MESSUNG UND SIMULATION DER MECHANISCHEN ELASTIZITÄT EINZELNER DNA-LIGAND-KOMPLEXE

Diplomarbeit

vorgelegt von

Rainer Eckel

aus Frankenberg (Eder)

Fakultät für Chemie

Universität Bielefeld

Bielefeld, Mai 2002

Die folgende Arbeit entstand unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. Norbert Sewald
(Bioorganische und Organische Chemie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld)
sowie
Herrn Professor Dr. Dario Anselmetti
in der Zeit von Dezember 2001 bis Mai 2002 im Arbeitskreis
Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften
der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.
Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.

Bielefeld, den 29. Mai 2002

(Rainer Eckel)

Φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ.

Die Natur der Dinge versteckt sich gern.

Heraklit

The problems of chemistry and biology can be greatly helped if our ability to see what we are doing, and to do things on an atomic level, is ultimately developed - a development which I think cannot be avoided.

Richard P. Feynman

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

Kettenförmige Polymere mit der Eigenschaft, der Einwirkung äußerer Kräfte durch ihre molekulare Elastizität einen Widerstand entgegenzusetzen, spielen eine wichtige Rolle in der Natur. Ein paar Beispiele mögen dies verdeutlichen: Strukturproteine wie das aus antiparallelen β-Faltblättern bestehende Seidenfibroin, das tripelhelikale Kollagen oder das hochvernetzte Elastin müssen der Beanspruchung durch hohe Zugspannungen standhalten. Im quergestreiften Muskelgewebe von Wirbeltieren gewährleisten die Aktin- und Myosin-Filamente die Kontraktilität, während das 3 Megadalton-Protein Titin als entropische Feder die Rückstellkraft für die Relaxation des Muskels bereitstellt. Vielleicht das prominenteste hochelastische Makromolekül ist schließlich der Kautschuk, ein natürliches Polyisopren, das als Gummi (quervernetzt über S_X-Gruppen) eine eminente wirtschaftliche Bedeutung erlangt hat. Diese elastischen Eigenschaften sind die Folge intramolekularer Kräfte, die in ihren unterschiedlichen Ausprägungen als kovalente, elektrostatische und Van der Waals-Kräfte, als Wasserstoffbrücken oder entropische (Schein-)Kräfte allesamt auf die fundamentale elektromagnetische Wechselwirkung zurückzuführen sind.
Auch das DNA-Molekül, dessen Strukturaufklärung durch Watson und Crick Anfang der 50er Jahre die Biologie revolutionierte, fällt bezüglich seiner Struktur in die Kategorie der kettenförmigen Biopolymere. Appliziert man an den Enden der Doppelhelix eine mechanische Kraft, so durchläuft das DNA-Molekül verschiedene strukturelle Stadien. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix bis auf das 1.7-fache der B-DNA-Konturlänge gestreckt, das neue Konformer bezeichnet man als S-DNA. Dann setzt das mechanische Schmelzen des Doppelstrangs ein. Bei einer bestimmten Kraft ist die Helix vollständig geschmolzen, übrig bleibt ein DNA-Einzelstrang. Daß diese konformativen Änderungen auch in vivo von Bedeutung sind, sei kurz an einem Beispiel erläutert. Das RecA-Protein aus *E.coli* katalysiert den Austausch von DNA-Strängen bei der homologen Rekombination. Dazu bindet es in Gegenwart von ATP vorübergehend an die Doppelhelix. Diese Bindung induziert eine Überstreckung der DNA fast um den Faktor 1.5, wobei die Helix

um 15° pro Basenpaar entwunden wird [1, 2, 3].
Auf der Bindung von Peptiden, Proteinen und Ribonucleinsäuren an DNA beruhen neben der Rekombination so essentielle biochemische Vorgänge wie die Replikation und die Reparatur der DNA sowie die Transkription, die die in der DNA-Sequenz enthaltene genetische Information in RNA-Transkripte übersetzt. Wie am Beispiel des RecA-Proteins gezeigt, verändert die Bindung dieser Moleküle in unterschiedlichem Ausmaß die Konformation der DNA und damit auch ihre mechanischen Eigenschaften. Die Erforschung der molekularen Elastizität von DNA liefert also wertvolle Informationen auch über intermolekulare Wechselwirkungen - und umgekehrt.
Eine wichtige Größe in diesem Zusammenhang ist die Persistenzlänge, die als Maß für die angulare Korrelation zwischen den Segmenten eines kettenförmigen Polymers eine direkte Aussage über seine mechanische Steifheit gestattet. Bis zur Erfindung der optischen Pinzette und der Rastersondenverfahren bestand die einzige Möglichkeit, eine Persistenzlänge experimentell zu ermitteln, darin, durch verschiedene Methoden wie die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit oder der Lichtstreuung von Polymeren in Lösung den Gyrationsradius zu erhalten und aus diesem die Persistenzlänge zu errechnen. Alle diese Methoden beruhten auf der Messung von Ensemble-Mittelwerten der betreffenden Größen. Im Unterschied dazu ist es mit Hilfe der AFM-Kraftspektroskopie möglich, an einzelnen Molekülen die Auswirkungen externer Kräfte direkt zu messen, indem die Verbiegung einer elastischen Balkenfeder zur Detektion herangezogen wird. Der Kraft-Ausdehnungs-Kurve, d.h. der Auftragung der gemessenen Kraft gegen die (aus der vertikalen Bewegung der Balkenfeder errechnete) Ausdehnung des Moleküls, lassen sich viele Informationen über intramolekulare Kräfte und konformative Übergänge entnehmen.
In dieser Arbeit werden einzelne DNA-Moleküle mit Hilfe der AFM-Kraftspektroskopie auf ihre mechanische Elastizität untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf der Analyse der Änderungen im elastischen Verhalten der DNA, die durch die Bindung kleiner Moleküle an die DNA-Doppelhelix hervorgerufen werden. Ziel ist es zum einen, unterschiedliche Bindungsmoden (Interkalation, Bindung in der großen und kleinen Furche) aufgrund der resultierenden Kraft-Ausdehnungs-Kurven differenzieren zu können. Zum anderen sollen in der vorliegenden Arbeit aber auch die quantitativen Aspekte der DNA-Elastizität berücksichtigt werden: Der Vergleich mit theoretischen Elastizitätsmodellen für DNA durch Anpassung theoretischer Kraft-Ausdehnungs-Kurven an die experimentellen Daten liefert optimierte elastische Parameter (wie z.B. die Persistenzlänge), deren Werte Rückschlüsse auf die Intensität der Bindung und der mit ihr verbundenen konformativen Änderungen erlauben.

2 Grundlagen

Thema dieses Teils sind die theoretischen Grundlagen der Arbeit. Dazu werden zunächst die Technik der Rasterkraftmikroskopie sowie die Prinzipien der Rasterkraftspektroskopie vorgestellt und ein knapper Überblick über die Anwendung kraftspektroskopischer Methoden in der Untersuchung biochemischer Systeme gegeben. Danach wird kurz auf die Struktur der DNA und ihr Verhalten unter Einwirkung mechanischer Kräfte eingegangen. Daran anschließend werden die Eigenschaften kleiner, an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindender Moleküle behandelt, welche in der Arbeit auf ihre charakteristischen Bindungseigenschaften hin untersucht wurden. Am Schluß dieses Teils wird eine Einführung in verschiedene theoretische Modelle zur Beschreibung der elastischen Eigenschaften von Biopolymeren gegeben, welche zur Analyse der im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Kraft-Ausdehnungs-Kurven herangezogen wurden.

2.1 Kraftspektroskopie

Das von Binnig et al. [4] 1986 entwickelte *Rasterkraftmikroskop* zählt zur Gruppe der Rastersondenmikroskope (engl. Scanning Probe Microscope, SPM). Das gemeinsame Merkmal aller Rastersondenmikroskopie-Techniken ist, daß eine sehr feine Spitze (die Sonde) im Kontakt oder im Nahfeld (d.h. im Abstand $\approx$ 1 nm) einem Raster folgend über die Oberfläche der abzubildenden Probe geführt („gerastert“) wird. Gemessen wird die Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche, Unterschiede in der Intensität der Wechselwirkung erzeugen den Bildkontrast. Anhand der jeweils zugrundeliegenden Wechselwirkung zwischen Sonde und Probe unterscheidet man mehrere Techniken. Beim 1981 vorgestellten *Rastertunnelmikroskop* (engl. Scanning Tunneling Microscope, STM) [5, 6] liefert der zwischen einer metallischen Spitze und einer leitenden Probe (im Abstand weniger Ångström) gemessene quantenmechanische Tunnelstrom ein elektronisches Profil der Oberfläche. Beim *optischen Nahfeldmikroskop* (engl. Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) [7] wird das Bild durch die Wechselwirkung von Lichtwellen, die aus einer Glasfaser mit einer Blendenöffnung von mehreren 10 nm austreten (Prinzip der evaneszenten Wellen), mit der Oberfläche erzeugt. Das Prinzip des Rasterkraftmikroskops (engl. Atomic Force Microscope, AFM oder auch Scanning Force Microscope, SFM) besteht darin, daß die mechanische Verbiegung einer weichen Blattfeder (engl. cantilever), auf der die mit der Oberfläche wechselwirkende Spitze sitzt, gemessen und damit ein Höhenprofil der Probe erhalten wird. Ein Vorteil des Rasterkraftmikroskops gegenüber dem STM ist, daß es auch Messungen nicht-leitender Oberflächen erlaubt. Mit beiden Techniken sind auch Abbildungen in Flüssigkeit möglich.

Alle diese bildgebenden Techniken können aber auch dazu verwendet werden, lokal spektroskopische Messungen durchzuführen. Im Falle des Rasterkraftmikroskops wird dabei an einem bestimmten Punkt der Probe der Abstand zur Spitze variiert und die Auslenkung des Cantilevers als Funktion dieses Abstands gemessen. Diese als „Kraftspektroskopie“ bezeichnete Methode ist besonders interessant im Hinblick auf ihre hohe Empfindlichkeit, die es ermöglicht, Kräfte zwischen einzelnen (Makro-)Molekülen zu messen.

2.1.1 Das Rasterkraftmikroskop

Beim Rasterkraftmikroskop wird die Probenoberfläche mit einem mikrofabrizierten Sensor, bestehend aus dem Cantilever (Federbalken) und der am Ende des Cantilevers sitzenden Spitze mit einem Radius von einigen Nanometern, zeilenförmig abgerastert. Die Rasterbewegungen sowie die vertikalen Bewegungen der Spitze werden von piezokeramischen Stellelementen ausgeführt. Alternativ dazu kann auch statt der Probe die Spitze festgehalten werden, und die Probe wird vom Scanner bewegt (Abb. 2.1). Die zwischen Probe und Spitze wirkende Kraft wird während der Rasterbewegung gemessen, indem die Verbiegung des Cantilevers (d.h. seine Auslenkung aus der Gleichgewichtslage) aufgezeichnet wird. Dies geschieht meist nach der Methode der „optical beam deflection“ [8, 9]: Ein Laserstrahl wird auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert, von dort reflektiert und über einen Spiegel auf einen Quadrantenphotodetektor gelenkt. Die so detektierten Kräfte dienen als Rückkopplungssignal zur Regelung der Bewegung der Spitze in vertikaler Richtung (Feedback-Regelkreis).

In einem einfachen Modell kann das Wechselwirkungs-Potential zwischen Spitze und Probe mit einem Lennard-Jones- Potential angenähert werden. Je nachdem, in welchem Bereich der Potentialkurve man das AFM betreibt, werden verschiedene Abbildungsmodi unterschieden. Im sog. *Kontaktmodus* (contact mode) steht die Spitze im direkten Kontakt mit der Probenoberfläche, es dominieren repulsive Kräfte. Die Oberfläche wird

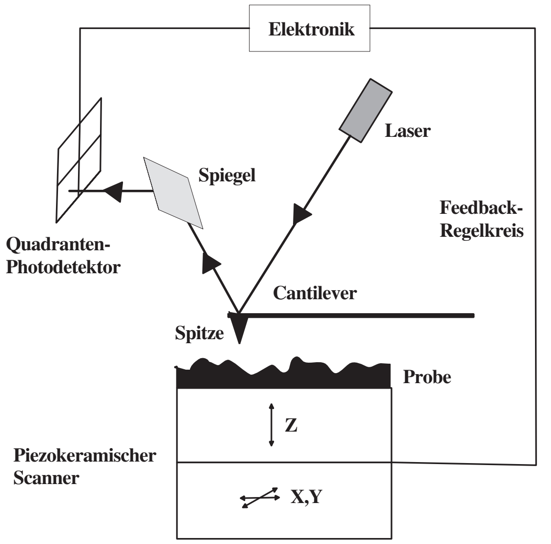

Abbildung 2.1: Rasterkraftmikroskop (Schema)

Das Rasterkraftmikroskop besteht aus dem piezokeramischen Scanner, der die Probe (alternativ den Sensor) bewegt, sowie der optischen Detektionseinheit, die die Cantilever-Verbiegung bestimmt. Die Regelung über einen Rückkopplungs-Regelkreis und die Datenaufnahme werden von der Elektronik gesteuert.

mit konstant gehaltener Verbiegung der Blattfeder (contact force mode) oder bei konstantem Abstand Spitze-Oberfläche (constant height mode) abgerastert. Bei der ersten Methode detektiert man die vertikale Position der Spitze, bei der zweiten die Position des Laserspots auf dem Photodetektor. Im Kontaktmodus lassen sich hohe Auflösungen erzielen (bis hinein in den atomaren Bereich), dieser Modus ist allerdings nur für harte Proben geeignet; weiche Proben (z.B. Biomoleküle) können im Kontaktmodus durch die Spitze zerstört werden.

Im Unterschied dazu sind im *Nichtkontaktmodus* (non-contact mode, tapping mode^{TM}, dynamischer Modus) die Kräfte zwischen Sonde und Probe hauptsächlich attraktiv. Bei dieser Abbildungsmethode wird der Cantilever zu mechanischen Schwingungen nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Die Wechselwirkung mit der Oberfläche macht sich nun in einer Verschiebung der Resonanzfrequenz bemerkbar. Entweder die Amplitude oder die Phase der Schwingung wird beim Rastern der Probe über Rückkopplung konstant gehalten.

Abb. 2.2 zeigt als Beispiel für die Anwendung der Rasterkraftmikroskopie auf biologische Systeme eine AFM-Aufnahme von dsDNA-Molekülen (verlängerte ExpG-Binderegion

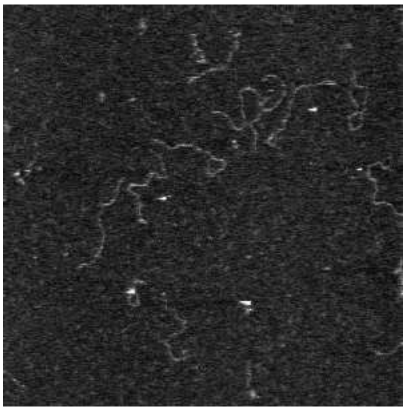

Abbildung 2.2: AFM-Aufnahme von dsDNA-Molekülen in wäßriger Lösung (Abbildung aus [10])

Das Bild zeigt die verlängerte ExpG-Binderegion aus S. meliloti. Aufgenommen wurde das Bild im Nichtkontaktmodus in einer Pufferlösung mit Ni^{2+}-Ionen (10 mM Hepes, 1mM $NiCl_2$, pH 7.0). Die Konzentration an DNA betrug 0.5 ng/μl. Die Höhenskala umfaßt 5 nm, die Breite des Bildausschnitts 1.5 μm.

von *Sinorhizobium meliloti*) in Flüssigkeit (tapping mode^{TM}) [10].

2.1.2 Grundlagen der Kraftspektroskopie mit dem AFM

Über die Analyse sog. *Kraft-Distanz-Kurven* ist es möglich, mit dem AFM Einsichten in das elastische Verhalten von Makromolekülen unter der Einwirkung äußerer Kräfte zu gewinnen. Kraft-Distanz-Kurven werden erhalten, indem man die AFM-Spitze an einem bestimmten Ort der Oberfläche in z-Richtung mit konstanter Geschwindigkeit auf- und abbewegt. Über die Verbiegung des Cantilevers lassen sich die zwischen dem Sensor und der Oberfläche wirkenden Kräfte messen. Trägt man jetzt gegen die Bewegung des Piezos die jeweils gemessene Kraft auf, erhält man eine Kraft-Distanz-Kurve. Mit Hilfe der Spitze ist es auch möglich, lokal auf der Oberfläche liegende Makromoleküle (z.B. DNA) über elektrostatische Anziehung zwischen Spitze und Molekül aufzunehmen. Bei der Aufwärtsbewegung der Spitze werden dann diese Moleküle, sofern sie an einer anderen Stelle noch an die Oberfläche binden, gestreckt. Aus der Form der Kraft-Distanz-Kurve erhält man wichtige Informationen über die Stärke der intramolekularen Kräfte, konformationelle Phasenübergänge sowie elastische Parameter. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit auf dsDNA-Moleküle angewandt. Es sei im Folgenden als Kraftspektroskopie bezeichnet.

Zur Einführung in die Analyse von Kraft-Distanz-Kurven sei als Beispiel die Kurvenform besprochen, die man bei unspezifischer Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche erhält (Abb. 2.3). Zunächst befindet sich die Spitze noch weit über der Oberfläche, es ist noch keine Wechselwirkung vorhanden (A). Wenn die Spitze nun der Oberfläche näher kommt, beginnen entweder langreichweitige *repulsive* Kräfte (elektrostatischen Ursprungs) oder *attraktive* Kräfte (van der Waals oder elektrostatisch) zu wirken, der Cantilever verbiegt sich also entweder nach oben (Abstoßung) oder nach unten (Anziehung). Bei einer bestimmten Distanz zur Oberfläche „springt“ die Spitze aufgrund

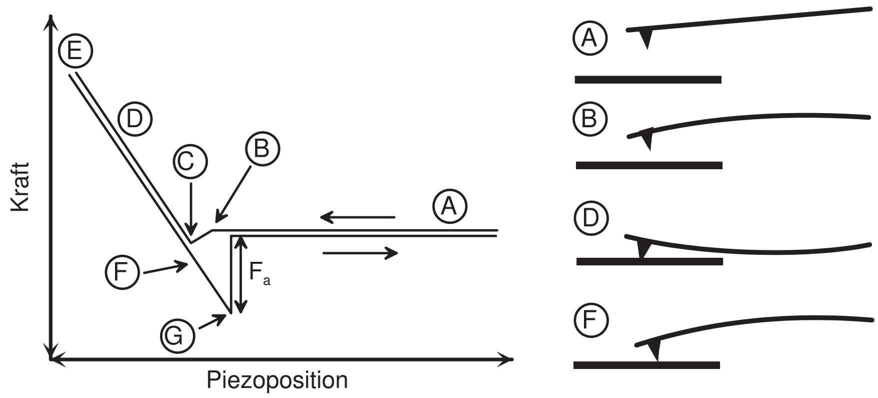

Abbildung 2.3: Schema einer Kraft-Distanz-Kurve (Erklärung im Text)

attraktiver Kräfte in den Kontakt mit der Probe (C). Bei weiterer Annäherung wird der Cantilever proportional zur Piezoposition verbogen (D). Diese Proportionalität kann man sich zur Kalibrierung der Kräfte zunutze machen: Die Sensorempfindlichkeit, d.h. die Steigung bei (D), wird zusammen mit der Federkonstanten (s. Abschnitt 2.1.3) dazu verwendet, um das von der Detektor-Photodiode stammende elektrische Signal in eine Kraft umzurechnen. Bei einer (vorher festgelegten) Verbiegung der Blattfeder (E) wird die Spitze wieder zurückgezogen. Beim Zurückziehen führen attraktive Wechselwirkungen mit der Oberfläche nun dazu, daß der Cantilever zur Oberfläche hingebogen wird ((F), ein Hysterese-Effekt). Im Falle der Immobilisierung von Makromolekülen auf der Oberfläche lassen sich aus der „Feinstruktur“ dieses Teils der Kurve Rückschlüsse auf das elastische Verhalten der Moleküle ziehen. Sobald die elastische Kraft des Cantilevers diese attraktive Kraft übersteigt, reißt die Bindung zwischen Spitze und Probe, und der Cantilever relaxiert (G). Die Größe dieses Sprungs wird auch als Abreißkraft F_a bezeichnet. Dieser Zyklus wird bei einer kraftspektroskopischen Messung viele Male durchlaufen.

2.1.3 Federkonstanten von Cantilevern

Um die bei einer kraftspektroskopischen Messung wirkenden Kräfte sicher bestimmen zu können, muß die Federkonstante des verwendeten Cantilevers bestimmt werden (die Herstellerangaben sind lediglich auf die Größenordnung genau). Für die Kalibrierung von Cantilevern existieren unterschiedliche Methoden. Die Federkonstante kann aus den geometrischen Abmessungen des Cantilevers berechnet [11], durch Beladen mit einer zusätzlichen Masse [12] oder durch Kopplung mit einer Eichfeder [13] bestimmt werden. Das in dieser Arbeit angewandte alternative Verfahren beruht auf der Analyse des thermischen Rauschens des Cantilevers [14, 15, 16].
Der Cantilever wird hierbei als harmonischer Oszillator angesehen. Dieser wird im thermischen Gleichgewicht durch folgenden Hamilton-Operator beschrieben:

$$\hat{H} = \frac{p^2}{2m_{eff}} + \frac{1}{2}m_{eff}\omega_0^2 q^2 \tag{2.1}$$

mit der effektiven Masse m_{eff}, der Auslenkung q, dem Impuls p sowie der Resonanzfrequenz ω_0. Aus dem Gleichverteilungssatz folgt

$$\left\langle \frac{1}{2}m_{eff}\omega_0^2 q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \tag{2.2}$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur ist. Aus der Beziehung $\omega_0^2 = k/m_{eff}$ folgt für die Federkonstante k des Federbalkens

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} \tag{2.3}$$

Bei kleinen Auslenkungen kann in guter Näherung von nur einem Freiheitsgrad des Cantilevers ausgegangen werden. Sieht man von anderen Rauschquellen sowie Dämpfung ab, dann wird die spektrale Dichte $\mathcal{Q}(\nu) = q/\sqrt{\nu}$ der thermischen Fluktuationen die Form einer Lorentzkurve annehmen [16]:

$$\mathcal{Q}(\nu) = \mathcal{Q}_{bg} + \frac{\mathcal{Q}_{amp}w^2}{w^2 + (\nu - \nu_c)^2} \tag{2.4}$$

wobei $\mathcal{Q}_{amp}$ die Amplitude, w die Güte, ν_c die Peakfrequenz und $\mathcal{Q}_{bg}$ den Hintergrund-Parameter des Lorentz-Profils darstellen. $\langle q^2 \rangle$ wird erhalten, indem man über $\mathcal{Q}$ integriert:

$$\langle q^2 \rangle \equiv P = \int_0^\infty d\nu \ \frac{q}{\sqrt{\nu}} \tag{2.5}$$

Für k folgt dann

$$k = \frac{k_B T}{P}. \tag{2.6}$$

2.1.4 Alternative Methoden der Kraftspektroskopie

In diesem Abschnitt werden exemplarisch noch zwei weitere Techniken vorgestellt, mit denen sich ebenfalls kraftspektroskopische Messungen an einzelnen Molekülen durchführen lassen.
Mit der sog. *Optischen Pinzette* (engl. Optical Tweezers, OT) [17] lassen sich lange Makromoleküle ($> 1\mu m$) kraftspektroskopisch untersuchen, die mit ihren Enden an der Oberfläche zweier kleiner Kügelchen (z.B. aus Polystyrol) immobilisiert und zwischen den beiden Kügelchen ausgestreckt sind. Eines der beiden Kügelchen wird (z.B. durch den Sog einer Mikropipette) festgehalten, das andere befindet sich im Focus eines Laserstrahls mit Gauss'schem Strahlprofil in einer „optischen Falle“. Das Prinzip dieser Falle

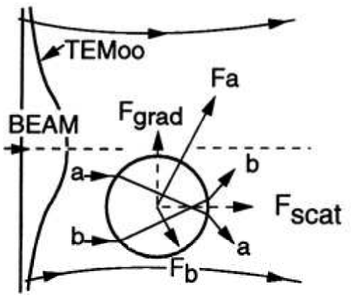

Abbildung 2.4: Prinzip der optischen Pinzette ([17], Erklärung im Text)

ist in Abb. 2.4 dargestellt: Das transparente Kügelchen, das einen höheren Brechungsindex als die Umgebung haben soll, ist in der Abbildung etwas aus der Ruhelage (entlang der Achse höchster Intensität des TEM_{00}-Strahls) ausgelenkt. Betrachten wir nun zwei Strahlen a und b, die symmetrisch zu seinem Mittelpunkt auf das Kügelchen treffen. Beide Strahlen werden (größtenteils) durch das Medium gebrochen, was zwei Kräfte $\mathbf{F}_a$ und $\mathbf{F}_b$ zur Folge hat, die in Richtung der Impulsänderung zeigen. Da die Intensität von Strahl a größer ist als die von Strahl b (vgl. TEM_{00}-Strahlprofil links im Bild), ist $\mathbf{F}_a$ größer als $\mathbf{F}_b$. Summiert man über alle Paare von symmetrischen Strahlen, so erhält man eine Netto-Kraft, die sich in zwei Komponenten $\mathbf{F}_{scat}$ und $\mathbf{F}_{grad}$ aufspalten läßt. $\mathbf{F}_{scat}$ ist die sog. Streukraft-Komponente, die in die Richtung des einfallenden Lichts zeigt. Die Komponente der Gradientenkraft $\mathbf{F}_{grad}$ ist auf den Gradienten der Lichtintensität zurückzuführen und hängt mit der Polarisierbarkeit $\boldsymbol{\alpha}$ des Kügelchens und der elektrischen Komponente des Laserstrahls $\mathbf{E}$ wie folgt zusammen:

$$\mathbf{F}_{grad} = \frac{1}{2}\,\boldsymbol{\alpha}\,\nabla\left(\mathbf{E}^2\right) \tag{2.7}$$

Sowohl die Gradienten- wie auch die Streukraft sind also auf den Strahlungsdruck zurückzuführen. Für ein Kügelchen, das sich auf der Achse der höchsten Intensität befindet, ist $\mathbf{F}_a = \mathbf{F}_b$, und es resultiert keine Gradientenkraft.
Zieht man nun mit einer externen Kraft $\mathbf{F}_{ext}$ an dem Kügelchen, so wird seine neue Gleichgewichtslage dort sein, wo sich alle Kräfte gerade kompensieren:

$$\sum\left(\mathbf{F}_{grad} + \mathbf{F}_{scat} + \mathbf{F}_{ext}\right) \;=\; 0 \tag{2.8}$$

Auf diesem Gleichgewicht beruht das optische Einfangen des Kügelchens und damit auch die Möglichkeit zur kraftspektrokopischen Anwendung. Gemessen wird die Auslenkung des Kügelchens aus der Gleichgewichtslage, die dem Hooke'schen Gesetz folgt (mit der elastischen Steifheit der optischen Falle als der Kraftkonstanten).
Die Technik, einen fokussierten Laserstrahl als Partikel-Falle zu benutzen, wurde 1984 in den Bell Laboratories entwickelt [17]. Der Kraftbereich der optischen Pinzette erstreckt sich von 0.1 bis $<$ 150 pN [18], was gut den mit AFM zugänglichen Bereich (10 pN bis 10 nN) ergänzt.
Ein ähnliches kraftspektrokopisches Verfahren ist die sog. magnetische Falle (auch magnetische Pinzette genannt) [19, 20]. Diese Technik ist insofern besonders interessant, als sie auch das Verdrehen eines Makromoleküls erlaubt. Das Prinzip besteht darin, das kettenförmige Makromolekül mit dem einen Ende an ein magnetisches Mikro-Kügelchen (Durchmesser: 1 - 5 μm) und mit dem anderen Ende an eine Oberfläche zu binden. Kleine Magneten, deren Position und Rotation kontrolliert werden können, werden nun benutzt, um das Kügelchen zu ziehen und zu drehen und damit das Molekül zu strecken und zu verdrillen. Dieses System hat den Vorteil, daß es die Kräfte *absolut* misst und deshalb nicht vorher kalibriert werden muß. Messungen mit magnetischen Fallen sind

möglich im Kraftbereich von wenigen fN (Femtonewton) bis fast 100 pN.

2.2 Kraftspektroskopie an DNA

Gegenstand dieser Arbeit sind kraftspektroskopische Untersuchungen an einzelnen DNA-Molekülen und DNA-Ligand-Komplexen. Der folgende Abschnitt befasst sich daher mit den strukturellen Eigenschaften eines einzelnen dsDNA-Moleküls unter dem Einfluß einer externen Zugspannung. Zuvor sei kurz die Konformation der B-DNA, also der Struktur doppelsträngiger DNA (dsDNA) bei Vorliegen physiologischer Bedingungen und ohne Einwirkung äußerer Kräfte, rekapituliert.

2.2.1 Struktur und Konformation der B-DNA

DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*, engl. für Desoxyribonukleinsäure) ist die molekulare Basis der genetischen Information, die Lebewesen bei der Zeugung an ihre Nachkommen vererben. Diese Fähigkeit der DNA zur Informationsspeicherung liegt in ihrer einzigartigen Struktur begründet.
DNA ist ein Polynucleotid [21, 22, 23], d.h. sie ist ein Polymer aus Nucleotiden. Ein Nucleotid der DNA besteht aus dem Kohlenhydrat Desoxyribose (genauer $\beta-D-$Desoxyribofuranose), das in 5'-Stellung mit einer Phosphatgruppe verestert ist und am 1'-C-Atom eine „nucleosidische“ Bindung zu einem N-Atom einer sog. Base aufweist. Basen sind die Pyrimidinderivate Cytosin (C) und Thymin (T) sowie die Purinderivate Adenin (A) und Guanin (G). Verestert man die 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose (so genannt wegen -H statt -OH am 2'-C-Atom) mit einer sauren Hydroxylgruppe der Phosphatgruppe eines anderen Nucleotids, so erhält man ssDNA (einzelsträngige DNA) als kettenförmiges Polymer. Winden sich nun zwei dieser Nucleotidstränge antiparallel (d.h. ein Strang in 3'-5'-, der andere in 5'-3'-Richtung, ausgehend von den freien Hydroxylgruppen am Ende der Kette) um eine gemeinsame Achse, bilden also eine Doppelhelix, dann spricht man von dsDNA (Doppelstrang-DNA). Stabilisiert wird diese Doppelhelix durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen: Adenin paart immer mit Thymin über zwei, Guanin immer mit Cytosin über drei Wasserstoffbrücken (sog. Watson-Crick-Basenpaarung, Abb. 2.5). Die beiden Stränge sind folglich komplementär zueinander, und die genetische Informationen steckt in der exakten Abfolge der Basen in der DNA. Die beiden Rückgrate aus alternierenden Zucker-Phosphat-Einheiten weisen in das Außenmedium, während die Basenpaare sich im Innern der Helix befinden. Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Ringsystemen benachbarter Basenpaare (sog.

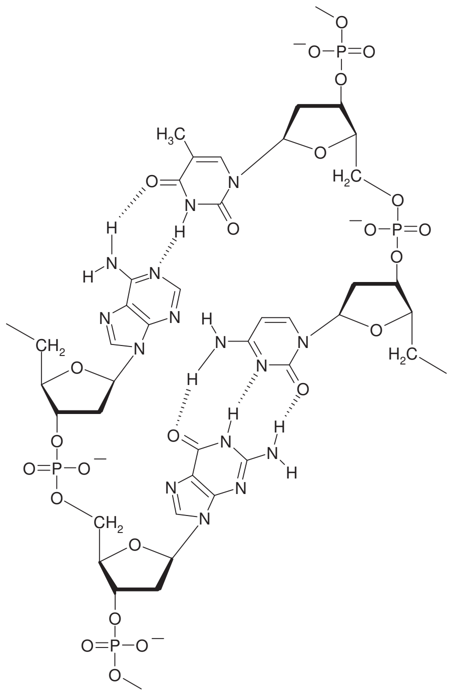

Abbildung 2.5: Strukturausschnitt aus dsDNA

Gezeigt ist ein zwei Basenpaare langer Ausschnitt aus der Struktur der Doppelhelix mit den beiden Rückgraten aus alternierenden Desoxyribose- und Phosphat-Einheiten sowie der Watson-Crick-Basenpaarung. Das obere Basenpaar ist ein A-T-Paar und das untere ein G-C-Paar. Die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

Basenstapelwechselwirkungen) stabilisieren die dsDNA zusätzlich. Die hohe negative Ladung der Phosphatgruppen des Rückgrats wird in vivo durch eine hohe Ionenstärke abgeschirmt (vor allem über zweiwertige Ionen wie Mg^{2+}).
Die unter physiologischen Bedingungen (entsprechende Ionenstärke, pH etc.) vorliegende Form der dsDNA ist die B-DNA. Bei dieser Konformation der DNA, die auch als Watson-Crick-Helix bezeichnet wird, stehen die Ringebenen der Basenpaare senkrecht (im Winkel 89°) zur Helixachse. Die Ringebenen der Desoxyriboseeinheiten stehen ebenfalls nahezu orthogonal zu den Basen. Der Durchmesser der Helix beträgt 2.37 nm. Benachbarte Basen sind 0.34 nm voneinander entfernt und um 36° gegeneinander gedreht. Die Struktur der DNA wiederholt sich folglich periodisch nach 10 (genauer: 10.4) Basenpaaren, die B-DNA ist also eine 10_1-Helix. In stereochemischer Hinsicht bleibt noch zu bemerken, daß die B-DNA eine *rechtsgängige* Helix darstellt. Eine wichtige sterische

Eigenschaft der Watson-Crick-Helix ist die Ausbildung einer großen und einer kleinen Furche (Abb. 2.6), die als potentielle Bindungsstellen für DNA-bindende Agenzien fungieren können (vgl. Abschnitt 2.3.2).

Bezüglich weiterer Konformere der dsDNA, wie die bei niedrigerem Wassergehalt vor-

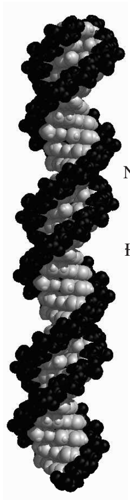

Abbildung 2.6: Kalottenmodell der B-DNA

Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist dunkel, die Basen hell dargestellt. Gut sichtbar sind die beiden Furchen, die als Bindestellen für kleine Moleküle dienen können. (Quelle: http://www.imb-jena.de/image-library/DNA/DNA-models/B-DNA/)

liegende A-DNA, die durch hohe Ionenstärke induzierte, linkshelikale Z-DNA sowie die seltenen C-, D-, E- und P-Konformere, die in dieser Arbeit keine Rolle spielen, sei auf die Literatur verwiesen [21, 22, 23].

2.2.2 Kraftspektroskopie an biochemischen Modellsystemen

Kraftspektroskopische Experimente mit AFM, optischer Pinzette und verwandten Techniken (Mikronadeln, Hydrodynamischer Fluß) lassen sich grob in zwei Kategorien einteilen. Zum einen ist es möglich, die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor- und Ligand-Molekülen zu messen [24, 25, 26]. Im Falle des AFM immobilisiert man dazu einen Bindungspartner auf der Oberfläche, während man den anderen kovalent mit der Spitze verbindet. Mit dieser Technik lassen sich Rückschlüsse auf kinetische Parameter der Bindung ziehen.

Die andere Möglichkeit besteht darin, einzelne Makromoleküle zu (über-)strecken und aus der Kraft-Ausdehnungs-Kurve Informationen über intramolekulare Kräfte, mögliche strukturelle Übergänge sowie damit verbundene elastische Parameter zu gewinnen (Einzelmolekülmechanik). Frühe Experimente in dieser Richtung wurden mit Mikronadeln an molekularen Motorproteinen, den Actinfilamenten des Muskelgewebes, gemacht [27]. Ein ebenfalls schon früh mit AFM [28, 29] und optischer Pinzette [30] untersuchtes Muskel-Protein ist das Titin mit einer periodischen Multidomänenstruktur, dessen Kraft-induzierte Denaturierung sich in der Kraft-Ausdehnungs-Kurve in einem charakteristischen „Sägezahnmuster“ bemerkbar macht. Ausgehend von diesen Anfängen hat sich die Einzelmolekül- Kraftspektroskopie an Proteinen mittlerweile als wichtiges Werkzeug für das mechanische Design neuer Strukturproteine entwickelt [31]. Ein anderes in diesem Zusammenhang wichtiges biochemisches Modellsystem ist das Polysaccharid Dextran, bei dem die Kraft-Ausdehnungs-Kurve Hinweise auf einen strukturellen Phasenübergang bei höheren Kräften lieferte [32]. Bereits 1994 wurde eine erste AFM-kraftspektrokopische Studie an dsDNA veröffentlicht, bei der die zwischen den komplementären Strängen wirkenden Kräfte direkt gemessen wurden [33]. Äußere Kräfte wurden schließlich dazu verwendet, um reversibel Domänen in RNA-Molekülen zu entfalten [34].

Kraftspektroskopische Elastizitätsmessungen an dsDNA-Molekülen wurden zunächst

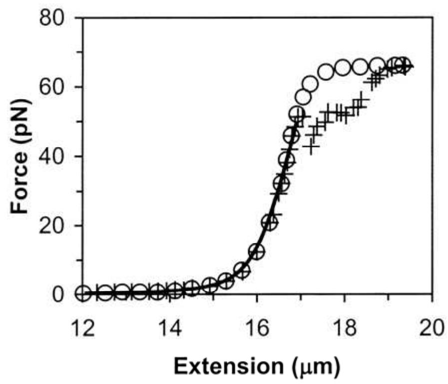

Abbildung 2.7: Kraft-Ausdehnungs-Kurven von dsDNA [35]

Die Kurven wurden mit optischer Pinzette bei einem pH von 6.0 aufgenommen. Die Kreise stellen die Ziehkurve, die Kreuze die Relaxation des Moleküls dar. Die durchgezogene Linie repräsentiert einen WLC-Fit an die Daten (Persistenzlänge: 45 nm)

von mehreren Gruppen mit optischen Pinzetten durchgeführt. Dabei ergab sich, daß sich B-DNA bis zu Kräften von ca. 40-70 pN (der genaue Wert ist hierbei abhängig von der Basensequenz) wie eine elastische Feder verhält [36], bei höheren Kräften dann aber ein hoch-kooperativer, struktureller Phasenübergang stattfindet [37, 38]. Williams et al. erforschten mit optischer Pinzette die Abhängigkeit dieses Übergangs von der Temperatur und dem pH-Wert [35, 39]; Abb. 2.7 zeigt eine typische Kraft-Distanz-Kurve. Rief et al. führten kraftspektroskopische Messungen mit dem AFM an λ-DNA sowie synthetischer Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)- und Poly(dA-dT)•poly(dA-dT)-DNA durch und fanden einen weiteren Phasenübergang, das Kraft-induzierte Schmelzen der dsDNA bei Kräften > 100 pN. Untersuchungen zur Änderung der elastischen Eigenschaften von dsDNA durch das Binden kleiner Moleküle wurden ebenfalls durchgeführt [40, 41].

2.2.3 S-DNA

Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt, ändert freie dsDNA ab einer bestimmten externen Zugspannung ihre Konformation. Das neue Konformer, das bis auf ca. 170 % der Konturlänge von B-DNA elongiert werden kann [38, 37, 42, 43], wird auch als S-DNA bezeichnet („S“ bedeutet „stretched“, engl. für gedehnt, gestreckt) [44]. In einer Auftragung der applizierten Kraft gegen die Elongation der DNA ist dieser kooperative Übergang zur S-Form als ein Plateau sichtbar, bei dem die DNA bei fast konstanter Kraft gestreckt wird. Das Plateau liegt bei Kräften von 40-80 pN, abhängig von der Sequenz der DNA.

In Abb. 2.8 ist eine tyische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von freier dsDNA, im vorliegenden Fall von Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)-DNA, dargestellt, die mit Hilfe der AFM-Kraftspektroskopie erhalten wurde. Die Kurve zeigt die einzelnen Zustände, die ein DNA-Molekül unter Einwirkung einer externen (hier durch die AFM-Spitze applizierten) Kraft durchläuft: Zunächst, hier bis zu einer Ausdehnung von 320 nm und einer Kraft von etwa 75 pN, wird die B-DNA elongiert. Dann folgt ein Plateau, das dem reversiblen Übergang von der B- zur S-Konformation der dsDNA entspricht. Bei etwa 530 nm steigt die Kraft wieder an bis auf etwa 330 pN; dieser Teil der Kraft-Ausdehnungs-Kurve ist auf das Kraft-induzierte Schmelzen der Doppelhelix zurückzuführen. Über eine kurze Distanz bleibt die Kraft nun wieder konstant, dann steigt sie steil an; man zieht jetzt an einem Einzelstrang (ssDNA). Dieser wird bis auf 630 nm gedehnt, bis er abreißt.
Der (Pseudo-)Phasenübergang zur S-Konformation vollzieht sich (auf der Zeitskala des AFM-Experiments) reversibel und hoch-kooperativ [46, 47]. Um dieses Phänomen zu erklären, wurde von Lavery et al. [48, 38] eine Molecular-Modelling-Simulation durchgeführt, die numerisch die Energie für DNA unter Zugspannung minimierte. Die Resultate dieser Simulationen sprechen in Übereinstimmung mit den Experimenten für

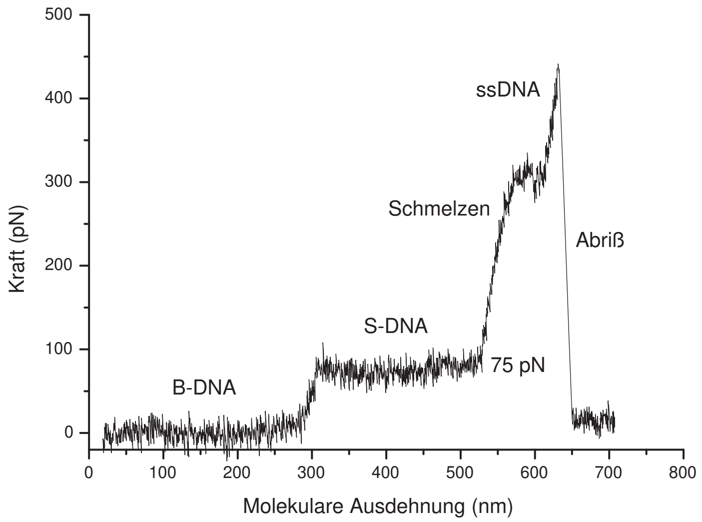

Abbildung 2.8: Kraft-Ausdehnungs-Kurve (Poly(dG-dC) dsDNA) (Erklärung im Text)

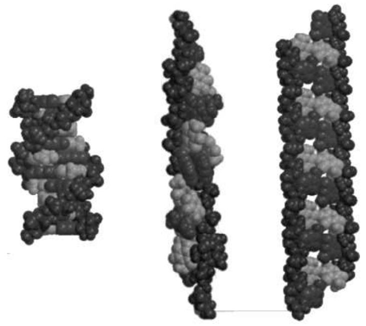

Abbildung 2.9: Überstreckte DNA-Konformere (nach [42])

Links: gewöhnliche B-DNA, Mitte: S-DNA (Zug an den 5'-Enden), rechts: S-DNA (Zug an den 3'-Enden)

die Existenz einer neuen DNA-Konformation, die tatsächlich gegenüber der B-DNA um 70% gestreckt ist. Die exakte Struktur dieser überstreckten Form ist davon abhängig, an welchen Enden gezogen wird (Abb. 2.9). Erfolgt der Zug an beiden 5'-Enden, so entspricht die neue Konformation einer Helix mit stark geneigten Basenpaaren, einer sehr engen Nebenfurche und einem Durchmesser von ca. 70% des B-DNA-Querschnitts. Wird an beiden 3'-Enden gezogen, dann führt das zur Aufwindung der Helix, und die

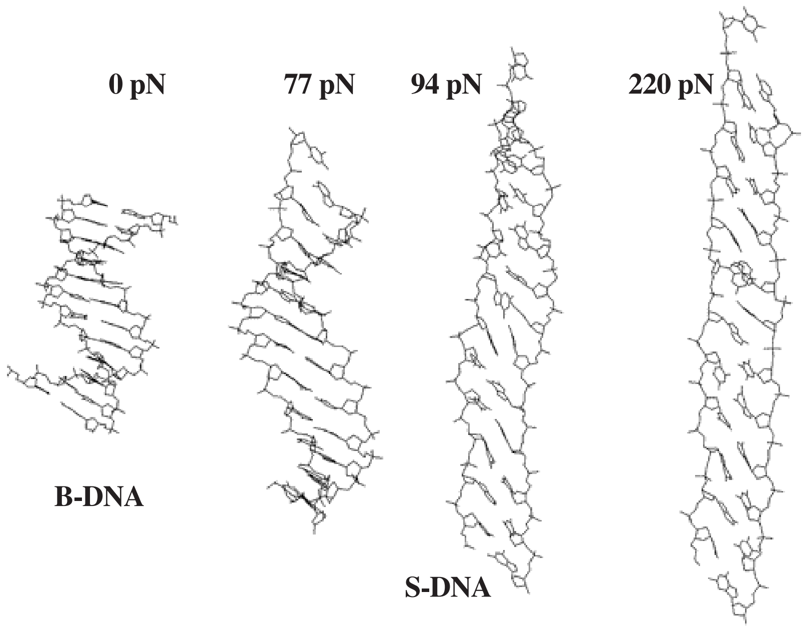

Abbildung 2.10: Struktur der dsDNA bei vier verschiedenen Kräften (molekulardynamische Simulation [45])

resultierende Konformation erinnert an eine Leiter [48, 45]. Abb. 2.10 zeigt eine molekulardynamische Simulation des Ziehens an dsDNA (in 3'-3'-Richtung). Deutlich erkennbar ist der Übergang zur Leiterartigen S-DNA-Konformation ab ca. 80 pN. Neuere Experimente [49] weisen darauf hin, daß die S-Phase der DNA auch eine (rechtsgängige) Helizität aufweist mit 38 Basenpaaren pro Drehung (38_1-Helix), so daß die Struktur eher einer leicht verdrillten Leiter ähnelt.

2.2.4 Kraft-induziertes Schmelzen der Doppelhelix

Wird ein dsDNA-Molekül auf mehr als das zweifache seiner Länge gestreckt, so führt diese Überstreckung zum Bruch der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren. Die äußere Zugkraft induziert also das Schmelzen der DNA-Doppelhelix [35, 39, 50]. Abb. 2.11 zeigt schematisch, wie man sich dieses Kraft-induzierte Schmelzen (im Unterschied zum thermischen Schmelzvorgang) vorzustellen hat: Während der eine Strang mit seinem unteren Ende noch an die Oberfläche bindet, wird der andere durch den Zug der Spitze von ihm abgelöst (für das Schmelzen ist es unerheblich, ob in 5'-5'- oder 3'-3'-Richtung gezogen wird).
Die Form der Schmelzkurve ist stark sequenzabhängig, man kann einen Zusammenhang

zur freien Enthalpie der Basenpaarung $\Delta G_{bp}(T)$ für die Paare A-T und G-C herstellen [51]: Für G-C-reiche Sequenzen erfolgt das Kraft-induzierte Schmelzen der Helix bei höheren Kräften als für A-T-reiche Sequenzen, bei denen zudem das Schmelzen nicht mehr eindeutig vom B-S-Phasenübergang zu separieren ist [47].
Ist der durch die AFM-Spitze gezogene Strang noch über sein unteres Ende an die Ober-

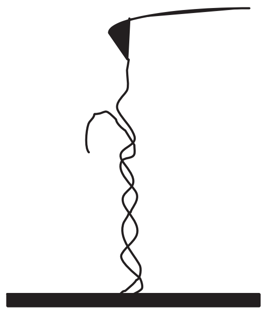

Abbildung 2.11: Kraft-induziertes Schmelzen der dsDNA-Helix (Schema)

fläche gebunden, so kann in der Kraft-Ausdehnungs-Kurve auch noch ein kleines Stück vor dem Abriß des Moleküls auftreten, das auf die Elongation eines DNA-Einzelstrangs (ssDNA) zurückzuführen ist (Abb. 2.8).

2.3 Bindung von Liganden an DNA

DNA kann als „Gastgeber“ für zahlreiche „Gäste“, also DNA-bindende Liganden, fungieren. Diese Bindung zwischen Effektormolekülen wie kleinen organischen Molekülen, Peptiden, Proteinen, und der dsDNA beruht auf schwachen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen, deren Bindungsenergien in der Größenordnung von 10 kJ/mol und damit zwischen dem Bereich der thermischen Energie ($1/2\, k_B T = 1.24\, kJ/mol$) und dem um ca. eine Zehnerpotenz größeren Bereich kovalenter chemischer Bindungen liegen. Daß auf schwachen Wechselwirkungen basierende Bindungsprozesse in der Natur dennoch eine so große Bedeutung haben, ist auf die große Anzahl dieser Wechselwirkungen zurückzuführen, die an der reversiblen Bindung eines Liganden an einen Rezeptor beteiligt sind; die *Anzahl* der Wechselwirkungen führt in der Summe zu einer großen Bindungsenergie. Zu diesen Kräften zählt man:

- Elektrostatische Wechselwirkungen (beruhend auf dem Coulomb-Gesetz) zwischen Ionen oder geladenen funktionellen Gruppen. Diese fanden bereits bei der Analyse der zwischen AFM-Spitze und Oberfläche wirkenden Kräfte Erwähnung. Ein Beispiel ist die Wechselwirkung zwischen einer negativ geladenen Phosphatgruppe im Rückgrat der DNA und der positiv geladenen Guanidinogruppe eines Argininrestes in einem Peptid.

- Wasserstoffbrückenbindungen, die schon im vorigen Kapitel, bei der Besprechung der dreidimensionalen Struktur der dsDNA, betrachtet wurden. Sie basieren auf dem schnellen Austausch von Protonen zwischen Protonen-Donatoren und Akzeptoren über eine kleine Potentialbarriere hinweg. Als Donatoren oder Akzeptoren kommen nur die Nichtmetallelemente der $2p$-Reihe in Frage. Wasserstoffbrücken erfüllen wichtige Funktionen bei der Bildung der Sekundärstruktur von Biopolymeren (Proteinen, Polysacchariden, Nucleinsäuren...).

- Van-der-Waals-Wechselwirkungen, also schwache Kräfte, die auf zeitliche Fluktuationen der Ladungsdichte in der Elektronenhülle sich nahe kommender Atome zurückzuführen sind. Auch diese Kräfte spielten schon bei der Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Oberfläche sowie bei der Struktur der dsDNA (Basenstapel-Wechselwirkungen) eine wichtige Rolle.

- Schließlich muß noch ein Effekt erwähnt werden, der rein entropischer Natur ist und auf der Verdrängung von Wassermolekülen durch unpolare Moleküle beruht. Gehen z.B. zwei Makromoleküle durch einen molekularen Erkennungsprozeß zwischen zwei unpolaren Domänen eine Bindung ein, dann werden durch diese Bindung Wassermoleküle frei, die vorher einen Käfig um die Bindungsdomänen der beiden Makromoleküle bildeten (man spricht von Hydratation zweiter Ordnung, d.h. ohne die energetisch günstige Ausbildung von Wasserstoffbrücken). Diese Wassermoleküle können nun durch Neuorientierung zusätzliche Wasserstoffbrücken ausbilden. Außerdem stehen den freigewordenen Wassermolekülen nun mehr mögliche Konfigurationen zur Verfügung, die Entropie des Gesamtsystems steigt.

Viele dsDNA-bindende Moleküle, wie z.B. die an der Replikation, Reparatur oder Transkription beteiligten Proteine, sind sehr groß und komplex und besitzen Domänen, mit denen sie spezifisch an bestimmte Sequenzen der DNA binden können (sog. „Bindungstaschen“). Diese Art spezifischer Bindung zwischen Ligand und Rezeptor bezeichnet man auch als *molekulare Erkennung*. Ein ganzes Arsenal intermolekularer Kontakte bildet hierbei die Basis für die Komplementarität zum Rezeptor. Molekulare Erkennung folgt in einem einfachen Modell dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“; bessere Modelle, wie

der „Induced fit“, berücksichtigen auch dynamische Erkennung, also konformationelle Anpassung des Rezeptors nach erfogter Bindung.
Zu unterscheiden hiervon ist die sequenz-unspezifische Bindung kleiner Ligandmoleküle an die DNA. Bei dieser Bindungsart werden keine speziellen Sequenzen bevorzugt gebunden. Der Übergang zwsichen spezifischer molekularer Erkennung und völlig unspezifischer Bindung ist allerdings fließend, entscheidend sind signifikante Unterschiede in der freien Bidungsenergie. Bei der unspezifischen Bindung von Liganden an dsDNA sind grundsätzlich zwei verschiedene Moden zu unterscheiden: Interkalation und Bindung in der Haupt- oder Nebenfurche [52].
Oft erzwingt die Bindung eine konformationelle Anpassung sowohl der dsDNA als auch des Liganden, und die Struktur der dsDNA wird erheblich deformiert. Daß diese mit der molekularen Erkennung verbundenen strukturellen Änderungen nicht ohne Auswirkung auf das elastische Verhalten der dsDNA bleiben, liegt auf der Hand. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Unterscheidung zwischen diesen unterschiedlichen Bindungsarten mit Hilfe der AFM-Kraftspektroskopie sowie die quantitative Analyse der Änderung des elastischen Verhaltens der dsDNA, die durch die Bindung von Liganden induziert wird. Als Modellsyteme wurden hier zunächst relativ kleine organische Moleküle, die als typische Vertreter der jeweiligen Bindungsart gelten können, verwendet.

2.3.1 Interkalatoren

Wechselwirkung mit der dsDNA durch Interkalation ist dadurch gekennzeichnet, daß sich kleine, flache Moleküle wie ein dünner Keil parallel zwischen die Basen der DNA einschieben. Potentielle Interkalatoren sind daher planare aromatische Ringsysteme, die auch mit den sie umgebenden Basenpaaren van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen können. Ionische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen funktionellen Gruppen am Interkalator und dem negativ geladenen DNA-Rückgrat stabilisieren den Komplex zusätzlich. Die positive Ladung begünstigt auch die Kinetik der Interkalation: Auf die (schnelle) Assoziation des Interkalators mit dem Rückgrat folgt dann die eigentliche Interkalation als zweiter Schritt. Die Interkalation ist immer verbunden mit einer erheblichen Ausdehnung und Aufwindung der Doppelhelix.

Viele Verbindungen, die durch Interkalation mit dsDNA wechselwirken, werden als Anti-Tumor-Therapeutika in der Krebstherapie eingesetzt [53]. Ihre cytostatische Wirkung beruht auf der Stabilisierung des Komplexes zwischen DNA und Topoisomerase II, einem Enzym, das bei der Entwindung negativ superspiralisierter dsDNA mitwirkt [54]. Interkalatoren wirken also als Inhibitoren der Topoisomerase II.

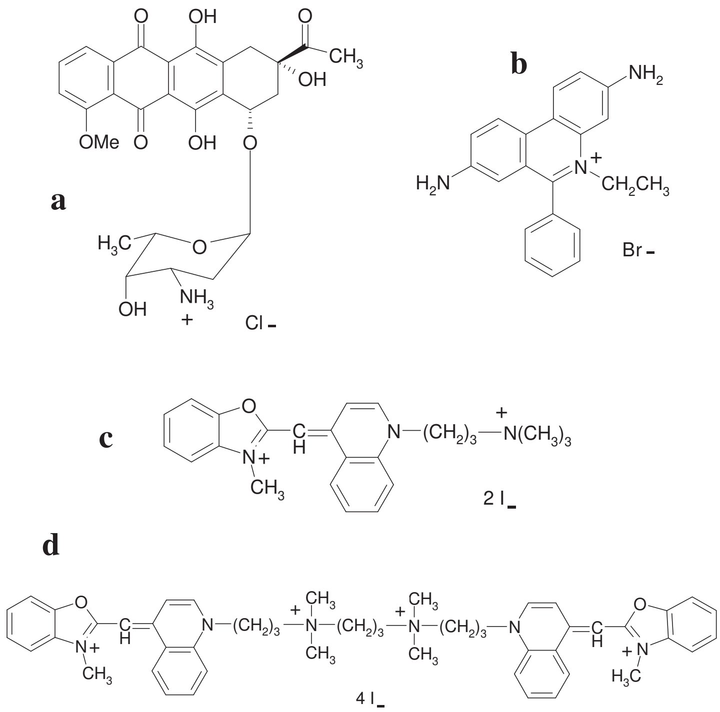

Abbildung 2.12: Strukturformeln der Interkalatoren
(a) Daunomycin, (b) Ethidiumbromid, (c) YO, (d) YOYO

Ein prominentes Beispiel für eine ganze Klasse dieser Chemotherapeutika ist das Daunomycin (auch als Daunorubicin bezeichnet), ein Anthracyclin-Antibiotikum [55, 56]. Der wesentliche, interkalierende Teil des Moleküls ist ein Tetracyclin-Ringsystem, das sich bei der Interkalation zwischen die Nucleotid-Basenpaare schiebt (Abb. 2.12 (a)).
Die Bindung zwischen Daunomycin und dsDNA gehört zu den am besten charakterisierten Wechselwirkungen von Interkalatoren mit dsDNA [57, 58]. Abb. 2.13 zeigt ein Modell des Daunorubicin-DNA-Komplexes. Ein anderes Beispiel für einen „reinen“ Interkalator ist das Ethidiumbromid, das beispielsweise zur Fluoreszenzmarkierung von dsDNA eingesetzt wird [59, 60]. Interkalation dieses Moleküls in doppelsträngige DNA führt zu einer Steigerung seiner Fluoreszenzintensität. Die Struktur von Ethidiumbromid mit dem zentralen Phenanthridinring zeigt Abb. 2.12 (b).
Ethidiumbromid als Beispiel für einen relativ einfach gebauten Interkalator sowie Daunorubicin als komplexeres Molekül wurden bezüglich der mit der Bindung verbundenen Änderungen in der Hydratation untersucht [61]. Während bei Ethidiumbromid keine Netto-Aufnahme oder -Abgabe von Wassermolekülen festgestellt wurde, fand man für Daunomycin eine signifikante Erhöhung der Hydratation. Weitere, ebenfalls erfolgreich

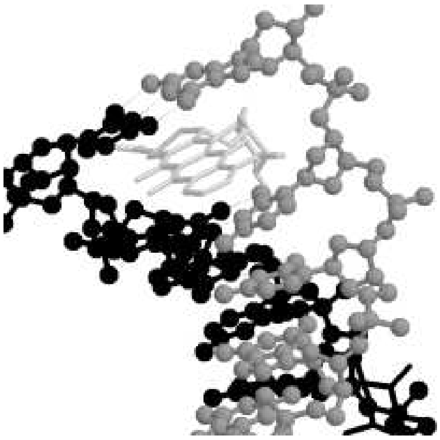

Abbildung 2.13: Interkalation von dsDNA durch Daunomycin *(Quelle: http://www.cs.dartmouth.edu/ brd/www/bio/biology.html)*

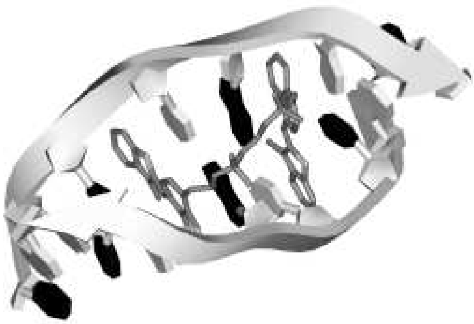

Abbildung 2.14: Interkalation von dsDNA mit YOYO

als Fluoreszenzmarker für dsDNA eingesetzte Interkalatoren sind die Moleküle „YO“ (nomenklatorisch: 4-[(3-Methyl-2(3H)-benzoxazolidin)methyl]-1-[3-(trimethylammonium) propyl]-chinolinium-diiodid, Abb. 2.12 (c)) und „YOYO“, ein YO-Dimer (Abb. 2.12 (d)) [62]. Beide können mit ihrem ausgedehnten heterocyclischen Ringsystem interkalieren, YOYO mit seinen zwei über eine flexible Kette verbundenen Ringen sogar zweimal, es ist also ein Bisinterkalator. Abb. 2.14 zeigt, wie diese Bisinterkalation aussieht: Die beiden Ringe schieben sich in die Basenabfolge ein, wobei sie zwei Basenpaare zwischen sich einschließen. Bei Zugabe von YOYO im Überschuß, also bei vollständiger „Belegung“ der dsDNA, kommen auf ca. 10 Basenpaare ein Interkalatormolekül.

Außerdem ist noch ein weiterer Effekt bei Interkalator-Überschuß zu beobachten: Sowohl YO als auch YOYO können bei höheren Konzentrationen zusätzlich in der Hauptfurche der DNA binden [63]; sie sind also keine reinen Interkalatoren.

2.3.2 DNA-bindende Agenzien in der Haupt- und Nebenfurche

Die Bindung kleiner, oft positiv geladener Moleküle in der Neben- oder Hauptfurche der dsDNA erfolgt im wesentlichen über elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Rückgraten. Im Gegensatz zur Interkalation ist dieser Bindungsmodus aber auch von drastischen Änderungen in der Hydratation des Rückgrats begleitet. Geringfügiger ist die Auswirkung der Bindung auf die Helixgeometrie, Furchen-bindende Agenzien induzieren lokal eine leichte Verbiegung der dsDNA.
Ein wichtiges Beispiel für ein Nebenfurchenbindendes Molekül ist das Distamycin A, das als kurzes Peptid wiederum Leitmotiv ist für eine ganze Gruppe diesmal nicht-interkalierender mutagener Substanzen zur Anwendung in der Krebstherapie [64, 65]. Die cytostatische Wirkung beruht hier wohl auf induzierter Dekondensation der Chromosomen [66] Abb. 2.15 zeigt die Struktur von Distamycin mit drei *N*-Methylpyrrol-

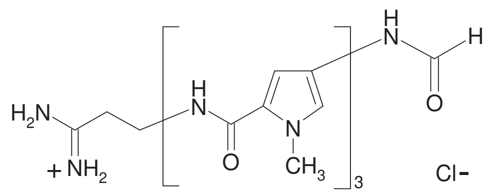

Abbildung 2.15: Struktur von Distamycin A

Einheiten in Reihe. In Abb. 2.16 ist die Wechselwirkung von Distamycin mit der Nebenfurche der dsDNA dargestellt: Das Molekül liegt in der durch die DNA-Struktur vorgegebenen Rille und folgt direkt der Windung der Helix.

Verwandt mit Distamycin in Bezug auf Struktur und Art der Wechselwirkung mit der DNA sind die amphipathischen helikalen Peptide Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker und Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker, die als Modellsysteme für dsDNA-bindende Domänen von Proteinen synthetisiert wurden [67]. (Zur Struktur vgl. Abb. 2.17.) Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker bildet eine α-Helix-Struktur, bei der eine Seite der Helix die polaren Arg-Seitenketten mit der Guanidinogruppe enthält, während die andere Seite unpolar ist; in der Primärstruktur sind die Arg-Reste durch jeweils drei unpolare Aminosäur-

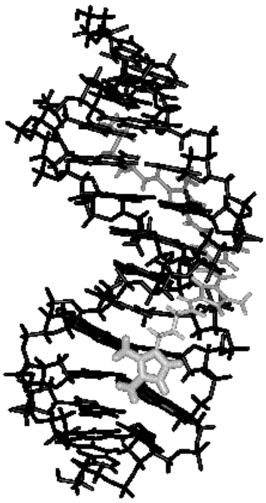

Abbildung 2.16: Bindung von Distamycin A in der DNA-Nebenfurche *(Quelle: http://www.cchem.berkeley.edu/ wemmer/AbsDNA/HopXL.html)*

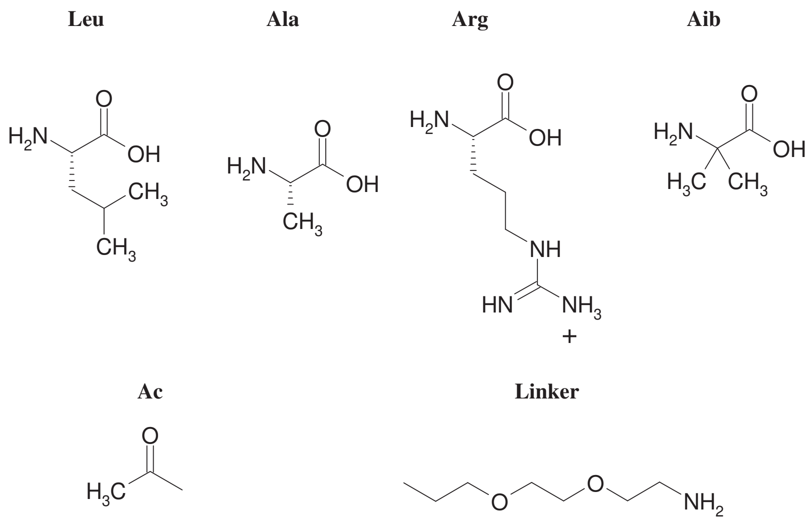

Abbildung 2.17: Zur Nomenklatur der synthetischen Peptide

en voneinander getrennt. Dieses Strukturmotiv, das das Peptid amphipatisch macht, findet sich z.B. in Apolipoproteinen oder Peptidhormonen [68].
Das andere hier untersuchte Peptid, Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker, enthält die Nichtstandard-Aminosäure α-Aminoisobuttersäure, die eine sog. β-Schleife in der Sekundär-

struktur bildet. Aib folgt viermal aufeinander, jeweils getrennt durch zwei Aminosäuren, und induziert eine 3_{10}-Helix-Struktur des Peptids. Die polare Aminosäure ist hier wieder Arginin [67].
Von beiden Peptiden wurde angenommen, daß sie über ihre polaren Arg-Reste mit dem Phosphatrückgrat der DNA wechselwirken. Die Bindung der Peptide konnte durch kraftspektroskopische Messungen verifiziert werden. Der genaue Bindungsmodus ist noch unbekannt, aber die Analogie zu sequenzspezifisch bindenden vergleichbaren Peptiden legt die Vermutung nahe, daß es sich um eine Bindung in der dsDNA-Hauptfurche handelt [69].

2.4 Elastizitätsmodelle I: Das Worm-Like Chain Modell

Freie DNA nimmt in wäßriger Lösung eine sog. Zufallsknäuel-Konformation an, welche für das System, das aus dem Biopolymer und seiner Umgebung aus Lösungsmittelmolekülen zusammengesetzt ist, größtmögliche Entropie bedeutet. Durch die Zufallsknäuel-Konformation steht diesem System ein Maximum an Konfigurationen (Mikrozuständen im Rahmen einer mikrokanonischen Gesamtheit) zur Verfügung. Zieht man an dem Polymerstrang, so verlangt die Reduzierung der Entropie (dem System stehen weniger Konfigurationen zur Verfügung) die Aufwendung von Energie. Um eine bestimmte End-zu-End-Distanz des Moleküls zu erreichen, muß Arbeit am System verrichtet werden. Bei voller Ausdehnung des Moleküls ist lediglich eine mögliche Konfiguration möglich. Die End-zu-End-Distanz entspricht dann der Konturlänge (d.h. der Bogenlänge der Raumkurve) des Moleküls. Die mit dem Ziehen an dsDNA verbundenen Kräfte sind nur im Bereich kleiner Kräfte (< 10 pN) rein entropischer Natur. Oberhalb dieses Regimes wird das elastische Verhalten durch die Enthalpie-Bilanz dominiert.
Das in den folgenden Abschnitten eingeführte Worm-Like Chain Modell ist ein Ansatz, mit dem sich das durch entropische (Pseudo-)Kräfte bestimmte Verhalten kettenförmiger Polymere beschreiben läßt. Gegenüber dem hier nicht diskutierten, einfacheren sog. Freely-Jointed Chain-Modell [70, 44], das auf einer Art Random Walk der Kettensegmente beruht und ebenfalls zum Fitten von Kraft-Ausdehnungs-Kurven von dsDNA herangezogen wurde [37, 71], ist das WLC Modell besser geeignet für relativ steife Bio-polymere, ein Kriterium, das auf dsDNA mit einer Persistenzlänge von 53.4 nm (typischer Wert [72]) zweifellos zutrifft.

2.4.1 Das Modell von Kratky und Porod

Zunächst betrachten wir eine Polymerkette, die keine durch äußere Kräfte hervorgerufene Verdrillung aufweisen soll. Ein solches System wird durch das sog. Kratky-Porod-Modell beschrieben [73, 74]: Eine Reihe von N Segmenten der Länge a_0, jedes Segment mit dem Orientierungsvektor $\mathbf{t}_i$ (vgl. Abb. 2.18), hat bei gegebener Konfiguration der

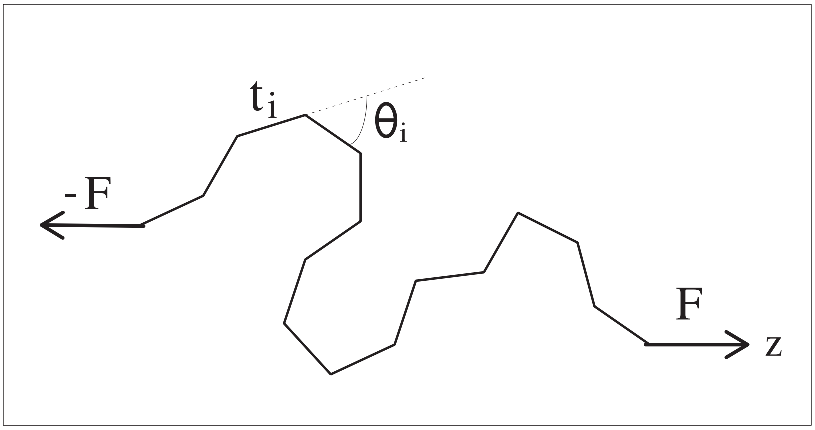

Abbildung 2.18: Kratky-Porod-Modell

Eine kontinuierliche Polymerkette kann durch eine Kette frei rotierender Segmente der Länge a_0 simuliert werden. Jedem Segment i wird ein Orientierungsvektor $\mathbf{t}_i$ zugeordnet, der mit dem Orientierungsvektor des folgenden Segments $i+1$ einen Winkel θ_i bildet. Die z-Achse verläuft entlang der Richtung der externen Zugkraft $\mathbf{F}$.

Kette, welche einem Ensemble der Mikrozustände der Segment-Orientierungen $\{\mathbf{t}_i\}$ entspricht, die Energie E_{KP} als Summe der Biegeenergien aufeinanderfolgender Segmente [18]:

$$E_{KP} = -\frac{\kappa}{a_0} \sum_{i=2}^{N} \mathbf{t}_i \, \mathbf{t}_{i-1} = -\frac{\kappa}{a_0} \sum_{i=2}^{N} \cos\theta_i \tag{2.9}$$

Hierbei ist θ_i der Winkel zwischen aufeinanderfolgenden Orientierungsvektoren und κ die Biegesteifigkeit. Die Winkel-Korrelation in diesem System nimmt mit der Distanz zwischen den Segmenten exponentiell ab [75]:

$$\langle \, \mathbf{t}_i \, \mathbf{t}_j \, \rangle = e^{-a_0|i-j|/\xi} \tag{2.10}$$

wobei

$$\xi = \frac{\kappa}{k_B T} \tag{2.11}$$

die für das System charakteristische Zerfallslänge der angularen Korrelation darstellt. Sie ist ein Maß für die Steifheit der Kette und wird auch als Persistenzlänge bezeichnet. Die mittlere quadratische End-zu-End-Distanz $\langle \mathbf{x}^2 \rangle$ der Kette erfüllt die Gleichung

$$R_g^2 = \langle \mathbf{x}^2 \rangle = \left(a_0 \sum_{i=1}^{N} \mathbf{t}_i \right)^2 \simeq 2\, N\, a_0\, \xi = 2\, L_0\, \xi \tag{2.12}$$

wobei $L_0 = N a_0$ die Konturlänge der Kette bezeichnet. Ein DNA-Molekül nimmt in Lösung bei Abwesenheit äußerer Kräfte folglich eine fluktuierende Zufallsknäuel-Konformation (engl. random coil) an. Die charakteristische Größe hierfür ist R_g, der sog. Gyrationsradius[1].

Nun soll das Verhalten einer Polymerkette unter der Einwirkung extern applizierter, dehnender Kräfte (realisiert beispielsweise durch das Ziehen am Polymerstrang mit einer AFM-Spitze) modelliert werden. Eine Kraft, die entlang der z-Achse auf die Kette wirkt, verrichtet die Arbeit

$$W = -\mathbf{F} \bullet \mathbf{x} = -F\, a_0 \sum_{i=1}^{N} t_{i,z} = -F\, a_0 \sum_{i=1}^{N} \cos \Theta_i \tag{2.13}$$

wobei Θ_i der Winkel zwischen $\mathbf{t}_i$ und der z-Achse sei. Dieser Term wird zu Gl. 2.9 addiert:

$$E_{KP} = -\frac{\kappa}{a_0} \sum_{i=2}^{N} \cos \theta_i - F\, a_0 \sum_{i=2}^{N} \cos \Theta_i \tag{2.14}$$

Dieses Modell ist leider nur für kleine Kräfte analytisch lösbar. Um das elastische Verhalten einer Polymerkette bei höheren Kräften zu modellieren, muß man zu Näherungen des Kratky-Porod-Modells greifen. Eine sinnvolle Näherung zu Gl. 2.14 ist die der kontinuierlichen Kette mit $a_0 \to 0$, welche auch als Worm-Like Chain (WLC)[2] Modell bezeichnet wird.

[1] $\gamma\acute{\upsilon}\varrho o\varsigma$ (gr.) = Knoten, verschlungenes Knäuel

[2] Auf eine deutsche Übersetzung des Begriffes sei zugunsten des gebräuchlichen englischen Ausdrucks verzichtet.

2.4.2 Entropische Elastizität der WLC

Bei der Worm-Like Chain Näherung müssen wir von diskreten Segment-Orientierungsvektoren $\mathbf{t}_i$ zum kontinuierlichen Tangentenvektor $\mathbf{t}$ übergehen. Wenn $\mathbf{r}(s)$ die Raumkurve der Polymerkette bezeichnet, dann gilt für den Tangentenvektor:

$$\mathbf{t} = \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial s} \tag{2.15}$$

Die partielle Ableitung dieses Ausdrucks nach s ist die Biegesteifigkeit κ für den kontinuierlichen Fall:

$$\kappa = \frac{\partial \mathbf{t}}{\partial s} = \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial s^2} \tag{2.16}$$

Diese ist ein Maß für die Krümmung der Polymerkette. Die Verbiegung der Polymerkette kostet eine Energie $k_B T \xi \kappa^2/2$ (pro Länge). Im folgenden seien Kraft und Ausdehnung der Kette immer entlang der zAchse orientiert. Gl. 2.14 schreibt sich für eine WLC als [76]:

$$\frac{E_{WLC}}{k_B T} = \frac{\xi}{2} \int_0^{L_0} \left(\frac{\partial \mathbf{t}}{\partial s} \right)^2 ds - F \int_0^{L_0} \cos \Theta(s) \, ds \tag{2.17}$$

Wenn große Kräfte appliziert werden, nähert sich die Ausdehnung der Kette der Konturlänge L_0, und der Tangentenvektor fluktuiert nur noch schwach um $\vec{z}$. Aus der Bedingung $|\mathbf{t}| = 1$ folgt, daß die t_z-Fluktuationen näherungsweise eine quadratische Funktion des Zweiervektors $\mathbf{t}_\perp \equiv [t_x, t_y]$ sind (sofern man t_x und t_y als unabhängige Komponenten annimmt): $t_z = 1 - \mathbf{t}_\perp^2/2 + \mathcal{O}(\mathbf{t}_\perp^4)$. Bis zur Ordnung 2 erhält man damit die Gauss'sche Näherung zu Gl. 2.17 [77, 78]:

$$\frac{E_{WLC}}{k_B T} = \frac{1}{2} \sum_0^{L_0} ds \left[\xi \left(\frac{\partial \mathbf{t}}{\partial s} \right)^2 + F \mathbf{t}_\perp^2 \right] - F \, L_0 \tag{2.18}$$

Fourier-Transformation des Zweiervektor-Anteils $\mathbf{t}_\perp$

$$\tilde{\mathbf{t}}_\perp(\bar{q}) = \int ds \, e^{i \, \bar{q} \, s} \, \mathbf{t}_\perp(s) \tag{2.19}$$

entkoppelt die Energie in Normalmoden:

$$\frac{E_{WLC}}{k_B T} = \frac{1}{2}\int \frac{d\bar{q}}{2\pi}[\xi\bar{q}^2 + F]|\tilde{\mathbf{t}}_\perp|^2 - F\,L_0 \tag{2.20}$$

Der Mittelwert von $\mathbf{t}_\perp^2$ an jedem Punkt ist durch den Gleichverteilungssatz gegeben:

$$\langle\mathbf{t}_\perp^2\rangle = \int \frac{d\bar{q}}{2\pi}\langle\tilde{\mathbf{t}}_\perp(|\bar{q})|^2\rangle = 2\int \frac{d\bar{q}}{2\pi}\frac{1}{\xi\bar{q}^2 + F} = \frac{1}{\sqrt{F\xi}} \tag{2.21}$$

Der Faktor 2 vor dem Integral ist auf die beiden Komponenten von $\mathbf{t}_\perp$ zurückzuführen. Die Ausdehnung erhält damit die Form (x bezeichnet die End-zu-End-Distanz der Kette):

$$\frac{x}{L_0} = \mathbf{t} \bullet \mathbf{z} = 1 - \langle\mathbf{t}_\perp^2\rangle/2 = 1 - 1/\sqrt{4\,F\,\xi} \tag{2.22}$$

In den Grenzfällen kleiner und großer Kräfte kann die exakte Kraft-Ausdehnungs- Beziehung (vgl. folgender Abschnitt) durch eine asymptotisch richtige Interpolationsformel approximiert werden [76, 36]:

$$\frac{F\xi}{k_B T} = \frac{1}{4}\frac{1}{(1 - x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \tag{2.23}$$

Mit Hilfe dieser Formel konnten Bustamante et al. [36] Daten einer Elastizitätsmessung an λ-DNA, die mit einer optischen Pinzette erhalten wurden, fitten.

2.4.3 Exakte Lösung des WLC Modells

Die im vorigen Abschnitt vorgestellte Näherungsformel für das Verhalten einer WLC unter extern applizierter Zugspannung (Gl. 2.23) hatte die Eigenschaft, sowohl für $x \to 0$ als auch für $x \to L_0$ die Asymptote für die exakte Kraft-Ausdehnungs-Beziehung zu sein. Für $x/L_0 \sim 0.5$ allerdings weicht die Interpolationsformel um bis zu 10% von der tatsächlichen Beziehung ab [36]. Im folgenden beschäftigen wir uns nun mit der exakten Kraft-Ausdehnungs-Beziehung.
Für die WLC-Energie erhielten wir (Gl. 2.17):

$$\frac{E_{WLC}}{k_B T} = \int_0^{L_0} ds\left(\frac{\xi}{2}\left(\frac{\partial\mathbf{t}}{\partial s}\right)^2 - F\,\cos\Theta(s)\right) \tag{2.24}$$

mit Θ als dem Winkel zwischen Tangentenvektor $\mathbf{t}$ und z-Achse. Die Zustandssumme $Q(L_0, F, \mathbf{t_0}, \mathbf{t_1})$ ist durch ein Pfadintegral gegeben [79]:

$$Q(L_0, F, \mathbf{t_0}, \mathbf{t_1}) = \int \mathcal{D}(\mathbf{t})\, e^{-E_{WLC}/k_B T} \tag{2.25}$$

$\mathcal{D}(\mathbf{t})$ ist das Integrationsmaß im Funktionsraum der Pfade auf der Einheitskugel, die beim Punkt $\mathbf{t}(s = 0) = \mathbf{t_0}$ beginnen und bei $\mathbf{t}(s = L_0) = \mathbf{t_1}$ enden. (Auf die Feynman'sche Pfadintegralmethode wird hier nicht weiter eingegangen. Eine Einführung findet sich in Lit. [80].) Durch analytische Fortsetzung des Integrals über ds entlang der imaginären Achse (vgl. Funktionentheorie, z.B. Lit. [81, 82]) nimmt die Zustandssumme die folgende Matrixelement-Form an:

$$Q(L_0, F, \mathbf{t_0}, \mathbf{t_1}) = \left\langle \mathbf{t}_1 \middle| \exp\left(- \frac{L_0}{\xi} \hat{H}_{WLC} \right) \middle| \mathbf{t}_0 \right\rangle \tag{2.26}$$

mit dem Hamilton-Operator

$$\hat{H}_{WLC} = -\frac{1}{2\,\sin\Theta}\frac{\partial}{\partial\Theta}\sin\Theta\frac{\partial}{\partial\Theta} - \alpha\cos\Theta \tag{2.27}$$

Hier ist $\alpha = \xi F/k_B T$, der obige Ausdruck für die Zustandssumme ist also dimensionslos. Nun führt man Eigenwerte η_n sowie Eigenfunktionen $\Psi_n(\Theta)$ als Lösungen der Gleichung

$$\hat{H}_{WLC}\, \Psi_n(\Theta) = \eta_n\, \Psi_n(\Theta) \tag{2.28}$$

ein. Die Zustandssumme Q kann jetzt nach ihren Eigenzuständen η_n in eine Reihe entwickelt werden; jeder Term dieser Reihe hat die Form $\exp\left[-L_0/\xi(\eta_n)\right]$. Die Konturlänge ist in unserem Fall groß gegenüber der Persistenzlänge ($L_0 >> \xi$), so daß man in guter Näherung nur den Beitrag des Grundzustands berücksichtigen muß. Der Logarithmus der Zustandssumme ist damit einfach:

$$\ln Q(L_0, F, \mathbf{t_0}, \mathbf{t_1}) = -\frac{L_0}{\xi}\,\eta_0(\alpha) + \mathcal{O}(1) \tag{2.29}$$

mit $\eta_0(\alpha)$ als der Grundzustandsenergie und $\mathcal{O}(1)$ als Rest-Term der Ordnung 1. Sind die Eigenzustände und -funktionen bekannt, dann kann die Kraft-Ausdehnungs-Beziehung für die WLC wie folgt berechnet werden:

$$\frac{x}{L_0} = \frac{k_B T}{L_0} \frac{\partial \ln Q}{\partial F} = \frac{\partial \eta_0}{\partial \alpha}(\alpha) = \langle\, \Psi_0 \mid \cos\Theta \mid \Psi_0 \,\rangle \tag{2.30}$$

Die hierfür erforderlichen Eigenwerte und Eigenfunktionen lassen sich durch numerische Lösungsverfahren ermitteln. Bouchiat et al. [79] verglichen die numerische Lösung des WLC Modells mit der Interpolationsformel Gl. 2.23, die sie um ein Polynom siebten Grades in x/L_0 erweiterten:

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left(\frac{1}{4} \frac{1}{(1 - x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \le 7} a_i \left(\frac{x}{L_0} \right)^i \right) \tag{2.31}$$

mit $a_2 = -0.516, a_3 = -2.737, a_4 = 16.074, a_5 = -38.876, a_6 = 39.499$ und $a_7 = -14.177$.
B-DNA zeigt bei großer Zugspannung ein lineares Kraft-Ausdehnungs-Verhalten (bis ca. 40-80 pN, abhängig von der Sequenz der DNA). Das rührt daher, daß auch die chemischen Bindungen leicht gedehnt werden, was zu einer zusätzlichen Längenzunahme führt [83]. Um diesem Verhalten Rechnung zu tragen, führte Odijk [84] einen weiteren, *enthalpischen*Term in die WLC-Interpolationsformel ein, indem er x/L_0 durch $x/L_0 - F/K_0$ ersetzte. K_0 ist ein Maß für die „Zerrbarkeit“ des Materials; typische Werte für dsDNA sind $K_0 = 500 - 1500pN$ [79]. Damit ergibt sich schließlich folgender Ausdruck für die WLC-Kraft-Ausdehnungs-Beziehung mit numerischer Korrektur für den mittleren Kraftbereich sowie Berücksichtigung enthalpischer Beiträge:

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left(\frac{1}{4} \frac{1}{(1 - \mathcal{L})^2} - \frac{1}{4} + \mathcal{L} + \sum_{i=2}^{i \le 7} a_i \, \mathcal{L}^i \right) \tag{2.32}$$

mit $\mathcal{L} = x/L_0 - F/K_0$. Diese Formel wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, wenn von einem „WLC-Fit“ die Rede ist.
Oberhalb von 40-70 pN (je nach Sequenz der dsDNA) vollzieht sich der Pseudo-Phasenübergang von der B- zur S-Form der DNA, eine drastische konformationelle Änderung des gesamten Moleküls. Dieser durch Überdehnung des Polymers hervorgerufene Übergang kann nicht mehr mit dem herkömmlichen WLC Modell erfaßt werden. Die folgenden beiden Kapitel befassen sich nun mit Theorien, die die Modellierung des B-S-Übergangs ermöglichen.

2.5 Elastizitätsmodelle II: Das Two-State WLC Modell

Im folgenden Abschnitt wird ein Elastizitäts-Modell vorgestellt, welches das konformative Verhalten der DNA-Doppelhelix im Kraftbereich des B-S-Übergangs beschreibt. Es verknüpft die Annahmen des Worm-Like Chain Modells mit dem eindimensionalen Ising-Modell: Aus dem Ising-Modell wird die Einteilung des Systems in diskrete, gleichartige Segmente, die in nur zwei verschiedenen Zustände vorliegen können, übernommen. Wechselwirkungen sind nur zwischen nächsten Nachbarn erlaubt, und Parallelität der Zustände wird durch einen zusätzlichen Kopplungsterm energetisch berücksichtigt.
Die Vorteile des hier vorgestellten Modells gegenüber der im nächsten Kapitel dargestellten Theorie von Zhou et al. [85] sind zum einen, daß man einen (wenn auch komplexen) analytischen Ausdruck für die Kraft-Ausdehnungs-Beziehung erhält, dann seine einfachen, anschaulichen Prämissen und schließlich die Tatsache, daß es im Gegensatz zu alternativen Modellen vier verhältnismäßig leicht zu optimierende Parameter liefert, die Aussagen über die elastischen Eigenschaften der betrachteten DNA erlauben. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit zur Auswertung der erhaltenen Kraft-Ausdehnungs-Kurven auf die im folgenden dargestellte analytische Formel von Ahsan et al. [72] zurückgegriffen.

2.5.1 Das eindimensionale Ising-Modell: Grundlagen

Ursprünglich entwickelt von Ernst Ising im Zusammenhang mit der Theorie des Ferromagnetismus [86] (zur Beschreibung des thermischen Verhaltens einer linearen Kette von Elementarmagneten, die mit ihren jeweiligen Nachbarn in Anwesenheit eines externen Magnetfeldes wechselwirken), wird das eindimensionale Ising-Modell heute in vielen anderen Bereichen der Naturwissenschaft erfolgreich angewendet, unter anderem bei der Beschreibung der Hydrophobizität von Proteinketten [87], der Kooperativität von Ionenkanälen [88] sowie der Statistischen Genetik[89]. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich das Ising-Modell gut zur Beschreibung kooperativer Effekte eignet.
Das hier allgemein formulierte eindimensionale Ising-Modell betrachtet ein System, das aus vielen gleichartigen Elementen besteht, von denen jedes nur zwei diskrete Zustände einnehmen kann (z.B. Spin$\uparrow$ oder Spin$\downarrow$, + oder -, 0 oder 1, B- oder S-Konformation der dsDNA). Zwischen diesen Elementen bestehe eine paarweise Wechselwirkung nur zwischen nächsten Nachbarn, die sich in einem energetischen Kopplungsparameter J auswirkt. Für das von Ising bearbeitete System, das eindimensionale Spin-Gitter [90], ist die Parallelstellung der Spins energetisch favorisiert; beim Beispiel des DNA-Phasenübergangs (vgl. folgenden Abschnitt) erniedrigt die Kopplung zwischen B-Segmenten die

Energie, während die Energie für „parallel" eingestellte S-Segmente um den gleichen Betrag ansteigt - ein wichtiger Unterschied zur Anwendung des Ising-Modells auf den Ferromagnetismus. Wirkt ein in z-Richtung angelegtes äußeres Feld auf diese Kette von Elementen ein, dann schreibt sich der Hamiltonoperator für dieses System [91]:

$$\hat{H}_I = -J \sum_{i=1}^{N} S_i \, S_{i+1} - B \sum_{i=1}^{N} S_i \tag{2.33}$$

Die S_i sind hierbei die sog. Ising-Variablen, die nur die Werte +1 und -1 annehmen können, je nachdem, welcher Zustand vom betreffenden Element angenommen wird. J ist die Kopplung zwischen benachbarten Elementen, und B beschreibt die Wirkung des äußeren Feldes (im Ferromagnetismus also das Produkt aus dem g-Faktor, dem Bohrschen Magneton und der Magnetfeldstärke). Das Gesamtsystem besitzt damit 2^N mögliche Zustände, und seine Zustandssumme Q lautet:

$$Q = \sum_{S_1=\pm 1} \sum_{S_2=\pm 1} ... \sum_{S_N=\pm 1} exp\left[\frac{1}{k_B T} \sum_{i=1}^{N} [B \, S_i + J \, S_i \, S_{i+1}]\right] \tag{2.34}$$

Mit Hilfe der sog. Transfermatrixmethode [91], auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, läßt sich die Zustandssumme dann als Spur einer Matrix (der Transfermatrix) darstellen. Der größere von zwei Eigenwerten dieser Matrix ist im Limes $N \to \infty$ identisch mit der Zustandssumme:

$$Q = e^{J/4k_B T} \left[\cosh \frac{B}{2k_B T} + \sqrt{\sinh^2 \frac{B}{2k_B T} + e^{-J/k_B T}}\right] \tag{2.35}$$

Damit gilt für die freie Energie $A = -k_B T \ln Q$ im eindimensionalen Ising-Modell (mit B_0 als der Stärke des externen Feldes):

$$A(B_0, T) = -N \, k_B \, T \left(\frac{J}{4k_B T} + \ln \left[\cosh \frac{B}{2k_B T} + \sqrt{\sinh^2 \frac{B}{2k_B T} + e^{-J/k_B T}}\right]\right) \tag{2.36}$$

Eine durch das äußere Feld erzwungene makroskopische Einstellung $\mathcal{M}$ der Elemente (beim Ferromagnetismus wäre das die Magnetisierung, bei dsDNA unter Einwirkung einer Zugspannung der Phasenübergang nach der S-DNA) errechnet sich dann gemäß

$$\mathcal{M}(B_0, T) = k_B \, T \, \frac{\partial \ln Q}{\partial B_0} = -\frac{\partial A(B_0, T)}{\partial B_0}. \tag{2.37}$$

2.5.2 Anwendung des Ising-Modells auf DNA

Cluzel et al. erarbeiteten ein reines 1-D-Ising-Modell für das elastische Verhalten von DNA unter dem Einfluß äußerer, mechanischer Kräfte [38, 92], das einen guten Fit an die mit einer optischen Pinzette erhaltenen Kraft-Ausdehnungs-Kurven ermöglichte. Sie teilen den dsDNA-Strang in viele gleichartige Segmente a_0 ein (die nicht identisch mit Basenpaaren sind, sondern jeweils mehrere Basenpaare umfassen). In ihrem Modell stehen die Ising-Variablen für den Zustand eines Segments: B-Zustand (geringe Zugspannung) oder S-Zustand (große Zugspannung, elongiert). Ein Nachteil dieses Modells ist, daß es die Kettenflexibilität vernachlässigt und daher im Bereich kleinerer Kräfte versagt, in welchem die WLC-Theorie bessere Fits erlaubt.(Im folgenden sei der Begriff „Kraft“ stets durch das Synonym „Zugspannung“ ersetzt; die Zugspannung wird erhalten, indem man die applizierte Kraft durch den Querschnitt der Polymerkette teilt.)
Um diese Schwierigkeit zu beheben, schlugen Ahsan et al. [72] das sog. „Two-State Worm-Like Chain Modell“ vor. Dieses Modell vereinigt in sich den WLC-Ansatz und den Ising-Ansatz. Es enthält beide Theorien als Grenzfälle: so reduziert sich das Two-State WLC für kleine Zugspannungen zum gewöhnlichen WLC, für große Zugspannungen nähert es sich dem reinen Ising-Modell.
Hierbei wird die DNA wieder in eine Reihe kleiner Segmente a_0 eingeteilt, von denen jedes Teilstück entweder im B- oder im S-Zustand vorliegen soll. Ein typischer Wert für a_0 liegt bei fünf Basenpaaren [72]. Die freie Energie ΔE, die aufgewendet werden muß, um ein einzelnes Segment bei Abwesenheit äußerer Kräfte vom B- in den S-Zustand zu überführen, hänge nur ab vom Zustand der beiden benachbarten Segmente. Wenn wir (in Analogie zur Theorie der eindimensionalen Kette magnetischer Partikel) den Zustand eines Segments mit einem Pfeil $\uparrow$ für „B“ und $\downarrow$ für „S“ bezeichnen, erhalten wir vier mögliche Energiewerte, je nachdem, in welchem Zustand sich die beiden Nachbarn befinden. Im einfachsten Fall erhalten wir ein symmetrisches Energiespektrum, das sich wie folgt parametrisieren läßt:

$$\Delta E(\uparrow\uparrow) = 2H + 4J \tag{2.38}$$

$$\Delta E(\uparrow\downarrow) = \Delta E(\downarrow\uparrow) = 2H \tag{2.39}$$

$$\Delta E(\downarrow\downarrow) = 2H - 4J \tag{2.40}$$

Hierbei identifizieren wir $2H$ als den Unterschied in der freien Energie zwischen dem B- und dem S-Zustand (pro Segment). Wenn $(1+\epsilon)$ den Faktor angibt, um den die elongierte S-DNA länger ist als die Konturlänge der B-DNA, dann ist die kritische Kraft Z_c für den B-S-Übergang von der Größenordnung $H/a_0\epsilon$. Der Parameter J bezeichnet die Korrelationsenergie zwischen benachbarten Segmenten. Der Parameter $\sigma = exp(-4J\beta)$ (im folgenden gelte die Abkürzung $\beta = 1/k_BT$) ist ein Maß für die Kooperativität des Übergangs: Wenn $\sigma << 1$, dann ist der Übergang hoch-kooperativ. Die Biegesteifigkeiten der beiden Zustände werden als gleich vorausgesetzt. Die Beziehung zwischen der Kettenkonformation und der inneren Struktur liefert schließlich die Bedingung:

$$L(\{S_i\}) = L_0\left(1 - \frac{\epsilon}{2N}\sum_{i=1}^{N}(S_i - 1)\right) \tag{2.41}$$

mit L_0 als Konturlänge der B-DNA, $N >> 1$ als Anzahl der Segmente, i als Segment-Index und $S_i = 1$ für den B-Zustand, $S_i = -1$ für den S-Zustand. Damit ist die Kettenlänge L eine statistische Variable geworden, deren Ensemble-Mittelwert $\langle L\rangle$ bestimmt werden muß.

Der konformative Anteil an der inneren Energie der Kette H_{int} ist:

$$H_{int} = -J\sum_{i=1}^{N} S_iS_{i+1} - H\sum_{i=1}^{N} S_i \tag{2.42}$$

Hinzu kommt die elastische Biegeenergie der WLC (unsere Annahme war, daß diese für B- und S-Segmente gleich sei):

$$H_{el} = \frac{1}{2}\kappa\int_0^L ds\left(\frac{1}{R(s)}\right)^2 \tag{2.43}$$

$R(s)$ ist der Krümmungsradius der Kette an einer Stelle s der Raumkurve.

Die Zustandssumme Q ist das Produkt der Konfigurations-Mittelwerte aller inneren Konfigurationen $\{S_i\}$ und aller geometrischen Konfigurationen $\mathbf{r}$ der Kette. Um zunächst letzteren Mittelwert zu erhalten, definieren wir die elastische freie Energie A_{el} der WLC:

$$A_{el}(L,x) = -\frac{1}{\beta}\,ln\left(\int D[\mathbf{r}(s)]e^{-H_{el}\beta}\right) \tag{2.44}$$

Hierbei bezeichnet x die End-zu-End-Distanz, welche bei der Berechnung des Mittelwertes konstant gehalten wird. $D[\mathbf{r}(s)]$ ist die Verteilungsfunktion der geometrischen Konfigurationen der Kette. A_{el} hängt über L immer noch von der jeweiligen Konfiguration $\{S_i\}$ der Kette ab und hat die Form:

$$A_{el}(L,x) = Lf(x/L) = Lf(y) \tag{2.45}$$

Sei $Z(x)$ die Zugspannung, die die End-zu-End-Distanz x bewirkt. Dann gilt:

$$\frac{\partial A_{el}(L,x)}{\partial x} = f'(\frac{x}{L}) = Z(x) \tag{2.46}$$

Dies muß mit der Kraft-Ausdehnungs-Beziehung der WLC übereinstimmen, d. h.

$$f'(y) = \frac{1}{\beta\,\xi}\left[\frac{1}{4}(1-y)^{-2} - \frac{1}{4} + y\right] \tag{2.47}$$

Durch Integration erhält man $f(y)$.
Es ist jetzt nützlich, von einem thermodynamischen Ensemble mit festem x zu einem Ensemble mit festem Z überzugehen. Aus Gl. 2.46 folgt, daß $y(t)$ nur eine Funktion der dimensionslosen Zugspannung $t = Z\xi\beta$ und damit unabhängig von der inneren Konfiguration ist. Für festes Z ist die Energie H_{WLC}:

$$H_{WLC} = Lf(y) - Zx \tag{2.48}$$

Es folgt aus Gl. 2.46 und Gl. 2.48, daß H_{WLC} proportional L ist: $H_{WLC} = Lg(Z)$ mit

$$g(Z) = f(f'^{-1}(Z)) - Zf'^{-1}(Z) \tag{2.49}$$

Jetzt berechnen wir die verbleibende Teilzustandssumme über die inneren Zustände mit der effektiven inneren Energie $H_{eff} = H_{int} + H_{WLC}$ bei fester externer Zugspannung:

$$H_{eff} = -J\sum_{i=1}^{N} S_i S_{i+1} - \tilde{H}\sum_{i=1}^{N} S_i + L_0(1+\epsilon/2)g(Z) \tag{2.50}$$

mit

$$\tilde{H}(Z) = H + \frac{\epsilon a_0}{2} g(Z) \tag{2.51}$$

Die freie Gesamt-Energie des Ensembles mit festem Z ergibt sich nach Berechnung der Teilzustandssumme der inneren Zustände:

$$A = -\frac{1}{\beta}\, ln\Bigg(\sum_{\{S_i\}} e^{-H_{eff}\beta}\Bigg) \tag{2.52}$$

Dies entspricht gerade der freien Energie des eindimensionalen Ising-Modells mit den Ising-Variablen S_i in einem äußeren „Feld“ $\tilde{H}(Z)$. Dieser Ausdruck läßt sich schreiben als [93]:

$$A = L_0(1+\epsilon/2)g(Z) - 1/\beta\, N\, ln\, Q \tag{2.53}$$

mit der Zustandssumme

$$Q(J,\tilde{H}) = e^{J\beta}\cosh(\tilde{H}\beta) + \sqrt{e^{2J\beta}\cosh^2(\tilde{H}\beta) - 2\sinh(2J\beta)}. \tag{2.54}$$

2.5.3 Kraft und Ausdehnung im Two-State WLC Modell

Die Beziehung zwischen extern applizierter Zugspannung und molekularer Ausdehnung folgt aus der Bedingung des mechanischen Gleichgewichts im Ensemble mit festem Z:

$$x = -\frac{\partial A}{\partial Z}\bigg|_{\beta} \tag{2.55}$$

Unter Benutzung der Gl.en 2.49-2.55 erhält man:

$$\frac{x}{L_0} = f'^{-1}(Z)\bigg(1 + \frac{\epsilon}{2}(1 - \langle S\rangle)\bigg) \tag{2.56}$$

Dabei bedeutet

$$\langle S\rangle = \frac{1}{N}\frac{\partial A}{\partial \tilde{H}}\bigg|_{\beta} \tag{2.57}$$

den Erwartungswert der Zustandsvariablen S_i. Gl. 2.56 läßt sich umschreiben zu:

$$f'^{-1}(x/\langle L\rangle) = Z \tag{2.58}$$

mit

$$\langle L \rangle = L_0 \Big(1 + \frac{\epsilon}{2}(1 - \langle S \rangle) \Big) \tag{2.59}$$

als dem thermodynamischen Erwartungswert für die Kettenlänge. Dieses Ergebnis entspräche, wenn man $\langle L \rangle$ durch die Kettenlänge L ersetzte, dem Ausdruck für die Kraft-Ausdehnungs-Relation der WLC.
Um nun eine explizite Form von Gl. 2.56 zu erhalten, schreibt man zunächst $\langle S \rangle$ aus:

$$\langle S \rangle = \frac{e^{J\beta} \sinh(\tilde{H}\beta) + 1/2 e^{2J\beta} \sinh(2\tilde{H}\beta)(e^{2J\beta} \cosh^2(2\tilde{H}\beta) - 2\sinh(2J\beta))^{-1/2}}{Q(J, \tilde{H})} \tag{2.60}$$

Um $\tilde{H}(Z)$ in Gl. 2.60 zu bestimmen, muß auch $g(Z)$ bekannt sein. Mit Hilfe der Gl.en 2.46 und 2.49 folgt:

$$g(Z) = f(y(Z)) - Zy(Z) \tag{2.61}$$

Die Funktion $f(y)$ erhält man durch Integration von Gl. 2.47:

$$f(y) = \frac{1}{\beta\xi} \Big(\frac{1}{4} \frac{1}{(1-y)} - 4(1+y) + \frac{1}{2} y^2 - ty \Big) \tag{2.62}$$

Hierbei gilt $f(0) = 0$.
Damit ergibt sich für $g(Z)$:

$$g(Z) = \frac{1}{\beta\xi} \Big(\frac{1}{4} \frac{1}{(1-y(t))} - 4(1+y(t)) + \frac{1}{2} y^2(t) - ty(t) \Big) \tag{2.63}$$

$g(Z)$ hängt über den dimensionslosen Parameter $t = Z\xi\beta$ von der Zugspannung ab. Um $y(t)$ zu bestimmen, wird Gl. 2.47 in der Form

$$t = \Big(\frac{1}{4} \frac{1}{(1-y)^2} - \frac{1}{4} + y \Big) \tag{2.64}$$

nach $y(t)$ aufgelöst. Man erhält:

$$y(t) = 1 - \frac{1}{(2+\sqrt{4-(4/3t-1)^3})^{1/3} + \frac{4/3\,t-1}{(2+\sqrt{4-(4/3\,t-1)^3})^{1/3}}} \tag{2.65}$$

Mit $y(t)$, $g(Z)$ und $\langle S \rangle$ folgt schlußendlich die Formel für die Beziehung zwischen applizierter Kraft und molekularer Ausdehnung für das Two-State WLC Modell:

$$\frac{x}{L_0} = y(t)\Big(1 + \frac{\epsilon}{2}(1 - \langle S \rangle)\Big) \tag{2.66}$$

.

2.6 Elastizitätsmodelle III: Berücksichtigung der Basenstapel-Wechselwirkungen

Das im vorigen Abschnitt dargestellte Two-State WLC Modell teilte den DNA-Strang in einzelne, diskrete Segmente ein, die nur zwei verschiedene Energiezustände einnehmen konnten. Das nun zu behandelnde Elastizitätsmodell zur Modellierung des B-S-Phasenübergangs der DNA von Zhou et al. [85, 94, 95] macht den Übergang von der diskreten zur kontinuierlichen Beschreibung. Es wird ein allgemeines Elastizitätsmodell für dsDNA vorgeschlagen, welches explizit die für das elastische Verhalten eines solchen Biopolymers relevanten Wechselwirkungen berücksichtigt: Die im Green-Operator erscheinenden Terme sind auf Basenstapel-Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen entlang des DNA-Rückgrats sowie sterische Effekte der Basenpaare zurückzuführen. Als struktureller Parameter für die Deformation der DNA unter Einwirkung äußerer Kräfte wird der sog. Faltungswinkel ϕ eingeführt.
Ein Nachteil dieses mikroskopischen Modells ist zum einen die Tatsache, daß es nur numerischen Lösungsverfahren zugänglich ist. Die exakte Kraft-Ausdehnungs-Beziehung beruht auf der Lösung einer nicht-linearen partiellen Differentialgleichung zweiter Ordnung mit Hilfe von Standard-Matrix-Diagonalisierungsverfahren. Zum anderen liefert es in der jetzigen Form nur *einen* optimierbaren Fit-Parameter, den erwähnten Faltungswinkel ϕ. Alle anderen Parameter, etwa die Persistenzlänge, werden bei der Berechnung der Eigenwerte konstant gehalten. Dies erschwerte die Anwendung des Modells bei der Auswertung der experimentellen Daten. Da aber im Rahmen dieser Diplomarbeit auch versucht wurde, das Modell dahingehend zu modifizieren, daß eine Optimierung anderer für das elastische Verhalten von dsDNA charakteristischer Parameter möglich wird, und da die Arbeit auf diesem Gebiet noch nicht abgeschlossen ist, wird es hier dennoch

dargestellt: Reizvoll erscheint es nicht zuletzt aufgrund seiner vergleichsweise genauen Abbildung der mikroskopischen Eigenschaften doppelsträngiger Biopolymere.

2.6.1 Die Methode der Green'schen Funktionen

In diesem Abschnitt wird, vor der eigentlichen Darstellung des Modells, eine kurze Einführung in die Green'schen Funktionen gegeben. Diese werden im nächsten Abschnitt in einem entscheidenden Schritt, bei der Herleitung der Eigenwertgleichung für das Verhalten der dsDNA unter dem Einwirken einer äußeren Kraft, verwendet werden.
Gegeben sei eine lineare Differentialgleichung in der allgemeinen Form

$$\hat{O}(x)\, u(x) = f(x). \tag{2.67}$$

Hier sei x ausnahmsweise nicht die End-zu-End-Distanz einer Polymerkette, sondern einfach irgendeine Variable, $\hat{O}(x)$ ein linearer Differentialoperator, $u(x)$ die unbekannte Funktion, und $f(x)$ die Inhomogenität der Differentialgleichung. Man kann eine Lösung für diese Gleichung wie folgt ansetzen:

$$u(x) = \hat{O}^{-1}(x)\, f(x) \tag{2.68}$$

wobei $\hat{O}^{-1}$ das Inverse des Differentialoperators $\hat{O}$ sei; $\hat{O}^{-1}$ ist also irgendein Integraloperator. Darüber hinaus soll die Gleichung

$$\hat{O}\,\hat{O}^{-1} = \hat{O}^{-1}\,\hat{O} = \mathcal{I} \tag{2.69}$$

erfüllt sein mit $\mathcal{I}$ als dem Neutralen Element (der Identität), d.h., $\hat{O}$ soll ein selbstadjungierter Operator sein. Wir definieren jetzt den inversen Operator etwas spezieller als

$$\hat{O}^{-1} f = \int G(x;x')\, f(x')\, dx' \tag{2.70}$$

mit $G(x;x')$ als der sog. *Green'schen Funktion* zum Differentialoperator $\hat{O}$. $G(x;x')$ ist eine Funktion zweier Veränderlicher. Jetzt wird die Dirac'sche Deltafunktion $\delta(x)$ als Identitätsoperator $\mathcal{I}$ eingeführt. Die Eigenschaften dieser Funktion sind:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta(x - x')\, f(x')\, dx' = f(x) \tag{2.71}$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta(x')\, dx' = 1 \tag{2.72}$$

Folglich erfüllt die Green'sche Funktion die Bedingung

$$\hat{O}(x)\, G(x; x') = \delta(x - x') \tag{2.73}$$

und die Lösung zu Gl. 2.67 kann geschrieben werden als:

$$u(x) = \int_{-\infty}^{\infty} G(x; x')\, f(x')\, dx' \tag{2.74}$$

Die Form der Green-Funktion enthält wichtige Informationen über die Physik des Problems [96]. Als ein kleines Beispiel aus der Elektrodynamik sei die Laplace-Gleichung in zwei Dimensionen herangezogen:

$$\triangle u = \frac{\partial^2 u}{\partial x_1^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial x_2^2} \tag{2.75}$$

Hier ist $\hat{O} = \triangle$. Die zugehörige Green'sche Funktion lautet

$$G(x; x') = -\frac{1}{2\pi}\, \ln r \tag{2.76}$$

mit

$$r = \sqrt{(x_1 - x_1')^2 + (x_2 - x_2')^2} \tag{2.77}$$

Die Green-Funktion gibt in diesem Fall das elektrostatische Potential am Punkt x, das durch eine Punktladung an der Stelle x' hervorgerufen wird.

2.6.2 Das Modell von Zhou

Das Modell von Zhou et al. [85, 95, 94] behandelt die beiden Phosphatrückgrate der dsDNA als unausdehnbare Worm-Like Chains mit einer sehr niedrigen Biegesteifigkeit $\kappa = k_B T \xi_p$, wobei ξ_p diesmal die Persistenzlänge von ssDNA sei. Die Biegenergie jedes Rückgrats hat wieder die (mittlerweile vertraute) Form

$$H_{el} = \frac{\kappa}{2} \int_0^{L_0} \left(\frac{\partial \mathbf{t}_i}{\partial s} \right)^2 ds \tag{2.78}$$

wobei $\mathbf{t}_i$ den Tangentenvektor bei der Bogenlänge s entlang des $i$ten Rückgrats bedeutet ($i = 1, 2$). L_0 ist diesmal die Konturlänge des Rückgrats. Da wir uns im Moment auf die Biegeenergie des Rückgrates konzentrieren, betrachten wir zunächst jedes Basenpaar als starres Stäbchen der Länge $2\,R$, in dessen Richtung der Vektor $\mathbf{b}$ zeige (Abb. 2.19). $\mathbf{t}$ ist der Tangentenvektor entlang der zentralen Molekülachse, und für den Vektor $\mathbf{n}$ gilt $\mathbf{n} = \mathbf{b} \times \mathbf{t}$. Alle Tangentenvektoren $\mathbf{t}$, $\mathbf{t}_1$ und $\mathbf{t}_2$ liegen in einer Ebene. Der Winkel ϕ ist

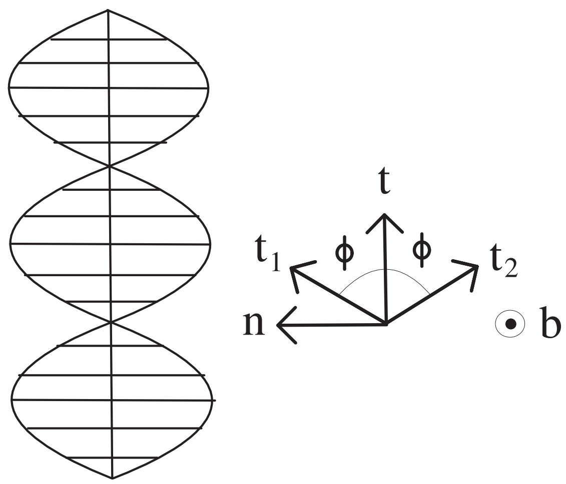

Abbildung 2.19: Modell von Zhou

Schema der Deklaration der Vektoren. Der rechte Teil zeigt die Definition des Faltungswinkels ϕ in der lokalen $\mathbf{t}-\mathbf{n}$-Ebene, wobei $\mathbf{t}$, $\mathbf{t_1}$ und $\mathbf{t_2}$ die Tangentenvektoren der zentralen Achse sowie der beiden Phosphatrückgrate bezeichnen. Der Vektor $\mathbf{b}$ zeigt entlang des als starrer Stab modellierten Basenpaars und steht senkrecht zur $\mathbf{t}-\mathbf{n}$-Ebene, so daß $\mathbf{t}$, $\mathbf{n}$ und $\mathbf{b}$ ein orthogonales Dreibein bilden.

definiert als die Hälfte des Winkels, der von $\mathbf{t}_1$ und $\mathbf{t}_2$ aufgespannt wird.

Aus Abb. 2.19 folgt

$$\frac{\partial \mathbf{b}}{\partial s} = \frac{\mathbf{t}_2 - \mathbf{t}_1}{2\,R} = -\frac{\sin\phi}{R}\,\mathbf{n} \tag{2.79}$$

sowie

$$1/2\,(\mathbf{t}_1 + \mathbf{t}_2) = \cos\phi. \tag{2.80}$$

Man sieht, daß $\cos\phi$ ein Maß für die Faltung der Rückgrate in Bezug auf die zentrale Achse darstellt. Es folgt für die Gesamt-Biegenergie der beiden Rückgrate:

$$H_{el} = \int_0^{L_0} ds \left[\kappa\left(\frac{\partial \mathbf{t}}{\partial s}\right)^2 + \kappa\left(\frac{\partial \phi}{\partial s}\right)^2 + \frac{\kappa}{R^2}\sin^4\phi\right] \tag{2.81}$$

Um diese Gleichung abzuleiten, hatten wir für die DNA eine leiterartige Struktur angenommen. Natürlich entspricht das nicht der Realität; Basenpaare sind eben keine starren Stäbchen, sondern nehmen ein endliches Volumen ein und haben unterschiedliche Struktur. Außerdem wurde noch die elektrostatische Abstoßung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen, die selbstverständlich einen großen Beitrag zur Biegesteifigkeit der Rückgrate leistet, vernachlässigt. Phänomenologisch ist dieses Problem zu lösen, indem man die Biegesteifigkeit κ durch eine effektive Biegesteifgkeit $\kappa^* > \kappa$ ersetzt.

Betrachten wir nun die Basenstapel-Wechselwirkungen. Sie rühren von der van-der-Waals-Anziehung zwischen benachbarten Nucleotid-Basenpaaren her, sind kurzreichweitig und werden meistens durch ein Lennard-Jones-Potential modelliert [21]. Im Rahmen einer kontinuierlichen Elastizitätstheorie ersetzt man die Summe der potentiellen Energie der Basenpaarstapel durch eine Integration:

$$H_{BP} = \sum_{i=1}^{N-1} U_{i,i+1} = \int_0^{L_0} \rho(\phi)\,ds \tag{2.82}$$

wobei $U_{i,i+1}$ das Basenstapel-Potential zwischen dem $i$ten und $(i+1)$tem Basenpaar, N die Anzahl der Basenpaare und ρ die sog. Basenstapel-Energie-Dichte bezeichnen; letztere läßt sich schreiben als:

$$\rho(\phi) = \frac{\varepsilon}{r_0}\left[\left(\frac{\cos\phi_0}{\cos\phi}\right)^{12} - 2\left(\frac{\cos\phi_0}{\cos\phi}\right)^{6}\right]\,;\ (\phi \geq 0) \tag{2.83}$$

$$\rho(\phi) = \frac{\varepsilon}{r_0}\left[\cos^{12}\phi_0 - 2\,\cos^6\phi_0\right];\;(\phi < 0) \tag{2.84}$$

Hierbei ist r_0 die Rückgrat-Bogenlänge zwischen benachbarten Basen ($r_0 = L_0/N$), ϕ_0 ist ein Parameter, der mit der Länge eines Basenpaars auf der DNA (0.34 nm) zusammenhängt ($r_0 \cos\phi_0$ =0.34 nm), und ε ist ein Maß für die Intensität der Basenstapelung und damit natürlich sequenzabhängig [21]. Der von Zhou angenommene Wert für ε ist $14.0\,k_BT$.
Wenn nun an den Enden der DNA mit einer externen Kraft $\mathbf{F} = F\mathbf{z}$ entlang der z-Achse gezogen wird, dann resultiert folgende potentielle Energie (mit $\mathbf{x}$ als dem End-zu-End-Vektor):

$$H_F = -\mathbf{x} \bullet \mathbf{F} = -\int_0^{L_0} \mathbf{t}\cos\phi\, ds \bullet \mathbf{F} = -\int_0^{L_0} F\mathbf{t} \bullet \mathbf{z}\cos\phi\, ds \tag{2.85}$$

Damit läßt sich nun die Gesamtenergie eines dsDNA-Moleküls unter der Einwirkung einer äußeren Kraft (und unter Vernachlässigung extern induzierter Torsion) schreiben als:

$$H_{ges} = \int_0^{L_0} ds\left[\kappa^*\left(\frac{\partial\mathbf{t}}{\partial s}\right)^2 + \kappa\left(\frac{\partial\phi}{\partial s}\right)^2 + \frac{\kappa}{R^2}\sin^4\phi + \rho(\phi) - F\mathbf{t}\bullet\mathbf{z}\cos\phi\right] \tag{2.86}$$

Einem Polymer mit dieser Energie wird nun eine Eigenfunktion $\Psi(\mathbf{t}, \phi, s)$ zugeordnet, welche alle Informationen über das System enthält (man beachte die Analogie zur Quantenmechanik!). Es wird angenommen, daß Ψ am Punkt mit der Bogenlänge s mit Ψ an der Stelle s' über eine Green'sche Funktion verknüpft ist (vgl. Gl. 2.74):

$$\Psi(\mathbf{t}, \phi, s) = \int d\mathbf{t}'\, d\phi'\, G(\mathbf{t}', \phi', s'; \mathbf{t}, \phi, s)\, \Psi(\mathbf{t}', \phi', s')\;\;(s > s') \tag{2.87}$$

Durch Anwendung der Pfadintegralmethode läßt sich dann hieraus die folgende Green'sche Gleichung mit der Eigenfunktion $\Psi(\mathbf{t}, \phi, s)$ (welche hier dem $u(x)$ des vorhergehenden Abschnitts entspricht) ableiten:

$$\frac{\partial\Psi(\mathbf{t}, \phi, s)}{\partial s} = \left[\frac{\partial^2}{4\xi_p^*\partial\mathbf{t}^2} + \frac{\partial^2}{4\xi_p\partial\phi^2} + \frac{F\cos\phi}{k_BT}\mathbf{t}\bullet\mathbf{z} - \frac{\xi_p}{R^2}\sin^4\phi\right]\Psi(\mathbf{t}, \phi, s) \tag{2.88}$$

mit $\xi_p^* = \kappa^*/k_BT$ und $\xi_p = \kappa/k_BT$. Das Spektrum dieser Green-Gleichung ist diskret. Der Erwartungswert der Ausdehnung $\langle x \rangle$ kann entweder durch Differentiation des Grundzustands-Eigenwerts η_0 nach der Kraft erhalten werden gemäß (vgl. Gl. 2.30):

$$\langle x \rangle = \int_0^{L_0} \langle \mathbf{t} \bullet \mathbf{z} \cos\phi \rangle \, ds = L_0 k_B T \frac{\partial \eta_0}{\partial F} \tag{2.89}$$

oder durch direkte Integration über das Quadrat der normierten Grundzustands-Eigenfunktion $\Psi_0(\mathbf{t}, \phi)$ (vgl. Gl. 2.30):

$$\langle x \rangle = L_0 \int |\Psi_0|^2 \mathbf{t} \bullet \mathbf{z} \cos\phi \, d\mathbf{t} \, d\phi \tag{2.90}$$

Sowohl η_0 als auch Ψ_0 können numerisch durch Standard-Diagonalisierungsmethoden (Methode der finiten Elemente [97, 98, 99]) berechnet werden. Als Basisfunktionen für $\Psi(\mathbf{t}, \phi, s)$ setzt man hierbei Produkte aus Kugelflächenfunktionen (spherical harmonics) und Lösungsfunktionen des unendlich tiefen Potentialtopfes der Breite $\mathcal{A}$ an:

$$\Psi(\mathbf{t}, \phi, s) = \sum_{lmn} C_{lmn}(s) \, Y_{lm}(\mathbf{t}) \, f_n(\phi) \tag{2.91}$$

mit

$$f_n(\phi) = \sqrt{\frac{2}{\mathcal{A}}} \sin\left(\frac{n\pi}{\mathcal{A}}\phi\right). \tag{2.92}$$

3 Materialien und Methoden

3.1 Das verwendete Rasterkraftmikroskop

Der Aufbau des Kraftspektroskopie-Experiments (Abb. 3.1) bestand aus einem kommerziellen AFM sowie der eigentlichen Kraftspektroskopie-Apparatur, die entwickelt wurde, um die Kraft-Distanz-Kurven mit ausreichender Genauigkeit aufnehmen zu können.

Abbildung 3.1: Aufbau des Experiments

In der Mitte des Bildes ist das MultiMode AFM mit aufmontierter Kamera und einem Bildschirm zu sehen. Links davon befinden sich die NanoScope IIIa-Steuerelektronik mit dem Meßrechner und zwei Monitoren. Rechts im Bild sichtbar ist die eigentliche Kraftspektroskopie-Apparatur mit Monitor, Hochspannungsverstärker, Universalfilter und Meßrechner.

3.1.1 Das Instrument

Alle kraftspektroskopischen Experimente wurden mit einem NanoScope IIIa Multimode AFM der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, USA) durchgeführt. Als Scanner wurde ein sog. J-Scanner (Scanbereich in z-Richtung: 4.2 μm) eingesetzt.
Alle kraftspektroskopischen Messungen wurden in Flüssigkeit vorgenommen. Als Meßzelle stand hierfür eine Contact-Mode-Flüssigmeßzelle (Digital Instruments) zur Verfügung, die ohne Dichtungsring verwendet wurde. Vor jeder einzelnen Messung wurde die Zelle gründlich mit reinem Ethanol und Millipore-Wasser (vgl. Abschnitt 3.3.1) gereinigt und mit Stickstoff trockengeblasen.

3.1.2 Kalibration der Cantilever-Federkonstanten

Als Kraftsensoren für die in dieser Arbeit präsentierten Messungen wurden ausschließlich oxid-geschärfte Cantilever aus Siliziumnitrid (Microlevers, Firma Thermomicroscopes, Sunnyvale, USA) verwendet. Alle Cantilever stammten vom gleichen Wafer, so daß die Federkonstanten nur leicht variierten. Auf einem Microlever-Chip sind an einer Seite fünf verschiedene Cantilever angebracht (an der anderen Seite noch einer), von denen wiederum ausschließlich ein V-förmiger Cantilever des Typs Microlevers C verwendet wurde (Abb. 3.2). Laut Herstellerangaben sind die Dimensionen dieses Cantilever-Typs 320 μm (Länge) $\times$ 22 μm (Breite) $\times$ 0.6$\pm$0.1 μm (Dicke) und die Federkonstante k = 10$\pm$5 pN/nm.
Kalibriert wurden die Si_3N_4-Cantilever nach der im Grundlagenteil beschriebenen Me-

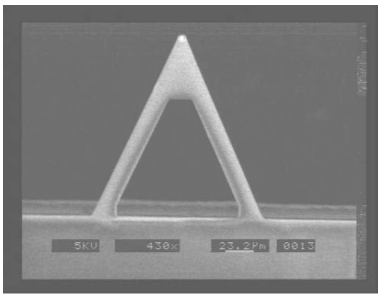

Abbildung 3.2: Si_3N_4-Cantilever (elektronenmikroskopische Aufnahme)

thode über ihr thermisches Rauschspektrum. Dazu wurde der Cantilever in großen Abstand zur Oberfläche gebracht (um Wechselwirkung auszuschließen), das vom Cantilever kommende Rauschsignal in einen elektronischen Universal-Filter mit Tief- und Hoch-

paß eingespeist, um nur Frequenzen im Bereich von 10 Hz bis 10 kHz zu erfassen, und schließlich von einem modifizierten LabVIEW-Programm (LabVIEW 6.0, National Instruments, Austin, USA) spektral zerlegt. Die Aufnahme des Rausch-Spektrums erfolgte mit einer Aufnahmerate von 11025 Hz mit 4048 Punkten, wobei über 200 aufeinanderfolgende Spektren gemittelt wurde. An diese Rohdaten wurde dann mit Hilfe eines MATLAB-Programmes (MATLAB 5.3, Firma MathWorks, Natick, USA) ein Lorentz-Profil gefittet und über das Integral die Federkonstante erhalten.
Abb. 3.3 zeigt das thermische Rausch-Spektrum eines Microlevers C samt dem Fit der

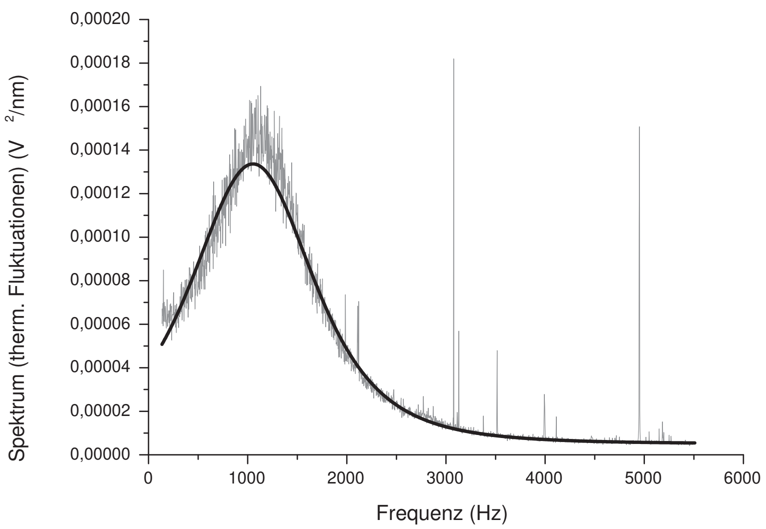

Abbildung 3.3: Thermisches Rausch-Spektrum (grau) eines Cantilevers und Lorentz-Fit (schwarz)

Lorentz-Funktion an die Meßdaten. Mit dieser Methode wurden für sämtliche verwendeten Cantilever Federkonstanten im Bereich von 11.9-14.2 pN/nm erhalten. Der Fehler liegt bei dieser Kalibrationsmethode (ebenso wie für alle anderen Methoden) allerdings bei bis zu 20%.

3.1.3 Aufbau und Meßprogramme

Abb. 3.4 zeigt schematisch den Aufbau des Kraftspektroskopie-Experiments. Anstatt die kommerzielle Standard-Software zur Kraftspektroskopie (Release 4.42r8) des AFMs zu verwenden, wurde die gesamte Steuerung sowie die Datenaufnahme bei den kraftspek-

troskopischen Messungen von in LabVIEW 6.0 geschriebenen Messprogrammen übernommen, die unter dem Betriebssystem Windows 2000 Professional (Firma Microsoft, USA) programmiert wurden. Die vertikale Piezo-Bewegung wurde gesteuert, indem ein von einer AD/DA-Meßkarte (PCI-6052E, National Instruments) stammendes analoges Signal (max. Bereich: -10 bis +10 V) über einen Hochspannungsverstärker (600H, NanoTechTools, Echandens, Schweiz; im Bild abgek.: HV) um den Faktor 30 verstärkt und dann auf den piezokeramischen Scanner (maximal: -220 bis +220 V) gelenkt wurde.
Das vom Photodetektor kommende Signal wurde auf einen elektronischen Tiefpaß-Filter

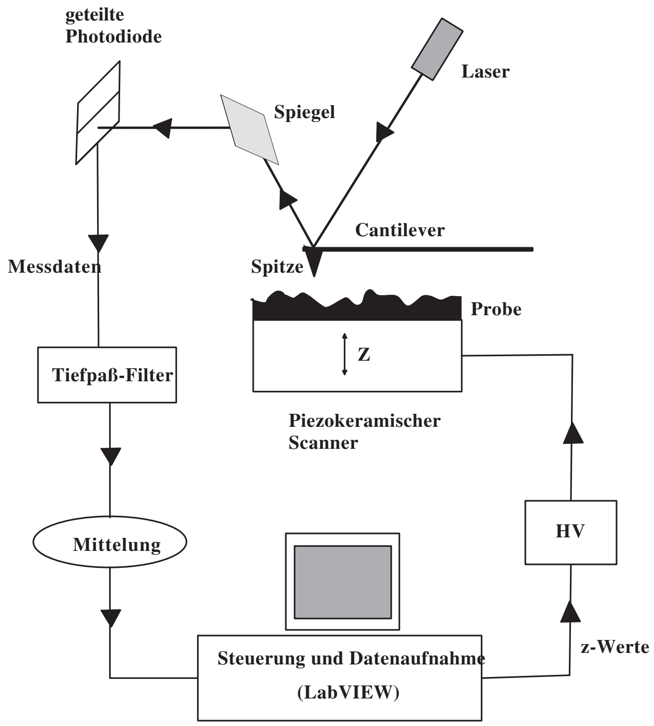

Abbildung 3.4: Schema des Messaufbaus zur Kraftspektrokopie (Beschreibung im Text)

gelenkt, der nur Frequenzen unter 10 kHz weiterleitete. Dann erfolgte eine Mittelung über jeweils 5-10 Datenpunkte. Von dort gelangte das Signal in den analogen Eingang der Meßkarte. Mit diesem Aufbau ließ sich bei 16 bit Auflösung eine maximale Abtastrate von 333kHz erzielen. Eingelesen und mit einem ASCII-Header versehen wurden die empfangenen Daten wieder durch ein LabVIEW-Programm.

3.2 Auswertung

3.2.1 Molekulare Ausdehnung

Zur Auswertung der kraftspektroskopischen Messdaten mußten diese zunächst von Kraft-Distanz-Kurven in Kraft-Ausdehnungs-Kurven umgewandelt werden, d.h., aus der Bewegung des piezokeramischen Scanners mußte eine molekulare Ausdehnung gewonnen werden. Daß dies notwendig ist, ist aus Abb. 3.5(a) ersichtlich: Die Bewegung des Piezos $\Delta\mathcal{Z}$ bei der Kraftspektroskopie setzt sich zusammen aus der tatsächlichen Streckung des Moleküls ΔL und der Strecke Δz, die von der Verbiegung des Cantilevers herrührt. Letztere folgt dem Hooke'schen Gesetz $F = -k_L \, \Delta z$. Man erhält also die wirkliche Streckung des Moleküls gemäß

$$\Delta L = \Delta\mathcal{Z} - \Delta z = \Delta\mathcal{Z} - \frac{F}{k_L} \tag{3.1}$$

Die resultierende qualitative Änderung der Kurvenform zeigt Abb. 3.5(b),(c).

Zur Bearbeitung der Rohdaten wurden mehrere MATLAB-Programme geschrieben,

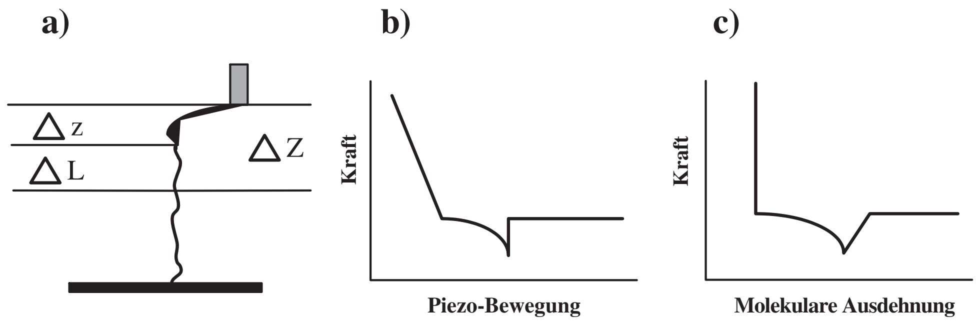

Abbildung 3.5: Zum Begriff der molekularen Ausdehnung

welche die Umrechnung der Ordinatenwerte von Volt in Nanometer (über die Sensorempfindlichkeit) sowie von Nanometer in Pikonewton (mit der Federkonstanten des Cantilevers) durchführten, ebenso die beschriebene Umrechnung der Kraft-Distanz-Kurve auf eine molekulare Ausdehnung. Eingebettet waren diese Programme in ein MATLAB-Programm, das das sukzessive Einlesen und Bearbeiten der in einer bestimmten Messreihe erhaltenen Kraft-Distanz-Kurven erlaubte.

3.2.2 Fit

Für das Fitten der unterschiedlichen molekularen Elastizitäts-Modelle für dsDNA an die experimentellen Daten wurden verschiedene kleine MATLAB-Programme geschrieben, die zum Optimieren der Parameter alle einen sog. Levenberg-Marquardt-Algorithmus verwenden. Dieser Algorithmus zur Optimierung nichtlinearer Parameter nach der Methode der kleinsten Quadrate ist als Interpolation aufzufassen zwischen Modellen, die auf der Entwicklung der Fit-Funktion in eine Taylor-Reihe basieren, und Modellen, welche bei der Optimierung nach der Methode des „steilsten Abstiegs“ (entlang des Gradienten) vorgehen. Gegenüber diesen Verfahren bietet der Levenberg-Marquardt-Algorithmus den Vorteil größerer numerischer Stabilität und schnellerer Konvergenz [100, 101].
Beim Fit von Gl. 2.66 an die Messdaten ergab sich das Problem, daß diese Gleichung eine Beziehung für die Ausdehnung der DNA in Abhängigkeit von einer Kraft liefert, bei den Messdaten jedoch die Ausdehnung auf der Abszisse und die Kraft auf der Ordinate aufgetragen sind. Man muß also die Meßdaten an der Winkelhalbierenden des Koordinatensystems spiegeln, mithin die „Umkehrfunktion“ für die Messdaten finden. Aufgrund des Rauschens von ca. 5-10 pN sind die Datenpunkte natürlich alles andere als streng monoton steigend; man braucht aber eine eineindeutige Zuordnung, um den Ising-Fit durchführen zu können. Behoben wurde das Problem, indem an die Messdaten *vor* dem eigentlichen Fit eine eineindeutige Funktion, die sehr gut (Korrelation >99%) dem Verlauf der Messkurve folgt und deswegen kein verfälschendes Präjudiz für die tatsächliche Kurve darstellt, durch Optimierung von drei Parametern angepaßt wurde. Es handelte sich hierbei um die Areasinushyperbolicus-Funktion

$$y = a_1 \operatorname{arsinh}(a_2 x + a_3) \tag{3.2}$$

(a_1, a_2, a_3: Fit-Parameter) mit der Umkehrfunktion

$$y = \frac{\sinh\left(x/a_1\right) - a_3}{a_2}. \tag{3.3}$$

An diese Funktion wurde dann die durch Gl. 2.66 definierte Beziehung für das Two-State WLC Modell gefittet.

3.3 Probenpräparation und Immobilisierung

3.3.1 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit vorgestellten kraftspektrokopischen Messungen verwendeten entweder synthetische Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)-DNA einer durchschnittlichen Länge von 724 Basenpaaren (≈ 250 nm) oder synthetische Poly(dA-dT)•poly(dA-dT)-DNA einer durchschnittlichen Länge von 3172 Basenpaaren (≈ 1100 nm) von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, USA). Daunorubicin (Daunomycin) und Distamycin A wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen, Ethidiumbromid (für die Molekularbiologie) von der Merck KG (Darmstadt) und die Fluoreszenzfarbstoffe YOYO-1-Iodid und YO-1-Iodid (YO-PRO-1-Iodid) von der Firma Molecular Probes (Eugene, USA). Die beiden Peptide Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker und Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker wurden von Sven David Wilking (Organische und Bioorganische Chemie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld) synthetisiert und freundlicherweise gespendet. Die für den Tris-Puffer verwendeten Chemikalien Tris(hydroxymethyl)aminomethan (kurz Tris) und das entsprechende Hydrochlorid (Tris-HCl) sowie das Natriumchlorid (für die Molekularbiologie) wurden von der Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz) erhalten, das EDTA (Ethylendiamintetraacetat) von der Sigma-Aldrich Chemie. Wasser war immer Reinst-Wasser von Milli-Q (Millipore, USA). Reines Ethanol (für die Spektroskopie) stammte von der Merck KG.
Gelöst wurden alle bindenden Moleküle bis auf Distamycin A (50% Puffer/50% Ethanol) und die beiden Peptide (50% Puffer/50% Acetonitril) in Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.3). Eine wichtige Besonderheit bei den Peptiden war die Tatsache, daß die kraftspektroskopische Messung bei pH 8.3 fehlschlug. Der Grund hierfür war wohl zu hohe Ladung der Peptide, die zu starken elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Spitze und in der Konsequenz zu unspezifischen Abrissen ohne Struktur führte. Die Messungen mit den Peptiden konnten jedoch erfolgreich bei pH 10.2 durchgeführt werden. Dieser pH liegt noch deutlich unter den abgeschätzten isoelektrischen Punkten für beide Peptide (Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker: 12.7, Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker: 12.2, abgeschätzt mit dem „EMBL Gateway to Isoelectric Point"-Programm, http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl), so daß keine große Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften der Peptide zu befürchten war.
Die DNA-Chargen enthielten jeweils 10 Einheiten = 500 μg dsDNA und wurden mit je 500 μl Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.3) versetzt. (Die kleine Menge an EDTA hatte hierbei die Aufgabe, zweiwertige Ionen zu

binden, die sonst Komplexe mit dem DNA-Rückgrat eingegangen wären.) Die Anzahl der Basenpaare in einem 10 μl-Tropfen betrug damit, wenn man für die molekulare Masse eines Basenpaars den Wert 640 g/mol annimmt, ca. 10^{14}. Die Zugabe der DNA-Liganden folgte der Regel, daß auf ein DNA-Basenpaar etwa zehn Moleküle kommen sollten, d.h. alle Liganden wurden der DNA in Konzentrationen von $150\mu M$ zugesetzt. Kraftspektroskopische Messungen bei größerem (z.B. 100,1000-fachem) Überschuß an bindenden Molekülen gestalteten sich schwierig, da ein solcher Überschuß die elektrostatischen Eigenschaften der Oberfläche zu stark veränderte, so daß statt verwertbarer Kraft-Distanz-Kurven große, unspezifische Abrisse erhalten wurden. Da leider keine Angaben über Assoziationskonstanten der dsDNA-Ligand-Komplexe vorlagen, sind auch Aussagen darüber, wieviele Moleküle wirklich an die dsDNA gebunden hatten, schwierig; da im zehnfachen Überschuß gemessen wurde, kann man aber sicherlich von einer „Belegung" der DNA ausgehen, die dem Maximum nahekommt. Für Ethidiumbromid existiert ein Richtwert, der besagt, daß bei maximaler Belegung der dsDNA mit dem Interkalator ein Ethidiumbromid-Molekül auf zwei Basenpaare kommt. Der entsprechende Wert für den Bisinterkalator YOYO liegt bei einem Molekül auf 10 Basenpaare.
Vor der Immobilisierung wurden die den Komplex aus dsDNA und dem Liganden enthaltenden Lösungen 1-2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.2 Immobilisierung

Zur Immobilisierung der dsDNA-Moleküle bzw. der dsDNA-Ligand-Komplexe wurde nach der Methode von Rief et al. [47, 46, 102] frisch aufgedampftes Gold verwendet. Die dsDNA bindet hierbei über unspezifische, wohl hauptsächlich elektrostatische Wechselwirkungen an die Goldoberfläche (Physisorption, im Unterschied zur kovalenten Verknüpfung mit der Oberfläche). Die genaue Ursache dafür, daß diese unspezifische Immobilisierung von DNA-Molekülen auf Gold so gut funktioniert, ist bis dato noch ungeklärt.
Die Goldoberflächen mußten, damit die Immobilisierung und die anschließende kraftspektroskopische Messung erfolgreich sein sollten, frisch aufgedampft sein. Nach der sog. „Template-Stripped Gold"-Methode hergestellte Oberflächen (hierbei wird frisch gespaltener Glimmer mit Gold bedampft, auf die Goldseite dann ein Glasplättchen geklebt und der Glimmer direkt vor dem Gebrauch abgezogen) erwiesen sich als untauglich für die Kraftspektroskopie. Ein möglicher Grund dafür scheint darin zu bestehen, daß die Goldoberfläche eine gewisse Rauhigkeit aufweisen muß, damit das Aufnehmen der dsDNA durch die Spitze gelingt (interessant insofern, als die Rauhigkeit der Oberfläche

beim *Abbilden* mit dem AFM gerade störend ist).
Zur Herstellung der Goldoberflächen wurden 8×8 mm^2 große Glasplättchen (Menzelgläser, Braunschweig) nacheinander mit Aceton, reinem Ethanol und Wasser gereinigt und anschließend mit Stickstoff trockengeblasen. Dann wurden die Glasplättchen in der Aufdampfanlage (BAL-TEC MED 020, BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein) bei einem durchschnittlichen Druck von 10^{-5} mbar, einer Stromstärke von 80-90 Ampère und einer Rate von ca. 1 $Å$/s mit einer etwa 30 nm dicken Goldschicht bedampft. Direkt nach dem Bedampfen wurden dann 5-10 μl der Probelösung auf die Goldoberfläche pipettiert. Nach einem Tag Inkubation bei 4°C wurde die Probe mit wenigen Tropfen Tris-Puffer gespült, um nicht-gebundene dsDNA-Moleküle (oder die entsprechenden DNA-Ligand-Komplexe) zu entfernen. Die so vorbereitete Probe wurde dann vermessen.

4 Resultate und Diskussion

4.1 Kraftspektroskopische Messungen

Im diesem Teil werden nun, geordnet nach den unterschiedlichen Systemen, die Resultate der kraftspektroskopischen Messungen mit dem AFM dargestellt und diskutiert. Dabei werden zum einen Unterschiede im Verlauf der Kraft-Ausdehnungs-Kurven von Bedeutung sein, die, wie sich zeigen wird, Rückschlüsse auf die Art der Bindung zwischen DNA-bindendem Agens und dem dsDNA-Molekül erlauben: AFM-Kraftspektroskopie ermöglicht die Unterscheidung zwischen interkalierendem Bindungsmodus des Liganden sowie der Bindung in der Neben- oder Hauptfurche. Ein Vergleich der Kräfte, bei denen der B-S-Übergang bei freier dsDNA und beim Komplex aus furchenbindenden Molekülen und der Doppelhelix stattfindet, deutet auf eine charakteristische Abnahme (um 25-35 %) dieser Kräfte für Bindung an DNA hin. Bei Bindung von Interkalatoren verschwindet das B-S-Plateau, der Übergang macht sich allenfalls noch als „Schulter“ in der Kraft-Ausdehnungs-Kurve bemerkbar oder verschwindet ganz.
Auf der anderen Seite lassen sich mit Hilfe der im Grundlagenteil besprochenen Elastizitätsmodelle die kraftspektroskopischen Daten auch quantitativ analysieren. Durch Fit des WLC Modells oder des auf dem Ising-Modell beruhenden Two-State WLC Modells an bestimmte Ausschnitte der Kraft-Ausdehnungs-Kurven erhält man Parameter, die Informationen über die elastischen Eigenschaften der betrachteten Systeme sowie über energetische Charakteristika des B-S-Übergangs beinhalten. Es zeigt sich dabei, daß die Steifheit der DNA durch Bindung kleiner Liganden im allgemeinen deutlich erhöht wird, zum anderen aber die Energie des B-S-Übergangs durch die Bindung abnimmt.
Um der besseren Lesbarkeit willen werden ein paar Abkürzungen eingeführt. Anstelle von Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)-DNA und Poly(dA-dT)•poly(dA-dT)-DNA werden die Begriffe *Poly(dG-dC)-dsDNA* und *Poly(dA-dT)-dsDNA* verwendet. Das Two-State Worm-Like Chain Modell wird kurz als *TS-WLC* bezeichnet werden.

4.1.1 Freie dsDNA

Die Resultate der kraftspektroskopischen Messungen an freier dsDNA reproduzierten im wesentlichen die Ergebnisse früherer Untersuchungen [46, 47, 40]. Abb. 4.1 zeigt eine Kraft-Ausdehnungskurve, die für freie Poly(dG-dC)-dsDNA erhalten wurde. Deutlich erkennbar ist zunächst das Plateau bei 80 pN, dessen Länge ca. 70 % der Konturlänge der B-DNA beträgt. Dieser Wert für die Überstreckung der S-DNA gegenüber der B-Form wurde auch von anderen Gruppen (mit optischer Pinzette) gemessen [37, 38] sowie molekulardynamisch berechnet [48]. Ab einer Ausdehnung von ca. 550 nm beginnt das Schmelzen der Doppelhelix. Bei einer Kraft von ca. 300 pN ist der Schmelzvorgang abgeschlossen (vgl. [47, 46]), ab hier wird nur noch an einem ssDNA-Einzelstrang gezogen. Bei 540 pN reißt der Einzelstrang ab, der Cantilever relaxiert. Der DNA-Strang wurde bis zum Abriß auf ca. 660 nm gedehnt, also auf mehr als das doppelte der B-DNA-Konturlänge.

Im vorderen Teil der Kraft-Ausdehnungs-Kurve Abb. 4.1, bis etwa 320 nm, wird die

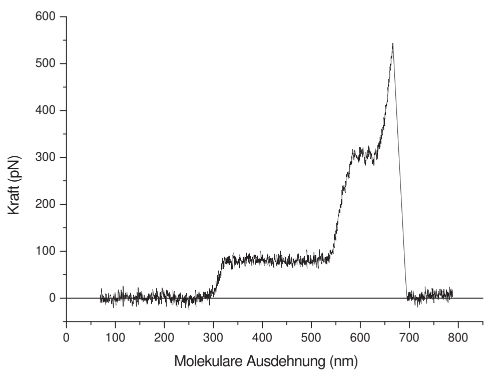

Abbildung 4.1: Kraft-Ausdehnungs-Kurve von freier Poly(dG-dC)-dsDNA

B-DNA elongiert. Bei Elongationen > 320 nm beginnt die kooperative Umwandlung zur S-Konformation, die Konturlänge der hier vermessenen B-DNA wird daher auf 320 nm abgeschätzt. Die Streckung der B-DNA vollzieht sich bis ca. 290 nm ohne nennenswerten Anstieg der Kraft. Bei weiterer Elongation jedoch steigt die Kraft stark an. Dieses Verhalten läßt sich, wie im Grundlagenteil besprochen wurde, durch ein WLC Modell mit enthalpischen Korrekturen modellieren. Abb.4.2 (a) zeigt den Fit dieses WLC Modells an die Messkurve. Fitparameter ist die Persistenzlänge ξ, für die man den mit der Literatur übereinstimmenden Wert ξ= 54.6 nm erhält (vgl. [18, 72]).

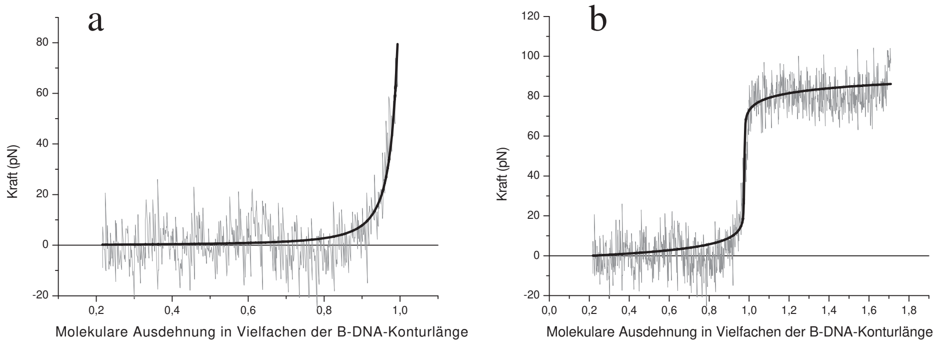

Abbildung 4.2: Freie Poly(dG-dC)-dsDNA: Fits der Elastizitätsmodelle

(a) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 54.6\,nm$)
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.86\,k_BT, J = 1.30\,k_BT, \epsilon = 0.73, \xi = 51.2\,nm$)

In Abb. 4.2 (b) ist der Bereich der Kraft-Ausdehnungs-Kurve herausgenommen, der dem B-S-Übergang entspricht. Der Fit des Ising-Modells an die Messdaten lieferte für die einzelnen Parameter Werte, die eine gute Übereinstimmung zu den von Ahsan et al. für freie dsDNA gefundenen aufweisen. H, die halbe freie Enthalpie für den B-S-Übergang eines Ising-Segments, ist H= 1.86 k_BT (vgl. 1.79 k_BT [72]). J, der Kopplungsparameter, nimmt den Wert J= 1.30 k_BT an (vgl. 1.27 k_BT [72]), ϵ, der Überstreckungsfaktor der S-DNA, ist gleich 0.73 (vgl. 0.78 [72]). Für die B-DNA-Persistenzlänge ergab sich der Wert ξ= 51.2 nm (vgl. 53.4 nm [72]). Dieser Wert korreliert auch relativ gut mit dem über den WLC-Fit erhaltenen (54.6 nm).

Abb. 4.3 (a) zeigt das Pendant zu Abb. 4.1 für Poly(dA-dT)-dsDNA. Besonders auffällig ist zunächst die Tatsache, daß in dieser Kraft-Ausdehnungs-Kurve die Schmelzkurve nicht mehr konkav, sondern konvex gekrümmt ist, so daß das Plateau des B-S-Übergangs und die Schmelzkurve ineinander übergehen. Auf molekularer Ebene bedeutet das, daß noch während des B-S-Übergangs die Doppelhelix zu schmelzen beginnt. Die Energie, die notwendig ist, um den B-S-Übergang einzelner Basenpaare zu ermöglichen, liegt für Poly(dA-dT)-dsDNA nur wenig niedriger als diejenige, die zum Bruch der Wasserstoffbrücken notwendig ist. Poly(dA-dT)-dsDNA bildet gegenüber Poly(dG-dC)-dsDNA um ein Drittel weniger Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aus, was die Poly-A-T-Helix deutlich instabiler macht als die Poly-G-C-Helix, ein Verhalten, das

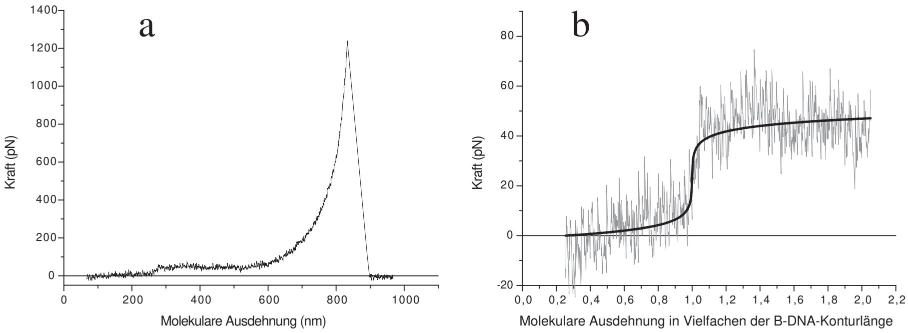

Abbildung 4.3: Resultate für freie Poly(dA-dT)-dsDNA

(a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.49\, k_B T$, $J = 1.16\, k_B T$, $\epsilon = 0.83$, $\xi = 45.3\, nm$)

auch beim thermischen Schmelzen von DNA zu beobachten ist: A-T-reiche Sequenzen in nativer DNA schmelzen bei niedrigeren Temperaturen als G-C-reiche Sequenzen. Dies führt auch dazu, daß das B-S-Übergangs-Plateau schon bei Kräften um 40 pN erreicht wird. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Rief et al. [47, 46] überein. Auch die Parameter des Ising-Fits (Abb. 4.3 (b)) bestätigen diesen Trend: H und J liegen deutlich, die Persistenzlänge ξ etwas unter den Vergleichswerten für Poly(dG-dC)-dsDNA.

4.1.2 Komplex von dsDNA mit Distamycin A

Die Kraft-Ausdehnungs-Kurve für den Komplex aus Poly(dG-dC)-dsDNA und dem in der Nebenfurche bindenden Peptid Distamycin A zeigt Abb. 4.4. Auffallend ist zunächst die Verschiebung des B-S-Plateaus hin zu kleineren Kräften ($\approx$ 50 pN) im Vergleich zur freien DNA. Die B-DNA-Konturlänge liegt für dieses DNA-Molekül bei etwa 110 nm, das B-S-Plateau erstreckt sich bis auf ca. 170 nm, was einer Überstreckung der S-DNA von 55 % der Konturlänge entspricht, einem etwas kleineren Wert als für freie dsDNA.

In Abb. 4.5 (a) ist der WLC-Fit an den B-DNA-Teil der Kurve zu sehen. Der Fit ergibt für die Persistenzlänge den Wert ξ= 79.5 nm. Bestätigt werden diese Befunde durch den TS-WLC-Fit (Abb. 4.5 (b)), der eine Persistenzlänge von 73.9 nm liefert sowie eine tiefere Umwandlungsenergie H und eine höhere Korrelationsenergie J als für freie

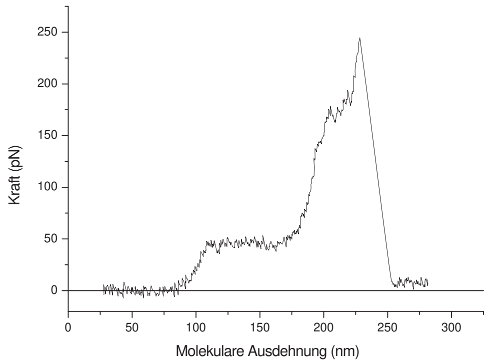

Abbildung 4.4: Kraft-Ausdehnungs-Kurve für den Distamycin - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex

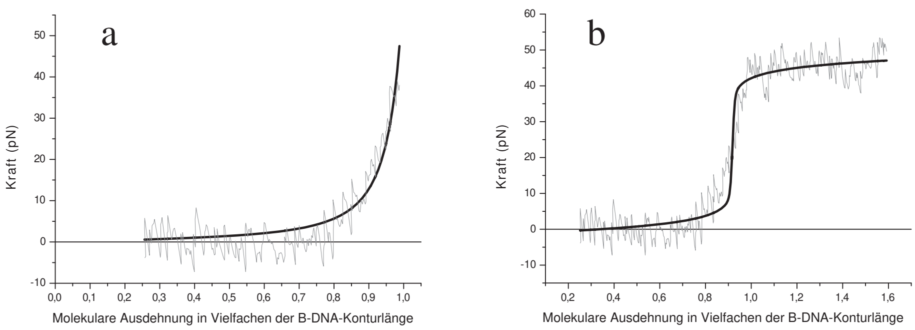

Abbildung 4.5: Distamycin - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex: Fits

(a) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 79.5\,nm$)
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.62\,k_BT, J = 1.51\,k_BT, \epsilon = 0.57,$ $\xi = 73.9\,nm$)

Poly(dG-dC) dsDNA. Für ϵ ergibt der TS-WLC-Fit den Wert 0.57, übereinstimmend mit dem Verlauf der Kraft-Ausdehnungs-Kurve.
Abb. 4.6 zeigt die Kraft-Ausdehnungskurve für den Distamycin A - poly(dA-dT)-dsDNA - Komplex. Die Kurve mit Plateau bei 30 pN zeigt wieder keine vom B-S-Übergang separierbare Schmelzkurve (wie freie Poly(dA-dT)-dsDNA). Das Absinken des Plateaus

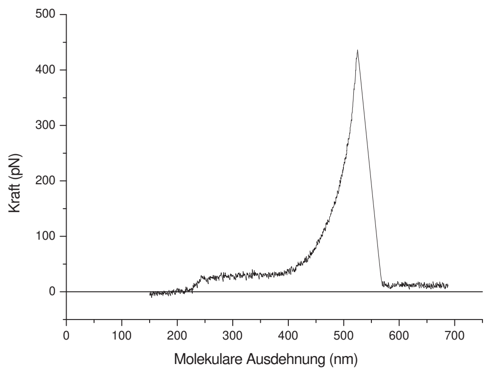

Abbildung 4.6: Kraft-Ausdehnungs-Kurve für den Distamycin - Poly(dA-dT)-dsDNA - Komplex

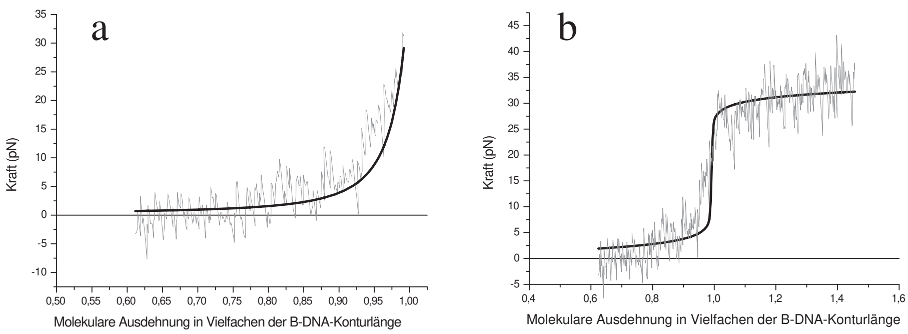

Abbildung 4.7: Distamycin - Poly(dA-dT)-dsDNA - Komplex: Fits

(a) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 68.2\,nm$)
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.37\,k_BT$, $J = 1.28\,k_BT, \epsilon = 0.69$, $\xi = 66.3\,nm$)

auf 30 pN durch Bindung des Peptids (gegenüber 40 pN bei freier DNA) sowie die aus Abb. 4.7 zu entnehmenden elastischen Parameter des WLC- und des TS-WLC-Fits zeigen die gleiche Tendenz wie bei der Poly(dG-dC)-Duplex: Die Bindung des Wirkstoffs in der Nebenfurche erhöht ξ und J, erniedrigt aber H und ϵ.
Die Bindung des Peptids in der kleinen Furche führt also offensichtlich zu einer signifi-

kanten Absenkung der freien Energie des B-S-Übergangs. Erkärt werden könnte dieser Befund, indem man die konformativen Änderungen des DNA-Rückgrats betrachtet, die den Übergang von der B- zur S-Konformation begleiten. Es sei daran erinnert, daß die Basenpaare in der S-Konformation einen viel kleineren Winkel zur Helixachse einnehmen als bei der B-DNA. Dazu müssen während des Phasenübergangs die stark negativ geladenen Rückgrate der DNA ein Stück aneinander vorbeigleiten, gleichzeitig windet sich die Helix stark auf. Dieser Vorgang erfordert Energie, die wohl um so niedriger sein wird, je stärker die Ladungen des Phosphatrückgrats abgeschirmt werden. Die Bindung von Distamycin A in der Nebenfurche erfolgt im wesentlichen über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Rückgrat, führt folglich zu einer stärkeren Abschirmung der negativen Ladung als bei freier DNA, bei welcher die Abschirmung nur über Ionen und Lösungsmittelmoleküle erfolgt. Der kooperative Charakter des Vorgangs (und damit J) sollte nach dieser Vorstellung bei Bindung des Peptids zunehmen, was ebenfalls beobachtet wird. Diese Deutung stellt jedoch nur einen ersten Ansatz dar, die experimentellen Resultate erfordern eine genauere Analyse (gegebenenfalls unter Berücksichtigung des Elastizitätsmodells von Zhou).

Ein weiteres signifikantes Resultat der Experimente mit Distamycin A ist der Anstieg der Persistenzlänge im Vergleich zu freier dsDNA. Dieses Ergebnis ist leichter zu begründen als die Absenkung des B-S-Plateaus. Vergleicht man die dsDNA anschaulich mit einem biegsamen Stab (was der Ausgangpunkt des WLC Modells ist), dann ist die Persistenzlänge ein Maß für die Biegsamkeit dieses Stabes (je größer ξ, desto steifer das Objekt). Binden zusätzliche Moleküle an den „DNA-Stab“, dann müssen diese entweder mit-verbogen werden, oder die Bindung muß gebrochen werden - beide Vorgänge erfordern Arbeit, die am System verrichtet werden muß.

4.1.3 Komplex von dsDNA mit Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker

Die Kraft-Ausdehnungs-Kurve für den Komplex aus Poly(dG-dC)-dsDNA und dem synthetischen Peptid Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker (Abb. 4.8) weist im Gegensatz zur entsprechenden Kurve für Distamycin (ebenfalls ein Peptid) keinen vom B-S-Übergang getrennten Schmelzübergang mehr auf. Der B-S-Übergang bewirkt auch kein wirkliches Plateau mehr, sondern hat eher die Form einer Schulter, die bei Kräften um 60 pN beginnt. Diese Kurvenform deutet bereits darauf hin, daß das Peptid in einem etwas anderen Modus als Distamycin an die DNA bindet. Bekannt war, daß die mögliche Bindung an die DNA über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Guanidinogruppen der Arg-Reste und den negativen Rückgraten zustande kommen muß. Es bestand jedoch keine Klarheit darüber, ob das Peptid sich nun in die kleine oder große Furche einfügt. Das kraftspektroskopische Experiment deutet nun zum einen darauf hin, daß wirklich eine Bindung des Peptids an DNA erfolgt. Zum anderen liefern die Experimente Hinweise darauf, daß man sich diese Bindung anders als beim klassischen Nebenfurchenbinder Distamycin vorzustellen hat.

Abb. 4.9 zeigt den WLC- (a) und den TS-WLC-Fit (b) an die Messkurve. Die Werte

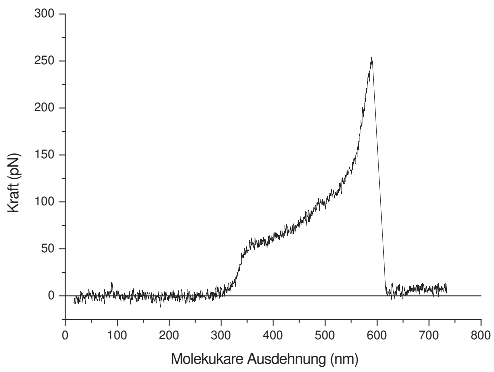

Abbildung 4.8: Kraft-Ausdehnungs-Kurve für den Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex

der elastischen Kenngrößen zeigen die gleiche Tendenz wie die entsprechenden Werte für Distamycin. Die Persistenzlängen, die durch den WLC-Fits und den TS-WLC-Fits erhalten wurden, stimmen wieder gut überein. Allerdings gilt es beim TS-WLC-Fit zu beachten, daß der Kurvenverlauf nicht mehr gut den Annahmen des Modells entspricht, der B-S-Übergang vollzieht sich eben nicht mehr unabhängig vom Schmelzen der Helix. Die Kraft-Ausdehnungskurve für das System Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker - Poly-(dA-dT)-dsDNA (Abb. 4.10 (a)) entspricht in ihrem Verlauf im wesentlichen der entsprechenden Kurve des Distamycin-Komplexes. Bei etwa 35 pN erscheint ein sehr kurzes, wieder nicht von der anschließenden Schmelzkurve abzutrennendes Plateau. Der TS-WLC-Fit (Abb. 4.10 (b)) ist nicht besonders gut, die Persistenzlänge von 79.0 nm entspricht der Erwartung für ein DNA-Molekül, das durch Bindung kleiner Peptidmoleküle einer Verbiegung größeren Widerstand entgegensetzen sollte als freie dsDNA.

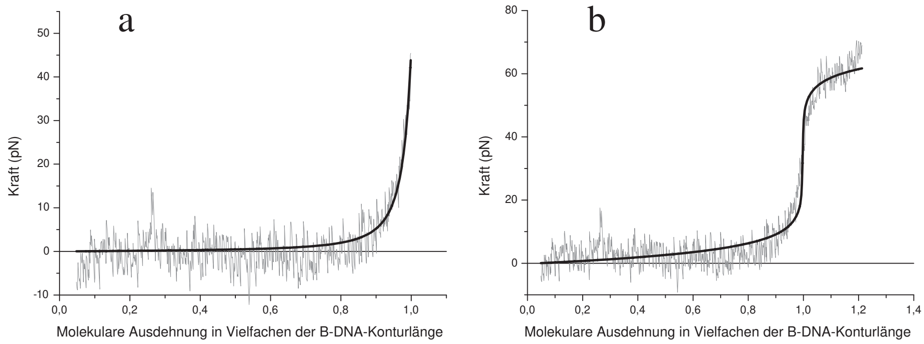

Abbildung 4.9: Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex: Fits

(a) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 85.2\,nm$)
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.39\,k_BT, J = 1.46\,k_BT, \epsilon = 0.56, \xi = 82.3\,nm$)

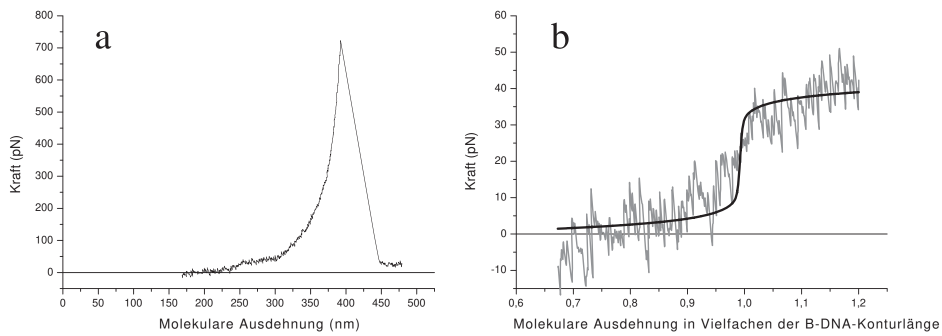

Abbildung 4.10: Resultate für den Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker - Poly(dA-dT)-dsDNA -Komplex

(a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.07\,k_BT, J = 1.19\,k_BT, \epsilon = 0.31, \xi = 79.0\,nm$)

4.1.4 Komplex von dsDNA mit Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker

Die Unterschiede des Systems Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker - Poly(dG-dC)-dsDNA zum im vorigen Abschnitt behandelten Komplex bestehen zum einen darin, daß Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker ein 3_{10}-Helixbildner ist (es enthält die Nichtstandard-Aminosäure Aib). Zum anderen besitzt das Peptid vier anstelle von drei polaren Guanidino-Gruppen, die je nach pH auch geladen sein können. Diese Gruppen wechselwirken mit dem Rückgrat der dsDNA. Ansonsten sollten die beiden Peptide sich jedoch ähneln, und eben dieses Ergebnis resultiert aus den Kraft-Ausdehnungs-Kurven: Abb. 4.11 mit Abb. 4.8 gleichen sich stark, ebenso wie die Parameter, die sich durch das Fitten der molekularen Elastizitätsmodelle an die Kurven ergeben (Abb. 4.12). Die Persistenzlänge ist wieder signifikant höher als für freie Poly(dG-dC)-dsDNA, d.h., die Steifheit der Kette erhöht sich stark durch die Bindung der Peptidmoleküle.

In Abb. 4.13 (a) ist die Kraft-Ausdehnungs-Kurve, in Abb. 4.13 (b) der TS-WLC-

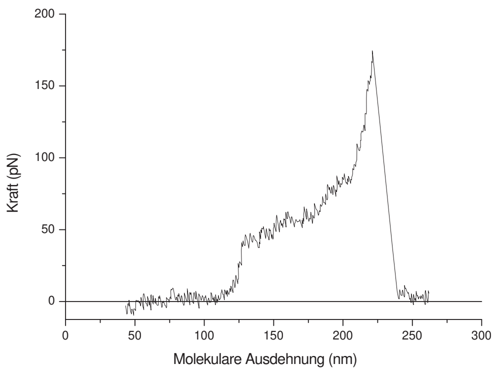

Abbildung 4.11: Kraft-Ausdehnungs-Kurve für den Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex

Fit für den Komplex aus Poly(dA-dT)-dsDNA und dem Peptid zu sehen. Qualitativ ergibt sich keine nennenswerte Veränderung gegenüber den entsprechenden Resultaten für Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker bzw. Distamycin. Der TS-WLC-Fit ist aus mehreren Gründen äußerst schlecht. Zum einen liegt das B-S-Plateau sehr tief bei 20 pN, während das experimentelle Rauschen bei ca. 10 pN liegt, der Übergang ist also nicht sehr deutlich als Stufe zu sehen. Zum anderen stehen für den Fit im Bereich der B-DNA sehr wenige Messdaten zur Verfügung. Die optimierten Parameter sind also mit Vorsicht zu betrachten.

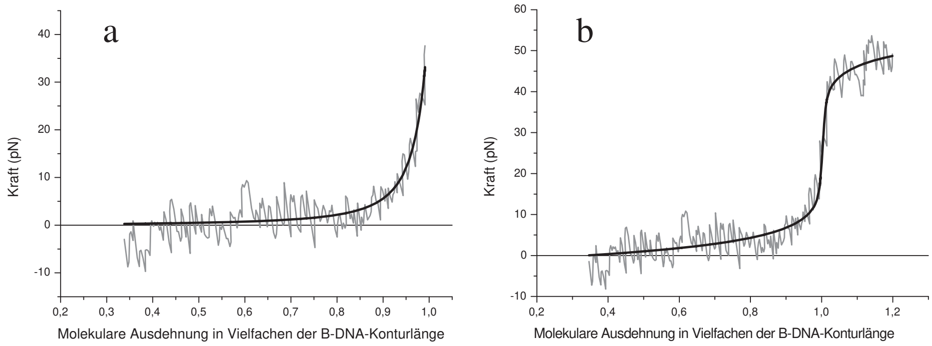

Abbildung 4.12: Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex: Fits

(a) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 88.9\,nm$)
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.45\,k_BT, J = 1.35\,k_BT, \epsilon = 0.22,$
$\xi = 87.0\,nm$)

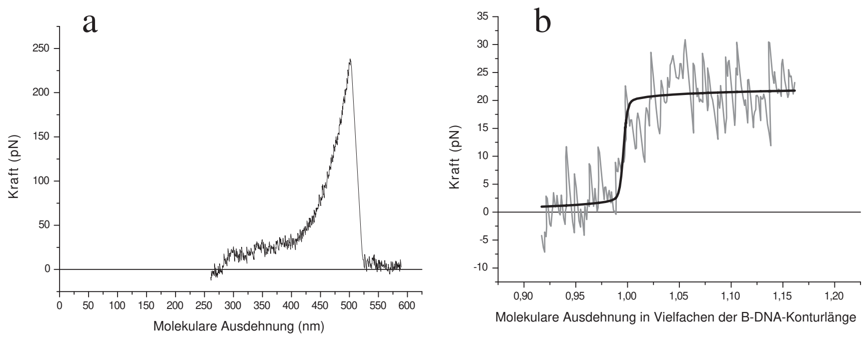

Abbildung 4.13: Resultate für den Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker - Poly(dA-dT)-dsDNA -Komplex

(a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve
(b) TS-WLC-Fit des B-S-Übergangs
Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($H = 1.13\,k_BT, J = 1.02\,k_BT, \epsilon = 0.38,$
$\xi = 78.1\,nm$)

4.1.5 Komplex von dsDNA mit Daunomycin

Daunomycin als Interkalator schiebt sich mit seinem aromatischen Ringsystem keilförmig in die Abfolge der Basenpaare der dsDNA ein. Wird nun an den Enden des DNA-Moleküls mit einer externen Kraft gezogen, so kann man erwarten, daß die Interkalatormoleküle der Dehnung der DNA, die unter anderem zur Verringerung des 90°-Winkels der Basenpaare mit der Helixachse führt, einen gewissen Widerstand entgegensetzen und das DNA-Molekül versteifen. Wie die Abb.en 4.14 (a) und (b) zeigen, bestätigen die Kraft-Ausdehnungs-Kurven diese Vermutungen. Die Kurven zeigen kein Plateau mehr, ein intramolekularer Übergang ist lediglich in einer Schulter bzw. einer Verflachung des Anstiegs der Kurve bei mittleren Ausdehnungen zu erahnen. Diese Kurvenform ist gut reproduzierbar und charakteristisch für die Bindung reiner Interkalatoren an die Doppelhelix.

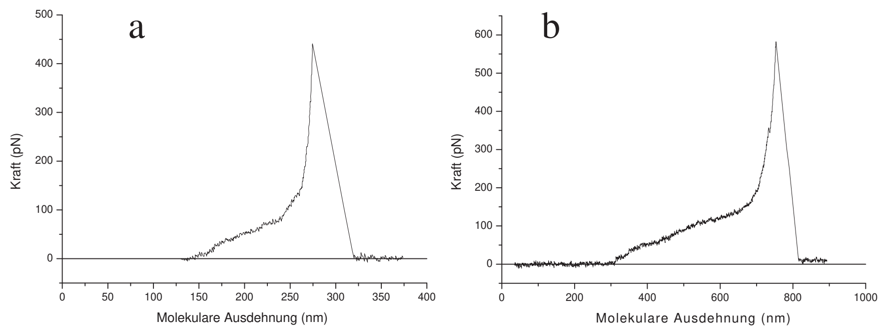

Abbildung 4.14: Kraft-Ausdehnungs-Kurven für die Daunomycin-dsDNA-Komplexe

(a) Daunomycin - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex
(b) Daunomycin - Poly(dA-dT)-dsDNA - Komplex

4.1.6 Komplex von dsDNA mit Ethidiumbromid

Die Abb.en 4.15 (a) und (b) zeigen die Kraft-Ausdehnungs-Kurven der Komplexe von Ethidiumbromid mit Poly(dG-dC)-dsDNA und Poly(dA-dT)-dsDNA. Der Vergleich mit den Kurven des vorigen Abschnitts beweist eindeutig den interkalierenden Charakter der Bindung zwischen Ethidiumbromid und der DNA-Doppelhelix. Die Kurven für Ethidiumbromid haben fast dieselbe Form wie die entsprechenden Graphen für Daunomycin; ein kleiner Unterschied besteht allenfalls darin, daß die Ethidiumbromid-Kurven steiler ansteigen. Für Ethidiumbromid gilt die Faustregel, daß bei Überschuß des Interkalators ein Interkalatormolekül auf nahezu zwei Basenpaare kommt, ein sehr hoher Wert. Die Interkalation von DNA durch Ethidiumbromid verändert also die elastischen Eigenschaften der dsDNA signifikant, so daß z.B. der intramolekulare Übergang von der B- zur S-Form der DNA nicht mehr stattfindet. Dieser Effekt ist bei Ethidiumbromid noch deutlicher sichtbar als bei Daunomycin.

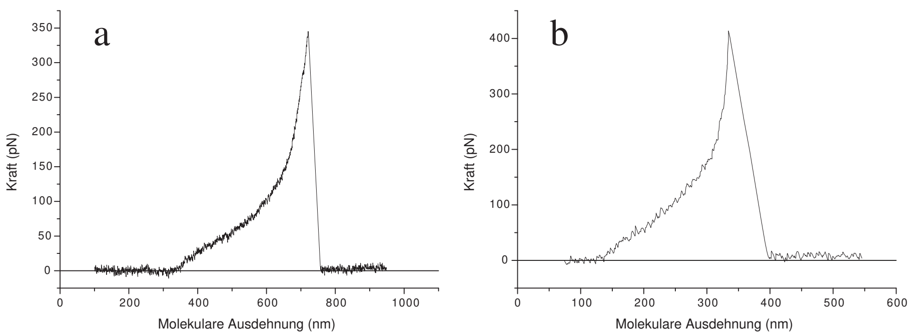

Abbildung 4.15: Kraft-Ausdehnungs-Kurven für die Ethidiumbromid-dsDNA-Komplexe

(a) Ethidiumbromid - Poly(dG-dC)-dsDNA - Komplex

(b) Ethidiumbromid - Poly(dA-dT)-dsDNA - Komplex

4.1.7 Komplex von dsDNA mit YO

Die Kraft-Ausdehnungs-Kurven für die Systeme YO und Poly(dG-dC)-dsDNA (Abb. 4.16 (a)) sowie YO und Poly(dA-dT)-dsDNA (Abb. 4.17 (a)) enthalten kein Anzeichen für einen Kraft-induzierten strukturellen Übergang des Komplexes mehr. YO kann sowohl als Interkalator als auch (bei höheren Konzentrationen) als Hauptfurchenbinder agieren, und die Bindung eines Überschusses an YO-Molekülen hat offenbar zur Folge, daß sich die DNA-Kette unter äußerer Zugspannung wie eine Worm-Like Chain verhält. Deswegen wurden bei diesem System WLC-Funktionen an die gesamte Kraft-Ausdehnungs-Kurve gefittet (Abb.en 4.16 (b) und 4.17 (b)). Die hohen Persistenzlängen deuten auf die hohe Biegesteifigkeit des Komplexes.

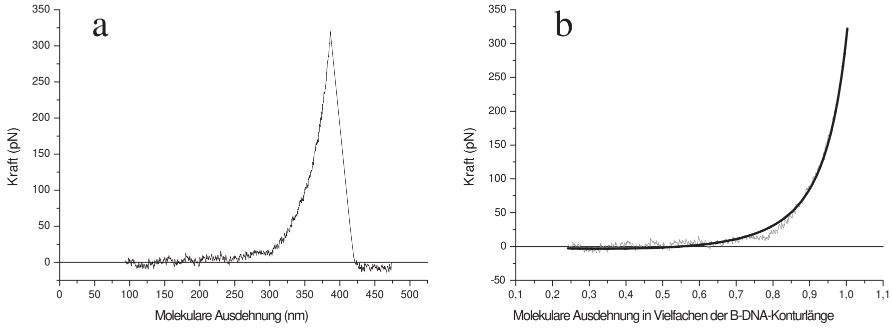

Abbildung 4.16: Resultate für den YO - Poly(dG-dC)-dsDNA -Komplex

(a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve

(b) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung

Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 93.5\,nm$)

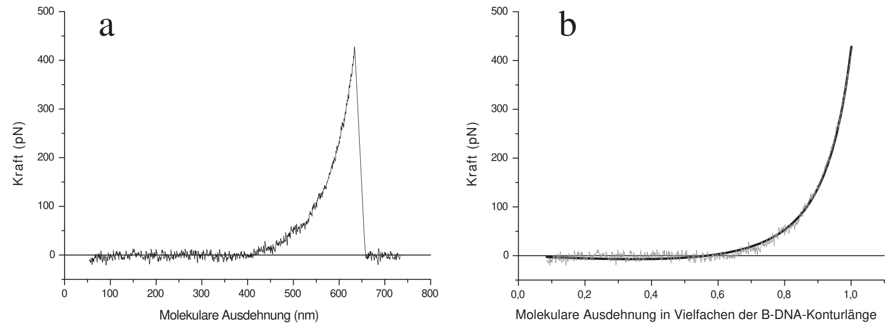

Abbildung 4.17: Resultate für den YO - Poly(dA-dT)-dsDNA -Komplex

(a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve

(b) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung

Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 81.6\,nm$)

4.1.8 Komplex von dsDNA mit YOYO

Wie bereits im Grundlagenteil erwähnt, besteht der Fluoreszenzfarbstoff YOYO aus zwei Molekülen YO, die über eine Trimethylenbrücke kovalent verknüpft sind, YOYO ist also ein potentieller Bisinterkalator. An den in Abb.en 4.18 (a) und 4.19 (a) dargestellten Kraft-Ausdehnungs-Kurven der Systeme YOYO und Poly(dG-dC)-dsDNA sowie YOYO und Poly(dA-dT)-dsDNA fällt vor allem die deutliche Verwandschaft zu den entsprechenden YO-Graphen auf. Der schon bei YO gesehene Effekt, daß die Bindung des Farbstoffs im Überschuß dazu führt, daß die bei freier DNA durch die Zugspannung induzierten intramolekularen Phasenübergänge verschwinden, ist hier auch wieder deutlich sichtbar. Der im Unterschied zu YO bis-interkalative Bindungsmodus hat keine messbaren Veränderungen in der Kraft-Ausdehnungs-Kurve im Vergleich zu YO zur Folge. Allerdings sind die durch den WLC-Fit an die Messkurve erhaltenen Persistenzlängen noch größer als bei YO.

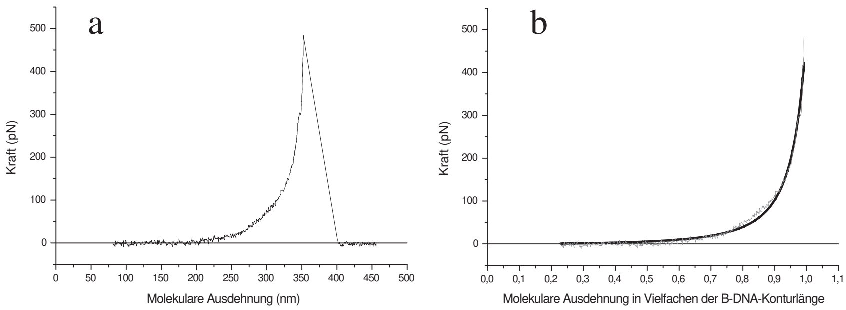

Abbildung 4.18: Resultate für den YOYO - Poly(dG-dC)-dsDNA -Komplex

(a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve

(b) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung

Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 114.3\,nm$)

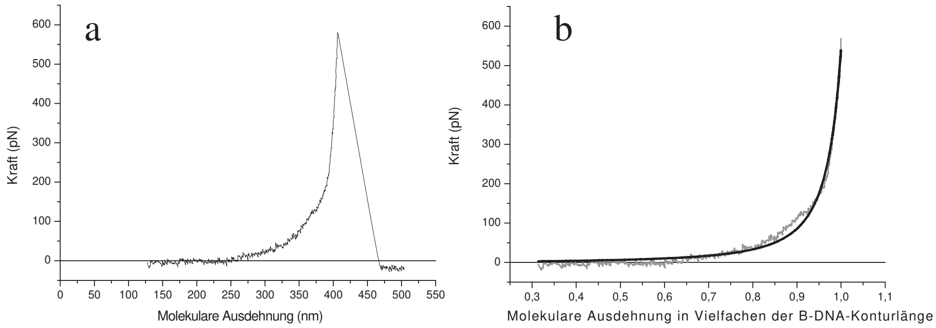

Abbildung 4.19: Resultate für den YOYO - Poly(dA-dT)-dsDNA -Komplex

(a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve

(b) WLC-Fit der B-DNA-Dehnung

Grau: Messdaten, schwarz: Fit ($\xi = 100.5\,nm$)

4.2 Tabellarische Übersicht der elastischen Parameter

In den vorigen Abschnitten wurden die Resultate der kraftspektroskopischen Messungen an freier Poly(dG-dC)-dsDNA und freier Poly(dA-dT)-dsDNA sowie an vierzehn verschiedenen dsDNA-Ligand-Systemen im einzelnen aufgeführt und diskutiert. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse lassen sich wie folgt skizzieren:

- Unterschiede im Bindungsmodus dsDNA-bindender Agenzien lassen sich AFM-kraftspektroskopisch unterscheiden. Die bei freier DNA in der Kraft-Ausdehnungs-Kurve sichtbaren intramolekularen Übergänge (B-S, Schmelzen) sind bei Bindung in den Furchen noch zu sehen, während sie bei Interkalation nicht mehr auftreten.

- Die Bindung von Liganden führt zu einer signifikanten Erhöhung der Biegesteifigkeit des dsDNA-Moleküls.

- Bei Bindung von Liganden in der kleinen oder großen Furche der dsDNA sind kleinere Kräfte notwendig, um den B-S-Phasenübergang zu induzieren, als bei freier dsDNA.

Zum Abschluß dieses Teils der Arbeit folgt nun noch eine tabellarische Übersicht über die elastischen Parameter, die durch Fit des WLC- sowie des TS-WLC-Modells an die Messdaten der untersuchten Systeme optimiert wurden.

System	ξ_{WLC} nm	ξ_{TS-WLC} nm	ϵ	H $\times k_BT$	J $\times k_BT$
Poly(dG-dC)-dsDNA	54.6	51.2	0.73	1.86	1.30
Poly(dA-dT)-dsDNA	-	45.3	0.83	1.49	1.16
Distamycin A / Poly(dG-dC)-dsDNA	79.5	73.9	0.57	1.62	1.51
Distamycin A / Poly(dA-dT)-dsDNA	68.2	66.3	0.69	1.37	1.28
Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker / Poly(dG-dC)-dsDNA	85.2	82.3	0.56	1.39	1.46
Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker / Poly(dA-dT)-dsDNA	-	79.0	0.31	1.07	1.19
Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker / Poly(dG-dC)-dsDNA	88.9	87.0	0.22	1.45	1.35
Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker / Poly(dA-dT)-dsDNA	-	78.1	0.38	1.13	1.02
YO / Poly(dG-dC)-dsDNA	93.5	-	-	-	-
YO / Poly(dA-dT)-dsDNA	81.6	-	-	-	-
YOYO / Poly(dG-dC)-dsDNA	114.3	-	-	-	-
YOYO / Poly(dA-dT)-dsDNA	100.5	-	-	-	-

Tabelle 4.1: Liste der elastischen Parameter für die einzelnen Systeme

ξ_{WLC}: Persistenzlänge, erhalten durch Anpassung des Worm-Like Chain Modells; ξ_{TS-WLC}: Persistenzlänge, erhalten durch Anpassung des Two-State Worm-Like Chain Modells; H: $2H$ ist die freie Energie für den Übergang eines einzelnen Segments vom B- in den S-Zustand (Two-State WLC); J: Korrelationsenergie (Two-State WLC); ϵ: Überstreckung der S-DNA (Two-State WLC). Wo kein Eintrag erscheint, wurde der Fit nicht durchgeführt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde das sequenzspezifische elastische Verhalten einzelner dsDNA-Moleküle sowie unterschiedlicher dsDNA-Ligand-Komplexe unter der Einwirkung einer extern applizierten Kraft mit Hilfe der Rasterkraftspektroskopie untersucht.
Die Messungen an freier Poly(dG-dC)-dsDNA lieferten Kraftwerte von etwa 75-80 pN für das B-S-Plateau (im Rahmen der Fehlergenauigkeit der Federkonstanten von 20% entsprechend den von Rief et al. berichteten 65 pN [46, 47]) sowie 300 pN für das Ende des Schmelzübergangs. Die entsprechenden Parameter für Poly(dA-dT)-dsDNA befanden sich im Einklang mit der Literatur. Auch die prozentuale Überstreckung der S-DNA gegen die B-DNA-Konturlänge von etwa 70-80% konnte verifiziert werden [37, 38]. Die Werte für die elastischen Größen wie die Persistenzlänge stimmen ebenfalls mit den Werten früherer Experimente überein [72].
Als Modellsysteme für die Wechselwirkung mit der DNA wurden sieben verschiedene, relativ kleine Liganden verwendet, die jeweils ein typisches Bindungsverhalten zeigten. Anhand der Kraft-Ausdehnungs-Kurven für die einzelnen Komplexe ließen sich die einzelnen Bindungsmodi unterscheiden. So ergab die Analyse der Kraft-Ausdehnungs-Kurve der Komplexe zwischen dsDNA und dem Nebenfurchenbinder Distamycin A, daß das B-S-Plateau erhalten bleibt, allerdings zu niedrigeren Kräften hin verschoben. Eine von diesem konformativen Übergang zu unterscheidende Schmelzkurve wurde bei Distamycin gefunden, bei den strukturverwandten Peptiden Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker und Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker jedoch nicht mehr; der B-S-Übergang war in der Kraft-Ausdehnungs-Kurve eher als Schulter denn als Plateau zu sehen. Ansonsten zeigten diese Peptide, sowohl das α-helikale Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)$_3$-NH-Linker wie auch der 3_{10}-Helix-Bildner Ac-(Aib-Leu-Arg)$_4$-NH-Linker, ein ähnliches Verhalten wie Distamycin A. Aus den Daten läßt sich die Vermutung begründen, daß die untersuchten Peptide über ihre Argininreste in der großen Furche der B-DNA-Helix binden. Der Fit der Elastizitätsmodelle an die Kurven für Distamycin A und die anderen beiden Peptide lieferte gegenüber freier dsDNA etwas erhöhte Persistenzlängen, was mit einer durch die

Bindung der Moleküle induzierten Vergrößerung der Biegesteifigkeit der DNA-Kette in Einklang steht. Etwas größere Schwierigkeiten bereitete die Deutung der Beobachtung, daß die Kraft für das B-S-Plateau sowie der Wert für die B-S-Übergangsenergie eines Ising-Segments H durch die Bindung signifikant sanken; erklärt werden könnte dieser Befund in einem ersten Ansatz durch die Abschirmung der Ladung des Phosphatrückgrats durch die Bindung kleiner, positiv geladener Moleküle in einer der Furchen.
Für die Interkalatoren Daunomycin und Ethidiumbromid wurde übereinstimmend gefunden, daß das B-S-Plateau aus der Kraft-Distanz-Kurve verschwindet. Dieses Resultat deutet auf die großen Auswirkungen der Bindung eines Interkalators auf die Konformation der DNA. Ein kleiner Unterschied zwischen dem relativ einfach gebauten Ethidiumbromid und dem komplexeren Anthracyclin Daunomycin besteht darin, daß beim Daunomycin anstelle des B-S-Übergangs noch deutlich eine kleine „Schulter" zu sehen war. Beim Ethidiumbromid war diese Schulter schwächer ausgeprägt, während sie bei den Fluoreszenzfarbstoffen YO und YOYO (Bisinterkalator) völlig verschwand. Die Kraft-Ausdehnungs-Kurven der Komplexe dieser Moleküle mit den beiden synthetischen DNA-Helices zeigten keinerlei Abweichungen von der für ein homogenes, kettenförmiges Makromolekül ohne mechanisch induzierbare intramolekulare Übergänge mehr, weshalb hier jeweils ein Fit des WLC-Modells mit enthalpischen Korrekturen an die gesamte Messkurve durchgeführt wurde. Als optimierte Parameter wurden Persistenzlängen erhalten, die nahezu doppelt so groß wie die für freie dsDNA sind, ein Indiz, das wieder für die Zunahme der Biegesteifigkeit des DNA-Polymers nach der Bindung der Interkalatoren spricht.
Resümierend folgt, daß die Art und Weise der unspezifischen Bindung der untersuchten Moleküle an DNA eindeutig durch die kraftspektroskopischen Messungen charakterisiert werden konnte.
Nachdem in der vorliegenden Arbeit durch unspezifische Wechselwirkung der AFM-Spitze mit physisorptiv an eine Goldoberfläche gebundener dsDNA die Auswirkung der Bindung kleiner Effektormoleküle auf die in der dsDNA wirkenden *intra*molekularen Kräfte untersucht worden ist, scheint es naheliegend, nun auch die *inter*molekulare Wechselwirkung zwischen dem Liganden (z.B. dem Peptid) und der DNA mit Einzelmolekülmethoden zu untersuchen. Auch hierfür bietet sich zunächst die Methode der AFM-Kraftspektroskopie an, mit deren Hilfe man Aussagen über die off-Rate der Bindung, also einen wichtigen kinetischen Parameter, erhalten kann. Als zu dieser Methode „orthogonale" Technik gestattet die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) die Messung von off- und auch von *on*-Raten an Einzelmolekülen in freier Lösung und an Oberflächen; interessant wäre daher der Vergleich der mit beiden Methoden erhal-

tenen Ergebnisse. Im Unterschied zur Kraftspektrokopie ist allerdings für das FCS die Fluoreszenz-Markierung mindestens eines Bindungspartners vonnöten.
Des weiteren erscheint es reizvoll, von unspezifisch bindenden Peptiden zu spezifisch bindenden überzugehen. Ein möglicher Ansatzpunkt für die kraftspektrokopische Untersuchung molekularer Erkennungsprozesse wäre hier beispielsweise ein Peptid, das die Aminosäuresequenz der Binderegion des Transkriptionsaktivators PhoB aufweist und daher als im Vergleich zum nativen Protein leichter zu handhabendes Modellsystem gelten kann. Ebenfalls vielversprechende Systeme, um die hier begonnenen Studien fortzusetzen, sind cyclische, interkalierende Peptide wie z.B. Triostin A, die photoisomerisierbare Gruppen aufweisen.
Schlußendlich stellt auch die theoretische Beschreibung dieser durch schwache Wechselwirkungen dirigierten Bindungsprozesse eine wichtige Herausforderung dar. Kinetische Modelle, die auch die Struktur des Übergangszustandes berücksichtigen, können zu einem tieferen Verständnis der Ursachen molekularer Erkennungsprozesse beitragen.

Literaturverzeichnis

[1] The helicity of DNA in complexes with RecA protein. *Nature*, 299:185–186, 1982.

[2] G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky, and A. Libchaber. RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: The role of ATP hydrolysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 96:7916–7921, 1999.

[3] RecA binding to a single double-stranded dna molecule: A possible role of DNA conformational fluctuations. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95:12295–12299, 1998.

[4] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber. Atomic Force Microscope. *Phys.Rev.Lett.*, 56(9):930–933, 1986.

[5] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl.Phys.Lett.*, 40:178–180, 1982.

[6] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys.Rev.Lett.*, 49:57–61, 1982.

[7] D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz. Optical stethoscopy: Image recording with resolution lambda/20. *Appl.Phys.Lett.*, 44:651–653, 1984.

[8] G. Meyer and N. M. Amer. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl.Phys.Lett.*, 53:1045–1047, 1988.

[9] G. Meyer and N. M. Amer. Simultaneous measurement of lateral and normal force with an optical-beam-deflection atomic force microscope. *Appl.Phys.Lett.*, 57:2089–2091, 1990.

[10] F. W. Bartels. *Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie an einzelnen Biomolekülen (Diplomarbeit).* Fakultät für Physik, Universität Bielfeld, 2002.

[11] J. M. Neumeister and W. A. Ducker. Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers. *Rev.Sci.Instr.*, 64:2527–2531, 1994.

[12] J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, and P. K. Hansma. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev.Sci.Instr.*, 64(2):403–405, 1993.

[13] C. T. Gibson, G. S. Watson, and S. Myhra. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology*, 7:259–262, 1996.

[14] J. L. Hutter and J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev.Sci.Instr.*, 7:1868–1873, 1993.

[15] D. A. Walters, J. P. Cleveland, N. H. Thomson, P. K. Hansma, M. A. Wendman, G. Gurley, and V. Elings. Short cantilevers for atomic force microscopy. *Rev.Sci.Instr.*, 67(10):3583–3590, 1996.

[16] A. Roters and D. Johannsmann. Distance-dependent noise measurements in scanning force microscopy. *J.Phys.:Condens.Matter*, 8:7561–7577, 1996.

[17] A. Ashkin. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94:4853–4860, 1997.

[18] T. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon. Twisting and stretching single DNA molecules. *Progr.Biophys.Mol.Biol.*, 74:115–140, 2000.

[19] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271:1835–1837, 1996.

[20] C. Gosse and V. Croquette. Magnetic tweezers: Micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys.J.*, 82(6):3314–3329, 2002.

[21] W. Sanger. *Principles of nucleic acid structure*. Springer, 1984.

[22] L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 4 edition, 1999.

[23] D. L. Nelson A. L. Lehninger and M. M. Cox. *Prinzipien der Biochemie*. Springer, 3 edition, 2001.

[24] J. Zlatanova, S. M. Lindsay, and S. H. Leuba. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Progr.Biophys.Mol.Biol.*, 74:37–61, 2000.

[25] E.-L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264:415–417, 1994.

[26] G. U. Lee, D. A. Kidwell, and R. J. Colton. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir*, 10:354–357, 1994.

[27] A. Kishino and T. Yanagida. Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature*, 334:74–76, 1988.

[28] H. E Erickson. Stretching single protein molecueles: titin is a weird spring. *Science*, 267:1090–1092, 1997.

[29] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276:1109–1112, 1997.

[30] M. S. Z Kellermayer, S. B. Smith, H. L Granzier, and C. Bustamante. Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 267:1112–1116, 1997.

[31] M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, T. E. Fisher, P. E. Marszalek, H. Li, and J. M. Fernandez. Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering. *Progr.Biophys.Mol.Biol.*, 74:63–91, 2000.

[32] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science*, 275:1295–1297, 1997.

[33] G. U. Lee, L. A. Chrisey, and R. J. Colton. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science*, 266:771–773, 1994.

[34] J. Liphardt, B. Onoa, S. B. Smith, Jr. I. Tinoco, and C. Bustamante. Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. *Science*, 292(5517):733–737, 27-4-2001.

[35] M. C. Williams, J. R. Wenner, J. Rouzina, and V. A. Bloomfield. Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: Evidence of force-induced DNA melting. *Biophys.J.*, 80:874–881, 2001.

[36] C. Bustamante. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 265:1599–1600, 1994.

[37] S. B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271:795–799, 1996.

[38] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA: An extensible molecule. *Science*, 271:792–794, 1996.

[39] M. C. Williams, J. R. Wenner, J. Rouzina, and V. A. Bloomfield. Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching. *Biophys.J.*, 80:1932–1939, 2001.

[40] D. Anselmetti, J. Fritz, B. Smith, and X. Fernandez-Busquets. Single molecule DNA biophysics with atomic force microscopy. *Single Molecules*, 1(1):17–23, 2000.

[41] R. Krautbauer, L. H. Pope, T. E. Schrader, S. Allen, and H. E. Gaub. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy. *FEBS Letters*, 510:154–158, 2002.

[42] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Stress-induced structural transitions in DNA and proteins. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*, 29:523–543, 2000.

[43] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and V. Croquette. Phase coexistence in a single DNA molecule. *Physica A*, 263:392–404, 1999.

[44] R. H. Austin, J. P. Brody, E. C. Cox, T. Duke, and W. Volkmuth. Stretch genes. *Physics Today*, February 1997:32–38, 1997.

[45] M. W. Konrad and J. I. Bolonick. Molecular dynamics simulation of DNA stretching is consistent with the tension observed for extension and strand separation and predicts a novel ladder structure. *J.Am.Chem.Soc.*, 118:10989–10994, 1996.

[46] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat.Struct.Biol.*, 6(4):346–349, 1999.

[47] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophys.J.*, 78(4):1997–2007, 2000.

[48] A. Lebrun and R. Lavery. Modelling extreme stretching of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 24(12):2260–2267, 1996.

[49] J. F. Leger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J. F. Marko. Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule. *Phys.Rev.Lett.*, 83(5):1066–1069, 1999.

[50] L. H. Pope, M. C. Davies, C. A. Laughton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, and P. M. Williams. Force-induced melting of a short DNA double helix. *Eur.Biophys.J.*, 30:52–62, 2001.

[51] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, and L. A. Marky. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83:3746–3750, 1986.

[52] M. Waring. Binding of antibiotics to DNA. *Ciba Found.Symp.*, 158:128–142, 1991.

[53] B. C. Baguley. DNA intercalating anti-tumour agents. *Anticancer Drug Des.*, 6(1):1–35, 1991.

[54] M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa, and A. Ramos. Intercalators as anticancer drugs. *Curr.Pharm.Des.*, 7(17):1745–1780, 2001.

[55] G. N. Hortobagyi. Anthracyclines in the treatment of cancer. an overview. *Drugs*, 54(4):1–7, 1997.

[56] G. Aubel-Sadron and D. Londos-Gagliardi. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, 66(5):333–352, 1984.

[57] J. B. Chaires. Biophysical chemistry of the daunomycin-DNA interaction. *Biophys.Chem.*, 35(2-3):191–202, 1990.

[58] Water ring structure at DNA interfaces: Hydration and dynamics of DNA-anthracycline complexes. *Biochemistry*, 33:3649–3659, 1994.

[59] A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, and D. H. Evans. Review: ethidium fluorescence assays, part 1: Physicochemical studies. *Nucleic Acids Res.*, 10(7):547–569, 1979.

[60] A. R. Morgan, D. H. Evans, G. U. Lee, and D. E. Pulleyblank. Review: ethidium fluorescence assays, part ii: Enzymatic studies and DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, 10(7):571–594, 1979.

[61] X. Qu and J. B. Chaires. Contrasting hydration changes for ethidium and daunomycin binding to DNA. *J.Am.Chem.Soc.*, 121:2649–2650, 1999.

[62] A. N. Galzer and H. S. Rye. Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection. *Nature*, 359(6398):859–861, 1992.

[63] A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson, and B. Albinsson. Characterization of the binding of the fluorescent dyes YO and YOYO to DNA by polarized light spectroscopy. *J.Am.Chem.Soc.*, 116:8459–8465, 1994.

[64] B. C. Baguley. Nonintercalative DNA-binding antitumour compounds. *Mol.Cell Biochem.*, 43(3):167–181, 1982.

[65] C. Bailly and J. B. Chaires. Sequence-specific DNA minor groove binders. design and synthesis of netropsin and distamycin analogues. *Bioconjug.Chem.*, 9(5):513–538, 1998.

[66] P. R. Turner and W. A. Denny. The mutagenic properties of DNA minor-groove binding ligands. *Mutat.Res.*, 355(1-2):141–169, 1996.

[67] S. D. Wilking. *Synthese DNA-bindender Peptide (Diplomarbeit).* Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, 2001.

[68] E. T. Kaiser and F. J. Kezdy. Amphiphilic secondary structure: Design of peptide hormones. *Science*, 223(4633):249–255, 1984.

[69] T. Niidome, N. Ohmori, A. Ichinose, A. Wada, H. Mihara, T. Hirayama, and H Aoyagi. Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA and their gene-transfer abilities into cells. *J.Biol.Chem.*, 272(24):15307–15312, 1996.

[70] P. J. Flory. *Statistical mechanics of chain molecules.* Wiley-Interscience, 1969.

[71] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258:1122–1126, 1992.

[72] A. Ahsan, J. Rudnick, and R. Bruinsma. Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition. *Biophys.J.*, 74:132–137, 1998.

[73] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Recl.Trav.Chim.Pays-Bas*, 68:1106–1123, 1949.

[74] C. R. Cantor and P. R. Schimmel. *Biophysical Chemistry, Part III: The Behaviour of Biological Macromolecules.* W. H. Freeman, 1980.

[75] M. E. Fisher. Magnetism in one-dimensional systems: the Heisenberg model for infinite spin. *Am.J.Phys.*, 32:343–346, 2002.

[76] J. F. Marko and E. D. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28:8759–8770, 1995.

[77] J. F. Marko. Statistical mechanics of supercoiled DNA. *Phys.Rev.E*, 52(3):2912–2938, 1995.

[78] J. F. Marko. DNA under high tension: Overstretching, undertwisting, and relaxation dynamics. *Phys.Rev.E*, 57(2):2134–2149, 1998.

[79] C. Bouchiat, M. D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys.J.*, 76:409–413, 1999.

[80] H. Kleinert. *Pfadintegrale in Quantenmechanik, Statistik und Polymerphysik.* BI-Wissenschaftsverlag, 1993.

[81] K. Jänich. *Funktionentheorie - eine Einführung.* Springer, 5 edition, 1999.

[82] L. V. Ahlfors. *Complex Analysis: An introduction to the theory of analytic functions of one complex variable.* McGraw-Hill, 3 edition, 1979.

[83] A Vologodskii. DNA extension under the action of an external force. *Macromolecules*, 27:5623–5625, 1994.

[84] T Odijk. Stiff chains and filaments under tension. *Macromolecules*, 28:7016–7018, 1995.

[85] H. Zhou, Y. Zhang, and Z.-C. Ou-Yang. Elastic property of single double-stranded DNA molecules: Theoretical study and comparison with experiments. *Phys.Rev.E*, 62(1):1045–1058, 2000.

[86] E. Ising. Beitrag zur Theorie des Ferromagnetismus. *Zeitschrift f. Physik*, 31:253–258, 1925.

[87] A. Irback, C. Peterson, and F. Potthast. Evidence for nonrandom hydrophobicity structures in protein chains. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 93:9533–9538, 1996.

[88] Y. Liu and J.-P. Dilger. Application of the one- and two-dimensional ising models to studies of cooperativity between ion channels. *Biophys.J.*, 64:26–35, 1993.

[89] J. Majewski, H. Li, and J. Ott. The Ising model in physics and statistical genomics. *Am.J.Hum.Genet.*, 69:853–862, 2001.

[90] W. Lenz. Beitrag zum Verständnis der magnetischen Erscheinungen in festen Körpern. *Physikalische Zeitschrift*, 21:613–615, 1920.

[91] W. Nolting. *Grundkurs Theoretische Physik, Band 6: Statistische Physik*. Vieweg, 3 edition, 1998.

[92] P. Cizeau and J.-L. Viovy. Modeling extreme extension of DNA. *Biopolymers*, 42:383–385, 1997.

[93] R. Kubo. *Statistical Mechanics*. North-Holland Publishing Co., 1967.

[94] H. Zhou, Y. Zhang, and Z.-C. Ou-Yang. Bending and base-stacking interactions in double-stranded DNA. *Phys.Rev.Lett.*, 82(22):4560–4563, 1999.

[95] H. Zhou and Z.-C. Ou-Yang. Bending and twisting elasticity: A revised Marko-Siggia model on DNA chirality. *Phys.Rev.E*, 58(4):4816–4819, 1998.

[96] G. F. Meyer. *Green's Functions: Introductory theory with applications*. Van Nostrand Reinhold Co., 1970.

[97] G. D. Smith. *Numerical solution of partial differential equations*. Clarendon Press, 3 edition, 1999.

[98] C. Johnson. *Numerical solution of partial differential equations by the finite element method*. Cambridge University Press, 1995.

[99] J. Stoer and R. Bulirsch. *Numerische Mathematik II*. Springer, 3 edition, 1990.

[100] D. W. Marquardt. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J.Soc.Indust.Appl.Math.*, 11(2):431–441, 1963.

[101] K. Levenberg. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Quarterly Applied Mathematics*, 2:164–168, 1944.

[102] H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, and H. E. Gaub. Force spectroscopy with single bio-molecules. *Curr.Op.Chem.Biol.*, 4:524–530, 2000.

Glossar

α	$\alpha = \xi F/k_BT$
$\boldsymbol{\alpha}$	Polarisierbarkeit (vgl. optische Pinzette)
A	Alanin (Einbuchstabencode)
A	Freie Energie (Two-State WLC)
$\mathcal{A}$	Breite eines Potentialtopfes
A_{el}	Elastische freie Energie der WLC
a_0	Länge eines DNA-Segments im WLC und Two-State WLC Modell
AFM	Atomic Force Microscope (Rasterkraftmikroskop)
Aib	α-Aminoisobuttersäure (Nicht-Standard-Aminosäure)
Ala	Alanin
Arg	Arginin
β	Inverse Temperatur: $\beta = 1/k_BT$
$\mathbf{b}$	Vektor in Richtung der Bindung zwischen einem Basenpaar (Modell von Zhou)
B	Operator, der die Wirkung des äußeren Feldes B_0 vermittelt (Ising-Modell)
B_0	Stärke des äußeren Feldes (Ising-Modell)
B-DNA	Normalform der dsDNA unter physiologischen Bedingungen

bp	Basenpaar (der DNA-Doppelhelix)
C	Cytosin
$C_{lmn}(s)$	Clebsch-Gordan-Koeffizient (Modell von Zhou)
δ	Dirac'sche Deltafunktion
ΔL	Molekulare Dehnung eines Moleküls
Δz	Vertikale Komponente der Auslenkung eines Cantilevers aus der Ruhelage
$\Delta \mathcal{Z}$	Bewegung des z-Piezos
$D(\mathbf{r})$	Verteilungsfunktion der geometrischen Konfigurationen der DNA-Kette
$\mathcal{D}(\mathbf{t})$	Integrationsmaß (Pfadintegralmethode)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige DNA
ΔE	Freie Energie, um ein DNA-Segment vom B- in den S-Zustand zu überführen, vgl. Two-State WLC Modell
ϵ	Länge der elongierten S-DNA = $(1+\epsilon) \times L_0$(B-DNA)
ε	Stärke der Basenstapel-Wechselwirkung
η	Eigenwert
η_0	Grundzustands-Eigenwert
$\mathbf{E}$	Elektrische Feldstärke
E_{KP}	Elastische Energie eines Polymers (Kratky-Porod-Modell)
E_{WLC}	Elastische Energie eines Polymers (WLC Modell)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	Unbestimmte Funktion
$\mathbf{F}$	Kraft (Betrag und vektoriell)

$\mathbf{F}_{grad}$	Gradientenkraft (optische Pinzette)
$\mathbf{F}_{scat}$	Streukraft (optische Pinzette)
$\mathbf{F}_{ext}$	Externe Kraft (optische Pinzette)
$f_n(\phi)$	Eigenfunktion des unendlich tiefen Potentialtopfes
g	Unbestimmte Funktion
G	Guanin
G	Green'sche Funktion
H	$2H$ ist die Energiedifferenz zwischen einem DNA-Segment im B- und im S-Zustand, vgl. Two-State WLC Modell
$\hat{H}$	Hamilton-Operator
$\tilde{H}$	$= H + (\epsilon a_0/2)\, g(Z)$
H_{el}	Innere Energie (elastischer Anteil)
H_{eff}	Effektive innere Energie (Ensemble mit fester Zugspannung Z)
H_{int}	Innere Energie (konformativer Anteil)
H_{WLC}	Elastische innere Energie (WLC; Ensemble mit fester Zugspannung)
His	Histidin
i	Index des i-ten Segments einer Polymerkette, vgl. Ising-Modell
$\mathcal{I}$	Identität, neutrales Element
J	Joule
J	Korrelationsenergie, vgl. Ising- und Two-State WLC Modell
κ	Biegesteifigkeit
κ^*	Effektive Biegesteifigkeit
k	Federkonstante
K	Kelvin

K_0	Elastische Materialkonstante, die von enthalpischen Beiträgen zur Elastizität herrührt
k_B	Boltzmann-Konstante (1.38 $\times 10^{-23}$ J/K)
k_L	Federkonstante für die Verbiegung eines Cantilevers in vertikaler Richtung
L	Leucin (Einbuchstabencode)
$\mathcal{L}$	$\mathcal{L} = x/L_0 - F/K_0$
$\langle L \rangle$	Erwartungswert der DNA-Kettenlänge L
L_0	Konturlänge (Polymer)
Leu	Leucin
Linker	Linkermolekül: 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan
$\mathcal{M}$	Makroskopische Observable (Ising-Modell)
m_{eff}	Effektive Masse
Mg^{2+}	Magnesium-Dikation
ν	Frequenz
ν_c	Resonanzfrequenz ($2\pi\nu_c = \omega_0$)
n	Vektor, der orthogonal zu **t** und **n** steht (Modell von Zhou)
N	Anzahl der Segmente eines Polymeren
nm	Nanometer (10^{-9} m)
NaCl	Natriumchlorid
ω	Resonanzfrequenz
$\hat{O}$	Operator (allgemein)
$\mathcal{O}(n)$	Rest-Terme der Ordnung n
OT	Optical Tweezers (Optische Pinzette)

ϕ_0	$r_0 \cos\phi_0$ =0.34 nm
ϕ	Faltungswinkel (Modell von Zhou)
Ψ	Eigenfunktion
Ψ_0	Grundzustands-Eigenfunktion
p	Impuls
P	$P = \langle q^2 \rangle$
PEG	Polyethylenglykol
pN	Piconewton (10^{-12} N)
q	Auslenkung
$\bar{q}$	Hilfsvariable bei der Fourier-Transformation
Q	Zustandssumme
$\mathcal{Q}$	Spektrale Dichte der thermischen Fluktuationen (engl. force spectral density)
$\rho(\phi)$	Basenstapel-Energie-Dichte (Modell von Zhou)
r_0	$r_0 = L_0/N$
$\mathbf{r}(s)$	Raumkurve (Vektor, der einer geometrischen Konfiguration der Kette entspricht)
R	Arginin (Einbuchstabencode)
R	$2\,R$: Länge eines Basenpaars entlang $\mathbf{b}$ (Modell von Zhou)
$R(s)$	Krümmungsradius der DNA-Kette an einer Stelle s
R_g	Gyrationsradius eines Polymerknäuels
RNA	Ribonukleinsäure
σ	Kooperativitätsparameter ($\sigma << 1 \Rightarrow$ hohe Kooperativität)
s	Bogenlänge (entlang der Raumkurve der DNA)

$\langle S \rangle$	Erwartungswert der Ising-Zustandsvariablen S_i
S-DNA	Überstreckte Form der dsDNA
S_i	Ising-Variable für ein Segment i einer Polymerkette, vgl. Ising-Modell
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscope (Optisches Nahfeldmikroskop)
SPM	Scanning Probe Microscope (Rastersondenmikroskop)
ssDNA	Einzelstrang-DNA
STM	Scanning Tunneling Microscope (Rastertunnelmikroskop)
θ_i	Winkel zwischen aufeinanderfolgenden Segment-Orientierungsvektoren $\mathbf{t}_i$ und $\mathbf{t}_{i+1}$
Θ	Winkel zwischen Tangentenvektor $\mathbf{t}$ und z-Achse
Θ_i	Winkel zwischen Segment-Orientierungsvektor $\mathbf{t}_i$ und z-Achse
t	Dimensionslose Zugspannung, vgl. Two-State WLC Modell
$\mathbf{t}$	Tangentenvektor
$\tilde{\mathbf{t}}$	Fouriertransformierte des Tangentenvektors
$\mathbf{t}_i$	Orientierungsvektor eines Kettensegments (vgl. Kratky-Porod-Modell)
T	Thymin
T	Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tromethamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
TS-WLC	WLC mit 2 Zuständen (vgl. Ising-Modell), Elastizitätsmodell zur Modellierung des B-S-Übergangs von dsDNA
u	Unbekannte Funktion (vgl. Green'sche Funktionen)
$U_{i,i+1}$	Basenstapel-Potential

WLC	Worm-Like Chain, rein entropisches Elastizitäts-Modell für Polymere
ξ	Persistenzlänge (typisch für freie B-DNA: 53.4 nm)
ξ_p	Persistenzlänge der Phosphatrückgrate (Modell von Zhou)
ξ_p^*	Effektive Persistenzlänge der Phosphatrückgrate (Modell von Zhou)
$x, \mathbf{x}$	End-zu-End-Distanz der DNA-Kette (Betrag und vektoriell)
$\langle x \rangle$	Erwartungswert der End-zu-End-Distanz der Kette
y	$= x/L$
$Y_{lm}(\mathbf{t})$	Kugelflächenfunktion
YO	4-[(3-Methyl-2(3H)-benzoxazolidin)methyl]-1-[3-(trimethylammonium)propyl]-chinolinium-diiodid
YOYO	YO-Dimer (bestehend aus 2 über Trimethylengruppe kovalent verknüpften YO-Molekülen)
$z, \mathbf{z}$	Achse, entlang der die äußere Kraft appliziert wird (Betrag und vektoriell)
Z	Zugspannung, vgl. Two-State WLC Modell

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und so zu ihrem Gelingen beigetragen haben.
Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald dafür, daß er diese Arbeit als Betreuer aus der Fakultät für Chemie begleitete und damit die Abfassung in der Physik ermöglicht hat.
Herzlich danken möchte ich ebenso Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für seine Unterstützung, seinen Optimismus sowie das stete Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Robert Ros für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sein Wissen sowie seine aufmunternde Art, die er erfolgreich meinem eigenen Zweck-Pessimismus entgegensetzte. Von ihm habe ich in diesen sechs Monaten Einiges gelernt.
Des weiteren möchte ich mich bei Prof. Robijn Bruinsma, PhD (Theoretical Condensed Matter, University of California, Los Angeles), sowie Dr. Haijun Zhou (MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Golm) für wertvolle Diskussionen bedanken. Dr. Zhou war auch so freundlich, mir seinen FORTRAN-Code für die numerische Anpassung der Kraft-Ausdehnungs-Kurven als Muster zu senden.
Sven David Wilking aus der Arbeitsgruppe Bioorganische und Organische Chemie (Prof. Sewald) danke ich für die Synthese und Überlassung der beiden DNA-bindenden Peptide.
Ein herzliches Dankeschön auch an Martina Mahne aus der Biochemie für die Durchführung mehrerer Gelelektrophoresen sowie ihre Ratschläge zum Thema Restriktionsenzyme.
Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften für das ausgesprochen freundliche Arbeitsklima. Danken möchte ich speziell Mr. Betriebssystem Thanh-Tu Duong, sowie Wibke Hellmich, ohne die ich heute nicht wüßte, warum in Japan

Linksverkehr herrscht. Herzlichen Dank auch an Dr. Katja Tönsing, die mich zu dieser Diplomarbeit überredete, Dr. Alexandra Ros für wertvolle Diskussionen, Christoph Pelargus für technische Hilfe bei der Minimierung des Hintergrundrauschens, Frank W. Bartels, der mich in das Abbilden mit dem AFM einführte, Carola Haumann für psychologische Unterstützung und Hermann Kleine für die stetige Versorgung mit Süßwaren. Schließlich möchte ich noch ganz besonders Friederike Steffen danken sowie meinen Eltern, deren tatkräftige Unterstützung mir das Studium erst ermöglicht hat.