

Kraftspektroskopie an DNA

F-Praktikumsversuch am
Lehrstuhl für Angewandte Physik LMU
(Version 2.01.β)

Einleitung

Direkte Messungen an einzelnen Molekülen und Atomen waren bis in die jüngste Zeit technisch nicht möglich. Trotzdem gelang es, durch Mittelung über ein ganzes Ensemble an Molekülen sehr genau auf die durchschnittlichen Eigenschaften der einzelnen Moleküle zu schließen. So konnten z. B. Atom- und Molekülspektren hochpräzise vermessen werden, Bindungsenergien wurden kalorimetrisch bestimmt, und sogar die Struktur von Biomolekülen wurde auf Ångström genau aufgelöst. Viele wichtige Informationen entziehen sich jedoch einer derartigen Ensemblemessung und erfordern die Messung am einzelnen Molekül.

Mit kraftmikroskopischen Techniken ist es möglich, einzelne Moleküle aufzugreifen und direkt deren mechanische Eigenschaften zu prüfen. Die scharfe Spitze der Kraftmikroskopnadel stellt dabei die stark verkleinerte "Hand" des Experimentators dar. Möglich sind Experimente zur Messung der Elastizität von einzelnen Polymersträngen und zur Entfaltung von Proteinen .

Insbesondere hängt auch die biologische Funktion unserer Erbsubstanz ganz eng mit den mechanischen Eigenschaften von DNA zusammen. Für das Ablesen und Vervielfachen der Erbinformation, aber auch das Reparieren von Fehlstellen in diesem Makromolekül sind meist Änderungen in der räumlichen Struktur (Konformation) der Polymerkette notwendig, welche durch die Wechselwirkung mit funktionellen Proteinen (Enzymen) gesteuert werden. Auch deren mechanische Eigenschaften spielen dabei natürlich eine ganz wesentliche Rolle .

In diesem Versuch soll das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen zwei komplementären DNA-Strängen sowohl auf thermischen als auch auf mechanischem Wege untersucht werden. Zunächst werden dazu in einer 'klassischen' Ensemble-Messung mittels UV-Spektroskopie die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten des Aufschmelzens doppelsträngiger DNA gemessen, und daraus die entsprechende freie Reaktionsenthalpie (ΔH) bestimmt.

Anschliessend sollen die mechanischen Eigenschaften von doppelsträngiger DNA gemessen werden, bis in einen Kraftbereich hinein, in dem zunächst strukturelle Umwandlungen der Polymerkonformation, und dann auch das Aufschmelzen des Doppelstranges in die beiden komplementären Einzelstränge der DNA sichtbar werden. Auch hier ist die Berechnung der (mechanischen) Schmelzenthalpie möglich, und zwar sogar für ein einziges DNA-Molekül. Durch die Messung eines detaillierten Kraft-Dehnungs-Profiles sind mit dieser Methode ausserdem interessante Einblicke in die Mechanik einzelner DNA-Moleküle möglich.

DNA

DNA steht für das englische Wort **deoxyribo nucleic acid**, zu deutsch Desoxyribonukleinsäure oder DNS. Die DNA ist die chemische Substanz, die durch ihre einzigartige Struktur Information über den Bauplan des Lebens speichern und weitergeben kann. Die Information ist durch die Abfolge ("Sequenz") von vier verschiedenen Bausteinen, den Nukleobasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) entlang des fadenförmigen DNA-Moleküls verschlüsselt (Abbildung 1).

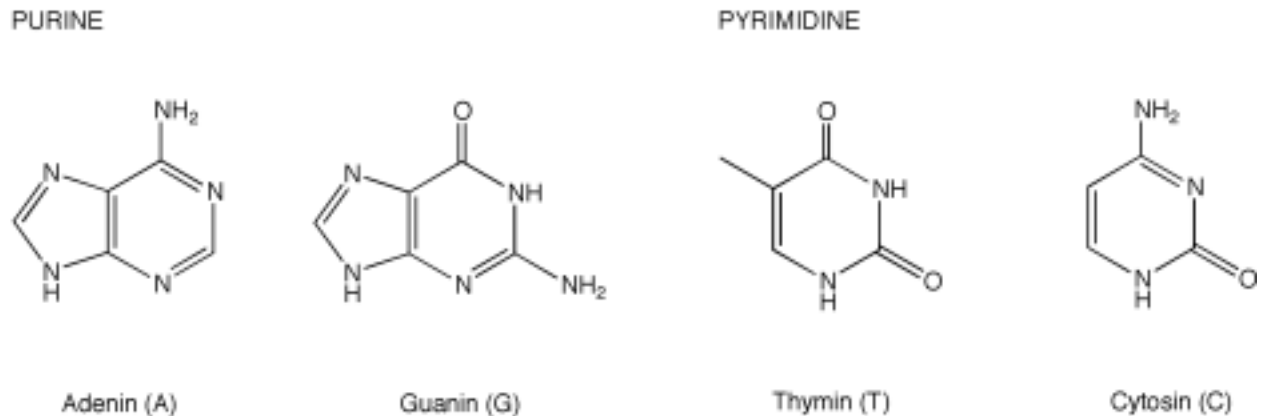


Abbildung 1: Die vier Basen der DNA

Jede Base ist mit einem bestimmten Zuckermolekül, der Desoxyribose, zu einem Nucleosid verknüpft. Diese Zucker sind dann wiederum miteinander über Phosphatgruppen zu einem Polymer, d.h. einem langen Molekül aus vielen gleichartigen, oder gleichartig verknüpften Grundbausteinen, verbunden. Ein DNA-Grundbaustein, das Nucleotid, besteht also aus einer Phosphatgruppe, einem Zucker und einer Base. Zur genaueren Beschreibung der Verknüpfung werden die Kohlenstoffatome des Zuckers durch Zahlen mit Apostroph gekennzeichnet, die 5'- und 3'- C-Atome benachbarter Zucker sind über Phosphatgruppen miteinander verbunden. Das eine Ende eines DNA-Strangs ist durch einen Zucker ohne Phosphatgruppe am 3'-C-Atom gegeben, das andere ohne am 5'-C-Atom. Durch die Verknüpfung der Zucker mit den Phosphatgruppen an bestimmten C-Atomen erhält der einzelne DNA-Strang damit eine Richtung (z.B. 3' nach 5').

Natürliche vorkommende DNA besteht im spannungsfreien Zustand normalerweise aus zwei einzelnen Polymersträngen, die sich über Wasserstoffbrücken wie ein Reißverschluß zu einem Doppelstrang zusammenlagern und antiparallel zueinander verlaufen, der eine Strang also von 3' nach 5', und der andere, komplementäre Strang von 5' nach 3'. Die Basen der beiden Einzelstränge bilden dabei Paare, wobei A immer nur T, und C immer nur G gegenüberstehen kann. Der DNA-Doppelstrang wiederum bildet eine 'Überstruktur' in Form einer Doppelhelix aus (Abbildung 2).

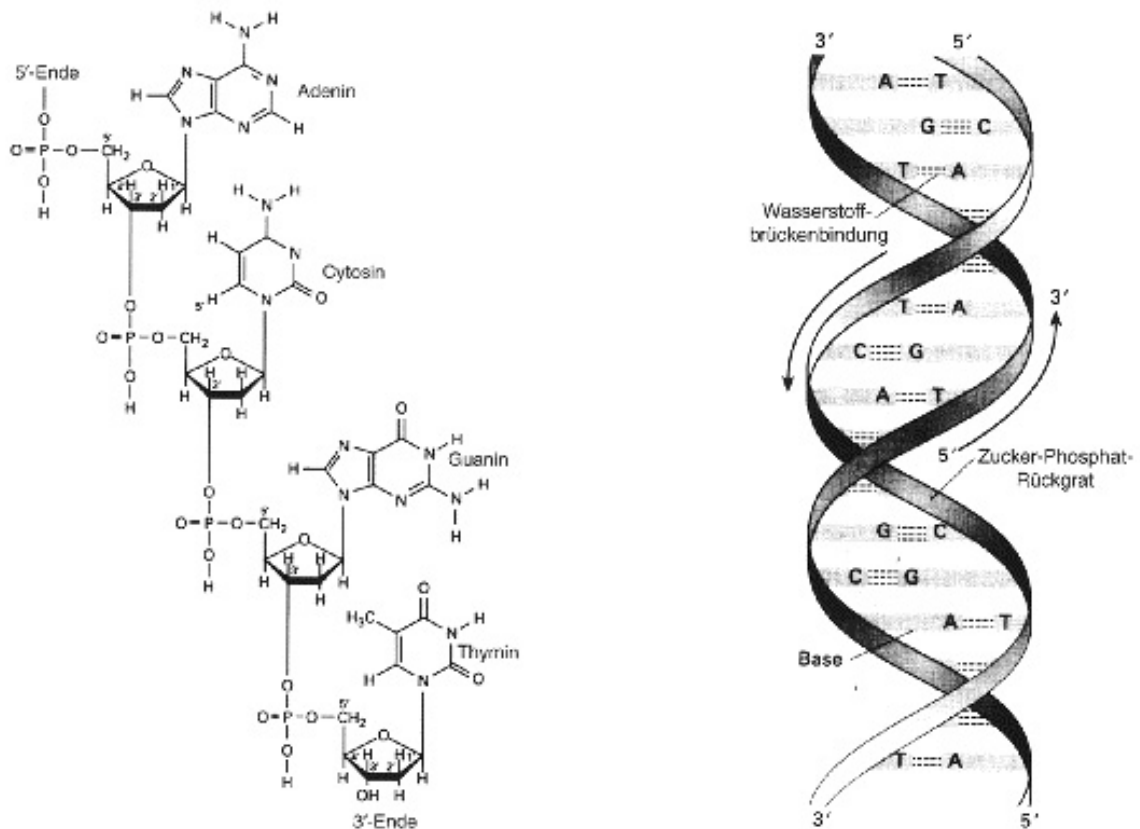


Abbildung 2: Verknüpfung der DNA-Basen über Zucker und Phosphatgruppen im DNA-Einzelstrang, und DNA- Doppelhelix

In vivo entsteht DNA vor einer Zellteilung unterstützt von Enzymen, die die DNA-stränge entlanglaufen, sie dabei lokal trennen und die jeweils komplementären Basen einbauen. Andere Enzyme reparieren Fehlpaarungen die z.B. auch durch UV-Strahlen oder Röntgenstrahlen erzeugt werden können. Viren versuchen in den Zellkern vorzudringen, um sich dort mit Unterstützung dieser und anderer Enzyme zu vermehren, bis die Zelle „aufgebraucht“ ist und stirbt.

Ausserhalb des Zellkerns gibt es viele Gefahren für die DNA in Form der DNA zersetzenden und schneidenden Moleküle, den DNAsen. Diese Enzyme schneiden DNA an ganz spezifischen Basenfolgen oder zerstückeln sie rasant in die einzelnen Basen. Solche Enzyme werden gentechnologisch gezielt eingesetzt um DNA zu manipulieren, aber sie lauern auch überall im Labor (in der Luft auf der Haut in den Kleidern, auf den Tischen...). Ihre Wirkung ist bei tiefen Temperaturen nahezu ausgeschaltet, weshalb DNA am besten im Tiefkühlschrank gelagert wird.

Deshalb DNA Proben nie unnötig außerhalb des Kühlschranks liegen lassen, geöffnete DNA Probenbehälter so schnell wie möglich wieder verschließen und zur Entnahme von DNA immer **sterile** Pipettenspitzen verwenden und immer in **sterile** Gefäße überführen und nur **sterile** Substanzen dazugeben.

Thermische Eigenschaften von DNA

Die beiden Stränge einer Doppelhelix trennen sich rasch, wenn die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen gelöst werden. Dies kann durch Erwärmen einer DNA-Lösung geschehen oder durch Säure- bzw. Alkalizugabe, die eine Ionisation der Basen zur Folge hat. Das Aufwinden der DNA wird Schmelzen genannt, weil es plötzlich bei einer bestimmten Temperatur eintritt. Die Schmelztemperatur, T_m , ist definiert als diejenige Temperatur, bei der die Helixstruktur zur Hälfte verlorengegangen ist. Die Abruptheit des Übergangs zeigt, dass die DNA-Doppelhelix eine höchst **kooperative** Struktur ist, die durch viele sich addierende Bindungen zusammengehalten wird; ihre Stabilität verdankt sie dabei nicht nur der Basenpaarung (H-Brücken), sondern auch der Basenstapelung (Wechselwirkung der π -Elektronen benachbarter Basenpaare).

Der Schmelzpunkt eines DNA-Moleküls hängt stark von seiner Länge und der Basenzusammensetzung ab. Oberhalb einer Länge von etwa 200 Basenpaaren nimmt er jedoch nur noch vernachlässigbar zu. Allgemein besitzt DNA mit vielen GC-Basenpaaren (drei H-Brücken, vgl. Abb. 1 und 2) einen höheren T_m -Wert als DNA mit überwiegend AT-Anteil (nur zwei H-Brücken), wobei T_m für viele DNA-Arten linear mit dem GC-Gehalt steigt. Typischerweise erhöht sich der Schmelzpunkt für ein 'unendlich' langes DNA-Molekül von 77°C auf 100°C, wenn der Anteil der GC-Paare von 20% auf 78% ansteigt. Entlang eines langen DNA-Doppelstranges schmelzen deswegen AT-reiche Bereiche zuerst. In vivo wird die DNA zusätzlich durch spezifische Proteine (Helikasen) entspiralisiert.

Getrennte komplementäre DNA-Stränge lagern sich spontan wieder zu Doppelsträngen zusammen, wenn die Temperatur wieder unter T_m gesenkt wird. Diese Renaturierung bezeichnet man auch als 'annealing'. Für kürzere DNA-Stränge, die nur etwa 10-20 Basenpaare enthalten ('Oligos'), kann dieser Prozess mehrere Stunden dauern. Die Leichtigkeit, mit der Doppelhelices geschmolzen und wieder reassoziert werden können, ist entscheidend für die biologischen Funktionen der DNA.

Mechanische Eigenschaften von DNA

Eine auffallende Eigenschaft natürlich vorkommender DNA-Moleküle ist ihre Länge. Sie müssen sehr lang sein, um die selbst in den einfachsten Zellen enorm grosse Anzahl von Proteinen zu codieren. Das Chromosom von E.coli ist zum Beispiel ein einziges Molekül doppelsträngiger DNA mit etwa vier Millionen Basenpaaren, und einer Molekülmasse von $2,6 \cdot 10^6$ kD. Bei einem Durchmesser von nur 2 nm hat es eine Länge von 1,4 mm. Die Länge von DNA liegt damit im mikroskopischen, die Dicke jedoch nur im atomaren Bereich. Solche stark asymmetrischen Moleküle sind sehr anfällig für eine Spaltung durch Scherkräfte, und zerbrechen daher leicht in Stücke, deren Masse tausendmal geringer ist als die des ursprünglichen Moleküls, wenn man bei ihrer Isolation nicht unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen arbeitet.

Das Interesse gilt aber natürlich eher den mechanischen Eigenschaften einzelner intakter DNA-Moleküle und den bei der DNA-Basenpaarung auftretenden Kräften und Wechselwirkungen. So muss, wie bereits erwähnt, bei der DNA-Transkription

beispielsweise das Enzym RNA-Polymerase die DNA-Doppelhelix lokal entwinden und die Basenpaare trennen, um die DNA abzulesen und sogenannte *messenger*-RNA herzustellen, aus der dann mit Hilfe des genetischen Codes Proteine hergestellt werden. Bei der Zellteilung muß die Doppelhelix sogar vollständig aufgetrennt werden. Die Expression und Regulation bestimmter Gene, also die Frage, welches Protein wann hergestellt werden soll, wird u. a. über die Torsionsspannung innerhalb bestimmter Bereiche der DNA gesteuert. Auch die Wirksamkeit vieler Krebsmedikamente, sogenannter Cytostatica, beruht darauf, dass sie insbesondere die mechanische Stabilität von DNA nachhaltig beeinflussen und so in die oben genannten Prozesse eingreifen. Die zum Aufbrechen der DNA-Doppelhelix nötigen Kräfte spielen aber auch bei zahlreichen technischen Anwendungen, wie etwa Gentests oder Expressionsanalysen mit sogenannten *DNA-Chips*, oder dem oft vorgeschlagenen Sequenzieren von DNA durch mechanisches Auseinanderziehen der Doppelhelix eine wichtige Rolle.

Experimentelle Techniken

UV/Vis-Spektroskopie

Absorption elektromagnetischer Strahlung

In einem Spektrometer geht die von einer Strahlungsquelle ausgesandte elektromagnetische Strahlung zunächst durch einen Monochromator, der nur Strahlung einer bestimmten Wellenlänge durchläßt, die dann wiederum durch die zu vermessende Probe hindurchgeschickt wird. Die Probe befindet sich in einer Meßzelle, einer Küvette. Der Teil der elektromagnetischen Strahlung, der von der Probe nicht absorbiert wird, verläßt die Küvette und wird von einem Detektor aufgefangen, der an ein Anzeigegerät angeschlossen ist. Speziell für die UV/VIS-Spektrometrie liefert die Strahlungsquelle die entsprechende sichtbare und UV-Strahlung.

Fällt Licht der Intensität I auf ein absorbierendes Medium, hier eine Lösung der Konzentration c , so wird es um dI abgeschwächt. Die Abschwächung ist proportional zum durchlaufenen Weg ds , der Konzentration c und der eingestrahnten Intensität I :

$$dI = -k(\lambda) I c ds \quad (1)$$

Der Proportionalitätsfaktor $k(\lambda)$ ist der wellenlängenabhängige Absorptions- oder Extinktionskoeffizient. Nach Integration der Gleichung 1 erhält man das Lambert-Beersche Gesetz:

$$I = I_0 \exp(-k(\lambda) \cdot c \cdot s) = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cs} \quad (2)$$

Dabei sind I die transmittierte und I_0 die ursprünglich eingestrahnte Intensität. Die dimensionslose Größe $E = \varepsilon(\lambda)cs$ heißt Extinktion oder optische Dichte, das Verhältnis $T = I / I_0$ Durchlässigkeit oder Transmission. Anstelle der Durchlässigkeit T wird oft die Absorption $A = 1 - T$ angegeben. k und ε unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer Exponentialbasis: $\varepsilon = k \log e$.

Absorptionsmessungen können sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse verwendet werden. Für die qualitative Analyse sind die Lage des Maximums bzw. der Maxima und die Intensität und Form der Absorptionsbanden von Bedeutung, da sie für die absorbierende Substanz charakteristisch sind. Zwar ist die eindeutige Identifizierung von unbekanntem Substanzen in Gemischen meist nicht möglich, aber für reine Substanzen ist die Zuordnung einer Struktur durch Vergleich des Spektrums mit den betreffenden katalogisierten Spektren in der Regel durchführbar.

Quantitative Bestimmungen mit dem Spektrometer werden meist bei der Wellenlänge (oder in dem Wellenlängenbereich) des Maximums der stärksten Absorptionsbande durchgeführt. Ist allerdings die Absorption zu groß (ca. 80 %) oder die betreffende Bande gestört, so geht man zweckmäßig zu einer schwächeren Bande über.

Quantitative Analysen werden überwiegend mit Hilfe von Kalibrierkurven durchgeführt. Für mehrere Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz trägt man die gemessene Extinktion auf der Ordinate gegen die Konzentration auf der Abszisse auf, so dass man bei Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes eine Kalibriergerade erhält, die durch den Koordinatenursprung geht. Nach der Erstellung der Kalibrierkurve mißt man die Extinktion der Lösung mit der unbekanntem Konzentration der betreffenden Substanz. Aus der Kalibrierkurve ergibt sich dann sofort der zur gemessenen Extinktion zugehörige Konzentrationswert. Alle Messungen müssen bei der gleichen Wellenlänge, mit der gleichen Referenzküvette und bei gleicher Temperatur durchgeführt werden. Für genaue Messungen ist eine Temperaturkonstanz von etwa ± 1 K erforderlich.

Die quantitative Analyse bei Gemischen basiert auf dem additiven Verhalten der Extinktionswerte. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Absorptionsspektren der vorliegenden Substanzen und die Extinktionskoeffizienten bei den zu wählenden Wellenlängen bekannt sind, dass das Lambert-Beersche Gesetz für jede Komponente gilt, dass die Kalibrierkurven sämtlich durch den Nullpunkt gehen und dass keine gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Verbindungen eintritt. Abbildung 3 zeigt schematisch das Absorptionsspektrum eines Gemisches von zwei Verbindungen mit sich überlappenden Banden.

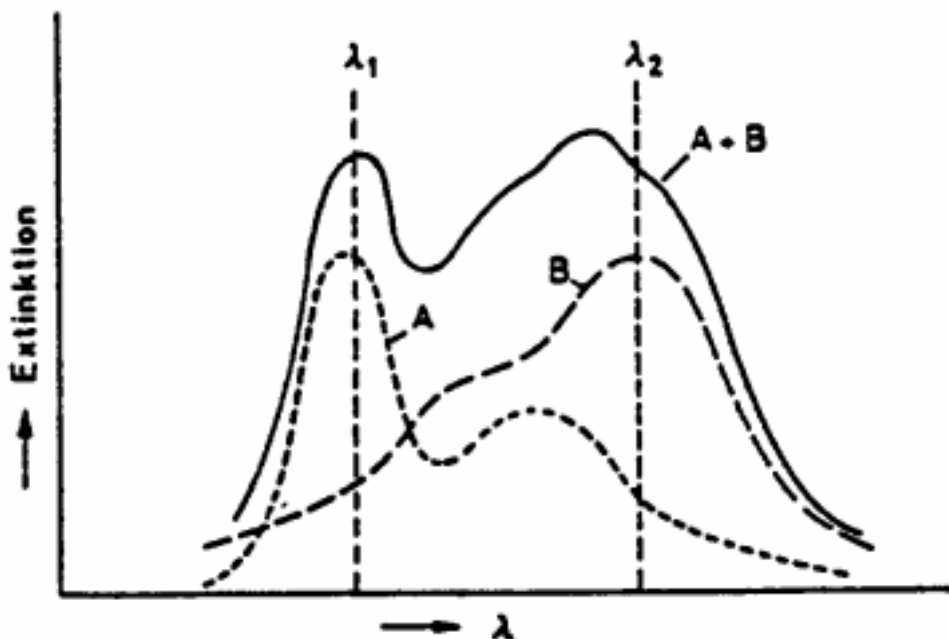


Abbildung 3: Absorptionsspektrum eines Gemisches von zwei Verbindungen A und B

In einer Lösung, in der sich zwei Verbindungen A und B in den unbekanntem Konzentrationen c_A und c_B mit sich überlappenden Absorptionsbanden befinden entspricht die Absorptionskurve der jeweiligen Summe der Extinktionen der Einzelverbindungen. Man misst nun die Extinktionen E_1 und E_2 des Gemisches bei zwei verschiedenen Wellenlängen λ_1 und λ_2 , die man so auswählt, dass sich die

Extinktionen der Einzelverbindungen möglichst stark unterscheiden. Bezeichnet man die molaren Extinktionskoeffizienten von A und B bei λ_1 mit $\varepsilon_1(A)$ und $\varepsilon_1(B)$ und bei λ_2 mit $\varepsilon_2(A)$ und $\varepsilon_2(B)$ so gilt:

$$E_1 = \{\varepsilon_1(A) c_A + \varepsilon_1(B) c_B\} \cdot s \quad (3a)$$

$$E_2 = \{\varepsilon_2(A) c_A + \varepsilon_2(B) c_B\} \cdot s \quad (3b)$$

Durch Lösen dieses linearen Gleichungssystems erhält man die gesuchten Konzentrationen c_A und c_B :

$$c_A = \frac{\{\varepsilon_2(B)E_1 - \varepsilon_1(B)E_2\}}{s \cdot \{\varepsilon_1(B)\varepsilon_2(A) - \varepsilon_1(A)\varepsilon_2(B)\}} \quad (4a)$$

$$c_B = \frac{\{\varepsilon_2(A)E_1 - \varepsilon_1(A)E_2\}}{s \cdot \{\varepsilon_1(B)\varepsilon_2(A) - \varepsilon_1(A)\varepsilon_2(B)\}} \quad (4b)$$

Dieses Verfahren läßt sich im Prinzip auf Mischungen beliebig vieler Komponenten ausdehnen, wobei die Extinktionsmessungen bei einer der Anzahl der Komponenten entsprechenden Anzahl von Wellenlängen durchgeführt werden müssen. Das Lösen der dann immer umfangreicher werdenden Gleichungssysteme kann mit Computern automatisch erfolgen.

Die UV/VIS-Spektrometrie ist jedoch nicht nur für Konzentrationsbestimmungen geeignet. Da Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz sich im allgemeinen durch das Auftreten von Gleichgewichten (einschließlich Assoziationsgleichgewichten) und zeitlichen Veränderungen des Meßsystems erklären lassen, kann man mit Hilfe der UV/VIS-Spektrometrie diese Gleichgewichte untersuchen und die Kinetik chemischer Reaktionen verfolgen. Die einzige Voraussetzung dafür ist, dass mindestens eine beteiligte Komponente im ultravioletten oder sichtbaren Bereich absorbiert.

Anwendung der UV/Vis-Methode zur Bestimmung der Schmelzenthalpie von DNA

Das Schmelzen der DNA lässt sich leicht durch Messung der Extinktion bei 260 nm verfolgen. Infolge des Zusammenbruchs der Basenpaarung nimmt die Extinktion zu - ein Effekt, der als Hyperchromie bezeichnet wird.

Zur Bestimmung der Freien Enthalpie der Basenpaarung wird in UV-Untersuchungen an wässrigen Lösungen meist auf sehr kurze DNA-Stränge mit jeweils 4 - 30 Basen ('Oligos') zurückgegriffen, da deren Schmelzpunkte im zugänglichen Temperaturbereich liegen. Für eine saubere UV-spektroskopische Bestimmung sollte T_m daher nicht viel höher als 70°C liegen. In diesem Versuch wird für die UV-Spektroskopie ein 15mer verwendet.

Abbildung 4 zeigt links qualitativ den Verlauf der UV-Spektren einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA. Rechts ist die normalisierte Absorption von Lösungen eines DNA-Oligos gegen die Temperatur aufgetragen. Die konzentrationsabhängigen Schmelzpunkte können aus den Wendepunkten der Kurve ermittelt werden, in dem gezeigten Beispiel liegen sie in Abhängigkeit der Konzentration zwischen 45 und 55°C.

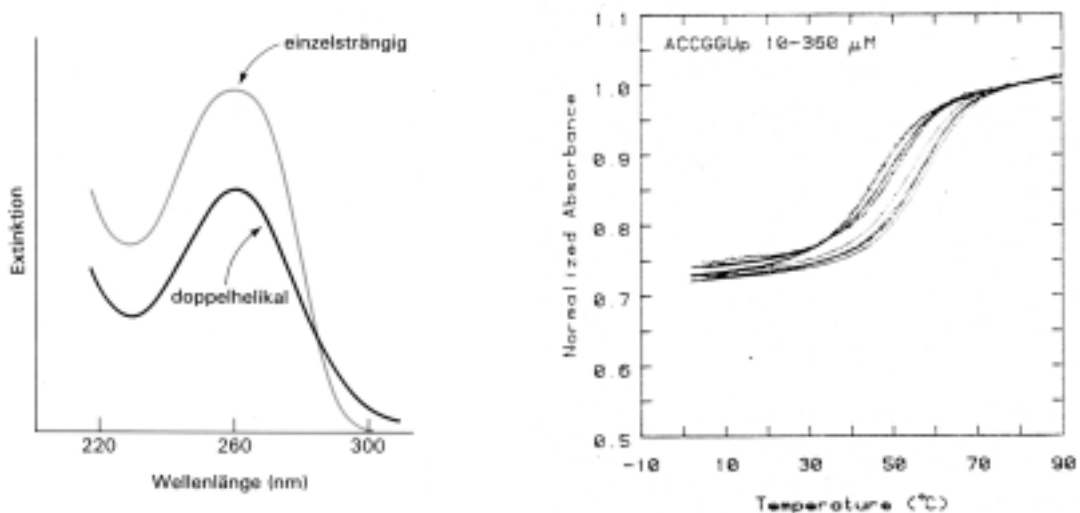


Abbildung 4:

links: Zunahme der Extinktion einer DNA-Lösung, wenn die Doppelhelix zu Einzelsträngen schmilzt; rechts: Temperaturabhängigkeit der Extinktion eines DNA-Oligos (6-mer) in gepufferter Lösung bei $\lambda = 280$ nm. Die verschiedenen, bei DNA-Konzentrationen von 10 bis 360 μM gemessenen Kurven sind auf die maximale Extinktion bei 80°C normiert. Die Schmelztemperatur ergibt sich jeweils aus den Wendepunkten der Kurven (Hybridisierungsgrad $\alpha = 0,5$). Sie nimmt mit zunehmender DNA-Konzentration zu (Abbildung aus M. Petersheim, D. H. Turner, Biochemistry (1983), 22, 256-263).

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit von T_m erlaubt einen direkten Zugang zur Gleichgewichtskonstanten der DNA-Hybridisierung und damit eine sehr genaue Bestimmung der freien Schmelzenthalpie des DNA-Doppelstranges. Sie kann aber in guter Näherung auch durch Anfitzen der bei einer einzigen gegebenen DNA-Konzentration gemessenen Extinktions-Temperatur-Kurve ermittelt werden. Wie oben

beschrieben setzt sich die bei einer bestimmten Wellenlänge gemessene Extinktion bei ausreichender Verdünnung additiv aus den individuellen Beiträgen der einzelnen Komponenten zusammen. Für die Gleichgewichtsreaktion der DNA-Hybridisierung



ergibt sich damit der temperaturabhängige Extinktionskoeffizient der Lösung einfach gemäß:

$$\varepsilon(T) = A(T)/l \cdot c_T = \alpha \cdot \varepsilon_{\text{ds}} + (1 - \alpha) \cdot \varepsilon_{\text{ss}} \quad (5)$$

wobei $A(T)$ die Adsorption der Lösung, l die optische Pfadlänge, c_T die Gesamtkonzentration an DNA-Strängen, α den Hybridisierungsgrad (d.h. den Anteil hybridisierter DNA-Stränge), und ε_{ss} sowie ε_{ds} die Extinktionskoeffizienten einzel- bzw. doppelsträngiger DNA bei der gegebenen Wellenlänge darstellen. Letztere können in erster Näherung als lineare Funktionen der Temperatur angenommen werden:

$$\varepsilon_{\text{ds}} = m_{\text{ds}} \cdot T + b_{\text{ds}} \quad (6a)$$

$$\varepsilon_{\text{ss}} = m_{\text{ss}} \cdot T + b_{\text{ss}} \quad (6b)$$

m_{ds} , b_{ds} , m_{ss} und b_{ss} werden bei ausreichender Zahl von Messkurven für unterschiedliche DNA-Konzentrationen als variable Fitparameter behandelt. Für diesen Versuch werden sie der Einfachheit halber aus den temperaturabhängigen Absorptionsspektren eines der beiden verwendeten einzelsträngigen DNA-Oligos (m_{ss} und b_{ss}) und von λ -phage DNA (m_{ds} und b_{ds}), welche im hier zu untersuchenden Temperaturintervall praktisch nicht aufschmilzt und ausschliesslich als Doppelstrang vorliegt, ermittelt. Damit wird der Hybridisierungsgrad α zum einzigen freien Parameter in Gleichung (5), und lässt sich direkt aus dem Extinktionskoeffizienten ermitteln. Daraus ergibt sich wiederum direkt die Gleichgewichtskonstante und die Freie Reaktionsenthalpie ΔG° der Hybridisierungsreaktion, und aus deren Temperaturabhängigkeit lassen sich schliesslich die weiteren thermodynamischen Grössen ΔH° und ΔS° bestimmen.

$$K = \frac{\alpha}{2(1 - \alpha)^2 \cdot c_T} = \exp\left(-\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}\right) \quad (7)$$

AFM-Kraftspektroskopie

Mechanische Experimente mit einzelnen Molekülen

Durch die Entwicklung neuer apparativer Methoden zur präzisen Messung von Kräften im pN-Bereich sind in den letzten Jahren mechanische Experimente mit Einzelmolekülen möglich geworden. Dabei erschliessen die verfügbaren Techniken wie magnetische und optische Pinzetten, Glasmikronadeln und das Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope, AFM) ein breites Kraft- und Geschwindigkeitsfenster, mit dem intra- und intermolekulare Wechselwirkungen von entropischen Kräften bei einigen Femtonewton bis zum Bruch kovalenter chemischer Bindungen bei wenigen Nanonewton auf der Ebene des Einzelmoleküls untersucht werden konnten. Einzelmolekül-Kraftexperimente haben sich so inzwischen zur strukturellen und funktionellen Untersuchung von Biomolekülen in natürlicher Umgebung etabliert und zahlreiche theoretische Ansätze für das Verständnis der komplexen und dynamischen Wechselwirkungen in biologischen Systemen angeregt.

Bei der AFM-Kraftspektroskopie werden einzelne Polymerketten zwischen der Spitze eines AFM-Cantilevers und einer Substratoberfläche eingespannt und gestreckt (Abbildung 5). Aus den hierbei ermittelten Kraft-Dehnungs-Kurven können quantitative Informationen zur Elastizität einzelner Polymere gewonnen, Konformationsumwandlungen entlang der Ketten oder die Ausbildung von Überstrukturen auf Einzelmolekülebene untersucht werden.

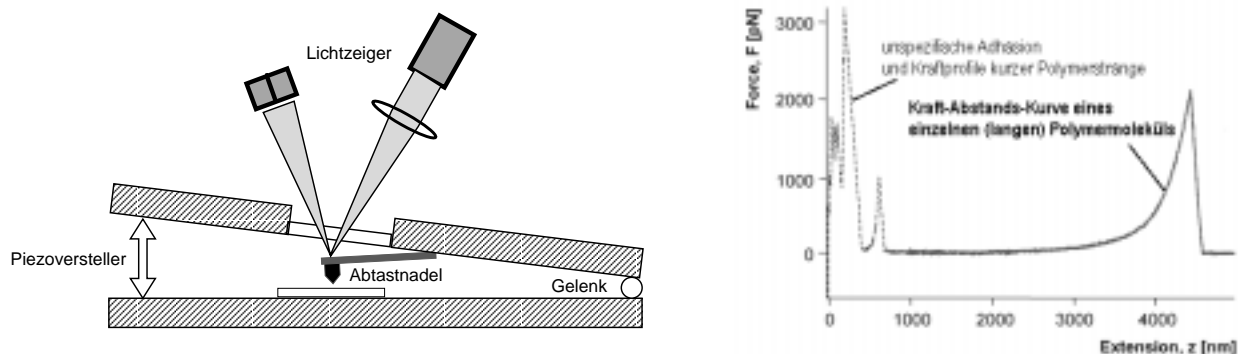


Abbildung 5

links: Schematischer Aufbau eines AFM-Kraftspektrometers

rechts: Kraft-Abstands-Kurve einer zwischen AFM-Cantilever und Substrat eingespannten Polymerkette

Da die Verwendung eines speziell für Einzelmolekülmessungen optimierten AFM's in der Versuchsanleitung 'AFM-Kraftspektroskopie' genau erklärt wird, wird hier nicht weiter darauf eingegangen. Im nächsten Abschnitt werden aber die wichtigsten Informationen zur Mechanik von DNA, welche für diesen Versuch benötigt werden, noch kurz zusammengefasst.

Kraftkurven von DNA, Bestimmung der mechanischen Schmelzenergie

Eine typische, mit dem AFM gemessene Kraft-Abstandskurve doppelsträngiger DNA (dsDNA) ist in Abbildung 6 gezeigt.

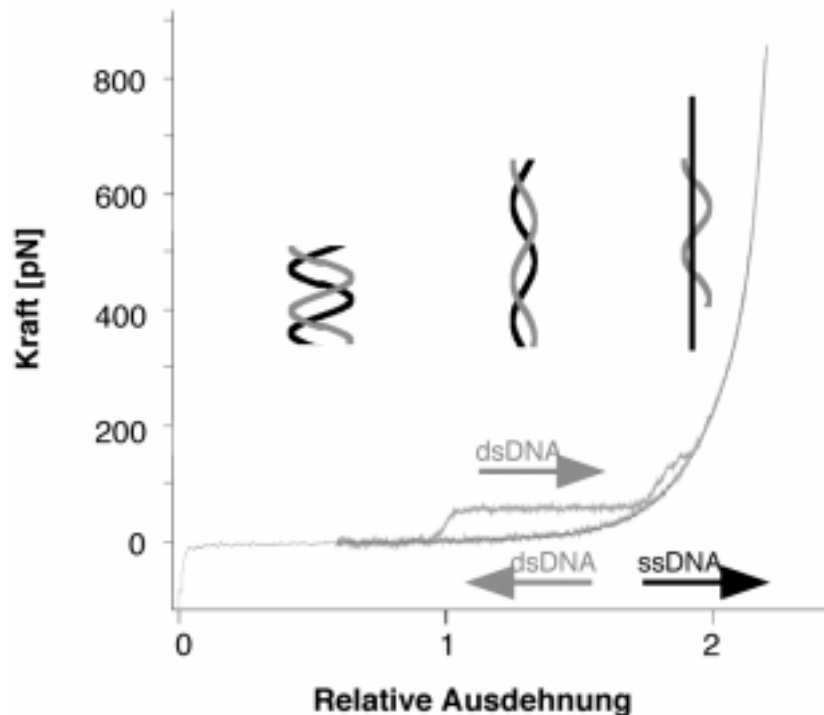


Abbildung 6: Typische Kraftkurve von DNA

Bis etwa 35 pN werden die mechanischen Eigenschaften von der Entropieelastizität des semiflexiblen Moleküls dominiert. Danach dominieren lineare enthalpische Beiträge, bis das Molekül bei 65 pN von der natürlichen B-Doppelhelixkonformation in die um den Faktor 1,7 überstreckte S-Konformation übergeht, die sich in der Kraft-Dehnungs-Kurve in einem Plateau konstanter Kraft widerspiegelt. Wird das Molekül über den B-S-Übergang hinaus gestreckt, so zeigt sich bei etwa 150 pN eine erneute Zunahme der Elastizität (Abflachen der Kraftkurve), was auf eine weitere Konformationsänderung hindeutet. Erst nachdem das Molekül fast auf das Doppelte seiner Konturlänge überstreckt worden ist, nimmt die Elastizität wieder ab, und die Kraft, die zum weiteren Strecken des Moleküls nötig ist, nimmt deutlich zu. Andererseits zeigt die anschließend aufgenommene Relaxationskurve (untere graue Kurve) einen glatten Verlauf, ohne die Konformationsänderungen der Dehnkurve.

Die deutliche Hysterese zwischen Dehnungs- und Relaxationskurve deutet darauf hin, daß während des Überstreckens eine massive strukturelle Umwandlung stattgefunden hat. Außerdem gleicht die Relaxationskurve der Kraft-Abstands-Kurve von einzelsträngiger DNA (schwarze Kurve, ssDNA), die selbst keine Hysterese zeigt und wie die Relaxationskurve einem glatten Kurvenverlauf ohne größere strukturelle Umwandlungen folgt. Die beiden Kurven lassen sich perfekt überlagern, was darauf hinweist,

dass es sich bei dem bei 150 pN beobachteten Konformationsübergang um ein kraftinduziertes Schmelzen der DNA-Doppelhelix handelt.

Es soll in diesem Versuch überprüft werden, inwieweit die beim Strecken doppelsträngiger DNA bis zum mechanischen Aufschmelzen in der Doppelhelix deponierte mechanische Energie mit der in den UV-Messungen ermittelten Freien Enthalpie der Basenpaarung vergleichbar ist. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die durch Integration der dsDNA-Streckkurve bestimmte mechanische Energie noch einen Beitrag des auch nach dem Schmelzen noch gestreckten Einzelstranges enthält (der abgeschmolzene Strang relaxiert). Dieser kann aber leicht aus der anschliessend gemessenen Relaxationskurve ermittelt werden, so dass sich die 'mechanische Schmelzenergie' von DNA aus den Kraft-Abstands-Kurven zu

$$E_{bp} = \int (F_{ds}(z) - F_{ss}(z)) dz \quad (8)$$

ergibt.

Um die im Versuch einerseits an kurzen DNA-Oligos (UV-Messungen) und andererseits an einigen Mikrometern langer λ -phage DNA (AFM-Messungen) ermittelten Schmelzenergien vergleichen zu können, müssen die beiden Ergebnisse als mittlere Energien pro Basenpaar angegeben werden. Während dies in UV-Messungen einfach ist, da dort ja die Länge der verwendeten Oligos bekannt ist, sind die Längen der in AFM-Experimenten vermessenen DNA-Stränge von Fall zu Fall unterschiedlich. Es ist aber bekannt, dass gestreckte DNA bei 35 pN vollständig gestreckt, jedoch noch nicht überdehnt ist, so dass bei dieser Kraft die Konturlänge des Doppelstranges ermittelt werden kann. Ein Nucleotid, also die DNA-Länge pro Basenpaar entspricht 0,34 nm. Damit kann für jede gemessene Kraftkurve auch hier die Anzahl der Basen im gestreckten DNA-Molekül angegeben, und die mechanische Schmelzenergie pro Basenpaar angegeben werden.

Aufgabenstellung

Teil 1: Untersuchung des thermischen Schmelzens von DNA-Oligos mit UV/Vis-Spektroskopie

Verwendete DNA-Oligos

Es wird ein doppelsträngiger DNA-Oligo (15 bp) untersucht, von denen ein Strang die Sequenz 5'-CTG ACT AGC TGC ATG-3' aufweist (welche Sequenz hat der andere komplementäre Strang?)

Probenvorbereitung

Die doppelsträngigen DNA-Oligos werden als 50µl-Aliquot Stammlösung in HEPES-Puffer zur Verfügung gestellt. Die Konzentration dieser Stammlösung (1 mM DNA-Doppelstränge) ist jedoch für die UV/Vis-Untersuchungen noch zu hoch. Für die Spektroskopie wird etwa 1 ml einer 50 µM Lösung benötigt. Die Stammlösung wird deswegen durch Zugabe von HEPES-Puffer verdünnt, in dem zuvor die Elektrolyt-konzentration noch auf 150 mM NaCl eingestellt werden muss (Molekulargewicht von NaCl \approx 58,5 g/mol).

Für die UV-Spektroskopie geeignete Quarzküvetten mit einem Volumen von ca. 0,5 ml werden vor der Messung mit Ethanol und entionisiertem Wasser (dreimal) gespült, und mit Stickstoff trocken geblasen.

Durchführung der UV-Messungen

Zunächst soll ein UV-Spektrum der DNA-Oligolösung bei Raumtemperatur im Bereich von 200 bis 600 nm gemessen werden, um zu überprüfen ob die Konzentration der Lösung richtig eingestellt wurde. Dabei wird zunächst eine Referenzmessung durchgeführt (baseline bzw. Autozero), bei der zwei Küvetten mit dem reinen Puffer gegeneinander vermessen werden. Dann wird die Probenküvette mit der DNA-Oligolösung gefüllt (gleiche Küvette verwenden, es reicht wenn der Puffer so gut wie möglich ausgeleert wird), und das Spektrum gegen die Referenzprobe gemessen. Die Absorption bei 260 nm wird notiert.

Anschliessend wird am angeschlossenen Temperaturregler ein Heiz- und Kühlzyklus eingestellt, um die UV-Absorption der Probenlösung bei 260 nm im Temperaturbereich von 25 bis 85°C zu verfolgen. Der Zyklus besteht aus einer 10-minütigen Äquilibration bei 25°C, anschliessend wird mit 1°C/min auf 85°C erhitzt, wo wiederum für 10 Minuten äquilibriert wird, bevor das Abkühlen mit der gleichen Rate beginnt (bitte im Zweifel die Einstellung am Regler vom Betreuer vornehmen lassen!).

Das UV-Spektrum und die temperaturabhängige Absorptionskurve (gegen die Zeit) werden am angeschlossenen PC aufgezeichnet. Die spätere Auswertung erfolgt an einem anderen Rechner (Dateien auf Diskette speichern).

Auswertung der UV-Daten

Die aufgezeichnete Absorptions-Zeit-Kurve wird in Igor geladen, und dort mit den vorinstallierten Makros nach Gleichungen (5) und (6) angefitet. Die Parameter m_{ss} , m_{ds} , b_{ss} und b_{ds} werden aus den ausgegeben temperaturabhängigen Spektren für einzelsträngigen DNA-Oligo und doppelsträngige λ -phage DNA ermittelt.

Berechnen Sie aus den Fitwerten die mittlere freie Enthalpie für eine DNA-Basenpaarung!

Teil 2: Untersuchung des mechanischen Schmelzens von DNA mit AFM-Kraftspektroskopie

Verwendete DNA

Die verwendete DNA (Lambda Bst E II digest) besteht aus einer Mischung verschiedener Moleküle, die durch das Schneiden des kompletten DNA Moleküls eines lambda-Phagen (47,5 Kilobasen) mit der Endonuklease Bst E II entsteht. Dieses Enzym spaltet die DNA an Stellen mit einer bestimmten Basenfolge, so dass aus jedem kompletten Molekül 14 Stücke bestimmter, aber verschiedener Sequenz zurückbleiben. Die Mischung der geschnittenen Moleküle (digest) wird in gereinigter Form auch als Marker bei der Gelelektrophorese eingesetzt und ist deshalb kommerziell erhältlich.

Probenpräparation

Die Messung wird durchgeführt in PBS (Phosphate Buffered Saline), der einfach durch Auflösen einer Tablette in deionisiertem Wasser hergestellt werden kann.

(Warum verwendet man Pufferlösung?)

Man pipettiert ca. 70 μ l einer DNA-Lösung mit einer Konzentration von etwa 100 μ g/ml auf eine Goldoberfläche. Die Probe wird dann bei einer Temperatur von ca. 60°C etwa 40 Minuten getrocknet. Danach wird die Probe mit Pufferlösung gespült und in das Kraftspektroskop gelegt.

*Im Chemielabor bitte die Laborregeln beachten und im Zweifel immer den Betreuer fragen... ..bitte **n i c h t** erst wenn's schon zu spät war...*

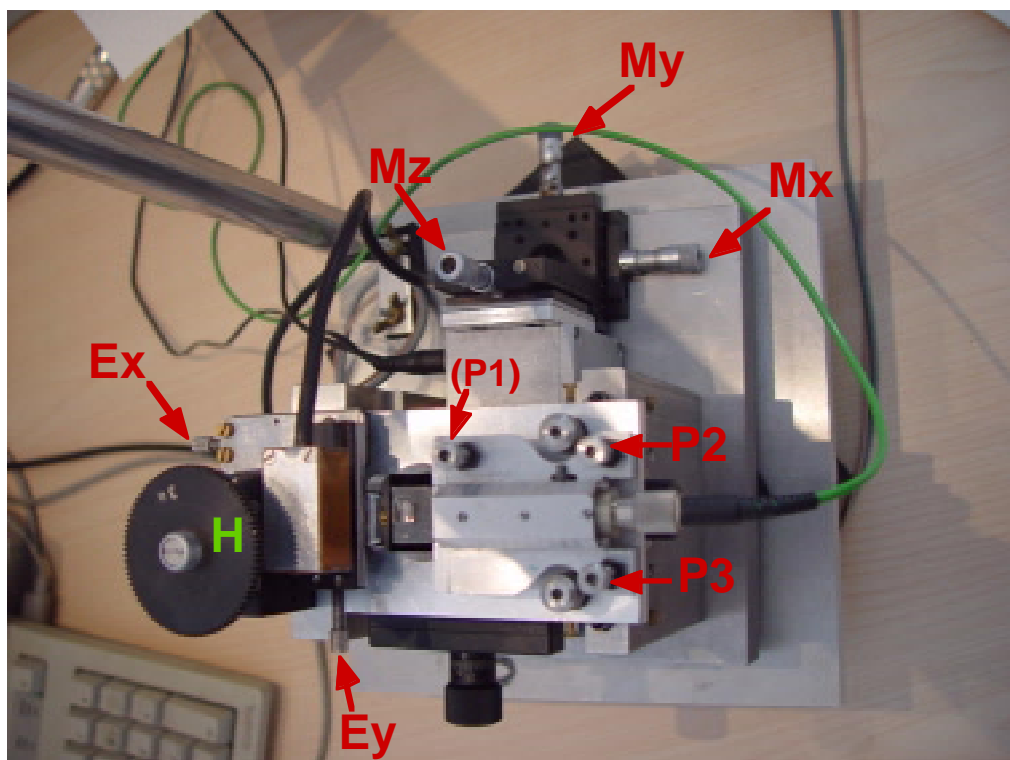
Der Versuchsaufbau

Inbetriebnahme

Hauptnetzsteckerleiste einschalten, Geräte einschalten, Computer starten.

Grundeinstellung des Kraftspektroskops

Zuerst wird die Höhenverstellschraube (###H###) durch Drehung im Uhrzeigersinn bis an den Anschlag „hoch“ gedreht, damit beim Aufsetzen des Kraftspektroskopes der empfindliche Sensor nicht durch unkontrollierten Kontakt mit der Probe zerstört wird. Für den Betrieb des Kraftspektroskops wird eine kommerziell gefertigte Sensorfeder (Cantilever) mit feiner Spitze verwendet, die in einen Plexiglasträger eingebaut ist. Dieser Träger wird vorsichtig in die Einschubhalterung des Kraftspektroskopes eingeführt. Das Kraftspektroskop wird auf die Halterung mit dem Probenstisch und dem Mikroskop in den dafür vorgesehenen Vertiefungen platziert. Der Plexiglasträger taucht nach vorsichtigem Absenken mittels der Höhenverstellschraube (###H###) in die Messlösung auf der Probenhalterung soweit ein, daß der goldene Sensorchip sich vollständig in Flüssigkeit befindet. Das Plexiglas kann vom Laserstrahl problemlos durchdrungen werden und definiert einen glatten Übergang (ohne Wellen) in die Meßlösung (hier PBS). Zunächst wird mit Hilfe des Mikroskops unter dem Kraftspektroskop die Sensorfeder gesucht und fokussiert. (Dabei nicht mit dem Objektiv gegen das Objektgläschen stoßen, da sonst zum einen die Linse zerkratzt und zum anderen das Gläschen gegen den Sensor gedrückt wird und ihn zerstört.) Dazu die Einstellschrauben (###Mxyz###) verwenden und die Beleuchtung möglichst so platzieren, daß das Monitorbild etwa gleichmäßig erleuchtet ist. Zur groben Voreinstellung senkrecht von oben durch den Plexiglasträger blicken und mit (###Mxy###) die Objektivlinse genau unter die Sensorfedern bewegen. Anschließend mit (###Mz###) den Fokus einstellen, und den größten Cantilever (rechtes großes Dreieck###) auswählen. Ist der Sensor auf dem Monitor scharf eingestellt, wird die LASERdiode am Schlüssel (###S###) in der Steuereinheit einschaltet: grüne KontrollLED sollte brennen. Dann wird der Laserstrahl mit etwas Geduld und Fingerspitzengefühl mit Hilfe der zwei Positionierschrauben (###P23###) so justiert, daß er zunächst überhaupt auf dem Bildschirm erscheint. Zur Grobjustierung wieder von oben senkrecht durch den Plexiglashalter blickend den kleinen roten LASERlichtpunkt mit (###P23###) so bewegen, daß er ins Objektiv trifft. (###P1###



kann zum Verstellen des Fokus verwendet werden – also lieber nicht verdrehen. -Falls doch geschehen, Betreuer Bescheid geben). Dann das Zentrum der Leuchtringe auf den Bildschirm justieren und es genau auf die goldbedampfte Rückseite der Sensorfeder bringen (###siehe skizze###). Jetzt muß nur noch der Detektor an den Einstellschrauben (###Exy###) in die Mitte des reflektierten Strahls bewegt werden. Die Mitte ist genau dann erreicht, wenn das Summensignal (a+b) (Anzeige ###a+b###) der beiden Detektorsegmente a und b maximal, und der Betrag des Differenzsignals (a-b) (Anzeige ###a-b###) minimal ist.



(Je nach Zeit kann die Justierung auch vom Betreuer vorgenommen werden.)

Jetzt ist der Sensor einsatzbereit und wird **vorsichtig** mit der Stellschraube (###H###) an die Probenoberfläche angenähert. Wenn das a-b Signal dabei langsam wegdriftet (Temperaturdrift und veränderter Einfall des Raumlichtes) wird es an der Detektoreinstellschraube (###Ex###) wieder auf Null nachgeregelt. Wenn das a-b Signal sich schlagartig ändert, berührt die Spitze die Oberfläche. **Sofort stoppen!!!** Die Einstellschraube nun wieder so weit von der Oberfläche wegdrehen bis das Signal wieder Null ist und dann noch etwa eine zehntel Umdrehung weiter weg. Jetzt kann das Lichtmikroskop nachgeregelt werden (mit (###Mz###) nach unten! drehen, denn der Sensor wurde abgesenkt) um wieder ein scharfes Bild am Bildschirm zu sehen.

Nun ist das Kraftspektroskop in „Messposition“.

Diese Grundeinstellung gelegentlich korrigieren, da der Kraftsensor sich bei Temperaturschwankungen verbiegt, der Brechungsindex des Messmediums sich

durch Verdunstung verändert, und der Steuerpiezo, sowie die Mechanik des Kraftspektroskopes sich mit der Zeit und der Temperatur verändern.

Eichen des Kraftspektroskops

Die Ausgabeelektronik liefert als Rohdaten nur Spannungssignale, nämlich die an dem Piezoelement anliegende Spannung und die Spannungsdifferenz a-b des Detektors (segmentierte Fotodiode). Diese Spannungswerte müssen für die Auswertung in Kraft und Längenwerte umgerechnet werden.

Die Längeneichung wird interferometrisch vorgenommen. Dazu dejustiert man den Laser so, dass er nicht vollständig auf die Cantileverrückseite trifft (Skizze###). So wird ein Teil des Lichts von der Probe in den Detektor reflektiert und interferiert dort mit dem von der Cantileverrückseite reflektierten Strahl. Wenn man jetzt den Abstand zwischen Spitze und Probe verändert ändert sich auch die Interferenz. Im Detektorsignal zeigt sich das in einem sinusförmigen Interferenzmuster, das genau eine halbe Lichtwellenlänge als Wellenlänge hat. Auf dem Mikroskopbildschirm sieht man die Interferenzlinien ebenfalls wandern, wenn das Spektrometer mit dem Krafthebel bewegt wird.

Die Verbiegung der Kraftsensorfeder ist für kleine Auslenkungen linear zur anliegenden Kraft. Der Detektionslaserstrahl wandert dabei aus der Mittelposition zwischen den Detektorsegmenten und verschiebt die Spannungsdifferenz a-b. Bei Kenntnis der Federkonstante ($k \approx 10^{-2}$ N/m, genaueren aktuellen Wert beim Betreuer erfragen) kann aus der Auslenkung also direkt die Kraft ermittelt werden.

Das Piezostellelement bewegt die Probenoberfläche angströmgenau. Daher wird es dazu verwendet den Zusammenhang zwischen dem a-b Signal (mV) und der Auslenkung des Sensors (nm) zu ermitteln. Dabei wird der Sensor mit dem Steuerhebel auf das Substrat gebracht und „eingedrückt“. Während des Eindrückens wird der Sensor jeweils genau um die Längenänderung des Piezostellelements verbogen. Die Steigung der Eindrückkurve kann also als "1nm/1nm" angenommen werden und ermöglicht so eine Umrechnung des a-b Signals (Auslenkung) von mV in nm, und dann über die Federkonstante in die entsprechende Kraft (pN). Die Umrechnung geschieht mit den Makros der Auswertesoftware.

Zur Eichung müssen (mindestens) eine Eindrückkurve und eine Kurve mit Interferenzmuster gespeichert werden.

Durchführung der Kraftmessung

Im Versuch sollen einzelne DNA Moleküle gedehnt, und aus den Kraft-Abstandskurven die freie Basenpaarungsenergie bestimmt werden. Dazu wird versucht mit dem Krafthebel einzelne Moleküle von der Probe aufzupicken und so zu dehnen, dass man den Verlauf der Kurve über einen möglichst großen Kraftbereich verfolgen kann ohne das Molekül abzureißen. Dazu benötigt man etwas Fingerspitzengefühl, das man am besten durch ausprobieren entwickelt. Es sollte dann mindestens eine "gute" Kurve gespeichert werden, am besten aber mehrere.

Auswertung

Die gespeicherten Kurven werden auf den Auswertungscomputer transferiert und dort mit den gegebenen Makros ausgewertet. Eine Einführung in die Software wird vom Betreuer gegeben.

Messung und Auswertung wird mit dem Programm "igor pro" durchgeführt.