

Adressierung und Strukturierung von Biomolekülen auf der Nanometer-Skala

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hauke Clausen-Schaumann
aus Elmshorn

München, 16. März 2000

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Hermann E. Gaub

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Köhler

Tag der mündlichen Prüfung:

25. Juli 2000

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit werden Nanostrukturen aus biologischen Molekülen untersucht, sowie neue Methoden zur Strukturierung biologischer Systeme im nanoskaligen Bereich entwickelt und vorgestellt. Neben selbstorganisierten und enzymatischen Prozessen, wie sie bei der Strukturbildung biologischer Systeme eine wesentliche Rolle spielen, wird insbesondere auch eine neuartige Methode der gerichteten enzymatischen Hydrolyse biologischer Membranen, die eine gezielte Strukturierung im Nanometerbereich ermöglicht, vorgestellt. Vor dem Hintergrund, daß die Natur mit Polynucleinsäuren extrem vielseitige, universell einsetzbare und chemisch sowie molekularbiologisch sehr gut handhabbare molekulare Bausteine für den selbstorganisierten Aufbau hochintegrierter Nanoarchitekturen zur Verfügung stellt, werden ferner die grundlegenden Mechanismen und Kräfte der molekularen Erkennung bei der DNA-Basenpaarung sowie die mechanische Stabilität der DNA-Doppelhelix untersucht.

- Durch kraftmikroskopische Untersuchungen an einer binären Mischung aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) und Diarachidoyl-Phosphatidylcholin (DAPC) konnte erstmals die laterale Struktur von binären Lipidmischungen in Lipiddoppelschichten direkt bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, daß diese biologisch wichtigen Lipide in Lipiddoppelschichten spontan Domänen mit einer charakteristischen Größe von etwa 10 nm bilden. Ein Vergleich der Ergebnisse der kraftmikroskopischen Untersuchungen mit denen von Neutronendiffraktionsexperimenten zeigte eine hervorragende Übereinstimmung der mit diesen beiden komplementären Techniken bestimmten mittleren Domänenabstände.
- Untersuchungen des enzymatischen Abbaus von Lipidmembranen durch das lipolytische Enzym Phospholipase A₂ (PLA₂) erlaubten erstmals Einblicke in die Aktivität dieser Enzyme auf der Einzelmolekülebene. Es konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivität stark von den physikalischen Eigenschaften der Membran abhängig ist und daß Membranen in der Gel-Phase ausschließlich von Membrandefekten her und entlang der Hauptachsen des Molekülkristalls hydrolysiert werden, während die Hydrolyse flüssigkristalliner Membranen im wesentlichen isotrop verläuft. Die am freien Enzym gewonnenen Erkenntnisse konnten dann in einem nächsten Schritt zur Entwicklung einer neuartigen

gerichteten Hydrolyse von Lipidmembranen genutzt werden, bei der mit der Spitze eines Rasterkraftmikroskops gezielt Defekte in kristallin gepackten Membranen induziert werden, und die Membranen dann durch das Enzym an Stellen mit diesen künstlichen Packungsdefekten hydrolysiert wird. Auf diese Weise konnten künstliche Strukturen in festkörpergestützten Membranen mit minimalen Strukturdurchmessern von bis zu 10 nm erzeugt werden.

- Mit Hilfe von kraftspektroskopischen Untersuchungen an einzelnen DNA-Molekülen konnte erstmals ein neuartiger kraftinduzierter Schmelzübergang, der je nach Kraftladungsrate, Umgebungsbedingungen und DNA-Sequenz und Topologie zwischen einigen Piconewton (pN) und etwa 300 pN stattfindet, nachgewiesen werden. Durch Variation von Kraftladungsrate, Ionenstärke, Umgebungstemperatur und DNA-Sequenz konnte gezeigt werden, daß die mechanische Energie die unter Gleichgewichtsbedingungen bis zum kraftinduzierten Schmelzen in der DNA-Doppelhelix deponiert werden kann, hervorragend mit der freien Basenpaarungsenthalpie ΔG_{bp} der entsprechenden DNA-Sequenz unter den jeweiligen Umgebungsbedingungen übereinstimmt. Es konnte gezeigt werden, daß sich mit Hilfe der Temperaturabhängigkeit der mechanischen Stabilität von DNA die thermodynamischen Größen ΔH_{bp} und ΔS_{bp} von DNA direkt aus Kraftexperimenten an einzelnen Molekülen bestimmen lassen. Schließlich konnten die Basenpaarungskräfte von DNA erstmals sequenzspezifisch bestimmt werden. Die zum reißverschlußartigen Aufbrechen einer GC-Basenpaarung nötigen Kräfte betragen demnach 20 ± 3 pN, die zum Aufbrechen einer AT-Basenpaarung nötigen Kräfte 9 ± 3 pN. Auch hier konnte eine sehr gute Übereinstimmung der zum Aufbrechen der Basenpaarungen nötigen mechanischen Energie mit der freien Basenpaarungsenthalpie ΔG_{bp} festgestellt werden.

Inhalt:

1 EINFÜHRUNG	1
2 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	5
3 FESTKÖRPERGESTÜTZTE LIPIDMEMBRANEN	7
3.1 Spreitung aus der Vesikelphase	8
3.2 Filmwaagenbeschichtung	9
4 STRUKTURIERUNG VON LIPIDMEMBRANEN AUF DER NANOMETER-LÄNGENSKALA	11
4.1 Strukturbildung durch Selbstorganisation am Beispiel binärer Lipidmischungen	11
4.1.1 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen am DPPC/DAPC-Mischsystem	13
4.1.2 Vergleich mit Neutronendiffraktionsexperimenten	15
4.1.3 Vergleich mit anderen Methoden	18
4.2 Strukturierung von biologischen Membranen mit Hilfe von Enzymen	18
4.2.1 Einzelne Moleküle bei der Arbeit: Enzymatischer Abbau von Lipidmembranen durch Phospholipase A ₂	20
4.2.1.1 Abbau einer homogenen Lipidmembran	20
4.2.1.2 Abbau einer heterogenen Lipidmembran	27
4.2.2 Enzymverstärkte Nanostrukturierung	29
5 KRAFTSPEKTROSKOPIE	35
5.1 Das Kraftspektrometer	36
5.2 Kraft-Abstandskurven	37
6 ELASTIZITÄT VON POLYMEREN	38
6.1 Die frei verbundene Kette	39
6.2 Die frei rotierende Kette	42
6.3 Die semiflexible Kette	43
6.4 Polyelektrolyte	46
7 ELASTIZITÄT VON DNA: THEORETISCHE MODELLE	49
7.1 Entropischer und linearer Kraftbereich	49
7.2 Der nichtlineare Kraftbereich	49
7.2.1 Semiflexible Kette mit Zwei-Zustands-Modell	50
7.2.2 DNA-Elastizität und Topologie	52
7.2.3 Einfluß der Basenstapelung	55
8 ELASTIZITÄT VON DNA: EXPERIMENTE	57
8.1 Einzelsträngige DNA	57
8.2 Doppelsträngige DNA	59
8.2.1 Das Kraftspektrum	59
8.2.2 Die topologischen Randbedingungen	62
8.2.3 DNA Schmelz- und Basenpaarungskinetik	65
8.2.4 Elektrostatik und DNA-Stabilität	71
8.2.5 Temperatur: Der entropische Beitrag zur DNA-Stabilität	74
8.2.6 Die Sequenzabhängigkeit	76
8.3 Die Basenpaarungskräfte von DNA	78
9 AUSBLICK	81
10 REFERENZEN	83

1 Einführung

Mit der Entwicklung von neuen experimentellen Techniken, die zum einen eine Ångström genaue Positionierung und zum anderen eine präzise Messung und Kontrolle der auftretenden Wechselwirkungen erlauben, ist es einerseits möglich geworden, kleinste Strukturen bis hin zu einzelnen Atomen mit höchster Auflösung zu vermessen und sie andererseits auch gezielt zu verändern und aus ihren Bestandteilen neue Strukturen aufzubauen [1]. Besonders die sogenannten Rastersondenverfahren [2, 3] haben sich in jüngster Zeit zunehmend von reinen bildgebenden Mikroskopietechniken zu hoch präzisen Werkzeugen auf der atomaren und der molekularen Längenskala entwickelt [4-6]. Mit Hilfe dieser Werkzeuge ist es möglich geworden, eine Vielzahl von Materialien auf der Nanometer-Skala gezielt zu handhaben und zu strukturieren [4, 5, 7-18] und so nicht nur der Miniaturisierung im technischen Bereich neue Dimensionen zu eröffnen, sondern auch die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser mesoskopischen Systeme im Grenzbereich zwischen klassischer Mechanik, Quantenmechanik und statistischer Physik besser zu verstehen [19].

Während im technischen Bereich zur Strukturierung meist ein sogenannter *top-down* Ansatz gewählt wird — d. h. aus makroskopischen Materialien immer kleinere Strukturen hergestellt werden — bedient sich die Natur fast immer des sogenannten *bottom-up* Ansatzes: komplexe Strukturen von molekularen Dimensionen bis hin zu vielzelligen Lebewesen werden direkt aus ihren Grundbestandteilen, den einzelnen Atomen und kleinen molekularen Bausteinen, aufgebaut. Der Versuch, so komplexe Gebilde, wie etwa einen vielzelligen Organismus oder einen Mikrochip mit einigen Millionen Transistoren von unten herauf aus ihren atomaren und molekularen Bestandteilen Stück für Stück aufzubauen, scheint wegen der Vielzahl der dazu nötigen Schritte ($\gg 10^{23}$) eine unlösbare Aufgabe. Die Natur bedient sich dazu jedoch einiger im Prinzip einfacher und zugleich hocheffizienter Hilfsmittel, wie der molekularen Erkennung, der darauf beruhenden Selbstorganisation und einer Vielzahl spezifischer molekularer Werkzeuge, den Enzymen. So entstehen biologische Membranen beispielsweise im wesentlichen durch Selbstorganisation aus ihren molekularen Bausteinen, den Lipiden. Nucleinsäuren erkennen

selbständig komplementäre Sequenzen und Enzyme ihre Substrate. Die einzelnen molekularen Bauelemente und Werkzeuge sind, anschaulich gesprochen, mit genügend Intelligenz ausgestattet, um selbständig ihren Platz und ihre Aufgabe im Organismus zu finden. Das ermöglicht ein in höchstem Maße paralleles Vorgehen beim Aufbau komplexer Strukturen¹.

Parallel zu den Fortschritten auf dem Gebiet der Rastersondentechniken und der gezielten Manipulation von Materie auf kleinster Skala, haben sich die Molekularbiologie und die darauf beruhende Biotechnologie in den letzten Jahren zu mächtigen Werkzeugen entwickelt, die es erlauben, gezielt in die Biosynthese einzugreifen und so neue intelligente molekulare Bausteine und Werkzeuge herzustellen. Die molekularen Baustoff- und Werkzeugfabriken der Zelle werden dabei quasi neu programmiert und gezielt zur Synthese bestimmter Substanzen eingesetzt. So ist es z. B. mit Hilfe der Gentechnik möglich geworden, DNA und damit auch Proteine gezielt zu verändern und zu vervielfältigen [22-25]. Es lassen sich für fast jede Ausgangssubstanz hoch spezifische monoklonale Antikörper herstellen, die an diese Substanz selektiv binden [26-28] und als Pharmaka, aber auch beim Nachweis des entsprechenden Antigens, eine wichtige Rolle spielen [29]. Auch lassen sich mit Hilfe molekularbiologischer Methoden inzwischen eine Vielzahl von Enzymen für bestimmte Aufgaben maßgeschneidert herstellen [30]. Die Einsatzgebiete solcher Enzyme reichen dabei von medizinischen Anwendungen [31] über den Abbau von Schadstoffen und Umweltgiften [32] bis zur Synthese neuer biologisch abbaubarer Werkstoffe [33, 34]. Vor diesem Hintergrund scheint es vielversprechend, die Möglichkeiten der Strukturierung und Manipulation im nanoskaligen Bereich mit den Werkzeugen und Methoden der Biologie zu kombinieren, um so einerseits zu einem besseren Verständnis der grundlegenden Mechanismen und Wechselwirkungen bei der Selbstorganisation, der molekularen Erkennung und bei enzymatischen Prozessen zu gelangen, und andererseits die biologischen Werkzeuge und Methoden für neue technische Anwendungen nutzbar zu machen.

¹ Beispiele für die Anwendung dieser Selbstorganisationsmechanismen sind die in Abschnitt 3 vorgestellten Techniken zum Aufbau mono- und bimolekularer Filme mit wohldefinierter lateraler Struktur, die in Abschnitt 4 untersuchten Nanostrukturen in Lipiddoppelschichten, aber auch der Aufbau supramolekularer Strukturen aus Polynucleinsäuren [20] und die in Anhang D vorgestellten DNA-Lipid-Komplexe. Auch die supramolekulare Chemie bedient sich solcher Selbstorganisationsmechanismen zum Aufbau komplexer Strukturen und Makromoleküle [21].

Zur Handhabung biologischer Systeme im molekularen oder nanoskaligen Bereich ist es wichtig, unter nativen Bedingungen, also in wäßrigen Lösungen, arbeiten zu können und die dabei auftretenden Kräfte präzise zu kontrollieren. Das Rasterkraftmikroskop [2] vereinigt diese beiden Voraussetzungen in idealer Weise mit Ångström genauer Positionierbarkeit und einer atomar scharfen Sonde [35-41] und ist somit ideal zur Nanostrukturierung mit biologischen Werkzeugen geeignet. Zusammen mit der Entwicklung von optischer und magnetischer Pinzette, hat seine Entwicklung aber auch mechanische Experimente an einzelnen Molekülen möglich gemacht, mit denen eine Vielzahl neuer Erkenntnisse sowohl über inter- als auch intramolekulare Kräfte und Wechselwirkungen gewonnen werden konnte [6, 42]. So wurden mit der sogenannten Einzelmolekül-Kraftspektroskopie erstmals die Bindungskräfte von biologischen Rezeptor-Ligand-Systemen, die in der molekularen Erkennung eine zentrale Rolle spielen untersucht [43-53]. Aber auch grundlegende physikalische Fragestellungen konnten auf diese Weise erstmals aufgeklärt werden. So führten beispielsweise mechanische Untersuchungen an einzelnen Polymeren, die über den durch entropische Rückstellkräfte dominierten Kraftbereich hinaus gedehnt wurden, zu völlig neuen Modellen in der Polymerphysik, die weit über die klassischen Polymermodelle hinaus gehen und auch Bindungswinkeldeformationen und Konformationsübergänge berücksichtigen [54-61]. Ferner geben derartige Einzelmolekülexperimente einen detaillierten Einblick in die Größe und Art der Schwankungen wichtiger physikalischer Parameter einzelner Moleküle um deren statistische Mittelwerte [62, 63], und selbst so elementare Fragestellungen, wie die nach der mechanischen Belastbarkeit kovalenter Bindungen konnten mit derartigen Experimenten erstmals direkt beantwortet werden [64].

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für zahlreiche biologische, medizinische und technologische Fragestellungen, galt den mechanischen Eigenschaften einzelner DNA-Moleküle sowie den bei der DNA-Basenpaarung auftretenden Kräften und Wechselwirkungen von Anfang an ein besonderes Interesse von Physikern und Biologen [62, 65-70]. So muß bei der DNA-Transkription beispielsweise das Enzym RNA-Polymerase die DNA-Doppelhelix lokal entwinden und die Basenpaare trennen, um die DNA abzulesen und sogenannte *messenger*-RNA herzustellen [71-74], aus der dann mit Hilfe des genetischen Codes Proteine hergestellt

werden. Bei der Zellteilung muß die Doppelhelix sogar vollständig aufgetrennt werden [75]. Die Expression und Regulation bestimmter Gene, also die Frage, welches Protein wann hergestellt werden soll, wird u. a. über die Torsionsspannung innerhalb bestimmter Bereiche der DNA gesteuert [76]. Auch die Wirksamkeit vieler Krebsmedikamente, sogenannter Cytostatica, beruht darauf, daß sie insbesondere die mechanische Stabilität von DNA nachhaltig beeinflussen und so in die oben genannten Prozesse eingreifen [77-80]. Die zum Aufbrechen der DNA-Doppelhelix nötigen Kräfte spielen aber auch bei zahlreichen technischen Anwendungen, wie etwa Gentests oder Expressionsanalysen mit sogenannten DNA-Chips [81-85] oder dem oft vorgeschlagenen Sequenzieren von DNA durch mechanisches Auseinanderziehen der Doppelhelix [86] eine wichtige Rolle. Ein grundlegendes Verständnis der bei der DNA-Basenpaarung auftretenden Kräfte ist nicht zuletzt auch unverzichtbare Voraussetzung, wenn man die hohe Spezifität bei gleichzeitig extrem hoher Variabilität der molekularen Erkennung bei der DNA-Basenpaarung (4^N mögliche Kombinationen bei einem Strang mit N Basen) zum Aufbau hoch integrierter komplexer Nanoarchitekturen aus dem Reagenzglas in einem parallelen *bottom-up* Ansatz nutzen möchte [20, 87-95]. Das gilt insbesondere für die Abschätzung von deren Stabilität und für die geeignete Wahl komplementärer Sequenzen und kohäsiver Enden, sowie für die Abschätzung von Fehlerraten und Toleranzen der dabei eingesetzten Verfahren. Schließlich erfordert auch die Beantwortung der Frage, ob sich komplementäre DNA-Stränge möglicherweise als Koppler, etwa zur direkten Anbindung molekularer Werkzeuge an die Kraftmikroskopspitze, einsetzen lassen eine genaue Kenntnis der bei der DNA-Basenpaarung auftretenden Kräfte und Wechselwirkungen.

In dieser Arbeit werden zunächst selbstorganisierte Nanostrukturen in festkörpergestützten biologischen Membranen untersucht. Am Beispiel des Enzyms Phospholipase A₂ wird der enzymatische Abbau solcher Membranen auf der Ebene einzelner Moleküle verfolgt, und in einem nächsten Schritt wird diese Enzym zur gezielten Strukturierung von Membranen im Nanometerbereich eingesetzt. Schließlich werden die mechanische Stabilität der DNA-Doppelhelix sowie die Basenpaarungskräfte von DNA vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Fragestellungen eingehend untersucht.

2 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscope*, AFM) [2] gehört, wie auch das Rastertunnelmikroskop [3] oder das optische Rasternahfeldmikroskop [96] zu den Rastersondenmikroskopen, bei denen eine feine Sonde in das Nahfeld der zu untersuchenden Probe gebracht wird und diese mittels mechanischer Stellelemente abgerastert wird. Im Gegensatz zu anderen Mikroskopietechniken, wie Licht- oder Elektronenmikroskopie, bei denen die maximal erreichbare Ortsauflösung durch die Wellenlänge der verwendeten Strahlung begrenzt ist, macht man sich bei den Rastersondentechniken zunutze, daß die zur Kontrastgebung verwendeten Nahfelder eine sehr starke Abstandsabhängigkeit aufweisen und dadurch eine sehr hohe Ortsauflösung ermöglichen. Das bedeutet jedoch auch, daß die Sonde in die unmittelbare Nähe des zu untersuchenden Objekts gebracht werden muß. Diese Techniken eignen sich deshalb insbesondere für die Untersuchung von Grenzflächen. Da beim Rasterkraftmikroskop, anders als beim Rastertunnelmikroskop Kräfte und nicht Ströme gemessen werden, eignet es sich besonders gut zur Untersuchung biologischer Systeme unter nativen Bedingungen [72, 97-101].

Zur Kontrastgebung dienen beim Rasterkraftmikroskop vor allem die Pauli-Abstoßung [102] und die van-der-Waals Wechselwirkung [103]. Zusätzlich können auch noch elektrostatische, magnetische oder chemische Bindungskräfte auftreten [103-105]. Das Meßprinzip beruht darauf, daß eine scharfe Spitze, die am Ende einer weichen Blattfeder montiert ist, über eine Oberfläche bewegt wird und dabei die Oberflächentopographie abtastet [104]. Die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe führt zu einer Auslenkung der Blattfeder. Diese Auslenkung wird dann in der Regel mit Hilfe eines Laserstrahls, der von der Rückseite der Blattfeder reflektiert wird, eines sogenannten *optischen Zeigers*, verstärkt und mit einer segmentierten Photodiode detektiert. Als Abtastnadeln werden meist Spitzen aus Silizium oder Siliziumnitrid verwendet, die zusammen mit der Blattfeder aus einem Stück hergestellt sind; man spricht deshalb auch von *integrierten Spitzen* (vgl. Anhang A). Die Differenz des Photostroms zwischen beiden Segmenten ist dann für kleine Auslenkungen der Blattfeder

direkt proportional zur Federauslenkung. Aus technischen Gründen wird die Spitze meist nicht direkt bewegt, sondern die zu untersuchende Probe wird mittels eines Piezostellelements relativ zur Spitze bewegt. Der schematische Aufbau eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

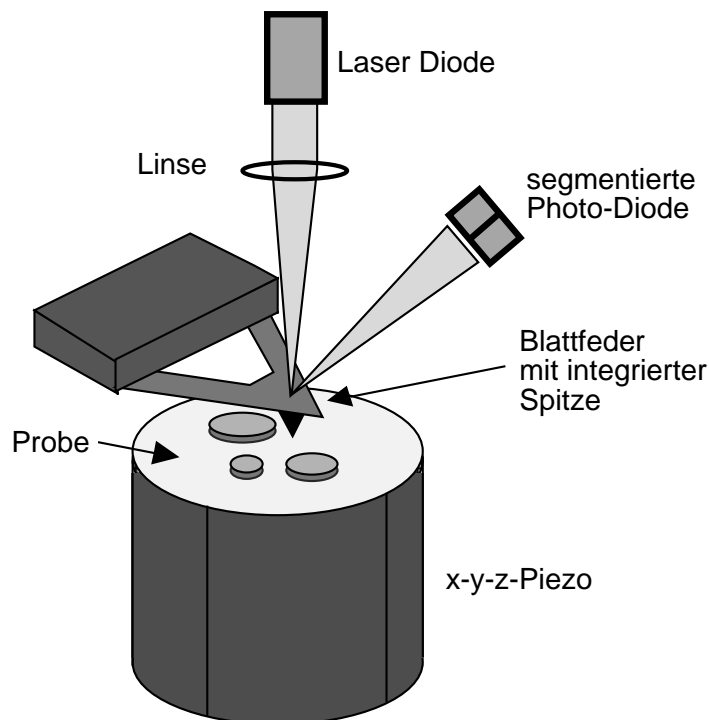


Abbildung 2.1 Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops: Die Probe wird mit Hilfe des Piezostellelements abgerastert und die Auslenkung der Blattfeder mittels Lichtzeiger verstärkt und in der positionsempfindlichen Photodiode detektiert.

Im einfachsten Fall wird die Probe zur Bildgewinnung in x - und y -Richtung abgerastert, die Differenz des Photostroms von einem Meßrechner in Grauwerte umgesetzt und als zweidimensionales Abbild der Probentopographie dargestellt. Es ist aber auch möglich mittels einer Nachregelung die Probenhöhe so zu verändern, daß die Verbiegung der Blattfeder und damit die Auflagekraft konstant bleibt. In diesem Fall gibt die Auslenkung des z -Piezos und nicht die Verbiegung der Blattfeder die Probentopographie wieder. Seit seiner Einführung 1986 durch Binnig, Quate und Gerber [2] wurden die Einsatzbereiche des Rasterkraftmikroskops durch eine Vielzahl neuer Betriebsmodi stetig erweitert. Eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Betriebsmodi sowie deren Einsatzmöglichkeiten findet sich in Anhang A.

3 Festkörpergestützte Lipidmembranen

Lipide sind neben den Membranproteinen die Hauptbestandteile biologischer Membranen [75]. Aufgrund ihres amphiphilen Aufbaus aus einer polaren und damit hydrophilen Kopfgruppe und aliphatischen, hydrophoben Schwänzen bilden sie an Grenzflächen zwischen hydrophilen und hydrophoben Medien, wie beispielsweise der Wasser-/Luft-Grenzfläche, spontan Monoschichten und reduzieren so die Grenzflächenenergie γ [106]. Innerhalb eines homogenen Mediums bilden sie je nach Medium und Konzentration spontan eine Vielzahl komplexer selbstorganisierter Strukturen [107-111]. Neben der Wechselwirkung mit dem Medium ist die Wechselwirkung der einzelnen Lipide untereinander dabei die treibende Kraft. Der amphiphile Charakter der Lipide hat zur Folge, daß sich die hydrophilen Köpfe bevorzugt nebeneinander anordnen; dasselbe gilt für die hydrophoben Schwänze. Geometrische Überlegungen, wie z. B. der Platzbedarf von Kopf- und Schwanzgruppe entscheiden darüber, ob planare oder gekrümmte Strukturen bevorzugt gebildet werden [103]. In wäßrigen Lösungen bilden Lipide unter anderem spontan molekulare Doppelschichten aus [112-115], die wesentlich für den Aufbau und die Struktur biologischer Membranen verantwortlich sind [116]. Damit gehören Lipide zu den wichtigsten strukturbildenden Molekülen in biologischen Systemen.

Neben den zum Teil sehr komplexen dreidimensionalen Strukturen, die Lipide in wäßrigen Lösungen bilden können, steht bei vielen biologischen Fragestellungen die laterale Struktur der Lipide innerhalb der Zellmembran im Vordergrund. Diese ist für zahlreiche biologische Prozesse, wie die Zell-Zell Erkennung, die Funktion von Membranproteinen, oder das Binden von Enzymen und anderen Stoffen an die Membran, aber auch die elektrischen sowie die mechanischen Eigenschaften der Zellmembran von Bedeutung [117].

Zur Charakterisierung der lateralen Struktur von Lipidmembranen mit der Rasterkraftmikroskopie, aber auch mit anderen Techniken, wie beispielsweise Neutronendiffraktion oder Fluoreszenzmikroskopie, ist es meist nötig, die Lipiddoppelschicht auf einem Festkörpersubstrat zu fixieren [118]. Um das zu erreichen, werden die Lipide

entweder aus der Vesikelphase auf dem Substrat gespreitet, oder mittels einer Filmwaage auf das Substrat übertragen.

3.1 Spreitung aus der Vesikelphase

Lipide bilden in der wäßrigen Phase unter geeigneten Bedingungen geschlossene Schalen aus Lipiddoppelschichten, sogenannte *Vesikel* — gelegentlich auch als *Liposomen* bezeichnet [112]. Bei der Spreitung aus der Vesikelphase, der sogenannten *Vesikelfusion* [119, 120] wird eine Suspension aus Lipidvesikeln auf einem Festkörpersubstrat aufgebracht. Besteht zwischen Substrat und Lipiden eine ausreichend starke attraktive Wechselwirkung — meist genügt die van-der-Waals-Wechselwirkung — so lagern sich die Vesikel an der Festkörperoberfläche an, werden dort flach gezogen und zerplatzen, so daß eine Lipidinsel auf der Festkörperoberfläche zurück bleibt. Benachbarte Inseln können dann an den Rändern miteinander fusionieren, bis schließlich die gesamte Festkörperoberfläche mit einer Doppelschicht aus Lipiden bedeckt ist. Durch Aufheizen der Probe läßt sich die laterale Beweglichkeit der Lipide auf dem Substrat erhöhen und so eine optimale Bedeckung der Probe erreichen [121] (vgl. auch Anhang A, sowie Abbildung 3.1 und [122, 123]).

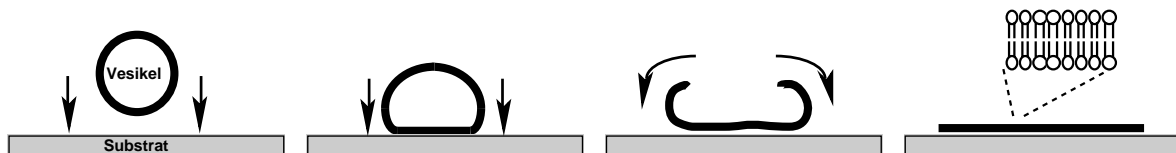


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Spreitung einer Lipiddoppelschicht aus der Vesikelphase.

Der Vorteil der Vesikelfusion gegenüber anderen Techniken besteht neben der einfachen Präparation darin, daß mit der Vesikelfusion hergestellte festkörpergestützte Lipiddoppelschichten das Verhalten der Lipide in biologischen Membranen verhältnismäßig gut widerspiegeln. Hingegen ist in mit der Filmwaage übertragenen Lipiddoppelschichten oft die Struktur der entsprechenden Monoschichten eingefroren [124]. Diese kann sich insbesondere in Mischsystemen deutlich von der Struktur einer entsprechenden Doppelschicht in Wasser unterscheiden [125]. Der Nachteil der Vesikelfusion besteht aber darin, daß kein direkter Einfluß auf die Packungsdichte der Lipide innerhalb der Doppelschicht

möglich ist. Ferner finden sich meist deutlich mehr und größere Defekte, als in Lipiddoppelschichten, die mit einer Beschichtungsfilmwaage übertragen wurden.

3.2 Filmwaagenbeschichtung

Die Filmwaagenbeschichtung beruht darauf, daß Lipide an der Wasser-/Luft-Grenzfläche spontan Monoschichten bilden (siehe oben). Die Lipide in diesen Monoschichten können dann mit einer beweglichen Barriere (vgl. Anhang A) soweit komprimiert werden, bis ihre Packungsdichte der gewünschten Lipiddichte in der festkörpergestützten Probe entspricht [126]. Zur Beschichtung mit jeweils einer Lipidmonolage wird das Festkörpersubstrat dann durch die Wasser-/Luft-Grenzfläche getaucht. Dabei ist zu beachten, daß die Lipidmonoschicht nur dann stabil auf das Substrat übertragen werden kann, wenn die hydrophilen Köpfe der Lipide auf hydrophile Oberflächen und die hydrophobe Schwänze auf hydrophobe Oberflächen übertragen werden. Deshalb wird eine hydrophile Festkörperoberfläche vom Wasser aus, also von unten, durch die mit Lipiden bedeckte Wasser-/Luft-Grenzfläche bewegt. Eine hydrophobe Oberfläche wird entsprechend von oben durch die Grenzfläche bewegt. Durch das Übertragen einer Lipidmonolage wird aus einer hydrophilen Oberfläche eine hydrophobe Oberfläche; das entsprechend Umgekehrte gilt für eine ursprünglich hydrophobe Oberfläche (vgl. auch Abbildung 3.2). Nach einer ersten Beschichtung kann der Vorgang also in umgekehrter Richtung wiederholt werden, um eine zweite Lipidschicht aufzubringen. Dieser Prozeß kann dann im Prinzip beliebig oft wiederholt werden. Zur Beschichtung eines hydrophilen Substrats mit einer Lipiddoppelschicht hat es sich in der Praxis als vorteilhaft erwiesen, beim ersten Transfer das Substrat vertikal durch die Wasser-/Luft-Grenzfläche zu ziehen, und es beim zweiten Transfer horizontal durch die Grenzfläche zu tauchen [127]. Ersteres wird auch als *Langmuir-Blodgett*-, letzteres als *Langmuir-Schäfer*- Methode bezeichnet [126, 128-130].

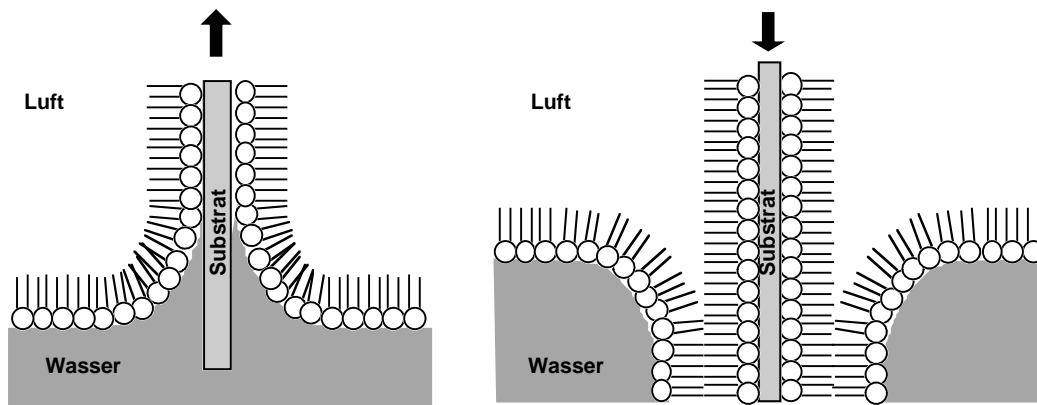


Abbildung 3.2 Übertrag einer Lipiddoppelschicht auf ein hydrophiles Substrat mit dem *Langmuir-Blodgett*-Verfahren.

Mit Hilfe einer Filmwaage können aber nicht nur Monolagen amphiphiler Moleküle auf ein Substrat übertragen werden, sondern es lassen sich auch zahlreiche Informationen über das Packungsverhalten und die laterale Ordnung in der Monoschicht gewinnen [131]. Der Transferdruck kann dann so gewählt werden, daß die Lipide beim Übertrag auf das Substrat in einer gewünschten Konformation vorliegen (vgl. Anhang A).

4 Strukturierung von Lipidmembranen auf der Nanometer-Längenskala

4.1 Strukturbildung durch Selbstorganisation am Beispiel binärer Lipidmischungen²

Lipide sind, wie bereits im letzten Abschnitt erwähnt, neben Membranproteinen die wichtigsten Bestandteile biologischer Membranen. Membranen bestehen dabei in der Regel nicht nur aus einer Sorte, sondern aus einer Vielzahl unterschiedlicher Lipide, die in der Membran zu einer lateralen Strukturbildung führen. Für viele der Membranfunktionen, z. B. bei der Zelladhäsion oder dem Aufbau eines Membranpotentials sind zwar Membranproteine verantwortlich [75], aber die laterale Organisation der Lipide innerhalb der Membran aktiviert und steuert zahlreiche Proteine und beeinflusst somit mittelbar die Funktionalität der Membran [132-139]. Darüber hinaus hängen die dynamischen und mechanischen Eigenschaften der Membran unmittelbar von der lateralen Struktur der Lipide ab [113, 140].

Mikrokalorimetrische Untersuchungen an Lipidmischungen haben gezeigt, daß diese durch die reguläre Lösungstheorie beschrieben werden können [141, 142]. Zusammen mit Monte-Carlo Simulationen [143] weisen sie darauf hin, daß es unter biologisch relevanten Bedingungen zur Phasenseparation in Lipiddoppelschichten und damit zu Domänenbildung kommt. Obwohl solche Domänen in Lipidmonoschichten mit optischen Methoden intensiv untersucht wurden [109, 144-146] ist es bisher nicht gelungen, diese auch in den biologisch relevanteren Lipiddoppelschichten direkt nachzuweisen und deren Größe und Struktur zu bestimmen. Indirekte Untersuchungen legen jedoch nahe, daß die zu erwartenden Domänengrößen unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen [147-151]. Da jedoch bereits Domänen im Nanometerbereich starken Einfluß auf die Funktionalität der Membran haben können [117],

² In diesem Abschnitt wird die Strukturbildung auf der Nanometer-Längenskala exemplarisch an binären Lipidmischungen untersucht. Weitere Beispiele zum selbstorganisierten Aufbau nanoskaliger Strukturen mit Hilfe von Lipiden finden sich in Anhang D und E.

liegt es nahe, Größe und Struktur dieser Domänen mit hochauflösenden Techniken, wie etwa der Rasterkraftmikroskopie, aber auch der Neutronenbeugung [152, 153] zu untersuchen.

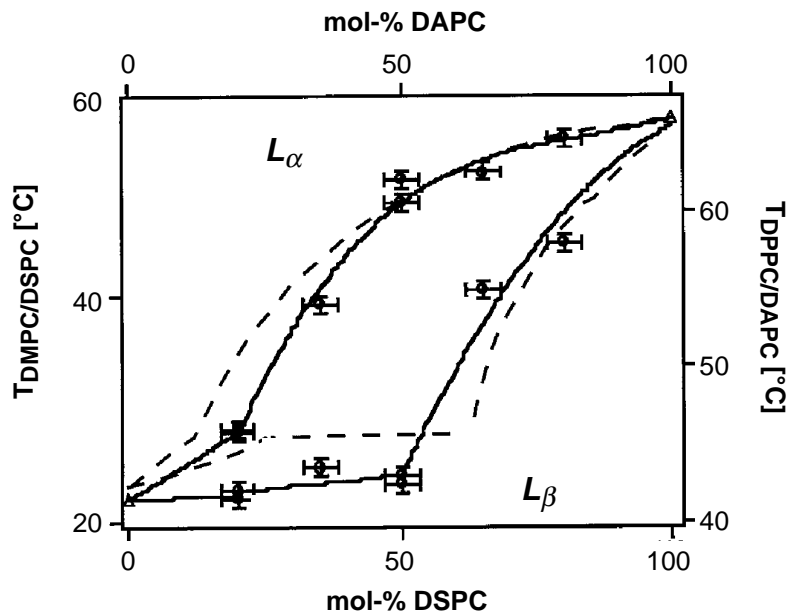


Abbildung 4.1 Mittels Mikrokolorimetrie (DSC) aufgenommenes Phasendiagramm einer DPPC/DAPC-Mischung (durchgezogene Linie u. Messpunkte) und einer DMPC/DSPC-Mischung (gestrichelte Linie) in Wasser; entnommen aus [122]. Oben sind alle Lipide in der fluiden Phase (L_{α}), unten in der Gel-Phase³ (L_{β}). Dazwischen ist eine Mischungslücke zu erkennen, in der beide Phasen koexistieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Domänenbildung bei den in biologischen Membranen häufig vorkommenden Phosphatidylcholinen (PC) [75] untersucht. Dazu wurde eine äquimolare binäre Mischung aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) und Diarachinoyl-Phosphatidylcholin (DAPC), die identische zwitterionische Kopfgruppen besitzen und sich ausschließlich in der Länge ihrer hydrophoben Kohlenwasserstoffketten unterscheiden, verwendet. Die Palmitinsäure von DPPC enthält 16 über Einfachbindungen miteinander verbundene Kohlenstoffatome; die Arachidinsäure von DAPC enthält 20 einfach verbundene Kohlenstoffatome [154] (siehe auch Anhang A). Bei einer Bindungslänge der C-C-Einfachbindung von 1.54 Å und einem Bindungswinkel von ca. 110° ergibt das einen Längenunterschied der hydrophoben Schwänze von 5.1 Å. Dieses sogenannte hydrophobe

³ Man spricht von der *Gel-Phase* (oder auch L_{β} -Phase), wenn die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten in einem hexagonalen Gitter angeordnet sind. Der Übergang von der Gel-Phase in die lateral ungeordnete fluide Phase (auch flüssig kristalline oder L_{α} -Phase genannt) wird auch als Kettenschmelz- oder Hauptphasenumwandlung bezeichnet.

mismatch führt in Gegenwart von Wasser zu einer Randspannung entlang der DPPC/DAPC Phasengrenze und damit dazu, daß sich Lipide gleicher Schwanzlänge zu Domänen zusammenlagern. Andererseits sorgt die Entropie für eine möglichst gute Durchmischung beider Lipide, so daß die Domänengröße im thermodynamischen Gleichgewicht durch das Minimum der freien Enthalpie ΔG gegeben ist [155, 156]. Das Phasendiagramm der DPPC/DAPC-Mischung (Abbildung 4.1) weist eine deutliche Mischungslücke auf, was ein klarer Hinweis auf die Existenz zweier unterschiedlicher Phasen unterhalb der sogenannten Liquiduslinie, also bei äquimolarer Mischung unterhalb von 61°C ist.

4.1.1 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen am DPPC/DAPC-Mischsystem

Abbildung 4.2 A und B zeigen rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer festkörpergestützten Lipiddoppelschicht aus DPPC und DAPC. Abbildung 4.2 C zeigt zum Vergleich eine reine DAPC-Doppelschicht, die unter identischen Bedingungen wie die in A und B gezeigte Lipiddoppelschicht hergestellt und mit dem Kraftmikroskop abgebildet wurde⁴. In Abbildung 4.2 A und B sind deutliche getrennte helle und dunkle Bereiche zu erkennen, die im wesentlichen zwei verschiedenen Höhenstufen entsprechen. Der Höhenunterschied beträgt $4.1 \pm 1 \text{ \AA}$, die laterale Ausdehnung der Bereiche variiert zwischen 4 nm und 60 nm. In Abbildung 4.2 C sind dagegen weder eine ausgeprägte Struktur noch Höhenstufen zu erkennen. Die größten gemessenen Höhenunterschiede auf dieser Probe betragen nur etwa 1-2 Å und sind damit deutlich niedriger, als die in Abbildung 4.2 A und B auftretenden Stufen von 4 Å.

Die Tatsache, daß der Höhenunterschied zwischen hellen und dunklen Bereichen etwa dem theoretisch erwarteten Längenunterschied der beiden Lipide von 5 Å entspricht, sowie die Tatsache, daß helle und dunkle Bereiche jeweils etwa 50% der untersuchten Oberflächen ausfüllen, deutet darauf hin, daß es sich bei den Bereichen um Domänen handelt, in denen jeweils eines der beiden Lipide in angereicherter Form vorliegt.

⁴ Alle in diesem Abschnitt gezeigten Lipiddoppelschichten wurden mittels Spreitung aus der Vesikelphase hergestellt (vgl. auch Abschnitt 3.1 sowie Anhang A). Die Dicke der Lipidmembranen wurde am Rand des gezeigten zusammenhängenden Membranausschnitts bestimmt. Der Höhenunterschied zum darunterliegenden Glimmersubstrat beträgt $6,8 \pm 0,2 \text{ nm}$. Das entspricht der zu erwartenden Dicke einer Lipiddoppelschicht [154, 157].

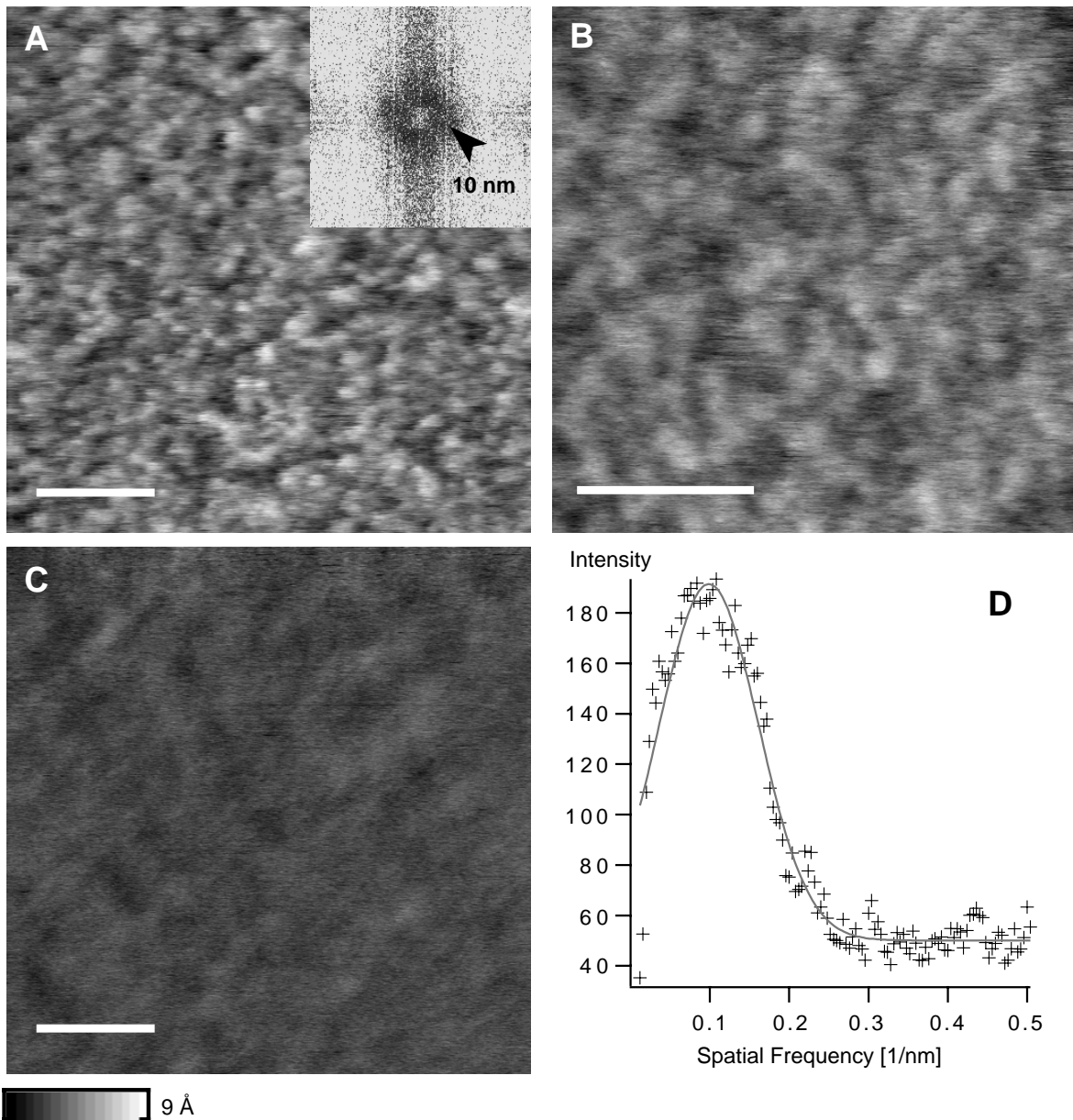


Abbildung 4.2 (A, B) Kraftmikroskopabbildungen einer äquimolaren DPPC/DAPC-Doppelschicht auf einem Glimmersubstrat in deionisiertem Wasser (25°C). Die hellen Bereiche entsprechen Domänen aus DAPC, die dunklen Bereiche DPPC-Domänen. Der Höhenunterschied zwischen hellen und dunklen Bereichen entspricht etwa 4 Å. Das in (A) eingefügte Bild zeigt die Differenz der Fouriertransformierten von A und C. Ein dunkler Ring bei etwa $(10 \text{ nm})^{-1}$ ist klar zu erkennen. (C) Kraftmikroskopabbildung einer reinen DAPC-Doppelschicht. Hier beträgt die Oberflächenrauigkeit nur etwa 2 Å, die Abstufung der Grauwerte ist dieselbe wie in A u. B. (D) Die mittlere radiale Intensität der Differenz der Fouriertransformierten aus A und C. Eine Gaußverteilung (durchgezogene Linie) wurde an die Meßwerte (Kreuze) angepaßt, um so den mittleren Abstand zwischen gleichartigen Domänen zu bestimmen. Alle Skalenbalken entsprechen 50 nm; die Grauwerte reichen von 0 nm (schwarz) bis 0,9 nm(weiß). Abbildungsparameter: konstante Kraft ($<0,2 \text{ nN}$), Scanraten 4-6 Hz.

Kraftmikroskopbilder zu Hilfe genommen⁵. Das in Abbildung 4.2 A eingefügte Bild zeigt die zweidimensionale Fouriertransformierte von Abbildung 4.2 A. Bei einer Periodizität von etwa 10 nm ist ein deutlich ausgeprägter Ring zu erkennen, der die regelmäßige Anordnung der Domänen in der Lipiddoppelschicht widerspiegelt. Dies wird noch deutlicher, wenn man anstatt der Fouriertransformierten die mittlere radiale Intensität der Fouriertransformierten als Funktion der räumlichen Frequenz betrachtet (Abbildung 4.2 D). Bei $0,099 \text{ nm}^{-1}$ ist ein deutliches Maximum der Intensität zu erkennen. Das entspricht einer Wellenlänge und damit einem mittleren Domänenabstand von 10,1 nm.

4.1.2 Vergleich mit Neutronendiffraktionsexperimenten⁶

Mikrokalorimetrische Untersuchungen (vgl. Abbildung 4.1) und Neutronenstreuexperimente an einer binären Lipidmischung aus Dimyristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) und Distearoyl-Phosphatidylcholin (DSPC) zeigen, daß auch dieses System entmischt und Domänen im Nanometerbereich bildet. Beide Lipide gehören, wie DPPC und DAPC, zu den Phosphatidylcholinen und weisen, wie DPPC und DAPC, einen Kettenlängenunterschied der Fettsäurereste von vier Kohlenstoffatomen auf⁷.

⁵ Da die einzelnen Domänen hier so groß sind, daß selbst große Bildausschnitte, wie etwa der in Abbildung 4.2 A gezeigte, nur relativ wenige Domänen zeigen und deshalb Randeffekte im langwelligen Bereich (Zentrum) der Fouriertransformation auftreten und außerdem auch einkomponentige festkörpergestützte Lipiddoppelschichten, wie die in C gezeigte, im langwelligen Bereich eine gewisse Oberflächenrauigkeit zeigen, die nicht auf die Phasenseparation der Lipide zurückzuführen ist, ist eine direkte Bestimmung des mittleren Domänenabstandes aus der Fouriertransformierten nicht möglich. (Der letzte Punkt ist besonders dann wichtig, wenn man die Ergebnisse mit denen anderer Techniken vergleichen möchte, die nicht die Oberflächentopographie, sondern direkt die Lipidzusammensetzung in der Membran messen – beispielsweise mittels Deuterierung einer Lipidsorte). Aus diesem Grund wurde für die folgende Auswertung die Differenz der Fouriertransformierten der DPPC/DAPC-Mischung und der Fouriertransformierten einer reinen DAPC-Doppelschicht verwendet (im weiteren Text als Fouriertransformierte bezeichnet). Dabei wurde darauf geachtet, daß beide Abbildungen identische laterale Abmessungen haben und daß sie eine einheitliche z -Skalierung aufweisen.

⁶ Die in diesem Abschnitt vorgestellten Neutronendiffraktionsexperimente, sowie die in Abbildung 4.1 zusammengefaßten mikrokalorimetrischen Untersuchungen am DPPC/DAPC-Mischsystem wurden von Dr. C. Gliss (Technische Universität München) im Rahmen eines gemeinsamen Projekts mit Prof. Dr. T. Bayerl (Universität Würzburg) durchgeführt.

⁷ Der Grund dafür, daß für die Neutronenstreuexperimente andere Lipide verwendet wurden, als für die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen, liegt darin, daß sich im Laufe der Untersuchungen herausgestellt hat, daß die Membran für kraftmikroskopische Untersuchungen möglichst vollständig in der Gel-Phase sein sollte, um das System stabil mit dem Kraftmikroskop abbilden zu können und zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen. Zwar lassen sich die lateralen Kräfte mit dem in Anhang A beschriebenen Tapping-Modus erheblich reduzieren; Aufgrund der hohen Beweglichkeit der einzelnen Lipide in fluiden Bereichen der Membran konnten die Domänen jedoch nur in der Gel-Phase reproduzierbar nachgewiesen werden. Eine Temperierung des Kraftmikroskops ist für derartige Untersuchungen kaum möglich, da die ausgeübten Auflagekräfte unbedingt auf ein Minimum reduziert werden müssen und die deshalb verwendeten weichen Blattfedern bei geringsten Temperaturschwankungen extrem driftenfällig sind. Andererseits schien die DMPC/DSPC-Mischung ideal geeignet, um den gesamten Temperaturbereich des

Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse von Neutronendiffraktionsexperimenten an orientierten äquimolaren DMPC/DSPC-D₈₃ Multischichten⁸ unter streifendem Einfall bei unterschiedlichen Temperaturen (vgl. [122, 153] für experimentelle Details). Während Kontrollexperimente an DMPC/DMPC-D₅₄ Mischungen keine Maxima in der Streuintensität aufweisen (Daten nicht gezeigt, vgl.[122]), zeigen die Messungen am DMPC/DSPC-D₈₃ System ausgeprägte Maxima, die mit steigender Temperatur an Intensität verlieren. Die Meßpunkte bei 10°C (Kreise) zeigen ein deutliches Maximum bei einer Korrelationslänge von 7,4 nm.

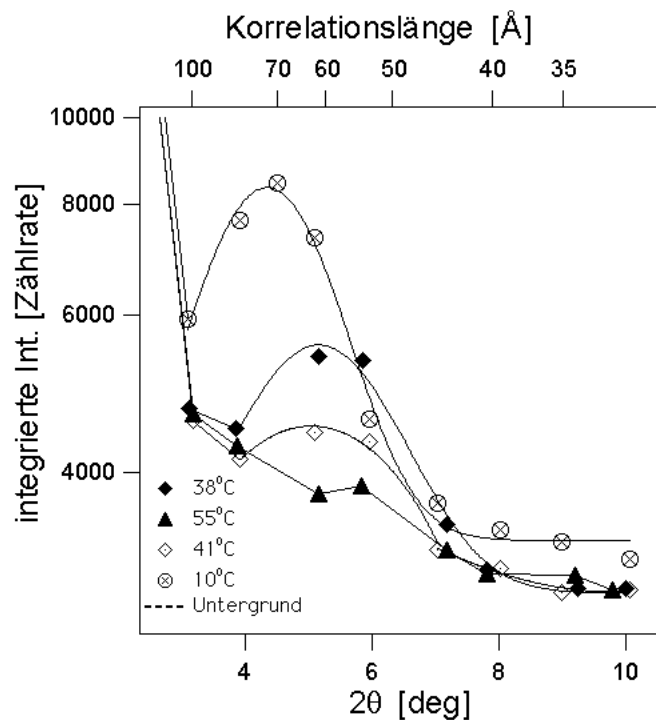


Abbildung 4.3 Ergebnisse der Neutronendiffraktion an orientierten DMPC/DSPC-D₈₃ Multischichten. Das Maximum entspricht der Korrelationslänge zwischen DSPC-D₈₃ reichen Domänen; Abbildung entnommen aus [153].

Phasenübergangs mittels Neutronenstreuung zu untersuchen. Aufgrund begrenzter Meßzeit konnten bisher keine Neutronenstreuuntersuchungen an DPPC/DAPC durchgeführt werden.

⁸ DSPC-D₈₃ bezeichnet DSPC bei dem 83 Wasserstoffatome durch Deuterium substituiert wurden. Entsprechendes gilt für DMPC-D₅₄.

Ein Vergleich der Phasendiagramme der DPPC/DAPC- und der DMPC/DSPC-Mischungen (Abbildung 4.1) zeigt, daß sich beide Mischsysteme in ihrem thermischen Verhalten zwar durch einen Offset und die Skalierung der Temperaturachse unterscheiden, beide Phasendiagramme bei entsprechend reduzierter Temperatur aber sehr ähnlich sind. Bei 10°C befindet sich die DMPC/DSPC-Mischung klar unterhalb der Soliduslinie, das System ist also vollständig in der Gel-Phase, so daß die Ergebnisse bei 10°C mit den kraftmikroskopischen Untersuchungen an DPPC/DAPC bei Raumtemperatur vergleichbar sein sollten.

Mit einer Korrelationslänge von 7,4 Å sind die Neutronendiffraktionsdaten durchaus mit den kraftmikroskopischen Ergebnissen vergleichbar. Dafür, daß die mittels Neutronendiffraktion an DMPC/DSPC-D₈₃ ermittelte Korrelationslänge dennoch etwa 25% unter der mit dem Kraftmikroskop ermittelten Korrelationslänge bei DPPC/DAPC liegt, gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen sind beide untersuchten Systeme trotz aller Ähnlichkeit nicht identisch. Auch Oberflächeneffekte aufgrund der Wechselwirkung mit dem Festkörpersubstrat können nicht ausgeschlossen werden. Es bleibt auch festzuhalten, daß bei der Kraftmikroskopie die Probenmorphologie gemessen wird, während die Neutronen aufgrund der Deuterierung direkt die DSPC-Verteilung in der Doppelschicht messen. Schließlich wird mit den Neutronen über einen großen Probenbereich von einigen Quadratmillimetern und auch über mehrere übereinanderliegende Lipiddoppelschichten gemittelt, während mit dem Kraftmikroskop immer nur Ausschnitte von unter einem Quadratmikrometer betrachtet werden. Die direkte Ortsrauminformation ist aber auch einer der größten Vorteile der kraftmikroskopischen Daten: während die Neutronendiffraktion sehr präzise Mittelwerte im Fourierraum ergibt, liefert das Kraftmikroskop direkt Informationen über die Geometrie, Topographie und Topologie der Probe. Es konnte gezeigt werden, daß die Domänen keineswegs kreisförmig sind. Der Höhenunterschied von 4 Å legt die Vermutung nahe, daß die Domänen auf beiden Seiten der Lipiddoppelschicht nicht stark miteinander korreliert sind. Auch was die Topologie betrifft zeigen die Kraftmikroskopbilder keine über größere Bereiche der Membran zusammenhängenden Domänen.

4.1.3 Vergleich mit anderen Methoden

Ein Vergleich mit weniger direkten Methoden zur Bestimmung der Nanostruktur binärer Lipidmischungen [147-151] zeigt, daß die hier vorgestellten Ergebnisse im unteren Bereich der bisher diskutierten Korrelationslängen (1-450 nm) liegen. Die Ursache dafür ist möglicherweise, daß alle bisherigen Untersuchungen dynamische Parameter, wie etwa die laterale Diffusion messen und daraus mit Hilfe von Modellannahmen die Domänengröße und deren Korrelationslänge bestimmen. Die den Modellen zugrundeliegenden Annahmen hängen jedoch auch stark von der Zeit- und Längenskala ab, auf der diese dynamischen Parameter gemessen werden. Die Interpretation sowohl der Kraftmikroskopie- als auch der Neutronendiffraktionsdaten ist dagegen weitgehend von Modellannahmen unabhängig.

Die bisher untersuchten Strukturen zeichnen sich u. a. dadurch aus, daß charakteristische Größen, wie etwa der mittlere Domänenabstand über große räumliche und zeitliche Distanzen konstant sind. Damit sind diese Strukturen Techniken wie der Neutronendiffraktion zugänglich, die über große Raum- und Zeitintervalle mitteln und so sehr präzise Ergebnisse liefern. Im folgenden Abschnitt werden dagegen dynamische Strukturbildungsprozesse untersucht, die zu sehr viel weniger regelmäßigen Strukturen führen und sich damit mittelnden Techniken entziehen. Hier sind folglich analytische Techniken mit hoher Orts- und Zeitauflösung, wie beispielsweise die Rasterkraftmikroskopie nötig.

4.2 Strukturierung von biologischen Membranen mit Hilfe von Enzymen⁹

Nanoskopische Strukturen in biologischen Membranen oder synthetischen Lipiddoppelschichten entstehen nicht nur durch Selbstorganisationsprozesse, wie im letzten Abschnitt beschrieben, sondern können auch aktiv, beispielsweise mit Hilfe von Enzymen oder Rastersondenverfahren, erzeugt werden. Am Beispiel des Enzyms Phospholipase A₂

⁹ Die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Grandbois (Univ. of Missouri, Columbus, MO) durchgeführt.

wird im folgenden der enzymatische Abbau verschiedener biologischer Modellmembranen sowie deren gezielte Strukturierung mit Hilfe enzymatischer Werkzeuge untersucht.

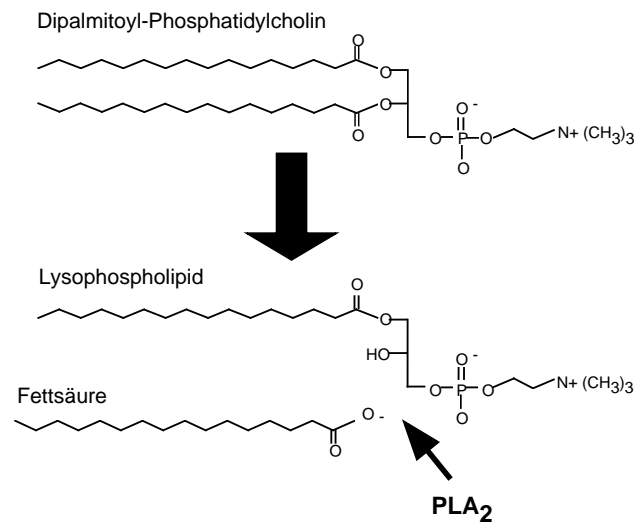


Abbildung 4.4 Hydrolyse von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin durch das Enzym Phospholipase A_2 .

Phospholipase A_2 (PLA_2) ist ein oberflächenaktives Enzym, welches die sn-2-Alkyl-Esterbindung von sn-3-Glycero-Phospholipiden hydrolysiert und somit essentielle Bestandteile der meisten biologischen Membranen katalytisch abbaut [75]. Als Hydrolyseprodukte entstehen eine Fettsäure sowie ein Lyso-Phospholipid (vgl. Abbildung 4.4), die in der Regel in der wässrigen Phase gelöst werden. Das Enzym PLA_2 kommt in hoher Konzentration in den meisten Schlangen- und Insektengiften, aber auch im Sekret der Bauchspeicheldrüse vor, wo es für den enzymatischen Abbau von Zellmembranen verantwortlich ist. Aufgrund seiner Rolle bei der zellulären Signalübertragung, insbesondere bei Entzündungsreaktionen, ist die Wirkungsweise von PLA_2 aber auch für zahlreiche pharmazeutische Fragestellungen von Interesse. So beruht etwa die entzündungshemmende Wirkung von Corticosteroiden, wie beispielsweise Cortison, im wesentlichen auf der inhibitorischen Wirkung dieser Substanzen auf PLA_2 ¹⁰ [75].

¹⁰ Die Freisetzung von Arachidonat durch PLA_2 ist der erste Schritt in der Biosynthese zahlreicher lokaler Hormone, sogenannter Mediatoren. Eine Reihe von Körperfunktionen, wie Schmerzempfinden, Zellproduktion- und Migration, Körpertemperatur, Blutdruck, Bronchien- oder Gebärmutterkontraktion, Knochenstoffwechsel oder die Aktivität des Immunsystems werden mittelbar von PLA_2 beeinflusst [75, 158].

Es ist seit längerem bekannt, daß die Aktivität von PLA₂ an Membranoberflächen, wie beispielsweise Lipidvesikeln, Lipidmonoschichten an der Wasser-/Luft-Grenzfläche oder festkörpergestützten Lipiddoppelschichten sehr viel höher ist, als in isotropen Lipiddispersionen. Weiterhin hängt die Enzymaktivität stark von den physikochemischen Eigenschaften der Membran, wie etwa von der lateralen Struktur und der Packung der Lipide in der Membran, ab [159, 160]. Eine besonders hohe Enzymaktivität konnte an gekrümmten Membranen und Membranen in der Hauptphasenumwandlung beobachtet werden [137, 161-165]. Insbesondere Epifluoreszenzmikroskopiestudien weisen ferner darauf hin, daß möglicherweise Defekte in der Membran als Keime für deren enzymatische Hydrolyse dienen könnten [166-169]. Allerdings reicht die mit Fluoreszenzmikroskopie erreichbare laterale Auflösung nicht aus, um einen detaillierten Einblick in die Enzymaktivität auf der molekularen Skala zu erhalten. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie läßt sich dagegen der Abbau einer Phospholipidmembran durch PLA₂ auf der molekularen Skala untersuchen: man kann den Enzymen quasi bei der Arbeit zusehen [170]. Schließlich lassen sich mit der Kraftmikroskopspitze künstlich Defekte in der Membran erzeugen, die als Angriffspunkte für das Enzym dienen können, so daß an diesen Stellen der Membran eine gerichtete Hydrolyse stattfindet [171].

4.2.1 Einzelne Moleküle bei der Arbeit: Enzymatischer Abbau von Lipidmembranen durch Phospholipase A₂

4.2.1.1 Abbau einer homogenen Lipidmembran

Um einen detaillierteren Einblick in die Hydrolyse einer Phospholipidmembran durch PLA₂ zu erhalten, wurde der enzymatische Abbau einer homogenen DPPC-Membran mit dem Rasterkraftmikroskop verfolgt [170]. Dazu wurde zunächst eine homogene DPPC-Doppelschicht mittels eines kombinierten Langmuir-Blodgett-/Langmuir-Schäfer-Verfahrens [127] auf ein Glimmersubstrat übertragen.

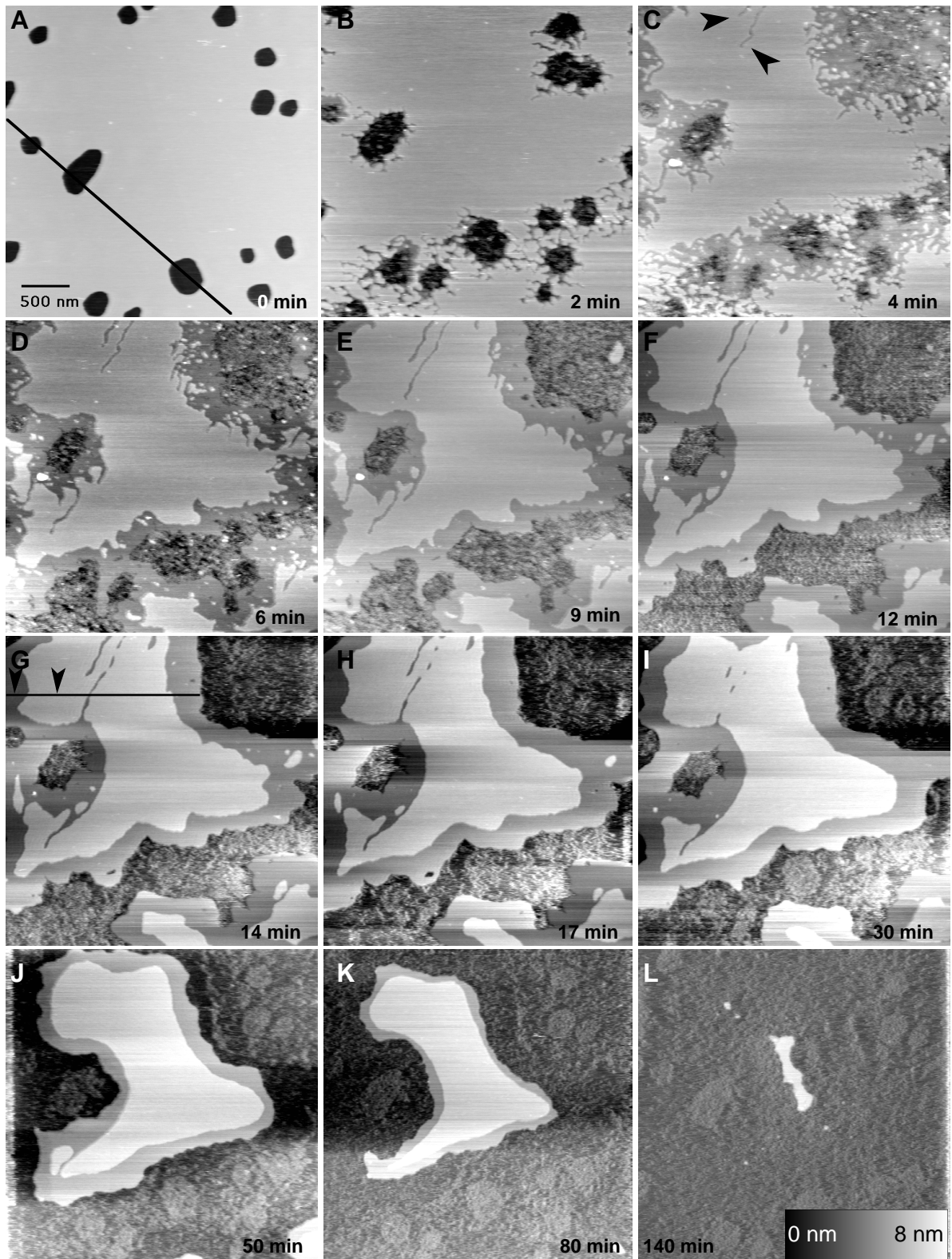


Abbildung 4.5 Rasterkraftmikroskop-Aufnahmen des enzymatischen Abbaus einer festkörperegstützten DPPC-Doppelschicht durch PLA₂, (A) vor der Zugabe von PLA₂, (B-L) nach der Zugabe von PLA₂. Pufferzusammensetzung: (A) 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM Tris, pH 8,9; (B-L) selber Puffer, mit 260 nM PLA₂. Abbildungsparameter: konstante Kraft (<0,5 nN), EBD-Spitze (35 mN/m; vgl. Anhang A), Scanrate 6,1 Hz, basislinienkorrigierte Rohdaten.

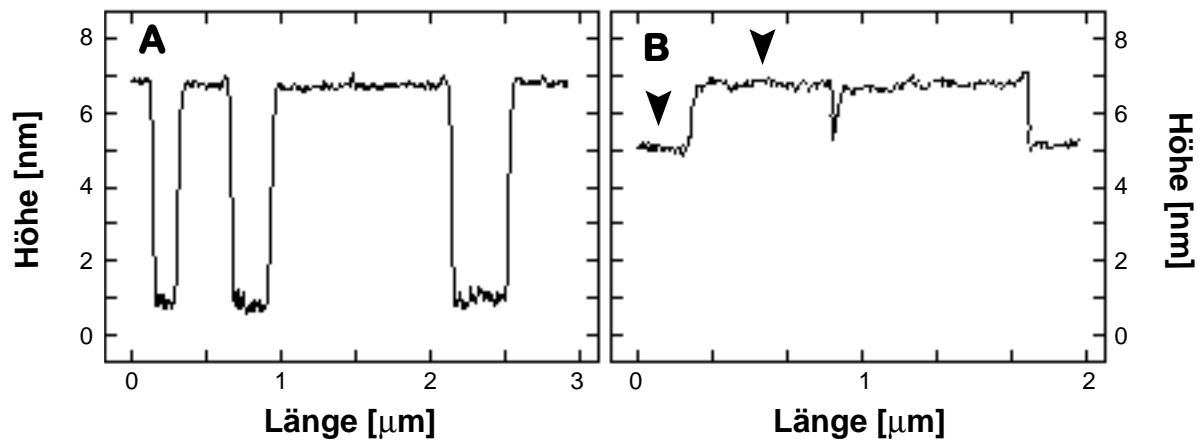


Abbildung 4.6 (A) Höhenprofil entlang der in Abbildung 4.5 (A) eingezeichneten Linie. Die Tiefe der Löcher ist $6,0 \pm 0,2$ nm, was der Dicke einer voll hydrierten DPPC-Doppelschicht entspricht. (B) Höhenprofil entlang der in Abbildung 4.5 (G) eingezeichneten Linie. Die Höhe der Stufe (siehe Pfeile) entspricht mit $1,5 \pm 0,2$ nm der Dicke einer intakten DPPC-Monoschicht mit einer Monolage der Hydrolyseprodukte darauf.

Der Transferdruck wurde dabei mit 35 mN/m so gewählt, daß beide Monoschichten in der Gel-Phase, also in einem hexagonal gepackten zweidimensionalen Gitter vorliegen (vgl. Anhang A). Anschließend wurde die Membran durch Zugabe von PLA_2 hydrolysiert und die Hydrolyse der Membran mit dem Kraftmikroskop verfolgt.

Abbildung 4.5 A zeigt die Membran vor der Zugabe von Phospholipase. Die dunklen Bereiche sind beim Transfer entstandene Löcher in der Membran, durch die das Festkörpersubstrat zu erkennen ist. Die Tiefe der Löcher beträgt $6,0 \pm 0,2$ nm (vgl. Abbildung 4.6 A), was gut mit den Strukturdaten von DPPC [37, 154, 157] übereinstimmt und zeigt, daß die Membran in der Tat aus einer DPPC-Doppelschicht besteht. Bereits zwei Minuten nach der Zugabe von PLA_2 (Abbildung 4.6 B) sind deutliche Gräben in der Membran zu erkennen. Da das Enzym die kristalline Gel-Phase von DPPC nur äußerst schlecht hydrolysieren kann [163, 172], beginnen die Gräben ausschließlich von den Rändern der Löcher her zu wachsen, wo die kristalline Ordnung der Lipide aufgrund der Membrankrümmung stark gestört ist (vgl. auch Abbildung 4.7), während in den homogenen Bereichen, wo die Membran in der hexagonalen Gel-Phase vorliegt, keine Hydrolyse der Membran beobachtet werden kann. Das liegt vermutlich daran, daß das Enzym die Phospholipide zur Hydrolyse mehrere Ångström aus der Membran heraus ziehen muß, um an deren Glycerolrückgrat zu gelangen, wo sich die Schnittstelle von PLA_2

befindet [173, 174]. Für Lipide in der Gel-Phase ist die dazu benötigte Energie etwa um das dreifache größer, als an Stellen, wo die kristalline Ordnung der Membran gestört ist, wie beispielsweise an den Rändern der Lipiddoppelschicht, wo die Membran stark gekrümmt ist [175-177].

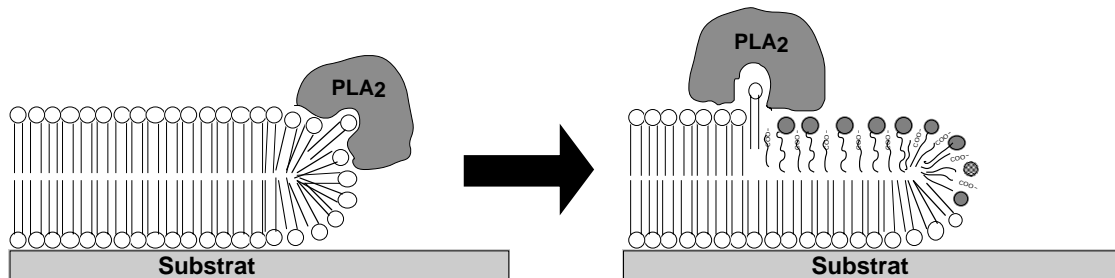


Abbildung 4.7 Schematische Darstellung der Lipiddoppelschicht und der Hydrolyse durch Phospholipase.

Abbildung 4.8 A zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von Abbildung 4.5 B, 2 Minuten nach der Zugabe von PLA₂. Die einzelnen Gräben, die die Membran von den Rändern der Defekte her durchziehen, sind klar zu erkennen. Die Breite der Gräben beträgt 15 ± 5 nm. Über die Tiefe der Gräben lassen sich dagegen aufgrund der Apertur der Kraftmikroskopspitze keine Angaben machen. Es fällt auf, daß die Gräben im wesentlichen entlang von drei Vorzugsrichtungen verlaufen. Betrachtet man beispielsweise die Winkel, die zwischen den zahlreichen Richtungsänderungen und Verzweigungspunkten auftreten, so erhält man ein ausgeprägtes Maximum der Winkelverteilung um 120° (vgl. Abbildung 4.8 B). Da die Lipidmembran, wie bereits oben erwähnt wurde, hier hexagonal gepackt ist, liegt die Vermutung nahe, daß das Enzym nicht nur Orte mit Packungsdefekten in der Membran erkennt, sondern daß es die Membran auch bevorzugt entlang ihrer Hauptkristallachsen hydrolysiert.

Da in den Rasterkraftmikroskopaufnahmen die Entstehung von Gräben definierter Breite und Richtung zu beobachten ist, und die Membran nicht diffus von den Rändern her abgebaut wird, stellt sich die Frage, ob die einzelnen Gräben von mehreren Enzymen gleichzeitig erzeugt werden, oder ob sie der Aktivität einzelner Enzyme zugeordnet werden können. Ein erster Hinweis darauf, daß es sich tatsächlich um die Aktivität einzelner Enzyme handeln könnte, ist die Breite der Gräben von etwa 15 nm; das entspricht 22 Phospholipiden. Der Durchmesser

von Phospholipase beträgt etwa 5 nm, und es ist aus kalorimetrischen Untersuchungen bekannt, daß ein Enzym an seiner Bindungsstelle mit ungefähr 40 Phospholipiden wechselwirkt.

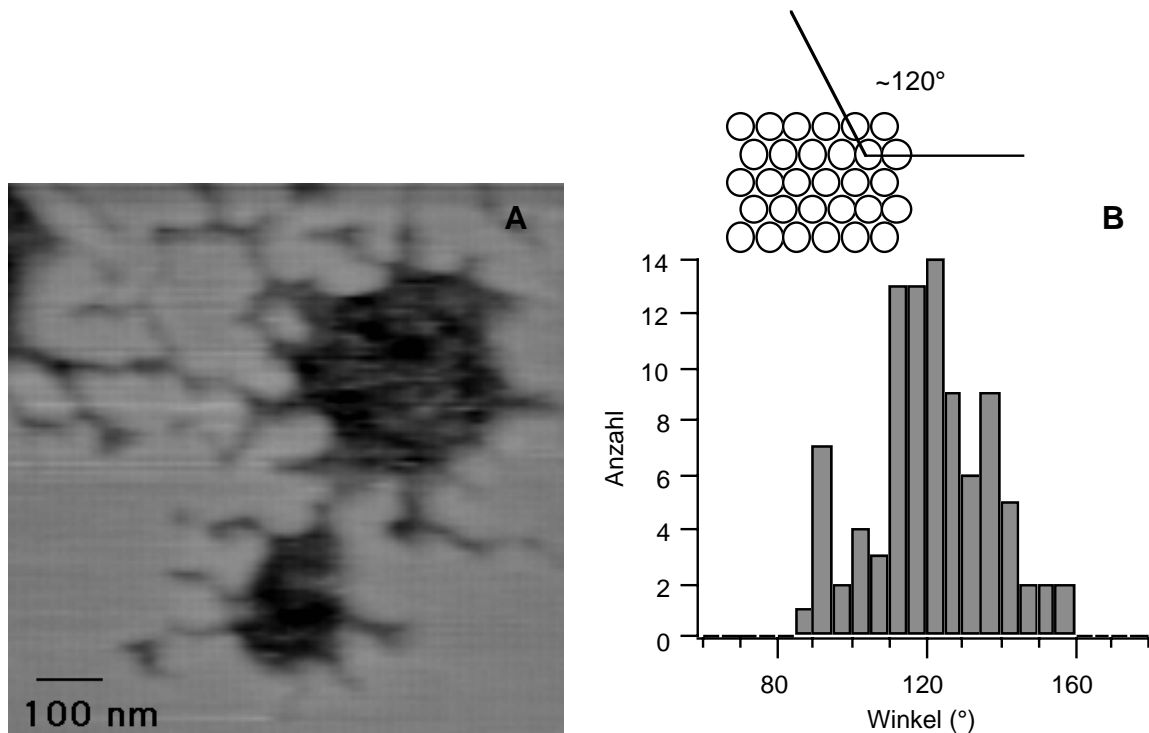


Abbildung 4.8 (A) Vergrößerung eines Ausschnitts von Abbildung 4.5 B. Die einzelnen Gräben, die von den Rändern der Defekte her die Membran durchziehen sind deutlich zu erkennen. An Verzweigungen oder bei Richtungsänderungen der Gräben treten ausschließlich Winkel von annähernd 120° auf. (B) Schematische Darstellung der zweidimensionalen hexagonalen Ordnung von DPPC in der Gel-Phase und Histogramm der in Abbildung 4.5 B an Verzweigungspunkten oder bei Richtungsänderung der Gräben auftretenden Winkel.

Ein weiterer Hinweis darauf läßt sich aus der Anzahl der Startpunkte in Abbildung 4.5 B erhalten. Wenn es sich bei den Gräben um das Werk einzelner Moleküle handelt, dann sollte die Anzahl aller Startpunkte in Abbildung 4.5 B nicht wesentlich größer sein, als die Anzahl der Phospholipasemoleküle, die aufgrund der Oberflächenbindungskonstante von PLA_2 an der Membran zu erwarten sind. Vergleicht man die Anzahl der Hydrolysestartpunkte entlang der Defektlinien in Abbildung 4.5 B mit der Anzahl an Phospholipasemolekülen, die aufgrund der Oberflächenbindungskonstante¹¹ von 10^{-4} M [161, 178] in einem 25 nm breiten Ring um die

¹¹ Die Oberflächenbindungskonstante von 10^{-4} M, sowie die Hydrolyserate von 230 Lipiden/s wurde an PLA_2 aus Schlangengift (z. B. *Agkistrodon piscivorus* oder *Naja naja*) bestimmt. Aufgrund des Artenschutzabkommens stehen

Defekte an die Lipidmembran binden sollten, so zeigt sich, daß die tatsächliche Anzahl der Startpunkte mit über 100 in Abbildung 4.5 B sogar etwas höher ist, als die 40 theoretisch erwarteten Phospholipasemoleküle, die an die Ränder der Defekte binden sollten¹². In Abbildung 4.5 B sind also sogar mehr Hydrolysestartpunkte vorhanden, als man Phospholipasemoleküle entlang der Membranränder erwarten würde. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, daß jeder Graben tatsächlich als Ergebnis der Aktivität eines einzelnen Enzyms interpretiert werden kann. Betrachtet man ferner die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Gräben wachsen, so ist diese mit etwa 88 ± 30 Lipiden/s kleiner, aber von derselben Größenordnung, wie die aus makroskopischen Experimenten bekannte Hydrolyserate von PLA₂ von 230 Lipiden/s pro Enzym [161, 178]. Auch das ist ein weiterer Hinweis darauf, daß vermutlich nicht mehrere Moleküle, sondern nur ein einzelnes in jedem Graben aktiv ist. Schließlich kann in Abbildung 4.5 C-F das parallele Wachstum zweier benachbarter Gräben beobachtet werden (siehe Pfeile in Abbildung 4.5 C). Beide Gräben wachsen anfangs mit der gleichen Geschwindigkeit (etwa 100 Lipide/s), bis das Wachstum des linken Grabens in Abbildung 4.5 E plötzlich stoppt und nur der rechte Graben mit konstanter Geschwindigkeit weiter wächst, bis er einen Bereich der Membran erreicht, der bereits hydrolysiert ist (vgl. auch Abbildung 4.9 A). Die Tatsache, daß beide Gräben anfangs mit derselben Geschwindigkeit wachsen, und einer dann abrupt stoppt, während der andere mit konstanter Geschwindigkeit weiter wächst, deutet auf einen Alles-oder-Nichts Mechanismus hin, und legt erneut den Schluß nahe, daß für die Entstehung jedes Grabens genau ein Phospholipasemolekül verantwortlich ist.

Von Abbildung 4.5 E an zeigt sich dann ein veränderter Hydrolyseverlauf. Die Hydrolyse verläuft deutlich langsamer als in der Anfangsphase. Das ist in Abbildung 4.9 B verdeutlicht: während in den ersten 9 Minuten der hydrolysierte Anteil an der Membran exponentiell anwächst, was sich mit der zunehmenden Fragmentierung der Membran und der damit stark

die meisten dieser Quellen heute jedoch nicht mehr zur Verfügung, so daß für die vorliegenden Experimente Bienengift-PLA₂ verwendet wurde, was zu geringfügigen Abweichungen von diesen Literaturwerten führen kann.

¹² Dabei stellen die 25 nm bereits eine obere Schranke für die Breite des den Enzymen zugänglichen Bereichs entlang der Defektlinien dar.

anwachsenden Anzahl an Angriffspunkten für die enzymatische Reaktion erklären läßt, nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit danach deutlich ab. Es fällt auf, daß die Fragmentierung der Membran nach 9 Minuten, also etwa ab Abbildung 4.5 E deutlich zurückgeht, und viele der bis dahin entstandenen Gräben wieder ausheilen. Auch nehmen die Ränder der Membran wieder deutlich rundere Formen an, was darauf schließen läßt, daß möglicherweise ein Teil der Hydrolyseprodukte in der Membran solubilisiert wurde, was zu einem langsamen Aufweichen der Membran geführt haben könnte. Die Randspannung könnte dann zusammen mit der höheren lateralen Beweglichkeit der Lipide zum Ausheilen der Gräben geführt haben.

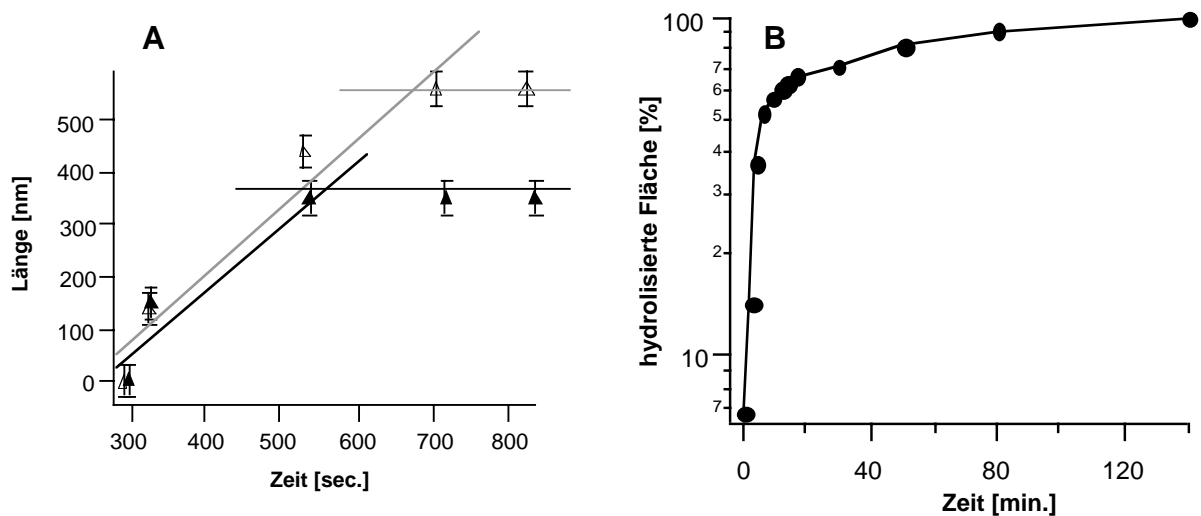


Abbildung 4.9 (A) Längenwachstum der beiden parallel verlaufenden Gräben im Abbildung 4.5 C-G. (B) Hydrolysierter Anteil der DPPC-Membran als Funktion der Zeit. Jeder Datenpunkt entspricht einem Bild aus Abbildung 4.5. Die zunächst exponentiell zunehmende Hydrolyse der Membran verlangsamt sich nach 9 Minuten deutlich.

Ab etwa Abbildung 4.5 D fällt ferner das Entstehen eines Randes um die noch intakte DPPC-Doppelschicht herum auf. Der Höhenunterschied zwischen der intakten DPPC-Doppelschicht und dem etwas dunkleren Rand beträgt $1,5 \pm 0,2$ nm (vgl. Abbildung 4.6 B). Das entspricht etwa dem Höhenunterschied, den man zwischen einer DPPC-Monoschicht und einer Monoschicht aus Hydrolyseprodukten erwartet und legt die Vermutung nahe, daß es sich bei den Rändern um eine untere Monolage aus DPPC handelt, auf der sich dann eine Monoschicht

aus Hydrolyseprodukten befindet¹³. Da die untere DPPC-Monoschicht aus sterischen Gründen nicht direkt vom Enzym hydrolysiert werden kann, sondern die Lipide zur Hydrolyse erst in die obere DPPC-Monoschicht gelangen müssen, liegt der Schluß nahe, daß die obere Lipidmonolage anfangs sehr viel schneller hydrolysiert wird, als die Lipide aus der unteren Monolage nach oben „nachrücken“ können. Erst ganz am Schluß, ab Abbildung 4.5 J, wird die Hydrolyse insgesamt langsamer, als das „Nachrücken“ der Lipide aus der unteren Monoschicht, und der Rand um die noch intakte DPPC-Doppelschicht nimmt allmählich wieder ab. Diese Interpretation konnte mit Hilfe von Experimenten mit langkettigeren Lipiden, wie z. B. Diarachinoyl-Phosphatidylcholin (DAPC) oder Dibehenoyl-Phosphatidylcholin (DBPC) bestätigt werden. Beim enzymatischen Abbau von festkörpergestützten DAPC- oder DBPC-Doppelschichten, bei denen das „Nachrücken“ von Lipiden aus der unteren Monolage deutlich langsamer vor sich gehen sollte als bei DPPC, bleiben diese Randbereiche über sehr lange Zeiträume stabil und werden von PLA₂ praktisch nicht abgebaut (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß das Enzym PLA₂ eine DPPC-Doppelschicht ausschließlich von bereits vorhandenen Defekten her entlang der Kristallachsen der Lipidmembran abbaut und daß die dabei entstehenden Gräben von wenigen Nanometern Durchmesser mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Aktivität einzelner Phospholipasemoleküle zurückgeführt werden können.

4.2.1.2 Abbau einer heterogenen Lipidmembran

Wie bereits im letzten Abschnitt diskutiert wurde, hängt die Aktivität von PLA₂ stark von den physikochemischen Eigenschaften der Membran, wie etwa der kristallinen Packung der Lipide oder der Membrankrümmung ab. Defekte und Inhomogenitäten spielen also eine wichtige Rolle als Startpunkte für den enzymatischen Abbau der Membran. Die Membran besitzt in der Hauptphasenumwandlung, also im Koexistenzbereich zwischen fluider und kristalliner Phase,

¹³ Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung wäre die Grenzflächenenergie sehr hoch, wenn die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der unteren DPPC-Monolage direkt mit der Pufferlösung in Kontakt wären. Eine Adsorbatschicht aus den amphiphilen Hydrolyseprodukten kann diese Grenzflächenenergie jedoch deutlich absenken.

ein Maximum an Heterogenität. Makroskopische Untersuchungen zeigen, daß PLA_2 dort ein Maximum an Aktivität aufweist[137, 161-165]. Um den Zusammenhang zwischen Membranheterogenität und Enzymaktivität genauer zu beleuchten, wird im folgenden der enzymatische Abbau von Membranen, die im Koexistenzbereich dieser Umwandlung auf ein Festkörpersubstrat übertragen wurden, untersucht.

Betrachtet man eine DPPC-Doppelschicht, die in der Hauptphasenumwandlung bei einem Transferdruck von etwa 10 mN/m mittels Langmuir-Blodgett-Technik auf ein Glimmersubstrat übertragen wurde, so fällt auf, daß in der Membran zwei deutlich zu unterscheidende Bereiche zu erkennen sind. Die Membran besteht zum einen aus einige Mikrometer großen zusammenhängenden Bereichen, in denen kaum größere Defekte zu erkennen sind, während die sie umgebenden Bereiche der Membran eine Vielzahl von Defekten unterschiedlicher Größe aufweisen. Ferner sind die defektfreien Bereiche von einem klar erkennbaren Rand umgeben, in dem offensichtlich keine Lipide vorhanden sind. Vermutlich entsprechen die defektfreien Bereiche kristallinen Domänen in der Membran, während die sie umgebenden Bereiche wahrscheinlich ursprünglich fluide Bereiche sind. Die genaue Struktur der Membran in den heterogenen Bereichen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden, aber vermutlich handelt es sich um Bereiche, die an der Wasser-/Luft-Grenzfläche in der fluiden Phase vorlagen und sich beim Transfer zumindest teilweise zusammengezogen haben, was zur Entstehung der zahlreichen Defekte geführt haben könnte. Ob die Lipide jedoch lokal in der fluiden Phase vorliegen oder in einer kristallinen Ordnung ist nicht klar.

Etwa 30 Sekunden nach der Zugabe von PLA_2 sind die heterogene Bereiche der Membran vollständig von etwa 30-50 nm breiten Gräben durchzogen, während die homogenen Bereiche langsam von den Rändern her abgebaut werden. Analog zu der im letzten Abschnitt beschriebenen Hydrolyse einer DPPC-Membran in der Gel-Phase entstehen zahlreiche einige 10 nm breite Gräben an den Rändern der homogenen Phase. Im weiteren Verlauf der Hydrolyse werden heterogene Membranbereiche schnell vollständig abgebaut, während die Hydrolyse der homogenen Membranbereiche analog zu der im vorigen Abschnitt beschriebenen Hydrolyse homogener Membranen in der Gel-Phase verläuft (Daten nicht

gezeigt). Es zeigt sich also, daß auch auf der molekularen Längenskala heterogene Bereiche der Membran wesentlich schneller von PLA₂ abgebaut werden als homogene Membranbereiche¹⁴.

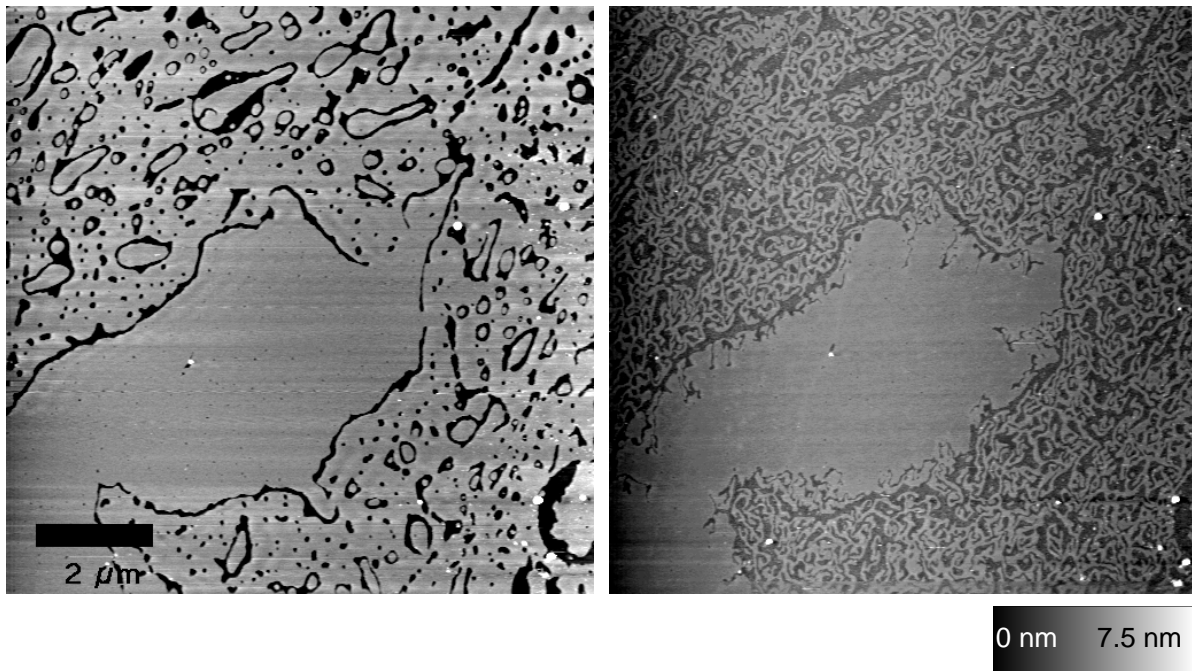


Abbildung 4.10 Abbau einer DPPC-Doppelschicht, die im Koexistenzbereich der Hauptphasenumwandlung ($\gamma \approx 5$ mN/m) auf ein Glimmersubstrat übertragen wurde, durch PLA₂; links vor und rechts 30 s nach der Zugabe von 1,3 µM PLA₂. Pufferzusammensetzung: 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM Tris, pH 8,9. Abbildungsparameter: konstante Kraft (<0,5 nN), Scanrate 6,1 Hz, basislinienkorrigierte Rohdaten.

4.2.2 Enzymverstärkte Nanostrukturierung

Mit dem Rasterkraftmikroskop hat man nicht nur ein Werkzeug zur Verfügung, welches es ermöglicht, biologische Prozesse, wie die Hydrolyse einer Lipidmembran durch Phospholipase, auf der molekularen Skala zu untersuchen, sondern das Kraftmikroskop erlaubt auch das gezielte Ausüben von Kräften im Bereich von pN und die gezielte Adressierung von Substraten im Nanometerbereich. Es ist also möglich, mit dem Kraftmikroskop durch das Ausüben einer Kraft gezielt lokale Defekte in biologischen

¹⁴ Das konnte auch an Membranen aus einer äquimolaren Mischung aus DPPC und DAPC, die wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, in etwa 10 nm große Domänen phasensepariert, bestätigt werden. Während der Hydrolyse entstehen überall in der Membran Löcher von der Größe der Lipid-Domänen und die Membran wird sehr schnell abgebaut. Eine genaue Zuordnung der Löcher zu diesen extrem kleinen Domänen ist jedoch aufgrund lateraler Drift bei der Zugabe von PLA₂ und der extrem schnellen Hydrolyse selbst bei geringer PLA₂ Konzentration kaum möglich.

Membranen zu erzeugen, die dann als Angriffspunkte für enzymatische Werkzeuge, wie Phospholipase, dienen können. Die im Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Experimente zeigen eindeutig, daß heterogene Lipidmembranen nicht nur sehr viel schneller von PLA₂ hydrolysiert werden als homogene Membranen, sondern sie zeigen auch, daß eine homogene Membran in der Gel-Phase ausschließlich von den Rändern der Membran oder von Defekten her hydrolysiert wird¹⁵. Aus diesem Grund sollte es möglich sein, eine kristallin gepackte Membran gezielt an den Stellen abzubauen, wo zuvor Defekte mit der Kraftmikroskopspitze induziert wurden (vgl. Abbildung 4.11 A).

Abbildung 4.11 B zeigt eine Rasterkraftmikroskopaufnahme einer festkörpergestützten DPPC-Membran, in die mit Hilfe von PLA₂ drei parallel Linien geschrieben wurden. Dazu wurde die Kraftmikroskopspitze in Gegenwart von PLA₂ mit einer Auflagekraft von 9 ± 3 nN und einer Rastergeschwindigkeit von 1 Hz für die linke Linie, 14 Hz für die mittlere bzw. 24 Hz für die rechte Linie für einige Minuten entlang der Linien hin und her bewegt. Die Linien wurden nacheinander von links nach rechts erzeugt. Nach Fertigstellung jeder Linie wurde die Auflagekraft auf unter 1 nN verringert und die Probe mit einer Rate von 6 Hz senkrecht zu den Linien abgerastert, um so ein Bild von der Probe zu erhalten. Die Breite der drei Linien in Abbildung 4.11 B beträgt von links nach rechts 29 ± 6 nm, 22 ± 9 nm bzw. 11 ± 5 nm. Offensichtlich nimmt die Breite der Linien mit zunehmender Rasterfrequenz beim Schreiben der Linien ab. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der geringeren lateralen Drift der Probe bei einem schnelleren und damit auch kürzeren Herstellungsprozeß sein. Aber auch die Zeit, die ein einzelnes Enzym an die Membran gebunden ist, bevor es von der Kraftmikroskopspitze erneut gestreift und wegen der hohen Auflagekraft möglicherweise wieder von der Membran abgelöst wird, könnte einen Einfluß auf die Breite der Linien haben. Da die drei Linien nacheinander geschrieben wurden, besteht schließlich auch noch die Möglichkeit, daß die Ränder der fertigen Linien als Angriffspunkte für die weitere Hydrolyse der Membran dienen, während die jeweils nächste Linie geschrieben wird. Ein Vergleich mit

¹⁵ Im Gegensatz zu vielen makroskopischen Experimenten, die nur zeigen, daß auch eine homogene Membranen in der Gel-Phase langsam hydrolysiert werden kann, zeigen diese Experimente auch, wo die Membran hydrolysiert wird, nämlich ausschließlich an den besagten Rändern und Defekten.

Kraftmikroskopabbildungen der Probe, die jeweils unmittelbar nach der Fertigstellung der linken bzw. der mittleren Linie aufgenommen wurden (Daten nicht gezeigt), zeigt jedoch, daß die ersten beiden Linien sich im Laufe der weiteren Oberflächenmodifizierung um nur etwa 2 nm verbreitert haben, während die mit 1 Hz erzeugte linke Linie etwa 18 nm breiter ist, als die mit 24 Hz erzeugte rechte Linie, so daß in der Tat die unterschiedlichen Rastergeschwindigkeiten beim Schreiben der Linien als Ursache für die unterschiedlichen Linienbreiten angesehen werden können¹⁶.

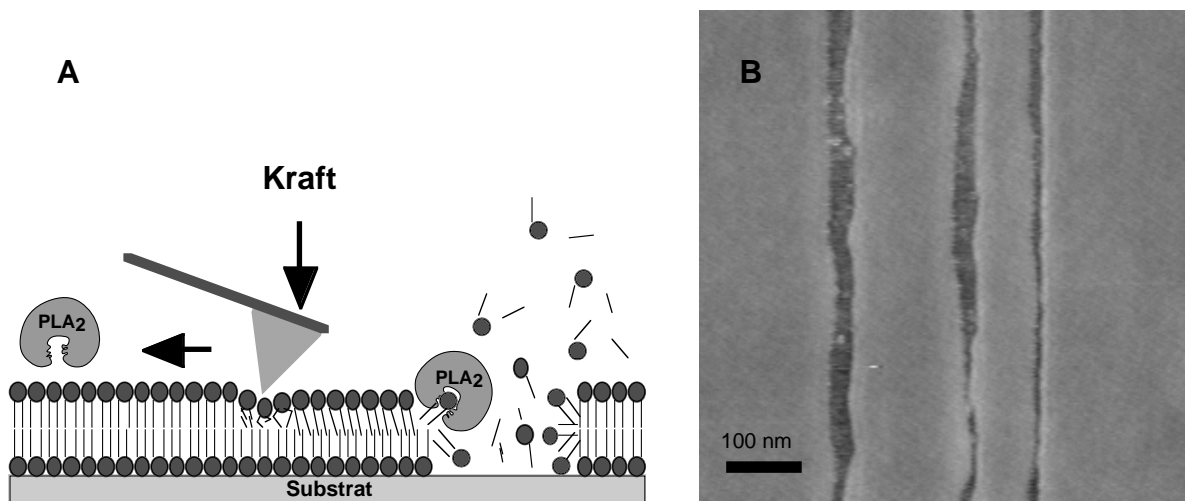


Abbildung 4.11 (A) Kraftinduzierter enzymatischer Abbau einer Lipidmembran. (B) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer festkörpergestützten DPPC-Doppelschicht, in die drei parallele Linien mit Hilfe von PLA₂ geschrieben wurden. Die Linien wurden dazu in Gegenwart von 30 nM PLA₂, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ und 10 mM Tris (pH 8,9) bei einer Auflagekraft von 9 ± 3 nN und Rasterfrequenzen von 1 Hz (linke Linie), 14 Hz (mittlere Linie) und 24 Hz (rechte Linie) mehrfach abgerastert.

Mit der hier vorgestellten Strukturierungsmethode ist es nicht nur möglich, die lateralen Dimensionen der in der Membran erzeugten Strukturen bis in den Nanometerbereich genau zu kontrollieren, sondern auch die Tiefe der Strukturen über die Auflagekraft beim Strukturieren zu steuern. Abbildung 4.12 zeigt zwei DPPC-Doppelschichten, die mit unterschiedlichen Auflagekräften strukturiert wurden. Während die Strukturierung in Abbildung 4.12 A mit einer Auflagekraft von 5 ± 3 nN durchgeführt wurde, betrug die zur Strukturierung von Abbildung 4.12 B verwendete Auflagekraft 12 ± 3 nN. Im Höhenprofil von Abbildung 4.12 A zeigt sich,

¹⁶ Der Driftbeitrag ist dabei schwer abzuschätzen, da der hier verwendete Aufbau (Nanoscope IIIa, J-Scanner) keine unabhängige (z. B. kapazitive) Abstandsmessung erlaubt, und die Piezos bei plötzlichen Änderungen des Scanbereichs, wie sie beim Umschalten vom Strukturieren zum Abbilden vorkommen, eine gewisse Trägheit aufweisen.

daß die mit etwa 5 nN erzeugte Struktur nur etwa 1,5 - 1,6 nm tief ist, was genau dem in Abschnitt 4.2.1 diskutierten Höhenunterschied zwischen einer DPPC-Doppelschicht und einer DPPC-Monolage mit einer Monoschicht aus Hydrolyseprodukten darauf entspricht. Die mit 12 nN erzeugte Struktur ist dagegen $6,0 \pm 0,5$ nm tief, was genau der Dicke einer hydrierten DPPC-Doppelschicht entspricht [154]. Bei Auflagekräften um 5 nN werden also ausschließlich Defekte in der oberen Lipid-Monolage der Membran erzeugt, während bei Auflagekräften um 12 nN auch Lipide aus der unteren Monolage enzymatisch hydrolysiert werden können. Die untere Lipid-Monolage wird also bei Kräften um die 12 nN so stark gestört, daß die Lipidköpfe samt Glycerolrückgrat für das Enzym zugänglich sind.

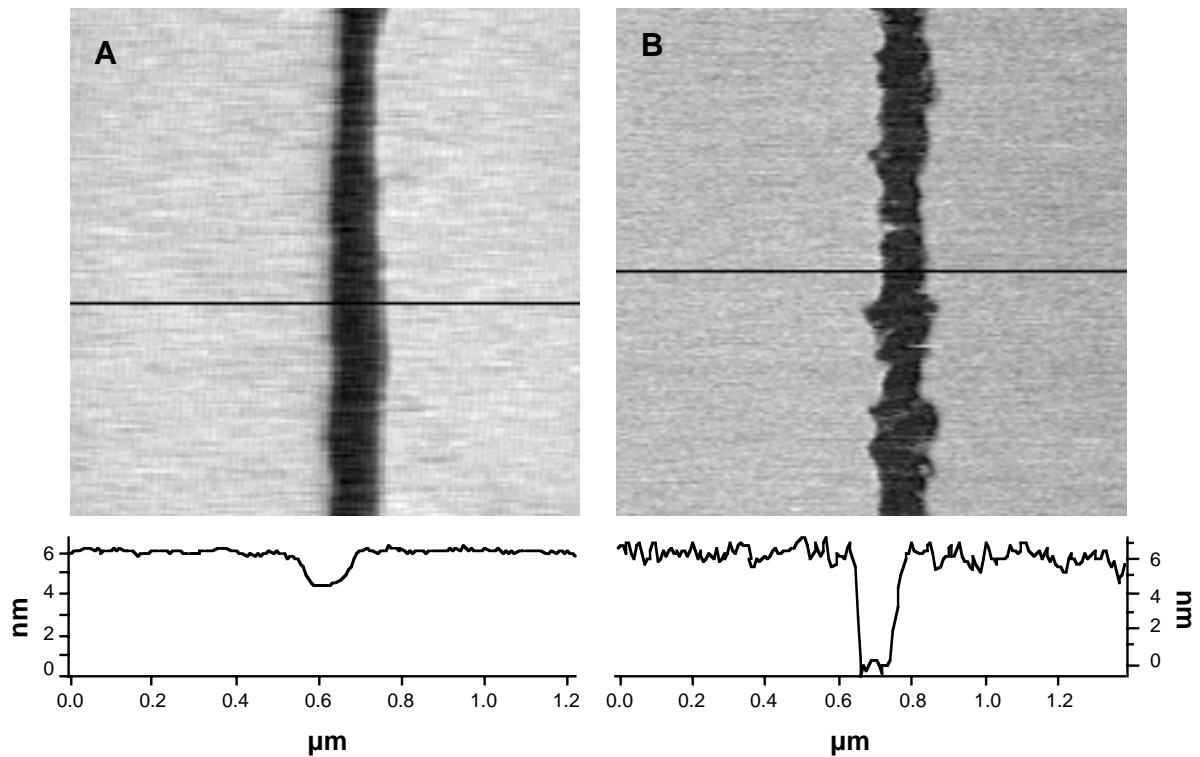


Abbildung 4.12 Kraftmikroskopische Aufnahmen sowie Höhenprofile von zwei DPPC-Doppelschichten, die mit unterschiedlichen Auflagekräften mit Hilfe von PLA_2 strukturiert wurden. Die Bedingungen während der Strukturierung waren: (A) 5 ± 3 nN Auflagekraft, 50 nM PLA_2 , 100 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM Tris (pH 8,9); (B) 12 ± 3 nN Auflagekraft, 130 nM PLA_2 , 100 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM Tris (pH 8,9).

Ein wichtiger Unterschied zwischen der hier vorgestellten Strukturierungsmethode und der Strukturierung von Lipidmembranen ohne Enzyme, bei der die Lipide einfach mit der Kraftmikroskopspitze mit einer hohen Auflagekraft in der Membran verschoben werden [179, 180], besteht darin, daß die Lipide bei der hier vorgestellten Methode durch die enzymatische

Reaktion tatsächlich aus der Membran entfernt werden, während sie ohne enzymatische Hydrolyse aufgrund ihrer starken Affinität zur Membran lediglich lateral in der Membran verschoben und nicht in der wäßrigen Phase gelöst werden. Dadurch lassen sich Strukturen von wenigen Nanometer Durchmesser sehr präzise erzeugen. Ferner lassen sich, wie in Abbildung 4.11 B gezeigt, beispielsweise parallele Linien erzeugen, während ohne die enzymatische Hydrolyse bereits fertiggestellte Strukturen leicht wieder mit Lipiden aufgefüllt werden, sobald in deren Nachbarschaft neue Strukturen erzeugt werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß mit der hier vorgestellten Strukturierungsmethode prinzipiell sowohl natürliche, als auch synthetische Lipidmembranen strukturiert werden können. Außerdem könnten die erzeugten Strukturen auch als Masken für eine weitere Oberflächenmodifikation, beispielsweise mit anderen Enzymen oder mit Hilfe elektrochemischer Prozesse dienen [181, 182]. Anschließend lassen sich die verbleibenden Phospholipide einfach mit einer hohen Konzentration an Phospholipase oder mit Detergenzien von der Oberfläche entfernen.

Möchte man mit dieser Technik sehr komplexe Oberflächenstrukturen erzeugen, so ist die unkontrollierte Hydrolyse der Membran an bereits strukturierten Stellen ein Problem, da prinzipiell die Ränder sämtlicher bereits erzeugter Strukturen als Angriffspunkte für das Enzym und damit als Startpunkte für eine weitere, unkontrollierte Hydrolyse der Membran dienen können. Das ließe sich z. B. dadurch umgehen, daß das für die Aktivierung des Enzyms notwendige Kalzium nur lokal in der unmittelbaren Umgebung der Kraftmikroskopspitze aus sogenannten *Caged Calcium Compounds* freigesetzt würde. Sehr viel naheliegender ist es jedoch, das Enzym über eine kovalente Ankopplung direkt an die Kraftmikroskopspitze zu binden und das Enzym so direkt mit den mechanischen Stellelementen des Kraftmikroskops zu positionieren. Erste Experimente in diese Richtung haben jedoch gezeigt, daß die dazu entwickelten kovalenten Ankopplungsprotokolle zwar grundsätzlich funktionieren, und daß die so angebindenen Enzyme auch nach wie vor enzymatische Aktivität zeigen (vgl. Anhang A). Es zeigte sich aber auch, daß nur ein Teil der Enzyme tatsächlich kovalent an die Kraftmikroskopspitze gebunden ist und daß der Anteil lediglich physisorbierter Enzyme sich ablösen und nach wie vor zu einer unkontrollierten Hydrolyse der Membran führen kann. Um

das zu vermeiden, ist eine spezifische Ankopplung des Enzyms nötig, die die unspezifische Adsorption von Enzymen an die Spitze von vorne herein ausschließt. Um die Funktionalität der Enzyme bei der Anbindung an die Kraftmikroskopspitze zu erhalten, ist es ferner nötig, deren Beweglichkeit soweit zu erhalten, daß diese mit ihrer Bindungstasche an das Substrat binden können [173]. Um das zu gewährleisten, ist ein flexibler Koppler von einigen nm Länge zwischen Spitze und Enzym nötig. Nicht zuletzt wäre es auch von Vorteil, wenn die Anbindung an die Spitze auch noch reversibel und schaltbar ist, so daß das Enzym bei Bedarf leicht gegen ein anderes ausgetauscht werden kann.

Ein möglicher Koppler, der zugleich hoch spezifisch, flexibel und über die Temperatur reversibel schaltbar ist, ist DNA. Um geeignete DNA-Sequenzen zu bestimmen, ist es jedoch zunächst nötig, die bei der DNA-Basenpaarung auftretenden Kräfte sowie die mechanische Belastbarkeit der DNA-Doppelhelix in Abhängigkeit von deren Sequenz, der Temperatur und anderer äußerer Parameter zu kennen. So beträgt die Bindungskraft von PLA₂ an ein Lipidsubstrat zwischen 20 pN und 30 pN (vgl. Anhang A). Ein geeigneter DNA-Koppler sollte daher in diesem Kraftbereich mechanisch stabil sein. Erste mechanische Experimente an DNA lieferten z. T. äußerst widersprüchliche Ergebnisse und lassen zahlreiche Punkte, wie etwa die Temperaturabhängigkeit ganz offen [69, 70, 183], so daß eine gründliche Untersuchung dieser Fragen mit Hilfe der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie eine nötige Voraussetzung für den Einsatz von DNA als schaltbarem molekularem Koppler ist. Darüber hinaus ist eine genaue Kenntnis der Stabilität der DNA-Doppelhelix und der Basenpaarungskräfte auch eine wichtige Voraussetzung zum Aufbau stabiler DNA-Nanostrukturen (vgl. Abschnitt 1).

5 Kraftspektroskopie

Neue experimentelle Techniken, die eine präzise Kontrolle und Messung von Kräften im Piconewton-Bereich und die Adressierung einzelner Moleküle erlauben, haben in jüngster Zeit erstmals mechanische Experimente mit einzelnen Molekülen ermöglicht. Mit Hilfe derartiger Einzelmolekülexperimente konnte innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl von Fragen zu intra- und intermolekularen Kräften und Wechselwirkungen aufgeklärt werden, die bis dahin experimentell nicht zugänglich waren (vgl. auch Abschnitt 1). Das zugängliche Kraftfenster reicht dabei von entropisch getriebenen Kräften [62, 184] über Konformationsänderungen in Polymeren oder Proteinen [6, 42, 54-56, 185-187] und den Kräften in der molekularen Erkennung [43-53] bis hin zur Abrißkraft kovalenter Bindungen [64, 188].

Die am häufigsten eingesetzten Kraftsensoren sind magnetische Mikropartikel [62, 189, 190], Mikropipetten [52, 191], optische Fasern [192], optische Pinzetten [193] und nicht zuletzt das Rasterkraftmikroskop [194]. Die derzeit mit speziell dafür entwickelten Kraftmikroskopen erzielbare Kraftauflösung (<3 pN) ist etwa zwei Größenordnungen über der von magnetischen Partikeln und etwa eine Größenordnung über der von optischen Pinzetten. Dafür steht mit dem Kraftmikroskop jedoch ein Instrument zur Verfügung, mit dem das gesamte für molekulare Wechselwirkungen relevante Kraftspektrum von thermischen Fluktuationen – wenige Piconewton¹⁷ [195] – bis hin zu kovalenten Bindungskräften – einige Nanonewton [64, 188] zugänglich ist. Ferner ermöglicht das Kraftmikroskop die Handhabung extrem kurzer Moleküle, die anders nur schwer adressiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit hat sich herausgestellt, daß es insbesondere zur mechanischen Charakterisierung der Stabilität von DNA erforderlich ist, den gesamten Kraftbereich von wenigen Piconewton bis zu mehreren hundert Piconewton untersuchen zu können.

¹⁷ Das Produkt aus Boltzmannkonstante und Temperatur $k_B T$ entspricht bei Raumtemperatur etwa 4,1 pN·nm, so daß thermische Fluktuationen typischerweise Kräfte von einigen pN ausüben.

5.1 Das Kraftspektrometer

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Kraftspektrometer (vgl. Anhang A und [196]) basieren zwar grundsätzlich auf dem in Abschnitt 2 eingeführten Rasterkraftmikroskop, weisen aber einige für die Detektion molekularer Kräfte und Wechselwirkungen wesentliche Modifikationen auf. So ist es beispielsweise wichtig, laterale Bewegungen während des Meßvorgangs möglichst zu minimieren, um daraus resultierende Reibungskräfte und laterale Zugkräfte so gering wie möglich zu halten. Bei den üblicherweise in der Kraftmikroskopie verwendeten Röhrenpiezos sind die drei Raumrichtungen jedoch nur unzureichend entkoppelt. Ein Aufbau, bei dem die Piezobewegung nicht unmittelbar auf die Probe übertragen wird, sondern der Abstand zwischen Spitze und Probe über eine mechanische Anordnung eingestellt wird, die nur eine Bewegungsrichtung zuläßt kann laterale Bewegungen während des Meßvorgangs deutlich reduzieren. Wenn die Probe ausreichend homogen ist, ist eine reine z-Bewegung ausreichend, da die laterale Position der Probe dann keine Rolle spielt. Soll die Probe dennoch auch lateral bewegt werden [197], so läßt sich das beispielsweise mit einem eigenen, nur in x- und y- verstellbaren Probentisch bewerkstelligen [198]. Da auch die Verbiegung der Abtastfeder durch die auf sie einwirkenden Kräfte zu einer lateralen Bewegung der Spitze relativ zur Probe führt, die näherungsweise proportional zum Sinus des Winkels zwischen Probe und Feder ist, muß ferner der Einbauwinkel der Feder (typischerweise 12-15°) auf ein Minimum (hier 6°) reduziert werden. Um die bei allen Piezos vorkommende Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtsbewegung zu kompensieren, ist es weiterhin wichtig, den tatsächlichen Piezoweg mit einem Dehnmeßstreifen oder einem kapazitiven oder induktiven Wegaufnehmer zu messen und den Piezo dann über eine Nachregelschleife exakt an die gewünschte Position zu bringen. Schließlich sollte auf eine gute Fokussierbarkeit und Modenstabilität des Laserstrahls im optischen Zeiger geachtet werden, um Interferenzen auf reflektierenden Proben sowie Intensitätsschwankungen zu vermeiden¹⁸.

¹⁸ Alternativ zu einem gut fokussierten Laserstrahl läßt sich auch eine möglichst inkohärente Lichtquelle verwenden.

5.2 Kraft-Abstandskurven

Bei der Auswertung der Meßkurven des Kraftspektrometers ist zu beachten, daß die eigentlichen Meßsignale die Verbiegung der Blattfeder und der Fahrweg des Piezos sind. In der Regel interessiert es aber nicht, wie weit der Piezo gefahren wurde, sondern wie weit beispielsweise ein Polymer bei einer bestimmten Kraft gedehnt wurde. D. h. entscheidend ist der tatsächliche Abstand zwischen Spitze und Probe. Um diesen zu erhalten muß die Auslenkung der Blattfeder vom Fahrweg des Piezos abgezogen werden¹⁹.

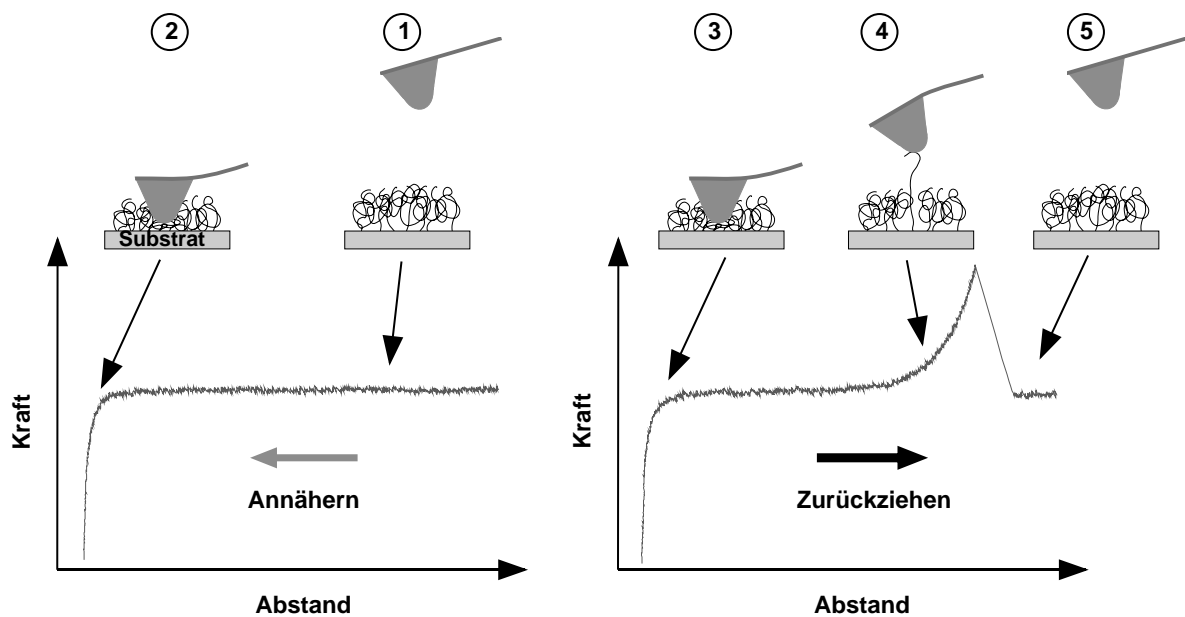


Abbildung 5.1 Ein typisches Kraftexperiment mit einem auf dem Kraftmikroskop basierenden Aufbau (oben) und die dazugehörigen Kraft-Abstandskurven (unten). Die Spitze wird zunächst an eine möglichst homogen präparierte Probe angenähert (1). Beim Eindringen in die Probe (2) lassen sich Informationen über die mechanischen Eigenschaften der Molekülschicht gewinnen. Anschließend werden Spitze und Probe wieder voneinander getrennt (3-5). Ein Molekül konnte an die Spitze gekoppelt werden. Beim Strecken des Moleküls (4) lassen sich die mechanischen Eigenschaften des Moleküls untersuchen. Schließlich reißt das Molekül von der Spitze ab (5). Beim Abriß kann die Adhäsionskraft der Verbindung gemessen werden (maximale Kraft vor dem Abreißen).

¹⁹ Um die Auslenkung der Blattfeder als Funktion der Photostromdifferenz zu erhalten, muß entweder vor oder nach dem eigentlichen Experiment eine Eindruckkurve auf einem harten Substrat (z. B. auf dem Substrat, neben der eigentlichen Polymerprobe) aufgezeichnet werden.

6 Elastizität von Polymeren

Um die aus kraftspektroskopischen Untersuchungen gewonnenen Informationen sinnvoll interpretieren zu können und die den Kraftspektren zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu verstehen, ist es notwendig, vorab einige grundlegende Überlegungen zur Elastizität von Polymeren im allgemeinen und von DNA im besonderen anzustellen.

Das elastische Verhalten von Polymeren läßt sich grob in drei Kraftbereiche unterteilen. Bei sehr niedrigen Kräften, je nach Molekül bis zu einigen zehn Piconewton, wird das Polymer, das ohne äußere Kraft ein sogenanntes Gauß'sches Knäuel bildet (siehe unten), in eine annähernd gestreckte Konformation gebracht. Dabei wird sein Konformationsraum mit zunehmender Ausdehnung stark verkleinert, was zu einer entropisch getriebenen Rückstellkraft führt [199-205]. Diese Entropieelastizität findet sich grundsätzlich bei allen Polymeren, unabhängig von Details der molekularen Struktur. Sie ist um so ausgeprägter, je flexibler und länger das Molekül ist²⁰. Im mittleren Kraftbereich, bis zu einigen hundert pN, werden dann auch Bindungswinkel innerhalb des Moleküls deformiert und es kann zu Änderungen der Molekülkonformation kommen [61, 206]. Im einfachsten Fall läßt sich die Entropieelastizität um eine lineare Segmentelastizität erweitern. In der Regel ist das Kraft-Abstands-Verhalten in diesem von enthalpischen Deformationskräften dominierten Bereich jedoch wesentlich komplexer, als daß es sich mit derart einfachen Modellen beschreiben ließe. Das gilt insbesondere auch für doppelsträngige DNA, die sich nur bis zu Kräften von etwa 50 pN durch die um eine lineare Segmentelastizität erweiterte Entropieelastizität beschreiben läßt. Hier ist dann eine individuelle Modellierung des untersuchten Polymers nötig, die im Idealfall direkt auf der quantenmechanischen Berechnung der Eigenzustände des Moleküls aufbaut [61]. Wo dies nicht möglich ist, lassen sich meist wenigstens bestimmte Aspekte des

²⁰ Da bis in die jüngste Zeit nur der entropische Bereich der Polymerelastizität experimentell zugänglich war, beschreiben die klassischen Modelle der Polymerphysik auch nur diesen Kraftbereich. In diesen Modellen wird angenommen, daß ein Polymer nicht über seine Konturlänge hinaus gedehnt werden kann. Das führt dazu, daß ein voll gestrecktes Polymer in diesen Modellen scheinbar unendlich hart ist und keine Überstreckung des Moleküls möglich ist (vgl. auch [196]).

Elastizitätsverhaltens mit Molekulardynamiksimulationen [53, 59, 60, 207] oder einfachen analytischen Ansätzen erfassen [208-210]. Im hohen Kraftbereich ab einigen hundert Piconewton werden dann zusätzlich intramolekulare Bindungen gedehnt, bis diese dann bei etwa 2 nN reißen [188]. Die Übergänge zwischen diesen drei Kraftbereichen sind dabei fließend.

Im Folgenden soll die theoretische Beschreibung der Entropieelastizität sowie deren Erweiterung um eine lineare Segmentelastizität kurz vorgestellt werden. Auf detaillierte Modelle zur Beschreibung doppelhelikaler DNA wird dann im darauffolgenden Abschnitt 7 näher eingegangen.

6.1 Die frei verbundene Kette

Im einfachsten Fall läßt sich ein Polymer aus N Monomeren wie eine Kette aus N starren Segmenten der Länge l beschreiben, bei der jedes Segment frei in eine beliebige Richtung zeigen kann. Die Konturlänge des Polymers ist dann gegeben durch

$$L = Nl. \quad (1)$$

Ohne äußere Kraft genügt die Wahrscheinlichkeit w des End-zu-End Abstand \mathbf{R} des Polymers einer Gaußverteilung [199-202]

$$w(\mathbf{R}) = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{3\mathbf{R}^2}{2Nl^2} \right), \quad (2)$$

und der mittlere quadratische End-zu-End Abstand²¹ ergibt sich daraus zu

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = Nl^2. \quad (3)$$

²¹ Es ist zu beachten, daß der End-zu-End Abstand nicht den Radius des Polymerknäuels wiedergibt. Ein besseres Maß dafür ist der Gyrationradius s , der den mittleren Abstand der Kettenglieder vom Schwerpunkt angibt und beispielsweise mit Streuexperimenten bestimmt werden kann. Es gilt: $\langle \mathbf{R}^2 \rangle = \langle s^2 \rangle / 6$.

Mit $S = k_B \ln w$ [211] ergibt sich für die Entropie des Polymers [200]:

$$S = S_0 - \frac{3}{2} \frac{R^2}{Nl^2} k_B. \quad (4)$$

Man sieht sofort, daß die Entropie des Systems mit zunehmendem R abnimmt, was zu einer Rückstellkraft des Polymers führt. Solange die Auslenkung R klein genug ist, daß Gleichung (2) die Verteilung des End-zu-End Abstands gut beschreibt, folgt für die entropisch bedingte Rückstellkraft:

$$f = -\left(\frac{\partial F}{\partial R}\right)_T = T\left(\frac{\partial S}{\partial R}\right)_T = -\frac{3k_B T}{Nl^2} R, \quad (5)$$

wenn F die freie Energie des Polymers bezeichnet. Für kleine Auslenkungen verhält sich ein Polymer also wie eine lineare Feder und die Rückstellkraft läßt sich auf sehr anschauliche Weise aus der Gauß'schen Verteilungsfunktion herleiten.

Wird das Polymer unter dem Einfluß einer äußeren Kraft stark gestreckt, so ist (2) jedoch nicht mehr erfüllt und damit sind (3-5) nicht mehr gültig. Um einen geschlossenen Ausdruck für das Kraft-Abstands-Verhalten des Polymers über das gesamte Kraftspektrum zu erhalten, wird dessen Zustandssumme $Z(f)$ für eine gegebene Zugkraft f berechnet, woraus die dazugehörige Auslenkung R folgt [211, 212]:

$$\langle R \rangle = k_B T \frac{\partial \ln Z(f)}{\partial f}. \quad (6)$$

Die Zustandssumme bei gegebener Kraft ist [211, 212]:

$$Z(f) = \int_{l_1} \cdots \int_{l_N} e^{-\frac{E(l_1 \dots l_N) - fR}{k_B T}} dl_1 \cdots dl_N. \quad (7)$$

$l_1 \dots l_N$ bezeichnen dabei die N Segmente der Länge l . Für die freie Kette hängt die innere Energie $E(l_1 \dots l_N)$ nicht von $l_1 \dots l_N$ ab, da zwischen den einzelnen Segmenten keine Wechselwirkung bestehen soll. $E(l_1 \dots l_N)$ ist also eine Konstante. Setzt man (6) in (7) ein und legt die Kraft in z -

Richtung an, so folgt für die mittlere Auslenkung in z -Richtung als Funktion der angelegten Kraft²²:

$$\langle z \rangle = N \cdot l \cdot \left[\coth\left(\frac{f_z l}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{f_z l} \right] = N \cdot l \cdot \mathcal{L}\left(\frac{f_z l}{k_B T}\right). \quad (8)$$

Dabei ist $\mathcal{L}(x)$ die Langevinfunktion $\coth(x) - 1/x$. Demnach ist die mittlere Kraft in z -Richtung gegeben durch:

$$\langle f(z) \rangle = \frac{k_B T}{l} \mathcal{L}^{-1}\left(\frac{z}{Nl}\right), \quad (9)$$

wobei \mathcal{L}^{-1} die Umkehrfunktion der Langevinfunktion ist. Die letzte Umformung ist jedoch nur dann zulässig, wenn N groß ist und die Fluktuationen von z um seinen Mittelwert klein sind [199].

Für reale Polymere ist die Annahme, daß jedes der N Segmente unabhängig von der Orientierung der Nachbarsegmente jede beliebige Orientierung annehmen kann, in der Regel nicht erfüllt. Es zeigt sich jedoch, daß für hinreichend großes k gilt: $\langle \mathbf{l}_i \cdot \mathbf{l}_{i+k} \rangle \approx 0$. Das heißt, jedes k -te Segment der Kette kann wieder als frei angesehen werden und k Segmente lassen sich zu einem fiktiven Segment der Länge l' zusammenfassen, welches auch als Kuhn'sches Segment bezeichnet wird. Das Polymer wird dann wie eine freie Kette aus N' Segmenten der Länge l' modelliert; die effektive Segmentlänge l' wird als Kuhnlänge bezeichnet. Damit diese Modellierung die realen Polymereigenschaften richtig wiedergibt, werden N' und l' meist über die Bedingungen

$$L = N' l' \quad (1') \quad \text{und} \quad \langle \mathbf{R}^2 \rangle = N' l'^2, \quad (3')$$

d.h. aus der Konturlänge und dem Gyrationradius bestimmt.

Bisher wurden die einzelnen Segmente \mathbf{l}_i als starr angesehen, so daß ein Strecken des Polymers über seine Konturlänge hinaus nicht möglich und die Rückstellkraft des Polymers in (9) rein

²² Die detaillierte Berechnung findet sich in Anhang B.

entropiebedingt war ($E(l_1 \dots l_N) = \text{konst.}$). Um auch enthalpiebedingte Kräfte beim Strecken einzelner Segmente zu berücksichtigen, läßt sich jedem Segment l_i eine Deformationsenergie $v(l_i - l_0)$ zuordnen²³ und die Energie in der Zustandssumme (7) um den Term $\sum_i v(l_i - l_0)$ erweitern²⁴. Hier steht l_0 für die Segmentlänge ohne äußere Kraft. Eine analytische Lösung der Zustandssumme ist dann jedoch oft nicht mehr möglich. Es zeigt sich aber in der Praxis, daß bei den meisten realen Polymeren die enthalpischen Beiträge zur Polymerelastizität erst dann beitragen, wenn das Polymer fast bis zur Konturlänge gestreckt ist und entropische Beiträge kaum noch eine Rolle spielen. Entropische und enthalpische Beiträge lassen sich deshalb in guter Näherung separieren (vgl. auch [54]). Für harmonische Potentiale etwa bedeutet das, daß sich (8) einfach um eine lineare Segmentelastizität erweitern läßt:

$$\langle z \rangle = N \cdot l \cdot \mathcal{L} \left(\frac{f_z l}{k_B T} \right) + \frac{N}{C} \cdot f. \quad (10)$$

Dabei ist C die Federkonstante pro Segment. In der Praxis wird meist nicht die Federkonstante pro Segment, sondern der Streckmodul S angegeben. Damit wird (10) zu

$$\langle z \rangle = L \cdot \mathcal{L} \left(\frac{f_z l}{k_B T} \right) + \frac{L}{S} \cdot f. \quad (11)$$

L_0 ist hier die Konturlänge des relaxierten Polymers.

6.2 Die frei rotierende Kette

Ein Spezialfall einer freien Kette aus N Segmenten der Länge l , bei der sich N' und l' analytisch bestimmen lassen, ist die frei rotierende Kette. Dabei wird der Tatsache Rechnung getragen, daß die Segmente vieler realer Polymere annähernd frei um einen festen Bindungswinkel θ

²³ Wenn ein Segment aus mehr als einer chemischen Bindung besteht, wie z. B. ein Kuhn-Segment, kann die Deformation der einzelnen Segmente dabei sowohl durch das Strecken einzelner Bindungen, als auch durch Bindungswinkeldeformationen hervorgerufen werden.

²⁴ In diesem Fall muß in der Zustandssumme auch noch über die Längen der einzelnen Segmente integriert werden, da diese nun variabel sind.

rotieren können. Der mittlere quadratische End-zu-End Abstand ergibt sich dann zu (vgl. auch [213]):

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = Nl^2 + 2l^2 \sum_{i < j} (\cos \theta)^{j-i}. \quad (12)$$

Für $N \rightarrow \infty$ ergibt das:

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = Nl^2 \frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta}. \quad (13)$$

Ein Berechnung der Zustandssumme ist für das Modell der frei rotierenden Kette nicht direkt analytisch möglich, da die Integrationsgrenzen für jedes Segment von der Stellung des vorhergehenden Segmentes abhängen²⁵. Ein Vergleich mit (1') und (3') ergibt aber, daß die frei rotierende Kette für große N auch durch eine freie Kette mit

$$N' = N / \alpha, \quad l' = l\alpha \quad \text{und} \quad \alpha = \frac{1 + \cos \theta}{(1 - \cos \theta)} \quad (14a, b, c)$$

modelliert werden kann.

6.3 Die semiflexible Kette

Während die freie Kette oder die frei rotierende Kette gut geeignet sind um flexible Polymere zu modellieren, bei denen das Verhältnis l'/l von Kuhnlänge zu molekularer Bindungslänge von der Größenordnung eins ist, wie beispielsweise bei einzelsträngiger DNA oder RNA oder bei einer ungefalteten Polypeptidkette, eignen sie sich nur bedingt zur Modellierung von semiflexiblen Polymeren, wie beispielsweise doppelsträngiger DNA oder Aktinfilamenten, bei denen $l'/l \gg 1$ ist. Zur Modellierung dieser semiflexiblen Polymere eignet sich das Kratky-Porod Modell [203], in der englischsprachigen Literatur meist als *worm-like chain (WLC)*

²⁵ Dieses Problem wurde von Fixman und Kovac durch ein Aufweichen der starren Bindungspotentiale umgangen. Das Kraft-Abstandsverhalten einer frei rotierenden Kette ergibt sich dann als Grenzfall aus diesem Ansatz [204].

model bezeichnet, wesentlich besser. Dieses Modell beschreibt ein semiflexibles Polymer wie einen kontinuierlichen elastischen Faden mit der elastischen Biegeenergie [214]:

$$E_B = \frac{B}{2} \int_0^L \left(\frac{\partial^2 \mathbf{r}(s)}{\partial s^2} \right)^2 ds. \quad (15)$$

Dabei steht $\mathbf{r}(s)$ für die vom Polymer beschriebene Raumkurve und B ist der Biegemodul des Polymers. Mit $w(\mathbf{r}) \propto \exp\left[-\frac{E_B}{k_B T}\right]$ folgt für die Korrelation zwischen zwei Tangenten $\mathbf{t}(s) = \partial_s \mathbf{r}(s)$ entlang des Polymers [201]:

$$\langle \mathbf{t}(s) \bullet \mathbf{t}(0) \rangle = \exp\left[\frac{-s}{B/(k_B T)} \right]. \quad (16)$$

$B/(k_B T)$ ist also die Länge, über die die Richtungskorrelation auf $1/e$ abgefallen ist. Sie wird aus diesem Grund auch als Persistenzlänge l_p bezeichnet und ist eine für die Elastizität des Polymers charakteristische Länge.

Für den mittleren quadratischen End-zu-End Abstand der semiflexiblen Kette gilt [201]:

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = \int_0^L \int_0^L \langle \mathbf{t}(s) \bullet \mathbf{t}(s') \rangle ds ds' = 2Ll_p - 2l_p^2 (1 - \exp(-L/l_p)). \quad (17)$$

Daraus ergeben sich folgende zwei Grenzfälle:

Für $L \gg l_p$ (Grenzfall flexibler Ketten) gilt: $\langle \mathbf{R}^2 \rangle = 2Ll_p.$ (18)

Für $l_p \gg L$ (Grenzfall steifer Stäbchen) gilt: $\langle \mathbf{R}^2 \rangle = L^2.$ (19)

Ein Vergleich von (18) mit (1') und (3') führt auf die wichtige Beziehung

$$l_p = l'/2 \quad (20)$$

zwischen Persistenzlänge l_p und Kuhnlänge l' .

Die Elastizität der semiflexiblen Kette wurde theoretisch erstmals 1994 von Marko und Siggia vollständig beschrieben²⁶ [208, 215], indem sie die Gleichung

$$Z(\mathbf{f}; s_0, \mathbf{t}_0; s_1, \mathbf{t}_1) = \int D\mathbf{t} \exp \left(- \frac{B/2 \int_{s_0}^{s_1} \left((\partial_s \mathbf{t})^2 - \mathbf{f} \bullet \mathbf{t} \right) ds}{k_B T} \right) \quad (21)$$

in eine Eigenwertgleichung für die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Tangentenvektors $\mathbf{t}(s) = \partial_s \mathbf{r}(s)$ überführten, die Eigenwerte numerisch bestimmten, daraus die Zustandssumme $Z(\mathbf{f})$ berechneten und durch Ableitung nach der Kraft (6) das Kraft-Abstandsverhalten bestimmten. D ist dabei eine Normierungskonstante, die gewährleistet, daß $\int Z(0; l) d^2 t_1 = 1$ für alle s_0, s_1 und \mathbf{t}_0 erfüllt ist. Obwohl die exakte Lösung nur numerisch berechnet werden kann, läßt sich doch eine analytische Formel angeben, die den Grenzfall kleiner sowie großer Kräfte asymptotisch korrekt wiedergibt, während sie im mittleren Kraftbereich um bis zu 10% von der exakten Lösung abweicht [208]. Bouchiat et al. schlugen deshalb 1999 vor, die Abweichungen der von Marko und Siggia angegebenen asymptotischen Formel von der exakten numerischen Lösung durch ein Polynom 7-ten Grades anzunähern und die asymptotische Formel um dieses Polynom zu erweitern [216]:

$$f(z) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{l}{4(1-z/L)^2} - \frac{l}{4} + \frac{z}{L} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L} \right)^i \right] \quad (22)$$

Die ersten drei Terme in der Klammer entsprechen der ursprünglichen Formel von Marko und Siggia [208, 215]; mit dem Polynom mit $\{\alpha_{2...7}\} = \{-0,6164228; -2,737418; 16,07497; -38,87607; 39,49944; -14,17718\}$ weicht diese Formel um weniger als 0,01% von der exakten Lösung ab.

²⁶ Frühere numerische Ansätze von Fixman und Kovac [204] und analytische Ansätze von Kovac und Crabb [205] gingen von einer frei rotierenden Kette mit harmonischen Biege- und Streckpotentialen in der Zustandssumme aus und machten dann für den semiflexiblen Fall den Grenzübergang $N \rightarrow \infty, l \rightarrow 0$ und $\cos \theta \rightarrow 1$. Das ist aber nur dann zulässig, wenn $L/l_p \gg 1$. Für Moleküle mit großer Persistenzlänge, wie z. B. DNA oder Aktinfilamente, entspricht das aber oft nicht den experimentellen Bedingungen.

In die Berechnung der Zustandssumme (21) geht im Gegensatz zur freien Kette zwar diesmal die elastische Biegeenergie E_B (15) ein, die Konturlänge des Polymers L wird aber wieder als fest angenommen und somit werden in (22) wieder nur die entropischen Beiträge zur Polymerelastizität erfaßt. Formal ließen sich enthalpische Beiträge wieder durch einen weiteren Energieterm in der Zustandssumme berücksichtigen. Für reale Polymere hat es sich jedoch bewährt, Formel (22) im Nachhinein um einen linearen Streckmodul S zu erweitern²⁷. Durch die Substitution $\frac{z}{L} \rightarrow \frac{z}{L_0} - \frac{f}{S} =: \Lambda$ erhält man die implizite Gleichung:

$$f(\Lambda) = \frac{k_B T}{l_P} \left[\frac{l}{4(1-\Lambda)^2} - \frac{l}{4} + \Lambda + \sum_{i=0}^{i \leq 7} \alpha_i \Lambda^i \right]. \quad (23)$$

L_0 steht dabei für die Konturlänge des entspannten Polymers.

6.4 Polyelektrolyte

Als Polyelektrolyte werden mehrfach elektrisch geladene Moleküle wie z. B. Polymere aus elektrisch geladenen oder elektrisch ladbaren Untereinheiten bezeichnet. Fast alle biologischen Polymere, wie Polypeptide, viele Polysaccharide oder DNA tragen unter physiologischen Bedingungen elektrische Ladungen. Formal lassen sich geladene Polymere durch einen zusätzlichen Term für die elektrostatische Selbstenergie

$$E_{el} = \frac{l}{2} \int_0^L \int_0^L V(\mathbf{r}(s) - \mathbf{r}(s')) ds ds' \quad (24)$$

in der Zustandssumme $Z(f)$ beschreiben [218-220]. V ist dabei die elektrostatische Potentialdichte. Meist wird zur Beschreibung der durch Gegenionen abgeschirmten

²⁷ Bestände das Polymer aus einem homogenen isotropen elastischen Material, so wäre das Biegemodul aus (15) $B=I\epsilon$, wobei I das Trägheitsmoment um die Molekülachse und ϵ der Elastizitätsmodul sind. Für das Streckmodul S gilt dann: $S=A\epsilon$. Dabei ist A die Querschnittsfläche des Moleküls. Zusammen mit $l_P=B/(k_B T)$ führt das für eine kreisförmige Querschnittsfläche mit Radius r auf die Beziehung $l_P=Sr^2/(4k_B T)$ zwischen Persistenzlänge und Streckmodul (vgl. auch [214]). Baumann et al. konnten 1997 zeigen, daß diese Beziehung zwischen S und l_P für DNA nicht erfüllt ist: mit abnehmender Salzkonzentration erhöht sich aufgrund zunehmender elektrostatischer Abstoßung die Biegesteifigkeit und damit l_P (vgl. auch Kap. 6.4), während S aus demselben Grund abnimmt [217].

elektrostatischen Wechselwirkung die Debye-Hückel Näherung [103, 221, 222] verwendet. Für $V(\mathbf{r}(s)-\mathbf{r}(s'))$ gilt dann:

$$V(\mathbf{r}(s)-\mathbf{r}(s')) = \frac{(q/d)^2}{4\pi\epsilon} \frac{\exp(-|\mathbf{r}(s)-\mathbf{r}(s')|/\lambda_D)}{|\mathbf{r}(s)-\mathbf{r}(s')|} \quad (25)$$

Dabei ist d der Abstand der Ladungen q entlang des Polymers, ϵ die Dielektrizitätskonstante des Mediums und $\lambda_D = \sqrt{\epsilon k_B T / (\sum_i n_i q_i^2)}$ die Debye'sche Abschirmlänge (n_i = Ladungskonzentrationen der Ladungen q_i). Der Ladungsabstand d kann dabei, wie sich zeigt, einen kritischen Wert Q nicht unterschreiten: Wenn die elektrostatische Energie $E_{el}(d)$ zweier benachbarter Ladungen größer wird als die thermische Energie $k_B T$ eines Gegenions in der Lösung, kondensieren so viele Gegenionen an das geladene Polymer, bis $E_{el}(d) = k_B T$ erfüllt ist [223]. Die elektrostatische Energie zweier benachbarter Ladungen, die sich sehr viel näher sind, als die Debye'sche Abschirmlänge λ_D ist $E_{el}(d) = q^2 / (4\pi\epsilon \cdot d)$. Daraus folgt unmittelbar: $Q = q^2 / (4\pi\epsilon \cdot k_B T)$. Für einwertige Ladungen und Gegenionen bei Raumtemperatur in Wasser ist $Q = 7,1 \text{ \AA}^{28}$. Diese Gegenionenkondensation wird auch als *Manningkondensation* bezeichnet; Q wird üblicherweise als *Bjerrumlänge* bezeichnet.

Bis heute gibt es keine exakte Lösung der Zustandssumme $Z(f)$ mit dem Energieterm $E = E_B + E_{el} - fz$, aus der sich dann gemäß (6) das Kraft-Abstands-Verhalten von Polyelektrolyten bestimmen ließe. Eine von Odijk, Skolnik und Fixman [224] vorgeschlagene Beschreibung gibt jedoch einige wesentliche Aspekte elektrisch geladener Polymere gut wieder. Dabei werden zwei Grenzfälle untersucht: Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen weit voneinander entfernten Bereichen des Polymers und die zwischen benachbarten Bereichen. Demnach machen sich die Ladungen für weit voneinander entfernte Segmente des Polymers durch ein größeres Ausschlußvolumen²⁹ bemerkbar, was aber auf das Kraft-Abstands-

²⁸ Für mehrwertige Gegenionen gilt dieser Wert so nicht. Eine detaillierte Herleitung findet sich in [223]. Für die meisten praktischen Anwendungen stellt die Vernachlässigung mehrwertiger Gegenionen jedoch eine gute Näherung dar.

²⁹ Das Ausschlußvolumen berücksichtigt die Tatsache, daß sich zwei Monomere einer Polymerkette nicht gegenseitig durchdringen können. Es wird meist durch den Wechselwirkungsterm der Art $W_{ij} = v\delta(r_i - r_j)$ beschrieben und hat nur

Verhalten praktisch keinen Einfluß hat. Bei benachbarten Segmenten führt die elektrostatische Repulsion dagegen zu einer zusätzlichen Versteifung des Polymers, was sich durch einen zusätzlichen elektrostatischen Beitrag zur Persistenzlänge des Polymers bemerkbar macht:

$$l_p^{eff} = l_p + l_p^{el}, \quad \text{mit} \quad l_p^{el} = \frac{\lambda_D^2 Q}{4d^2}. \quad (26)$$

Falls gilt $d < Q$ ist d dabei durch die Bjerrumlänge Q zu ersetzen.

einen geringen Einfluß auf das Kraft-Abstands-Verhalten eines gestreckten Polymers. Das gilt insbesondere für steife Polymere, wie DNA bei denen die Konturlänge oft von einer ähnlichen Größenordnung wie die Persistenzlänge ist. Bei einem idealen Lösungsmittel ist v gleich dem Volumen des Monomers; v hängt aber i.a. von der Qualität des Lösungsmittels ab [202]. Im Fall geladener Polymere wird nun jedem Monomer zusätzlich ein Zylinder mit Radius $r=2\lambda_D$ zugeordnet, der von keinem anderen Monomer durchdrungen werden kann [224 c].

7 Elastizität von DNA: Theoretische Modelle

7.1 Entropischer und linearer Kraftbereich

Während sich einzelsträngige DNA (engl. *single-stranded DNA* oder kurz ssDNA) bis zu Kräften von etwa 100 pN sehr gut durch das Modell einer freien Kette (vgl. 11) mit einer Kuhnlänge l' von 15 Å und einem linearen Streckmodul von S von 800 pN beschreiben läßt, und sich die Abweichungen von diesem Modell auch bei höheren Kräften in Grenzen halten (siehe Abschnitt 8.1), zeigt doppelsträngige DNA (dsDNA) aufgrund des Wechselspiels zwischen Zugspannung, Torsionsspannung und der Stapelung der Basenpaare ein sehr viel komplexeres Kraftspektrum mit hochgradig nichtlinearen Beiträgen (siehe Abschnitt 8.2). Unter physiologischen Bedingungen ($[\text{NaCl}] \approx 150 \text{ mM}$, $\text{pH} \approx 7,5$) läßt sich dsDNA bis zu Kräften von etwa 50 pN mit dem Modell der semiflexiblen Kette (vgl. 23) mit einer Persistenzlänge l_p von 47 nm und einem zusätzlichem linearen Streckmodul S von 1,0 nN beschreiben [225]. Sowohl l_p , als auch S hängen dabei von der Konzentration und der Wertigkeit der Gegenionen ab (vgl. auch (26) und [62, 217, 225]).

7.2 Der nichtlineare Kraftbereich

1996 entdeckten Smith et al. [226] und Cluzel et al. [192] unabhängig voneinander einen extrem kooperativen Konformationsübergang bei 65 pN, in dem sich doppelsträngige Lambda-Phagen-DNA (λ -DNA) bei einem Kraftanstieg von nur 2-3 pN um den Faktor 1,7 verlängert³⁰. Diese Entdeckung zog innerhalb kurzer Zeit mehrere analytische Beschreibungen sowie Simulationen dieses sogenannten *B-S-Übergangs* nach sich. B steht dabei für die natürliche B-Form von λ -DNA [227], während S für überstreckte (engl. *stretched*) DNA steht. Dabei ist zu beachten, daß die Simulationen zwar detaillierte Einblicke in die molekularen Strukturen zulassen, aber die experimentellen Kraftspektren meist nur sehr grob wiedergeben und

³⁰ Der Kraftanstieg von nur 2-3 pN ist etwa 30-40 mal kleiner, als bei einem völlig unkooperativen Prozeß [226].

insbesondere beim B-S-Übergang von DNA bisher kein einheitliches Bild ergeben [228-231] (vgl. auch [46, 53, 54, 59, 60, 207]). Aus diesem Grund ist oftmals ein direkter Vergleich der experimentellen Daten mit den im folgenden beschriebenen stark vereinfachenden analytischen Modellen besser möglich, als beispielsweise mit den Ergebnissen von Molekulardynamiksimulationen.

7.2.1 Semiflexible Kette mit Zwei-Zustands-Modell

Der allgemeinste Ansatz zur Beschreibung des B-S-Übergangs vernachlässigt sämtliche molekularen Details der DNA-Doppelhelix und geht ganz allgemein von einem eindimensionalen elastisch deformierbaren System mit kooperativer Wechselwirkung unter Einwirkung einer äußeren Kraft aus [192, 232]. Einzelne Segmente³¹ können dabei sowohl im überstreckten S-Zustand, als auch im ungestreckten B-Zustand sein. Die Kooperativität wird, wie beim Ising-Modell [233], durch eine Nächste-Nachbar-Wechselwirkung der Art

$$\Delta E(B,B) = 2H + 4J \quad (27a)$$

$$\Delta E(B,S) = \Delta E(S,B) = 2H \quad (27b)$$

$$\Delta E(S,S) = 2H - 4J. \quad (27c)$$

eingeführt. Dabei ist ΔE die freie Energie, die aufgebracht werden muß, um ein Segment vom B in den S-Zustand zu überstrecken, wenn (a) beide nächste Nachbarn im B-Zustand sind, (b) einer der nächste Nachbarn im S-Zustand ist oder (c) beide nächste Nachbarn im S-Zustand sind. $2H$ ist dann der freie Energieunterschied zwischen B- und S-Zustand und $4J$ ist die Korrelationsenergie zweier benachbarter Segmente. Wird die Zustandssumme mit $E = E_B + \Delta E$, (15, 27) berechnet, so ergibt sich folgendes Kraft-Abstands-Verhalten [232]:

³¹ Die Segmente sind hier nicht einzelne Basenpaare, sondern es werden bis zu 10 Basenpaare zu einem Segment zusammengefaßt.

$$\langle z \rangle = L_0 \cdot \gamma(t) \cdot \left[1 + \frac{\alpha}{2} \right] \cdot \left(1 - \frac{e^{\beta J} \sinh \beta H^* + \frac{1}{2} e^{2\beta J} \sinh 2\beta H^* (e^{2\beta J} \cosh^2(\beta H^* - 2 \sinh(2\beta J)))^{-1/2}}{e^{\beta J} \cosh(\beta H^*) + (e^{2\beta J} \cosh^2(\beta H^*) - 2 \sinh(2\beta J))^{1/2}} \right) \quad (31a)$$

mit

$$\gamma(t) = 1 - \left[\left(2 + \sqrt{4 - (4/3t - 1)^3} \right)^{1/3} + \frac{4/3t - 1}{\left(2 + \sqrt{4 - (4/3t - 1)^3} \right)^{1/3}} \right]^{-1} \quad (31b)$$

und

$$H^* = H + \frac{\Delta l \cdot l^* \cdot k_B T}{2l_p} \left[(4(1 - \gamma(t)))^{-1} - 4(1 + \gamma(t)) + (\gamma(t))^2 / 2 - t\gamma(t) \right]. \quad (31c)$$

Dabei steht β für $1/(k_B T)$, t für die dimensionslose Zugspannung $f \cdot l_p / (k_B T)$, Δl für die relative Längenänderung im B-S-Übergang ($\Delta l = L_S / L_B - 1$) und l^* ist neben H und J ein weiterer freier Parameter, der für die Länge einzelner voneinander unabhängiger Segmente steht und aus der Anpassung des Modells an die experimentellen Daten ermittelt werden muß (vgl. auch Fußnote 31).

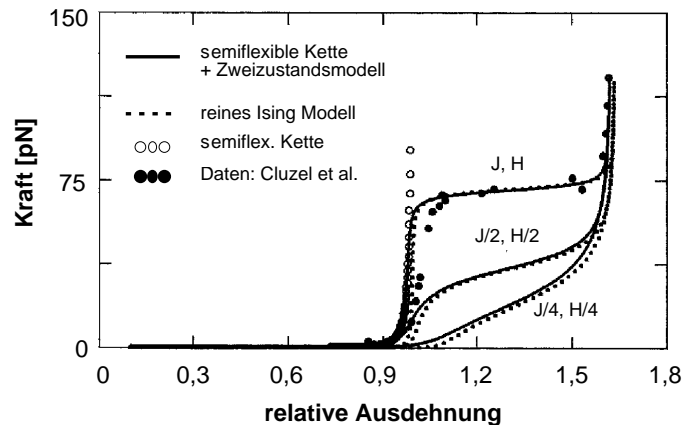


Abbildung 7.1 Semiflexible Kette mit Zweizustandsmodell (27a, b, c; mit $H=1,64 k_B T$, $J=1,25 k_B T$, $\Delta l=0,78$ und $l^*=3,4 \text{ \AA}$), reines Ising-Modell, semiflexible Kette (ohne Zweizustandsmodell) und experimentelle Daten aus [192]. Die relative Ausdehnung bezeichnet die Ausdehnung eines Moleküls (L) bezogen auf seine B-DNA Konturlänge (L_B). Sie ist gegeben durch L/L_B . Graphik nach [232].

Mit Hilfe der freien Parameter läßt sich dieses Modell recht gut an die experimentelle Daten anpassen, und aufgrund der sehr allgemein formulierten Annahmen sollte es sich auch auf andere kooperative Konformationsänderungen in flexiblen eindimensionalen Systemen übertragen lassen³². Allerdings trägt dieses Modell wegen seines allgemeinen Ansatzes nur sehr begrenzt zur Aufklärung der intramolekularen Mechanismen, die für den B-S-Übergang verantwortlich sind, bei. Insbesondere der Einfluß der Rotationsfreiheitsgrade und der Basenstapelung auf den B-S-Übergang werden in diesem Modell nicht erfaßt. Außerdem bleiben die physikalischen Bedeutungen von J und l^* z. T. unklar, da beide Parameter die Kooperativität erhöhen und sich sowohl mit einem l^* von eins, als auch mit l^* von 10 eine ähnlich gute Anpassung an die experimentellen Daten erreichen läßt, wenn auch J entsprechend angepaßt wird [232].

7.2.2 DNA-Elastizität und Topologie

Aufgrund der Helizität von DNA (10,4 Basenpaare/Helixumdrehung bei B-DNA [227]) sollte deren Elastizität stark von den topologischen Randbedingungen abhängen. Erste Experimente in diese Richtung von Strick et al. zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen Torsions- und Zugspannung bei Kräften unterhalb von 10 pN [190, 234-236]. Im Rahmen dieser Arbeit sowie in einer Untersuchung Léger et al. [237] konnte übereinstimmend gezeigt werden, daß die Elastizität von DNA auch im Bereich des B-S-Übergangs stark von den topologischen Randbedingungen abhängt (vgl. auch Abschnitt 8.2.2).

Um die Kopplung zwischen Torsions- und Zugspannung in der DNA-Doppelhelix theoretisch zu erfassen, wurde 1997 von Marko ein Modell vorgeschlagen, welches die Biegeenergie der semiflexiblen Kette $(B/2)\left(\partial^2 \mathbf{r}(s)/\partial s^2\right)^2$ im Integranden von (15) um die Terme

$$\frac{a_1}{2} \Delta l^2 + \frac{a_2}{2} \Delta \Omega^2 + a_3 \Delta l \Delta \Omega + \frac{a_4}{2} \left(\frac{d\Delta l}{ds} \right)^2 + V(\Delta l) \quad (29)$$

³² Nur bei Kräften kurz unterhalb des B-S-Übergangs zeigen sich geringe Abweichungen von den experimentellen Kurven, da dieses Modell die lineare Segmentelastizität bei Kräften um die 50 pN nicht berücksichtigt.

ergänzt [209, 210]. Die a_i sind dabei elastische Konstanten, Δl ist, wie in (28c) die relative Längenänderung bezogen auf die B-DNA-Konturlänge und $\Delta\Omega$ beschreibt den Torsionswinkel bezogen auf seine Ruhelage. Die ersten beiden Terme in (29) sind die harmonischen Zug- und Torsionspotentiale, der dritte Term berücksichtigt die lineare Kopplung zwischen Δl und $\Delta\Omega$, der vierte Term ist die Korrelationsenergie zwischen stark überstreckten S- und nicht überstreckten B-DNA Bereichen, und $V(\Delta l)$ ist ein nichtlineares Potential, das zusammen mit der Korrelationsenergie den B-S-Übergang modelliert³³.

Die Zustandssumme der semiflexiblen Kette (21) mit einer um (29) erweiterten Gesamtenergie ist nicht analytisch lösbar. Für den Fall frei rotierender DNA stimmt die numerische Lösung gut mit den experimentellen Ergebnissen von Smith et al. und Cluzel et al. [192, 226] überein: Bei etwa 65 pN läßt sich die Doppelhelix bei einem Kraftanstieg von wenigen pN um den Faktor 1,7 verlängern. Für den Fall, daß das DNA-Molekül nicht frei um seine Längsachse rotieren kann, ist der B-S-Übergang zu höheren Kräften verschoben (ca. 90-110 pN) und zeigt deutlich weniger Kooperativität, als im Fall eines frei rotierenden Moleküls. Die Übereinstimmung mit experimentellen Daten ist jedoch nur von qualitativer Art (vgl. Abschnitt 8.2.2 und [237]).

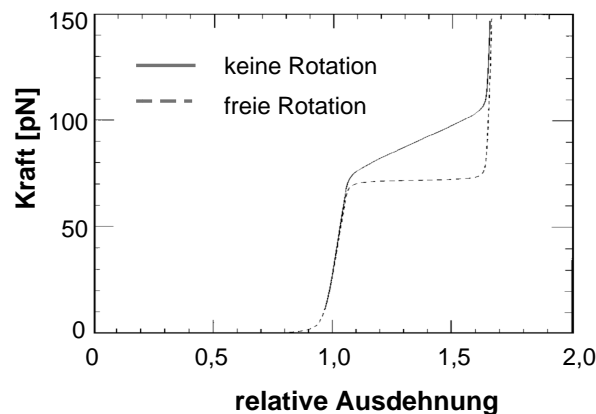


Abbildung 7.2 Elastizität rotationsbeschränkter und frei rotierender DNA nach [210].

³³ Im einfachsten Fall ist $V(\Delta l)$ proportional Δl^3 .

Der Grund dafür liegt in der Annahme, daß sich die elastischen Konstanten a_i (29) und B (15) während des Konformationsübergangs nicht ändern. Es zeigt sich jedoch, daß sich die Konformation der DNA-Doppelhelix während des Übergangs so stark ändert, daß diese Annahme nicht mehr gerechtfertigt ist [228-230, 238]. So sind beispielsweise zur Beschreibung des B-S-Übergangs bei rotationsbeschränkter DNA tatsächlich drei verschiedene DNA-Konformationen nötig, die sich nicht nur in ihrer Gleichgewichts-Konturlänge und Helizität unterscheiden, sondern auch in ihren elastischen Konstanten [237]: die natürliche B-Konformation mit einer Helixumdrehung alle 10,4 Basenpaare (bp) und einer Länge von 3,4 Å/bp [227], die um 72% unterwundene und 70% längere S-Konformation (37 bp/Helixumdrehung, $L_S/L_B=1,7$) und die um 300% überwundenene und um 60% gestreckte sogenannte P-DNA (3,5 bp/Helixumdrehung, $L_P/L_B=1,6$), bei der, ähnlich wie bei der 1953 von Pauling für relaxierte DNA vorgeschlagenen Struktur, die Basen nach außen zeigen, während sich das Phosphat-Zucker-Rückgrat im Inneren der Doppelhelix befindet³⁴ [238, 239]. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Konformationen derart, daß ein kontinuierlicher Übergang von der einen in die andere Konformation kaum möglich erscheint. Simulationen zeigen, daß eine von außen aufgezwungene Änderung der Parameter Länge oder Helixumdrehung pro Basenpaar dazu führt, daß die potentielle Energie der immer stärker gestörten B-Konformation kontinuierlich ansteigt, während die potentielle Energie anderer Konformationen abnimmt, bis Teile der Doppelhelix schlagartig in eine andere, z. B. eine gestrecktere Konformation übergehen [228-230]. Die Länge dieser neuen Bereiche mit anderer Konformation wächst dann mit zunehmender Längenänderung bzw. Helizitätsänderung stetig an, bis keine Bereiche mit B-Konformation mehr vorhanden sind.

³⁴ Mit Hilfe der experimentell ermittelten elastischen Konstanten der unterschiedlichen DNA-Konformationen läßt sich das Überstrecken rotationsbeschränkter DNA dann auch theoretisch modellieren [237]. Im völlig überstreckten Zustand besteht das DNA-Molekül dann, da ja die Summe der Helixumdrehungen in diesem Fall konstant ist und wegen $72\%/300\%=1/4$ aus vier Teilen (80%) S-DNA und einem Teil (20%) P-DNA.

7.2.3 Einfluß der Basenstapelung³⁵

Ein kürzlich von Haijun et al. vorgeschlagenes Modell zur Beschreibung der Elastizität von DNA [242] berücksichtigt erstmals nicht nur eine Koppelung zwischen Zug- und Torsionsspannung, sondern auch den Einfluß der Basenstapelung, die neben den Wasserstoffbrückenbindungen zu komplementären Basen einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung der Doppelhelix leistet [240, 241]. Die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix werden dabei wie zwei semiflexible Ketten behandelt, die über die Basenpaare starr und symmetrisch zur Molekülachse miteinander verbunden sind. Die Länge des Moleküls wird mit dem Winkel ϕ zwischen der Molekülachse und den Tangenten an die beiden Rückgrate parametrisiert. Die elastische Energie der Doppelhelix ist dann gegeben durch:

$$E_{elast} = \frac{B}{2} \int_0^L \left(\left(\frac{\partial \mathbf{t}_1}{\partial s} \right)^2 + \left(\frac{\partial \mathbf{t}_2}{\partial s} \right)^2 + \rho \right) ds = B \int_0^L \left(B \left(\frac{\partial \mathbf{t}}{\partial s} \right)^2 + B \left(\frac{\partial \phi}{\partial s} \right)^2 + \frac{B}{R^2} \sin^4 \phi + \rho(\phi) \right) ds. \quad (30)$$

\mathbf{t}_1 und \mathbf{t}_2 sind die Tangenten an die Rückgrate der Doppelhelix, \mathbf{t} ist die Tangente an die Molekülachse, R ist der Radius der Doppelhelix und ρ gibt die Liniendichte der Basenstapelungsenergie an. Letztere wird durch das Lennard-Jones Potential

$$\rho(\phi) = \frac{\varepsilon}{r_0} \begin{cases} \left(\frac{\cos \phi_0}{\cos \phi} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\cos \phi_0}{\cos \phi} \right)^6 & \text{für } \phi \geq 0 \\ \cos^{12} \phi_0 - 2 \cos^6 \phi_0 & \text{für } \phi < 0 \end{cases} \quad (31)$$

beschrieben. ε hängt dabei von der Sequenz ab und gibt die Stärke der Basenstapelung an, r_0 ist die Rückgratbogenlänge zwischen zwei benachbarten Basen und ϕ_0 bestimmt die Gleichgewichtslage von ϕ ohne äußere Kraft. ε wird aus quantenchemischen Berechnungen und r_0 und ϕ_0 aus den Strukturdaten von B-DNA bestimmt [240]. Damit ist B der einzige freie Parameter in diesem Modell. Auch hier läßt sich die Zustandssumme nur numerisch berechnen. Mit $\varepsilon = 14 k_B T$, $\phi_0 = 62^\circ$, $r_0 = 0,59$ nm, $R = 0,81$ nm und $B = 1,89 \times 10^{-28}$ Nm² ergibt sich für eine

³⁵ Unter Basenstapelung versteht man die Wechselwirkung entlang der Molekülachse benachbarter Basen. Dazu gehören vor allem elektronische Wechselwirkungen der sich z. T. überlappenden π -Orbitale der Basen, sowie sterische Wechselwirkungen (vgl. auch Anhang C und [240-241]).

DNA-Sequenz bei der alle 10 Watson-Crick Basenpaarungen (vgl. Anhang C) gleichmäßig vorkommen eine gute Anpassung an die Daten für den B-S-Übergang frei rotierender DNA. Für rotationsbegrenzte Moleküle liegen die numerischen Ergebnisse bisher nur bis zu einer Kraft von 8 pN vor.

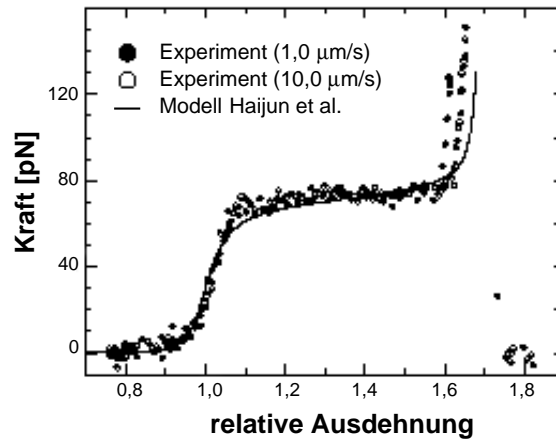


Abbildung 7.3 Elastizität von DNA unter Berücksichtigung der Basenstapelung und Vergleich mit experimentellen Daten. Abbildung nach [242].

8 Elastizität von DNA: Experimente³⁶

Zur experimentellen Bestimmung der mechanischen Eigenschaften von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA, der mechanischen Stabilität der DNA-Doppelhelix sowie der Basenpaarungskräfte wurden einzelne DNA-Moleküle zwischen einem Substrat und der Spitze eines Kraftspektrometers eingespannt und gedehnt. Die angelegte Kraft gegen den Abstand zwischen Spitze und Probe – im folgenden auch als Ausdehnung bezeichnet – aufgetragen³⁷.

8.1 Einzelsträngige DNA

Die Elastizität von einzelsträngiger DNA wird im wesentlichen von deren Phosphat-Zucker-Rückgrat bestimmt und genügt, wie aus Abbildung 8.1 ersichtlich ist, unter physiologischen Bedingungen³⁸ bis zu Kräften von etwa 100 pN dem Modell einer freien Kette mit einer Kuhnlänge l' von 15 Å und einem zusätzlichen linearen Streckmodul S von 800 pN (vgl. 11 und [226]). Mit 5,9 Å pro Base entspricht das einer Federkonstanten C (10) von 136 pN/Å pro Base. Einzelsträngige DNA ist damit in diesem Kraftbereich etwa 5-10 mal weicher als die meisten vergleichbaren Polymere [54, 57, 59, 245, 246]. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine kraftinduzierte Konformationsänderung des Furanoserings von der C3'-endo Konformation (5,9 Å/Base) in die um 1,1 Å längere C2'-endo Konformation sein (vgl. auch [226]). Der Energieunterschied zwischen beiden Konformationen hängt dabei von der Sequenz

³⁶ Die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente wurden z. T. in Zusammenarbeit mit Dr. M. Rief (Stanford University, Stanford, CA), sowie Dipl. Phys. C. Tolksdorf (LMU-München) durchgeführt.

³⁷ Eine Skizze des Kraftspektrometers findet sich in Anhang A; die Probenpräparation ist ebenfalls in Anhang A ausführlich beschrieben.

³⁸ Da mehrwertige Ionen sowohl bei einzelsträngiger, als auch bei doppelsträngiger DNA zur Komplexierung führen können [243, 244] wurden die Experimente in Tris-EDTA-Puffer bei pH 8 durchgeführt. Falls nicht ausdrücklich anders erwähnt, beziehen sich im folgenden alle Angaben zur DNA-Elastizität auf 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA und 20°C. Da oberhalb von pH 1 die Phosphatgruppen des Rückgrats vollständig deprotoniert sind und die Basen im physiologischen Bereich von pH 5 bis pH 9 ungeladen sind [241], ist die Elastizität von DNA über einen weiten Bereich unabhängig vom pH-Wert.

und den Umgebungsbedingungen ab, liegt aber i. A. unterhalb der thermischen Energie $k_B T$ und auch die Barriere zwischen beiden Konformationen ist von derselben Größenordnung wie $k_B T$ [240, 241].

Bei Kräften über 100 pN machen sich aber auch nichtlineare enthalpische Beiträge deutlich bemerkbar. Die DNA wird härter, was vermutlich auf eine weitere Deformation des Furanoseringes sowie auf Bindungswinkeldeformationen zurückzuführen ist [54, 57], bis schließlich ab etwa 1 nN die kovalenten Bindungen gestreckt werden [64, 188]. Quantenchemische Berechnungen sämtlicher Biege- und Streckpotentiale sowie Molekulardynamiksimulationen einzelsträngiger DNA könnten hier einen wichtigen Beitrag zu einem detaillierten Verständnis der intramolekularen Ursachen der Elastizität von einzelsträngiger DNA über den gesamten Kraftbereich leisten [60, 61].

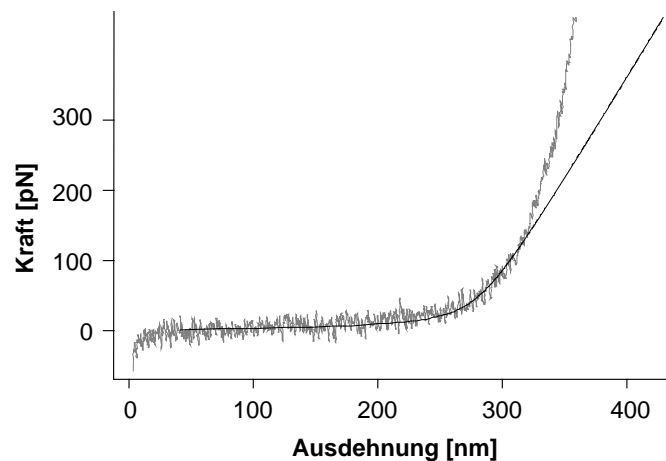


Abbildung 8.1 Kraft-Abstands-Kurve von einzelsträngiger DNA (graue Kurve) und die Elastizität einer freien Kette mit linearem Streckmodul $S=800$ pN und Kuhnlänge $l'=15$ Å (schwarze Kurve). Bis etwa 100 pN lässt sich einzelsträngige DNA durch dieses Modell beschreiben. Puffer-Bedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 20°C.

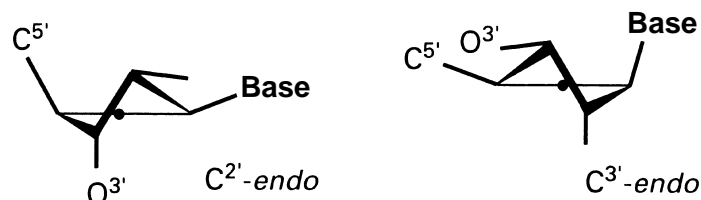


Abbildung 8.2 C2'-endo- (links; $l=7,0$ Å/Base) und C3'-endo-Konformation (rechts; $l=5,9$ Å/Base) des Furanoseringes von Nucleotiden.

8.2 Doppelsträngige DNA

8.2.1 Das Kraftspektrum

Abbildung 8.3 A zeigt eine Dehnkurve eines 1,5 μm langen Segments doppelsträngiger DNA (obere graue Kurve). Bis etwa 35 pN werden die mechanischen Eigenschaften von der Entropieelastizität des semiflexiblen Moleküls dominiert ($l_p \approx 50 \text{ nm}$; vgl. (22) und [62]). Danach dominieren lineare enthalpische Beiträge ($S \approx 1 \text{ nN}$; vgl. (23) und [216, 217, 225]), bis das Molekül bei 65 pN von der natürlichen B-Konformation in die um den Faktor 1,7 überstreckte S-Konformation übergeht [192, 226] (vgl. auch Abschnitt 7.2). Wird das Molekül über den B-S-Übergang hinaus gestreckt, so zeigt sich bei etwa 150 pN eine erneute Zunahme der Elastizität (Abflachen der Kraftkurve), was auf eine weitere Konformationsänderung hindeutet. Erst nachdem das Molekül fast auf das Doppelte seiner Konturlänge überstreckt worden ist, nimmt die Elastizität wieder ab, und die Kraft, die zum weiteren Strecken des Moleküls nötig ist, nimmt deutlich zu. Andererseits zeigt die anschließend aufgenommene Relaxationskurve (untere graue Kurve) einen glatten Verlauf, ohne die Konformationsänderungen der Dehnkurve. Diese deutliche Hysterese zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve deutet darauf hin, daß während des Überstreckens eine massive strukturelle Umwandlung stattgefunden hat. Außerdem gleicht die Relaxationskurve der Kraft-Abstands-Kurve von einzelsträngiger DNA, die selbst keine Hysterese zeigt und wie die Relaxationskurve aus Abbildung 8.3 A einem glatten Kurvenverlauf ohne größere strukturelle Umwandlungen folgt (vgl. Abschnitt 8.1). Diese Ähnlichkeit zwischen der Relaxationskurve aus Abbildung 8.3 A und der Kraftkurve einzelsträngiger DNA zeigt sich besonders deutlich, wenn dieser Relaxationskurve eine an einzelsträngiger DNA aufgenommene Kraftkurve überlagert wird (schwarze Kurve in Abbildung 8.3 A): die beiden Kurven lassen sich perfekt überlagern, so daß sie kaum noch voneinander zu unterscheiden sind. Die gute Übereinstimmung mit einzelsträngiger DNA zeigt sich auch daran, daß sich die Relaxationskurve im Kraftbereich bis etwa 100 pN wie einzelsträngige DNA sehr gut durch eine freie Kette modellieren läßt (vgl. Abbildung 8.3 B) und die Anpassung der freien Parameter wie bei einzelsträngiger DNA eine Kuhnlänge l' von 15 Å und einen linearen

Streckmodul S von 800 pN ergibt (vgl. Abschnitt 8.1). Zusammen mit der ausgeprägten Hysterese legt dies die Schlußfolgerung nahe, daß es sich bei dem bei 150 pN beobachteten Konformationsübergang um ein kraftinduziertes Schmelzen der DNA-Doppelhelix handelt (vgl. auch [247-249]).

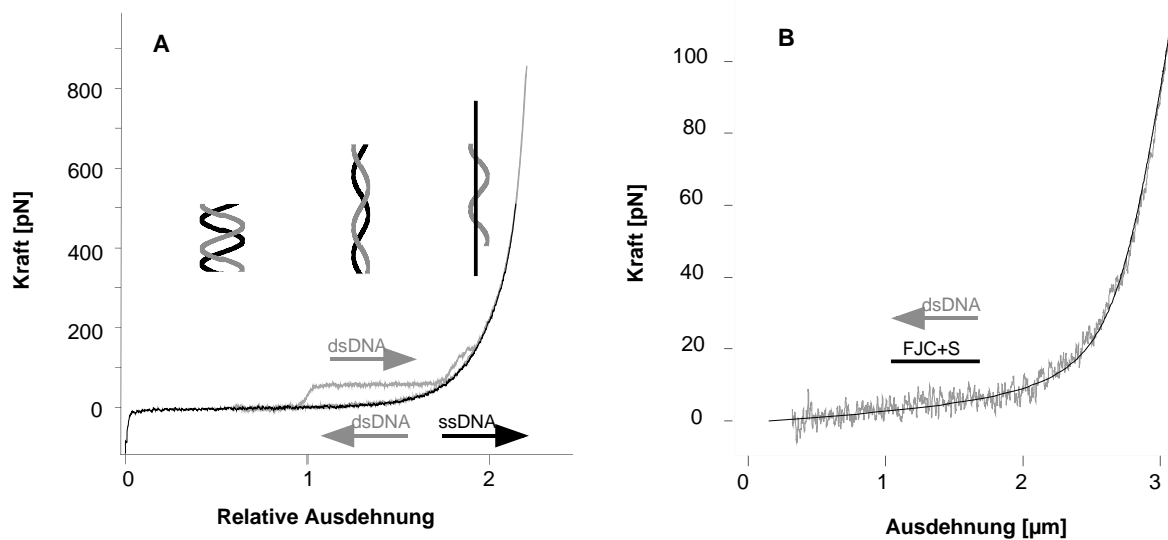


Abbildung 8.3 (A) Kraft-Abstands-Kurve eines 1,5 µm langen Segments doppelsträngiger λ -BstE II digest DNA in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA bei Raumtemperatur (20°C) (obere graue Kurve). Nach dem B-S-Übergang bei 65 pN, bei dem das Molekül auf das 1,7-fache seiner Konturlänge gedehnt wird, zeigt sich ein weiterer Konformationsübergang bei etwa 150 pN, in dem die DNA-Doppelhelix schmilzt und nur einer der beiden Stränge zwischen Kraftmikroskopspitze und Substratoberfläche eingespannt bleibt. Die Relaxationskurve (untere graue Kurve) gleicht der Kraftkurve einzelsträngiger DNA. Der Relaxationskurve überlagert ist eine an einzelsträngiger DNA aufgenommene Kraftkurve (schwarze Kurve). Aufgrund der unterschiedlichen Konturlängen wurden die Kurven auf gleiche relative Ausdehnung normiert. (B) Der untere Kraftbereich der Relaxationskurve aus A (graue Kurve) zusammen mit der Elastizität einer freien Kette mit Kuhnlänge $l' = 15 \text{ \AA}$ und einem Streckmodul $S = 800 \text{ pN}$ (schwarze Kurve).

Vergleicht man die mechanische Energie, die während des Streckens doppelsträngiger DNA in der Doppelhelix deponiert wird, mit der freien Basenpaarungsenthalpie ΔG_{bp} von DNA, so zeigt sich, daß bereits vor dem Ende des B-S-Übergangs die in das Molekül gesteckte mechanische Arbeit die freie Basenpaarungsenthalpie ΔG_{bp} übersteigt. In Abbildung 8.4 wird die Dehnkurve ($f_{ds}(z)$) und die Relaxationskurve ($f_{ss}(z)$) eines 2,3 µm langen λ -DNA-Segmentes (graue Kurven), sowie das Integral $\int (f_{ds}(z) - f_{ss}(z)) \cdot dz$ (schwarze Kurve), das die Fläche zwischen den beiden Kurven und damit die dissipierte Energie wiedergibt, direkt mit den thermodynamischen Daten von DNA verglichen werden. Die gestrichelte Linie entspricht der freien Basenpaarungsenthalpie $\Delta G_{bp}(20^\circ\text{C})$ eines 2,3 µm langen DNA Segments bei 20°C nach

Breslauer et al. [250]. Die gepunktete Linie entspricht der freien Basenpaarungsenthalpie $\Delta G_{bp}(20^\circ\text{C})$ nach Duguid et al. [251]³⁹. Zur Berechnung von $\Delta G_{bp}(20^\circ\text{C})$ wurde die Gleichung

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (32)$$

verwendet und angenommen, daß sowohl ΔH_{bp} als auch ΔS_{bp} nicht von der Temperatur abhängen [252].

Der Einfluß der Salzkonzentration auf ΔH_{bp} wurde mit Hilfe der empirischen Formel

$$T_m(C) = T_m(1\text{ M}) + 16,6 \cdot \log C \cdot ^\circ\text{C} \quad (33)$$

berechnet. Dabei ist T_m die Schmelztemperatur und C die NaCl Konzentration [253].

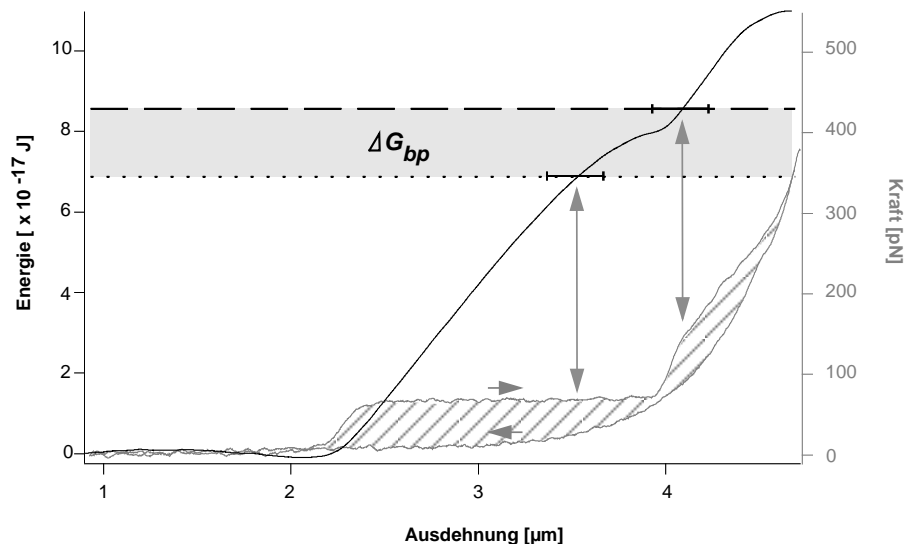


Abbildung 8.4 Dehnungs - und Relaxationskurve eines λ -BstE II digest DNA-Segments in 100 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA bei 20°C (graue Kurven, Kraftachse auf der rechten Seite) und die in dem Zyklus dissipierte Energie $\int (f_{ds}(z) - f_{ss}(z)) \cdot dz$ (schwarze Kurve, Energieachse auf der linken Seite), verglichen mit der mittleren freien Basenpaarungsenthalpie einer $2,3\ \mu\text{m}$ langen DNA-Sequenz nach Breslauer et al. [250] (gestrichelte Linie) bzw. nach Duguid et al. [251] (Punkte).

Selbst wenn die mechanische Energie, die in dem zwischen Spitze und Probe verbleibenden Einzelstrang gespeichert ist, von der zum Strecken der Doppelhelix nötigen mechanischen

³⁹ Während Breslauer et al. ΔH_{bp} und ΔS_{pb} für alle 10 möglichen Watson-Crick-Basenpaarkombinationen aus den Werten kurzer synthetischer Oligonucleotide ableiten und für eine natürliche DNA-Sequenz wie der hier verwendeten die Mittelwerte von ΔH_{bp} und ΔS_{pb} gelten sollten, wurden von Duguid et al. 160 bp lange Kalb-Thymus-DNA-Fragmente zur Bestimmung von ΔH_{bp} und ΔS_{pb} von natürlicher DNA verwendet.

Arbeit abgezogen wird, so übersteigt die in der Hysterese eines solchen Zyklus „dissipierte“ Energie also schon ab einem Überstreckungsverhältnis von etwa 1,6-1,8 die freie Basenpaarungsenthalpie ΔG_{bp} . Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich bei dem Konformationsübergang bei 150 pN tatsächlich um ein kraftinduziertes Schmelzen der DNA-Doppelhelix handelt.

Schließlich zeigt die Tatsache, daß sich die geschmolzene DNA mit Kräften von über 800 pN strecken läßt, ohne daß das Rückgrat des zwischen Spitze und Substrat verbleibenden Einzelstrangs reißt, daß das kovalent geschlossene DNA-Rückgrat wesentlich belastbarer ist als bisher angenommen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit neuesten Untersuchungen über die Bruchlast kovalenter chemischer Bindungen [64]. Frühere Abschätzungen gingen dagegen von einer maximalen Belastbarkeit des DNA-Rückgrats von weniger als 500 pN aus [254].

8.2.2 Die topologischen Randbedingungen

Wie sich schon in den theoretischen Betrachtungen (Abschnitt 7.2.2) gezeigt hat, sind bei doppelsträngiger DNA Zug- und Torsionsspannung eng aneinander gekoppelt. Aus diesem Grund hängt die Elastizität von doppelsträngiger DNA auch stark von den topologischen Randbedingungen ab, was sich im Kraft-Abstands-Verhalten deutlich bemerkbar macht. Grundsätzlich können bei den hier vorgestellten Experimenten fünf verschiedene Fälle auftreten:

Falls das DNA-Molekül nur mit einem Strang am Substrat verankert und die Spitze des Kraftspektrometers mit dem dazu komplementären Strang verbunden ist, so reißt die Verbindung zwischen Spitze und Probe unmittelbar nach dem kraftinduzierten Schmelzen der DNA-Doppelhelix. Dasselbe gilt im Fall von Strangbrüchen in beiden Strängen der Doppelhelix, was im Experiment regelmäßig beobachtet werden kann.

In anderen Fällen, wie beispielsweise bei dem in Abbildung 8.3 A gezeigten Molekül, findet beim kraftinduzierten Schmelzen der Doppelhelix eine irreversible Umwandlung in einzelsträngige DNA statt. Das legt den Schluß nahe, daß der abgeschmolzene Strang keine Verbindung zum Substrat oder zur Spitze mehr hat und nach dem kraftinduzierten Schmelzen

frei in der Lösung diffundieren kann. Möglicherweise erleichtern auch Einzelstrangbrüche, wie sie in DNA häufig vorkommen⁴⁰, das vollständige Ablösen des abgeschmolzenen Strangs.

In einigen Fällen löst sich aber auch nur ein Teil des abgeschmolzenen Strangs. Der Rest bleibt entweder mit dem Substrat oder mit der Kraftspektrometerspitze verbunden. Er kann dann, wenn der eingespannte Strang relaxiert wird, wieder an diesen binden und eine Doppelhelix bilden. In diesem Fall muß mindestens ein Einzelstrangbruch im abgeschmolzenen Strang vorliegen.

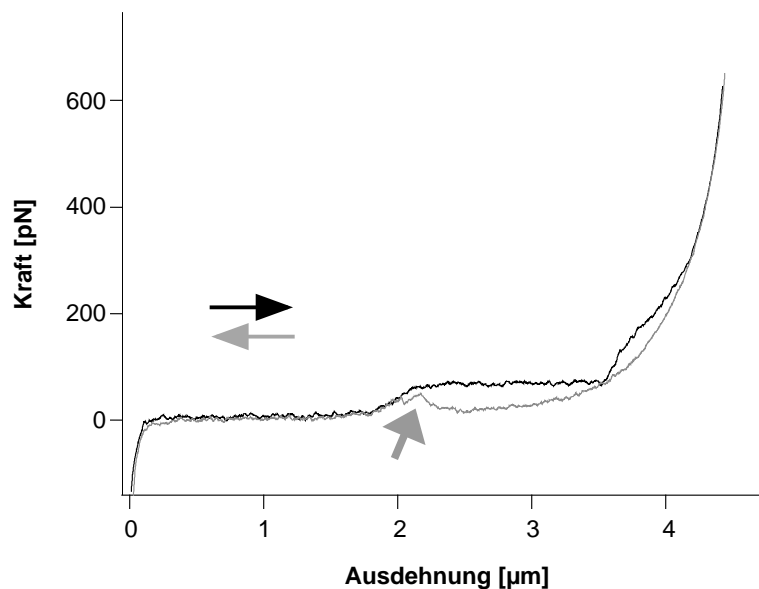


Abbildung 8.5 Dehnungs- und Relaxationskurve eines 2 µm langen λ -BstE II digest DNA-Segments in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, bei Raumtemperatur. Nachdem das Molekül bis auf das 1,2-fache seiner Konturlänge relaxiert ist (siehe Pfeil) beginnt die Rehybridisierung der DNA-Doppelhelix. Vor dem hier gezeigten Kraftexperiment hat das Molekül bereits über 70 solcher Schmelz- /Rehybridisierungszyklen hinter sich, ohne daß sich dabei strukturelle Veränderungen am Molekül gezeigt haben.

Bei der Mehrzahl aller untersuchten Moleküle bleibt der abgeschmolzene Strang jedoch vollständig mit dem Substrat oder mit der Spitze oder, im Fall eines Einzelstrangbruchs im abgeschmolzenen Strang, mit beiden Oberflächen verbunden. In solchen Fällen läßt sich nach dem Relaxieren des gespannten Strangs eine vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen DNA-Doppelhelix beobachten. Kraftinduziertes Schmelzen und anschließendes Ausheilen

⁴⁰ Einzelstrangbrüche in DNA entstehen oft beim Einfrieren und Auftauen der Proben sowie durch Scherung beim Pipetieren. In den meisten molekularbiologischen und gentechnischen Verfahren stören sie nicht. Durch Aufbewahren der DNA in CHCl_3 sowie vorsichtiges Pipetieren läßt sich die Zahl der Einzelstrangbrüche deutlich verringern.

(Rehybridisieren) der Doppelhelix können an ein und demselben Molekül beliebig oft wiederholt werden, ohne daß sich permanente strukturelle Veränderungen im Molekül zeigen (siehe Abbildung 8.5).

Schließlich ist es möglich, daß die DNA-Doppelhelix mit beiden Strängen an Substrat und Spitze befestigt ist und keine Einzelstrangbrüche vorliegen. In diesem Fall sollte keine irreversible Umwandlung in einzelsträngige DNA möglich sein und die Hysterese zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve sollte folglich gering sein. Außerdem erwartet man aufgrund theoretischer Vorhersagen eine geringere Kooperativität des ersten Konformationsübergangs, sowie eine Verschiebung dieses Übergangs zu Kräften von etwa 100 pN [209, 210] (vgl. Abschnitt 7.2.2). Abbildung 8.6 zeigt einen Dehnungs-/Relaxationszyklus an doppelsträngiger λ -digest-DNA, bei der die Hysterese zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve gegenüber allen bisher diskutierten Zyklen deutlich reduziert ist und insbesondere die Form der Relaxationskurve darauf schließen läßt, daß hier keine irreversible Umwandlung in einzelsträngige DNA stattgefunden hat. Außerdem zeigt der erste Übergang deutlich weniger Kooperativität und ist zu Kräften von 96-110 pN verschoben, was qualitativ gut mit den theoretischen Vorhersagen für DNA ohne Rotationsmöglichkeit um die Molekülachse – d. h. mit fester Anzahl an Helixwindungen – übereinstimmt. Bei höheren Kräften (etwa 200-300 pN) zeigt sich auch hier ein zweiter Konformationsübergang, der dem Schmelzübergang in den bisher diskutierten Kraftkurven ähnelt. Allerdings zeigt sich in der Relaxationskurve in Abbildung 8.6 nur eine äußerst geringe Hysterese. Ein denkbare Erklärung dafür ist, daß auch hier die Doppelhelix zumindest teilweise schmilzt, daß beide Stränge aber aufgrund der starken Überstreckung in unmittelbarer Nähe zueinander bleiben müssen, so daß die Rehybridisierung extrem schnell stattfinden kann und die Hysterese entsprechend klein ist. Die Vermutung, daß es sich bei der Kraftkurve in Abbildung 8.6 tatsächlich um die Kraftkurve eines Moleküls ohne Rotationsmöglichkeit um die Molekülachse handelt, konnte durch den Vergleich mit Kraftexperimenten an kovalent geschlossener Plasmid-DNA weiter erhärtet werden (vgl. Anhang F, sowie [255]). Auch durch jüngste Experimente von Léger et al. mit einem drehbaren Kraftsensor, in Verbindung mit einer semi-empirischen Beschreibung mit verschiedenen elastischen Konstanten für die unterschiedlichen DNA-Konformationen (vgl. Abschnitt 7.2.2)

konnte diese Interpretation weiter bestätigt werden [237]. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten traten Kraftkurven, wie die in Abbildung 8.6 gezeigte, lediglich in etwa fünf Prozent aller Fälle auf, was sich vermutlich auf die Anzahl an Einzelstrangbrüchen in der verwendeten DNA (siehe auch Fußnote 40) sowie auf die Anbindung der Moleküle zurückführen läßt (vgl. Anhang A).

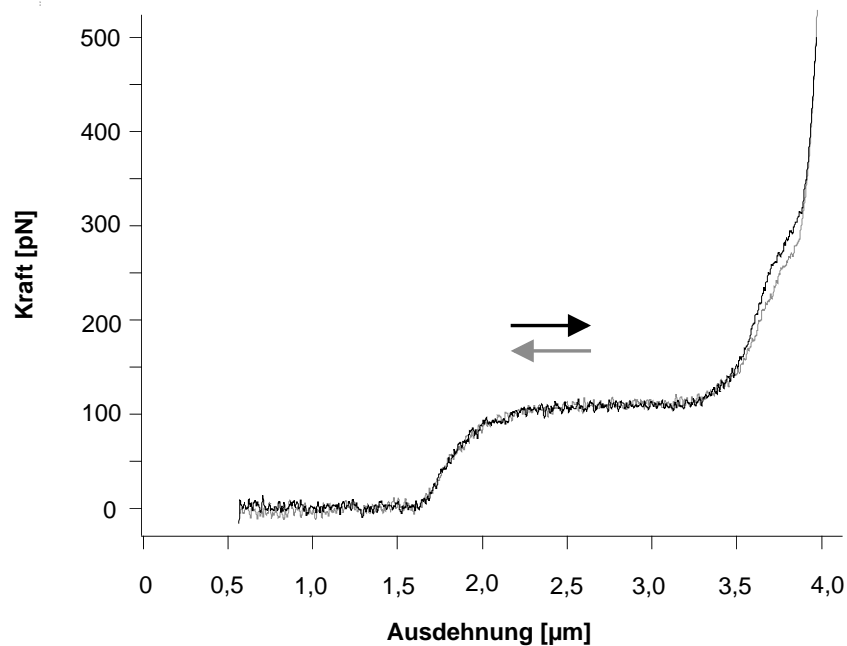


Abbildung 8.6 Dehnungs- (schwarz) und Relaxationskurve (grau) eines λ -BstE II digest DNA-Segments in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, bei 20°C, das sehr wahrscheinlich mit beiden Strängen der Doppelhelix sowohl mit dem Substrat als auch mit der Kraftspektrometerspitze fest verbunden ist und dessen Rückgrat keine Einzelstrangbrüche aufweist. Der erste Konformationsübergang beginnt bei etwa 96 pN (Plateaumitte: 105 pN; Plateauende: 110 pN).

8.2.3 DNA Schmelz- und Basenpaarungskinetik

Ein interessanter Unterschied zwischen dem B-S-Übergang und dem Schmelzübergang bei DNA ist in Abbildung 8.7 A dargestellt, wo vier Dehnungskurven, die mit verschiedenen Zuggeschwindigkeiten am selben DNA-Stück aufgenommenen wurden, überlagert sind. Die Kraft, bei der der B-S-Übergang stattfindet, ist im Rahmen der experimentell zugänglichen Zuggeschwindigkeiten nicht von der Geschwindigkeit abhängig. Beim kraftinduzierten Schmelzübergang dagegen zeigt sich eine ausgeprägte Geschwindigkeitsabhängigkeit. Während die DNA bei einer Zuggeschwindigkeit von 150 nm/s am Ende des B-S-Plateaus scheinbar

kontinuierlich in die einzelsträngige Konformation übergeht⁴¹, zeigt sich bei 3 $\mu\text{m/s}$ ein ausgeprägter Schmelzübergang zwischen 200 pN und 300 pN.

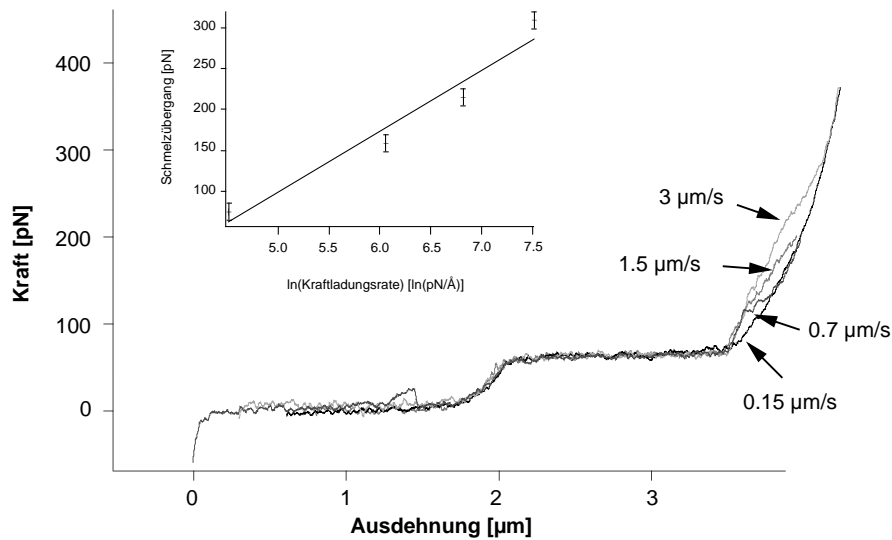


Abbildung 8.7 Überlagerung von vier am selben Stück λ -BstE II digest DNA aufgenommenen Dehnungskurven. Alle vier Kurven wurden mit unterschiedlichen Zuggeschwindigkeiten von 150 nm/s bis 3 $\mu\text{m/s}$ aufgenommen. Eingefügt: Kraft des Schmelzübergangs, aufgetragen gegen den Logarithmus der Kraftladungsrate [$\ln(\text{pN}/\text{\AA})$]. Puffer-Bedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 20°C.

Das bedeutet, daß der B-S-Übergang – auf der Zeitskala des Experiments – quasistatisch, also im thermodynamischen Gleichgewicht abläuft, während der Schmelzübergang bei Zugraten über 700 nm/s kein Gleichgewichtsprozeß in thermodynamischem Sinn ist. Mit anderen Worten: die intramolekularen Konformationsänderungen während des B-S-Übergangs laufen sehr viel schneller ab, als man das Molekül im Experiment strecken kann⁴², während das kraftinduzierte Schmelzen der DNA-Doppelhelix auf derselben Zeitskala stattfindet, wie die

⁴¹ Interessanterweise ergibt eine Extrapolation der zum Auseinanderziehen kurzer Oligonucleotide nötigen Kräfte zu längerer DNA einen Grenzwert von etwa 70 pN für lange DNA-Sequenzen [256]. Das entspricht etwa der Kraft am Ende des B-S-Plateaus und damit der Kraft des Schmelzübergangs bei 150 nm/s Zuggeschwindigkeit.

⁴² Nimmt man an, daß die Ausbreitungsgeschwindigkeit des B-S-Übergangs die Schallgeschwindigkeit c in DNA nicht überschreitet, so müßte der B-S-Übergang etwa ab einer Zuggeschwindigkeit von c geschwindigkeitsabhängig werden. Eine einfache Abschätzung für c ist: $c = \sqrt{S/\rho}$. Dabei ist S der Streckmodul und ρ die Masse pro Länge von DNA. Mit $S = 1 \text{ nN}$ und $\rho = 3,26 \cdot 10^{-12} \text{ g/m}$ ergibt sich c zu etwa 18 m/s. Inelastische Lichtstreuexperimente an DNA-Bündeln ergeben sogar eine um zwei Größenordnungen höhere Schallgeschwindigkeit. Allerdings hängen diese Ergebnisse stark von der verwendeten Laserintensität ab. Außerdem ist nicht klar, inwieweit sich die mechanischen Eigenschaften von DNA aufgrund kollektiver Effekte in den nur teilweise hydrierten Proben verändern [257, 258]. Der experimentell zugängliche Geschwindigkeitsbereich reicht derzeit aufgrund hydrodynamischer Effekte nur bis etwa bis 50 $\mu\text{m/s}$ (vgl. Abbildung 8.8). Es ist jedoch durchaus möglich, daß der Einsatz kleinerer Abtastfedern [259-261] in Zukunft deutlich höhere Zuggeschwindigkeiten möglich machen wird.

Kraftexperimente. In Anbetracht der komplexen strukturellen und topologischen Änderungen während des kraftinduzierten Schmelzens ist dies durchaus verständlich. Im Gegensatz zum B-S-Übergang, wo nur interne Umlagerungen der Basen, sowie ein partielles Entwinden der Doppelhelix stattfinden, müssen die beiden Stränge im Schmelzübergang voneinander getrennt werden. Der abschmelzende Strang rotiert dabei vermutlich um die Molekülachse, bevor er die Konformation eines Gauß'schen Knäuels mit möglichen Intrastrangquerverbindungen oder Haarnadelstrukturen annimmt [248]. Bei der Rehybridisierung muß dieser komplexe Prozeß dann in umgekehrter Reihenfolge ablaufen, was zu der beobachteten Hysterese führt (vgl. auch Abbildung 8.5).

Die hier beobachtete Geschwindigkeitsabhängigkeit des Schmelzübergangs deutet auf die Existenz einer Energiebarriere gegenüber dem Aufschmelzen der DNA-Doppelhelix hin. Eine solche Barriere könnte entweder dynamischer Natur sein, beispielsweise durch hydrodynamische oder intramolekulare Reibung hervorgerufen, oder es könnte sich um eine statische Aktivierungsbarriere handeln, wie sie auch beim Trennen von Rezeptor-Ligand Paaren [52, 262, 263] oder kurzen DNA-Oligonucleotiden auftritt [256, 264]. Für eine kinetische Barriere aufgrund von Reibung wäre in erster Näherung eine lineare Geschwindigkeitsabhängigkeit der Kraft zu erwarten. Eine Auswertung der Schmelzkräfte und der Kraftladungsrate (Kraftanstieg pro Zeit) am Schmelzübergang zeigt jedoch, daß die zum Schmelzen der Doppelhelix nötige Kraft nicht linear von der Zuggeschwindigkeit abhängt. Außerdem ergibt eine Abschätzung der zu erwartenden hydrodynamischen Kräfte [265], daß diese die Kraftunterschiede beim Schmelzübergang nicht erklären können⁴³. Bei einer statischen Aktivierungsbarriere⁴⁴ wäre andererseits ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Kraftladungsrate und der zum Aufschmelzen der Doppelhelix nötigen Kraft zu erwarten [52, 262, 263, 270]. Abbildung 8.7, in welcher auch der Logarithmus der Kraftladungsrate gegen die zum Schmelzen benötigte Kraft aufgetragen ist (Einschub), zeigt, daß auch diese Interpretation

⁴³ Selbst die aufgrund von hydrodynamischer Reibung auf das Ende der Blattfeder ausgeübten Kräfte sind wesentlich kleiner als die hier beobachteten Kraftunterschiede beim kraftinduzierten Schmelzübergang.

⁴⁴ Aufgrund der nichtlinearen nächsten-Nachbar-Wechselwirkung bei der Basenstapelung, die auch für die hohe Kooperativität beim thermischen Schmelzen von DNA verantwortlich ist [266-269], würde man insbesondere an der Grenze zwischen doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA eine Energiebarriere erwarten, die Keimbildung sowohl beim Schmelzen, als auch beim Rehybridisieren erschwert.

die Daten nicht in angemessener Weise erklären kann. Offensichtlich ist das kraftinduzierte Schmelzen von DNA ein sehr viel komplexerer Prozeß, der sich nicht durch derart vereinfachende Annahmen erklären läßt. Hier muß eine Vielzahl verschiedener Schritte, wie die Keimbildung, das sequentielle Öffnen der DNA-Basen, sowie Rotation um die Molekülachse und die Ausbildung eines Gauß'schen Knäuels auf koordinierte Art und Weise erfolgen.

Aufgrund der oben geschilderten Komplexität der zum Schmelzen und umgekehrt auch zum Ausheilen der DNA nötigen Prozesse, scheint es zunächst schwierig, aus der in Abbildung 8.7 gezeigten Geschwindigkeitsabhängigkeit der zum Schmelzen der DNA-Doppelhelix benötigten Kräfte weitere Informationen über die Kinetik dieser Prozesse zu gewinnen. Die Tatsache, daß sich die verschiedenen DNA-Konformationen in den hier beschriebenen Einzelmolekül-Kraftexperimenten anhand ihrer Kraftkurven deutlich voneinander unterscheiden lassen, ermöglicht jedoch auch einen direkten Zugang zur Kinetik des kraftinduzierten Schmelzens von DNA und der anschließenden Rehybridisierung. So ist das Plateau des B-S-Übergangs charakteristisch für doppelsträngige DNA, während einzelsträngige DNA im wesentlichen dem Kraftverlauf einer freien Kette, ohne markante strukturelle Übergänge folgt (vgl. 8.1). Werden an einem Molekül schnelle Deformations- / Relaxationszyklen durchgeführt, und wird dabei durch das Einführen einer kurzen Wartezeit an den Umkehrpunkten des Zyklus der Zeitraum variiert, in dem sich das Molekül entweder im völlig überstreckten oder im relaxierten Zustand befindet, so sollte die Änderung der Länge des B-S-Plateaus in Abhängigkeit von der Wartezeit ein Maß dafür sein, wieviele Basenpaare während der Wartezeit schmelzen oder rehybridisieren konnten.

Im Folgenden wird anhand von 6 exemplarischen Deformations- / Relaxationszyklen die Kinetik des kraftinduzierten Schmelzens bzw. der Rehybridisierung von DNA untersucht. Eine Wartezeit im voll überstreckten Zustand (Abbildung 8.8 A) erlaubt dabei einen Einblick in die Schmelzkinetik, eine Wartezeit im relaxierten Zustand (Abbildung 8.8 B) einen Einblick in die Basenpaarungskinetik.

Abbildung 8.8 A zeigt drei am selben DNA-Segment aufgenommene Deformations- / Relaxationszyklen, mit deren Hilfe sich die Kinetik des kraftinduzierten Schmelzens von DNA

untersuchen läßt. Im ersten Zyklus (obere Kurven) wird das Molekül ohne Wartezeit extrem schnell deformiert und relaxiert. Zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve ist keine Hysterese zu erkennen. Nach einer Wartezeit von 100 ms in der voll überstreckten Konformation (mittlere Kurven), ist in der Relaxationskurve eine deutliche Hysterese zu erkennen, und das für die doppelhelikale Konformation charakteristische B-S-Plateau ist um etwa 25% verkürzt. Wird die Wartezeit in der überstreckten Konformation auf 500 ms erhöht (untere Kurven), so verschwindet das B-S-Plateau in der Relaxationskurve vollständig und die Kurve gleicht der von einzelsträngiger DNA.

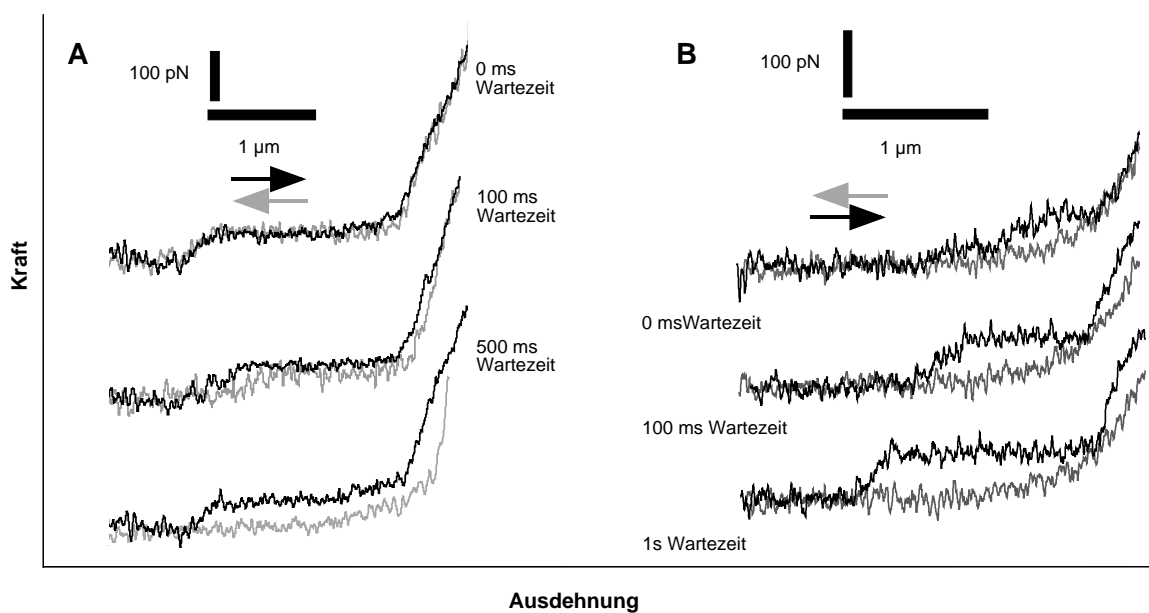


Abbildung 8.8 (A) Drei Dehnungs- und Relaxationszyklen (112 ms/Zyklus) an λ -BstE II digest DNA in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, bei 20°C. Oben wird die DNA überstreckt und sofort wieder relaxiert. Im mittleren Zyklus wird an der Position maximaler Ausdehnung eine Wartezeit von 100 ms eingeführt. Im unteren Zyklus wird die Wartezeit auf 500 ms verlängert. (B) Drei Relaxations- und Dehnungszyklen (112 ms/Zyklus) an λ -BstE II digest DNA (selber Puffer). Zunächst wird das Molekül überstreckt und einige Sekunden in der überstreckten Konformation belassen (Daten nicht gezeigt). Im oberen Zyklus wird das Molekül relaxiert und sofort wieder überstreckt. Im mittleren Zyklus ist eine Wartezeit von 100 ms in der relaxierten Konformation eingeführt. Im unteren Zyklus wird die Wartezeit auf 1 s verlängert. Das B-S-Plateau erreicht wieder 100% seiner ursprünglichen Länge.

Während des ersten schnell gefahrenen Zyklus kann also praktisch keine DNA abschmelzen, erkennbar an der nicht vorhandenen Hysterese in der Relaxationskurve⁴⁵. Nach der Wartezeit

⁴⁵ Grundsätzlich ist es möglich, daß einige Basenpaare im überstreckten Zustand auch ohne Wartezeit abschmelzen und so schnell wieder rehybridisieren können, daß in der Relaxationskurve keine Hysterese auftritt. Die Anzahl an Basenpaaren, die auch ohne die Wartezeit schon schmelzen können sollte aber in allen drei Zyklen gleich sein, da die Piezogeswindigkeiten und die Lage der Anfangs- und Endpunkte in alle Zyklen identisch sind. Der Anteil an

von 100 ms verkürzt sich das für die doppelhelikale Konformation charakteristische B-S-Plateau in der Relaxationskurve um etwa 25%. Das bedeutet, daß während dieser 100 ms etwa 25% des Moleküls oder 2 Kilo-Basenpaare (kbp) aufgetrennt werden, was einer kraftinduzierten Schmelzrate von 20 kbp/s entspricht. Bei einer Wartezeit von 500 ms schmilzt dann die gesamte Doppelhelix. Das entspricht etwa 15 kbp/s, wobei sich hier allerdings nicht ausschließen läßt, daß die Doppelhelix bereits nach weniger als 500 ms vollständig geschmolzen ist, so daß 15 kbp/s hier nur eine untere Grenze für die Schmelzrate ist.

Es zeigt sich, daß die an verschiedenen DNA-Segmenten ermittelten Schmelzraten erheblich variieren, was sowohl am Einfluß der Sequenz und der topologischen Randbedingungen liegen kann, als auch an geringfügigen Abweichungen der experimentellen Rahmenbedingungen, wie beispielsweise dem maximalen Überstreckungsgrad. Dennoch läßt sich festhalten, daß die auf diese Art ermittelten Schmelzraten von DNA insgesamt deutlich über 1 kbp/s liegen.

Abbildung 8.8 B zeigt ein Experiment zur Bestimmung der DNA-Basenpaarungskinetik. Vor dem ersten Zyklus muß das Molekül überstreckt und einige Sekunden in der überstreckten Konformation gehalten werden (Daten nicht gezeigt), um sicher zu stellen, daß die Doppelhelix vollständig geschmolzen ist.

Im ersten Zyklus (obere Kurven) wird das Molekül relaxiert und sofort wieder überstreckt. In der Dehnungskurve ist ein kurzes Plateau bei 65 pN zu erkennen, dessen Länge etwa 35% der ursprünglichen B-S-Plateaulänge entspricht. Nach einer Wartezeit von 100 ms im relaxierten Zustand (mittlere Kurven) ist das Plateau in der Dehnungskurve auf etwa 60% der ursprünglichen B-S-Plateaulänge angewachsen. Nach einer Wartezeit von einer Sekunde (untere Kurven) erreicht das B-S-Plateau dann wieder seine ursprüngliche Länge.

Etwa 35% oder 2,3 kbp des Moleküls können also auch ohne Wartezeit im relaxierten Zustand wieder rehybridisieren. Wartet man 100 ms im relaxierten Zustand, so können 60% des

geschmolzenen Basenpaaren, der sich im folgenden Zyklus in einer Hysterese bemerkbar macht kann deshalb auf die zusätzliche Wartezeit zurückgeführt werden.

Moleküls oder 3,9 kbp rehybridisieren. Während der 100 ms können also 1,6 kbp mehr rehybridisieren, als ohne Wartezeit. Das entspricht einer Rehybridisierungsrate von 16 kbp/s. Während einer Wartezeit von einer Sekunde rehybridisieren sämtliche 6,5 kbp des Moleküls. Daraus ergibt sich eine untere Grenze für die Hybridisierungsrate von 6,5 kbp/s⁴⁶.

Auch die auf diese Weise ermittelten Hybridisierungsraten von DNA unterliegen gewissen Schwankungen, die aber wesentlich geringer sind, als bei den oben beschriebenen Schmelzexperimenten. Typische Raten liegen zwischen 10 kbp/s und 20 kbp/s und damit mindestens eine Größenordnung über den bisher veröffentlichten Literaturwerten von 1 kbp/s [271]. Dabei gelten die bisher publizierten, am Ensemble ermittelten Werte, allerdings nur als untere Grenze für die Hybridisierungsrate von DNA [241]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Ensemblemessungen in drei Dimensionen und den hier vorgestellten Einzelmolekül-Kraftexperimenten besteht darin, daß die Hybridisierung von DNA in drei Dimensionen ein diffusionslimitierter Prozeß ist, bei dem sich die komplementären Stränge zunächst einmal finden müssen und der Diffusionsbeitrag zur so ermittelten Hybridisierungsrate sehr sorgfältig abgeschätzt werden muß⁴⁷. Bei Experimenten am Einzelmolekül handelt es sich hingegen um einen ratenlimitierten Prozeß, bei dem die Diffusion der Moleküle praktisch keine Rolle spielt und der eine direkte Messung der Reaktionsraten ermöglicht.

8.2.4 Elektrostatik und DNA-Stabilität

Da die thermische Stabilität der DNA-Doppelhelix stark von der Salzkonzentration abhängt (vgl. 33), liegt die Vermutung nahe, daß auch die mechanische Stabilität von DNA von der Ionenstärke der verwendeten Pufferlösung abhängig ist. Aus diesem Grund wird im folgenden der Zusammenhang zwischen mechanischer Stabilität von DNA und Ionenstärke anhand von

⁴⁶ Auch hier ist die Wartezeit von einer Sekunde vermutlich weit größer, als es für die vollständige Hybridisierung des Moleküls nötig wäre.

⁴⁷ Bei längeren DNA-Sequenzen wird die Ausbildung der vollständigen Doppelhelix dabei zusätzlich durch das Hybridisieren von nur lokal zueinander komplementären Bereichen behindert. Die Konformation kann in einem lokalen Energieminimum hängen bleiben.

typischen Kraft-Abstands-Kurven, die bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen in Tris-EDTA Puffer (10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA) aufgenommen wurden, untersucht.

Bei hoher Salzkonzentration (Abbildung 8.9 A; 1 M NaCl) tritt zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve kaum Hysterese auf, und irreversibles Schmelzen der DNA-Doppelhelix kann nur in sehr seltenen Fällen beobachtet werden. Das B-S-Plateau liegt bei 65 pN und ist extrem kooperativ. Außerdem ist die Kraft des Schmelzübergangs über einen großen Geschwindigkeitsbereich unabhängig von der jeweiligen Zuggeschwindigkeit bei etwa 230 pN.

Bei geringer Salzkonzentration (Abbildung 8.9 B; 10 mM NaCl) ist die Hysterese zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve dagegen stark ausgeprägt und die Doppelhelix rekombiniert erst, nachdem das Molekül bis unter seine Konturlänge relaxiert wurde. Auch irreversibles Schmelzen kann bei dieser Salzkonzentration häufig beobachtet werden. Schließlich beginnt das B-S-Plateau meist bereits bei etwa 50 pN und endet bei 65 pN.

Wird die DNA schließlich in reinem Tris-EDTA Puffer ohne NaCl gestreckt (Abbildung 8.9 C), so scheint der größte Teil des Moleküls bereits vor dem ersten Strecken denaturiert zu sein, was sich an einem extrem kurzen Überstreckungsplateau bemerkbar macht. Nach dem ersten Strecken des Moleküls kann kaum noch eine Rehybridisierung beobachtet werden und das kurze Plateau beginnt schon bei etwa 40 pN und steigt dann schnell bis auf 65 pN an.

Vor dem Hintergrund, daß die Debye'sche Abschirmlänge in 1 M NaCl mit 3 Å [103] bereits deutlich unter dem Abstand der Phosphatgruppen komplementärer Stränge von 8,8-14 Å [241] liegt, während sie in 10 mM NaCl mit 3 nm darüber liegt, erscheinen diese Resultate durchaus verständlich⁴⁸. Die elektrostatische Abstoßung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen ist in 1 M NaCl bereits stark abgeschirmt, während sie in 10 mM NaCl noch nicht abgeschirmt ist, was zu einer Destabilisierung der Doppelhelix führt.

⁴⁸ Die Phosphatgruppen zweier komplementärer Basen liegen bei B-DNA etwa 2 nm auseinander. Das entspricht dem Helixdurchmesser von B-DNA. Der kürzeste inter-Strang-Abstand zwischen den Phosphatgruppen ist aber mit 8,8-14 Å nur etwa halb so groß und ist der P-P-Abstand durch die kleine Furche [241]. In der überstreckten S-Konformation ist der kürzeste P-P-Abstand 10,8 Å [229].

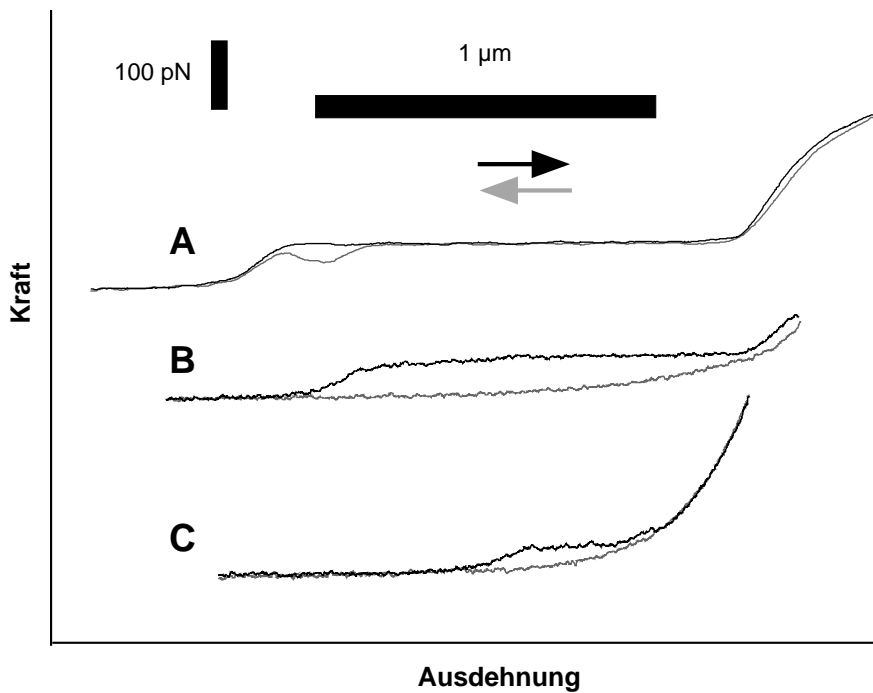


Abbildung 8.9 Drei Kraft-Abstandszyklen von λ -BstE II digest DNA in (A) 1 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA; (B) 10 mM NaCl 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA; (C) 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA.

Eine Abnahme der Kooperativität des B-S-Übergangs bei niedriger Salzkonzentration wurde von Ahsan und Bruinsma [232] auf der Grundlage des in Abschnitt 7.2.1 vorgestellten Zwei-Zustands-Modells theoretisch vorhergesagt, da eine größere Debyelänge aufgrund der damit verbundenen größeren elektrostatischen Repulsion zwischen den komplementären Strängen die Werte für H und J in (28a, b, c) absenken sollte. Nach dem Zwei-Zustands-Modell sollte das zu einer Abnahme der Kooperativität des B-S-Übergangs führen (vgl. 31 und Abbildung 7.1). Eine andere Ursache dafür könnte aber auch das kraftinduzierte Schmelzen AT-reicher Regionen bei Kräften unterhalb von 65 pN sein, denn es zeigt sich, daß reine AT-Sequenzen bei physiologischen Salzkonzentrationen bereits bei 35 pN schmelzen⁴⁹ (vgl. auch Abschnitt 8.2.5).

⁴⁹ Der Beginn des B-S-Plateaus bereits deutlich unterhalb von 65 pN, bei geringen Salzkonzentrationen, stimmt auch gut mit Ergebnissen von Baumann et al. überein [217]. Allerdings wird die DNA dort nicht bis zum Ende des B-S-Plateaus überstreckt, so daß dort keine Aussagen über die Kooperativität des B-S-Übergangs oder die mechanische Stabilität der Doppelhelix gemacht werden können.

8.2.5 Temperatur: Der entropische Beitrag zur DNA-Stabilität

Die meisten natürlich vorkommenden DNA-Sequenzen schmelzen unter physiologischen Bedingungen bei Temperaturen von etwa 90°C. Neben der im letzten Abschnitt untersuchten Frage nach der Salzabhängigkeit stellt sich deshalb auch die Frage nach der Temperaturabhängigkeit der mechanischen Stabilität von DNA. Deshalb wurde auch der Einfluß der Temperatur auf die DNA-Mechanik untersucht. Dazu wurden Kraft-Abstandskurven an λ -DNA Fragmenten bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen und miteinander verglichen.

Erhöht man die Temperatur im Kraftexperiment auf 40°C oder mehr, so tritt selbst bei vergleichsweise hohen Zuggeschwindigkeiten kein separater Schmelzübergang mehr auf. Der B-S-Übergang ist dann etwas weniger kooperativ und zu kleineren Kräften verschoben, und es scheint, daß die DNA bereits im B-S-Übergang in die einzelsträngige Konformation übergeht (vgl. Abbildung 8.10 A). Betrachtet man die im B-S-Übergang verrichtete mechanische Arbeit als Funktion der Temperatur und vergleicht sie mit thermodynamischen Daten [250], so zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen der zum Überstrecken des Moleküls benötigten mechanischen Energie und den thermodynamischen Werten der freien Basenpaarungsenthalpie $\Delta G_{bp}(T)$. Die Temperaturabhängigkeit von ΔG_{bp} läßt sich dabei mit Hilfe von Gleichung (32) bestimmen [252]; die Werte für $\Delta H_{bp}(150 \text{ mM NaCl})$ wurden mit Hilfe von Gleichung (33) bestimmt. Abbildung 8.10 B zeigt die Höhe des B-S-Plateaus gegen die Temperatur aufgetragen (Balken und durchgezogene Gerade). Damit diese Werte mit der freien Basenpaarungsenthalpie $\Delta G_{bp}(T)$ verglichen werden können, muß von der mechanischen Energie, die zum Überstrecken der DNA benötigt wird, noch die mechanische Energie, die im verbleibenden Einzelstrang gespeichert ist, abgezogen werden, da diese Energie ja nicht zum kraftinduzierten Schmelzen der Doppelhelix zur Verfügung steht⁵⁰. Vergleicht man also die mechanische Energie, die tatsächlich zum Aufbrechen der DNA-Doppelhelix zur Verfügung steht (graue Linie), mit der freien Basenpaarungsenthalpie (gestrichelte Linie), so zeigt sich, daß beide Größen im Rahmen der Meßgenauigkeit miteinander übereinstimmen. In Abbildung

⁵⁰ Die im Einzelstrang gespeicherte Energie hängt dabei auch von der Temperatur ab (vgl. 9-11).

8.10 B sind dabei alle Energien auf ein Basenpaar bezogen und durch die Länge des B-S-Plateaus pro Basenpaar ($\Delta L_{B-S} = L_S - L_B = 2,38 \text{ \AA}$) geteilt, um einen direkten Vergleich mit der B-S-Plateaukraft zu ermöglichen.

Benutzt man umgekehrt Steigung und Ordinate der aus den Kraftexperimenten ermittelten (graue) Geraden in Abbildung 8.10 B um die thermodynamischen Größen ΔH_{bp} und ΔS_{bp} zu bestimmen, so ergibt sich aus der Ordinate (bei 0 K) ein ΔH_{bp} von 10,26 kcal/(mol·bp) und aus der Steigung ein ΔS_{bp} von 28,70 cal/(mol·bp). Diese liegen nur geringfügig oberhalb der kalorimetrisch bestimmten Werte [250] und machen erneut die gute Übereinstimmung zwischen kraftspektroskopisch und kalorimetrisch ermittelten Werten deutlich⁵¹.

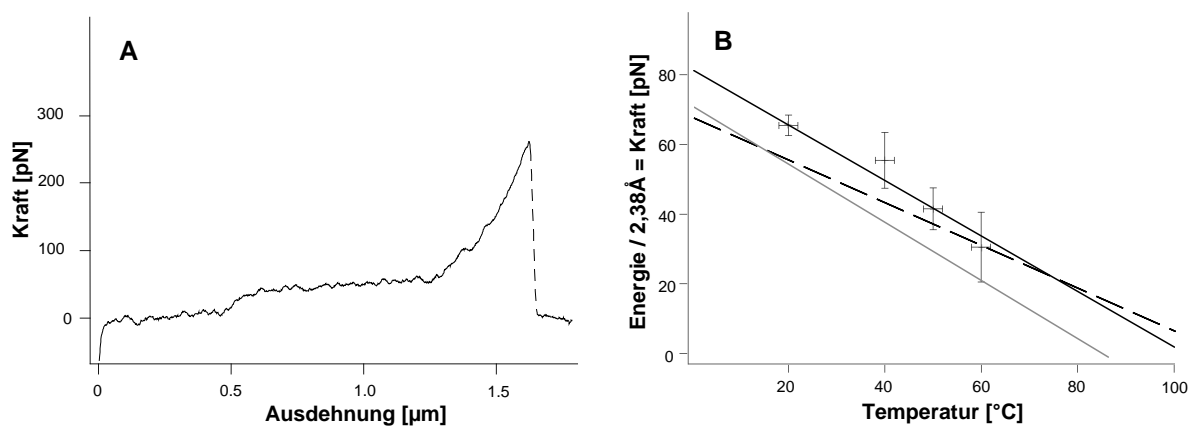


Abbildung 8.10 (A) Dehnkurve von λ -BstE II digest DNA in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA bei 50°C. (B) B-S-Plateaukräfte (λ -BstE II digest DNA selber Puffer wie (A)) gegen die Temperatur (Marker), eine Ausgleichsgerade (durchgezogene schwarze Linie), sowie die B-S-Plateaukräfte minus die im DNA-Einzelstrang bei 5,78 Å gespeicherte mechanische Energie (durchgezogene graue Linie) und die freie Basenpaarungsenthalpie $\Delta G_{bp}(T)$ nach [250] (gestrichelte Linie). Alle Energien sind auf 2,38 Å normiert, um sie direkt mit den B-S-Plateaukräften vergleichen zu können.

Die hohe Kooperativität des B-S-Übergangs bei Raumtemperatur deutet auf einen Alles-oder-Nichts-Prozess hin [226, 232]. Das bedeutet, daß die DNA sehr wahrscheinlich nicht gleichmäßig und kontinuierlich vom B- in den S-Zustand übergeht, sondern daß einzelne Bereiche schlagartig von einer in die andere Konformation wechseln [230]. Bei weiterem Dehnen des Moleküls wachsen dann voll überstreckte S-Bereiche auf Kosten der relaxierten B-Bereiche an [237]. Wird die doppelhelikale Konformation durch eine Temperaturerhöhung

⁵¹ Es ist also grundsätzlich möglich, die thermodynamischen Größen ΔH und ΔS sowie deren Temperaturabhängigkeit direkt aus kraftspektroskopischen Untersuchungen zu bestimmen.

soweit destabilisiert, daß $65 \text{ pN} \cdot \Delta L_{B-S} \geq \Delta G_{bp}(T)$ ⁵², dann beginnen die Bereiche der Doppelhelix zu schmelzen, die bereits in die S-Konformation überstreckt wurden. Teile des Moleküls beginnen also bereits am Anfang des B-S-Übergangs zu schmelzen, obwohl das Molekül dort insgesamt noch relativ wenig überstreckt ist und die insgesamt verrichtete mechanische Arbeit die gesamte freie Basenpaarungsenthalpie des ganzen Moleküls noch nicht erreicht hat. Mit zunehmender Überstreckung geht dann immer mehr DNA in die einzelsträngige Konformation über. Zusammen mit der Tatsache, daß sich bei höheren Temperaturen kein separater Schmelzübergang bei DNA zeigt, deutet die gute Übereinstimmung der B-S-Plateaukräfte mit den thermodynamischen Werten darauf hin, daß bei höheren Temperaturen das kraftinduzierte Schmelzen der DNA-Doppelhelix also nicht erst am Ende des B-S-Übergangs, sondern schon während des B-S-Übergangs stattfindet. Bei Raumtemperatur beginnt der Prozeß des kraftinduzierten Schmelzens dagegen – mit der Ausnahme von AT-reichen Regionen – sehr wahrscheinlich erst am Ende des B-S-Übergangs⁵³ (vgl. auch Abschnitt 8.2.6).

8.2.6 Die Sequenzabhängigkeit

In diesem Abschnitt soll schließlich anhand von Kraftexperimenten mit definierten synthetischen DNA-Sequenzen der Einfluß der Sequenz auf die mechanischen Eigenschaften und auf die mechanische Stabilität von DNA beleuchtet werden⁵⁴.

Abbildung 8.11 zeigt Kraft-Abstandskurven von poly(dG-dC)·poly(dG-dC) bzw. poly(dA-dT)·poly(dA-dT)-DNA unter physiologischen Bedingungen. Die beiden Sequenzen unterscheiden sich dabei deutlich in ihren strukturellen Umwandlungen. Während bei der

⁵² ΔL_{B-S} und ΔG_{bp} beziehen sich auch hier wieder auf ein Basenpaar.

⁵³ Die Körpertemperatur vieler Organismen (ca. 30-40°C bei ca. 150 mM NaCl) scheint also genau dem Optimum der DNA-Stabilität zu entsprechen: die Doppelhelix ist gegenüber Kräften bis etwa 50 pN stabil und dennoch kann die Doppelhelix ohne großen Energieverbrauch durch die Anlagerung von Proteinen, wie beispielsweise RecA [272, 273] und die daraus resultierende Überstreckung lokal geöffnet werden, was unabdingbare Voraussetzung für zahlreiche zelluläre Prozesse ist. Darüber hinaus scheint DNA auch zum reversiblen Ankoppeln von Enzymen, wie beispielsweise Phospholipase an die Kraftmikroskopspitze geeignet: Bei 20°C reicht die Stabilität von DNA aus, um das Enzym von seinem Substrat zu trennen (vgl. Anhang A). Bei höheren Temperaturen läßt sich das Enzym dann leicht wieder von der Spitze trennen, um anderen Enzymen Platz zu machen.

⁵⁴ Mikrokolorimetrische Untersuchungen zeigen, daß sich die freien Basenpaarungsenthalpien ΔG_{bp} unterschiedlicher Basen je nach Sequenz bis zum vierfachen voneinander unterscheiden (vgl. Anhang C u.[250]).

poly(dG-dC) Sequenz (Abbildung 8.11 A) der B-S-Übergang, wie bei λ -DNA, bei 65 pN auftritt, ist der Schmelzübergang zu Kräften von etwa 250-350 pN verschoben. Bei der poly(dA-dT)-Sequenz findet die erste strukturelle Umwandlung dagegen schon bei 35 pN statt, und ähnlich wie bei den oberhalb von 40°C aufgenommenen Kraftkurven an λ -DNA findet sich in den an poly(dA-dT)-DNA gemessenen Kurven kein zweiter Übergang. Das legt die Schlußfolgerung nahe, daß auch hier die DNA-Doppelhelix bereits im B-S-Übergang aufschmilzt. Ein Vergleich der im AT-Molekül deponierten mechanischen Energie mit der freien Basenpaarungsenthalpie einer reinen AT-Sequenz [250] zeigt, daß die freie Basenpaarungsenthalpie in dem bei 35 pN auftretenden B-S-Übergang bereits vollständig aufgebraucht wird. Die Schlußfolgerung, daß die AT-Doppelhelix bereits bei 35 pN zu schmelzen beginnt, wird auch dadurch bestätigt, daß sich in Relaxationskurven von AT-DNA bereits Haarnadelstrukturen zeigen, sobald Moleküle ein Stück in den B-S-Übergang hinein gestreckt wurden (vgl. Abschnitt 8.3).

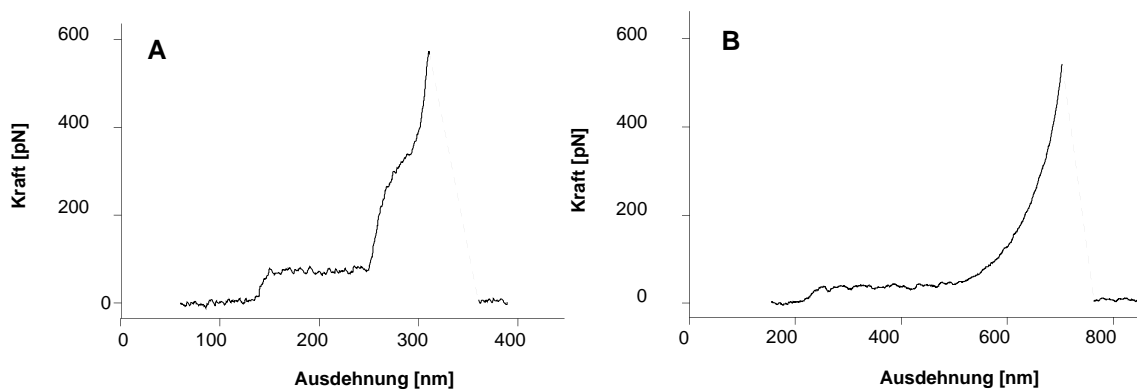


Abbildung 8.11 Kraft-Abstands-Kurven von (A) poly(dG-dC)-poly(dG-dC)-DNA und (B) poly(dA-dT)-poly(dA-dT)-DNA in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA bei 20°C.

Die Tatsache, daß der B-S-Übergang auch bei reinen GC-Sequenzen bei 65 pN stattfindet, obwohl die freie Basenpaarungsenthalpie hier gegenüber λ -DNA deutlich größer ist [250] zeigt, daß B-S und Schmelzübergang grundsätzlich voneinander unabhängig sind, auch wenn beide Übergänge bei λ -DNA unter physiologischen Bedingungen fast unmittelbar zusammentreffen.

8.3 Die Basenpaarungskräfte von DNA

Die im letzten Abschnitt bereits diskutierten poly(dG-dC)·poly(dG-dC) und poly(dA-dT)·poly(dG-dC)-Moleküle erlauben nicht nur Einblicke in die Sequenzabhängigkeit des mechanischen Überstreckens von DNA, sondern sie ermöglichen auch auf einfache Art und Weise die Basenpaarungskräfte zwischen reinen GC- und reinen AT-Sequenzen direkt zu bestimmen. Sowohl der poly(dG-dC)-Strang als auch der poly(dA-dT)-Strang sind nämlich nicht nur zu ihren jeweiligen Partnersträngen komplementär, sondern sie sind auch beide selbstkomplementär und können deshalb auf sich selbst zurückbinden und Haarnadelstrukturen, sogenannte *hairpins* (engl.) bilden. Wird also eine poly(dG-dC)- oder eine poly(dA-dT)-Doppelhelix bis in den kraftinduzierten Schmelzübergang überstreckt, so kann der abgeschmolzene Strang die freie Enthalpie dadurch reduzieren, daß er auf sich selbst zurückfaltet, eine Haarnadelstruktur bildet und damit nicht mehr zur Hybridisierung zur Verfügung steht (vgl. Abbildung 8.12 A). Wird anschließend der gestreckte Strang relaxiert, so kann dieser nicht mehr auf den abgeschmolzenen Strang zurückfalten und muß deshalb beim Relaxieren ebenfalls eine Haarnadelkonformation bilden. Wird der Strang dann erneut gestreckt, so wird die Haarnadelstruktur in einer Art Reißverschlußmechanismus wieder auseinandergezogen und dabei die einzelnen Basenpaare der Haarnadel nacheinander aufgebrochen. Auf diese Weise lassen sich dann die Basenpaarungskräfte von GC- und AT-Basenpaaren direkt bestimmen.

Die in Abbildung 8.12 B gezeigte Abfolge von drei Kraft-Abstandszyklen, die alle an demselben poly(dG-dC)-Duplex aufgenommen wurden, zeigt die Entstehung von Haarnadelstrukturen nach dem kraftinduzierten Schmelzen der Doppelhelix. Im erste Zyklus (oben) wird das Molekül lediglich bis zum Ende des B-S-Übergangs überstreckt. Die geringe Hysterese deutet darauf hin, daß während diesem Zyklus praktisch keine Umwandlung in einzelsträngige DNA oder Haarnadelstrukturen stattgefunden hat. Wird das Molekül erneut gedehnt, so gleicht die Dehnkurve (mittlere schwarze Kurve) der vorangegangenen Relaxationskurve. Dieses Mal wird das Molekül jedoch bis in den Schmelzübergang hinein überstreckt. In der dazugehörigen Relaxationskurve (mittlere graue Kurve) ist deutlich zu erkennen, daß sich das für die doppelhelikale Konformation charakteristische B-S-Plateau

verkürzt hat und statt dessen eine neues Plateau bei 20 ± 3 pN erscheint. Die Länge des neuen Plateaus (δ_{hp}) entspricht dabei etwa 2,1 mal der Verkürzung der doppelhelikalen Konformation (δ_{ds}), was dem Längenunterschied zwischen einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA bei 20 pN entspricht⁵⁵.

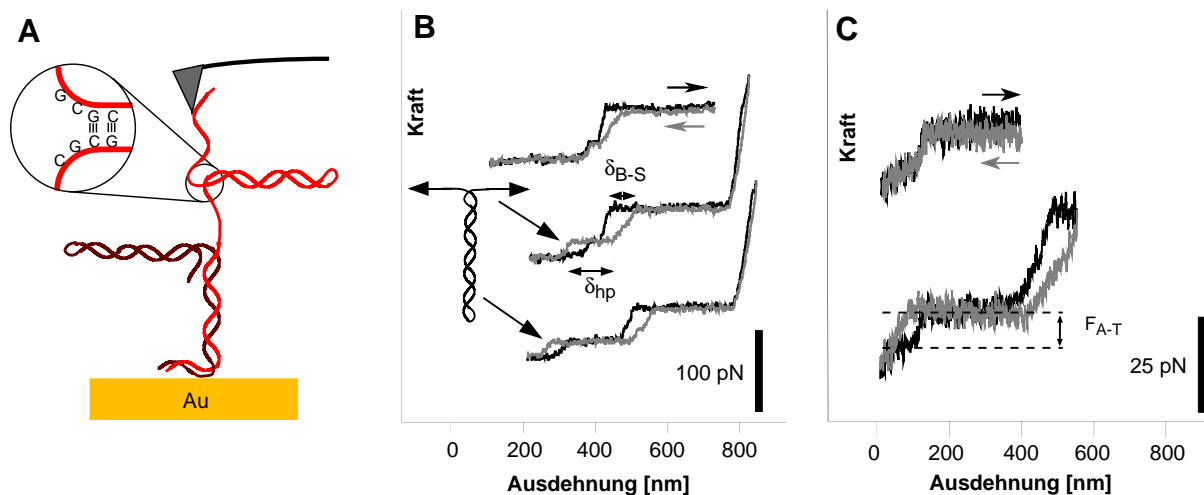


Abbildung 8.12 (A) Entstehung von Haarnadelstrukturen in selbstkomplementärer DNA. (B) Drei nacheinander am selben poly(dG-dC)-poly(dG-dC)-Segment aufgenommene Deformationszyklen. (C) Zwei am selben poly(dA-dT)-poly(dG-dC)-Segment aufgenommene Deformationszyklen. Pufferbedingungen in B und C: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 20°C.

Wird das Molekül erneut überstreckt (untere schwarze Kurve), so wird bei 20 pN zunächst die Haarnadelstruktur wieder aufgebrochen und dabei die einzelnen Basenpaare der Reihe nach getrennt. Im Schmelzübergang geht dann weitere DNA in die einzelsträngige Konformation über, was sich beim Relaxieren (graue Kurve) in einer erneuten Verkürzung des B-S-Plateaus und in einer entsprechenden Verlängerung des Plateaus bei 20 pN bemerkbar macht. Das läßt sich solange wiederholen, bis die gesamte DNA in die Haarnadelkonformation überführt ist. Bei AT-Sequenzen kann die Entstehung von Haarnadelstrukturen bereits nach dem ersten Überstrecken in den B-S-Übergang beobachtet werden (siehe Abbildung 8.12 C). Die Basenpaarungskraft der nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildenden AT-Basenpaarung ist dabei 9 ± 3 pN, und wie bei den GC Sequenzen ist das durch die Haarnadeln

⁵⁵ Dabei wurde berücksichtigt, daß dieses GC-Segment, im Gegensatz zu dem in Abbildung 8.11 A gezeigten, bereits beim ersten Strecken eine kurze Stufe bei 20 pN zeigt, die auf die Existenz einer kurzen Haarnadel schon vor dem ersten Strecken hindeutet.

verursachte Plateau etwa doppelt so lang, wie die dadurch hervorgerufene Verkürzung der doppelhelikalen Konformation⁵⁶.

Die Beobachtung, daß die Basenpaarungskräfte bei der Entstehung und beim Auftrennen der Haarnadeln dieselben sind, und daß sie nicht von der Zuggeschwindigkeit abhängen, zeigt, daß es sich hier um einen Gleichgewichtsprozeß handelt, der sehr viel schneller abläuft, als die Kraftexperimente. Außerdem zeigt es, daß die hydrodynamischen Kräfte auf die rotierende Haarnadel unterhalb der experimentellen Auflösungsgrenze liegen.

Schließlich stimmen auch hier die im Molekül deponierten mechanischen Energien wieder sehr gut mit den entsprechenden freien Basenpaarungsenthalpien reiner GC- bzw. AT-Sequenzen überein, wenn man berücksichtigt, daß sich die DNA bei reißverschlußartigem Auseinanderziehen der Doppelhelix um 14,2 Å/bp verlängert⁵⁷.

⁵⁶ Ein Vergleich der hier gemessenen Basenpaarungskräfte mit den zum reißverschlußartigen Auftrennen von λ -DNA benötigten Kräften (12-14 pN, vgl. [265, 274, 275]) zeigt, daß die Beziehung zwischen mittlerem GC- bzw. AT-Anteil und der zu Auftrennen benötigten Kraft nicht unbedingt linear ist, sondern aufgrund des Beitrags der Basenstapelung zu ΔG_{bp} stark von der konkreten Basenabfolge abhängt [250]. So ergibt eine lineare Extrapolation von Essevaz-Roulet et al [274] zu 100% CG-Anteil beispielsweise eine Kraft von 15 pN und zu 100% AT-Anteil 10 pN, was im Widerspruch zu den hier gemessenen Werten steht. Das zeigt, daß diese lineare Extrapolation nicht zulässig ist und die genaue Abfolge der Basen berücksichtigt werden muß.

⁵⁷ Für die Basenpaarungskräfte gilt: $\Delta G_{bp} \approx 14,2 \text{ \AA} \cdot f_{bp}$. Im B-S-Übergang verlängert sich die Doppelhelix, je nach Sequenz, nur um etwa $\Delta l = 2,4-3,7 \text{ \AA/bp}$ und es gilt $\Delta G_{bp} \approx \Delta l \cdot f_{B-S}$ (außer für reine GC-Sequenzen). Die Energien stimmen also jedesmal gut mit den kalorimetrisch ermittelten Werten überein.

9 Ausblick

Über die eigentlichen Ergebnisse dieser Arbeit hinaus eröffnen die hier vorgestellten Experimente und Methoden neue Perspektiven für zukünftige Untersuchungen. So stellt die Kombination aus komplementären analytischen Techniken, wie der Rasterkraftmikroskopie, die lokal im Ortsraum Strukturinformationen von höchster Präzision liefert, mit der Neutronendiffraktion, die über große Probenbereiche mittelt und präzise Informationen im Frequenzraum liefert, einen neuen Ansatz bei der Strukturuntersuchung im nanoskaligen Bereich dar. Es ist denkbar, daß eine derartige Kombination komplementärer Techniken auch an anderen Systemen wertvolle Beiträge zur Strukturaufklärung liefern könnte. Darüber hinaus öffnet die genaue Kenntnis der lateralen Struktur in gemischten Lipiddoppelschichten, wie den hier vermessenen den Weg zu einem besseren Verständnis der Funktionalität biologischer Membranen.

Auch die Symbiose zwischen molekularen biologischen Werkzeugen und Verfahren der Nanotechnologie, wie der Strukturierung mit Rastersondentechniken, sollte sich grundsätzlich auf eine Vielzahl anderer Systeme übertragen lassen. Insbesondere durch verbesserte molekulare Koppler, die nicht nur flexibel, sondern möglichst auch reversibel schaltbar sein sollten, könnte dann die enorme Vielfalt biologischer Werkzeuge als eine Art *molekulare Werkzeugkiste* genutzt werden, die zusammen mit der hohen Präzision der Rastersondentechniken völlig neue Strukturierungsmöglichkeiten im Nanometer-Bereich ermöglicht.

Die Experimente zur mechanischen Stabilität der DNA-Doppelhelix sowie zu den Basenpaarungskräften bei DNA haben gezeigt, daß komplementäre DNA-Sequenzen durchaus zur reversiblen Anbindung von Enzymen, wie beispielsweise Phospholipase an die Kraftmikroskopspitze geeignet sind. Darüber hinaus sind derartige Experimente eine wichtige Voraussetzung zum Aufbau komplexer Nanoarchitekturen aus Polynucleinsäuren. Das gilt insbesondere für die Abschätzung von deren Stabilität und für die geeignete Wahl

komplementärer Sequenzen und kohäsiver Enden. Aber auch für Gen- und Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips eröffnen die hier vorgestellten Ergebnisse Perspektiven, um die nach wie vor hohen Fehlerraten möglicherweise deutlich zu senken, beziehungsweise mit völlig neuen Strategien die Empfindlichkeit dieser Technologie soweit zu erhöhen, daß Sequenzpolymorphismen von einem oder nur wenigen Basenpaaren zuverlässig nachgewiesen werden können. Schließlich geben erste kraftspektroskopische Untersuchungen an mit Cisplatin komplexierter DNA (vgl. Anhang G) zu der Hoffnung Anlaß, daß mit Hilfe von kraftspektroskopischen Untersuchungen in Zukunft detaillierte Einblicke in den Zusammenhang zwischen Struktur, Kraft und Funktion möglich sein werden. Die Kraftspektroskopie könnte sich damit möglicherweise zu einem neuen analytischen Werkzeug in der Struktur- und Funktionsaufklärung, beispielsweise bei der Untersuchung neuartiger Krebsmedikamente, entwickeln.

10 Referenzen

- [1] R. P. Feynman, "There's plenty of room at the bottom," *Engineering and Science*, vol. 23, pp. 22-36, 1960.
- [2] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, "Atomic force microscope," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, pp. 930, 1986.
- [3] G. Binnig and H. Rohrer, "Scanning Tunneling Microscopy - from birth to adolescence," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 59, pp. 615-625, 1987.
- [4] D. M. Eigler and E. K. Schweizer, "Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope," *Nature*, vol. 334, pp. 524-526, 1990.
- [5] T. A. Jung, R. R. Schlittler, J. K. Gimzewski, H. Tang, and C. Joachim, "Controlled room-temperature positioning of individual molecules: molecular flexure and motion," *Science*, vol. 271, pp. 181-184, 1996.
- [6] J. K. Gimzewski and C. Joachim, "Nanoscale science of single molecules using local probes," *Science*, vol. 283, pp. 1683-1688, 1999.
- [7] P. K. Hansma, V. B. Elings, O. Marti, and C. E. Bracker, "Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: applications to biology and technology," *Science*, vol. 242, pp. 209-216, 1988.
- [8] S. C. Minne, P. Flueckiger, H. T. Soh, and C. F. Quate, "Atomic force microscope lithography using silicon as a resist and advances in parallel operation," *J. Vac. Sci. & Technol.*, vol. 13, pp. 1380-1385, 1995.
- [9] K. Wilder, "Hybrid atomic force/scanning tunneling lithography," *J. Vac. Sci. & Technol.*, vol. 15, pp. 1811-1817, 1997.
- [10] S. Buchholz, H. Fuchs, and J. P. Rabe, "Characterization and modification of conducting substrates for ultrathin organic films by scanning tunneling microscopy," *Adv. Mater.*, vol. 3, pp. 51-54, 1991.
- [11] M. Wendel, S. Kühn, H. Lorenz, J. P. Kotthaus, and M. P. Holland, "Nanolithography with an atomic force microscope for integrated fabrication of quantum electron devices," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 65, pp. 1775-1777, 1994.
- [12] M. Wendel, H. Lorenz, and J. P. Kotthaus, "Sharpened electron beam deposited tips for high resolution atomic force microscope lithography and imaging," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 67, pp. 3732-3734, 1995.
- [13] W. Müller, D. Klein, T. Lee, J. Clarke, P. McEuen, and P. Schultz, "A Strategy for the Chemical Synthesis of Nanostructures," *Science*, vol. 268, pp. 272-273, 1995.
- [14] B. W. Chui, T. D. Stowe, T. W. Kenney, H. J. Mamin, B. D. Terris, and D. Rugar, "Low-stiffness silicon cantilevers for thermal writing and piezoresistive readback with the atomic force microscope," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 69, pp. 2767-2769, 1996.
- [15] B. Irmer, M. Kehrlé, H. Lorenz, and J. P. Kotthaus, "Fabrication of Ti/TiO_x tunneling barriers by tapping mode atomic force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 71 (12), pp. 1733-1735, 1997.
- [16] H. Sugimura and N. Nakagiri, "Organosilane monolayer resists for scanning probe lithography," *J. Polym. Sci. Technol.*, vol. 10, pp. 661-666, 1997.
- [17] H. Sugimura and N. Nakagiri, "Combination of photo and atomic force microscope lithographies by use of an organosilane monolayer resist," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 36, pp. L968-L970, 1997.
- [18] J. Wang, J. Kenseth, V. Jones, J. Green, M. McDermott, and M. Porter, "SFM Tip-Assisted Hydrolysis of a Dithiobis(succinimidoundecanoate) Monolayer Chemisorbed on a Au(111) Surface," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, pp. 12796-12799, 1997.
- [19] E. Schrödinger, *What is life?* Cambridge: Cambridge University Press, 1944.
- [20] N. C. Seeman, "Nanostrukturen und Topologien von Nucleinsäuren," *Angew. Chem.*, vol. 110, pp. 3408-3428, 1998.
- [21] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*. Weinheim: VCH, 1995.
- [22] J. Bryson, S. Betz, H. Lu, D. Suich, H. Zhou, K. O'Neil, and W. DeGrado, "Protein design: A hierarchical approach," *Science*, vol. 270, pp. 935-941, 1995.

- [23] B. I. Dahiya and S. L. Mayo, "De novo protein design: Fully automated sequence selection," *Science*, vol. 278, pp. 82-87, 1997.
- [24] D. Urry, "Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein based polymers," *J. Phys. Chem.*, vol. 101, pp. 11007-11028, 1997.
- [25] D. Urry, "Elastic molecular machines in metabolism and soft-tissue restoration," *Trends Biotechnol.*, vol. 17, pp. 249-257, 1999.
- [26] M. Egger, S. P. Heyn, and H. E. Gaub, "A synthetic membrane bound receptor based on the binding site of a monoclonal antibody," *BBA*, vol. 1104, pp. 45-54, 1992.
- [27] H. Ochiai, J. Stadler, M. Westphal, G. Wagle, R. Merkl, and G. Gerisch, "Monoclonal antibodies against contact sites A of *Dictyostelium discoideum*: detection of modifications of the glycoprotein in tunicamycin-treated cells," *EMBO J.*, vol. 1, pp. 1011-1016, 1982.
- [28] R. A. Roth, D. J. Cassell, K. Y. Wong, B. A. Maddux, and I. D. Goldfine, "Monoclonal antibodies to the human insulin receptor block insulin binding and inhibit insulin action," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 79, pp. 7312-7316, 1982.
- [29] C. A. Janeway, "How the immune system recognizes invaders," *Scientific American*, vol. 269, pp. 40-47, 1993.
- [30] P. Ball, *Made to measure: new materials for the 21st century*. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1997.
- [31] B. Miñambres, H. Martínez-Blanco, E. R. Olivera, B. García, B. Diez, J. L. Barredo, M. A. Moreno, C. Schleissner, F. Salto, and J. M. Luengo, "Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *pseudomonas putida* U phenylacetyl-coA ligase. Use of this gene to improve the rate of benzylpenicillin biosynthesis in *penicillium chrysogenum*," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 33531-33538, 1996.
- [32] P. G. Eglund, D. A. Pelletier, M. Dispensa, J. Gibson, and C. S. Harwood, "A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, pp. 6484-6489, 1997.
- [33] B. García, E. R. Olivera, B. Miñambres, M. Fernández-Valverde, L. M. Cañedo, M. A. Prieto, J. L. García, M. Martínez, and J. M. Luengo, "Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-coa catabolon," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, pp. 29228-29241, 1999.
- [34] S. Y. Lee, Y. Lee, and F. Wang, "Chemical compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 65, pp. 363-368, 1999.
- [35] A. Engel, "Biological applications of scanning probe microscopes," *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, vol. 20, pp. 79-108, 1991.
- [36] M. Radmacher, R. W. Tillmann, M. Fritz, and H. E. Gaub, "From molecules to cells-imaging soft samples with the AFM," *Science*, vol. 257, pp. 1900-1905, 1992.
- [37] Z. Shao and J. Yang, "Progress in high resolution atomic force microscopy in biology," *Quart. Rev. Biophys.*, vol. 28, pp. 195-251, 1995.
- [38] Z. Shao, J. Yang, and A. P. Somlyo, "Biological atomic force microscopy: from microns to nanometers and beyond," *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, pp. 241-265, 1995.
- [39] C. Bustamante and D. Keller, "Scanning force microscopy in biology," *Physics Today*, pp. 32 - 38, 1995.
- [40] H. G. Hansma, K. J. Kim, D. E. Laney, R. A. Garcia, M. Argaman, M. J. Allen, and S. M. Parson, "Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: a review," *J. Struc. Biol.*, vol. 119, pp. 99-108, 1997.
- [41] M. Miles, "Probing the future," *Science*, vol. 277, pp. 1845-1846, 1997.
- [42] A. D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith, and R. M. Simmons, "Single molecule biomechanics with optical methods," *Science*, vol. 283, pp. 1689-1694, 1999.
- [43] V. T. Moy, E. L. Florin, and H. G. Gaub, "Intermolecular forces and energies between ligands and receptors," *Science*, vol. 266, pp. 257-259, 1994.
- [44] E.-L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, "Adhesive forces between individual ligand-receptor pairs," *Science*, vol. 264, pp. 415-417, 1994.
- [45] G. U. Lee, D. A. Kidwell, and R. J. Colton, "Sensing discrete streptavidin biotin interactions with the atomic force microscope," *Langmuir*, vol. 10, pp. 354-357, 1994.
- [46] H. Grubmüller, B. Heymann, and P. Tavan, "Ligand binding: molecular mechanics calculation of the streptavidin- biotin rupture force," *Science*, vol. 271, pp. 997-999, 1995.

- [47] S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, and K. Schulten, "Molecular Dynamics Study of Unbinding of the Avidin-Biotin Complex," *Biophysical Journal*, vol. 72, pp. 1568-1581, 1997.
- [48] U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, and G. N. Misevic, "Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy," *Science*, vol. 267, pp. 1173-1175, 1995.
- [49] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler, "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp. 3477-3481, 1996.
- [50] J. Fritz, A. G. Katopodis, F. Kolbinger, and D. Anselmetti, "Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, pp. 12283-12288, 1998.
- [51] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plueckthun, and L. Tiefenauer, "Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules," *Biophysics*, vol. 95, pp. 7402-7405, 1998.
- [52] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans, "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy," *Nature*, vol. 397, pp. 50-53, 1999.
- [53] B. Heymann and H. Grubmüller, "AN0w/DNP-hapten unbinding forces studied by molecular dynamics atomic force microscopy simulations," *Chemical Physics Letters*, vol. 303, pp. 1-9, 1999.
- [54] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub, "Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM," *Science*, vol. 275, pp. 1295-1298, 1997.
- [55] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub, "Reversible unfolding of individual titin Ig-domains by AFM," *Science*, vol. 276, pp. 1109-1112, 1997.
- [56] M. Rief, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub, "Elastically Coupled Two-Level-Systems as a Model for Biopolymer Extensibility," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 81, pp. 4764-4767, 1998.
- [57] P. E. Marszalek, A. F. Oberhauser, Y. P. Pang, and J. M. Fernandez, "Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring," *Nature*, vol. 396, pp. 661-664, 1998.
- [58] F. Oesterhelt, M. Rief, and H. E. Gaub, "Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of Poly(ethylene-glycol) in water," *New Journal of Physics*, vol. 1, pp. 6.1-6.11, 1999.
- [59] B. Heymann and H. Grubmüller, "'Chair-boat' transitions and side groups affect the stiffness of polysaccharides," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 305, pp. 202-208, 1999.
- [60] B. Heymann and H. Grubmüller, "Elastic properties of poly(ethylene-glycol) studied by molecular dynamics stretching simulations," *Chem. Phys. Lett.*, vol. in press, 1999.
- [61] H. J. Kreuzer, R. L. Wang, and M. Grunze, "Effects of stretching on the molecular conformation of oligo (ethylene oxide): a theoretical study," *New Journal of Physics*, vol. in press, 2000.
- [62] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, "Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads," *Science*, vol. 258, pp. 1122-1126, 1992.
- [63] T. Perkins, D. Smith, and S. Chu, "Single Polymer Dynamics in an Elongational Flow," *Science*, vol. 276, pp. 2016-2021, 1997.
- [64] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub, "How Strong is a Covalent Bond?," *Science*, vol. 283, pp. 1727-1730, 1999.
- [65] S. B. Smith and A. J. Bendich, "Electrophoretic charge density and persistence length as measured by fluorescence microscopy," *Biopolymers*, vol. 29, pp. 1167-1173, 1990.
- [66] C. Bustamante, "Direct observation and manipulation of single DNA molecules using fluorescence microscopy," *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, vol. 20, pp. 415-446, 1991.
- [67] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon, "Alignment and Sensitive Detection of DNA by a Moving Interface," *Science*, vol. 265, pp. 2096-2098, 1994.
- [68] J. Maddox, "Elastic properties of DNA revealed," *Nature*, vol. 375, pp. 627, 1995.
- [69] G. U. Lee, L. A. Chris, and R. J. Colton, "Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA," *Science*, vol. 266, pp. 771-773, 1994.

- [70] T. Boland and B. D. Ratner, "Direct measurement of hydrogen bonding in DNA nucleotide bases by atomic force microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 92, pp. 5297-5301, 1995.
- [71] H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block, and J. Gelles, "Transcription against an applied force," *Science*, vol. 270, pp. 1653-1657, 1995.
- [72] S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev, and P. K. Hansma, "Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy," *Biochem*, vol. 36, pp. 461-468, 1997.
- [73] M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, "Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase," *Science*, vol. 282, pp. 902-907, 1998.
- [74] F. Jülicher and R. Bruinsma, "Motion of RNA polymerase along DNA: a stochastic model," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 1169-1185, 1998.
- [75] V. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, *Molecular biology of the cell*, 3rd ed. New York: Garland Publishing Inc., 1994.
- [76] J. C. Wang, "DNA topoisomerases," *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 65, pp. 635-692, 1996.
- [77] G. D. Cimano, H. B. Gamper, S. T. Isaacs, and J. E. Hearst, "Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry," *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 54, pp. 1151-93, 1985.
- [78] N. P. Johnson, J.-L. Butour, G. Villani, F. L. Wimmer, M. Defais, V. Pierson, and V. Brabec, "Metal antitumor compounds: the mechanism of action of platinum complexes," *Prog. Clin. Biochem. Med.*, vol. 10, pp. 1-24, 1989.
- [79] L. Marrot and M. Leng, "Chemical probes of the conformation of DNA modified by cis-diamminedichloroplatinum(II)," *Biochemistry*, vol. 28, pp. 1454-1461, 1989.
- [80] M. J. Bloemink and J. Reedijk, "Cisplatin and derived anticancer drugs: mechanism and current status of DNA binding," *Met. Ions Biol. Sys.*, vol. 32, pp. 641-685, 1996.
- [81] L. T. Mazzola and S. P. A. Fodor, "Imaging biomolecule arrays by atomic force microscopy," *Biophys. J.*, vol. 68, pp. 1653-1660, 1995.
- [82] M. Chee, E. Yang, E. Hubbel, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris, and S. P. Fodor, "Accessing genetic information with high density DNA arrays," *Science*, vol. 274, pp. 610-614, 1996.
- [83] D. G. Wang, J.-B. Fan, C.-J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbel, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, and E. S. Lander, "Large-scale identification, mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome," *Science*, vol. 280, pp. 1070-1082, 1998.
- [84] R. J. Lipshutz, S. P. Fodor, T. R. Gingeras, and D. J. Lockhart, "High density synthetic oligonucleotide arrays," *Nature Genetics*, vol. 21, pp. 20-24, 1999.
- [85] L. T. Mazzola, C. W. Frank, S. P. Fodor, C. Mosher, R. Lartius, and E. Henderson, "Discrimination of DNA hybridization using chemical force microscopy," *Biophys. J.*, vol. 76, pp. 2922-2933, 1999.
- [86] R. E. Thompson and E. D. Siggia, "Physical limits on the mechanical measurements of the secondary structure of bio-molecules," *Europhys. Lett.*, vol. 31, pp. 335-340, 1995.
- [87] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez Jr., and P. G. Schultz, "Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA," *Nature*, vol. 382, pp. 609-611, 1996.
- [88] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff, "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials," *Nature*, vol. 382, pp. 607-609, 1996.
- [89] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, and C. A. Mirkin, "Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles," *Science*, vol. 277, pp. 1078-1081, 1997.
- [90] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, and M. R. Wasielewski, "Distance-dependant electron transfer in DNA hairpins," *Science*, vol. 277, pp. 673-676, 1997.
- [91] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, and G. Ben-Yoseph, "DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire," *Nature*, vol. 391, pp. 775-778, 1998.

- [92] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, and N. C. Seeman, "Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals," *Nature*, vol. 394, pp. 539-544, 1998.
- [93] C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, and P. G. Schultz, "DNA als Gerüst zur Bildung von Aggregaten aus Gold-Nanokristallen," *Angew. Chem.*, vol. 111, pp. 1925-1929, 1999.
- [94] H.-W. Fink and C. Schönberger, "Electrical conduction through DNA molecules," *Nature*, vol. 398, pp. 407-410, 1999.
- [95] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, and C. Decker, "Direct measurement of electrical transport through DNA molecules," *Nature*, vol. 403, pp. 635-638, 2000.
- [96] M. Paesler and N. F. van Hulst, "Near field optics and related techniques," in *Ultramicroscopy*, vol. 61. Amsterdam: Elsevier, 1995.
- [97] M. Fritz, M. Radmacher, and H. E. Gaub, "Granula motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy," *Biophys. J.*, vol. 66, pp. 1328-1334, 1994.
- [98] M. Radmacher, M. Fritz, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, "Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope," *Science*, vol. 265, pp. 1577-1579, 1994.
- [99] D. J. Müller, G. Büldt, and A. Engel, "Force-induced conformational change of bacteriorhodopsin," *J. Mol. Biol.*, vol. 249, pp. 239-249, 1995.
- [100] N. H. Thomson, S. Kasas, B. Smith, H. Hansma, G., and P. K. Hansma, "Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging," *Langmuir*, vol. 12, pp. 5905-5908, 1996.
- [101] S. J. van Noort, K. O. van der Werf, A. P. Eker, C. Wyman, B. G. Grooth, N. F. van Hulst, and J. Greve, "Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 2840-2849, 1998.
- [102] F. Schwabl, *Quantenmechanik*, 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- [103] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 2nd ed. New York: Academic Press, 1992.
- [104] M. Radmacher, "Kraftmikroskopie an weichen Proben", Doktorarbeit, Physik Department, Technische Universität München, Garching, 1993.
- [105] H. Hölscher, "Kontrastmechanismen in der Rasterkraftmikroskopie", Dissertation, Fachbereich Physik, Universität Hamburg, Hamburg, 1999.
- [106] C. M. Knobler, "Seeing phenomena in flatland: studies of monolayers by fluorescence microscopy," *Science*, vol. 249, pp. 870-874, 1990.
- [107] W. Knoll, K. Ibel, and E. Sackmann, "SANS study of lipid phase diagrams by the contrast variation method," *Biochemistry*, vol. 20, pp. 6379-6383, 1981.
- [108] E. Jürgens, G. Höhne, and E. Sackmann, "Calorimetric study of the dipalmitoylphosphatidylcholine/water phasediagram," *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, vol. 87, pp. 95-104, 1983.
- [109] M. Lösche, E. Sackmann, and H. Möhwald, "A fluorescence microscopic study concerning the phase diagram of phospholipids," *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, vol. 87, pp. 848-852, 1983.
- [110] S. A. Safran, *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces, and membranes*. New York: Addison-Wesley Publishing Company, 1994.
- [111] P. G. Gennes de, *The physics of liquid crystals*, 2nd ed. Oxford: Clarendon press, 1993.
- [112] G. Cevc and D. Marsh, *Phospholipid bilayers*. New York: Wiley, 1987.
- [113] I. R. Lipowsky and E. Sackmann, "Structure and dynamics of membranes," in *Handbook of biological physics*, vol. 1A. Amsterdam: Elsevier, 1995.
- [114] I. R. Lipowsky and E. Sackmann, "Structure and dynamics of membranes," in *Handbook of biological physics*, vol. 1B. Amsterdam: Elsevier, 1995.
- [115] S. U. Egelhaaf and P. Schurtenberger, "Micelle-to-vesicle transition: a time resolved study," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 82, pp. 2804-2807, 1999.
- [116] L. Stryer, *Biochemistry*. San Francisco: Freeman Publications, 1981.
- [117] W. Knoll, G. Schmidt, T. Rotzer, T. Henkel, W. Pfeiffer, E. Sackmann, S. Mittlerneher, and J. Spinke, "Lateral order in binary lipid alloys and its coupling to membrane functions," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 57, pp. 363-374, 1991.
- [118] E. Sackmann, "Supported membranes: scientific and practical applications," *Science*, vol. 271, pp. 43-48, 1996.

- [119] H. Schindler, "Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles," *FEBS Lett.*, vol. 122, pp. 77-79, 1980.
- [120] E. Kalb, S. Frey, and L. K. Tamm, "Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1103, pp. 307-316, 1992.
- [121] J. Rädler, H. Strey, and E. Sackmann, "Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces," *Langmuir*, vol. 11, pp. 4539-4548, 1995.
- [122] C. Gliss, H. Clausen-Schaumann, R. Günther, S. Odenbach, O. Randl, and T. Bayerl, "Direct detection of domains in phospholipid bilayers by grazing incidence diffraction of neutrons and atomic force microscopy," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 2443-2450, 1998.
- [123] H. Clausen-Schaumann and H. E. Gaub, "DNA adsorption to laterally structured charged lipid membranes," *Langmuir*, vol. 15, pp. 8246-8251, 1999.
- [124] R. Merkel, E. Sackmann, and E. Evans, "Molecular friction and epitactic coupling between monolayers in supported bilayers," *J. Phys. France*, vol. 50, pp. 1535-1555, 1989.
- [125] F. Jähnig, "What is the surface tension of a lipid bilayer membrane?," *Biophys. J.*, vol. 71, pp. 1348-1349, 1996.
- [126] I. Langmuir, "The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 39, pp. 1848, 1917.
- [127] L. K. Tamm and H. M. McConnell, "Supported phospholipid bilayers," *Biophys. J.*, vol. 47, pp. 105-113, 1985.
- [128] I. L. Langmuir and V. J. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 60, pp. 1351-1360, 1938.
- [129] K. B. Blodgett and I. Langmuir, "Built-up of films of barium stearat and their optical properties," *Phys. Rev.*, vol. 37, pp. 964-982, 1937.
- [130] V. Tscharner and H. M. McConnell, "Physical properties of lipid monolayers on alcyated glass surfaces," *Biophys. J.*, vol. 36, pp. 421-427, 1981.
- [131] O. Albrecht, H. Gruler, and E. Sackmann, "Polymorphism of phospholipid monolayers," *Journal de Physique*, vol. 39, pp. 301-313, 1978.
- [132] T. Thuren, K. K. Eklun, J. A. Virtanen, and P. K. Kinnunen, "Hyrolosys of supporte pyrenephospholipid monolayers by phospholipase A₂," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 55, pp. 55-60, 1990.
- [133] F. Zhang, B. Crise, B. Su, Y. Hou, J. K. Rose, A. Bothwell, and K. Jacobson, "The lateral mobility of some membrane proteins is etermined by their ectoomains," *Biophys. J.*, vol. 62, pp. 92-94, 1992.
- [134] F. Zhang, G. M. Lee, and K. Jacobson, "Protein lateral mobility as a reflection of membrane microstructure," *Bio Essays*, vol. 15, pp. 579, 1993.
- [135] R. Simson, E. D. Sheets, and K. Jacobson, "Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis," *Biophys. J.*, vol. 69, pp. 989-993, 1995.
- [136] E. D. Sheets, R. Simson, and K. Jacobson, "New insight into membrane dynamics from the analysis of cell surface interactions by physical methos," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 7, pp. 707-714, 1995.
- [137] T. Hønger, K. Jørgensen, R. L. Biltonen, and O. G. Mouritsen, "Systematic relationship between phospholipase A₂ acticity and dynamic lipid bilayer heterogeneity," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 9003-9006, 1996.
- [138] A. Rietveld and K. Simons, "The differential miscibility of lipids is the basis for the formation of functional membrane rafts," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1376, pp. 467-479, 1998.
- [139] K. Jacobson and C. Dietrich, "Looking at lipid rafts?," *Trend Cell Biol.*, vol. 9, pp. 87-91, 1999.
- [140] R. Lipowsky, "From bunches of membranes to bundles of strings," *Z. Phys. B*, vol. 97, pp. 193-203, 1995.
- [141] A. G. Lee, "Lipid phase transitions and phase diagrams," *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 472, pp. 237-344, 1977.
- [142] A. G. Lee, "Calculation of phase diagrams for non ideal mixtures of lipids—and possible non random distribution of lipids in lipid mixtures in the liquid crystalline phase," *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 507, pp. 433-444, 1978.

- [143] O. G. Mouritsen, "Theoretical models of phospholipid phase transitions," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 19, pp. 159-175, 1991.
- [144] H. M. McConnell, L. K. Tamm, and R. M. Weis, "Periodic structures in lipid monolayer phase transitions," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 81, 1984.
- [145] H. Möhwald, "Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 41, pp. 441-476, 1990.
- [146] H. M. McConnell, "Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 42, pp. 171-95, 1991.
- [147] P. F. F. Almeida, W. L. C. Vaz, and T. E. Thompson, "Lateral diffusion and percolation in two-phase-two-component lipid bilayers: topology of the solid phase domains in-plane and across the lipid bilayer," *Biochemistry*, vol. 31, pp. 7198-7210, 1992.
- [148] M. B. Sarkam, D. Marsh, and T. E. Thompson, "Determination of fluid and gel domain sizes in two component, two-phase lipid bilayers: an electron spin resonance spin lable study," *Biophys. J.*, vol. 63, pp. 340-349, 1992.
- [149] R. Mendelsohn, G. L. Liang, S. H. L., and R. G. Snyder, "IR spectroscopic determination of gel state miscibility in long-chain phosphatidylcholine mixtures," *Biophys. J.*, vol. 69, pp. 1987-1998, 1995.
- [150] S. Pedersen, K. Jorgensen, T. R. Baekmark, and O. G. Mouritsen, "Indirect evidence of lipid domain formation in the transition region of phospholipid bilayers by two-probe fluorescence energy transfer," *Biophys. J.*, vol. 71, pp. 554-560, 1996.
- [151] C. Dolainsky, P. Karakatsanis, and T. M. Bayerl, "Lipid domains as obstacles for lateral diffusion in supported bilayers probed at different time and length scales by two dimensional exchange and field gradient solid state NMR," *Phys. Rev. E*, vol. 55, pp. 4512-4521, 1997.
- [152] T. P. Russel, "X-ray and neutron reflectivity for the investigation of polymers," *Mater. Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 171-271, 1990.
- [153] C. Gliss, "Molekulare Dynamik und Laterale Ordnung von binären Modellmembranen: Eine Neutronenbeugungsuntersuchung", Dissertation, Physik Department, Technische Universität München, Garching, 1999.
- [154] G. Cevc, *Phospholipids Handbook*. New York: M. Dekker, 1993.
- [155] J. D. Benvegnu and H. M. McConnell, "Line tension between liquid domains in lipid monolayers," *J. Phys. Chem.*, vol. 96, pp. 6820-6824, 1992.
- [156] H. M. McConnell and R. Koker de, "Note on the theory of the sizes and shapes of lipid domains in monolayers," *J. Phys. Chem.*, vol. 96, pp. 7101-7103, 1992.
- [157] J. F. Nagle and M. C. Wiener, "Structure of fully hydrated bilayer dispersions," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 942, pp. 1-10, 1988.
- [158] J. Koolman and K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*, 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1998.
- [159] E. A. Dennis, *Phospholipases. The enzymes*, vol. 16. New York: Academic press, 1983.
- [160] W. R. Burack and R. L. Biltonen, "Lipids bilayer heterogeneities and modulation of phospholipase A₂ activities.," *Chem. Phys. of Lipids*, vol. 1994, pp. 209-222, 1994.
- [161] J. D. Bell and R. L. Biltonen, "Thermodynamic and Kinetic Studies of the Interaction of Vesicular Dipalmitoylphosphatidylcholine with *Agkistrodon piscivorus piscivorus* Phospholipase A₂," *J. of Biol. Chem.*, vol. 264 (1), pp. 225-230, 1989.
- [162] D. Lichtenberg, G. Romero, M. Menashe, and R. L. Biltonen, "Hydrolysis of Dipalmitoylphosphatidylcholine Large Unilamellar Vesicles by Porcine Pancreatic Phospholipase A₂," *J. of Biol. Chem.*, vol. 261 (12), pp. 5334-5340, 1986.
- [163] J. A. op den Kamp, M. T. Kauerz, and L. L. v. Deenen, "Action of Pancreatic Phospholipase A₂ on Phosphatidylcholine Bilayers in Different Physical States," *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 406, pp. 169-177, 1975.
- [164] P. van Hoogevest, J. de Gier, and B. de Kruijff, "Determination of the size of the packing defects in dimyristoylphosphatidylcholine bilayer present at the phase transition temperature.," *FEBS Lett.*, vol. 171, pp. 160-164, 1984.
- [165] T. Hønger, K. Jørgensen, D. Stokes, R. L. Biltonen, and O. G. Mouritsen, "Phospholipase A₂ activity and physical properties of lipid-bilayer substrates," in *Methods Enzymol.*, vol. 286, 1997, pp. 168-190.

- [166] D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, and C. Salesse, "An enzyme caught in action: direct imaging of hydrolytic function and domain formation of phospholipase A₂ in phosphatidylcholine monolayers.," *FEBS Lett.*, vol. 252, pp. 73-82, 1989.
- [167] M. Grandbois, C. Salesse, and J. Dufourcq, "Study of the synergistic action of phospholipase A₂ and melittin in the hydrolysis of phospholipid monolayers.," *Thin Solid Films*, vol. 284,285, pp. 743-747, 1996.
- [168] L. P. Vernon and J. D. Bell, "Membrane structure toxins and phospholipase A₂ activity.," *Pharmac. Ther.*, vol. 54, pp. 269-295, 1992.
- [169] K. M. Maloney, M. Grandbois, C. Salesse, D. W. Grainger, and M. Roberts, "Phospholipase A₂ domain formation in hydrolysed asymmetric phospholipid monolayers at the air-water interface.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1235, pp. 395-405, 1995.
- [170] M. Grandbois, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub, "Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A₂," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 2398-2404, 1998.
- [171] H. Clausen-Schaumann, M. Grandbois, and H. E. Gaub, "Enzyme assisted nano-scale lithography in lipid membranes," *Adv. Mat.*, pp. 949-952, 1998.
- [172] C. R. Kensil and E. A. Dennis, "Action of Cobra Venom Phospholipase A₂ on the Gel and Liquid Crystalline States of Dimyristoyl and Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Vesicles," *J. of Biol. Chem.*, vol. 254 (13), pp. 5843-5848, 1979.
- [173] D. L. Scott, S. P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, H. G. Gelb, and P. B. Sigler, "Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂," *Science*, vol. 250, pp. 1541-1546, 1990.
- [174] D. L. Scott, Z. Otwinowski, M. H. Gelb, and P. B. Sigler, "Crystal structure of bee venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue," *Science*, vol. 250, pp. 1563-1566, 1990.
- [175] W. C. Wimley and T. E. Thompson, "Exchange and flip-flop of Dimyristoylphosphatidylcholine in liquid-crystalline, gel, and two-component, two phase large unilamellar vesicles," *Biochemistry*, vol. 29, pp. 1296-1303, 1990.
- [176] E. Evans and F. Ludwig, "Dynamic strength of molecular anchoring and material cohesion in fluid biomembranes," *J. Physics: Condensed Matter*, vol. in press, 2000.
- [177] E. Evans, "Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy," *Faraday Discuss.*, vol. 111, pp. 1-16, 1998.
- [178] M. K. Jain, B. Z. Yu, J. Rogers, G. N. Ranadive, and O. G. Berg, "Interfacial catalysis by phospholipase A₂: dissociation constants for calcium, substrate, products, and competitive inhibitors," *Biochemistry*, vol. 30, pp. 7306-7307, 1991.
- [179] E. L. Florin and H. E. G. Gaub, "Painted supported lipid membranes," *Biophys. J.*, vol. 64, pp. 375-383, 1993.
- [180] N. C. Santos, E. Ter-Ovanesyan, J. A. Zasadzinski, and M. A. Castanho, "Reconstruction of phospholipid bilayer by an atomic force microscope tip," *Biophys. J.*, vol. 75, pp. 2119-2120, 1998.
- [181] S. Manne, P. K. Hansma, J. Massie, V. B. Elings, and A. A. Gewirth, "Atomic-resolution electrochemistry with the atomic force microscope : copper deposition on gold surfaces," *Science*, vol. 251, pp. 183-186, 1991.
- [182] S. Manne, J. Massie, V. B. Elings, P. K. Hansma, and A. A. Gewirth, "Electrochemistry on a gold surface observed with the atomic force microscope," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 9, pp. 950-954, 1991.
- [183] E. L. Florin, M. Rief, H. Lehmann, M. Ludwig, C. Dornmair, V. T. Moy, and H. E. Gaub, "Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 10, pp. 895 - 901, 1995.
- [184] A. Roters and D. Johannsmann, "Distance dependant noise measurements in scanning force microscopy," *J. Phys.: Condens. Matter*, vol. 8, pp. 7561-7577, 1996.
- [185] A. Kishino and T. Yanagida, "Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles," *Nature*, vol. 334, pp. 74-76, 1988.
- [186] M. Rief, M. Gautel, A. Schemmel, and H. E. Gaub, "The mechanical stability of Immunoglobulin and Fibronectin III Domains in the muscle protein Titin mesured by AFM," *Biophys. J.*, vol. in Press, 1998.

- [187] M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, and H. E. Gaub, "Single Molecule Force Spectroscopy of Spectrin Repeats: Low Unfolding Forces in Helix Bundles.," *Molecular Biology*, vol. 286, pp. 553-561, 1999.
- [188] M. Beyer, "The mechanical strength of a covalent bond calculated by density functional theory," *J. Chem. Phys.*, vol. in press, 2000.
- [189] F. Ziemann, J. Rädler, and E. Sackmann, "Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin. Networks using an oscillating magnetic bead micro-rheometer," *Biophys. J.*, vol. 66, pp. 2210-2216, 1994.
- [190] T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, "Behavior of supercoiled DNA," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 2016-2028, 1998.
- [191] E. Evans, K. Ritchie, and R. Merkel, "Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces," *Biophys. J.*, vol. 68, pp. 2580-2587, 1995.
- [192] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron, "DNA: an extensible molecule," *Science*, vol. 271, pp. 792-794, 1996.
- [193] M. P. Sheetz, "Laser tweezers in cell biology," in *Methods in cell biology*, vol. 55. New York: Academic Press, 1997.
- [194] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer, and H. Fuchs, "Kraftspektroskopie an molekularen systemen," *Angew. Chem*, vol. in press, 2000.
- [195] J. P. Cleveland, T. E. Schaeffer, and P. K. Hansma, "Probing oscillatory hydration potentials using thermal-mechanical noise in an atomic-force microscope," *Phys. Rev. B*, vol. 52, pp. R8692-8695, 1995.
- [196] M. Rief, "Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen", Dissertation, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians Universität, München, 1997.
- [197] F. Oesterhelt, D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub, and D. J. Müller, "Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins," *Science*, vol. in press.
- [198] T. Wandel, "Aufbau eines Rasterkraftmikroskops zur kombinierten Abbildung, Kraftspektroskopie, Kraftmanipulation und Leitfähigkeitsuntersuchung von isolierten Einzel-Molekülen", Diplomarbeit, Physik Department, Ludwig-Maximilians Universität, München, 1999.
- [199] P. J. Flory, *Statistical mechanics of chain molecules*. München: Hanser, 1988.
- [200] P. G. Gennes de, *Scaling concepts in polymer physics*. Ithaca, N.Y.: Cornell University Press, 1979.
- [201] M. Doi and S. F. Edwards, *The theory of polymer dynamics*. Oxford: Clarendon Press, 1995.
- [202] M. Doi, *Introduction to polymer physics*. Oxford: Clarendon Press, 1996.
- [203] O. Kratky and G. Porod, "Röntgenuntersuchungen gelöster Fadenmoleküle," *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, vol. 68, pp. 1106-1123, 1949.
- [204] M. Fixman and J. Kovac, "Polymer conformational statistics. III. Modified Gaussian models of stiff chains.," *Journal of Chemical Physics*, vol. 58, pp. 1564-1568, 1973.
- [205] J. Kovac and C. C. Crabb, "Modified Gaussian Model for Rubber Elasticity. 2. The Wormlike Chain," *Macromolecules*, vol. 15, pp. 537-541, 1982.
- [206] T. Odijk, "Stiff chains and filaments under tension," *Macromolecules*, vol. 28, pp. 7016-7018, 1995.
- [207] H. Lu, B. Isralewitz, A. Krammer, V. Vogel, and K. Schulten, "Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation," *Biophys. J.*, vol. 75, pp. 662-671, 1998.
- [208] J. F. Marko and E. D. Siggia, "Stretching DNA," *Macromolecules*, vol. 28, pp. 8759-8770, 1995.
- [209] J. F. Marko, "Stretching must twist DNA," *Europhys. Lett.*, vol. 38, pp. 183-188, 1997.
- [210] J. F. Marko, "DNA under high tension: overstretching, undertwisting and relaxation dynamics," *Phys. Rev. E*, vol. 57, pp. 2134-2149, 1998.
- [211] W. Brenig, *Statistische Theorie der Wärme*, 3 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- [212] R. Becker, *Theorie der Wärme*, 3 ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 1985.
- [213] D. Richter and T. Springer, "Physik der Polymere," in *IFF-Ferienkurse*, vol. 22. Jülich: Forschungszentrum Jülich GmbH, 1991.
- [214] L. D. Landau and E. M. Lifschitz, *Lehrbuch der theoretischen Physik*, vol. 7, 7 ed. Berlin: Akademie Verlag, 1991.

- [215] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith, "Entropic Elasticity of λ -Phage DNA," *Science*, vol. 265, pp. 1599-1600, 1994.
- [216] C. Bouchiat, M. D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette, "Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements," *Biophys. J.*, vol. 76, pp. 409-413, 1999.
- [217] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, and C. Bustamante, "Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, pp. 6185-6190, 1997.
- [218] H. Dautzenberg, W. Jaeger, J. Kötz, B. Philipp, C. Seidel, and D. Stscherbina, *Polyelectrolytes; formation, characterization and application*. München: Hanser, 1994.
- [219] M. Grosholz, "Kraftmikroskopuntersuchungen der Adsorptionskräfte von Polyelektrolyten auf geladenen Oberflächen", Diplomarbeit, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1999.
- [220] R. R. Netz and H. Orland, "Variational theory for a single polyelectrolyte chain," *Eur. Phys. J. B*, vol. 8, pp. 81-98, 1999.
- [221] C. Gerthsen, H. O. Kneser, and H. Vogel, *Physik*, 15 ed. Berlin: Springer, 1986.
- [222] K. Dransfeld and P. Kienle, *Physik II: Elektrodynamik*, 3 ed. München: Oldenbourg Verlag, 1989.
- [223] G. S. Manning, "Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties," *J. Chem. Phys.*, vol. 51, pp. 924-933, 1969.
- [224] a) T. Odijk, "Polyelectrolytes near the rod limit," *J. Polym. Sci. (Polym. Phys. Edn.)*, vol. 15, pp. 477-483, 1977; b) J. Skolnik and M. Fixman, "Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte," *Macromolecules*, vol. 10, pp. 944-948, 1977; c) T. Odijk and A. C. Houwaart, "On the theory of excluded-volume effect of a polyelectrolyte in a 1-1 electrolyte solution," *J. Polym. Sci. (Polym. Phys. Edn.)*, vol. 16, pp. 627-639, 1978.
- [225] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, "Stretching DNA with Optical Tweezers," *Biophys. J.*, vol. 72, pp. 1335-1346, 1997.
- [226] S. B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante, "Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules," *Science*, vol. 271, pp. 795-798, 1996.
- [227] D. Voet and J. Voet, *Biochemistry*. New York: Wiley, 1995.
- [228] A. Lebrun and R. Lavery, "Modelling extreme stretching of DNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 24, pp. 2260-2267, 1996.
- [229] M. W. Konrad and J. I. Bolonick, "Molecular dynamics simulation of DNA stretching is consistent with the tension observed for extension and strand separation and predicts a novel ladder structure," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, pp. 10989-10994, 1996.
- [230] K. M. Kosikov, A. A. Gorin, V. B. Zhurkin, and W. K. Olson, "DNA stretching and compression: large-scale simulations of double helical structures," *J. Mol. Biol.*, vol. 289, pp. 1301-1326, 1999.
- [231] W. K. Olson, K. M. Kosikov, A. Colasanti, A. A. Gorin, and V. B. Zhurkin, "Pulling and pushing the DNA double helix," presented at Biological Physics: Third International Symposium, 1999.
- [232] A. Ahsan, J. Rudnick, and R. Bruinsma, "Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 132-137, 1998.
- [233] F. Reif, *Fundamentals of statistical and thermal physics*. London: McGraw-Hill Book Company, 1985.
- [234] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette, "The elasticity of a single supercoiled DNA molecule," *Science*, vol. 271, pp. 1835-1837, 1996.
- [235] R. D. Kamien, T. C. Lubensky, P. Nelson, and C. S. O'Hern, "Direct determination of DNA twist-stretch coupling," *Eur. Phys. J.*, vol. B1, pp. 95-102, 1997.
- [236] P. Nelson, "New measurements of DNA twist elasticity," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 2501-2503, 1998.
- [237] J. F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J. F. Marko, "Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 83, pp. 1066-1069, 1999.
- [238] J. F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and V. Croquette, "Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, pp. 14152-14157, 1998.

- [239] L. Pauling and R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 39, pp. 84-97, 1953.
- [240] W. Saenger, *Principles of nucleic acid structure*. New York: Springer-Verlag, 1984.
- [241] G. M. Blackburn and M. J. Gait, *Nucleic acids in chemistry and biology*, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- [242] Z. Haijun, Z. Yang, and O.-Y. Zhong-can, "Bending and base-stacking interactions in double-stranded DNA," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 82, pp. 4560-4563, 1999.
- [243] V. A. Bloomfield, "Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism," *Biopolymers*, vol. 31, pp. 1471-1481, 1991.
- [244] V. A. Bloomfield, "DNA condensation by multivalent cations," *Biopolymers: Nucleic Acid Science*, 1998.
- [245] H. Li, M. Rief, F. Oesterhelt, and H. E. Gaub, "Single-molecule force spectroscopy on xanthan by AFM," *Adv. Mat.*, vol. 3, pp. 316-319, 1998.
- [246] H. Li, M. Rief, F. Oesterhelt, H. E. Gaub, X. Zhang, and J. Shen, "Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by AFM -Nanomechanical Fingerprint of α -(1,4) linked polysaccharides," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 305, pp. 197-201, 1999.
- [247] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, and H. E. Gaub, "Sequence dependent mechanics of single DNA molecules," *Biophys. J.*, vol. 76, pp. A151, 1999.
- [248] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub, "Sequence dependent mechanics of single DNA-molecules," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 6, pp. 346-349, 1999.
- [249] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub, "Mechanical stability of single DNA molecules," *Biophys. J.*, in press.
- [250] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, and L. A. Marky, "Predicting DNA duplex stability from the base sequence," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 83, pp. 3746-3750, 1986.
- [251] J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, and G. J. Thomas Jr., "DNA melting investigated by differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy," *Biophys. J.*, vol. 71, pp. 3350-3360, 1996.
- [252] K. J. Breslauer, "Extracting thermodynamic data from equilibrium melting curves for oligonucleotide order-disorder transitions," in *Energetics of biological macromolecules*, vol. 259, *Methods in enzymology*, M. L. Johnson and G. K. Ackers, Eds. San Diego: Academic Press, 1995, pp. 221-242.
- [253] C. Schildkraut and S. Lifson, "Dependence of the melting temperature of DNA on the salt concentration," *Biopolymers*, vol. 3, pp. 195-208, 1965.
- [254] D. Bensimon, A. J. Simon, V. Croquette, and A. Bensimon, "Stretching DNA with a Receding Meniscus: Experiments and Models," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 74, pp. 4754-4757, 1995.
- [255] C. Tolksdorf, "Mechanische Eigenschaften von DNS-Molekülen und von mit DNS wechselwirkenden Molekülen", Diplomarbeit, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians Universität, München, 1999.
- [256] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schäfer, and H.-J. Güntherodt, "Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 96, pp. 11277-82, 1999.
- [257] M. B. Hakim, S. M. Lindsay, and J. Powell, "The speed of sound in DNA," *Biopolymers*, vol. 23, pp. 1185-1192, 1984.
- [258] Yakushevich, *Nonlinear physics of DNA*. New York: J. Wiley & Sons, 1998.
- [259] D. A. Walters, J. P. Cleveland, N. H. Thomson, P. K. Hansma, M. A. Wendman, G. Gurley, and V. Elings, "Short cantilevers for atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 67, pp. 3583-3590, 1996.
- [260] D. A. Walters, M. Viani, G. T. Paloczi, T. E. Schäffer, J. P. Cleveland, M. A. Wendman, G. Gurley, V. Elings, and P. K. Hansma, "Atomic force microscopy using small cantilevers," *SPIE*, vol. 3009, pp. 43-47, 1997.
- [261] T. E. Schäffer, M. Viani, D. A. Walters, B. Drake, E. K. Runge, J. P. Cleveland, M. A. Wendman, and P. K. Hansma, "An atomic force microscope for small cantilevers," *SPIE*, vol. 3009, pp. 48-52, 1997.
- [262] E. Evans and K. Ritchie, "Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds," *Biophysical Journal*, vol. 72, pp. 1541-1555, 1997.
- [263] P. Hänggi, P. Talkner, and M. Borkovec, "Reaction-rate theory: fifty years after Kramers," *Reviews of Modern Physics*, vol. 62, pp. 251-341, 1990.
- [264] L. H. Pope, M. C. Davies, C. A. Laughton, C. J. Roberts, S. J. Tendler, and P. M. Williams, "Force-induced melting of a short DNA double helix," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. submitted.

- [265] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot, "Molecular Stick-Slip Motion Revealed by Opening DNA with Piconewton Forces," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 79, pp. 4489-4492, 1997.
- [266] T. Dauxois, M. Peyrard, and A. R. Bishop, "Entropy-driven DNA denaturation," *Phys. Rev. E*, vol. 47, pp. R44-R47, 1993.
- [267] T. Dauxois, M. Peyrard, and A. R. Bishop, "Dynamics and thermodynamics of a non-linear model for DNA denaturation," *Phys. Rev. E*, vol. 47, pp. 684-695, 1993.
- [268] T. Dauxois and M. Peyrard, "Entropy-driven transition in a one dimensional system," *Phys. Rev. E*, vol. 51, pp. 4027-4040, 1995.
- [269] A. Campa and A. Giansanti, "Experimental test of the Peyrard-Bishop model applied to the melting of very short DNA chains," *Phys. Rev. E*, vol. 58, pp. 3585-3588, 1998.
- [270] A. K. Wehle, "Messung von Bindungskräften an Rezeptor-Ligand-Paaren", Diplomarbeit, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians Universität, München, 1999.
- [271] T. L. James, "Relaxation behavior of nucleic acids: dynamics and structure," in *Phosphorus-31 NMR*, J. Gorenstein, Ed. San Diego: Academic Press, 1984, pp. 349-400.
- [272] J. F. Léger, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J. F. Marko, "RecA binding to a single double-stranded DNA molecule: A possible role of DNA conformational fluctuations," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, pp. 12295-12299, 1998.
- [273] M. Hegner, S. B. Smith, and C. Bustamante, "Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. in press, 1999.
- [274] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot, "Mechanical separation of the complementary strands of DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, pp. 11935-11940, 1997.
- [275] U. Bockelmann, F. Essevaz-Roulet, and F. Heslot, "DNA strand separation studied by single molecule force measurements," *Phys. Rev. E*, vol. 58, pp. 2386-2394, 1998.
- [276] M. Radmacher, "Spontane Bildung von planaren Bilayern auf Festkörperoberflächen aus der Vesikelphase", Diplomarbeit, Physik Department, Technische Universität München, Garching, 1990.
- [277] F. Ohnesorge and G. Binnig, "True atomic resolution by AFM," *Science*, vol. 260, pp. 1451-1456, 1993.
- [278] R. W. Tillmann, "Untersuchung zur Struktur von polymeren Lanmuir-Blodgett-Schichten mit Hilfe der Kraftmikroskopie", Doktorarbeit, Physik Department, Technische Universität München, Garching, 1993.
- [279] U. Hofmann, "Untersuchungen an polymerisierbaren, geladenen Diacetylen-Lipiden an der Wasser/Luft-Grenzfläche", Diplomarbeit, Physik Department, Technische Universität München, Garching, 1993.
- [280] C. A. J. Putman, K. O. Werf van der, B. G. Grooth de, N. F. Hulst van, J. Greve, and P. K. Hansma, "A new imaging mode in atomic force microscopy based on the error signal," presented at Proc. SPIE, 1992.
- [281] M. Fritz, "Struktur und Dynamik menschlicher Thrombozyten - eine Untersuchung mit Hilfe der Kraftmikroskopie", Doktorarbeit, Physik Department, Technische Universität München, Garching, 1993.
- [282] C. Rotsch, "Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen mit dem Rasterkraftmikroskop", Doktorarbeit, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1999.
- [283] M. Benoit, "Die supramolekulare Struktur von Nematocysten", Diplomarbeit, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians Universität, München, 1994.
- [284] M. Benoit, T. Holstein, and H. E. Gaub, "Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles," *European Biophysical Journal*, vol. 26, pp. 283-290, 1997.
- [285] H. G. Hansma, J. Vesenka, G. Kelderman, H. Morrett, R. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, and P. K. Hansma, "Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the AFM," *Science*, vol. 256, pp. 1180-1184, 1992.
- [286] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, and V. Elinggs, "Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy," *Surf. Sci. Lett.*, vol. 290, pp. L688, 1993.
- [287] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, and V.

- Elings, "Tapping mode atomic force microscopy in liquids," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 64, pp. 1738-1740, 1994.
- [288] C. A. J. Putman, K. O. van der Werf, B. G. De Groot, N. F. Van Hulst, and J. Greve, "Tapping mode atomic force microscopy in liquid," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 64, pp. 2454-2456, 1994.
- [289] J. Chen, R. K. Workman, D. Sarid, and R. Höper, "Numerical simulations of a scanning force microscope with a large-amplitude vibrating cantilever," *Nanotechnology*, vol. 5, pp. 199 - 204, 1994.
- [290] J. P. Spatz, S. Sheiko, M. Möller, R. G. Winkler, P. Reineker, and O. Marti, "Forces affecting the substrate in resonant tapping force microscopy," *Nanotechnology*, vol. 6, pp. 40-44, 1995.
- [291] S. N. Mangonov, V. Elings, and M.-H. Whangbo, "Phase imaging and stiffness in atomic force microscopy," *Surface Science*, vol. 375, pp. L385-L391, 1997.
- [292] J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid, and V. B. Elings, "Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 72, pp. 2613-2615, 1998.
- [293] H. G. Hansma, D. E. Laney, M. Bezanilla, R. L. Sinsheimer, and P. K. Hansma, "Applications for atomic force microscopy of DNA," *Biophys. J.*, vol. 68, pp. 1672-1677, 1995.
- [294] M. Fritz, M. Radmacher, J. P. Cleveland, M. W. Allersma, R. J. Stewart, R. Gieselmann, P. Janmey, C. Schmidt, and P. K. Hansma, "Imaging globular and filamentous proteins in physiological buffer solution with tapping mode atomic force microscopy," *Langmuir*, vol. 11, pp. 3529-3535, 1995.
- [295] Clausen-Schaumann, "Polyelektrolytadsorption an polyelektrolyten Grenzflächen", Diplomarbeit, Physik Department, Technische Universität München, Garching, 1996.
- [296] F. A. Schabert and J. P. Rabe, "Vertical dimension of hydrated biological samples in tapping mode scanning force microscopy," *Biophys. J.*, vol. 70, pp. 1514-1520, 1996.
- [297] T. R. Albrecht, S. Akamine, T. E. Larver, and C. F. Quate, "Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope," *J. Vac. Sci. Tech.*, vol. A8, pp. 3386-3396, 1990.
- [298] W. Hollemann, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101. ed. Berlin: Walter de Gruyter, 1995.
- [299] L. Wilhelm, *Ann. Physik*, vol. 119, pp. 177-217, 1893.
- [300] J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, and P. K. Hansma, "A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 64, pp. 403-405, 1993.
- [301] H.-J. Butt and M. Jaschke, "Calculation of thermal noise in atomic force microscopy," *Nanotechnology*, vol. 6, pp. 1-7, 1995.
- [302] M. Rief, "Kräfte in der molekularen Erkennung", Diplomarbeit, Physik-Department, Technische Universität München, Garching, 1995.
- [303] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [304] A. D. Miller, "Kationische Liposomen für die Gentherapie," *Angew. Chem.*, vol. 110, pp. 1862-1880, 1998.
- [305] H. E. Gaub, R. Büschl, H. Ringsdorf, and E. Sackmann, "Phase transitions, lateral phase separation and microstructure of model membranes composed of a polymerizable two-chain lipid and dimyristoylphosphatidylcholine," *Chem. & Phys. of Lipids*, vol. 37, pp. 19-43, 1985.
- [306] P. G. Scherer and J. Seelig, "Electric charge effects on phospholipid headgroups: phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles," *Biochemistry*, vol. 28, pp. 7720-7728, 1989.
- [307] J. R. Silvius, "Anomalous mixing of zwitterionic and anionic phospholipids with double-chain amphiphiles in lipid bilayers," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1070, pp. 51-59, 1991.
- [308] A. Weisenhorn, M. Egger, F. Ohnesorge, S. A. C. Gould, S. P. Heyn, H. G. Hansma, R. L. Sinsheimer, H. E. Gaub, and P. Hansma, "Molecular resolution images of Langmuir Blodgett films and DNA by atomic force microscopy," *Langmuir*, vol. 7, pp. 8-12, 1991.
- [309] F. M. Linseisen, B. S., and T. Bayerl, "²H-NMR and DSC study of DPPC-DODAB mixtures," *Chem. Phys. Lip.*, vol. 83, pp. 9-23, 1996.

- [310] R. Zantl, L. Baicu, F. Artzner, I. Sprenger, G. Rapp, and J. O. Rädler, "Thermotropic phase behavior of cationic lipid-DNA complexes compared to binary lipid mixtures," *J. Phys. Chem.*, vol. in press.
- [311] J. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, and C. Safinya, "Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes," *Science*, vol. 275, pp. 810-814, 1997.
- [312] T. Salditt, I. Koltover, J. O. Rädler, and C. R. Safinya, "Two-dimensional smectic ordering of linear DNA chains in self-assembled DNA-cationic liposome mixtures," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 79, pp. 2582-2585, 1997.
- [313] T. Salditt, I. Koltover, J. O. Rädler, and C. R. Safinya, "Self-assembled DNA-cationic liposome complexes: two-dimensional smectic ordering, correlations, and interactions," *Phys. Rev. E*, vol. 58, pp. 889-904, 1998.
- [314] J. Mou, D. M. Czajkowsky, Y. Zhang, and Z. Shao, "High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix," *FEBS Letters*, vol. 371, pp. 279-282, 1995.
- [315] Y. Fang and J. Yang, "Two-dimensional condensation of DNA molecules on cationic lipid membranes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, pp. 441-449, 1997.
- [316] Y. Fang and J. Yang, "Effect of cationic strength and species on 2-D condensation of DNA," *J. Phys. Chem.*, vol. 101, pp. 3453-3456, 1997.
- [317] R. Bruinsma, "Electrostatics of DNA-cationic lipid complexes: isoelectric instability," *Eur. Phys. J. B*, vol. 4, pp. 75-88, 1998.
- [318] R. Bruinsma and J. Mashl, "Long-range electrostatic interaction in DNA-cationic lipid complexes," *Europhys. Lett.*, vol. 41, pp. 165-170, 1998.
- [319] C. H. Spink and J. B. Chaires, "Thermodynamics of the binding of a cationic lipid to DNA," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, pp. 10920-10928, 1997.
- [320] A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, R. S. Maxwell, D. Margolese, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, and B. F. Chmelka, "Cooperative formation of inorganic-organic interfaces in the synthesis of silicate mesostructures," *Science*, vol. 261, pp. 1299, 1993.
- [321] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petro, F. Schüth, and G. D. Stucky, "Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials," *Nature*, vol. 368, pp. 317-321, 1994.
- [322] G. D. Stucky, A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Margolese, D. Kumar, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, and B. F. Chmelk, "Molecular and atomic arrays in nano- and mesoporous materials synthesis," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 240, pp. 187, 1994.
- [323] M. Hetzer, S. Bayerl, X. Camps, O. Vostrowsky, A. Hirsch, and T. M. Bayerl, "Fullerenes in membranes: structural and dynamic effects of lipophilic C60 derivatives in phospholipid bilayers," *Adv. Mat.*, vol. 9, pp. 913, 1997.
- [324] M. Hetzer, T. Gutberlet, M. F. Brown, X. Camps, O. Vostrowsky, H. Schönberger, A. Hirsch, and T. M. Bayerl, "Thermotropic behavior of lipophilic derivatized Fullerenes studied by deuterium NMR, X-ray diffraction and microcalorimetry," *J. Phys. Chem.*, vol. 103, pp. 637-642, 1999.
- [325] M. Hetzer, H. Clausen-Schaumann, S. Bayerl, T. M. Bayerl, X. Camps, O. Vostrowsky, and A. Hirsch, "Nanosphären aus polymerisierbaren Lipofullererenen," *Angew. Chem.*, vol. 111, pp. 2103-2106, 1999.
- [326] R. Krautbauer, "DNS als organisches Templat zur Ausbildung metallischer Nanodrähte", Diplomarbeit, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1999.
- [327] G. J. Wuite, S. B. Smith, M. Young, D. Keller, and C. Bustamante, "Single molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity," *Nature*, vol. 404, pp. 103-106, 2000.
- [328] R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, R. Wahl, G. Sadowski, K. J. Böhm, and E. Unger, "Three-dimensional metallization of microtubules," *Thin Solid Films*, vol. 305, pp. 248-253, 1997.
- [329] J. Richter, R. Seidel, R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, J. Plaschke, and H. K. Schackert, "Nanoscale palladium metallization of DNA," *Preprint*, 1999.
- [330] R. Krautbauer, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub, "Anticancer drug cisplatin changes the mechanics of single DNA-molecules," *Angew. Chem.*, vol. submitted.

- [331] Y. Z. Chen, Y. Zhang, and E. W. Prohofsky, "Binding stability of a cross-linked drug: Calculation of an anticancer drug cisplatin-DNA complex," *Phys. Rev. E*, vol. 55, pp. 5543-5548, 1997.

Anhang

Inhalt:

ANHANG A MATERIALIEN UND METHODEN	1
Betriebsmodi des Rasterkraftmikroskops	1
Verwendete Abtastfedern und Spitzen	3
Vesikelspreitung	4
Filmwaagenbeschichtung	5
Zweidimensionale Druck-Flächen-Diagramme von Lipidmonoschichten	6
Kovalente Ankopplung von Phospholipase und Bindungskräfte an das Substrat	8
Aufbau des Kraftspektrometers	10
Bestimmung der Federkonstante	10
Präparation der DNA-Proben	11
ANHANG B ZUSTANDSSUMME UND ELASTIZITÄT DER FREIEN KETTE MIT ÄUßERER KRAFT	13
ANHANG C STRUKTUR- UND THERMODYNAMISCHE DATEN VON DNA	14
ANHANG D DNA-NANOSTRUKTUREN AUF KATIONISCHEN LIPIDMEMBRANEN	16
ANHANG E LIPIDE ALS TEMPLATE ZUM AUFBAU VON NANOSTRUKTUREN MIT NEUEN MATERIALEIGENSCHAFTEN	19
ANHANG F ELASTIZITÄT VON KOVALENT GESCHLOSSENER PLASMID-DNA	21
ANHANG G ÄNDERUNGEN DER DNA-MECHANIK DURCH CISPLATIN	22

Anhang A Materialien und Methoden

Betriebsmodi des Rasterkraftmikroskops

Modus konstanter Höhe

Beim Modus konstanter Höhe, auch als *Auslenkungsmodus* (engl. *constant height mode* oder *deflection mode*) bezeichnet, wird die Probe mit Hilfe des Piezos nur in horizontaler Richtung bewegt, während die vertikale Position — meist mit z bezeichnet — konstant gehalten wird. Die durch die Proben topographie hervorgerufenen und in der Photodiode detektierten Auslenkungen der Blattfeder werden unmittelbar als Meßsignal verwendet, in einem Meßrechner gespeichert und z. B. als Grauwerte an einem Monitor dargestellt. Die Vorteile dieses Abbildungsmodus gegenüber den im folgenden beschriebenen Modi liegen zum einen in seiner sehr hohen Empfindlichkeit. So ist es etwa möglich, auf Kristalloberflächen atomare Auflösung zu erzielen. Zum anderen lassen sich sehr hohe Rastergeschwindigkeiten realisieren. Da bei größeren Auslenkungen der Blattfeder jedoch hohe Kräfte auf die Probe wirken, eignet sich diese Methode nur für sehr flache und feste Proben [276-279].

Modus konstanter Kraft

Beim Modus konstanter Kraft wird mittels einer Nachregelung die Höhe der Probe mit Hilfe des Piezos so eingestellt, daß die Auslenkung der Blattfeder und damit auch die Auflagekraft der Spitze konstant gehalten wird (engl. *constant force mode*). Als Meßsignal wird in diesem Fall die am z -Piezo angelegte Spannung aufgezeichnet, die proportional zur Höhe der Probe ist. Diese Methode erlaubt es auch hohe Strukturen mit dem Rasterkraftmikroskop abzubilden. Außerdem können die auf die Probe wirkenden Kräfte minimal gehalten werden, was insbesondere bei weichen biologischen Proben von Bedeutung ist. Allerdings lassen sich mit diesem Modus in der Regel nicht so hohe Rastergeschwindigkeiten realisieren, wie im oben beschriebenen Modus konstanter Höhe, da das nachgeregelter System leicht zu schwingen beginnt und damit die niedrigste Resonanzfrequenz des Gesamtsystems die Nachregelgeschwindigkeit begrenzt [104].

Kombinierter Nachregel- /Auslenkungsmodus

Schließlich lassen sich die beiden oben beschriebenen Betriebsmodi auch kombinieren, indem so schnell gerastert wird, daß die Nachregelung nur den groben Strukturen der Probe folgen kann [280, 281]: Aufgezeichnet werden dabei sowohl das Nachregelsignal, das die grobe Struktur der Probe wiedergibt, als auch die Federauslenkung, die die feinen Strukturen wiedergibt. Mit dieser Methode können sowohl grobe, wie auch feine Strukturen von großen Objekten, wie zum Beispiel Zellen, bei vergleichsweise hoher Rastergeschwindigkeit aufgelöst werden [97, 282].

Der Tapping Modus

Bei den bisher besprochenen Betriebsmodi wirken selbst bei minimaler Auflagekraft der Spitze oft hohe laterale Kräfte zwischen Spitze und Probe. So beträgt die Lateralkraft, bis zum 40-fachen der Auflagekraft [283, 284]. Selbst bei minimalen Auflagekräften um die 50 pN betragen¹ die Lateralkräfte also bis zu einigen tausend pN. Das kann dazu führen, daß die Probe lateral auf dem Substrat verschoben wird und kein Abbilden mehr möglich ist, oder daß die Probe von der Spitze zerschnitten wird [64, 285].

Ein wesentlicher Durchbruch bei der Verringerung der Lateralkräfte zwischen Spitze und Probe ist 1993/94 mit Entwicklung des Tapping-Modus [286-288] gelungen. Bei diesem Abbildungsmodus wird die Blattfeder zu einer Schwingung mit einer Frequenz Ω — oft eine Frequenz nahe der ersten Resonanz Ω_0 der freien Blattfeder — und einer Amplitude von einigen 10 nm angeregt. Die Spitze berührt die Probe dabei idealerweise nur in einem kleinen Bereich dieser Oszillation. Die Wechselwirkung der Spitze mit der Probe führt zu einer effektiven Resonanzfrequenz Ω' des Gesamtsystems Feder-Spitze-Probe, die sich im allgemeinen von der Resonanzfrequenz Ω_0 der freien Spitze unterscheidet. Meist wird die Oszillation durch die Wechselwirkung mit der Probe auch gedämpft, was neben der Verschiebung der Resonanzfrequenz zu einer Verringerung der Oszillationsamplitude führt [39, 261, 289-292]. Die Änderung der Oszillationsamplitude der Blattfeder bei vorgegebener

¹ Die thermischen Fluktuationen der weichsten kommerziell erhältlichen Federn liegen bei 10-20 pN (peak to peak).

Anregungsfrequenz Ω ist also ein Maß für die Intensität der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe und erlaubt somit ein Abtasten der Proben topographie. Wie bei den oben beschriebenen Abbildungsmodi, die zur Unterscheidung vom Tapping-Modus auch als Kontaktmodi bezeichnet werden, kann auch hier wieder ohne Nachregelung abgebildet und analog zur Federverbiegung beim Modus konstanter Höhe die Oszillationsamplitude direkt als Meßsignal verwendet werden. Alternativ kann auf eine konstante Oszillationsamplitude nachgeregelt werden und wie beim Modus konstanter Auslenkung das Nachregelsignal, also die Höhe des z -Piezos, als Meßsignal verwendet werden. In der Praxis findet meist die nachgeregelt Variante Verwendung, da der Tapping-Modus in der Regel eingesetzt wird, um eine Beeinträchtigung der Probe beim Abbilden zu minimieren [100, 123, 293-296].

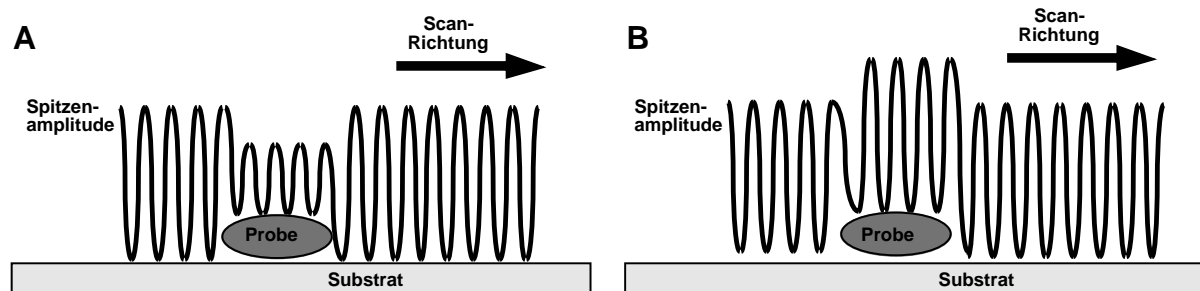


Abbildung A.1 Schematische Darstellung des Tapping-Modus (A) ohne Nachregelung und (B) mit Nachregelung auf konstante Amplitude.

Verwendete Abtastfedern und Spitzen

In der Rasterkraftmikroskopie und der auf dem Kraftmikroskop basierenden Kraftspektroskopie werden meist Abtastfedern und Spitzen aus Silizium oder Siliziumnitrid verwendet, die aus einem Stück hergestellt sind; man spricht auch von *integrierten Spitzen*. Typische Abtastfedern sind etwa 1 μm dick, einige Micrometer breit und etwa 100 μm bis 200 μm lang [297]. Die Spitzen sind einige Micrometer lang und haben am Ende Krümmungsradien von wenigen Nanometern. Zur Erhöhung der Reflektivität sind die Federn auf der Rückseite meist mit Gold beschichtet. Die Federkonstanten reichen je nach Anwendungsgebiet von etwa 10 mN/m bis zu einigen N/m und die entsprechenden Resonanzfrequenzen liegen zwischen 1 kHz und einigen hundert kHz.

Für die Untersuchungen an binären Lipidmischungen und die enzymverstärkte Strukturierung von DPPC wurden Siliziumnitrid-Federn und Spitzen (DNP-S-TT) von Digital Instruments (Mannheim) mit einer nominellen Federkonstante von 30 mN/m verwendet. Für die zur Strukturierung verwendeten Federn wurden die Federkonstanten individuell über deren thermische Rauschamplitude ermittelt (siehe unten).

Der in Abb. 4.5 gezeigte enzymatische Abbau von DPPC wurde mit einer von M. Benoit hergestellten Kontaminationsspitze (EBD-Spitze; vgl. [11, 12]) an einer Siliziumnitrid-Feder (35 mN/m) untersucht.

Für die kraftspektroskopischen Untersuchungen wurden Siliziumnitrid-Federn und Spitzen (Sharp Microlevers; nominelle Federkonstante 10 mN/m) von Park Scientific Instruments (Sunnyvale CA, USA) verwendet. Für die Messungen bei 40-60°C wurde die reflektierende Goldschicht mit Königswasser [298] von den Federn geätzt und anschließend mit einer geeigneten Blende eine 10 nm dicke Goldschicht auf die vordersten 10 µm der Feder aufgedampft, um die Temperaturdrift der Federn zu reduzieren. Alle Federkonstanten wurden individuell aus dem thermischen Rauschen bestimmt (siehe unten).

Vesikelspreitung

Zur Herstellung von festkörpergestützten Lipiddoppelschichten mittels Spreitung aus der Vesikelphase wurde 1 mg der lyophilisierten Lipide² in 0,5 ml Chloroform (HPLC-Grade; Sigma, Deisenhofen) gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter Stickstoffzugabe verdampft und die Lipide in einem Glaskolben im Vakuum ($P \approx 10^{-3}$ mbar) getrocknet. (Um die Löslichkeit ionischer Lipide zu erhöhen wurden 10% Ethanol (HPLC-Grade; Sigma, Deisenhofen) zum Lösungsmittel dazugegeben. Anschließend wurden die Lipide in 5 ml deionisiertem Wasser ($\rho=18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$, $\pi=71 \text{ mN/m}$; Mili-Q Plus, Milipore Systems, Moselheim, Fr.) rehydriert, ca. 5-10°C über die Hauptphasenumwandlungstemperatur der Lipide bzw. Lipidmischungen erwärmt (vgl. Tabelle A.1) und für ca. 30 sec in einem Ultraschallgenerator (Bandelin, Berlin) beschallt. Die Suspension wurde dann bis auf eine

² Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lipide stammen von Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA.

Lipidkonzentration von 2 mg/ml-100 mg/ml, je nach gewünschtem Bedeckungsgrad, verdünnt³ und 300 µl der Suspension auf einer frisch gespaltenen Glimmerscheibe mit 15 mm Durchmesser (Plano, Wetzlar) inkubiert. Falls eine möglichst vollständige Bedeckung des Substrats mit Lipiden benötigt wurde, wurde die Probe während der Inkubation mit Lipiden über die Hauptphasenumwandlungstemperatur aufgeheizt. Anschließend wurden die Proben mit deionisiertem Wasser gespült, um nicht adsorbierte Lipide zu entfernen und in die Meßzelle des Rasterkraftmikroskops eingebaut.

Tabelle A.1 Temperatur der Hauptphasenumwandlung (Kettenschmelztemperatur) einiger Diacyl-Phosphatidylcholine nach [154].

<i>1,2-Glycero-</i>	<i>T[°C]</i>
C14:0/C14:0 (DMPC)	23,5
C16:0/C16:0 (DPPC)	41,5
C18:0/C18:0 (DSPC)	55,5
C20:0/C20:0 (DAPC)	66
C22:0/C22:0 (DBPC)	75

Filmwaagenbeschichtung

Sämtliche in Abschnitt 4.2 gezeigten Lipiddoppelschichten wurden in einer temperierbaren Beschichtungsfilmwaage (Troggröße: 450 mm x 90 mm x 5 mm) mit Tauchbecken (50 mm x 40 mm x 50 mm) und positionierbarem Lift (vgl. Abbildung A.1) mit einem kombinierten *Langmuir-Blodgett / Langmuir-Schäfer* Verfahren (vgl. auch Abschnitt 3.2, sowie [127]) auf frisch gespaltenen Glimmersubstrate (Plano, Wetzlar) übertragen. Die Lipide wurden dazu in Chloroform (HPLC-Grade; Sigma, Deisenhofen) gelöst (2 mg/ml) und aus der Chloroformlösung auf der Wasser-/Luft-Grenzfläche gespreitet. Nach dem Verdampfen des Chloroforms (ca. 2-3 min. nach dem Spreiten) wurden die Lipide bis auf den Transferdruck (35 mN/m, außer bei der in Abschnitt 4.2.1.2 gezeigten Membran) komprimiert und eine erste Lipidmonolage mittels vertikalen Transfers (Transfergeschwindigkeit 50 µm/s) auf das

³ Bei zu hohen Lipidkonzentrationen und ungeladenen Lipiden können so auch Lipidmultischichten entstehen.

Substrat übertragen. Die Barrierenposition wurde dabei so nachgeregelt, daß der Lateraldruck in der Lipidmonoschicht zu jedem Zeitpunkt konstant blieb. Das Transferverhältnis⁴ wurde zu einer ersten Kontrolle der Übertragungsqualität herangezogen. Nachdem die erste Monolage 15 min. an Luft getrocknet wurde, wurde die zweite Lipidmonolage durch horizontales Tauchen der Probe übertragen. Die Oberflächenspannung war dabei dieselbe wie beim ersten Transfer. Sowohl die Subphasentemperatur, als auch die Umgebungstemperatur betrug für beide Transfers 25°C.

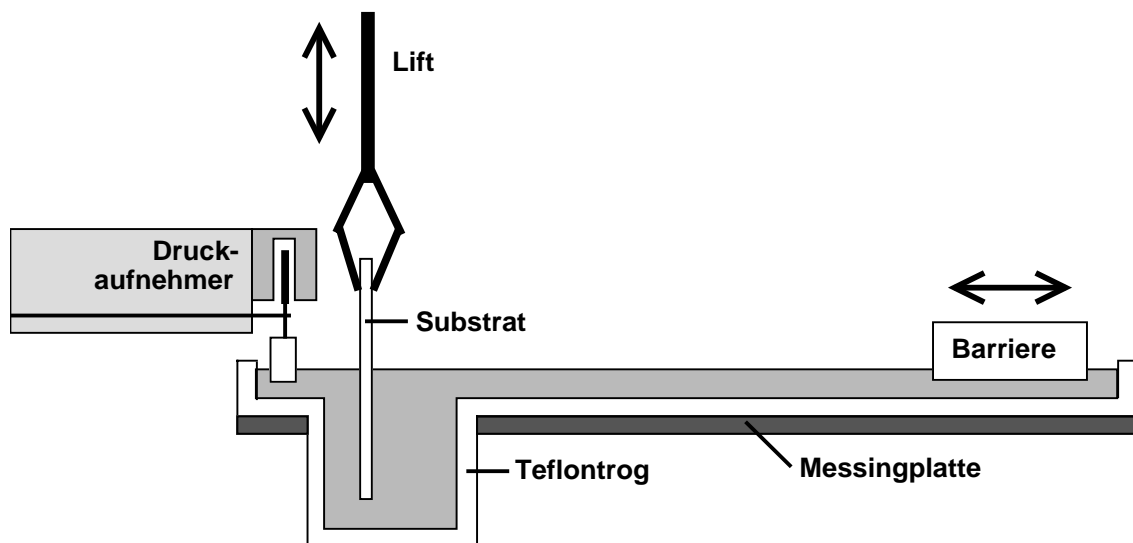


Abbildung A.1 Schematischer Aufbau der zur Präparation von festkörpergestützten Lipidmembranen verwendeten Beschichtungsfilmwaage.

Zweidimensionale Druck-Flächen-Diagramme von Lipidmonoschichten

Mit Hilfe einer Filmwaage können nicht nur Monolagen amphiphiler Moleküle auf ein Substrat übertragen werden, sondern es lassen sich auch zahlreiche Informationen über das Packungsverhalten und die laterale Ordnung in der Monoschicht gewinnen [131]. Der Transferdruck kann dann so gewählt werden, daß die Lipide beim Übertrag auf das Substrat in einer gewünschten Konformation vorliegen.

⁴ Das Transferverhältnis ergibt sich aus: $(\text{Trogbreite} \times \text{Barrierengeschwindigkeit}) / (2 \times \text{Substratbreite} \times \text{Transfergeschwindigkeit})$

Die Reduktion der Oberflächenspannung γ des Wassers durch die Lipidschicht kann anschaulich als lateraler Druck π der Lipide in der Grenzfläche interpretiert werden:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma. \quad (\text{A.1})$$

Dabei ist γ_0 die Oberflächenspannung von reinem Wasser und beträgt 71 mN/m, γ ist die reduzierte Oberflächenspannung von mit Lipiden bedecktem Wasser. Die Oberflächenspannung sinkt mit steigender Lipidkonzentration. π läßt sich mit einem *Wilhelmsystem*, einem teilweise in die Flüssigkeit eingetauchten und an einer Waage befestigtem Filterpapier, auf einfache Weise messen [299]. Für die Kraft, mit der ein benetztes Filterpapier aufgrund der Oberflächenspannung in eine Flüssigkeit gezogen wird, gilt:

$$F = 2b\gamma \quad (\text{A.2})$$

Dabei ist b die Breite des Filterpapiers⁵. Analog zu dreidimensionalen Systemen können die Lipide in der Grenzfläche, abhängig von Konzentration und Temperatur, in verschiedenen Phasen vorliegen. Bei sehr geringer Lipidkonzentration wechselwirken die einzelnen Lipide praktisch nicht miteinander. Man spricht deshalb von einer gasanalogen Phase.

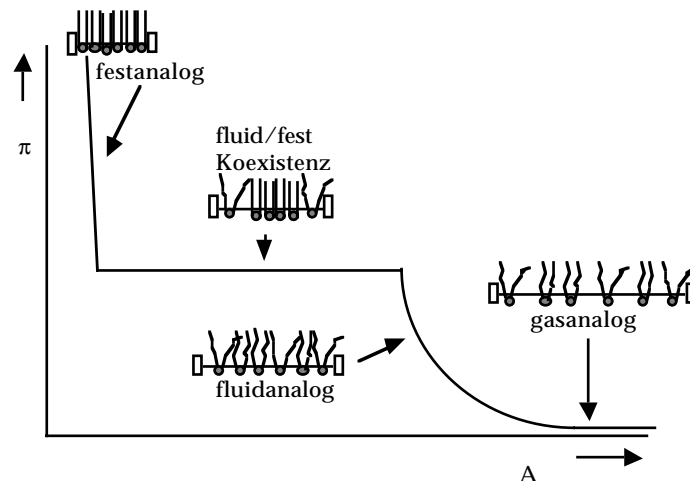


Abbildung A.2 Schematische Isotherme einer Lipidmonolage. π bezeichnet den Lateraldruck, A die zur Verfügung stehende Fläche.

⁵ Der Faktor 2 kommt durch die zweite Seite des Filterpapiers zustande.

Mit zunehmender Lipidkonzentration treten die Lipide miteinander in Wechselwirkung und der Lateraldruck π beginnt zu steigen. Man spricht jetzt von der flüssiganalogen Phase. Bei weiter zunehmender Konzentration beginnen die Lipide sich zu zweidimensionalen Kristallen zu ordnen; man spricht von der festanalogen oder kristallinen Phase. Bei noch höherem Lateraldruck kann es dann noch zu Umlagerungen der Lipide in den Kristalliten kommen. Anhand eines Druck-Flächen-Diagrammes (vgl. Abbildung A.2) läßt sich also sehr genau feststellen, wie die Lipide in der Membran gepackt sind, so daß dann ein geeigneter Transferdruck für den Übertrag auf ein Festkörpersubstrat gewählt werden kann.

Kovalente Ankopplung von Phospholipase und Bindungskräfte an das Substrat⁶

Zur kovalenten Ankopplung von Phospholipase an die Kraftmikroskopspitzen wurden die Siliziumnitrid-Spitzen (Microlevers, Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA, USA) zunächst mit N'-[3-(Trimethoxysilyl)-Propyl]-Diethylentriamin (DETA) von Aldrich (Deisenhofen) beschichtet. Dabei hat sich gezeigt, daß die üblicherweise zur Beschichtung glatter Oberflächen mit DETA verwendeten Protokolle, bei denen die Silanolgruppen zunächst in saurer Lösung hydrolysiert werden [294], für die Beschichtung von Kraftmikroskopspitzen mit ihren kleinen Krümmungsradien nicht geeignet sind. Bei der hier verwendeten Silanisierung wurden die Spitzen deshalb 10 min. direkt in auf 80°C erwärmtes DETA getaucht und anschließend überschüssiges Aminosilan in 70% Ethanol (HPLC-Grade; Sigma, Deisenhofen) / Wasser entfernt. Anschließend wurden die Spitzen 15 min. in 80°C warmes deionisiertes Wasser ($\rho=18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$, $\pi=71 \text{ mN/m}$; Mili-Q Plus, Milipore Systems, Moselheim, Fr.) gelegt und danach bei 120°C an Luft getrocknet (ca. 15 min.).

Im nächsten Schritt wurde dann das Enzym über ein Polymer an die Spitze angebunden. Dazu wurden 50 mg/ml Carboxymethylamylose in Phosphatpuffer (137 mM NaCl, 10 mM H₃PO₄ (pH 7,4), 2,7 mM KCl) mit 10 mg/ml N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 50 mg/ml 1-Ethyl-3-

⁶ Die hier vorgestellte kovalente Ankopplung von Phospholipase wurde zusammen mit Dr. M. Grandbois (Univ. of Missouri, Columbus, MO, USA) und Dipl. Chem L. Nielsen-Kildemark (Tech. Univ. of Denmark, Lyngby, Dänemark) entwickelt. Die gezeigten Experimente (Abbildung A.3) wurden von L. Nielsen-Kildemark durchgeführt.

(3-Dimethylaminopropyl)-Carboimid (EDC) aktiviert und die Spitze 10 min. mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Spitze für eine Stunde mit Phospholipase (100 µg/ml) inkubiert und danach 24 Stunden mit deionisiertem Wasser gespült (alle Substanzen von Sigma, Deisenhofen).

Es konnte gezeigt werden, daß diese Ankopplung bei Kraftladungsraten von 10 nN/s mit Kräften bis zu 2 nN belastet werden kann, bevor die Silizium-Kohlenstoff-Bindung des Silans als schwächste Bindung in dieser Ankopplung reißt [64]. Ferner konnte gezeigt werden, daß die auf diese Weise kovalent an die Spitze des Kraftmikroskops gekoppelte Phospholipase nach wie vor enzymatisch aktiv ist und geeignete Substrate erkennen und daran binden kann. So bindet das Enzym beispielsweise an DMPC-Membranen in der Hauptphasenumwandlung (23°C) mit Kräften von ca. 25-30 pN, während es an das bei gleicher Temperatur kristalline DPPC nicht binden kann (vgl. Abbildung A.3).

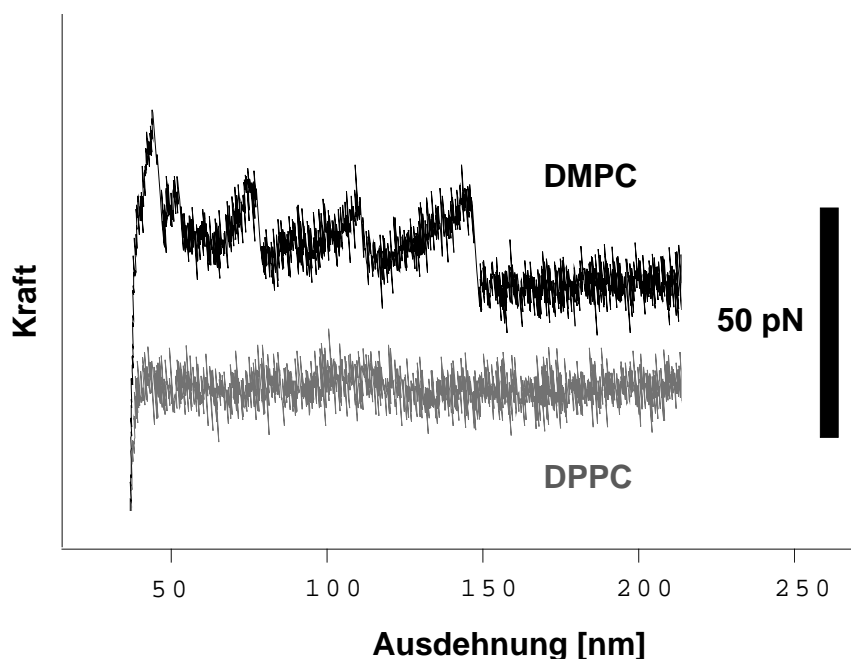


Abbildung A.3 Kraftkurve einer mit Carboxymethylamylose und PLA2 funktionalisierten Spitze auf einer festkörpergestützten DMPC-Membran (schwarze Kurve) und einer DPPC-Membran (graue Kurve) bei 23°C. Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8,9), 5 mM CaCl₂. (Daten: Lars Nielsen-Kildemark.)

Auch in ersten Strukturierungsexperimenten mit den mit Phospholipase funktionalisierten Spitzen hat sich gezeigt, daß die an die Spitze gebundenen Moleküle vermutlich noch

enzymatisch aktiv sind. Allerdings erschwert hier die trotz intensiven Spülens nach wie vor vorhandene unkontrollierte Membranhydrolyse eine eindeutige Zuordnung der Hydrolyse zu den tatsächlich kovalent gebundenen Enzymen.

Aufbau des Kraftspektrometers

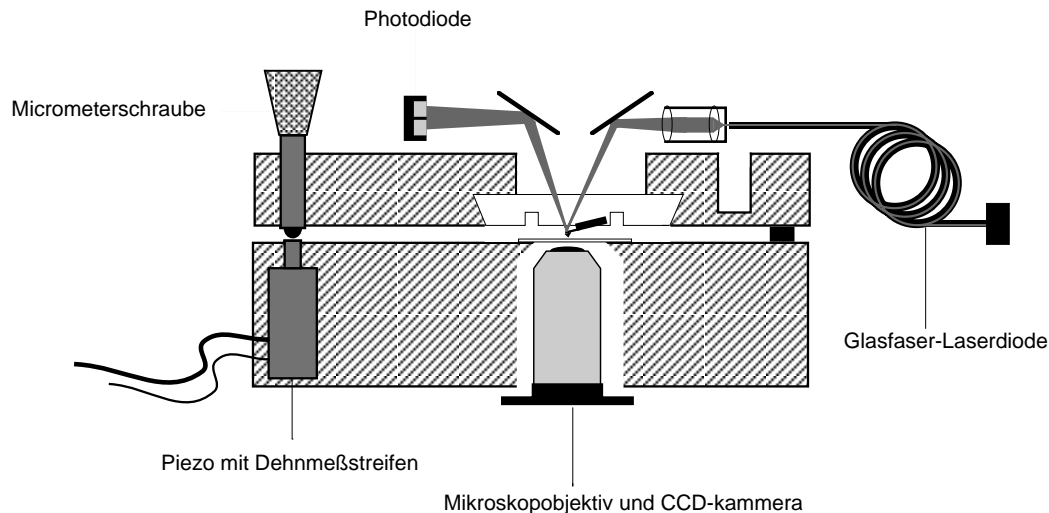


Abbildung A.4 Eines der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kraftspektrometer. Es basiert auf dem Meßprinzip der Rasterkraftmikroskops und wurde von M. Rief im Rahmen seiner Dissertation entwickelt und aufgebaut [196]. Die Einschränkung auf eine Bewegungsrichtung, sowie der Dehnmeßstreifen und das über eine Glasfaser eingekoppelte Laserlicht, erhöhen die Präzision gegenüber konventionellen Geräten.

Bestimmung der Federkonstante

Die Federkonstanten k_C der verwendeten Abtastfedern wurden mit Hilfe des thermischen Rauschens bestimmt. Dabei macht man sich zu Nutze, daß nach dem Equipartitionstheorem jeder Freiheitsgrad eines Systems im thermodynamischen Gleichgewicht, der homogen quadratisch zur Gesamtenergie des Systems beiträgt, sowie die dazugehörigen Impulse die mittlere Energie $k_B T/2$ besitzen [212]. Das bedeutet, daß das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle z^2 \rangle$ der Abtastfeder gleich $k_B T/k_C$ ist [183, 300]. Berücksichtigt man ferner, daß die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lichtzeigerdetektion nicht die Auslenkung, sondern die Verbiegung der Feder mißt, so ergibt sich zwischen Federkonstante und mittlerem Auslenkungsquadrat folgende Beziehung [301]:

$$k_C = 0,8 \cdot \frac{k_B T}{\langle z^2 \rangle} \quad (\text{A.3})$$

Das mittlere Auslenkungsquadrat erhält man dabei aus dem Integral über die erste Resonanz der Abtastfeder im Frequenzraum. (Der Beitrag höherer Resonanzen zum mittleren Auslenkungsquadrat ist im Faktor 0,8 in Gleichung (A.3) bereits berücksichtigt).

Präparation der DNA-Proben

Die DNA-Moleküle wurden meist unspezifisch an die Substrat- und Spitzenoberfläche gekoppelt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer spezifischen Anbindung, beispielsweise mit dem Rezeptor-Ligand System Biotin-Avidin, besteht zum einen darin, daß sich so sehr hohe Kopplungskräfte bis etwa 1,5 nN erreichen lassen [54, 55, 196] und damit ein großer Kraftbereich untersucht werden kann, während die Biotin-Avidin-Bindung je nach Kraftladungsrate (Kraftanstieg pro Zeit) schon bei etwa 20-200 pN reißt [43-45, 49, 52, 270, 302]. Außerdem lassen sich auf diese Weise auch DNA-Sequenzen mit einigen hundert Basenpaaren und nur einer Sorte von Basenpaarungen untersuchen, da funktionelle Gruppen, wie etwa Biotin üblicherweise an kurze DNA-Sequenzen angebracht werden, die dann mit Restriktionsenzymen und dem Enzym DNA-Ligase an den kohärenten Enden längerer DNA-Sequenzen befestigt werden. DNA-Sequenzen mit nur einer Sorte von Basenpaarungen besitzen jedoch keine spezifischen Schnittstellen für diese Restriktionsenzyme⁷ [303].

Lambda- BstE II Digest DNA (117-8454 bp) wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Doppelsträngige poly(dG-dC) (durchschnittliche Länge 1257 bp) und poly(dA-dT) stammt von Pharmacia (Freiburg). Die DNA wurde entweder aus einer Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA) mit 100 µg/ml DNA über Nacht auf frisch aufgedampftem Gold inkubiert, oder ein Tropfen (100 µl) der DNA-haltigen Lösung wurde auf einem frisch aufgedampften Goldsubstrat eingetrocknet und anschließend rehydriert. Vor dem Einbau ins

⁷ Auch die kovalente Anknüpfung über Epoxy-Silane wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Aufgrund der leichten Hydrolisierbarkeit der Epoxy-Verbindung unter physiologischen Pufferbedingungen ließ sich damit jedoch keine wesentliche Verbesserung gegenüber der unspezifischen Kopplung erreichen. Auch durch Thiol-Gold Verbindungen lassen sich kaum höhere Kräfte erreichen [64]. Eine Anbindung an die Basen über Isothiocyanat-Silan könnte hier Abhilfe schaffen. Dieses Silan ist jedoch nicht kommerziell erhältlich.

Kraftspektrometer wurde die Probe intensiv mit Pufferlösung (siehe oben) gespült, um schlecht adsorbierte DNA von der Probe zu entfernen. Einzelsträngige DNA wurde durch Dialyse gegen deionisiertes Wasser aus doppelsträngiger DNA hergestellt. Zusätzliche Kontrollexperimente wurden mit dem +Strang von M13mp18 Phagen DNA (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Anhang B Zustandssumme und Elastizität der freien Kette mit äußerer Kraft

Die Zustandssumme $Z(\mathbf{f}) = \int_{l_1} \dots \int_{l_N} e^{-\frac{E(l_1 \dots l_N) - \mathbf{f} \cdot \mathbf{R}}{k_B T}} dl_1 \dots dl_N$ (7) einer freien Kette unter einer äußeren Kraft ist wegen $E(l_1 \dots l_N) = \text{konst.}$:

$$Z(\mathbf{f}) = \int \dots \int e^{\frac{f l}{k_B T} (\cos \vartheta_1 \dots \cos \vartheta_N)} \sin \vartheta_1 \dots \sin \vartheta_N d\vartheta_1 \dots d\vartheta_N d\varphi_1 \dots d\varphi_N \quad (\text{B.2})$$

mit dem Polarwinkel φ und dem Azimutalwinkel ϑ . Dabei wurde die Kraft O. B. d. A. in z -Richtung angenommen. Da zwischen den einzelnen Segmenten keine Wechselwirkung besteht,

zerfällt das Integral in N unabhängige Integrale: $Z(\mathbf{f}) = \prod_{i=1}^N Z_i(\mathbf{f})$ mit

$$Z_i(\mathbf{f}) = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi e^{\frac{f l}{k_B T} \cos \vartheta_i} \sin \vartheta_i d\vartheta_i d\varphi_i. \quad (\text{B.3})$$

Mit $z = \cos(\vartheta_i)$ und $dz = -\sin \vartheta_i d\vartheta_i$ folgt:

$$Z_i(\mathbf{f}) = 2\pi \frac{k_B T}{f \cdot l} \left(e^{\frac{f \cdot l}{k_B T}} - e^{-\frac{f \cdot l}{k_B T}} \right) = 4\pi \frac{k_B T}{f \cdot l} \sinh\left(\frac{f \cdot l}{k_B T}\right) \quad (\text{B.4})$$

und damit:

$$Z(\mathbf{f}) = \left[4\pi \frac{k_B T}{f \cdot l} \sinh\left(\frac{f \cdot l}{k_B T}\right) \right]^N. \quad (\text{B.5})$$

Mit $\langle z \rangle = k_B T \frac{\partial \ln Z(\mathbf{f}_z)}{\partial f_z}$ (6) folgt dann:

$$\langle z \rangle = Nl \left[\coth\left(\frac{f_z l}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{f_z l} \right] =: NlL\left(\frac{f_z l}{k_B T}\right) \quad (8).$$

Anhang C Struktur- und thermodynamische Daten von DNA

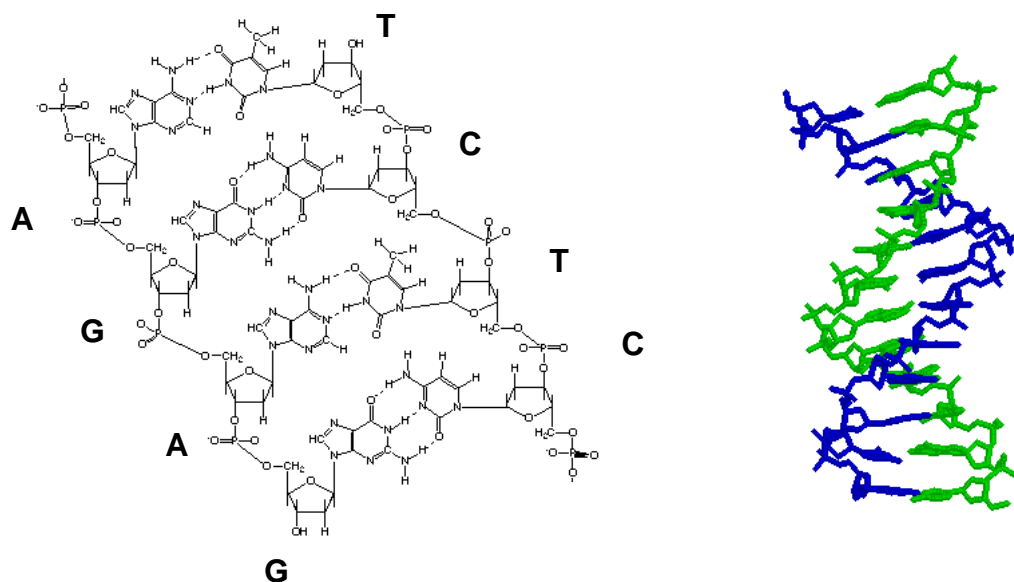


Abbildung C.1 Chemische Struktur von DNA (links) und räumliche Struktur von B-DNA (rechts) (Quellen: [http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/lm/nucleic acids/dna.html](http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/lm/nucleic%20acids/dna.html) und Nucleic Acid Data Base).

Tabelle C.1 Strukturdaten von A-, B- und Z-DNA nach [241].

	<i>A-DNA</i>	<i>B-DNA</i>	<i>Z-DNA</i>
Schraubensinn	rechtshändig	rechtshändig	linkshändig
Basenpaare/Helixwindung	11	10	12
Winkel zwischen zwei Basen	32,7°	36°	-9,-51°
Abstand der Basenpaare	2,9 Å	3,3-3,4 Å	3,7 Å
Winkel zw. Helixachse u. Bp.	70°	90°	97°
Konformation des Zuckers	C ₃ '-endo	C ₂ '-endo	C ₃ '-endo(syn)

Tabelle C.2 Thermodynamische Daten von DNA nach [250]. Alle Werte beziehen sich auf ein Basenpaar in 1 M NaCl bei pH 7. Die ΔG_{bp} Werte beziehen sich ferner auf 25°C. Außerdem muß pro Doppelhelix noch ein Betrag von -6 kcal/mol bzw. -5 kcal/mol für reine AT-Sequenzen für die Helixbildung zu ΔG_{bp} addiert werden, sowie für selbstkomplementäre Sequenzen ein Symmetrieterm von -0,4 kcal/mol, um ΔG_{bp} für eine gegebene Sequenz zu berechnen. Diese Daten wurden zur Berechnung von ΔG_{bp} der in Abschnitt 8 untersuchten DNA-Segmente verwendet.

Wechselwirkung	ΔH_{bp} [kcal/mol]	ΔS_{bp} [cal/mol]	ΔG_{bp} [kcal/mol]
AA/TT	9,1	24,0	1,9
AT/TA	8,6	23,9	1,5
TA/AT	6,0	16,9	0,9
CA/GT	5,8	12,9	1,9
GT/CA	6,5	17,3	1,3
CT/GA	7,8	20,8	1,6
GA/CT	5,6	13,5	1,6
CG/GC	11,9	27,8	3,6
GC/CG	11,1	26,7	3,1
GG/CC	11,0	26,6	3,1

Anhang D DNA-Nanostrukturen auf kationischen Lipidmembranen

Mit Lipidmischungen lassen sich nicht nur selbstorganisierte nanoskalige Domänen unterschiedlicher Lipide wie in Abschnitt 4.1 erzeugen, sondern es lassen sich auch gezielt Ladungsmuster auf der molekularen Skala herstellen, mittels derer sich dann regelmäßige Strukturen aus geladen Biomolekülen, wie beispielsweise DNA aufbauen lassen⁸. So zeigen etwa viele binäre equimolare Mischungen aus kationischen und anionischen oder kationischen und zwitterionischen Lipiden ein stark nicht-ideales Mischungsverhalten und die Tendenz regelmäßige zweidimensionale Co-Kristalle auszubilden, was sich zum einen in einer deutlichen Absenkung des Koexistenzdrucks zwischen flüssig-expandierter (FE) und flüssig-kondensierter (FC) Phase der Lipide an der Wasser-/Luft-Grenzfläche und zum anderen in einem Anstieg der Kettenschmelztemperatur der entsprechenden Lipidvesikel bemerkbar macht [123, 278, 305-310].

Es konnte gezeigt werden, daß die zweidimensionale Ordnung von DNA, die mit solchen geladenen Lipiden komplexiert wird, stark mit diesen molekularen Ladungsmustern korreliert ist. Abbildung D.1 A zeigt Φ X174 Hae III digest DNA auf einer festkörpergestützten Doppelschicht aus dem kationischen Dipalmitoyl-Trimethylammoniumpropan (DPTAP; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). Es bildet sich eine zweidimensionale smektische Phase mit geordneten Domänen von etwa 100 nm Durchmesser und einem mittleren Abstand d von 6,5 nm zwischen benachbarten DNA-Strängen (Kreis in der Fouriertransformierten). Wird die DNA dagegen mit einer equimolaren Mischung aus DPTAP und dem zwitterionischen DPPC komplexiert (Abbildung D.1 B), so nimmt die Größe geordneter Domänen auf einige 10 nm ab und der mittlere Abstand d verdoppelt sich auf etwa 13 nm, und an eine equimolare Mischung aus anionischem DPPG und kationischem DODAB (vgl. Abbildung D.2) bindet gar keine DNA mehr. Sowohl die Größe geordneter Domänen, als auch der Abstand benachbarter

⁸ Komplexe aus derartigen Lipidmischungen und DNA spielen insbesondere bei der Gentherapie eine wichtige Rolle, wo sie zur Gentransfektion eingesetzt werden. Eine gute Übersicht über den aktuellen Stand der Forschung befindet sich in [304].

DNA-Stränge lassen sich also über die Ladungsdichte der zum Komplexieren verwendeten Lipidmembran einstellen. Die Packungsdichte der DNA zeigt dabei eine lineare Abhängigkeit von der Ladungsdichte der Membran, was gut mit Beobachtungen an dreidimensionalen DNA-Lipid Komplexen übereinstimmt [311-313]. Neben der attraktiven Wechselwirkung zwischen DNA und kationischen Lipiden hat auch die elektrostatische Repulsion zwischen benachbarten DNA-Strängen einen deutlichen Einfluß auf die Packungsdichte der DNA. So nimmt d auf rein kationischen Membranen in 20 mM NaCl, auf etwa 4,5 nm ab [314, 315] und durch Inkubation mit geringen Mengen $MgCl_2$ läßt sich d bis auf etwa 3,6 nm reduzieren [316]. Mit zunehmender Salzkonzentration nimmt die Packungsdichte der DNA dann wieder ab, bis sich die DNA dann ab etwa 100 mM NaCl von der Membran abzulösen beginnt⁹ [314, 315].

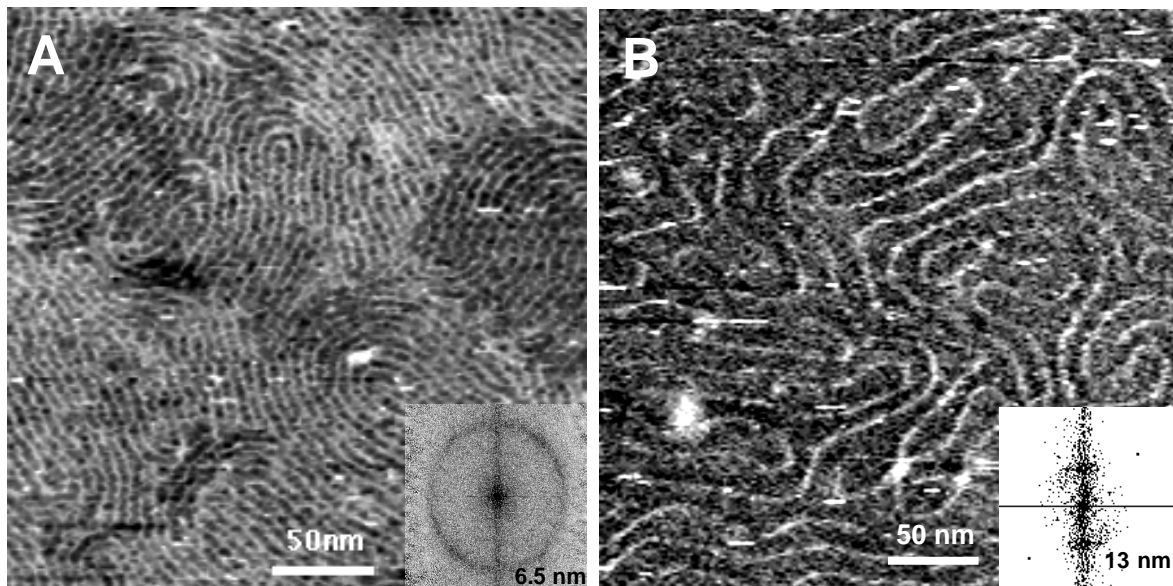


Abbildung D.1 Kraftmikroskopische Aufnahme von Φ X174 Hae III digest-DNA auf einer festkörpergestützten DPTAP-Doppelschicht (A) und einer festkörpergestützten Doppelschicht aus 50% DPTAP und 50% DPPC (B). Abbildungsparameter: Tapping Modus, Tappingfrequenz 33 kHz, Scanrate 3,5 Hz, basislinienkorrigierte Rohdaten; Puffer: 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA

⁹ Die treibende Kraft hinter diesem Adsorptionsverhalten ist der Entropiegewinn der Gegenionen, die durch die Komplexierung von DNA mit der kationischen Membran freigesetzt werden [317-319].

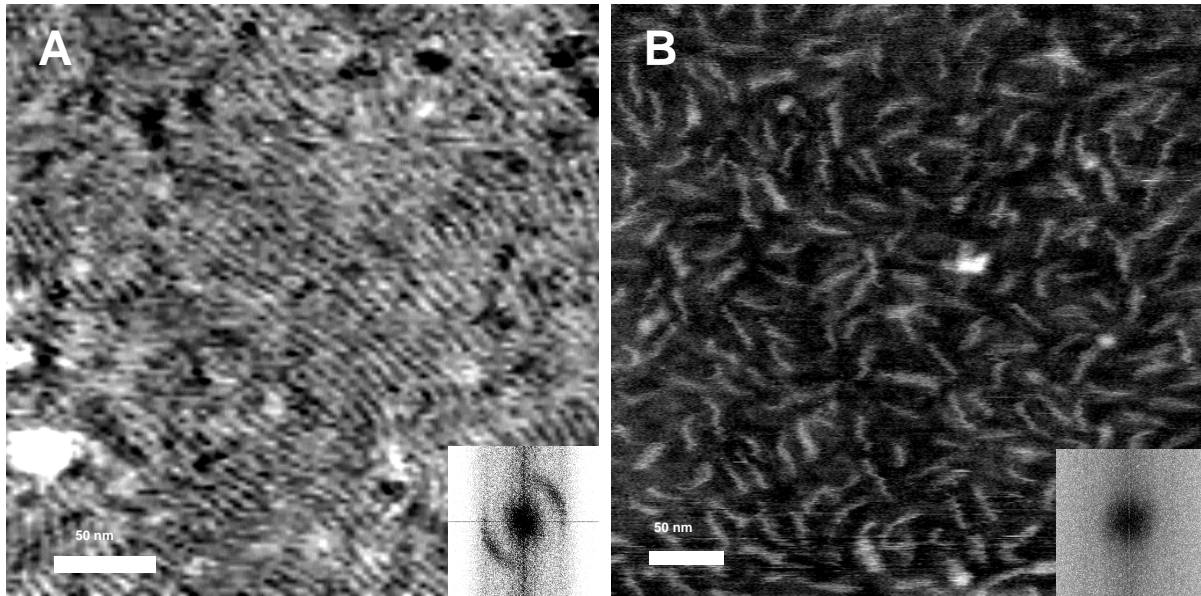


Abbildung D.2 80 bp-Oligonucleotide (MWG-Biotec, Ebersberg) auf festkörpergestützten DPTAP-Doppelschichten, in 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA (A) und im selben Puffer nach 24-stündiger Inkubation bei erhöhter Salzkonzentration. Abbildungsparameter: Tapping Modus, Tappingfrequenz 33 kHz, Scanrate 3,5 Hz, basislinienkorrigierte Rohdaten.

Beim Übergang zu DNA-Lipid-Komplexen mit kurzer monodisperser DNA stellt sich die Frage, ob ein solcher Übergang auch zu einer Änderung der lateralen Ordnung der komplexierten DNA, beispielsweise von der flüssigkristallinen smektischen Ordnung mit einer starken Autokorrelation entlang einer Raumrichtung zu einer zweidimensionalen kristallinen Ordnung mit Korrelationen in beide Richtungen führt (vgl. auch [111]). Es zeigt sich jedoch, daß auch Oligonucleotide mit nur 80 Basenpaaren (27 nm) auf DPTAP eine smektische Phase ausbilden. Allerdings sind die geordneten Domänen hier mit einigen hundert Nanometern Durchmesser deutlich größer, als bei der längeren Φ X174 Hae III digest DNA (Abbildung D.1 A) oder Lambda-DNA (keine Daten gezeigt), was sich auch in der Fouriertransformierten in Form einer Doppelsichel zeigt. Auch hier ist die laterale Ordnung mit der Packungsdichte der DNA korreliert. Abbildung D.1 B zeigt 80 Basenpaar lange Oligonucleotide auf einer festkörpergestützten DPTAP-Doppelschicht. Die DNA wurde durch Inkubation mit einer hohen Salzkonzentration stark verdünnt, so daß keine laterale Ordnung mehr zu erkennen ist.

Anhang E Lipide als Template zum Aufbau von Nanostrukturen mit neuen Materialeigenschaften

Aus Lipiden aufgebaute Nanostrukturen haben oftmals nicht die für bestimmte Anwendungen benötigten Materialeigenschaften oder sind überhaupt nur in bestimmten Lösungsmitteln unter bestimmten Umgebungsbedingungen stabil, was ihre möglichen Einsatzgebiete insbesondere hinsichtlich technischer Anwendungen stark einschränkt. Aus Lipiden aufgebaute Nanostrukturen können aber auch als Template für den selbstorganisierten Aufbau von Nanostrukturen aus einer Vielzahl nicht amphiphiler Stoffe verwendet werden. So werden bereits seit längerem hochporöse Keramiken mit wohldefinierter Porengröße im Nanometerbereich aus Lipiden und den ihnen verwandten Detergenzien aufgebaut [320-322].

Hetzer et al. konnten 1997 zeigen [323, 324], daß lipophile Hexaaddukte von C_{60} in großen Mengen im Inneren von Lipiddoppelschichten eingebaut werden können (vgl. Abbildung E.1). Die Verwendung von polymerisierbaren lipophilen Resten erlaubt damit eine Quervernetzung der Hexaaddukte und den Aufbau von kovalent quervernetzten Strukturen aus Poly- C_{60} -Kugeln. Die Struktur des Poly- C_{60} -Netzwerks folgt dabei der Struktur der Lipiddoppelschicht, und so lassen sich beispielsweise mit Hilfe unilamellarer Lipidvesikel extrem widerstandsfähige Hohlkugeln aus Poly- C_{60} -Kugeln mit Durchmessern von einigen 10 nm bis zu einigen Micrometern herstellen (vgl. Abbildung E.2 A). Der Kugeldurchmesser läßt sich dabei prinzipiell durch geeignete Präparation der Lipidvesikel sehr präzise einstellen, so daß auch sehr monodisperse Proben hergestellt werden können. Es konnte gezeigt werden, daß die Schalen derartiger Hohlkugeln aus mehreren Lagen Poly- C_{60} bestehen und extrem widerstandsfähig gegen äußere Kräfte sind. Selbst bei Auflagekräften von etwa 100 nN, was bei einer geschätzten Kontaktfläche zwischen Spitze und Probe von ca. 100 nm² einem Druck von etwa 10⁹ Pa oder etwa 10⁴ Atmosphären entspricht¹⁰, konnte keine Beschädigung der Kugeln beobachtet werden [325].

¹⁰ Die genaue Kontaktfläche zwischen Spitze und Probe ist jedoch schwer zu bestimmen; der nominelle Krümmungsradius der verwendeten Spitzen beträgt 2 nm.

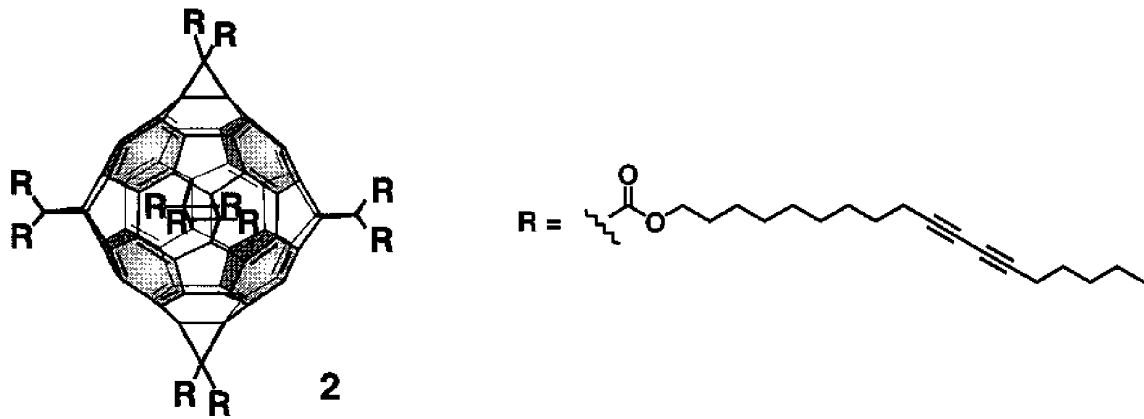


Abbildung E.1 lipophiles Hexaaddukt von C₆₀ Abbildung entnommen aus [325].

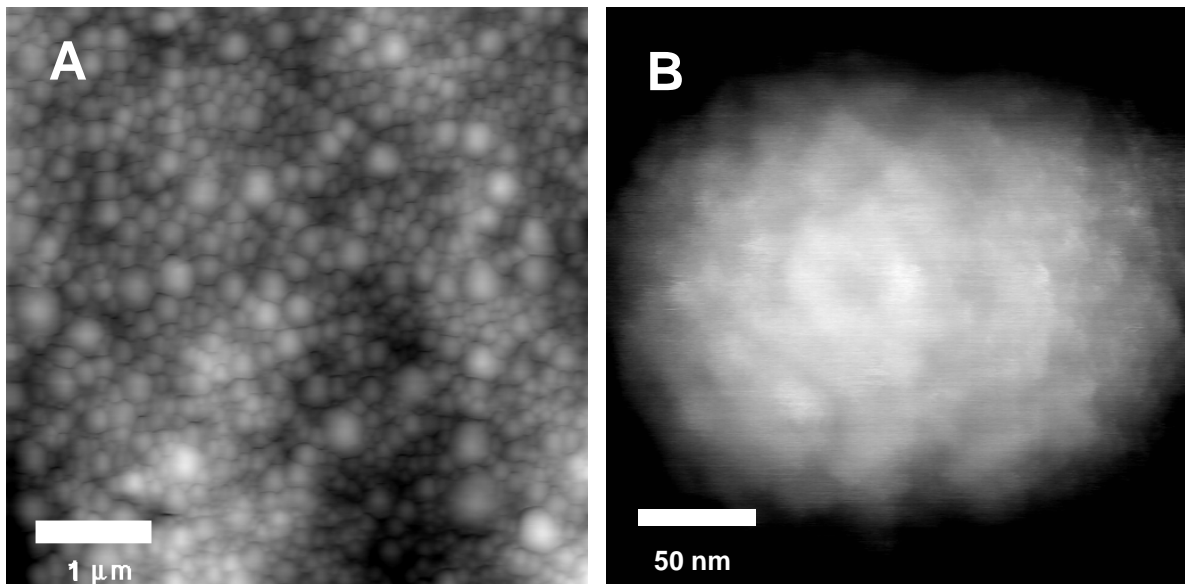


Abbildung E.2 Kraftmikroskopische Aufnahme (A) von Poly-C₆₀-Kugeln auf einem Glimmersubstrat; (B) vom oberen Bereich einer Poly-C₆₀-Kugel. Abbildungsparameter: (A) Tapping Modus an Luft, Tappingfrequenz 270 kHz, Scanrate 1 Hz, basislinienkorrigierte Rohdaten; (B) Modus konstanter Kraft (< 1 nN) in 1-Propanol, Scanrate 6,8 Hz, Rohdaten.

Anhang F Elastizität von kovalent geschlossener Plasmid-DNA

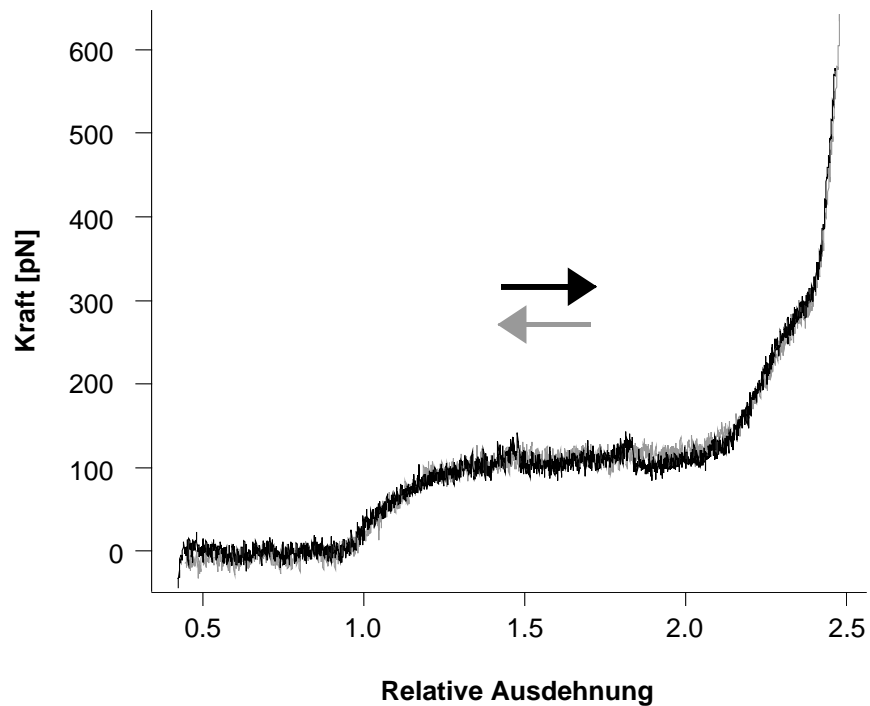


Abbildung F.1 An zirkular geschlossener Plasmid-DNA (M13 mp18 RF I in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA) aufgenommene Kraft-Abstands-Kurven. (Daten von Dipl. Phys. C. Tolksdorf [255]).

Anhang G Änderungen der DNA-Mechanik durch Cisplatin¹¹

Viele in der Chemotherapie gebräuchlichen Cytostatika verdanken ihre Antitumoraktivität der Tatsache, daß sie DNA komplexieren und daß die durch die Komplexierung verursachten strukturellen Veränderungen die mechanischen Eigenschaften von DNA nachhaltig verändern. Die veränderten mechanischen Eigenschaften von DNA beeinflussen dann unmittelbar deren biologische Funktion, da Proteine, wie DNA- und RNA-Polymerase [71, 73, 74, 327], Isotopomerase [76] oder RecA [272, 273] mit Kräften von wenigen pN die Struktur von DNA auf eine spezifische Art und Weise verändern müssen, um ihre biologische Funktion zu erfüllen, was nach einer Komplexierung der DNA oftmals nicht mehr möglich ist. Davon besonders betroffen sind Zellen mit hohen Stoffwechselraten und hoher Zellteilungsrate, wie beispielsweise Tumorzellen. Der genaue Wirkungsmechanismus vieler Cytostatika auf der molekularen Skala ist dabei bis heute nicht eindeutig aufgeklärt. Ein besseres Verständnis der für die Antitumoraktivität verantwortlichen strukturellen Veränderungen auf der molekularen Ebene könnte daher bei der Weiterentwicklung dieser Wirkstoffe eine Schlüsselrolle spielen.

Ein in doppelter Hinsicht interessantes DNA bindendes Molekül ist Cisplatin (Cis-Dichlordiamminplatin). Zum einen ist Cisplatin eines der am häufigsten eingesetzten und am besten untersuchten Krebsmedikamente, welches auf eine sehr spezifische Art und Weise an bestimmte DNA-Basen bindet. Damit eignet sich Cisplatin in besonderer Weise als Prototyp, um anhand unterschiedlicher DNA-Sequenzen den Einfluß bestimmter Bindungsmodi auf die mechanischen Eigenschaften von DNA zu untersuchen. Andererseits dient Cisplatin aber auch als Keim bei der autokatalytischen Metallabscheidung an DNA [328, 329]. Aus diesem Grund spielt Cisplatin neben seiner bedeutenden pharmazeutischen Rolle möglicherweise auch eine zentrale Rolle beim Aufbau elektrisch leitender Nanostrukturen aus DNA.

¹¹ Sämtliche in diesem Abschnitt gezeigten Daten stammen von Dipl. Phys. R. Krautbauer (LMU-München), der im Rahmen seiner Diplomarbeit die Wechselwirkung von DNA mit Cisplatin untersuchte [326].

Cisplatin hat zwei Bindungsstellen, die bevorzugt an die N7 Atome der Guanin-Basen binden, was entweder zu einer intra-Strang Vernetzung zweier Guanin Basen desselben Strangs (G*G* oder G*XG*) führen kann oder zu einer inter-Strang Quervernetzung an Stellen mit GC-Sequenz. Außerdem können auch noch inter-Strang Verbindungen zwischen benachbarten Guanin und Adenin-Basen (3'-G*A*-5') auftreten [77-80].

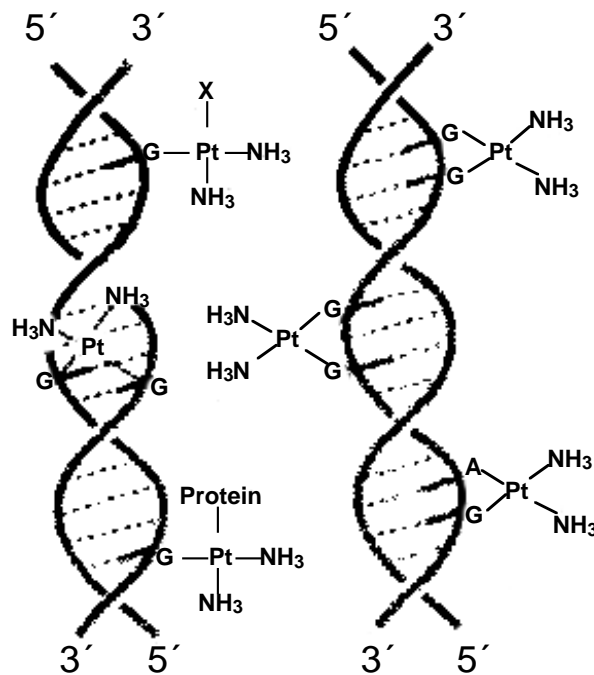


Abbildung G.1 Chemische Struktur von Cisplatin und die unterschiedlichen Addukte von Cisplatin und DNA.

Abbildung G.2 zeigt eine Dehnungs- und Relaxationskurve von λ -digest DNA nach der Inkubation mit Cisplatin. Es zeigt sich, daß der B-S-Übergang im Vergleich zu unbehandelter DNA (vgl. Abschnitt 8.2) deutlich an Kooperativität eingebüßt hat. Anstelle eines flachen Plateaus kann ein stetiger Kraftanstieg bis 73 pN beobachtet werden. Bei 73 ± 5 pN weist die Kurve einen Knick auf, nach dem die Elastizität des Moleküls abnimmt, und bei 318 ± 22 pN zeigt sich ein weiterer Knick in der Kraftkurve, und die Elastizität des Moleküls nimmt erneut deutlich ab. Ein Abflachen der Kurve, wie beim Schmelzübergang unbehandelter DNA kann praktisch nicht mehr beobachtet werden. Die Kräfte, bei denen die beiden Knicke in der Kraftkurve auftreten sind über einen Geschwindigkeitsbereich von 0,2-4 $\mu\text{m/s}$ unabhängig von der Zuggeschwindigkeit, und es kann, im Gegensatz zu unbehandelter DNA keine Hysterese

zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve beobachtet werden. Das zeigt klar, daß eine irreversible Auftrennung der beiden DNA-Stränge nach der Behandlung mit Cisplatin nicht mehr möglich ist.

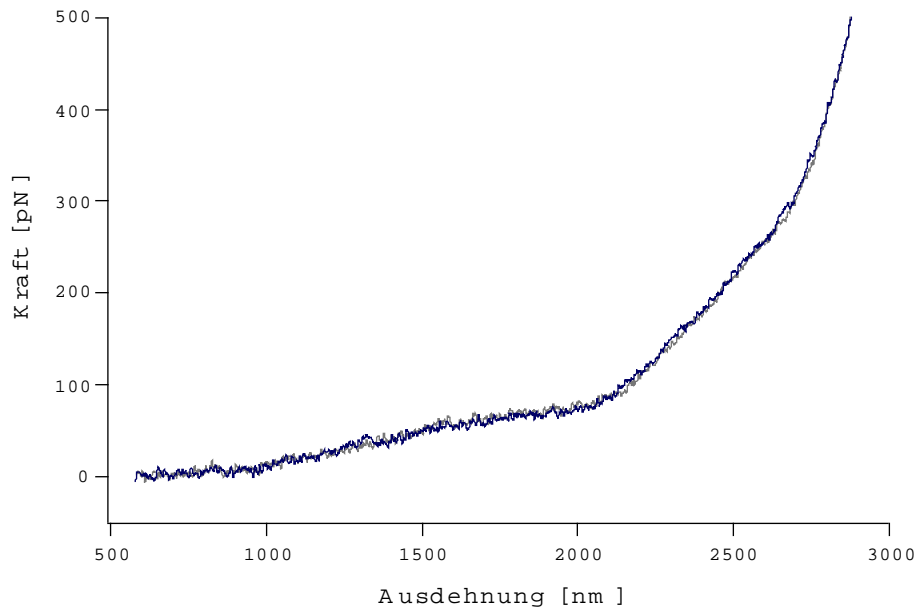


Abbildung G.2 Dehnungs- und Relaxationskurve von λ -BstE II digest DNA nach 24-stündiger Inkubation mit Cisplatin. Pufferbedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA.

Während bei natürlicher λ -DNA sämtliche der oben beschriebenen Addukte vorkommen können, lassen sich mit Hilfe spezieller DNA-Sequenzen die unterschiedlichen Veränderungen in der Mechanik von DNA eindeutig bestimmten Bindungsmodi von Cisplatin zuordnen. In Abbildung G.3 A ist eine Dehnungs- und Relaxationskurve an mit Cisplatin behandelter poly(dG-dC)·poly(dG-dC)-DNA gezeigt, bei dem sowohl inter-Strang Querverbindungen, als auch intra-Strang Verbindungen des Typs G*CG* auftreten können. Während das unbehandelte Molekül einen hochgradig kooperativen B-S-Übergang bei 65 pN und einen Schmelzübergang bei ~300 pN aufweist (vgl. Abschnitt 8.2), zeigt der B-S Übergang des platinieren Moleküls deutlich weniger Kooperativität und auch ein eigener Schmelzübergang kann nicht beobachtet werden. Selbst wenn das Molekül mehrere Minuten mit 500 pN gedehnt wird, tritt in der Relaxationskurve kaum Hysterese auf, und auch das Entstehen von Haarnadelstrukturen, wie bei unbehandelten Molekülen (vgl. Abschnitt 8.3) konnte nicht

beobachtet werden. Die inter-Strang Querverbindungen scheinen also ein kraftinduziertes Schmelzen der Doppelhelix zu verhindern.

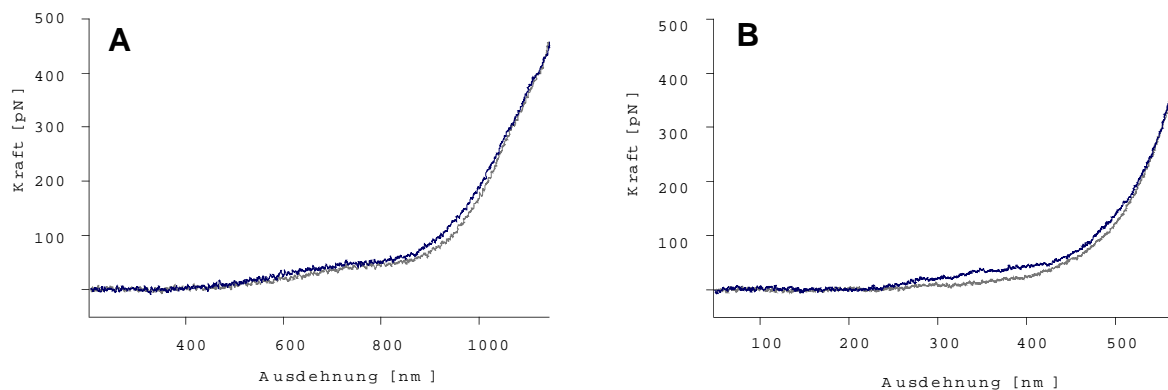


Abbildung G.3 Dehnungs- und Relaxationskurve von poly(dG-dC)-poly(dG-dC)-DNA (A) und poly(dA-dT)-poly(dA-dT)-DNA (B) nach 24-stündiger Inkubation mit Cisplatin. Puffer-Bedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA.

Bei mit Cisplatin behandelter poly(dA-dT)-poly(dA-dT)-DNA (Abbildung G.3 A), die keine spezifischen Bindungsstellen für Cisplatin aufweist, konnten dagegen keine Unterschiede gegenüber den entsprechenden unbehandelten Molekülen festgestellt werden. Auch das Entstehen von Haarnadelstrukturen konnte beobachtet werden, sobald das Molekül bis in das Plateau bei 35 pN gedehnt und anschließend wieder relaxiert wurde.

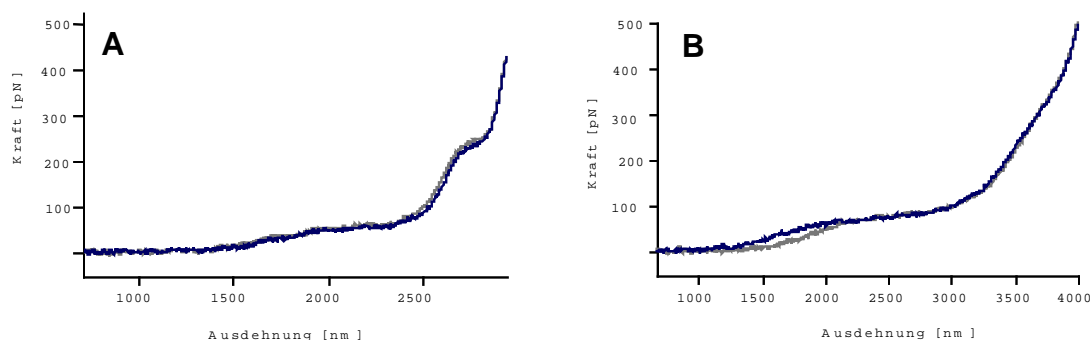


Abbildung G.4 Dehnungs- und Relaxationskurve von poly(dA-dC)-poly(dG-dT)-DNA (A) und poly(dG)-poly(dC)-DNA (B) nach 24-stündiger Inkubation mit Cisplatin. Puffer-Bedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA.

Kraftexperimente an poly(dA-dC)-poly(dG-dT)- und poly(dG)-poly(dC)-Sequenzen (Abbildung G.4) zeigen weitere Details des Zusammenhangs zwischen durch die Komplexierung mit Cisplatin hervorgerufenen strukturellen Veränderungen und den mechanischen Eigenschaften von DNA. Obwohl Cisplatin in poly(dA-dC)-poly(dG-dT)-

DNA nur intra-Strang Bindungen zwischen Guanin-Basen (G^*TG^*) bilden kann, ändert die Komplexierung mit Cisplatin die mechanischen Eigenschaften des Moleküls deutlich. Während die Mechanik des unbehandelten Moleküls im wesentlichen der von unbehandelter λ -DNA gleicht (Daten nicht gezeigt, vgl. [326] und [330]), verliert der B-S-Übergang des platinieren Moleküls wieder deutlich an Kooperativität, was darauf hindeutet, daß die B-Konformation des relaxierten Moleküls und insbesondere die für die hohe Kooperativität des B-S-Übergangs verantwortliche Basenstapelung [242] durch die Komplexierung mit Cisplatin nachhaltig gestört wird. Bei etwa 300 pN zeigt sich ein weiterer Übergang, der dem Schmelzübergang des unbehandelten Moleküls gleicht. Dennoch weist die Relaxationskurve kaum Hysterese auf, was den Schluß nahelegt, daß die Rekombination der beiden DNA-Stränge hier schneller stattfindet, als die Relaxation des Moleküls. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit Molekulardynamiksimulationen, die eine Stabilisierung der Doppelhelix durch zwei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen in den G^*TG^* -Komplexen vorhersagen [331]. Auch in poly(dG)-poly(dC)-DNA kann Cisplatin nur intra-Strang Verbindungen (G^*G^* oder G^*GG^*) bilden, auch hier verliert der B-S-Übergang durch die Behandlung mit Cisplatin deutlich an Kooperativität, und es zeigt sich gegenüber dem unbehandelten Molekül eine sehr viel geringere Hysterese (vgl. [326] und [330] für die Daten des unbehandelten Moleküls).

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

M. Grandbois, H. Clausen-Schaumann und H. E. Gaub,
Atomic Force Microscope Imaging of Phospholipid Bilayer Degradation by Phospholipase A₂,
Biophys J. (1998), 74, 2398-2404.

C. Gliss, H. Clausen-Schaumann, R. Günther, S. Odenbach, O. Randl und T.M. Bayerl,
Direct Detection of Domains in Phospholipid Bilayers by Grazing Incidence Diffraction of Neutrons and Atomic Force Microscopy,
Biophys. J. (1998), 74, 2443-2450.

H. Clausen-Schaumann, M. Grandbois und H. E. Gaub,
Enzyme Assisted Nanoscale Lithography in Lipid Membranes,
Adv. Mat. (1998), 10, 949-952.

M. Rief, H. Clausen-Schaumann und H. E. Gaub,
Single Molecule Force Spectroscopy by AFM - Nanomechanics Meets Molecular Biology,
Electron Microscopy (1998), I, 579.

H. Clausen-Schaumann, M. Rief und H. E. Gaub,
Sequence Dependent Mechanics of Single DNA Molecules,
Biophys J. (1999), 76, A151.

M. Rief, H. Clausen-Schaumann und H. E. Gaub,
Sequence Dependent Mechanics of Single DNA Molecules,
Nat. Struct. Biol. (1999), 6, 346-349.

M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann und H. E. Gaub,
How Strong is a Covalent Bond?,
Science (1999), 283, 1727-1730.

M. Hetzer, H. Clausen-Schaumann, S. Bayerl, T. M. Bayerl, X. Camps, O. Vostrowsky und A. Hirsch,
Nanosphären aus polymerisierbaren Lipofullerenen,
Angew. Chem. (1999), 111, 2103-2106,
Angew. Chem. Int. Ed. (1999), 38, 1962-1965.

H. Clausen-Schaumann und H. E. Gaub,
DNA Adsorption to Laterally Structured Charged Lipid Membranes,
Langmuir (1999), 15, 8246-8251.

A. Stasiak, A. Dobay, G. Dietler, H. E. Gaub, H. Clausen-Schaumann, M. Beyer, M. Rief und M. Grandbois,
Knotted Fishing Line, Covalent Bonds, and Breaking Points,
Science (1999), 286, 11a.

H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf und H. E. Gaub
Mechanical Stability of Single DNA Molecules
Biophys. J. (2000), 78, 1997-2007.

H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer und H. E. Gaub
Single-Molecule Force Spectroscopy with Bio-Molecules,
Current Opinion in Chemical Biology, im Druck.

H. Clausen-Schaumann, M. Rief und M. Seitz
Artificial Noses Sniff DNA,
Chem. Phys. Chem., im Druck.

C. Preininger, H. Clausen-Schaumann, A. Ahluwalia und D. de Rossi
Characterization of IgG Langmuir-Blodgett Films Immobilized on Functionalized Polymers
Talanta, (2000), 52 (5), 921-930.

R. Krautbauer, H. Clausen-Schaumann und H. E. Gaub
Anticancer Drug Cisplatin Changes the Mechanics of Single DNA-Molecules
Angew. Chem., im Druck.

R. Zantl, H. Clausen-Schaumann und J. Rädler
Diffusion of ds-DNA Oligonucleotides on Supported Cationic Lipid Membranes
Langmuir, eingereicht.

M. Grosholz, T. Hugel, H. Clausen-Schaumann, A. Pfau, H. E. Gaub und M. Seitz
Investigation of Polyelectrolyte Elasticity and Their Desorption from Charged Surfaces by
AFM Based Single Molecule Force Spectroscopy
Macromolecules, eingereicht.

C. Tolksdorf, H. Clausen-Schaumann, M. Rief und H. E. Gaub
Elasticity of Circular Closed and Nicked Plasmid DNA
in Vorbereitung.

Danke

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Hermann Gaub für die engagierte und kompetente Betreuung der Arbeit und die großen Freiräume, die er mir dabei einräumte.
- Der Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Angewandte Physik; ein gutes Team ist eine entscheidende Voraussetzung für das Gelingen einer solchen Arbeit.
- Christine Gliss und Thomas Bayerl für die Zusammenarbeit an den binären Lipidmischungen.
- Michel Grandbois für die Einführung in die Welt der Phospholipase und die gemeinsamen Experimente mit diesem Enzym.
- Matthias Rief für die Einführung in die Kraftspektroskopie im Rahmen der gemeinsamen mechanischen Experimente an DNA sowie die unzähligen stimulierenden Diskussionen und Anregungen.
- Carolin Tolksdorf, die mit Experimenten an Plasmid DNA einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle der Topologie bei der DNA-Mechanik geleistet hat.
- Rupert Krautbauer, der die Experimente mit Cisplatin durchgeführt hat und damit neue Wege zur Strukturaufklärung von Krebsmedikamenten aufgezeigt hat.
- Matthias Grosholz, Markus Seitz, Thorsten Hugel, Andreas Pfau und Roland Netz für die Zusammenarbeit und Diskussionen über Desorptionskräfte von Polyelektrolyten von geladenen Grenzflächen.
- Lars Nielsen-Kildemark für die Kopplung von Phospholipase an die AFM-Spize und die gemeinsam durchgeführten Experimente.
- Michael Hetzer und Thomas Bayerl für die Zusammenarbeit an Nanostrukturen aus Lipofullerenen.
- Michael Bonin der doppelsträngige RNA für erste Kraftexperimente daran exprimiert und isoliert hat.
- Roman Zantl und Joachim Rädler für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung von mit kationischen Lipiden komplexierten Oligonucleotiden.
- Michel Grandbois, Martin Beyer und Matthias Rief, für die Beantwortung der Frage: Wie stark ist eine kovalente Bindung?
- Manfred Radmacher und Markus Seitz für zahlreiche Anregungen und Diskussionen und Prof. K. Stierstadt für die hilfreichen Anmerkungen zur Thermodynamik von DNA.
- Wolfgang Parak, Markus Seitz, Rupert Krautbauer und Evi für das Korrekturlesen der Arbeit.

Schließlich gibt es auch noch ein Leben außerhalb des Labors. So erwies sich Michel nicht nur als ausgezeichnete Wissenschaftler, sondern auch als excellenter Kletterer. Die Familie Gaub sorgte jedes Mal für optimale Rahmenbedingungen bei den legendären Schlittenrennen an der Firstalm und Martin für den richtigen Kurs beim Segeln nahe Torbole. Danke außerdem an Alex, Martin, Wolfgang, Pit und Evi.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Hauke Clausen-Schaumann
geboren: am 13.3.1967 in Elmshorn
Eltern: Andreas und Isolde Clausen-Schaumann
Familienstand: verheiratet

Ausbildung und beruflicher Werdegang:

1973-77 Besuch der Grundschule Warmbronn
1977-78 Besuch der Hauptschule Tutzing
1978-84 Besuch des Gymnasiums Tutzing
1984-85 Besuch der T.W. Andrews High-School, High Point, NC, USA (Diplom)
1985-87 Besuch des Gymnasiums Tutzing (Abitur)
1987-89 Zivildienst, Bildungshaus St. Martin, Bernried
1989-96 Studium der Allgemeinen Physik an der Technischen Universität München (Diplom)
Seit 1996 Promotion am Lehrstuhl für Angewandte Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Seit 1999 Wissenschaftlicher Koordinator des Kompetenzzentrums Nanoanalytik