



***Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an
doppelsträngiger DNA und einzelsträngiger RNA
mit Hilfe der Optischen Pinzette***

Master-Arbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (M.Sc.)

Angefertigt in der

Experimentellen Biophysik und Angewandte Nanowissenschaft

Fakultät für Physik, Universität Bielefeld

Vorgelegt der

Universität Bielefeld

Von Tanja Plötz,

geb. am 03.07.1985 in Oschatz

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur wörtlich oder sinngemäß entnommenen Zitate habe ich als solche kenntlich gemacht. Weiterhin erkläre ich, dass diese Arbeit weder vollständig noch teilweise einer anderen Prüfungsbehörde mit dem Ziel vorgelegt wurde, einen akademischen Titel zu erwerben.

Bielefeld, den 09.11.2010

Tanja Plötz

Gutachter

Prof. Dr. Dario Anselmetti

AG Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften
Universität Bielefeld

Prof. Dr. Karsten Niehaus

AG Proteom- und Metabolomforschung
Universität Bielefeld

Datum des Einreichens der Arbeit: 09.11.2010

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind wie sie sind.

(Aristoteles)

Abstract

Einzelmolekülspektroskopie wurde in den letzten Jahren erfolgreich angewendet, um einen Einblick in das Aufbrechen von molekularen Bindungen zu bekommen, z.B. DNA (Desoxyribonukleinsäure)- und RNA (Ribonukleinsäure)-Bindungsstudien oder Nukleinsäure-Protein-Wechselwirkungen. Die Stabilität von DNA bei höheren Temperaturen und auch die Formation von Sekundärstrukturen der RNA sind fundamental für das Verständnis der Systembiologie. Für das Zusammenfassen von biochemischen Prozessen in Zellen und Organismen ist das Verständnis der Interaktion von Nukleinsäuren und der anschließenden Expression von Proteinen eine nötige Voraussetzung. Ziehexperimente, durch die Anwendung physikalischer Methoden, eröffnen uns einen neuen Blickwinkel auf die elementaren Prozesse des Nukleinsäure-Zusammenspiels. Mit der Aufnahme von Kraft-Ausdehnungskurven ist es möglich, die freien Energien und kinetischen Parameter von Biomolekülen, Zwischenstrukturen und Weg von biochemischen Prozessen zu beschreiben. Für die Erweiterung des Grundlagenwissens in diesem Bereich hinterfragen wir die Bindungsstruktur beispielsweise bei der Faltung von Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren. Diese kinetischen Prozesse werden durch eine Vielzahl von Strukturen und Interaktionen mit Proteinen oder anderen Nukleinsäuren bestimmt und können auch zu missgefaltete Strukturen führen, die in Organismen zu erheblichen Schäden führen oder die Formation von Viren beeinflussen. Folglich untersuchen wir mit Hilfe der Optischen Pinzette die Bindungskräfte der DNA bei unterschiedlichen Temperaturen und charakterisieren die RNA-Entfaltung durch Expansion der Moleküle. Das Laser gestützte Fangprinzip des Optischen Pinzetten Systems wird zusätzlich durch eine individuell angefertigte Inkubationskammer erweitert. Es kann gezeigt werden, dass mit steigender Temperatur die Steifigkeit der DNA ab- und somit die Flexibilität zunimmt. Weiterhin sollen die Bindungskräfte mit der instabileren Nukleinsäure RNA verglichen und anschließend die Assemblierung der Proteinhülle untersucht werden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Nukleinsäuren.....	3
2.2. Optische Pinzette.....	9
2.2.1 Das Prinzip der Optischen Falle	9
2.2.2 Das Worm-like-Chain (WLC) Modell.....	11
2.2.3 Fangen der Beads	15
2.3 <i>Nicotiana tabacum</i>	18
2.4 Viren	19
2.5 Tobacco mosaic virus (TMV).....	20
2.6. Rasterkraftmikroskopie	25
3. Experimentelle Umsetzung und Probenbereitung	27
3.1. Experimenteller Aufbau der Optischen Pinzette	27
3.1.1 Realisierung der Optischen Falle	27
3.1.2 Bau der Flüssigzelle	31
3.1.3 Inkubationskammer	32
3.2. Präparation der λ -DNA für Streckversuch bei verschiedenen Temperaturen	33
3.3 Viruspräparation.....	34
3.3.1 Pflanzenanzucht und Inokulation.....	34
3.3.2 Virusreinigung	34
3.4 RNA Transkription.....	36
3.4.1 Plasmidtransformation und Plasmidisolierung	36
3.4.3 Vorbereitung des Vektors	37
3.4.4 RNA-Synthese.....	38
3.4.5 Gelelektrophorese zur Größenkontrolle der RNA-Proben	39
3.4.6 Vorbereitung der RNA-Kraftmessung.....	39

4. Ergebnisse	41
4.1. Kraft-Distanzkurven der DNA bei verschiedenen Temperaturen	41
4.1.1 Ergebnisse der λ -DNA Messungen	42
4.1.2 Kraft-Distanzkurve bei der Hysterese	47
4.2 Charakterisierung der RNA	49
4.2.1 Größenbestimmung der RNA	49
4.2.2 Ermittlung der Sekundärstruktur der RNA	50
4.2.3 Überprüfung der Streptavidin-Biotin-Bindung	53
4.3 Ergebnisse der RNA-Expansion	56
5. Diskussion	58
5.1. Kraft-Distanzkurven der DNA bei verschiedenen Temperaturen	58
5.2. Charakterisierung der RNA	63
5.3. Ergebnisse der RNA-Expansion	64
6. Zusammenfassung und Ausblick	66
7. Literaturverzeichnis	67
8. Abkürzungsverzeichnis	71
9. Danksagung	74
10. Anhang	76
10.1. Konstruktionsskizze der Inkubationskammer	76
10.2. Verwendete Lösungen und Geräte	78
10.3. Protokoll der Sekundärstrukturvorhersage ViennaRNA	84

1. Einleitung

„We wish to suggest a structure for the salt of desoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.“ {J. D. Watson 1953}. Mit diesem Satz beginnt die Veröffentlichung der beiden Wissenschaftler Watson und Crick aus Cambridge, die eine dreidimensionale Struktur für die Nukleinsäure DNA vorhersagt. Damit revolutionierten die den Bereich der Genetik und begründeten mit Forschern wie Levine, Pauling und Hershey eine neue Ära. Ausgehend von der Struktur der DNA bis hin zum Humangenomprojekt sind bedeutende Entdeckungen und Erkenntnisse veröffentlicht, die dem Verständnis der Molekularbiologie hilfreich sind. Darunter fallen die Entdeckung der DNA-Polymerasen (1957), das Modell der Eiweiß-induzierten Genregulation (Monod und Jacob, 1960), die Entdeckung der Polymerasekettenreaktion (Kary Mullis, 1985) und der *Expressed Sequence Tags* (Craig Venter, 1991), sowie die Sequenzierung. Dies sind nur einige Beispiele von den Methoden der Molekularbiologie, die zu einem systembiologischen Verständnis der Grundlagenforschung führen. Doch auch physikalische Methoden können für die Aufklärung von biologischen Fragestellungen angewendet werden. Das Hauptziel der biologischen Wissenschaftler ist die Charakterisierung der Chemie des Lebens {Ritort 2006}, d.h. die Funktion und Beschreibung essentieller Bestandteile von Zellen und lebenden Organismen. Hierbei kann die Physik durch die Anwendung von Einzelmolekülexperimenten (*single-molecule experiments*) wie beispielsweise Rasterkraftmikroskopie (*atomic-force-microscopy* - AFM), Magnetische Pinzette (*magnetic tweezer* - MT) oder Optische Pinzette (*optical tweezers* - OT) erfolgsversprechende Beiträge leisten {Ritort 2006}. Denn mit diesen Methoden ist es möglich einzelne Moleküle wie Nukleinsäuren oder Proteine zu analysieren und neue Erkenntnisse zu gewinnen. Dies wird möglich, da die Physik mit anderen Fragestellungen an die Thematik der Biologie heranführt.

Die Anwendung der Optischen Pinzette bietet die Möglichkeit durch ihre ausreichend hohe Kraftauflösung die Bindung der Segmente der Polymerkette untereinander zu untersuchen. Durchführbar wird dies durch die Konstruktion einer dreidimensionalen Optischen Falle auf Grund eines fokussierten Laserstrahls, in dem Objekte, biologische Proben oder Moleküle bis in den Mikrometerbereich gefangen werden können. Ein Vorteil in der Verwendung der Optischen Pinzette besteht in der Detektion der Kraft im pN-Bereich, die erlaubt Kraftspektroskopie an Molekülen durchzuführen und diese auf die Bindungskräfte der Polymerkette zu übertragen. Durch piezoelektrische Elemente können die Objekte nicht nur gezielt gefangen, sondern auch gerichtet bewegt werden. Dies gestattet die Annäherung von zusätzlichen Objekten von allen Seiten. So können beispielsweise biologische Proben in Kontakt gebracht werden, und anschließend die Bindungskraft zwischen beiden Objekten bei der Abstandstrennung detektiert werden.

In dieser Masterarbeit soll mit Hilfe der Optischen Pinzette eine neue Herangehensweise für die Aufklärung der Struktur und Bindungskräfte von Nukleinsäuren aus biologischer Sicht verdeutlicht

werden. Die Charakteristik des kraftinduzierten Schmelzprozesses der DNA wurde bereits im Jahr 2005 veröffentlicht {Bustamante 1994} {Rouzina 2001}. Nun stellt sich die Frage, ob verschiedene Temperaturen einen Einfluss auf die Charakteristik der Bindungskräfte der Basen besitzen und zu der Bindungskraft der RNA ein signifikanter Unterschied besteht. So wird zum einen die Bindungskraft der Segmente der Lambda-DNA (λ -DNA) unter dem Einfluss verschiedener Temperaturen untersucht und zum anderen soll die Bindungskraft der TMV-RNA beschrieben werden. Im Vordergrund der Untersuchung stehen der Faltungsprozess der RNA und die anschließende Assemblierung der Proteine bei der Formation von Viren. Bei der Formation des Tabakmosaikvirus (tobacco mosaic virus – TMV) stellt sich beispielsweise die Frage, ob sich die RNA entfaltet, bevor die Hüllproteine assembliert werden, oder ob die Initiation durch die Ausbildung einer Haarnadelstruktur bewerkstelligt wird und anschließend die Anlagerung der Hüllproteine erfolgt. Die Untersuchung der Aufbruch-Kinetiken von Nukleinsäurestrukturen kann uns somit einen kleinen Einblick in die Dynamik und Stabilität gewähren und möglicherweise Rückschlüsse auf enzymatische und regulatorische Prozesse erkennen.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Nucleinsäuren

Nucleinsäuren sind neben Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten eine weitere wichtige Gruppe der Biomoleküle. Sie sind aufgebaut aus Nucleotiden. Diese Makromoleküle bestehen jeweils aus einem Phosphatrest, einem Zucker und einer Base. Die Nucleinbasen sind hierbei an das Zuckermolekül verknüpft und die Zuckermoleküle untereinander durch Phosphodiesterbindungen zu einer polymeren Verbindung verknüpft. Die Nucleinsäuren werden auf Grund des Einfachzuckers unterteilt in DNA (Deoxyribonucleic acid) und RNA (Ribonucleic acid) und sind Träger der Erbinformation. Sie können je nach Organismus unterschiedlich lokalisiert sein. Die Erbinformation in Form von DNA ist in Eukaryoten beispielsweise im Zellkern lokalisiert, in Prokaryoten hingegen im Cytoplasma. In Viren ist die genetische Information in RNA oder DNA-Form möglich und umschlossen von einer Proteinhülle {Löffler 2007}.

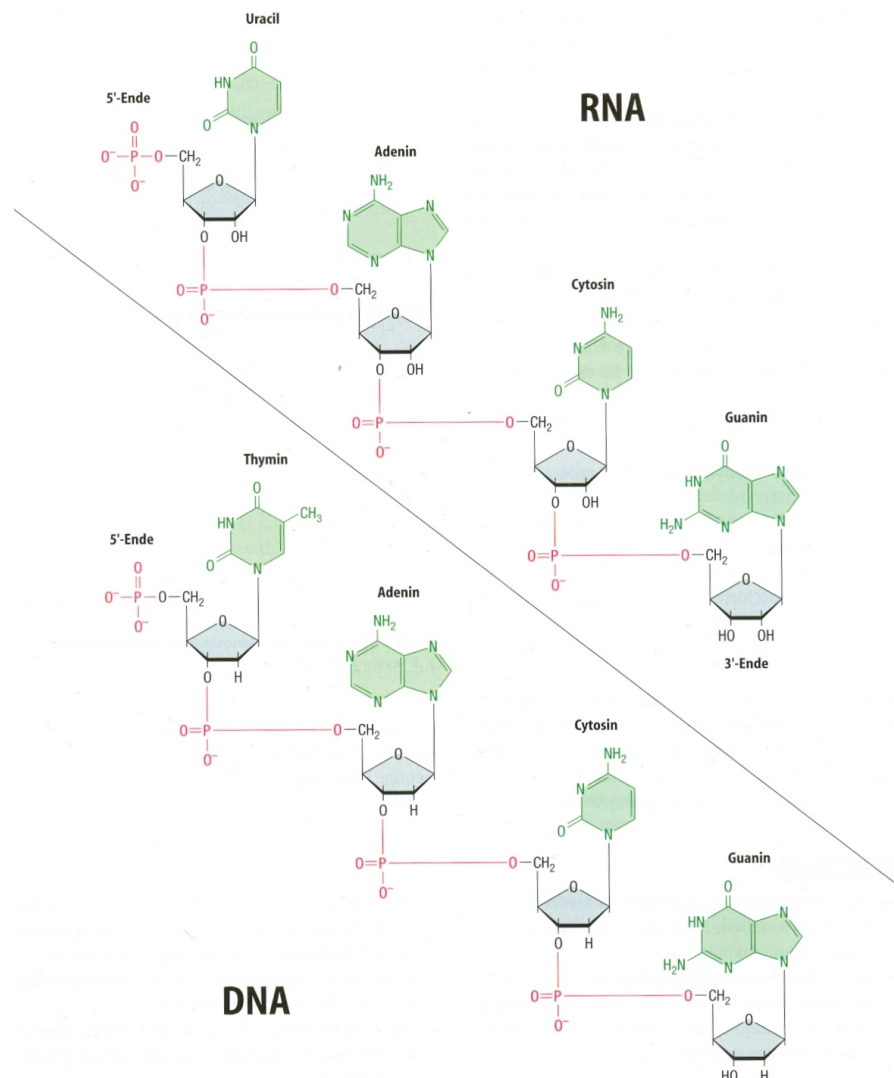


Abbildung 01 Primärstruktur der Nucleinsäure RNA und DNA. Die chemischen Strukturformeln zeigen jeweils die Basen Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin und Uracil als auch die Pentosen und die Verknüpfung über die Phosphosäureester. {Löffler 2007}

Die Genetische Information eines Organismus wird durch die Verwendung von heterozyklischen, stickstoffhaltigen Basen realisiert. Diese werden unterteilt in Purinbasen: Adenin (A) und Guanin (G) und Pyrimidinbasen: Cytosin (C) und Thymin (T). Der strukturelle Aufbau der Nucleinsäuren erfolgt nach folgender Konvention: Das 5'-Phosphatende wird an den Anfang des 3'-OH-Endes des Zuckers geschrieben, wobei die Purin- oder Pyrimidinbasen durch eine N-glycosidische Bindung an das C1-Atom des Einfachzuckers Pentose verknüpft sind. Die Mononukleotide werden durch eine Phosphodiesterbindung zwischen dem C3-Atom der einen Pentose und dem C5-Atom der nächsten Pentose verbunden. Der Aufbau der Polymerkette in 5' - 3' - Richtung gibt somit die Richtung der Gensequenz, die Grundlage der Proteinbiosynthese, vor. Der Aufbau der Primärstruktur ist in Abbildung 01 verdeutlicht. Kodiert wird ein Gen durch die Sequenz der vier Basen Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) und Adenin (A), wobei jeweils drei Basen in eine Aminosäure übersetzt werden. Aufgrund der Variation der Startbase zur Translation in eine Aminosäure sind drei Leseraster möglich. Durch die Komplementäre Basenpaarung des Doppelstrangs sind bei der DNA sechs Leseraster möglich. Die Proteinbiosynthese beinhaltet das „Abschreiben“ der Matrizen-DNA in RNA (Transkription) und die Translation der RNA in Aminosäuren (AS). Die Aminosäuren werden am Ribosomen untereinander mit einer Peptidbindung verkettet, die durch die Peptidyltransferase-Aktivität des Ribosomens katalysiert wird.

DNA

Im Jahr 1869 beschrieb Friedrich Miescher erstmals eine Substanz im Zellkern, die phosphorhaltig aber proteinfrei ist und nannte sie „nuclein“. 1893 veröffentlichte dann Albrecht Kossel erstmals die in Nucleinsäuren vorkommenden Basen und Zuckermoleküle {Löffler 2007}. Erst 1953 wurde das noch bis heute gültige Modell der DNA-Struktur vorgestellt, welches den Aufbau der Purin- und Pyrimidinbasen, Phosphatsäureester und des Einfachzuckers Desoxyribose auf Grund von Wasserstoffbrückenbindung und hydrophoben Wechselwirkungen beinhaltet. Dabei winden sich zwei helikale antiparallele Nucleotidstränge um eine gemeinsame Achse, bei der eine 3,3 nm lange Windung 10,4 Basenpaarungen beinhaltet. Die am häufigsten vorzufindende B-DNA-Form besitzt einen Durchmesser von 2,37 nm, eine große Furche (1-2 nm Breite) und eine kleine Furche (0,6 nm Breite). Die Struktur der B-DNA ist in Abbildung 02 gezeigt. Die Ausbildung der Furchen ist besonders wichtig bei der Bindung von Signalmolekülen oder DNA-Bindeproteinen. Hierbei wird zum einen die spezifische Bindesequenz exponiert und zum anderen funktionelle Gruppen zugänglich, die als Akzeptor oder Donor für Wasserstoffbrückenbindungen dienen.

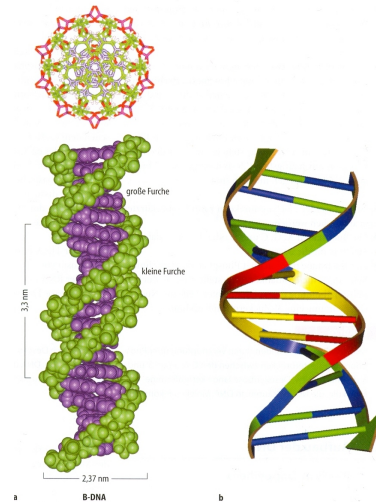


Abbildung 02 a) Atommodell der DNA-Doppelhelixstruktur im Querschnitt (oben) und seitlich gesehen (unten). Gezeigt ist hier die große und kleine Furche, als auch die Basen (violett) und das DNA-Rückgrat (grün). b) schematische Zeichnung, die die Richtung der DNA und die Drehung der DNA {Löffler 2007}.

Die Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin sind im Winkel von 36° zueinander angeordnet, zeigen in das Helix-Innere und sind durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden. Die Pentose und das Phosphosäureester sind nach außen gerichtet und formen das negative, stabile Rückgrat der DNA. Bei der Synthese eines Doppelstrangs bilden sich spezifische Watson-Crick-Basenpaarungen aus. Hierbei bindet jeweils eine Purinbase mit einer Pyrimidinbase: Adenin paart immer mit Thymin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Guanin paart immer mit Cytosin unter Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen. Die jeweils beteiligten Wasserstoff- und Stickstoffmoleküle sind in Abbildung 03 gezeigt.

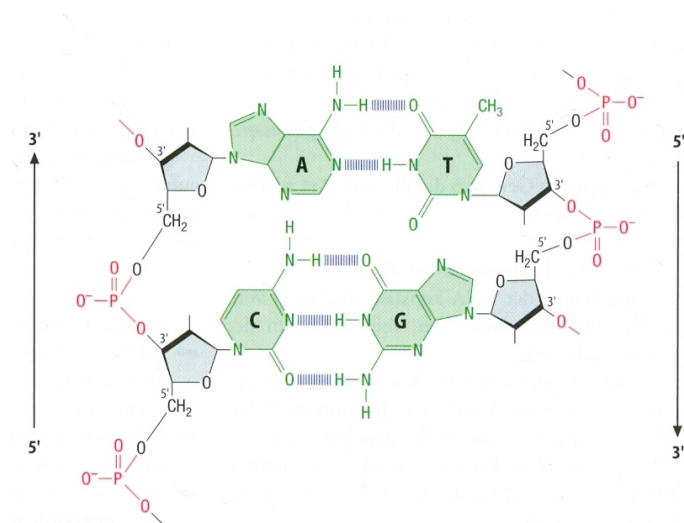


Abbildung 03 Struktur der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin (A) und Thymin (T), sowie Guanin (G) und Cytosin (C) {Löffler 2007}.

Auf Grund der spezifischen Basenpaarung ist der antiparallele Strang zum Matrizenstrang komplementär. Zusätzlich zu den Wasserstoffbrückenbindungen verstärken Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Aromaten die Stabilität der Doppelhelix.

RNA

RNA ist wie DNA ein Polynukleotid, welche biologische Informationen speichert, die in Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt abgerufen werden. Da die RNA das Äquivalent der Matrizen-DNA ist, besitzt sie einerseits kodierende Funktionen, z.B. für die Expression von Proteinen in Form von mRNA als Matrize für die Translation in Aminosäuren, andererseits sind in der Zelle auch RNA-Moleküle mit nicht-kodierenden Sequenzen enthalten. In Zellen ist verhältnismäßig mehr RNA als DNA enthalten, welches unter anderem auf die vielfältigen Funktionen der RNA zurückgeführt werden kann. Diese Moleküle stellen die verhältnismäßig größere Menge an Gesamt-RNA in der Zelle dar. Hier sind tRNA und ribosomale RNA (rRNA) Moleküle zu 80% an der Gesamtmenge beteiligt. Auf die Funktionen nicht-kodierender RNA wird im zweiten Abschnitt genauer eingegangen. In folgenden Abschnitt soll jedoch genauer auf die Struktur der RNA eingegangen werden, die vor allem bei der Kraftmessung untersucht wird.

Die RNA zeigt zwei wesentliche Unterschiede in ihrer Struktur im Gegensatz zur DNA auf:

Bei der Synthese der RNA wird nicht die Base Thymin transkribiert, sondern stattdessen Uracil: Thymin besitzt im Gegensatz zu Uracil eine Methylgruppe mehr. Wie in Abbildung 01 erkennbar ist, ist die Pentose eine Ribose mit 2 Hydroxylgruppen. Somit wird die Polynukleotidkette in ihrer Gesamtheit auf Grund der sterischen Hinderung der zweiten Hydroxylgruppe instabiler. Eine weitere indirekte Auswirkung übt die zweite OH-Gruppe auf die Phosphodiesterbindung aus, welches ein weiteres Instabilitätsmerkmal der RNA ist und dazu führt, dass die RNA vorwiegend einzelsträngig auftritt. RNA Moleküle sind im Durchschnitt nicht länger als 1000 bp, jedoch gibt es auch Viren, die ihre Erbinformation in Form von RNA übertragen und weitaus länger als 5000 bp sind. {Brown 2007}. Die RNA besitzt die Fähigkeit eine Sekundärstruktur auszubilden und somit die Polynukleotidkette zu stabilisieren. Die sekundären Strukturelemente enthalten nicht-Protein-kodierende Sequenzen, stellen jedoch auf Grund ihrer Struktur gebenden Eigenschaft eine unerlässliche Funktion bei der Proteinexpression dar. So sind sie beispielsweise Bestandteile von Ribosomen, Telomerasen, *signal recognition particles* (SPR) oder sind selbst aktiv an der Translation in Form von Transportern (tRNA) beteiligt. Die Sekundärstruktur der tRNA ist in Abbildung 04 dargestellt {Löffler 2007}.

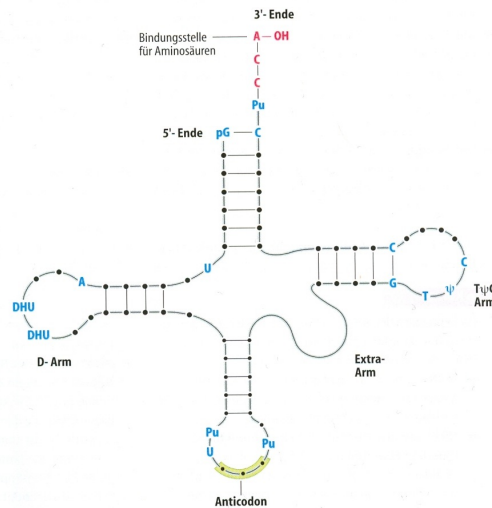


Abbildung 04 Sekundärstruktur der tRNA mit 3 Haarnadel-loops und der Bindungsstelle für Aminosäuren {Löffler 2007}.

Weiterhin können RNA-Moleküle als Katalysator fungieren, so z.B. in Ribosomen, indem sie an der Peptidbindungsknüpfung beteiligt sind. Nicht-kodierende RNA ist ebenfalls an Spleißvorgängen oder Regulierungsprozessen beteiligt. Moleküle mit diesen Funktionen sind meist nicht länger als 100 bp und sehr kurzlebig. Dies ist notwendig, damit die Zelle schnell auf einen Umwelt- oder Stressfaktor reagieren kann. Bisher bekannte variable kurze RNA-Moleküle in Eukaryoten sind beispielsweise:

Tabelle 1 Überblick über nicht-kodierende RNA in Eukaryoten {Brown 2007}.

Kurz-Bezeichnung	Name	Funktion	Besonderheit
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>	Beteiligt am Spleißprozess im Zellkern	Besonders reich Uridin-nucleotiden
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>	Transportieren rRNA zu Enzymen, an denen Modifizierung, z.B. Methylierung vorgenommen wird	
siRNA miRNA	<i>small interfering RNA</i> <i>mikro-RNA</i>	Regulation des Translationsprozesses, Abbau von Viraler RNA	21 – 28 bp

Die Kurzlebigkeit der RNA wird nicht nur durch die Instabilität der Moleküle bewirkt, sondern auch durch ubiquitär vorkommende RNA-abbauende Enzyme wie beispielsweise *Ribonucleasen (RNase)*. Die Restriktion von RNA kann intern geschehen mit den Ribonucleasen E (RNaseE) und III oder am 5'-Ende beginnend mit der Ribonuclease III. {Brown 2007}. RNaseE und die Polynucleotidphosphorylase (PNPase) liegen im sogenannten Multiproteinkomplex (Degradasomen) vor. Dieser RNA-abbauende

Proteinkomplex kann auf Grund seiner RNA-Bestandteile jedoch auch am RNA-Aufbau beteiligt sein. Ein Beispiel für eine Ribonuclease ist in Abbildung 05 dargestellt. Die Abbildung zeigt eine gut erforschte Nuclease, die an den meisten RNA-Molekül abbauenden Prozessen beteiligt ist.

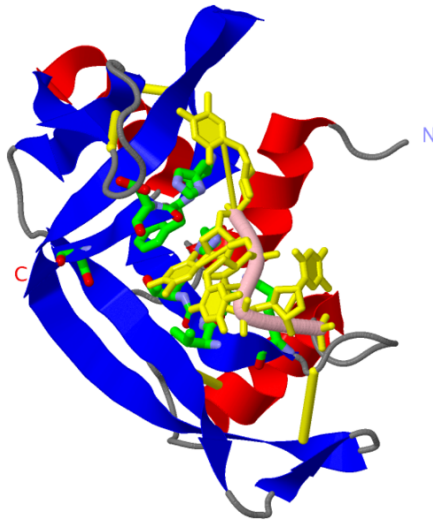


Abbildung 05 Schematische Darstellung der Ribonuclease A im Komplex mit einem Thymidic-acid-Tetramer {Watkins 2010}.

2.2. Optische Pinzette

Im Jahr 1971 beschrieb Ashkin {Ashkin 1970} erstmals eine Methode mit der es möglich war, durch eine gezielte Ausrichtung eines fokussierten Laserstrahls Objekte in der Schwebe zu halten (*optical levitation*). Die Grundlage des Fangens von Objekten mittels Licht basiert auf dem Impulsübertrag von Photonen auf eben diese Objekte, z.B. transparente Kügelchen. Sie besitzen eine höhere optische Brechzahl n als das umgebende Medium, sodass bei Brechung und Streuung des Lichts der Impuls von den Photonen teilweise auf die Kügelchen übertragen wird. Bei einem Gaußschem Strahlprofil eines stark fokussierten Laserstrahls wird das Objekt, bedingt durch den starken Gradienten des Lichtfeldes, zum Fokus hin beschleunigt und dort stabil gehalten. Somit ist es möglich, Kräfte im Bereich von 10^{-13} bis 10^{-9} N mit einer Ortsauflösung von bis zu 10^{-10} m zu detektieren.

2.2.1 Das Prinzip der Optischen Falle

Bei der optischen Falle wird die Wirkung eines TEM_{00} Nd:YAG-Laserstrahls ($\lambda = 1064$ nm) auf mikroskopische Partikel genutzt. Dieser Strahl zeigt ein gaußförmiges Intensitätsprofil, welches in Abbildung 06 schematisch aufgezeigt ist. Die Teilchen werden, unabhängig ob der Laserfokus etwas ober- oder unterhalb des Teilchens ist, entlang der optischen Laserachse zur Strahlmitte und in Strahlrichtung beschleunigt und können gegenüber anderen Objekten gezielt bewegt oder manipuliert werden. Die zu bewegenden Objekte müssen dafür durchlässig für die vom Laser emittierte Strahlung sein. Da eine Erhöhung der Laserleistung zu einer Überhitzung und dementsprechender Zerstörung der biologischen Proben führen können, sind nur Kräfte im pN-Bereich möglich, die durch Laserleistung der Größenordnung von wenigen Watt erzeugt werden.

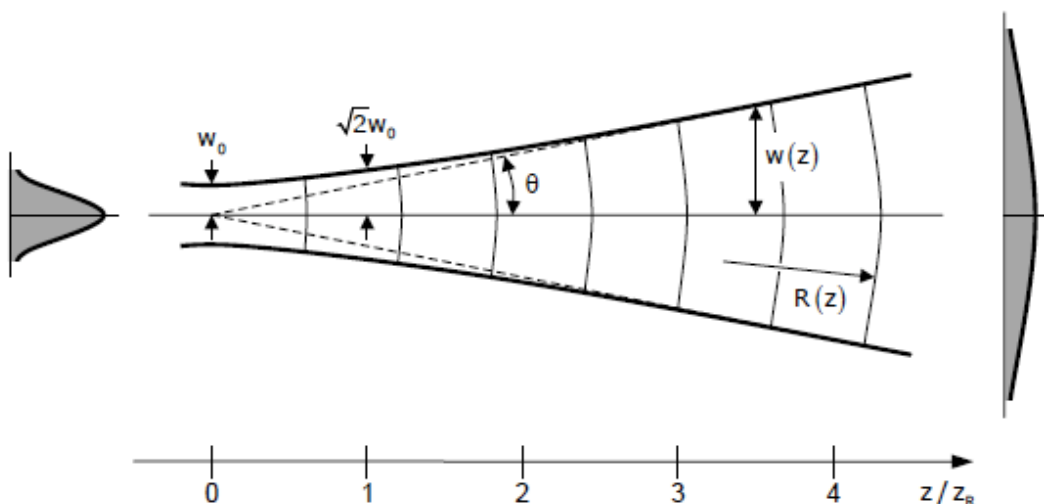


Abbildung 06 Darstellung eines Gaußschen Strahlprofils und der nötigen Parameter {Sischnka 2005}

Im Rahmen der Quantentheorie des Lichts, wird einem Lichtquant ein Impuls zugeordnet:

$$\mathbf{p} = \frac{h}{\lambda} = \frac{h\nu}{c} \quad \text{Formel I}$$

Durch Impulsänderung:

$$\Delta \vec{p} = \hbar * \Delta \vec{k} = \hbar (\vec{k}' - \vec{k}) \quad \text{Formel II}$$

Sobald das Photon an einem Teilchen gebrochen oder reflektiert wird, entsteht eine Kraft:

$$\vec{F} = \frac{\Delta \vec{p}}{\Delta t} \quad \text{Formel III}$$

Bei der Beschreibung der Kräfte einer Optischen Pinzette wird der Laserstrahl als geometrischer Lichtstrahl betrachtet, der sich geradlinig im homogenen Medium ausbreitet. Bei dem zu untersuchenden Teilchen wird eine perfekte Kugel angenommen, wobei Beugungserscheinungen nicht auftreten. Unter der Annahme der geometrische Strahlenoptik können Optische Kräfte auf Grund der Brechung von Lichtstrahlen an unterschiedlichen Medien verschiedener Brechungsindizes beschrieben werden {Beerlink 2006}. Die Teilchen besitzen einen Brechungsindex n_2 , welches einen größeren Wert besitzt als der Brechungsindex des umgebenden Mediums n_1 . Bei der Betrachtung des Übergangs eines Lichtstrahls vom Medium in ein Teilchen erfährt der Lichtstrahl auf Grund der auftretenden Reflexion und Brechung eine Impulsänderung, die eine Kraft F auf das Teilchen ausübt. Diese Kräfte lassen sich in Streu- und Gradientenkräfte unterteilen.

Die resultierende Kraft ist bei der Streukraft in Einfallrichtung des Laserstrahls gerichtet. Diese Kraft sollte möglichst minimiert werden, da die Teilchen durch die Reflexion des Lichts an Strahleintritt- und Strahlaustrittsfläche in Strahlrichtung beschleunigt werden.

Der Kraftanteil, der für das Fangen des Teilchens verantwortlich ist, wirkt entlang der Intensitätsgradienten in Richtung des Intensitätsmaximums. Dies ist die sogenannte Gradientenkraft, siehe 2.2.3 Fangen der Beads.

Um das Verhalten eines gefangenen Objektes in der Optischen Falle zu beschreiben, ist es unumgänglich auf die Brownsche Molekularbewegung einzugehen. Diese führt letztlich zu einer homogenen Verteilung von Teilchen in einer Suspension. Grundlage dafür ist die mittlere kinetische Energie E eines beweglichen Teilchens in einem System mit der Temperatur T nach der kinetischen Gastheorie:

$$E = \frac{3}{2} k_B T$$

Formel IV

Diese Energie bedingt eine ständig wechselnde und regellos thermische Translationsbewegung, die sogenannte Brownsche Molekularbewegung. Die mittlere Geschwindigkeit eines Teilchens unter Vernachlässigung der Rotationsenergie ergibt sich wie folgt:

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle$$

$$\bar{v} = \sqrt{\langle v^2 \rangle} = \sqrt{\frac{k_B T}{m}}$$

Formel V

Leichte Teilchen besitzen somit eine größere mittlere Geschwindigkeit als schwerere Teilchen. Dementsprechend führt die Brownsche Molekularbewegung bei einer inhomogenen Konzentrationsverteilung zu einem Konzentrationsausgleich. Somit erhält man nach einiger Zeit eine homogene Durchmischung des Präparates. Die Gleichverteilung der Teilchen, aus einem Nichtgleichgewicht auf Grund der Molekularbewegung, wird Diffusion genannt. {Ros 2008}

2.2.2 Das Worm-like-Chain (WLC) Modell

Makromoleküle in Lösungsmitteln bilden ein System, welches die größtmögliche Entropie annimmt. Somit fällt ein ausgestrecktes DNA-Molekül in Lösung zu einem Statistischen Knäuel zusammen, um seine Entropie zu maximieren {Ros 2008}. Das erneute Strecken, das Zusammendrücken oder Auseinanderziehen des Knäuels geschieht somit nur mit einem gewissen Energieaufwand. Der Grund dafür ist die thermische Bewegung der Lösungsmittelmoleküle, die beim Strecken der DNA stets entgegengesetzt wirkt. Für die Streckung der DNA wird die Entropie reduziert, was dazu führt, dass Arbeit an dem System verrichtet werden muss, damit die gewünschte End-End-Distanz des Moleküls erreicht wird {Sischa 2005}. Das Verhalten solcher Polymerknäuel durch entropische Kräfte wurde erstmals als Modell durch Flory im Jahr 1969 beschrieben {Flory 1969}:

Das *Freely Jointed Chain (FJC)*-Modell: Hierbei wird eine individuelle Kette aus unabhängigen, zufällig orientierten Kettensegmenten von gleich langen, starren Gliedern der Länge l_0 beschrieben, deren Bindungswinkel beliebig sein können, und die Massepunkte miteinander verbinden. {Sischa 2005}

Das *Freely Rotating Chain (FRC)*-Modell erweitert das FJC-Modell um die Beschreibung von bevorzugten, festen Bindungswinkeln, um die jedoch die Kettenglieder beliebig rotieren können {Sischa 2005}.

Das *Worm-like-Chain (WLC)*-Modell erweitert das FRC-Modell mit der Bedingung, dass die Länge der Glieder gegen 0 geht: $l_0 \rightarrow 0$. Dieses Modell ist für die Beschreibung von steifen Polymeren, wie der

DNA am besten geeignet. Auf die Beschreibung des Verhaltens eines Polymers mit Hilfe dieses Modells soll im nachfolgenden Abschnitt kurz eingegangen werden. {Sischa 2005}

Das Modell bedient sich zunächst noch der Annahme des FJC-Modells, bei der von N isotrop homogenen steifen Kettensegmenten der Länge s ausgegangen wird. 2 Segmente dieser sogenannten Markov-Kette sind unter einem bestimmten Winkel φ_i , miteinander verbunden. {Sischa 2005}

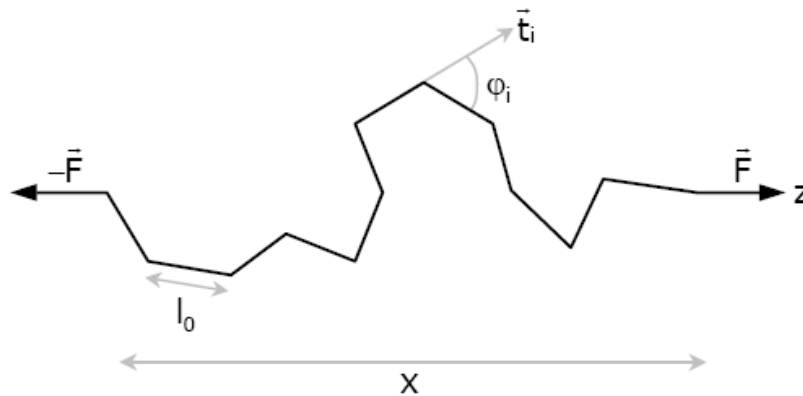


Abbildung 07 Darstellung des Kratky-Porod-Modell aus N Segmenten der Länge l_0 , dem Orientierungsvektor \vec{t}_i , dem Winkel φ , und der Richtung der externen Kraft F {Porod 1949} {Sischa 2005}

Die Herleitung der Gleichung für die Kraft, die auf das DNA-Molekül bei der Streckung mit der Optischen Pinzette wirkt, ist nachfolgend in den Formeln beschrieben.

Die Gesamtenergie im Modell wird aus der Summe aller einzelnen Biegeenergien zusammengesetzt:

$$E = -\frac{\kappa}{s} \sum_{i=2}^N \vec{t}_i \vec{t}_{i-1} = -\frac{\kappa}{s} \sum_{i=2}^N \cos(\varphi_i) \quad \text{Formel VI}$$

Die Winkelkorrelation ist eine Funktion der Segmentlänge:

$$\langle \vec{t}_i \vec{t}_j \rangle = \exp\left(-\frac{s|i-j|}{p}\right),$$

mit

$$p = \frac{\kappa}{k_B T} \quad \text{Formel VII}$$

Wobei p hierbei für die Persistenzlänge steht und κ die Biegesteifigkeit des Polymers charakterisiert. Je länger die Persistenzlänge des Polymers, desto steifer ist das Molekül. Der mittlere quadratische Abstand der beiden DNA-Enden voneinander wird folgendermaßen angegeben:

$$\langle \vec{x}^2 \rangle = \left(s \sum_{i=1}^N t_i \right)^2 \approx 2Nsp = 2L_0p \quad \text{Formel VIII}$$

Wirkt eine Kraft F auf das System ein, so wird die zu verrichtende Arbeit nach folgender Gleichung beschrieben:

$$W = -\vec{F} * \vec{x} = -F * s \sum_{i=1}^N t_{iz} = -F * s \sum_{i=1}^N \cos(\varphi_i) \quad \text{Formel IX}$$

Wird diese Gleichung zu Formel VI summiert, erhält man die Gesamtenergie, bei Krafteinwirkung auf das Polymerknäuel:

$$E_{Ges} = E + W = -\frac{\kappa}{s} \sum_{i=2}^N \cos(\theta_i) - F * s \sum_{i=1}^N \cos(\varphi_i) \quad \text{Formel X}$$

Beim Übergang der Kettensegmentlänge $s \rightarrow 0$ erhält man durch die Verwendung von unendlich kleinen Segmentlängen näherungsweise eine kontinuierliche Raumkurve $\vec{r}(l)$ mit dem Tangentenvektor:

$$\vec{t} = \frac{\partial \vec{r}}{\partial l} \quad \text{Formel XI}$$

Mit Hilfe dieser Gleichung eingesetzt in Formel X mit

$$\kappa = \frac{\partial \vec{t}}{\partial l} = \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial l^2}$$

erhält man:

$$E_{wLC} = \frac{p * k_B T}{2} \int_0^{L_0} \left(\frac{\partial \vec{t}}{\partial l} \right)^2 dl - F \int_0^{L_0} \cos \varphi_i(l) dl. \quad \text{Formel XII}$$

Wird eine maximale Streckung ausgeübt, so wird die seitliche Fluktuation immer geringer. Die seitlichen Fluktuationen können bei der Streckung in z-Richtung folgend beschrieben werden:

$$t_z = 1 - \frac{[t_x, t_y]^2}{2} + O\left([t_x, t_y]^4\right) \quad \text{mit } |\vec{t}| = 1 \quad \text{Formel XIII}$$

Nach Fouriertransformation von $[t_x, t_y]$ zu $\tilde{t}(\tilde{q})$ kann Formel XII neu beschrieben werden durch:

$$E_{wlc} = -k_B T * FL_0 + \frac{1}{2} \int \frac{p\tilde{q}^2 + F}{2\pi} |\tilde{t}|^2 d\tilde{q} \quad \text{Formel XIV}$$

Mit Formel XIII und

$$\langle [t_x, t_y]^2 \rangle = \frac{1}{2\pi} \int \langle |\tilde{t}(\tilde{q})|^2 \rangle d\tilde{q} = \frac{1}{\pi} \int \frac{1}{p\tilde{q}^2 + F} = \frac{1}{\sqrt{Fp}} \quad \text{Formel XV}$$

ergibt sich für die End-zu-End-Distanz in Relation zur Konturlänge:

$$\frac{x}{L_0} = \vec{tZ} = \mathbf{1} - \frac{\langle [t_x, t_y]^2 \rangle}{2} = \mathbf{1} - \frac{1}{\sqrt{4Fp}} \quad \text{Formel XVI}$$

Mit Formel XV kann somit die Kraft, die nötig ist ein Polymer mit der Konturlänge L_0 auf die End-zu-End-Distanz x zu bringen, nachfolgend formuliert werden:

$$F = \frac{k_B T}{p} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_0}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right] \quad \text{Formel XVII}$$

Mit Hilfe dieser Formel ist es möglich, die Kraft-Distanz-Kennlinie einer DNA-Streckversuchs vorherzusagen. Dieses enthält jedoch Gültigkeitsgrenzen: $x < L_0$.

Mit zunehmender Krafteinwirkung verlieren die Gleichungen des WLC-Modells ihre Gültigkeit. Bis zur Streckung der DNA zum charakteristischen Plateau bei $x \approx L_0$, kann das *extended worm-like-chain model* verwendet werden:

$$F = \frac{k_B T}{p} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_0}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} - \frac{F}{Y} \right] \quad \text{Formel XVIII}$$

Bei der Vorhersage der Kraft bei der End-zu-End-Streckung der DNA wird beim erweiterten WLC-Modell von einer bereits geringen Streckung der intramolekularen Bindungen ausgegangen. Diese Tatsache wird mit dem Young-Modul $\left(\frac{F}{Y}\right)$ in Formel XVIII eingebettet. Nach dem Kraftanstieg auf etwa 64 pN bei dsDNA stellt sich zunächst das charakteristische Plateau der Kurve ein, siehe Abbildung 8.

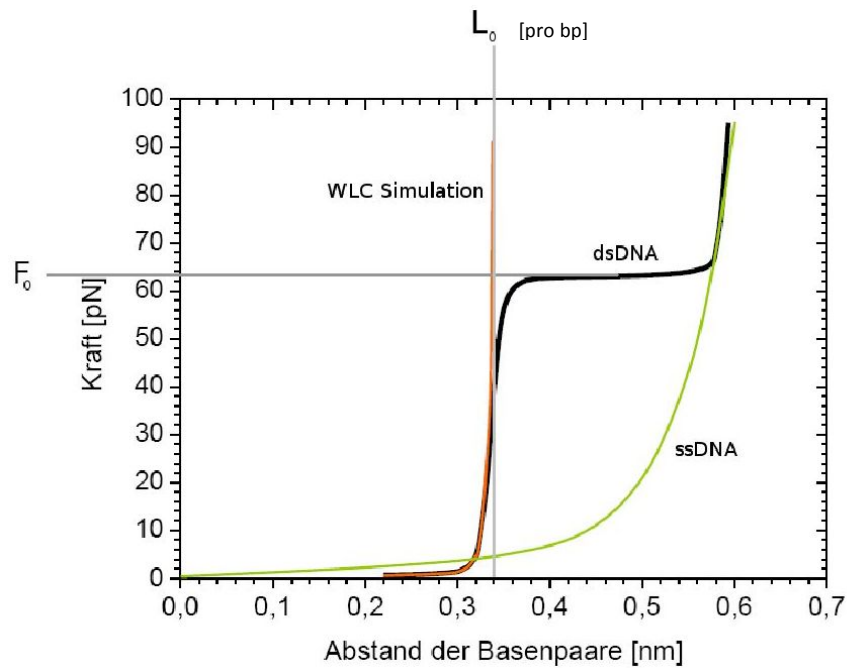


Abbildung 8 Beispielhafte Darstellung der Kraft-Distanzcurve beim Strecken dsDNA mit Erweiterung des WLC-Modells {Rouzina 2001}

Das Plateau liegt darin begründet, dass hier strukturelle Übergänge innerhalb des DNA-Moleküls stattfinden. Hier wird die DNA auf ca. 1,7 der Konturlänge L_0 gestreckt, ohne dass die Kraft F_0 merklich ansteigt. Nach Rouzina *et al.* wird bei der Expansion der DNA davon ausgegangen, dass ein kraftinduzierter Schmelzvorgang auftritt. Die DNA-Helix wird dementsprechend teilweise entspiralisiert und entwirrt, d.h. sie liegt beim Überstrecken nicht in einzelsträngiger Struktur vor. Es bilden sich auf Grund der Expansion nicht-helikale Domänen aus, in denen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aufgebrochen werden. Bei diesem Schmelzprozess kann der Abstand zwischen den Basen auf 80% ihres ursprünglichen Abstands (0,34 nm) gestreckt werden, sodass die DNA weiter entwunden wird und helikale Strukturen ausbildet. Somit sinkt die Steifigkeit des DNA-Moleküls und ermöglicht eine schnelle Hybridisierung bei der Relaxierung des Moleküls.

2.2.3 Fangen der Beads

In diesem Abschnitt soll das Fangen von Polystyrolkügelchen beschrieben werden. Ein Kügelchen mit einem Brechungsindex $n_{\text{Objekt}} > n_{\text{Medium}}$ befindet sich in der Strahltaile des fokussierten Strahls, jedoch räumlich neben der Optischen Achse. Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs ist in Abbildung 9 verdeutlicht.

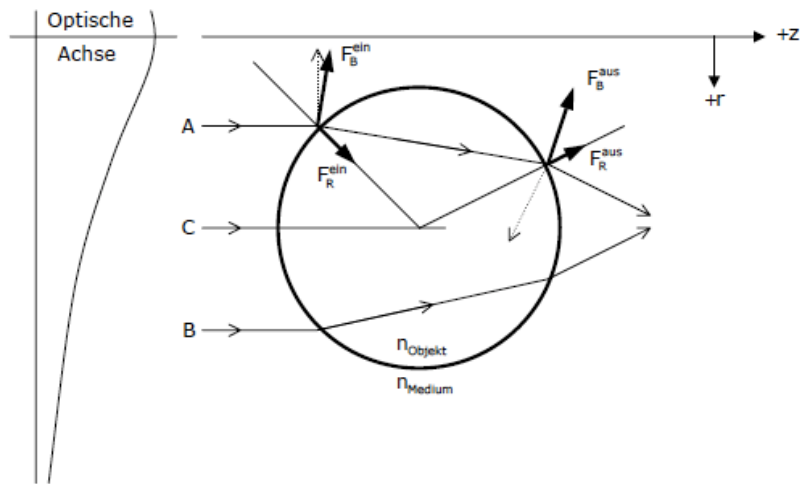


Abbildung 9 Schematische Darstellung der radialen Kraft {Sischka 2005}.

Hierbei wird Strahl A beim Eintritt und beim Austritt des Kügelchens zweimal gebrochen. Dies bewirkt auf Grund des zweiten Newtonschen Axioms einen Impulsübertrag. Durch die einwirkenden Kräfte erfährt das Kügelchen eine Beschleunigung, die der Kraft proportional ist und dessen Richtung besitzt. Somit wird zum einen bei der ersten Brechung des Lichtstrahls eine Kraft F_B^{ein} sowie die Kraft F_R^{ein} ausgeübt. Analog dazu werden die Kräfte F_B^{aus} und F_R^{aus} ausgeübt. Siehe hierfür Abbildung 9. Die Komponenten haben Kräfte in $+z$ Richtung, sodass das Kügelchen in die Richtung des Laserstrahls beschleunigt wird.

Beim vergleichsweise schwächeren Strahl B ergibt sich nicht nur eine Reflexionskraft in Richtung $+z$, sondern ebenfalls eine Brechungskraft, die das Kügelchen in Richtung $-r$ treibt.

Es ergeben sich somit 2 resultierende Nettokräfte. Die Streukräfte, die aus der Reflexionskraft resultieren, bewegen das Kügelchen in Richtung $+z$. Die zweite Kraft ist die Gradientenkraft, die aus der Richtung des Gradienten der Strahlungsintensität herrührt, beschleunigt das Kügelchen in $-r$ Richtung. Diese betragsmäßig größeren Kräfte bewirken das Ziehen des Kügelchens in Richtung der höchsten Lichtintensität. Dies schafft die Grundlage für eine zweidimensionale Optische Falle, welches ein Fallpotential in radiale Richtung darstellt.

Die nachfolgende Darstellung eines fokussierten Laserstrahls verdeutlicht das Beschleunigen des Kügelchens zum Fokus hin, wobei eine dreidimensionale Optische Falle erzeugt wird.

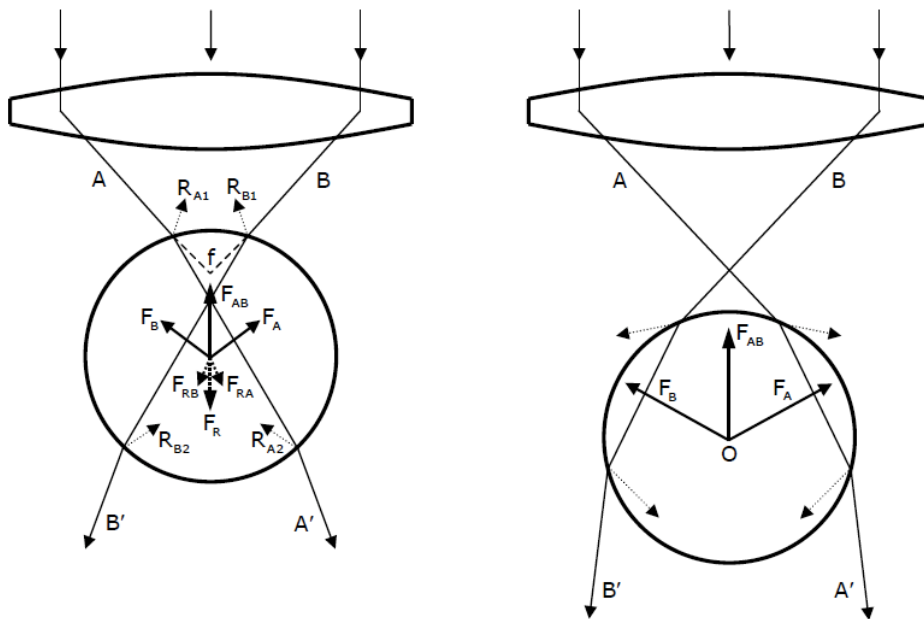


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Beschleunigungsrichtung des Kügelchens auf Grund der resultierenden Kräfte durch den Impulsübertrag {Sischa 2005}.

Die Strahlaufweitung im experimentellen Aufbau der Optischen Pinzette, siehe dazu 3.1. Experimenteller Aufbau der Optischen Pinzette, hat zusätzlichen Einfluss auf das Fangen der Polystyrolkügelchen in der Optischen Falle. Für das Erzeugen einer stabilen Falle sollte die gesamte Numerische Apertur von Laserstrahl ausgenutzt werden. Nur somit ist es möglich, dass ein genügend großer Konvergenzwinkel entsteht, da ein größerer Brechungswinkel zu einer höheren Gradientenkraft in z-Richtung führt. Würde der Laserstrahl hingegen sehr aufgeweitet werden, ergibt sich auf Grund des Gaußschen Strahlprofils zwar eine höhere Intensität der schwächeren Randstrahlen, jedoch würde die durch die Apertur eintretende Leistung verringert werden. Im Gegenzug ist bei einer zu geringen Strahlaufweitung davon auszugehen, dass bei den Randstrahlen kaum noch transmittierte Leistung erwartet werden kann. Ein guter Kompromiss kann durch die 1,5 fache Strahlausfüllung der Apertur erreicht werden.

2.3 *Nicotiana tabacum*

Die Zweikeimblättrige Pflanze *Nicotiana tabacum* gehört zur Familie der *Solanaceae* (Kartoffelfamilie). Sie ist eine blütenausbildende Gefäßpflanze (*Magnoliophyta*, *Tracheobionta*), die durch die Verteilung der Samen kultiviert wird (*Spermatophyta*) {PLANTS Profile}. Die einjährig-blühende Pflanze erreicht eine Höhe von 75 – 300 cm und ist an den Blättern behaart. Die wechselständigen, ganzrandigen Blätter sind aufrecht am Stängel angeordnet. Abbildung 12 zeigt die Anordnung der Primär- und Sekundärblätter der Virusresistenten Pflanzenart *Nicotiana tabacum vulgare U2*. Die rötliche, fünfzipfelige, bis zu 5,5 cm lange Blüten und die zugespitzte Kapseln, die den Samen enthalten, sind in Abbildung 11 erkennbar. {Rebmann 2007}



Abbildung 11 Blüte der *Nicotiana tabacum* {J.S. Peterson 05.09.2010}



Abbildung 12 Fotografie der für die Isolierung der Tabakmosaikviren verwendeten *Nicotiana tabacum vulgare U2*

2.4 Viren

Viren sind Infektionserreger, die ausschließlich aus Nukleinsäuren und Proteinen bestehen und gelegentlich von einer Membran umhüllt sind. Sie sind keine eigenständigen Lebewesen, da diese nach Definition einen eigenen Stoffwechsel besitzen, reizbar sind, und sich eigenständig vermehren. Viren hingegen leben parasitär und können sich nur in Wirtszellen vermehren. Sie dringen in die Zellen des Organismus ein und verwenden die Energie und Syntheseleistung der infizierten Zelle des Wirts für die Bildung ihrer Nachkommen. Ihr Genom kodiert meist nur für die Vermehrung wichtige Informationen. Viren werden nach der Art ihres Genoms, des Vorhandenseins einer Membranhülle und der Symmetriefform der Hüllproteinassamblierung (Capside) eingeteilt {Löffler 2007}.

Die am häufigsten vorkommenden Viren sind meist nur aus Capsiden oder Hüllproteinen aufgebaut, welche die entsprechende Nukleinsäure einschließen. Hierbei können die Informationen für die Bildung neuer Nachkommen in Form von RNA oder DNA gespeichert werden. Bei einigen Virusarten werden die Capside noch zusätzlich von einer Lipidschicht umschlossen, die als Membran Schutz bietet und Signalproteine für die Wechselwirkung mit der Wirtszelle einbettet. Dies findet man meistens bei Humanpathogenen Viren {Löffler 2007}. Die in dieser Arbeit untersuchte Virus-Art *tobacco mosaic virus* wird im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

2.5 Tobacco mosaic virus (TMV)

Infektion von Nachtschattengewächsen und Kreuzblütlern

Das Virus erhielt seinen Namen auf Grund der Infektion von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*). Jedoch kann das *tobacco mosaic virus* ebenfalls Tomaten und weitere Nachtschattengewächse oder Kreuzblütler infizieren. Die befallenen Blätter zeigen helle und dunkle Bereiche, die sich mosaikartig anordnen. Abbildung 13 zeigt ein infiziertes Primärblatt der *N. tabacum*. Ein weiteres Symptom, das den Befall der Pflanze durch TMV aufweist, ist rudimentäres Wachstum. Das Virus kann einerseits in gesunde Pflanzen durch eine kleine Verletzung, z.B. der Blatthaare, nach Blattkontakt einer infizierten Pflanze eintreten. Die Hauptverbreitung des Virus andererseits geschieht jedoch durch die Verbreitung von kontaminierten Nährlösungen. Hierbei geben infizierte Pflanzen die Viren durch die Ausscheidung von Nährlösung über die Wurzeln ab, die anschließend zur Ausbreitung im gesamten Bestand führt. Eine Verbreitung des Virus in einem Pflanzenbestand kann zusätzlich auch durch den Samen geschehen, oder durch Kulturmaßnahmen, d.h. bei der Anwendung von virushaltigen Pflanzenbestandteilen im Boden als Nährstofflieferant für neue Bestände {Butler 1984}.

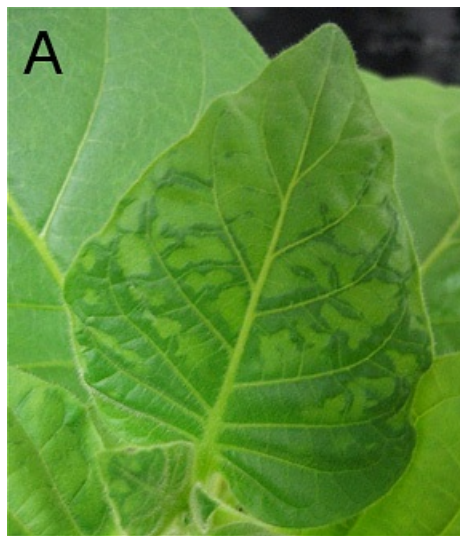


Abbildung 13 Infektion eines *N.tabacum* Blatts durch TMV {Scholthof 2004}.

Grundstruktur des TMV

Das *tobacco mosaic virus* ist ein stäbchenförmiges Virus mit einer Länge von 300 nm. Es besitzt einen Radius von ca. 10 nm, womit es schmäler ist als Ribosomen. Das Virus besitzt ein starres, stabförmiges Capsid, das aus über 1000 Molekülen eines einzigen Proteins zu einer Helix zusammengelagert wird und die einzelsträngige RNA (ssRNA) umhüllt. Die Untereinheiten sind zu einer einzelnen, rechtshändigen Helix arrangiert, weshalb es als helikales Virus bezeichnet wird. Eine Windung der Helix besteht aus $1\frac{1}{3}$ Untereinheiten und 49 Nukleotiden. Die RNA in der Helix interkaliert in die benachbarte Wendung

dieser Proteinhelix: drei Nukleotide binden ionisch in der Grube zwischen den einander folgenden Schichten der Proteinuntereinheit und ergeben einen Radius von 4 nm. Somit wird die Größe des Virus von der Größe der genomischen RNA bestimmt. Die Capside bestehen meist nur aus einem Hüllprotein, jedoch können an den Enden zusätzliche Partikel angelagert werden, die Funktionen bei der Assemblierung und bei der vektorialen Übertragung (Bindung an Rezeptor) übernehmen. Jedes Hüllprotein, welches sich zum Capsid zusammenlagert, besteht aus 158 Aminosäuren, welches einem Molekulargewicht von 17,5 kDa entspricht. Die außerordentliche Stabilität des Virus, welches bei 4°C für mehrere Jahre gelagert werden kann, beruht auf starken Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dies führt dazu, dass die stäbchenförmige Protein-Assemblierung stattfinden kann, selbst wenn keine RNA vorhanden ist. Eine zusätzliche Stabilität wird jedoch auch durch RNA-Protein-Wechselwirkungen erreicht, da die RNA in der Spalte bei der Umstrukturierung der Hüllproteine fixiert wird {Butler 1984}.

Genom des TMV

Die einzelsträngige RNA besitzt eine positive Polarität und umfasst ca. 6400 Nukleotide. Die Länge kann zwischen 6395 und 6398 Nukleotiden variieren und kodiert 4 Polypeptide. Jeweils ein Protein für die Transkription und eines für die Replikation, welche Molekulargewichte zwischen 126 – 183 kDa umfassen. Weiterhin kodiert das Genom ein 18 kDa Protein, für die Virushüllformation, und ein 30 kDa Protein, für die Zell-zu-Zell-Virusübertragung in infizierten Pflanzen. Die vier *Open-reading-frames* (ORFs) beginnen am 5'-Ende mit einem m⁷-Gppp-Cap (7 Methylguanositriphosphat 5' – 5' gebunden) gefolgt von 60 – 70 Nukleotiden untranslatierter Region (UTRs) {Zimmern 1975}. Der 3'-UTR kann sich auf Grund seiner Basenpaarungen zu einer tRNA-ähnlichen Struktur falten und gleichsam wie eine tRNA mit Histidin aminoacetyliert werden. Die Sekundärstrukturbildung am 3'-Ende kann somit als möglicher Assemblierungsstop gesehen werden, da sich die Proteine auch ohne RNA zu einer stäbchenförmigen Struktur zusammenlagern können. Die ersten beiden ORFs werden direkt von der viralen RNA translatiert, hierbei wird im Verhältnis von 10:1 das erste Protein im Vergleich zum Fusionsprotein aus ORF 1 und ORF 2 gebildet. Das Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 180-183 kDa übernimmt Translations- und Replikationsaufgaben: ORF 1 ist eine Methyltransferase und besitzt eine Helikasedomäne, durch ORF 2 erhält das Fusionsprotein eine Polymerasedomäne und ist somit unumgänglich im Replikaseprozess. Die nachfolgenden 2 ORFs (Transportprotein und Hüllprotein) werden zunächst zu genomischer mRNA transkribiert {Butler 1984}.

Neben den kodierenden Frames enthält die virale RNA wichtige strukturelle Bereiche, die zum Teil nicht translatiert werden, jedoch regulierende Funktionen besitzen:

Vor dem ersten Startcodon befinden sich auf der RNA Guanin-freie Bereiche, der sogenannte Ω -Bereich, der eine poly-CAA Sequenz beinhaltet und als Translationsverstärker fungiert.

Ein weiterer regulatorischer Bereich ist zwischen ORF 3 und ORF 4 gelegen. Dieser 3'-Bereich trägt auf Grund der Formung von drei Schleifen zur Initiierung der Stäbchenbildung bei. Dieser Bereich wird auch als origin of assembly (OA) angesehen, da Deletionen in diesem Bereich enorme Effekte auf die Größe

der Viruspartikel bewirken. Hierbei sind die dritte Schleife mit der Sequenz AACAAAG und die Länge des Stamms ungepaarter Basen von größter Bedeutung.

Im 3' untranslatierten Bereich der TMV-RNA liegt ein Bereich, der fünf sogenannte „pseudoknots“ ausbilden kann. Hier sind die letzten beiden aminoacetyliert und bilden eine tRNA ähnliche Sekundärstruktur aus. Diese Strukturen sind vermutlich an der Replikation beteiligt, da die drei vorgeschalteten pseudoknots mit einem 102 kDa Wirtspotein interagieren, dass den 5' – und 3' – Bereich einer viralen RNA zusammenbringt {Butler 1984} {Zimmern 1977}.

Assemblierungsprozess

Die Bildung neuer Viruspartikel untersuchte erstmals Butler & Klug 1971. Sie veröffentlichten ihre Ergebnisse, bei denen für den Zusammenbau neuer TMV-Partikel 20S-Aggregate des Hüllproteins (disks) notwendig sind {Butler 1971}. Diese bestehen aus 2 Ringen und werden von 17 Hüllproteinuntereinheiten gebildet. Sie interagieren spezifisch an die *origin of assembly* Sequenz, an der anschließend eine Konformationsänderung geschieht, die zur Bildung der Helix führt. Die ausgebildete Sekundärstruktur an der spezifischen origin of assembly Sequenz ist in Abbildung 14 dargestellt.

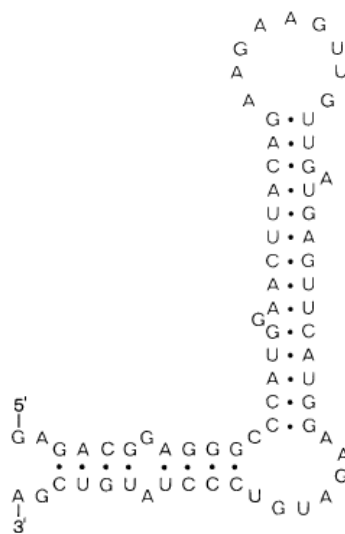


Abbildung 14 Nukleotidsequenz und die erwartete Ausbildung der Sekundärstruktur des *origin of assembly* der TMV RNA {Butler 1984}

Der zweite Proteinring dockt dann von oben an die erste *disk* an, während die RNA aus dem Zentralkanal mit beiden Enden heraushängt.

In 5'-Richtung werden weitere Proteinringe angefügt, sodass das 5'-Ende schrittweise durch den Zentralkanal an seine endgültige Position befördert wird. Erst wenn das 5'-Ende verpackt ist, erfolgt die schrittweise Verpackung des 3'-Endes. Diese Ergebnisse konnten nur durch in vitro Anwendungen erarbeitet werden, jedoch wird davon ausgegangen, dass dies durchaus auch physiologisch ist {Butler 1984}. Die Proteinassamblierung ist stark abhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke. Durham et al. untersuchten daraufhin die Häufigkeit der gefundenen TMV-Partikel. In Abbildung 15 sind die physiologischen Bedingungen und die verschiedenen Aggregate dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass

bei pH 7.0 und einer geringen Ionenstärke die 20S Proteinringe vorzufinden sind, und dies als optimale Assemblierungsumgebung angenommen wird. Ist der pH Wert zu sauer, ist nur eine einzelne Proteinhelix zu finden, ist der pH Wert hingegen zu basisch, sind kristalline Proteinringe zu finden, sowie eine limitierte Größe des Proteinringstapels.

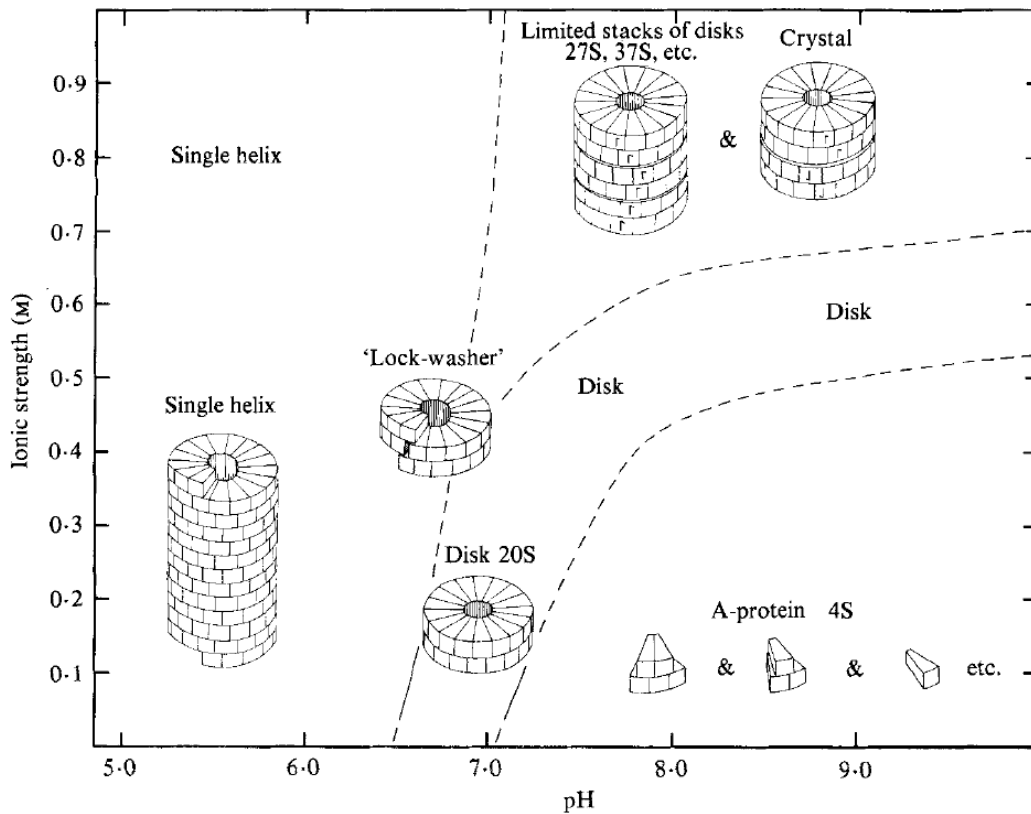


Abbildung 15 Darstellung des Assemblierungsprozesses des TMV bei verschiedenen pH- und Ionenstärke-Werten {Durham 1971}.

Bisher konnte noch nicht aufgeklärt werden, ob vorerst die RNA die Sekundärstruktur bildet und die RNA in den ersten Proteinring interagiert, oder ob der Proteinring mit der einzelsträngigen RNA reagiert und sich anschließend die Helix in die Proteinhüllringe einbettet. Mögliche Mechanismen der Initiation der Assemblierung sind in Abbildung 16 dargestellt.

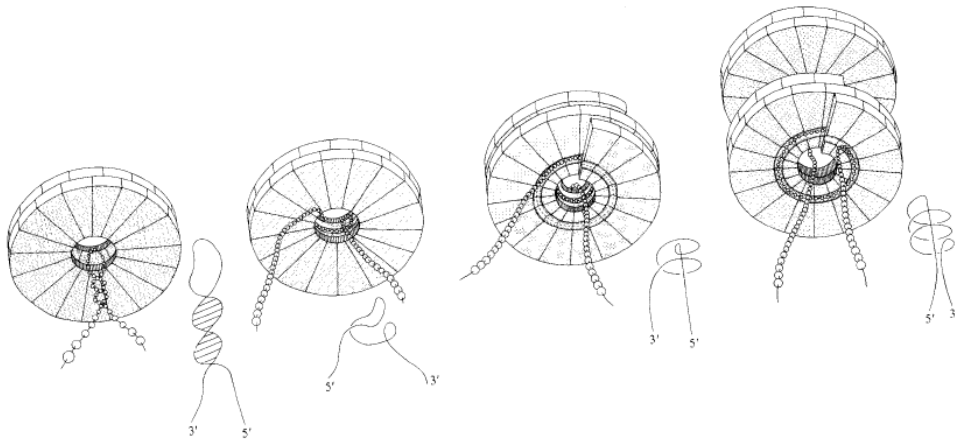


Abbildung 16 Mögliche Mechanismen der Proteinassemblierung zur Bildung neuer TMV Partikel {Butler 1984}.

Mit Hilfe der Optischen Pinzette könnte es nun möglich sein, die Bindungskräfte zur Ausbildung der Sekundärstruktur des origin of assembly zu erfassen. Sind diese bekannt, können die Proteinringe hinzugegeben und die Bindungsstudien mit der Ausbildung der Sekundärstruktur einer einzelnen RNA verglichen werden.

2.6. Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (AFM) ist eine in der Biophysik geeignete Methode zur Abbildung von Einzelmolekülen. Das Herzstück ist eine Messspitze aus Silizium oder Siliziumnitrid (Si_3N_4). Mit dieser ist es möglich Wechselwirkungskräfte an biologischen Oberflächen zu detektieren. Diese setzen sich aus repulsiven und attraktiven Beiträgen zu einer Gesamtgrößenordnung von 0,01 bis 100 nN zusammen. Dabei wirken der Kontakt der Spitze mit der Elektronenhülle abstoßend, Van-der-Waals-Wechselwirkungen oder Kapillarkräfte anziehend und Elektrostatische Wechselwirkungen anziehend oder abstoßend. Damit Kräfte in dieser Größenordnung messbar werden, wird die Spitze an einer mikroskopischen Blattfeder „cantilever“ fixiert. Der Cantilever besitzt eine niedrige Federkonstante ($k \approx 0,1 \text{ Nm}^{-1}$), so dass bei einer Kraftausübung auf die Spitze der Cantilever ausgelenkt wird. Auf der Spitze des Cantilevers ist ein Laser gerichtet, sodass bei einer Auslenkung der Winkel des reflektierten Laserstrahls geändert wird. Mit Hilfe eines positionsempfindlichen 2- oder 4- Quadranten-Photodetektors wird die Auslenkung durch eine Spannungsdifferenz zwischen den Quadranten registriert. Diese verläuft annähernd linear zur anliegenden Kraft. Die rasterförmige Bewegung der Spitze über die biologischen Oberflächen wird durch piezoelektrische Abstandshalter erreicht. Eine schematische Darstellung des Aufbaus der kraftmikroskopischen Abbildung von Probenoberflächen ist in Abbildung 17 dargestellt {Lottspeich 2009}.

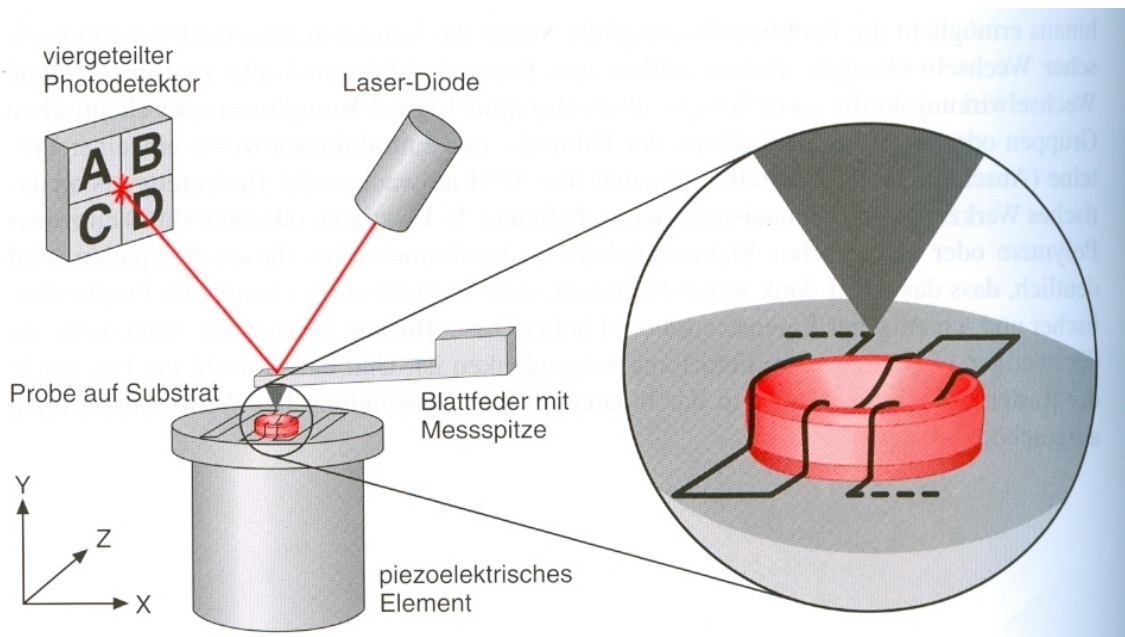


Abbildung 17 Schematische Darstellung des Rasterkraftmikroskops. {Lottspeich 2009}.

Es sind zwei verschiedene Messmodi möglich. Die bekannteste Variante ist der Kontaktmodus (*constant force contact mode*) bei der die Spitze in ständigem Kontakt mit der Probenoberfläche steht. Durch einen vom Benutzer vorgegebenen Wert für die Verbiegung der Blattfeder wird diese beim Abtasten konstant gehalten. Auf Grund der konstanten Kontaktkraft werden nun die Höhenunterschiede nachgeregelt und die Oberfläche und das Höhenprofil wiedergegeben. Bei der Untersuchung der Proben im Kontaktmodus können jedoch Lateralkräfte auftreten, die die weiche Oberfläche biologischer Proben

verformen könnte. Diese können durch den zweiten dynamischen Messmodus umgangen werden: der Tapping-Modus. Dabei wird der Cantilever in sinusförmige Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Die Spitze berührt die biologische Probe nur am unteren Ende jeder Schwingung, so dass die lateralen Wechselwirkungen minimal gehalten werden können. Das Höhenprofil der Probe ergibt sich dann aus der Regelung der Höhenposition, welche die Amplitude der Schwingung konstant hält{Lottspeich 2009}{Anselmetti 2000} {Raibel 2009}{Eckel 2003}.

3. Experimentelle Umsetzung und Probenbereitung

In diesem Kapitel wird im ersten Abschnitt auf die technische Umsetzung der Optischen Falle als Optische Pinzette eingegangen. Dabei stehen der experimentelle Aufbau und die Ausführung der Kraftmessung im Vordergrund.

Im zweiten Abschnitt soll dann genauer auf die Präparation der biologischen Proben eingegangen werden. Dieser Abschnitt beinhaltet zusätzlich die benötigten Chemikalien, Puffer und Geräte.

3.1. Experimenteller Aufbau der Optischen Pinzette

3.1.1 Realisierung der Optischen Falle

Die Basis der Optischen Pinzette stellt das inverse Mikroskop („Axiovert 200“ , Zeiss) dar. Das System steht auf einem schwingungsgedämpften Tisch („Optische Bank RP Reliance™ Scaled hole table top“, Newport). Die Photonenquelle der Firma Laser Quantum Manchester UK ist der diodengepumpte Nd:YAG Laser „ventus“. Dieser emittiert im cw-Betrieb mehr als 99% polarisiertes, infrarotes Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1064$ nm. Der Strahlquerschnitt $2w$ beträgt ca. 2 mm und die Strahldivergenz liegt bei $\theta = 1,3$ Bogenminuten. Der Strahlquerschnitt mit einem Gaußförmigen Intensitätsprofil ist in Abbildung 06 aufgezeigt. Hierbei entspricht der halbe Strahlquerschnitt w dem Abstand a von der optischen Achse, bei dem das elektromagnetische Feld nur noch den Betrag $1/e$ des Maximums entspricht. Für die passive Kühlung des Lasers wurde ein hohles Aluminiumgehäuse um die Laserquelle gebaut.

Der Laserstrahl wird durch 2 planare Umlenkspiegel, auf die Rückseite des Mikroskops zum Epifluoreszenzeingang gerichtet. Eine Verkleidung in der Umgebung des Laserstrahls verhindert störende Luftströmungen, welche den Laserstrahl nur um wenige Bogensekunden ablenken, jedoch starken Einfluss auf die Kraftmessung ausüben würden, siehe Abbildung 20 schwarzes Polyacryl-Gehäuse. Eine weitere kanalförmige Verkleidung am vorderen Kühlblock lenkt aufsteigende warme Luft vom Laserstrahl weg. Der Beamexpander, besteht aus 2 Sammellinsen, eine 2,5 fache Strahlaufweitung ca. 5 mm bewirkt. Der Strahl wird durch einen dichroitischen Spiegel, der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1064$ nm 96% reflektiert und 80% sichtbares Licht durchlässt, nach oben gelenkt. Er wird dann auf die rückwärtige Apertur des 60 fach Wasserimmersionsobjektiv („UPL-APO60W/IR“) mit einer Numerischen Apertur von 1,2 gelenkt.

Für Kraftmessungen ist es nötig, dass Objekte in der Falle in 2 Richtungen relativ zu einem fixierten Objekt in der Mikropipette bewegt werden können. Diese Bewegung von 120 μm in x- und y-Richtung sollte zusätzlich mit einer exakt definierten Geschwindigkeit ausgeführt werden. Dies wird mit Hilfe eines Piezotisches („PXY-101“, Piezosysteme Jena) realisiert. Dieser trägt den xy-Verstelltisch, der 5 mm

in x- sowie in y-Richtung manuell bewegbar ist. Das Steuern des Piezotisches geschieht durch einen Controller („d-drive“, Piezosysteme Jena), der über eine Schnittstelle mit einem Messrechner ausgelesen und bedient werden kann. Mechanische Schwingungen, ausgehend vom Laser, Mikroskop, Piezotisch oder Flüssigzelle sind vernachlässigbar. Die Spannungssignale und die Werte des Piezotisches werden mit Hilfe des erstellten LabView-Programms (National Instruments) verarbeitet [Sischa 2005].

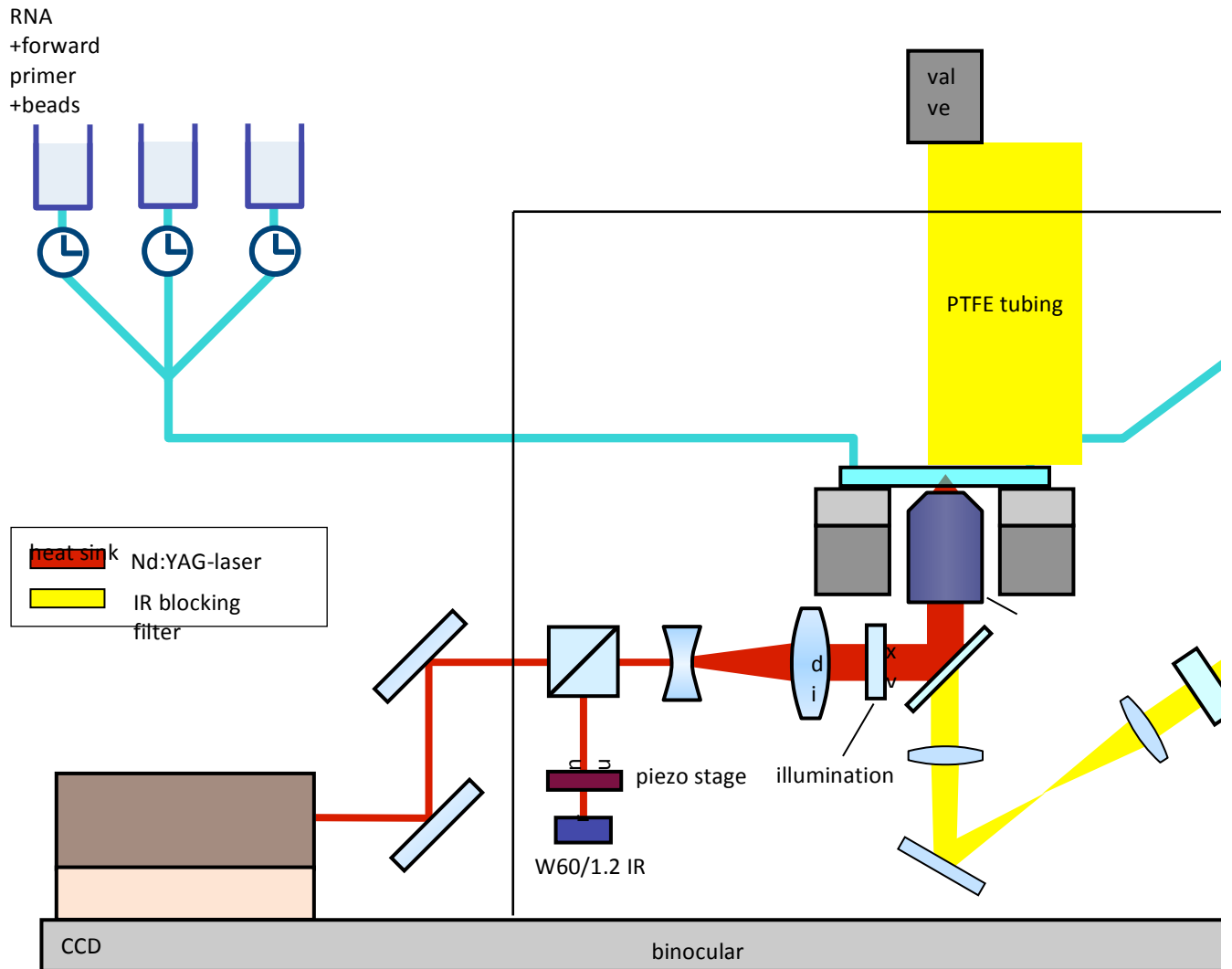


Abbildung 18 Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der Optischen Pinzette der Universität Bielefeld [Sischa 2005].

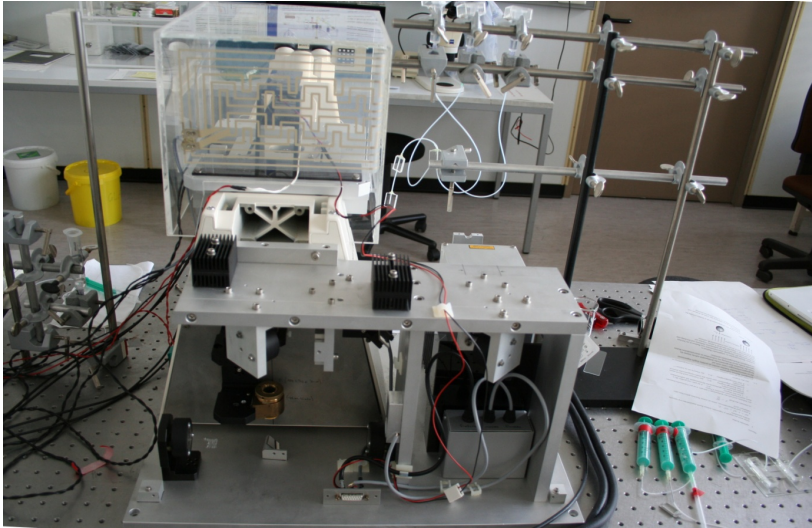


Abbildung 19 Photographie der Optischen Pinzette. Zu sehen ist der offene Strahlengang des Lasers zum Epifluoreszenzeingang des Mikroskops.

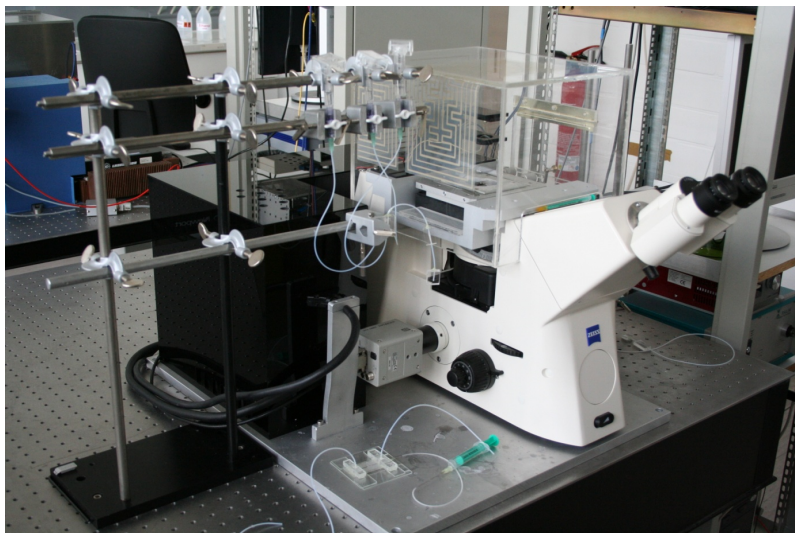


Abbildung 20 Photographie der Optischen Pinzette mit Flüssigkanalsystem, Mikroskop und Inkubationskammer.

Das Prinzip der Kraftmessung kann leicht durch die geometrische Strahlenoptik verdeutlicht werden. Die Kraftmessung beruht auf der reflektierten Kraft bzw. auf der Detektion des rückgestreuten Lichts. Der größte Teil der Strahlen tritt zwar nach „oben“ aus („vorwärts gestreutes Licht“), jedoch wird auch ein kleiner Anteil ($\approx 1\%$) zurückgestreut („rückwärts gestreutes Licht“). Beide Lichtanteile bilden auf Grund ihrer Position im Fokus charakteristische Strahlkegel. Wirkt anschließend eine Kraft auf die Kügelchen (dunkelgraue Schattierung in der rechten Schemazeichnung Abbildung 21), ist ein „Kippen“ des Strahlkegels erkenn- und detektierbar.

Die Detektion des veränderten Strahlkegels wird durch den Einbau einer Lambda-Viertel Platte und eines polarisierenden Strahlteilers (polarizing beam splitter, siehe Abbildung 18) möglich.

Die Lambda-Viertel Platte, die von der Strahlrichtung aus gesehen hinter dem Beamexpander eingebaut wurde, siehe Abbildung 18, besitzt die Aufgabe, linear polarisiertes Licht in zirkular polarisiertes Licht umzuwandeln. Das zurückgestreute Licht ist somit letztendlich vom Laserstrahl trennbar, da beide Strahlen vor der $\lambda/4$ zwar linear polarisiert sind, jedoch steht deren Polarisierungsebene nun senkrecht aufeinander. Die Separation erfolgt dann durch den polarisierenden Strahlteiler. Dieser Strahlteiler reflektiert das rückgestreute Licht in Richtung des Lineardetektors. Er besteht aus einer langen photoaktiven Fläche mit zwei Ausgängen. Trifft ein Strahlsignal auf einen Punkt auf dieser Fläche, wird ihm ein Positionswert entsprechend der Spannungsdifferenz an beiden Ausgängen zugeordnet. Der durch den photodiodenartigen Detektor ausgegebenen Spannungswert muss nachträglich nur noch mit einem Faktor multipliziert, so dass ein Kraft-pro-Spannungswert ausgegeben werden kann. Die Bestimmung des Faktors erfolgt durch die Kalibrierung des Lasers mit Hilfe des LabView-Programms und sollte für jede Messung neu erfasst werden.

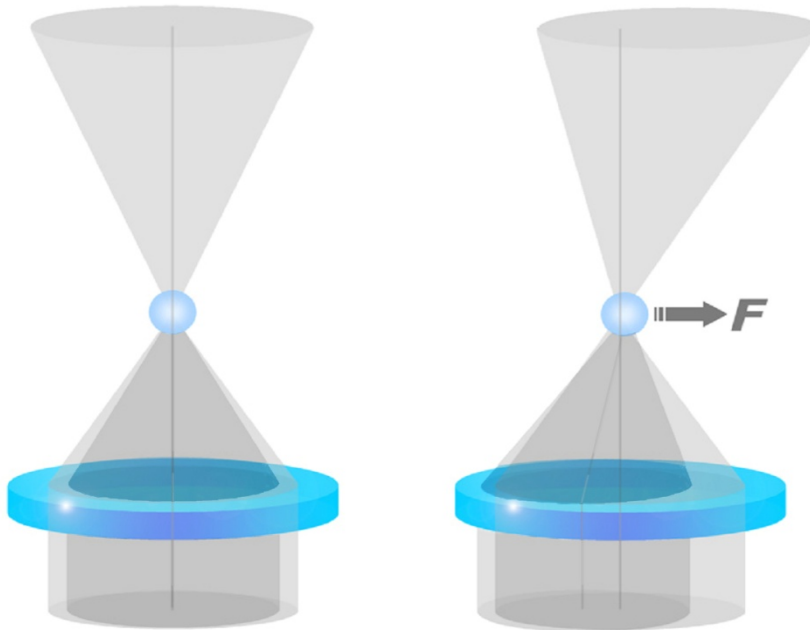


Abbildung 21 Schematische Darstellung der Winkelverschiebung des gestreuten Lichtkegels, wenn eine Kraft F anliegt {Sischka 2005}.

Vor der Kraftmessung findet eine Kalibrierung statt, bei der die zu wirkende Kraft über die Formel der Stokes'schen Reibung errechnet wird:

$$F = -6\pi * \eta * r * v$$

Formel XIX

Das Kügelchen wird im Laserfokus gefangen, der Flüssigkeitsstrom gestoppt und die Kraft auf den Wert null gesetzt. Anschließend werden durch die schnelle und kurze Verschiebung der Flüssigzelle

hydrodynamische Kräfte bekannter Größe durch die Piezo-Kristalle auf das Kügelchen ausgeübt. Der Faktor, der das Spannungssignal in ein Kraftsignal „übersetzt“, kann anschließend in das LabView Programm übertragen werden.

3.1.2 Bau der Flüssigzelle

Die Kraftmessungen finden in sogenannten Flüssigzellen statt. Sie gewährleisten die kontinuierlichen langsamen Strömungen, die für das Experiment unabdingbar sind. Eine schematische Zeichnung der Flüssigzelle ist in Abbildung 22 zu sehen. Die Basis der Flüssigzelle bilden zwei 0,14 mm dünne Deckgläschen (24 x 60 mm). Der *Parafilm*, eine Art Wachspapier, wird auf eine Größe von 60 x 20 mm mit einem Kanal der Größe 2 x 43 mm zugeschnitten. Das untere Deckgläschen wird mit zugeschnittenem Parafilm bedeckt und für die Adhäsion des Parafilms an das Deckgläschen kurzfristig bei 60°C erhitzt. Für die Fixierung von Polystyrolbeads werden Glaskapillaren mit einer Spitze von ca. 2-6 µm Durchmesser mit Hilfe eines Pipettenziehgeräts („*pipette puller model P-2000*“, *Sutter Instruments Co.*) gezogen. Diese Glaskapillare wird vorsichtig auf die erste Parafilmschicht gesetzt und anschließend mit dem zweiten zugeschnittenen Parafilm überdeckt. Das System schließt mit einem zweiten dünnen Deckgläschen ab, welches analog zum Kanal im Parafilm, zwei Bohrungen mit einem Durchmesser von ca. 1 mm enthält.

Anschließend wird die Konstruktion erhitzt und somit „fest verbacken“. Die Fixierung eines Polystyrolkügelchens an der Mikropipette übernimmt der Unterdruck, der in der Kapillare variiert werden kann. Dafür ist es nötig ein Glasröhrchen über die Mikropipette ausserhalb des Deckgläschensystems zu stülpen, und den Übergang mit Epoxidkleber zu verschlossen. Daran kann ein flexibler Silikonschlauch mit Spritze befestigt werden, sodass durch Änderung des Drucks in der Kapillare das Kügelchen befestigt (Unterdruck) oder gelöst (Überdruck) werden kann.

Das stabile Gerüst für das Deckgläschensystem bilden insgesamt vier Objektträger, die anschließend auf dem Mikroskop fixiert werden können.

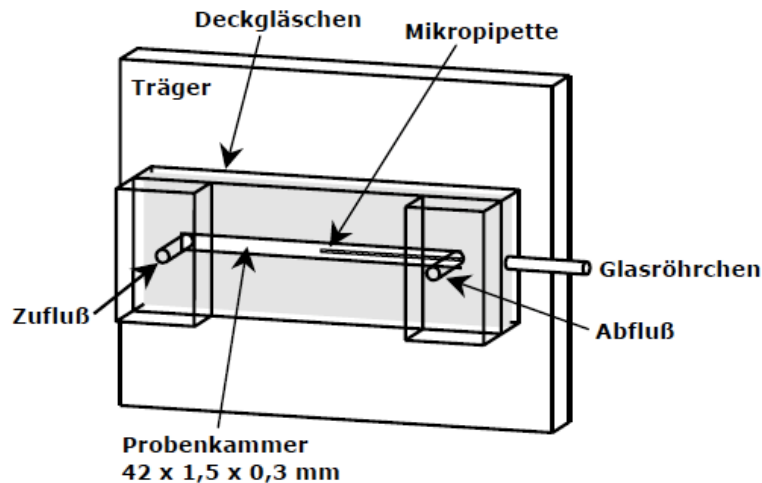


Abbildung 22 Schematische Darstellung des Aufbaus der Flüssigzelle (Sischa 2005).

3.1.3 Inkubationskammer

Für die Kraftmessungen der Nukleinsäuren wurde eine spezielle Inkubationskammer gebaut. Diese dient der Erwärmung der Umgebung der biologischen Proben auf gewünschte Temperaturen. Somit ist es möglich Kraftmessungen bei verschiedenen Temperaturen durchzuführen. Die Inkubationskammer ist ein halboffenes Polyacryl-System mit Heizelementen oberhalb des Objektivs.

Die Abmessungen der Inkubationskammer sind im Anhang in Abbildung 50 und Abbildung 51 dargestellt. Auf der rechten Seite der Inkubationskammer ist eine verschließbare Öffnung zur Bedienung der Stallelemente des Piezotisches eingebaut.

Die Heizelemente sind zum einen zwei selbstklebende Heizfolien (der Firma „thermo Flächenheizsysteme“), mit einer Größe von 320 mm x 137 mm und 35 W Leistung bei 12 V Betriebsspannung. Sie sind innenliegend an der Decke der Inkubationskammer befestigt, siehe Abbildung 20. Eine zweite Heizmanschette der Größe 20 x 110 mm und 5 W Leistung bei 12 V Betriebsspannung (der Firma „thermo Flächenheizsysteme“) ist um das Objektiv befestigt und soll die Temperatur in der Nähe der Optischen Falle in der Flüssigzelle beeinflussen.

Die Temperatur wird mit einem PI-Regler („ESM-4450 PID-/Prozessregler“ der Firma EMKO) über das dazugehörige Computerprogramm variiert.

In diesem Inkubationskammersystem sind Temperaturen zwischen 20°C und 40°C möglich und können konstant über einen längeren Zeitraum eingehalten werden.

3.2. Präparation der λ -DNA für Streckversuch bei verschiedenen Temperaturen

Für die Aufnahme von Kraft-Distanz-Kurven bei verschiedenen Temperaturen wird ein DNA-Molekül mit einer großen Anzahl an Basenpaaren benötigt. Hierfür eignet sich die DNA der Enterobakteria Phage λ . Die Bakteriophage gehört zur Klasse der Viren, die Bakterien infizieren. Auf Grund ihrer schnellen Kultivierung in *Escherichia coli* erlangte der Bakteriophage große Bedeutung in der Mikrobiologie. Die Sequenz umfasst 48502 Basenpaare und kann kommerziell bezogen werden. Für die Kraftmessung müssen beide Enden der linearisierten DNA immobilisiert werden. Dies wird durch die Hybridisierung von Primern mit Linker möglich oder durch den Einbau gelabelter Fragmente (sogenannter *nicks*) durch die Polymerase. Diese in dieser Arbeit verwendete Form des Nukleinsäurelabelings wird *Nick Translation* genannt. Geeignet ist hierfür die Verwendung der stabilen Bindung zwischen Streptavidin und Biotin. Es ist möglich, biotinylierte Nukleotide der Firma *Invitrogen* {Invitrogen™ Life technologies 2003} zu verwenden sowie Streptavidin-beschichteten-Polystyrolkugeln der Firma *Kisker*. Die Biotinylierung der λ -DNA ist im nachfolgenden Abschnitt detaillierter beschrieben.

Die DNA wird vorerst bei 50°C für 7 min denaturiert, sodass kein zirkuläres Molekül, sondern ein lineares Molekül mit überhängenden Enden (*steaky ends*) vorliegt, siehe dazu Sequenzbeispiel unten. Durch Zugabe von freien Nukleotiden werden die *sticky ends* wieder aufgefüllt. Mit Hilfe des *Klenow-Fragments* (Proteinfragmente der DNA-Polymerase der Firma *New England Biolabs*) ist es möglich modifizierte Nukleotide zu verwenden. Durch ein an Cytosin-gekoppeltes Biotin ist es möglich, die Endstücke der DNA stabil zu markieren. Nach 2 Stunden bei 37°C sollten alle freistehenden Enden durch die Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragments abgeschlossen sein.

Die Aufreinigung der biotinylierten DNA erfolgt mit Hilfe von spezifischen Säulen, z.B. der Firma *Qiagen* oder *Microcon-Zentrifugenröhrchen*.

```
1  gggcggcgac ctcgcggggtt ttcgctatct
      gcgcccaa aagcgataaa
  sticky ends
```

```
48491 cgacagggtta cg
      gctgtccaat gc cccgcccgtg ga
```

3.3 Viruspräparation

Für spätere Assemblierungsexperimente ist es nötig, die Viren aus einer Stammlösung zu verwenden. Dafür werden Virusresistente Pflanzen inokuliert und anschließend die Viren isoliert. Die biologische Präparation und die anschließende Hüllproteinisolierung sind in nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

3.3.1 Pflanzenanzucht und Inokulation

Die *Nicotiana tabacum* (Samsun N/N) Keimlinge der Gärtnerei der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld wurden nach acht bis zehn Tagen pikiert und anschließend bei Raumtemperatur kultiviert. Sobald die auf TMV systemisch reagierende Pflanze drei bis vier entwickelte Blätter aufweist, werden sie umgetopft und für die Inokulation verwendet. Nur die primär infizierten Blätter werden dabei für die Versuche verwendet.

Dazu werden die unteren kleinen Blätter der Pflanze entfernt und auf ein sich entwickelndes Blatt Glasstaub (Glasperlendurchmesser: 40 bis 70 μm) gegeben. Im Anschluss werden drei bis vier Tropfen der Virusstammlösung (*tobacco mosaic virus – vulgare U2* 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 10 mM Phosphatpuffer) auf die Blätter getropft und mit einem Glasspatel sanft verteilt. Danach muss das inokulierte Blatt unter fließendem Wasser abgespült werden. Der Virus benötigt für die Vermehrung circa 14 Tage bei Raumtemperatur, in dieser Zeit ist eine regelmäßige Wasserzuführung unabdingbar für das erfolgreiche entwickeln der Blätter der Pflanze. Die primär und sekundär infizierten Blätter werden im Anschluss für die Virusreinigung verwendet.

3.3.2 Virusreinigung

Die Viruspräparation beruht zum einen bei dieser Methode auf der Wasserlöslichkeit und zum anderen auf der Nicht-Sedimentierbarkeit des Virus bei niedrigen Umdrehungszahlen (g), sowie auf der Hitze- und Einfrierstabilität gegenüber anderen Pflanzenproteinen. Die Chloroformstabilität und die Sedimentierbarkeit in der Ultrazentrifuge bestimmen hierbei die nachfolgend aufgeführten Reinigungsschritte.

Die infizierten Tabakblätter werden von der Mittelrippe getrennt und gewogen. Bei der Homogenisierung im Fleischwolf wird schrittweise Extraktionspuffer A zugesetzt, bis ein Zehntel des Volumens des Blattmaterials erreicht ist. Die Suspension wird im Anschluss durch Gaze gefiltert und der Rückstand kurzfristig aufbewahrt. Nach der Zentrifugation bei 5311 g bei 4°C wird der Überstand in ein Sammelgefäß überführt und das Pellet mit dem Rückstand aus der Gaze-Filtration vereint. Das Homogenisieren der Suspension erfolgt mit ½ Volumen mit Extraktionspuffer A. Diese wird erneut zentrifugiert bei 5311 g und 4°C. Der Überstand wird anschließend im Wasserbad unter kontinuierlichem Schwenken auf 60 °C erwärmt (hierbei ist darauf zu achten dass die Suspension 60 °C

beträgt) und danach sofort auf Eis gekühlt. Die ausgeflockten Proteine werden bei 5311 g für 30 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird in ein Sammelgefäß überführt und das Pellet mit Extraktionspuffer A erneut resuspendiert und zentrifugiert. Der gesammelte Überstand wird anschließend in der Ultrazentrifuge für 90 min bei 70.000 g zentrifugiert und das Sediment in 2 ml Extraktionspuffer B über Nacht bei 4°C quellen gelassen. Die Suspension ist erneut in der Ultrazentrifuge für 90 min allerdings bei 100.000 g zu zentrifugieren. Das Pellet wird vorsichtig in 5 ml 20 mM Phosphatpuffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Ist die Suspension milchig trüb und dunkel gefärbt ist der Virus erfolgreich aufgereinigt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer kann Kapitel 8 entnommen werden.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch die Messung der Extinktion mit Hilfe eines Photometers durch nachfolgende Berechnungen:

C_{Protein} in mgx mL^{-1}	$E_{280} \times 0.810 \times \text{Verdünnung}$
C_{RNA} in mgx mL^{-1}	$E_{260} \times 0.400 \times \text{Verdünnung}$
C_{Virus} in mgx mL^{-1}	$E_{260} \times 0.365 \times \text{Verdünnung}$

3.4 RNA Transkription

Ausgangspunkt für die RNA-Synthese stellt das Plasmid T843TE35TMVR.1 dar, welches die gewünschte Sequenz für die Transkription enthält und zusätzlich die spezifische Sequenz für die erfolgreiche Bindung der T3 Polymerase. Dieses wird freundlicherweise von der Universität Stuttgart, Fakultät für Biologie – Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Frau Christina Wege und Herr Fabian Eber, zur Verfügung gestellt. Ein schematischer Überblick der Eigenschaften des Plasmids ist in Abbildung 23 dargestellt.

Für eine optimale Wiederholung der Versuche ist es notwendig, das Plasmid in ein bakterielles System zu injizieren, sodass unendlich viele Plasmide reproduzierbar isoliert und somit die Transkription etliche Male wiederholt werden kann. Für die Vervielfältigung der Plasmide werden diese mit Hilfe der chemischen Transformation in die *E.coli Mach1* Zellen gebracht und anschließend kultiviert. Nach der Anlegung der Glycerinkultur für die Stammhaltung können die Plasmide beliebig oft isoliert werden. Die Plasmidisolierung wird mit Hilfe des Plasmid Aufreinigungskits QIAprep Spin Miniprep Kit (Firma Qiagen) durchgeführt. Im Anschluss wird die Konzentration mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 (Firma PeqLab Biotechnologie GmbH) bestimmt. Die RNA Transkription bedingt die Restriktion des Plasmids an der Endsequenzstelle der gewünschten RNA mit Hilfe der Exonuclease BsiWI und einer anschließenden DNA Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Aufreinigung. Anschließend kann der Prozess des Umschreibens der DNA durch die T3 Polymerase in RNA erfolgen. Die bisher beschriebenen Schritte werden im folgenden Textabschnitt detailliert aufgeführt.

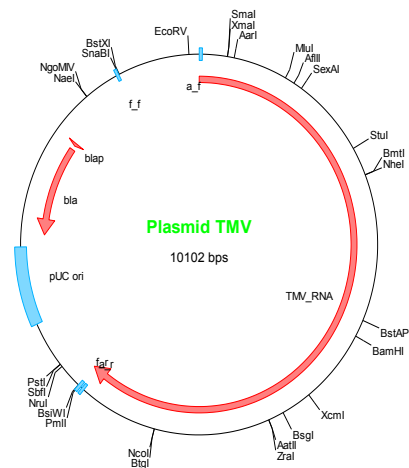


Abbildung 23 Schematischer Überblick über die Eigenschaften des Plasmids pTMV der Universität Stuttgart. Das Plasmid enthält die gewünschte TMV-Sequenz, den T3-Promoter für die Synthese der RNA, eine β -lactamase-Aktivität für die Selektion durch Ampicillin, sowie die Origin-of-Replication-Sequenz des Klonierungsvektors pUC {NCBI}.

3.4.1 Plasmidtransformation und Plasmidisolierung

Für eine erfolgreiche Plasmidtransformation ist es notwendig die Zellen chemisch kompetent vorzubereiten, da die Grundlage dafür die Endocytose, d.h. die Aufnahme von Makromolekülen über die Zellmembran, darstellt. Durch die Behandlung der Zellen mit Calciumchlorid und Tris-HCl adhären die

Plasmide an der Zellmembran und vereinfachen somit den Einschuss in die Zelle. Die gewünschten Bakterienstämme werden zuvor über Nacht bei 37°C kultiviert und anschließend in 250 ml SOC-Medium überimpft, so dass eine Absorption im Photometer bei OD₆₀₀ von 0.1-0.2 erreicht wird. Die Kultivierung der Zellen bei 37°C kann abgebrochen werden, sobald die Suspension eine Absorption von OD₆₀₀=0.8 erreicht hat. Anschließend werden die Zellen für 15 min auf Eis gekühlt und bei 4°C für 10 min bei 4000 g pelletiert. Das Pellet wird in 10 ml eisgekühlten Puffer 1 durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4°C für 10 min bei 4000 g wird das Pellet in Puffer 2 gelöst und anschließend zu 50 µl aliquotiert.

Die chemisch kompetenten Zellen (*Mach1*) werden für die Transformation auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Plasmid T843TE35TMVR.1 vereint. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die Konzentration nicht höher als 1 µg/µl ist. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis werden die Zellen für 60 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und sofort in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde können die Zellen nach einer sanften Pelletierung ausplattiert werden. Die Agarplatten werden mit Ampicillin gegossen, sodass eine Selektion der Klone durch das Antibiotikum gegeben ist. Die Kolonien, die sich bei der Übernachtskultur gebildet haben, werden in frisches Medium überführt und anschließend eine Glycerinkultur zur Stammhaltung angelegt. Dafür wird die Kultur, die mindestens eine Optische Dichte OD₆₀₀ von 1 aufweisen sollte, mit 99%-ige Glycerin versetzt. Die Aliquote werden mit Hilfe flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die *in vitro* Transkription der RNA ist es notwendig die Plasmide in einer möglichst reinen Form als Ausgangspunkt vorzulegen. Dafür werden die Plasmide mit der Komplettanwendung „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt und anschließend die Proteine und Restlösemittel entfernt. Eine hohe Konzentration an Plasmiden kann durch die Verwendung von 1-5 ml der Bakterienkultur erreicht werden. Das Pellet der Übernachtskultur wird in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 250 µl Puffer P2 sollte die Suspension möglichst schnell 4-6 malig invertiert und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wird nun vorsichtig in die Säule (spin column) dekantiert und mit 500 µl Puffer PE und nachfolgend 750 µl Puffer PE gewaschen. Der Überstand sollte möglichst vollständig entfernt werden, wobei eine nochmalige Zentrifugation für 1 min erforderlich ist. Die Säule wird anschließend in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 50 µl Puffer EB eluiert. Hierbei wird vor der einminütigen Zentrifugation eine Inkubationsdauer von 1 min eingefügt.

3.4.3 Vorbereitung des Vektors

Die Plasmide müssen im Anschluss *linearisiert* werden, so dass die T3-RNA-Polymerase nicht die vollständige Sequenz des Plasmids amplifiziert, sondern nur die gewünschte TMV-Sequenz. Dies wird

durch die *Restriktionsendonuclease BsiWI* realisiert, die zu 20 µg Plasmid-DNA bei einer anschließenden Inkubationsdauer von 12 Stunden bei 55°C zugegeben wird. Danach folgt die Aufreinigung der DNA nach folgender Vorschrift:

Die Enzyme werden nach Zugabe von 5 µl 0.5 M EDTA und 10 µl 3 M Natriumacetat und 230 µl Ethanol für 60 min bei -20°C gefällt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 µl H₂O resuspendiert und dient als Ausgangspunkt für die Proteinase-Behandlung. Hierbei wird zu der Lösung 2.5 µl 10% SDS sowie 2 µl ProteinaseK einer 5 mg/ml Stammlösung zugegeben und für 30 min bei 50°C inkubiert. Die Phenol-Chloroform-Behandlung beruht auf der Lösung von Proteinen und Rest-Zellbestandteilen in organischen Lösemitteln. Dafür wird der Probe nach der ProteinaseK-Behandlung vorerst 50 µl Phenol zugesetzt, invertiert und zentrifugiert. Die obere Phase enthält hierbei die RNA und wird anschließend mit 50 µl einer 25:24:1 Lösung aus Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol versetzt. Nach Durchmischen und erneuter Zentrifugation wird die Lösung zentrifugiert und die obere Phase mit 50 µl Chloroform versetzt, erneut gemischt und zentrifugiert. Die RNA in der oberen Phase wird mit 100 µl Ethanol bei -20°C für 60 min gefällt. Zusätzlich wird zu der Fällungsreaktion 5 µl EDTA und 10 µl Natriumacetat zugefügt. Nach der Fällung wird die Probe bei 4°C für 5 min bei 13.000 rpm pelletiert und in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.4.4 RNA-Synthese

Die Transkription der RNA erfolgt mit dem Fertigkit MEGAscript® T3 Polymerase (Firma Ambion – applied biosystems), welches die nötige T3-Polymerase, Puffer und NTPs enthält. Für die Transkription sollte die DNA-Anfangskonzentration ca. 1 µg betragen. Die Agenzien werden nach folgender Reihenfolge zugegeben:

20 µl H₂O

2 µl der jeweiligen NTPs

1 µg lineares Template

2 µl Enzym-Mix

Die Probe wird sorgfältig gemischt, kurz anzentrifugiert und anschließend für mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die verbleibende DNA wird im Anschluss mit der ebenfalls im Kit enthaltenen „Turbo“-DNAase degradiert und die Nukleinsäure mit 30 µl Lithiumchlorid bei -20°C über Nacht gefällt. Die nachfolgende Zentrifugation und Waschung der Probe mit 1 ml 70% Ethanol ist ausreichend für die Reinigung der RNA. Das Ethanol-gewaschene RNA-Pellet wird in 50 µl nuklease-freiem Wasser aufgenommen, die Konzentration bestimmt und zu 1 µg/µl aliquotiert. Die RNA-Probe kann bei -20°C für ca. 2-3 Monate gelagert werden. Eine längere Lagerung ist bei einer Temperatur von -80°C möglich.

3.4.5 Gelelektrophorese zur Größenkontrolle der RNA-Proben

Die Auftrennung einer RNA mit ausgeprägten Sekundärstrukturen kann in einem Formaldehydgel erfolgen. Die Aldehydgruppen binden an die primären Amine von Adenin, Guanin und Cytosin und bilden Schiff'sche Basen aus. Diese verhindern die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen und dementsprechend die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA. Die linearisierte RNA wandert im Agarosegel im elektrischen Feld somit negativ dekadisch logarithmisch zu ihrem Molekulargewicht. Ein Größenvergleich ermöglicht der in

Abbildung 52 gekennzeichnete *RNA Millennium Marker*[®] der Firma *Ambion Inc. – Applied Biosystem*.

Die Gelkammer und der Gelkamm sollten über Nacht mit 3%-igem H₂O₂ inkubiert werden. 0,3 g Agarose werden in 30 ml Reinstwasser gelöst und in der Mikrowelle erhitzt, bis keine Schlieren in der Lösung erkennbar sind. Nach der Auspolymerisierung wird das Gel mit 1% MOPS-Puffer übergossen und die RNA, sowie der Marker, in Stopplösung überführt. Die Stopplösung enthält 10x MOPS-Puffer, deionisiertes Formamid, 37%iges Formaldehyd und Bromphenolblau.

Die Proben werden für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt, bevor sie in die Probenkammern aufgetragen werden. Ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 10 V/ cm ist ausreichend. Nachfolgend wird das Gel mit 1%-igem Ethidiumbromid gefärbt, sodass die Nukleinsäurebanden im UV-Licht sichtbar werden.

3.4.6 Vorbereitung der RNA-Kraftmessung

Bei der RNA-Kraftmessung müssen beide Enden der RNA an Polystyrolkugeln gebunden werden. Es eignet sich hierfür die Hybridisierung von Primern an die einzelsträngige RNA. Die Primer sind 26-29 bp lang und sind am 3'-Ende mit einem Biotinmolekül versehen. Die Bindung der Primer an die TMV-RNA-Sequenz sind im nachfolgenden Abschnitt dargestellt:

```
3841 catttcattt ggagaggta tttttacaac aattaccaac aacaacaac acaaaacaac
    gtaaagtaaa cctctccat aaaaatggtg ttaatggtg ttggtggtg ttgtttggtg
        >>.....TMV-RNA.....>>
        >>.....FE-forward.....>>
```

.....

```
10031 tctagtcctg caacttgagc tagtcaagat gcataataaa taacggattg tgccgtaat
    agatcaggac gttgaactcg atcagttcta cgtattattt attgcctaac acaggcatta
    >>.....TMV-RNA.....>>
        >>.....FE-reverse.....>
```

```
10091 cacacgtggt gc
    gtgtgcacca cgcattg
    >...TMV-RNA...>>
```

Die Hybridisierungstemperatur für beide Primer ist bei 63°C bzw. 64°C und errechnet sich nach folgender Formel:

$$T_M = 81,5^\circ\text{C} + 0,041 * (\%GC - \text{Gehalt}) + 16,6 * \log \left[Na^+ - \frac{820}{\text{Länge}} \right] \quad \text{Formel XX}$$

Eine kurze Übersicht der verwendeten Primer ist in Tabelle 2 zusammengefasst

Tabelle 2 Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Primer

Eigenschaft	Primer FE_forward	Primer FE_reverse
Sequenz	GTACCGAGCTCGAATTTCGTCTCTCCC	GCACCACGTGTGATTACGGACACAATCCG
Modifizierung	3'-Biotin	3'-Biotin
Länge	26 bp	29 bp
Molekular- Gewicht	8293,1 kDa	9306,8 kDa
GC-Gehalt	58 %	55 %
Schmelz- temperatur	63 °C	64 °C

Die verwendeten Primer werden von der Firma *Invitrogen* synthetisiert. Mit Hilfe der nichtkovalenten Bindung der Biotin-Moleküle ist es möglich, die Moleküle stabil an Streptavidin-beschichteten Polystyrolkugeln der Firma *Kisker* zu binden. Die Polystyrolkugeln besitzen einen Durchmesser von 3,28 µm. Die Bindung der Kugeln an die Mikropipette und die Fixierung durch den Laserfokus sind in Abbildung 24 zu erkennen.

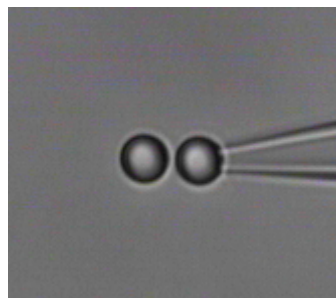


Abbildung 24 Fotografische Aufnahme der Fixierung zweier Polystyrolkugeln im Optischen Pinzetten System-

Die Vorbereitung der Kraftmessung beinhaltet dementsprechend die Bindung der Primer an die einzelsträngige RNA bei 64°C für 5 min im Thermocycler und die anschließende Zugabe der Polystyrolkugeln zur Ausbildung der nichtkovalenten Bindung zwischen Biotin und Streptavidin.

4. Ergebnisse

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden verschiedene Kraft-Distanzkurven der λ -DNA untersucht. Hierbei soll vor allem auf die Unterschiede der charakteristischen Expansionskurve der DNA bei verschiedenen Temperaturen eingegangen werden. Die Temperaturen bis 42°C werden mit der selbst-konstruierten Inkubationskammer realisiert.

Im zweiten Abschnitt sollen die Eigenschaften der RNA charakterisiert werden. Dazu wird die Sekundärstruktur der RNA mittels AFM untersucht und zusätzlich die Größe bestimmt. Weiterhin soll die Bindung der Biotin-Primer an die RNA untersucht werden.

Die Untersuchung der Kraft-Distanzkurven der RNA wird im letzten Abschnitt beschrieben. Eine Diskussion der Ergebnisse soll im Kapitel 4 erfolgen.

4.1. Kraft-Distanzkurven der DNA bei verschiedenen Temperaturen

Basis der Untersuchung einer Kraft-Distanzkurve stellt die 48502 bp lange λ -DNA dar. Sie besitzt eine Länge von 16,4 μm an deren Enden Biotinmoleküle verlinkt sind. (siehe 3.2. Präparation der λ -DNA für Streckversuch bei verschiedenen Temperaturen). Die präparierten DNA-Moleküle werden separat dem Versuchsaufbau zugeführt. Vorerst wird ein geringes Volumen der Polystyrolkugelchen-Suspension in die Flüssigzelle transportiert. Dies geschieht über ein Schlauchsystem durch hydrostatischen Druck. Ein Kugelchen wird im Laserfokus gefangen, zur Pipette bewegt und an der Mikropipette fixiert. Das Polystyrolkugelchen wird auf Grund des Unterdrucks durch Variation der Kunststoffspritze stabil gehalten. Zusätzlich wird ein zweites Kugelchen im Fokus gehalten und die biotinylierte λ -DNA im konstanten Fluss zugeführt. Das Polystyrolkugelchen erfährt auf Grund der Strömung eine konstante Kraft in Folge der Stokes'schen Reibung von 20 – 40 pN. Die Biotin-Streptavidin-Bindung kann sich in der langsamen Strömung ausbilden, sodass die Bindung eines längeren DNA-Moleküls als Kraftsprung im Signal erfasst wird, siehe Abbildung 25. Anschließend wird die Flüssigzelle mit Phosphatpuffer (10 mM) gespült ohne den Flüssigstrom zu unterbrechen. Dies könnte das Zurückschnellen der DNA zur Folge haben, bei dem das andere Ende der DNA ebenfalls an das Kugelchen im Fokus bindet.

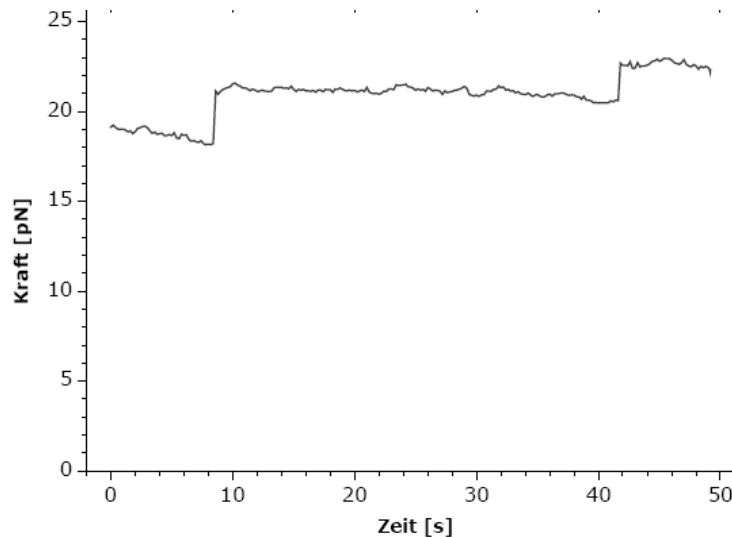


Abbildung 25 Auftragung des Kraftsignals pro Zeit bei der Ausbildung der Biotin-Streptavidin-Bindung von zwei DNA-Molekülen {Sischa 2005}.

Das zweite Ende der DNA wird optimal am Kügelchen an der Mikropipette „gegriffen“, wenn das zweite Kügelchen stromaufwärts dem Kügelchen im Fokus angenähert wird. Dabei stellt das Kügelchen an der Mikropipette ein Strömungshindernis dar, bei der die DNA eine geringe Kraft in Folge der geschwächten Strömung erfährt und dementsprechend nicht vollständig gestreckt ist. Wird der Abstand beider Kügelchen auf etwa 9 – 11 μm angenähert, ist die Wahrscheinlichkeit der Immobilisierung am größten. Anschließend wird die Pipette ein wenig in Stromrichtung bewegt, um die Bindung der DNA zu überprüfen. Ist ein Kraftanstieg bei ca. 13 – 14 μm detektierbar, war die Immobilisierung der DNA erfolgreich.

4.1.1 Ergebnisse der λ -DNA Messungen

In den nachfolgenden Diagrammen Abbildung 26 bis Abbildung 33 sind die Ergebnisse der λ -DNA Messungen dargestellt. Die Kraft-Distanzkurven der DNA in Phosphatpuffer (100 mM) sind unter Standardbedingungen mit der Optischen Pinzette aufgenommen. Der Piezotisch wird mit einer Geschwindigkeit von 1000 nm/s bei automatischen Messungen bewegt, sodass die DNA 1 μm pro Sekunde gestreckt wird. Bei allen Messungen wird die Kraft-Distanzkurve bis zum charakteristischen Plateau aufgenommen, um ein Überstrecken und Reißen der DNA zu verhindern. Bei unterschiedlich hohen und konstant gehaltenen Temperaturen konnte jeweils ein einzelnes DNA-Molekül getreckt und entspannt werden. Die Diagramme Abbildung 26 bis Abbildung 33 zeigen dementsprechend die Kraft-Distanz-Kurve des selbigen Moleküls bei den Temperaturen 21°C, 24°C, 37°C, 40°C, 42,5°C

Die λ -DNA-Expansion bei Raumtemperatur 21°C dient als Längennormal. Bei allen Kurven konnte der beginnende Kraftanstieg bei ca. 15 μm detektiert werden, sodass die Kraftkurven auf die entsprechende Länge normiert werden können. Der Abstand variiert auf Grund der Bindung der DNA zwischen den Polystyrolkügelchen, beispielsweise wenn das zweite Kügelchen seitlich gebunden hat. {Sischa 2005}

Der Fit der Kraft-Distanzkurve kann mit Hilfe der *Worm-like-Chain*- Formel:

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

durchgeführt werden. Das WLC-Modell kann nur bis zu einer Kraft von 10 pN angewendet werden, da es nur entropische Kräfte beschreibt. Die entsprechenden Auswertungen der Kontur- und Persistenzlänge werden mit Hilfe des Programms Origin 8.1G errechnet und sind in den nachfolgenden Diagrammen eingebettet. Die errechneten Persistenzlängen liegen bei allen Kraft-Distanzkurven unterhalb des erwarteten Wertebereichs von 40 – 50 nm {Wenner 2002}.

Das Plateau der charakteristischen Kraft-Distanz-Kurve liegt bei der Messung bei Raumtemperatur in dem theoretisch erwarteten Kraftbereich von 63 - 67 pN {Smith 1996}. Die berechnete Konturlänge beträgt 15,78 μm mit einer Persistenzlänge von 38 nm.

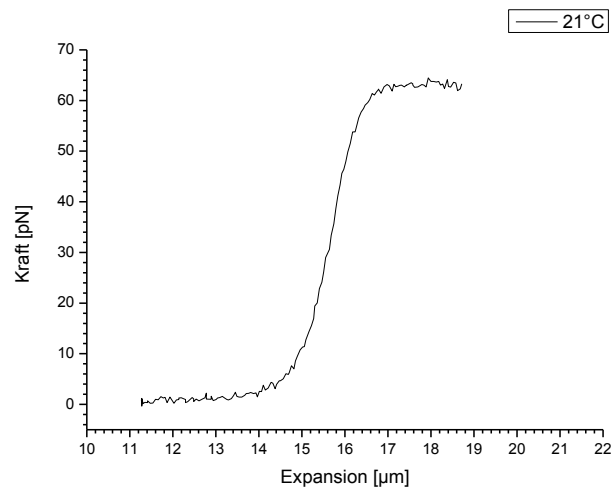


Abbildung 26 Kraft-Distanz-Kurve der λ -DNA bei Raumtemperatur (21°C.)

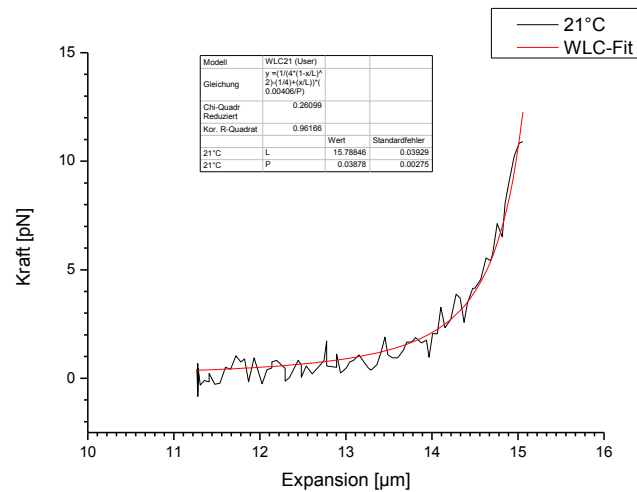


Abbildung 27 Kraft-Distanz-Kurve der λ -DNA bei 21°C und WLC-Angleich im Kraftbereich bis 10 pN.

Das Plateau der Kraft-Distanz-Kurve liegt bei 37°C bei 52 pN. Dies liegt bereits deutlich unterhalb des charakteristischen Plateaus der DNA-Expansion bei Raumtemperatur. Die berechnete Konturlänge beträgt 15,69 μm mit einer Persistenzlänge von 33 nm.

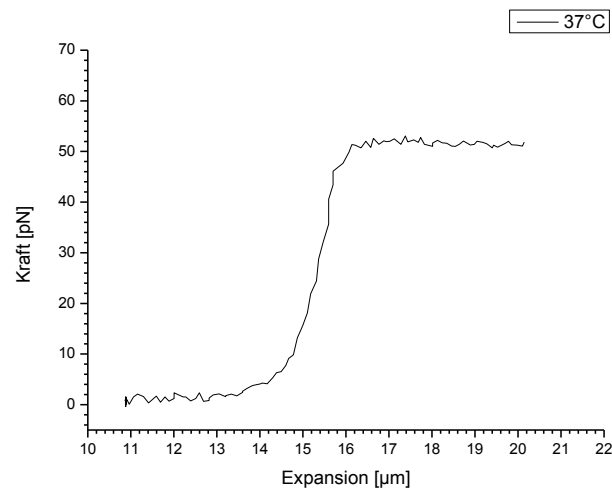


Abbildung 28 Kraft-Distanz-Kurve der λ -DNA bei 37°C.

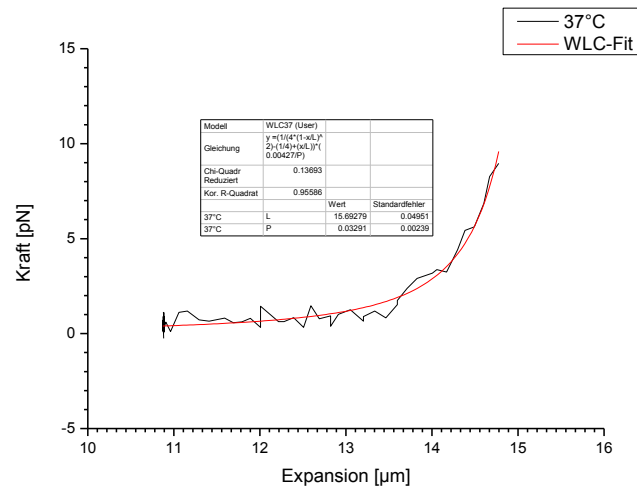


Abbildung 29 Kraft-Distanz-Kurve der λ -DNA bei 37°C und WLC-Angleich im Kraftbereich bis 10 pN.

Das Plateau der Kraft-Distanz-Kurve liegt bei 40°C bei 46 pN. Die berechnete Konturlänge beträgt 15,89 μ m mit einer Persistenzlänge von 25 nm.

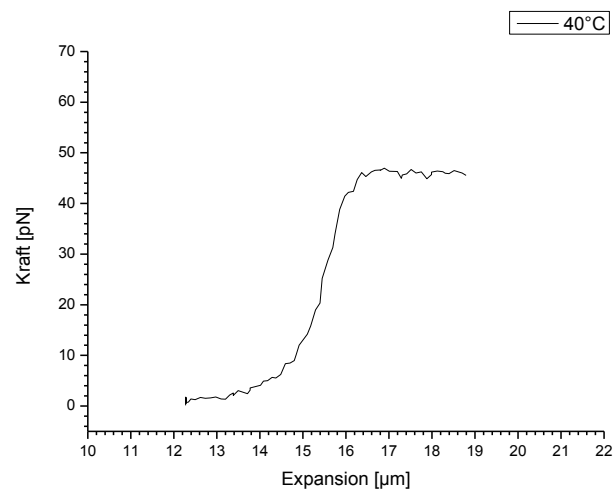


Abbildung 30 Kraft-Distanz-Kurve der λ -DNA bei 40°C.

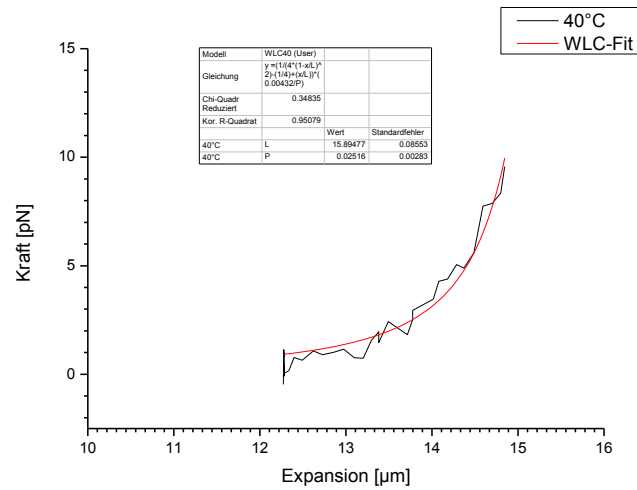


Abbildung 31 Kraft-Distanz-Kurve der λ -DNA bei 40°C und WLC-Angleich im Kraftbereich bis 10 pN.

Das Plateau der Kraft-Distanz-Kurve liegt bei 42,5°C nur noch im Kraftbereich von 40 - 42 pN. Mit steigender Temperatur sinkt dementsprechend die Kraft die für eine Basenpaar-Streckung nötig ist. Die berechnete Konturlänge beträgt 16,12 μm mit einer Persistenzlänge von 24 nm.

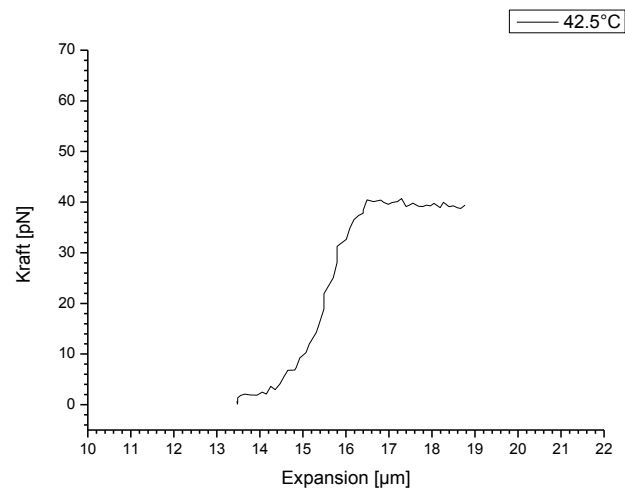


Abbildung 32 Kraft-Distanz-Kurve der λ -DNA bei 42,5°C.

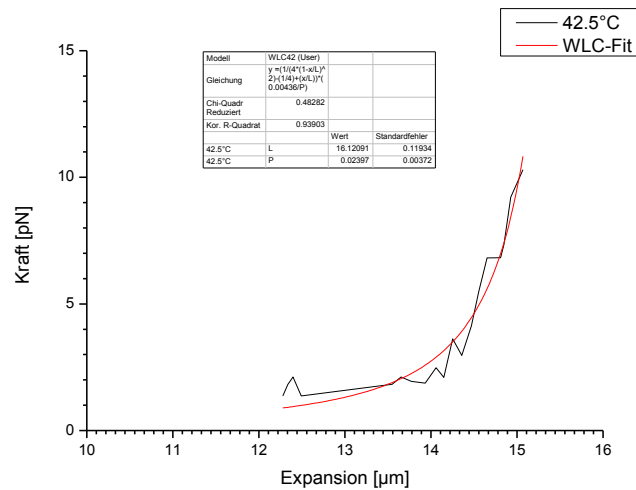


Abbildung 33 Kraft-Distanzkurve der λ -DNA bei 42,5°C und WLC-Angleich im Kraftbereich bis 10 pN

4.1.2 Kraft-Distanzkurve bei der Hysterese

Die Expansion der DNA über ihre Konturlänge hinaus, und somit der Übergang in die überstreckte Form, stellt einen theoretisch reversiblen Prozess dar. Jedoch können bei der Überstreckung der DNA Strangbrüche auftreten, welche die Auflösung der Basenpaarung zwischen den antiparallelen Strängen zur Folge hat. Im folgenden Abschnitt soll kurz auf den Prozess der Relaxierung der DNA eingegangen werden. Dabei wird das System der Hysterese charakterisiert, bei dem die Wirkung nach Wegfall der Ursache untersucht wird. Bei der Überstreckung der DNA ist es theoretisch möglich die Urform nach der Hybridisierung der Basenpaare wieder zu erlangen. Dazu wird das zweite Kügelchen wieder auf einen Abstand von 11 μm gebracht. Tritt Hysterese auf, so weisen die Relaxierungs- und Expansionskurven signifikante Unterschiede auf. Diese wird vorwiegend bei der Relaxierung überstreckter DNA-Moleküle registriert. In dieser Arbeit ist die λ -DNA nur bis zum charakteristischen Plateau gestreckt und anschließend relaxiert worden, wobei nur eine geringe Hysterese verzeichnet wurde. Bei 20°C verringert sich dabei die Kraft, die das Kügelchen aus dem Laserfokus zieht, dabei parallel zur Expansionskraft. Im Vergleich zum Expansionsweg, wird bei der Relaxierung die gleiche Kraft bei ca. 1,5 μm größerer Abstandsverringering erreicht, siehe hierfür Abbildung 34.

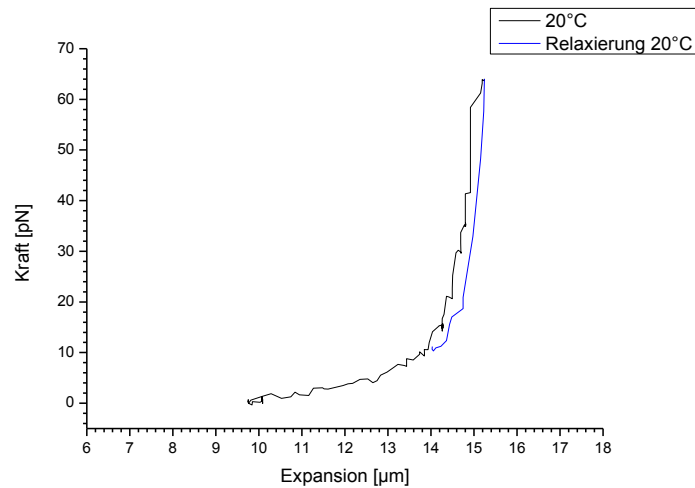


Abbildung 34 Kraft-Distanzkurve der λ -DNA bei 20°C mit Relaxierungsweg (blau gekennzeichnet).

Im Gegensatz zur Relaxierungskurve der λ -DNA bei 20°C, ist die Kraft-Distanzkurve bei Relaxierung bei 30°C annähernd identisch zur Expansion. Abbildung 35 zeigt den Hin- und Rückweg der DNA-Streckung bei 30°C. Im Bereich von 15,5 – 16 µm wird eine geringe Kraft bei entsprechendem Abstand registriert. Die Kraftkurve verläuft bei der Annäherung ab 15 µm jedoch nahezu identisch zur Expansionskurve.

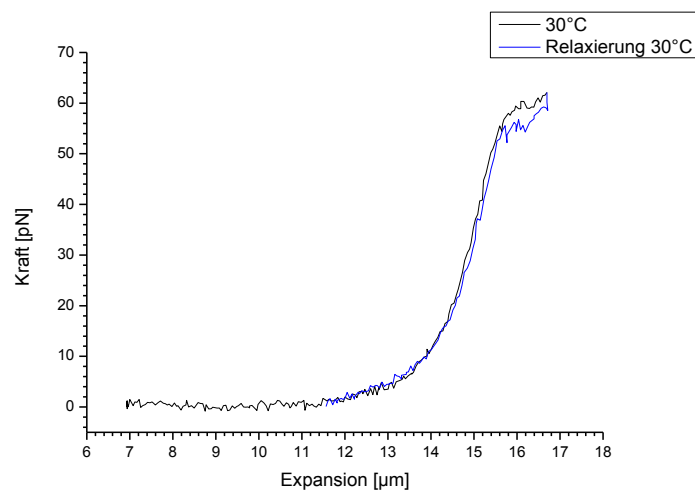


Abbildung 35 Kraft-Distanzkurve der λ -DNA bei 30°C mit Relaxierungsweg (blau gekennzeichnet).

4.2 Charakterisierung der RNA

Die RNA wird entsprechend der Vorschrift in Kapitel 2 synthetisiert. Auf Grund der geringen Stabilität der RNA von ein bis zwei Monaten, sollte die RNA im Vorfeld neu transkribiert und die Konzentration bestimmt werden. In der nachfolgenden Tabelle 3 sind die ermittelten Konzentrationen mittels Nanodrop tabellarisch aufgeführt. Die Konzentration wird auf Grund der Absorption bei 260 nm berechnet und in ng/μl angegeben. Proteinkonzentrationen können auf Grund der Absorption bei 280 nm berechnet werden. Die Verunreinigung durch Proteine kann durch das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm bestimmt werden. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

Tabelle 3 Übersicht über die Konzentration der transkribierten RNA.

Datum	Probe	Konzentration [ng/μl]	Verhältnis 260/280	Volumen [μl]
01.02.2010	1	1541,2	2,17	30
	2	1098,5	2,18	30
05.02.2010	1	171,6	2,09	75
	2	57,1	2,00	75
15.04.2010	1	2643,5	2,18	40
	2	4506,2	1,68	40
	3	4442,4	1,66	40
	4	3453,4	2,11	40
15.06.2010	1	227,4	2,15	50
	2	2103,0	2,20	50
27.07.2010	1	4470,5	1,61	50

4.2.1 Größenbestimmung der RNA

Die RNA des TMV ist nicht nur durch die generelle strukturelle Eigenschaft, d.h. die sterische Hinderung der zweiten Hydroxylgruppe an der Pentose, instabiler. Auch die Länge der einzelsträngigen RNA von ca. 8000 bp wirkt sich negativ auf die Stabilität aus. Aus diesen Gründen ist es bedeutend, die Größe der RNA vor jeder Messung zu überprüfen. Hierfür wird die Länge des Moleküls mit Hilfe eines Formaldehydgels im Vergleich zu einem speziellen RNA-Markern bestimmt. Dieser Marker (Abbildung 36 Spur I) enthält RNA-Fragmente definierter Länge, die auf Grund ihres Molekulargewichts im Agarosegel bei angelegter Spannung unterschiedlich weit wandern. Als Beispiel werden im Vergleich dazu Aliquote der transkribierten RNA vom 12.04.2010 Probe 1 und 4 in Abbildung 36 in den Spuren II und III aufgetragen. Unter UV-Beleuchtung bei 254 nm sind die Fragmente durch die Interkalierung des Ethidiumbromids in der unteren Abbildung deutlich zu erkennen. In den Spuren II und III deutlichen Banden unterhalb der 9000 bp Markerbande erkennbar. Dies entspricht der erwarteten theoretischen Größe von 7000 bp der transkribierten TMV-RNA. Da keine weiteren Banden in den Spuren feststellbar

sind, kann davon ausgegangen werden, dass die RNA zu diesem Zeitpunkt noch nicht fragmentiert ist. Anschließend kann die RNA für weiterführende Messungen genutzt werden.

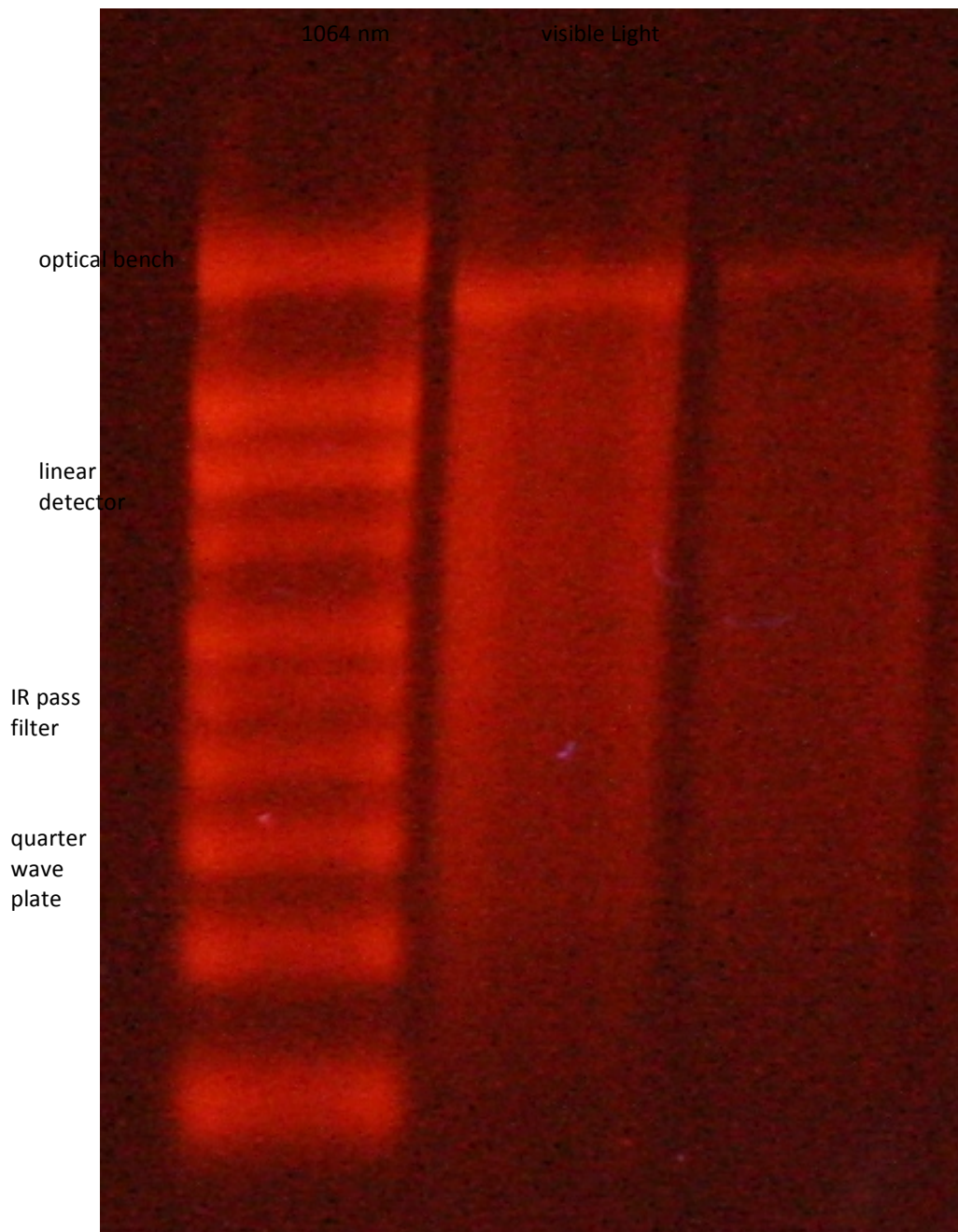


Abbildung 36 Agarosegel zur Größenbestimmung der RNA.
Bande I: RNAMillenniumMarker® der Firma Ambion Inc. – Applied Biosystems;
Bande II: transkribierte RNA vom 12.04.2010 Nr. 1,
Bande III: transkribierte RNA vom 12.04.2010 Nr. 2

4.2.2 Ermittlung der Sekundärstruktur der RNA

Die zweidimensionale Struktur der RNA kann mit Hilfe der Rasterkraftspektroskopie (AFM) ermittelt werden. Im Vorfeld kann die erwartete Ausbildung der Sekundärstruktur berechnet werden und anschließend mit der AFM-Abbildung verglichen werden. Die Arbeitsgruppen um Hofacker behandelten dieses Thema und konstruierten das Open-Source-Programm *ViennaRNA* für die erwartete Faltung der

RNA. Dafür wird die 7036 bp lange Sequenz der TMV-RNA in das Programm eingelesen. Mögliche RNA Strukturelemente sind:

- a) Haarnadelstruktur b) Ausbuchtungen (Bulge) c) Interne Schleifen
 d) 3-Wege-Verknüpfung e) n-Wege-Verknüpfungen f) Pseudoknoten

Sie sind genauer in den Darstellungen Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt.

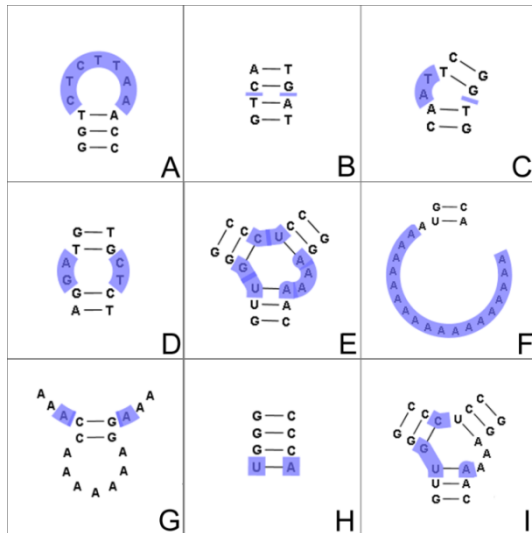


Abbildung 37 Schematische Darstellung der RNA Sekundärstrukturelemente {CLC Bio 2010}..

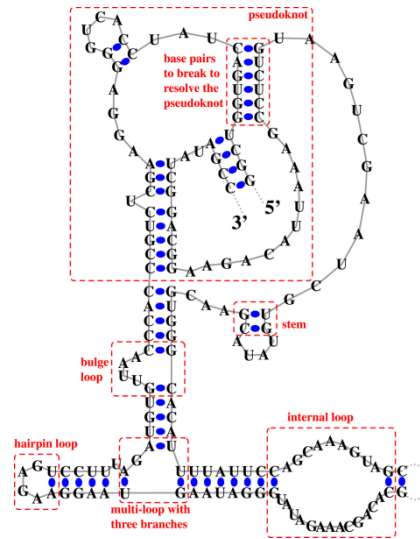


Abbildung 38 Schematische Darstellung der möglichen internen RNA-Strukturelemente {Popenda 2010}.

Auf Grund der spezifischen Basenpaarung, der möglichen Strukturelemente und der Berechnung der Entropie kann somit die erdenkliche Sekundärstruktur ermittelt werden. In Abbildung 39 ist die wahrscheinlichste Ausbildung der Sekundärstruktur nach Entropie aufgezeigt.



Abbildung 39 Vorhersage der Sekundärstruktur nach Entropie durch das Programm ViennaRNA-1.5.4 {Hofacker 2007}.

Für die Bilderstellung mittels des Rasterkraftmikroskops wird ein geringes Volumen (ca. $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) der RNA-Lösung auf einer mit APTES- ((3-Aminopropyl)Triethoxysilan) immobilisierten MICA-Oberfläche aufgetragen. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit wird die Probe vorsichtig abgespült und in das Mikroskop gelegt. Die AFM-Darstellung erfolgt im *tapping mode* mit einem J-Scanner.

In Abbildung 40 ist die RNA-Probe bei Raumtemperatur dargestellt. Sehr deutlich sind die Knäuel bzw. Konglomerate zu erkennen. Diese sind über den gesamten Scanbereich verteilt und sind zwischen 1,7 bis 2,2 nm hoch.

Eine weitere RNA-Probe wurde zuvor in kurzer Zeit auf eine Temperatur von -20°C auf Eis aufgetaut und sofort auf das 37°C erwärmte APTES-immobilisierte MICA aufgetragen. Nach kurzer Inkubationszeit erfolgt ebenfalls die Spülung und der Scan im *tapping mode*. Das Höhenprofil ist in Abbildung 41 dargestellt. Hier sind keine Konglomerate mehr erkennbar, sondern Ketten von ca. 1,5 – 1,7 nm Höhe. Diese Verbindungen werden der RNA zugeordnet, da die MICA-Oberfläche keine Unregelmäßigkeiten im Höhenprofil aufzeigt und Proteinverunreinigungen auf Grund der vorherigen Charakterisierung der RNA ausgeschlossen werden können.

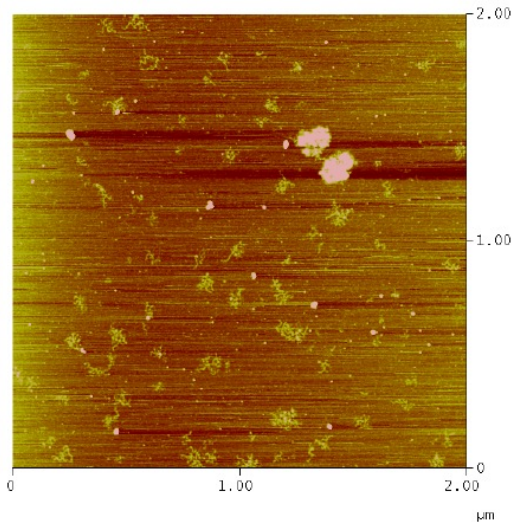


Abbildung 40 AFM-Abbildung der TMV-RNA bei Raumtemperatur in einem Scanbereich von 2 µm bei einer Scanrate von 0,7266 Hz. Gut zu erkennen sind die Konglomerate der RNA.

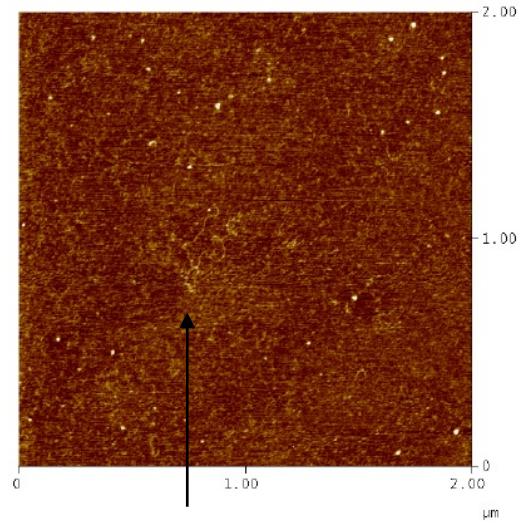


Abbildung 41 AFM-Abbildung der TMV-RNA bei 37°C in einem Scanbereich von 2 µm bei einer Scanrate von 0,7266 Hz. Gut zu erkennen ist eine ausgestreckte Polymerkette in der Mitte der Abbildung.

4.2.3 Überprüfung der Streptavidin-Biotin-Bindung

Vor der ersten Kraftspektroskopischen Messung sollte die Hybridisierung der biotinylierten Primer überprüft werden. Parallel dazu wird die Probe in unterschiedlichen Puffern aufgetragen, um die optimalen Bedingungen zu rekonstruieren. Die Proben für die Überprüfung werden unverändert der Probenpräparation für die Messung behandelt, jedoch in MilliQ-Wasser, TE-Puffer oder verminderten Salzkonzentrationspuffer (NP-Puffer) aufgetragen. Spiegelverkehrt werden die RNA-Proben mit den jeweiligen vorwärts- und rückwärts-Primern (*f-Primer*: vorwärts-Primer; *r-Primer*: rückwärts-Primer) in den jeweiligen Puffern in einem Agarosegel injiziert. Die Auftragung der Proben ist in der Beschriftung der Abbildung 42 zu entnehmen.

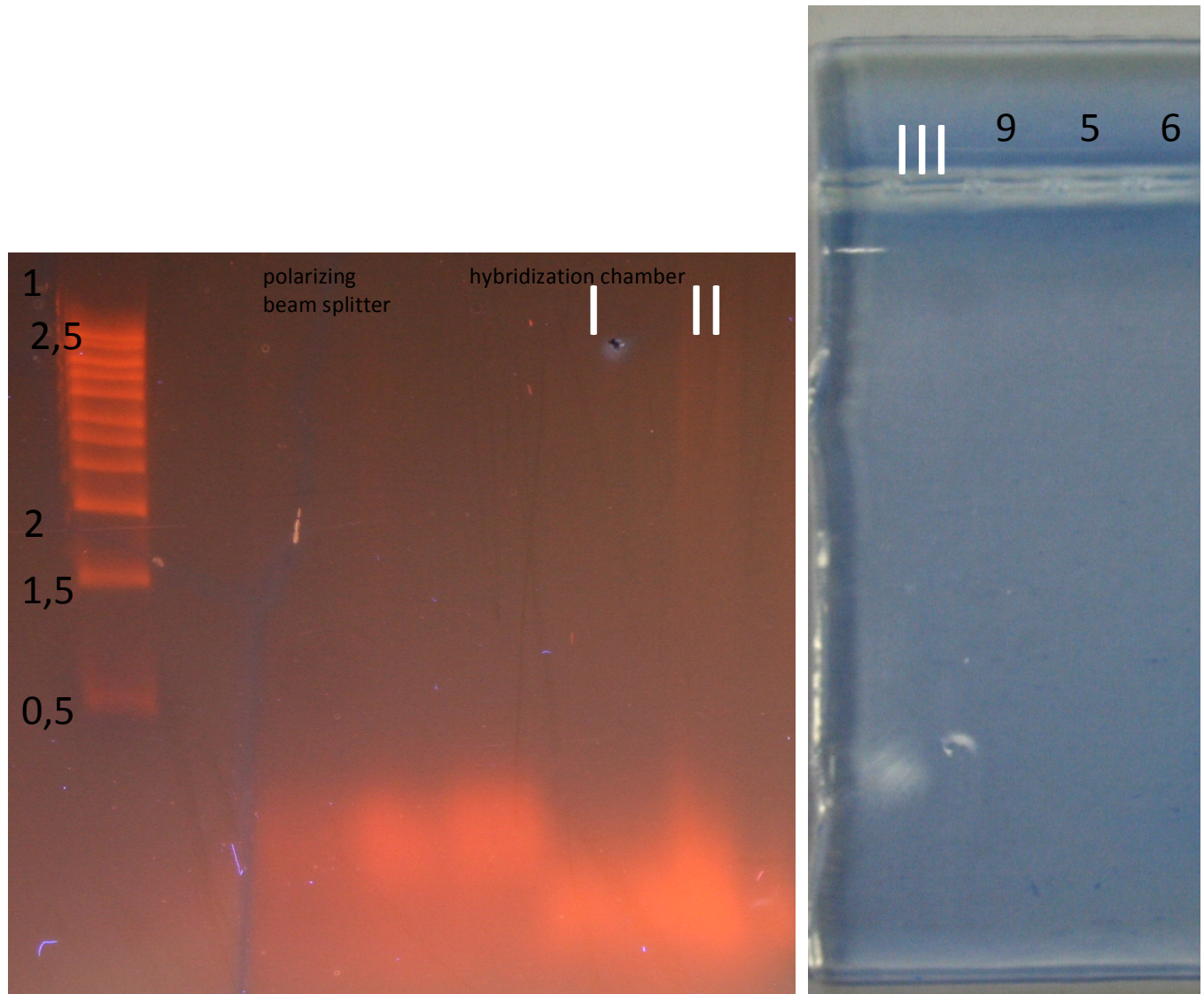


Abbildung 42 links: Agarosegel nach UV-Beleuchtung. Rechts: Coomassie-Färbung des Agarosegels nach Auftragung der RNA, der biotinylierten Primer als auch der Streptavidin-Kügelchen.

Spur I: 1kbp DNA Ladder (PF)	Spur II: NP-Puffer f-Primer	Spur III: NP-Puffer r-Primer
Spur IV: TE-Puffer f-Primer	Spur V: TE-Puffer r-Primer	Spur VI: H ₂ O f-Primer
Spur VII: H ₂ O r-Primer	Spur VIII: NP-Puffer f-Primer	Spur IX: NP-Puffer r-Primer
Spur X: TE-Puffer f-Primer	Spur XI: TE-Puffer r-Primer	Spur XII: H ₂ O f-Primer
Spur XIII: H ₂ O r-Primer		

Im linken Agarosegel sind in keinen der Probenspuren klare Banden erkennbar. Zusätzlich wurde in Spur I ein DNA-Marker aufgetragen, welcher die Lauflänge anzeigen soll. In den ersten beiden Probenspuren (II und III) sind helle Bereiche am unteren Ende der Lauflänge erkennbar. Diese werden in den Spuren der Proben in TE-Puffer deutlicher. Im Wasser gelöste Proben weisen kleinere Fragmente auf (Spur VI und VII). Somit ist für die Kraftmikroskopische Messung TE-Puffer am geeignetsten. Dieser *Schmier* an Nukleinsäure sind RNA-Fragmente. In diesen Proben ist die mit biotinylierten Primern verlinkte RNA aufgetragen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass das Biotin an die Streptavidin-Kügelchen bindet und diese Verbindung bei angelegter Spannung in den Taschen verbleibt.

Damit dieses Ergebnis begründet werden kann, wird anschließend eine Coomassie-Färbung des Gels durchgeführt. Dabei wird das Gel über Nacht in *kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue R-250* inkubiert und

geschwenkt. Der Triphenylmethanfarbstoff lagert sich dabei an die basischen Seitenketten der Aminosäuren und färbt somit unspezifisch die enthaltenen Proteine. Anschließend wird das Gel in 1% Methanol für 24 Stunden entfärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 42 rechts dargelegt. Im Bereich der Taschen sind die dunklen Bereiche deutlich erkennbar. Dies beweist die Vermutung, dass der Streptavidin-Biotin-Komplex nicht im 1%-Agarosegel für Nukleinsäuren aufgetrennt werden kann. In Spur XII sind blaue Bereiche auch in Laufrichtung erkennbar. Möglicherweise war hier die Bindung des Komplexes in NP-Puffer nicht stark genug, sodass das Biotin an den Primern detektiert werden konnte. Bei den Proben in Wasser und TE-Puffer können untereinander keine Unterschiede in der Färbung erfasst werden.

4.3 Ergebnisse der RNA-Expansion

Nach der Charakterisierung der TMV-RNA kann anschließend die Kraftspektroskopische Messung durchgeführt werden. Hierfür werden die Zuleitungen und die Flüssigzelle mit Diethylpyrocarbonat- (DEPC) Wasser gespült. Dieses bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine im katalytischen Zentrum der RNasen und vermindert die Wahrscheinlichkeit der Degradation der RNA während des Versuchs. Der hydrodynamische Druck ist hierbei ausreichend für den Fluss der Lösung in der Flüssigzelle.

Im Vorfeld erfolgt die Hybridisierung der vorwärts-Primer an die RNA bei 64°C für 5 min und die anschließende Zugabe der Polystyrolkugeln. Für den Versuchsaufbau werden im ersten Schritt Polystyrol-Kügelchen mit rückwärts-Primern gemischt und der Flüssigzelle zugeführt. Ein Kügelchen wird gefangen, zur Mikropipette bewegt und an dieser fixiert. Im Anschluss wird ein geringes Volumen der Polystyrolkugeln mit RNA über das Schlauchsystem zugeführt und ein zweites Kügelchen im Laserfokus gefangen. Ein Überblick über den Versuchsaufbau ist in Abbildung 43 zu erkennen.

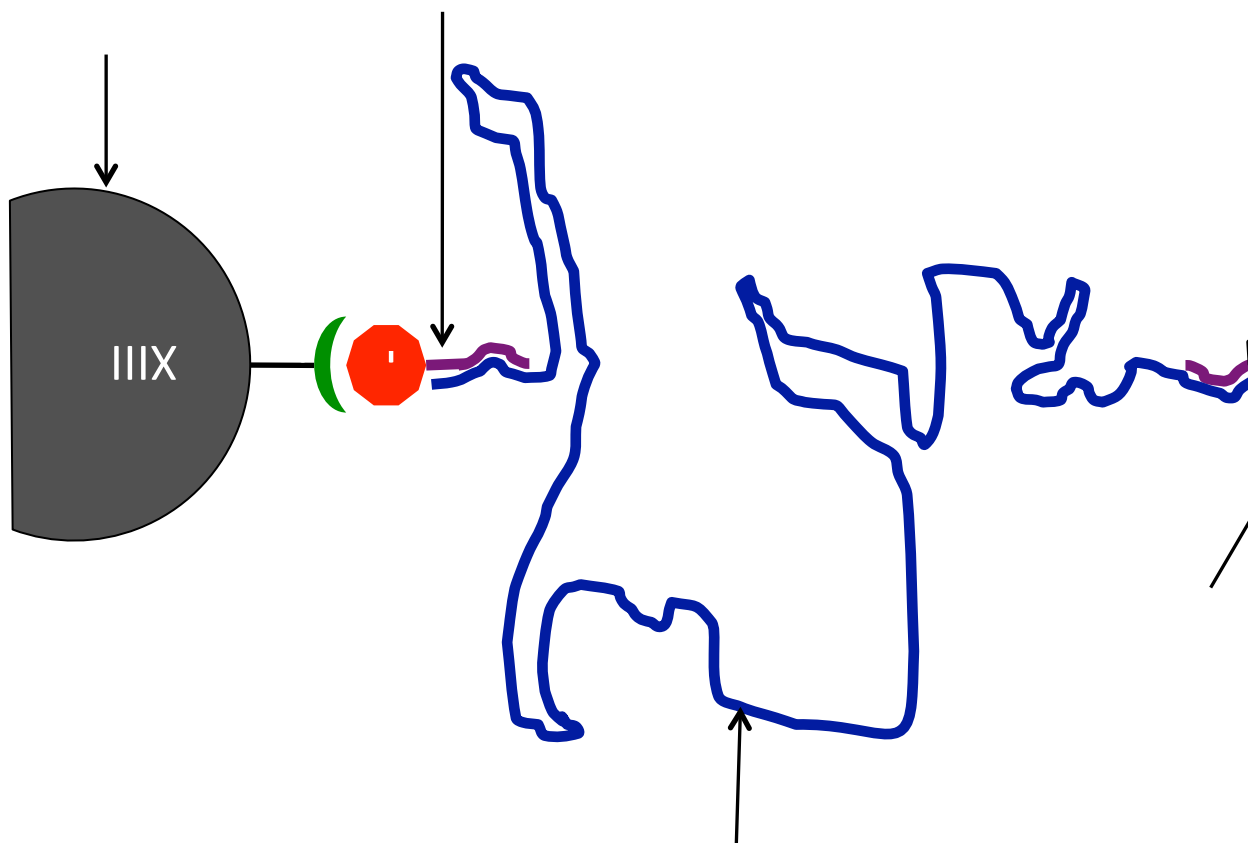


Abbildung 43 Überblick über die Verknüpfung der RNA zwischen zwei Polystyrolkugeln.

Das zweite Ende der RNA soll durch das Kügelchen in der Mikropipette mit dem rückwärts-Primer gegriffen werden. Ein Problem stellt hierbei die Sekundärstruktur der RNA dar, da somit das Hybridisieren der Primer an die RNA durch die Strukturelemente verhindert werden könnte. Aus diesem Grund wird das Umfeld der Flüssigzelle auf 37°C erhitzt. Nachfolgend wird das zweite Kügelchen in der

Mikropipette dem Kügelchen im Laserfokus angenähert und langsam wieder zurück bewegt. Ist die RNA zwischen den beiden Kügelchen immobilisiert, so wird dies durch einen Anstieg der Kraft verdeutlicht. In der Versuchsreihe im Rahmen dieser Arbeit ist dieser Zustand nicht aufgetreten.

Jedoch war es einmalig möglich, einen Kraftanstieg durch einen geringen Drift der Mikropipette zu detektieren. In Abbildung 44 ist das Ergebnis in Form eines Diagramms dargestellt.

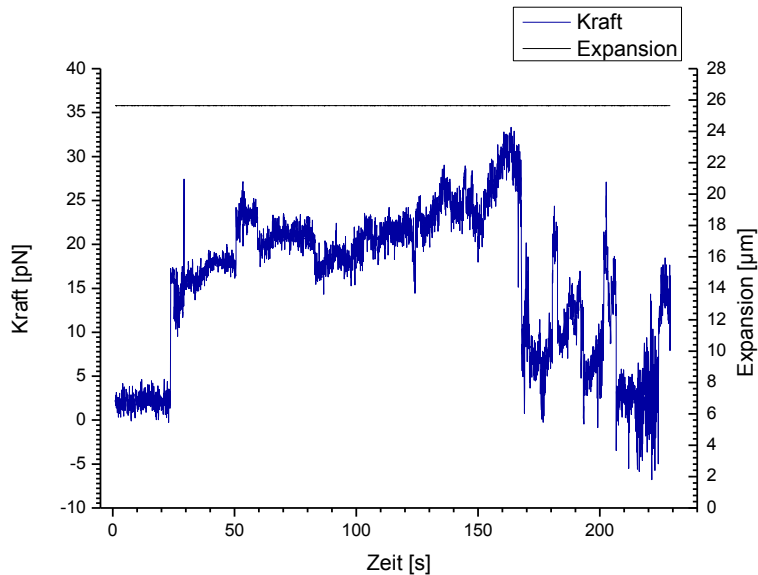


Abbildung 44 Kraftspektroskopisches Ergebnis der RNA-Messung bei gleichbleibenden Expansionsabstand.

Der unvermeidliche kontinuierliche Drift der Mikropipette auf Grund der Erwärmung der Probenkammer, erfolgte in z-Richtung und kann mit dem verwendeten Optischen Pinzetten Aufbau nicht detektiert werden. Im Diagramm ist nach ca. 25 s ein sprunghafter Anstieg der Kraft auf 18 pN zu erkennen. Im Anschluss daran steigt die Kraft auf bis zu 33 pN an und fällt anschließend sprunghaft auf 5 pN. Es kann auf Grund dieses Diagramms davon ausgegangen werden, dass die Kraftkurven die Entfaltung der Sekundärstruktur darstellen. Die Peaks bis zu 26 pN könnten die Auflösung eines Strukturelements darstellen, da anschließend die RNA in diesem Bereich linear ist, und nicht mehr aktiv an dem Kügelchen zieht. Eine Charakterisierung der Überstreckung der RNA konnte nicht detektiert werden.

5. Diskussion

5.1. Kraft-Distanzkurven der DNA bei verschiedenen Temperaturen

In Kapitel 3 wurde bereits auf die Ergebnisse der Kraft-Distanz-Kurven eingegangen. In diesem Abschnitt sollen zunächst die Ergebnisse miteinander verglichen und analysiert werden. Anschließend erfolgt eine Diskussion der bei den Messungen aufgetretenen Probleme.

Bei der Kraftmessung einer λ -DNA ist es für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unabdingbar, ein einzelnes DNA-Molekül zu untersuchen. Die Bindung einer einzelnen DNA wird durch einen sprunghaften Kraftanstieg im Flüssigkeitsstrom (siehe Abbildung 25) sichtbar und somit kontrolliert. Werden hierbei mehr als ein Sprung detektiert, so sollte vorerst überprüft werden, ob zwei DNA-Moleküle zwischen den Kügelchen gebunden haben. Dies erreicht man damit, dass das zweite Kügelchen angenähert und die charakteristische Kraft-Distanz-Kurve aufgenommen wird. Wird das Plateau der Kurve erst bei weit über 65 pN erreicht, so kann davon ausgegangen werden, dass zwei oder mehrere DNA-Moleküle gebunden haben und zunächst versucht beide Moleküle zu überstrecken, in der Hoffnung, dass eines vom Kügelchen abreißt. Hierdurch wird das Experiment auf Einzelmolekülbasis gewährleistet. Andernfalls ist es nötig, ein neues Polystyrolkügelchen und DNA-Molekül zu fixieren.

Während der Aufnahme der Kraft-Distanzkurve wird darauf geachtet, jeweils dasselbe DNA-Molekül bei unterschiedlichen Temperaturen zu strecken. Dies garantiert die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Bisher beschäftigten sich viele Arbeitsgruppen mit dem Phänomen des kraftinduzierten Schmelzvorgangs der DNA {Konrad 1996}{Lebrun 1996}{Kosikov 1999}{Williams 2001}. Diese können jedoch nicht die Vorhersage der Übergangskraft von S-Form in B-Form DNA bei unterschiedlichen Temperaturen vorhersagen. Williams *et al* veröffentlichten in ihren Ergebnissen die kraftinduzierten Schmelzkurven bei unterschiedlichen Temperaturen. {Williams 2001}. In Ihren Ergebnissen stellten Sie zum einen die charakteristischen Kraft-Distanz-Kurven dar, als auch die Überstreckungskräfte. Dies bedeutet, dass sie verschiedene DNA-Moleküle bei unterschiedlichen Temperaturen charakterisiert haben. Es kann in diesen Fällen nicht ausgeschlossen werden, dass die Streptavidin-Biotin-Bindung seitlich gebunden hat oder nicht die optimale End-zu-End-Distanz gewährleistet werden konnte. In dieser Arbeit wird jeweils ein DNA-Molekül bei unterschiedlichen Temperaturen gestreckt. Somit wird zum einen der Aspekt der Hysterese aufgegriffen, als auch das kraftinduzierte Schmelzen bei unterschiedlichen Temperaturen. Das Ergebnis dieser Kraft-Distanz-Kurven bei Temperaturen bis 42°C ist Abbildung 45 dargestellt.

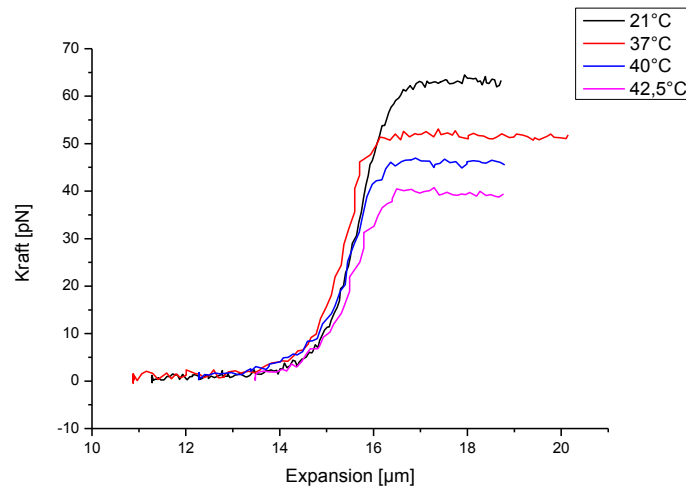


Abbildung 45 Temperaturvergleich eines DNA-Moleküls bei unterschiedlichen Temperaturen.

Im obigen Diagramm sind die unterschiedlichen Kräfte bei Erreichen des charakteristischen Plateaus gut erkennbar. Mit steigender Temperatur sinkt die Schmelztemperatur auf bis zu 40 pN. Ein kurzer Überblick über die ermittelten Schmelztemperaturen und den mit Hilfe des WLC-Fit berechneten Werten für die Kontur- und Persistenzlänge sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 4 Übersicht über die Kraft, bei Erreichen des Plateaus; sowie die berechnete Kontur- und Persistenzlänge nach WLC-Fit.

Temperatur	Kraft [pN]	Konturlänge [μm]	Persistenzlänge [nm]
21°C	63.9	15.78	38
30°C	61.5	15.15	15
37°C	51.8	15.69	33
40°C	45.3	15.89	25
42°C	39.4	16.12	24

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Kraft, die bei Erreichen des Plateaus detektiert wurde, auf 62% absinkt. Die berechnete Konturlänge variiert hingegen zwischen 15.15 μm bis 16.12 μm unspezifisch und ist zurückzuführen auf den mechanischen Drift beim Heizen. Schenkt man der errechneten Persistenzlänge bei 30°C keine Beachtung, so sinkt diese signifikant auf 24 nm. Die Steifigkeit der Polymerkette nimmt somit stetig ab und wird somit flexibler. Dies lässt sich auf die thermische Bewegung bei höheren Temperaturen zurückführen. Bei der Messung der Relaxierungskurve (siehe dazu Abbildung 34 und Abbildung 35) konnten keine direkten Hysterese-Effekte registriert werden. Eine Zusammenfassung beider Kurven ist in Abbildung 46 dargestellt.

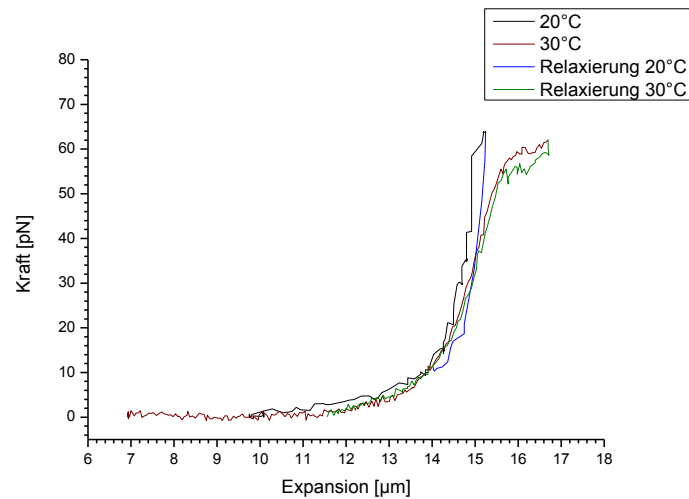


Abbildung 46 Zusammenfassung der Kraft-Distanzkurven mit Relaxationsweg bei 20°C und 30°C.

An Hand dieser beiden annähernd übereinstimmenden Expansions- und Relaxierungskurven könnte theoretisch davon ausgegangen werden, dass die Expansion keine direkten Einflüsse auf den Übergang in die überstreckte Form ausübt. Bei 30°C ist die Relaxierungskurve approximativ identisch zur Expansionskurve, sodass möglicherweise alle Basenpaarungen der Urform identisch hybridisiert wurden. Bei 20°C hingegen ist bei der Relaxierung die Kraft, die das Kügelchen aus dem Fokus zieht, bei 1,5 µm weniger Abstandsverringering erreicht. Wahrscheinlich könnte dies darauf hin deuten, dass sich die sequenzspezifische Hybridisierung unvollständiger ist, als bei der Auftrennung der Basen durch Expansion. Da bei 30°C die Kraft-Distanzkurven annähernd übereinstimmend sind, könnte der Initiationssequenzabschnitt für Expansion und Relaxierung im gleichem nicht helikalen Bereich sein, oder die Hybridisierung in entgegengesetzter Reihenfolge der Auftrennung erfolgen. Es stellt sich nun die Frage, ob die Expansion der DNA einen indirekten Einfluss auf die Stabilität der DNA besitzt, d.h. dass der Übergang in die überstreckte Form nicht reversibel ist.

Abbildung 45 zeigt, dass sich die Schmelztemperatur, das heißt die Kraft bei Erreichen des charakteristischen Plateaus, mit steigender Temperatur verringert. Die Expansion mit verschiedenen DNA-Molekülen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigt ein deutlich verringertes kraftinduziertes Schmelzen bei höheren Temperaturen. Dies fundiert zusätzlich Abbildung 47.

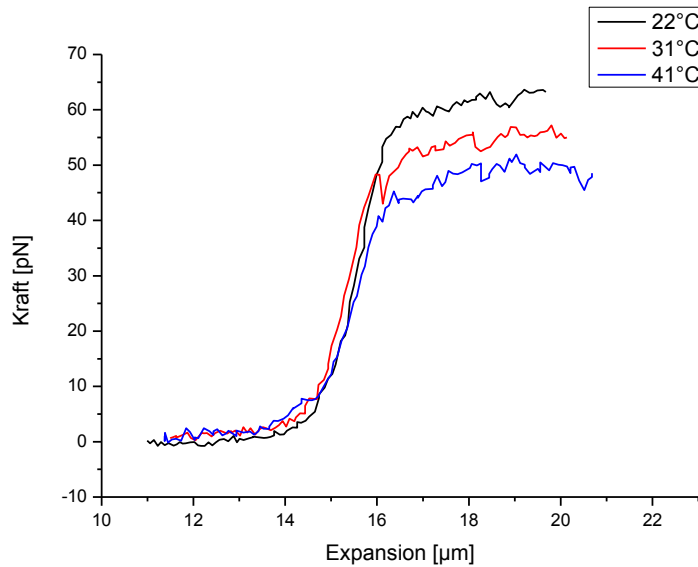


Abbildung 47 Kraft-Distanzkurve mit unterschiedlichen λ -DNA-Molekülen bei 22°C, 31°C und 41°C.

Auch in dieser Abbildung ist die Erreichung des charakteristischen Plateaus bei steigender Temperatur unterhalb der Normierten Kraft von 65 pN bei Raumtemperatur zu erkennen. Bei 41°C ist die Kraft im Plateau bei 51 pN. Dies ist im Vergleich zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Williams *et al* mäßig geringer, siehe Abbildung 48. Die Tendenz der veröffentlichten Diagramme konnte belegt werden, jedoch ist das Plateau bei bereits zuvor gestreckten DNA-Molekülen bei einer niedrigeren Kraft erreicht.

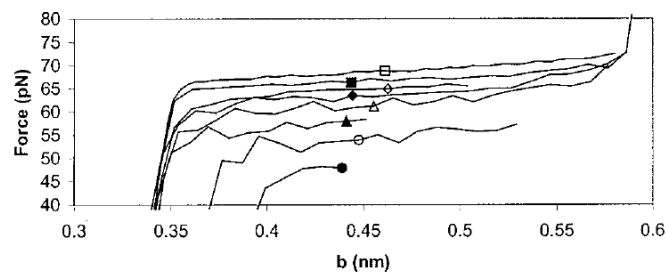


FIGURE 3 Temperature dependence of DNA stretching in 500 mM ionic strength Hepes buffer at pH 7.5. The data are shown as lines between data points separated by 500 nm. The data were obtained at 11°C (\square), 21°C (\blacksquare), 28°C (\diamond), 31°C (\blacklozenge), 35°C (\triangle), 40°C (\blacktriangle), 45°C (\circ), and 52°C (\bullet). As the temperature of the environment surrounding the DNA is increased, the overstretching force decreases, as expected for force-induced DNA melting. For the curves shown at the highest temperatures, the DNA strand was already partially single-stranded, so at low extensions the force does not match the other curves. The data obtained at less than 45°C exhibit the standard force-extension behavior shown by the data in Fig. 2 at forces below 40 pN. All of these curves were obtained when stretching the DNA.

Abbildung 48 Temperaturabhängigkeitsergebnis der Arbeitsgruppe von Williams et al {Williams 2001}.

Aus den Ergebnissen im Diagramm lässt sich für 40°C eine Kraft von ca. 56 pN, sowie bei 45°C eine Kraft von ca. 53 pN ablesen. Die Ergebnisse in dieser Arbeit für die Expansion bei Temperaturen angrenzend 40°C variieren im Bereich von 46 pN bis 52 pN. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei

Erhöhung der Temperatur die Steifigkeit der Segmente der DNA-Polymerkette abnimmt und diese flexibler ist. Bezugnehmend auf die Kraft-Distanzkurven einer einzelnen DNA bei verschiedenen Temperaturen, sinkt die Schmelzkraft der DNA zunehmend stärker, als bei unbehandelter, d.h. vorher nicht-expandierter, λ -DNA. Dies deutet darauf hin, dass bei der Relaxierung die doppelsträngige Urform nicht vollständig ausgebildet wurde. So kann davon ausgegangen werden, dass Strangbrüche auftraten oder die helikale Struktur nicht vollständig ausgebildet wurde, und somit eine unvollständige Hybridisierung stattfand. Somit wird die DNA flexibler und der kraftinduzierte Schmelzvorgang findet bei geringerer Kraftauswirkung statt. Zusätzlich belegt diese Tatsache den Einfluss der Hysterese auf die Stabilität der DNA. Was möglicherweise in der Evolution den Einsatz von Proteinen zur Stabilisierung der DNA in höher entwickelten Organismen zur Folge hatte (Verpackung durch *Histone*). Die Stabilität der einzelnen Segmente der Polymerkette bis zu einer Temperatur von 37°C wird ebenfalls durch die Möglichkeit poikilothermer Organismen ihre Temperatur bis 10°C zu verringern belegt. Somit ist es wichtig, die Stabilität der Träger der genetischen Information auch bei diesen Temperaturen zu gewährleisten. An Hand der verringerten kraftinduzierten Schmelzkraft bei Temperaturen über 40°C kann die Vermutung aufgestellt werden, dass bei diesen Temperaturen nicht nur Proteine degradieren, sondern sich ebenfalls die stabile Struktur der DNA-Helix ändert. Diese Vermutung könnte die tödliche Folge bei Körpertemperaturen über 40°C in Säugetieren zusätzlich zur Stabilität der Proteine belegen. Dies würde jedoch zu zusätzlichen Fragen anregen, beispielsweise, ob die DNA bei thermophilen Bakterien wie *streptococcus thermophilus* zusätzlich durch Proteine oder Lipide geschützt ist.

5.2. Charakterisierung der RNA

Die Transkription der RNA verlief, wie in Abschnitt 4.2 Charakterisierung der RNA zu sehen, erfolgreich. Die ermittelten Konzentrationen waren für die nachfolgenden Charakterisierungen und anschließenden Messungen ausreichend. Die Aufreinigung der RNA nach der Transkription konnte ebenfalls durch die Messung der Proteinverunreinigung kontrolliert werden. Diese Tatsache kann durch das Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen $\lambda = 260 \text{ nm}$ und 280 nm beurteilt werden. Diese Werte lagen bei der Mehrheit der gemessenen Konzentrationen im Bereich von 1,8 bis 2,2 und stellen somit proteinarme RNA-Lösungen dar.

Die Größenbestimmung der RNA verlief ebenfalls bei allen untersuchten Proben erfolgversprechend. Bei allen gelelektrophoretischen Aufnahmen konnte bei der Auftragung der Proben mit hoher Nukleinsäure-Konzentration eine Bande zwischen den spezifischen Fragmenten mit den Größen 6 kbp und 9 kbp des Markers festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt bereits keine Fragmentierung der RNA beispielsweise durch RNasen stattgefunden hat. Die Proben wurden anschließend für die Aufnahme der Kraft-Distanz-Kurven verwendet. Die Messungen fanden auf Grund der Ergebnisse der Gelelektrophorese und zusätzlicher Coomassie-Färbung in TE-Puffer statt.

An Hand der Rastermikroskopaufnahmen Abbildung 40 und Abbildung 41 konnte gezeigt werden, dass bei AFM-Aufnahmen die schnelle Temperaturerhöhung auf 37°C für die Entfaltung der Sekundärstruktur ausreichend ist. Dies kann jedoch nicht auf generelle physikalische Messungen übertragen werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die RNA auf Grund der molekularen Zusammensetzung von APTES auf MICA entfaltetete. Diese Abbildungen zeigen jedoch sehr deutlich, dass die RNA zum einen mit AFM abbildbar ist, und zum anderen keine höhenprofilreichen Moleküle in der Suspension enthalten sind.

Diese Charakterisierung der TMV-RNA belegt die geeignete Verwendung des Moleküls für kraftspektroskopische Untersuchungen.

5.3. Ergebnisse der RNA-Expansion

In Abbildung 49 ist eine der aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurve dargestellt. Hierbei wurde nicht die Distanz zwischen den Kügelchen in x-Richtung geändert, sondern der Abstand in z-Richtung durch Drift der Pipette. Dieser Abstand kann jedoch mit der in dieser Arbeit verwendeten Optischen Pinzette nicht detektiert werden. Dementsprechend ist es nicht möglich, die gemessene Kraft einem Expansionsabstand zuzuordnen. Das Ergebnis kann jedoch mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Manosas *et al* verglichen werden. {Manosas 2006}{Manosas 2008}{Manosas 2007}. In diesen Veröffentlichungen wurde ein RNA-Hairloop zwischen zwei DNA-Moleküle immobilisiert und die Expansionskraft vermessen. Aus ihren Diagrammen wird ersichtlich, dass die Basenpaare bei direkt anliegender Kraft von 15 pN „entzupft“ und somit die Haarnadelstruktur entfaltet wird. {Manosas 2008}. Dieses Ergebnis lässt sich auf den ersten Sprung der Kraft anwenden:

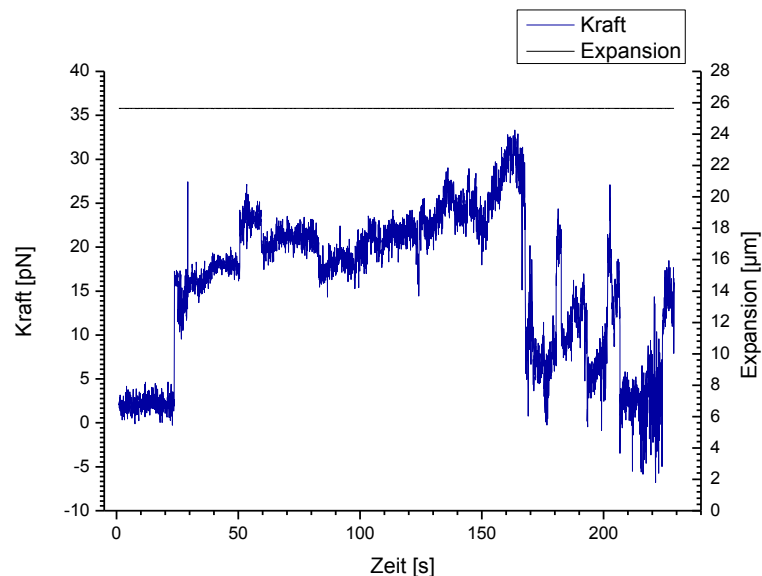


Abbildung 49 Kraft-Distanz kurve der TMV-RNA bei gleichbleibenden Expansionsabstand in x-Richtung

In diesem Diagramm konnte ein starker Anstieg der Kraft in wenigen Sekunden detektiert werden. Hier fehlen jedoch die Abstandswerte, so dass eine genaue Deutung des Kraftsprungs ausgeschlossen ist. Der weitere Anstieg der Kraft auf bis zu 30 pN könnte ebenfalls der schrittweisen Entfaltung der RNA zugeordnet werden. Eventuell ist zwischen den Kügelchen nur ein kurzes Fragment gespannt, da eine Expansion in x-Richtung keine auswertbaren Ergebnisse lieferte. Ein mögliches Problem könnte in der ausgebildeten Sekundärstruktur der RNA begründet liegen. Durch die Annäherung des am zweiten Kügelchen fixierten Primers könnte die Hybridisierungssequenz verdeckt sein, so dass das 3'-Ende in der Ausbildung der Sekundärstruktur durch Ausbildung von doppelsträngigen Fragmenten involviert ist. Die Temperaturerhöhung der Flüssigzelle auf 40°C war dementsprechend nicht ausreichend für die Entfaltung der RNA und die Hybridisierung des Primers an die End-Sequenz.

Weiterhin besteht die Möglichkeit der Fragmentierung der RNA durch RNasen im Schlauch- oder Flüssigzellensystems. Die Schläuche wurden im Vorfeld jeder Kraftspektroskopischen Messung mit DEPC-Wasser gespült, jedoch kann einerseits nicht die Gesamtmenge an RNasen blockiert werden, und andererseits neue RNasen durch Handhabung der Lösungen und Spritzen in das System gelangen.

Zusätzlich ist eine Fragmentierung der RNA durch die Wirkung von Scherkräften in der Strömung möglich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die RNA (die bereits an die Streptavidin-Kügelchen fixiert ist) durch die mechanische Kraftwirkung der Kügelchen in der Strömung die RNA fragmentierte oder Strangbrüche an den *Knoten* der RNA auftraten.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung der intramolekularen Bindungskräfte von Nukleinsäuren mit der Optischen Pinzette. Dazu wurden zunächst die kraftinduzierten Schmelzkurven der λ -DNA bei Raumtemperatur aufgenommen. Im Anschluss daran wurde eine Inkubationskammer konstruiert, die die Temperaturerhöhung in der Nähe der Flüssigkeitszelle auf 42°C ermöglicht. Somit konnte das kraftinduzierte Schmelzen der DNA-Moleküle bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht werden. Dazu wurde einerseits von verschiedenen DNA-Molekülen die Kraft-Distanzkurven bei den Temperaturen 21°C, 30°C, 37°C und 41°C aufgenommen und anschließend eine einzelne λ -DNA bei unterschiedlichen Temperaturen gestreckt.

Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender Temperatur das Plateau des kraftinduzierten Schmelzvorgangs sinkt. Bei Raumtemperatur liegt die Kraft, die zur Erreichung des Plateaus nötig ist, bei etwa 64 pN. Bei 31°C sinkt die Kraft des charakteristischen Plateaus um 16%. Bei 41°C ist die Kraft bei nur noch 70% im Vergleich zum normierten Wert bei Raumtemperatur. Diese Werte konnten mit verschiedenen DNA-Molekülen bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen werden. Weiterführend wurde ein einzelnes DNA-Molekül bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Es konnte aufgezeigt werden, dass bei zuvor gestreckten Molekülen die Kraft bei beispielsweise 40°C um 25% im Vergleich zu unbehandelten DNA-Molekülen sinkt. Es konnte somit belegt werden, dass der Übergang der B-Form DNA in S-Form DNA nicht reversibel ist.

Die Ergebnisse der RNA-Kraftmessung in Kapitel 3.3 zeigen die mögliche Entfaltung der RNA bei Streckung in z-Richtung. Limitiert wurde die Messung durch die Sekundärstruktur der RNA. Für zukünftige Untersuchungen sind mehrere Änderungen denkbar. In weiterführenden Messungen soll die RNA durch unterschiedlich modifizierte Primer verlinkt und kraftspektroskopisch untersucht werden. Die Modifizierung der Primer durch beispielsweise eine Thiol-Gruppe und die Beschichtung der Streptavidin-Polystyrolkugeln mit Maleimid würden die gleichzeitige Hybridisierung ermöglichen. Anschließend kann die RNA zwischen den beiden modifizierten Kugeln immobilisiert und die Kraft-Distanz-Kurve aufgenommen werden.

Die Experimente können weiterführend ausgeweitet werden, um die Proteinassamblierung an der RNA zu untersuchen. Die Viren liegen bereits in aufgereinigter Form vor, so dass anschließend nur noch die Proteinisolierung nötig ist und zu der gestreckten RNA zugegeben werden können. Dies könnte *a posteriori* die bisher unbekannte Initiation der Proteinassamblierung des Tabakmosaikvirus aufklären. Da die Untersuchung Einblicke geben können, ob die RNA vorerst eine Haarnadelstruktur ausbildet und sich anschließend die Hüllproteine anlagern, oder ob die Proteine an die einzelsträngige RNA binden oder ob die RNA in die Proteinhülle interkaliert und keine Helix ausbildet.

7. Literaturverzeichnis

- AHSAN, A.** 1998. Elasticity theory of the b-DNA to s-DNA transition state. *Biophys. J.* 74, 132–137.
- ALLISON, D.P.** 1996. Direct atomic force microscope imaging of EcoRI endonuclease site specifically bound to plasmid DNA molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 8826–8829.
<http://www.pnas.org/content/93/17/8826.full.pdf#page=1&view=FitH>.
- AMBION INC. APPLIED BIOSYSTEMS.** 2008. *RNA Millenium TM Marker*. Catalog AM7150.
- ANSELMETTI, D.** 2000. Single Molecule DNA Biophysics with Atomic Force Microscopy. *Single Mol.* 1, 53–58. [http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/\(SICI\)1438-5171\(200004\)1:1%3C53:AID-SIMO53%3E3.0.CO;2-U/asset/53_ftp.pdf?v=1&t=gfs8dukp&s=7b072fe92d6b599ec34822d0d73d91c2b21df1d8](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/(SICI)1438-5171(200004)1:1%3C53:AID-SIMO53%3E3.0.CO;2-U/asset/53_ftp.pdf?v=1&t=gfs8dukp&s=7b072fe92d6b599ec34822d0d73d91c2b21df1d8).
- ANSELMETTI, D.** 2005. Single cell analytics for nanobiology. *J. Nanobiotechnol.*, 267–270. DOI: 10.1385/Nano:1:3:267.
- ANSELMETTI, D.** 2006. *Nanobiology: Imaging, manipulation and functional probing at the single molecule level*. FontisMedia, Lausanne.
- ANSELMETTI, D.** 2007. Analysis of subcellular surface structure, function and dynamics. *Anal Bioanal Chem* 387, 83–89. DOI 10.1007/s00216-006-0789-3.
- ANSELMETTI, D.** 2009. *Single cell analysis. Technologies and applications*. Wiley-VCH, Weinheim.
- ASHKIN, A.** 1970. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.* 24, 156–159.
- BEERLINK.** 2006. *Kraftmessung in mikroskopischen Dimensionen. die optische pinzette*.
- BOGUNOVIC, L.** 2008. *Kraftspektroskopie an einzelnen Lambda-DNA-Strängen mittels einer optischen Pinzette. Versuchsprotokoll*.
- BROWN, T.A.** 2007. *Genome und Gene. Lehrbuch der molekularen Genetik*. Spektrum, Akad. Verl., Berlin [u.a.].
- BUSTAMANTE, C.** 1994. Entropic elasticity of Lambda-Phage DNA. *science* 265, 1599–1600.
- BUSTAMANTE, C.** 2005. The nonequilibrium thermodynamics of small systems. *Phys. Today*.
- BUTLER, P.J.G.** 1971. Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disks of protein. *nature* 229, 47–50.
- BUTLER, P.J.G.** 1984. The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus. *J. gen. Virol.*, 65, 253–279.
- CHEN, G.** 2009. Triplex structures in an RNA pseudoknot enhance mechanical stability and increase efficiency of -1 ribosomal frameshifting. *PNAS* 106, 31, 12706–12711.
- CIZEAU, P.** 1997. Modeling extreme extension of DNA. *Biopolymers* 42, 383–385.
- CLC Bio.** 2010. *RNA structure prediction*. <http://www.clcbio.com/index.php?id=1195>. Accessed 11 January 2010.
- CLUZEL.** 1996. DNA: An Extensible Molecule. *science* 271, 792–794.
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sci;271/5250/792>.

- COLLIN, D.** 2005. Verification of the crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. *nature* 437.
- DURHAM, A.C.H.** 1971. Polymerization of tobacco mosaic virus protein and its control. *nature* 229, 42–46.
- ECKEL, R.** 2003. Identification of binding mechanisms in single molecule–DNA complexes. *Biophys. J.* 85, 1968–1973. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1303368/pdf/1968.pdf>.
- ESSEVAZ-ROULET, B.** 1997. Mechanical separation of the complementary strand of DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 11935–11940.
- FLORY, P.J.,** Ed. 1969. *Statistical mechanics of chain molecules*. Interscience Publ., New York [u.a.].
- GOELET, P.** 1982. Nucleotid sequence of tobacco mosaic virus RNA. *J. Biochem.* 79, 5818–5822.
- HOFACKER, I.** 2007. *ViennaRNA. RNA secondary structure prediction and comparison*. <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/>.
- HORN, W.T.** 2004. The crystal structure of a high affinity RNA stem-loop complexed with the bacteriophage MS2 capsid. Further challenges in the modeling of ligand-RNA interactions. *RNA*, 1776–1782.
- INVITROGEN™ LIFE TECHNOLOGIES.** 2003. *Nick Translation System. Cat. No. 18160-010*.
- J. D. WATSON.** 1953. Molecular structure of nucleic acids. A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid. *nature* 171, 4356, 737–738. <http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf>.
- J.S. PETERSON.** 2010. *Nicotiana tabacum L. cultivated tobacco*. http://plants.usda.gov/gallery/pubs/nita_001_pvp.jpg. Accessed 15 October 2010.
- KONRAD, M.W.** 1996. 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.
- KOSIKOV, K.M.** 1999. DNA stretching and compression: a large scale simulations of double helical structures. *J.Mol.Biol* 289, 1301–1326.
- LEBRUN, A.** 1996. Modelling Extreme stretching of DNA. *Nucleic Acids Res.* 24, 2260–2267.
- LIPHARDT, J.** 2002. Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski's equality. *science* 296, 1832–1835.
- LÖFFLER, G.** 2007. *Biochemie und Pathobiochemie. Mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg [u.a.].
- LOTTSPEICH, F.,** Ed. 2009. *Bioanalytik*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.
- MANOSAS, M.** 2005. Thermodynamic and kinetic aspects of RNA pulling experiments. *Biophys. J.* 88, 3224–3242.
- MANOSAS, M.** 2006. Force-dependent fragility in RNA hairpins. *Phys. Rev.*, 218301. <http://prl.aps.org/abstract/PRL/v96/i21/e218301>.
- MANOSAS, M.** 2007. Force unfolding kinetics of RNA using optical tweezers. II. Modelling Experiments. *Biophys. J.* 92, 3010–3021.
- MANOSAS, M.** 2008. Force-induced misfolding in RNA. *Phys. Rev.*, 061925. <http://pre.aps.org/abstract/PRE/v78/i6/e061925>.
- MANOSAS, M.** 2009. Dynamic force spectroscopy of DNA hairpins. Irreversibility and dissipation. II. *J. Stat. Mech.* <http://iopscience.iop.org/1742-5468/2009/02/P02061/>.

- MARKO, J.F.** 1998. DNA under high tension. overstretching, undertwisting and relaxation dynamics. *Phys. Rev. E* 57, 2134–2149.
- MOSSA, A.** 2009. Measurement of work in single-molecule pulling experiments. *J. Chem. Phys.* 130, 234116. http://jcp.aip.org/resource/1/jcpsa6/v130/i23/p234116_s1?isAuthorized=no.
- PARK, J.-S.** 2006. Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *PNAS* 103, 13, 4870–4875.
- PAVCO, P.** 1990. Elongation by Escherichia coli RNA Polymerase is blocked in vitro by a site-specific DNA binding protein. *Biol. Chem.* 265, 17, 9960–9969.
- PLANTS PROFILE.** <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=NITA>.
<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=NITA>. Accessed 15 October 2010.
- PLASMIDFACTORY.** 2010. *Übersicht der Molekularen Längenstandards*, Bielefeld.
- POPENDA, M.** 2010. RNA Frabase 2.0. an advanced web-accessible database with the capacity to search the three-dimensional fragments with RNA structures. *BMC Bioinf.* 231.
- POROD, G., AND KRATKY.** 1949. Röntgenuntersuchung Gelöster Fadenmoleküle. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* 68, 12, 1106–1122.
- RAIBEL, M.** 2009. *Theorie der AFM-Kraftspektroskopie an Rezepto-Liganden-Systemen*. <http://www.uni-bielefeld.de/sfb613/poster/k7.pdf>. Accessed 27 October 2010.
- REBMANN, R.** 2007. *Nicotiana tabacum*. http://www.gifte.de/Giftpflanzen/nicotiana_tabacum.htm. Accessed 15 October 2010.
- RIEF, M.** 1999. Sequence-dependent mechanics of single DNA-molecules. *nature*, Structural & molecular biology 6, 346–349. doi:10.1038/7582.
- RITORT, F.** 2006. Single-molecule experiments in biological physics. methods and applications. *J. Phys. Condens. Matter* 18, R531-R583. <http://iopscience.iop.org/0953-8984/18/32/R01/>.
- ROS, R.** 2008. *Vorlesungsskript Biophysik II*. Accessed 21 September 2010.
- ROUZINA, I.** 80. Force-induced melting of the DNA double helix. II. Effect of solution conditions. *Biophys. J.* 2001 (80), 894–900.
- ROUZINA, I.** 1999. Heat capacity effects on the melting of DNA. I. General aspects. *Biophys. J.* 77, 3242–3251.
- ROUZINA, I.** 2001. Force-induced melting of the DNA double helix. I. Thermodynamic analysis. *Biophys. J.* 80, 882–893.
- SACHSE, C.** 2007. High-resolution Electron Microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol* 371, 812–835. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.088.
- SCHOLTHOF, K.-B.G.** 2004. Tobacco mosaic virus. a model system for plant biology. *J. Phytopath.* 42, 13–34.
- SCHOLZ, D.** 2006. *Kraftmessung in mikroskopischen Dimensionen.: die optische Pinzette*.
- SISCHKA, A.** 2005. *Kraftspektroskopie und Einzelmoleküldetektion mit der Optischen Pinzette*.
- SMITH, S.B.** 1996. Overstretching B-DNA. the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *science* 271, 795–798.
<http://www.phys.ens.fr/~vincent/smb/PDF/bustamante/document1.pdf>.
- VAN MAMEREN, J.** 2009. Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging. *PNAS* 106, 43, 18231–18236.

- WATANABE, T.** 1999. Isolation from tobacco mosaic virus-infected tobacco of a solubilized template-specific RNA-dependent RNA polymerase containing a 126K/183K protein heterodimer. *J.Gen.Virol.* 73, 4, 2633–2640.
- WATKINS, H.** 2010. Structural and functional characterisation of an RNase HI domain from the bifunctional protein Rv2228c from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* <http://jb.asm.org/cgi/reprint/JB.01615-09v1.pdf>.
- WEN, J.-D.** 2007. Force unfolding kinetics of RNA using optical tweezers. I. Effect of experimental variables on measured results. *Biophys. J.* 92, 2996–3009.
- WENNER, J.** 2002. Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophys. J.* 82, 3160–3169. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1302105/pdf/12023240.pdf>.
- WILLIAMS, M.** 2001. Effect of pH on overstretching transition of double-stranded DNA. Evidence of force-induced DNA-melting. *Biophys. J.* 88, 874–881.
- WILLIAMS, M.** 2001. Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching. *Biophys. J.* 80, 1932–1939.
- WILLIAMS, M.** 2009. Peeling back the mystery of DNA overstretching. *PNAS* 106, 43, 18047–18048.
- ZIMMERN, D.** 1975. The 5' end group of tobacco mosaic virus RNA is m7G5'ppp5'Gp. *Nucl. Acids Res.*, 1189–1202.
- ZIMMERN, D.** 1977. The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell* 11, 463–482.

8. Abkürzungsverzeichnis

Nukleinsäuren

DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige (doublestranded) DNA
ssDNA	einzelsträngige (singlestranded) DNA
RNA	Ribosenucleinsäure
ssRNA	einzelsträngige (singlestranded) RNA
RNasen	Ribonukleasen
dNTPs	desoxynukleosidtriphosphat
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
AFM	atomic force microscopy
APTES	(3-Aminopropyl) Triethoxysilan
AS	Aminosäure
cw-Betrieb	continuous wave (kontinuierlich gepulst)
Nd:YAG	Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat-Laser

TMV	Tobacco mosaic virus
WW	Wechselwirkung

Chemikalien

DEPC	Diethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
EtBr	Ethidiumbromid
HCl	Salzsäure
KCl	Potassiumchlorid
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
Na₂HPO₄	Disodiumhydrogenphosphat
NaCl	Sodiumchlorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Formeln

<i>Nr.</i>	<i>Symbol</i>	<i>Bezeichnung</i>
1-3	p	Impuls
	h	Planck'sches Wirkungsquantum ($6,626 \times 10^{-34}$ Js)
	λ	Wellenlänge
	c	Lichtgeschwindigkeit
	u	Geschwindigkeit
	k	Wellenvektoren

<i>Nr.</i>	<i>Symbol</i>	<i>Bezeichnung</i>
1-3	F	Kraft
4	E	Energie
	k_B	Boltzmannkonstante ($1,381 \times 10^{-23}$ J/K)
	T	Temperatur [K]
	m	Masse
6	κ	Biegesteifigkeit der Segmente
	p	Persistenzlänge
	t_{iz}	Komponente von \vec{t}_i parallel zur Zugrichtung
	s	Segmentlänge
	θ_i	Winkel zwischen \vec{t}_i und der Zugrichtung
8	L₀	Konturlänge
9	W	Arbeit
	φ_i	Winkel zwischen 2 Objekten, die Arbeit verrichten
11	\vec{r}	Raumkurve
	l	Länge des Polymers
18	Y	Young-Model des Moleküls

9. Danksagung

Mit der Fertigstellung dieser Masterarbeit möchte ich mich bei allen, die bei der Vorbereitung, dem Entstehen und der Vollendung dieser Arbeit mitgewirkt haben, herzlich bedanken.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti, der es mir ermöglichte dieses Thema und die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften* anzufertigen. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für die Motivation, das entgegengebrachte Vertrauen, und die anschließende kritische Diskussion der Ergebnisse bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Karsten Niehaus für die Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe Proteom- und Metabolomforschung, als auch für die fachliche Unterstützung, ohne die es mir nicht gelungen wäre, dieses Thema umfassend zu bearbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Peter Reimann für die umfassende Hilfe bei der Beschaffung der Pflanzen und die anschließende Aufreinigung der Viren bedanken.

Für die Betreuung der Versuche, die Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. Andy Sischka bedanken.

Mein Dank gilt des Weiteren allen Mitarbeitern und Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre, besonders Herrn Christoph Pelargus, Herrn Lukas Bogunovic, Herrn Dominik Greif und Herrn Lukas Galla. Ihre fortwährende Hilfe, Beratung, Motivation, Unterstützung und Auseinandersetzung mit den physikalischen Problemstellungen in dieser Arbeit ermöglichten mir die Fertigstellung der praktischen Tätigkeit. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Katja Tönsing bedanken, da ich bei Problemen bei Ihr stets ein offenes Ohr gefunden habe und bei Fragen der Beschaffung von Materialien stets auf Sie zurückkommen konnte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Stephan Kaminski, der mich während der Erstellung der Arbeit nach allen Kräften unterstützt hat. Bei Problemen über das fachliche hinaus fand ich bei Ihm immer ein offenes Ohr und die Motivation in beschwerlichen Zeiten meine Ziele zu verwirklichen. Bei meinen Freunden Magdalena, Rieke, Marina und Jakob möchte ich mich für die Unterstützung nicht nur während der gemeinsamen Studienzeit, sondern auch über die Universitätsgrenzen hinaus für die zahlreichen Erinnerungen und Erfahrungen bedanken.

Speziell bedanken möchte ich mich bei meiner Familie. Ich bedanke mich bei meinen Eltern Rita und Ingo für die unendliche Unterstützung und Liebe bei der Realisierung meines Studiums. Die Förderung, Motivation und der Glaube an die Fertigstellung dieser Arbeit hat mich immer wieder motiviert. Während der Studiendauer fand ich immer ein offenes Ohr für meine Probleme. Ihren Beistand in

unangenehmen Zeiten und die Möglichkeit für ein aufmunterndes Gespräch gaben mir jederzeit den nötigen Rückhalt. Besonderer Dank gilt meinen Geschwistern Tina und Tilo für die Hilfe und Unterstützung in allen Fragestellungen und die gemeinsamen Erinnerungen. Es war mir somit möglich meinem Studium zielstrebig nachzugehen, ohne den Spaß und die Freude am Leben zu vernachlässigen.

10. Anhang

10.1. Konstruktionsskizze der Inkubationskammer

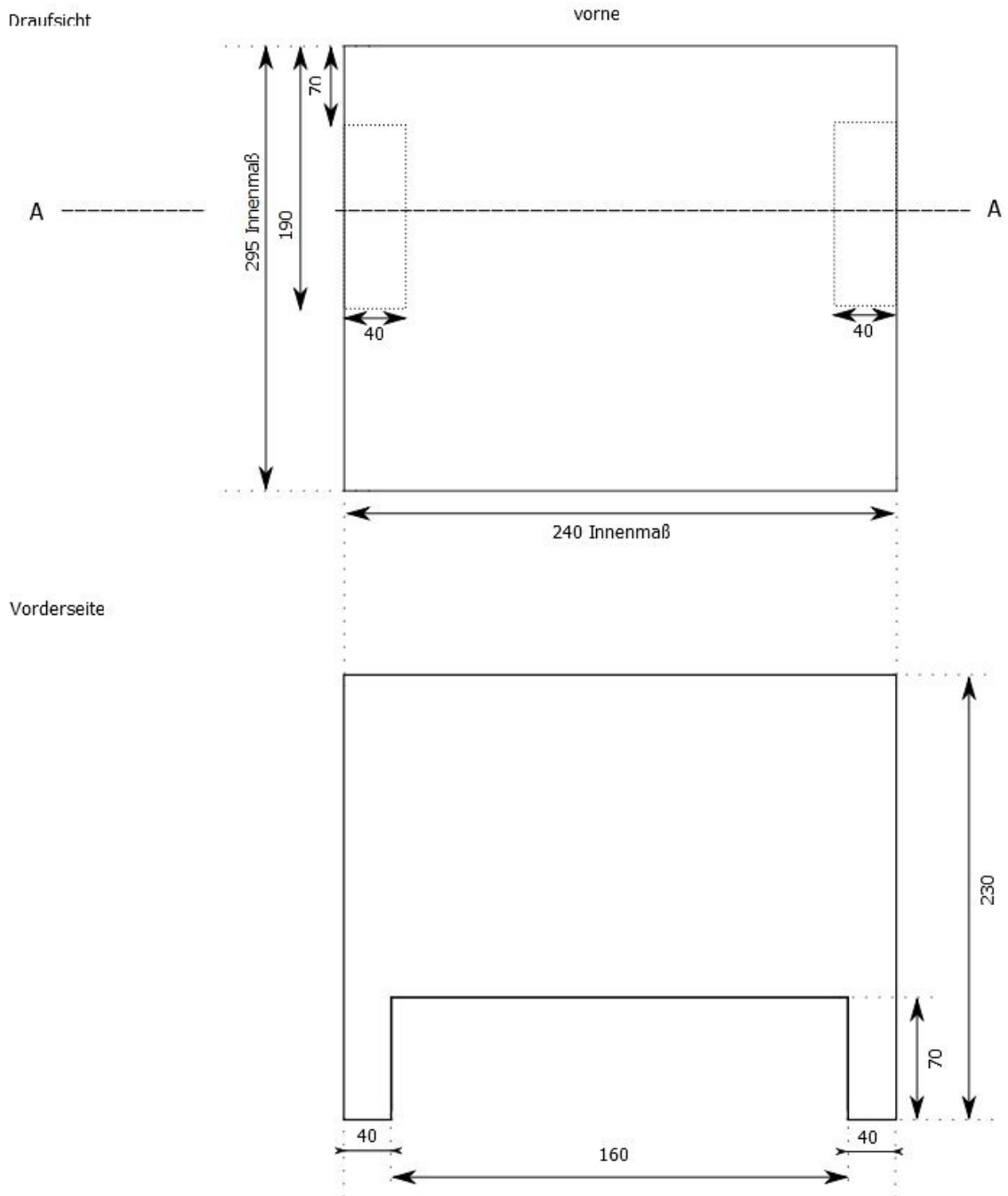
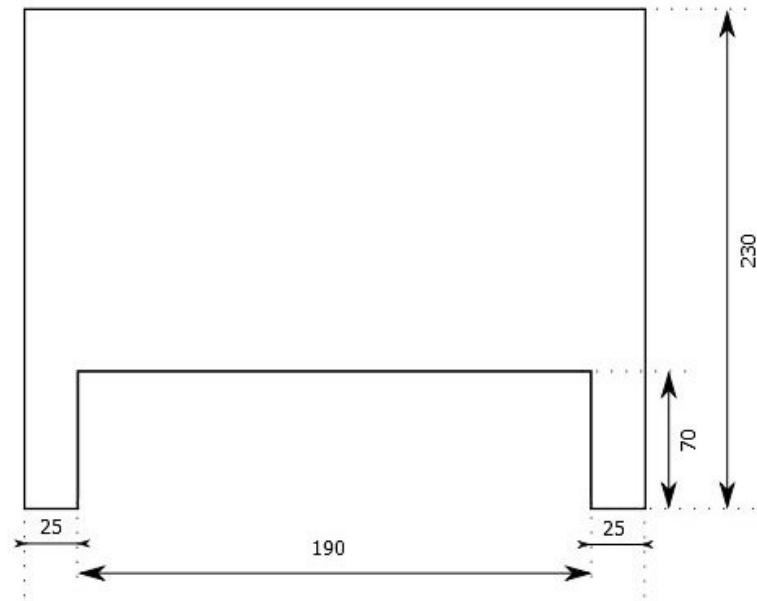


Abbildung 50 Abmessungen der Inkubationskammer als offenes System. Oben: Draufsicht und Unten: Vorderansicht.

Rückseite



Schnitt A

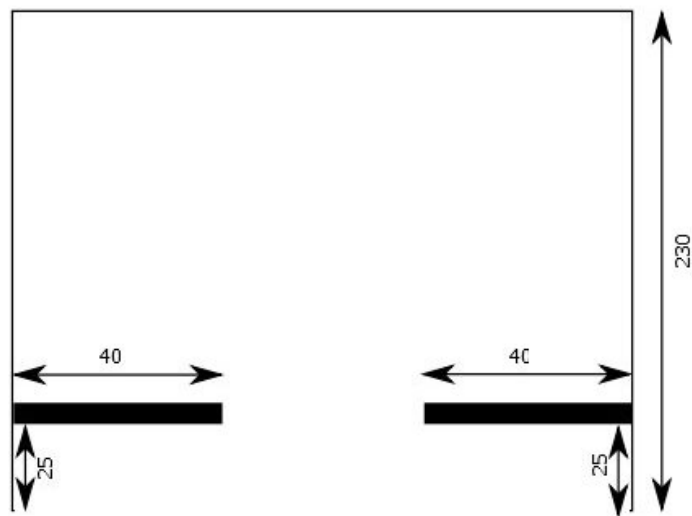


Abbildung 51 Abmessungen der Inkubationskammer als offenes System. Rückansicht und Unten: Querschnitt.

10.2 Verwendete Lösungen und Geräte

Chemikalien

Trivialname	Chemischer Name	Hersteller
Agar-Agar		ROTH
Agarose		ROTH
Ampicillin		ROTH
Ascorbinsäure		ALTAPHARMA/ROSSMANN
Bromphenolblau		SIGMA-ALDRICH
DEPC	Diethylpyrocarbonat	SIGMA-ALDRICH
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	ROTH
Essigsäure		MERCK
Ethanol		Chemikalienlager UniBi
Ethidiumbromid	EtBr	Chemikalienlager UniBi
Formaldehyd		SIGMA-ALDRICH
Formamid		SIGMA-ALDRICH
Gaze		1. Hilfe Kasten
Glucose		VWR
Glycerin		Roth
Hefeextrakt		Deutsche Hefewerke
Imidazol		Chemikalienlager UniBi
Kalziumchlorid	KCl	J.T.BAKER
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	MERCK
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ *H ₂ O	MERCK
Monokaliumphosphat		SIGMA-ALDRICH
	3-(N-Morpholino)	
MOPS	propansulfonsäure	SIGMA-ALDRICH
Natriumacetat		Chemikalienlager UniBi

Trivialname	Chemischer Name	Hersteller
Natriumazid		MERCK
Natriumchlorid	NaCl	FLUKA
Natriumdithionat		J.T.BAKER
Natriumhydroxid	NaOH	ROTH
Natriumphosphat	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	SIGMA-ALDRICH
Phenol		Chemikalienlager UniBi
RNaseZap®		AMBION-APPLIED BIOSYSTEMS
Salzsäure	HCl	J.T.BAKER
SDS	Sodiumdodecylsulfat	Chemikalienlager UniBi
Sojapepton		UD CHEMIE GMBH
Tris		FLUKA
Tris-HCl		FLUKA-J.T.BAKER

Restriktionsenzyme, Polymerase, Marker

A.) Verwendeter Bakterienstamm:

Escherichia Coli Mach1

- Mutationen in der chromosomalen DNA:
recA1398 endA1 tonA Φ[80dΔ (lacZ)M15] ΔlacX74 hsdR(rK- mK+)
- Referenz: Laborbestand Uni Bielefeld, AG Fermentationstechnik

B) Verwendete Restriktionsenzyme:

BsiWI, recombinant

Referenz: New England Biolabs, R0553 S

EcoRI

Referenz: Fermentas, ER0271 5000 units

C.) Verwendete Gelelektrophoresemarker:

RNAMillenniumMarker[®] der Firma *Ambion Inc.* –
Applied Biosystems

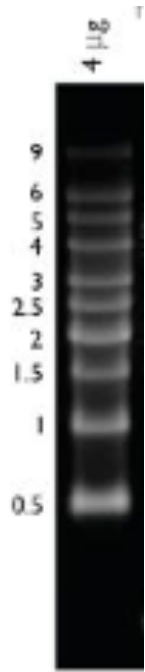


Abbildung 52 Größenmarkierung des *RNAMillenniumMarker* der Firma *Ambion* – *Applied Biosystems* {*Ambion Inc. Applied Biosystems 2008*}

1 Kbp DNA Ladder Molekularer DNA-
Längenstandard der Firma *PlasmidFactory*

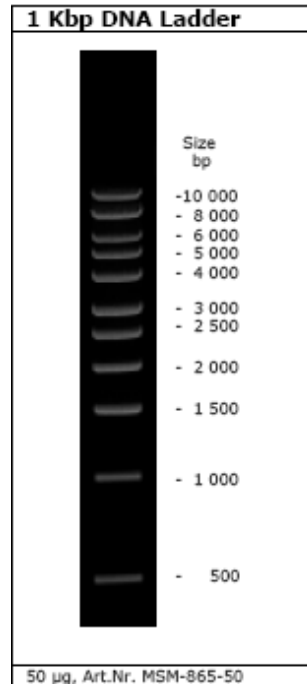


Abbildung 53 1-Kbp DNA Ladder der Firm: *PlasmidFactory* {*PlasmidFactory 2010*}

D) Verwendete Kits:

MEGAscript[®] polymerase kit 40 rxns

Referenz: *Ambion* – *Applied Biosystems*; AM1338

Verwendung: RNA-Transkription T3-Polymerase

QIAprep Spin Miniprep Kit (50)

Referenz: *Qiagen*, 27104

Verwendung: Aufreinigung DNA und Plasmide

Filter Ultracel YM-3 Centrifugal filter devices

Microcon[®]

Referenz: *Millipore*

E) Verwendete Primer:

TMV_5'_Ende: GCACCACGTGTGATTACGGACACAATCCG

50N, Modifizierung: 3'-Biotin

Referenz: Invitrogen

TMV_3'_Ende: GTACCGAGCTCGAATTCGTCTCTCCC

50N, Modifizierung: 3'-Biotin

Referenz: Invitrogen

Geräte**Tabelle 5 Übersicht über die Geräte, Hersteller und Verwendung**

Name	Hersteller	Verwendung
Nanodrop ND-1000	peQLab Biotechnologie GmbH	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen
Thermocycler Unocycler	VWR	Zyklische Thermobehandlung von Proben; für Denaturierung, Hybridisierung, Annealing, PCR
Zentrifugen Tischzentrifuge 5417C Kühlzentrifuge 4K15C Ultrazentrifuge L7-80	Eppendorf SIGMA-ALDRICH BECKMAN Rotor: TFT 45/94 & TFT 65/13	Zentrifugation zur Aufreinigung von biologischen Proben
Waage Analysewaage AE240-S	METTLER-TOLEDO	Massebestimmung
Autoklav 300	ZIRBUS technology - BIOMEDIS	Sterilisieren von Glas, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen

Lösungen und Puffer

A) Kultivierungsmedien für die Plasmidtransformation

Tabelle 6 Übersicht über die nötigen Komponenten zur Herstellung des Kultivierungsmediums SOC

Komponente	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
Soja Pepton	20.00
Hefeextrakt	5.00
NaCl	0.58
$\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	1.02
KCl	0,18
Glucose	0.39
MgCl_2	0.95

Tabelle 7 Übersicht über die nötigen Komponenten zur Herstellung des Kultivierungsmediums SOC

Komponente	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
Soja Pepton	10.00
Hefeextrakt	5.00
NaCl	10.00

B) Pufferlösungen

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTS pH 7,5
NP-Puffer	20 mM KCl 2 mM Tris pH 8,0
TSE-Puffer	25 mM Tris 100 mM NaCl 0,1 mM EDTA
10x-PBS-Puffer	1,37 M NaCl 85 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 27 mM KCl 15 mM KH_2PO_4

DEPC-Lösung 0,5% (v/v) DEPC
Ü.N. inkubieren, anschließend autoklavieren

Virusreinigung:

Extraktionspuffer A	100 mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	10 mM	EDTA
	5 mM	Ascorbinsäure
	pH 7,2	
Extraktionspuffer B	100 mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	10 mM	EDTA
	5 mM	Ascorbinsäure
	5 mM	Natriumdithionat
	pH 7,2	

Plasmidtransformation

Puffer1	0,1 M	CaCl ₂
	2 mM	Tris-HCl
	pH 7,4	
Puffer 2	1 mM	CaCl ₂
	2mM	Tris-HCl
	pH 7,4	

10.3. Protokoll der Sekundärstrukturvorhersage ViennaRNA

Quelle: {Hofacker 2007}



Results for minimum free energy prediction

The optimal secondary structure with a minimum free energy of $-2102.01 \text{ kcal/mol}$

Results for thermodynamic ensemble prediction

The free energy of the thermodynamic ensemble is: $-2223.52 \text{ kcal/mol}$.

The frequency of the MFE structure in the ensemble is 0.00% .

The ensemble diversity is 1448.18 .

The centroid secondary structure with a minimum free energy of $-1650.24 \text{ kcal/mol}$ is given below.

Here you find a mountain plot presentation of the MFE structure, the thermodynamic ensemble of RNA structure, and the centroid structure. Additionally we present the positional entropy for each position.

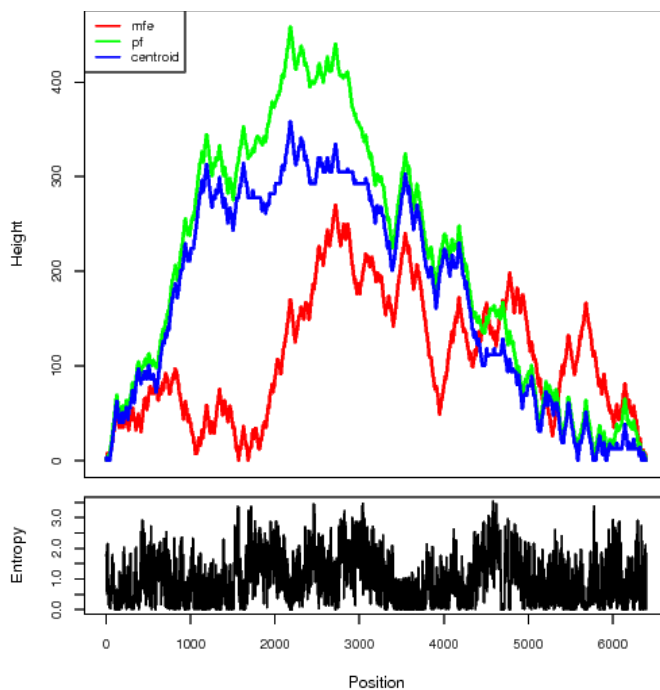


Abbildung 54 Diagramm zur Darstellung der MFE Struktur und der thermodynamischen Zusammensetzung

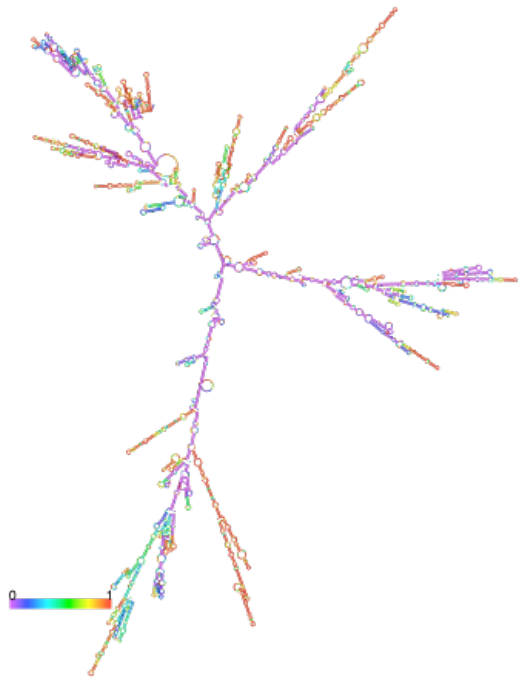


Abbildung 55 Mögliche Zusammensetzung auf Grund der Sequenz der Basenpaare

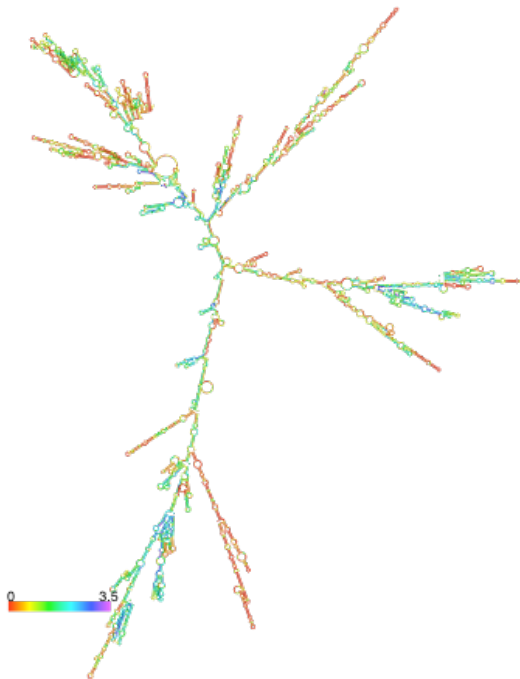


Abbildung 56 Zusammensetzung nach Entropieberechnung

Erstellt am 27.10.2009