzenen Domänen muß daher identisch sein, um das Kraftplateau jedesmal bei 28  $\mu\text{m}$  enden zu lassen.



**Abbildung 64:** Strecken der  $\lambda$ -DNA bis 160 pN und sofortiges Relaxieren ruft eine wesentlich ausgeprägtere Hysterese hervor, deren Verlauf sich nach Wiederholen des Versuches kaum verändert. Jedoch vergrößert sich die Konturlänge der DNA infolge einer irreversibel geschmolzenen Domäne. Nach dem vierten Relaxieren (die irreversible Domäne blieb bis dato bestehen) wird bei etwa 21  $\mu\text{m}$  gestoppt, und der zeitliche Verlauf der Kraft betrachtet.

Selbst nach dem vierten Streck-Relaxierungsversuch blieb die Domäne bestehen. Zwischen den Experimenten wurden jeweils Pausen von 10 Sekunden eingelegt, in denen das Molekül ohne Spannung zwischen den Kügelchen hing.

Der zeitliche Verlauf der Kraftkurve nach dem Stop der Relaxierung im rechten Bild von Abbildung 64 weist einen wesentlich schnelleren Anstieg der Haltekraft auf, als in Abbildung 62. Die Ursache hierfür könnte weniger an abgeschmolzenen Einzelsträngen, sondern mehrheitlich am schnellen Rekombinieren von dissoziierten Basenpaaren liegen.

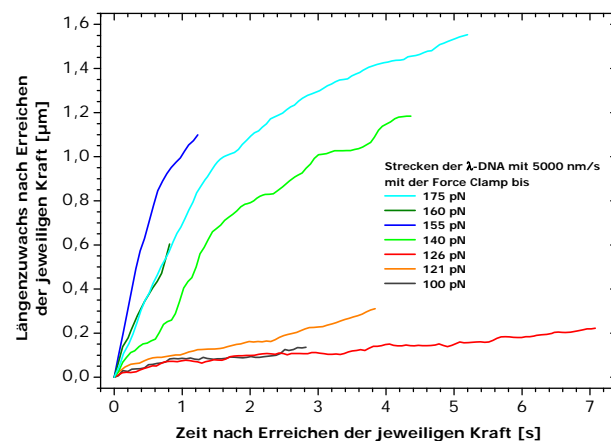
Betrachtet man vor allem das rechte Bild in Abbildung 64 genauer, dann fällt auf, daß die Kraftkurve mit der irreversiblen Domäne im Bereich bis etwa 15  $\mu\text{m}$  über der der intakten dsDNA verläuft. Eine identische Situation für fast den gleich Längenbereich erhält man, wenn die Kraftkurve einer dsDNA mit einer reinen ssDNA verglichen wird. Deren erster Schnittpunkt liegt auch dort bei 15  $\mu\text{m}$  und 5 pN [Rouzina 2001a]. Dies läßt den Schluß zu, daß im Falle der DNA mit der irreversiblen Domäne zu Beginn des Kraftanstieges zunächst vor allem die Domäne - bestehend aus lediglich einem Einzelstrang - gestreckt wird. Dies

wiederum bedeutet, daß auch alle geschmolzenen Domänen aus Einzelsträngen bestehen müssen.

Die beiden letzten Aussagen scheinen konträr zueinander zu sein. Eine mögliche Auflösung dieses Problems besteht darin, davon auszugehen, daß zwar an den Strangbrüchen Einzelstränge abschmelzen, es aber auch Domänen innerhalb der intakten DNA geben muß, die lediglich aus dissoziierten Basenpaaren bestehen.

Ein weiterer wichtiger Punkt bezüglich des Abschmelzens von Einzelsträngen betrifft den Fall in Abbildung 58. Auch wenn dort behauptet wird, daß es nahezu unbedeutend ist, an welchen Termini die Kraft angreift, so gilt dies jedoch nicht für den Fall des vollständigen Abschmelzens eines Einzelstranges zwischen einem Strangbruch und einem Ende der DNA, was bei einer hohen Zugkraft der Fall wäre. Die DNA in Abbildung 58 B würden durchreißen, wenn alle Basenpaare rechts des Strangbruches dissoziieren. Bei Abbildung 58 A hingegen hält der Einzelstrang die DNA noch zusammenhalten.

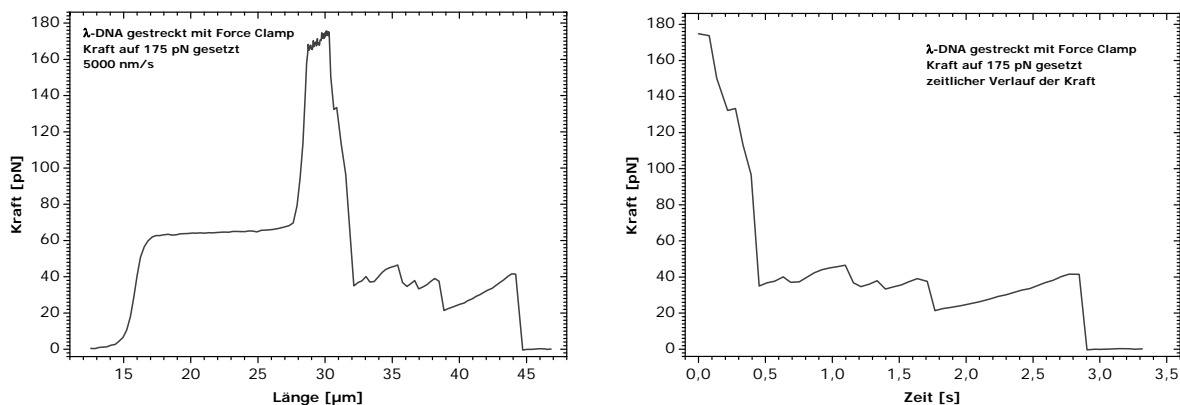
Bei einem abschließenden Versuch wurde die DNA mit der Force Clamp Methode gesteckt. Das Ziel war, herauszufinden, ob und wie sich die Länge der DNA in Abhängigkeit einer konstanten Kraft ändert, die am Molekül anliegt.



**Abbildung 65:** Die  $\lambda$ -DNA wird bis zu einer definierten Kraft ausgestreckt, wobei die Ziehgeschwindigkeit bis zum Erreichen dieser Kraft 5000 nm/s beträgt (die DNA ist in dem Moment je nach Zugkraft 28,2 bis 28,9  $\mu\text{m}$  lang). Die DNA vergrößert daraufhin trotz der konstanten Kraft ihre Länge, da sich weitere geschmolzene Domänen ausbilden können. Nach wenigen Sekunden unter der jeweiligen Zugkraft reißen entweder der DNA-Strang oder die Biotin-Streptavidin-Bindungen.

In Abbildung 65 läßt sich erkennen, daß bei einer Geschwindigkeit von 5000 nm/s und Kräften unter 130 pN sich kaum neue geschmolzene Domänen (bestehend entweder aus dissoziierten Basenpaaren oder aus abgeschmolzenen Einzelsträngen) ausbilden konnten - dementsprechend gering ist der Längenzuwachs. Ab 140 pN wird das Ausbilden dieser Domänen stark beschleunigt. Die Längenzunahme steigt deshalb nicht exakt linear mit der Kraft an, da für jedes Teilexperiment eine neue  $\lambda$ -DNA verwendet wurde. Infolge unterschiedlicher Strangbrüche scheint das Wachstum von Domänen daher mehr oder weniger stark begünstigt zu werden.

Das letzte Experiment mit der Force Clamp - die Messung mit 175 pN - zeigte noch einen weiteren interessanten Aspekt: Es war die erste Messung überhaupt, bei der es gelungen war, eine dsDNA etappenweise in ihrer Länge zu vergrößern und erst dann zu zerreißen.

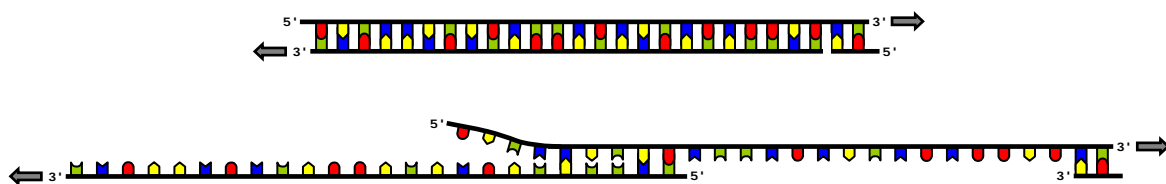


**Abbildung 66:** Links: Eine  $\lambda$ -DNA wird überstreckt, und reißt in mehreren Schritten durch. Rechts: Der Ausschnitt aus dem linken Graph von dem Zeitpunkt an, an dem 175 pN erreicht wurden, dargestellt als Kraft/Zeit Kurve.

Während in der Messung von Abbildung 63 rechts nach dem Stop die DNA in zwei Schritten hindurchriß (dabei war die Länge konstant gehalten), sorgt die Methode der Force Clamp dafür, daß nach einem Abfall der Kraft (als Folge des Übereinandergleitens der beiden vollständig abgeschmolzenen Einzelstränge und der darauffolgenden Rekombinierung einiger Basenpaare) das Molekül noch weiter ausgestreckt wird. Dies bewirkt einen neuen Kraftanstieg, der infolgedessen ein weiteres Dissoziieren von Basenpaaren und ein erneutes Übereinandergleiten der Einzelstränge hervorruft. Geschieht dies mehrmals, dann bildet sich ein Sägezahnmuster aus, wobei die "Größe" der Zähne von der Anzahl der jeweils neu ausgebildeten Basenpaare abhängt.

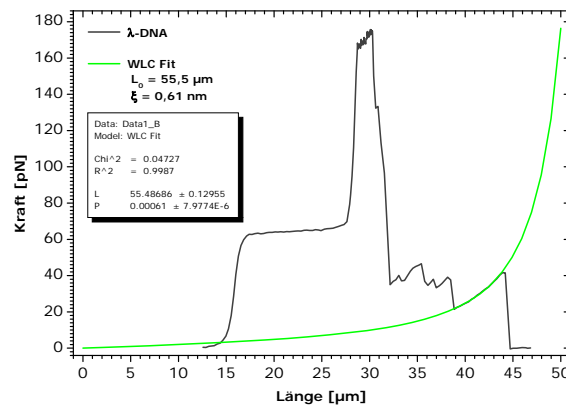
Zwei Möglichkeiten für das vollständige Abschmelzen beider Einzelstränge gehen dem voraus: Für den Fall, daß die DNA von Abbildung 66 keinen Strangbruch besaß, mußte

neben möglichen geschmolzenen Domänen innerhalb der DNA mindestens ein Einzelstrang von einem Ende her abschmelzen (so wie in Abbildung 59), um das Entwinden der DNA zu ermöglichen. Alle Basenpaare müssen daraufhin dissoziieren, auf daß die Einzelstränge sich voneinander trennen, übereinandergleiten, und sich kurz darauf einige neue Basenpaare ausbilden. Bei der zweiten Variante besaß die DNA mindestens einen Strangbruch (was als am wahrscheinlichsten anzusehen ist): Diese Brüche durften sich dann allerdings nur nahe den Enden der DNA befinden, auf dem Strang nahe des 5' Terminus. Strangbrüche weiter in der Mitte der DNA würden bei einer vollständigen Dissoziation der Basenpaare zu einem sofortigen Hindurchreißen der DNA führen.



**Abbildung 67:** Dem etappenweisen Durchreißen der DNA mit einem Strangbruch nahe eines 5' Terminus geht die vollständige Dissoziation der Basenpaare zwischen dem Strangbruch und dem gegenüberliegenden Ende voraus. Die beiden Einzelstränge in Form einer ssDNA gleiten übereinander weg, während sich gelegentlich neue Basenpaare ausbilden.

Nach dem ersten kompletten Dissoziieren der Basenpaare und dem darauffolgenden Über-einandergleiten liegen die Einzelstränge in Form einer ssDNA vor, gleichgültig ob sich daraufhin neue Basenpaare ausbilden. Im Mittel findet nur maximal jede vierte Base einen passenden Bindungspartner, wodurch der Überlappbereich der beiden Einzelstränge weniger als dsDNA angesehen werden könnte, sondern mehr als lose, miteinander verknüpfte ssDNAs. Die DNA kann somit nach dem ersten, starken Abfall der Kraft (auf 35 pN bei einer Länge von 32  $\mu\text{m}$ ), bis auf den kleinen dsDNA Bereich in Abbildung 67 unten rechts als ssDNA angesehen werden. Das Indiz dafür läßt sich geschickterweise aus der linken Kraftkurve von Abbildung 66 extrahieren. Der erste, triviale Grund hierfür sind die erreichten 44  $\mu\text{m}$  bis die DNA endgültig durchreißt (selbst einen Einzelstrang mit 48502 Basen auf 44  $\mu\text{m}$  Länge zu ziehen ist unmöglich). Den zweite Hinweis findet man, wenn an den Bereich zwischen 39 und 44  $\mu\text{m}$  ein WLC-Fit angelegt wird (siehe Abbildung 68). Hieraus folgt eine Konturlänge von 55,5  $\mu\text{m}$  und eine Persistenzlänge von 0,61 nm. Letztere stimmt größenordnungsmäßig sehr gut mit der Persistenzlänge einer ssDNA von 0,75 nm überein [Smith 1996]. Das bedeutet, daß ein oder mehrere dsDNA Reste im Molekül nicht mehr ins Gewicht fallen.



**Abbildung 68:** Der WLC Fit des Längenbereiches von 39 bis 44  $\mu\text{m}$  ergibt eine Persistenzlänge von 0,61 nm, die gut mit der einer ssDNA ( $\xi = 0,75 \text{ nm}$ ) übereinstimmt.

Ausgehend davon kann beispielsweise die Länge des Überlappbereiches bei 44  $\mu\text{m}$  errechnet werden. Die Kraft an diesem Punkt ist 43 pN. Nach [Smith 1996] beträgt der Basenabstand einer ssDNA bei dieser Kraft 0,55 nm. Die DNA hat somit eine Länge von mindestens 80000 Basen, und der Überlappbereich kann demnach nicht länger als 17000 Basen sein.

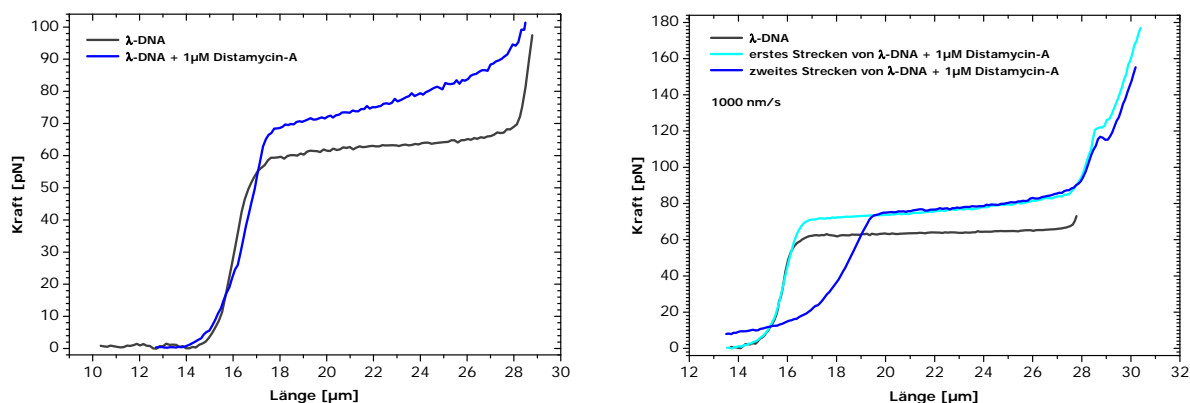
### 3.5 Groove Binder

Die Methodik dieses Experiment - wie auch für alle folgenden bis inklusive Kapitel 3.8 - ist analog wie beim Anbinden einer  $\lambda$ -DNA. Zusätzlich wird vor Beginn der Kraftmessung eine Lösung der jeweiligen DNA-bindenden Liganden in der gewünschten Konzentration in die Flüssigkeitszelle eingeleitet.

#### 3.5.1 Distamycin-A

Im ersten Versuch wird eine Lösung von 1  $\mu\text{M}$  Distamycin-A in die Flüssigkeitszelle eingebracht. In dieser Konzentration bindet der Ligand ausschließlich im 1:1 Bindungstyp und besitzt eine Bindungskonstante von  $10^7$ - $10^8 \text{ M}^{-1}$  [Pelton 1989; Bielawski 2001].

Die Kraftkurve zeigt noch ein geneigtes, und in der Kraft auf 70 - 85 pN erhöhtes Überstreckungsplateau (Abbildung 69). Eine weitere Messung förderte zu Tage, daß auch beim  $\lambda$ -DNA-Distamycin-A-Komplex ein zweites Überstreckungsplateau bei etwa 120 pN zu finden ist. Zudem bildete sich beim ersten, starken Überstrecken eine irreversibel geschmolzene Domäne aus (analog zu Abbildung 64).



**Abbildung 69:** Links: Die Kraftkurve eines  $\lambda$ -DNA-Distamycin-A-Komplexes bei 300 nm/s. Rechts: Starkes Überstrecken des  $\lambda$ -DNA-Distamycin-A Komplexes lässt eine irreversible Domäne entstehen.

Weiterhin haben die Relaxierungshysterese eine ähnliche Form und Größe, wie die einer  $\lambda$ -DNA, was bedeutet, daß Distamycin keinen meßbaren Einfluß auf die Rekombinierung von geschmolzenen Domänen hat.

Die Existenz des Überstreckungsplateaus ist ein weiteres Indiz dafür, daß zwar die Entstehung von geschmolzenen Domänen leicht behindert (daher auch das erhöhte Plateau), jedoch nicht verhindert wird.

Die Kraftkurve hat immer denselben Verlauf, unabhängig davon, ob das Molekül mit 100 nm/s oder 12000 nm/s gestreckt wird.

Das Binden von Distamycin-A hat kaum eine nennenswerte Auswirkung auf die mit Hilfe des WLC Fits bestimmte Konturlänge von 16,3  $\mu\text{m}$  ( $\lambda$ -DNA: 16,2  $\mu\text{m}$ ), während sich die Persistenzlänge auf 26,7 nm ( $\lambda$ -DNA: 46 nm) reduzierte.

Vor allem das Ausbilden von bis zu vier gegabelten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren scheint die Hauptursache für die erhöhte Stabilität des Komplexes im Vergleich zur  $\lambda$ -DNA zu sein, die sich in einem erhöhten Überstreckungsplateau manifestiert. Die Basenpaare wurden auf diese Weise durch das Distamycin zusätzlich stabilisiert, und setzen dem kraftinduzierten Schmelzen einen Widerstand entgegen. Vergleichsmessungen mit Netropsin, ebenfalls ein minor groove binder, ergaben einen ähnlichen Anstieg des Überstreckungsplateaus [Krautbauer 2002a]. NMR-Untersuchungen zeigten zudem, daß beim Binden von Distamycin sich die Nebenfurche von 0,94 auf 0,7 nm verengt [Olsen 2003]. Bei Netropsin hingegen wurde eine Aufweitung der Nebenfurche festgestellt, zusammen mit einer Erhöhung der Persistenzlänge auf 56 nm [Tessmer 2003]. Dies legt den Schluß nahe, für einen (zumindest mittelbaren) Zusammenhang zwischen der Persistenzlänge und strukturellen Veränderungen innerhalb

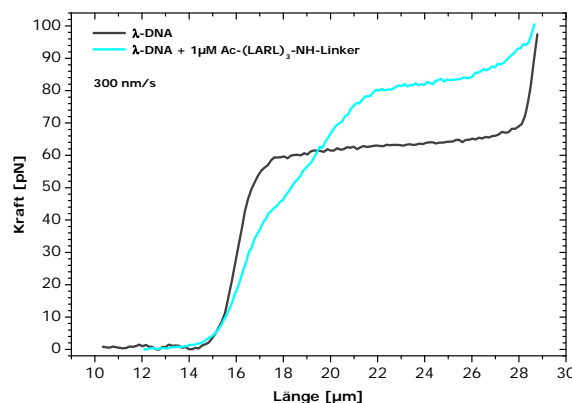


der Nebenfurche. Eine weitere Ursache für die Reduzierung der Persistenzlänge kann in der positiv geladenen Amidiniumgruppe ( $\text{NH}_2^+$ ; siehe Abbildung 13 links) zu finden sein, da diese positive Ladung die negative des DNA Rückgrates teilweise abschirmt, und somit dem Komplex eine erhöhte mechanische Flexibilität verleiht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit Messungen des Komplexes aus poly(dG-dC) dsDNA und Distamycin [Eckel 2003] verglichen. Dort zeigte sich jedoch ein leichtes Absinken des Überstreckungsplateaus als Folge des Bindens von Distamycin. Dies könnte im Zusammenhang mit der verringerten Bindungsaffinität von  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  für GC-reiche DNA [Bielawski 2001] stehen.

### 3.5.2 Ac-[LARL]<sub>3</sub>-NH-Linker

Die Kraftkurve dieses  $\alpha$ -helikalen Peptids zeigt ebenfalls ein in der Länge verkürztes Überstreckungsplateau zwischen 80 und 85 pN.



**Abbildung 70:** Die Kraftkurve des  $\lambda$ -DNA-Peptid Komplexes ist ein Hinweis für eine Bindung in der Haupt- bzw. Nebenfurche der DNA.

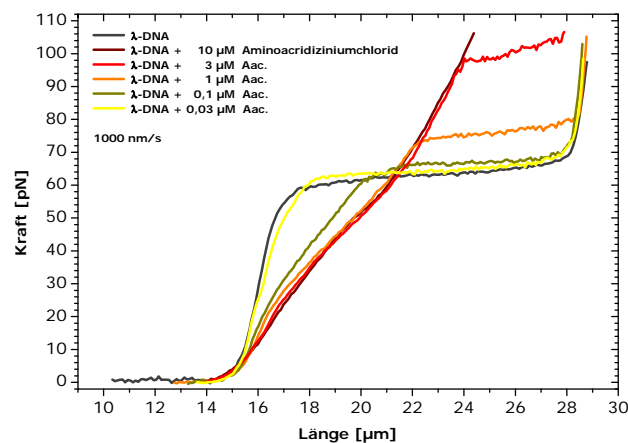
Der Knick in der Kraftkurve zwischen 17 und 22  $\mu\text{m}$  könnte ein Indiz für einen Bindungsmodus sein, der sich vom gewöhnlichen minor groove binder unterscheidet, und somit eher einem Binden in der Hauptfurche zugeordnet werden kann. Dies wurde auch von anderer Seite in Betracht gezogen [Niidome 1996], wobei hier die unspezifische Wechselwirkung zwischen den positiven Guanidiniumgruppen und dem DNA-Rückgrat eine entscheidende Rolle spielte. Hierbei tritt ebenfalls der Effekt des Abschirmens der intrinsischen negativen Ladung im Rückgrat auf, denn die Persistenzlänge ist auf 29,4 nm reduziert (die Konturlänge beträgt andererseits 16,5  $\mu\text{m}$ ). Bei dem Peptid fanden sich auch ähnliche Relaxierungshysteresen wie bei der  $\lambda$ -DNA. Weiterhin hatte die Kraftkurve bei allen zugänglichen Ziehgeschwindigkeiten immer den gleichen Verlauf.

Kraftmessungen an einem poly(dG-dC)-Peptid-Komplex [Eckel 2003] deuteten auf ein Verschwinden des Knickes in der Kraftkurve hin, was entweder bedeuten kann, daß dieses Peptid eine unterschiedliche Bindungsspezifität für GC-reiche Regionen besitzt, oder dort einen minor groove Bindungsmodus besitzt. Würde letzteres der Fall, muß das Peptid an der  $\lambda$ -DNA sowohl in der Haupt- als auch in der Nebenfurche binden.

### 3.5.3 Aminoacridiziniumchlorid

Wie im Kapitel 3.6 beschrieben wird, weichen die Kraftkurven aller Interkalatoren deutlich von der einer dsDNA ab. Auch der reine Interkalator 6-Aminoacridiziniumchlorid (ebenso wie das in der Struktur identische 6-Aminoacridiziniumbromid [Ihmels 2003]) bildet da keine Ausnahme.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden jedoch Kraftkurven gemessen, die die Interkalation zunächst in Frage stellten:

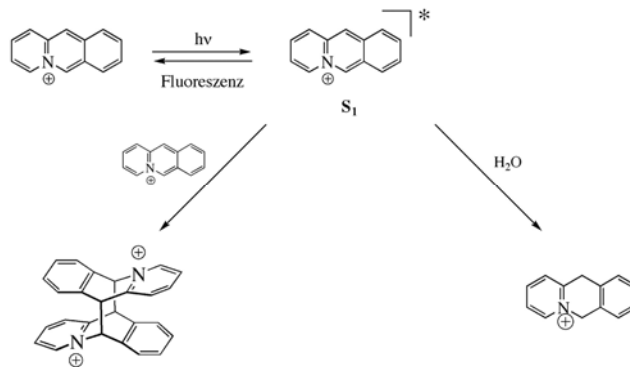


**Abbildung 71:** Die Kraftkurven von Aminoacridiziniumchlorid bei verschiedenen Konzentrationen weisen nicht auf ein Interkalieren hin.

Das waren zum einen das noch größtenteils vorhandene Überstreckungsplateau. Weiterhin begann der Kraftanstieg analog dem der  $\lambda$ -DNA bei etwa 15  $\mu\text{m}$ , und der letzte Punkt war das Auftreten der Relaxierungshysterese (siehe auch Diskussion in Kapitel 3.6.1). Der WLC-Fit ergab je nach Konzentration eine Konturlänge von 16,8  $\mu\text{m}$  bei 10  $\mu\text{M}$  und 16,1  $\mu\text{m}$  bei 0,03  $\mu\text{M}$ . Die Persistenzlänge lag für 10, 3 und 1  $\mu\text{M}$  bei  $29,4 \pm 5,3$  nm.

Nach der Form der Kraftkurve zu urteilen, konnte diese Substanz nur ein groove binder sein. Höchstwahrscheinlich fand eine Bindung in der Hauptfurche statt.

Die Ursache hierfür in der Lichtempfindlichkeit des Aminoacridiziniums. Die in den  $S_1$ -Zustand angeregten Moleküle können in Gegenwart von Wasser und nichtangeregten Molekülen dimerisieren [Ihmels 2005]:



**Abbildung 72:** Die möglichen Reaktionswege des angeregten Acridiziniums. Die Dimerisierung bewirkt das Entstehen einer nicht-planaren Verbindung [Ihmels 2005].

Da ausschließlich flache, aromatische Moleküle interkalieren können [Coury 1996; Graves 2000; Reha 2002], ist es dem dimerisierten Aminoacridizinium nicht mehr möglich, in seiner räumlich ausgedehnten Form sich zwischen die Basenpaare zu schieben. Infolge der zwei positiv geladenen Iminogruppen kann dieses Molekül noch elektrostatisch mit dem Rückgrat der DNA interagieren, was eine Bindung in der Haupt- oder Nebenfurche nahelegt.

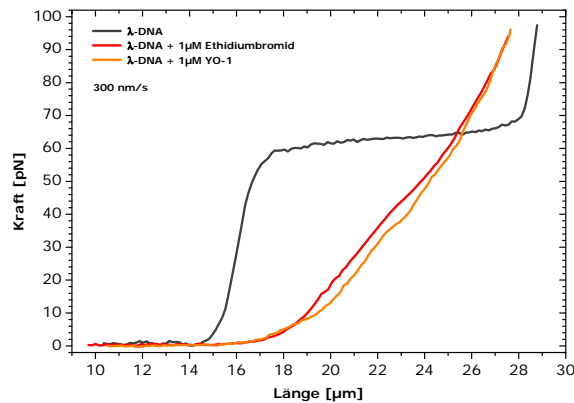
## 3.6 Interkalatoren

### 3.6.1 Ethidiumbromid und YO-1

Die Kraftkurven von Ethidiumbromid und YO-1 (Abbildung 73) lassen in beiden Fällen ein komplettes Verschwinden des Überstreckungsplateaus erkennen. Auch wenn die Ursache hierfür noch nicht geklärt ist, so kann dies nur auf eine direkte Wechselwirkung der Interkalatoren mit den Basenpaaren zurückzuführen sein. Die Interkalation bewirkt, daß das Ausbilden von geschmolzenen Domänen in der Form, wie es die Theorie von Bloomfield vorsieht, verhindert wird. Die Bindung zwischen Interkalator und Basenpaar gründet unter anderem auf der Wechselwirkung zwischen den beweglichen  $\pi$ -Elektronen des Interkalators (Delokalisierung) und den  $\pi$ -Elektronen der Aromatenringe der Basen.

Das Fehlen einer Relaxierungshysterese ist ein weiteres Indiz dafür, daß sich keine geschmolzene Domänen ausbilden. Die Kraftkurven beim Strecken und Relaxieren sind bei allen Geschwindigkeiten zwischen 100 und 12000 nm/s ausnahmslos identisch, was

außerdem daraufhin deutet, daß der  $\lambda$ -DNA-Interkalator Komplex, im Gegensatz zu allen anderen Messungen zuvor in dieser Arbeit, in einem Gleichgewichtszustand vorlag. Strangbrüche, gleich welcher Anzahl, haben keinen Einfluß auf die Stabilität des Komplexes, wie Messungen an mehreren  $\lambda$ -DNAs zeigten.



**Abbildung 73:** Die Kraftkurven der beiden Interkalatoren zeigen die drei "klassischen" Merkmale: Verschwinden des Überstreckungsplateaus, Erhöhung der Konturlänge, und das Nichtvorhandensein einer Relaxierungshysterese.

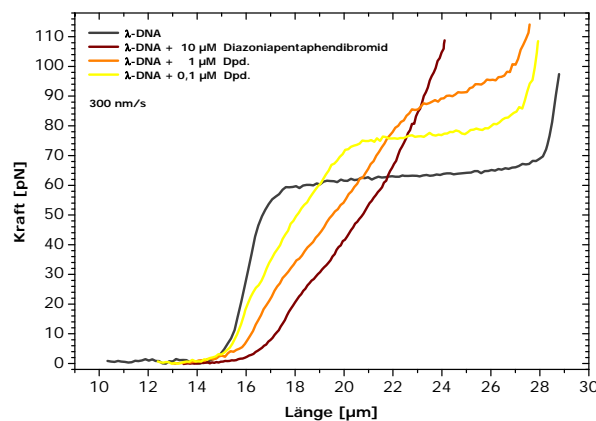
Die erhöhte WLC Konturlänge von 20,4  $\mu\text{m}$  für Ethidiumbromid und 19,8  $\mu\text{m}$  für YO-1 läßt sich bereits am "verzögerten" Kraftanstieg ab etwa 18  $\mu\text{m}$  Länge erkennen. Da jeder Interkalator den Basenpaarabstand um 0,34 nm vergrößert, kann auf Basis der erhöhten Konturlänge die Zahl der interkalierenden Moleküle errechnet werden. Etwa 12400 Ethidiumbromidmoleküle und 10600 YO-1 Moleküle interkalierten in einer  $\lambda$ -DNA, was bedeutet, daß jede vierte (siehe auch [Husale 2002]) und jede 4,6te Interkalationsstelle besetzt ist. Dies bedeutet auch, daß bei 1  $\mu\text{M}$  noch keine Sättigungskonzentration beider Interkalatoren vorlag. In diesem Fall würde jede zweite Interkalationsstelle besetzt werden.

Die Persistenzlänge von 20,7 nm bei Anwesenheit von Ethidiumbromid (die die Messungen von [Tessmer 2003] bestätigt) und 29,2 nm bei YO-1 ist auf die elektrostatische Wechselwirkung von einer positiv geladenen Iminogruppe bei beiden Substanzen, sowie einer positiv geladenen Aminogruppe bei YO-1 zurückzuführen. Die Aminogruppe ragt jedoch in die Nebenfurche der DNA hinein. Das scheint die Ursache für die etwas höhere Persistenzlänge des YO-1 zu sein (siehe auch Kapitel 3.7).

Die Tatsache, daß die Kraftkurve der Interkalatoren die Spanne zwischen 18 und 28  $\mu\text{m}$  nicht in Form eines Plateaus, sondern mit einem nahezu konstanten Kraftanstieg überbrückt, kann als Hinweis für eine gleichmäßige Zunahme des Abstandes der Basenpaare während des Streckens angesehen werden.

### 3.6.2 Diazoniapentaphendibromid

Erst eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Diazoniapentaphendibromid ließ das Überstreckungsplateau für den gemessenen Kraftbereich komplett verschwinden. Die Konturlänge betrug 18,2  $\mu\text{m}$ , und dementsprechend waren circa 5900 Moleküle in die  $\lambda$ -DNA interkaliert. Dennoch stieg die Kraft ab 17  $\mu\text{m}$  stärker an, als bei Ethidiumbromid und YO-1, was sich durch eine wesentlich stärkere Interaktion der fünf Aromatenringe des Diazoniapentaphendibromids mit den Aromatenringen der Basenpaare erklären läßt.



**Abbildung 74:** Die Kraftkurven für drei Konzentrationen des Diazoniapentaphendibromids.

Die zwei positiv geladenen Iminogruppen sind für eine Reduzierung der Persistenzlänge auf 24,0 nm verantwortlich.

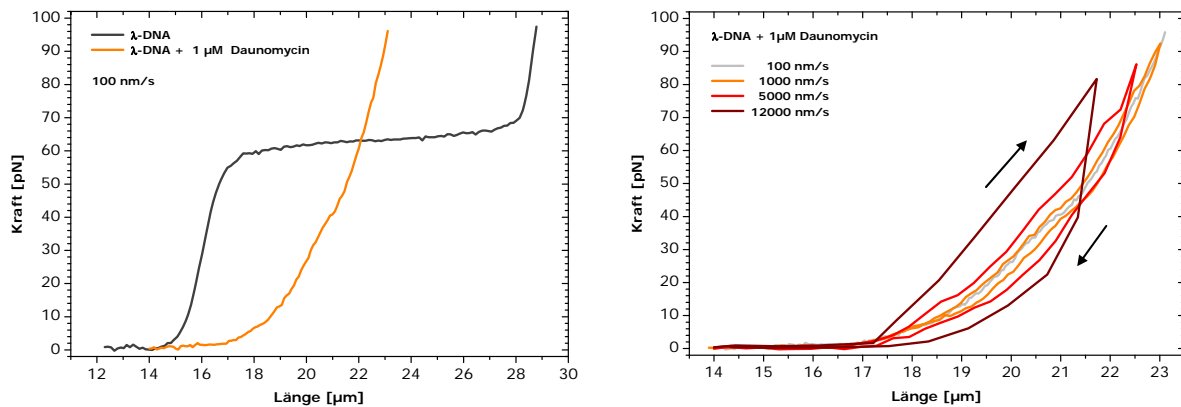
Mit abnehmender Konzentration ist deutlich der Rückgang der Konturlänge (17,2  $\mu\text{m}$  bei 1  $\mu\text{M}$  und 16,4  $\mu\text{m}$  bei 0,1  $\mu\text{M}$ ) zu erkennen. Die geringere Anzahl der interkalierten Moleküle sorgt für einen kontinuierlichen Übergang zwischen der reinen Interkalator-Kraftkurve und dem Überstreckungsplateau der DNA. Wenige (< 3000) interkalierte Moleküle scheinen hierbei das Entstehen von geschmolzenen Domänen noch leicht zu behindern. Dem gegenüber nimmt mit geringerer Konzentration die Persistenzlänge wieder zu (28,4 nm bei 1  $\mu\text{M}$  und 37,5 nm bei 0,1  $\mu\text{M}$ ).

## 3.7 Hystereseneffekte bei Daunomycin und YOYO-1

Als Resultat des WLC Fits der Kraftkurve von Daunomycin bei einer Geschwindigkeit von 100 nm/s erhält man eine Konturlänge von 19,8  $\mu\text{m}$  und eine Persistenzlänge von 28,1 nm. Letztere ist damit größer als die von Ethidiumbromid und fast identisch mit der von YO-1. Auch Daunomycin besitzt eine positiv geladene Seitenkette, die in die kleine Furche

hineinragt. Diese Besonderheit scheint unter anderem die Ursache für die erhöhte Persistenzlänge zu sein.

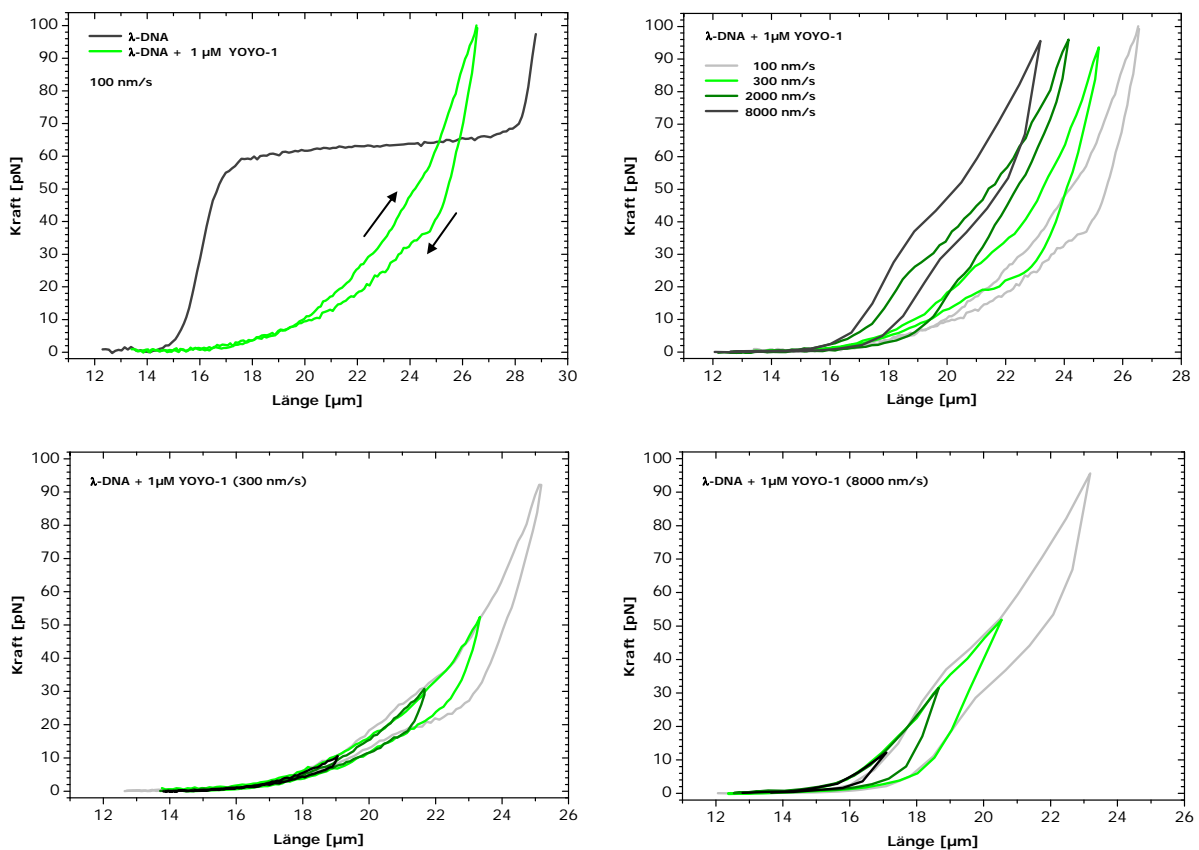
Bei 100 nm/s sind Streckungs- und Relaxierungskurve wie bei allen anderen Interkalatoren identisch. Wird jedoch die Geschwindigkeit merklich erhöht ( $\geq 1000$  nm/s), so verläuft die Streckungskurve stets über der Relaxierungskurve. Mit wachsender Geschwindigkeit schließen einerseits beide Kurven eine immer größere Fläche ein, und der Gradient der Streckungskurve steigt zusehends an. Obwohl Daunomycin bisher schon mit AFM-Kraftmessungen untersucht wurde [Eckel 2003], war dies die erste bekannte Entdeckung einer Krafthysterese am DNA-Daunomycin-Komplex [Sischka 2005] - und somit für einen Monointerkalator.



**Abbildung 75:** Links: Die Kraftkurve von Daunomycin ist bei Streckung und Relaxierung identisch. Rechts: Bei höheren Ziehgeschwindigkeiten bilden sich Hysteresen, wenn nach der Streckung bis zu einer definierten Kraft die Ziehrichtung umgekehrt wird.

Der DNA-YOYO-Komplex [Bennink 1999; Eckel 2003; Sischka 2005] zeigte selbst bei geringsten Ziehgeschwindigkeiten bis hinunter zu 10 nm/s eine ausgeprägte Hysterese. Deren eingeschlossene Fläche wächst jedoch mit zunehmender Geschwindigkeit nur mäßig an. Hingegen verschieben sich Streck- und Relaxierungskurven zu geringeren Längen (Abbildung 76 rechts oben). Auch bei geringen Kräften bilden sich Hysteresen aus (Abbildung 76 unten), was ein erster Hinweis darauf ist, daß dieser Effekt nichts mit der gewöhnlichen Relaxierungshysterese einer dsDNA gemein haben kann, und auf einem völlig anderen Prinzip basieren muß.

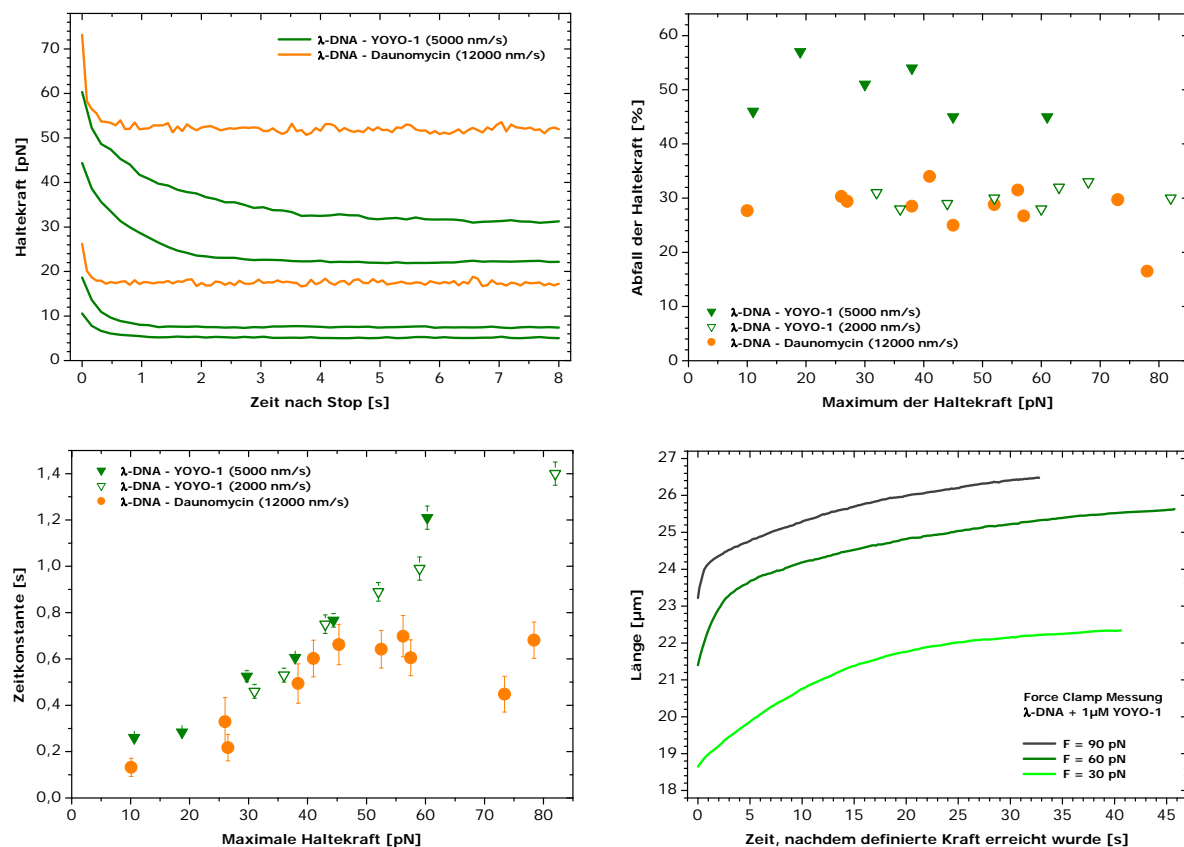
Wird der Komplex bis zu einer vordefinierten Kraft gestreckt, und die Bewegung beim Erreichen dieser Kraft gestoppt, so läßt sich ein zeitlich exponentieller Abfall der Haltekraft beobachten, wenn das Molekül bei einer konstanten Länge gehalten wird.



**Abbildung 76:** Links oben: YOYO-1 zeigt selbst bei geringen Geschwindigkeiten eine deutliche Hysterese. Rechts oben: Streckungs- wie Relaxierungskurve werden mit steigender Geschwindigkeit zu geringeren Längen verschoben. Unten: Hysteresen bilden sich auch bei geringen Zugkräften aus.

Es wurde der Daunomycin- und der YOYO-1-Komplex bei zwei verschiedenen Geschwindigkeiten gestreckt. Um eine sinnvolle Messung zu erhalten, wurde die Ziehgeschwindigkeit bei Daunomycin auf 12000 nm/s gesetzt, und die Datenrate reduziert, mit der die Kraftdaten in den Rechner eingelesen wurden. Aus diesem Grund waren die Kraft/Zeit Kurven bei Daunomycin mit mehr Rauschen (Abbildung 77 oben links) und die daraus errechneten Zeitkonstanten (Abbildung 77 unten links) mit einem größeren Fehler behaftet.

Der exponentielle Kraftabfall auf ein tieferes Kraftniveau bei beiden Komplexen weist auf einen neu erreichten Gleichgewichtszustand hin. Der nahezu lineare Anstieg der Zeitkonstante (Zeit, bis die Kraft auf 1/e der Differenz zwischen maximaler Kraft und Kraft im Gleichgewichtszustand abgefallen ist) bei YOYO in Abhängigkeit von der maximalen Haltekraft (dies ist die vordefinierte Kraft, bis zu der das Molekül ausgestreckt wird) wies auf eine veränderte Kinetik hin, ganz im Gegensatz zum DNA-Daunomycin Komplex, bei dem ab 45 pN die Kinetik unverändert blieb.



**Abbildung 77:** Oben links: Der exponentielle Abfall der Haltekraft einiger exemplarischer Messungen, nach dem das Ausstrecken des Moleküls gestoppt wurde. Die hieraus ermittelten Zeitkonstanten zeigten eine individuelle Kinetik beider Komplexe (unten links). Der prozentuale Abfall der Haltekraft konnte leicht ermittelt werden (oben rechts). Unten rechts: Force-Clamp-Messung an YOYO-1. Bei einer konstanten Haltekraft wurde die zeitliche Änderung der Länge des Moleküls gemessen (die Geschwindigkeit bis zum Erreichen der Haltekraft betrug 6000 nm/s). Aus dem Längenzuwachs ließen sich unter anderem zwei kraftabhängige Zeitkonstanten ermitteln (siehe Text).

Bennink et al. ermittelten bei einem  $\lambda$ -DNA-YOYO-1 Komplex mit einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M an freien YOYO-1 Moleküle mit Hilfe der Force-Clamp-Methode eine Zeitkonstante (etwa 35 Sekunden bei einer Längenzunahme auf  $1/e^2$  des Abstandes zwischen  $L(t=0)$  und  $L(t=\infty)$ , und somit 17,5 Sekunden bei einer Zunahme auf  $1/e$ ). Sie war jedoch unabhängig von der jeweiligen Haltekraft.

Die Messungen in dieser Arbeit bei 1  $\mu$ M freier YOYO-1 Moleküle zeigten jedoch eine Längenzunahme gemäß



$$L(t) = L(t = \infty) - c_1 \cdot \exp\left[-\frac{t}{\tau_1}\right] - c_2 \cdot \exp\left[-\frac{t}{\tau_2}\right],$$

wobei  $\tau_1$  und  $\tau_2$  die beiden kraftabhängigen Zeitkonstanten sind (mit einer einzigen Zeitkonstante war kein vernünftiger Fit der Daten aus Abbildung 77 unten rechts möglich). Der Fit jener Gleichung ergibt folgende Werte:

Haltekraft	$L(t = \infty)$	$\tau_1$	$\tau_2$
30 pN	22,5 $\mu\text{m}$	5,08 s	10,2 s
60 pN	26,0 $\mu\text{m}$	1,57 s	24,8 s
90 pN	27,1 $\mu\text{m}$	0,45 s	18,3 s

Bevor weiter auf die Zeitkonstanten eingegangen wird, ist die Frage nach dem Ursprung dieser Hysteresen zu klären. Alle Hysteresen waren sowohl bei Daunomycin als auch bei YOYO-1 exakt reproduzierbar, und zeigten auch bei Folgeexperimenten immer die gleiche Form. Deshalb können dies keine Relaxierungshysteresen im eigentlichen Sinne sein, so wie sie beispielsweise in Abbildung 61 und Abbildung 62 auftraten. Auch die Kraftzunahme in diskreten Schritten (wie in Abbildung 62) fand ebenfalls nicht statt, wenn beim *Relaxieren* von Daunomycin und YOYO-1 plötzlich gestoppt wurde - dann nahm die Haltekraft aber gleichermaßen *zu*, ganz im Gegensatz zu Abbildung 77 oben links (die Kraftkurven ständen dann auf dem Kopf).

Auf jeden Fall befanden sich beide Komplexe (mit Ausnahme von Daunomycin bei Geschwindigkeiten unter 1000 nm/s) bei sich verändernden äußeren Bedingungen (Kraft und Länge) in einem Nicht-Gleichgewichtszustand. Rief et al. [Rief 1998] entwickelten ein Modell, in dem die Elastizität von Biopolymeren anhand von Segmenten erklärt wird. Diese können sich zeitlich in ihrer Länge verändern (aufgrund konformeller Strukturänderungen infolge einer äußeren Kraft, basierend auf thermodynamischen Faltungs- und Ent-Faltungsprozessen der Segmente). Die Verlängerung dieser Segmente kann im Fall von Daunomycin und YOYO-1 als eine kraftinduzierte Veränderung kleiner Abschnitte der DNA angesehen werden, in die dann *zusätzliche* Moleküle interkalieren können.

Wirkt auf die DNA somit keine äußere Kraft, sind wenige potentielle Interkalationsstellen durch Daunomycin oder YOYO-1 besetzt. Deren Anzahl kann wiederum leicht auf Basis der Konturlänge beider Komplexe errechnet werden: Bei Daunomycin sind zu Beginn etwa 10600 Interkalationsstellen besetzt, bei YOYO-1 (die Konturlänge beträgt bei der Kraftkurve mit 100 nm/s 21,8  $\mu\text{m}$ ) mindestens 8200. Hierbei ist bereits berücksichtigt, daß der Bisinterkalator YOYO-1 an gleich zwei Stellen interkaliert (siehe Abbildung 20), und somit die DNA um 0,68 statt 0,34 nm verlängert - vorausgesetzt, der Basenabstand der zwei, zwischen

den beiden Ringsystemen des YOYO-1 eingeschlossenen Basenpaare bleibt bei der Interkalation konstant. Da infolge der "nearest neighbour exclusion" zwischen zwei (Bis-)Interkalatoren mindestens eine freie Interkalationsstelle vorhanden sein muß [Carell], beansprucht ein YOYO-1 Molekül vier statt zwei Interkalationsstellen. Daher können pro  $\lambda$ -DNA nur maximal 12125 YOYOs interkalieren. Dieser Wert (wie auch die maximal möglichen 24251 bei einem Monointerkalator) wird aber nie erreicht, da die DNA nicht von einer Seite aus kontinuierlich aufgefüllt wird, sondern sich die Interkalatoren (so sie denn keine Präferenzen für bestimmte Regionen der DNA besitzen) infolge des dynamischen Bindungsgleichgewichtes an beliebiger Stelle aus- und wieder einlagern. Deshalb befinden sich zum Beispiel auch häufig zwischen zwei Monointerkalatoren zwei potentielle Bindungsstellen, dann aber nicht durch einen weiteren Monointerkalator aufgefüllt werden können (bei drei Bindungsstellen wäre es hingegen wieder möglich).

Mit zunehmender Kraft bzw. mit zunehmender Länge könnte sich die Struktur des Komplexes so verändern, daß mehr und mehr neue potentielle Bindungsstellen entstehen. Ebenfalls denkbar ist, daß bereits interkalierte Moleküle während des Streckens wieder herausgedrängt werden, und an anderer Stelle erneut interkalieren. Grundsätzlich ist aber die oben angesprochene zusätzliche Interkalation die wahrscheinlichste Variante für die Ursachen des Kraftabfalls in Abbildung 77 oben links und die Längenzunahme in Abbildung 77 unten rechts: Nach dem Stop der Streckung helfen zusätzlich interkalierende Moleküle, die DNA noch weiter auszudehnen, wodurch die benötigte Haltekraft sich im selben Maße reduziert. Nach dem Erreichen einer definierten Haltekraft bei der Force-Clamp-Messung verlängern diese zusätzlichen Interkalatoren die DNA ebenfalls. Deren Anzahl läßt sich hieraus leicht ermitteln: Bei 6000 nm/s beträgt die Konturlänge etwa 18,4  $\mu\text{m}$ . Das bedeutet, bereits mindestens 3800 YOYO-Moleküle sind interkaliert. Während der Längenzunahme bei 30, 60 und 90 pN finden noch weitere 5700, 6700 und 5700 Interkalatoren ihren Platz in der DNA.

Die zusätzliche Interkalation ist auch eine Erklärung für die geringere prozentuale Abnahme der Haltekraft in Abbildung 77 oben links, wenn mit einer geringeren Geschwindigkeit bis zu einer definierten Kraft gezogen wird. Die benötigte Zeitspanne bis zum Erreichen dieser Kraft ist größer, wobei infolge dessen bereits mehr Moleküle Zeit hatten sich einzulagern.

Da ein Nicht-Gleichgewichtszustand auch während der Relaxierung vorliegt, müssen in diesem Fall die zusätzlichen Interkalatoren wieder aus dem Komplex herausgedrängt werden. In diesem Zusammenhang ließe sich auch eine Erklärung für die unterschiedliche Stärke der Hysteresen finden. Die klammerartige Form des YOYO-1-Moleküls könnte die Ursache für die deutlich ausgeprägtere Hysterese als bei Daunomycin sein. Die noch vor Beginn des Streckens eingelagerten YOYO-Moleküle könnten unter Einwirkung einer äußeren Kraft auf die DNA teilweise wieder herausgedrängt werden, da sich beim Strecken

der Basenabstand vergrößern muß, und somit sterische Verformungen in der Umgebung eines YOYO Moleküls unvermeidlich sind. Jedes YOYO-Molekül würde während des Streckens und Relaxierens erst einen Teil der Verformungsarbeit in sich aufnehmen, bevor es aus der DNA herausgedrängt wird. Dies ist eine die Erklärung, warum bei einer bestimmten Länge der DNA die Kraft beim Strecken stets größer ist, als beim Relaxieren.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß beim Strecken sowohl ein Herausdrängen, aber ein weitaus stärkeres zusätzliches Anlagern von YOYO-Molekülen die Ursache für die stets höhere Kraft als beim Relaxieren ist.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß beim Erreichen einer hohen Kraft der Basenabstand bereits so weit vergrößert worden ist, daß bei einem zusätzlich sich einlagernden YOYO nunmehr nur noch ein Basenpaar zwischen seine beiden Ringsysteme paßt. Solch interkalierende YOYOs nehmen dann beim Relaxieren zunächst den Druck der sich wieder annähernden Basenpaare bis zu einem gewissen Grad auf, was die benötigte Haltekraft absinken läßt, werden aber später wieder herausgedrängt.

Die Kinetik von Daunomycin ab 45 pN Haltekraft gibt ebenfalls noch Rätsel auf: Der prozentuale Abfall der Haltekraft bleibt auch über 45 pN nahezu konstant, was auf eine konstante Zahl und eine Ratenunabhängigkeit der zusätzlich interkalierenden Daunomycin-Moleküle schließen läßt. Offensichtlich bilden sich ab 45 pN verstärkt zusätzliche neue Interkalationsstellen für Daunomycin aus, so daß die schnelle Kinetik gewahrt bleibt. Bei YOYO hingegen ist es bei weiter steigender Haltekraft den Molekülen nicht mehr möglich, genügend schnell zu interkalieren.

Das Herausdrängen als weitere Erklärung der Kinetik des Daunomycin heranzuziehen ist nicht vorstellbar, auch wenn die Seitenkette (der Aminozucker in Abbildung 16) als möglicher zweiter "Haltepunkt" des Moleküls an der DNA angesehen würde. Es sollten dann aber bei YO-1, bei dem ebenfalls eine positiv geladene Seitenkette mit der kleinen Furche wechselwirkt, auch Hysteresen auftreten. Möglich sind auftretende Hysteresen bei Geschwindigkeiten von deutlich über 12000 nm/s, die zwar mit dem momentanen Setup der Optischen Pinzette erreichbar sind. Es kann durch die Kürze der Messungen dann nur eine geringe Anzahl von Kraftdaten aufgezeichnet werden.

Interessant bei YOYO sind hingegen die deutlich unterschiedlichen Zeitkonstanten bei der Längenzu- und der Kraftabnahme. Bei der Abnahme der Haltekraft verlängert sich die DNA um weniger als 300 nm, da mit geringerer Haltekraft das Kügelchen in der Falle nicht mehr so stark aus dem Fallenmittelpunkt ausgelenkt wird ( $\Delta L = \Delta F / k$ ). Es können noch etliche zusätzliche Moleküle interkalieren, nur die absinkende Haltekraft verringert ihrerseits auch die Zahl der möglichen neuen Interkalationsstellen. Dennoch sollte die Zeitkonstante bei der Force-Clamp-Methode ähnlich gering sein. Hierbei muß jedoch infolge der zusätzlichen

Interkalation die Länge der DNA stetig "nachgeregelt" werden, was neue Interkalationsstellen entstehen läßt und die Kinetik beeinflusst.

Die Assoziierung der Interkalatoren mit der DNA geschieht in einem ersten, unmeßbar schnellen Prozeß, während die eigentliche Interkalation von Daunomycin und YOYO meßbar langsam vonstatten geht - im Prinzip mit den ermittelten Zeitkonstanten.

Bei der Abnahme der Haltekraft hat offensichtlich nur der Prozeß der zusätzlichen Interkalation eine direkte Auswirkung auf die dortigen Zeitkonstanten. Da keine bedeutende Längenänderung stattfindet, spielt das Herausdrängen nahezu keine Rolle.

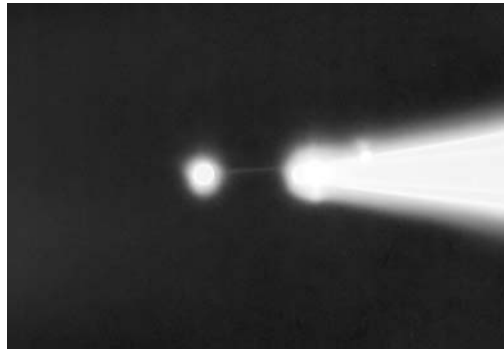
Die zwei, sich deutlich voneinander unterscheidenden Zeitkonstanten bei der Force Clamp weisen hingegen auf eine Kinetik hin, bei der beide Effekte wirken.  $\tau_2$  könnte hierbei der infolge der steten Längenzunahme verzögerte Prozeß des zusätzlichen Interkalierens sein, wohingegen  $\tau_1$  den Prozeß des Herausdrängens darstellt, das bei hohen Kräften deutlich schneller vonstatten geht. Eventuell ist die Bindungsstärke der bereits interkalierten YOYO-Moleküle bei hohen Kräften infolge des größeren Basenabstandes geringer, was ein leichteres und schnelleres Herausdrängen begünstigt.

Zum Schluß stellt sich noch die Frage, warum bei anderen Interkalatoren keine Hysteresen auftraten. Hierfür kann es zwei Erklärungen geben: Erstens hatte das Strecken und Relaxieren keinen Einfluß auf das Bindungsverhalten der Interkalatoren. Die Zahl der gebundenen Moleküle bleibt bei allen Zugkräften konstant. Zweitens könnte der Effekt des zusätzlichen Interkalierens (oder unter Umständen auch das Herausdrängen bereits gebundener Moleküle) auch bei allen anderen Interkalatoren auftreten, nur auf einer im Rahmen dieser Experimente bislang unmeßbar kleinen Zeitskala.

### 3.8 Fluoreszenz von YOYO-1

Das Ziel dieses Experimentes mit  $\lambda$ -DNA war es, zu untersuchen, ob sich die Fluoreszenzintensität des  $\lambda$ -DNA-YOYO-1 Komplexes beim Strecken verändert. Man auf diese Weise einen Hinweis auf eine veränderte Anzahl der interkalierten Moleküle.

Auf die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde verzichtet, da der Puffer vor jedem Experiment entgast, und somit die Zahl der Sauerstoffmoleküle bereits deutlich reduziert wurde. Weiterhin ist die Meßzeit beim Strecken des Komplexes sehr kurz, so daß die Gefahr eines Durchreißen der DNA infolge induzierter Strangbrüche durch den angeregten Fluorophor relativ gering ist. Zudem sollten Kraftmessungen während der Fluoreszenz in der gleichen Umgebung wie in Kapitel 3.7 stattfinden.



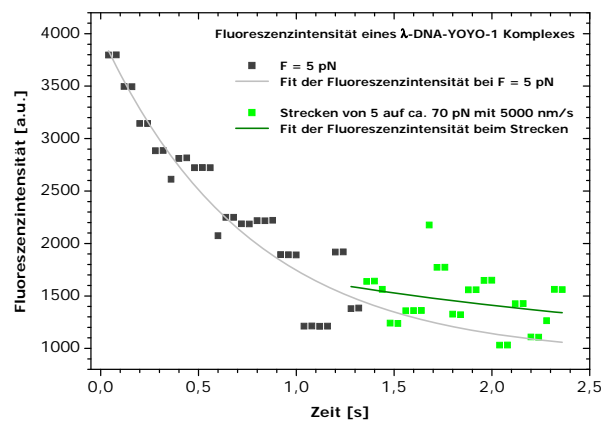
**Abbildung 78:** Eine zwischen zwei Kügelchen immobilisierte  $\lambda$ -DNA fluoresziert in Gegenwart von YOYO-1. Infolge des Ausbleichens nimmt die Fluoreszenz bereits innerhalb weniger Sekunden deutlich ab (siehe auch Abbildung 79). Das Bild entstand durch Mittelung von etwa 150 Einzelbildern. An der Glaspipette, und besonders an deren Spitze (direkt am festgesaugten Kügelchen) erkennt man Knäuel von adhärirter  $\lambda$ -DNA.

In den ersten Versuchen wurde die DNA in Gegenwart von etwa  $3 \mu\text{M}$  YOYO-1 zunächst nur leicht gesteckt ( $F \approx 5 \text{ pN}$ ; ähnlich wie in Abbildung 78). Eine geringe Zugkraft war notwendig, da sich ansonsten der DNA Strang räumlich zu stark bewegt hätte, denn vor und während des Streckens sollte die Fluoreszenzintensität durch die Kamera aufgezeichnet werden.

Aus dem Videobild wurde dann der Bereich um die fluoreszierende DNA ausgewählt, das Histogramm erstellt, und die Zahl der Pixel mit deren Helligkeitswert gewichtet. Da sich beim Stecken die Länge der DNA verändert, muß deshalb der ausgewählte Bereich im Videobild angepaßt werden, so daß immer der gleiche Teil der DNA analysiert wird.

Zu Beginn des Experimentes wurde die DNA leicht gestreckt, daraufhin das Anregungslicht eingestrahlt, und kurze Zeit darauf die DNA mit einer Geschwindigkeit von  $5000 \text{ nm/s}$  gesteckt. In der Zeit vor Beginn des Streckens sollte die Fluoreszenzintensität infolge des Ausbleichens bereits deutlich absinken. Beim Strecken war zu erwarten, daß falls zusätzliche YOYOs sich einlagern, die Fluoreszenz ebenfalls zunimmt (falls das Ausbleichen durch die Zunahme der interkalierten Moleküle mehr als kompensiert wird) oder zumindest nicht mehr so stark abnimmt (falls diese Kompensation nicht ausreicht).

Die Auswertung der Fluoreszenz eines erfolgreichen Experimentes (bei vielen Versuchen riß die DNA zu schnell) zeigt Abbildung 79:



**Abbildung 79:** Die Fluoreszenzintensität des  $\lambda$ -DNA-YOYO-1 Komplexes vor und während des Streckens. Der extrapolierte Fit bei  $F = 5$  pN beschreibt den gemittelten Verlauf des Ausbleichens, falls keine Streckung stattfinden würde. Die Fluoreszenzintensität während des Streckens ist relativ gesehen stärker, als ohne Strecken, und liegt fast immer über dem extrapolierten Fit, was durch ein Anlagern zusätzlicher Moleküle erklärt werden könnte. Da die CCD-Kamera nur etwa 13 Bilder pro Sekunde aufnehmen konnte, aber 25 Bilder pro Sekunde im Video abgespeichert wurden, sind häufig zwei Datenpunkte identisch.

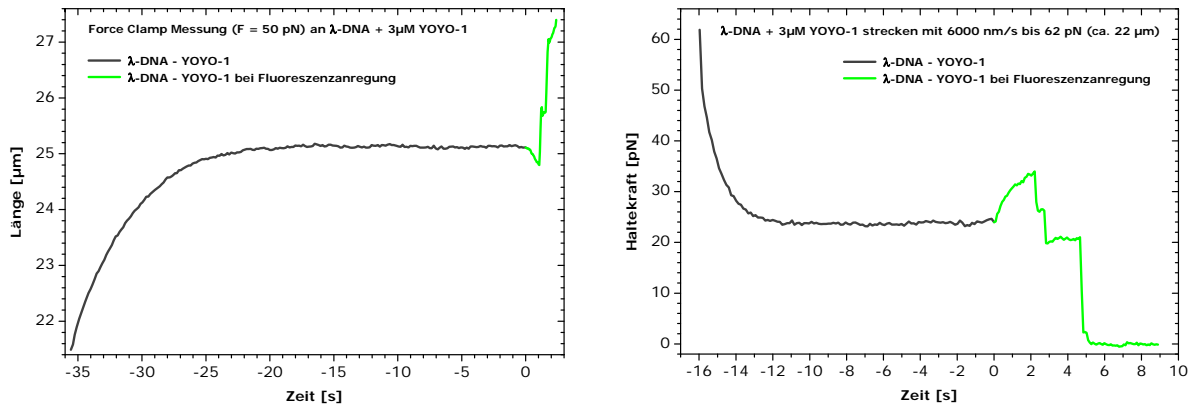
Bei etwa 70 pN riß die DNA infolge fluoreszenzinduzierter Strangbrüche. Dennoch ist trotz des Rauschens der Kamera eine relative Zunahme der Intensität während des Streckens im Vergleich zur Intensität bei einer konstanten Haltekraft zu erkennen. Das könnte durch ein zusätzliches Interkalieren erklärt werden.

Ein anderer Grund für die relative Zunahme der Fluoreszenz wären auch Änderungen in der elektronischen Struktur des Fluorophors, da infolge der anwachsenden Kraft sich auch der Basenabstand, und somit auch der Abstand von Basenpaar zu dem interkalierten Molekül verändert. Es müßte die Frage geklärt werden, ob sich der veränderte Basenabstand negativ oder positiv auf die Fluoreszenzintensität auswirkt.

Für den Fall, daß der Basenabstand eine Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität hat, wäre es interessant nachzuprüfen, ob die Fluoreszenz als solche eine Auswirkung auf den Basenabstand hat - also letztendlich die mechanischen Eigenschaften der DNA verändert.

Hierzu wurden zwei Experimente durchgeführt. Zum einen eine Force-Clamp-Messung, bei der, wie in Abbildung 77 unten rechts, die Längenzunahme im Laufe der Zeit gemessen wurde. Nach einer Ablauf einer gewissen Zeit wurde der Komplex dann angeregt. Bei der

zweiten Messung wurde, wie in Abbildung 77 oben links, der Abfall der Haltekraft gemessen, und zu einem späteren Zeitpunkt das Anregungslicht eingestrahlt:



**Abbildung 80:** Links: Force-Clamp-Messung von  $\lambda$ -DNA in Gegenwart von 3  $\mu\text{M}$  YOYO-1, vor und während der Fluoreszenz. Rechts: Der zeitliche Verlauf der Haltekraft des gleichen Komplexes, ebenfalls vor und während der Fluoreszenz (bei  $t = 0$  wird mit dem Einstrahlen des Anregungslichts begonnen).

Die mechanischen Eigenschaften eines  $\lambda$ -DNA-YOYO-1 Komplexes, der sich vor dem Einstrahlen des Anregungslichtes im Gleichgewichtszustand befand (keine meßbare Längen- oder Kraftänderung), wurden beim Fluoreszieren verändert - ein Effekt, der bei Interkalatoren zuvor noch nicht beschrieben wurde. Die Fluoreszenz sorgt in erster Linie für eine sofortigen Kraftanstieg, der sich ebenfalls in einer Verkürzung der Länge während der Force-Clamp-Messung bemerkbar macht.

Wenige Augenblicke nach Beginn der Fluoreszenz sind bereits so viele Strangbrüche induziert worden, daß die Einzelstränge ähnlich wie in Abbildung 67 beginnen, übereinander herzugleiten. Aus diesem Grund nimmt bei der Force-Clamp-Messung die Länge wieder zu, bzw. bei der zweiten Messung die Haltekraft ab, bis nach fünf Sekunden die DNA komplett hindurchreißt.

Dies läßt darauf schließen, als daß bei YOYO-1 entweder die Basenpaare bereits bei geringen Haltekraften (24 pN bei der zweiten Messung) teilweise dissoziiert sein müssen, um in der Folge ein Übereinandergleiten der Einzelstränge beim Auftreten einer genügend hohen Anzahl von Strangbrüchen zu ermöglichen. Oder die Basenpaare bleiben infolge der Interkalation größtenteils intakt. Die Fluoreszenz muß in diesem Fall jedoch eine schnelle Dissoziation der Basenpaare in einer genügend hohen Anzahl hervorrufen.

Die kurzzeitige Längenabnahme und Kraftzunahme zu Beginn der Fluoreszenz sagen im Grunde das gleiche aus: Die mechanischen Veränderungen werden entweder durch das

Herausdrängen von 440 YOYO Moleküle aus dem Komplex erreicht (Reduzierung der Konturlänge um 300 nm), oder pro YOYO Molekül verringert sich der Abstand zu beiden benachbarten Basenpaaren um insgesamt 0,32 Angström (schätzungsweise 9300 YOYO-Moleküle sind interkaliert).



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Optische Pinzette bezüglich ihrer Leistung und deren Kraftauflösung verbessert, um Messungen an einer Vielzahl von physikalischen, biologischen und biochemischen Systemen durchführen zu können.

Zunächst wurde das Verhalten von gefangenen Kügelchen bezüglich deren Brownscher Bewegung in der Optischen Falle untersucht, mit der Zielsetzung, die lokalviskosen Eigenschaften einer Flüssigkeit in der Umgebung von Grenzflächen zu untersuchen. Diese Messungen, die nur mit einem störungsunanfälligen Meßsystem zu erreichen sind, eröffnen die Möglichkeit, das Verhalten einer Vielzahl gleichartiger Kolloide zu untersuchen, deren adhäsive Eigenschaften sich zeitlich verändern. Es kann somit als ein Schritt in Richtung der Bestimmung einer On-Rate für molekulare Bindungen dienen.

Die Kraftspektroskopie von Systemen der intrazellulären Signalweiterleitung, sowie der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung auf lebenden B-Zellen stößt eine Tür zu einem neuen, vielversprechenden Untersuchungsfeld mit Optischen Pinzetten auf. Auch wenn die ersten Ergebnisse noch durch viele unspezifische Bindungen zwischen der Zelloberfläche und dem Probenkügelchen überlagert wurden, kann unter anderem durch gezielte biochemische Präparation der Rezeptoren die Extraktion des gewünschten Signals in Zukunft verfeinert werden. Beispielsweise die Liganden können geschützt werden, wenn empfindliche Schutzgruppen, die von Linkermolekülen im basischen oder sauren Milieu abgespalten werden, um eben diese Liganden zu verknüpfen, statt dessen an Linkermolekülen mit photoabspaltbaren Schutzgruppen immobilisiert werden.

Die Anpassung der Kraft/Ausdehnungskurven von DNA-Fragmenten an theoretische Elastizitätsmodelle lieferte Rückschlüsse auf mögliche Auswirkungen der lokalviskosen Eigenschaften des die DNA umgebenden Mediums auf die elastischen Parameter, wie die Persistenzlänge.

Einige Schwächen der theoretischen Modelle, welche die entropische, mechanische DNA-Elastizität unter Wirkung einer äußeren Kraft beschreiben, wurden benannt, sowie die daraus resultierenden Schlußfolgerungen an experimentellen Daten bestätigt. Hierbei konnten beispielsweise zum ersten Mal das nahezu komplette Schmelzen und ein wiederholtes Rekombinieren der sich noch überlappenden Einzelstränge einer dsDNA unter Einwirkung einer äußeren Kraft beobachtet werden.

Die Veränderungen der elastischen Eigenschaften der dsDNA in Gegenwart von DNA-bindenden Liganden ist eine der Stärken des Systems der Optische Pinzette. Die hervorragende Kraftauflösung ermöglicht sehr präzise Messungen der Elastizität dieser DNA-Ligand-Komplexe. Dies wiederum erlaubt eine genaue Identifizierung sowohl der Bindungsmoden (auch bei noch unbekanntem Bindungsmoden synthetischer Liganden) als auch der bisher kaum untersuchten Kinetik, wie im Falle von Daunomycin und YOYO-1. Hierbei spielten die verschiedenen Meßmodi der Optischen Pinzette ihre Vorteile aus. Die

Entdeckung von fluoreszenzabhängigen Veränderung der Elastizität des DNA-YOYO-1-Komplexes stellt eine interessante Alternative zu dem Gebiet der photoschaltbaren Moleküle dar, und kann zu einem tiefen Einblick in das Verständnis der Bindung zwischen Liganden und DNA führen.

## Literaturverzeichnis

- [Allemand 1998] J. F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery und V. Croquette: *Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **95**, 14152-14157 (1998)
- [Arrhenius 1889] S. Arrhenius: *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei Inversion von Rohrzucker durch Säuren*; Zeitschrift für physikalische Chemie, **4**, 226-248 (1889)
- [Ashkin 1970] A. Ashkin: *Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*; Physical Review Letters, **24**, 156-159 (1970)
- [Ashkin 1986] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm und S. Chu: *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*; Optics Letters, **11**, 288-290 (1986)
- [Ashkin 1992] A. Ashkin: *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*; Biophysical Journal, **61**, 569-582 (1992)
- [Baguley 1991] B. C. Baguley: *DNA intercalating anti-tumor agents*; Anticancer Drug Design, **6**, 1-35 (1991)
- [Bailly 1998] C. Bailly und J. B. Chaires: *Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of entropsin and distamycin analogues*; Bioconjugate Chemistry, **9**, 513-538 (1998)
- [Baliga 2000] R. Baliga und D. M. Crothers: *On the kinetics of distamycin binding to its target sites on duplex DNA*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **97**, 7814-7818 (2000)
- [Bartels 2005] Frank W. Bartels: *Kraftspektroskopische Bindungsstudien an einzelnen Protein-DNA-Komplexen*; Dissertation; Universität Bielefeld (2005)
- [Baumgarth 2005] B. Baumgarth, F. W. Bartels, D. Anselmetti, A. Becker und R. Ros: *Detailed studies of the binding mechanism of the Sinorhizobium meliloti transcriptional activator ExpG to DNA*; Microbiology, **151**, 259-268 (2005)
- [Bennink 1999] M. L. Bennink, O. D. Schärer, R. Kanaar, K. Sakata-Sogawa, J. M. Schins, J. S. Kanger, B. G. de Grooth und J. Greve: *Single-molecule manipulation of double-stranded DNA using*

- optical tweezers: Interaction studies of DNA with RecA and YOYO-1*; Cytometry, **36**, 200-208 (1999)
- [Bielawski 2001] K. Bielawski, S. Wolczynski und A. Bielawska: *DNA-binding properties and cytotoxicity of extended aromatic bisamidines in breast cancer mcf-7 cells*; Polish Journal of Pharmacology, **53**, 143-147 (2001)
- [Bouchiat 1999] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. F. Allemand, T. Strick, S. M. Block und V. Croquette: *Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements*; Biophysical Journal, **76**, 409-413 (1999)
- [Brana 2001] M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa und A. Ramos: *Intercalators and anticancer drugs*; Current Pharmaceutical Design, **7**, 1745-1780 (2001)
- [Bustamante 1994] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia und S. Smith: *Entropic elasticity of  $\lambda$ -phage DNA*; Science, **265**, 1599-1600 (1994)
- [Bustamante 2003] C. Bustamante, Z. Bryant und S. B. Smith: *Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics*; Nature, **421**, 423-427 (2003)
- [Cantor 1980] C. R. Cantor und P. R. Schimmel: *Biophysical Chemistry III, The behaviour of biological macromolecules*; Freeman Publications (1980)
- [Carell 2000] T. Carell: *Vorlesungsskript: Chemische Biologie für Chemiker; WiSe 2000/01*; Phillips-Universität Marburg (2000)
- [Chen 1996] Y. Z. Chen und E. W. Prohofsky: *Melting profile and temperature dependent binding constant fo an anticancer drug daunomycin-DNA complex*; European Biophysics Journal, **24**, 203-212 (1996)
- [Clausen 2000] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf und H. E. Gaub: *Mechanical stability of single DNA molecules*; Biophysical Journal, **78**, 1997-2007 (2000)
- [Cluzel 1996] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J. L. Viovy , D. Chatenay und F. Caron: *DNA: an extensible molecule*; Science, **271**, 792-794 (1996)
- [Coll 1987] M. Coll, C. A. Frederick, A. H. J. Wang und A. Rich: *A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(AT) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **84**, 8385-8389 (1987)

- [Coury 1996] J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Williams und L. A. Bottomley: *A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: scanning force microscopy*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **93**, 12283-12286 (1996)
- [Dai 1999] J. Dai und M. P. Sheetz: *Membrane tether formation from blebbing cells*; Biophysical Journal, **77**, 3363-3370 (1999)
- [Dammer 1996] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber und H. J. Güntherodt: *Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy*; Biophysical Journal, **70**, 2437-2441 (1996)
- [Eckel 2003] R. Eckel, R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald und D. Anselmetti: *Identification of binding mechanisms in single molecule-DNA complexes*; Biophysical Journal, **85**, 1968-1973 (2003)
- [Eichler 1998] J. Eichler und H. J. Eichler: *Laser: Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*; 3. Auflage, Springer Verlag (1998)
- [Evans 1997] E. Evans und K. Ritchie: *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*; Biophysical Journal, **72**, 1541-1555 (1997)
- [Florin 1998] E. L. Florin, A. Pralle, E. H. K. Stelzer und J. K. H. Hörber: *Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis*; Applied Physics A, **66**, S75-S78 (1998)
- [Flory 1969] P. J. Flory: *Statistical mechanics of chain molecules*; Wiley-Interscience (1969)
- [Galzer 1992] A. N. Galzer und H. S. Rye: *Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection*; Nature, **359**, 859-861 (1992)
- [Gerthsen 1993] C. Gerthsen und H. Vogel: *Physik*; 17. Auflage, Springer Verlag (1993)
- [Gittes 1998] F. Gittes und C. F. Schmidt: *Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers*; Optics Letters **23**, 7-9 (1998)
- [Grabbe 2004] Annika Grabbe; Fakultät für Chemie, Biochemie I, Universität Bielefeld; persönliche Mitteilung
- [Graves 2000] D. E. Graves und L. M. Velea: *Intercalative binding of small molecules into Nucleic Acids*; Current Organic Chemistry, **4**, 915-929 (2000)

- [Gurrieri 1996] S. Gurrieri, S. B. Smith, K. S. Wells, I. D. Johnson und C. Bustamante: *Real-time imaging of the reorientation mechanisms of YOYO-labelled DNA molecules during 90° and 120° pulsed field gel electrophoresis*; Nucleic Acids Research, **24**, 4759-4767 (1996)
- [Guthold 2001] M. Guthold, R. Superfine und R. M. Taylor II: *The rules are changing: Force measurements on single molecules and how they relate to bulk reactions kinetics and energies*; Biomedical Microdevices, **3**, 9-18 (2001)
- [Gutsche 2005] Christoph Gutsche; Fakultät für Physik und Geowissenschaften, Experimentelle Physik I, Physik anisotroper Fluide, Uni-Leipzig; persönliche Mitteilung
- [Happel 1965] J. Happel und H. Brenner: *Low Reynolds number hydrodynamics*; Prentice Hall, Englewood Cliffs (1965)
- [Hinterdorfer 1996] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. Gruber, K. Schilcher und H. Schindler: *Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **93**, 3477-3481 (1996)
- [Hortobagyi 1997] G. N. Hortobagyi: *Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview*; Drugs, **54**, 1-7 (1997)
- [Husale 2002] S. Husale, W. Grange und M. Hegner: *DNA mechanics affected by small DNA interacting ligands*; Single Molecules, **3**, 91-96 (2002)
- [Ihmels 2003] H. Ihmels, K. Faulhaber, K. Wissel, G. Viola und D. Vedaldi: *6-Aminoacridizinium bromide: a fluorescence probe which lights up in AT-rich Regions of DNA*; Organic and Biomolecular Chemistry, **1**, 2999-3001 (2003)
- [Ihmels 2005] Heiko Ihmels; Fakultät für Chemie, Organische Chemie II, Universität Siegen; Persönliche Mitteilung
- [Janeway 1999] C. Janeway, B. Travers, M. Walport und D. Capra: *Immunobiology, the immune system in health and disease*; 4. Auflage, Garland Publishing (1999)
- [Kegler 2005] Kati Kegler, Christoph Gutsche; Fakultät für Physik und Geowissenschaften, Experimentelle Physik I, Physik anisotroper Fluide, Uni-Leipzig; persönliche Mitteilung

- [Kellermayer 1997] M. S. Z. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier und C. Bustamante: *Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers*; Science, **267**, 1112-1116 (1997)
- [Kneubühl 1999] F. K. Kneubühl und M. W. Sigrist: *Laser*; 5. Auflage, Teubner-Studienbücher (1999)
- [Kosikov 1999] K. M. Kosikov, A. A. Gorin, V. B. Zhurkin und W. K. Olson: *DNA stretching and compressions: large-scale simulations of double helical structures*; Journal of Molecular Biology, **289**, 1301-1326 (1999)
- [Kramers 1940] H. A. Kramers: *Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions*; Physica, **7**, 284-304 (1940)
- [Kratky 1949] O. Kratky und G. Porod: *Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle*; Journal of the Royal Netherlands Chemical Society, **68**, 1106-1123 (1949)
- [Krautbauer 2002a] R. Krautbauer, S. Fischerländer, S. Allen und H. E. Gaub: *Mechanical fingerprints of DNA drug complexes*; Single Molecules, **3**, 97-103 (2002)
- [Krautbauer 2002b] R. Krautbauer, L. H. Pope, T. E. Schrader, S. Allen und H. E. Gaub: *Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy*; FEBS Letters, **510**, 154-158 (2002)
- [Kremer 2005] F. Kremer, K. Keger, C. Gutsche, J. Reinmuth, W. Skokow und M. Salomo; Fakultät für Physik und Geowissenschaften, Experimentelle Physik I, Physik anisotroper Fluide, Universität Leipzig
- [Lakowicz 1999] J. R. Lakowicz: *Principles of fluorescence spectroscopy*; 2. Auflage, Kluwer Academic, Plenum Publisher (1999)
- [Larsson 1994] A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson und B. Albinsson: *Characterization of the binding of the fluorescent dyes YO and YOYO to DNA by polarized light spectroscopy*; Journal of the American Chemical Society, **116**, 8459-8465
- [Lebrun 1996] A. Lebrun und R. Lavery: *Modelling extreme stretching of DNA*; Nucleic Acids Research, **24**, 2260-2267 (1996)
- [Lee 1994] G. U. Lee, L. A. Chrisey und R. J. Colton: *Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA*; Science, **266**, 771-773 (1994)

- [Loset 2004] G. A. Loset, H. K. Roux, P. Zhu, T. E. Michaelsen und I. Sandlie: *Differential segmental flexibility and reach dictate the antigen binding mode of chimeric IgD and IgM: implications for the function of the B cell receptor*; Journal of Immunology, **172**, 2925-2934 (2004)
- [Marko 1995a] J. F. Marko und E. D. Siggia: *Stretching DNA*; Macromolecules, **28**, 8759-8770 (1995)
- [Marko 1995b] J. F. Marko: *Statistical mechanics of supercoiled DNA*; Physical Review E, **52**, 2912-2938 (1995)
- [McCauley 2005] M. McCauley, P. R. Hardwidge, L. J. Maher III und M. C. Williams: *Dual binding modes for an HMG Domain from human HMGB2 on DNA*; Biophysical Journal, **89**, 353-364 (2005)
- [McMurray 1991] C. McMurray, E. W. Small und K. E. van Holde: *Binding of ethidium to the nucleosome core particle. 2. Internal and external binding modes*; Biochemistry, **30**, 5644-5652 (1991)
- [Merkel 1999] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie und E. Evans: *Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy*; Nature, **397**, 50-53 (1999)
- [Nelson 2001] D. L. Nelson, A. L. Lehninger und M. M. Cox: *Prinzipien der Biochemie*; 3. Auflage, Springer Verlag (2001)
- [Nguyen 2003] M. Nguyen-Duong, K. W. Koch und R. Merkel: *Surfaces anchoring reduces lifetime of single specific bonds*; Europhysics Letters, **61**, 845-851 (2003)
- [Niidome 1996] T. Niidome, N. Ohmori, A. Ichinose, A. Wada, H. Mihara, T. Hirayama und H. Aoyagi: *Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA and their gene-transfer abilities into cells*; Journal of Biological Chemistry, **272**, 15307-15312 (1996)
- [Niiro 2002] H. Niiro, A. Maeda, T. Kurosaki und E. A. Clark: *The B lymphocyte adaptor molecule of 32 kD (Bam 32) regulates B cell antigen receptor signalling and cell survival*; Journal of Experimental Medicine, **195**, 143-149 (2002)
- [Odijk 1995] T. Odijk: *Stiff chains and filaments under tension*; Macromolecules, **28**, 7016-7018 (1995)
- [Olsen 2003] G. L. Olsen, E. A. Louie, G. P. Drobny und S. T. Sigurdsson: *Determination of DNA minor groove width in distamycin-DNA complexes by solid-state NMR*; Nucleic Acids Research, **31**, 5084-5089 (2003)



- [Pampaloni] F. Pampaloni, M. Böhmer, D. Berti, P. Baglioni und J. Enderlein: *Measuring viscosity by monitoring the Brownian motion of optically trapped micro-beads*; Skript des "Institute for Biological Information Processing I" des Forschungszentrums Jülich
- [Pelton 1989] J. G. Pelton und D. E. Wemmer: *Structural characterisation of a 2:1 distamycin-A d(CGCAAATTGCG) complex by two-dimensional NMR*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **86**, 5723-5727 (1989)
- [Pralle 1998] A. Pralle, E. L. Florin, E. H. K. Stelzer und J. K. H. Hörber: *Local viscosity probed by photonic force microscopy*; Applied Physics A, **66**, S71-S73 (1998)
- [Qu 2001] X. Qu und J. B. Chaires: *Hydration changes for DNA intercalation reactions*; Journal of the American Chemical Society, **123**, 1-7 (2001)
- [Raible 2004] M. Raible, M. Evstigneev, P. Reimann, F. W. Bartels und R. Ros: *Theoretical analysis of dynamic force spectroscopy experiments*; Journal of Biotechnology, **112**, 13-23 (2004)
- [Raible 2005] M. Raible, M. Evstigneev, F. W. Bartels, R. Eckel, M. Nguyen-Duong, R. Merkel, R. Ros, D. Anselmetti und P. Reimann: *Theoretical analysis of single-molecule force spectroscopy experiments: heterogeneity of chemical bonds*; zur Begutachtung gesendet an: Biophysical Journal
- [Reddy 2001] B. S. P. Reddy, S. K. Sharma und J. W. Lown: *Recent developments in sequence selective minor groove DNA effectors*; Current Medicinal Chemistry, **8**, 475-508 (2001)
- [Reha 2002] D. Reha, M. Kabelac, F. Ryjacek, J. Sponer, J. E. Sponer, M. Elstner, S. Suhai und P. Hobza: *Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study*; Journal of the American Chemical Society, **124**, 3366-3376 (2002)
- [Remeta 1993] D. P. Remeta, C. P. Mudd, R. L. Berger und K. J. Breslauer: *Thermodynamic characterization of danomycin-DNA interactions: Comparison of complete binding profiles for a series of DNA host duplexes*; Biochemistry, **32**, 5064-5073 (1993)
- [Resnick 2001] A. Resnick: *Design and construction of a space-borne optical tweezers apparatus: Review of Scientific Instruments*, **72**, 4059-4065 (2001)
- [Rief 1997] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez und H. E. Gaub: *Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM*; Science, **276**, 1109-1112 (1997)

- [Rief 1998] M. Rief, J. M. Fernandez und H. E. Gaub: *Elastically coupled two-level systems as a modell for biopolymer extensibility*; Physical Review Letters, **81**, 4764-4767 (1998)
- [Rief 1999] M. Rief, H. Clausen-Schaumann und H. E. Gaub: *Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules*; Nature Structural Biology, **6**, 346-349 (1999)
- [Rouzina 2001a] I. Rouzina und V. A. Bloomfield: *Force induced melting of the DNA double helix; 1. Thermodynamic analysis*; Biophysical Journal, **80**, 882-893
- [Rouzina 2001b] I. Rouzina und V. A. Bloomfield: *Force induced melting of the DNA double helix; 2. Effect of solution conditions*; Biophysical Journal, **80**, 894-900
- [Rye 1992] H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies und A. N. Glazer: *Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis- intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications*; Nucleic Acid Research, **20**, 2803-2812 (1992)
- [Sanger 1984] W. Sanger: *Principles of nucleic acid structure*; Springer Verlag (1984)
- [Sayegh 2000] C. E. Sayegh, S. L. Demaries, K. A. Pike, J. E. Friedman und M. J. H. Ratcliffe: *The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development*; Immunological Reviews, **175**, 187-200 (2000)
- [Schwesinger 2000] F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H. J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer und A. Plückthun: *Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **97**, 9972-9977 (2000)
- [Sischka 2003] A. Sischka, R. Eckel, K. Tönsing, R. Ros und D. Anselmetti: *Compact, microscope based optical tweezers system for molecular manipulation*; Review of Scientific Instruments, **74**, 4827-4831 (2003)
- [Sischka 2005] A. Sischka, K. Tönsing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Ros und D. Anselmetti: *Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA-binding ligands*; Biophysical Journal, **88**, 404-411 (2005)
- [Smith 1996] S. B. Smith, Y. Cui und C. Bustamante: *Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*; Science, **271**, 795-799 (1996)

- [Strandh 1998] M. Strandh, M. Ohlin, C. A. Borrebaeck und S. Ohlson: *New approach to steroid separation based on a low affinity IgM antibody*; Journal of Immunological Methods, **214**, 73-79 (1998)
- [Strick 1998] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon und V. Croquette: *Behavior of supercoiled DNA*; Biophysical Journal, **74**, 2016-2028 (1998)
- [Strick 2000a] T. R. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette und D. Bensimon: *Twisting and stretching single DNA molecules*; Progress in Biophysics and Molecular Biology, **74**, 115-140 (2000)
- [Strick 2000b] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon und V. Croquette: *Stress induced structural transitions in DNA and proteins*; Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, **29**, 523-543 (2000)
- [Strunz 2000] T. Strunz, K. Oroszlan, I. Schumakovitch, H. J. Güntherodt und M. Hegener: *Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand-receptor bonds*; Biophysical Journal, **79**, 1206-1212 (2000)
- [Stryer 1999] L. Stryer: *Biochemie*; 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag (1999)
- [Svoboda 1994] K. Svoboda und S. M. Block: *Biological applications of optical forces*; Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, **23**, 247-285 (1994)
- [Tessmer 2003] I. Tessmer, C. G. Baumann, G. M. Skinner, J. E. Molloy, J. G. Hoggett, S. J. B. Tendler und S. Allen: *Mode of drug binding to DNA determined by optical tweezers force spectroscopy*; Journal of Modern Optics, **50**, 1627-1636 (2003)
- [Turner 1996] P. R. Turner und W. A. Denny: *The mutagenic properties of DNA minor-groove binding ligands*; Mutation Research, **355**, 141-169 (1996)
- [Viola 2003] G. Viola, H. Ihmels, H. Kraußner, D. Vedaldi und F. Dall'Acqua: *DNA-binding and DNA-photocleaving properties of 12a,14a-diazo-niapentaphene*; ARKIVOC, **V**, 219-230 (2004)
- [Visscher 1992] K. Visscher und G. J. Brakenhoff: *Theoretical study fo optically induces forces on spherical particles in a single beam trap I: Rayleigh scatterers*; Optik, **89**, 174-180 (1992)
- [Wang 1974] J. C. Wang: *The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients*; Journal of Molecular Biology, **89**, 783-801 (1974)

- [Wang 1987] A. H. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley und A. Rich: *Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: Molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpGp) at 1.2-Angstroem resolution*; *Biochemistry*, **26**, 1152-1163 (1987)
- [Waring 1991] M. Waring: *Binding of antibiotics to DNA*; *Ciba Foundation Symposia*, **158**, 128-142 (1991)
- [Wenner 2002] J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rouzina und V. A. Bloomfield: *Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules*; *Biophysical Journal*, **82**, 3160-3169 (2002)
- [Wienands 1995] J. Wienands, F. Freuler und G. Baumann: *Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of syk*; *International Immunology*, **7**, 1701-1708 (1995)
- [Wilking 2001] S. D. Wilking: *Synthese DNA-bindender Peptide*; Diplomarbeit; Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld (2001)
- [Williams 2001a] M. C. Williams, J. R. Wenner, I. Rouzina und V. A. Bloomfield: *Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: Evidence of force-induced DNA melting*; *Biophysical Journal*, **80**, 874-881 (2001)
- [Williams 2001b] M. C. Williams, J. R. Wenner, I. Rouzina und V. A. Bloomfield: *Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching*; *Biophysical Journal*, **80**, 1932-1939 (2001)
- [Williams 2002] M. C. Williams, I. Rouzina und V. A. Bloomfield: *Thermodynamics of DNA interactions from single molecule stretching experiments*; *Accounts of Chemical Research*, **35**, 159-166 (2002)
- [Winter 1998] R. Winter und F. Noll: *Methoden der biophysikalischen Chemie*; Teubner Studienbücher Chemie (1998)
- [Wuite 2000] G. J. L. Wuite, R. J. Davenport, A. Rappaport und C. Bustamante: *An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules*; *Biophysical Journal*, **79**, 1155-1167 (2000)
- [Yamada 2000] S. Yamada, D. Wirtz, und S. C. Kuo: *Mechanics of living cell measured by laser tracking microrheology*; *Biophysical Journal* **78**, 1736-1747 (2000)

## Glossar

a	Abstand von der optischen Achse
AFM	Atomic Force Microscope (Rasterkraftmikroskop)
AT	Adenin-Thymin (Basenpaar)
ATP	Adenosintriphosphat
$\alpha$	Polarisierbarkeit
bp	Basenpaar (einer dsDNA)
D	Diffusionskonstante
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige (double stranded) DNA
$\eta$	Viskosität
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	Brennweite
$\bar{F}$	wahrscheinlichster Wert der Abrißkraft
FJC	Freely Jointed Chain (Modell)
FRC	Freely Rotating Chain (Modell)
$\Delta G^\ominus$	Freie Standardreaktionsenthalpie
$\gamma$	Stokesscher Reibungskoeffizient; $\gamma = 6\pi\eta r$ , $r$ = Radius des Objektes
GC	Guanin-Cytosin (Basenpaar)
$\Delta H^\ominus$	Standardreaktionsenthalpie

---

Ig	Immunoglobulin (Antikörper)
IgM	Immunoglobulin der Klasse M
k	Kraftkonstante eines harmonischen Potentials (Federkonstante)
$k_{\text{eff}}$	effektive Federkonstante (eines Systems aus Optischer Falle + Komplex + Untergrundelastizität)
$K_A$	Assoziationskonstante; $K_A = k_{\text{on}} / k_{\text{off}}$
$K_0$	Young-Elastizitätsmodul
$k_B$	Boltzmann-Konstante ( $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$K_D$	Dissoziationskonstante; $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$
$k_{\text{off}}$	Off-Rate (Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation)
$k_{\text{on}}$	On-Rate (Geschwindigkeitskonstante der Assoziation)
$\kappa$	Biegesteifigkeit
$L_0$	Konturlänge eines Polymers
$\lambda$	Wellenlänge
M	Molarität (Quotient aus Stoffmenge in mol und Volumen in 1000 ml)
Mol	Stoffmenge
n	Brechungsindex
$N_A$	Avogadro-Konstante; Zahl der Teilchen pro Mol ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
$n_{\text{Medium}}$	Brechungsindex eines (das gefangene Objekt umgebenden) Mediums
$n_{\text{Objekt}}$	Brechungsindex eines (in der Falle gefangenen) Objektes

---

NA	Numerische Apertur einer Linse; $NA = n_{\text{Medium}} \cdot \sin \theta = r / f$
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
r	Radius eines gefangenen Objektes, oder der Apertur einer Linse
r	loading rate (Rate, mit der eine äußere Kraft ansteigt); $r = k_{\text{eff}} \cdot v$
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase (rezeptorartige PTK)
$\vec{S}$	Poyntingvektor
$\Delta S^\ominus$	Standardreaktionsentropie
$\sigma$	Streuquerschnitt
ssDNA	einzelsträngige (single stranded) DNA
syk	nicht-rezeptorartige Protein-Tyrosin-Kinase in B-Zellen
T	absolute Temperatur
TEM <sub>00</sub>	Transversale elektromagnetische Grundmode eines Lasers
$\theta$	Halber Öffnungswinkel eines konvergenten oder divergenten Strahles
Tris	Trihydroxyaminomethan
w	Fleckgröße (halber Strahlquerschnitt eines Gaußschen Strahles)
WLC	Worm Like Chain (Modell); entropisches Elastizitätsmodell für Polymere
$x_\beta$	charakteristische Reaktionslänge (Abstand zwischen dem Potentialminimum und dem Maximum der Potentialbarriere)
$\xi$	Persistenzlänge

## Danksagung

Diese Seite ist denjenigen gewidmet, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, und denen ich zu Dank verpflichtet bin. Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti möchte ich für die Möglichkeit danken, in der Arbeitsgruppe "Experimentelle Biophysik und angewandte Nanotechnologie" meine Doktorarbeit durchzuführen, und so auch die Optische Pinzette aus der reinen Bauphase herauswachsen zu lassen.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Katja Tönsing für ihre unermüdliche Hilfe auf dem biochemischen Glatteis, und für Ratschläge und Unterstützungen bei neu begonnenen Projekten und Versuchen. Ebenso möchte ich Dr. Robert Ros für die stete Versorgung mit neuester Literatur, für Hilfe und Tips sowie für das schnelle Einspringen bei Fragen zu Veröffentlichungen, und Christoph Pelargus für technischen Rat und schnelle Tat danken.

Zudem danke ich Dr. Annika Grabbe und Prof. Jürgen Wienands für die freundliche Hilfe, die unentwegte Präparation von Zellen, Proteinen und Antikörpern und die Unterstützung während einiger langwieriger, experimenteller Durststrecken.

Ein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Martin Hegner von der Universität Basel für viele technische Ratschläge während der Aufbauphase der Optischen Pinzette.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Heiko Ihmels und der Arbeitsgruppe der Fakultät für Chemie der Uni Siegen für die Zusammenarbeit, die Überlassung der verwendeten Interkalatoren und die entspannte Sicht auf anfänglich schier unlösbare Rätsel.

Ebenso gilt mein besonderer Dank an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Friedrich Kremer der Fakultät für Physik an der Universität Leipzig, und hierbei ganz besonders Kati Kegler, Christoph Gutsche und Matthias Salomo für die freundliche und hilfreiche Kooperation, die Überlassung von DNA Fragmenten, und natürlich für die nette Aufnahme eines weiteren "Optikers" in den dortigen "geheiligten Hallen".

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der mechanischen und elektrotechnischen Werkstatt, insbesondere Wolfgang Gronemeyer für die äußerst hilfreichen Anregungen und die völlige Unkompliziertheit beim Umschiffen von konstruktionsbedingten Klippen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für praktische Hilfen und Diskussionen. Besonders danke ich Wibke Hellmich und Kai Leffhalm für die geschickte Arbeitsteilung an der Optischen Pinzette, bereichernde Diskussionen über Fotografie & Co. und Hilfen bei etwas heikleren Zellexperimenten, Thanh Tu Duong und Jan Regtmeier für die angenehme Atmosphäre im "Großraumlabor", Tobias Kahre für die kurzweilige Büroatmosphäre und Gabi Krome als den guten Geist beim Ringen mit administrativen Schwierigkeiten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken für die fortwährende Unterstützung mit allen Kräften, und natürlich schulde ich Dank für treue Freundschaft Gerhard Schmitz, Mathias Straube, Michael Wenge, Oliver Schneider, Thorsten Simon, Wiebke Fock, Wolfgang Marx und Viola Baumgärtel.



## Anhang

### Publikationen

1. A. Sischka, R. Eckel, K. Tönsing, R. Ros und D. Anselmetti  
*Compact, microscope based optical tweezers system for molecular manipulation*  
Review of Scientific Instruments, **74**, 4827-4831 (2003)
2. R. Ros, R. Eckel, F. Bartels, A. Sischka, B. Baumgarth, S. D. Wilking, A. Pühler, N. Sewald, A. Becker und D. Anselmetti  
*Single Molecule Force Spectroscopy on Ligand-DNA Complexes: From Molecular Binding Mechanisms to Biosensor Applications*  
Journal of Biotechnology, **112**, 5-12 (2004)
3. A. Sischka, K. Tönsing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Ros und D. Anselmetti  
*Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA-binding Ligands*  
Biophysical Journal, **88**, 404-411 (2005)
4. W. Hellmich, K. Leffhalm, A. Sischka, T. Duong, N. Jensen, K. Niehaus, K. Tönsing, A. Ros und D. Anselmetti  
*Towards Single Cell Fingerprinting in Microfluidic Device Format: Single Cell Manipulation, Protein Separation and Detection*  
Proceedings of the  $\mu$ TAS, Boston, USA (2005)

### Konferenzbeiträge

1. A. Sischka, K. Tönsing, A. Grabbe, K. Leffhalm, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, J. Wienands, R. Ros und D. Anselmetti  
*Optical Tweezers: A single molecule biosensor for molecular DNA manipulation and detection of individual receptors on living cells*  
DPG Frühjahrstagung in Regensburg 8.-12. März 2004 (Poster)
2. K. Leffhalm, A. Sischka, W. Hellmich, T. Duong, A. Grabbe, J. Wienands, K. Tönsing, R. Ros, A. Ros und D. Anselmetti  
*Single cell manipulation in microfluidic networks by optical tweezers*  
DPG Frühjahrstagung in Regensburg 8.-12. März 2004 (Poster)

- 
3. A. Sischka, K. Tönsing, K. Leffhalm, R. Eckel, H. Ihmels, R. Ros und D. Anselmetti  
*Optical Tweezers: A single molecule biosensor for investigation of DNA ligand binding modes*  
DPG Frühjahrstagung in Berlin 4.-9. März 2005 (Poster)
  
  4. K. Leffhalm, A. Sischka, W. Hellmich, T. Duong, K. Tönsing, R. Ros, A. Ros und D. Anselmetti  
*Single cell manipulation in microfluidic networks by optical tweezers*  
DPG Frühjahrstagung in Berlin 4.-9. März 2005 (Poster)