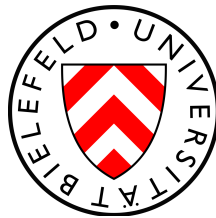


Kraftspektroskopische Untersuchungen an DNA mit Hilfe der Optischen Pinzette

DIPLOMARBEIT

vorgelegt am 30.06.2014



Fakultät für Physik der Universität Bielefeld

angefertigt von

Roland Hillmann

Experimental Biophysics & Applied Nanoscience

Erstgutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti

Zweitgutachter: Dr. Andy Sischka

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 30.06.2014

(Roland Hillmann)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti
Dr. Andy Sischka

»Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.«

Franz Kafka

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Ziele	5
2	Theoretische Grundlagen	7
2.1	Desoxyribonukleinsäure	7
2.2	Einzelsträngige Nukleinsäuren	9
2.3	Bakteriophage Lambda	10
2.4	Polymermodelle	12
2.5	Optische Falle	13
2.6	Kraftspektroskopie an DNA	16
2.7	Histone	19
3	Materialien und Methoden	21
3.1	Mikroskopie und Lichtweg	21
3.2	Flusszelle	23
3.3	Ablauf einer Messung	24
3.4	dsDNA	27
3.4.1	Präparation mit Biotin	27
3.4.2	Präparation mit Digoxigenin	29
3.5	ssDNA	31
3.5.1	Abtrennung über eine Zentrifuge	32
3.5.2	Präparation mit Eisbad	33
3.5.3	Unterschiedliche Salzkonzentrationen	33
3.6	UV/VIS-Spektroskopie	34
4	Messungen und Auswertung	37
4.1	Kraftspektroskopie an dsDNA	37
4.1.1	Native Streckkurven	37
4.1.2	Streckkurven mit Histonen	47
4.2	UV/VIS-Spektroskopie	55
4.3	Kraftspektroskopie an ssDNA	57
5	Fazit und Ausblick	62
6	Danksagung	63
7	Literatur	64

1 Motivation und Ziele

In der Biophysik finden viele Prozesse in einer hochkomplexen Umgebung statt. Einzelne Vorgänge stehen immer unter dem Einfluss einer großen Anzahl unterschiedlicher Faktoren und die Natur hat für viele Probleme im Laufe der Evolution faszinierende Lösungen entwickelt. Möchte man in diesem Ensemble ein bestimmtes Phänomen näher untersuchen, braucht man spezielle experimentelle Methoden, um Zugang zu diesem Mikrokosmos zu erhalten. Darüber hinaus ist es in der Regel unabdingbar, das umfassende biologische Zusammenspiel auf ein kontrollierbares Mindestmaß zu beschränken, um die gegenseitige Beeinflussung zu verstehen. Erst die Kombination von Erkenntnissen vieler solcher scharf abgegrenzter Einzelexperimente lässt ein Bild des Ganzen entstehen.

Mit der Rastersondenmikroskopie und der Optischen Pinzette ist es heute möglich, biologische Systeme auf eine atomare Skala aufzulösen. Diese Techniken haben zu einem tiefgreifenden Verständnis mechanischer Eigenschaften von Einzelmolekülen, ihren Bindungen und Konformationsänderungen geführt. Durch sie ist ein maßgeblicher Beitrag zur Entwicklung der Nanowissenschaften und der Nanotechnologie geleistet worden.

Die Experimente dieser Arbeit sind alle an der Optischen Pinzette durchgeführt worden. Ihr Funktionsprinzip basiert auf dem Festhalten mikroskopisch kleiner Partikel mit einem fokussierten Laserstrahl. Durch Auswertung des reflektierten Lichtes kann mit einer Präzision von wenigen Nanometern aufgelöst werden. Aber vor allem die Eigenschaft, Kräfte in der Größenordnung von Piconewton zu bestimmen, machen sie zu einem hervorragenden Instrument bei der Untersuchung kettenartiger Makromoleküle wie DNA. Die Beobachtung von Kraftantworten auf veränderte Bedingungen gelingen mit einer Präzision, die Rückschlüsse auf feinste Unterstrukturen des Einzelmolekül-Systems zulässt.

Zielsetzung dieser Arbeit ist das Vermessen von DNA-Kraftkurven, die als Kraftantwort auf eine angelegte mechanische Spannung entstehen. Diese Kraftkurven erlauben Rückschlüsse auf Konformationsänderungen der DNA. Darüber hinaus werden Einflüsse von Molekülen untersucht, die durch Wechselwirkungen mit der DNA entstehen. Eine Auswertung kann über die charakteristischen Veränderungen im Streckprofil der Messung vorgenommen werden.

Vor dem biologischen Hintergrund ist die Reaktion von Nukleinsäuren auf Krafteinwirkung hochinteressant. So macht das Auslesen von Genen durch Enzyme im Rahmen der Proteinsynthese eine strukturelle Veränderung der DNA erforderlich. Auch die Packungsform der DNA, die in den Chromosomen ihre Erscheinungsform findet, ist mit räumlicher Umordnung und Kraftwirkung verbunden.

Besonderes Augenmerk soll in den folgenden Experimenten dem Bindungsverhalten von Histonen an Nukleinsäuren gewidmet werden. Diese Proteine sind zentraler Bestandteil bei der strukturgebenden Wechselwirkung mit DNA auf dem Weg zum Chromatin.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird eine Einführung in alle relevanten theoretischen Hintergründe gegeben. Nukleinsäuren und ihre biologische Funktion finden genauso Platz wie die Biologie der Lambda-Phage und ihr spezialisiertes Genom. Das Funktionsprinzip der Optischen Pinzette wird anschaulich anhand von Bildern dargestellt, außerdem wird ihre Rolle im Verfahren der Kraftspektroskopie an Polymeren erläutert.

Das zweite Kapitel geht auf die Probenkammer ein, in der alle Messungen stattfinden. Sie stellt die Schnittstelle zwischen dem Mikrokosmos der Einzelmoleküle einerseits und der makroskopischer Steuerung andererseits dar. Das Kapitel schließt mit Präparationsmethoden und der gezielten Markierung von DNA mit Biotin und Digoxigenin, um sie für Manipulation in der Optischen Pinzette aufzubereiten. Auch die Synthese von einzelsträngiger DNA findet hier Platz.

Im dritten Teil werden vor allem Messungen aus Streckversuchen mit DNA diskutiert. Dabei findet eine Einführung in DNA-Kraftspektroskopie ohne beeinflussende Zusätze statt. Anschließend wird die Veränderung durch Histone untersucht. Die verkürzenden Eigenschaften lassen sich mit der sensitiven Optischen Pinzette experimentell hervorragend studieren. Im Fokus steht dabei die Längenverkürzung, die ein einzelnes Histon herbeiführt. Schließlich wird der Erfolg der Präparation einzelsträngiger DNA anhand ihres abweichenden Streckprofils überprüft.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Desoxyribonukleinsäure

Jede Zelle trägt in ihrem Innersten den vollständigen Bauplan aller biologischen Komponenten eines Organismus. Diese Information ist in Form der Desoxyribonukleinsäure, kurz DNA, gespeichert. Das kettenartige Molekül enthält über eine spezielle Abfolge von wiederkehrenden Strukturen unter anderem die Anleitung zur Synthese von Proteinen und besitzt damit eine wichtige Funktion aller Lebewesen.

Einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis des Aufbaus der DNA haben 1953 James D. Watson und Francis Crick in ihrem Artikel [1] geleistet, für den sie zusammen mit Maurice Wilkins 1962 den Nobelpreis für Medizin bekommen haben. In ihrer Veröffentlichung schlugen sie für DNA eine Struktur vor, die aus zwei helikale Ketten besteht, welche jeweils um die gleiche Achse gewickelt sind. Jede der beiden Ketten besteht aus der periodischen Abfolge einer Phosphatgruppe und einer β -D-Desoxyribofuranose. Die Neuheit bestand auch darin, dass die beiden Stränge durch die Purin- und Pyrimidin-Basen zusammen gehalten werden.

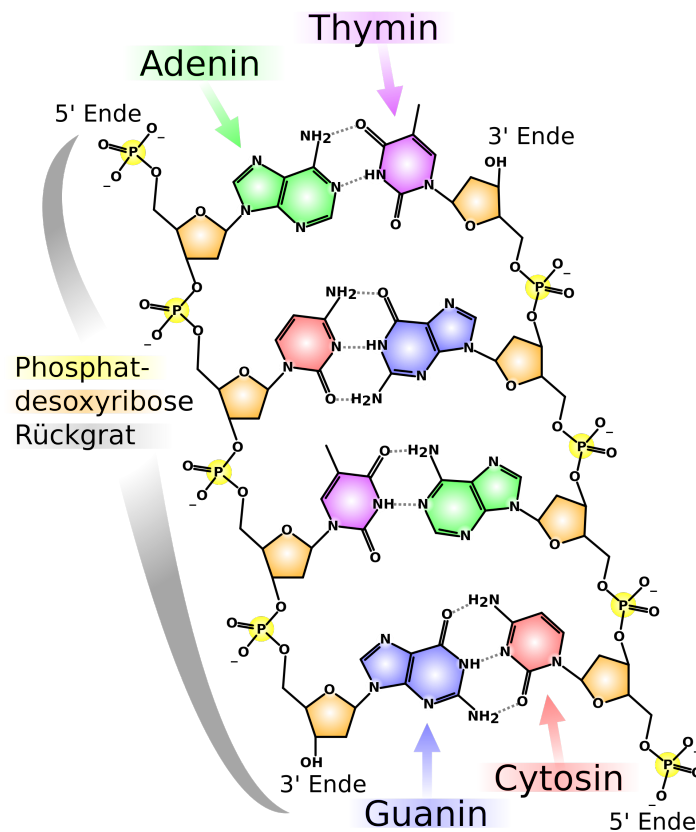


Abbildung 1: Die chemische Struktur der DNA [2]. Gut erkennbar sind der antiparallele Verlauf der Einzelstränge und die Basenpaarungen durch H-Brücken.

Die kleinste Untereinheit der DNA ist das Nukleotid. Es besteht aus der Phosphatgruppe, einer Desoxyribofuranose und einer von vier möglichen Basen. Bei der Base handelt es sich entweder um ein Purin (Adenin oder Guanin) oder um ein Pyrimidin (Thymin oder Cytosin). Die Base ist am 1'-C-Atom des zyklischen Zuckers angebunden, am 5'-C-Atom sitzt das Phosphat. Die nächst höhere Ordnung wird erreicht, wenn die Phosphatgruppe über eine Phosphodiester-Bindung am 3'-C-Atom der Ribose eines anderen Nukleotids anbindet. Es entsteht also ein Einzelstrang mit einer Folge aus Basen, der noch nicht notwendigerweise helikal geordnet ist. Erst die Wechselwirkung mit einem zweiten, komplementären Strang, führt zur Ausprägung der Doppelhelix. Dieser zweite Strang verläuft antiparallel zum ersten, und enthält eine Folge aus Basen, die durch die Sequenz des ersten Stranges vorgegeben ist. Denn die Verbindung der Basen zu einer Basenpaarung geschieht abhängig von ihrer chemischen Struktur über zwei (Adenin-Tymin) oder drei (Guanin-Cytosin) Wasserstoffbrückenbindungen und kann ausschließlich zwischen diesen passenden Partnern erfolgen. Den größten Beitrag zur Stabilität der DNA geben allerdings nicht die Wasserstoffbrückenbindungen, sondern das Rückgrat und die Stapelwechselwirkungen zwischen aufeinander folgenden Basen [3].

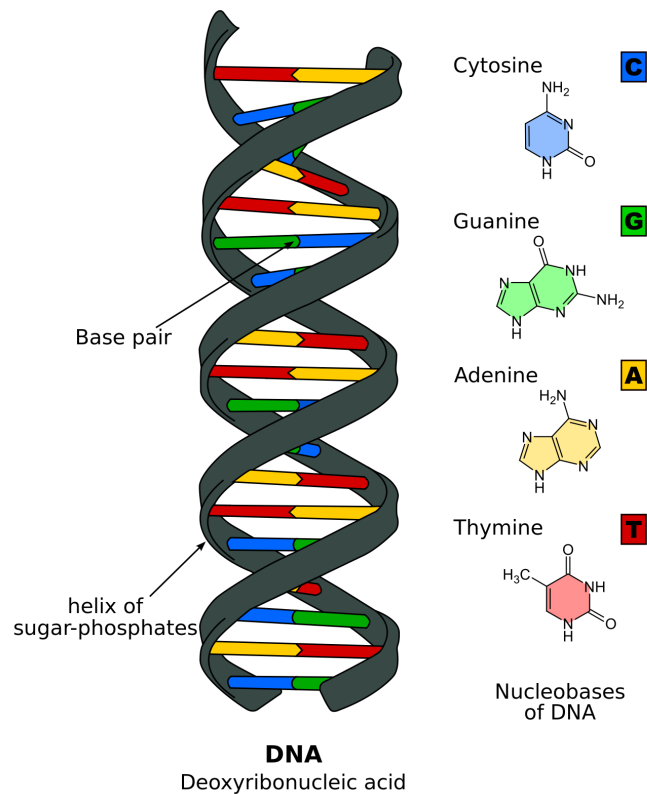


Abbildung 2: Die komplementären Einzelstränge ordnen sich zu einer Doppelhelix an. Über das Rückgrat und Stapelwechselwirkungen der Basenpaare ist diese Konformation sehr stabil [4].

Aus der räumlichen Anordnung der Basenpaare im Inneren und dem Phosphatrückgrat nach außen gewandt folgt auch die hohe Löslichkeit von DNA in wässriger Umgebung. Die unpolaren Basen sind wie als Sprossen einer Leiter umschlossen vom Rückgrat der hydrophilen Moleküle Ribose und Phosphat. Dazu trägt erheblich bei, dass die Phosphatgruppe zweifach negativ geladen ist und das Makromolekül DNA zu einem Polyelektrolyt macht.

Die Distanz zwischen benachbarten Zuckern oder Phosphaten in der DNA beträgt 0,6 nm [5, S. 19]. Die Basenpaarung und ihre H-Brücken halten die jeweiligen Phosphate auf einem Abstand von 1,8 nm. Da die Höhe einer DNA-Base 0,33 nm beträgt, würde ohne die Anordnung zu einer Helix eine Lücke von 0,27 nm zwischen den Basenpaarungen bleiben. Durch die helikale Geometrie wird in einer rechtsgängigen Doppelhelix nach 3,4 nm eine komplette Windung erreicht. Dabei enthält dieser Abschnitt 10,5 Basenpaare [5, S. 23], die somit einen Abstand von 0,33 nm besitzen und in einem Winkel von $32,3^\circ$ zu einander stehen. Der Durchmesser der Doppelhelix beträgt etwa 2,4 nm [6].

2.2 Einzelsträngige Nukleinsäuren

Zur dauerhaften Sicherung aller genetischen Informationen eines Organismus ist die biologisch sehr stabile Konformation der doppelsträngigen DNA gut geeignet. Um diese Informationen der Proteinsynthese im Ribosomen zugänglich zu machen, findet ein Auslesen der entsprechenden Gensequenz der DNA durch Polymerasen statt. Der Bauplan, der auf diese Weise entsteht, gelangt jedoch nicht als doppelsträngige DNA zu seinem Ziel. Die ausgelesenen Gene erreichen ihren Zielort als kurze, einzelstränge Ribonukleinsäure (RNA). Im Unterschied zu DNA besitzt RNA eine Hydroxygruppe am 2'-C-Atom des Pentose-Rings, wo DNA nur ein Wasserstoffatom hat. Darüberhinaus ist die Base Thymin durch Uracil ersetzt.

An dem Prozess der Proteinsynthese nehmen verschiedene Formen der einzelsträngigen RNA (ssRNA) teil. *Messenger RNA* (mRNA) ist eine direkte Kopie der Abfolge von Basen aus der DNA und dient als Informationsträger, in welcher Reihenfolge die Aminosäuren am Ribosomen zu einem Protein zusammen gesetzt werden. Die richtige Aminosäure wird jeweils durch eine *transfer RNA* (tRNA) übergeben. Eine dritte Form der natürlich vorkommenden, einzelsträngigen Nukleinsäure ist die *ribosomale RNA* (rRNA). Neben verschiedenen Proteinen ist sie Hauptbestandteil der Ribosomen.

Da einzelsträngigen Nukleinsäuren kein stabilisierendes Gegenstück für eine Doppelhelix zur Verfügung steht, bilden sich Sekundärstrukturen, die aus komplementären Teilstücken verschiedener Bereiche des Einzelstrangs bestehen. So ist die Struktur von *tRNA* mit ihren drei Schleifen wie die Blätter eines Kleeblattes angeordnet und für die molekulare Erkennung von wichtiger Bedeutung. Die einfachste Form der Selbstaggregation ist eine in Abbildung 3 auf Seite 10 gezeigte *Hairpinstruktur*.

Anders als in eukaryotischen Zellen sind in vielen Bakteriophagen und Viren einzelsträngige Nukleinsäuren Träger des Genoms. Der *M13* ist beispielsweise ein filamentöser Phage mit einer zirkulären ssDNA von 6407 Basen. Die DNA liegt geschützt durch eine Proteinhülle im Inneren des Phagen, der bei einer Länge von 1-2 μm nur einen Durchmesser von 6 nm [7] besitzt. Als Wirt kommen für den *M13* nur Bakterien in Frage, die

aufreißt. Mit dem Tod der Wirtszelle werden bis zu 200 neue Phagen freigesetzt. Im lysogenen Zyklus hingegen wird das Genom des Phagen in das Erbgut des Bakteriums integriert. Dazu kann es kommen, weil in der DNA von *E. coli* eine Sequenz existiert, die genau mit den 12 Basenpaaren aus der DNA der Phage übereinstimmt, die im Kapsid noch als Einzelstränge vorlagen. Mit diesen sogenannten *sticky ends* verschmelzen die beiden Genome zu einem neuen. Ein spezieller Repressor verhindert vorerst die Synthese neuer Phagen. Da das Genom des Phagen jetzt jedoch fester Bestandteil des Bakterienchromosoms ist, wird es bei jeder Zellteilung an die nächste Bakteriengeneration weiter gegeben. Durch UV-Strahlung oder Hitze kann jedoch der Repressor deaktiviert werden. Es kommt zum Ausgliedern des Prophagen aus dem bakteriellen Genom und es beginnt ein lytischer Zyklus. Durch diesen Prozess kann virale DNA lange Zeit im Genom befallener Wirtszellen verbleiben und stressinduziert eine Infektion auslösen.

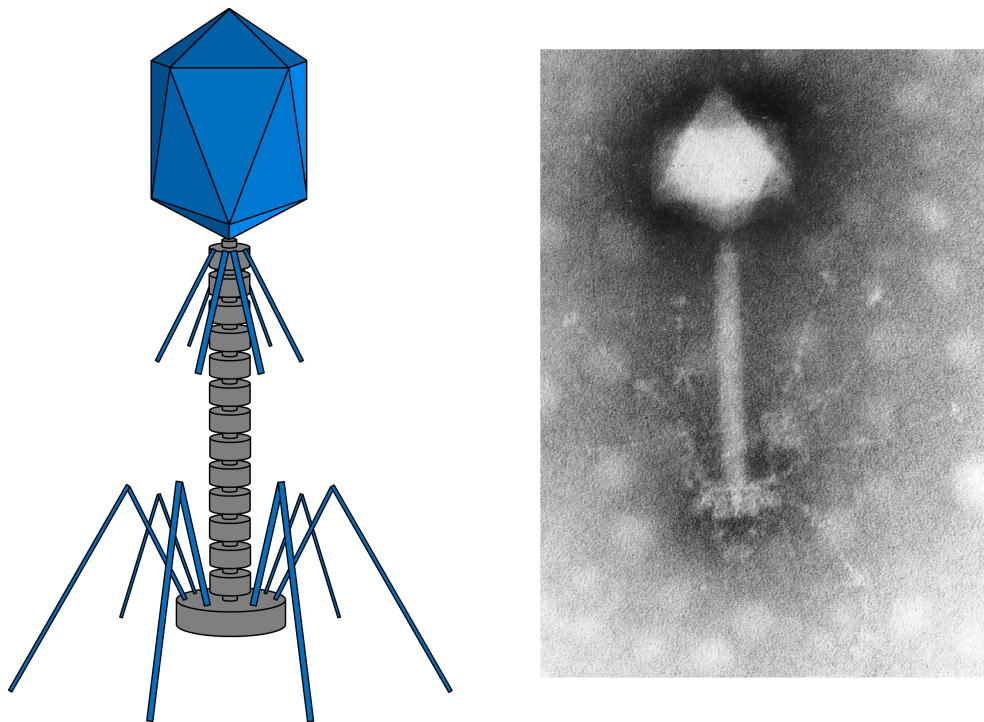


Abbildung 4: Links ist die Struktur eines typischen Bakteriophagen dargestellt. In der Kopfgruppe ist die Nukleinsäure untergebracht. Unterhalb davon sitzt der Schwanzteil, an den sich der Injektionsapparat anschließt. Rechts ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines *Lambda-Phagen* zu sehen [10]. Das Kapsid hat einen Durchmesser von etwa 60 nm, das Schwanzstück ist 100 nm lang. Die abstehenden Fiberproteine sind zu sehen.

2.4 Polymermodelle

Ein Polymer ist ein kettenartiges Makromolekül, das sich aus ständig wiederholenden Untereinheiten zusammensetzt. Ihr Verhalten in wässriger Umgebung kann mit Hilfe von Polymermodellen charakterisiert werden. Insbesondere beschreiben sie die räumliche Konformation des Moleküls durch eine statistische Mittelung. Im einfachsten Fall des *Freely-Jointed Chain-Modells* werden die Monomere als starre Stäbe mit festgelegter Länge betrachtet. Ihre Orientierung und Position ist zufällig und unabhängig von der des Nachbarn. Der Gyrationradius eines Polymers, der sich aus dieser Theorie ergibt, ist proportional zur Wurzel der Segmentanzahl. Die Gültigkeit dieses Polymermodells ist jedoch begrenzt. Beliebige Winkel zwischen benachbarten Monomeren können zu Überschneidungen führen und berücksichtigen unter sterischen Gesichtspunkten nicht das Eigenvolumen der Kettenglieder.

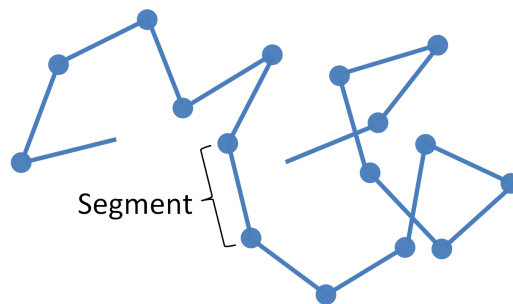


Abbildung 5: Ein Polymer vereinfacht im FJC-Modell dargestellt.

Eine Verbesserung durch die Festlegung der Bindungswinkel zwischen den Kettensegmenten stellt das Modell der *Freely-Rotating-Chain* dar. Zusätzlich können die Segmente sich über ihre Bindung frei zueinander drehen. Über ein individuelles Steifheitsmaß, das der Natur des Makromoleküls gerecht wird, erfolgt eine weitere Verfeinerung des FRC-Modells. Ergebnis dieser Modifizierung ist eine effektive Segmentlänge (Kuhn-Länge), die den Randbedingungen gerecht wird.

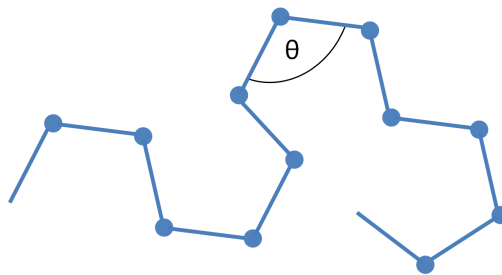


Abbildung 6: Ein Polymer vereinfacht im FRC-Modell dargestellt.

Das *Wormlike-Chain-Modell* berücksichtigt Energie, die beim Verbiegen des Polymers aufgebracht werden muss. Im Gegensatz zu Polymer-Modellen mit streng abgegrenzten Kettengliedern, wird das Molekül näherungsweise als flexibler Stab betrachtet und verhält sich unterhalb seiner Persistenzlänge sehr steif. Freiheitsgrade entstehen nicht an streng definierten Bindestellen von Monomeren, sondern existieren kontinuierlich über das Makromolekül. Eine anschauliche Kenngröße bei bekannter Gesamtlänge l und Persistenzlänge L_p ist das gemittelte Abstandsquadrat $\langle R^2 \rangle$ der beiden freien Enden.

$$\langle R^2 \rangle = 2lL_p \left[1 - \frac{L_p}{l} \left(1 - e^{-\frac{l}{L_p}} \right) \right] \quad (1)$$

Ein Polymer wie Lambda-DNA, das eine Konturlänge von $16,4 \mu\text{m}$ besitzt, liegt in wässriger Lösung als zusammengefaltetes Knäuel vor. Seine End-zu-End Distanz liegt also deutlich unter der Konturlänge. Aufgrund ihrer Ladung ist DNA von einer Hydrathülle umgeben. Eine kleine Veränderung der Geometrie von DNA hat zur Folge, dass unterschiedlich viele Wasserteilchen gebunden werden. Das vollständige Ausstrecken von DNA bindet erheblich mehr Wassermoleküle als die Knäuel-Konformation und hat damit ein Absenken der Entropie zur Folge. Der Energieaufwand, der bei kraftspektroskopischen Untersuchungen an DNA nötig wird, kann so über eine Näherung [11] bestimmt werden.

$$\frac{FL_p}{k_B T} = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_0} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \quad (2)$$

Für dsDNA mit einer Konturlänge L_0 ergibt sich daraus bei einer von der Auslenkung x abhängigen Kraft F eine Persistenzlänge L_p von etwa 50 nm . Diese Näherung ist für Kräfte bis 15 pN gültig, da hier noch kein Schmelzen der DNA zu erwarten ist und die Konturlänge konstant bleibt.

2.5 Optische Falle

Die erste Veröffentlichung zur optischen Falle stammt von A. Ashkin et al. aus dem Jahr 1970 zurück. In seiner Arbeit [12] beschreibt er das Einfangen und Beschleunigen von Mikropartikeln durch Laserstrahlung. Kernstück seiner Experimente bildete ein fokussierter Argon-Laser, den er auf Latexkügelchen mit wenigen Mikrometer Durchmesser richtete. Dabei konnte er beobachten, dass die Kügelchen zum einen durch den Strahlungsdruck in Ausbreitungsrichtung beschleunigt wurden, gleichzeitig aber auch eine Kraft zur optischen Achse hin erfuhren. Den Grund für dieses Phänomen sah er in der stärkeren Brechkraft des zu fangenden Objektes gegenüber des umgebenen Mediums. Die so geschaffene zweidimensionale Falle nannte er „optical bottle“. Auch untersuchte er bereits die Möglichkeit, mit einem zweiten, entgegengesetzten Laser, den Strahlungsdruck auf ein Mikroobjekt an einem Gleichgewichtspunkt aufzuheben und realisierte damit eine Falle in allen drei Raumrichtungen.

Eine Anordnung, die mit einem einzigen Laser auskommt, geht ebenfalls auf Ashkin et al. zurück. Im Jahr 1986 publiziert er einen Aufbau [13] einer optischen Falle, die auf einem stark fokussierten Einzelstrahl basiert. Er fängt damit Objekte in der Größenordnung von bis zu 25 nm. Mit einer weiteren Arbeit [14] zur Manipulation von *E. coli* und Tabakmosaikviren hat er die Möglichkeiten aufgezeigt, die sich mit dieser Technik für die Biophysik ergeben.

Prinzipiell muss bei der Größe der zu fangenden Partikel zwischen Rayleigh-Streuung (mit typischen Objektmessungen sehr viel kleiner als die Wellenlänge $d \ll \lambda$) und Mie-Streuung ($d \gg \lambda$) unterschieden werden. Im letzteren Fall lassen sich die resultierenden Kräfte ganz einfach durch Strahlenoptik beschreiben. Ein Laser in der Grundmode TEM_{00} besitzt ein gaußförmiges Strahlprofil. In Abbildung 7 die Kräfte gezeigt, die aus drei exemplarische Lichtwege resultieren.

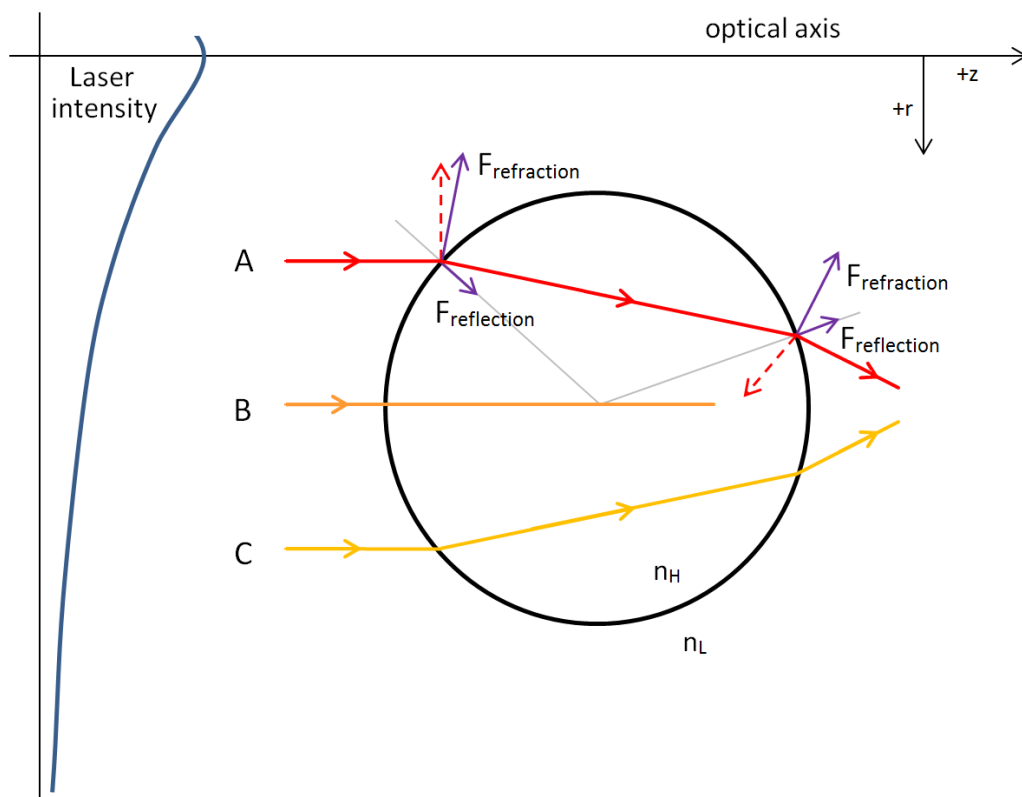


Abbildung 7: Unter der Einwirkung eines gaußförmig verteilten Strahlenprofils entstehen an einer Kugel Kräfte durch Brechung und Reflexion. Das Farbschema repräsentiert die unterschiedlich starken Intensitäten des Laserlichtes. Gilt für die Brechungsindizes $n_H > n_L$, so zeigt die resultierende Kraft zur Strahlmitte und in Ausbreitungsrichtung. Nach [12]

Der Strahl A wird beim Eintritt ins Objekt sowohl reflektiert, als auch gebrochen. Aufgrund des höheren Brechungsindex des Kügelchens, erfährt der Laserstrahl eine Ablenkung hin zum Lot der Trennfläche, so dass das Objekt als Sammellinse wirkt. Der Impulserhaltung entsprechend erfolgt somit eine Kraftwirkung in Richtung $-r$. Durch Symmetrie hat der Strahl C die entgegen gesetzte Wirkung, wegen des gaußförmigen Strahlprofils allerdings um Größenordnungen kleiner. Die durch gestrichelte Pfeile dargestellten Reflexionen führen zum Strahlungsdruck $F_{\text{reflection}}$ in Ausbreitungsrichtung des Lasers und liegen für typische Objekte im Bereich von wenigen Prozentpunkten [15] der Laserleistung.

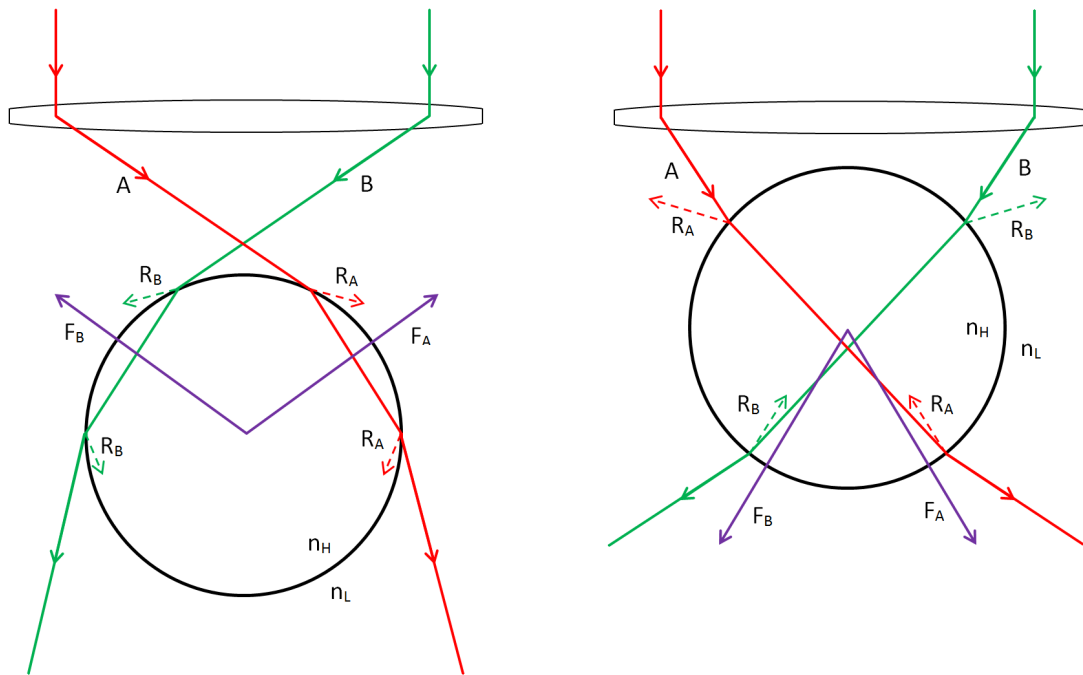


Abbildung 8: Eine Kugel befindet sich unter der Einwirkung eines stark fokussierten Laserstrahls. Die resultierende Kraft zeigt immer zum Fokus. Nach [12]

In Abbildung 8 ist links eine Situation zu sehen, in der sich das Kügelchen aus Sicht der Strahlenquelle hinter dem Fokus befindet. Wieder werden die exemplarischen Strahlen A und B beim Übergang zwischen den Medien sowohl reflektiert, als auch gebrochen. Dem Einfallswinkel entsprechend findet je einmal beim Eintritt und Austritt eine Brechung statt, die mit einer Richtungsänderung des Lichtimpulses einhergeht, sodass es zu einer Kraft $F_R = F_A + F_B$ auf das Kügelchen kommt. Diese Kraft wirkt in Richtung des Laserfokus, entgegen des Strahlungsdrucks.

Die rechte Hälfte der Abbildung 8 zeigt eine Situation, wie sie sich einstellt, wenn das Kügelchen vor dem Fokus platziert ist. Hier durchläuft der Strahlengang A gemäß

der Brechung eine Linkskrümmung und erfährt eine entsprechende Impulsänderung. Auf das gefangene Objekt wirkt eine Kraft in Ausbreitungsrichtung des Laserlichtes. Die Position des Kügelchens relativ zum Laserfokus entscheidet also über das Vorzeichen der Brechungskräfte, wobei diese in jedem Fall zum Fokus zeigen. Zu einem Kräftegleichgewicht kommt es, sobald Strahlungsdruck, Gravitation und Brechungskräfte sich aufheben. Dem Strahlungsdruck geschuldet, wird sich dieses Gleichgewicht ein wenig hinter dem Laserfokus einstellen.

2.6 Kraftspektroskopie an DNA

Viele makroskopische Gegenstände reagieren über das Hooksche Gesetz mit einer elastischen Verformung, die linear zur einwirkenden Belastung steht. Bei diesem linear-elastischen Verhalten zeigen kraftspektroskopische Untersuchungen, also das Vermessen der Kraftantwort auf eine Zugbelastung, keine Phänomene, die durch Unterstrukturen verursacht werden. Biologische Moleküle hingegen bestehen fast immer aus einer Vielzahl solcher Unterstrukturen, die maßgeblich zur Funktion des Makromoleküls beitragen und das Ergebnis einer komplexen Faltungsdynamik sind.

Bei doppelsträngiger DNA kommt es in Folge einer Reihe von Strukturveränderungen zu einem unerwarteten Verhalten der Kraft-Weg-Kurve. Kurz vor Erreichen der Konturlänge steigt die aufzuwendende Kraft stark an, um schließlich bis zum 1,7-fachen Überstrecken der Konturlänge auf annähernd konstantem Niveau zu verbleiben.

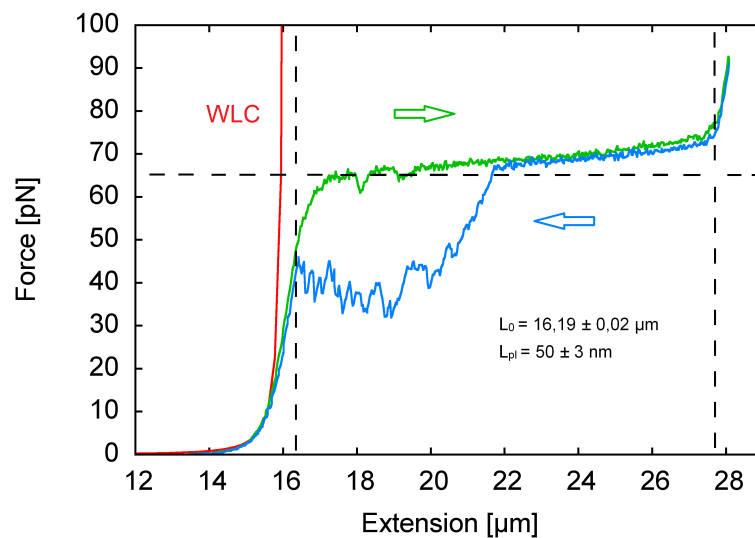


Abbildung 9: Es ist eine charakteristische Kraftkurve einer Überstreckung von dsDNA zu sehen. Mit Hilfe des WLC-Modells können Kontur- und Persistenzlänge bestimmt werden. Die Hysterese ist typisch für DNA und wird durch Rekombination von Unterstrukturen ausgelöst. Die Pfeile zeigen die Streckrichtung der gleichfarbigen Kurve an. Zur besseren Ansicht sind Konturlänge und ihr 1,7-faches durch Linien markiert.

Es gibt drei Mechanismen, die maßgeblich zur Längenausdehnung der dsDNA während des Überstreckens beitragen. In einer Veröffentlichung von Graeme A. King aus 2013 [16] wurden diese mit Hilfe von spezifisch bindenden Farbstoffen untersucht. Um Stellen einzelsträngiger DNA zu identifizieren, ist fluoreszenzmarkiertes *Replikationsprotein A* (RPA) verwendet worden. Bereiche von doppelsträngiger DNA, die in ihrer nativen B-Form vorliegt, konnten mit *Sytox* markiert werden.

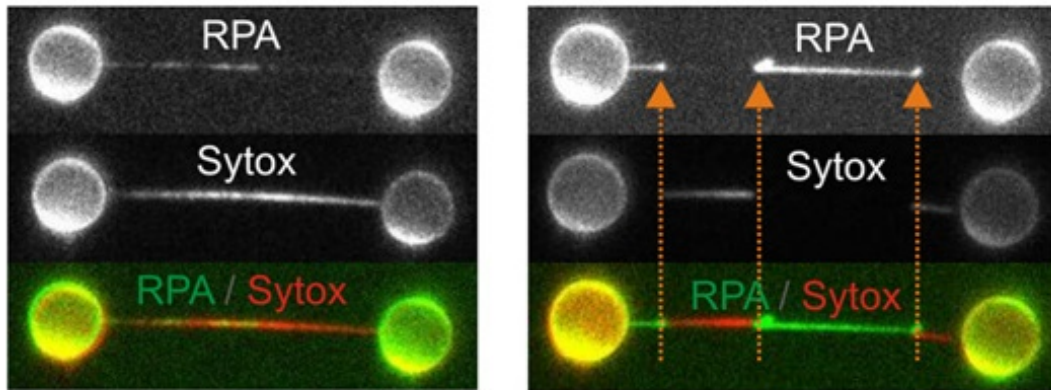


Abbildung 10: Fluoreszenz von *RPA* und *Sytox* an einer gestreckten DNA. Gut zu sehen sind die Bereiche mit einzelsträngiger DNA [16].

Zwei verschiedene Phänomene verursachen die Bildung von ssDNA. In Abbildung 11 sind die sogenannten *melting bubbles* zu sehen, das heißt lokal auftretendes Schmelzen von Basenpaaren. Sequenzen, in denen viel Guanin-Cytosin-Paarungen auftreten, zeigen dieses Verhalten seltener. Auch durch stabilisierende Gegenionen, wie etwa Magnesiumchlorid, kann dieser Effekt reduziert werden. Die Rekombination der Basenpaare im Bereich von *melting bubbles* verläuft während des Relaxierens der DNA vergleichsweise schnell ab.

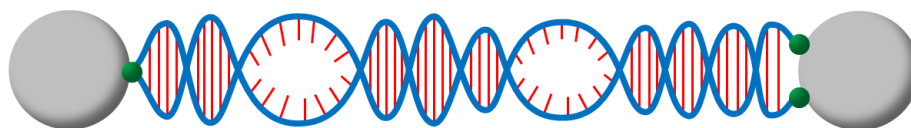


Abbildung 11: Bei kleinen Ionenkonzentrationen (50 mM NaCl) treten *melting bubbles* auf, wodurch die Basenpaarungen lokal aufgebrochen werden. Nach [16]

Ein weiterer Effekt wird *strand unpeeling* genannt. Voraussetzung dafür sind Strangbrüche im DNA-Rückgrat oder eine Befestigung am Kügelchen über nur einen der beiden DNA-Stränge, so dass es zu einem großflächigen Abwickeln eines Einzelstranges vom anderen kommt. Dieses Verhalten ist vor allem im rechten Bild der Abbildung 10 auf Seite 17 gut zu sehen, wo es am mittleren roten Pfeil aufgrund entropischer Kräfte bereits zur Bildung einer Art Knäuel von ssDNA kommt.

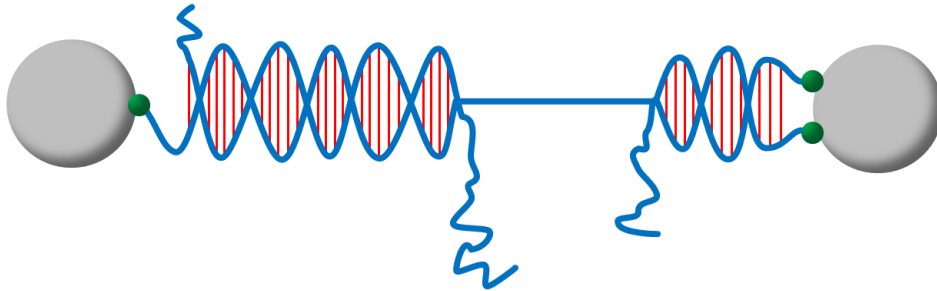


Abbildung 12: Bei Fehlstellen im Rückgrat der DNA, oder einem freien Endstück eines Einzelstranges, kommt es zum *unpeeling*, also dem großflächigen Ablösen eines Stranges vom anderen. Aufgrund der langen einzelsträngigen Abschnitte läuft die Rekombination zeitlich verzögert ab. Nach [16]

Bei der dritten Möglichkeit, ihre Konturlänge unter mechanischer Spannung zu vergrößern, kommt es zur Entwindung der helikalen Struktur. Die Basenpaarungen bleiben dabei erhalten. Der Gewinn an Länge entsteht auf Kosten der Stabilität, da die Stapelwechselwirkungen der DNA wegfallen.

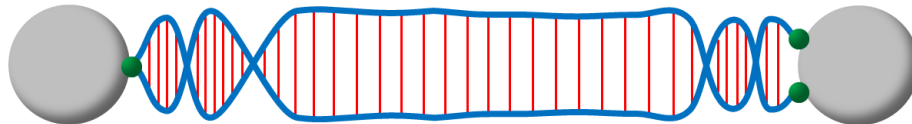


Abbildung 13: Bei höheren Salzkonzentrationen, und im speziellen bei Anwesenheit von $MgCl_2$ (20 mM) steigt die Stabilität von Basenpaarungen. Jetzt kann es zur Entwindung von DNA kommen. Nach [16]

2.7 Histone

Das menschliche Genom besteht aus etwa 3,2 Milliarden Basenpaaren [17] und besitzt damit eine Länge von circa zwei Metern [18]. Damit diese große Menge an DNA in einem Zellkern mit typischer Ausdehnung von 10 μm Platz findet, übernehmen vor allem Histone eine wichtige Rolle bei der räumlichen Verpackung von DNA. Diese Proteine sind dabei so zahlreich und groß, dass das Chromatin, also der gefaltete Komplex aus DNA und strukturgebenden Proteinen, fast doppelt so viel Masse besitzt, wie die DNA selbst [19]. Über Histone kann jedoch auch das Auslesen der DNA gezielt gesteuert werden. So wird vermutet, dass die Histone sich in Archaeen entwickelt haben, um Einfluss auf die Genexpression zu nehmen. Die Möglichkeit der Verpackung von DNA war ein Nebeneffekt, der das immer komplexer werdende Genom erst ermöglicht hat [20]. So besitzen neben einigen Archaeen praktisch alle eukaryotischen Zellen Histone, welche dabei über die Evolution mit zu den konservativsten Proteinen überhaupt gehören. Zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden sie sich nur durch wenige Aminosäurereste.

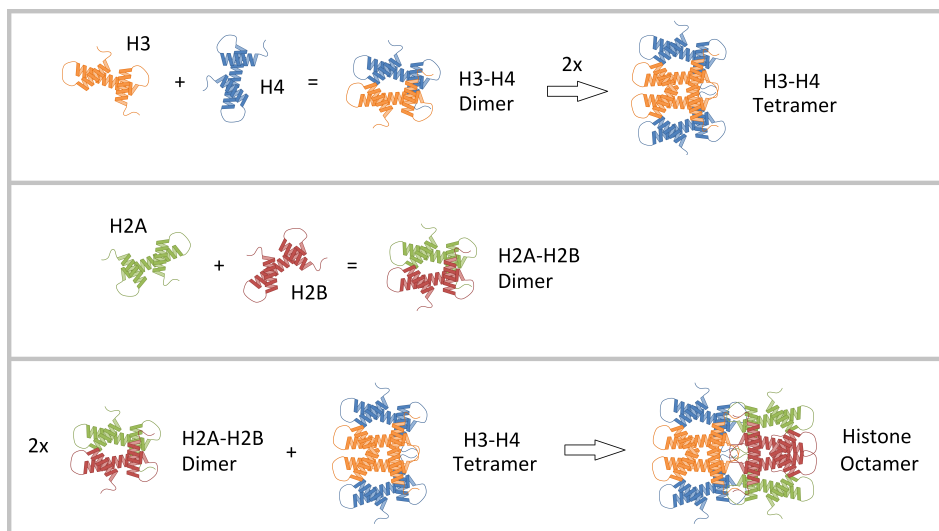


Abbildung 14: Untereinheiten formen sich in mehreren Schritte zu einem Histone.

Auf der untersten Ebene der Verpackung ist die DNA um einzelne Histone gewickelt. Diese sind ihrerseits wieder aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Je zwei Exemplare der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 bilden gemeinsam einen Oktamer, um den 147 Basenpaare 1,67 mal [21] in einer links gerichteten Drehung gewunden sind. Die Kernhistone binden jeweils in Dimeren über einen N-Terminus und einen C-Terminus, wobei zwei H3/H4 Dimere anschließend einen Tetramer bilden. Aufgrund der hohen Ladung der basischen Kernhistone, lagern sich zwei H2A/H2B Dimere erst in Anwesenheit von DNA oder hohen Salzkonzentrationen an den Tetramer an und formen zusammen den Oktamer.

Über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, sowie durch Wasserstoffbrückenbindungen bindet die DNA jetzt an den Oktamer an und formt ein Nukleosom, das einem Zylinder mit 5 nm Höhe und 11 nm Durchmesser gleicht. Mit der ersten Stufe der Komprimierung wird bereits eine 5- bis 10-fache [22] Verkürzung erreicht. Ein weiteres Histon bindet nun jeweils an den Stellen an, wo DNA auf den Oktamer aufgewickelt wird und stabilisiert die Windungen auf dem Nukleosom. Dieses Protein H1 ermöglicht auch die Ausbildung von Strukturen höherer Ordnung, und ist somit für die nächste Stufe der Raumordnung von DNA verantwortlich.

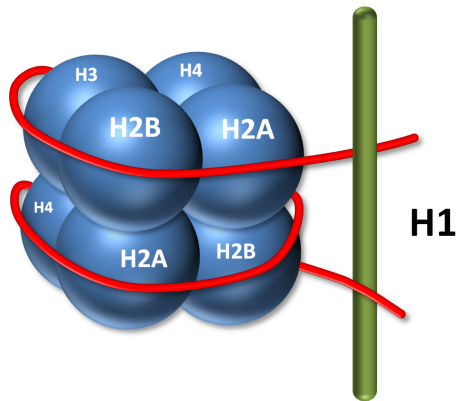


Abbildung 15: Ein mit DNA unwickeltes Histon wird als Nukleosom bezeichnet.

An ein Nukleosom schließt sich, unterbrochen durch ein 10-80 Basenpaare langes Stück DNA (Linker-DNA), das nächste Nukleosom an. Diese Form, die an eine Perlenkette erinnert, windet sich weiter zu einer helikalen Struktur und wird zu einer kompakten Faser mit einem Durchmesser von rund 30 nm. Das Histon H1 trägt erheblich zur Stabilisierung dieser Chromatinfaser bei, die das Genom nun bereits um einen Faktor von 50 zusammenkürzt [20]. Die weitere Ordnung des Chromatins übernehmen verschiedene Proteine und ist noch nicht vollständig verstanden [20]. Am Ende dieses Prozesses entstehen beim Menschen die 46 Chromosomen.

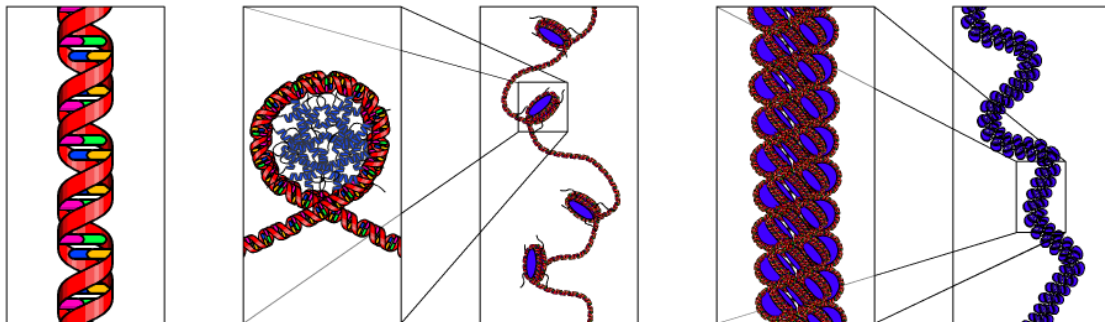


Abbildung 16: Stationen der Komprimierung von DNA bis zum Chromatinfaden [23].

3 Materialien und Methoden

3.1 Mikroskopie und Lichtweg

Für den Betrieb der Optischen Pinzette ist ein Laser nötig, der durch ein System aus Linsen in die Probenkammer eingestrahlt wird. Gleichzeitig muss das Experiment durch ein Mikroskop beobachtbar sein, sodass sowohl der Laser, als auch das sichtbare Licht durch das selbe Objektiv geführt werden. Durch die Arbeit mit biologischen Proben sind an die Laserwellenlänge besondere Anforderungen gestellt, da die Empfindlichkeit von DNA und anderen Biomolekülen gegenüber energiereicher Strahlung berücksichtigt werden muss. Unter Beachtung des Absorptionsvermögens von Wasser eignet sich besonders eine Wellenlänge im nahen infraroten Bereich, wie der Neodym-dotierte Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (kurz Nd:YAG-Laser) mit seinen 1064 nm [24].

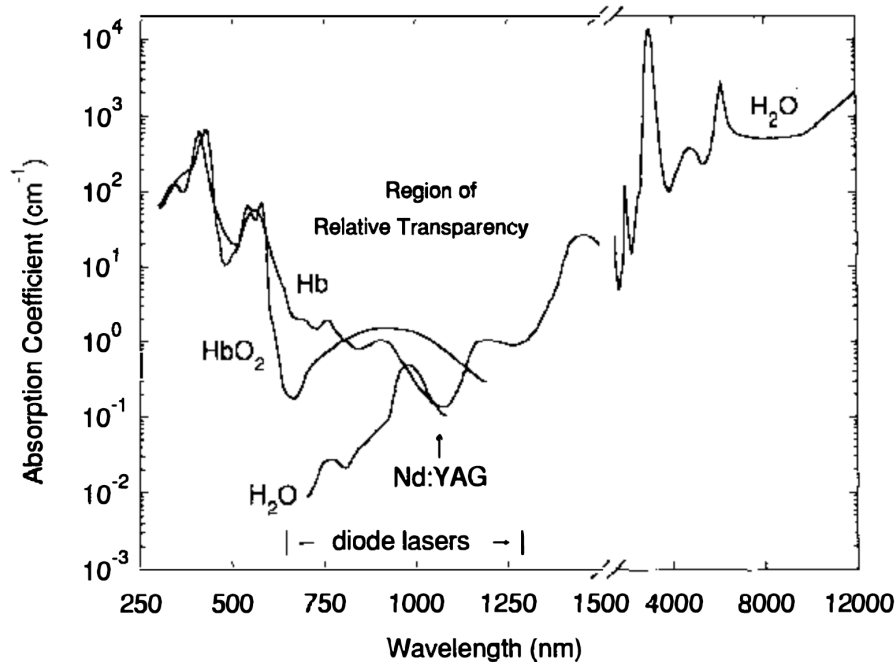


Abbildung 17: Der Graph zeigt das Spektrum der Absorption von Wasser im nahen Infrarot. Die relative Transparenz biologischer Proben erfolgt am Beispiel von Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin [25].

Die Verwendung einer Laserwellenlänge außerhalb des sichtbaren Lichtes bringt zudem den Vorteil, dass es verhältnismäßig einfach über einen dichroitischen Spiegel ausgeblendet werden kann. Das Experiment lässt sich so weiterhin in Echtfarben beobachten.

Nachdem Reste vom Pumplicht herausgefiltert sind, wird der Laserstrahl durch eine geeignete Kombination von Sammellinsen aufgeweitet, um die Divergenz des Strahlprofils zu verbessern. Dabei gilt, dass sich die Brennfleckgröße eines fokussierten Laserstrahls umgekehrt proportional zur Strahlbreite vor der Fokussierlinse verhält.

Das linear polarisierte Laserlicht passiert einen Polwürfel und wird im Anschluss daran durch ein $\lambda/4$ -Plättchen in zirkular polarisiertes Licht umgewandelt. In der Probenkammer wird dieses zirkular polarisierte Licht am Polysterolkügelchen reflektiert und ändert dabei seine Polarisationsrichtung. Im $\lambda/4$ -Plättchen wird das Laserlicht wieder in linear polarisiertes Licht überführt, allerdings besitzt es nun aufgrund der Spiegelung am Kügelchen eine Drehung der Polarisationsrichtung gegenüber des eingestrahلتen Lichtes. Diese Unterscheidung führt im Polwürfel dazu, dass reflektiertes von einfallendem Licht getrennt werden kann und in einem eigenen Lichtweg auf einen Lineardetektor trifft.

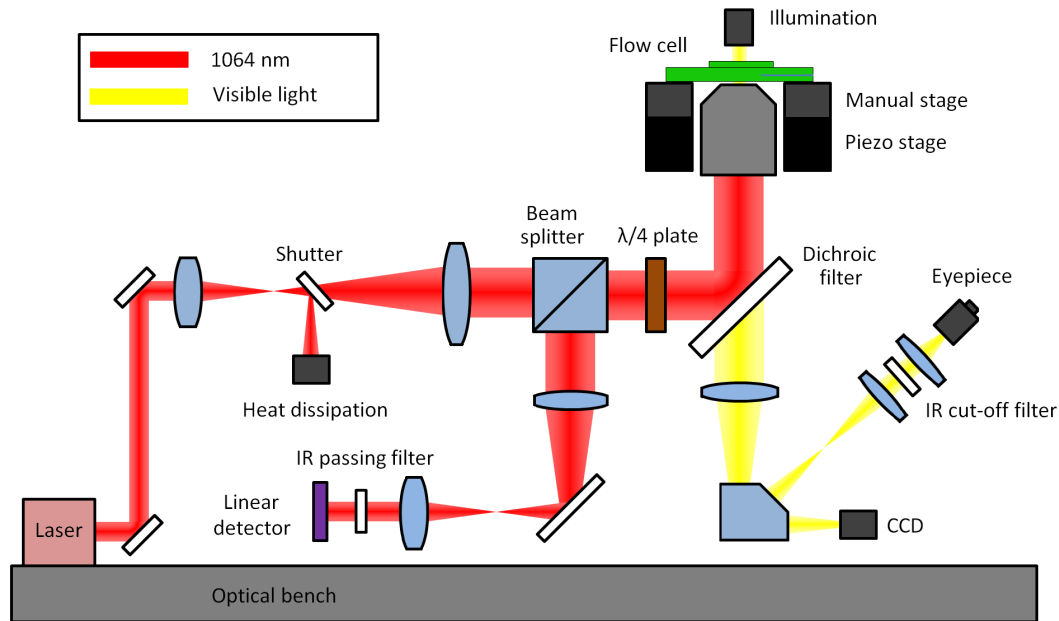


Abbildung 18: Lichtweg im Mikroskop

Über das Licht, dass am Detektor einstrahlt, kann die Auslenkung des gefangenen Objektes bestimmt werden. Dieses wird sich nur wenig aus der Position der Gleichgewichtslage herausbewegen. Die optische Falle ist dann vergleichbar mit einem eindimensionalen harmonischen Potential. Die Auslenkung aus der Ruhelage ist nahezu proportional zur angelegten Kraft. Aus dem Licht, dass durch Rückstreuung am gefangenen Objekt entsteht, kann die Auslenkung aus der Ruhelage bestimmt werden und auf die Kraft geschlossen werden, die dazu nötig ist.

Einen dritten Weg durch das Mikroskop nimmt das Beleuchtungslicht, welches von oben auf die Flüssigkeitszelle eingestrahlt wird. Ein dichroitischer Spiegel wirkt als Strahlteiler, indem er für definierte Wellenlängen reflektierend wirkt, andere Frequenzen jedoch verlustarm passieren lässt. Um auch letzte Anteile an Laserlicht zu unterdrücken, befindet sich vor dem Okular ein Infrarotsperfilter.

3.2 Flusszelle

Die Manipulation kleinster Biomoleküle erfordert eine Umgebung, in der Instrumente zur Verfügung stehen, die von ähnlicher Größenordnung sind, wie die experimentellen Materialien. Eine solche Umgebung muss neben DNA eine Pufferlösung und verschiedene Zusatzstoffe gezielt zu- und abführen können. Außerdem müssen alle experimentellen Parameter durch makroskopische Einwirkung eingestellt werden können. Materialien aus Glas bieten den Vorteil, dass das Experiment durch eine Kamera beobachtet werden kann und der Laser für die optische Falle ohne Aufwand eingestrahlt werden kann.

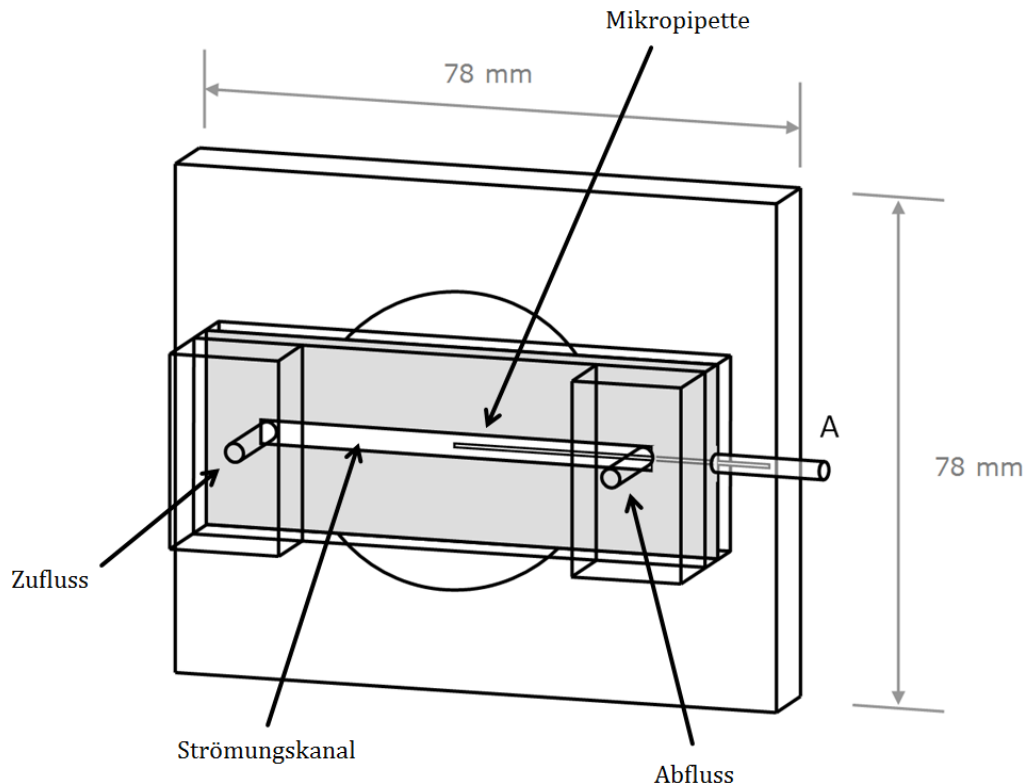


Abbildung 19: Schematisches Modell einer Flüssigkeitszelle zur Manipulation von DNA.

In einem dünnen Kanal mit einer typischen Höhe von $200\ \mu\text{m}$ ist eine Glasfaser gelagert, die durch spezielle Präparation an der Spitze einen Durchmesser von wenigen Mikrometern aufweist. An diese Mikropipette ist an ihrem Austritt (bei A in Abbildung 19) aus der Flusszelle ein größeres Glasröhrchen angebracht, in der über eine angeschlossene Spritze ein variabler Druck eingestellt werden kann. Über diesen Druck kann während des Experiments an der Mikropipette ein Polystyrolkugelchen festgehalten werden, an das die DNA bindet. Der Zulauf von Materialien erfolgt über eine vertikale Öffnung und strömt die Mikropipette von ihrer angespitzten Seite her an, um in einem zweiten Loch wieder abgeführt zu werden.

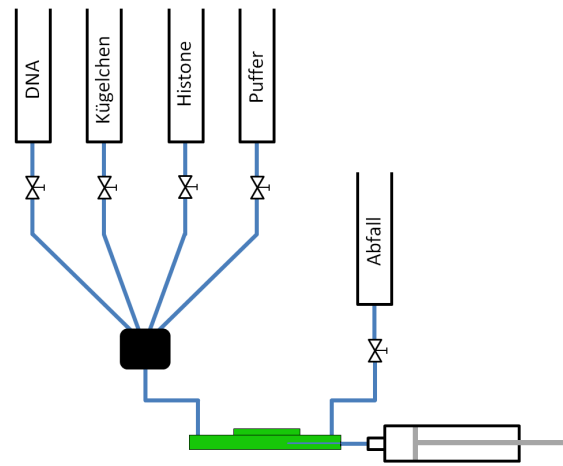
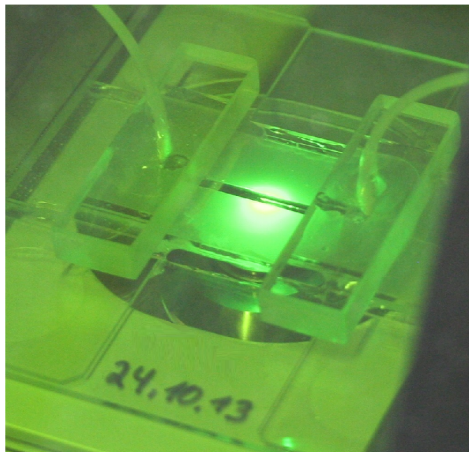


Abbildung 20: Links ist die Flüssigkeitszelle im Experiment zu sehen, die Grünfärbung entsteht durch Laserschutzglas. Rechts sind die Zu- und Ableitungen schematisch abgebildet.

Herzstück der Flusszelle ist ein Strömungskanal, der entsteht, wenn man je eine Schicht *Parafilm* unter kurzer Hitzeeinwirkung auf einen Objektträger und ein Deckglas aufbringt. Vor dem Zusammenführen dieser beiden präparierten Gläser wird eine Glaskapillare so auf die Aussparung im *Parafilm* gelegt, dass die Spitze mittig im Kanal liegt und mit dem anderen Ende aus der Zelle heraus ragt. Anschließend werden die Gläser unter erneuter Erwärmung fest mit einander verbunden und es entsteht ein Kanal, in dem die Mikropipette frei stehend gelagert ist. Diese speziell angefertigte Pipette entsteht durch das Ziehen einer $150\ \mu\text{m}$ dünnen Glasfaser, die mit einem Laser erhitzt wird. Auf diese Weise können Spitzen mit typischen Abmessungen weniger Mikrometer erzeugt werden.

Über ein System aus Schlauchführungen und Ventilen (Abbildung 20 rechts) können während des Experiments alle benötigten wässrigen Komponenten in die Zelle eingespült werden. Dabei lassen sich mit biegesteifen Teflonschläuchen und Innendurchmessern von $0,3\ \text{mm}$ größere Totraumvolumen vermeiden.

3.3 Ablauf einer Messung

Staub und Verunreinigungen, aber auch Luftblasen können die Messung erheblich stören, so dass vor jeder Versuchsdurchführung eine Kontrolle der Zuleitungen und Behältnisse erforderlich ist. Schmutzteilchen werden von der optischen Falle gefangen und beeinträchtigen die empfindliche Auswertung des rückgestreuten Lichtes. Lufteinschlüsse oder gelöste Gase können die Strömung behindern oder ein gefangenes Kügelchen aus der Falle stoßen.

Die Pufferlösung kann in einer verschlossenen Spritze, in der durch Aufziehen ein Unterdruck entsteht, durch Klopfen entgast werden. Vor der weiteren Verwendung des Puffers

sollte er durch einen Mikrofilter mit einer 0,2 μm PTFE Membran gegeben werden. Alle Zuleitungen werden jetzt mit frischer Pufferlösung durchspült und Luftblasen mit einer Injektionsnadel abgesaugt. Hartnäckige oder unzugängliche Lufteinschlüsse können auch durch die Zugabe von Ethanol beseitigt werden. Mit seiner mehr als dreimal so kleinen Oberflächenspannung kriecht es in jeden Zwischenraum und löst durch sein Benetzen restliche Luftblasen. Der Einsatz sollte dennoch sparsam erfolgen, da die Kapillarität proportional zur Oberflächenspannung ist. Dadurch kann es zum Überwinden des Zwischenraums der beiden Schichten *Parafilm* in der Probenkammer kommen, wodurch die Flüssigkeitszelle unbrauchbar wird. Hartnäckige Rückstände im Bereich der Mikropipette können auch mit Natronlauge entfernt werden.

Neben einer Zuleitung mit Pufferlösung, ist ein Vorrat mit Mikrobeads erforderlich. Bei Einsatz von beidseitig biotinylierter DNA werden nur streptavidinbeschichtete Kügelchen benötigt. Die verwendete Konzentration stellt einen Kompromiss aus zwei Ansätzen dar. Auf der einen Seite muss ein Polyesterolpartikel in angemessener Zeit zu fangen sein, auf der anderen Seite führt eine zu hohe Konzentration allerdings häufig dazu, dass mehrere Kügelchen gleichzeitig gefangen werden und aneinander kleben bleiben. Allen folgenden Experimenten liegt bei einer Konzentration der Stammlösung von 5 % eine Verdünnung von 0,4 μl auf 1000 ml Pufferlösung zu Grunde. Über eine dritte Zuleitung kann eine 15 pM DNA-Lösung einströmen. Die Lösungen fließen gewöhnlich allein durch die Höhendifferenz zwischen Vorratsgefäß und Ablauf in die Probenkammer. Leichter Unterdruck kann die Befüllung beschleunigen, zusätzlicher Druck auf der Eingangsseite kann jedoch die empfindliche Flüssigkeitszelle beschädigen.

Das Einspannen und Strecken einer zwischen zwei Kügelchen immobilisierten DNA erfolgt in mehreren Schritten, von denen der erste das Einfangen von Polyesterolkügelchen ist. Dazu wird das Depot mit der Kügelchenlösung geöffnet. Nach einiger Zeit kann man durch das Mikroskop schwarze Schatten beobachten, die im Flusskanal der Probenkammer von links nach rechts strömen. Um ein Kügelchen zu fangen, muss der Laserfokus hinter das zu fangende Objekt gebracht werden. Denn auf diese Weise schiebt der Strahlungsdruck des Lasers das Kügelchen in den Fokus und damit in die Falle. Ein Partikel, das sich hinter dem Laserfokus befindet, erfährt nur im Bereich weniger Mikrometer eine anziehende Kraft und wird in der Regel weggestoßen.

Die Kontur der Kügelchen erscheint etwas unscharf, da die Gleichgewichtslage durch den Strahlungsdruck leicht hinter den Laserfokus verschoben ist. Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens sind Beugungsscheibchen zu sehen. In Abbildung 21 auf Seite 26 ist das linke Kügelchen durch die optische Falle gehalten, das rechte durch den Unterdruck in der Mikropipette. Dort ist auch der Flüssigkeitsmeniskus zu erkennen, der durch eingeströmte Pufferlösung entsteht.

Das erste gefangene Kügelchen wird mit dem Laser unmittelbar vor die Mikropipette geführt und durch Unterdruck fixiert. Mit der nun wieder freien optischen Falle wird ein zweites Objekt eingefangen und der Zustrom an Kügelchen unterbrochen. Das Reservoir mit Pufferlösung wird geöffnet, um verbleibende Kügelchen aus der Zelle und dem Zustromsystem zu spülen.

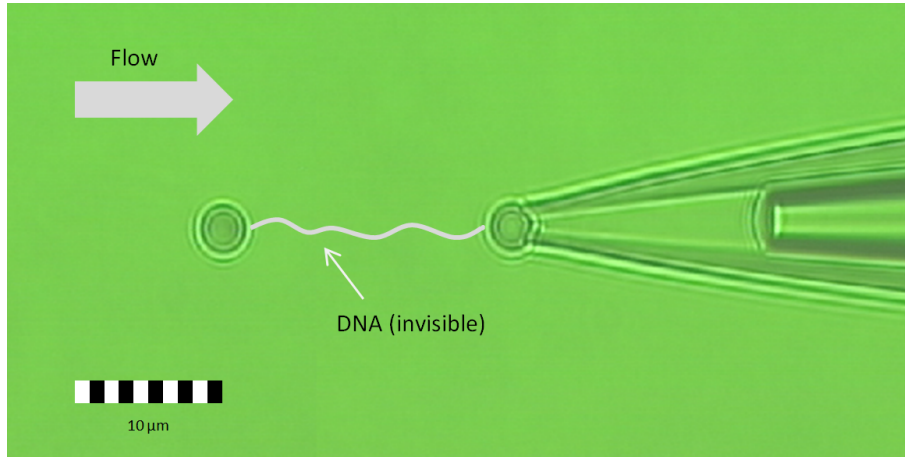


Abbildung 21: Ansicht der Probenkammer durch das Mikroskop

Zur Berechnung der Kraft, die auf ein gefangenes Objekt wirkt, wird seine Auslenkung aus der Ruhelage betrachtet. Dazu muss zu jedem Kügelchen vor der Messung einmal eine Kalibrierung durchgeführt werden, da leicht abweichende Durchmesser zu anderen Werten führen. Am besten in der Größenordnung der Kräfte, die in der folgenden Messung bestimmt werden sollen. Da sich die Probenkammer durch einen Piezotisch relativ zum Laserfokus verschieben lässt, kann eine genau eingestellte Flussgeschwindigkeit v am gefangenen Kügelchen erzeugt werden. Über die Stokessche Reibung

$$F_R = 6\pi r\eta v \quad (3)$$

kann bei bekanntem Radius r und Viskosität η die auf das Objekt wirkende Kraft bestimmt werden.

Um eine DNA zwischen den Kügelchen einzuspannen, wird nun DNA-Lösung in die Flusszelle eingeströmt. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Biotin und Streptavidin kommt es nach einiger Zeit zu einer Anbindung von DNA an die Kügelchen in der Probenkammer. Eine Anbindung an das Kügelchen in der optischen Falle führt zu einem veränderten Strömungswiderstand. In der Folge kommt es zu einem Anstieg der Kraft um wenige Piconewton und das Binden kann deshalb erfasst werden. Um Anbindungen weiterer DNA-Moleküle zu verhindern, erfolgt der Zustrom von DNA jeweils in Intervallen von 15 s, unterbrochen von längeren Durchläufen mit Pufferlösung. In einem solchen Zeitfenster von 15 s bindet meistens keine weitere DNA an. Ein Anbinden von DNA an das Kügelchen der Mikropipette ist unkritisch.

Sobald es zu einer Bindung zwischen DNA und Kügelchen kommt, richtet sich das System entsprechend der Strömung aus. Durch Annäherung der Mikropipette von rechts wird das freie Ende der DNA erreicht. Wie in Abbildung 22 systematisch zu sehen ist, muss zu diesem Zeitpunkt weiterhin eine konstante Strömung aus Pufferlösung bestehen. Auf diese Weise bleibt die DNA fadenförmig ausgestreckt und ist für das zweite Kügelchen erreichbar. Eine Annäherung auf etwa $10\ \mu\text{m}$ genügt, um eine Bindung zu erreichen. Durch vorsichtiges Variieren des Abstandes kann geprüft werden, ob es bereits zu einer

Anbindung gekommen ist. Nicht immer ist die DNA mittig hinter der optischen Falle platziert. Auch kann eine weitere, unspezifische Bindung der DNA am Kügelchen der optischen Falle vorliegen, so dass nur ein Bruchstück ihrer Konturlänge von der Strömung erfasst wird. Das kann eine Annäherung der Kügelchen auf wenige Mikrometer erforderlich machen.

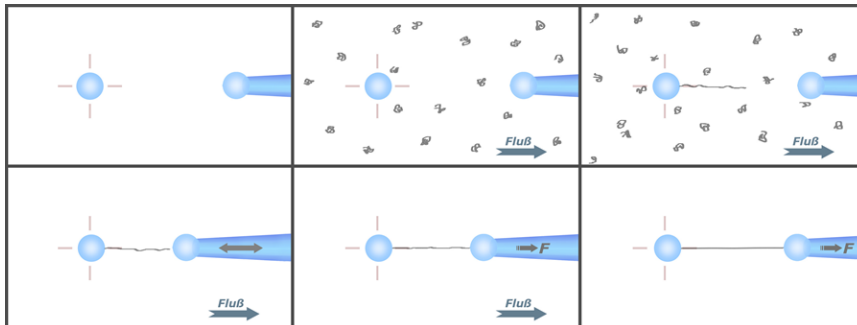


Abbildung 22: Mehrstufiges Verfahren zum Einspannen von DNA [26].

Für die Messung werden alle einströmenden Flüssigkeiten gestoppt und die Kraft per Offset auf Null gestellt. Über Parameter im Messprogramm kann definiert werden, ob die Streckung der DNA bis auf eine bestimmte Länge, oder bis zu einer bestimmten Kraft erfolgen soll. Ebenfalls lässt sich die Streckgeschwindigkeit festlegen und ob auch für die Entspannung der DNA Messdaten aufgezeichnet werden sollen.

3.4 dsDNA

3.4.1 Präparation mit Biotin

In allen Streckversuchen dieser Arbeit wird DNA des *Bakteriophagen Lambda* verwendet. Gründe dafür liegen in der guten Verfügbarkeit, aber auch in den Eigenschaften der DNA selbst. Die lineare DNA besitzt an beiden Enden 12 ungepaarte Basen, die komplementär zueinander sind und der Rezirkularisierung der Phagen-DNA nach Injektion in den Wirt dienen. An diesen einzelsträngigen Abschnitten kann man durch geeignete Präparation Basen anbinden lassen, die eine funktionelle Gruppe besitzen. So kann eine Kontaktstelle für eine makroskopische Manipulation geschaffen werden.

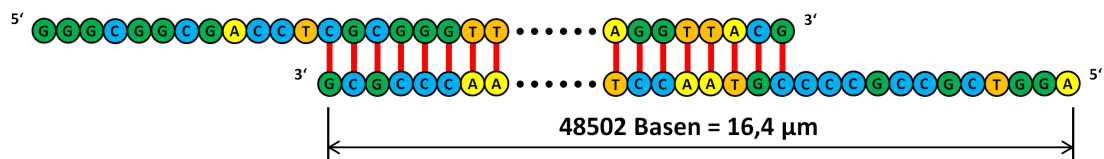


Abbildung 23: Die DNA des *Lambda-Phagen* besitzt in ihrer linearen Form an beiden Enden 12 ungepaarte Basen, die zur Präparation genutzt werden können.

Für die Präparation wird eine 16,3 nM Stammlösung mit zirkulärer Lambda-DNA verwendet. Um dieses Genom in seine lineare Form zu überführen, werden 10 µl im Thermocycler für 5 min auf 65 °C erhitzt. Um die DNA an der Rezirkularisierung zu hindern, wird die Probe direkt nach dem Heizen auf Eis gelegt. Das 16,4 µm lange Genom geht dabei unmittelbar in eine Knäuelform über und besitzt an seinen Enden sogenannte *sticky ends*, die jeweils aus 12 ungepaarten Basen bestehen.

Im nächsten Schritt werden die einzelsträngigen Abschnitte der Phagen-DNA mit entsprechenden Basen aufgefüllt. Dazu wird in einem zweiten Ansatz 180 µl steriles H_2O mit 20 µl *10x NE Buffer 2* (50 mM *NaCl*, 10 mM *Tris-HCl*, 10 mM *MgCl₂*, 1 mM *DTT* bei pH 7,9) versetzt. Es werden dann 2 µl 5 mM *Biotin-11-dCTP* und je 0,21 µl 100 mM *dATP*, *dGTP* und *dTTP* zugegeben. Außerdem werden noch 2 µl (entspricht ~500 units) *Klenow-Enzym* (ein Proteinfragment der DNA-Polymerase aus *E. coli* hinzugefügt. Dieses Enzym koppelt bei Zugabe von Phagen-DNA die Desoxyribonukleosidtriphosphate an die freien Basen der *sticky ends*.

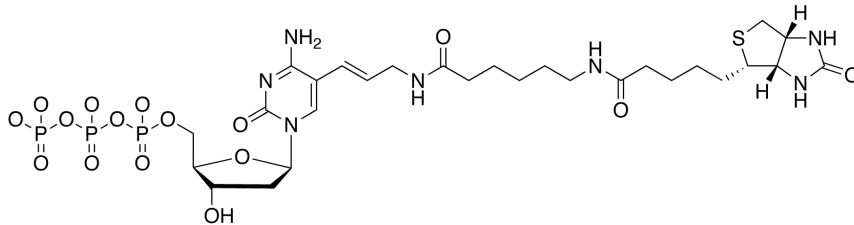


Abbildung 24: Die Struktur des *Biotin-11-dCTP* besteht aus einer Triphosphatgruppe, der Desoxyribofuranose, dem Cytosin, einem Linker und dem Biotin.

Die DNA wird nun dazu pipettiert und die Lösung für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit fängt die Polymerase an, am 3'-Ende das jeweils passende Nukleosid anzubinden. Da an jeder der aufgefüllten Cytosinbasen ein Biotinmolekül kovalent gebunden ist, verfügt die fertig präparierte DNA über zehn Biotinmoleküle. An dieser Schnittstelle kann im Experiment ein mit Streptavidin überzogenes Kügelchen anbinden.

Im Anschluss wird die Enzymaktivität mit 20 µl 0,5 M EDTA und 5 min bei 70 °C gestoppt. Um die DNA mit einem Filter abzutrennen, wird das Reaktionsgemisch mit 420 µl NaCl-Tris Puffer versetzt und über einen Zellulosefilter (*Amicon Ultra 50K*) in einer Zentrifuge bei 14 000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nur die DNA mit ihrer großen molaren Masse bleibt im Filter zurück. Nachdem der Durchfluss verworfen ist, wird die Prozedur zum Waschen vier weitere Mal wiederholt.

Im letzten Schritt wird der Filter umgedreht und die DNA durch Fliehkräfte und Pufferlösung aus dem Filter gespült. Im Durchfluss befindet sich jetzt biotinylierte Lambda-DNA, die entsprechend aliquotiert und bei -20 °C gelagert wird. Für experimentelle Zwecke hat sich eine Konzentration von 15 pM als optimal herausgestellt.

3.4.2 Präparation mit Digoxigenin

In einem ersten Ansatz wird ein dNTP-Mix aus 9,9 μl 1 mM Dig-dUTP, 3 μl 10 mM dTTP, 3 μl 10 mM dATP, 3 μl 10 mM dCTP, 3 μl 10 mM dGTP sowie 9 μl steriles H_2O hergestellt. Durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) soll eine kurze Nukleinsäuresequenz entstehen, die an ihren Uracilbasen Digoxigenin trägt.

Dazu wird ein zweiter Ansatz vorbereitet, der 3 μl 16,33 nM Lambda-DNA, 1 μl 100 μM *Primer 1* (5'-GAAAGCCAGACGTAACAGCA), 1 μl 100 μM *Primer 2* (5'-GGCACTTTTCCGCTTCAG), 15 μl *10x Standard Taq Reaction Buffer* (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂ bei pH 8,3), 1,5 μl 50 mM MgCl₂, 95 μl steriles H_2O sowie 2 μl Taq Polymerase (entspricht ~ 10 units) enthält. Die *Taq-Polymerase* stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, welches unter extremen Bedingungen in Geysieren vorkommt. Seine DNA-Polymerase ist sehr hitzebeständig und deshalb für die bei einer PCR auftretenden Temperaturen gut geeignet.

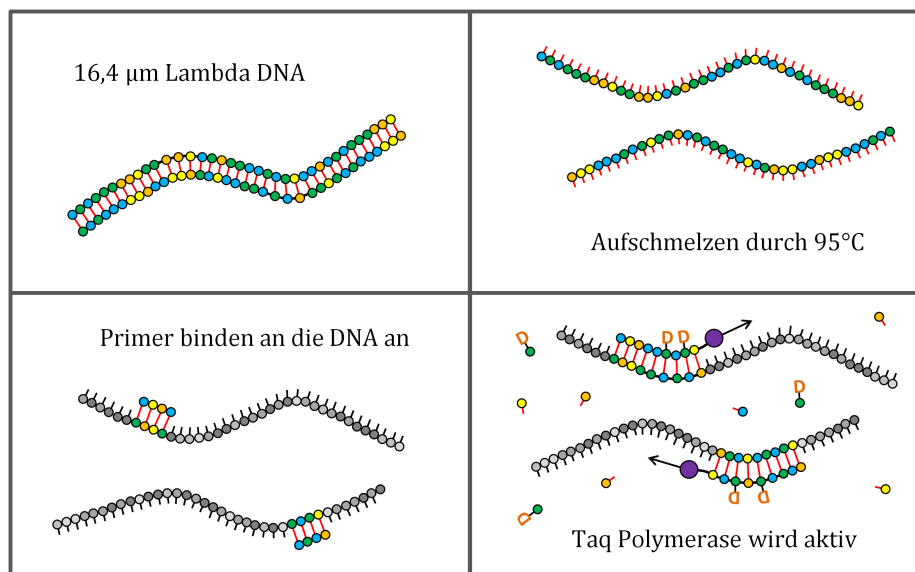


Abbildung 25: Nach dem Schmelzen der DNA binden die Primer an die Einzelstränge an. Die Polymerase startet dort und verlängert die kurzen doppelsträngigen Sequenzen. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgetreu.

Schließlich werden die Nukleoside zum Ansatz mit der Polymerase pipettiert und in einen Thermocycler gegeben. Dort kommt es für 6 min bei 95 °C zur Denaturierung der biotinylierten Lambda-DNA. Bei 54 °C für 45 s lagern sich die Primer an die einzelsträngige DNA an, um dann in 90 s bei 72 °C durch die Polymerase verlängert zu werden. Dieser Vorgang schließt mit einer erneuten Denaturierung für 45 s bei 95 °C ab, um sich im Rahmen der PCR weitere 19 mal zu wiederholen. Nach Durchlauf der Wiederholungen wird noch einmal für 10 min bei 72 °C inkubiert, um eventuell fehlende Nukleoside aufzufüllen. Das PCR-Produkt wird zum Schluss mit einem *QIAGEN PCR Purification Kit* aufgereinigt und bei 4 °C gelagert.

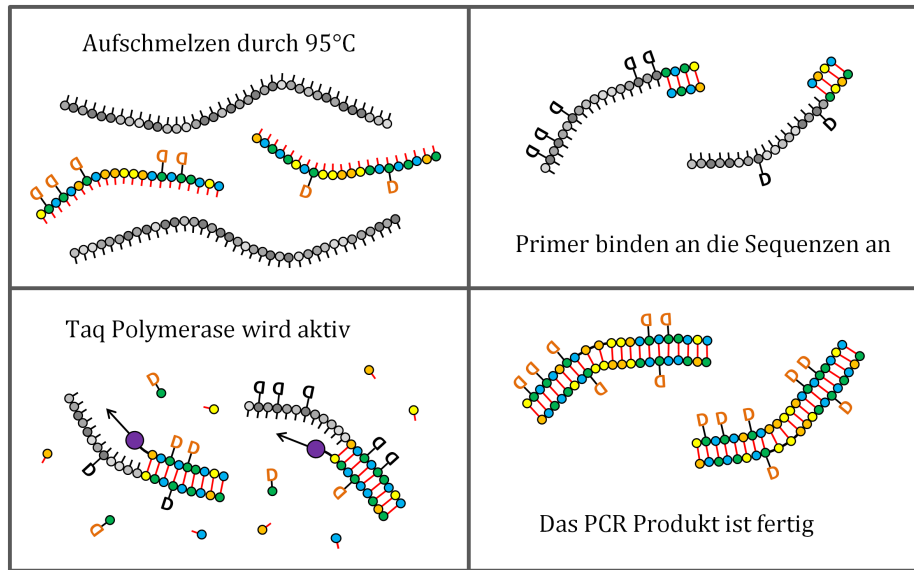


Abbildung 26: Ein erneutes Denaturieren bei 95 °C löst die neu synthetisierten Abschnitte ab. Die Primer binden jetzt auch an diese Sequenzen an und die Polymerase vervollständigt den Abschnitt zum fertigen PCR-Produkt.

Die kurzen Nukleinsäuresequenzen, die an ihren Uracilbasen Digoxigenin tragen, werden nun über kurze *sticky ends* mit nur vier Basen an komplementären *sticky ends* an der biotinylierten Lambda-DNA verknüpft. Die Schnittstellen dazu können durch das Restriktionsenzym *EagI-HF* generiert werden. Diese Schnittstelle verläuft auch durch die doppelsträngige Sequenz, die durch die PCR synthetisiert wurde. Das wird erreicht, indem die beiden Primer komplementär zu Bereichen links und rechts von der Schnittstelle sind und die Polymerase dann über die spätere Schnittstelle fährt.

Das Schneiden des aufgereinigten PCR-Produkts erfolgt durch Zugabe von 5,8 µl *10x NE Buffer 4* (50 mM CH_3COOK , 20 mM *Tris-Acetat*, 10 mM $(CH_3COO)_2Mg$, 1 mM *DTT* bei pH 7,9) und 2 µl *EagI-HF* (entspricht ~40 units) zu 50 µl aufgereinigtem PCR-Produkt. Inkubiert wird über Nacht bei 37 °C. Die Enzymaktivität wird bei 65 °C über 20 min gestoppt. Parallel dazu erfolgt das Schneiden von 72 µl biotinylierter Lambda-DNA mit 1 µl Puffer und 2 µl Enzym. Hierbei wird für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Ein Stoppen der Enzymaktivität erfolgt mit 1,5 µl 0,5 M EDTA bei 70 °C für 20 min. Aus der Lambda-DNA entstehen durch das Schneiden drei verschiedene DNA-Fragmente, da die Sequenz *GGCC* (an dieser schneidet *EagI-HF*) im Genom doppelt vorkommt. Die Segmentlängen betragen 4,0 µm, 6,8 µm und 5,6 µm. Für das Endprodukt sind die beiden ersten Teilstücke relevant, da nur sie mit Biotin gelabelt sind.

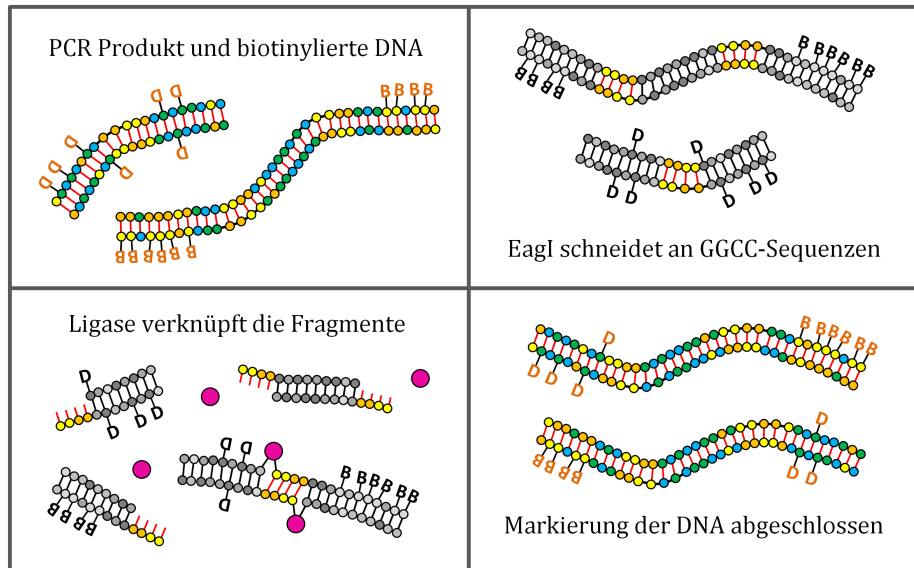


Abbildung 27: In diesem Schritt werden PCR-Produkt und biotinylierte Lambda-DNA zusammengegeben. Jetzt schneidet *EagI-HF* an den farbig markierten *GGCC*-Stellen. Im nächsten Schritt verbinden sich die Teilstücke zu neuen Molekülen, wobei Ligase das Rückgrat verknüpft. Dabei können beliebige Kombinationen entstehen, von denen der Übersicht halber nur zwei Möglichkeiten im vierten Bild gezeigt sind.

Nachdem sowohl die Lambda-DNA als auch das PCR Produkt mit *EagI-HF* geschnitten sind, werden im letzten Schritt der Präparation 2 μ l PCR-Produkt mit 10 μ l Lambda-DNA versetzt. Weiterhin erfolgt die Zugabe von 12 μ l *2x Quick Ligation Reaction Buffer* (66 mM *Tris-HCl*, 10 mM *MgCl₂*, 7,5 % Polyethylenglycol, 1 mM *ATP*, 1 mM *DTT* bei pH 7,6) und 3 μ l *Quick T₄ DNA-Ligase*. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wird die Reaktion mit 4 μ l 0,5 M EDTA und 10 min bei 65 °C gestoppt.

3.5 ssDNA

Um Streckversuche auch mit einzelsträngigen Nukleinsäuren durchzuführen, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Methoden zur Synthese aus doppelsträngiger Lambda-DNA erprobt. Den einfachsten Zugang stellt dabei ein temperaturinduziertes Aufschmelzen einer doppelsträngigen Nukleinsäure dar. Dieses Verfahren stellt den Ausgangspunkt für alle hier vorgestellten Arbeitsweisen dar.

Die beiden Einzelstränge einer DNA können durch Erhitzen voneinander getrennt werden. Dieses Schmelzen findet ab einer bestimmten Temperatur statt und führt zu einem plötzlichen Zusammenbruch der doppelhelikalen Struktur. Die notwendige Temperatur ist über die Stabilität der DNA verknüpft und proportional zu ihrem Cytosin-Guanin-Gehalt, da diese Basenpaarbildung mit ihren drei Wasserstoffbrückenbindung eine höhere Stabilität besitzt. Typischerweise liegt der Schmelzpunkt für natürlich vorkommende

DNA bei mindestens 85 °C und kann mit Hilfe von UV-Spektroskopie bestimmt werden.

Nach dem Aufschmelzen einer doppelsträngigen Nukleinsäure muss verhindert werden, dass die komplementären Einzelstränge wieder in ihre helikale Struktur zurückfinden. Die erste Methode, die hier vorgestellt werden soll, ist eine Trennung in einer Zentrifuge. Dazu kommt die im Kapitel 3.4.2 speziell aufgearbeitete Lambda-DNA mit unterschiedlicher Funktionalisierung an ihren Enden zum Einsatz.

3.5.1 Abtrennung über eine Zentrifuge

Nach einer temperaturinduzierten Denaturierung besteht die Möglichkeit, dass sich komplementäre Teilstücke zweier Einzelstränge wieder verknüpfen. Mit einer Zentrifuge kann eine Auftrennung nach unterschiedlichen Massen erfolgen. Eine nach Kapitel 3.4.2 präparierte DNA ist dazu geeignet. Gibt man mit Streptavidin beschichtete Kügelchen zu dieser DNA-Lösung, wird am biotinylierten Ende jedes DNA-Moleküls ein Kügelchen anbinden. Aufgrund der Methode zum Labeling der DNA ist nur einer der beiden DNA-Stränge mit Biotin markiert. Der andere Strang besteht aus jenen 12 Basen, die das *sticky end* der *Lambda-Phage* darstellt. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, besitzen am anderen Ende der DNA hingegen beide Einzelstränge eine Markierung mit Digoxigenin. Beim Aufschmelzen entstehen jetzt zwei verschiedene Sorten von Einzelsträngen. Die einen sind über ihre Biotinmoleküle mit einem Streptavidinkügelchen verbunden und tragen am anderen Ende zusätzlich Digoxigenin, die zweite Gruppe von Einzelsträngen verfügt zwar ebenfalls über eine Digoxigeninschnittstelle, besitzen jedoch kein Biotin am anderen Ende. In einer Zentrifuge können diese zwei Sorten über ihre Gewichtsunterschiede abgetrennt werden. Bei der Durchführung hat sich gezeigt, dass sich die zuvor vollständig gelösten Kügelchen am Boden des Reaktionsgefäßes zu einer trüben Phase abgesetzt haben. Im Überstand ist die Konzentration an einzelsträngiger DNA ohne Biotin sehr groß und lässt sich leicht abnehmen.

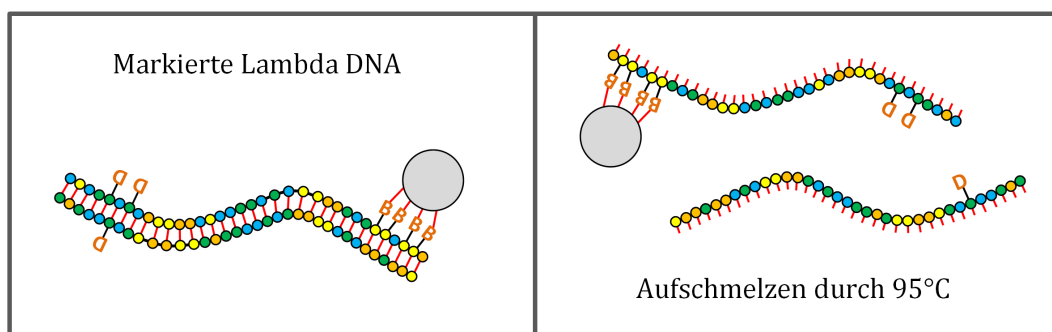


Abbildung 28: Zur Trennung in der Zentrifuge

Allerdings ist es wichtig, dass die Trennung bei entsprechend hoher Temperatur stattfindet. Die Konzentration von einzelsträngiger Nukleinsäure gegenüber bereits wieder verknüpfter muss für eine gute Ausbeute möglichst groß sein. Sofern keine heizbare Zentrifuge ($>90^\circ\text{C}$) zur Verfügung steht, muss auf andere Weise sichergestellt werden, dass wenigstens die ersten Sekunden beim Zentrifugieren eine Temperatur über der Denaturierung vorliegt. Bei einer Zentrifuge mit einem Drehteller aus Metall kann dieser dazu ausgebaut und in einem Ofen aufgeheizt werden. In der Präparation dieser Arbeit wurde der etwa 1 kg schwere Teller auf 150°C aufgewärmt. Auch die DNA-Lösung wurde zuvor in einem Wasserbad aufgeheizt und mit Streptavidinkügelchen versetzt. Anschließend wird die DNA in der heißen Zentrifuge für 5 min bei 10 000 rpm getrennt.

3.5.2 Präparation mit Eisbad

Um dem Problem des Rückfalls in die helikale Konformation von dsDNA zu begegnen, kann auch auf die Eigenschaft von Nukleinsäuren zurück gegriffen werden, dass sie sich bei niedrigen Temperaturen zu einem sogenannten *kausalen Knäuel* zusammenziehen. In dieser Form ist die Rekombination zu einer doppelsträngigen DNA ohne Enzyme praktisch auszuschließen. Dazu wird ebenfalls eine nach Kapitel 3.4.2 präparierte DNA mit Streptavidinkügelchen versetzt und in einem Wasserbad für 3 min auf 90°C aufgeheizt. Anschließend erfolgt sofort eine Lagerung auf Eis. Auch dieses Gemisch aus zwei verschiedenen ssDNA-Strängen kann jetzt in einer Zentrifuge getrennt werden.

3.5.3 Unterschiedliche Salzkonzentrationen

Die hohen Temperaturen von über 90°C sind notwendig, um die dsDNA durch Denaturierung in zwei Einzelstränge zu überführen. Für die sich anschließenden Experimente ist jedoch eine intakte Markierung der DNA mit Biotin und Digoxigenin unerlässlich. Dabei muss immer eine Abwägung getroffen werden, inwieweit eine Temperatur für das Denaturieren der DNA erforderlich ist und ob bereits eine Schädigung der Moleküle Biotin und Digoxigenin stattfindet. Ein erfolgreiches Immobilisieren der DNA im Experiment ist abhängig von der biologischen Unversehrtheit der Marker. Aus dieser Motivation heraus kann auch eine Variation der Salzkonzentration erfolgen, um die Denaturierung zu unterstützen. Prinzipiell lassen vor allem zweiwertige Ionen wie Magnesium die Stabilität einer doppelsträngigen DNA steigen, da sie die negativen Ladungen am Phosphatrückgrad abschirmen. Ein destabilisierender Effekt hingegen stellt sich prinzipiell bei einer Absenkung der Salzkonzentration ein, wobei ein zu geringer Wert wiederum zu Fehlstellen im Rückgrat führen kann. Auch eine Steuerung über den pH-Wert ist möglich. So können durch alkalische Zusätze der DNA Protonen entzogen werden, die für die Wasserstoffbrückenbindungen an den Basen nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Stapelwechselwirkung werden dadurch geschwächt und die Abstoßung der negativen Ladungen im Phosphatrückgrat führt zu einer Destabilisierung des DNA-Moleküls.

3.6 UV/VIS-Spektroskopie

In einem UV/Vis-Spektrometer lässt sich das Absorptionsverhalten einer Messlösung im Verhältnis zu einer Vergleichslösung bestimmen. Dabei kann das vollständige Emissionsspektrum der Lichtquelle oder ein bestimmter Ausschnitt davon vermessen werden. Das Kürzel UV/VIS steht dabei für „Ultraviolett/Visible“.

Als Beleuchtung wird häufig eine Gasentladungslampe verwendet, die eine kontinuierliche Strahlung im UV-Spektrum liefert. Dazu können weitere Leuchtquellen wie Halogenlampen eingesetzt werden, die den zu vermessenen Bereich ergänzen. Über einen Monochromator wird zuerst aus dem Spektrum eine bestimmte Wellenlänge ausgewählt. Grob vorselektiert geschieht das über einen geeigneten Farbfilter, dem dann ein dispergierendes Element, wie ein Prisma, nachgeschaltet ist, der das Licht abhängig von seiner Wellenlänge auffächert. Eine andere Möglichkeit stellt ein Kristall dar, der wie ein optisches Gitter fungiert, an dem das Licht winkelabhängig gebeugt wird.

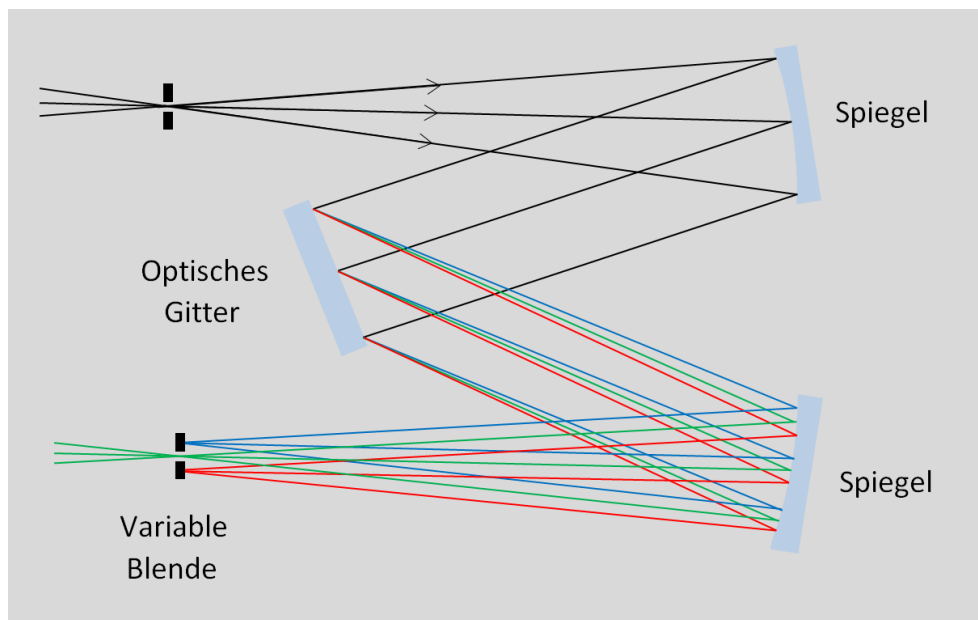


Abbildung 29: Aufbau und Funktionsweise eines Czerny-Turner-Monochromators

Das Licht fällt nun abwechselnd durch die Probe und die Referenzlösung. Nachdem ein Detektor die Absorption aus der Intensität des transmittierten Lichtes bestimmt hat, wird die nächste Frequenz ausgewählt. Schrittweiten der Wellenlänge in Bruchteilen eines Nanometers sind typisch. Die Proben befinden sich in Küvetten zu je 20 μl .

Die Absorption von Licht geschieht über die Anregung von Elektronen. Photonen bestimmter Energie können Quantenübergänge im Molekül auslösen, die genau die Energiedifferenz besitzen, die das Photon aufweist. Die Relaxation kann strahlungslos erfolgen oder durch Phänomene wie Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Anwendung findet die UV/VIS-Spektroskopie deshalb unter anderem bei der Bestimmung von Konzentrationen. Dazu ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Absorption einer Lösung proportional zur Konzentration des absorbierenden Stoffes und der Weglänge in der Lösung.

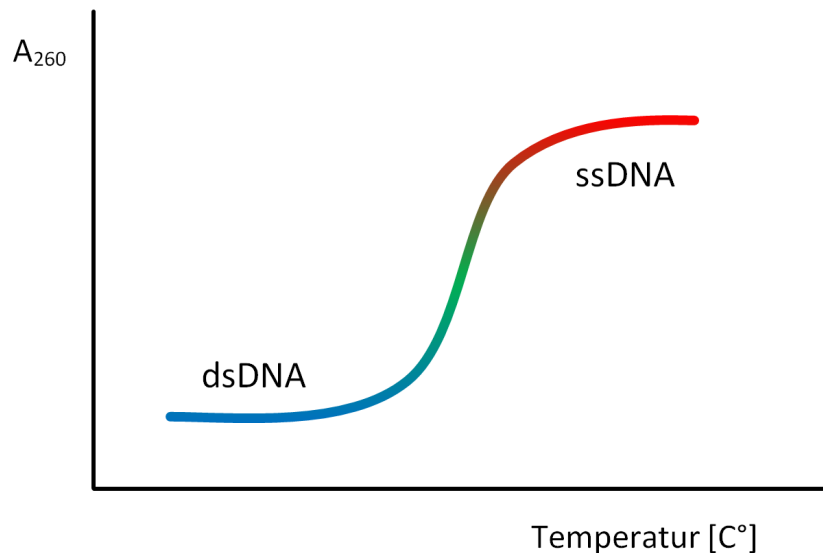


Abbildung 30: Das Schmelzen der DNA ist von der Temperatur abhängig. Die Absorption von UV-Licht ist ein Indikator, wie weit der Prozess fortgeschritten ist. Wenn Absorption und Temperatur dann gegeneinander aufgetragen werden, wird der Kurvenverlauf als „Hyperchromer Shift“ bezeichnet.

Ein anderer Einsatzbereich entsteht aus dem Zusammenhang zwischen charakteristischen Absorptionspeaks und entsprechenden molekularen Bindungen. So kann mit Hilfe der Woodward-Fieser-Regeln durch eine effektive Analyse der UV-Spektren von Alkenen die Struktur vieler organisch-chemischer Verbindungen aufgeklärt werden. Auf der anderen Seite kann mit dieser Methode auch auf eine Veränderung der molekularen Struktur geschlossen werden. Am Beispiel von dsDNA kann so das temperaturinduzierte Aufschmelzen beobachtet werden. Dabei wird die helikale Struktur aufgelöst und es bilden sich zwei Einzelstränge. In einer 0,2 molaren Lösung befindet sich der Mittelpunkt dieser Umwandlung zwischen 80° und 90° , abhängig von der Menge an Guanin-Cytosin Paarungen in der DNA-Sequenz [27]. Diese Abhängigkeit besteht, da Guanin und Cytosin über 3 statt 2 Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft sind und deshalb über eine stärkere Bindung verfügen. Mit der Konformationsänderung steigt die Absorption um 40 % und kann über das Absorptionsverhalten bei 260 nm gut beobachtet werden [28].

UV-Absorption von DNA bei verschiedenen Temperaturen

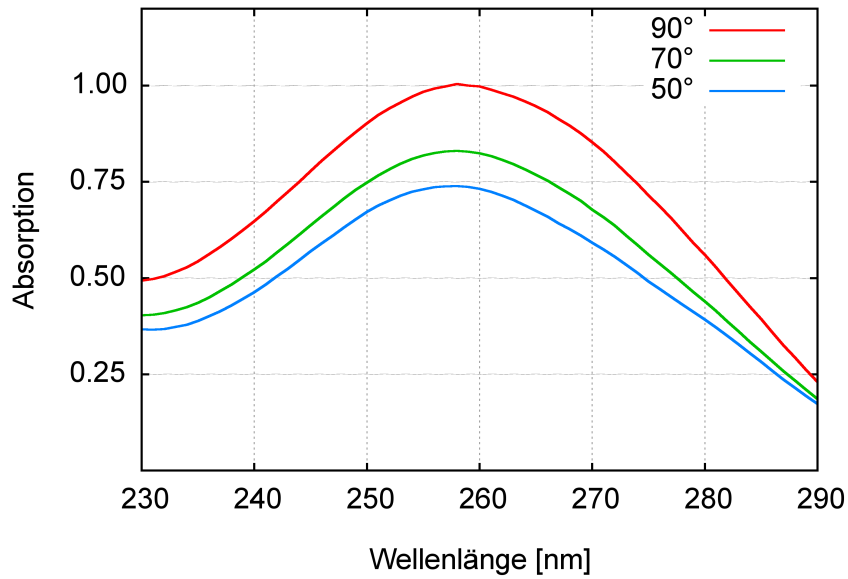


Abbildung 31: Absorptionsverhalten von DNA bei bestimmten Temperaturen

Die Ursache für dieses Verhalten, das „Hyperchromer Shift“ genannt wird, liegt in der Beeinflussung von Nukleinbasen durch Wasserstoffbrücken. Die Resonanz der aromatischen Struktur von Purinen und Pyrimidinen auf UV-Strahlung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basen gehemmt.

4 Messungen und Auswertung

4.1 Kraftspektroskopie an dsDNA

4.1.1 Native Streckkurven

In kraftsensitiven Streckversuchen können Details über die Struktur einer Nukleinsäure in Erfahrung gebracht werden. Die konformationellen Veränderungen, die durch eine Krafteinwirkung stattfinden, können durch die Vermessung der Kraftantwort auf eine äußere Zugbelastung erfasst werden. Aber auch die Beeinflussung durch Liganden kann in einem veränderten Kurvenprofil sichtbar gemacht werden.

In diesem ersten Teil der Auswertung sollen Kraftkurven von nackter (ohne Liganden) Lambda-DNA mit einer Konturlänge von $16,4\ \mu\text{m}$ präsentiert werden.

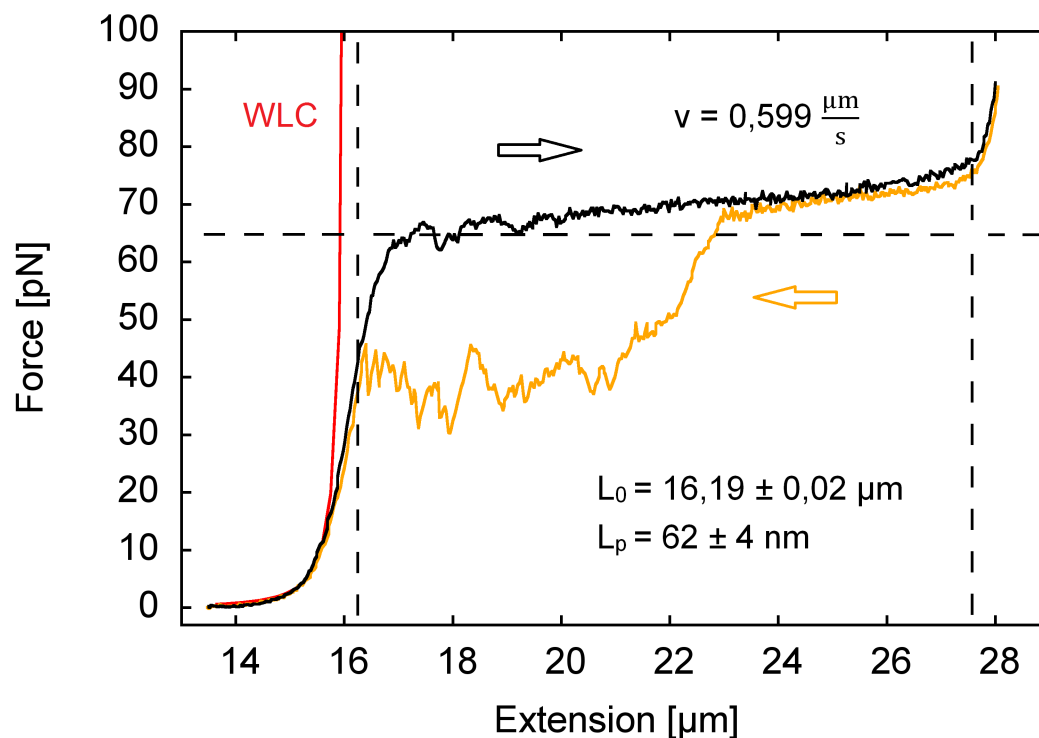


Abbildung 32: Das Plateau verläuft kurz oberhalb von 65 pN, um ab etwa 27,5 μm erneut anzusteigen. In orange ist der Rückweg gezeichnet. Mit dem *Wormlike-Chain-Modell* sind Konturlänge und Persistenzlänge in Gnuplot bestimmt worden. Die Pfeile stellen die Bewegungsrichtung der gleichfarbigen Messkurven dar.

Die Streckversuche wurden in Puffer mit 150 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl bei pH 8,0 ausgetragen. Der Messmodus sieht vor, dass die DNA zunächst mit konstanter Geschwindigkeit gestreckt wird, bis eine definierte Kraft erreicht wird. Von hier an wird die DNA mit der gleichen Geschwindigkeit relaxiert. Dasselbe DNA-Molekül kann auf diese Weise mehrfach hintereinander gestreckt werden. Es können auch Streckweg oder Geschwindigkeit verändert werden. Es vorkommen, dass eine Messung durch den Abriss der DNA vom Kügelchen vorzeitig beendet wird.

In Abbildung 33 ist eine typische Kraftkurve einer 16,4 μm langen dsDNA zu sehen. Das Plateau verläuft über weite Teile kurz oberhalb von 65 pN. Um dieses Verhalten besser erkennen zu können, sind in allen folgenden Grafiken Linien bei dieser Marke eingezeichnet. Ebenso sind sowohl eine Kennzeichnung der Konturlänge als auch die typische Ausstreckung auf das 1,7-fache eingetragen. Zusätzlich ist jeweils die Geschwindigkeit vermerkt, mit der die DNA gestreckt worden ist.

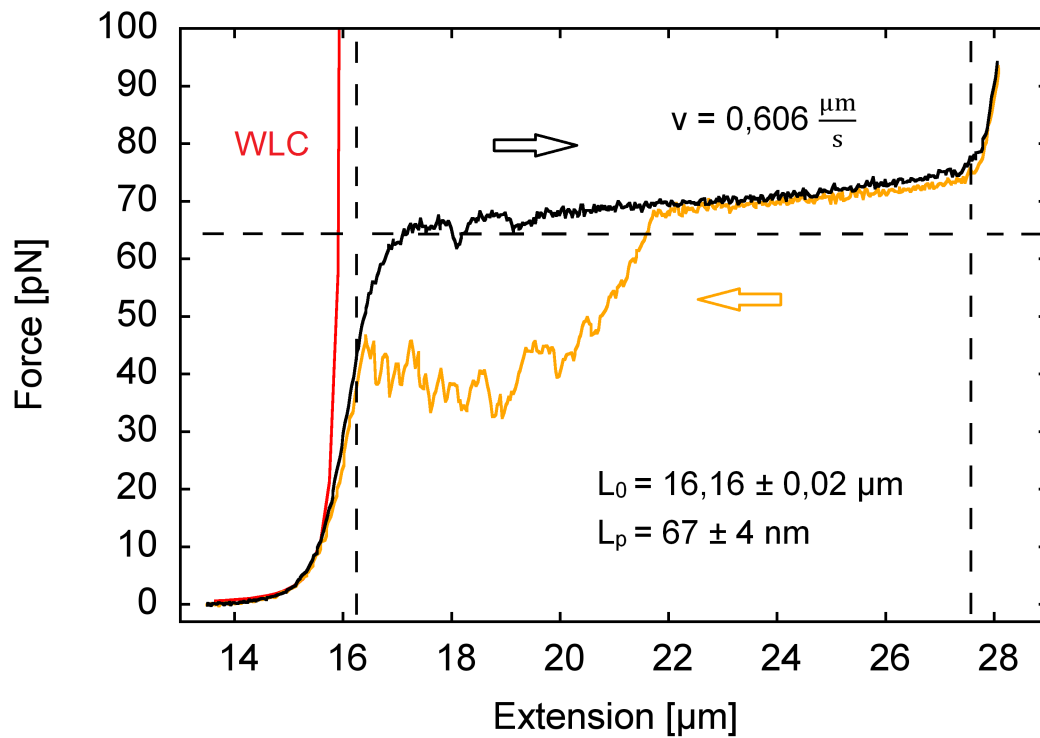


Abbildung 33: Es ist eine Streckkurve zu sehen, bei der ebenfalls der zweite Anstieg im Anschluss an das Plateau zu erkennen ist. Die Hysterese hat einen typischen Verlauf, bei dem der Rückweg etwa ab der Hälfte des Plateau zu kleineren Kräften abzweigt.

Es kann vorkommen, dass die vermessene Konturlänge vom theoretischen Wert abweicht. Dabei muss berücksichtigt werden, dass im Experiment die eingespannte DNA in den wenigsten Fällen optimal angeordnet ist. Die Immobilisierung auf dem rechten Kügelchen, dass durch die Mikropipette festgehalten und geführt wird, kann relativ präzise vom Experimentator durchgeführt werden. Die DNA wird dort also näherungsweise am äußersten, dem Laserfokus zugewandten, Punkt angebracht sein. Auf der anderen Seite jedoch, am Kügelchen im Laserfokus, ist man darauf angewiesen, dass sich die DNA durch die Strömung optimal im Nachlauf, und damit der Mikropipette zugewandt, befindet. Dass dies nicht immer optimal geschieht, kann man an Messkurven sehen, bei denen sich das gefangene Kügelchen während der Messung plötzlich dreht. Ist das Kügelchen nicht ganz homogen, kann das auch durch das Mikroskop beobachtet werden.

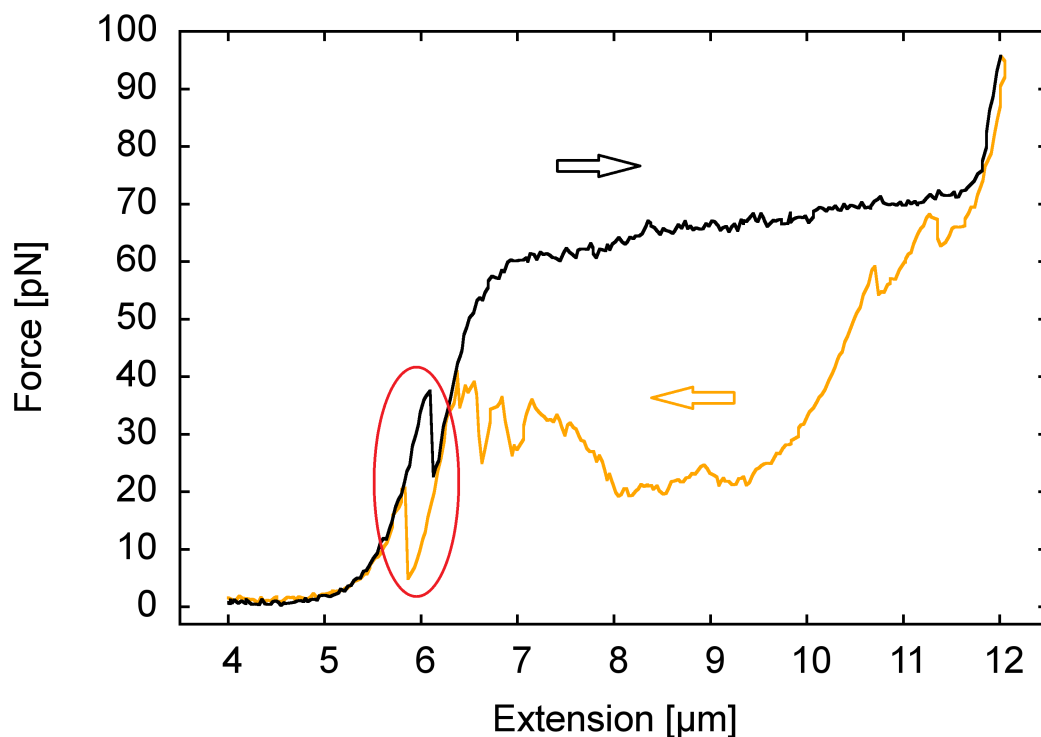


Abbildung 34: Die rote Markierung zeigt eine Stelle, bei der sich die Kugel im Laserfokus gedreht hat. Dabei wird eine Länge von etwa $0,3\ \mu\text{m}$ frei. Dieser Vorgang konnte im Mikroskop genau beobachtet werden, da dem Kügelchen Dreck anhaftete und somit ein Bezugspunkt während der Rotation bestand. Diese Verunreinigung ist auch der Grund für die Umkehrbarkeit der Drehung auf dem Rückweg, da sie ebenfalls von der Optischen Pinzette gefangen wird.

In jenen Streckversuchen, die eine zu geringe Konturlänge als Ergebnis ermitteln, ist die DNA also in irgendeiner Weise nicht optimal zwischen den Kügelchen platziert. Dabei kann die DNA auch über unspezifische Bindungen zusätzlich am Kügelchen anheften, so dass diese Abschnitte nicht von der Messung erfasst werden.



Abbildung 35: Die DNA ist teilweise um das Kügelchen gewickelt. Das Messergebnis zeigt ein Streckprofil, welches auf eine verkürzte Konturlänge deutet. An der Pipette kann auch eine Sogwirkung auftreten, da ein Unterdruck zur Fixierung des Kügelchens nötig ist. Das kann dazu führen, dass die DNA selbst bei sorgfältigster Präparation auch um das rechte Kügelchen gewickelt ist.

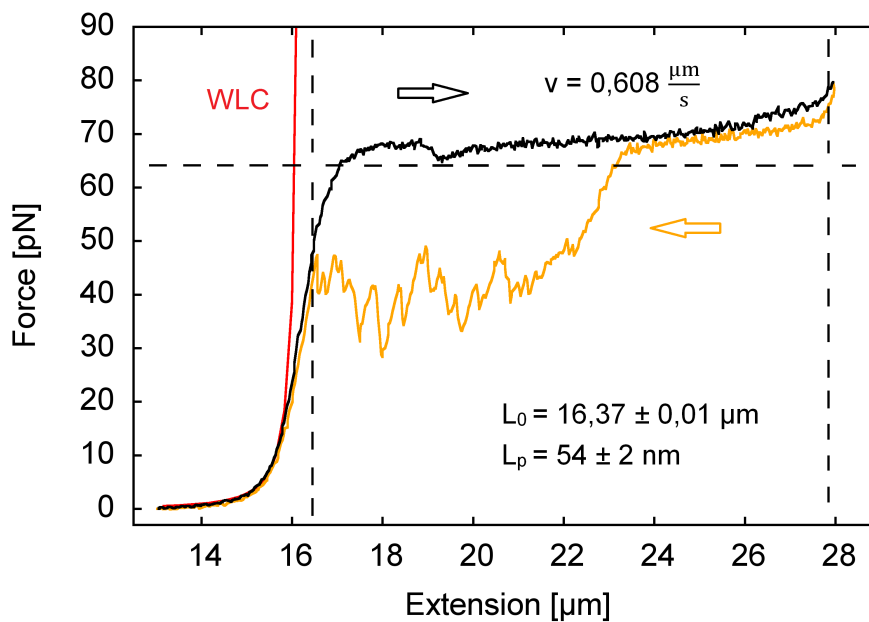


Abbildung 36: Der Fit in Gnuplot hat eine Persistenzlänge ermittelt, die dem Literaturwert von 50 nm besonders nah kommt. Die Hysterese setzt in dieser Messung relativ früh ein und schlägt im weiteren Verlauf den häufig beobachteten parallelen Weg ein.

Die Hysterese wird (siehe Kapitel 2.6) durch das Abwickeln eines der beiden DNA Stränge vom jeweils anderen während des Streckens verursacht. Beim Zurückfahren findet die Rekombination der komplementären Basen statt und nimmt Zeit in Anspruch. Sie verläuft bei kleineren Kräften, da die Verkürzung der DNA zunächst langsamer geschieht, als die Geschwindigkeit, mit der das Relaxieren abläuft. Auf eine ersten Phase, in der die Hysterese stark abfällt, folgen unterschiedliche zweite Phasen. In Abbildung 33 verläuft der zweite Abschnitt sogar mit einer leichten Steigung. Die Geschwindigkeit der Rekombination nimmt hier offensichtlich wieder zu. In den Abbildungen 32 und 36 nimmt sie jedoch den typischen Verlauf eines parallelen Rückweges.

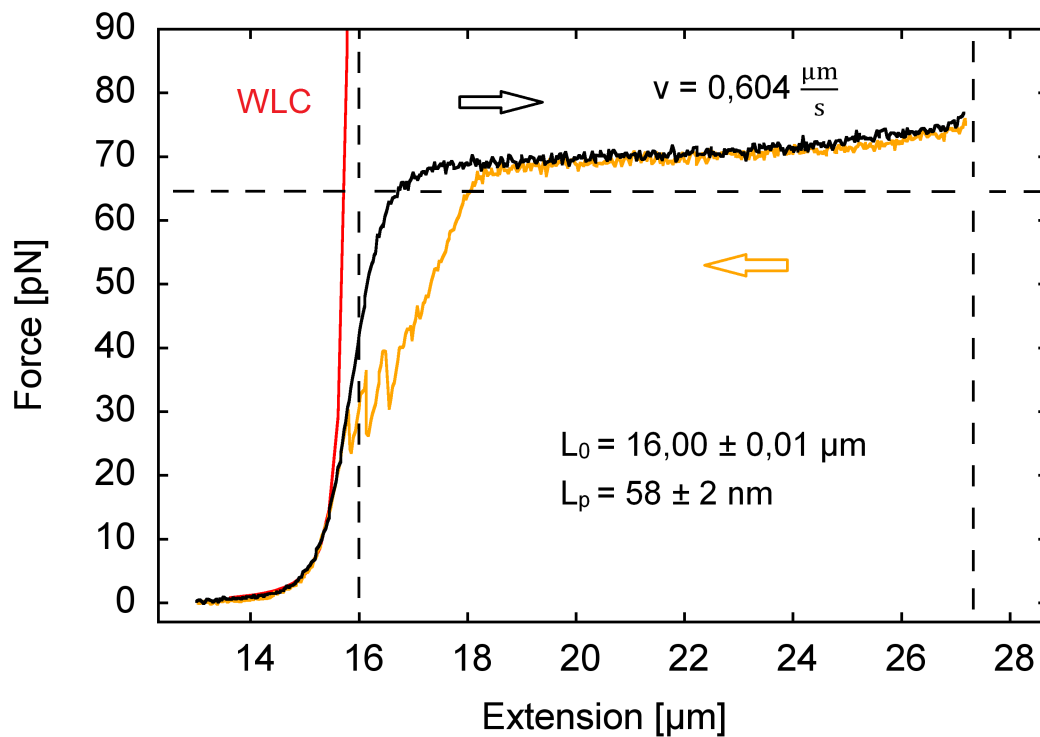


Abbildung 37: Die schwach ausgebildete Hysterese setzt eher spät ein, der Längenzuwachs der DNA geschieht größtenteils durch *melting bubbles* (schnelle Rekombination) und Entwindung der helikalen Struktur.

Aber auch eine durchgehend abfallende Hysterese kann beobachtet werden und stellt sogar den am meisten zu erwartenden Fall dar. Der Verlauf der Hysterese in den Abbildungen 37 und 38 ist fast durchgehend nach unten gerichtet. Dieser Abwärtstrend wird der Tatsache gerecht, dass die Geschwindigkeit der Basen-Rekombination langsamer ist, als die Geschwindigkeit, mit der die DNA relaxiert wird. Dadurch entsteht immer weniger mechanische Spannung im DNA-Molekül und die Kraft sinkt kontinuierlich.

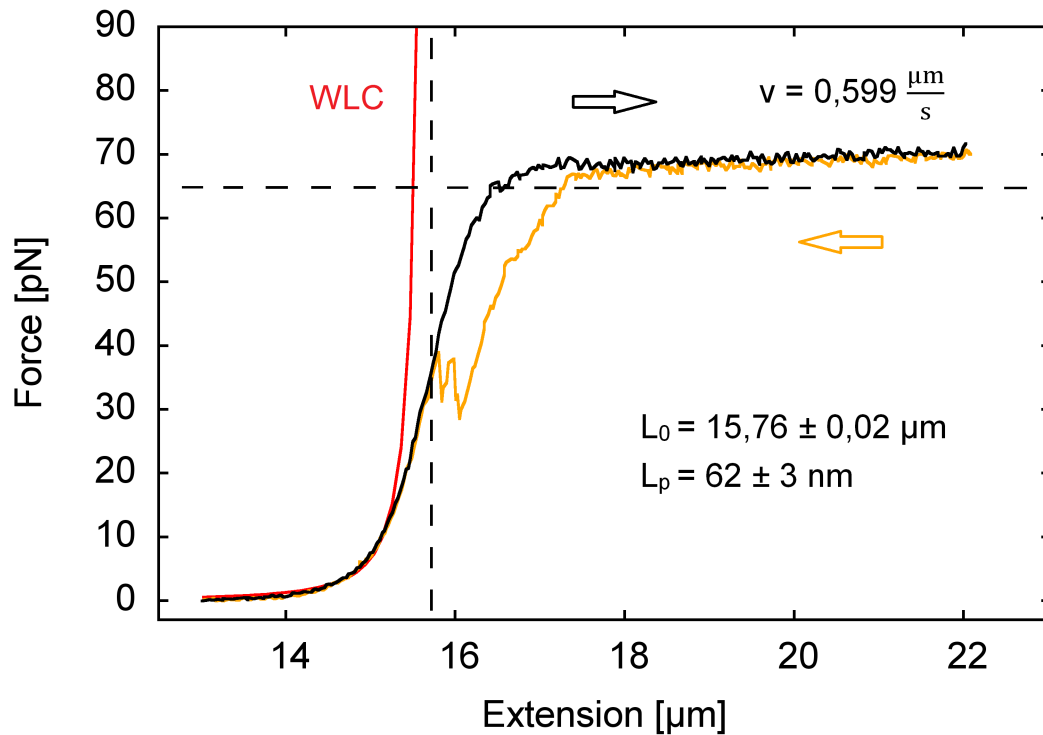


Abbildung 38: Auch hier tritt nur wenig Hysterese auf. Besonderes Merkmal, wie schon in Abbildung 37, ist hier die fast bis zum Ende steil nach unten verlaufende Hysterese.

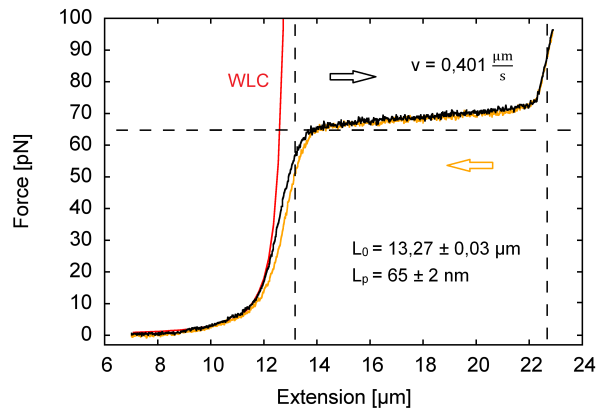


Abbildung 39: Im Bereich des Plateaus ist keine Hysterese zu sehen. Der Längenzuwachs erfolgt ohne *unpeeling* von DNA oder die Rekombination der Basen erfolgt schneller als die Rückführung im Experiment. Wenn keine Strangbrüche im Rückgrat der DNA vorliegen, kann das *unpeeling* nur noch am Kügelchen beginnen, wo nicht beide Stränge über eine Bindung befestigt sind.

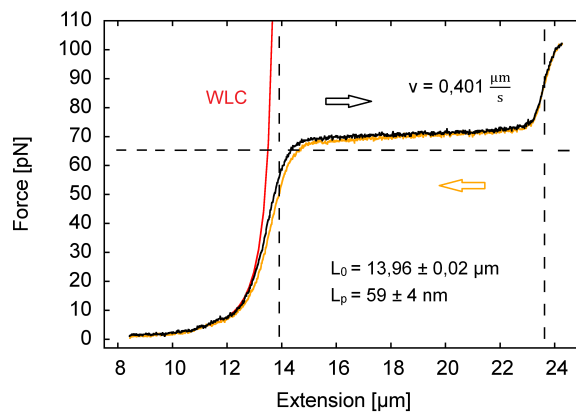


Abbildung 40: Wie in Abbildung 39 verläuft die Rückrichtung nur mit einer minimalen Hysterese. Auch hohe Salzkonzentrationen, vor allem solche mit Magnesiumchlorid, können zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

In vielen Messkurven ist ein weiterer Anstieg der Kraft im Anschluss an das Plateau um 65 pN zu beobachten. An diesem Punkt ist die DNA durch ein Zusammenspiel aus *strand unpeeling* und *melting bubbles* in großen Teilen bereits zu einer einzelsträngigen DNA aufgeschmolzen. Wird das Molekül jetzt noch weiter überstreckt, kommt es zu einer Veränderung der Bindungswinkel zwischen benachbarten Atomen im Rückgrat der DNA. Diese Konformationsänderung geht mit einem sehr starken Anstieg der benötigten Kraft einher. Auch diese Strukturumwandlung ist reversibel.

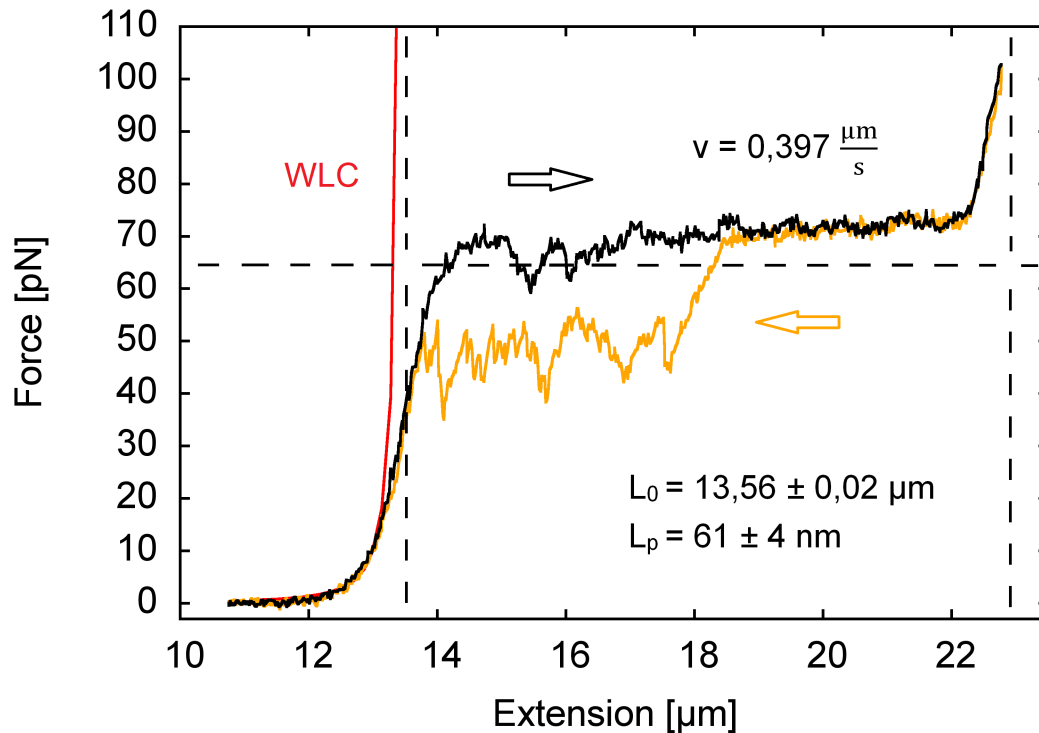


Abbildung 41: Der zweite Anstieg setzt ab etwa 22 μm ein. Dazu sind Kräfte über 80 pN nötig. In diesem Bereich der Kraftkurve werden chemisches Bindungswinkel im Rückgrat der DNA belastet.

Messungen im Bereich dieser relativ großen Kräfte sind häufig von Abrissen der DNA begleitet. Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin gerät bei diesen hohen Belastungen an ihre Grenzen. Auch sind nicht immer sind alle Biotinmoleküle eine Bindung mit einem Streptavidinmolekül auf der Oberfläche des beschichteten Kügelchens eingegangen.

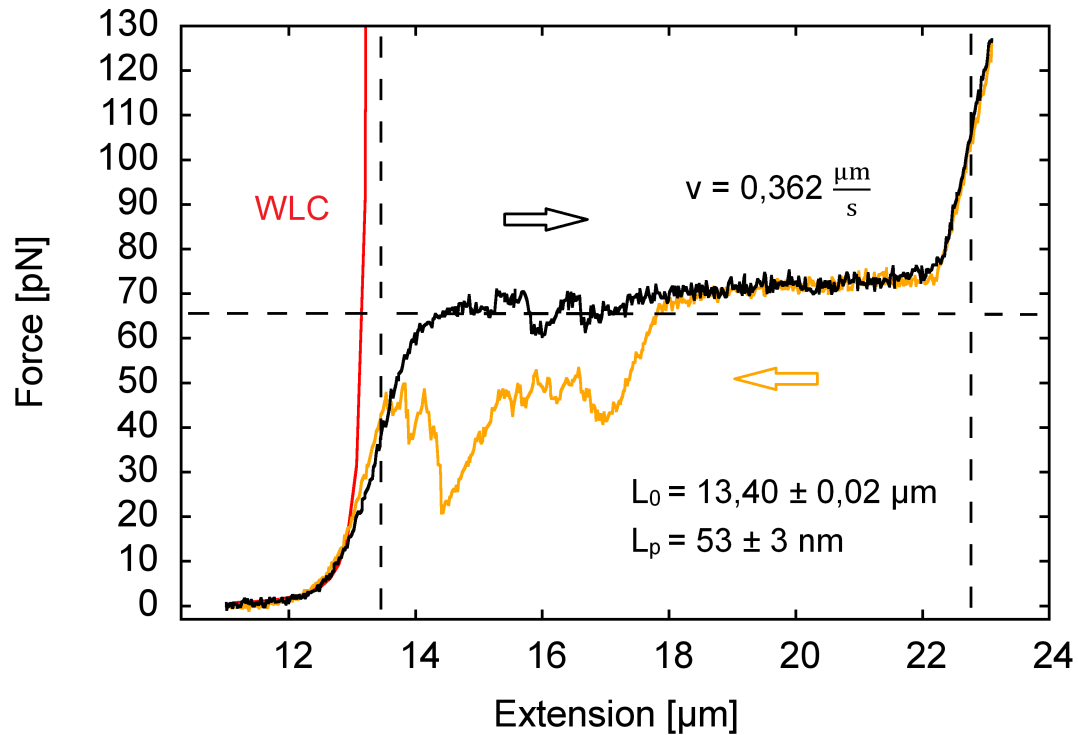


Abbildung 42: Die DNA wird noch ein wenig stärker belastet. Es werden Kräfte von fast 130 pN erreicht. An dieser Stelle ist die Bindung der DNA an das Kügelchen über den Biotin-Streptavidin-Komplex ein Schwachpunkt, der leicht abreißen kann.

Bei der Anbindung von DNA durch Einspülen einer entsprechend konzentrierten Lösung kann es auch zu mehrfachen Events kommen. Durch geschickte Präparation kann anschließend zwar versucht werden, lediglich das am weitesten hervorstehende Molekül an das zweite Kügelchen anzubinden, aber eine Verankerung mehrerer DNA-Moleküle ist nicht auszuschließen. Bei der folgenden Messung kann dann an dem Kraftaufwand festgestellt werden, dass sich mehr als ein DNA-Molekül zwischen den Kügelchen befindet.

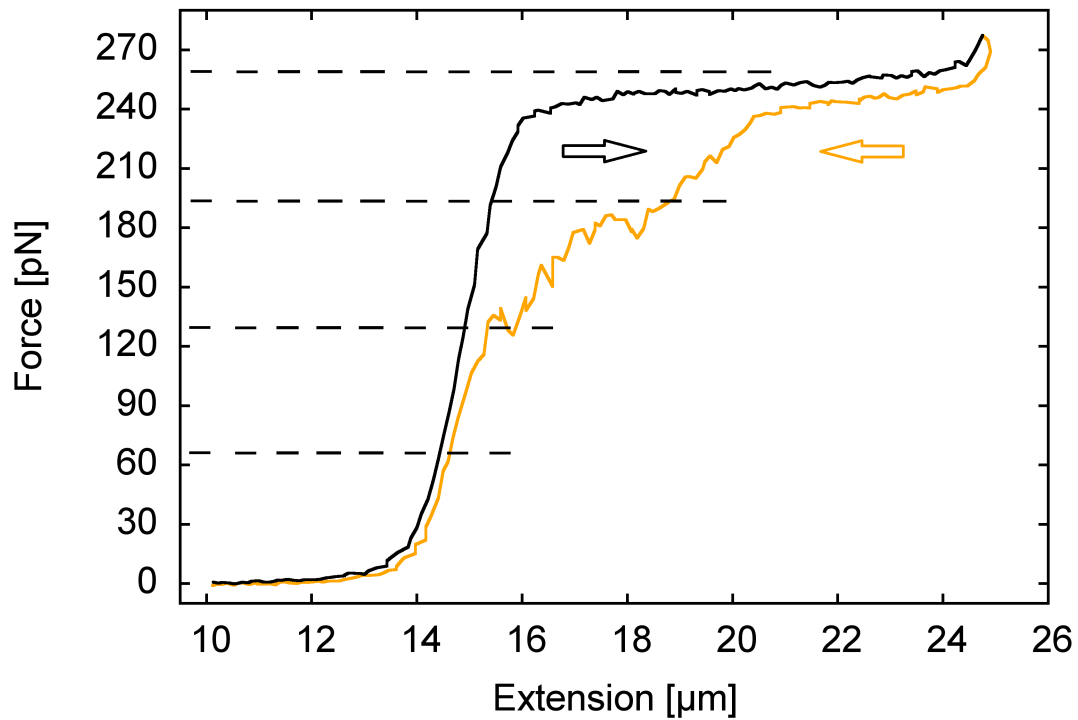


Abbildung 43: An den gestrichelten Linien müssten die Kraftplateaus einzelner DNA-Moleküle auftauchen. Jede weitere Linie steht für Vielfache dieser Kraft. Es wird sich also um drei oder vier Moleküle handeln, die gleichzeitig gestreckt werden.

4.1.2 Streckkurven mit Histonen

Nach einer Reihe von Messergebnissen aus Streckversuchen mit nackter Lambda-DNA, soll nun der Einfluss durch Liganden am Beispiel von Histonen gezeigt werden. Da die Anbindung dieser Proteine an DNA im Zellkern reversibel verlaufen muss, ist in Streckversuchen ein kraftinduziertes Ablösen zu erwarten. Durch diese Messungen soll die Menge an DNA bestimmt werden, die ein einzelnes Histon freigibt.

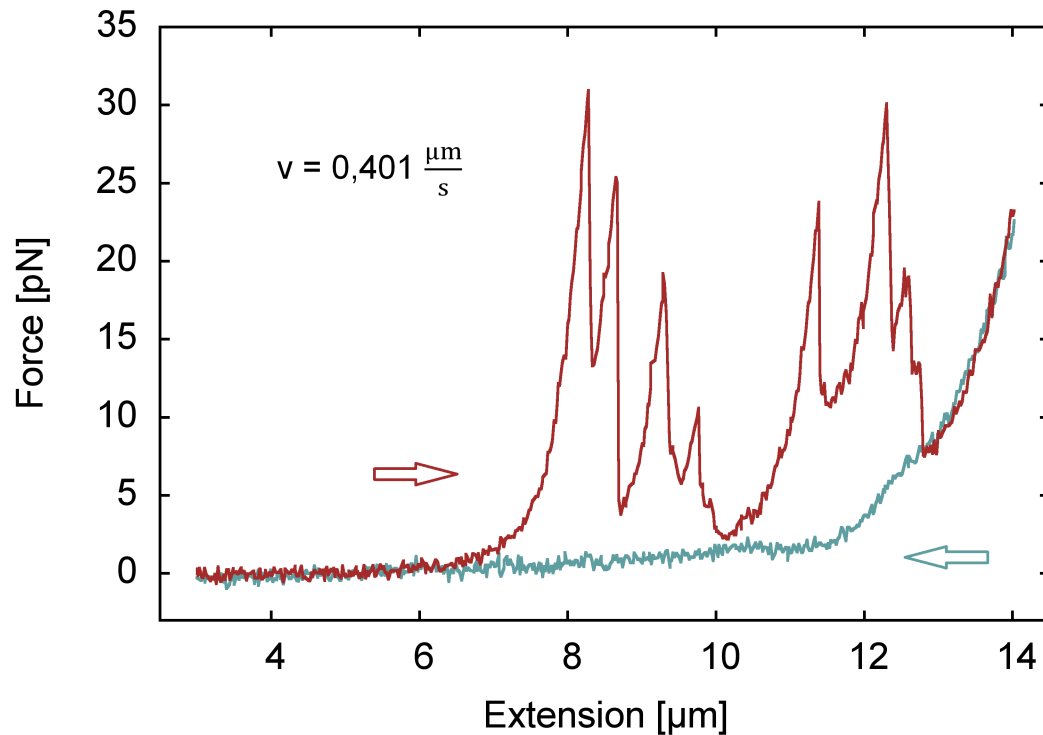


Abbildung 44: Mit konstanter Geschwindigkeit wurde an $16,4 \mu\text{m}$ Lambda-DNA gezogen. Histone (10 nM) wurden direkt vorher eingespült. Deutlich zu erkennen sind Einbrüche der Kraft, bei denen DNA frei wird und die mechanische Spannung des Moleküls verringert wird. Die Pfeile zeigen die Richtung an, in die die Bewegung der gleichfarbigen Kurve im Experiment läuft.

In Abbildung 44 sind neun Einbrüche des Kraftsignals von unterschiedlicher Intensität zu erkennen. An jeder dieser Stellen sinkt die Kraft plötzlich, die nötig ist, um das Molekül auf der entsprechenden Länge gestreckt zu halten. Dieses Verhalten kann nur mit einem Anstieg der Konturlänge erklärt werden. Dieser Zuwachs ist durch abreißende Histone entstanden, die die aufgewickelte DNA freigegeben haben. Jeder der Anstiege zeigt außerdem den typischen Verlauf, den eine DNA kurz vor Erreichen seiner Konturlänge annimmt.

Um den Längenzuwachs an freier DNA zu bestimmen, muss der weitere Verlauf der Messkurve untersucht werden. An der Stelle, wo die gleiche Kraft erneut anliegt, kann die Differenz der Konturlängen bestimmt werden. Häufig ist dazu eine Extrapolation mit Hilfe eines WLC-Fits erforderlich, weil vorher bereits der nächste Abriss eintritt.

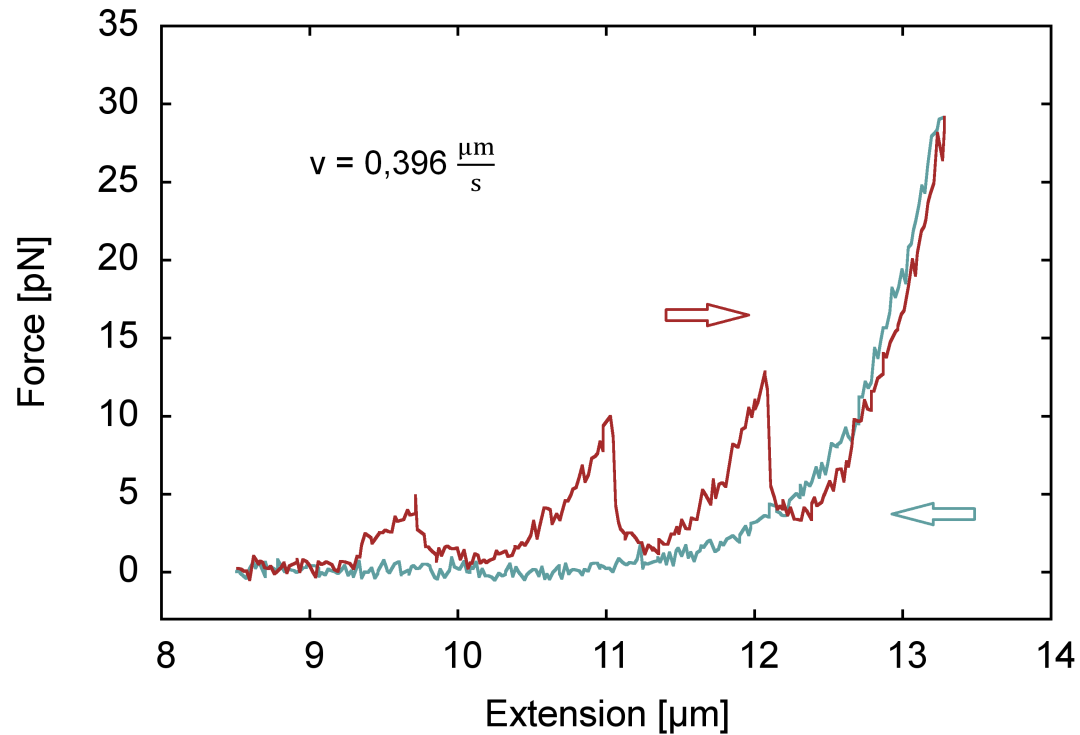


Abbildung 45: Drei Abrisse bei kleineren Kräften geben jeweils etwas mehr als 1 μm DNA frei. Der frühe Anstieg bei 12,5 μm zum Plateau lässt vermuten, dass am Ende der Messung noch Histone an der DNA verblieben sind.

Die Histone, die in diesen Versuche verwendet wurden, enthielten das Protein H1, das bei der Vernetzung der einzelnen Histone zur nächst höheren Ordnung eine wichtige Rolle spielt. Wie in Abbildung 45 ist deshalb sehr häufig zu beobachten, dass große Mengen DNA gleichzeitig freierwerden. Die Histone, die sich über H1 zu übergeordneten Strukturen zusammensetzen, reißen als Gesamtes ab.

Bei allen Versuchen bisher waren während der Messung noch ungebundene Histone in der Nähe der DNA. Wurde dasselbe DNA-Molekül für eine Folgemessung untersucht, war es also möglich (und erwünscht), dass neue Histone an die DNA gebunden haben. Dazu wurde zwischen den Messungen auch der Strom der Flüssigkeit wieder aktiviert, damit zusätzliche Histone die DNA umspülen konnten. Bei diesem Verfahren bleibt die Frage jedoch offen, ob sich Histone bei einem Abriss vollständig von der DNA lösen.

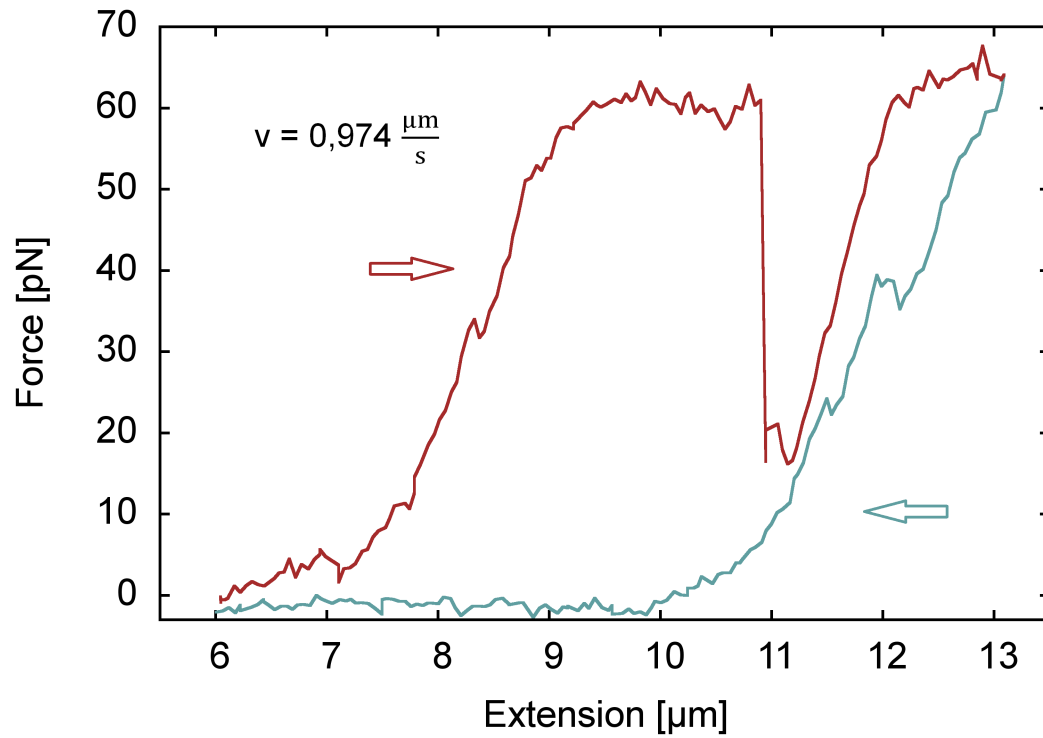


Abbildung 46: Obwohl bereits Kräfte von 15 pN für wenige Sekunden ausreichen [16], um einzelne Histone abzulösen, verzögert sich der Abriss teilweise bis ins Plateau einer Lambda-DNA.

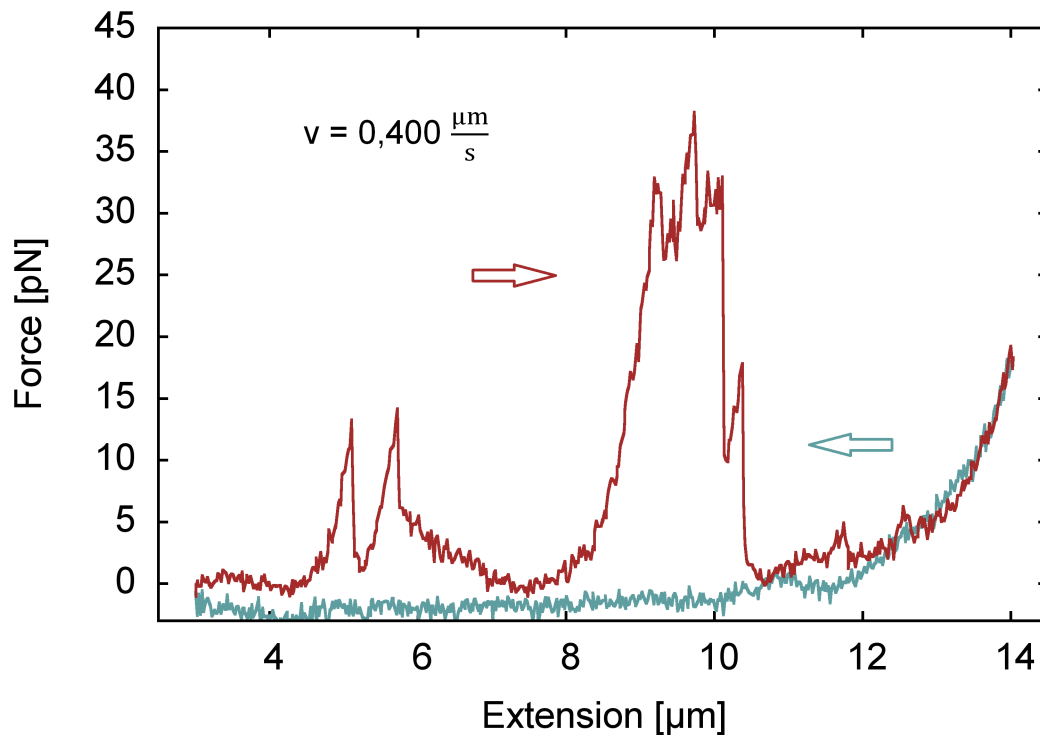


Abbildung 47: Neben mehreren Abrissen ist hier bei 6 μm ein ungewöhnlicher Abschnitt zu sehen. Die Kraft sinkt kontinuierlich, während die DNA weiter gestreckt wird. Auch hier könnten sich fortlaufend einzelne Histone ablösen und wie Perlen von einer Schnur rutschen, nachdem sich die große Struktur zuvor aufgelöst hat.

In Abbildung 48 auf Seite 51 ist nach der ersten Messung (rot) unmittelbar eine zweite (blau) durchgeführt worden. Am Ende der Streckung bei etwa 13,5 μm verläuft die zweite Messung exakt in der Spur der ersten. Da genau die gleiche Konturlänge erreicht wird, muss es sich bei den Abrissen der blauen Kurve um Histone handeln, die in der roten Kurve bereits DNA freigegeben haben und über eine Bindung an der DNA verblieben sind ohne diese jedoch zu verkürzen. Es kann sich dabei keinesfalls um Histone handeln, die in der ersten Messung gar nicht abgerissen sind, denn sonst würde es zu einer vergrößerten Konturlänge, und keinem übereinstimmenden Profil mit der roten Kurve am Ende kommen. Das komplette Ablösen eines Histons in die Umgebung macht jedoch einen Wiedereinbau sehr unwahrscheinlich. Dieses Verhalten lässt sich auch mit der dritten Messkurve (grün) belegen. Nur ein weiterer Abriss ist noch zu beobachten. Dies wird offenbar durch Histone verursacht, die bei den ersten beiden Messungen vollständig gebunden geblieben sind. Deshalb ergibt sich am Ende der dritten Messung auch eine vergrößerte Konturlänge.

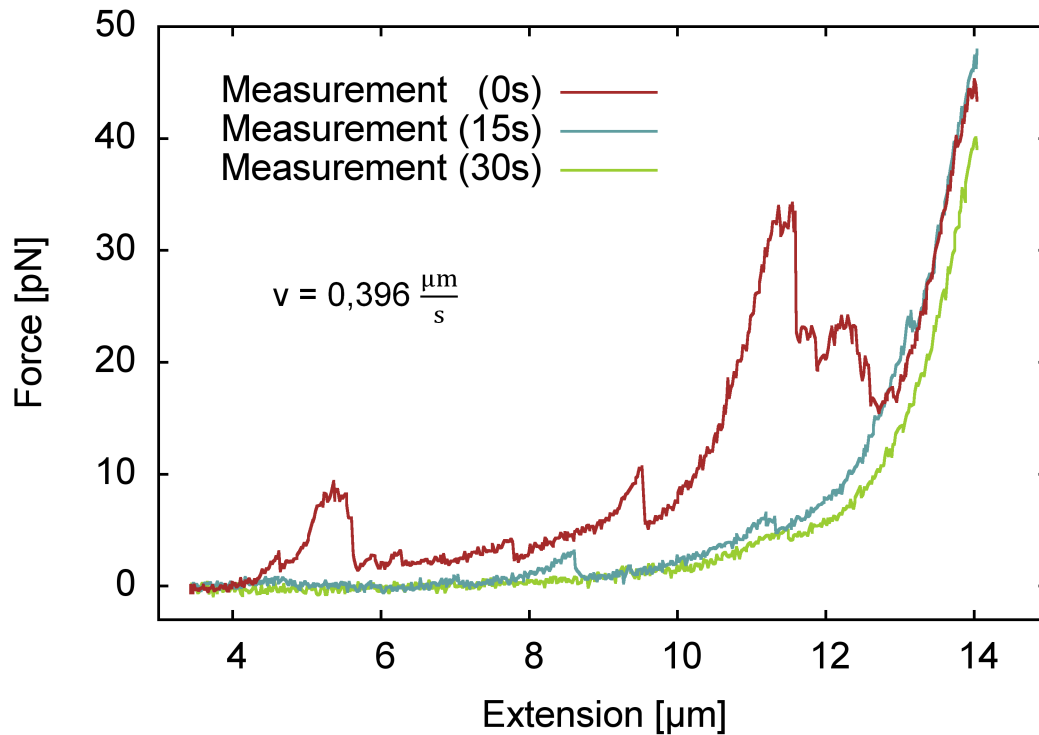


Abbildung 48: Nach einer Zugabe von Histonen ist die Flusszelle bei diesem Versuch vor der ersten Messung mit Puffer durchgespült worden. Bei kurz aufeinander folgenden Streckversuchen ist zu sehen, dass erneut Abrisse stattfinden.

Die meisten Messungen bisher haben vor allem Abrisse gezeigt, bei denen sich mehrere Histone gleichzeitig ablösen. Stark variierende Verlängerungen der Konturlänge in der Größenordnung eines Mikrometers sind die Regel. Um Einzeleffekte zu beobachten, ist deshalb ein zweites Messverfahren verwendet worden. Im *Force-Clamp-Modus* wird das Molekül bei einer definierten Kraft gestreckt gehalten. Dabei wird die Auslenkung gegen die Zeit aufgetragen. Im Bereich von 12-15 pN können nun ebenfalls Abrisse gemessen werden [16]. Nach einem Event wird die DNA vom Programm automatisch wieder auf die vorgegebene Kraft gestreckt. Das Ablösen von Histonen wird deshalb als Stufe im Messsignal sichtbar. Der Vorteil bei diesem Verfahren liegt darin, dass die zum Ablösen benötigte Kraft beliebig lange angelegt werden kann. Die durchschnittliche Lebensdauer einer Bindung ist erhöht und Abrisse treten verzögert (und vor allem einzeln) auf.

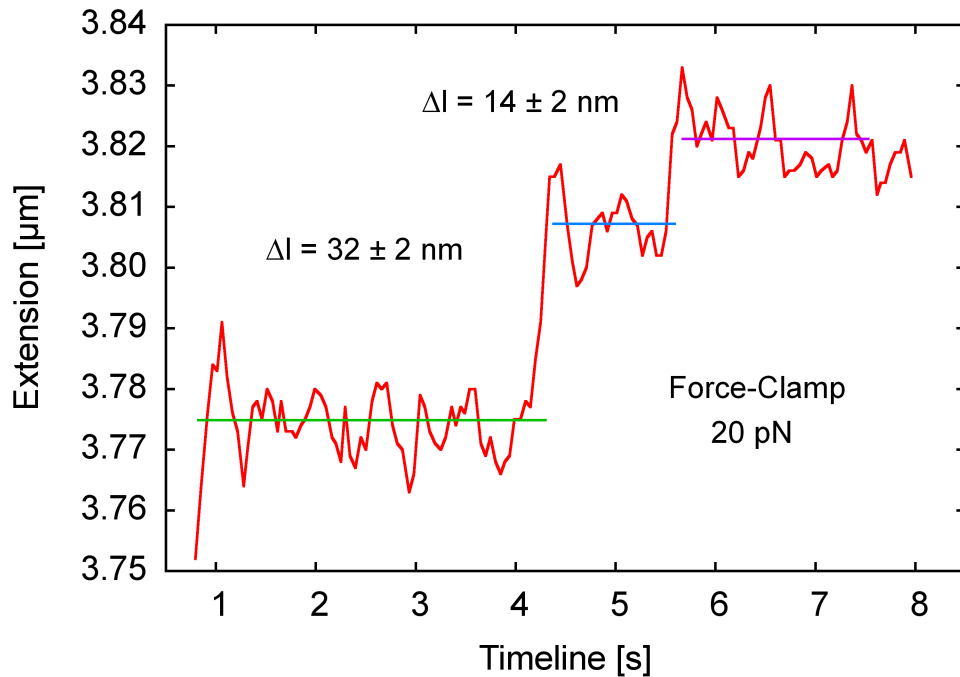


Abbildung 49: Bei 20 pN zeigen sich nach wenigen Sekunden bereits zwei Abrisse. Ein Histon bindet 147 Basenpaare [21], also etwa 47 nm. Ein Abriss kann aber auch mit Zwischenschritten erfolgen, so wie es hier zu sehen ist.

In Abbildung 49 sind zwei Abrisse zu erkennen, die nach dem Modell des mehrstufigen Abtrennens einem einzigen Histon zugeordnet werden können. Dieser Theorie nach löst sich die DNA symmetrisch in einem ersten Schritt mit 76 Basenpaaren [29] vom Histon. In einem zweiten und dritten Schritt reißt auch die verbliebene DNA ab.

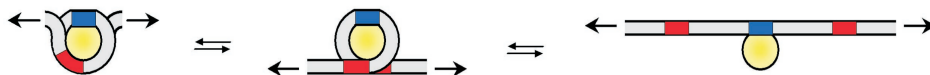


Abbildung 50: An den blau und rot markierten Stellen sind die Bindungen der DNA mit dem Histon besonders ausgeprägt. Ein Ablösen kann daher schrittweise ablaufen. Über die blaue Sequenz kann das Histon wie angedeutet an der DNA verbleiben, um zu einem späteren Zeitpunkt wieder komplett anzubinden. Aus [29]

Vor diesem Hintergrund kann der erste Sprung in Abbildung 49 mit 32 ± 2 nm als Zusammenschluss von Phase eins und zwei betrachtet werden. Damit sind bereits 100 ± 6 Basenpaare abgelöst. Im unmittelbar folgenden zweiten Event gibt das Histon die restlichen 14 ± 2 nm bzw. 44 ± 6 Basenpaare frei.

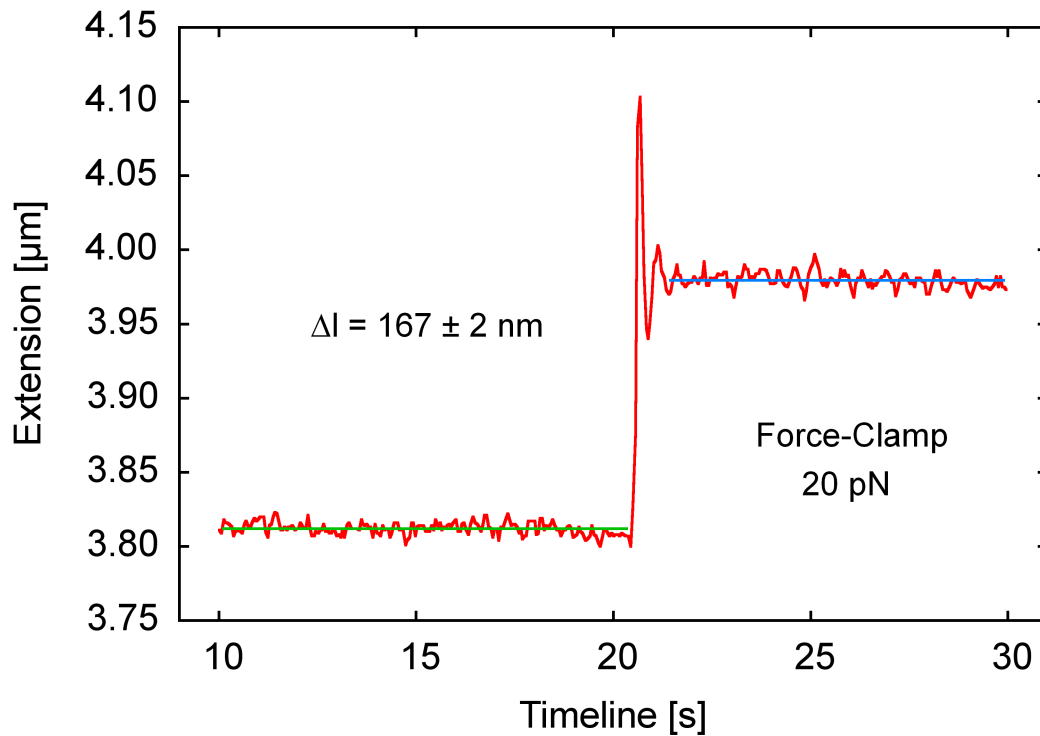


Abbildung 51: Ein Abriss in derselben Messung wie in Abbildung 49 wenige Sekunden später. Ein nicht optimal gewählter Parameter in der Nachkorrektur des Kraftsignals bedingt das Überschwingen in der Messung. Die abgelöste Menge DNA lässt den Schluss zu, dass sich drei Histone abgelöst haben. Zwei kurze Abschnitte von *Linker-DNA* müssen auch berücksichtigt werden.

In Abbildung 51 ist ein Abriss von etwa 522 ± 6 Basenpaaren zu erkennen. Neben 441 ± 6 Basenpaaren, die direkt durch drei Histone freigegeben werden, ist auch ein Anteil an *Linker-DNA* möglich. Bei der Anordnung von Histonen untereinander durch das Histon H1 kommt es zu spulenartigen Strukturen, bei denen die DNA zwischen zwei Histonen nicht zwangsläufig parallel zur Streckrichtung im Versuch angeordnet sein muss. Sie trägt also unter Umständen erheblich zur abgelösten Länge an DNA bei. Auf diese *Linker-DNA* entfallen in Abbildung 51 damit 81 ± 6 Basenpaare, die sich aus zwei Teilstücken zwischen je zwei Histonen zusammensetzen.

Abriss	Fehler	Histone	Fehler	Abriss	Fehler	Histone	Fehler
248 nm	54 nm	5,3	1,1	436 nm	43 nm	9,3	0,9
258 nm	19 nm	5,5	0,4	205 nm	5 nm	4,4	0,1
318 nm	33 nm	6,8	0,7	39 nm	13 nm	0,8	0,3
372 nm	27 nm	7,9	0,6	83 nm	17 nm	1,8	0,4
155 nm	26 nm	3,3	0,6	356 nm	50 nm	7,6	1,1
1001 nm	51 nm	21,3	1,1	250 nm	49 nm	5,3	1,0
837 nm	13 nm	17,8	0,3	133 nm	45 nm	2,8	1,0
402 nm	55 nm	8,5	1,2	482 nm	34 nm	10,2	0,7
655 nm	49 nm	13,9	1,0	350 nm	73 nm	7,4	1,6
539 nm	70 nm	11,5	1,5	929 nm	52 nm	19,7	1,1
1547 nm	66 nm	32,9	1,4	38 nm	16 nm	0,8	0,3
491 nm	55 nm	10,4	1,2	585 nm	22 nm	12,4	0,5
174 nm	20 nm	3,7	0,4	595 nm	22 nm	12,6	0,5
1792 nm	20 nm	38,1	0,4	1031 nm	15 nm	21,9	0,3
753 nm	32 nm	16,0	0,7	912 nm	23 nm	19,4	0,5
528 nm	21 nm	11,2	0,4	720 nm	24 nm	15,3	0,5
1190 nm	51 nm	25,3	1,1	1222 nm	63 nm	26,0	1,3
322 nm	64 nm	6,8	1,4	354 nm	51 nm	7,5	1,1

Tabelle 1: Die Tabelle enthält die Ergebnisse aller auswertbarer Events von über 25 Messungen. Unterschiedlich große Fehler ergaben sich aus verschiedenen Streckgeschwindigkeiten. Der Umrechnung liegen 147 Basenpaare pro Histon und 0,32 nm pro Basenpaar zu Grunde.

Um die empfindliche Bindung zwischen DNA und Kügelchen nicht zu stark zu belasten, sind häufig hohe Streckgeschwindigkeiten gewählt worden. Dadurch entstehen bei den Messungen abweichende Genauigkeiten. So liegt die Schrittweite der Messpunkte, die das Programm anlegt, zwischen 10 nm und 50 nm. Dieser Fehler geht auch nicht nur in den Zeitpunkt ein, an dem das Histon abreißt, sondern macht ebenfalls die Bestimmung des Referenzpunktes ungenau. Damit liegt der Fehler teilweise in der Größenordnung eines sich ablösenden Histons, so dass ein Auflösen auf einzelne Histone nicht zu allen Abrissen sinnvoll ist.

Der Präzision des *Force-Clamp-Modus* ist hier eindeutig der Vorzug zu geben. Mit dieser Methode konnten einzelne Abriss nachgewiesen werden.

4.2 UV/VIS-Spektroskopie

Zum Aufschmelzen von dsDNA wird die Probe in der Regel für wenige Minuten auf eine hohe Temperatur aufgeheizt. Bei 95 °C ist praktisch sichergestellt, dass selbst Bereiche mit einem hohen Anteil von Guanin-Cytosin-Bindungen zuverlässlich aufbrechen. Für die Experimente zur einzelsträngigen DNA ist diese jedoch beim Erhitzen bereits mit Biotin und Digoxigenin markiert. Das Streckexperiment ist auf die biologisch intakte Funktion dieser Moleküle angewiesen. Deshalb soll über die UV-Absorption von Lambda-DNA eine Temperatur bestimmt werden, die einerseits zu einem Aufschmelzen führt, andererseits die empfindlichen Komponenten schont.

Für die Bestimmung ist eine Vermessung an einem UV-VIS-Spektrometer (*Shimadzu UV-2450 Spectrometer*) durchgeführt worden. Die Probenhalterung besitzt eine Vorrichtung für einen Wasserkreislauf, der extern über eine Pumpe mit gekoppelter Heizung versorgt wird.

UV-Absorption von DNA bei verschiedenen Temperaturen

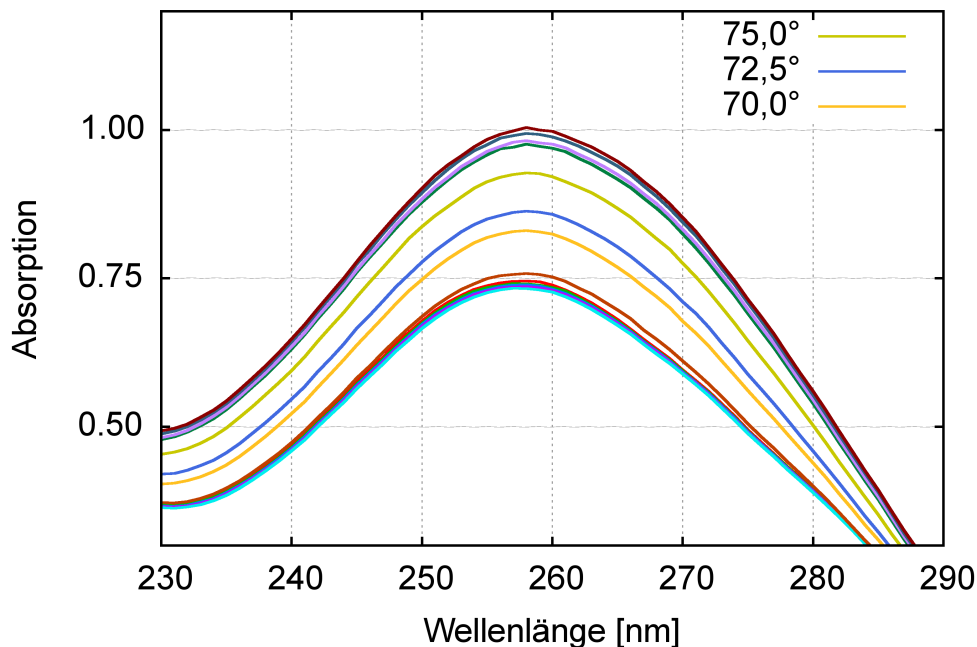


Abbildung 52: UV-Absorption mit verschiedenen Temperaturen. Bis 60 °C ist die Absorption fast konstant, bis sie über den Bereich von 70 °C bis 75 °C stark ansteigt. Die Basenpaarung bricht hier großflächig auf. Ab 80 °C sind fast alle Paarungen abgelöst, der Anstieg ist moderat. Die Schrittweite beträgt 1 nm, die DNA liegt konzentriert bei 16,3 nM vor. Puffer besteht aus 10 mM *Tris-HCl* und 1 mM *EDTA*.

Eine Aufheizung bis in Temperaturbereiche um 60 °C hat keinerlei Auswirkung auf das Absorptionsverhalten der DNA. Erst bei 70 °C fängt die Basenpaarung an aufzubrechen. Werden die Absorptionsmaxima für jede Temperatur in einem Diagramm aufgetragen, entsteht die charakteristische Kurve eines *hyperchromen shifts*, die an ein logistisches Wachstum erinnert.

Anhand der Abbildung 53 kann die benötigte Temperatur zum Denaturieren von DNA abgeschätzt werden. Präparationen mit Temperaturen unter 75 °C scheinen kaum lohnenswert. Ab 80 °C gibt es jedoch einen Bereich, in dem die Ausbeute einen experimentellen Versuch sinnvoll erscheinen lässt. Ferner hat das Experiment bestätigt, dass die Trennung der Einzelstränge beinahe unmittelbar mit der Temperatur einhergeht. Ein längeres Heizen bringt also keine weiteren Vorteile und gefährdet lediglich die Moleküle Biotin und Digoxigenin.

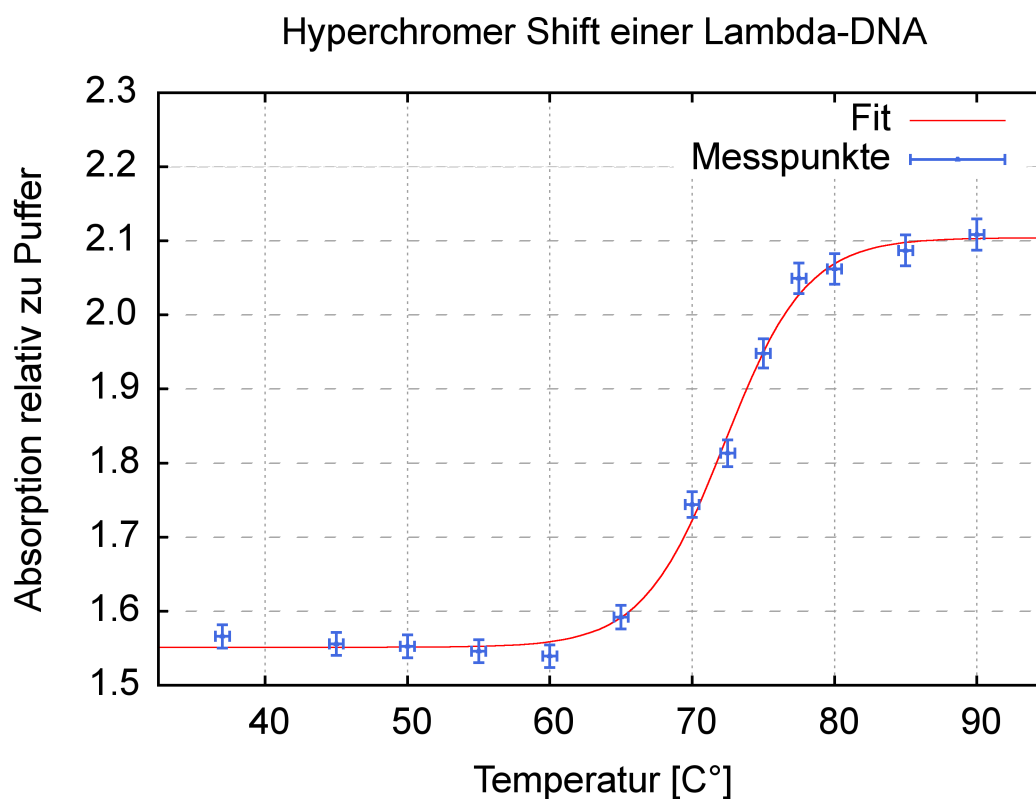


Abbildung 53: Zu jeder Temperatur wurde die UV-Absorption der Probe gegen eine Pufferlösung gemessen. Der Fit geschieht über eine logistische Funktion. Als Fehler für die Temperatur werden 0,5 °C angenommen. Die Absorption geht mit einem Fehler von 1 % ein.

4.3 Kraftspektroskopie an ssDNA

Im letzten Abschnitt dieser Auswertung soll durch experimentelle Verfahren bestimmt werden, ob die Präparation von einzelsträngiger DNA erfolgreich war. Die Methode der Kraftspektroskopie durch die Optische Pinzette ist auch hier ein geeignetes Verfahren. Der Grund liegt in der speziellen Struktur der einzelsträngigen Nukleinsäure. Wie in Kapitel 2.2 eingeführt, bildet ssDNA in komplementären Abschnitten intramolekulare Doppelstränge. Mit Unterbrechung von einzelsträngigen Teilstücken entstehen auf diese Weise häufig *hairpin loops*. Das Kurvenprofil, das sich durch Streckung der ssDNA ergibt weicht deshalb sichtbar von dem der dsDNA ab. Von Beginn an sind in der Regel kleine Kräfte von 12-13 pN [30] nötig, um Basenpaarungen abzulösen. Die Streckkurve steigt in ihrem Verlauf kontinuierlich an, da der Längenzuwachs der ssDNA gleichmäßig über den Anstieg der Basenpaarabstände entlang des Einzelstranges geschieht. Auch ist die Persistenzlänge durch den Wegfall der helikalen Überstruktur gegenüber einer dsDNA stark verkürzt. Für Werte von 0,75 nm [31] kann mit dem *Wormlike-Chain-Modell* der Verlauf einer Streckkurve für einzelsträngige DNA angenähert werden.

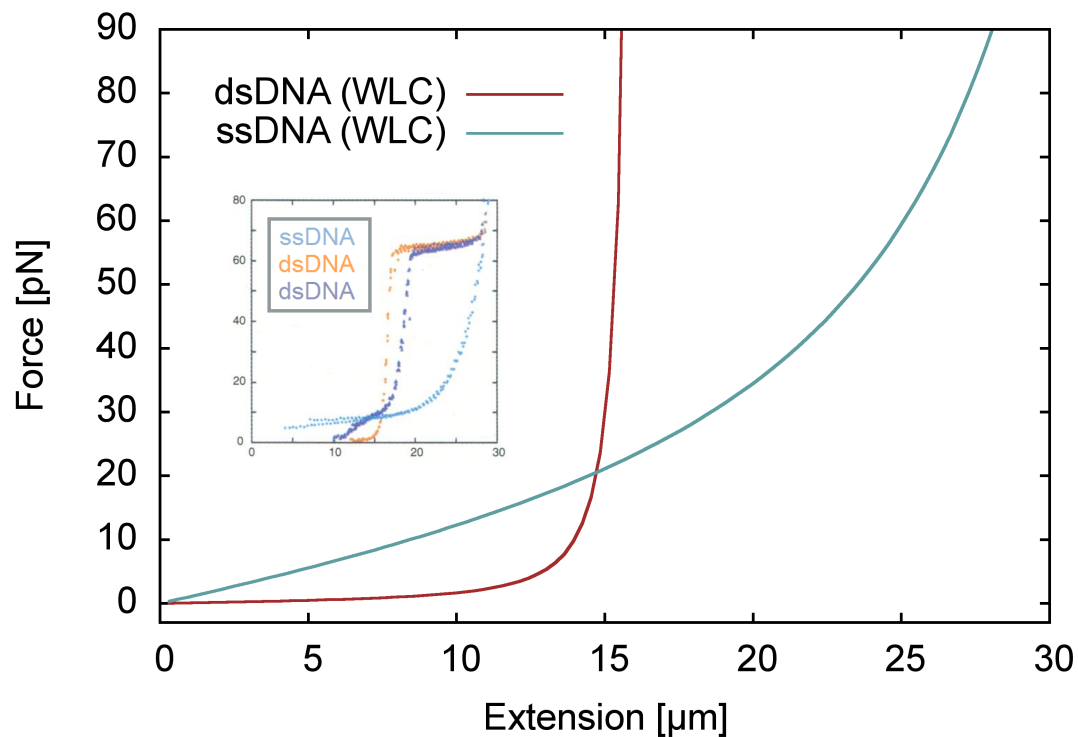


Abbildung 54: Mit Hilfe eines WLC-Fit kann das unterschiedliche Streckverhalten simuliert werden. Das Plateau der dsDNA bei 65 nm ist nicht dargestellt. Mit dem zweiten Anstieg der Kraft (dsDNA) gingen bei etwa 28 μm die Kurven in einander über. Das kleine Bild [30] zeigt Kurven realer Messungen.

Der Erfolg einer ssDNA-Präparation lässt sich also an einer veränderten Streckkurve ermitteln. Das charakteristische Plateau einer dsDNA sollte nicht mehr zu sehen sein und der Kraftanstieg im Verlauf deutlich flacher erfolgen. Als problematisch in allen Messungen hat sich dabei die Kontaktstelle zwischen DNA und Kügelchen herausgestellt. Erfolgte die Anbindung zur Vermessung der 16,4 μm langen Lambda-DNA noch jeweils über Biotin, so erfordert die Präparation zur ssDNA unterschiedliche Markierungen an beiden Enden. Die Verbindung von Digoxigenin (DNA) mit seinem Antikörper (Kügelchen) hat sich nur in wenigen Experimenten als beständig gegenüber Kräfteinflüssen oberhalb von 80 pN gezeigt.

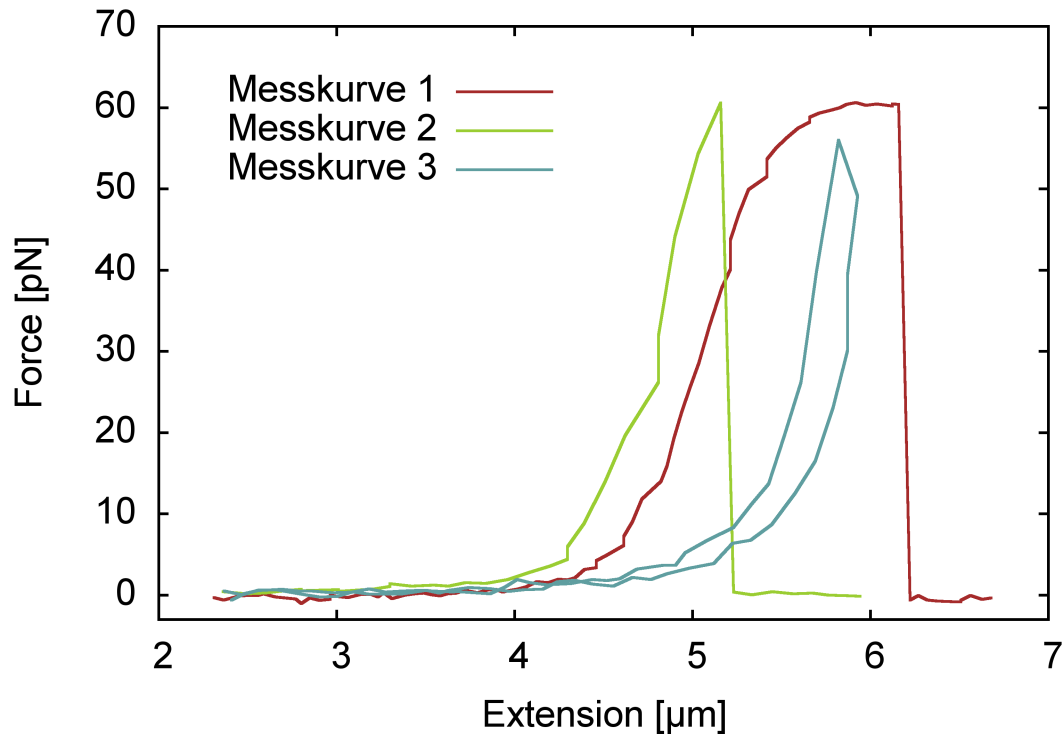


Abbildung 55: Hier sind Messkurven von DNA zu erkennen, bei denen die Präparation zur ssDNA nicht funktioniert hat. Das Ausbilden eines Plateaus, wie es die Messkurve 1 deutlich zeigt, ist ein Ausschlusskriterium. Der Abriss der DNA in den Kurven 1 und 2 verdeutlicht das Problem der schwachen Bindung zwischen Digoxigenin und seinem Antikörper. Der eckige Charakter der Messkurven wird durch eine schnelle Streckgeschwindigkeit verursacht. Sie wurde gewählt, um die Bindung nur kurzzeitig zu belasten.

In Abbildung 55 erfolgte die Präparation der DNA zu den Messkurven 1 und 3 durch Aufschmelzen von Lambda-DNA für 3 min bei 83 $^{\circ}\text{C}$ mit anschließendem Eisbad und zentrifugieren. Die Konturlänge der DNA beträgt durch das Schneiden der *EagI-HF* 4,0 bzw. 6,8 μm . Die Messkurve 2 ist mit einer DNA entstanden, bei der der Zentrifugenteller

im Ofen aufgeheizt wurde (Kapitel 3.5.1). Auch sie deutet ein sich ausbildendes Plateau an. Außerdem entsprechen die Persistenzlängen einer doppelsträngigen DNA. Diese können auch ohne das WLC-Modell über den Grad der Steigung ansatzweise abgeschätzt werden.

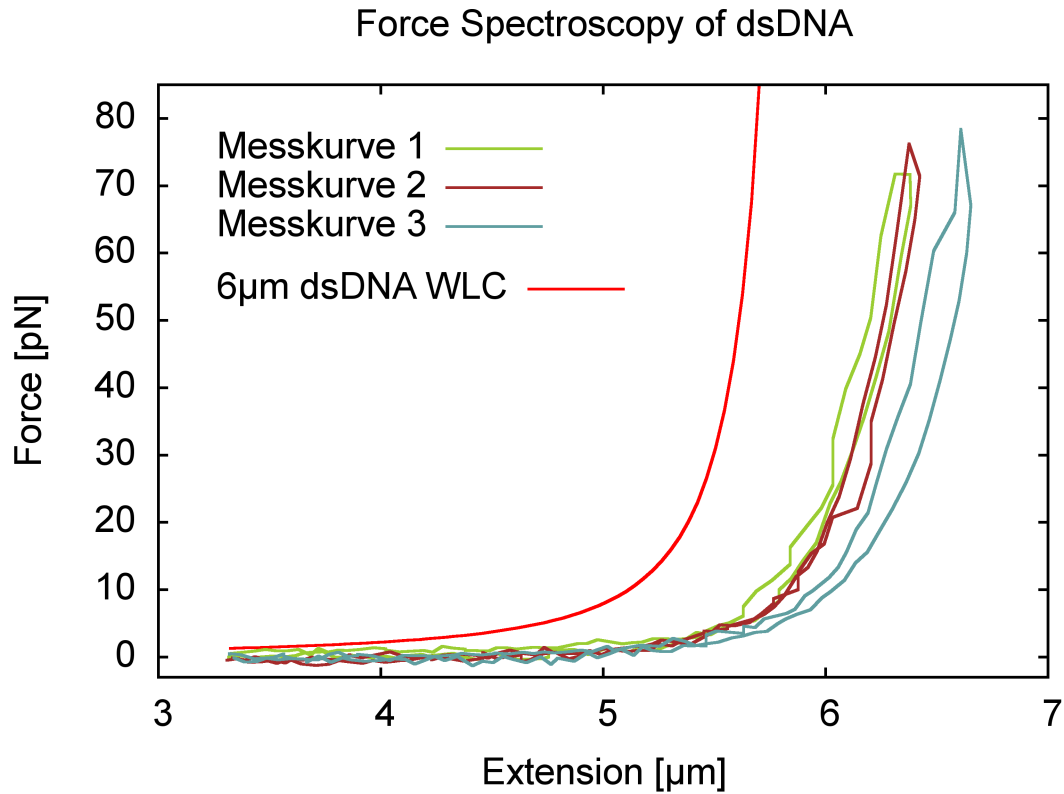


Abbildung 56: Alle drei Messkurven sind aus derselben Probe, aber von unterschiedlichen DNA-Molekülen. Es könnte sich dabei um einzelsträngige DNA mit einer Konturlänge von $4,0\ \mu\text{m}$ handeln, die am oberen Ausläufer in die Streckkurve einer dsDNA mit der gleichen Konturlänge übergeht. Die Persistenzlänge (siehe WLC-Fit) spricht jedoch für dsDNA.

In Abbildung 56 sind die Streckkurven von drei verschiedenen DNA-Molekülen zu sehen, die nach derselben Methode präpariert wurden ($83\ ^\circ\text{C}$ für 3 min, Eisbad, Zentrifuge). Der Anstieg setzt seinen Trend auch über die Marke von $65\ \text{nm}$ hinaus fort und zeigt keine Hinweise auf ein Plateau. Die Steigung der Graphen legt allerdings den Schluss nahe, dass die Persistenzlänge im Bereich einer doppelsträngigen Nukleinsäure liegt und für einen Einzelstrang viel zu groß ist. Der WLC-Fit einer dsDNA mit $50\ \text{nm}$ Persistenzlänge verläuft beinahe parallel. Auch zeigt keine der Messkurven die typischen Kräfte von $12\text{-}13\ \text{pN}$, die bei einzelsträngiger DNA durch Aufbrechen von Sekundärstrukturen auftreten.

Force Spectroscopy of dsDNA

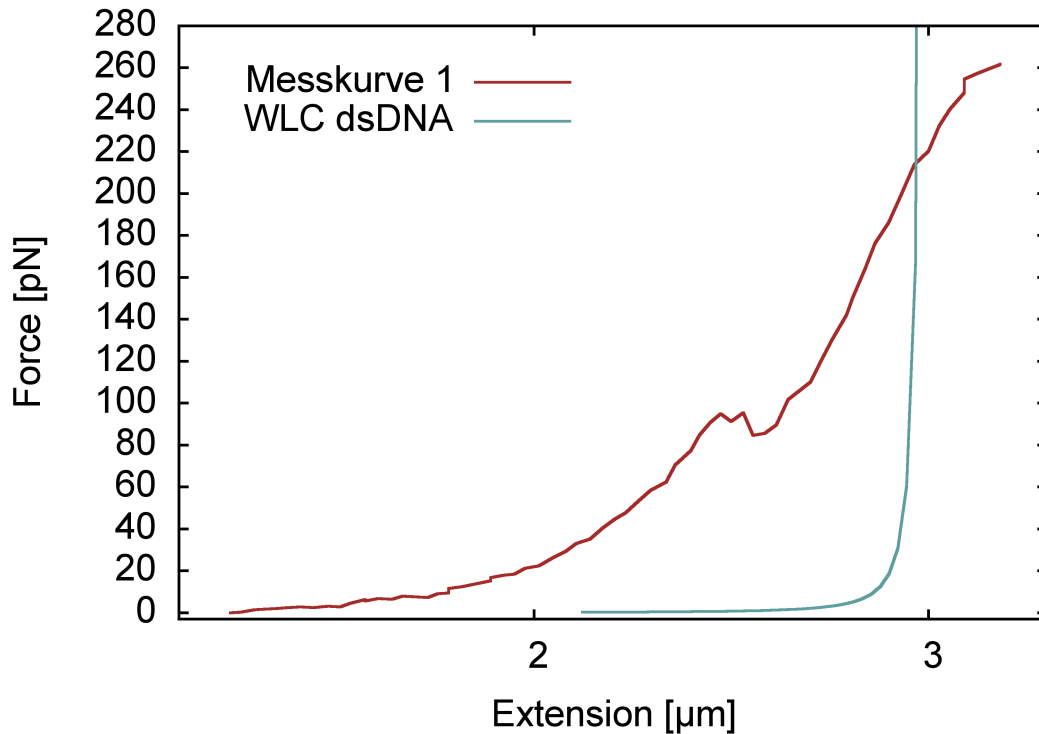


Abbildung 57: Die Streckkurve in dieser Messung zeigt einen typischen Verlauf einer einzelsträngigen DNA. Ein sehr flacher, aber stetiger Anstieg der Kraft ist charakteristisch. Zum Vergleich ist ein WLC-Fit einer dsDNA aufgetragen, deren Anstieg viel steiler verläuft. Stellen mit gleichbleibender Kraft können ein Hinweis auf das Auflösen von Unterstrukturen sein.

In der Grafik 57 verläuft die Messkurve zu keinem Zeitpunkt parallel zum WLC-Fit einer dsDNA. Die Persistenzlänge liegt erkennbar unterhalb einer doppelsträngigen DNA. Bei der Präparation wurde die DNA zunächst für 1 min auf 90 °C aufgeheizt und anschließend 3 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Zentrifugenteller wurde vorher auf 150 °C erhitzt.

In der Messkurve ist zwar ein leichtes Plateau bei 80-100 pN zu erkennen, dieses wäre bei einer dsDNA jedoch viel ausgeprägter. Vielmehr kommt es bei ssDNA zu kleinen Bereichen konstanter Kraft, in denen sich eine Sekundärstruktur ablöst.

Abbildung 58 zeigt ein Objekt, das selbst bei einem Offset von 10 µm noch mindestens 12 µm Länge messen würde. Das liegt deutlich über der Konturlänge aller beteiligter Nukleinsäuren (4,0 µm und 6,8 µm). Eine Verunreinigung durch 16,4 µm Lambda-DNA ist zwar prinzipiell denkbar, diese könnte aber mit dem Messaufbau nicht zwischen den beiden unterschiedlich beschichteten Kügelchen (Streptavidin am Laserfokus, Anti-DIG

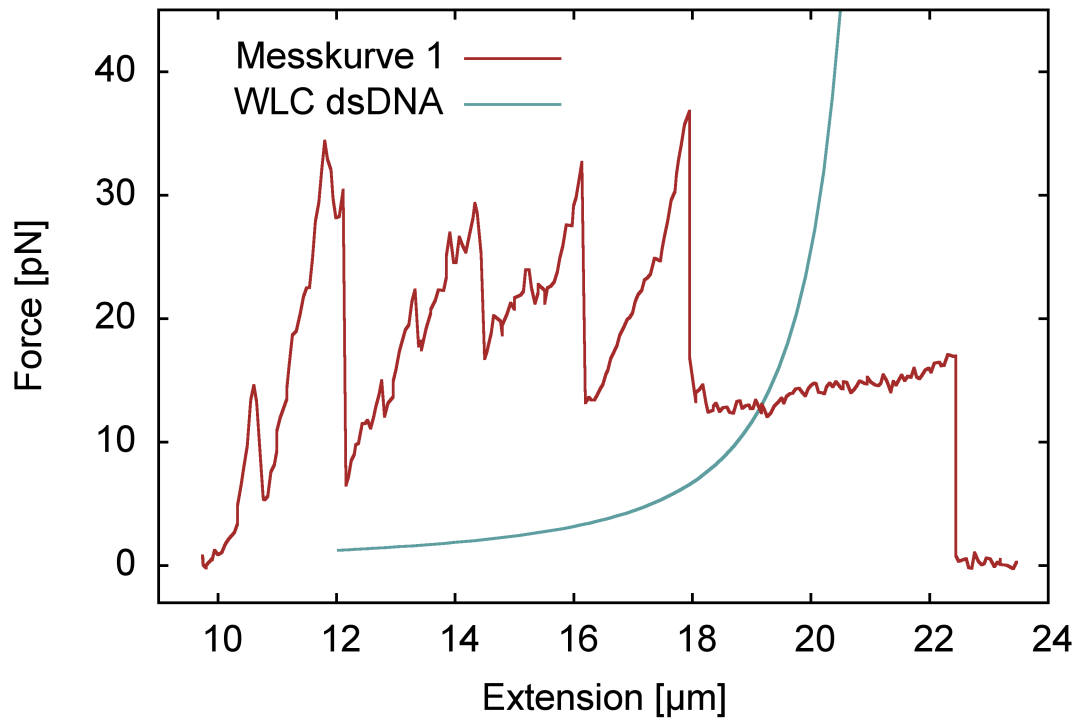


Abbildung 58: Die Zacken in dieser Messkurve werden, ähnlich wie bei Experimenten mit Histonen, durch ein Freiwerden von großen Teilstücken vorher unter Zugspannung stehender DNA verursacht. Nach einem Abschnitt mit geringer Steigung, reißt die DNA bei etwas mehr als 22 µm schließlich ab.

an der Pipette) eingespannt werden. Dennoch haben die Anstiege vor den Abrissen die Form einer dsDNA-Streckkurve. Das letzte Teilstück vor dem endgültigen Abriss der DNA ist jedoch sehr viel flacher und lässt die Vermutung zu, dass hier ssDNA gestreckt wird.

Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass bei der Markierung der DNA mit Digoxigenin das beteiligte Restriktionsenzym *EagI-HF* einen der beiden Schnitte nicht ausgeführt hat. Auf diese Weise könnten weitere Teilstück von 11,7 µm und 9,1 µm entstehen. Von der geringen Wahrscheinlichkeit abgesehen, dass sich solche Moleküle bilden und den Weg ins Experiment finden, würde es dennoch nicht die Abrisse in der Messkurve erklären.

Es sind daher wahrscheinlich zwei Einzelstränge über mehrere komplementäre Teilstücke aneinander gebunden. Sie formen auf diese Weise ein Objekt, das länger als 6,8 µm ist. Mit dem Abriss eines gebundenen Teilstückes wird augenblicklich jene DNA frei, die zwischen dieser und dem nächsten doppelsträngigen Abschnitt liegt. Dort kommt es dann erneut zur Streckung einer kurzen doppelsträngigen Sequenz, bis auch diese wieder abreißt.

5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnten mit der Optischen Pinzette zahlreiche Streckkurven von Lambda-DNA aufgenommen werden. Sie hat sich damit als erfolgreiches Instrument bei der kraftsensitiven Analyse von Molekülen bewährt. So ist das charakteristische Plateau bei Kräften um 65 pN mehrfach erfolgreich vermessen worden. Auch die Ausbildung einer Hysterese im Streckprofil konnte gezeigt werden. Mit Hilfe des *Wormlike-Chain-Modells* sind Konturlänge und Persistenzlänge bestimmt worden. Dabei hat sich gezeigt, dass Probleme bei der Präparation in der Flüssigkeitszelle auftreten können, wenn die DNA unspezifisch an einem der Kügelchen klebt. Für die Streckung steht dann nur noch ein Teil ihrer Konturlänge zur Verfügung.

Das Prinzip von Histonen, DNA zu verdichten, und ihre effektive Länge zu verringern, ist in Experimenten gezeigt worden. Dass Histone über eine Bindungsstelle an der DNA verbleiben können, obwohl sie keine Verkürzung mehr herbeiführen, konnte ebenso bestätigt werden. Das Ablösen von Histonen wurde anfangs vor allem in Messungen mit konstant festgelegter Streckgeschwindigkeit beobachtet. Die begrenzte Auflösung hat eine Auswertung von Einzelereignissen erschwert. Dabei könnte in Zukunft vor allem von kleineren Messintervallen profitiert werden. Durch limitierende PC-Hardware legt das Programm etwa alle 60 ms einen Messwert an. Es kann zwar bei beliebig geringen Geschwindigkeiten gestreckt werden, aber dadurch werden die empfindlichen Bindungen länger belastet. So hat sich gezeigt, dass die Bindung zwischen Digoxigenin und seinem Antikörper nur kurzfristig über 60 pN belastet werden kann. Wo es möglich ist, sollte daher auf Biotin und Streptavidin zurückgegriffen werden.

Die Auflösung einzelner Abrisse von Histonen konnte schließlich im *Force-Clamp-Modus* gezeigt werden. Bei kleinen Kräften reißen die Bindungen zeitlich verzögert ab und lassen sich wesentlich besser auswerten. Trotzdem hat sich die Anwesenheit von H1 im Histonpräparat ungünstig ausgewirkt. So haben sich die Histone mit aufgewickelter DNA durch H1 zu Strukturen höherer Ordnung organisiert. Im Experiment haben sich diese häufig in einem einzigen Ereignis abgelöst und haben eine feinere Auflösung erschwert.

Anfragen bei namhaften Pharmaunternehmen zu aufgereinigten Produkten ohne H1 wie *Roche* oder *Worthington* blieben während der Experimente ohne Erfolg. Mittlerweile konnte jedoch eine Quelle erschlossen werden, so dass es sehr interessant erscheint, vergleichbare Messungen ohne H1 in der Zukunft nachzuholen.

Im letzten Schritt sollte die Präparation einzelsträngiger DNA aus Lambda-DNA erfolgen. Verschiedene Ideen konnten dazu ausgearbeitet werden. Im Fokus stand dabei ein temperaturinduziertes Aufschmelzen, ein Vorgang, wie er bei künstlicher PCR eingesetzt wird. Die gewünschten Erfolge sind dabei nur sehr bedingt eingetreten. Im Experiment hat die behandelte DNA sehr häufig noch das typische Verhalten von doppelsträngiger DNA gezeigt. In Zukunft könnte ein Aufschmelzen direkt in der Messvorrichtung bei bereits immobilisierter dsDNA erprobt werden. Auch ein Aufschmelzen durch Zugabe von Alkalisalzen hätte noch getestet werden können.

Der nächste Schritt würde überprüfen, ob Histone auch an ssDNA binden. Dabei könnte auch auf natürlich vorkommende einzelsträngige Nukleinsäuren wie beim *M13-Phagen* zurückgegriffen werden.

6 Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich noch bei allen Menschen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Ein solches Vorhaben ist nämlich nur in einer entsprechenden Umgebung erfolgreich zu bewältigen. So gilt mein erster Dank Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, in seiner Abteilung an unterschiedlichen Geräten die spannende Vielfalt der Einzelmolekülphysik zu untersuchen. In den Gesprächen über meine Fortschritte und Ergebnisse hat er in mir stets die Motivation geweckt, auch weiterhin mit viel Einsatz und Begeisterung im Labor zu experimentieren.

Mein nächster Dank geht an Dr. Andy Sischka, der mir während meiner Experimente mit seiner großen Erfahrung unzählige Male geholfen hat. In einem engen Betreuungsverhältnis hat er mir in jeder Phase meiner Arbeit bereitwillig und helfend zur Seite gestanden. Mit seinem Optimismus und einem breiten Wissensschatz aus der experimentellen Physik hat er mir oft neue Ideen gezeigt und mich bei Durststrecken motiviert. Auch erinnere ich mich gerne an die zahlreichen heiteren Momente im Labor, die in der Zeit entstanden sind.

Und mit diesem Stichwort möchte ich mich bei der gesamten Abteilung für die angenehme Zeit bedanken. Ich denke, dass ein gutes Betriebsklima Voraussetzung für ein produktives und erfolgreiches Arbeiten ist. So hat sich in den zurückliegenden Monate immer jemand gefunden, mit dem man über seine Experimente und aktuellen Projekte sprechen konnte. Zusammen mit dem Gruppenseminar hat man auf diese Weise ständig anregende Ideen für Neues erhalten.

Für Fragen zur Chemie und Biophysik standen mir Dr. Katja Tönsing und Helene Schellenberg immer gerne zur Verfügung. Ich danke ihnen für die Tipps bei Verständnisfragen oder Verfahren zur Probenpräparation.

Wenn es um Probleme bei technischer Ausrüstung ging, hat mir Christoph Pelargus immer ein offenes Ohr geschenkt und eine Lösung angeboten. Wenn es sich ergeben hat, konnte man auch hervorragend über Technik aller Art mit ihm fachsimpeln.

Ganz besonders möchte ich mich mit meinem Dank dabei an meine Bürokollegen Sebastian Knust, Tamara Münnich und Mirjam Schulz richten. In einer harmonischen Atmosphäre habe ich die Momente genossen, wo man vom Monitor aufschauen und den neusten Klatsch austauschen konnte. Auch für die zahlreichen Antworten auf meine verzweifelten Computerprobleme möchte ich Sebastian noch einmal gesondert danken.

Für das freundschaftliche Klima im Labor und die vielen anregende Diskussionen möchte ich mich außerdem bei Dr. André Spiering und Lukas Galla bedanken.

7 Literatur

- [1] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*, **171**:737–738, (1953).
- [2] DNA Deoxyribonucleic Acid. [http : //upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Chemische_Struktur_der_DNA.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Chemische_Struktur_der_DNA.svg), (11.04.2014).
- [3] P. Yakovchuk, E. Protozanova and M. D. Frank-Kamenetskii. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*, **34**:564–574, (2006).
- [4] DNA Deoxyribonucleic Acid. [http : //upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fd/Difference_DNA_RNA – DE.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fd/Difference_DNA_RNA-DE.svg), (11.04.2014).
- [5] Chris R. Calladine, Horace R. Drew, Ben F. Luisi and Andrew A. Travers. *DNA Das Molekül und seine Funktionsweise*. Spektrum Akademischer Verlag, (2006). ISBN 3-8274-1605-1.
- [6] M. Mandelkern, J. G. Elias, D. Eden and D. M. Crothers. The Dimension of DNA in Solution. *Journal of Molecular Biology*, **152**:153–161, (1981).
- [7] D. A. Marvin, R. D. Hale, C. Nave and M. Helmer-Citterich. Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), If1 and IKE. *Journal of Molecular Biology*, **235**:260–286, (1994).
- [8] F. Sanger, A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill, G. B. Petersen. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology*, **162**:729–773, (1982).
- [9] Michael B. Yarmolinsky. Making and Joining DNA Ends, *in* The Bacteriophage Lambda. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **2**:97–111, (1971).
- [10] Phage. [http : //en.citizendium.org/images/thumb/f/f9/Phage_S.gif/200px – Phage_S.gif](http://en.citizendium.org/images/thumb/f/f9/Phage_S.gif/200px-Phage_S.gif), (09.06.2014).
- [11] John F. Marko and Eric D. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, **28**:8759–8770, (1995).
- [12] A. Ashkin. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical Review Letters*, **24**:156–159, (1970).
- [13] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. *Optical Letters*, **11**:288–290, (1986).
- [14] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical Review Letters*, **24**:156–159, (1970).

- [15] A. Sischka et al. Single beam optical tweezers setup with backscattered light detection for three-dimensional measurements on DNA and nanopores. *Review of Science Instrument*, **79**, (2008).
- [16] Graeme A. King, Peter Gross, Ulrich Bockelmann, Mauro Modesti, Gijs J. L. Wuite, and Erwin J. G. Petermann. Revealing the competition between peeled ssDNA, melting bubbles, and S-DNA during DNA overstretching using fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**:3859–3864, (2013).
- [17] Human Genom Project. Genomics and Its Impact on Science and Society. [http : //web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/publicat/primer2001/primer11.pdf](http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/publicat/primer2001/primer11.pdf), (12.05.2014).
- [18] Rohinton T. Kamakaka and Sue Biggins. Histone variants: deviants? *Genes and Develpment*, **19**:295–316, (2005).
- [19] P. J. Butler. The folding of chromatin. *CRC critical reviews in biochemistry*, **15**:57–91, (1983).
- [20] G. Felsenfeld and M. Groudine. Controlling the double helix. *nature*, **421**:448–453, (2003).
- [21] T. J. Richmond and C. A. Davey. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, **423**:145–150, (2003).
- [22] R. D. Kornberg. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, **184**:868–871, (1974).
- [23] chromatin. [http : //upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Chromatin_Structures.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Chromatin_Structures.png), (19.05.2014).
- [24] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical Trapping and Manipulation of Single Cells Using Infrared-LAsER Beams. *Nature*, **330**:769–771, (1987).
- [25] K. Svoboda and T. Asakura. Biological Applications of Optical Forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **23**:247–285, (1994).
- [26] A. Sischka. Kraftspektroskopie und Einzelmoleküldetektion mit der Optischen Pinzette. *Dissertation*, (2005).
- [27] P. Doty, J. Marmur, J. Eigner and C. Schildkraut. Strand Separation and specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Physical Chemical studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **46**:461–476, (1960).
- [28] P. Doty, H. Boedtke, J. R. Fresco, R. Haselkorn and M. Litt. Secondary Structure in Ribonucleic Acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **45**:482–499, (1959).

- [29] Brent D Brower-Toland et al. Mechanical Disruption of Individual Nucleosomes Reveals a Reversible Multistage Release of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**:1960–1965, (2002).
- [30] Carlos Bustamante, Steven B. Smith, Jan Liphardt and Doug Smith. Single-molecule studies of DNA mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*, **10**:279–285, (2000).
- [31] Steven B. Smith, Yujia Cui, Carlos Bustamante. Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science*, **271**:795–799, (2010).