DNA Einzelmolekül-Mechanik

Dissertation an der Fakultät für Physik der

Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Rupert Krautbauer

aus München

München, 10. Oktober 2002

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Hermann E. Gaub
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang M. Heckl
Tag der mündlichen Prüfung:	16. Dezember 2002

Inhalt

0. ZUSAMMENFASSUNG 1

1. EINLEITUNG 2

2. KRAFTSPEKTROSKOPIE 6

2.1. KRAFT ALS STRUKTURPARAMETER 6

2.2. MESSUNG VON KRÄFTEN/ KRAFTSPEKTREN 8

2.3. THEORETISCHE BESCHREIBUNG VON POLYMEREN UNTER KRAFT 11

3. DNA UND DNA-BINDENDE MOLEKÜLE 15

3.1. DNA 15

3.2. DNA-BINDENDE MOLEKÜLE 18

3.2.1. Bindungsmoden 18

3.2.2. Pharmakologische Relevanz 20

3.3. MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN VON DNA 25

3.3.1. Unzipping 26

3.3.2. Überstrecken 29

3.3.3. Kraftinduziertes Schmelzen langer DNA- Moleküle 32

3.3.4. Sequenzspezifische Mechanik und Topologieeffekte 35

3.3.5. Kraftinduziertes Schmelzen von Oligonukleotiden 36

3.3.6. Weitere Einzelmolekülexperimente mit DNA 37

4. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE 39

4.1. UNZIPPING VON DNA 39

4.1.1. Kopplung der Moleküle an Spitze und Unterlage 39

4.1.2. Unzipping repetitiver Sequenzen 42

4.1.3. Unzipping nativer Sequenzen 45

4.1.4. Diskussion 46

4.2. DNA-MECHANIK UND DNA-BINDENDE MOLEKÜLE 49

4.2.1. Cisplatin-Crosslinks 49

4.2.2. Interkalatoren und Groove-Binder 56

4.2.3. Diskussion 61

4.2.4. Bezug zu klassischen Schmelzexperimenten 63

5. AUSBLICK 65

6. ANHANG 67

6.1. UV-SPEKTROSKOPIE 67

6.2. PSORALEN UND DNA 68

6.3. THEORIE MOLEKULARER BINDUNGEN 69

6.4. STABILITÄT VON LNA-DNA-HYBRIDEN 71

6.4.1. Kraftmessungen 72

6.4.2. DSC-Messungen 73

6.4.3. Diskussion 74

6.5. MATERIAL UND METHODEN 76

6.5.1. Verwendete Geräte 76

6.5.2. Chemikalien 77

6.5.3. DNA 78

6.5.4. Protokolle 79

6.5.5. Software 81

7. LITERATURVERZEICHNIS 82

8. LEBENSLAUF 103

9. DANKSAGUNG 104

0. Zusammenfassung

DNA ist als Trägermolekül der Erbinformation von zentraler biologischer Bedeutung. Die vielfältigen Strukturen, die DNA bildet, werden dabei durch molekulare Erkennungsmechanismen gesteuert, die für jede Sequenz einzigartig sind. So bietet DNA auch die Möglichkeit gezielt und selbstorganisiert Strukturen aufzubauen, die als Grundlage für nanotechnologische Systeme dienen können. Um die Funktion einer Zelle sicher zu stellen treten viele verschiedene Moleküle mit DNA in Wechselwirkung. Dabei wird die DNA kompaktiert, entwunden, aufgetrennt und komplexiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kraftmessungen an einzelnen DNA-Molekülen durchgeführt. Dabei wurde sowohl das Entfalten (Unzipping), als auch das Überstrecken und kraftinduzierte Schmelzen untersucht. Insbesondere wurden die mechanischen Aspekte der Wirkung DNA-bindender Pharmaka auf molekularer Ebene studiert. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Es wurde gezeigt, dass mit Kraftmikroskopie Sequenzvariationen in natürlichen und synthetischen DNA-Molekülen auf einer Skala von zehn Basenpaaren direkt über die Entfaltungskraft detektiert werden können.
- Es wurden die mechanischen Auswirkungen der Bindung kleiner Moleküle auf das Kraft-Ausdehnungs-Verhalten (Kraftspektrum) von DNA untersucht. So konnten erstmals Bindungsvorgang und –kinetik von kovalenten und nicht-kovalenten Liganden an DNA mechanisch detektiert werden.
- Es wurde gezeigt, dass die Änderungen der Überstreckungskräfte und –bereiche in den Kraftspektren von DNA bei Wechselwirkung mit verschiedenen Liganden mit denen des thermischen Schmelzens korrelieren. Das stützt die Interpretation des Überstreckungsprozesses als Teil eines kraftinduzierten Schmelzprozesses.
- Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist die verschiedenen Addukte des Krebsmedikaments Cisplatin über Kraftspektroskopie direkt und sequenzspezifisch an einzelnen Molekülen nachzuweisen und zu unterscheiden.
- Es wurde gezeigt, dass die Kraftspektren komplexierter DNA-Moleküle für die jeweilige Art der Bindung charakteristisch sind. So wurde Kraftspektroskopie als analytische Methode zur Unterscheidung verschiedener Bindungsmoden von DNA-bindenden Substanzen etabliert.

1. Einleitung

Die naturwissenschaftliche Entwicklung der vergangenen Jahren ist geprägt von einem engeren Zusammenwachsen der einzelnen Disziplinen. Weltweit entstehen immer mehr interdisziplinäre Forschungszentren, die die Zusammenarbeit von Biologen, Chemikern und Physikern weiter fördern sollen. Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei häufig Systeme auf der Nanometerskala. Gerade durch die Anwendung moderner physikalischer Messtechnik auf biologische Systeme entsteht so eine Fülle neuer Information, die das Verständnis vieler grundlegender Mechanismen kontinuierlich anwachsen lässt. Die Voraussetzungen für diese Entwicklung wurden größtenteils in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts gelegt. So wurden mit den verschiedenen Rastersondenverfahren die Möglichkeiten geschaffen, Materie mit sub-molekularer Auflösung zu untersuchen und zu manipulieren.[1,2] Mit lithographischen Verfahren[3] und Stempeltechniken[4] ist es ebenfalls möglich, Materie auf der Nanometerskala zu strukturieren, wobei sogar mechanisch bewegliche Elemente realisiert werden können.[5]

Die Entschlüsselung der B-DNA-Struktur von Watson und Crick[6] war ein weiterer wichtiger Meilenstein, der die Weiterentwicklung der Biologie von einer eher phänomenologisch orientierten Wissenschaft hin zur modernen Molekularbiologie mit ausgelöst hat. Die Entdeckung der verschiedensten biochemischen Verfahren und Methoden, wie DNA-Sequenzierung[7] und Polymerase-Kettenreaktion (PCR),[8] hat dazu geführt, dass es heute möglich ist verschiedenste Biomoleküle – typischerweise mit Größen im Nanometerbereich – gezielt herzustellen, zu verändern und zu untersuchen. Chemische Verfahren ermöglichen zudem die spezifische Kopplung von Biomolekülen an „tote Materie“ wie Festkörperoberflächen.[9,10] Dies ist wiederum vielfach die Voraussetzung für eine genaue Untersuchung mit physikalischen Methoden. Gleichzeitig wurden Systeme entwickelt, mit denen große supramolekulare Strukturen mit Ausdehnungen über mehrere Nanometer gezielt synthetisiert werden können.[11-14] Auch in der theoretischen Beschreibung und Simulation gibt es große Fortschritte, so dass es mit den derzeit verfügbaren Computern möglich ist das Verhalten von Systemen aus einigen hundert Atomen durch ab initio Rechnungen zu beschreiben.[15-20] Es scheint also zwangsläufig, dass die

einzelnen Disziplinen auf der Nanometerskala zusammentreffen und auch zusammenwachsen.

Während die ersten Untersuchungen mit den verschiedenen neuen Techniken meistens auf ein Verständnis der Systeme durch Beobachtung abzielten ist heute eine Tendenz zur gezielten Manipulation von Materie auf der Nanometerskala erkennbar. Der Aufbau von funktionalen Elementen mit molekularen Dimensionen scheint als ultimatives Ziel der Miniaturisierung auch die Möglichkeiten für eine ökonomischere Ressourcenverwertung zu bieten. Viele dieser Visionen sind aber geprägt von Konzepten, die sich in der Makrowelt bewährt haben. Doch im Zuge des immer weiter gehenden Verständnisses hat sich gezeigt, dass effiziente molekulare Systeme nicht einfach durch die Verkleinerung von Mikrosystemen entworfen werden können.[21] Vielmehr sind grundlegend andere Denkweisen und Designstrategien nötig, um die auf kleinen Skalen vorherrschenden Kräfte zu „domestizieren“. So ist die Euphorie über die aus der Makrowelt nicht gekannten Eigenschaften von Nanomaterialien, wie etwa Kohlenstoff-Nanoröhren,[22,23] teilweise der Erkenntnis gewichen, dass diese Eigenschaften häufig sogar eine notwendige Voraussetzung für Stabilität und Funktionalität kleinster Systeme sind. Es erscheint deshalb sinnvoll, auf schon existierende Systeme zurückzugreifen, wie sie in der Biologie in verschiedensten Ausprägungen vorhanden sind. In jeder einzelnen Zelle findet sich eine große Zahl von „Nanomaschinen“ und Mechanismen, die die verschiedensten Funktionen erfüllen: Auf der DNA einer einzigen menschlichen Zelle ist etwa die gleiche Informationsmenge gespeichert wie auf einer CD und Motorproteine können Materie mit hohen Wirkungsgraden über Strecken von Mikrometern mechanisch bewegen. Der Treibstoff für die Aktivität der meisten biologischen Systeme – das ATP – wird dabei ebenfalls direkt in Zellen über den Metabolismus bzw. über Photosynthese hergestellt.[24] Will man einzelne Elemente in vitro untersuchen oder als Bauteile komplexerer Mechanismen einsetzen, so ist es notwendig, die Systeme immer mit hinreichend großen Konzentrationen von ATP zu versorgen. Da dies nicht immer praktikabel ist, wird auch angestrebt, Licht als Energiequelle nutzbar zu machen.[11] Generell lässt dies zwar niedrigere Effizienzen erwarten, aber dafür bieten sich neue Möglichkeiten zur Steuerung und Manipulation einzelner Komponenten. Das wiederum könnte helfen, das Problem der Ankopplung von Nanosystemen an die Makrowelt zu lösen.

Doch auf dem Weg hin zum gezielten Design und „praktischen“ Einsatz funktionaler nanoskopischer Systeme ist noch viel Raum für neue Entwicklungen.
Die Fortschritte, die in den vergangenen Jahren gemacht wurden, sind vielfältig. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, exakt definierte geometrische Strukturen aus DNA aufzubauen,[25,26] und dass DNA eingesetzt werden kann, reversible Konformationsumwandlungen zu durchlaufen.[27,28] Mit Hilfe von Oligonukleotiden ist es möglich, Kolloide, Nanokristalle und Proteine in geordnete Strukturen anzuordnen.[29-33] Auch die Möglichkeiten, funktionale Elemente und Materialien mit veränderbaren Eigenschaften aus Polypeptiden aufzubauen, werden immer vielseitiger.[34,35] Gleichzeitig ist der Fortschritt im Bereich der nicht biogenen Nanomaterialien immens. Mittlerweile wurden so schon verschiedenste elektronische Elemente aus Kohlenstoff-Nanoröhrchen[22,23] und leitfähigen Polymeren[36,37] realisiert. Mit einer Weiterentwicklung der chemischen Funktionalisierung[38] ist hier auch eine spezifische Kopplung – und damit die Grundlage für den „bottom-up“ Aufbau von Strukturen – möglich. Dagegen können andere gezielt aufgebaute Makromoleküle schon jetzt elektrochemisch geschaltet werden und Konformationsumwadlungen ausführen, die sie etwa für nanoskopische Speicherelemente geeignet erscheinen lassen.[11]
Eine Schlüsselrolle in der momentanen Forschung kommt den sogenannten Einzelmolekül-Techniken zu, die es erlauben, molekulare Systeme direkt zu untersuchen. Neben den abbildenden Techniken wie Einzelmolekülfluoreszenz,[39] Elektronenmikroskopie (EM), Raster-Tunnelmikroskopie (STM),[2] optischer Nahfeldmikroskopie (SNOM)[40] und Kraftmikroskopie (AFM)[1] sind mittlerweile auch die spektroskopischen Methoden, wie etwa optische, Tunnelstrom- und Kraftspektroskopie nicht mehr wegzudenken. Nach der Etablierung dieser wird in jüngster Zeit immer mehr versucht, verschiedene Techniken im gleichen Experiment zu kombinieren. So konnte an einem einzelnen Azopeptid-Polymer eine lichtinduzierte Konformationsumwandlung direkt mechanisch detektiert werden.[41] In anderen Experimenten werden abbildende Kraftmikroskopie mit Kraftspektroskopie[42,43], Einzelkanal Patch-Clamp mit Fluoreszenztansfer-Messungen[44] oder Kraftmessungen mit Einzelmolekül-Fluoreszenz[45] verbunden. Die Fülle an weiteren interessanten Kombinationsmöglichkeiten scheint unbegrenzt.

Trotz des beeindruckenden Fortschritts in vielen Bereichen sind die meisten neu entwickelten nanoskopischen Systeme aber noch weit davon entfernt tatsächlich praktischen Nutzen außerhalb der Grundlagenforschung zu bringen. Dennoch werden schon heute nanoanalytische Techniken und Hilfsmittel dazu eingesetzt, um neue Information zu verschiedensten Fragestellungen zu erhalten. Hier ist vor allem die Untersuchung elementarer biologischer Prozesse von Bedeutung, da viele Systeme typische Größen von einigen Nanometern besitzen und es eine Reihe an wichtigen Prozessen gibt, die noch weitgehend unverstanden sind. Mögliche Anwendungen reichen von der Untersuchung der Faltungsmechanismen von Proteinen[46] und RNA[47] mit Kraftspektroskopie oder Fluoreszenztransfer[48] über die hochauflösende Abbildung einzelner Moleküle,[49,50] die auch zur Untersuchung dynamischer Prozesse [51-53] und zur Strukturaufklärung verwendet werden kann,[54] bis hin zur Extraktion bestimmter Genregionen aus Chromosomen.[55] In dieser Arbeit wurde Kraftmikroskopie als nanoanalytische Technik eingesetzt, um gezielt die Beziehung zwischen Kraft und Struktur in DNA zu untersuchen. Insbesondere wurde dabei die Wechselwirkung von DNA mit verschiedenen pharmakologisch relevanten Substanzen, wie Chemotherapeutika und Antibiotika, untersucht. So konnte hier – wie auch in vielen anderen neueren Arbeiten – gezeigt werden, dass Nanotechnologie und Nanoanalytik schon heute Nutzen bringend eingesetzt werden können, z.B. im Einsatz als Messsysteme höchster Präzision, die es erlauben verschiedenste Fragestellungen direkt anzugehen und zu lösen.

2. Kraftspektroskopie

2.1. Kraft als Strukturparameter

Fast alle klassischen Beschreibungen molekularer Systeme beruhen auf energetischen Betrachtungen. Die Grundlage solcher Energie-basierter Rechnungen bildet häufig die Beschreibung des Systems als statistisches Ensemble, das sich im thermodynamischen Gleichgewicht befindet oder einem konstanten Energie- oder Entropiezu- und abfluss ausgesetzt ist. So bilden in vielen klassischen Experimenten die Energien als Ensemblemittel die eigentlichen Messgrößen. Die Entwicklung verschiedener Einzelmolekültechniken hat in den letzten Jahren jedoch dazu geführt, dass immer häufiger auch Kräfte als Strukturparameter untersucht werden. Als vektorielle Größen bieten Kräfte etwa die Möglichkeit auch komplexere „Energielandschaften“ zu untersuchen, die mit thermodynamischen Methoden nicht zugänglich sind. Mit Kraftexperimenten an einzelnen Molekülen können so etwa verschiedene Reaktionswege für bestimmte Prozesse analysiert werden, z. B. beim Auftrennen von DNA-Doppelsträngen in unterschiedlichen topologischen Anordnungen. Außerdem ist es durch die genaue Kontrolle von Kräften möglich, einzelne Moleküle gezielt in Zustände zu bringen, die zwar für die Funktion relevant sind, aber nicht im Ensemble detektiert werden können. Es hat sich gezeigt, dass vor allem in biologischen Systemen Kräfte eine präzisere Beschreibung erlauben, die ein besseres Verständnis von Stabilität und Funktionalität molekularer Systeme ermöglichen. Offensichtlich ist die Bedeutung von maximalen Zug- und Haltekräften der verschiedenen Motorproteine, die für jegliche Art von aktiver Bewegung und Transport in allen biologischen Systemen verantwortlich sind. Aber auch in anderen Systemen, wie etwa Rezeptor-Ligand Paaren, zellulären Adhäsionsproteinen und den Proteinen des Zytoskeletts, die Zellen ihre mechanische Stabilität verleihen, spielen Kräfte eine wesentliche Rolle. Da die Kräfte immer einen sehr engen Bezug zur jeweiligen Funktion haben, bildet die Untersuchung eben dieser Kräfte auch eine wichtige Grundlage für das Verständnis der zu Grunde liegenden Prozesse.

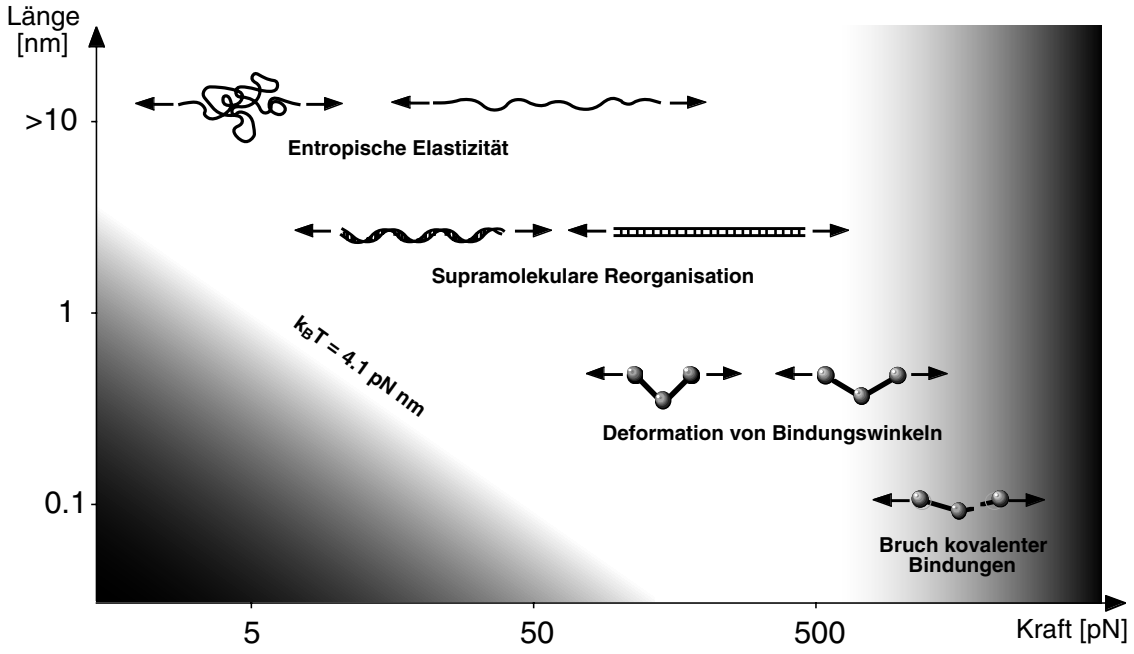


Abbildung 1: Kraft und Längenskala für einzelne Moleküle.[56]

Die relevante Kraftskala für molekulare Prozesse ist in Abbildung 1 dargestellt und befindet sich im wesentlichen im Bereich von Pikonewton (pN). Die Kräfte hängen dabei sehr eng mit der Größe der betrachteten Systeme zusammen, die von etwa einem Nanometer (Ausdehnung einzelner Moleküle) bis zu einigen Mikrometern (Größe einzelner Zellen) reicht. Die untere Grenze auf der relevanten Kraftachse wird bestimmt von der Kraft, die durch thermische Fluktuationen ausgeübt wird. Biologische Prozesse sind nur in Gegenwart von flüssigem Wasser möglich, typischerweise bei Temperaturen um 300 K. Bei Raumtemperatur ist die thermische Energie k_BT gerade 4,1 pN•nm ($4{,}1 \cdot 10^{-21}$ J). Das bedeutet, dass durch thermische Anregung Kräfte von einigen Pikonewton über eine Strecke von etwa einem Nanometer ausgeübt werden. Dementsprechend werden etwa auf ein über einige 100 nm ausgestrecktes Molekül thermische Kräfte von einigen 10 Femtonewton (fN) wirken, während etwa über die Breite einer Bindung mit 0,4 nm Breite schon Kräfte von 10 pN auftreten. So lassen sich auch die molekularen Prozesse, die durch von außen angelegte Kräfte ausgelöst werden, in typische Kraftbereiche einteilen. Entropische Polymerknäuel werden schon bei wenigen pN entfaltet, im Bereich einiger 10 pN finden verschiedene Prozesse statt, die den Aufbau supramolekularer Komplexe verändern, wie etwa das Aufbrechen von Rezeptor-Ligand Bindungen, das Entfalten von Proteindomänen oder das Überstrecken von DNA. Bei einigen 100 pN wer-

den Bindungen so stark überstreckt, dass sich die Konformationen und Bindungswinkel einzelner Moleküle ändern können, bis dann bei einigen Nanonewton (nN) die Stabilitätsgrenze kovalenter Bindungen erreicht ist und die Moleküle „reißen“.[56-59]

2.2. Messung von Kräften/ Kraftspektren

Bei der Untersuchung molekularer Kräfte ist es wichtig zwischen Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichtsprozessen zu unterscheiden. Entscheidend ist dabei immer die Zeitskala, auf der sich Gleichgewichte einstellen. Die typischen Relaxationszeiten innerhalb der molekularen Komplexe in Flüssigkeiten können dabei zwischen 10^{-13} s für kleinere Moleküle[60] und Sekunden[61-63] für das relaxieren überdehnter Polymere liegen. In Systemen mit komplexeren „Energielandschaften“, wie sie etwa in Proteinen oder Gläsern auftreten, ist es auch möglich, dass das System über größere Zeiträume in Nebenminima gefangen ist, die nicht dem thermodynamischen Gleichgewichtszustand entsprechen. Die zugehörigen Relaxationszeiten hängen dabei von der Höhe der Energiebarriere zwischen dem momentanen und dem Gleichgewichtszustand ab[60] (siehe auch Anhang 6.3).
Für die Messung molekularer Kräfte wurden in den vergangenen Jahren Techniken entwickelt, die verschiedene dynamische Bereiche und Empfindlichkeiten umspannen. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die verbreitetsten Methoden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften auch für die Untersuchung der verschiedensten Systeme geeignet sind.

Technik	**Kraftbereich[pN]**	**Zeitauflösung**
magnetische Kugeln	0.01-100	1s
optische Falle (OT)	0.1-150	10 ms
Mikronadeln	>0,1	0,1-100 ms
Biomembrane Force Probe (BFP)	0,5-1000	1 ms
Kraftmikroskop (AFM)	>1	10 ms

Tabelle 1: Techniken zur mechanischen Untersuchung einzelner Moleküle.[56]

Zur Messung von Kräften wird jeweils ein empfindlicher Kraftsensor benötigt, etwa eine Feder, deren Auslenkung dann ausgemessen und direkt in eine Kraft umgerechnet wird. Im Falle der magnetischen Kugeln[64,65] wird die Kraft über die Auslenkung der Kugel in einem magnetischen Gradientenfeld bestimmt. In einer optischen Falle wird eine dielektrische Kugel im Fokus eines Laserstrahls gefangen. Die auftretende Rückstellkraft ist dann proportional zur Auslenkung der Kugel aus dem Fokus und kann optisch ausgelesen werden.[66,67] Eine Erweiterung dieser Technik, bei der die räumlichen thermischen Fluktuationen der Kugel im Feld der Falle aufgezeichnet werden, erlaubt auch eine Kraftmessung in allen drei Raumrichtungen.[68] Die Technik des „Biomembrane Force Probe“ (BFP) benutzt als Kraftsensor ein Membranvesikel, das mit Hilfe einer Mikropipette unter Druck gesetzt wird.[69] Im Kraftmikroskop und bei Mikronadeln wird die Kraft über eine Balkenfeder („Cantilever“ bzw. die Mikronadel selbst) übertragen und die Verbiegung in der Regel optisch ausgelesen, was interferometrisch oder über einen Lichtzeiger geschehen kann. Die maximal erreichbare Empfindlichkeit der Messung hängt wesentlich von den Eigenschaften des Kraftsensors ab: Die Zeitauflösung wird durch die Resonanzfrequenz des Kraftsensors limitiert, Orts- und Kraftauflösung werden von thermischen Fluktuationen begrenzt. Im thermodynamischen Mittel besitzt nach dem Gleichverteilungssatz jeder quadratisch zur Gesamtenergie beitragende Freiheitsgrad die Energie $^1/_2\, k_B T$. Das bedeutet, dass die kraftübertragende Feder mit der Federkonstante k_C im Mittel jeweils die potenzielle Energie $^1/_2\, k_C \langle \Delta x^2 \rangle = {}^1/_2\, k_B T$ besitzt. Damit ist die mittlere quadratische Auslenkung $\langle \Delta x^2 \rangle = k_B T / k_C$, also umgekehrt proportional zur Federhärte.[1] Gleichzeitig ergibt sich eine mittlere quadratische Kraftfluktuation $\langle \Delta F^2 \rangle = k_C^2 \langle \Delta x^2 \rangle = k_B T \bullet k_C$, die proportional zur Federhärte ist. Anders formuliert könnte man die Beziehung auch als eine „thermische Unschärferelation“ bezeichnen:

$$\langle \Delta F \bullet \Delta x \rangle = k_B T .$$

Das bedeutet, dass die Kontrolle kleiner Kräfte prinzipiell die Verwendung weicher Kraftsensoren erfordert, während hohe mechanische Stabilität (also möglichst geringe mittlere Auslenkungen) nur mit harten Federn zu erreichen ist. Ein genaues Abwägen dieser gegensätzlichen Faktoren ist die Voraussetzung für

[1] Diese Beziehung wird auch dazu benützt die Federhärte im Experiment zu messen.

die mechanische Messung und Manipulation einzelner Moleküle. Zu harte Kraftsensoren können durch die großen thermischen Kraftfluktuationen die Proben irreversibel beschädigen, während zu weiche Sensoren eine exakte Positionierung unmöglich machen. Bei der Kraftmessung ist es jedoch auch möglich, die Kraftempfindlichkeit zu verbessern indem man die Messwerte über längere Zeiträume mittelt. Da die Fluktuationen um den Gleichgewichtszustand herum auftreten, lässt sich dieser genauer bestimmen, wenn man die Frequenzbreite der Messung beschränkt. Die Kraftsensoren werden durch thermische Fluktuationen vor allem zu Schwingungen mit ihrer eigenen Resonanzfrequenz angeregt. Deshalb ist es vorteilhaft Sensoren mit hohen Resonanzfrequenzen einzusetzen, da diese über den Mittelungszeitraum viele eigene Schwingungszyklen durchlaufen können, und so eine genauere Messung ermöglichen.[2] Mit dem Kraftmikroskop kann so bei einer Auflösung im Bereich von einigen Millisekunden die Kraftskala von einigen pN bis hin zu vielen nN abgedeckt werden.[3] In den vergangenen Jahren wurden immer mehr verschiedene Systeme mit Kraftspektroskopie charakterisiert und auch die behandelten Fragestellungen werden dabei zunehmend spezieller und komplexer. Der Schwerpunkt der Forschung liegt nach wie vor bei der Untersuchung von Biomolekülen. Insbesondere werden immer weitergehende Probleme im Bereich der Proteinfaltung und -entfaltung untersucht.[43,70-76] Auch die verschiedenen Motorproteine, wie Myosin,[77-79] Kinesin[80-83] oder ATP-Synthase[84] werden weiter intensiv untersucht, vor allem mit optischen Fallen.[67,85,86] Ebenso intensiv wird das Verhalten einzelner DNA-[64,87-104] und RNA-Moleküle[47,105] unter dem Einfluss äußerer Kräfte untersucht. Außerdem wurde gezeigt, dass in Zuckermolekülen bei jeweils charakteristischen Kräften Konformationsumwandlungen induziert werden,[106,107] mit Hilfe derer es möglich ist verschiedene Moleküle analytisch zu unterscheiden.[108]

Neben den eigentlichen mechanischen Eigenschaften der Moleküle selbst ist auch die Untersuchung von Bindungskräften – auch im Hinblick auf eine Cha-

[2] In Flüssigkeiten sind die Schwingungen stark gedämpft, was zu stark verbreiterten Resonanzspektren führt. Dennoch ist auch hier die thermische Anregungsenergie im Bereich der Resonanzfrequenz am größten.

[3] Die derzeit weichsten kommerziell erhältlichen Cantilever besitzen Federkonstanten von etwa 6 mN/m bei Resonanzfrequenzen um 3 kHz. Damit können bei einer Zeitauflösung im Bereich einiger Millisekunden Kräfte von wenigen Pikonewton detektiert werden.

rakterisierung der zugehörigen Potenziallandschaften – weiter von großem Interesse. Die Anwendungen reichen dabei von der Charakterisierung von Rezeptor-Ligand Systemen[109-118] und Oligonukleotiden[119-122] bis hin zur Messung von Desorptionskräften synthetischer Polymere von Oberflächen[123] und der Haltekraft kovalenter Bindungen.[124]

2.3. Theoretische Beschreibung von Polymeren unter Kraft

Lange Moleküle nehmen immer eine Konformation mit minimaler freier Energie an, die durch enthalpische und entropische Beiträge bestimmt wird. Dabei werden die enthalpischen Kräfte das Molekül in bestimmte geometrische Konformationen[4] bewegen, während die Entropie ein „Zufallsknäuel“ begünstigt.[125-128] In Lösung wird das Molekül von außen durch die Brownsche Molekularbewegung zu thermischen Fluktuationen angeregt. So wird das Molekül im Zeitverlauf den zugänglichen Konformationsraum austesten und dabei im thermodynamischen Mittel eine typische Größe haben bzw. eine bestimmte End-zu-End-Ausdehnung annehmen. Die Grundlage der klassischen theoretischen Beschreibung von Polymeren bildet üblicherweise die Betrachtung des Moleküls als Ensemble von Untereinheiten oder Monomeren in einem Wärmebad. Im einfachsten Fall des Gaußschen Knäuels beschreibt man das Polymer der Länge L_C als Kette aus N Segmenten der Länge L_K, es gilt also $L_C = N\,L_K$. Die Segmente können zueinander zufällig orientiert sein, wobei alle möglichen Anordnungen energetisch gleichwertig sind. Damit kann man leicht die Zustandssumme der Kette als Ensemble und daraus den mittleren End-zu-End-Abstand im Gleichgewicht berechnen. Für ein solches Molekül, auch freie Kette (freely jointed chain, FJC) genannt, ergibt sich ein mittlerer quadratischer End-zu-End-Abstand von

$$\langle R^2 \rangle = N\,L_K^2,$$

bzw. ein Gyrationsradius

$$\langle R_G^2 \rangle = 1/6\,N\,L_K^2.$$

[4] Man denke etwa an feste Bindungswinkel.

Zur Beschreibung des Ausdehnungsverhaltens eines solchen Polymers unter dem Einfluss einer äußeren Kraft betrachtet man die Zustandssumme Z(F) des Ensembles, in die nun noch die Streckenergie für jede mögliche Ausdehnung eingeführt wird. Der mittlere End-zu-End-Abstand <z> des Moleküls bei einer Rückstellkraft F ergibt sich aus der freien Energie E_F zu:

$$< z >= -\left(\frac{\partial E_F}{\partial F}\right)_T = -k_B T \frac{\partial \ln[Z(F)]}{\partial F} = NL_K\left[\coth\left(\frac{FL_K}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{FL_K}\right] = NL_K \mathcal{L}\left(\frac{FL_K}{k_B T}\right),$$

mit der Langevinfunktion $\mathcal{L}(x)$. Die Kraft in Abhängigkeit der Dehnung ergibt sich durch die Umkehrung dieser Beziehung:

$$(1) \qquad < F(z) >= \frac{k_B T}{L_K} \mathcal{L}^{-1}\left(\frac{z}{NL_K}\right).$$

Diese Beziehung behält ihre Gültigkeit, wenn man statt der frei beweglichen Kettenglieder feste Bindungswinkel zwischen den Segmenten annimmt, um die das Molekül frei rotieren kann (frei rotierende Kette). In diesem Fall bezeichnet die Größe L_K aber nicht mehr die wahre Segmentlänge, sondern eine effektive Segmentlänge, die sogenannte Kuhn-Länge des Moleküls. Zu beachten ist jedoch die Grundannahme des hier verwendeten Gibbs-Ensembles, nämlich dass eine konstante Kraft an das Molekül angelegt wird und sich dazu jeweils die Gleichgewichtsausdehnung *z* einstellt. Das ist zwar nicht streng erfüllt, doch hat es sich gezeigt, dass die Annahme für Experimente mit weichen Kraftsensoren - wie sie üblicherweise eingesetzt werden - hinreichend gut erfüllt ist.[98,129]
Alternativ zu diesen diskreten Ensemble-Modellen ist es auch möglich, ein Molekül als Kontinuum zu beschreiben. Das Modell der semiflexiblen Kette (Worm-Like-Chain, WLC) nimmt an, dass das Polymer der Konturlänge L_C eine feste Biegesteifigkeit B besitzt. Durch Wechselwirkung mit der Umgebung wird das Molekül dann thermisch zu Biegefluktuationen angeregt. Die charakteristische Länge $L_P=B/(k_BT)$, über die Richtungskorrelationen entlang des Rückgrats abfallen, nennt man Persistenzlänge. Ohne äußere Kräfte bildet eine WLC so ein Knäuel mit einer mittleren End-zu-End-Ausdehnung

$$<R^2>=2\, L_C\, L_P.$$

Im Grenzfall weicher langer Ketten ergibt sich durch Vergleich mit der freien Kette

$$L_K = 2\,L_P.$$

So ist es möglich das Kontinuumsmodell der WLC direkt mit den diskreten Kettenmodellen zu vergleichen. Das exakte Kraft-Ausdehnungs Verhalten einer WLC läßt sich nicht geschlossen angeben, jedoch wurden Näherungsformeln entwickelt, die diese Beziehung approximieren. Die meisten publizierten Arbeiten benützen die Näherungsformel von Bustamante, Marko und Siggia:[130]

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_P}\right)\left[\frac{z}{L_C} + \frac{1}{4\left(1-\frac{z}{L_C}\right)^2} - \frac{1}{4}\right] \text{ mit } F >> \frac{k_B T}{L_P}, \tag{2}$$

die aber im Bereich zwischen 1 und 20 pN um bis zu 10% von der wahren Lösung abweicht. Diese Abweichung von der exakten Lösung wurde von Bouchiat et al.[131] numerisch berechnet und durch eine Potenzreihe beschrieben, so dass sich mit den Koeffizienten α_i (i=1,...,7) das Verhalten bis auf 0,01% Abweichung angeben lässt:

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_P}\right)\left[\frac{z}{L_C} + \frac{1}{4\left(1-\frac{z}{L_C}\right)^2} - \frac{1}{4} + \sum_{i=2}^{7}\alpha_i\left(\frac{z}{L_C}\right)^i\right]. \tag{3}$$

i	2	3	4	5	6	7
α_i	-0,5164228	-2,737418	16,07497	-38,87607	39,49944	-14,17718

Tabelle 2: Koeffizienten für WLC-Formel (3).[131]

In der Grundform wird sowohl im FJC als auch im WLC Modell die Konturlänge L_C des Polymers als fest angenommen, das heißt beide Modelle erlauben kein Überstrecken der Moleküle über die Länge des molekularen Rückgrats hinaus. Nachdem aber experimentell gezeigt werden konnte, dass dies bei vielen Molekülen möglich ist, wurden die Modelle entsprechend phänomenologisch erweitert indem zusätzlich zur entropischen Elastizität ein linear Hookescher Elastizitätsterm in die Kraft-Abstands Beziehung eingeführt wurde. Dies geschieht am einfachsten indem man in Gleichungen (1), (2) und (3) die relative Ausdehnung

z/L_C durch $z/L_C - F/S$ ersetzt, wobei L_C die Konturlänge des entspannten Moleküls und S dessen linearen Streckmodul bezeichnet.[87,131] Im Experiment hat sich gezeigt, dass häufig eine Aufteilung in Regimes mit überwiegend entropischer bzw. enthalpischer Elastizität möglich ist. Bei kleineren Kräften dominieren entropische Effekte, während bei größeren Kräften (einige 100 pN) - wenn das Polymer schon bis auf etwa L_C gedehnt ist - die enthalpische Elastizität dominierend ist.

3. DNA und DNA-bindende Moleküle

3.1. DNA

DNA ist ein lineares Polymer, das sich aus einzelnen Untereinheiten, den Nukleotiden, zusammensetzt. Die Nukleotide bestehen wiederum aus drei Teilen: einem Zuckermolekül (bei DNA Desoxyribose, bei RNA Ribose), einer Phosphatgruppe und einer heterozyklischen Stickstoffbase. Während Zucker und Phosphat gemeinsam das Rückgrat der DNA bilden, ist die genetische Information in den Basen codiert. In DNA treten die vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin auf, die jeweils mehrere Wasserstoffbrücken ausbilden können.

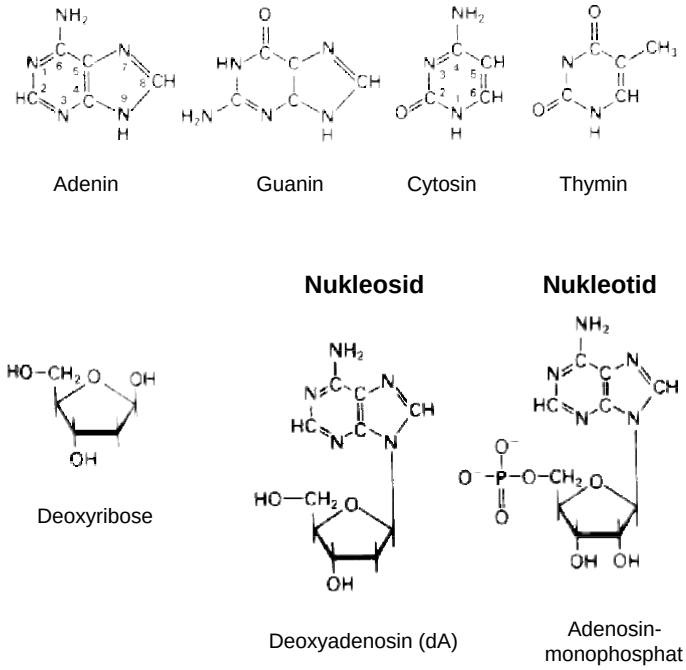


Abbildung 2:

Die vier DNA-Basen (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) bilden zusammen mit der Deoxyribose Nukleoside. Durch die weitere Anbindung einer Phosphatgruppe entsteht ein Nukleotid, die Untereinheit des DNA-Moleküls.[132,133]

In der von Watson und Crick entdeckten doppelhelikalen B-DNA-Struktur[6] bilden zwei antiparallel angeordnete Stränge eine rechtsgängige Helix aus, bei der sich das Zucker-Phosphat-Rückgrat an der Außenseite befindet und die Basen gestapelt und gepaart im Zentrum liegen. Voraussetzung für die Ausbildung dieser Doppelhelix ist es, dass die jeweils gegenüberliegenden Basen komplementär und über Wasserstoffbrücken verbunden sind: Adenin bildet mit Thymin immer zwei Wasserstoffbrücken, Guanin und Cytosin koppeln über drei

Wasserstoffbrücken. In der B-DNA-Konformation bilden sich an der Außenseite der Helix zwei unterschiedlich breite Furchen aus („minor groove“ und „major groove“), in denen mögliche Bindungsstellen für andere Moleküle liegen.

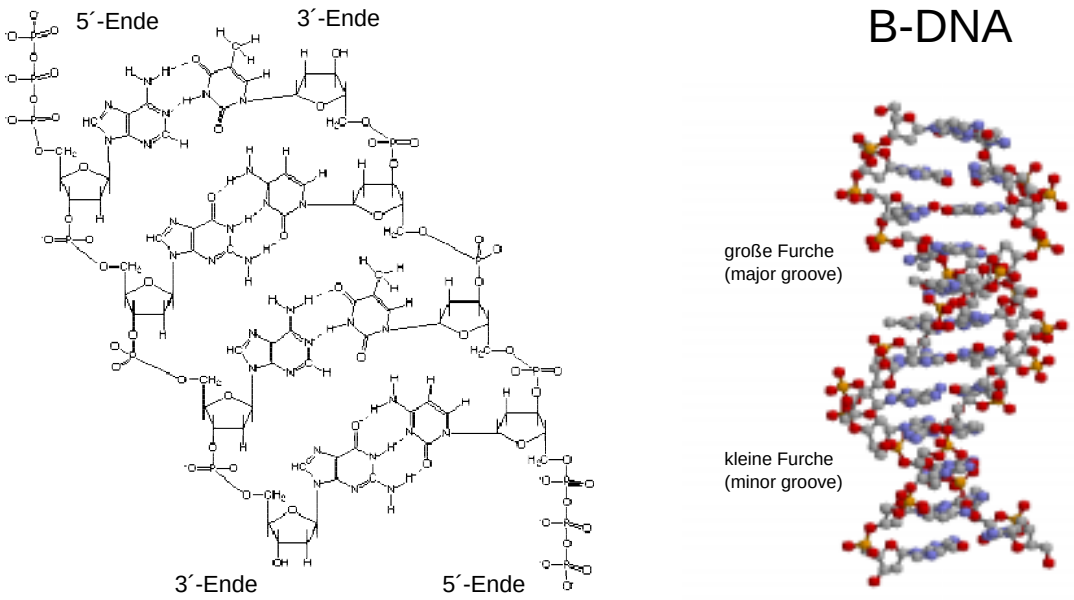


Abbildung 3: In B-DNA sind die beiden Einzelstränge antiparallel orientiert und über die komplementären Basenpaare aneinander gebunden.[133]

Unter physiologischen Bedingungen trägt DNA eine negative Nettoladung im Rückgrat,[134] die durch die Kondensation von positiven Gegenionen aus der Lösung teilweise neutralisiert wird (Manning-Kondensation[135]).

Die freie Bindungsenergie der Doppelstrangbildung setzt sich zusammen aus den entropischen Anteilen, die im wesentlichen von den hydrophoben Basen und der Konformationsentropie der Einzelstränge herrühren, und enthalpischen Anteilen der Basenstapelung, der Bildung der Wasserstoffbrücken und der elektrostatischen Abstoßung der beiden Rückgrate. Die genauen Werte hängen dabei nicht nur vom jeweiligen Basenpaar ab, sondern auch von den nächsten Nachbarn und den Umgebungsbedingungen, wie pH und Salzkonzentration.

Durch Erhitzen kann doppelsträngige DNA in die beiden Einzelstränge aufgespalten werden, was man auch als „Denaturieren“ oder „Schmelzen“ bezeichnet. Dieser Übergang ist hochgradig kooperativ und findet in kurzen Oligomeren je nach Sequenz bei einer bestimmten Temperatur statt. Dabei haben GC-reiche

Sequenzen tendenziell höhere Schmelztemperaturen als AT-reiche. Für lange Moleküle mit einigen hundert Basen liegen die Schmelztemperaturen bei physiologischer Salzkonzentration bei etwa 75 bis 90°C.[136] Die Bindungsenthalpie und -entropie wurde für alle möglichen Basenabfolgen mittels Kalorimetrie und optischer Spektroskopie bestimmt.[137] So kann die Stabilität von Oligonukleotiden beliebiger Sequenz mit guter Genauigkeit berechnet werden.

Neben DNA gibt es noch eine große Zahl anderer polymerer Nukleinsäuren, die sich von DNA in allen Untereinheiten der Nukleotide unterscheiden können. So besitzt etwa die natürlich vorkommende RNA im Gegensatz zu DNA ein Ribosemolekül anstelle der Desoxyribose und Uracil statt der DNA-Base Thymin. In den vergangenen Jahren wurden – insbesondere im Rahmen der Entwicklung von sogenannten Antisense-Medikamenten (siehe 3.2.2) – auch viele Polynukleinsäuren synthetisiert, die zum Teil auch eine größere Affinität zu einem komplementären DNA-Strang aufweisen als DNA selbst.

LNA ist ein RNA Derivat, in dem die Ribose durch eine 2‘O, 4‘-C-Methylenbrücke in der Konformation festgehalten ist.[138,139] LNA bildet mit DNA B-DNA-artige Duplexe, die stabiler sind als reine DNA-Duplexe. Da die Struktur des Moleküls ansonsten identisch mit der von DNA ist, können auch einzelne LNA-Basen direkt in DNA-Moleküle eingebunden werden. Solche Hybridmoleküle haben dann eine stärkere Affinität zu DNA und bieten so vielfältige Anwendungsmöglichkeiten als Antisense-Medikamente oder in der Sensorik.[5]

Eine andere mittlerweile weit verbreitete synthetische Polynukleinsäure ist PNA (peptide nucleic acid),[140] die an Stelle des Phosphat-Zucker-Gerüsts ein Peptid-Rückgrat besitzt. Auch PNA bildet mit DNA sehr stabile Duplexe aus, wobei durch das ungeladene Peptid-Rückgrat sogar eine Verdrängen von DNA aus Doppelsträngen möglich ist. Gleichzeitig steigt dabei aber die Wahrscheinlichkeit von Fehlpaarungen innerhalb des Doppelstrangs.[6] Durch die unterschiedliche chemische Struktur des Rückgrats ist es auch nicht einfach möglich PNA- und DNA-Nukleotide innerhalb eines Polymers zu kombinieren. Neben den möglichen pharmakologischen und analytischen Anwendungsmöglichkei-

[5] Die im Rahmen dieser Arbeit an LNA durchgeführten Messungen sind im Anhang 6.4 zusammengefasst.

[6] Auch für andere DNA bindende Moleküle konnte gezeigt werden, dass die Ladung vor allem die Affinität beeinflusst, während die Selektivität von anderen Faktoren bestimmt wird.[141]

ten werden DNA und andere synthetische Nukleinsäuren auch immer mehr als Bausteine zum „bottom-up“ Aufbau von Strukturen auf der Nanometerskala verwendet. Dabei wird vor allem der Selbsterkennungsmechanismus komplementärer Moleküle ausgenützt, um bestimmte topologosche Strukturen[25,142] oder mechanisch bewegliche Elemente[28] aufzubauen und Proteine,[31] Metallkolloide[30] oder Halbleiter-Nanokristalle[32,33] zu positionieren. Außerdem wird DNA als Vorlage zur Ausbildung metallischer Strukturen auf der Nanometerskala eingesetzt. Dazu wird an DNA-Molekülen in autokatalytischen Prozessen aus Lösung Metall abgeschieden, was den DNA-gesteuerten Aufbau von elektrischen Kreisen ermöglichen soll.[143-146]

3.2. DNA-bindende Moleküle

Viele Moleküle treten mit DNA in Wechselwirkung indem sie direkt an die Doppelhelix binden. Eine Vielzahl von Enzymen regelt die Mechanismen der Genexpression und DNA-Vervielfältigung. Die Bindung der DNA an Histone ermöglicht die hohe Kompaktierung im Zellkern und die spezifische Bindung von Hormonen an DNA ist die Voraussetzung für das Auslösen verschiedenster Reaktionen. In vielen Fällen findet die Bindung hoch spezifisch an bestimmten Sequenzen statt, wie etwa bei den Endonukleasen, die die Doppelhelix an bestimmten Sequenzen schneiden und als Werkzeuge bei der Erforschung und Manipulation von Genen unverzichtbar sind. Außerdem existiert eine große Zahl an relativ kleinen Molekülen, die ebenfalls direkt an DNA binden und so die verschiedenen natürlichen Prozesse stören oder verhindern können. Viele dieser Substanzen werden deshalb als hoch wirksame Pharmaka gegen verschiedenste Krankheiten eingesetzt.[134,136,147]

3.2.1. Bindungsmoden

Die Bindung an DNA kann grundsätzlich auf vielfältige Art geschehen. Insbesondere erfordert die Bindung großer Moleküle und Enzyme das Zusammenwirken verschiedener Kräfte, wie elektrostatischer, van-der-Waals- und hydrophober Kräfte, sterischen Wechselwirkungen und der spezifischen Bildung von Wasserstoffbrücken und kovalenten Bindungen. Bei kleinen Molekülen ist die Art der Wechselwirkung mit doppelsträngiger DNA leichter zu klassifizieren,

und man unterscheidet drei Grundtypen, auch Bindungsmoden genannt: Interkalation, Groove-Binding und kovalente Bindung.

Die kovalente Bindung eines Moleküls an die DNA kann entweder an nur einer Stelle (monofunktional) oder auch an mehreren Stellen gleichzeitig (z.B. bifunktional) erfolgen. Das kovalente Quervernetzen der DNA bezeichnet man auch als Crosslinking, wobei die beiden Bindungsstellen entweder auf dem gleichen Strang (Intrastrang-Crosslinks) oder auf beiden Strängen (Interstrang-Crosslinks) liegen können. Im Gegensatz zum Crosslinking bezeichnen Interkalation und Groove-Binding nicht-kovalente Bindungsmoden.

Interkalation geschieht durch das Einfügen planarer Moleküle in die gestapelten Basen im Inneren der Doppelhelix, wobei der Interkalator direkt mit den π-Orbitalen der Basen in Wechselwirkung tritt. Dadurch wird die Doppelhelix lokal überstreckt und entwunden. Interkalation ist meist enthalpisch getrieben, die Wechselwirkung kann durch eine positive Ladung des Interkalators noch weiter verstärkt werden. Typischerweise liegen die Bindungskonstanten von Interkalatoren bei etwa 10^6 M^{-1}.[134,136,148,149]

Minor-Groove-Binder binden von außen in die kleine Furche (minor groove) der Doppelhelix. Dabei kann die Bindung durch verschiedene Kräfte stabilisiert sein. Die meisten Groove-Binder binden selektiv an AT-reiche Sequenzen, da bei diesen die kleine Furche besonders eng und nicht mit Seitengruppen blokkiert ist, so dass eine starke van-der Waals Wechselwirkung möglich ist. Weitere Beiträge zur Bindungsenthalpie kann eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA und die Bildung von Wasserstoffbrücken mit den DNA-Basen liefern. Außerdem ist Groove-Binding generell auch entropisch vorteilhaft, da durch die Bindung Wassermoleküle aus dem Hydratisierungsband in der kleinen Furche verdrängt werden. Dazu müssen auch Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden, wobei die dafür nötige Bindungsenergie durch die Bildung von neuen Wasserstoffbrücken durch den Groove-Binder aufgewogen werden kann. Typische Bindungskonstanten von Groove-Bindern liegen zwischen 10^5 M^{-1} und 10^9 M^{-1}[148,150-153](siehe auch Tabelle 3).

Substanz	Bindungsmode	Bindungsenergie	Referenzen
Cisplatin	Crosslinking	80-160 kcal/mol	[154,155]
Netropsin	Minor-Groove-Binding	7-13 kcal/mol	[151,156-158]
Hoechst 33258	Minor-Groove-Binding	ca. 12 kcal/mol	[151]
Berenil	Minor-Groove-Binding/ Interkalation	6-10 kcal/mol	[159,160]
Ethidium	Interkalation	6-9 kcal/mol	[151,156]
Proflavin	Interkalation	6-8 kcal/mol	[161]

Tabelle 3: Wechselwirkung verschiedener Substanzen mit DNA.

3.2.2. Pharmakologische Relevanz

In den vergangenen Jahren wurden viele Gene identifiziert, die mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung stehen. Neben den Genen, die direkt für die verschiedensten Erbkrankheiten verantwortlich sind, spielen die in jeder Zelle vorliegenden Chromosomenenden (Telomere), die sehr große Anteile an GC-Basenpaaren enthalten, eine wesentliche Rolle beim Alterungsprozess von Zellen und bei Krebserkrankungen.[7] Darüber hinaus sind DNA und RNA natürlich auch die Träger der Erbsubstanz von Krankheitserregern. In vielen Fällen besitzt die DNA von Parasiten typische Gene, die oft reich an AT-Basenpaaren sind, wie z. B. das Chromosom des Malariaerregers Plasmodium falciparum, das zu etwa 80% aus AT Basenpaaren besteht.[153] Aufgrund dieser Zusammenhänge bietet DNA ein ideales Ziel für molekulare Wirkstoffe unerschiedlichster Art. Die spezifische Bindung an bestimmte Sequenzen soll selektiv bestimmte Prozesse blockieren und so die gewünschte pharmakologische Wirkung erzielen. Klassische DNA-bindende Pharmaka bestehen meist aus kleinen Molekülen, die mit einer bestimmten Bindungsmode binden.

[7] Insbesondere tritt bei allen Krebsarten eine erhöhte Aktivität von Telomerase, einem Enzym, das die Länge der Telomere reguliert, auf.

In der kleinen Furche der DNA spiegelt sich die Sequenz durch Variationen in elektrostatischem Potenzial, Hydrophobizität und durch die Positionen möglicher Bindungsstellen für Wasserstoffbrücken wider. Deshalb sind die Minor-Groove-Binder besonders für eine sequenzselektive Bindung geeignet.[153] Abbildung 4 zeigt die Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Groove-Binder. Netropsin ist ein natürlich vorkommendes Oligopeptid, das gegen Bakterien, Pilze und Viren antibiotisch wirkt und auch Anti-Tumor-Aktivität zeigt. Aufgrund seiner zu hohen Toxizität wird Netropsin aber nicht klinisch eingesetzt. Das Molekül ist zweifach positiv geladen, was zu einer elektrostatisch attraktiven Wechselwirkung mit dem DNA-Rückgrat führt, und kann an den Enden Wasserstoffbrücken zu Thymin- und Adeninbasen bilden.[153,157,158] Hoechst 33258 ist ein kationischer synthetischer Farbstoff.[152] Berenil ist ein ebenfalls kationischer Groove-Binder, der mit den terminalen Aminogruppen auch Wasserstoffbrücken zu den DNA-Basen ausbilden kann. In der Praxis wird Berenil vor allem in der Veterinärmedizin gegen Trypanosomen (einzellige Parasiten) eingesetzt. Trotz der antibakteriellen und antiviralen Wirkung zeigt Berenil aber keine signifikante antileukämische Aktivität.[152,159,160]

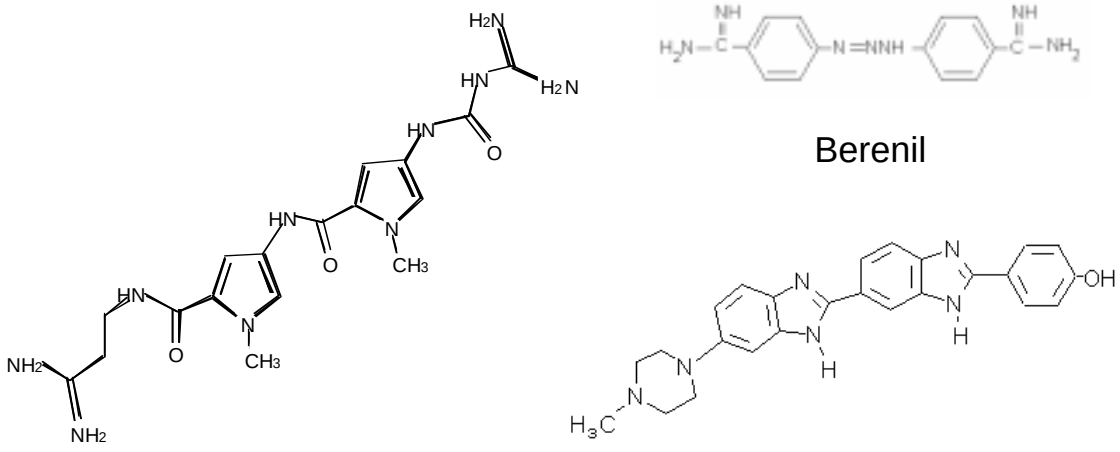
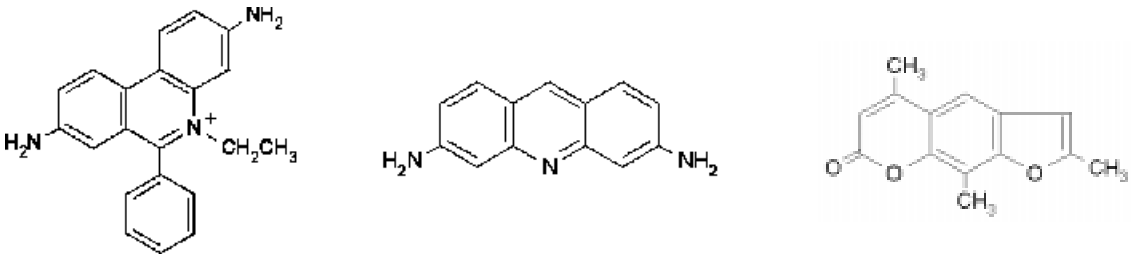


Abbildung 4: Strukturformeln der verwendeten Minor-Groove-Binder.

Die Affinität von Netropsin, Hoechst 33258 und Berenil zu verschiedenen Sequenzen ist unterschiedlich, es wird jedoch von allen Molekülen bevorzugt in die kleine Furche von reinen AT-Basen gebunden. Die Bindungsstellen sind jeweils vier bis fünf Basenpaare lang, die B-DNA-Struktur wird dabei aber kaum

verändert.[141,152,159,162,163] Basierend auf den natürlich vorkommenden Substanzen Netropsin und Distamycin wurden in den vergangenen Jahren neue Strategien zum gezielten Design von Minor-Groove-Bindern entwickelt. Damit ist es heute möglich gezielt Moleküle mit hoher Affinität und Spezifität für nahezu jede beliebige Sequenz zu entwerfen. Diese Liganden werden unter Beachtung bestimmter Designregeln modular aus Pyrrol, Imidazol und Hydroxypyrrol-Grupen zusammengesetzt.[164-166]



Ethidium Proflavin Trimethylpsoralen

Abbildung 5: Strukturformeln der verwendeten Interkalatoren.

Interkalatoren (Abbildung 5) besitzen im Gegensatz zu Minor-Groove-Bindern im allgemeinen keine Sequenzselektivität. Dennoch gibt es viele Interkalatoren, die klinisch eingesetzt werden, in den meisten Fällen als Krebsmedikamente. Die hier verwendeten Interkalatoren Ethidium und Proflavin werden hauptsächlich als Farbstoffe für DNA verwendet. Proflavin wurde außerdem im zweiten Weltkrieg als Desinfektionsmittel eingesetzt. Da der unbestätigte Verdacht bestand, dass Proflavin Krebs auslösen könnte, wurde es über lange Zeit nur noch als Antiseptikum verwendet. Mittlerweile wird Proflavin in der Praxis gegen Schuppenflechte und TypII Herpes Infektionen eingesetzt.[136,149,167] Psoralene finden als natürlich vorkommende Substanzen schon seit der Antike Anwendung in der Behandlung von Hautkrankheiten. Heute werden Psoralene vor allem in Verbindung mit UVA-Bestrahlung gegen Schuppenflechten und Hautkrebserkrankungen eingesetzt, sind aber auch als wirksamer Bestandteil in Bräunungscremes zu finden. Psoralene im allgemeinen, wie auch das hier eingesetzte Trimethylpsoralen,[8] binden zunächst interkalativ an DNA und können dann durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalente Crosslinks bilden.[168-170]

[8] Im Folgenden nur als Psoralen bezeichnet.

Aufgrund der kovalenten Bindung besitzen Crosslinker die mit Abstand größten Wechselwirkungsenergien mit DNA. Der wohl am weitesten verbreiterte Crosslinker im klinischen Einsatz ist Cisplatin, das seit mehr als 30 Jahren in der Chemotherapie eingesetzt wird. Wie die meisten Cytostatika wirkt Cisplatin nur

liche Selektivität für Tumorzellen vor. Der vollständige Wirkmechanismus ist zwar noch nicht verstanden, aber es ist bekannt, dass die bifunktionalen Crosslinks, die Cisplatin vor allem zwischen Guanin-Basen bildet, die beobachtete antiproliferative Wirkung hervorrufen. Die möglichen Addukte, die Cisplatin mit DNA bildet sind in Abbildung 6 schematisch dargestellt, wobei die Bindung zunächst immer an das N7-Atom einer Guanin-Base erfolgt.

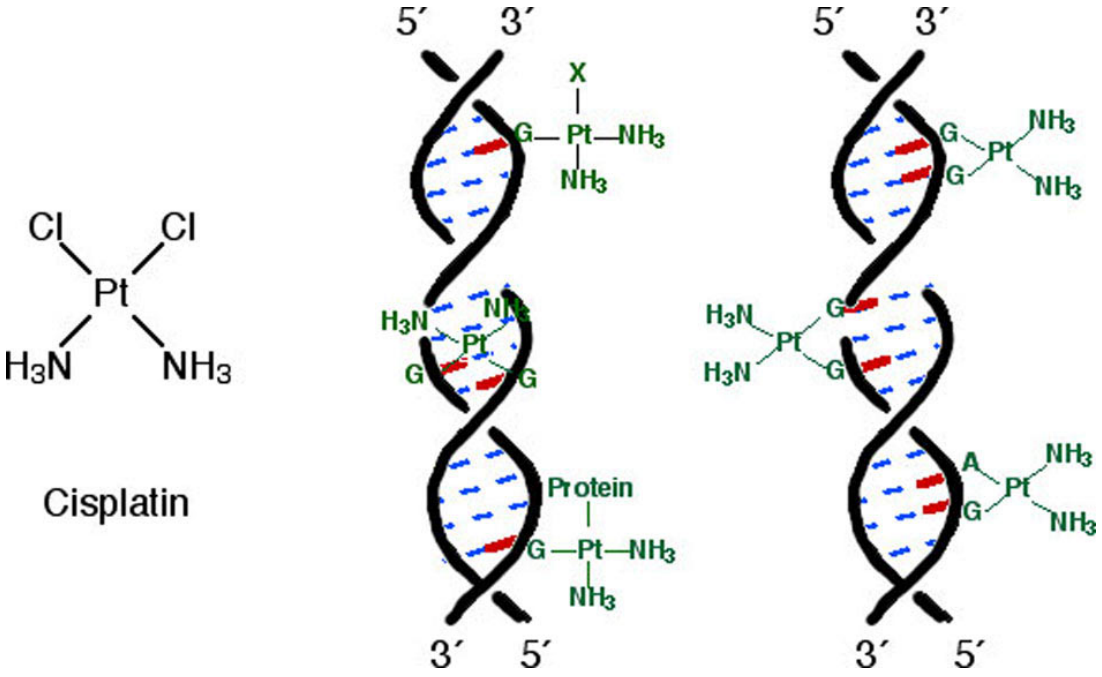


*Abbildung 6: Schematische Darstellung aller möglichen Cisplatin-DNA-Addukte: Neben den Intrastrang-Crosslinks G*G*, A*G* und G*XG* und dem Interstrang-Crosslink G*C•CG* besteht auch die Möglichkeit monofunktionaler Bindung an Guanin.*[9]

[9] „*“ kennzeichnet die an Cisplatin gebundenen Basen.

Mittlerweile gibt es eine große Zahl von Platinwirkstoffen in der Chemotherapie, von denen viele strukturell auf Cisplatin basieren sowie weitere Medikamente auf der Basis anderer Schwermetalle.[171-175]

Neben der Bindung an B-DNA werden auch die Effekte der Bindung kleiner Moleküle an andere DNA-Strukturen, wie Tripelhelices,[176] die G-Quadruplex-Strukturen der Telomere,[177] nukleosomal kompaktierte DNA,[178] sowie auf linkshändige DNA-Strukturen[179] untersucht. Andere neuere Strategien verfolgen das Ziel auch längere Sequenzen von DNA bzw. RNA zu binden und zu deaktivieren. Dies geschieht etwa über therapeutische Antikörper oder mit sogenannten Antisense-Oligonukleotiden.[180] Bei letzteren handelt es sich um oligomere Nukleinsäuremoleküle, die aufgrund ihrer Komplementarität zu bestimmten Gensequenzen an DNA bzw. RNA binden und diese damit für die normalen zellulären Prozesse blockieren. Als Antisense-Medikamente eignen sich deshalb besonders solche Nukleinsäuren, die eine sehr hohe Affinität zu DNA bzw. RNA besitzen. Zu den aussichtsreichsten Kandidaten hierfür zählen die synthetischen Nukleinsäuren PNA und LNA.

Neben der eigentlichen Bindung an die Zielsequenz ist natürlich auch der gezielte Transport der Wirksubstanzen in die betroffenen Zellen von enormer Wichtigkeit. Die verschiedenen Mechanismen, die dies bewirken sind teilweise hoch komplex und Gegenstand aktueller Forschung. Beispielhaft soll hier nur kurz gezeigt werden, dass auch mit „einfachen“ kleinen Molekülen „intelligente“ Transportstrategien realisiert werden können: Im Fall von Cisplatin wird das cis-$Pt(NH_3)Cl_2$-Molekül im Blutserum aufgrund der dort herrschenden hohen Chloridkonzentration zunächst nicht hydrolysiert. Das neutrale Molekül kann über einen noch nicht genau bekannten Prozess durch Zellmembranen diffundieren. Aufgrund der geringeren Chloridkonzentration im Zytoplasma setzt dort der Hydrolyseprozess ein, der zur Bildung positiv geladener Moleküle führt. Diese diffundieren zur negativ geladenen DNA hin, wo sie schließlich binden können.[10] Die Bindung an die DNA ist die Ursache der pharmakologischen Wirkung, löst aber gleichermaßen die bekannten Nebenwirkungen aus, da nicht nur in den Tumorzellen sondern auch in anderen aktiven Zellen die DNA kovalent gebunden wird. Deshalb treten als Nebenwirkungen bei der Chemotherapie

[10] Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ausschließlich hydrolysiertes Cisplatin verwendet.

häufig die Schädigung von Knochenmark, Haarausfall und Sterilität auf.[153,171,172,174,181]

3.3. Mechanische Eigenschaften von DNA

Die mechanischen Eigenschaften von DNA wurden in den vergangenen zehn Jahren intensiv mit verschiedensten Techniken untersucht.[96,100,182-185] Für Kraftmessungen an einzelnen DNA-Molekülen gibt es dabei prinzipiell zwei mögliche geometrische Anordnungen: man kann die Kraft entweder parallel zur Molekülachse ausüben und das Molekül strecken oder die beiden Stränge am gleichen Ende des Moleküls auseinanderziehen („Unzipping“, Abbildung 7 a). Im ersten Fall muss weiter unterschieden werden ob man an jedem Ende des Moleküls nur einen der beiden Stränge fest verankert („kraftinduziertes Schmelzen“, Abbildung 7 b) oder das ganze Molekül streckt (Einzelmolekül-Kraftspektroskopie im eigentlichen Sinne, Abbildung 7 c).

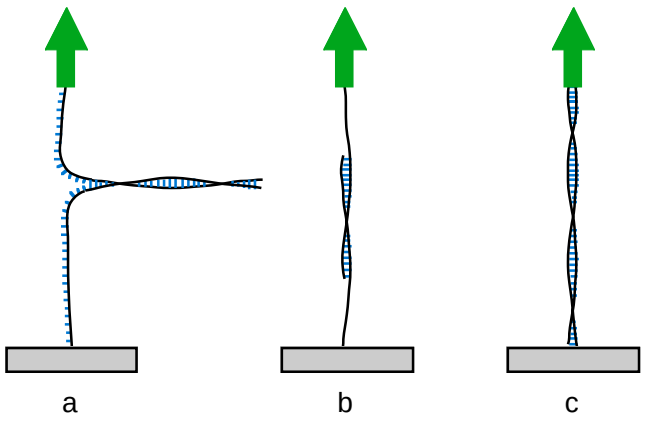


Abbildung 7:

Mögliche geometrische Anordnungen für Kraftexperimente an einzelnen DNA-Molekülen: Unzipping (a), kraftinduziertes Schmelzen (b) und Überstrecken (c).

In allen drei Fällen ist es möglich den Doppelstrang in die Einzelstränge aufzutrennen (Schmelzen). Für den Fall b sind in langen DNA-Molekülen die beiden Einzelstränge mechanisch so stark gekoppelt, dass die ausgeübte Kraft innerhalb des Moleküls auch zwischen den beiden Strängen übertragen wird, so dass das Experiment effektiv nicht mehr von einem wie in Anordnung c zu unter-

scheiden ist, solange die beiden Stränge des Moleküls frei rotieren können.[11] Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente zu allen drei Szenarien durchgeführt. In den folgenden Abschnitten werden kurz die bisher bekannten Experimente und theoretischen Modelle zur Beschreibung dieser vorgestellt.

3.3.1. Unzipping[101,102]

Die Besonderheit beim Unzipping von DNA liegt darin, dass das Molekül entlang seiner Achse immer weiter aufgetrennt wird und sich so allein durch geometrische Überlegungen ein direkter Bezug der zum Auftrennen notwendigen Kraft zur Sequenz der DNA an der jeweiligen Stelle ergibt. Die ersten Experimente zum Unzipping von DNA wurden von Bockelmann und Essevaz-Roulet durchgeführt.[101-103] Dabei wurde ein Strang am Ende eines 16,2 µm langen Moleküls Lambda-Phagen-DNA über ein Verbindungsstück aus DNA an einen Objektträger und der andere Strang direkt an ein Polystyrenkügelchen gekoppelt. Das Polystyrenkügelchen wurde dann mit einer dünnen Glasfaser, die gleichzeitig als Kraftsensor diente, bewegt.

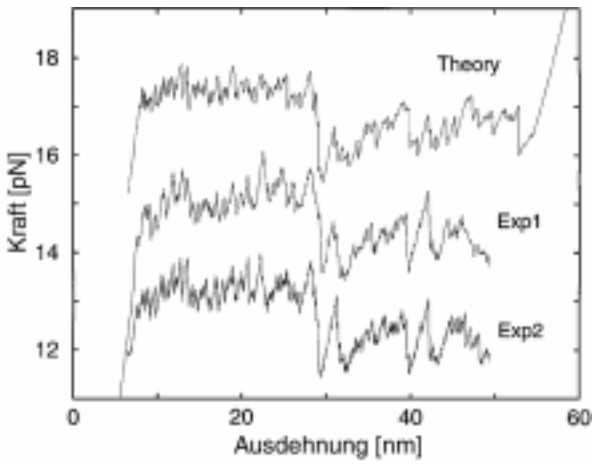


Abbildung 8:

Beim Unzipping von Lambda-Phagen-DNA ergibt sich ein charakteristisches Kraftmuster, das in weiten Bereichen gut mit der theoretisch berechneten Kurve übereinstimmt[101] (Kurven um je 2 pN abgesetzt).

Die beim Entfalten des gesamten Moleküls gemessene Kraft (Abbildung 8) weist in Abhängigkeit der jeweils zu entfaltenden Sequenz charakteristische Variationen in der Kraft zwischen etwa 10 und 15 pN auf. Dieses Kraftmuster lässt sich auch theoretisch mit der entfalteten Sequenz in Verbindung setzen, wenn man

[11] Das ist gleichermaßen möglich, wenn ein beliebiges Ende des Moleküls nicht fest verankert ist oder Einzelstrangbrüche im Molekül vorliegen.

das gesamte System der Messung als thermodynamisches Ensemble im Gleichgewicht beschreibt: Das betrachtete Ensemble besteht aus dem Kraftsensor, dem DNA-Molekül selbst und den Verbindungsstücken (siehe Abbildung 9).

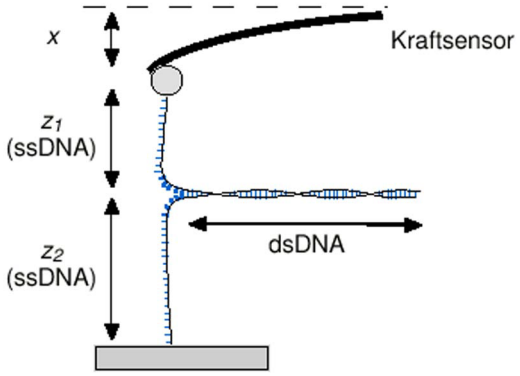


Abbildung 9:

Das Ensemble der Unzipping-Messung besteht aus dem zu entfaltenden dsDNA-Molekül, den ssDNA-Verbindungsarmen und dem Kraftsensor.

Der Kraftsensor ist eine einfache Hookesche Feder mit Federkonstante k_C und besitzt bei Auslenkung um eine Strecke x die potenzielle Energie $E_C = 0{,}5\, k_C\, x^2$. Das Molekül besteht aus den einzelsträngigen Verbindungen z_1 und z_2 zur Unterlage bzw. zum Kraftsensor und dem doppelsträngigen Teil. Wenn eine bestimmte Anzahl j an Basenpaaren geöffnet ist, besitzen diese eine potenzielle Energie $E_{BP}(j)$ in Höhe der freien Enthalpie, wobei dieser Wert von der Art der jeweiligen Basenpaare und den direkten Nachbarn abhängt.[137] Für die hier dargestellte Simulation wurden als mittlere freie Enthalpien der Basenpaarung 1,3 k_BT für jedes AT-Basenpaar und 2,9 k_BT für jedes GC-Basenpaar angenommen. In den einzelsträngigen Abschnitten ist bei einer gesamten Ausdehnung $z = z_1 + z_2$ die Streckenergie $E_{ssDNA}(j,z)$ gespeichert, die mit dem Modell der freien Kette (siehe Formel (1) in 2.3) für die Ausdehnung z und die zugehörige Konturlänge berechnet werden kann indem man die Kraft über die gesamte Ausdehnung integriert.[12] Die Konturlänge der Verbindungsarme hängt dabei wiederum von der Anzahl der schon entfalteten Basen ab:

$$E_{ssDNA}(j,z) = \int_0^z F_{FJC}\left(L_C(j), z'\right) dz' = \int_0^z F_{FJC}(j,z')\, dz' .$$

Somit ergibt sich die Gesamtenergie des Systems mit j geöffneten Basenpaaren bei der Ausdehnung z zu:

[12] Die Kuhnlänge einzelsträngiger DNA ist etwa 1,4 bis 1,5 nm.[87,98]

$$E_{ges}(z,j) = E_C + E_{BP}(j) + E_{ssDNA}(j,z).$$

Die Zustandssumme Z des Systems erhält man durch Summation über alle Basenpaare j und Integration über alle möglichen Ausdehnungen z:

$$Z = \sum_j \int_z e^{-\frac{E_{tot}(z,j)}{k_B T}} dz .$$

So erhält man dann den thermodynamischen Mittelwert der Kraft F für jede Ausdehnung z:

$$< F(z) >= \frac{\sum_j \int_0^z F_{FJC}(j,z') \, e^{-\frac{E_{tot}(z',j)}{k_B T}} dz'}{Z} .$$

Damit ist es möglich die Kraft-Ausdehnungs-Charakteristik für das Unzipping doppelsträngiger DNA beliebiger Sequenz zu berechnen. In den Experimenten von Bockelmann ergab sich über weite Bereiche eine gute Übereinstimmung der gemessenen Kraft mit der Simulation, was auch ein Hinweis dafür ist, dass sich das System bei hinreichend langsamen Ziehgeschwindigkeiten tatsächlich nahe des thermodynamischen Gleichgewichts befindet. In neueren Arbeiten wurde weiter gezeigt, dass bei hohen Geschwindigkeiten auch der Rotationswiderstand des Moleküls eine Rolle spielt.[186] Die beobachteten Kraftvariationen beim Unzipping stehen in engem Zusammenhang zum GC-Gehalt der entfalteten DNA. Dabei wird die räumliche Auflösung aber durch die thermische Fluktuation der einzelsträngigen Verbindungsarme begrenzt, die es der DNA ermöglichen, sich um die Gleichgewichtslänge herum weiter aufzutrennen bzw. zu rehybridisieren. In dem beschriebenen Experiment mit Lambda-Phagen-DNA hatten diese Fluktuationen Amplituden bis zu 350 Basenpaaren. Eine Verbesserung dieser Auflösung ist prinzipiell erreichbar, wenn man die Länge der Verbindungsarme beschränkt. Dies wurde in neueren Arbeiten von Bockelmann[104] und in Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, realisiert. Mittlerweile wurde das Unzipping von DNA ferner dazu benutzt, um die Bindungsstellen von Restriktionsenzymen entlang eines DNA-Moleküls zu untersuchen. In diesem Experiment führt die Anwesenheit des Enzyms dazu, dass die Kraft an den Bindungsstellen stark ansteigt. Aufgrund des nichtlinearen Kraft-Ausdehnungs-Verhaltens der DNA wird das System bei ei-

ner größeren Zugkraft steifer, wodurch eine Auflösung von 25 Basenpaaren erreicht werden konnte.[187]

Über die oben dargestellte Beschreibung des Unzipping nahe des Gleichgewichts hinaus wurden in den vergangenen Jahren mehrere theoretische Arbeiten publiziert, die das Unzipping von DNA und RNA und die dabei auftretenden dynamischen und kinetischen Prozesse beschreiben.[188-195] Viele der theoretischen Vorhersagen betreffen jedoch Bereiche, die derzeit mit Einzelmolekülexperimenten noch nicht zugänglich sind.

3.3.2. Überstrecken

Die ersten Experimente zum Überstrecken von DNA wurden bereits 1992 durchgeführt,[64] wobei Anfangs nur der Kraftbereich bis etwa 25 pN zugänglich war. Es folgten Experimente mit verschiedenen Techniken, wie optischen Fallen,[87,90,91] magnetischen Kügelchen,[89,92] Mikronadeln[88] und Kraftmikroskopie,[95,97] mit denen auch der untersuchte Kraftbereich immer größer wurde. Das typische Kraft-Ausdehnungsverhalten eines einzelnen DNA-Moleküls ist in Abbildung 10 dargestellt.[13]

[13] Das zugehörige Molekül konnte dabei frei um seine eigene Achse rotieren. Alle weiteren Aussagen betreffen wenn nicht anders vermerkt immer frei rotierende Moleküle.

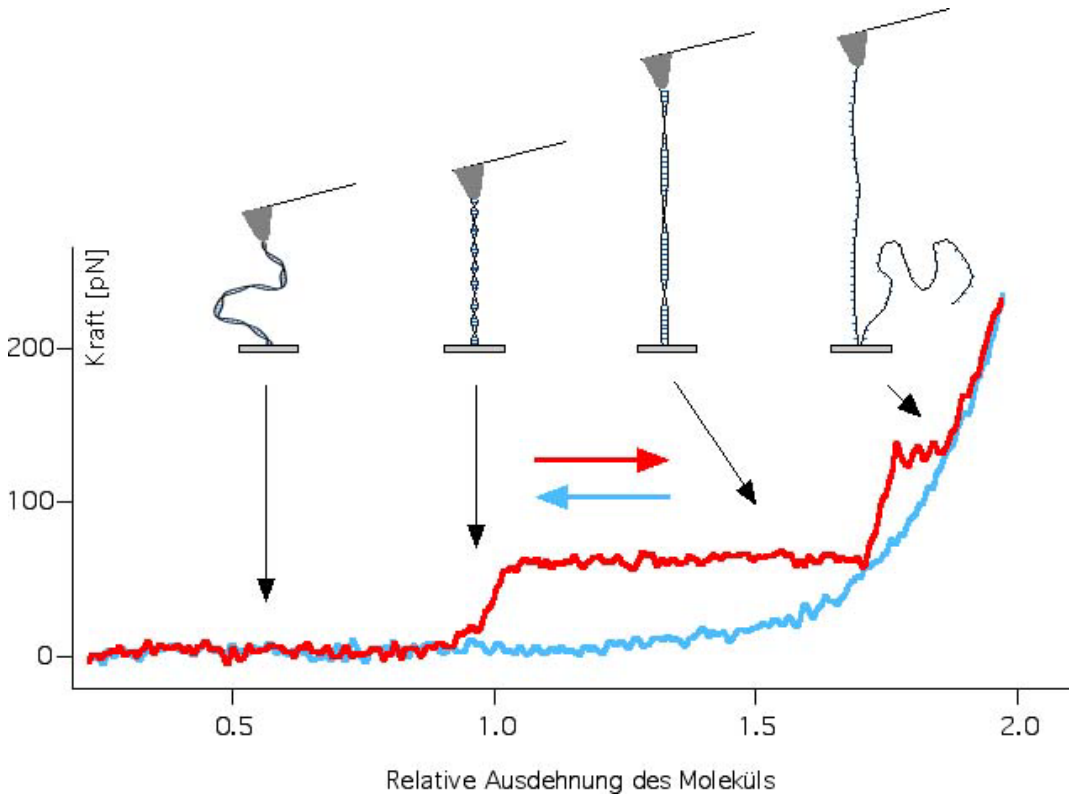


Abbildung 10:

Das Kraftspektrum eines einzelnen DNA-Moleküls zeigt deutlich das Überstreckungs-Plateau bei 65 pN und den Schmelzübergang um 150 pN.[196]

Beim Dehnen des Moleküls erkennt man zunächst einen langsamen Anstieg der Kraft, der bei Annäherung an die Konturlänge immer steiler wird. Bei einer Kraft von 65 pN zeigt sich ein Plateau in der Kraft, in dem sich das Molekül fast ohne weiteren Kraftanstieg auf das etwa 1,7-fache seiner Konturlänge dehnen läßt. Am Ende des Plateaus steigt die Kraft wieder stark an und es folgt ein weiteres Abflachen der Kurve um 150 pN. Bei noch größeren Kräften verläuft die Kurve dann – bis zum endgültigen Abreißen oder dem Beginn der Relaxation – immer steiler. Für den Bereich kleiner Kräfte bis etwa 50 pN konnte gezeigt werden, dass sich das Molekül wie eine semiflexible Kette verhält: Das Kraftverhalten kann durch das Modell der Worm-Like-Chain (WLC) im Bereich von etwa 10 fN bis hin zu 50 pN sehr gut beschrieben werden.[130,197] In dem Plateau bei 65 pN wird das Molekül in einem sehr kooperativen Prozess bis weit über die Konturlänge hinaus überstreckt[87,88] (siehe unten). Im Bereich der Abflachung bei 150 pN („Schmelzübergang“) erfolgt dann eine vollständige

Trennung des Doppelstrangs in zwei Einzelstränge. Wird das Molekül wieder entspannt, so folgt die Rückfahrkurve zunächst der Ausdehnungscharakteristik einzelsträngiger DNA, kann dann aber wieder zum Doppelstrang rehybridisieren. Im Kraftspektrum erkennt man dies daran, dass sich die Relaxationskurve wieder der Dehnungskurve des Doppelstrangs annähert. Die so zwischen Dehnungs- und Entspannungskurve entstehende Hysterese ist ein deutlicher Hinweis für kraftinduziertes Schmelzen des Doppelstrangs. Die genaue Ursache des Plateaus bei 65 pN ist nach wie vor Gegenstand von Diskussionen, wobei der Überstreckungsprozess von verschiedenen Seiten entweder als Konformationsumwandlung in eine neue stabile Struktur oder aber als reines Schmelzen angesehen wird.

Nach der erstmaligen Beobachtung des Überstreckungsplateaus wurde vermutet, dass das Molekül in einer Art eindimensionalem Phasenübergang in eine überstreckte Struktur („S-DNA“) überführt wird, in der die Basenpaarung noch erhalten ist. Diese würde dann am Ende des sogenannten „B-S-Plaeaus“ weiter überstreckt, das Schmelzen erfolgt demnach erst bei höheren Kräften. Die These, dass es sich dabei um eine Strukturumwandlung handelt, bei der zwar die Basenstaplung stark verändert wird, die Basenpaare aber erhalten bleiben, wird qualitativ durch Modellrechnungen gestützt,[198-201] die eine solche Umwandlung vorhersagen – jedoch bei deutlich höheren Kräften und weniger kooperativ als in den Experimenten beobachtet. Ein anderes theoretisches Modell zeigt, dass die Dehnungskurven auch nur unter Berücksichtigung von externer Zugspannung, der Biegesteifigkeit des Moleküls und der Basenstapelung gut simuliert werden können.[202] Demnach ist der Übergang insbesondere empfindlich gegenüber Störungen der Basenstapelung, was auch im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestätigt werden konnte.

Die These des kraftinduzierten Schmelzens wird in neueren Arbeiten von Rouzina und Bloomfield beschrieben.[98,99] Die theoretischen Vorhersagen dieses Modells konnten dann auch quantitativ durch Temperatur- und pH-abhängige Messungen unterstützt werden.[203,204] Darüber hinaus konnte in weiteren Arbeiten, in denen die Salzabhängigkeit von DNA-Elastizität und Überstreckung untersucht wurde, gezeigt werden, dass die beiden Stränge während des Überstreckens nahe beieinander bleiben.[205] Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen und wichtigsten Vorhersagen dieses Modells vorgestellt.

3.3.3. Kraftinduziertes Schmelzen langer DNA-Moleküle[98]

Das im folgenden dargestellte Modell beschreibt das Verhalten von DNA unter dem Einfluss einer von außen angelegten Zugkraft. Da die Betrachtung im thermodynamischen Gleichgewicht erfolgt, ist es notwendige Voraussetzung, dass beim kraftinduzierten Schmelzen einzelsträngige und doppelsträngige Bereiche koexistieren können. Das bedeutet gleichermaßen, dass immer Moleküle betrachtet werden, deren Länge über der Länge einer kooperativen Einheit des Schmelzprozesses (ca. 40 Basenpaare) liegt. Grundsätzlich kann man zwei verschiedene thermodynamische Potenziale zur Beschreibung von Polymeren unter Spannung verwenden. Die Helmholtzsche freie Energie

$$E_{HH}(L) = \int_{o}^{L} F(L')dL'$$

beschreibt die Energie, die über die mechanische Kraft aufgewendet werden muss, um das Molekül auf eine bestimmte vorgegebene Ausdehnung L zu strekken. Die Gibbs´sche freie Energie

$$E_G(F) = -\int_{o}^{F} L(F')dF'$$

ist dagegen geeignet, Systeme unter fest angelegter Kraft F zu beschreiben. Zwischen den beiden Potenzialen besteht bei einer Ausdehnung $L(F)$ mit der zugehörigen Kraft F der Zusammenhang:

$$E_G(F) = E_{HH}(L) - FL(F).$$

Die Minimierung des zugehörigen Potenzials für die jeweiligen Randbedingungen ermöglicht die Berechnung der Kraft-Ausdehnungs-Kurven. In typischen Kraftspektroskopie-Experimenten ist die Kraft der von außen bestimmte Parameter, der entlang des gesamten Moleküls fest vorgegeben wird.[129] Deshalb wird im folgenden jeweils die Gibbs´sche freie Energie E_G betrachtet. Beim kraftinduzierten Übergang der DNA von der B-DNA-Struktur mit der freien Energie E_1 in einen Zustand mit der freien Energie E_2 besteht eine Differenz von $\Delta E_G = E_2 - E_1$. Für den Übergang von doppelsträngiger DNA (dsDNA mit E_{ds}) in einzelsträngige (ssDNA mit E_{ss}) kann die freie Energiedifferenz für die beiden

Zustände mit den experimentell bestimmten Parametern über das WLC-Modell berechnet werden:

$$\Delta E_G(F) = E_{ss}(F) - E_{ds}(F) = -\int_0^F \left[L_{ss}(F') - L_{ds}(F')\right] dF' = -\frac{F^2}{3k_B T}\left(L_C^{ss} L_P^{ss} - L_C^{ds} L_P^{ds}\right),$$

mit den Konturlängen L_C und Persistenzlängen L_P, jeweils von Einzel- und Doppelstrang. Die gesamte Ausdehnung des Moleküls ergibt sich dabei aus der Summe des einzelsträngigen und des doppelsträngigen Anteils bei der vorgegebenen Kraft F. Abbildung 11 zeigt die Abhängigkeit der freien Energiedifferenz von der Zugkraft für die beiden Fälle, dass nur einer der beiden bzw. beide Einzelstränge nach dem Übergang gestreckt bleiben.

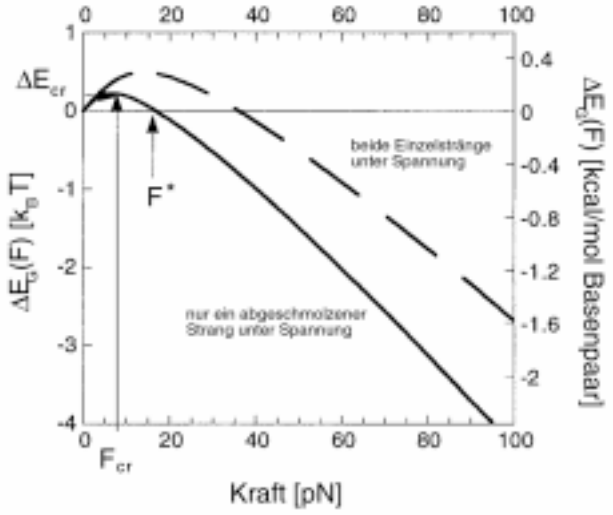


Abbildung 11:

Differenz der freien Energie von dsDNA und dsDNA in Abhängigkeit der Zugkraft. Bei $F_{cr} \approx 6$ pN ist die Ausdehnung von ssDNA und dsDNA gleich (Grafik aus [98]).

Um die erwarteten Werte für kraftinduziertes Schmelzen mit den experimentell beobachteten Parametern des Überstreckens vergleichen zu können, muss man auch die entropischen Effekte beachten, die durch das Überstrecken im Gegensatz zum klassischen Schmelzen des Doppelstrangs entstehen. Über die Entropie S^{WLC} der WLC,

$$S^{WLC}(F) = -\frac{\partial E_G^{WLC}}{\partial T},$$

läßt sich zeigen, dass durch die Dehnung mit einer von außen angelegten Kraft von 65 pN der Entropieverlust für ssDNA etwa 1,4 k_B, für dsDNA sogar nur 0,2 k_B pro Base beträgt, womit praktisch alle Freiheitsgrade des Rückgrats „herausgezogen“ sind. Die Entropiedifferenz zwischen Einzel- und Doppelstrang

beträgt jedoch 12,5 k_B pro Basenpaar, was etwa $2{,}7 \cdot 10^5$ Freiheitsgraden entspricht. Damit kann der entropische Beitrag des Streckens auf die freie Energie des kraftinduzierten Schmelzens als klein betrachtet werden und man kann die experimentell bestimmten Differenzen der freien Energie direkt mit der Gibbs´schen freien Energie $\Delta G^0 = \Delta G^{ss} - \Delta G^{ds}$ aus klassischen Schmelzexperimenten vergleichen:

$$\Delta E_G(F_s) = -\Delta G^0.$$

Mit dieser Abschätzung ergibt sich, dass die klassischen Werte von etwa 2,9 k_BT pro Basenpaar in den Kraftexperimenten bei Kräften zwischen 80 und 100 pN – je nach dem Zustand der entstehenden ssDNA – erreicht werden. Das bedeutet, dass bei diesen Kräften der Doppelstrang auf jeden Fall nicht mehr dauerhaft stabil ist. Diese quantitative Abschätzung zeigt auch, dass das Überstrecken von DNA energetisch gleichwertig mit dem klassischen Schmelzen von DNA ist. Aus der klassischen Helix-Knäuel-Theorie läßt sich weiter ableiten, dass sich aufgrund der Eindimensionalität des Schmelzens die beiden Stränge erst bei höheren Kräften als der „Schmelzkraft“ F_S vollständig voneinander trennen, was mit dem beobachteten Verhalten übereinstimmt. Die ebenfalls vorhergesagte Abhängigkeit der Trennungskraft von der genauen Sequenz und der Anzahl der Einzelstrangbrüche wurde auch im Experiment beobachtet.

Weitere Zusammenhänge zwischen Überstreckung und thermischem Schmelzen ergeben sich aus den Unzipping-Experimenten und der Kooperativität der Überstreckung. In den Unzipping-Experimenten werden Kräfte zwischen 10 und 15 pN zum Auftrennen des Doppelstrangs gemessen. In dieser Geometrie ist die Ausdehnung eines Basenpaars in etwa 1 nm, was dem Doppelten der Ausdehnung einer Base in einem mit etwa 20 pN gestrecktem Einzelstrang entspricht. Im Vergleich zu der Überstreckung von 0,22 nm pro Basenpaar[14] bei 65 pN ist diese Strecke also um einen Faktor von 4,5 größer. Da die Kräfte aber um den gleichen Faktor kleiner sind, ergibt sich hier die gleiche Änderung an freier Energie. Die Kooperativität σ der Überstreckung hängt direkt mit der Breite der Übergangskraft ΔF_s zusammen:

[14] Im Überstreckungsplateau wird das Molekül auf das etwa 1,7-fache überdehnt, wodurch die Länge pro Basenpaar ausgehend von den 0,34 nm für B-DNA um etwa 0,22 nm zunimmt.

$$\Delta F_S = \frac{4k_B T\sqrt{\sigma}}{\Delta L}.$$

Aus den bekannten Messwerten ergibt sich mit ΔF_s = 2 pN und $\Delta L(F_s)$ = 0,22 nm so ein Wert von $\sigma = 8 \cdot 10^{-4}$. Die analoge Beziehung für das thermische Schmelzen lautet:

$$\Delta T_m = \frac{4k_B T_m\sqrt{\sigma}}{\Delta S},$$

mit Kooperativitätsparametern σ von etwa 10^{-5} bis 10^{-4}. Wenn man die Gleichheit der beiden Prozesse unterstellt, läßt sich über die Clausius-Clapeyron-Beziehung $\Delta G = \Delta T_m\, \Delta S^0 = \Delta F_s\, \Delta L(F_s)$ die Breite der Überstreckung aus der Breite des thermischen Schmelzübergangs vorhersagen:

$$\Delta F_s = \Delta T_m \frac{\Delta S^0}{\Delta L} = 0{,}8 \frac{\mathrm{pN}}{\mathrm{K}} \Delta T_m.$$

Alle bisher veröffentlichten Messdaten sowie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit verschiedenen DNA-bindenden Molekülen sind in Übereinstimmung mit diesem Modell. Kürzlich wurde dieses Modell auch angewandt, um die Wirkungsweise des HIV-1 Nukleokapsid Proteins mit Hilfe von Einzelmolekülexperimenten zu analysieren.[206]

3.3.4. Sequenzspezifische Mechanik und Topologieeffekte

Der Einfluss der Sequenz auf das Kraft-Ausdehnungs-Verhalten von DNA wurde erstmals an synthetischen DNA-Polymeren mit den repetitiven Sequenzen poly(dGdC)•poly(dGdC) und poly(dAdT)•poly(dAdT) untersucht.[95] Dabei hat sich gezeigt, dass bei der reinen GC-Sequenz die Überstreckung ab 65 pN und der Schmelzübergang erst bei etwa 300 pN erfolgt. Die reinen AT-Moleküle werden ab 35 pN überstreckt und können dabei schon schmelzen, weshalb hier kein eigener Schmelzübergang mehr beobachtet wurde. Die untersuchten Moleküle besitzen zudem die Eigenschaft der Selbstkomplementarität, das heißt jeder Strang kann auch auf sich selbst zurückfalten und kruziforme Haarnadelstrukturen (Hairpins) ausbilden. Durch das kraftinduzierte Schmelzen der Moleküle können so gezielt Hairpins gebildet und wieder entfaltet werden, was es – analog zu den in 3.3.1 beschriebenen Experimenten – ermöglicht, direkt die Unzipping-Kraft für reine AT- und GC-Basenpaare zu bestimmen. In den Kraft-

kurven ist das Unzipping durch das zusätzliche Auftreten von Plateaus erkennbar,[15] was zudem ein Hinweis darauf ist, dass die Entfaltung nahe am thermodynamischen Gleichgewicht stattfindet. So wurde die Unzipping-Kraft bestimmt zu 9 pN bzw. 20 pN für AT- bzw. GC-Basenpaare.

Neben der Sequenz ist auch die Topologie der DNA wesentlich für das Kraft-Ausdehnungs-Verhalten. Alle bisher beschriebenen Effekte beim Überstrecken beziehen sich auf Moleküle, die in ihrer Rotation nicht beschränkt sind. DNA, die durch eine feste Verankerung beider Stränge an beiden Enden nicht frei rotieren kann reagiert aufgrund der Kopplung der Torsion an die Dehnung anders auf externe Kräfte. So findet die Überstreckung hier weniger kooperativ bei Kräften um 100 pN statt und es tritt fast keine Schmelzhysterese in den Kurven auf. Das Dehnungsverhalten von über- und unterwundener DNA wurde sehr detailliert mit magnetischen Kügelchen untersucht, die es ermöglichen, einzelne Moleküle gleichzeitig zu dehnen und zu drehen.[89,92,93] Dabei hat sich gezeigt, dass unterwundene DNA schon bei etwa 30 pN denaturiert werden kann. Überwundene Moleküle können dagegen durch äußere Kräfte in eine Struktur überführt werden, in der sich die Basen nach außen drehen und das Phosphat-Rückgrat ins Zentrum der Doppelhelix tritt.[207] Für eine phänomenologische Beschreibung des Kraft-Ausdehnungs-Verhaltens von Molekülen mit beliebigem Grad an Über- oder Unterwindung wurde ein Modell vorgeschlagen, das insgesamt vier verschiedene Strukturen der DNA umfasst.[94] Ebenso wurde auch die Kopplung von Torsion und Verdrillung an die Streckung theoretisch beschrieben.[208-214]

3.3.5. Kraftinduziertes Schmelzen von Oligonukleotiden

In den oben beschriebenen Experimenten werden jeweils Moleküle gedehnt, deren Länge weit über der einer kooperativen Einheit des Schmelzens bzw. Überstreckens liegt. Es ist jedoch gleichermaßen möglich kurze Oligonukleotide aufzutrennen indem man jeweils an beide 3‘ oder 5‘-Enden eine Kraft anlegt. Erste Experimente dazu wurden bereits 1994 durchgeführt.[215] Es folgten weitere Arbeiten, wobei die gemessenen Kräfte sehr stark voneinander abwichen. Aufgrund des erst in den vergangenen Jahren entstandenen Verstän-

[15] Siehe auch Abbildung 23 in 4.2.1.

dnisses der zugrunde liegenden Prozesse wurden die ersten Messungen, die gut mit den bekannten thermodynamischen Daten korrelierten, von Strunz et al. durchgeführt.[119] In diesen Experimenten wurden komplementäre Moleküle einzelsträngiger DNA über heterofunktionale Polyethylenglykolmoleküle kovalent an Glasobjektträger und Kraftmikroskopspitzen gekoppelt. Wenn die komplementären Stränge dann durch Annähern der Spitze an die Probe in Kontakt kommen bildet sich ein Doppelstrang aus, der nur an den jeweiligen 5'-Enden der Einzelstränge an Unterlage bzw. Spitze gekoppelt ist. So wurde die Abrisskraft komplementärer 10mer, 20mer und 30mer Moleküle in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit bestimmt. Dabei ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Kraftladungsrate und der jeweiligen Abrisskraft. Nach der im Anhang 6.3 kurz zusammengefassten Theorie von Evans,[60,216,217] konnte so gezeigt werden, dass das Auftrennen der beiden Stränge im dynamisch zugänglichen Bereich des Kraftmikroskops gut durch eine einfache Energiebarriere beschrieben werden kann. Die so ermittelten thermischen off-Raten für 10mer, 20mer und 30mer Moleküle liegen bei 10^{-2} s^{-1}, 10^{-6} s^{-1} und 10^{-10} s^{-1}, die jeweilige Breite des Bindungspotenzials bei etwa 1,2 bzw. 2,0 und 2,4 nm. In den Messungen von Pope et al.[120] wurden komplementäre 12mer DNA-Moleküle über nur einige nm lange Alkanthiolmoleküle direkt an eine Goldoberfläche und an goldbeschichtete Kraftmikroskopspitzen gekoppelt. Aus der Ratenabhängigkeit der Abrisskräfte zeigte sich auch hier eine einfache Potenzialbarriere. Für die Potenzialbreite und thermische off-Rate ergaben sich 0,58 nm und etwa 1 s^{-1}, was gut mit den von Strunz gemessenen Werten übereinstimmt. In weiteren Arbeiten wurde dann noch die Temperaturabhängigkeit der Abrisskräfte eines 16mers bestimmt.[121,122] So konnte gezeigt werden, dass Potenzialbreite und durchschnittliche Lebenszeit der Bindung mit steigender Temperatur abnehmen. Insgesamt hat sich durch diese Ergebnisse in den vergangenen Jahren ein schlüssiges Bild des kraftinduzierten Aufbrechens von DNA-Oligonukleotiden ergeben.

3.3.6. Weitere Einzelmolekülexperimente mit DNA

Kraftexperimente an einzelnen Molekülen sind nicht nur dazu geeignet die Eigenschaften von DNA selbst zu charakterisieren, sondern ermöglichen auch die Untersuchung der Wechselwirkung von DNA mit verschiedensten Liganden und

Enzymen. Die Relaxationsdynamik einzelner DNA-Moleküle wurde in verschiedenen Studien untersucht,[61-63,218-220] in denen die Moleküle in einem laminaren Flüssigkeitsstrom gedehnt wurden. Die Kondensation von DNA durch kationische Liganden,[221,222] sowie an kationische Lipidmembranen[223] wurde mit Kraftmessungen untersucht. Mittlerweile gibt es auch einige Studien zur Kompaktierung von DNA in Chromatin,[224,225] bzw. an Nukleosomen[226] und dem Packungs-Mechanismus des Bakteriophagen Phi-29.[227] Das Bindungs- und Polymerisationsverhalten des RecA-Proteins, das eine wichtige Rolle bei der Gen-Rekombination spielt, wurde ebenfalls an einzelnen DNA-Molekülen untersucht[228-231] und mit magnetischen Kügelchen war es möglich, einzelne Schritte des Entwindens überspiralisierter DNA durch Topoisomerase zu detektieren.[232] Verschiedene Messungen an RNA- und DNA-Polymerasen haben gezeigt, dass diese Enzyme Kräfte von etwa 30 pN ausüben können und auch die Geschwindigkeit der Polymerisation stark von der angelegten Kraft abhängt.[233-238]

Durch die schnell wachsende Zahl an Kraftstudien zeigt sich immer deutlicher, dass Kräfte gerade in biologischen Systemen eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus steht die Reaktion auf von außen angelegte Kräfte immer in einem engen Zusammenhang zum Aufbau und der Funktion einzelner Moleküle und bietet so die Möglichkeit zur Gewinnung neuer struktureller Information.

4. Experimentelle Ergebnisse

4.1. Unzipping von DNA

Im Rahmen der im folgenden beschriebenen Experimente wurden oligomere dsDNA-Moleküle mit charakteristischen Sequenzen in Unzipping-Geometrie entfaltet. Insbesondere wurden dabei die praktischen Grenzen der Sequenzunterscheidung beim Unzipping untersucht. Für die Durchführung solcher Experimente ist eine spezifische Verankerung der zu untersuchenden Moleküle essenziell. Da die beim Unzipping erwarteten Kräfte an der Grenze der derzeit mit Kraftmikroskopie möglichen Auflösung liegen, ist es ebenso notwendig die unspezifische Adhäsion der Moleküle zu minimieren. Nur über eine gezielte Kontrolle der Oberflächenchemie ist es möglich, klar interpretierbare Ergebnisse zu erhalten.

4.1.1. Kopplung der Moleküle an Spitze und Unterlage

Für die hier dargestellten Experimente wurden verschiedene Methoden der chemischen Kopplung von DNA an Cantilever und Proben angewandt, die schematisch in Abbildung 12 dargestellt sind (Details der Reaktionen siehe Anhang 6.5).

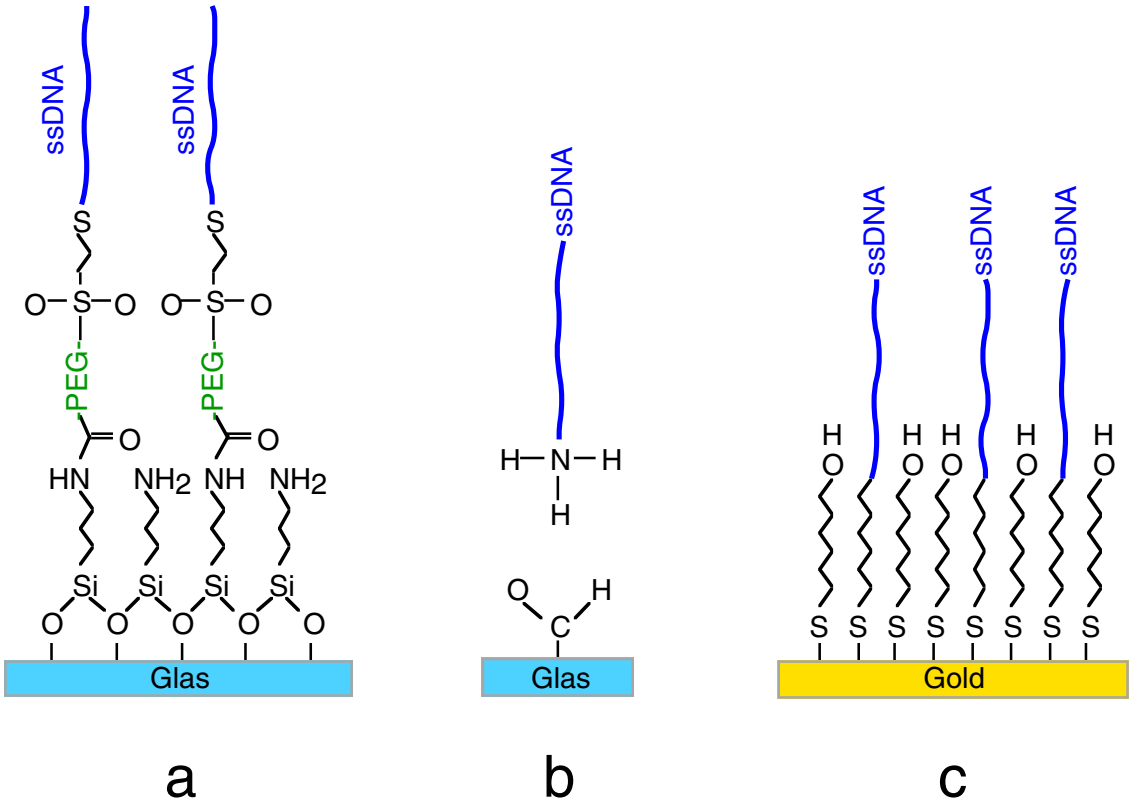


Abbildung 12:

Verwendete Kopplungsstrategien für ssDNA: Bindung von SH-terminierten Molekülen an hetero-funktionale PEG-Koppler auf amino-silanisiertem Glas (a), Aldehyd-Amino-Kopplung (b) und Thiol-Gold-Bindung (c).

Zur Bindung an die Proben wurden entweder SH-terminierte Oligonukleotide an mit Gold bedampfte Objektträger gekoppelt (c) oder amino-terminierte Oligonukleotide an Aldehyd-funktionalisierte Objektträger gebunden (b). Zur Kopplung an die Kraftmikroskop-Spitzen wurden die Oligonukleotide entweder über heterofunktionale Polyethylenglykol-Koppler (PEG) und Aminosilan direkt an das Siliziumnitrid (a) oder SH-terminierte Oligonukleotide an mit Gold bedampfte Spitzen gebunden (c).

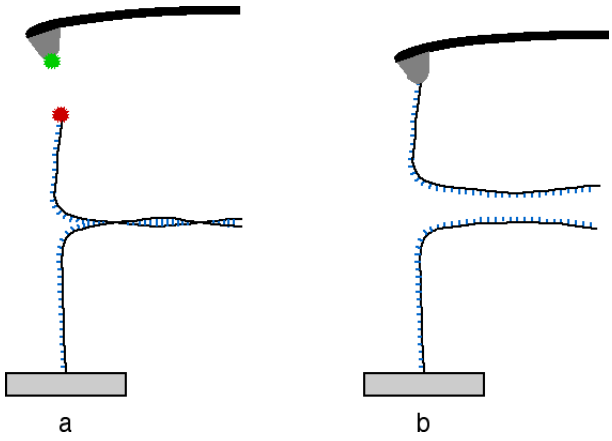


Abbildung 13:

Mögliche geometrische Anordnungen für Unzipping-Experimente: Aufpicken funktioneller Gruppen mit einer reaktiven Spitze (a) oder Kopplung komplementärer ssDNA-Moleküle an Spitze und Unterlage (b).

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene geometrische Anordnungen für das Experiment (siehe Abbildung 13). Man könnte die Doppelstränge etwa am 3‘-Ende eines Strangs kovalent an der Unterlage verankern und dann im Experiment das chemisch funktionale 5‘-Ende des anderen Strangs mit einer reaktiven Spitze „aufpicken“. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die komplemetären Stränge vor dem eigentlichen Experiment jeweils an Spitze und Unterlage zu koppeln, wobei diese dann bei Annäherung einen Doppelstrang ausbilden. Wie sich im Laufe der Experimente gezeigt hat, ist die erste Strategie aber mit verschiedenen Problemen behaftet: Viele Reaktionen benötigen eine gewisse Zeit, um effizient abzulaufen, was zu erheblichen Wartezeiten bei der Messung führen kann. Aufgrund des kleinen Spitzenradius können außerdem nur wenige Moleküle anbinden. Deshalb ist es nicht möglich, mit der gleichen Spitze eine größere Zahl von Messungen an verschiedenen Molekülen durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die freien Thiol-modifizierten 5‘-Enden aufzupikken. Dabei ist ein weiteres großes Problem die begrenzte Lebenszeit der freien Thiolgruppen, die eine spezifische Kopplung in situ im Verlauf der Messung immer unwahrscheinlicher machen.[16] Da viele Moleküle – darunter auch DNA – jedoch auch unspezifisch stark an Gold adsorbieren, wurde im Experiment auch diese Wechselwirkung beobachtet. Die in den Kurven auftretenden Maximalkräfte waren dabei häufig im Bereich unter 20 pN, teilweise wurden aber auch Kurven gemessen, in denen die Adhäsion deutlich stärker war.

[16] Die Halbwertszeit einer freien SH-Gruppe in Pufferlösung im Hinblick auf die Bildung von Disulfiden und die Oxidation der SH-Gruppe beträgt nur wenige Stunden.[239] Probenpräparation und das Äquilibrieren des Messaufbaus benötigen mindestens zwei Stunden, was die Überlebenswahrscheinlichkeit der reaktiven SH-Gruppen schon zu Beginn der Messung relativ gering werden läßt.

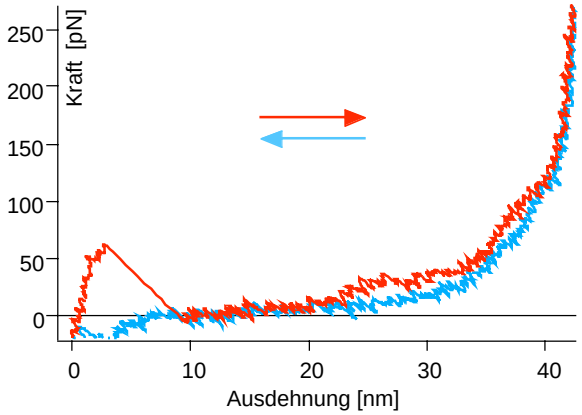


Abbildung 14:

Durch unspezifische Kopplung an Goldspitzen können kurze Doppelstränge mit Kräften über 250 pN gedehnt werden. Man erkennt deutlich das Überstreckungsplateau und die Schmelzhysterese.

Die Kurve in Abbildung 14 zeigt ein so gemessenes Kraftspektrum, in dem ein Molekül mit mehr als 250 pN überdehnt wird. Die resultierende Kurve zeigt große Ähnlichkeit mit den Kraftspektren langer dsDNA. Es sind deutlich ein Überstreckungsplateau und die Hysterese zwischen Dehnung und Entspannung zu erkennen, jedoch sind die Kräfte niedriger als bei langen Molekülen. Wegen des ssDNA-Verbindungsarms erscheint das Plateau im Vergleich zur gesamten Ausdehnung auch etwas kürzer als in vollständigen Doppelsträngen. Das zeigt, dass Goldoberflächen zur gezielten spezifischen Kopplung in situ nur begrenzt geeignet sind, da eine Unterscheidung der spezifischen von der unspezifischen Kopplung nicht ohne weiteres möglich ist. Aufgrund der so erhaltenen Ergebnisse wurde im folgenden die Strategie verfolgt jeweils komplementäre ssDNA-Moleküle schon vor der Durchführung des eigentlichen Experiments an Spitze und Unterlage zu koppeln.

4.1.2. Unzipping repetitiver Sequenzen

Zur Untersuchung der maximal erreichbaren Sequenzauflösung wurden Unzipping-Experimente an DNA-Molekülen mit repetitiven Sequenzen durchgeführt, die aus einer alternierenden Abfolge von Blöcken mit je zehn AT- bzw. GC-Basenpaaren bestehen. Für die jeweiligen Sequenzen wurde auch der theoretische Kurvenverlauf im thermodynamischen Gleichgewicht mit dem Modell von Bockelmann (siehe Kapitel 3.3.1) berechnet. Abbildung 15 zeigt die berechneten Kurvenverläufe für vollständig komplementäre Stränge und solche, die eine bzw. zwei aufeinanderfolgende Fehlstellen („Mismatches“) enthalten.

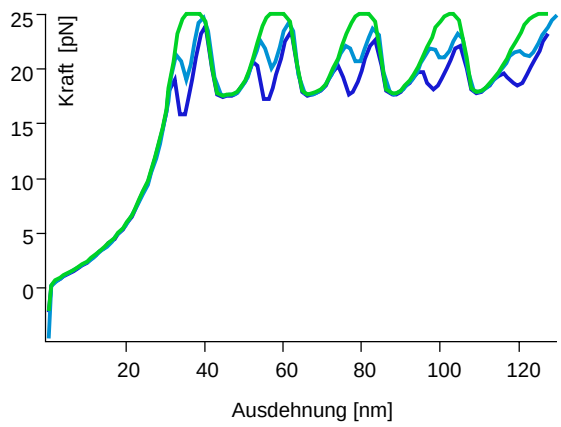


Abbildung 15:

Simulation der Unzipping-Kurven von doppelsträngiger DNA mit Blöcken reiner Basenpaare ($A_{10}G_{10}$, grün) und mit einer (hellblau) bzw. zwei (dunkelblau) Fehlstellen.

Um die zur Messung dieser Kurven nötige Genauigkeit zu erhalten, muss die Frequenzbreite der Messung – und damit auch die beobachtete Frequenzbreite des thermischen Rauschens – stark eingeschränkt werden. In den hier dargestellten Messungen wurde dies durch die Mittelung von 20 bis 200 Messwerten für jeden aufgenommenen Datenpunkt und anschließendes Glätten der Daten mit einem Box-Car-Algorithmus erreicht. Bei den Experimenten an den vollständig komplementären Molekülen wurde sehr häufig eine Kraftvariation im vorhergesagten Abstand beobachtet (Abbildung 16 a).

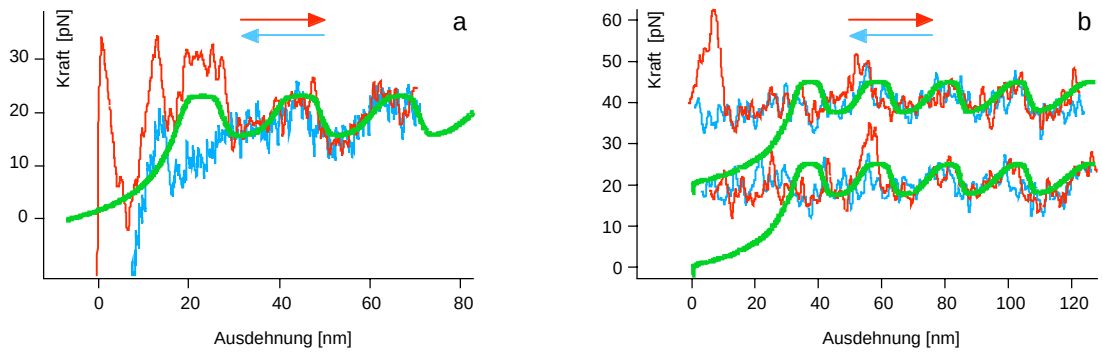


Abbildung 16: Unzipping-Kurven an doppelsträngiger DNA mit der Sequenz $(dA_{10}dG_{10})_5$•$(dT_{10}dC_{10})_5$ und simulierte Kurven (grün).

In den meisten Fällen war die maximal erreichte Ausdehnung vor der vollständigen Trennung jedoch deutlich kleiner als die theoretisch erwartete maximale Ausdehnung. In einigen Fällen konnten auch Kraftkurven über den vollen Ausdehnungsbereich aufgezeichnet werden. Bei den in den Experimenten typischen Ziehgeschwindigkeiten von etwa 50 nm/s waren die Dehnungs- und Entspannungskurven häufig auch reversibel. Abbildung 16 b zeigt zwei direkt

hintereinander aufgenommene Dehnungs- Entspannungszyklen. Man erkennt deutlich, dass die Kraft im Verlauf der Kurven mit einer Periode von etwa 20 nm um etwa 5 pN variiert. Diese Experimente zeigen, dass es möglich ist, Sequenzvariationen auf eines Skala von zehn Basenpaaren direkt über die Unzipping-Kraft zu messen. Analoge Experimente wurden auch an Molekülen mit Blöcken aus je 20 AT- bzw. GC-Paaren durchgeführt, wobei sich ebenfalls charakteristische Variationen in der Unzipping-Kraft beobachten ließen, in diesem Falle jedoch mit der zu erwartenden Periode von etwa 40 nm (Abbildung 17).

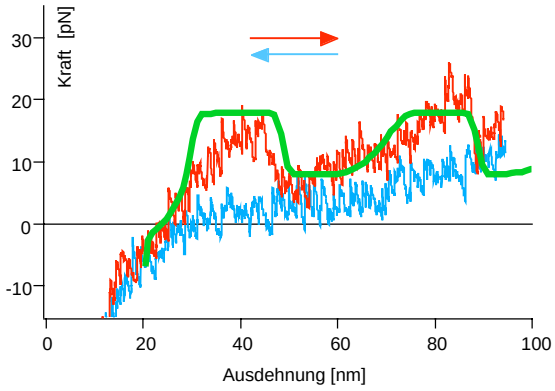


Abbildung 17:

Unzipping-Kurve eines modularen dsDNA-Moleküls mit Blöcken aus $(dA_{20}dG_{20})\bullet(dT_{20}dC_{20})$ und simulierte Kurve (grün).

Weitere Experimente wurden mit repetitiven Sequenzen mit je einer bzw. zwei Fehlstellen innerhalb von zehn Basenpaaren langen GC-Blöcken durchgeführt. Die Ausbeute an Kurven mit klarem Kraftmuster war dabei jedoch sehr klein. In Abbildung 18 ist beispielhaft eine solche Kurve dargestellt.

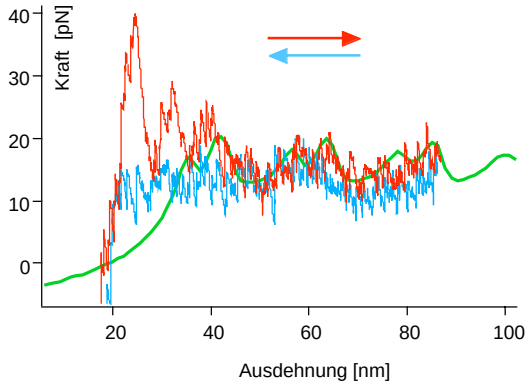


Abbildung 18:

Unzipping-Kurven der modularen $(dA_{10}dG_4\ TG_5)_5\bullet(dT_{10}dC_{10})_5$ Doppelstränge mit einer Fehlstelle und simulierte Kurve (grün). Das charakteristische Kraftmuster war hier nicht mehr klar aufzulösen.

Man erkennt zwar Variationen in der Kraft im Kurvenverlauf, die genaue Stärke und Periode dieser läßt sich jedoch nicht klar bestimmen, so dass eine Zuordnung der Muster zur jeweiligen Sequenz nicht mehr eindeutig möglich ist.

4.1.3. Unzipping nativer Sequenzen

Es wurden auch Unzipping-Experimente mit natürlich vorkommender DNA durchgeführt. Eine geeignete Wahl der Sequenz sollte es ermöglichen charakteristische Variationen der Unzipping-Kräfte zu detektieren und gleichzeitig die Probleme von Multistrangbildung und unvollständiger Hybridisierung zu vermeiden, die bei den modularen synthetischen Molekülen auftreten können. Dazu wurde das komplette Genom des Lambda-Phagen nach Sequenzen durchsucht, die in der theoretischen Simulation zu einer möglichst klaren Kraftvariation führen. Die ausgewählte Sequenz mit 90 Basenpaaren Länge besteht grob aus sechs Bereichen, die jeweils alternierend sehr GC- bzw. AT-reich sind. Diese Moleküle können keine stabilen Hairpins ausbilden, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass gleiche Moleküle – auf der Unterlage bzw. auf der Spitze – über eine Länge von bis zu neun Basen aneinander binden. Die theoretische Simulation zeigt, dass für den Fall des Unzippings im thermodynamischen Gleichgewicht in den Kraftkurven eine charakteristische Kraftvariation mit einer Periode um 25 nm (grüne Kurve in Abbildung 19) auftreten sollte. Da sich die Messwerte an der Grenze des derzeit mit Kraftmikroskopie erreichbaren Kraftbereichs bewegen, ist die Gesamtzahl der gemessenen Kraftspektren mit klar erkennbarem Kraftmuster auch hier klein, allerdings war die Ausbeute deutlich größer als in den Messungen mit den repetitiven Sequenzen.

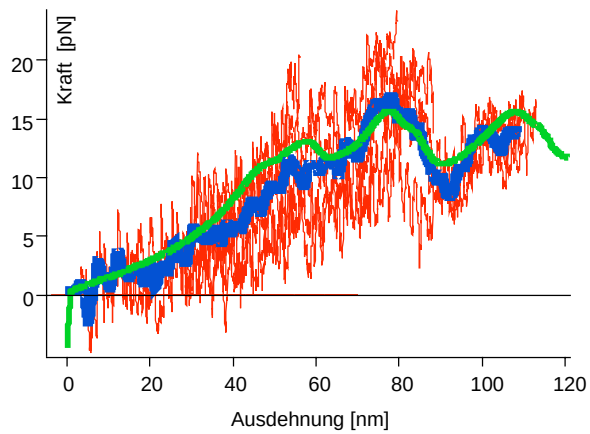


Abbildung 19:

Überlagerung mehrerer Unzipping-Kurven eines 90bp Abschnitts aus natürlicher Lambda-Phagen-DNA (rot) und eine gemittelte Kurve (blau) im Vergleich zur Simulation (grün).

In allen gemessenen Kurven, die die maximale Ausdehnung erreichen – und damit eindeutig in der gewünschten Unzipping-Geometrie stattfanden –

wurden im Bereich kleiner Ausdehnung zusätzliche Abrissereignisse beobachtet. Das deutet darauf hin, dass zunächst entweder mehrere Moleküle wechselwirken oder das untersuchte Molekül mit einer der Oberflächen interagiert. Abbildung 19 zeigt deshalb die Überlagerung mehrerer gemessener Kurven (rot) sowie eine über mehrere Kurven gemittelte (blau) im Vergleich zur theoretisch berechneten Unzipping-Kurve (grün). Für die gemittelte Kurve wurden acht Kurven, die jeweils über einen Längenbereich zwischen etwa 45 und 100 nm reichen, gemittelt. Obwohl die Messungen sich jeweils nahe an der Grenze zum thermischen Rauschen befinden erkennt man, dass der Mittelwert qualitativ und quantitativ in guter Übereinstimmung mit der theoretisch berechneten Kurve ist.

4.1.4. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass beim Unzippen von Oligonukleotiden mit repetitiven Blöcken aus reinen AT- bzw. GC-Basenpaaren und solchen mit nativen Sequenzen jeweils charakteristische Muster in den Kraftkurven beobachtet werden können, wobei eine Auflösungsgrenze um zehn Basenpaare erreicht wurde.
Für die Moleküle mit repetitiven Sequenzen war jedoch die Ausbeute an Kurven mit einem klar erkennbaren Muster gering. Dies hat mehrere prinzipielle und praktische Gründe: Die kleinen Kräfte (< 20 pN) und kleinen Ausdehnungen (<100 nm), die beobachtet werden sollen, erfordern eine ideale Stabilität des Versuchsaufbaus und der Umgebungsbedingungen. Schon kleinste Störungen durch Schall, Temperaturdrift oder Luftbewegungen während der Messung können die Messdaten so stark beeinträchtigen, dass die Effekte nicht mehr klar erkannt werden. Ein weiteres Problem liegt in den verwendeten repetitiven Sequenzen. Wie mittels Gelelektrophorese auch nachgeprüft werden konnte, ist die Hybridisierungsrate dieser Moleküle relativ gering, das heißt es bilden sich keineswegs immer vollständige Doppelstränge aus. Ebenso ist es möglich, dass sich mehrere Moleküle durch teilweisen Überlapp zu längeren Ketten verbinden. In diesem Fall kann jeweils nur ein Teil des so entstehenden doppelsträngigen Gebildes entfaltet werden. Möglicherweise können die repetitiven Sequenzen auch Strukturen höherer Ordnung ausbilden, wie sie schon für verschiedene ähnliche Sequenzen mit Blöcken gleicher Basen beobachtet wurden.[240] Die Kraftvariationen finden immer im Bereich zwischen etwa 10 und

25 pN statt, was mit den theoretischen Vorhersagen gut übereinstimmt. Grundsätzlich steht der Bindungsprozess der beiden Einzelstränge aber auch in Konkurrenz zur Bindung der Moleküle an die Oberflächen. In den hier beschriebenen Experimenten wurde versucht die Bindung an die Oberflächen zu minimieren, indem die Oberflächen chemisch mit hydrophilen Gruppen funktionalisiert wurden, welche die unspezifische Adhäsion minimieren sollten. Außerdem wurden die Messungen in Pufferlösung mit kleinen Konzentrationen von Detergenzien durchgeführt. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass durch die Krafteinwirkung diese Passivierung beeinträchtigt oder die repulsive Energiebarriere überwunden wird, so dass die Moleküle über van-der-Waals Wechselwirkung an der Oberfläche adhärieren könnten. Experimente mit einzelnen Polyelektrolyten haben gezeigt, dass der von der Elektrostatik unabhängige Beitrag zur Desorptionskraft einzelner Polymermoleküle an Oberflächen um 30 pN liegt.[123] Trotz der verwendeten chemischen Passivierung der Oberflächen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass im Bereich kleiner Ausdehnungen ein Einfluss der Desorption auf die Kraftmuster möglich ist. Kontrollmessungen an nicht komplementären Oligonukleotiden ergaben in seltenen Fällen Adhäsionskräfte von bis zu 20 pN, allerdings nur über Ausdehnungen von weniger als 15 nm, was weniger als eine Periode der in den eigentlichen Experimenten beobachteten Kraftvariation ist. Das zeigt, dass dieser Effekt die Messungen nur im Bereich kleiner Ausdehnungen beeinträchtigt. Angesichts aller Unwägbarkeiten erstaunt es nicht, dass die Ausbeute an Kurven mit vollständiger Länge klein war. Die Längenskala der beobachteten Kraftvariationen war in den beschriebenen Experimenten aber auch bei geringeren Ausdehnungen jeweils typisch für die verwendeten Sequenzen. Das bedeutet, dass das typische Kraftmuster bei diesen Molekülen immer der verwendeten Sequenz zugerechnet werden kann. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Ursache des sequenztipischen Kraftmusters bei kleinen Ausdehnungen nicht ausschließlich im Unzipping von Doppelsträngen liegt und möglicherweise auch Desorptionskräfte und Multistrangbildung eine Rolle spielen. Für die Kurven, die die volle erwartete Ausdehnung zeigen können diese Effekte – vor allem aus geometrischen Gründen – ausgeschlossen werden. Im Bereich großer Ausdehnungen (etwa größer 40 nm) kommt als einzig plausible Erklärung für das Kraftmuster nur das Unzipping einzelner Doppelstränge in Frage.

Dieser Schluss wird durch die Ergebnisse der Messungen an den Oligonukleotiden mit nativer Sequenz untermauert, in denen Multistrangbildung ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise hat aber die Hybridisierung von Molekülen gleicher Sequenz – also die Bindung von Molekülen an der Spitze aneinander – auf der Zeitskala des Experiments als Konkurrenzprozess zur vollständigen Doppelstrangbildung einen Einfluss auf die Messungen. Dies würde dazu führen, dass im Bereich kleiner Ausdehnungen die gleichzeitige Wechselwirkung mehrerer Moleküle auftreten könnte. In den Fällen, in denen die volle Unzipping-Länge erreicht wurde, waren bei Abständen von weniger als etwa 40 nm tatsächlich zusätzliche Abrissereignisse zu sehen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die konkurrierenden Bindungsprozesse eine weitere praktische Beschränkung der Auflösungsgrenze bei kurzen Molekülen darstellen. Für Abstände größer als etwa 40 nm sollte dieser Einfluss zu vernachlässigen sein, da in diesem Fall nur die verbindenden ssDNA-Stränge teilweise durch doppelsträngige Abschnitte ersetzt würden. Bei Kraftanwendung parallel zur Molekülachse bliebe der Doppelstrang in diesem Fall unbeeinträchtigt (siehe auch folgendes Kapitel). Aufgrund der höheren Biegesteifigkeit – bzw. der größeren Persistenzlänge – von dsDNA gegenüber ssDNA sollte sich dadurch die Kraftauflösung tendenziell sogar verbessern.

Es konnte also gezeigt werden, dass es mit Kraftmikroskopie möglich ist an synthetischen sowie an nativen Sequenzen charakteristische Kraftmuster beim Unzipping mit einer Auflösung von etwa 10 bis 20 Basenpaaren zu messen. Die bei den Messungen auftretenden praktischen Probleme könnten zum Teil mit weicheren und driftstabileren Cantilevern verringert werden. Zudem ist aber immer eine genaue Kontrolle der chemischen Funktionalität der Oberflächen unabdingbare Voraussetzung für klar interpretierbare Messergebnisse. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen Wege auf, wie es in der Zukunft möglich sein sollte Messungen mit noch größerer Genauigkeit durchzuführen.

4.2. DNA-Mechanik und DNA-bindende Moleküle

In den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten wurde die Auswirkung verschiedener DNA-bindender Moleküle auf das mechanische Verhalten von DNA untersucht. Dazu wurden einzelne DNA-Moleküle mit einigen tausend Basenpaaren gemischter Sequenz mit einem Kraftspektroskop in Pufferlösung gedehnt und die Kraft-Ausdehnungs-Kurven analysiert (Abbildung 20).[17]

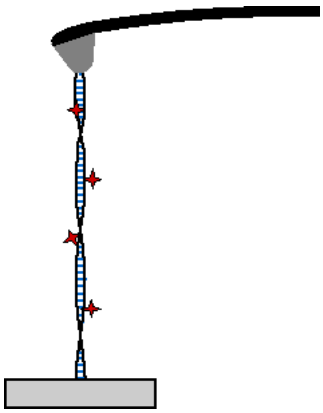


Abbildung 20:

Schematische Darstellung der kraftspektroskopischen Untersuchung der Wirkung DNA-bindender Moleküle. Es wurden jeweils einige tausend Basenpaare lange DNA-Moleküle gedehnt und das Kraft-Abstands-Verhalten vor und nach der Komplexierung analysiert.

4.2.1. Cisplatin-Crosslinks

Das Chemotherapeutikum Cisplatin bindet kovalent an DNA und kann, abhängig von der jeweiligen Sequenz, verschiedene Addukte bilden. Da Cisplatin zwei mögliche Bindungsstellen besitzt, können Crosslinks innerhalb eines Strangs (intrastrang) und zwischen den beiden Strängen (interstrang) entstehen, wobei in Molekülen mit gemischter Sequenz die G*G* Intrastrang-Crosslinks mit einem Anteil von 60 bis 65% aller Bindungen am häufigsten auftreten.[172,174,241] Abbildung 21 zeigt die Kraft-Abstandskurven eines unbehandelten DNA-Moleküls (a) neben der eines vollständig mit Cisplatin komplexierten Moleküls (b). Man erkennt, dass durch die Cisplatin-Bindung die Kooperativität des Überstreckungsplateaus deutlich reduziert wird – an Stelle des flachen Plateaus zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Kraft bis 73 pN.

[17] Soweit es nicht anders angegeben ist handelt es sich dabei um Moleküle aus Lambda Bst EII Digest. Die Messungen wurden bei pH 8,0 in TE-Puffer mit 150 mM NaCl durchgeführt. Details der Probenpräparation und Messungen finden sich im Anhang 6.5.

Die ursprüngliche Plateaukraft wird aber erst bei einer deutlichen Überstrekkung des Moleküls erreicht. Im Bereich zwischen 73 und 310 pN verläuft die Kraftkurve fast linear und es ist kein Schmelzübergang in der Kurve erkennbar. Die Relaxationskurve des komplexierten Moleküls folgt der Streckungskurve, es ist also keine Schmelzhysterese mehr vorhanden. Das zeigt deutlich, dass es nicht mehr möglich ist, die komplexierten Moleküle mechanisch dauerhaft in Einzelstränge aufzutrennen. Dieses Verhalten ist im Bereich zwischen 200 nm/s und 4000 nm/s unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit und hängt auch nicht von der maximalen Zugkraft ab.

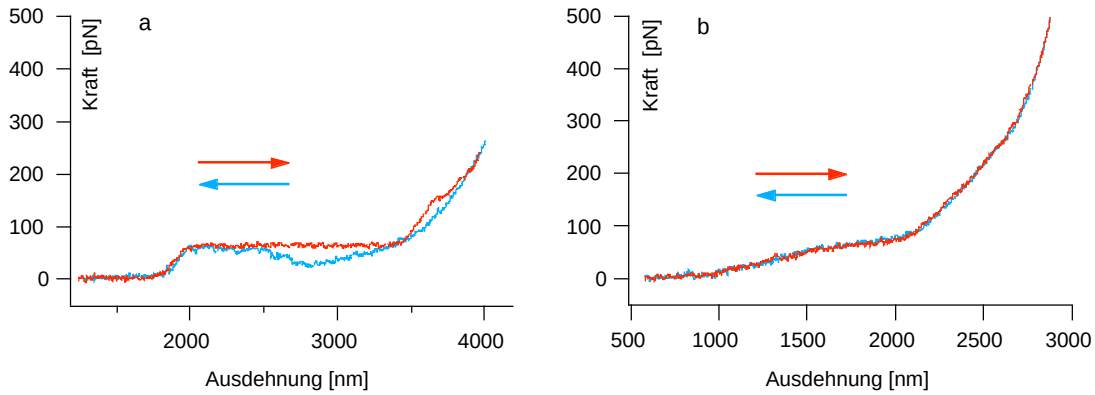


Abbildung 21: Kraftspektren eines unbehandelten (a) und eines vollständig mit Cisplatin abgesättigten DNA-Moleküls (b).[242]

Da die vollständige Reaktion mit Cisplatin in einem Mehrschrittprozess über mehrere Stunden erfolgt, ist es möglich die ersten Schritte der Reaktion an einzelnen Molekülen zu verfolgen. Dies ist in Abbildung 22 dargestellt. Unmittelbar nach der Zugabe von Cisplatin weist die Kraftkurve noch alle für B-DNA typischen Merkmale auf (Kurve a). Insbesondere erkennt man das flache Überstreckungsplateau bei 65 pN, den Schmelzübergang bei größeren Kräften und die Hysterese zwischen Dehnungs- und Entspannungskurve. Nach einer Stunde Reaktionszeit – und damit einer nur kleinen Zahl an bifunktionalen Cisplatin-Crosslinks – erkennt man, dass der Kraftanstieg am Anfang des Plateaus flacher verläuft und bei kleineren Ausdehnungen beginnt. Der Schmelzübergang ist weiterhin klar sichtbar, doch es tritt fast keine Hysterese zwischen Dehnungs- und Entspannungskurve auf. Das bedeutet, dass schon wenige Crosslinks die dauerhafte Strangtrennung verhindern können. Da diese Effekte

mit einer deutlichen Zeitverzögerung nach der Zugabe von Cisplatin auftreten, kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um einfache elektrostatische Effekte durch die positive Ladung des Cisplatins handelt. Kurve (c) zeigt zum Vergleich das Kraftspektrum eines vollständig platinierten Moleküls, das das oben beschriebene Verhalten aufweist.

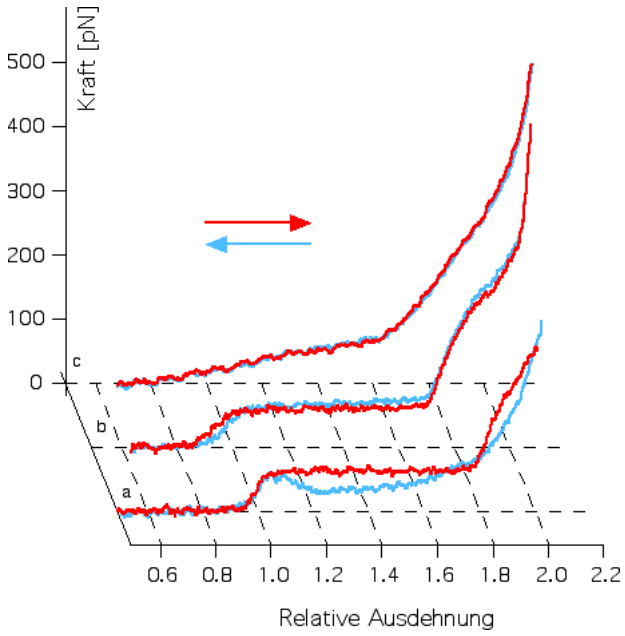


Abbildung 22:

Kraftspektren eines einzelnen DNA-Moleküls direkt nach der Zugabe von Cisplatin (a) und nach einer Stunde Reaktionszeit (b) sowie das eines abgesättigten Moleküls nach 24 Stunden (c). Die Komplexierung verringert die Kooperativität des Überstreckens und verkürzt das Molekül. Schon wenige Crosslinks reichen aus, um die Hysterese zu unterbinden.[196]

Um das mechanische Verhalten direkt mit bestimmten Addukten korrelieren zu können, wurden die gleichen Experimente auch mit verschiedenen Molekülen mit repetitiven Sequenzen durchgeführt. Abbildung 23 zeigt die Kraftspektren von poly(dGdC)•poly(dGdC) Molekülen im unbehandelten (a) und im vollständig platinierten Zustand (b).

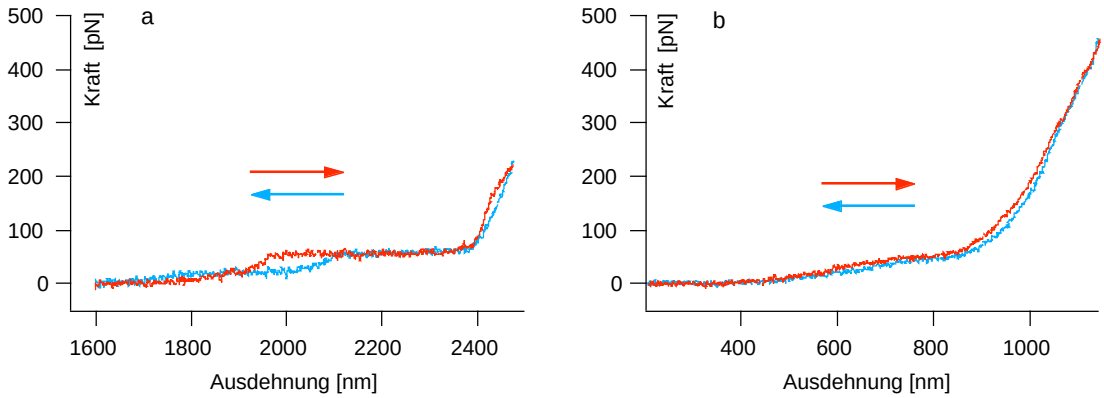


Abbildung 23: Kraftspektren eines unbehandelten (a) und eines vollständig mit Cisplatin abgesättigten poly(dGdC)•poly(dGdC) Moleküls (b).[242] Nach der Komplexierung ist die Dehnungskurve stark verändert und es können keine Hairpins mehr erzeugt werden.

An diesen Molekülen kann Cisplatin nur zwei mögliche bifunktionale Addukte ausbilden: G*C•CG* Interstrang-Crosslinks und G*XG* Intrastrang-Crosslinks. Außerdem sind diese Moleküle selbstkomplementär, können also auf sich selbst zurückfalten und Haarnadelstrukturen (Hairpins) ausbilden. Ohne Cisplatin ist deutlich zu erkennen, dass durch ein Überstrecken des Moleküls über den Schmelzübergang hinaus ein weiteres Plateau um 20 pN in den Kraftkurven auftaucht, dessen Länge auf Kosten der des Überstreckungsplateaus wächst. In diesem sogenannten Unzipping-Plateau werden Haarnadelstrukturen (Hairpins) neu gebildet bzw. entfaltet.[95] Nach der Anbindung von Cisplatin (b) erkennt man, dass die Überstreckung deutlich an Kooperativität verloren hat und der Schmelzübergang vollständig verschwunden ist. Auch nach Dehnung mit über 500 pN tritt nur sehr wenig Hysterese auf und es bilden sich keine Hairpins aus. Das zeigt, dass die Gegenwart von G*C•CG* Interstrang-Crosslinks und G*XG* Intrastrang-Crosslinks ausreicht, um die Kooperativität von Überstreckung und Schmelzen drastisch zu vermindern und eine dauerhafte Strangtrennung zu verhindern.

Die in Abbildung 24 gezeigten Kurven wurden an poly(dAdC)•poly(dGdT) Molekülen gemessen, an denen Cisplatin nur an einem Strang der Doppelhelix binden kann, nämlich an poly(dGdT). Als einzige bifunktionale Addukte können hier nur G*XG* Intrastrang-Crosslinks entstehen.

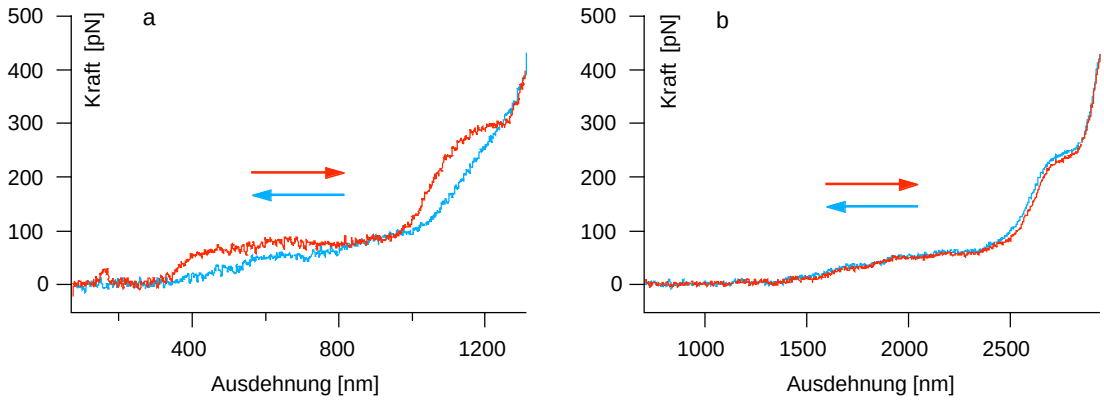


Abbildung 24: Kraftspektren eines unbehandelten (a) und eines vollständig platinierten Moleküls poly(dAdC)•poly(dGdT) (b).[242]

Man erkennt, dass diese Addukte ausreichen, um die Kooperativität des Überstreckens und die Schmelzhysterese deutlich zu reduzieren. Jedoch tritt auch bei den vollständig platinierten Molekülen ein klar ausgeprägter Schmelzübergang auf. Das weist darauf hin, dass der Doppelstrang noch immer in einem ähnlichen Prozess wie in den unbehandelten Molekülen aufgetrennt werden kann. Die fehlende Hysterese zeigt aber, dass die Stränge schon während der Entspannung wieder hybridisieren. Die erhöhte Hybridisierungsrate kann dadurch erklärt werden, dass die beiden Stränge zwar aufgetrennt, aber nicht räumlich getrennt werden, etwa indem eine Wegdiffusion des abgeschmolzenen Strangs durch die positive elektrostatische Ladung des Cisplatins verhindert wird.

In poly(dG)•poly(dC) Molekülen kann Cisplatin ebenfalls nur an einen der beiden Stränge binden. Grundsätzlich sind die beiden Intrastrang-Crosslinks G*G* und G*GG* möglich, wobei die Crosslinks zwischen zwei benachbarten Guaninbasen jedoch deutlich begünstig sind.[172,174,241] Man kann also annehmen, dass das mechanische Verhalten von den G*G* Intrastrang-Crosslinks dominiert wird. Abbildung 25 zeigt die Kraftspektren eines unbehandelten (a) und eines vollständig platinierten Moleküls (b).

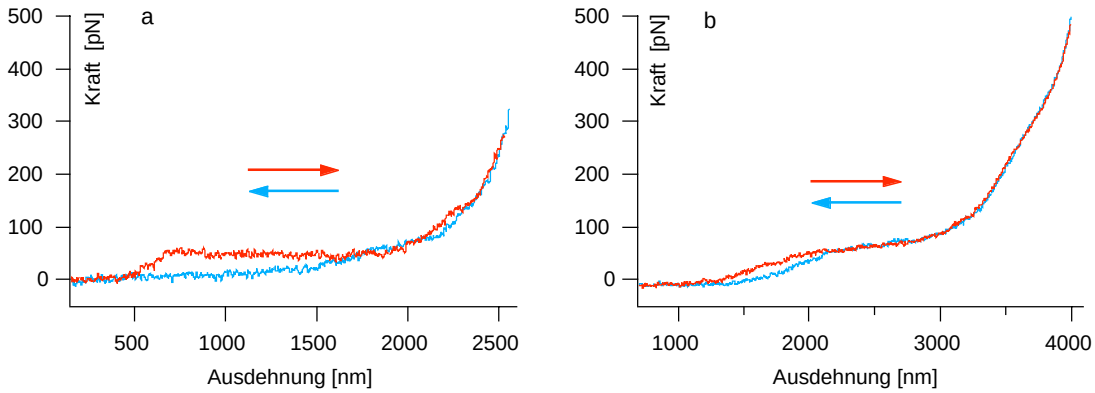


Abbildung 25: Kraftspektren eines unbehandelten (a) und eines mit Cisplatin abgesättigten Moleküls poly(dG)•poly(dC) (b).[242]

Das unbehandelte Molekül zeigt die bekannte Überstreckungscharakteristik von B-DNA mit einem kooperativen Überstreckungsplateau bei 65 pN, dem Schmelzübergang um 150 pN und Schmelzhysterese. Die Bindung von Cisplatin reduziert auch in diesen Molekülen die Kooperativität des Überstreckens. Ein Schmelzübergang ist ebenfalls nicht mehr erkennbar, aber in geringem Maße tritt noch Hysterese auf, jedoch immer nur im Bereich kleiner Kräfte.
Die Spezifizität der beobachteten Effekte wurde an Molekülen mit der Sequenz poly(dAdT)•poly(dAdT) überprüft, an die Cisplatin nicht bindet. Diese Moleküle sind selbstkomplementär, das heißt die Einzelstränge können auch auf sich selbst zurückfalten, was in den Kraftspektren durch das Auftreten von Unzipping-Plateaus bei 10 pN beobachtet werden kann. Das Überstreckungsplateau tritt schon bei deutlich geringeren Kräften auf als bei Molekülen gemischter Sequenz, wobei die Duplexe auch schon während des Überstreckens schmelzen können. Abbildung 26 zeigt die Kraftspektren von unbehandeltem poly(dAdT)•poly(dAdT) (a) und nach 24-stündiger Inkubation mit Cisplatin (b). In beiden Kurven erkennt man das Überstreckungsplateau bei etwa 30 bis 50 pN sowie das vollständige Schmelzen des Doppelstrangs. Auch die Unzipping-Plateaus bei 10 pN treten weiter auf und es sind keine qualitativen Unterschiede in den Kraftspektren erkennbar. Das Verhalten der Moleküle ist auch in Gegenwart von Cisplatin in guter Übereinstimmung mit dem von Rief et al.[95] beschriebenen Verhalten und den theoretischen Vorhersagen von Rouzina et al.[98]

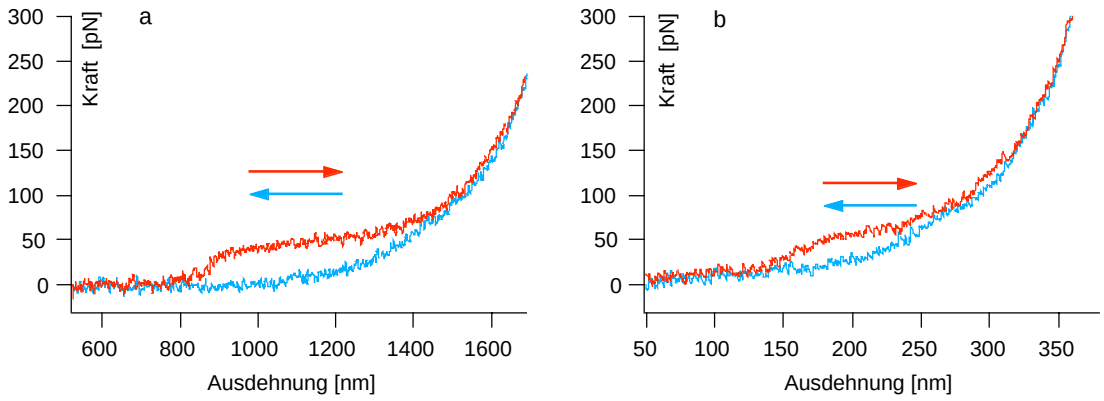


Abbildung 26: Die Kraftspektren von mit Cisplatin inkubierten poly(dAdT)•poly(dAdT) Molekülen (b) unterscheiden sich qualitativ nicht von denen unbehandelter Moleküle gleicher Art (a).[242]

Es konnte gezeigt werden, dass Cisplatin-Crosslinks in Molekülen gemischter Sequenz die Kooperativität des Überstreckens stark reduzieren und eine permanente mechanische Strangtrennung verhindern. Durch eine sequenzspezifische Untersuchung konnte gezeigt werden, dass G*G* und G*XG* Intrastrang-Crosslinks die Kooperativität des Überstreckens gleichermaßen verringern. Der Schmelzübergang wird aber nur durch G*G* und G*C•CG* Crosslinks unterbunden, während er durch G*XG* Addukte nicht beeinträchtigt wird. Eine dauerhafte Strangtrennung ist jedoch auch bei G*XG* Addukten nicht möglich. Nur in Molekülen mit G*G* Crosslinks ist Schmelzhysterese erkennbar – allerdings auch hier in wesentlich geringerem Maße als in unbehandelten Molekülen. Die drastische Reduktion der Hysterese in allen Molekülen bedeutet, dass der Doppelstrang nicht permanent aufgetrennt werden kann und zudem wesentlich schneller rehybridisiert als in unkomplexierten Molekülen. Für die poly(dAdC)•poly(dGdT) Moleküle kann man die Rehybridisierungsrate abschätzen, da das komplette Fehlen von Hysterese bedeutet, dass während der Entspannung alle Basenpaare korrekt rekombinieren müssen. So ergibt sich eine untere Grenze von 20 kb/s, was im Vergleich zu den Raten unbehandelter B-DNA um einen Faktor von drei erhöht ist.[97] Da in den Kurven keinerlei Anzeichen von Schmelzhysterese zu erkennen sind, liegt die tatsächliche Rehybridisierungsrate vermutlich noch deutlich über dieser Grenze.

4.2.2. Interkalatoren und Groove-Binder

Interkalatoren und Groove-Binder binden im Gegensatz zu Cisplatin nicht-kovalent an DNA. Die hier untersuchten Moleküle stellen typische Repräsentanten der jeweiligen Bindungsmode dar. Alle Interkalatoren sind klassische einfache Interkalatoren und die Groove-Binder Netropsin und Hoechst 33258 binden nur in dieser definierten Bindungsmode. Berenil hingegen ist ein klassischer Groove-Binder, der unter bestimmten Bedingungen auch interkalativ bindet.[18] Deshalb werden hier zunächst die Messungen an den einfachen Bindern vorgestellt und dann die Besonderheiten bei mehreren möglichen Bindungsmoden diskutiert.

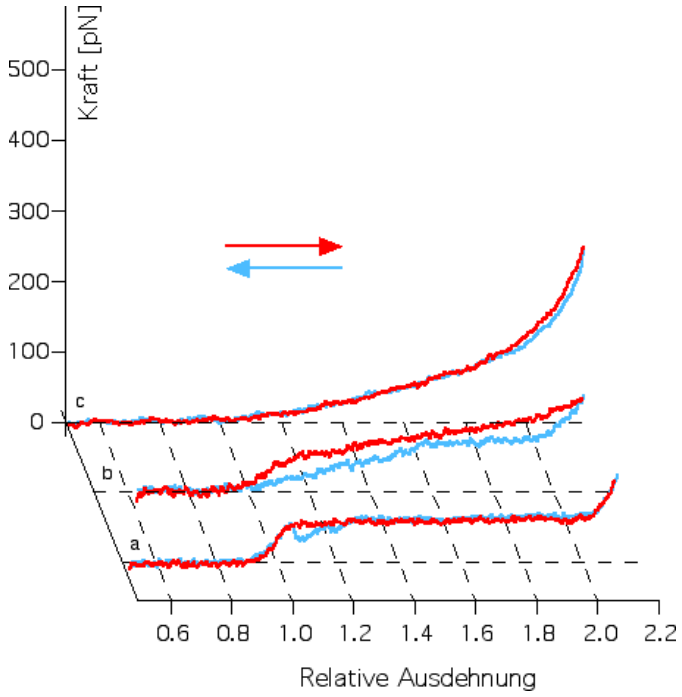


Abbildung 27:

Kraftspektren eines DNA-Moleküls in reinem Puffer (a) und in Gegenwart von 0,44 µg/ml und 2,2 µg/ml Ethidium Bromid. Die Konzentrationen entsprechen in etwa Verhältnisen von einem Molekül Ethidium pro zehn (b) bzw. zwei Basenpaaren (c).[196]

Abbildung 27 zeigt die Kraftspektren eines einzelnen DNA-Moleküls in verschiedenen Umgebungsbedingungen. Zu Beginn der Messung (a) befindet sich das Molekül in reiner Pufferlösung ohne Ethidium. Das Molekül zeigt das bekannte Dehnungsverhalten mit einem sehr kooperativen Überstreckungsplateau bei 65 pN und Schmelzhysterese. Kurve (b) zeigt das Kraftspektrum des gleichen Moleküls nach der Zugabe von 0,44 µg/ml Ethidium Bromid, was etwa einem Verhältnis von einem Molekül des Interkalators pro zehn Basenpaaren

[18] Psoralen bindet zunächst durch einfache Interkalation, kann aber durch Bestrahlung mit UV-Licht auch kovalente Crosslinks bilden.

entspricht.[19] Man erkennt, dass die Kooperativität des Überstreckens deutlich reduziert ist und weiter Schmelzhysterese in der Kurve auftritt. Nach der Zugabe von 2,2 µg/ml Ethidium Bromid (entsprechend einem Molekül Ethidium pro zwei Basenpaare) ist die Kooperativität des Überstreckens vollständig verschwunden, und es tritt keine Hysterese mehr auf. Der Beginn der Überstreckung ist dabei jeweils zu größeren Ausdehnungen hin verschoben. Die an den einzelnen Molekülen direkt gemessenen Veränderungen wurden für jede Konzentration mit den Dehnungskurven anderer Moleküle unter gleichen Bedingungen verglichen. Dabei waren die Abweichungen der skalierten Kurven voneinander sehr klein, so dass das gezeigte Verhalten für alle Moleküle gemischter Sequenz typisch ist.

Der Interkalator Proflavin zeigt sehr ähnliche Auswirkungen auf die Kraftspektren. Abbildung 28 zeigt die Kraftspektren von DNA-Molekülen – jeweils skaliert auf die Konturlänge – in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Proflavin, die den Verhältnissen von einem Molekül pro zehn, vier und einem Basenpaar entsprechen.

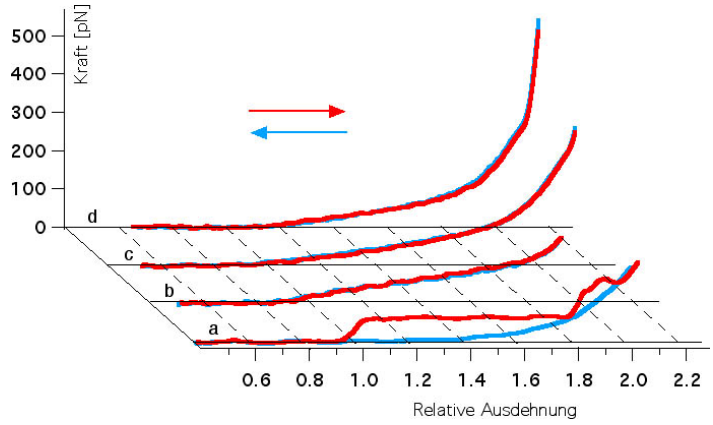


Abbildung 28:

Kraftspektren verschiedener DNA-Moleküle in reinem Puffer (a) und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Proflavin (b: 0,30 µg/ml, c: 0,74 µg/ml, d: 3,0 µg/ml).[243]

Mit zunehmender Anzahl interkalierter Moleküle wird das Überstreckungsplateau kürzer und steiler, das heißt die Überstreckung findet innerhalb einer kürzeren Strecke über einen größeren Kraftbereich hinweg statt, wobei sich der Anfang der Überstreckung zu immer größeren Ausdehnungen hin verschiebt. Ab einer Konzentration von 0,30 µg/ml reicht der Überstreckungsbereich bis zu einer Kraft von 120 pN, im Gegensatz zu etwa 70 pN bei unbehandelten Mole-

[19] Die Abschätzung der Molekülverhältnisse ist im Anhang 6.5 dargestellt.

külen. Der Schmelzübergang ist in den Kurven nicht mehr klar auszumachen und bei Konzentrationen über 0,30 µg/ml wird keine Schmelzhysterese mehr beobachtet.

Es wurde auch die Wirkung von Proflavin auf die Hairpin-bildenden poly(dGdC)•poly(dGdC) Moleküle untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass durch das Überstrecken der interkalierten DNA-Moleküle kaum neue Hairpins entstehen. Abbildung 29 a zeigt, wie ein einzelnes Molekül poly(dGdC)•poly(dGdC) mit Kräften von etwa 300 pN gedehnt wird. Auch in diesen Molekülen wird die Kooperativität des Überstreckens drastisch verringert. Bei höheren Kräften findet sich weiter der Schmelzübergang, doch es tritt fast keine Hysterese auf und es werden deutlich weniger Hairpins gebildet als ohne Proflavin. Das entfalten bestehender Hairpins findet aber weiter um 20 pN statt (siehe Abbildung 29 b).

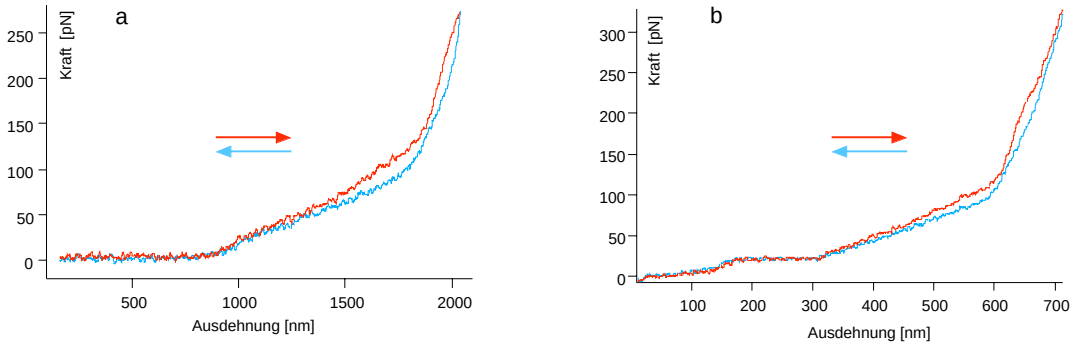


Abbildung 29: Kraftspektren von poly(dGdC)•poly(dGdC) in Gegenwart von 0,3 µg/ml Proflavin. Man erkennt, dass durch ein Überstrecken der Moleküle mit mehr als 300 pN keine Hairpins gebildet werden, bestehende Hairpins aber weiter bei 20 pN entfaltet werden (b).

Einfache Interkalation durch Trimethylpsoralen führt zu qualitativ sehr ähnlichen Kraftkurven, wobei jedoch die Konzentration des Psoralens in der Pufferlösung aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit nicht beliebig variiert werden kann.[20] Abbildung 30 zeigt eine Kraftkurve, die an mit Psoralen inkubierter DNA in TE-Puffer gemessen wurde. Man erkennt, dass das

[20] Eine detaillierte Untersuchung der mechanischen Effekte von Psoralenen und der Auswirkungen der UV-induzierten Crosslinks wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Stefan Fischerländer durchgeführt. Eine kurze Zusammenfassung findet sich im Anhang 6.2.

Überstreckungsplateau weniger kooperativ ist als in unbehandelten Molekülen. Bei den maximal erreichten Psoralen Konzentrationen wurde noch deutliche Schmelzhysterese beobachtet.

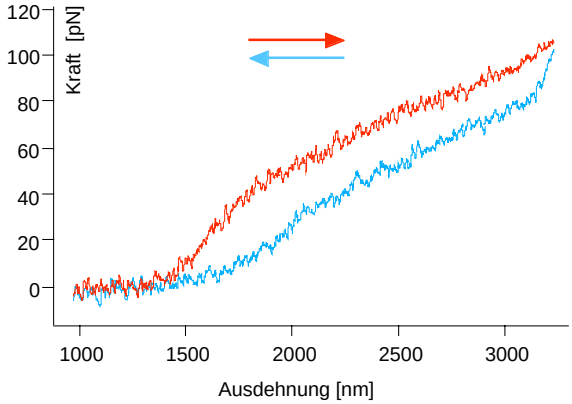


Abbildung 30:

Kraftspektrum eines mit Psoralen interkalierten, nicht gecrosslinkten, Moleküls.

Netropsin bindet als klassischer Groove-Binder nicht-kovalent in die kleine Furche von B-DNA. Auch für diesen Fall konnte gezeigt werden, dass man die Bindung durch Kraftmessungen an einzelnen DNA-Molekülen direkt nachweisen kann. Abbildung 31 zeigt die Kraftspektren des selben Moleküls in reinem Puffer (a) und in Gegenwart von 14,6 µg/ml Netropsin (b und c), was etwa einem 2,5-fachen Überschuss von Netropsin zur vorhandenen Anzahl an Basenpaaren entspricht. Durch die Bindung verliert das Überstreckungsplateau etwas an Kooperativität und verschiebt sich gleichzeitig zu deutlich größeren Kräften. Statt der 65 pN bei unbehandelter DNA findet die Überstreckung nun im Kraftbereich zwischen 75 und 90 pN statt. Die Überstreckungslänge bleibt dabei nahezu unverändert. Der Schmelzübergang findet sich auch in den mit Netropsin komplexierten Molekülen. Es ist weiter möglich die Moleküle mechanisch zu schmelzen, was in Abbildung 31 (b und c) an der ausgeprägten Schmelzhysterese zu erkennen ist. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Form der Rückfahrkurven sich qualitativ leicht verändert, und das Rehybridisieren „glatter“, also mit weniger Zacken in der Kraftkurven, stattfindet. Qualitativ ähnliche Resultate wurden mit dem Groove-Binder Hoechst 33258 erzielt.

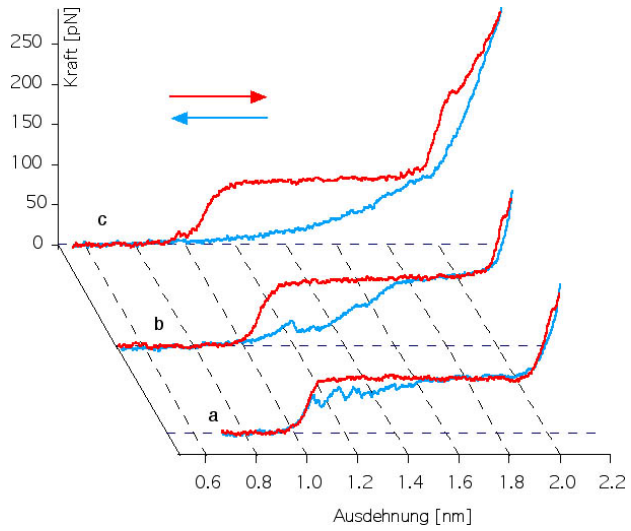


Abbildung 31:

Kraftspektren des gleichen DNA-Moleküls in reinem Puffer (a) und in Gegenwart von 14,6 µg/ml Netropsin (b und c), was einem 2,5-fachen Überschuss von Netropsin zur Anzahl der Basenpaare in der Probe entspricht.[196]

Berenil gilt ebenfalls als klassischer Groove-Binder, der selektiv an AT-reiche Sequenzen bindet. In jüngster Vergangenheit hat sich jedoch herausgestellt, dass Berenil auch in GC-reiche Sequenzen interkaliert – allerdings mit einer deutlich kleineren Bindungskonstante und damit erst bei größeren Konzentrationen.

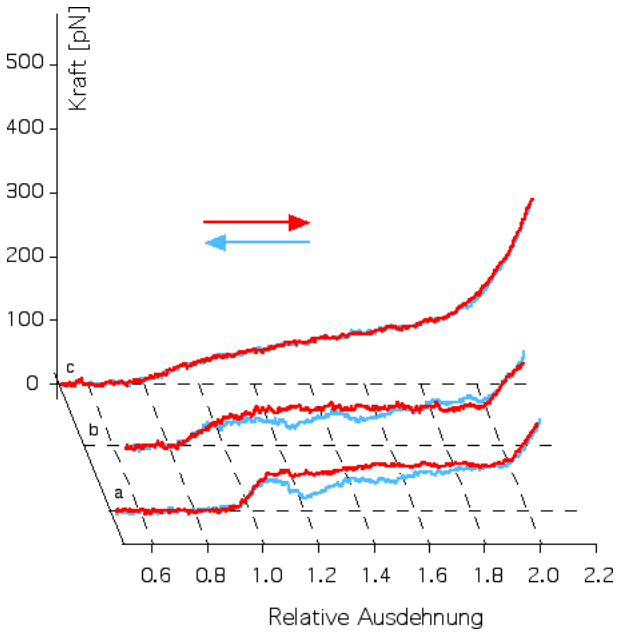


Abbildung 32:

Kraftspektren eines DNA-Moleküls in reiner Pufferlösung (a) und nach der Zugabe von Berenil in Konzentrationen von 1,5 µg/ml (b) und 15 µg/ml (c), entsprechend Verhältnissen von etwa einem Molekül Berenil pro 4 bzw. 0,4 Basenpaaren.[196]

Kleine Konzentrationen (Abbildung 32 b) verändern die Kraftkurven nur im Bereich kleiner Kräfte unterhalb des Überstreckungsplateaus. Das Plateau bleibt in der Länge und der Kraft unverändert, der Schmelzübergang wird weiter beobachtet und es tritt in gewohntem Maße Schmelzhysterese auf. Bei größeren Konzentrationen (Abbildung 32 c) verändert sich das Kraftspektrum jedoch drastisch: die Überstreckungsregion erstreckt sich nun über einen deutlich grö-

ßeren Kraftbereich und endet bei 95 pN. Bei größeren Kräften ist zwar weiter der Schmelzübergang zu erkennen, es tritt aber keine Schmelzhysterese auf. Auch in diesem Fall war es möglich die Reaktion direkt an einem einzelnen Molekül zu beobachten. Abbildung 32 zeigt die Kraftspektren des gleichen Moleküls in reinem Puffer (a) und in Gegenwart von Berenil in Konzentrationen von 1,5 µg/ml (b) und 15 µg/ml (c), entsprechend einem Verhältnis von einem Berenil pro vier bzw. 0,4 Basenpaaren. Wie bei allen anderen Molekülen war das gezeigte Verhalten typisch und die jeweiligen Dehnungskurven in sehr guter Übereinstimmung mit denen anderer DNA-Moleküle unter gleichen Bedingungen.

4.2.3. Diskussion

Die beobachteten typischen Effekte der verschiedenen DNA-bindenden Moleküle zeigen, dass sich die Art der Bindung deutlich und in einer jeweils für die Bindungsmode charakteristischen Art in den Dehnungskurven widerspiegelt. Alle untersuchten Interkalatoren – Ethidium, Proflavin und Psoralen – reduzieren die Kooperativität des Überstreckens drastisch, wobei auch immer eine deutlich höhere Kraft als bei unbehandelten Molekülen erreicht wird. Zudem tritt eine Verkürzung des Überstreckungsbereichs auf, die vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Interkalatoren selbst die Doppelhelix durch ihre Bindung überstrecken. Die reinen Groove-Binder Netropsin und Hoechst 33258 lassen die Plateaulänge dagegen unverändert. Die Überstreckungskraft steigt um etwa 40% an, die Kooperativität verringert sich dabei aber nicht so stark, wie bei Interkalation: Die Kooperativitätsparameter σ für Netropsin und Hoechst 33258 liegen um 10^{-5} im Gegensatz zu $7 \cdot 10^{-4}$ für unbehandelte und etwa 10^{-6} für interkalierte Moleküle.[21] Berenil, das sowohl als Groove-Binder als auch als Interkalator wirkt, verändert bei kleinen Konzentrationen nur das Verhalten im niedrigen Kraftbereich, während bei größeren Konzentrationen klar die für Interkalatoren typischen Effekte hervortreten. Eine eindeutige Zuordnung der Kraftspektren zu den Bindungsmoden ist in allen untersuchten Fällen möglich. Umgekehrt sollte es also auch möglich sein, die Kraftspektroskopie als analytisches Hilfsmittel zur Bestimmung der jeweiligen Bindungsmode einzu-

[21] Für die Interkalatoren ist eine genauere Angabe der Kooperativitätsparameter nicht möglich, da der Anfang der Überstreckung nicht mehr klar auszumachen ist.

setzen.[22] Dazu ist es zunächst notwendig die Charakteristika in den Kraftspektren jeder Bindungsmode zu identifizieren und zu vergleichen. Für den Fall der Groove-Binder wurden dazu die Dehnungskurven mehrerer Moleküle verschiedener Länge gemittelt (Abbildung 33). Die einzelnen gemessenen Kurven weichen jeweils nur unwesentlich von den gemittelten Kurven ab, was ein deutlicher Hinweis dafür ist, dass die Sequenzunterschiede zwischen den untersuchten Molekülen für diese Art von Messung unwesentlich sind solange der AT- bzw. GC-Anteil ähnlich groß ist.

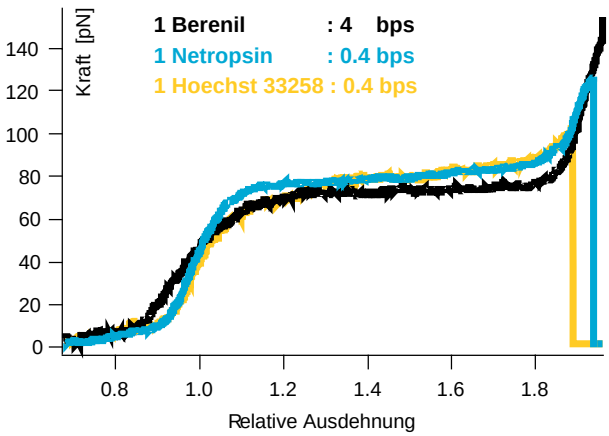


Abbildung 33:

Gemittelte Dehnungskurven mehrerer DNA-Moleküle in Gegenwart verschiedener Minor-Groove-Binder.[243]

Abbildung 33 zeigt auch die große Ähnlichkeit der gemittelten Dehnungskurven, die mit den jeweils gleichen relativen Mengen von Netropsin und Hoechst 33258 aufgenommen wurden. Weiter erkennt man, dass die gemittelten Berenil-Kurven im Bereich kleiner Kräfte schon bei einer zehnmal kleineren Konzentration von denen der beiden anderen Groove-Binder abweichen. Bei größeren Konzentrationen ergibt sich dann eine große Ähnlichkeit der Berenil-Kurven mit den Kurven, die in Gegenwart kleiner Interkalator-Konzentrationen gemessen wurden.

[22] Die hier vorgeschlagene Methode (vorab in [196] veröffentlicht) wurde mittlerweile auch von anderen Gruppen eingesetzt, um unbekannte Substanzen zu charakterisieren.[244]

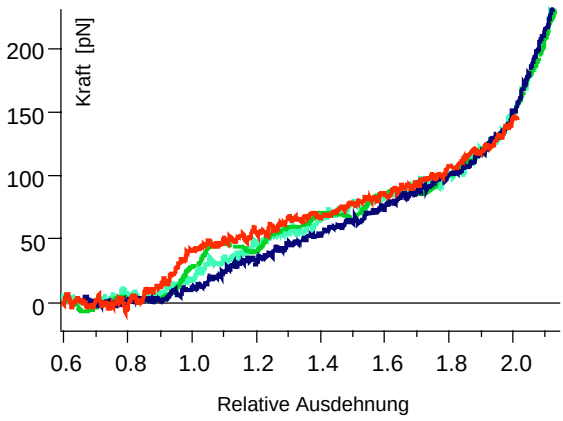


Abbildung 34:

Dehnungskurven einzelner DNA-Moleküle in Gegenwart verschiedener Interkalatoren (rot: 0,44 µg/ml Ethidium, grün: Psoralen, türkis: 15 µg/ml Berenil, blau: 0,3 µg/ml Proflavin).[243]

Abbildung 34 zeigt die große Ähnlichkeit dieser Kurven zu den Dehnungskurven, die mit den Interkalatoren Ethidium, Trimethylpsoralen und Proflavin gemessen wurden. Die bestehenden Unterschiede können dabei zum Teil auf die verwendeten Konzentrationen und die Bindungskonstanten der Moleküle zurückzuführen sein. Im Bereich der vollständigen Absättigung der DNA ergibt sich wieder eine große Übereinstimmung der Effekte von Proflavin und Ethidium (Abbildung 35).

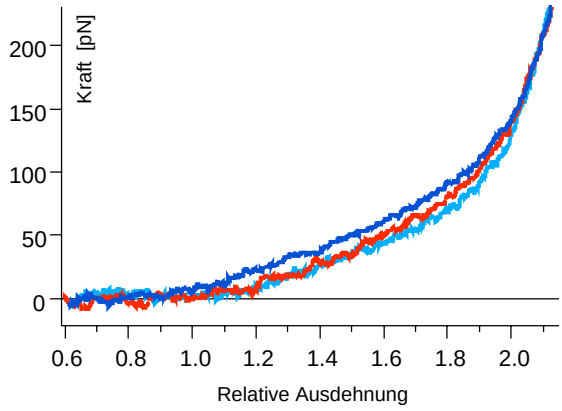


Abbildung 35:

Dehnungskurven einzelner mit Ethidium (rot: 2,2 µg/ml) und Proflavin (dunkelblau: 0,74 µg/ml, hellblau: 3,0 µg/ml) interkalierter DNA-Moleküle.[243]

4.2.4. Bezug zu klassischen Schmelzexperimenten

Nach dem in Kapitel 3.3.2 vorgestellten theoretischen Modell[98] spiegelt das Überstreckungsplateau im Gleichgewichtsfall das kraftinduzierte Schmelzen des Doppelstrangs wieder. Demnach sollten die Änderungen in Kraft und Steigung des Überstreckungsplateaus bei einer Variation der Umgebungsbedingungen mit denen der thermischen Schmelztemperaturen und Übergangsbreiten korrelieren. Die Wechselwirkung mit DNA-bindenden Molekülen stellt eine solche Variation dar. Bei zu starker Absättigung der Moleküle kann allerdings der

Schmelzprozess so stark verändert werden, dass eine einfache Beschreibung durch ein Zwei-Zustands-Gleichgewichtsmodell nicht mehr zutreffend ist. Tabelle 4 zeigt qualitativ[23] die gemessenen Veränderungen der Überstreckungskräfte F_s und Breiten ΔF_s des Überstreckungsplateaus neben den Schmelztemperaturen T_m und -bereichen ΔT_m, die zum Teil der Literatur entnommen sind und zum Teil selbst mit temperaturabhängigen Absorptionsmessungen an Oligonukleotiden gemischter Sequenz bestimmt wurden.[24]

	Substanz	**T_m**	**F_s**	**ΔT_m**	**ΔF_s**
CROSSLINKER	Cisplatin	-	-	+	+
INTER-KALATOREN	Ethidium	+	+	+	+
	Proflavin	+	+	+	+
MINOR-GROOVE-BINDER	Berenil	+/-[25]	0	+	+
	Netropsin	+	+	+	+
	Hoechst 33258	+	+	+	+

Tabelle 4: Qualitative Veränderung der thermischen Schmelztemperaturen T_m und –bereiche ΔT_m von DNA sowie der gemessenen Plateaukräfte F_s und Breite der Überstreckung ΔF_s bei Wechselwirkung mit verschiedenen DNA-bindenden Substanzen.

Für alle untersuchten Substanzen stimmt die qualitative Änderung der Kraftkurven also gut mit den thermodynamischen Ensemblewerten aus den klassischen Schmelzexperimenten überein. Diese Beobachtung stärkt die These, dass das Überstreckungsplateau eng an ein kraftinduziertes Schmelzen gekoppelt ist.

---

[23] Ein quantitativer Vergleich würde voraussetzen, dass die gleichen Moleküle für Kraftexperiment und Spektroskopie verwendet werden. Für die hier dargestellten Experimente ist das prinzipiell nicht möglich, da die Kraftexperimente an langen Molekülen durchgeführt werden müssen, eine genaue Analyse der Spektroskopiedaten aber nur mit kurzen Oligonukleotiden sinnvoll ist.

[24] Eine Beschreibung der Schmelzexperimente findet sich in Anhang 6.1.

[25] Bei Berenil hängt die Änderung der Schmelztemperatur von der Sequenz ab.

5. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigen, dass es möglich ist, Einzelmolekül-Kraftspektroskopie als analytisches Hilfsmittel zur Untersuchung von DNA einzusetzen. Die mögliche Unterscheidung von Bindungsmoden an einzelnen Molekülen bietet neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Wechselwirkung verschiedenster Substanzen mit DNA, wie sie etwa in frühen Phasen der Medikamententwicklung nötig sind. Wie am Beispiel von Cisplatin demonstriert wurde, kann das Bindungsverhalten durch die Verwendung spezifischer DNA-Sequenzen auch zu bestimmten Bindungssequenzen und sogar zu einzelnen Addukten korreliert werden. Dabei sind sowohl der technische als auch der zeitliche Aufwand für die entsprechenden Experimente durchaus zu anderen klassischen Techniken konkurrenzfähig. Durch eine Kombination des hier vorgestellten Messprinzips mit geeigneter Mikrofluidik sollte es darüber hinaus auch möglich sein, direkt kinetische Parameter wie Off-Raten verschiedener bindender Substanzen an einzelnen DNA-Molekülen zu bestimmen. Ebenso könnten Verdrängungsreaktionen und die relative Bindungspräferenz konkurrierender Binder untersucht werden.

Auch mit der derzeit mit Kraftmikroskopie erreichbaren Auflösung sollte es weiter möglich sein, die Auswirkungen von DNA-bindenden Substanzen auf das Unzipping zu untersuchen. Wie hier gezeigt werden konnte, erhöhen viele Interkalatoren und Groove Binder die zur Auftrennung des Doppelstrangs erforderlichen Kräfte. So könnten auch die Unzipping-Kräfte erhöht werden, was eine genauere Messung des Zusammenhangs zwischen Sequenz und Kraft ermöglichen könnte. Durch die Verwendung sequenzspezifischer Binder könnten auch gezielt bestimmte Sequenzen markiert werden. Für die in dieser Arbeit erstmals vorgestellten Messungen und Konzepte bieten sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung der physikalischen Prozesse und elementaren biochemischen und pharmakologischen Wirkmechanismen auf molekularer Ebene.

In den vergangenen Jahren hat sich das Verständnis von Systemen auf der Nanometer-Skala durch Fortschritte im experimentellen und theoretischen Bereich kontinuierlich erweitert. Durch die Kombination verschiedener Techniken, wie etwa optischer Spektroskopie und Kraftspektroskopie, wird es in Zukunft möglich sein, noch viele weitere Effekte direkt und mit bisher nicht ge-

kannter Präzision zu untersuchen und letztendlich zu verstehen. Inwieweit sich unser Weltbild dadurch weiter verändern wird ist noch nicht abzusehen - das Nano-Zeitalter hat eben erst begonnen.

6. Anhang

6.1. UV-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur doppelsträngiger Oligonukleotide wurden temperaturabhängige UV-Absorptionsmessungen durchgeführt. Da die beiden Einzelstränge bei 260 nm Licht stärker absorbieren als der jeweilige Doppelstrang ergibt sich beim Aufheizen der Probe ein sigmaoider Verlauf der Absorption mit der Temperatur. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur, bei der genau die Hälfte der Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt ist. Abbildung 36 zeigt die so gemessenen Kurven an einem doppelsträngigen 15mer in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Proflavin.[26]

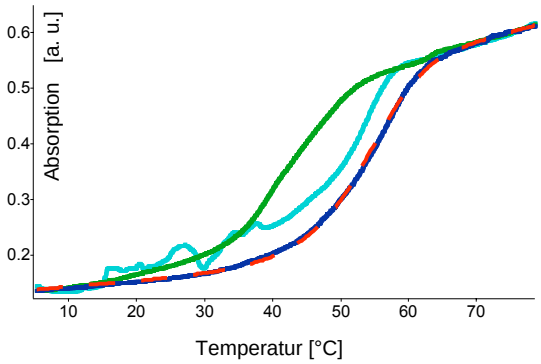


Abbildung 36:

Temperaturabhängige UV-Absorption von 15mer dsDNA in Gegenwart von 1,15 µM (grün), 5,75 µM (türkis) und 11,5 µM (dunkelblau) Proflavin sowie eine simulierte Kurve (rot gestrichelt).

Es wurde jeweils eine dsDNA-Konzentration von etwa 1-2 µM in TE-Puffer verwendet und die Konzentration des DNA-Binders variiert. Die gemessenen Kurven wurden mit einem Zwei-Zustands-Modell angefittet.[245]

[26] Die Messungen wurden von Julia Morfill im Rahmen eines Praktikums durchgeführt.

	c [µM]	T_m [°C]
-	0	36,8
Proflavin	1,15	41,3
	5,75	53,0
	11,5	55,3
Ethidium	1,15	41,5
	11,5	60,8
Netropsin	1,15	40,3
	11,5	56,8

Tabelle 5:

Schmelztemperaturen für15mer dsDNA (1,8 µM) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Proflavin, Ethidium Bromid und Netropsin.

6.2. Psoralen und DNA[27]

Es wurde der Einfluss von Psoralen (Trimethypsoralen), eines in der Photochemotherapie eingesetzten Wirkstoffs, auf das mechanische Verhalten von DNA untersucht. Psoralen bindet zunächst interkalativ an DNA, kann aber durch Bestrahlung mit UVA-Licht mit 320-400 nm Wellenlänge kovalente Crosslinks ausbilden. Diese können durch Bestrahlung mit UVC (100-280 nm) dann teilweise wieder aufgelöst werden. Das reversible Schalten konnte durch UV-Absorptionsmessungen am Ensemble nachgewiesen werden. Die Kraftspektren von mit Psoralen interkalierter DNA vor und nach der UVA-induzierten Quervernetzung sowie nach dem UVC-induzierten Auflösen der Crosslinks, wurden charakterisiert. Die Interkalation führt in der Dunkelreaktion zu Kraftspektren, wie sie auch in Wechselwirkungen mit anderen Interkalatoren beobachtet wurden (siehe auch 4.2.2). Erstmalige UVA-Bestrahlung reduziert dann den Elastizitätsmodul im Bereich bis 50 pN. Die Bestrahlung von unbehandelter DNA mit UVA führte ebenfalls zu einer Reduktion des Elastizitätsmoduls im gleichen Bereich – möglicherweise durch die Bildung von Einzelstrangbrüchen und das partielle Abschmelzen von Teilen des Doppelstrangs. Durch die UVA-Bestrahlung wird also auch die DNA selbst irreversibel geschädigt. Es konnte

[27] Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden größtenteils von Stefan Fischerländer im Rahmen seiner Diplomarbeit erarbeitet.[246]

aber gezeigt werden, dass die Verkleinerung des Elastizitätsmoduls durch UVC-Bestrahlung teilweise wieder umgekehrt werden kann. Dies konnte sowohl durch Messungen an mehreren mit UVC bestrahlten Proben, als auch direkt an einem einzelnen Molekül nachgewiesen werden (siehe Abbildung 37) indem das Molekül während des Experiments mit UVC bestrahlt wurde.

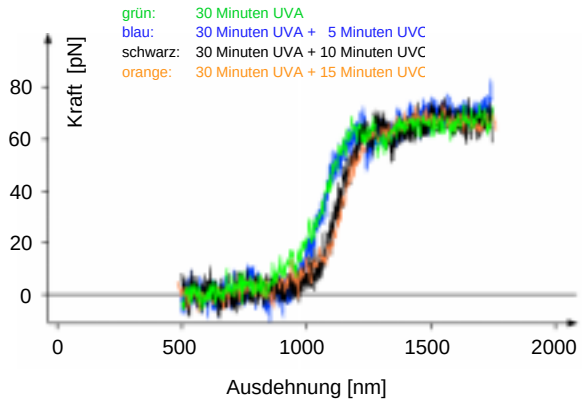


Abbildung 37:

Das durch UVC-Licht induzierte Aufbrechen von Psoralen-Crosslinks kann direkt an einem einzelnen DNA-Molekül verfolgt werden: man erkennt eine Zunahme von Konturlänge und Elastizitätsmodul.[246]

6.3. Theorie molekularer Bindungen[58-60,216,217]

Die Stärke von Bindungen im Gleichgewicht lässt sich durch die Gleichgewichtskonstante K^{-1} beschreiben, die sich wiederum aus den Reaktionsraten k_{on} und k_{off} von Hin- und Rückreaktion zusammensetzt. Jede Rate hängt dabei nur von einer „Grundreaktionsrate“ ν_0,[28] sowie der Höhe der Energiebarrieren – ΔG^{on} für die Hin- und ΔG^{off} für die Rückreaktion – ab:

$$K = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{\nu_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^{off}}{k_B T}\right)}{\nu_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^{on}}{k_B T}\right)} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{k_B T}\right).$$

[28] Die Konstante ν_0 kann entweder aus der sogenannten Eyring Theorie („transition state theory”), die eine reibungsfreie Bewegung im Potenzial voraussetzt, oder aus der Kramers-Theorie, die eine Überdämpfung des Systems entlang der Reaktionskoordinate unterstellt, hergeleitet werden. So ergeben sich zwar unterschiedliche Zahlenwerte für ν_0, ansonsten sind die Formulierungen jedoch gleich.[59]

Dabei gilt:

$$\Delta G = \Delta G^{off} - \Delta G^{on}.$$

Wenn das System sich in einem Wärmebad befindet wird es laufend durch thermische Fluktuationen angeregt. So ergibt sich eine endliche Wahrscheinlichkeit, dass die Bindung aufgebrochen wird. Die mittlere Lebenszeit τ_0 der Bindung ist dann

$$\tau_0 = \frac{1}{\nu_0} \exp\left(\frac{\Delta G}{k_B T}\right).$$

Zur Beschreibung der kraftabhängigen Dissoziation einer molekularen Bindung nimmt man an, dass die angelegte Kraft *F* das thermodynamische Potenzial des Systems entlang der Reaktionskoordinate um *Fx* reduziert. Außerdem nimmt man an, dass durch die Kraft eine Rückreaktion ausgeschlossen wird. Wenn das Potenzial hinreichend steil ist findet das Entbinden von einem Übergangszustand in der Entfernung Δx vom Gleichgewicht statt. Damit ergibt sich eine kraftabhängige off-Rate

$$k_{off}(F) = \nu_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^{off} - F\Delta x}{k_B T}\right) = k_0 \exp\left(\frac{F\Delta x}{k_B T}\right),$$

die die Dissoziationskinetik des Systems vollständig beschreibt. Die Wahrscheinlichkeit *p(t)*, dass eine Bindung bei einer konstant angelegten Kraft *F* nach einer Zeit *t* aufbricht ist dann

$$p(t) = -k_{off}(F)\, t.$$

Diese Beziehung für eine zeitlich konstant angelegte Kraft *F* lässt sich erweitern, um den Fall einer monoton ansteigenden Kraft *F(t)* zu beschreiben. Wenn man dann jeweils die Zeit *t* durch die Kraft ersetzt erhält man:

$$p(F) = -\frac{k_{off}(F)}{\dot{F}} \exp\left(-\int_0^F k_{off}(F')dF'\right) = -\frac{k_0 \exp\left(\frac{F\Delta x}{k_B T}\right)}{\dot{F}} \exp\left(-\int_0^F k_0 \exp\left(\frac{F'\Delta x}{k_B T}\right) \frac{1}{\dot{F}}\, dF'\right)$$

$$\text{mit der Kraftladungsrate } \dot{F} = \frac{dF}{dt}.$$

Eine Berechnung von *p(F)* für beliebige Verläufe von *F(t)* und $\dot{F}(t)$ kann dann nur numerisch erfolgen.[29] Um das Maximum F_{max} dieser Verteilung zu bestimmen logarithmiert und differenziert man die Gleichung nach *F*. Daraus erhält man:

$$F_{\max}\left(\dot{F}\right) = \frac{k_B T}{\Delta x} \ln\left(\frac{\dot{F}\,\Delta x}{k_0\, k_B T}\right).$$

Die wahrscheinlichste Abrisskraft F_{max} für ein System mit einer einfachen Potenzialbarriere steigt also mit dem Logarithmus der Kraftladungsrate linear an. Dieser Zusammenhang wird auch in typischen Experimenten untersucht in denen über einen möglichst großen dynamischen Bereich die wahrscheinlichste Abrisskraft als Funktion der Kraftladungsrate bestimmt wird. Wenn man die Abrisskräfte in einem Diagramm gegen die logarithmierten Kraftladungsraten aufträgt ergibt sich so eine Gerade, aus deren Abszissenabschnitt direkt die off-Rate k_0 des freien Systems abgelesen werden kann. Die Steigung der Geraden ist proportional zu Δx^{-1}, wobei Δx der Breite des Bindungspotenzials im Übergangszustand entspricht. Für ein System mit mehreren Potenzialbarrieren ergibt sich ein Stückweise linearer Verlauf der Abrisskräfte gegen die logarithmierten Kraftladungsraten, wobei jeder lineare Abschnitt einem lokalen Minimum der Potenziallandschaft entspricht, dessen Entfernung Δx_i vom gebundenem Zustand jeweils aus der Steigung berechnet werden kann.[112] In den vergangenen Jahren wurde die hier zusammengefasste Theorie erfolgreich zur Beschreibung der Experimente an verschiedensten molekularen Systemen benutzt.[111,115,117,119,247,248].

6.4. Stabilität von LNA-DNA-Hybriden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Experimente zur Stabilität von doppelsträngigen LNA-DNA-Hybridmolekülen durchgeführt. Dazu wurden Kraftmessungen und differenzielle kalorimetrische Messungen (DSC: Differen-

[29] Von besonderem Interesse ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung, die sich ergibt, wenn die Bindung über ein Polymermolekül an den Kraftsensor gekoppelt ist. Der entsprechende Verlauf von *F(t)* ergibt sich dann aus der Polymerelastizität *F(x)* und der Ziehgeschwindigkeit $v=dx/dt$.[115,247]

tial Scanning Calorimetry) an doppelsträngigen LNA-DNA-Hybriden und dsDNA-Molekülen mit identischen Sequenzen durchgeführt.

6.4.1. Kraftmessungen[30]

Es wurde untersucht, inwieweit LNA-Basen die Aufrisskräfte von DNA-Doppelsträngen verändert. Die verwendeten Moleküle waren reine dsDNA 15mere bzw. 30mere und entsprechende LNA/DNA-Hybride, in denen jeweils auf einem ssDNA-Strang jede dritte DNA-Base gegen eine LNA-Base ausgetauscht war. Dazu wurden jeweils komplementäre Moleküle über PEG-Koppler an Glasoberflächen und Kraftmikroskopspitzen gebunden. Bei der Annäherung der Spitze an die Oberfläche bildet sich so ein Doppelstrang, der an beiden 5'-Enden kovalent verankert ist. Beim darauf folgenden Entfernen der Spitze von der Probe wird der Doppelstrang dann gedehnt und wieder in Einzelstränge aufgetrennt. So wurden für die 15mer und 30mer Duplexe mit und ohne LNA-Basen die Kräfte gemessen, bei denen die Trennung erfolgt. Abbildung 38 zeigt die relativen Häufigkeiten der beim kraftinduzierten Schmelzen dieser Duplexe auftretenden Abrisskräfte für die verschiedenen Systeme.

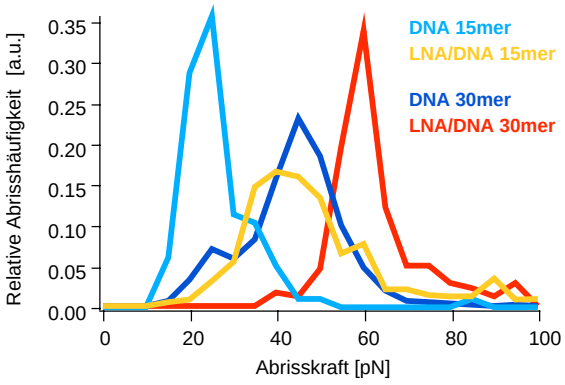


Abbildung 38:

Histogramme der Abrisskraft von 15mer und 30mer dsDNA und LNA/DNA-Molekülen bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1 µm/s.

Die Zahlenwerte für den Median der Abrisskräfte sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Alle Messungen wurden in PBS-Puffer durchgeführt.

[30] Die Kraftmessungen wurden von Dr. Wenke Zhang im Rahmen eines Gastaufenthalts am Lehrstuhl für Angewandte Physik durchgeführt.

System:	**15mer DNA**	**15mer LNA/DNA**	**30mer DNA**	**30mer LNA/DNA**
Abrisskraft:	28 pN	46 pN	48 pN	63 pN

Tabelle 6: Median der Abrisskräfte der dsDNA- und LNA/DNA-Oligonukleotide.

6.4.2. DSC-Messungen

Es wurden kalorimetrische Messungen an reinen 15mer dsDNA-Molekülen (siehe 6.5.3, Moleküle C und D) und doppelsträngigen 15mer LNA/DNA-DNA-Hybridmolekülen (Moleküle C und F), in denen fünf DNA-Basen durch LNA-Basen ersetzt waren, durchgeführt. Die eingesetzten Moleküle waren mit den in den Kraftexperimenten verwendeten bis auf die funktionalen Endgruppen identisch. Zunächst wurden die Oligonukleotide in PBS-Puffer gelöst und die Konzentrationen mit UV-Absorptionsspektroskopie kontrolliert. Dann wurden jeweils äquivalente Mengen der komplementären Stränge bei entsprechenden Temperaturen hybridisiert. Unmittelbar vor der jeweiligen Messung wurden die Proben dann mit PBS auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt. Die Messungen wurden mit einem Microcal Kalorimeter in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Bärmann am Lehrstuhl E22 (Prof. Dr. Sackmann) an der TU-München durchgeführt. Für jeden Doppelstrang wurde die Differenz ΔC zwischen der Wärmekapazität der Probe und der einer reinen Pufferlösung während des Aufheizens von 10°C auf 110°C bei etwa 3 bar Druck gemessen. Die Heizraten waren 15°C pro Stunde für die reinen dsDNA-Moleküle und 25°C pro Stunde für die LNA/DNA-DNA-Hybride. *Abbildung 39* zeigt die gemessenen Kurven nach der Nullinienkorrektur. Aus den DSC-Kurven berechnet man dann die Übergangsenthalpie ΔH und die Übergangsentropie ΔS für die Auftrennung der Doppelstränge in Einzelstränge gemäß

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C \, dT \qquad \text{und} \qquad \Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta C}{T} \, dT .$$

Die Schmelztemperaturen T_m können als Mittelpunkte der Übergänge direkt aus den Messkurven abgelesen werden bzw. aus der Beziehung $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ hergeleitet werden: am Phasenübergang gilt $\Delta G(T_m)=0$ und damit

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S}.[249]$$

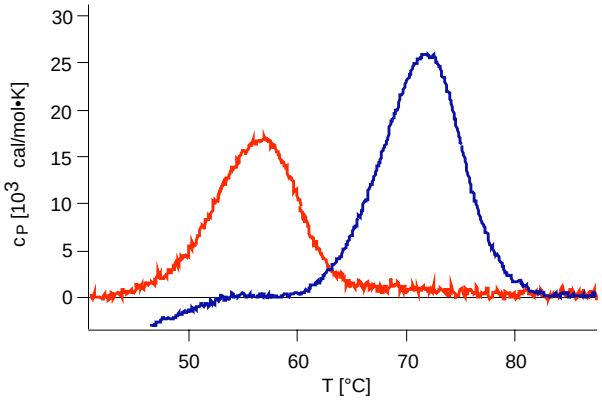


Abbildung 39: Korrigierte DSC-Kurven des dsDNA 15mers (rot) und des LNA/DNA 15mer Hybrids (blau).

Die gemessenen Werte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

	15mer DNA	**15mer LNA/DNA**
ΔH [kcal/mol]	132 ± 80	200 ± 40
ΔS [cal/molK]	400 ± 80	580 ± 80
ΔG (300K) [kcal/mol]	14 ± 5	29 ± 6
T_m [°C]	56,5 ± 0,2	71,9 ± 0,2

Tabelle 7: Ergebnisse der DSC Messung an den beiden 15mer Molekülen.

Es konnte gezeigt werden, dass die LNA/DNA-DNA-Hybride eine um etwa 15°C höhere Schmelztemperatur als die reinen dsDNA-Moleküle aufweisen, wobei die Stabilisierung stark enthalpisch getrieben ist und zum Teil durch eine größere Übergangsenthalpie ausgeglichen wird. Insgesamt ist die freie Energie der Basenpaarung für die LNA/DNA-DNA-Hybride mit 29 kcal/mol um 15 kcal/mol größer als die der reinen dsDNA 15mere, die nur 14 kcal/mol beträgt.

6.4.3. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die LNA/DNA-Duplexe eine deutlich größere Stabilität als die reinen dsDNA-Oligomere aufweisen. In den Kraftexperimenten wurde für die 15mere und 30mere eine um 18 bzw. 15 pN größere mittlere Ab-

risskraft gemessen. Nach der in Kapitel 6.3 zusammengefassten Theorie molekularer Bindungen hängt die Kraft bei einer bestimmten Zugrate von der Breite und Höhe der Potenzialbarriere zwischen dem gebundenen und dem ungebundenen Zustand ab. Die wahrscheinlichste Abrisskraft für die dsDNA 15mere lässt sich in guter Übereinstimmung mit den von Strunz et al.[119] gemessenen Daten mit einer thermischen off-Rate von $5 \cdot 10^{-3}\ s^{-1}$ und einer Potenzialbreite von 2,0 nm beschreiben. Da die strukturellen Unterschiede zwischen dem reinen DNA-Duplex und dem LNA/DNA-Duplex relativ gering sind, kann man zunächst annehmen, dass sich die Breiten der beiden Bindungspotenziale in der angewandten experimentellen Geometrie nicht wesentlich unterscheiden. Wenn man die Abrisskräfte der LNA/DNA-Hybride unter Annahme der gleichen Potenzialbreite mit dem theoretischen Modell beschreibt, so ergibt sich eine thermische off-Rate von $5 \cdot 10^{-6}\ s^{-1}$. Das würde also bedeuten, dass die Höhe der Potenzialbarriere durch das Einfügen der fünf LNA Basen um etwa 7 k_BT zugenommen hat.

Die kalorimetrische Messung ergab für den LNA/DNA-Hybrid eine um etwa 15 kcal/mol (25 k_BT) größere Bindungsenthalpie ΔG. Würde diese zusätzliche Energie bei gleichbleibender Potenzialbreite nur den gebundenen Zustand betreffen, so würde sich dadurch die off-Rate um einen Faktor $\exp(25) \approx 7 \cdot 10^{10}$ verkleinern und die on-Rate unverändert bleiben. Für diesen Wert würde sich dann in der theoretischen Beschreibung der Abrisskraft eine Potenzialbreite von 3,9 nm ergeben. In Anbetracht der Tatsache, dass sich die LNA/DNA-Hybride von den reinen dsDNA-Molekülen nur in fünf der 15 Basenpaare unterscheiden, erscheint dieser Wert in der verwendeten experimentellen Geometrie aber deutlich zu groß. Es ist also anzunehmen, dass durch die LNA-Basen das Bindungspotenzial auch qualitativ stark verändert wird. Die DSC-Messungen ergaben für den LNA/DNA-Duplex eine starke enthalpische Stabilisierung, die aber durch eine gleichzeitige entropische Destabilisierung abgeschwächt wird. Beim Schmelzen von dsDNA werden pro Basenpaar 12,5 k_B an Entropie gewonnen, was der Freisetzung von $2{,}7 \cdot 10^5$ Freiheitsgraden entspricht. Im Vergleich dazu stellt die Methylenbrücke an nur fünf der 30 Basen des LNA/DNA-Duplexes eine relativ kleine Störung dar. Das bedeutet, dass die Konformationsentropie der Einzelstränge mit und ohne LNA-Basen sich auch nicht wesentlich unterscheiden kann und somit auch nicht als Ursache für den gemessenen Entropieunterschied in Frage kommt. Die um 90 k_B größere Über-

gangsenthalpie des LNA/DNA-Hybrids ist somit ein klarer Hinweis auf eine deutlich niedrigere Entropie des LNA/DNA-DNA-Duplexes. Eine mögliche Ursache dafür könnte etwa eine unterschiedliche Ausprägung der Hydratisierung sein. Da in dsDNA die kleinen Furchen ohnehin Bänder immobilisierter Wassermoleküle enthalten, scheint es an dieser Stelle keine weitere strukturelle Ursache für eine drastische Verringerung der Entropie zu geben. Es kann daher vermutet werden, dass sich die LNA/DNA-Hybride von dsDNA insbesondere in der Hydratisierung der großen Furche unterscheiden. Das sollte dann auch wesentlich das Bindungsverhalten von Liganden beeinflussen, die in die große Furche von DNA binden. Experimente zum Bindungsverhalten solcher Moleküle an LNA/DNA-Hybride sollten es also ermöglichen, die genaue strukturelle Ursache besser zu lokalisieren. Weiter bleibt zu untersuchen, wie die Änderung der Potenzialbreite zu der veränderten Entropie in Bezug steht. Hier könnten ratenabhängige Kraftmessungen weiteren Aufschluss geben. Durch die Kombination von klassischer Ensemblemessung und Einzelmolekülexperimenten besteht so die Möglichkeit, neue strukturelle Information zu erhalten.

6.5. Material und Methoden

6.5.1. Verwendete Geräte

Kraftspektroskopie:

- Der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Kraftmessungen wurde an dem von Prof. Dr. Matthias Rief im Rahmen seiner Doktorarbeit aufgebauten Kraftmikroskop durchgeführt.[250] Einzelne Messungen sowie die Untersuchung der Bindungskräfte der LNA/DNA und dsDNA-Duplexe wurden mit einem MPF (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt.
- Für die Kraftmessungen wurden Microlever von ThermoMicroscopes (früher: Park Scientific, bezogen über Atos, Darmstadt) und Olympus Biolevers (Olympus, Tokyo, Japan) eingesetzt. Die Federkonstanten wurden direkt in jeder Messung über die Methode des thermischen Rauschens bestimmt.[251]

UV-VIS-Spektroskopie:

- Sämtliche UV-Absorptionsmessungen wurden an einem Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS-Spektrometer durchgeführt. Für die thermischen Schmelzexperimente wurde zusätzlich ein externer Temperaturregler (Perkin Elmer PTP-1 Peltier System) eingesetzt.

Goldbeschichtungen:

- Cantilever und Glas-Objektträger wurden an der lehrstuhleigenen Aufdampfanlage mit 15 bis 45 nm Gold bedampft, wobei jeweils 5 nm Cr/Ni (80:20) als Haftvermittler verwendet wurden.

6.5.2. Chemikalien

- TEN-Puffer:
  150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 (HCl)
- PBS (Phosphate Buffered Saline):
  10 mM Phosphatpuffer, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4
- PBST-Puffer:
  PBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20
- CLEAN-Lösung:
  H_2O : H_2O_2 : NH_4OH im Verhältnis 5 : 1 : 1
- BIND-Lösung:
  1 mg $NaBH_4$ gelöst in 10 ml Ethanol und 40 ml H_2O

Alle Puffer wurden mit ddH_2O aus den laboreigenen MilliQ-Anlagen (Millipore) zubereitet.

- Sämtliche DNA-bindenden Substanzen und Chemikalien für Pufferlösungen wurden über Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.
- Heterofunktionale NHS-PEG-VS-Moleküle wurden bei Shearwater Corporation (Huntsville, AL, USA) bestellt.
- Aldehyd-funktionalisierte Objektträger („Xenobind“) wurden über Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen.

6.5.3. DNA

- Lambda Bst EII digest DNA wurde über Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.
- Die synthetischen Polymere poly(dAdT)•poly(dAdT), poly(dAdC)•poly(dGdT), poly(dG)•poly(dC) und poly(dGdC)•poly(dGdC) wurden über Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.
- Die DNA-Oligonukleotide mit der Sequenz 5'-CTG ACT AGC TGC ATG-3' (und komplementäre Moleküle) für die UV-Absorptionsmessungen wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.
- Für Kraft- und DSC-Messungen wurden die DNA-Oligonukleotide über die inno-TRAIN Diagnostik GmbH (Kronberg), die LNA/DNA-Oligomere von Proligo (Boulder, CO, USA) bezogen.
- Sequenzen der Moleküle für die Unzipping-Experimente:
- Synthetische Sequenzen mit 10er Blöcken:
  - 5'-SH- ACATGCCTCC GAAGGATTAT TGGTTTGAGT G_{10} A_{10} G_{10} A_{10} G_{10} A_{10} G_{10} A_{10} G_{10} -3'
  - 5'- C_{10} T_{10} C_{10} T_{10} C_{10} T_{10} C_{10} T_{10} C_{10} TGAGTTTGGT TATTAGGAAG CCTCCGTACA -NH_2-3' bzw. -SH-3'
- Synthetische Sequenz mit 20er Blöcken:
  - 5'-SH- GCATCAGTC G_{20} A_{20} G_{20} A_{20} G_{10} -3'
  - 5'- C_{10} T_{20} C_{20} T_{20} C_{20} AGCTAGGCAG -NH_2-3' bzw. -SH-3'
- Synthetische Sequenz mit 10er Blöcken und Mismatches:
  - 5'-SH- ACATGCCTCC GAAGGATTAT TGGTTTGAGT G_4TG_5 A_{10} G_4TG_5 A_{10} G_4TG_5 A_{10} G_4TG_5 A_{10} G_4TG_5 -3'
- Native Sequenz aus Lambda-Phagen-DNA (Basenpaare 19221 bis 19311):
  - 5'-SH- GCATTTATCA TCTCCATAAA ACAAAACCCG CCGTAGCGAG TTCAGATAAA ATAAATCCCC GCGAGTGCGA GGATTGTTAT GTAATATTGG -3'
  - 5'- CCAATATTAC ATAACAATCC TCGCACTCGC GGGGATTTAT TTTATCTGAA CTCGCTACGG CGGGTTTTGT TTTATGGAGA TGATAAATGC TTTTT-NH_2-3'
- Sequenzen der für die DSC-Messung verwendeten Moleküle:
  - C: DNA 15mer: 5'-TCG TCT TAA TCA TGC
  - D: DNA 15mer compl.: 5'-GCA TGA TTA AGA CGA

- F: LNA 15mer 5'-GC^{L}A TG^{L}A TT^{L}A AG^{L}A CG^{L}A
  (^{L} steht für LNA-Basen)

- Sequenzen der DNA- und LNA/DNA-Oligomere für die Kraftmessungen:
  - A: DNA 30mer: 5'-HS-(CH2)6-GGC TCC CTT CTA CCA TCG TCT TAA TCA TGC
  - B: DNA 30mer comp.: 5'-HS-(CH2)6-GCA TGA TTA AGA CGA TGG TAG AAG GGA GCC
  - C: DNA 15mer: 5'-HS-(CH2)6-TCG TCT TAA TCA TGC
  - D: DNA 15mer compl.: 5'-HS-(CH2)6-GCA TGA TTA AGA CGA
  - E: LNA-DNA 30mer: 5'-HS-(CH2)6-GC^{L}A TG^{L}A TT^{L}A AG^{L}A CG^{L}A TG^{L}G TA^{L}G AA^{L}G GG^{L}A GC^{L}C
    (^{L} steht für LNA-Basen)

6.5.4. Protokolle

<u>Kopplung von SH-terminierten Oligonukleotiden an SiN Cantilever:</u>

- Für die Silanisierung von SiN Cantilevern mit N'-[3-(trimethoxysilyl)-propyl]-diethylentriamin wurde dem Protokoll von Grandbois et al. gefolgt.[124]
- Zur Bindung der NHS-PEG-VS wurden die silanisierten Cantilever dann für zwei bis vier Stunden mit einer Lösung von 3,4 µg/ml in DMSO inkubiert und anschließend in DMSO und Ethanol gespült.
- Die Kopplung der SH-terminierten Oligonukleotide an die VS-Gruppen des PEG erfolgte dann indem je zwei bis vier Cantilever mit ca. 20 µl DNA-Lösung (10 bis 50 µM in PBS) über Nacht inkubiert wurden.

<u>Kopplung von SH-Oligonukleotiden an Goldoberflächen:</u>

- Alle Goldoberflächen und mit Gold bedampften Cantilever wurden jeweils direkt vor der Funktionalisierung für 15 bis 30 Minuten bei 60 bis 80°C in CLEAN-Lösung gereinigt und anschließend mit H_2O gespült.
- Zur Anbindung der SH-terminierten Oligonukleotide wurden 10 bis 20 µl der ssDNA-Lösung (10 µM in PBS) auf die frisch gereinigte Goldoberfläche bzw. auf die Spitzen von je zwei bis vier Cantilevern pipettiert und für 20 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde ein größeres Volumen Mercaptohexanol-Lösung (1 µM) zugegeben und für mindestens eine

weitere Stunden inkubiert. Dies führt zu einer Absättigung der freien Bindungsstellen auf der Goldoberfläche durch die hydrophilen Mercaptohexanol-Moleküle. In den Kontrollexperimenten zeigt sich dies deutlich durch eine drastische Verringerung der unspezifischen Adhäsion.

Kopplung von NH_2-Oligonukleotiden an Xenoslides:

- Es wurden jeweils 10 bis 20 µl der ssDNA-Lösung (10 µM in PBS) auf die Oberfläche eines Aldehyd-funktionalisierten Objektträgers (Xenobind) pipettiert und für 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Teilweise wurde dann zur Absättigung der freien Bindungsstellen mit hydrophilen Gruppen 20 µl Ethanolamin zugegeben und für weitere 10 bis 20 Minuten inkubiert.
- Zur chemischen Reduktion der Schiff-Base zwischen der Amingruppe am DNA-Molekül und der Aldehydgruppe an der Oberfläche wurde die Probe mit BIND-Lösung gespült und für weitere 20 bis 40 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Proben gründlich mit H_2O und PBS gespült.

Unzipping-Experimente:

- Alle Experimente wurden in PBST-Puffer durchgeführt.

DNA-Proben für Überstreckungsexperimente:

- Zur Immobilisierung langer Moleküle wurde die bekannte starke Adsorption von DNA an Goldoberflächen ausgenützt.[95,252,253] Es wurden jeweils 50 bis 100 µl DNA-Lösung (100µg/ml in TEN-Puffer) auf Gold-bedampfte Objektträger pipettiert und bei ca. 50°C eingetrocknet. Anschließend wurden die Proben gründlich mit TEN-Puffer gespült und direkt in die Messapparatur eingebaut.
- Zur Bestimmung der immobilisierten Menge DNA wurde die zum Spülen der Probe verwendete Pufferlösung aufgefangen und die darin enthaltene DNA-Konzentration über das UV-Absorptionsspektrum ermittelt.

Messungen mit DNA-bindenden Molekülen:

- Von alle verwendeten DNA-bindenden Substanzen wurden Vorratslösungen in H_2O angelegt, die vor den Experimenten mit TEN-Puffer auf die jeweils

gewünschte Konzentration verdünnt wurden. Die Konzentrationen wurden auch über die Absorptionsspektren der Lösungen nachgemessen.

- Für die Messungen bei fester Konzentration wurde die Pufferlösung mit einer 1 ml fassenden Spritze über die Kanäle der Flüssigkeitszelle in die Probenkammer eingeführt. Die angegebenen Konzentrationen benennen die ursprünglich eingesetzten Konzentrationen, die angegebenen Verhältnisse der Moleküle pro Basenpaar beziehen sich auf die Mengen im Probenvolumen (etwa 100 µl Puffer und die gesamte immobilisierte DNA).
- Für die Messungen bei denen die Konzentration verändert wurde, wurde die Pufferlösung mit Hilfe einer Spritze und eines Gummischlauches über einen Kanal der Flüssigkeitszelle in die Probenkammer eingeführt, während gleichzeitig über den anderen Kanal Flüssigkeit abgesaugt wurde. Insgesamt wurde so jeweils mit etwa 500 µl neuem Puffer nachgespült, was zu einem vollständigen Austausch in der Zelle führen sollte.

6.5.5. Software

Die Auswertung aller Messungen und die Simulation der Unzipping-Experimente erfolgte mit IGOR pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) unter Verwendung verschiedenster Makros.

7. Literaturverzeichnis

1. Binnig, G., Quate, C. F. and Gerber, C.: "Atomic force microscope" **Physical Review Letters** (1986), *56*, 930.

2. Binnig, G. and Rohrer, H.: "Scanning Tunneling Microscopy - from birth to adolescence" **Rev. Mod. Phys.** (1987), *59*, 615-625.

3. Gölzhäuser, A., Eck, W., Geyer, W., Stadler, V., Weimann, T., Hinze, P. and Grunze, M.: "Chemical Nanolithography with Electron Beams" **Advanvced Materials** (2001), *13*(11), 806-809.

4. Xia, Y. and Whitesides, G. M.: "Soft Lithography" **Angewandte Chemie Int. Ed.** (1998), *37*, 550-575.

5. Erbe, A., Blick, R. H., Tilke, A., Kriele, A. and Kotthaus, J. P.: "A mechanically flexible tunneling contact operating at radio frequencies" **Applied Physics Letters** (1998), *73*(25), 3751-3753.

6. Watson, J. D. and Crick, F. H. C.: "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid" **Nature** (1953), *171*, 964-967.

7. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1977), *74*(12), 5463-7.

8. Mullis, K. B. and Faloona, F. A.: "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction" **Methods Enzymol** (1987), *155*, 335-50.

9. Ulman, A.: "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers" **Chemical Reviews** (1996), *96*(4), 1533-1554.

10. Hermanson, G. T.: "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego (1996).

11. Balzani, V., Credi, A., Raymo, F. M. and Stoddart, J. F.: "Künstliche molekulare Maschinen (Artificial molecular machines)" **Angewandte Chemie** (2000), *112*, 3484-3530; **Angewandte Chemie Int. Ed.** (2000), *39*, 3348-3391.

12. Lehn, J. M.: "Toward complex matter: supramolecular chemistry and self-organization" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2002), *99*(8), 4763-8.

13. Whitesides, G. M. and Boncheva, M.: "Beyond molecules: self-assembly of mesoscopic and macroscopic components" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2002), *99*(8), 4769-74.

14. Stoddart, J. F. and Tseng, H. R.: "Chemical synthesis gets a fillip from molecular recognition and self- assembly processes" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2002), *99*(8), 4797-800.

15. Car, R. and Parinello, M.: "Unified approach for molecular dynamics and density functional theory" **Physical Review Letters** (1985), *55*, 2471-2474.

16. Kohn, W. and Sham, L. J.: "Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects" **Physical Review** (1965), *140*(4A), A1133-A1138.

17. Ben-Nun, M. and Martinez, T. J.: "Ab Initio Quantum Molecular Dynamics" **Adv. Chem. Phys.** (2002), *121*, 439.

18. Grubmüller, H. and Tavan, P.: "Multiple Time Step Algorithms for Molecular Dynamics Simulations of Proteins: How Good Are They?" **Journal of Computational Chemstry** (1998), *19*(13), 1534-1552.

19. Isralewitz, B., Gao, M. and Schulten, K.: "Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins" **Current Opinion in Structural Biology** (2001), *11*, 224-230.

20. Heymann, B. and Grubmüller, H.: "Molecular Dynamics Force Probe Simulations of Antibody/Antigen Unbinding: Entropic Control and Nonadditivity of Unbinding Forces" **Biophysical Journal** (2001), *81*, 1295-1313.

21. Smalley, R. E.: "Chemie, Liebe und dicke Finger" **Spektrum der Wissenschaft - Spezial: Nanotechnologie** (2001), *2*, 66-67.

22. Dresselhaus, M., Dresselhaus, G. and Avouris, P. (eds.): "Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure Properties and Applications" . Springer-Verlag, Berlin (2001).

23. Bernholc, J., Brenner, D., Buongiorno Nardelli, M., Meunier, V. and Roland, C.: "Mechanical and Electrical Properties of Nanotubes" **Annu. Rev. Mater. Res.** (2002), *32*(1), 347-375.

24. Alberts, B.: "Molekularbiologie der Zelle" 3. Aufl., VCH, Weinheim (1995).

25. Seeman, N. C.: "Nanostrukturen und Topologien von Nucleinsäure" **Angewandte Chemie** (1998), *110*, 3408-3428.

26. Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L. A. and Seeman, N. C.: "Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals" **Nature** (1998), *394*, 539-544.

27. Mao, C., Sun, W., Shen, Z. and Seeman, N. C.: "A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA" **Nature** (1999), *397*, 144-146.

28. Yurke, B., Turberfield, A. J., Mills Jr, A. P., Simmel, F. C. and Neumann, J. L.: "A DNA-fuelled molecular machine made of DNA" **Nature** (2000), *406*, 605-608.

29. Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. and Storhoff, J. J.: "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials" **Nature** (1996), *382*, 607-609.

30. Mirkin, C. A.: "Programming the Assembly of Two- and Three-Dimensional Architectures with DNA and Nanoscale Inorganic Building Blocks" **Inorganic Chemistry** (2000), *39*, 2258-2272.

31. Niemeyer, C. M.: "Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology" **Current Opinion in Chemical Biology** (2000), *4*, 609-618.

32. Alivisatos, A. P.: "Colloidal quantum dots. From scaling laws to biological applications" **Pure and Applied Chemistry** (2000), *72*(1-2), 3-9.

33. Parak, W. J., Gerion, D., Zanchet, D., Woerz, A. S., Pellegrino, T., Micheel, C. M., Williams, S. C., Seitz, M., Bruehl, R. E., Bryant, Z., Bustamante, C., Bertozzi, C. R. and Alivisatos, A. P.: "Conjugation of DNA to Silanized Colloidal Semiconductor Nanocrystalline Quantum Dots" **Chemical Materials** (2002), *14*, 2113-2119.

34. Urry, D. W.: "Molecular Machines - How Motion and Other Functions Of Living Organisms Can Result From Reversible Chemical Changes" **Angewandte Chemie** (1993), *105*, 859-883; **Angewandte Chemie Int. Ed.** (1993), *32*, 819-841.

35. Urry, D. W.: "Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers" **J. Phys. Chem. B** (1997), *101*(51), 11007-11028.

36. Schön, J. H., Dodabalapur, A., Kloc, C. and Batlogg, B.: "A light-emitting field-effect transistor." **Science** (2000), *290*(5493), 963-6.

37. Angelopoulos, M.: "Conducting polymers in microelectronics" **IBM Journal of R & D** (2001), *45*(1), 57-76.

38. Wong, S. S., Joselevich, E., Woolley, A. T., Cheung, C. L. and Lieber, C. M.: "Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology" **Nature** (1998), *394*, 52-55.

39. Weiss, S.: "Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules" **Science** (1999), *283*, 1676-1683.

40. Kawata, S. (ed.) "Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons" . Topics in Applied Physics. Springer, Berlin (2001).

41. Hugel, T., Holland, N. B., Cattani, A., Moroder, L., Seitz, M. and Gaub, H. E.: "Single-Molecule Optomechanical Cycle" **Science** (2002), *296*(6670), 1103.

42. Müller, D. J., Baumeister, W. and Engel, A.: "Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1999), *96*, 13170-13174.

43. Oesterhelt, F., Oesterhelt, D., Pfeiffer, M., Engel, A., Gaub, H. E. and Müller, D. J.: "Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins" **Science** (2000), *288*, 143-146.

44. Ide, T., Takeuchi, Y. and Yanagida, T.: "Development of an Experimental Apparatus for Simultaneous Observation of Optical and Electrical Signals from Single Ion Channels" **Single Molecules** (2002), *3*(1), 33-42.

45. Ishijima, A., Kojima, H., Funatsu, T., Tokunaga, M., Higuchi, H., Tanaka, H. and Yanagida, T.: "Simultaneous Observation of Individual ATPase and Mechanical Events by a Single Myosin Molecule during Interaction with Actin" **Cell** (1998), *92*, 161-171.

46. Best, R. B. and Clarke, J.: "What can atomic force microscopy tell us about protein folding?" **Chem. Commun. (Camb)** (2002), (3), 183-92.

47. Liphardt, J., Onoa, B., Smith, S. B., Tinoco Jr., I. and Bustamante, C.: "Reversible Unfolding of Single RNA Molecules by Mechanical Force" **Science** (2001), *292*, 733-737.

48. Kim, H. D., Nienhaus, G. U., Ha, T., Orr, J. W., Williamson, J. R. and Chu, S.: "Mg2+-dependent conformational change of RNA studied by fluorescence correlation and FRET on immobilized single molecules" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2002), *99*(7), 4284-9.

49. Müller, D. J., Fotiadis, D., Scheuring, S., Müller, S. A. and Engel, A.: "Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscopy" **Biophysical Journal** (1999), *76*, 1101-1111.

50. Scheuring, S., Fotiadis, D., Möller, C., Müller, S. A., Engel, A. and Müller, D. J.: "Single Proteins Observed by Atomic Force Microscopy" **Single Molecules** (2001), *2*, 59-67.

51. Radmacher, M., Fritz, M., Hansma, H. G. and Hansma, P. K.: "Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope" **Science** (1994), *265*, 1577-1579.

52. Thomson, N. H., Fritz, M., Radmacher, M. and Hansma, P. K.: "Protein tracking and observation of protein motion using atomic force microscopy" **Biophysical Journal** (1996), *70*(5), 2421-2431.

53. Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K. and Toda, A.: "A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2001), *98*(22), 12468-72.

54. Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H. and Muller, D. J.: "Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor" **Nature** (2000), *405*(6785), 418-9.

55. Thalhammer, S., Stark, R. W., Müller, S., Wienberg, J. and Heckl, W. M.: "The Atomic Force Microscope as a New Microdissecting Tool for the Generation of Genetic Probes" **Journal of Structural Biology** (1997), *119*, 232-237.

56. Clausen-Schaumann, H., Seitz, M., Krautbauer, R. and Gaub, H. E.: "Force spectroscopy with single bio-molecules" **Current Opinion in Chemical Biology** (2000), *4*, 524-530.

57. Janshoff, A., Neitzert, M., Oberdörfer, Y. and Fuchs, H.: "Force Spectroscopy of Molecular Systems - Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules" **Angewandte Chemie Int. Ed.** (2000), *39*, 3212-3237.

58. Hugel, T. and Seitz, M.: "The Study of Molecular Interactions by AFM Force Spectroscopy" **Macromol. Rapid Commun.** (2001), *22*(13), 989-1016.

59. Merkel, R.: "Force Spectroscopy on Single Passive Biomolecules and Single Biomolecular Bonds" **Physics Reports** (2001), *346*, 343-385.

60. Evans, E.: "Probing the Relation between Force - Lifetime - and Chemistry in Single Molecular Bonds" **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** (2001), *30*, 105-28.

61. Perkins, T. T., Smith, D. E., Larson, R. G. and Chu, S.: "Stretching of a Single Tethered Polymer in a Uniform Flow" **Science** (1995), *268*, 83-87.

62. Perkins, T., Smith, D. and Chu, S.: "Single Polymer Dynamics in an Elongational Flow" **Science** (1997), *276*, 2016-2021.

63. Quake, S. R., Babcock, H. and Chu, S.: "The dynamics of partially extended single molecules of DNA" **Nature** (1997), *388*, 151-154.

64. Smith, S. B., Finzi, L. and Bustamante, C.: "Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads" **Science** (1992), *258*(13), 1122-1126.

65. Gosse, C. and Croquette, V.: "Magnetic Tweezers: Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level" **Biophysical Journal** (2002), *82*, 3314-3329.

66. Ashkin, A., Schütze, K., Dziedzic, J. M., Euteneuer, U. and Schliwa, M.: "Force generation of organelle transport measured *in vivo* by an infrared laser trap" **Nature** (1990), *348*(6299), 346-348.

67. Mehta, A. D., Rief, M., Spudich, J. A., Smith, D. A. and Simmons, R. M.: "Single-Molecule Biomechanics with Optical Methods" **Science** (1999), *283*, 1689-1695.

68. Pralle, A., Prummer, M., Florin, E.-L., Stelzer, E. H. K. and Hörber, J. K. H.: "Three-Dimensional High-Resolution Particle Tracking for Optical Tweezers by Forward Scattered Light" **Microscopy Research and Technique** (1999), *44*, 378-386.

69. Evans, E., Ritchie, K. and Merkel, R.: "Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces" **Biophysical Journal** (1995), *68*, 2580-2587.

70. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. and Gaub, H. E.: "Reversible unfolding of individual titin Ig-domains by AFM" **Science** (1997), *276*, 1109-1112.

71. Kellermayer, M. S., Smith, S. B., Granzier, H. L. and Bustamante, C.: "Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers." **Science** (1997), *276*, 1112-1116.

72. Tskhovrebova, L., Trinick, J., Sleep, J. A. and Simmons, R. M.: "Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin." **Nature** (1997), *387*, 308-312.

73. Oberhauser, A. F., Marszalek, P. E., Erickson, H. P. and Fernandez, J. M.: "The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin." **Nature** (1998), *393*, 181-185.

74. Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A. F., Fowler, S. B., Marszalek, P. E., Broedel, S. E., Clarke, J. and Fernandez, J. M.: "Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1999), *96*(7), 3694-9.

75. Best, R. B., Li, B., Steward, A., Daggett, V. and Clarke, J.: "Can non-mechanical proteins withstand force? Stretching barnase by atomic force microscopy and molecular dynamics simulation" **Biophysical Journal** (2001), *81*(4), 2344-56.

76. Brockwell, D. J., Beddard, G. S., Clarkson, J., Zinober, R. C., Blake, A. W., Trinick, J., Olmsted, P. D., Smith, D. A. and Radford, S. E.: "The effect of core destabilization on the mechanical resistance of i27" **Biophysical Journal** (2002), *83*(1), 458-72.

77. Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S. and Cheney, R. E.: "Myosin-V is a processive actin-based motor" **Nature** (1999), *400*, 590-593.

78. Yanagida, T., Kitamura, K., Tanaka, H., Iwane, A. H. and Esaki, S.: "Single molecule analysis of the actomyosin motor" **Current Opinion in Cell Biology** (2000), *12*(1), 20-25.

79. Ali, M. Y., Uemura, S., Adachi, K., Itoh, H., Kinosita, K., Jr. and Ishiwata, S.: "Myosin V is a left-handed spiral motor on the right-handed actin helix" **Nature Structural Biology** (2002), *9*(6), 464-7.

80. Crevel, I., Carter, N., Schliwa, M. and Cross, R.: "Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive Neurospora kinesin" **EMBO Journal** (1999), *18*(21), 5863-5872.

81. Visscher, K., Schnitzer, M. J. and Block, S. M.: "Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp" **Nature** (1999), *400*, 184-189.

82. Schnitzer, M. J., Visscher, K. and Block, S. M.: "Force production by single kinesin motors" **Nature Cell Biology** (2000), *2*(10), 718-23.

83. Uemura, S., Kawaguchi, K., Yajima, J., Edamatsu, M., Toyoshima, Y. Y. and Ishiwata, S.: "Kinesin–microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2002), *99*(9), 5977-5981.

84. Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. and Futai, M.: "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1): direct observation" **Science** (1999), *286*(5445), 1722-4.

85. Junge, W.: "ATP synthase and other motor proteins" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1999), *96*, 4735-4737.

86. Ishii, Y. and Yanagida, T.: "Single molecule detection in life science." **Single Molecules** (2000), *1*, 5-16.

87. Smith, S. B., Cui, Y. and Bustamante, C.: "Overstretching B-DNA: the Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules" **Science** (1996), *271*, 795-798.

88. Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J.-L., Chatenay, D. and Caron, F.: "DNA: an Extensible Molecule" **Science** (1996), *271*, 792-794.

89. Strick, T. R., Allemand, J. F., Bensimon, D., Bensimon, A. and Croquette, V.: "The elasticity of a single supercoiled DNA molecule." **Science** (1996), *271*, 1835-1837.

90. Wang, M. D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J. and Block, S. M.: "Streching DNA with Optical Tweezers" **Biophysical Journal** (1997), *72*, 1335-1346.

91. Baumann, C. G., Smith, S. B., Bloomfield, V. A. and Bustamante, C.: "Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1997), *94*, 6185-6190.

92. Strick, T. R., Allemand, J.-F., Bensimon, D. and Croquette, V.: "Behavior of Supercoiled DNA" **Biophysical Journal** (1998), *74*, 2016-2028.

93. Strick, T. R., Bensimon, D. and Croquette, V.: "Micro-mechanical measurement of the torsional modulus of DNA" **Genetica** (1999), *106*, 57-62.

94. Léger, J. F., Romano, G., Sarkar, A., Robert, J., Bourdieu, L., Chatenay, D. and Marko, J. F.: "Structural Transitions of a Twisted and Stretched DNA Molecule" **Physical Review Letters** (1999), *83*(5), 1066-1069.

95. Rief, M., Clausen-Schaumann, H. and Gaub, H. E.: "Sequence dependent mechanics of single DNA-molecules" **Nature Structural Biology** (1999), *6*(4), 346-349.

96. Bustamante, C., Smith, S. B., Liphardt, J. and Smith, D.: "Single-molecule studies of DNA mechanics" **Current Opinion in Structural Biology** (2000), *10*, 279-285.

97. Clausen-Schaumann, H., Rief, M., Tolksdorf, C. and Gaub, H. E.: "Mechanical Stability of Single DNA Molecules" **Biophysical Journal** (2000), *78*(4).

98. Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.: "Force-induced melting of the DNA double helix 1. Thermodynamic analysis." **Biophysical Journal** (2001), *80*(2), 882-93.

99. Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.: "Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions." **Biophysical Journal** (2001), *80*(2), 894-900.

100. Williams, M. C. and Rouzina, I.: "Force spectroscopy of single DNA and RNA molecules" **Current Opinion in Structural Biology** (2002), *12*(3), 330-336.

101. Bockelmann, U., Essevaz-Roulet, B. and Heslot, F.: "Molecular Stick-Slip Motion Revealed by Opening DNA with Piconewton Forces" **Physical Review Letters** (1997), *79*(22), 4489-4492.

102. Essevaz-Roulet, B., Bockelmann, U. and Heslot, F.: "Mechanical separation of the complementary strands of DNA" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1997), *94*(October), 11935-11940.

103. Bockelmann, U., Essevaz-Roulet, B. and Heslot, F.: "DNA strand separation studied by single molecule force measurements" **Physical Review E** (1998), *58*(2), 2386-2394.

104. Bockelmann, U., Thomen, P., Essevaz-Roulet, B., Viasnoff, V. and Heslot, F.: "Unzipping DNA with Optical Tweezers: High equence Sensitivity and Force Flips" **Biophysical Journal** (2002), *82*, 1537-1553.

105. Bonin, M., Zhu, R., Klaue, Y., Oberstrass, J., Oesterschulze, E. and Nellen, W.: "Analysis of RNA flexibility by scanning force spectroscopy" **Nucleic Acids Research** (2002), *30*(16), e81.

106. Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B. and Gaub, H. E.: "Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM" **Science** (1997), *275*, 1295-1298.

107. Marszalek, P. E., Oberhauser, A. F., Pang, Y. P. and Fernandez, J. M.: "Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring" **Nature** (1998), *396*, 661-664.

108. Marszalek, P. E., Li, H. and Fernandez, J. M.: "Fingerprinting polysaccharides with single-molecule atomic force microscopy" **Nature Biotechnology** (2001), *19*(3), 258-62.

109. Florin, E.-L., Moy, V. T. and Gaub, H. E.: "Adhesive forces between individual ligand-receptor pairs." **Science** (1994), *264*, 415-417.

110. Dammer, U., Hegner, M., Anselmetti, D., Wagner, P., Dreier, M., Huber, W. and Guntherodt, H. J.: "Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy" **Biophysical Journal** (1996), *70*(5), 2437-41.

111. Thie, M., Röspel, R., Dettmann, W., Benoit, M., Ludwig, M., Gaub, H. E. and Denker, H.-W.: "Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces." **Human Reproduktion** (1998), *13*(11), 3211-3219.

112. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. and Evans, E.: "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy" **Nature** (1999), *397*, 50-53.

113. Raab, A., Han, W., Badt, D., Smith-Gill, S. J., Lindsay, S. M., Schindler, H. and Hinterdorfer, P.: "Antibody recognition imaging by force microscopy" **Nature Biotechnology** (1999), *17*(9), 901-5.

114. Grandbois, M., Dettmann, W., Benoit, M. and Gaub, H. E.: "Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope" **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** (2000), *48*(5), 719-724.

115. Dettmann, W., Grandbois, M., Andrè, S., Benoit, M., Wehle, A. K., Kaltner, H., Gabius, H.-J. and Gaub, H. E.: "Differences in zero-force and

force-driven kinetics of ligand dissociation from b-galactoside-specific proteins (plant and animal lectins, immunoglobulin G) monitored by plasmon resonance and dynamic single molecule force microscopy" **Archives of Biochemistry and Biophysics** (2000), *383*(2), 157-170.

116. Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, A., Vestweber, D., Schindler, H. and Drenckhahn, D.: "Cadherin interaction probed by atomic force microscopy" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2000), *97*(8), 4005-10.

117. Schwesinger, F., Ros, R., Strunz, T., Anselmetti, D., Güntherodt, H.-J., Honegger, A., Jermutus, L. and Plückthun, A.: "Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2000), *97*(18), 9972-9977.

118. Hinterdorfer, P.: "Molecular recognition studies using the atomic force microscope" **Methods in Cell Biology** (2002), *68*, 115-39.

119. Strunz, T., Oroszlan, K., Schäfer, R. and Güntherodt, H.-J.: "Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1999), *96*, 11277-11282.

120. Pope, L. H. and M. C. Davies, C. A. L., C. J. Roberts, S.J.B. Tendler, P. M. Williams: "Force-induced melting of a short DNA double helix" **European Biophysical Journal** (2001), *30*(1), 53-62.

121. Grange, W., Strunz, T., Schumakovitch, I., Güntherodt, H.-J. and Hegner, M.: "Molecular Recognition and Adhesion of Individual DNA Strands Studied by Dynamic Force Microscopy" **Single Molecules** (2001), *2*, 75-78.

122. Schumakovitch, I., Grange, W., Strunz, T., Bertoncini, P., Güntherodt, H.-J. and Hegner, M.: "Temperature Dependence of Unbinding Forces between Complemenatry DNA Strands" **Biophysical Journal** (2002), *82*, 517-521.

123. Hugel, T., Grosholz, M., Clausen-Schaumann, H., Pfau, A., Gaub, H. and Seitz, M.: "Elasticity of single polyelectrolyte chains and their desorption from solid supports studied by AFM based single molecule force spectroscopy" **Macromolecules** (2001), *34*, 1039-1047.

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

125. Flory, P. J.: "Statistical Mechanics of Chain Molecules", Hanser, München (1988).

126. Rief, M.: "Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen" (Doktorarbeit), LMU, München (1997).

127. Strobl, G.: "The Physics of Polymers" 2nd Ed., Springer, Berlin (1997).

128. Doi, M. and Edwards, S. F.: "The Theory of Polymer Dynamics", Oxford University Press, Oxford (1998).

129. Kreuzer, H. J. and Payne, S. H.: "Stretching a macromolecule in an atomic force microscope: statistical mechanical analysis" **Physical Review E** (2001), *63*, 021906.

130. Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D. and Smith, S.: "Entropic Elasticity of λ-Phage DNA" **Sience** (1994), *265*, 1599-1600.

131. Bouchiat, C., Wang, M. D., Allemand, J.-F., Strick, T., Block, S. M. and Croquette, V.: "Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements" **Biophysical Journal** (1999), *76*, 409-413.

132. Wilson, K. and Goulding, K. H.: "Methoden der Biochemie" 3. Auflage, Thieme Verlag (1991).

133. http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/lm/nucleicacids/

134. Blackburn, G. M. and Gait, M. J.: "Nucleic acids in chemistry and biology" 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford (1996).

135. Manning, G. S.: "The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides" **Quarterly Reviews of Biophysics** (1978), *2*, 179-246.

136. Saenger, W.: "Principles of nucleic acid structure", Springer-Verlag, New York (1984).

137. Breslauer, K. J., Frank, R., Blöcker, H. and Marky, L. A.: "Predicting DNA duplex stability from the base sequence" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1986), *83*, 3746-3750.

138. Koshkin, A. A., Nielsen, P., Meldgaard, M., Rajwanshi, V. K., Singh, S. K. and Wengel, J.: "LNA (Locked Nucleic Acid): An RNA Mimic Forming Exceedingly Stable LNA:LNA Duplexes" **J. Am. Chem. Soc.** (1998), *120*, 13252-14253.

139. Christensen, U., Jacobsen, N., Rajwanshi, V. K., Wengel, J. and Koch, T.: "Stopped flow kinetics of locked nucleic acid (LNA)-oligonucleotide duplex formation: studies of LNA-DNA and DNA-DNA interactions" **Biochemical Journal** (2001), *354*, 481-484.

140. Larsen, H. J., Bentin, T. and Nielsen, P. E.: "Antisense properties of peptide nucleic acid" **Biochimica et Biophysica Acta** (1999), *1489*, 159-166.

141. Neidle, S., Mann, J., Rayner, E. L., Baron, A., Opuko-Boahen, Y., Simpson, I. J., Smith, N. J., Fox, K. R., Hartley, J. A. and Kelland, L. R.:

"Symmetric bis-benzimidazoles: new sequence selective DNA-binding molecules" **Chem. Commun.** (1999), **,** 929-930.

142. Kuhn, H., Demidov, V. V. and Frank-Kamenetskii, M. D.: "Topological Links between Duplex DNA and a Circular DNA Single Strand" **Angewandte Chemie Int. Ed.** (1999), *38*(10)**,** 1446-1449.

143. Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U. and Ben-Yoseph, G.: "DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire" **Nature** (1998), *391***,** 775-778.

144. Richter, J., Seidel, R., Kirsch, R., Mertig, M., Pompe, W., Plaschke, J. and Schackert, H. K.: "Nanoscale palladium metallization of DNA" **Advanced Materials** (2000), *12***,** 507.

145. Richter, J., Mertig, M., Pompe, W. and Vinzelberg, H.: "Low temperature resistance of DNA-templated nanowires" **Applied Physics A** (2002), *74***,** 725-728.

146. Keren, K., Krueger, M., Gilad, R., Ben-Yoseph, G., Sivan, U. and Braun, E.: "Sequence-Specific Molecular Lithography on Single DNA Molecules" **Science** (2002), *297***,** 72-75.

147. Stryer, L.: "Biochemie", Spektrum Akad. Verl., Heidelberg (1994).

148. Haq, I. and Ladbury, J.: "Drug-DNA recognition: energetics and implications for design" **J. Mol. Recognit.** (2000), *13***,** 188-197.

149. Graves, D. E. and Velea, L. M.: "Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids" **Current Organic Chemistry** (2000), *4*(9)**,** 1-11.

150. Neidle, S.: "Crystallographic Insights into DNA Minor Groove Recognition by Drugs" **Biopolymers** (1997), *44***,** 105-121.

151. Chaires, J. B.: "Energetics of Drug-DNA Interactions" **Biopolymers** (1998), *44*(3)**,** 201-215.

152. Reddy, B. S., Sondhi, S. M. and Lown, J. W.: "Synthetic DNA minor groove-binding drugs" **Pharmacology & Therapeutics** (1999), *84***,** 1-111.

153. Turner, P. R. and Denny, W. A.: "The Genome as a Drug Target: Sequence Specific Minor Groove Binding Ligands" **Current Drug Targets** (2000), *1*(1)**,** 1-14.

154. Kagemoto, A., Takagi, H., Naruse, K. and Baba, Y.: "Thermodynamic characterization of binding of DNA with cisplatin in aqueous solution by calorimetry" **Thermochimica Acta** (1991), *190***,** 191-201.

155. Lee, G.-Y. and Jun, M.-S.: "DFT Studies on Binding of Pt(NH3)2Cl+ to Guanine" **Bull. Korean Chem. Soc.** (2001), *22*(1)**,** 11-12.

156. Breslauer, K. J., Remeta, D. P., Chou, W.-Y., Ferrante, R., Curry, J., Zaunckowski, D., Snyder, J. G. and Marky, L. A.: "Enthalpy-entropy compensations in drug-DNA binding studies" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1987), *84*, 8922-8926.

157. Marky, L. A. and Breslauer, K. J.: "Origins of netropsin binding affinity and specificity: Correlations of thermodynamic and structural data" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1987), *84*, 4359-4363.

158. Patel, N., Berglund, H., Nilsson, L., Rigler, R., McLaughlin, L. W. and Gräslund, A.: "Thermodynamics of Interaction of a Fluorescent DNA Oligomer with the Antitumour Drug Netropsin." **Eur. J. Biochem.** (1992), *203*, 361-366.

159. Schmitz, H.-U. and Hübner, W.: "A thermodynamic and spectroscopic study on the binding of berenil to poly d(AT) and to poly (dA)•poly (dT)" **Biophysical Chemistry** (1993), *48*, 61-74.

160. Schmitz, H.-U., Hübner, W. and Ackermann, T.: "Thermodynamic and Spectroscopic Characterization of the Berenil and Pentamidine Complexes with the Dodecanucleotide $d(CGCGATATCGCG)_2$" **Z. Naturforsch.** (1995), *50 c*, 263-274.

161. Colson, P., Houssier, C. and Bailly, C.: "Use of Electric Linear Dichroism and Competition Experiments with Intercalating Drugs to Investigate the Mode of Binding of Hoechst 33258, Berenil and DAPI to GC Sequences." **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** (1995), *13*(2), 351-366.

162. Abu-Daya, A., Brown, P. M. and Fox, K. R.: "DNA sequence preference of several AT-selective minor groove binding ligands" **Nucleic Acids Research** (1995), *23*(17), 3385-3392.

163. Reinert, K.-E.: "DNA Multimode Interaction with Berenil and Pentamidine; Double Helix Stiffening, Unbending and Bending" **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** (1999), *17*(2), 311-331.

164. Chaires, J. B.: "Drug-DNA interactions" **Current Opinion in Structural Biology** (1998), *8*, 314-320.

165. Iida, H., Jia, G. and Lown, J. W.: "Rational recognition of nucleic acid sequences" **Current Opinion in Biotechnology** (1999), *10*, 29-33.

166. Wemmer, D. E.: "Designed Sequence-Specific Minor Groove Ligands" **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** (2000), *29*, 439-61.

167. National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS): "Bioassay of Proflavine for Possible Carcinogenicity (CAS No. 952-23-8)" (1977).

168. Cimino, G. D., Gamper, B. G., Isaacs, S. T. and Hearst, J. E.: "Psoralens as Photoactive Probes of Nucleic Acid Structure and Function: Organic Chemistry, Photochemistry, and Biochemistry" **Ann. Rev. Biochem.** (1985), *54*, 1151-1193.

169. Ussery, D. W., Hoepfner, R. W. and Sinden, R. R.: "Probing DNA Structure with Psoralen in Vitro" **Methods in Enzymology** (1992), *212*, 242-262.

170. Pathak, M. A. and Fitzpatrick, T. B.: "The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD." **Journal of Photochemistry and Photobiology. B. Biology** (1992), , 3-22.

171. Sherman, S. E. and Lippard, S. J.: "Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA" **Chemical Reviews** (1987), *87*, 1153-1181.

172. Johnson, N. P., Butour, J.-L., Villani, G., Wimmer, F. L., Defais, M., Pierson, V. and Brabec, V.: "Metal Antitumor Compounds: The Mechanism of Action of Platinum Complexes" **Prog. Clin. Biochem. Med.** (1989), *10*, 1-24.

173. Lepre, C. A. and Lippard, S. J.: "Interaction of platinum antitumor compounds with DNA" **Nucleic Acids and Molecular Biology** (1990), *4*, 9-38.

174. Bloemink, M. J. and Reedijk, J.: "Cisplatin and Derived Anticancer Drugs: Mechanism and Current Status of DNA Binding" **Metal Ions in Biological Systems** (1996), *32*, 641-685.

175. Reedijk, J.: "Medicinal applications of heavy-metal compounds" **Current Opinion in Chemical Biology** (1999), *3*, 236-240.

176. Park, Y.-W. and Breslauer, K. J.: "Drug binding to higher ordered DNA structures: Netropsin complexation with a nucleic acid triple helix" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1992), *89*, 6653-6657.

177. Kerwin, S. M.: "G-Quadruplex DNA as a target for drug design." **Current Pharmaceutical Design** (2000), *6*(4), 441-78.

178. Brown, P. M. and Fox, K. R.: "Minor Groove Binding Ligands Alter the Rotational Positioning of DNA Fragments on Nucleosome Core Particles" **Journal of Molecular Biology** (1996), *262*, 671-685.

179. Qu, X., Trent, J. O., Fokt, I., Priebe, W. and Chaires, J. B.: "Allosteric, chiral-selective drug binding to DNA" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2000), *97*(22), 12032-12037.

180. Gibbs, J. B.: "Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research" **Science** (2000), *287*, 1969-1973.

181. Arndt, M. (Diplomarbeit), Universität Regensburg, Regensburg (1996).

182. Strick, T. R., Allemand, J.-F., Bensimon, D. and Croquette, V.: "Stress-Induced Structural Transitions in DNA and Proteins" **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** (2000), *29*, 523-543.

183. Anselmetti, D., Fritz, J., Smith, B. and Fernandez-Busquets, X.: "Single Molecule DNA Biophysics with Atomic Force Microscopy" **Single Molecules** (2000), *1*(1), 53-58.

184. Lavery, R., Lebrun, A., Allemand, J.-F., Bensimon, D. and Croquette, V.: "Structure and mechanics of single biomolecules: experiment and simulation" **J. Phys.: Condens. Matter** (2002), *14*, R383-R414.

185. Williams, M. C., Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.: "Thermodynamics of DNA Interactions from Single Molecule Stretching Experiments" **Acc. Chem. Res.** (2002), *35*, 159-166.

186. Thomen, P., Bockelmann, U. and Heslot, F.: "Rotational Drag on DNA: A Single Molecule Experiment" **Physical Review Letters** (2002), *88*(24), 2481021-2481024.

187. Koch, S. J., Shundrovsky, A., Jantzen, B. C. and Wang, M. D.: "Probing Protein-DNA Interactions by Unzipping a Single DNA Double Helix" **Biophysical Journal** (2002), *83*, 1089-1105.

188. Lubensky, D. K. and Nelson, D. R.: "Pulling Pinned Polymers and Unzipping DNA" **Physical Review Letters** (2000), *85*(7), 1572-1575.

189. Zhou, H., Zhang, Y. and Ou-Yang, Z.-C.: "Stretch-Induced Hairpin-Coil Transitions in Designed Polynucleotide Chains" **Physical Review Letters** (2001), *86*(2), 356-359.

190. Montanari, A. and Mezard, M.: "Hairpin Formation and Elogation of Biomolecules" **Physical Review Letters** (2001), *86*(10), 2178-2181.

191. Cocco, S., Monasson, R. and Marko, J. F.: "Force and kinetic barriers to unzipping of the DNA double helix" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2001), *98*(15), 8608-8613.

192. Marenduzzo, D., Trovato, A. and Maritan, A.: "Phase diagram of force-induced DNA unzipping in exactly solvable models" **Physical Review E** (2001), *64*, 0319011-03190112.

193. Gerland, U., Bundschuh, R. and Hwa, T.: "Force-Induced Denaturation of RNA" **Biophysical Journal** (2001), *81*, 1324-1332.

194. Kuznetsov, S. V., Shen, Y., Benight, A. S. and Ansari, A.: "A Semiflexible Polymer Model Applied to Loop Formation in DNA Hairpins" **Biophysical Journal** (2001), *81*, 2864-2875.

195. Marenduzzo, D., Bhattacharjee, S. M., Maritan, A., Orlandini, E. and Seno, F.: "Dynamical Scaling of the DNA Unzipping Transition" **Physical Review Letters** (2002), *88*(2), 0281021-0281024.

196. Krautbauer, R., Pope, L. H., Schrader, T. E., Allen, S. and Gaub, H. E.: "Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy" **FEBS Letters** (2002), *510*(3), 154-158.

197. Marko, J. F. and Siggia, E. D.: "Stretching DNA" **Macromolecules** (1995), *28*, 8759-8770.

198. Konrad, M. W. and Bolonick, J. I.: "Molecular Dynamics Simulation of DNA Streching Consistent with the Tension Observed for Extension and Strand Separation and Predicts a Novel Ladder Structure" **J. Am. Chem. Soc.** (1996), *118*(45), 10989-10994.

199. Lebrun, A. and Lavery, R.: "Modelling extreme streching of DNA" **Nucleic Acids Research** (1996), *24*(12), 2260-2267.

200. Kosikov, K. M., Gorin, A. A., Zhurkin, V. B. and Olson, W. K.: "DNA stretching and compression: large-scale simulations of double helical structures." **Journal of Molecular Biology** (1999), *289*(5), 1301-1326.

201. Olson, W. K. and Zhurkin, V. B.: "Modeling DNA deformations." **Current Opinion in Structural Biology** (2000), *10*, 286-297.

202. Haijun, Z., Yang, Z. and Zhong-can, O.-Y.: "Bending and Base-Stacking Interactions in Double-Stranded DNA" **Physical Review Letters** (1999), *82*(22), 4560-4563.

203. Williams, M. C., Wenner, J. R., Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.: "Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching." **Biophysical Journal** (2001), *80*(4), 1932-9.

204. Williams, M. C., Wenner, J. R., Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.: "Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA melting." **Biophysical Journal** (2001), *80*(2), 874-81.

205. Wenner, J. R., Williams, M. C., Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.: "Salt Dependence of the Elasticity and Overstretching Transition of Single DNA Molecules" **Biophysical Journal** (2002), *82*, 3160-3169.

206. Williams, M. C., Rouzina, I., Wenner, J. R., Gorelick, R. J., Musier-Forsyth, K. and Bloomfield, V. A.: "Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2001), *98*, 6121-6126.

207. Allemand, J. F., Bensimon, D., Lavery, R. and Croquette, V.: "Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1998), *95*, 14152-14157.

208. Kamien, R. D., Lubensky, T. C., Nelson, P. and O´Hern, C. S.: "Direct determination of DNA twist-stretch coupling" **Europhysics Letters** (1997), *38*(3), 237-242.

209. Marko, J. F.: "Streching must twist DNA" **Europhysics Letters** (1997), *38*(3), 183-188.

210. Moroz, J. D. and Nelson, P.: "Torsional directed walks, entropic elasticity, and DNA twist stiffness." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1997), *94*(26), 14418-22.

211. Marko, J. F.: "DNA under high tension: overstreching, undertwisting and relaxation dynamics" **Physical Review E** (1998), *57*(2), 2134-2149.

212. Nelson, P.: "New Measurements of DNA Twist Elasticity" **Biophysical Journal** (1998), *74*, 2501-2503.

213. Nelson, P.: "Transport of torsional stress in DNA" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1999), *96*(25), 14342-14347.

214. Sarkar, A., Leger, J.-F., Chatenay, D. and Marko, J. F.: "Structural transitions in DNA driven by external force and torque" **Physical Review E** (2001), *63*, 0519031-05190310.

215. Lee, G. U., Chris, L. A. and Colton, R. J.: "Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA" **Science** (1994), *266*, 771-773.

216. Evans, E. and Ritchie, K.: "Dynamic strength of molecular adhesion bonds" **Biophysical Journal** (1997), *72*, 1541-1555.

217. Evans, E. and Ritchie, K.: "Strength of a Weak Bond Connecting Flexible Polymer Chains" **Biophysical Journal** (1999), *76*, 2439-2447.

218. LeDuc, P., Haber, C., Bao, G. and Wirtz, D.: "Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow" **Nature** (1999), *399*, 564-566.

219. Hatfield, J. W. and Quake, S. R.: "Dynamic Properties of an Extended Polymer in Solution" **Physical Review Letters** (1999), *82*(17), 3548-3551.

220. Meiners, J.-C. and Quake, S. R.: "Femtonewton Force Spectroscopy of Single Extended DNA Molecules" **Physical Review Letters** (2000), *84*(21), 5014-5017.

221. Baumann, C. G., Bloomfield, V. A., Smith, S. B., Bustamante, C., Wang, M. D. and Block, S. M.: "Stretching of single collapsed DNA molecules" **Biophysical Journal** (2000), *78*, 1965-1978.

222. Murayama, Y. and Sano, M.: "Force Measurements of a Single DNA Molecule in the Collapsing Phase Transition" **Journal of the Physical Society of Japan** (2001), *70*(2), 345-348.

223. Cai, X.-E. and Yang, J.: "Molecular Forces for the Binding and Condensation of DNA Molecules" **Biophysical Journal** (2002), *82*, 357-365.

224. Cui, Y. and Bustamante, C.: "Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2000), *97*(1), 127-132.

225. Bennink, M. L., Pope, L. H., Leuba, S. H., de Grooth, B. G. and Greve, J.: "Single Chromatin Fibre Assembly Using Optical Tweezers" **Single Molecules** (2001), *2*, 91-97.

226. Brower-Towland, B. D., Smith, C. L., Yeh, R. C., Lis, J. T., Peterson, C. L. and Wang, M. D.: "Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2002), *99*(4), 1960-1965.

227. Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L. and Bustamante, C.: "The bacteriophage Phi-29 portal motor can package DNA against a large internal force" **Nature** (2001), *413*, 748-752.

228. Léger, J. F., Robert, J., Bourdieu, L., Chatenay, D. and Marko, J. F.: "RecA binding to a single double-stranded DNA molecule: A possible role of DNA conformational fluctuations" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1998), *95*, 12295-12299.

229. Hegner, M., Smith, S. B. and Bustamante, C.: "Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1999), *96*, 10109-10114.

230. Shivashankar, G. V., Feingold, M., Krichevsky, O. and Libchaber, A.: "RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: The role of ATP hydrolysis" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1999), *96*(14), 7916-7921.

231. Bennink, M. L., Schärer, O. D., Kanaar, R., Sakata-Sogawa, K., Schins, J. M., Kanger, J. S., de Grooth, B. G. and Greve, J.: "Single-Molecule Manipulation of Double-Stranded DNA Using Optical Tweezers: Interaction Studies of DNA With RecA and YOYO-1" **Cytometry** (1999), *36*, 200-208.

232. Strick, T. R., Croquette, V. and Bensimon, D.: "Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase" **Nature** (2000), *404*, 901-904.

233. Yin, H., Wang, M. D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S. M. and Gelles, J.: "Transcription against an applied force" **Science** (1995), *270*, 1653-1657.

234. Wang, M. D., Schnitzer, M. J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J. and Block, S. M.: "Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase" **Science** (1998), *282*, 902-907.

235. Davenport, R. J., Wuite, G. J. L., Landick, R. and Bustamante, C.: "Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by E. coli RNA polymerase" **Science** (2000), *287*, 2497-2500.

236. Wuite, G. J. L., Smith, S. B., Young, M., Keller, D. and Bustamante, C.: "Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity" **Nature** (2000), *404*(6773), 103-106.

237. Maier, B., Bensimon, D. and Croquette, V.: "Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2000), *97*(22), 12002-7.

238. Goel, A., Frank-Kamenetskii, M. D., Ellenberger, T. and Herschbach, D.: "Tuning DNA "strings": Modulating the rate of DNA replication with mechanical tension" **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (2001), *98*(15), 8485-8489.

239. Abele, R. (innoTRAIN, Kronberg): persönliche Mitteilung (2000).

240. Sühnel, J.: "Beyond Nucleic Acid Base Pairs: From Triads to Heptads" **Biopolymers** (2002), *61*, 32-51.

241. Yang, D. and Wang, A. H.-J.: "Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA" **Prog. Biophys. molec. Biol.** (1996), *66*(1), 81-111.

242. Krautbauer, R., Clausen-Schaumann, H. and Gaub, H. E.: "Cisplatin Changes the Mechanics of Single DNA-Molecules" **Angewandte Chemie Int. Ed.** (2000), *39*(21), 3913-3915.

243. Krautbauer, R., Fischerländer, S., Allen, S. and Gaub, H. E.: "Mechanical Fingerprints of DNA Drug Complexes" **Single Molecules** (2002), *2-3*, 97-103.

244. Husale, S., Grange, W. and Hegner, M.: "DNA Mechanics Affected by Small DNA Interacting Ligands" **Single Molecules** (2002), *3*(2-3), 91-96.

245. Petersheim, M. and Turner, D.: "Base-Stacking and Base-Pairing Contributions to Helix Stability: Thermodynamics of Double-Helix Formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp" **Biochemistry** (1983), *22*, 256-263.

246. Fischerländer, S.: "Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an DNA" (Diplomarbeit), Ludwig-Maximilians Universität, München (2001).

247. Dettmann, W.: "Dynamische Kraftspektroskopie von einzelnen Rezeptor-Ligand Paaren zu Interaktionen von Zellen" (Doktorarbeit), Ludwig-Maximilians Universität, München (1999).

248. Evans, E. and Ludwig, F.: "Dynamic strength of molecular anchoring and material cohesoin in fluid biomembranes" **J. Physics: Condens. Matter** (1999), *11*, 1-6.

249. Marky, L. A. and Breslauer, K. J.: "Calculating Thermodynamic Data for Transitions of any Molecularity from Equilibrium Melting Curves" **Biopolymers** (1987), *26*, 1601-1620.

250. Oesterhelt, F., Rief, M. and Gaub, H. E.: "Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of Poly(ethylene-glycol) in water" **New Journal of Physics** (1998), *1*(6), 1-11.

251. Butt, H. J. and Jaschke, M.: "Thermal noise in atomic force microscopy" **Nanotechnology** (1995), *6*, 1-7.

252. Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mirkin, C. A. and Letsinger, R. L.: "Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles" **Langmuir** (2002), *18*, 6666-6670.

253. Demers, L. M., Östblom, M., Zhang, H., Jang, N.-H., Liedberg, B. and Mirkin, C. A.: "Thermal Desorption Behavior and Binding Properties of DNA Bases and Nucleosides on Gold" **J. Am. Chem. Soc.** (2002), *124*(38), 11248-11249.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Force Spectroscopy with Single Bio-Molecules

H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, and H. E. Gaub,
Current Opinion in Chemical Biology, 2000, 4 (5), 524-530.

Cisplatin Changes the Mechanics of Single DNA-Molecules

R. Krautbauer, H. Clausen-Schaumann and H. E. Gaub
Angewandte Chemie, 2000, 112 (21), 4056-4059.
Angewandte Chemie International Edition, 2000, 39 (21), 3912-3915.

Single Molecule Force Spectroscopy Investigations of DNA-Drug Interactions

R. Krautbauer, S. Allen, I. Tessmer, G. Skinner, L. H. Pope, T. E. Schrader, J. E. Molloy, S. J. B. Tendler, and H. E. Gaub
Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc. 2001, 221, 247-COLL.

Discriminating Small Molecule DNA Binding Modes by Single Molecule Force Spectroscopy

R. Krautbauer, L. H. Pope, T. E. Schrader, S. Allen, and H. E. Gaub
FEBS letters 2002, 510 (3), 154-158.

Discriminating Small Molecule DNA Binding Modes by Single Molecule Force Spectroscopy

R. Krautbauer, T. E. Schrader, L. H. Pope, S. Allen, and H. E. Gaub
Biophysical Journal 2002, 82 (1), 692.

Mechanical Fingerprints of DNA Drug Complexes

R. Krautbauer , S. Fischerländer , S. Allen, and H. E. Gaub
Single Molecules 2002, 2-3, 97-103

Mechanical Stability of LNA-DNA Duplexes

W. Zhang, R. Krautbauer, and H. E. Gaub, in Vorbereitung

Unzipping Short DNA

R. Krautbauer, M. Rief and H. E. Gaub, in Vorbereitung

8. Lebenslauf

Rupert Krautbauer, geboren am 21. Mai 1973 in München,
verheiratet mit Angela Weisensee.

Schulbildung

9/79 – 8/80	Grundschule an der Jahnstraße, Unterhaching.
9/80 – 8/83	Grundschule an der Forellenstraße, München.
9/83 – 7/92	Michaeli-Gymnasium München (Abitur).

Zivildienst

10/92 – 10/93	Rettungsdiensthelfer beim Bayerischen Roten Kreuz, München.

Hochschulstudium

11/93 – 11/99	Physikstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Diplomarbeit: „DNA als organisches Templat zur Ausbildung metallischer Nanodrähte.“
9/95 – 7/96	Physikstudium an der University of Nottingham, England.
11/99 – 12/02	Promotion in Physik am Lehrstuhl für Angewandte Physik, Biophysik und neue Materialien der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Gaub).
seit 10/00	Aufbaustudium Betriebswirtschaftslehre an der FernUniversität Hagen (Vordiplom Herbst 2002).

9. Danksagung

Forschungsarbeit findet natürlich nicht im Alleingang statt und deshalb haben zu dieser Arbeit auch viele andere einen Beitrag geleistet. Eine wichtige Voraussetzung für erfolgreiches Arbeiten ist eine gute Arbeitsathmosphäre. Dafür möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der „Gambicrew“ bedanken, die immer ein starkes Team waren – im Labor genauso wie bei Schlittenrennen, in Venedig oder im „Simpl“. Ebenso wichtig waren für mich die vielen Diskussionen, die ich mit Gästen unseres Labors, an anderen Instituten und auf Konferenzen geführt habe. Mein Dank gilt allen, die wissentlich oder unwissentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

- meinen Zimmerkollegen für die gute Stimmung.
- Dr. Hauke Clausen-Schaumann, Tobias Schrader, Stefan Fischerländer und Dr. Wenke Zhang für die gemeinsame Arbeit.
- Thorsten Hugel für viele Diskussionen über Wissenschaft, Politik und Fußball und besonders für den gemeinsamen Endspurt.
- Dr. Stephanie Allen für die sehr gute Zusammenarbeit.
- Prof. Dr. Matthias Rief für die vielen hilfreichen Tips und Diskussionen.
- Prof. Dr. Hermann Gaub für die Betreuung dieser Arbeit. Besonders bedanke ich mich für die vielen Freiheiten und Möglichkeiten, die ich während meiner Zeit am Lehrstuhl hatte und für die von ihm ausgestrahlte und weitergegebene Freude an der Wissenschaft.
- allen meinen Freunden und meiner Familie, die mir immer eine wichtige Unterstützung waren und mir den nötigen Ausgleich zur Nanowelt gegeben haben. Ganz besonders bedanke ich mich dafür natürlich bei meiner Frau Angie!