

Beobachtung von Strukturänderungen und Restriktionsanalyse einzelner DNA- Moleküle im Fluoreszenzmikroskop

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Physiker Bürk Schäfer
geboren am 31. Mai 1968 in Frankfurt (Oder)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karl Otto Greulich
2. Prof. Dr. Wolfgang M. Heckl (LMU München)
3. Prof. Dr. Alfred Pingoud (JLU Giessen)

Tag des Rigorosums: 10 Mai 2001

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25. Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

Symbole und Abkürzungen	V
0 Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Analyse einzelner DNA-Moleküle	2
1.2 Zielstellung	5
2 Theorie	6
2.1 Aufbau der DNA	6
2.1.1 Grundlagen	6
2.1.2 Topologie der DNA	7
2.1.3 Hydratation der DNA-Helix	8
2.2 Mechanische Eigenschaften von DNA-Molekülen	9
2.2.1 Faltung und Streckung von DNA	9
2.2.2 Das FJC-Modell	9
2.2.3 Das WLC-Modell	10
2.3 DNA - Protein - Wechselwirkungen	11
2.3.1 Grundlagen	11
2.3.2 Lambda-DNA und Apa I, Sma I, EcoR I	12
2.3.3 pRevTet-On/-Off DNA und Pvu I, Mlu I, Mfe I	14
2.3.4 DNA-Ligase und Terminale Transferase	15
2.3.5 Minor-Groove-Binder	15
2.4 Fluoreszenzfarbstoffe	15
2.4.1 Grundlagen	15
2.4.2 DNA Fluoreszenzfarbstoffe	17
2.4.3 Photoausbleichen	18
2.4.4 Stabilisierung der Fluoreszenz	19
2.4.5 Längenbestimmung der DNA-Fragmente	19
2.5 Mikroskopie	20
2.5.1 Auflösungsvermögen	20

2.5.2	Durchlichtmikroskopie	22
2.5.3	Fluoreszenzmikroskopie	23
2.5.4	Bildverstärkung und CCD-Kameras	24
2.6	Optische Pinzette	25
2.6.1	Aufbau	25
2.6.2	Kraftwirkung	25
2.7	Mikroinjektion und Diffusion	27
2.7.1	Mikroinjektion der Enzymmoleküle	27
2.7.2	Diffusion der Enzymmoleküle	28
2.7.3	Freie Weglänge und Diffusionszeit	29
3	Materialien und Methoden	30
3.1	Katalog der Geräte und optischen Materialien	30
3.2	Katalog der biologischen und chemischen Materialien	31
3.3	Vorbereitung der Präparation	32
3.3.1	Reinigung und Entgasung des H ₂ O	32
3.3.2	Linearisierung von pRevTet-On/-Off	32
3.3.3	Vorbereitung der Restriktionsendonukleasen	33
3.3.4	Reinigung der Objektträger	33
3.4	Biotinylierung der DNA	33
3.4.1	Hybridisierung eines biotinylierten Oligonukleotids an verlängerte DNA	33
3.4.2	Ligation eines biotinylierten Oligonukleotids an einen DNA-Überhang	34
3.4.3	Synthese eines biotinylierten DNA-Überhangs	35
3.4.4	Biotinylierung der DNA mit Biotin-16-ddUTP	35
3.5	Inkubation der DNA mit Minor-Groove-Bindern	36
3.6	Färbung der DNA	36
3.7	DNA-Streckung mit Poly-L-Lysin	37
3.8	Bindung der DNA an Mikrokugeln	37
3.9	Mikroskopische Beobachtung	37
3.10	Streckung der DNA und Mikroinjektion der Restriktionsendonukleasen	37
3.11	Experimenteller Aufbau	38

3.12	Bildaufnahme, Digitalisierung und Auswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Optimierung der Experimente	41
4.1.1	Konzentration der DNA	41
4.1.2	Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe	41
4.1.3	Charakterisierung der Fluoreszenzstabilisatoren	43
4.1.4	Biotinylierung der DNA	44
4.1.5	Konzentration der Reaktionspuffer	44
4.1.6	Konzentration und Diffusion der Restriktionsendonukleasen	45
4.2	Handhabung einzelner DNA-Moleküle	47
4.2.1	Einzelne Moleküle	47
4.2.2	Freie Bewegung einzelner Moleküle	47
4.2.3	Unterscheidung zwischen einem und mehreren Molekülen	48
4.3	Strukturveränderungen von DNA-Molekülen	49
4.3.1	Streckung und Relaxation eines Moleküls	49
4.3.2	Einfluß von Minor-Groove-Bindern	50
4.4	Enzymreaktionen an einzelnen DNA-Molekülen	52
4.4.1	Globuläre Moleküle	52
4.4.2	Apa I	53
4.4.3	Sma I	54
4.4.4	EcoR I	55
4.5	Analyse der Restriktionsfragmente	56
4.5.1	Sma I	57
4.5.2	EcoR I	58
4.5.3	Zeitverlauf der Restriktionsschritte	59
4.5.4	Geschwindigkeit der Restriktionsschritte	60
4.6	Unterscheidung einzelner DNA-Moleküle	62
4.6.1	Analyse mit Mlu I	62
4.6.2	Analyse mit Mfe I	64
5	Diskussion	67
5.1	Streckung und Relaxation	67
5.2	Analyse der Restriktionsfragmente	68

5.3	Zeitliche Abfolge der Restriktion	69
5.3.1	Auffinden der Zielsequenz des Enzyms auf der DNA	70
5.3.2	Restriktionsstart und schrittweise Restriktionsfolge	71
5.3.3	Vergleich der Restriktionsgeschwindigkeiten	73
5.4	Unterscheidung einzelner DNA-Moleküle	74
5.5	Ausblick	75
6	DNA-Restriktionstafeln	77
6.1	Lambda-DNA + Sma I	77
6.2	Lambda-DNA + EcoR I	79
6.3	Zeitverlauf einer Restriktionsfolge	81
6.4	pRevTet-On + Mlu I	82
6.5	pRevTet-Off + Mfe I	84
6.6	pRevTet-On + Mfe I und pRevTet-Off + Mlu I	85
7	Literaturverzeichnis	87
8	Anhang	92
8.1	Wissenschaftliche Beiträge	92
8.1.1	Auszeichnungen	92
8.1.2	Publikationen	92
8.1.3	Vorträge	92
8.1.4	Poster	93
8.1.5	Tagungsbeiträge als Koautor	93
8.2	Lebenslauf	95
8.2.1	Persönliche Daten	95
8.2.2	Ausbildung	95
8.3	Danksagung	95
8.4	Erklärung	96

Symbole und Abkürzungen

α	halber Öffnungswinkel
γ	Faktor der Impulsübertragung
Φ_{bl}	durch Photoausbleichen limitiert Quantenausbeute
λ	Wellenlänge
η	Viskosität
ρ	Dichte
σ	Wirkungsquerschnitt
A	Adenin
A	numerische Apertur
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bandpaß
BSA	Rinder Serum Albumin
c	Lichtgeschwindigkeit
c	Konzentration
c_{Fl}	Fluorophorkonzentration
C	Cytosin
d	Durchmesser
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (5'-Desoxyribonukleotid)
dTTP	Desoxythymine-5'-triphosphat
D	Diffusionskonstante
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Doppelstrang
E	Energie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Kraft
FWHM	Bandbreite bei halber Maximaltransmission
G	Guanin
I	Intensität
IR	Infrarot-Spektralbereich
k	Boltzmann-Konstante
k_{bl}	Bleichkonstante
kbp	10^3 Basenpaare
K	Kontrast

l	Länge
l_0	Konturlänge
l_p	Persistenzlänge
m	Masse
M	Molar (mol/l)
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
n	Brechungsindex
n_{bl}	Anzahl der gebleichten Moleküle
n_{phot}	Anzahl der absorbierten Photonen
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NCO	Grenzwert der Nukleotidanzahl
NMWL	nominale Grenze des Molekulargewichts
OD	optische Dichte, $OD = -\log_{10}(T)$
p	Druck
p	Impuls
P	Leistung
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
t	Zeit
T	absolute Temperatur
T	Thymin
T	Transmission
TrisHCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-hydrochlorid
U	Einheiten (Units)
v	Geschwindigkeit
V	Volumen
x	Weg

0 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die direkte Beobachtung von Strukturveränderungen und Enzymreaktionen an einzelnen DNA-Molekülen in einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop. Die markierte DNA ist dafür an eine Mikrokugel gekoppelt, die als „Griff“ zum Halten des Moleküls mit einer optischen Pinzette dient und damit die Auswahl eines individuellen DNA-Moleküls erlaubt. Die Streckung eines Moleküls und Beobachtung der anschließenden Relaxation ermöglicht die Untersuchung seiner strukturellen Dynamik. Die Analyse von enzymatischen Reaktionen erfolgt nach Mikroinjektion einer Restriktionsendonuklease in die Umgebung eines gestreckten Moleküls und der durch ihre Mikrofluidität charakterisierten Verteilung. Für die Aufzeichnung der ablaufenden Reaktion wird eine intensivierete Videokamera mit nachfolgender digitaler Bildverarbeitung verwendet.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt, ausgehend von der Optimierung der eingesetzten Methoden und Molekülkonzentrationen, die Handhabung einzelner, an Mikrokugeln gekoppelter DNA-Moleküle. Es wird das kontrollierte Bewegen einzelner Moleküle, ihre Streckung und die Unterscheidung zwischen einzelnen und mehreren DNA-Molekülen dargestellt.

Der zweite Teil zeigt Veränderungen der DNA-Struktur auf Einzelmolekülebene. Zwei Gruppen von SYBRGreen gefärbten DNA-Molekülen werden dafür mit verschiedenen Minor-Groove-Bindern inkubiert, die sich an die DNA anlagern und zu einer unterschiedlichen Versteifung und Verkürzung der Helix führen. Eine weitere Gruppe von Molekülen ist nur fluoreszenzmarkiert und dient als Kontrolle. Die molekularen Veränderungen werden durch die Streckung von 14 einzelnen DNA-Molekülen und den Vergleich ihrer Konturlängen und ihrer Relaxationszeiten beim Übergang von der gestreckten in die globuläre Form deutlich.

Im dritten Teil erfolgt eine Analyse der Größe der Restriktionsfragmente und des Zeitverlaufs der Reaktionen der Endonukleasen Apa I, Sma I und EcoR I, welche eine, drei bzw. fünf Erkennungssequenzen auf der verwendeten Lambda-Phagen-DNA besitzen. Die Auswertung erfolgt an 21 Molekülen. Durch die Beobachtung der Reaktion eines oder einiger weniger Enzymmoleküle mit der DNA ergeben sich bisher nicht mögliche Einblicke in den Mechanismus dieser Enzym-DNA-Reaktion. Dabei zeigt sich eine vorhandene Prozessivität, die sich durch eine sequenzspezifische Bindung des Enzymmoleküls an die DNA, verbunden mit einer linearen Diffusion entlang der DNA bis zum Zusammentreffen des Enzyms mit seiner Erkennungssequenz, erklären läßt.

Der vierte Teil der Arbeit stellt die Anwendung der Restriktionsanalyse zur Unterscheidung zwischen zwei ähnlichen DNA-Molekülen, die sich nur in einigen wenigen Mutationen unterscheiden, dar. Die Analyse erfolgt mit den Restriktionsendonukleasen Mlu I und Mfe I, die wechselseitig jeweils eine bzw. keine Erkennungssequenz auf den DNA-Molekülen pRevTet-On und pRevTet-Off besitzen. Die Identifizierung individuell ausgewählter DNA-Moleküle durch ihr charakteristisches Fragmentmuster wird an 28 Molekülen gezeigt.

1 Einleitung

1.1 Analyse einzelner DNA-Moleküle

Das wohl bekannteste und am besten charakterisierte biologische Makromolekül ist die DNA. In ihrer periodischen Struktur ist durch die Abfolge von vier verschiedenen Basenpaaren die genetische Information des jeweiligen Organismus gespeichert. Mit zunehmender Komplexität des Organismus wächst die für seine Funktion notwendige Menge an Informationen. Die Größe des DNA-Genoms nimmt damit von einigen Tausend Basenpaaren bei Viren, einigen Millionen Basenpaaren bei Bakterien über Hunderte von Millionen Basenpaaren bei Insekten bis zu 3 Milliarden Basenpaaren beim Menschen zu. Die Länge der haploiden menschlichen DNA beträgt ca. 1 m und ist als dünnes Filament in den Zellkernen einer jeden Zelle verpackt [1]. Die Vielfalt der in einem DNA-Molekül speicherbaren Information wird deutlich, wenn man berechnet, daß die Masse des gesamten sichtbaren Universums nicht ausreichen würde, um ein einziges Molekül jeder möglichen Variante einer nur 120 Basenpaare langen DNA herzustellen [2] oder daß, bei optimaler Nutzung der Information, eine Unterscheidung aller 6 Milliarden Menschen mit einem nur 17 Basenpaare langen Oligonukleotid möglich wäre.

Das Verständnis dieser molekularen Individualität und Variabilität erfordert den Einsatz von Techniken, die einzelne DNA-Moleküle einer Analyse zugänglich machen. Die detaillierteste Antwort darauf würde die Sequenzierung einzelner DNA-Moleküle liefern. Dieser Weg konnte jedoch bis heute nicht erfolgreich beschritten werden, und eine Vielzahl ungelöster experimenteller Probleme läßt Zweifel aufkommen, ob eine Einzelmolekülsequenzierung innerhalb der nächsten Jahre möglich werden wird. Demgegenüber liefert eine Reihe deutlich einfacherer Techniken ebenfalls Informationen über individuelle Eigenschaften von DNA-Molekülen.

Eine Möglichkeit, auf DNA-Molekülen oder in einem gesamten Chromosomen nach einer gewünschten DNA-Sequenz zu suchen, ist die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden. DNA-Abschnitte im Bereich von 300-2.000 bp werden dabei markiert. Eine dreidimensionale Ortsauflösung wird durch die Analyse in einem Laserraster-Mikroskop erreicht [3].

Ein anderer Ansatz ist die Analyse der biomechanischen Eigenschaften einzelner DNA-Moleküle. Die Bewegung eines DNA-Moleküls mit einer optischen Pinzette durch die umgebende Flüssigkeit oder das Halten des Moleküls in einem hydrodynamischen Fluß bewirken eine Streckung der ansonsten in globulärer Form vorliegenden DNA-Moleküle. Die bei der Streckung und anschließenden Relaxation eines DNA-Moleküls auftretenden Kräfte sind in der Literatur umfassend charakterisiert [4,5]. Die vorhandenen Modelle (z.B. FJC- und WLC-Modell) wurden mit den gemessenen Daten überprüft, wobei die Streckung der DNA im Bereich ihrer

Konturlänge eine Modifizierung notwendig machte [6,7]. Die Abhängigkeiten der DNA-Relaxation von den umgebenden Pufferbedingungen, speziell der Ionenstärke, sind ebenfalls untersucht [8]. Nicht gezeigt sind hingegen die Möglichkeiten, durch Messung von Konturlänge und Relaxationszeit einzelner gestreckter Moleküle Veränderungen der DNA-Struktur, wie z.B. eine Verkürzung oder Versteifung durch Einwirkung von DNA-bindenden bzw. -interkalierenden Substanzen, nachzuweisen.

Detailliertere Informationen über ein individuelles DNA-Molekül und der an ihm ablaufenden Reaktionen geben Arbeiten, bei denen die Analyse des Reaktionsprozesses über die während der Reaktion auf das DNA-Molekül übertragenen mechanischen Kräfte erfolgt. Die dadurch hervorgerufene Verschiebung einer an die DNA gekoppelten und mit der optischen Pinzette gehaltenen Mikrokugel wird analysiert. Die optische Pinzette dient dabei zur Messung der auftretenden Kräfte, die Aussagen über den Reaktionsprozeß ermöglichen. Der enzymatische Verdau eines einzelnen DNA-Moleküls mit einer Exonuklease wird in [9] gezeigt. Weiterhin wurde die Verkürzung eines einzelnen, zwischen zwei Mikrokugeln aufgespannten DNA-Moleküls durch die Interaktion mit Farbstoff- und Enzymmolekülen bestimmt [10]. Die Messung der bei der Transkription eines einzelnen DNA-Moleküls durch ein fixiertes Polymerase-Molekül ausgeübten Kraft erfolgte über die Verschiebung der Mikrokugel aus dem Fokus einer optischen Pinzette [11].

Die Charakterisierung eines einzelnen DNA-Moleküls ermöglicht die Einzelmolekül-Restriktionsanalyse, d.h., die Auswertung der DNA-Fragmente nach der Restriktion mit einer spezifischen Endonuklease. Der Ansatz liefert zwar nicht die Information einer Sequenzierung, zeigt aber ebenfalls die Individualität eines einzelnen DNA-Moleküls. Das zu analysierende Molekül wird dafür mit einer ausgewählten Restriktionsendonuklease geschnitten. Diese erkennt eine für jede Endonuklease spezifische Sequenz von 4-8 Basenpaaren auf dem DNA-Molekül und schneidet dieses an einer entsprechenden Stelle. Dabei entsteht ein für das jeweilige DNA-Molekül charakteristisches Muster von Restriktionsfragmenten, eine Restriktionskarte. Das Auftreten einer Mutation an einer dieser Erkennungsstellen verhindert den Schnitt der Endonuklease, und es entsteht ein Unterschied in der Restriktionskarte. Eine solche Restriktionsanalyse mit einer großen Anzahl von gleichen DNA-Molekülen in einem Experiment ist eine Standardtechnik in der Molekularbiologie und wird z.B. bei einem Vaterschaftstest oder in der Forensik beim „genetischen Fingerabdruck“ genutzt.

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, eine Einzelmolekül-Restriktionsanalyse zu entwickeln. Eine mögliche Strategie zur Lösung des Problems ist der Verdau des Moleküls in einem Flüssigkeitsstrom und die anschließende Analyse der Restriktionsfragmente während des Durchströmens eines spektroskopischen Fluoreszenzdetektors. Die Methode wird als *Einzelmolekül-Durchflußanalyse* bezeichnet [12]. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse einzelner Moleküle ist ihre Restriktion und anschließende Trennung in einem Elektrophoresegelel. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgt in einem Fluoreszenzmikroskop und ist als *Optisches Mapping* bekannt [13]. Die Nachteile sind eine nahezu blind ablaufende Reaktion in der *Einzelmolekül-Durchflußanalyse* und die relativ geringe Ortsauflösung des *Optischen Mapping*.

Beide Techniken richten sich auf die Analyse der DNA-Sequenz, jedoch nicht auf eine direkte Beobachtung der ablaufenden Reaktionen.

Eine überraschend gut geeignete Methode zur direkten Beobachtung der ablaufenden Reaktion mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ist die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie. Die Beobachtung eines fluoreszenzmarkierten RNA-Polymerase-Moleküls und seine Bewegung entlang unmarkierter DNA ist in [14] dargestellt. Dafür wurde ein einzelnes, mit beiden Enden an jeweils eine Mikrokugel gekoppeltes DNA-Molekül gehalten und aufgespannt. Ebenso konnte die schrittweise Bewegung eines einzelnen fluoreszenzmarkierten Kinesin-Moleküls entlang eines an eine Glasoberfläche gebundenen Mikrotubulus gezeigt werden [15].

In den Arbeiten von Hoyer [16,17], auf denen die vorliegende Arbeit aufbaut, erfolgt die Bewegung und Streckung eines einzelnen fluoreszenzgefärbten DNA-Moleküls unter direkter visueller Kontrolle als Voraussetzung für nachfolgende enzymatische Reaktionen. Der Schnitt der Restriktionsendonuklease Apa I mit genau einer Erkennungssequenz auf Lambda-DNA wurde an einem ausgewählten DNA-Molekül gezeigt. Das Potential dieser Technik eröffnet den Übergang von einem einzelnen beobachteten „ja-nein-Prozeß“ zur Analyse von Reaktionsfolgen mit Enzymen, die mehrere Erkennungssequenzen auf dem DNA-Molekül besitzen. Dabei ist die Messung der Länge der DNA-Fragmente zusammen mit der zeitlichen Abfolge der Reaktion möglich. Die Unterscheidung einzelner DNA-Moleküle kann durch ihr Restriktionsmuster erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wird jeweils ein einzelnes DNA-Molekül mit einem Ende an eine Mikrokugel gekoppelt, wobei diese als „Griff“ zum Halten und gezielten Bewegen des Moleküls dient. Die Manipulation erfolgt dabei mit einer optischen Pinzette, die das berührungslose Halten der angekoppelten Mikrokugel durch Lichtdruckkräfte im Fokus des Laserstrahls erlaubt. Die Steuerung des Laserstrahls ermöglicht damit die freie Auswahl und räumliche Bewegung eines einzelnen DNA-Moleküls [18].

Die direkte Beobachtung des einzelnen Moleküls und seiner Bewegung erfolgt nach Markierung mit einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff in einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop. Dies scheint auf den ersten Blick Lehrbuchwissen zu widersprechen. Bei der Darstellung von Objekten im Mikroskop muß jedoch zwischen dem optischen Auflösungsvermögen zweier noch getrennt wahrnehmbarer Objekte und der Sichtbarkeit eines selbstleuchtenden Objekts unterschieden werden. Während das Auflösungsvermögen auf ca. 250 nm begrenzt ist, ist die Sichtbarkeit nur von der Leuchtintensität des Objekts abhängig. Das DNA-Molekül mit einem Durchmesser von 2 nm liegt deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops, es ist nur durch die Fluoreszenzemission der angelagerten Fluorophore sichtbar. Die weitere Kombination mit einer intensivierten Videokamera und die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit einer Laser-Spektrallinie ergeben die für die Detektion eines einzelnen Moleküls notwendige Sensitivität zusammen mit einem ausreichenden Kontrastverhältnis. Eine nachfolgende digitale Bildbearbeitung ist für die Auswertung der Ergebnisse notwendig.

1.2 Zielstellung

Für die vorliegende Arbeit ergeben sich die folgenden Ziele:

- Einzelne Lambda-DNA-Moleküle werden an eine Mikrokugel gekoppelt, mit der optischen Pinzette gehalten und im hydrodynamischen Fluß gestreckt. Ihre Konturlänge und Relaxationszeit wird gemessen. Veränderungen der DNA-Struktur durch Inkubation mit Minor-Groove-Bindern, die sich an die DNA anlagern, sollen auf diese Weise dargestellt werden.
- Es soll die Möglichkeit untersucht werden, neben der Restriktionsendonuklease Apa I, welche eine einzelne Erkennungssequenz auf Lambda-DNA besitzt, die Reaktionen weiterer Enzyme mit mehreren Schnittstellen, wie Sma I mit drei Schnittstellen und EcoR I mit fünf Schnittstellen, darzustellen.
- Die Analyse der Restriktionsfragmente soll eine Restriktionskarte liefern, die mit den erwarteten Fragmentlängen verglichen werden kann. Die zeitliche Auflösung soll den Reaktionsverlauf und die Geschwindigkeit der einzelnen Restriktionsschritte zeigen. Durch Aufstellung einer Statistik sollen Unterschiede im Verhalten der einzelnen Moleküle dargestellt werden.
- Es soll durch Auswertung des Restriktionsverlaufes der Mechanismus, mit dem das Enzym seine Zielsequenz auf der DNA auffindet, untersucht werden. Muß das Enzym zufällig und genau auf seine Erkennungssequenz treffen, um das DNA-Molekül zu schneiden oder ist eine zunächst sequenzunspezifische Bindung des Enzyms an das DNA-Rückgrat mit einer anschließenden linearen Diffusion entlang des Moleküls bis zum Zusammentreffen mit einer Zielsequenz möglich?
- Die Unterscheidung von zwei ähnlichen DNA-Molekülen, die sich nur in wenigen Mutationen unterscheiden, soll demonstriert werden. Die Moleküle werden dafür mit einer bekannten Restriktionsendonuklease geschnitten und ihre Fragmente analysiert. Ihre verschiedenen Restriktionsmuster sollen eine Kategorisierung beider Moleküle erlauben.

2 Theorie

2.1 Aufbau der DNA

2.1.1 Grundlagen

DNA ist ein Polymer aus Desoxyribonukleotiden. Jedes Nukleotid besteht aus einer von 4 stickstoffhaltigen Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe. Die genetische Information ist durch die Abfolge der Basen entlang des Polymers festgelegt, der Zucker und die Phosphatgruppen erfüllen strukturelle Aufgaben. Die stickstoffhaltigen Basen sind die aus einem Fünfer- und einem Secherring zusammengesetzten Derivate von Purin, Adenin (A) und Guanin (G) und die aus einem Secherring bestehenden Derivate von Pyrimidin, Thymin (T) und Cytosin (C). Im DNA-Molekül können sich nur die beiden komplementären Basen A und T bzw. C und G über Wasserstoffbrückenbindungen paaren.

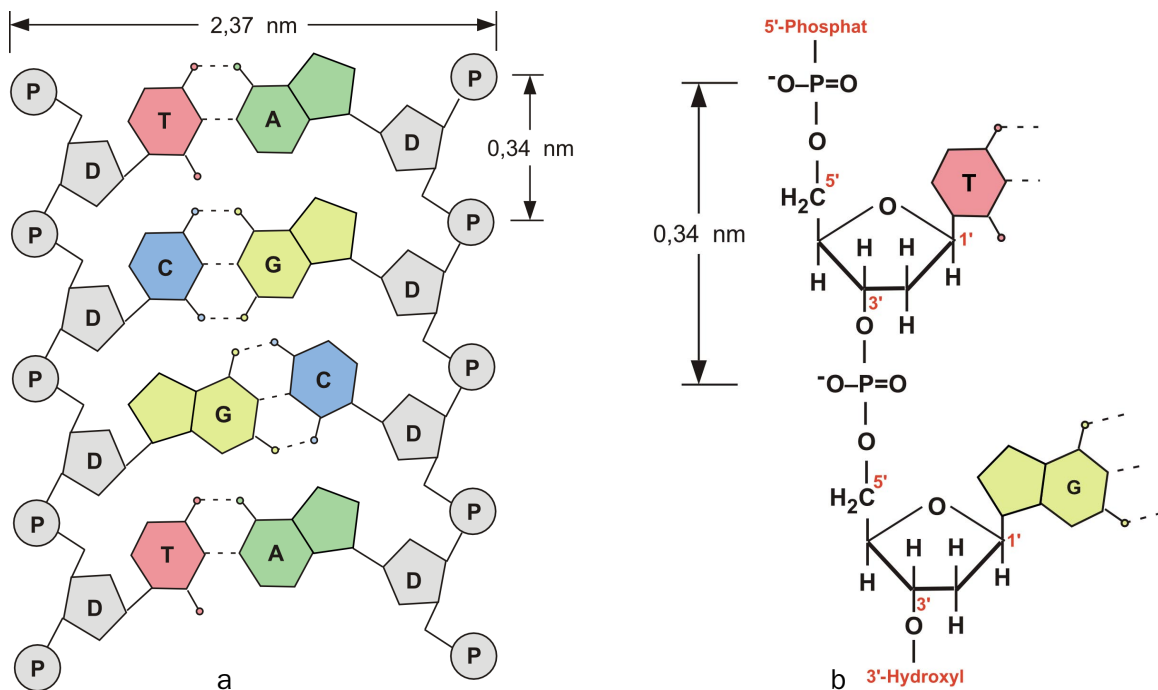


Abbildung 2.1 a: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Molekül. b: Aufbau des DNA-Rückgrats. Die Basen A, C, G und T sind an Desoxyribose (D) gekoppelt, die über Phosphatgruppen (P) miteinander verbunden sind. Die genetische Information ist durch Abfolge der Basen festgelegt.

Ein Nukleosid besteht aus einer dieser Basen, gebunden an einen Zucker (Desoxyribose). Der Phosphatester des Nukleosids ist das Nukleotid. Das gleichbleibende Rückgrat des DNA-Moleküls wird aus diesen Desoxyriboseeinheiten gebildet, die über Phosphatgruppen miteinander verknüpft sind. Die 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers ist dabei mit der 5'-Hydroxylgruppe des nächsten Zuckers über eine Phosphordiesterbrücke verbunden.

Die dreidimensionale Struktur der DNA wurde im Jahr 1953 von *Watson* und *Crick* aus Röntgenbeugungsbildern abgeleitet. Sie ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt und hat die folgenden grundlegenden Eigenschaften:

- Zwei helikale Polynukleotidstränge sind um eine gemeinsame Achse gewunden, verlaufen in entgegengesetzter Richtung und bilden eine rechtsgängige Doppelhelix.
- Die Basen befinden sich im Inneren der Helix, während Phosphat und Zucker außen liegen. Die Ringebenen der Basen stehen senkrecht auf der Helixachse, die Zucker stehen fast im rechten Winkel zu den Basen.
- Die Helix hat einen Durchmesser von 2,37 nm. Aufeinanderfolgende Basen sind 0,34 nm voneinander entfernt. Jede Windung der Helix besteht aus 10,4 Nukleotiden, die Ganghöhe ist 3,32 nm.
- Die beiden Ketten werden durch 2 Wasserstoffbrücken zwischen A und T und 3 Wasserstoffbrücken zwischen C und G zusammengehalten.

Die Spezifität der Basenpaarung ist erstens durch die sterische Beschränkung der regelmäßigen Helixstruktur des Zucker-Phosphat-Rückgrats gegeben, die nur eine Bindung zwischen einer Purin- und einer Pyrimidin-Base erlaubt. Die zweite Beschränkung ist die Bedingung für die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen, die durch Anzahl und Position der Wasserstoffatome an den Basen festgelegt ist und Bindungen zwischen A und C sowie zwischen G und T verhindert. Damit sind ausschließlich Bindungen zwischen A und T sowie zwischen C und T in der DNA-Doppelhelix möglich.

2.1.2 Topologie der DNA

Durch Erwärmung der DNA oder Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichts ist eine Lösung der Wasserstoffbrücken und damit eine Trennung der Doppelhelix in seine Einzelstränge möglich. Dieser Schmelzpunkt liegt im Bereich zwischen 75°C und 100°C und ist abhängig vom pH-Wert und von der Basenzusammensetzung, da GC-reiche Regionen eine höhere Stabilität als AT-reiche Regionen aufweisen. Bei Abkühlung lagern sich die Doppelstränge spontan wieder zu einer Doppelhelix zusammen.

DNA-Moleküle sind stark asymmetrisch. Ein einzelnes Molekül kann leicht mehrere Millionen Basenpaare enthalten, was einer Länge im Millimeter-Bereich entspricht. Oftmals liegt das Molekül nicht in linearer, sondern in zirkulärer Form vor oder kann im Organismus zwischen linear und zirkulär wechseln. Bei diesem Gestaltwechsel tritt als Überstruktur die Verdrillung der

Doppelhelix zur Superhelix auf. Diese kompaktere gespannte Form erfüllt eine wichtige Rolle bei der Verpackung der DNA in der Zelle.

Die Doppelhelix ist keine feste Struktur, vielmehr führen Neigungsänderungen der Basenpaare oder Verdrehung zwischen den Basenpaaren zu sequenzabhängigen lokalen Veränderungen der DNA-Symmetrie. Diese Veränderungen dienen sequenzerkennenden Proteinen zur Erkennung ihrer Zielsequenz. Des Weiteren besitzt die B-DNA-Helix eine große 1,2 nm breite Furche und eine gegenüberliegende kleine 0,6 nm breite Furche. Beide Furchen enthalten Donor- und Akzeptoratome der Basenpaare für Wasserstoffbrücken, wobei die große Furche im Gegensatz zur kleinen Furche mehr charakteristische Anordnungen und eine leichtere Zugänglichkeit besitzt. Beide Furchen dienen damit neben der DNA-Lokalstruktur ebenfalls der Sequenzerkennung durch spezifische Enzyme.

Neben der oben beschriebenen Struktur, die als B-DNA bezeichnet wird, kommen DNA-Moleküle in weiteren verschiedenen Strukturvarianten vor. In dehydratisierter DNA tritt eine A-DNA-Helix auf, bei der die Basen in einem weiteren Abstand voneinander stehen, jedoch enger gestapelt sind. Eine weitere Struktur wird von DNA mit regelmäßiger CGCGCG-Abfolge gebildet. Diese Z-Form ist eine linksgängige Helix mit nur einer tiefen Furche, wobei die Phosphatgruppen eine zickzackförmige Anordnung im Rückgrat bilden [19,20,21].

2.1.3 Hydratation der DNA-Helix

Die Konformation der DNA ist stark von ihrem Wassergehalt abhängig, der als Hydratation bezeichnet wird. In Lösung haben vorhandene Kationen einen starken Einfluß auf die Hydratation, da sie auf Grund ihrer eigenen Hydratation mit der DNA um H₂O-Moleküle konkurrieren. Dieser Einfluß ist von der Ionenstärke der Lösung abhängig. Darüber hinaus existieren spezifische Kation-DNA-Wechselwirkungen, die abhängig von der Art des Kations die DNA-Konformation beeinflussen. Eine Abhängigkeit von der Basensequenz ist ebenfalls gegeben.

Die Hydrathülle der DNA-Helix läßt sich in einen primären, einen sekundären und einen tertiären Teil untergliedern. Die primäre Hydrathülle besteht aus 11-12 H₂O-Molekülen/Nukleotid und steht durch Ion-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in intensiver Beziehung mit der DNA. Diese Hülle ist für Ionen undurchlässig. Am stärksten ist dabei die Ion-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei H₂O-Molekülen und dem O⁻ des Phosphates, gefolgt von der Wechselwirkung von 4 H₂O-Molekülen über Wasserstoffbrücken mit den Phosphor-diester-O- und dem Pentose-O-Atom. Die restlichen H₂O-Moleküle wechselwirken mit den Basen entlang der beiden Furchen der Helix.

Die sekundäre Hydrathülle besteht aus 6-9 H₂O-Molekülen, die über Wasserstoffbrücken an die Moleküle der ersten Schicht gekoppelt sind. Der tertiäre Teil der Hülle zeigt nur noch geringe Unterschiede zu normalen H₂O-Molekülen [22].

2.2 Mechanische Eigenschaften von DNA-Molekülen

Die oben beschriebenen Strukturmerkmale werden typischerweise an Oligonukleotiden mit 16-22 Basenpaaren ermittelt. Daraus könnte der Eindruck entstehen, das DNA-Molekül sei eine starre Struktur. Die geringfügige Flexibilität dieser Struktur, die unterhalb der Auflösung von Kernspin-Resonanz-Spektroskopie bzw. Röntgenstrukturanalyse liegt, amplifiziert sich in langen DNA-Molekülen so, daß sich ein hochflexibles Makromolekül ergibt.

2.2.1 Faltung und Streckung von DNA

Die mechanischen Eigenschaften dieser DNA-Makromoleküle spielen eine zentrale Rolle in zellulären Funktionen, wie Faltung, Packung, Regulation, Rekombination, Replikation und Transkription des Genoms. Bei Bakteriophagen und Viren ist die DNA in eine Proteinhülle eingeschlossen. In Bakterien ist die DNA in kompakte Strukturen gefaltet und befindet sich im Nukleoid, dem Kernäquivalent. Bei eukaryontischen Zellen bilden basische Proteine, die Histone, eine entscheidende Rolle bei der Packung der DNA in Nukleosomen, die in einer übergeordneten Struktur das Chromatin formen.

Wird ein DNA-Molekül außerhalb der Zelle in Lösung betrachtet, liegt es in der Regel als globuläres Molekül vor. Erst durch den Einsatz einer Kraft läßt sich das Molekül in eine gestreckte Form bringen. Die notwendige mechanische Kraft kann durch die in einem hydrodynamischen Fluß auf die DNA wirkenden Reibungskräfte übertragen werden. Dafür wird ein DNA-Molekül mit einem Ende an eine Mikrokugel gekoppelt und mit einer optischen Pinzette gehalten [23,24].

Analog dazu ist die Streckung eines Moleküls im elektrostatischen Feld möglich. Durch seine negative Ladung streckt sich das Molekül bei Feldstärken von $2\text{-}14 \text{ Vcm}^{-1}$ in Richtung der positiven Elektrode [16,25].

Erfolgt die Kopplung von Mikrokugeln an beide Seiten des Moleküls ist ein direktes Halten und Strecken des DNA-Moleküls ohne zusätzliche Kräfte möglich.

2.2.2 Das FJC-Modell

Im Bereich geringer Streckung läßt sich das DNA-Molekül in guter Näherung mit dem *FJC-Modell* (*freely jointed chain*) [26,27,28] beschreiben. Das Molekül entspricht in diesem Fall einer statistischen Kette mit aneinander gehängten Gliedern und verhält sich wie eine entropische Feder. Die Kraft, die die Relaxation des Moleküls bewirkt, ist entropischer Natur, da die gestreckte Form der Kette einen unwahrscheinlicheren Zustand geringerer Entropie darstellt [29].

Die elastische Eigenschaft einer solchen Feder ist durch seine Persistenzlänge l_p gekennzeichnet. Sie gibt an, wie weit die einzelnen Glieder der Kette in dieselbe Richtung zeigen.

Innerhalb der Persistenzlänge läßt sich die DNA als starr ansehen. Ab etwa 10 Persistenzlängen ergibt sich ein relativ flexibles Molekül. Die experimentelle Bestimmung der Persistenzlänge eines DNA-Moleküls zeigt die Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Lösung [8] und ergibt $l_p = 53 \text{ nm}$ für 10 mM Na^+ [27] bzw. $l_p = 15 \text{ nm}$ für 80 mM Na^+ [30].

Die Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment ist in diesem Modell auf einzelsträngige DNA und bei doppelsträngiger DNA auf den Bereich geringer Ausdehnung beschränkt. Eine rein entropische Feder ist nur bis an ihre Konturlänge l_0 dehnbar, im Gegensatz dazu kann DNA jedoch darüber hinaus gestreckt werden. Das Verhalten der DNA im Bereich ihrer Konturlänge zeigt Abbildung 2.2. Es wird durch ein elastisches Modul (Enthalpiekräfte) beschrieben und ist durch einen starken Anstieg der rücktreibenden Kraft gekennzeichnet. Das elastische Modul des Moleküls liegt im Bereich von $1\text{-}1,2 \text{ nN}$ [6].

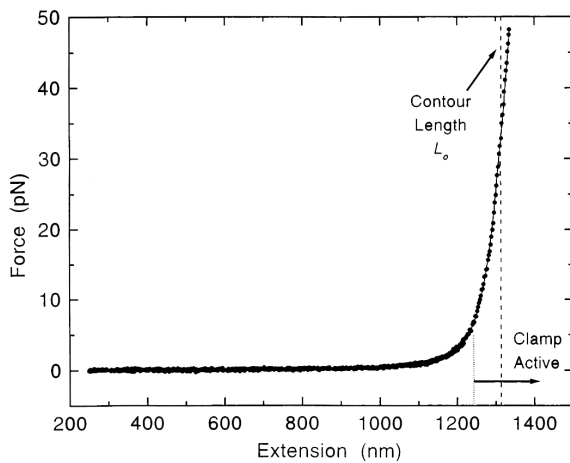


Abbildung 2.2: Anstieg der rücktreibenden Kraft an der Konturlänge bei Ausdehnung eines DNA-Moleküls. Meßwerte gefittet mit dem modifizierten Marko-Siggia-Modell [6].

2.2.3 Das WLC-Modell

Eine gute experimentelle Übereinstimmung wird mit einem *WLC-Modell* (*wormlike chain*), modifiziert nach *Marko-Siggia*, erreicht. Es stellt eine Kombination aus entropischer und enthalpischer Theorie dar. Die rücktreibende Kraft F des DNA-Moleküls errechnet sich aus

$$(2.1) \quad F = \left(\frac{k \cdot T}{l_p} \right) \left[\frac{1}{4(1 - x/l_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{l_0} \right]$$

mit der Boltzmann-Konstante k , der absoluten Temperatur T , der Persistenzlänge l_p , der Konturlänge l_0 und seiner Ausdehnung x [31].

Die Modellierung der hydrodynamischen Streckung eines DNA-Moleküls und der dabei wirkenden Kräfte erfolgt beim *WLC-Modell* unter Einbeziehung der *Stokes-Reibung*. Das DNA-Molekül wird dabei in elliptische Segmente doppelter Persistenzlänge aufgeteilt. Abbildung 2.3

zeigt Meßwerte und Modellierung für die Streckung eines 21,8 μm langen DNA-Moleküls in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit des umgebenden Mediums [25].

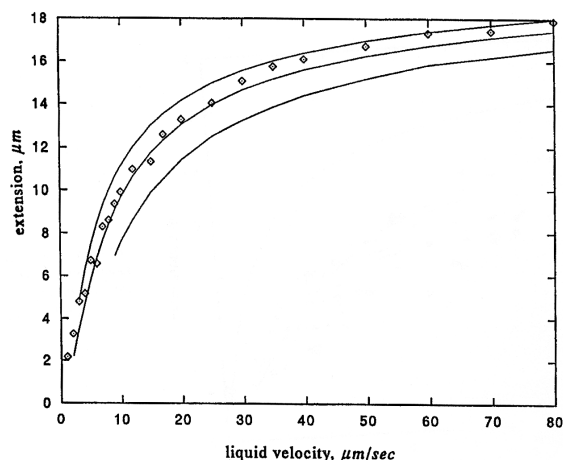


Abbildung 2.3: Streckung eines 21,8 μm langen DNA-Moleküls durch hydrodynamische Kräfte im Fluß. Von unten nach oben zeigen die Linien die Berechnung für Persistenzlängen von 85, 68 und 50 nm. Die Punkte zeigen die Meßwerte [25].

2.3 DNA - Protein - Wechselwirkungen

2.3.1 Grundlagen

Proteine spielen in nahezu allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Die Bandbreite ihrer Aktivität reicht von der enzymatischen Katalyse der meisten Reaktionen im biologischen System über Transport- und Speicherprozesse, koordinierte Bewegung, mechanische Stützfunktion, Immunabwehr, Erzeugung und Übertragung von Nervenimpulsen bis zur Kontrolle von Wachstum und Differenzierung.

Ein Beispiel für einen enzymatischen Katalyseprozeß ist die Erkennung der DNA durch Nukleasen und ihre unspezifische Verdauung durch DNase I zu kürzeren Oligonukleotiden. Elektrostatische Wechselwirkungen besitzen eine wichtige Funktion bei der Bindung zwischen DNA und Enzym, eine Peptidschleife paßt genau in die kleine Furche der DNA und bildet mit den Phosphatgruppen beider Stränge Salzbrücken aus. Die Wechselwirkung erfolgt etwa auf der Länge einer Helixwindung, die Sequenzspezifität erklärt sich aus der geringen Wechselwirkung mit den Basen. Für die Reaktion ist ein zweiwertiges Kation erforderlich.

Restriktionsenzyme spalten im Gegensatz dazu beide Stränge eines DNA-Moleküls an spezifischen Stellen. Sie erkennen eine zweifach rotationsymmetrische (palindrome) Nukleotidsequenz, d.h., beide Stränge der Doppelhelix werden an identischen Stellen geschnitten, wobei auf jeder Seite der Symmetrieachse dieselbe Sequenz, jedoch in umgekehrter Richtung vorliegt. Das Enzym EcoR I spaltet z.B. die in Abbildung 2.4 dargestellte Erkennungssequenz:

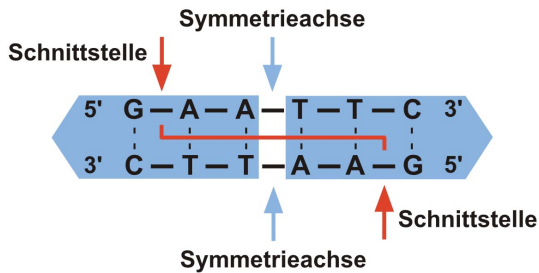


Abbildung 2.4: Zweifach rotations-symmetrische Zielsequenz einer Endonuklease am Beispiel von EcoR I.

Die Endonuklease EcoR I ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, wobei die Symmetrie des Enzyms mit der seines Substrates übereinstimmt. Die hohe Spezifität des Enzyms erfordert einen engen Kontakt zu den Basen. Dieser wird durch eine kurze Unterbrechung der Doppelhelixstruktur durch einen vom Enzym induzierten Knick (Neokink) an der Bindungsstelle der DNA erreicht. Dieser Neokink entwindet die DNA-Helix um 25° und erweitert die große Furche von 1,2 nm auf 1,6 nm. Das ermöglicht den Eintritt von jeweils zwei α -Helices der beiden Untereinheiten des Enzyms und damit die Ermittlung der Identität der Basen.

In jeder Untereinheit bildet eine α -Helix zwei Wasserstoffbrücken mit Guanin, eine zweite α -Helix 4 Wasserstoffbrücken mit zwei benachbarten Adeninen. Die zweite Untereinheit bindet das symmetrische G-A-A im komplementären DNA Strang.

Eine weitere wesentliche Rolle spielen elektrostatische Ladungen. Eine α -Helix ist dipolar und trägt auf ihrem Aminoende ca. eine halbe positive Ladung. Die Aminoenden stehen mit der DNA in Kontakt und werden von den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats angezogen.

Es bietet sich damit die Vorstellung an, daß die Endonuklease die große Furche entlangleitet, die DNA vorübergehend knickt und nach zweifach symmetrisch angeordneten und für sie spezifischen Basenpaaren sucht. Die Erkennung erfolgt ohne eine Trennung der Basenpaare, die den Erkennungsprozeß verlangsamen würde [19,20].

2.3.2 Lambda-DNA und Apa I, Sma I, EcoR I

Lambda-DNA ist die doppelsträngige DNA des Bakteriophagen λ mit einer Länge von 48.502 Basenpaaren. Die Länge des Moleküls in seiner gestreckten Form beträgt ca. 16,5 μm . Das DNA-Molekül besitzt an beiden 5'-Enden zueinander komplementäre, jeweils 12-bp lange einzelsträngige Überhänge (kohäsive Enden) [69]. Den schematischen Aufbau von Lambda-DNA zeigt Abbildung 2.5.

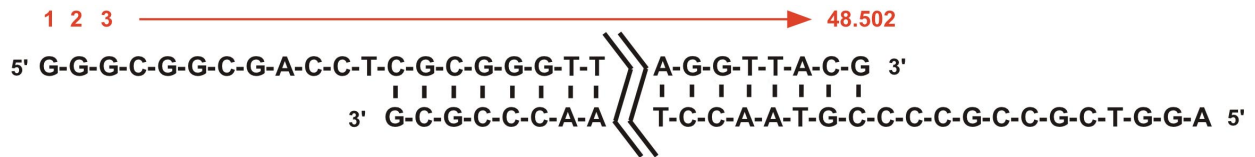


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der komplementären Enden von Lambda-DNA und Nomenklatur der Basenzählung [69].

Nach Infektion eines Bakteriums durch den Bakteriophagen wird die Phagen-DNA durch eine Ligase der Wirtszelle zu einer zyklischen DNA geschlossen. Es können zwei verschiedene Entwicklungswege eingeschlagen werden. Beim lytischen Zyklus werden die viralen Funktionen voll expremiert, was zur Entstehung von ca. 100 neuen Viruspartikeln und dabei zur Lyse des Bakterium führt. Bei einem alternativen lysogenen Zyklus wird die Phagen-DNA kovalent in die DNA der Wirtszelle eingebaut. Die meisten Phagenfunktionen werden in diesem Schritt ausgeschaltet, und die virale DNA ruht als Prophage. Erst eine Inaktivierung des für dieses Stadium notwendigen λ -Repressors ermöglicht die Rückkehr zum lytischen Zyklus [32]. Der λ -Phage ist ein oft verwendeter Vektor für die DNA-Klonierung in Bakterien, im folgenden wird seine DNA jedoch für Einzelmolekül-Untersuchungen verwendet.

Das Lambda-DNA-Molekül besitzt die in Tabelle 2.1 aufgeführten und für die nachfolgenden Experimente genutzten Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen.

	Molekulargewicht [g mol ⁻¹]	Erkennungssequenz	Schnittstellen auf Lambda-DNA [bp]	Länge der Fragmente [bp]
Apa I		5'—G GGCC↓C—3' 3'—C↑CCGG G—5'	10.090	10.090 38.412
Sma I	28.780	5'—CCC↓GGG—3' 3'—GGG↑CCC—5'	19.399 31.619 39.890	19.399 12.220 8.271 8.612
EcoR I	30.926	5'—G↓AATT C—3' 3'—C TTAAT↑G—5'	21.226 26.104 31.747 39.168 44.972	21.226 4.878 5.643 7.421 5.804 3.530

Tabelle 2.1: Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Apa I*, *Sma I* und *EcoR I* auf Lambda-DNA.

2.3.3 pRevTet-On/-Off DNA und Pvu I, Mlu I, Mfe I

Die Vektoren pRevTet-On und pRevTet-Off dienen normalerweise dem Aufbau stabiler Tet-On bzw. -Off Zelllinien. Sie ermöglichen dabei den Gentransfer in die Wirtszelle, in der in Kombination mit einem retroviralen Expressionsvektor die effektive und Tetracyclin-gesteuerte Expression eines vorbestimmten Gens erfolgen würde [33].

In dieser Arbeit wird das DNA Paar pRevTet-On (7.649 bp) und pRevTet-Off (7.847 bp) jedoch zur Darstellung zweier nahezu identischer DNA-Moleküle verwendet, die sich nur in einigen wenigen bekannten Mutationen unterscheiden.

Beide DNA-Moleküle liegen als Vektoren vor und müssen für die weiteren Experimente linearisiert werden. Dafür dient die Restriktionsendonuklease Pvu I, die beide Vektoren einmal schneidet.

	Erkennungssequenz	Position der Schnittstelle auf pRevTet-On [bp]	Länge der Fragmente [bp]	Position der Schnittstelle auf pRevTet-Off [bp]	Länge der Fragmente [bp]
Pvu I	5'—CG AT↓CG—3' 3'—GC↑TA GC—5'	6.884	7.649	7.082	7.847
Mlu I (an mit Pvu I linearisierter DNA)	5'—A↓CGCG T—3' 3'—T GCGC↑A—5'	3.867	4.632 3.017	keine	--
Mfe I (an mit Pvu I linearisierter DNA)	5'—C↓AATT G—3' 3'—G TTAA↑C—5'	keine	--	4.654	5.419 2.428

Tabelle 2.2: Schnittstellen und Fragmentlängen der Restriktionsendonuklease Pvu I auf zyklischer pRevTet-On/-Off DNA und von Mlu I und Mfe I auf der mit Pvu I linearisierten DNA.

Die zwei, nahezu identischen DNA-Moleküle dienen nach ihrer Linearisierung als Modell für die durchgeführte Einzelmolekül-Unterscheidung. Tabelle 2.2 zeigt die auf ihnen vorhandenen Schnittstellen für die beiden Restriktionsendonukleasen Mlu I und Mfe I [34,35]. Je nachdem, ob eine Mikroinjektion des entsprechenden Enzyms das beobachtete DNA-Molekül in zwei Fragmente schneidet oder nicht, ist eine Zuordnung der beiden DNA-Moleküle nach Tabelle 2.2 möglich.

2.3.4 DNA-Ligase und Terminale Transferase

DNA-Ligase katalysiert eine Phosphordiesterbindung zwischen zwei doppelsträngigen DNA-Molekülen mit kohäsiven Enden. Für diese Reaktion muß am 5'-Ende der zu verknüpfenden Stränge eine Phosphatgruppe und am 3'-Ende eine freie OH-Gruppe vorhanden sein. Für den Ablauf der Reaktion ist eine Energiequelle, wie ATP oder NAD⁺, erforderlich. T4-DNA-Ligase verknüpft ebenfalls stumpf endende DNA-Doppelstränge [36].

Terminale Transferase katalysiert die Verknüpfung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) mit 3'-OH-Enden von Doppel- oder Einzelstrang-DNA-Molekülen in einer Matrizenunabhängigen Reaktion. Dabei wird anorganisches Phosphat freigesetzt. Die Reaktion ist ebenfalls mit vielen modifizierten dNTP's, wie Biotin-16-ddUTP möglich [72].

2.3.5 Minor-Groove-Binder

Minor-Groove-Binder sind Proteine, die spezielle Bindungsmechanismen zur kleinen Furche der DNA-Doppelhelix aufweisen. In den folgenden Experimenten dienen die Minor-Groove-Binder SN6113 und Netropsin dazu, die mechanischen Eigenschaften der DNA zu variieren. Die Bindung dieser Moleküle an DNA führt einerseits zu einer Versteifung aufgrund der geringeren Beweglichkeit der Doppelhelix und andererseits zu einer Verkürzung durch zusätzliche Knicke. Die Kräfte zwischen Minor-Groove-Bindern und der DNA beruhen auf einer Kombination aus elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen.

SN6113 und Netropsin gehören zur selben Gruppe von Molekülen und sind strukturell ähnlich. Während die Bindung von SN6113 jedoch sequenzunspezifisch und mit relativ geringer Bindungsaffinität erfolgt, bindet Netropsin mit hoher Affinität vor allem an AT-reiche Bereiche der DNA [37].

Beide Moleküle spielen in der pharmazeutischen Forschung als Anti-Leukämie-Präparate eine Rolle. Die durch sie hervorgerufenen Veränderungen der DNA und damit der DNA-Enzym-Interaktionen sind für ein Verständnis ihrer Wirkungsweise wichtig.

2.4 Fluoreszenzfarbstoffe

2.4.1 Grundlagen

Die Emission von Photonen aus angeregten Elektronenzuständen bezeichnet man als Lumineszenz. Handelt es sich hierbei um einen Singulettzustand, in dem das angeregte Elektron die entgegengesetzte Spinorientierung zu dem Elektron im Grundzustand hat, spricht man von Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu kann sich das angeregte Elektron in einem Triplettzustand mit paralleler Spinorientierung zu dem Elektron im Grundzustand befinden. In

diesem Fall ist ein Übergang des Elektrons in den Grundzustand nur durch Umklappen seines Spins möglich, die Übergangsraten sind dadurch wesentlich langsamer, und es handelt sich um Phosphoreszenz. Die Lebensdauer eines Elektrons im angeregten Zustand liegt hier im Bereich von 10^{-3} bis 10^2 s, im Gegensatz zur Fluoreszenz, bei der die Übergangszeiten bei ca. 10^{-8} s liegen [38,39]. Abbildung 2.6 zeigt die Elektronenniveaus und die möglichen Elektronenübergänge.

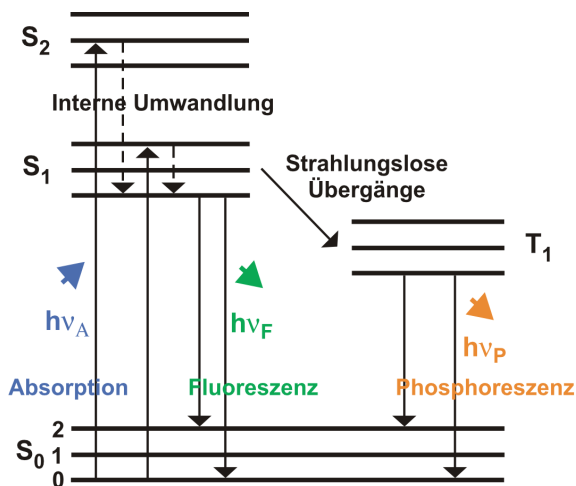


Abbildung 2.6: Darstellung von Absorption und Emission durch das Jablonski-Diagramm.

S_0 , S_1 , S_2 stellen den Grundzustand bzw. den ersten oder zweiten angeregten Zustand eines Elektrons dar. Jeder dieser Zustände besitzt noch eine Anzahl weiterer Unterniveaus (0,1,2). Die Anzahl der Moleküle in den unterschiedlichen Energieniveaus im thermischen Gleichgewicht ist durch die *Boltzmann-Verteilung* gegeben und zeigt, daß sich die weitaus größte Anzahl der Moleküle bei Raumtemperatur im untersten Niveau des jeweiligen Energiezustandes befindet. Die Übergangszeiten zwischen den Unterniveaus liegen in der Größenordnung von 10^{-12} s und erfolgen damit wesentlich schneller als die Fluoreszenzemission. Fluoreszenzübergänge treten dadurch zwischen den jeweils untersten Niveaus der Energiezustände auf. Der Energieverlust, der durch diese internen Übergänge in das thermische Gleichgewicht auftritt und sich in einer niedrigeren Energie des Fluoreszenzlichts im Gegensatz zum Anregungslicht ausdrückt, wird als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet [38].

Des weiteren treten gleichzeitig zur Fluoreszenzemission strahlungslose Übergänge in den Grundzustand S_0 auf, was zu einer Verringerung der Quantenausbeute des Fluorophors führt. Die Quantenausbeute ist definiert durch die Anzahl der emittierten Photonen dividiert durch die Anzahl der absorbierten Photonen. Sie ist in erster Linie abhängig vom betrachteten Fluorophor, jedoch immer kleiner eins.

2.4.2 DNA Fluoreszenzfarbstoffe

Die folgende Darstellung bezieht sich auf die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Fluoreszenzfarbstoffe. Es handelt sich dabei um die Cyanin-Dimere TOTO-1 und YOYO-1 und die DNA-Farbstoffe SYBRGreen und PicoGreen. Die Farbstoffe sind mit der 488 nm Linie des Ar-Kr-Lasers anregbar und zeichnen sich durch eine hohe Bindungsspezifität und Affinität zu DNA aus. Bindung an DNA führt bei ihnen durch einen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute zu einer mehr als 1000-fachen Verstärkung der Fluoreszenz im Gegensatz zum ungebundenen Farbstoff. Die Fluoreszenz der frei in Lösung befindlichen Fluorophore kann damit im Vergleich zur Fluoreszenz der an die DNA gebundenen Fluorophore vernachlässigt werden. Zum Vergleich deckt die Intensitätsauflösung der Kamera 256 (8 bit) Stufen ab. Ein Auswaschen der überschüssigen Farbstoffe ist damit nicht notwendig.

Die Cyanin-Farbstoffe interkalieren mit jeweils einem Ringsystem zwischen zwei Basenpaare der Doppelhelix und bewirken dabei eine teilweise Entwindung der Helix. Die Verbindung der beiden Cyanin-Ringsysteme liegt in der kleinen Furche der DNA [40]. Der Farbstoff besitzt damit eine stabile Position in der Doppelhelix. Die Struktur von TOTO-1 zeigt Abbildung 2.7.

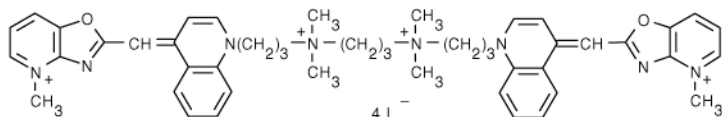


Abbildung 2.7: Strukturformel von TOTO-1 [40].

Über Struktur und DNA-Bindung der Farbstoffe SYBRGreen und PicoGreen sind keine Informationen bekannt bzw. zugänglich. Sie gehören zu den sensitivsten, zur Zeit verfügbaren DNA-Fluoreszenzfarbstoffen. SYBRGreen dient in erster Linie zum Färben von DNA in Gelen, während PicoGreen zur Quantifizierung von DNA in Lösungen verwendet wird. SYBRGreen und PicoGreen haben eine schwächere Bindung an DNA als die oben beschriebenen Cyanin-Farbstoffe und unterbinden nicht die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wie Apa I, EcoR I oder Hind III [16,42]. Diese Eigenschaft ist für die in dieser Arbeit durchgeführten Restriktionsexperimente von besonderer Bedeutung.

Die spektralen Eigenschaften der verwendeten DNA-Farbstoffe sind in Tabelle 2.3 dargestellt [41,42,43].

	Molekulargewicht [g mol ⁻¹]	Absorptionsmaximum [nm]	Absorptionskoeffizient [cm ⁻¹ M ⁻¹]	Emissionsmaximum [nm]	Quantenausbeute
TOTO-1	1.303	514	117	533	0,34
YOYO-1	1.271	491	98,9	509	0,52
SYBRGreen	keine Angaben	497	keine Angaben	520	0,8
PicoGreen	keine Angaben	502	keine Angaben	523	keine Angaben

Tabelle 2.3: Spektrale Eigenschaften der verwendeten DNA-Fluoreszenzfarbstoffe

2.4.3 Photoausbleichen

Die irreversible Zerstörung der angeregten Fluorophore auf Grund intensiver Bestrahlung stellt einen limitierenden Faktor bei der Fluoreszenzdetektion dar. Jedes fluoreszierende Molekül emittiert eine Farbstoff-spezifische Anzahl von Photonen, bevor es ausbleicht. Die durch das Photoausbleichen bestimmte Quantenausbeute eines Fluoreszenzfarbstoffes Φ_{bl} entspricht dem Verhältnis von ausgebleichten Moleküle n_{bl} zu der Gesamtzahl der absorbierten Photonen n_{phot}

$$(2.2) \quad \Phi_{bl} = n_{bl}/n_{phot}.$$

Die Abnahme der Fluorophorkonzentration $dc_{Fl}(t)/dt$ mit der Bestrahlungszeit t ist proportional zur Fluorophorkonzentration $c_{Fl}(t)$. Sie ist eine Reaktion erster Ordnung und kann mit Hilfe der Bleichkonstante k_{bl} beschrieben werden. Es folgt

$$(2.3) \quad c_{Fl}(t) = c_{Fl}(0) \cdot \exp(-k_{bl} \cdot t),$$

wobei die Fluorophorkonzentration zum Zeitpunkt null durch $c_{Fl}(0)$ gegeben ist.

Die Bleichkonstante k_{bl} ist stark von dem umgebenden Lösungsmittel abhängig, da dieses durch dielektrische Wechselwirkungen und auftretende Wasserstoffbrückenbindungen Einfluß auf die molekularen Energiebänder des Fluoreszenzmoleküls hat. Besonders H₂O besitzt durch seine starke Polarität und als Protonendonator bzw. -akzeptor eine starke Wechselwirkung mit organischen Fluorophoren.

Eine deutliche Verstärkung des Ausbleichprozesses tritt durch im Lösungsmittel gebundenen Sauerstoff auf. Sauerstoff hat einen Triplet-Elektronengrundzustand ³O₂ mit ungepaarten Elektronen. Im Gegensatz dazu befinden sich die meisten organischen Fluorophore in einem Singulettzustand. Die unter diesen Bedingungen ablaufenden photoinduzierten Reaktionen mit freien Radikalen spielen allerdings eine untergeordnete Rolle. Durch

Bestrahlung der Sauerstoffmoleküle entstehen jedoch angeregte Singulettzustände mit ebenfalls gepaarten Elektronen, wodurch effizientere Reaktionen zwischen dem Sauerstoff und den Fluorophoren ermöglicht werden. Diese Reaktionen führen zu einer irreversiblen Zerstörung der Fluorophore [44].

2.4.4 Stabilisierung der Fluoreszenz

Eine Verzögerung des Ausbleichprozesses ist durch eine Verminderung des Sauerstoffs in der Lösung bzw. durch einen Austausch des Sauerstoffs mit Argon oder Stickstoff möglich. Das Austauschgas wird dafür unter Rühren im Vakuum in die Lösung eingeleitet.

Eine weitere Möglichkeit, ein schnelles Ausbleichen zu verhindern, besteht in der Anwendung von Fluoreszenzstabilisatoren. Diese erschweren sowohl die Reaktion der aktivierten Sauerstoffmoleküle als auch die Reaktion der freien Radikale oder verringern ihre Konzentration in der Lösung. Ein Nachteil ist, daß Stabilisatoren oftmals in hohen Konzentrationen (> 1 mM) eingesetzt werden müssen und damit sowohl die Untersuchungsbedingungen verändern als auch ein Auslöschen der Fluoreszenz hervorrufen können [44].

Die folgende Aufstellung betrachtet gängige Fluoreszenzstabilisatoren und vergleicht einige ihrer Eigenschaften:

- Glucose-Oxidase (0,1 mg Glucose-Oxidase + 0,018mg Katalase + 2,3 mg Glucose auf 1ml Puffer) [45]: Reduziert die Konzentration des gelösten Sauerstoffs.
- 2-Mercaptoethanol (1%) bzw. Dithiothreitol (1%) [46]: Reduziert die Konzentration freier Radikale.
- p-Phenylendiamin (PPD) (90% Glycerin + 10% PBS mit 5 mM PPD) [47]: Sehr effektiv, jedoch photo- und thermoinstabil, toxisch - nicht *in vivo* anwendbar.
- 1,4-Diazobicyclo[2,2,2]-octane (DAPCO) (90% Glycerin + 10% TrisHCl (1 M, pH 8,0) mit 220 mg DAPCO) [47]: Stabil und nichtionisierend, nicht toxisch - *in vivo* anwendbar.
- „Antifade“ (kommerzielles Produkt) [48]: Verhindert Fluoreszenzquenching, entwickelt für Chromosomenfärbung bei *in situ* Hybridisierung.

2.4.5 Längenbestimmung der DNA-Fragmente

Die Länge der Restriktionsfragmente folgt aus der Messung ihrer Fluoreszenzintensität. Eine direkte mikroskopische Längenmessung liefert keine verwertbaren Ergebnisse, da die Fragmente unterschiedlich stark gestreckt sind und nach dem enzymatischen Schnitt in ihre globuläre Form relaxieren.

Bei der Vernachlässigung von Quenchingprozessen und der Annahme einer homogenen Fluorophorverteilung entlang des DNA-Moleküls (1 Fluorophor je 3-5 bp [42]) ist die gemessene

Intensität der Fragmente I_{Fr} proportional zu ihrer Länge x_{Fr} . Mit der gemessenen Fluoreszenzintensität I_{ges} des gesamten DNA-Moleküls und seiner bekannten Länge (48.502 bp für Lambda-DNA) ergibt sich nach Abzug der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz I_{FrHg} bzw. I_{gesHg} die Länge des jeweiligen DNA-Fragments zu

$$(2.4) \quad x_{Fr} = \frac{48.502 \text{ bp} \cdot (I_{Fr} - I_{FrHg})}{I_{ges} - I_{gesHg}}.$$

2.5 Mikroskopie

2.5.1 Auflösungsvermögen

Vergrößerung und Bildentstehung im Lichtmikroskop werden durch die geometrische Optik dargestellt [49]. Im Gegensatz dazu erklärt die Wellenoptik Bildauflösung und Kontrast. Das Abbild eines leuchtenden Punkts ist ein Beugungsscheibchen mit airischer Intensitätsverteilung (Abbildung 2.8 a), die durch eine Besselfunktion erster Ordnung (Abbildung 2.8 b) beschrieben wird.

Die Intensitätsminima des Beugungsscheibchens sind Ringe mit den Radien

$$(2.5) \quad r_1 = \frac{1,22 \cdot \lambda}{2 \cdot A}, \quad r_2 = \frac{2,23 \cdot \lambda}{2 \cdot A} \quad \text{und} \quad r_3 = \frac{3,24 \cdot \lambda}{2 \cdot A},$$

wobei λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts und A die numerischen Apertur des Objektivs angeben. Damit ist die von *Abbe* eingeführte numerische Apertur

$$(2.6) \quad A = n \cdot \sin\alpha$$

(n : Brechungsindex der Immersionsflüssigkeit bzw. $n = 1$ im Trockensystem und α : halber Öffnungswinkel des Objektivs) eine entscheidende Größe für das Auflösungsvermögen des Mikroskops.

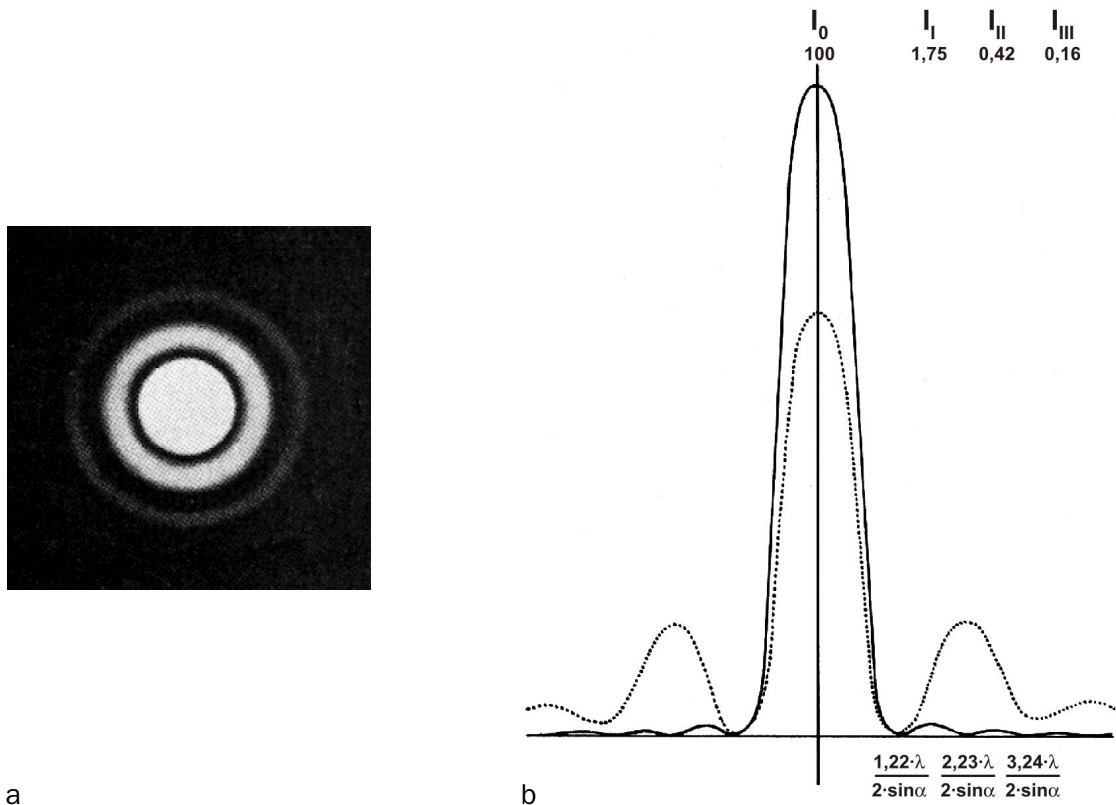


Abbildung 2.8 a: Das Beugungsmuster der Airy-Scheibe zeigt die Abbildung eines Punkts [50].
 b: Mathematisch wird die Intensitätsverteilung durch eine Besselfunktion beschrieben.
 — zeigt die Intensitätsverteilung bei einem fehlerfreien Objektiv, ... die Intensitätsverteilung bei einem Objektiv mit sphärischer Aberration [51].

Zwei Objekte sind getrennt wahrnehmbar, wenn ihr Abstand größer als ihr scheinbarer Durchmesser ist, d.h., wenn das Hauptmaximum des einen Beugungsscheibchens auf das erste Minimum seines benachbarten Beugungsscheibchens fällt. Der Abstand x zweier gerade noch auflösbarer Objektpunkte, das *Abbe-Kriterium*, ist damit

$$x = \frac{1,22 \cdot \lambda}{2 \cdot A} \quad (2.7)$$

Sind die Objekte keine Selbstleuchter, sondern werden im Mikroskop durch einen Kondensator beleuchtet, setzt sich die Apertur aus Objektiv- und Kondensorapertur zusammen ($A = A_{\text{ob}} + A_{\text{ko}}$) [52].

Durch den Einsatz bildverarbeitender Techniken ist eine Kontrastverstärkung, die noch geringere als durch das *Abbe-Kriterium* vorgegebene Intensitätsunterschiede auflösen kann, möglich. Selbst geringste Einsattelungen zwischen den Beugungszentren benachbarter Punkte sind damit nachweisbar. Die Auflösung ist in diesem Fall durch das *Sparrow-Kriterium*

$$(2.8) \quad x = \frac{0,5 \cdot \lambda}{2 \cdot A}$$

begrenzt.

2.5.2 Durchlichtmikroskopie

Im Durchlicht-Hellfeld bleiben Strukturen auch oberhalb des *Abbe-Kriteriums* unsichtbar, wenn zwischen ihnen kein wesentlicher Intensitätsunterschied besteht.

Eine Möglichkeit der Kontrasterhöhung bildet die Dunkelfeldtechnik. Bei Objekten, die keine stärkeren Kontrastunterschiede zeigen, führt eine indirekte Beleuchtung durch gebeugtes oder gestreutes Licht oft zu höherem Kontrast. Es entstehen helle Objekte auf dunklem Grund. Weitere Möglichkeiten der Kontrasterhöhung bieten Phasenkontrast-, differentielle Interferenzkontrast-, Interferenz- oder Polarisationsmikroskopie [49].

Damit ist die Auflösungsgrenze des Mikroskops durch die Kontrastgrenze gegeben. Der Kontrast K zwischen hellen und dunklen Bereichen eines Objekts ist definiert als

$$(2.9) \quad K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}},$$

wobei I_{\max} die Intensität der hellen Bereiche und I_{\min} die Intensität der dunklen Bereiche angibt. $K = 1$ entspricht einem maximalen Kontrast und $K = 0$ einer gleichmäßig leuchtenden Fläche. Ein Maß für die Abbildungsgüte des Mikroskops ist damit der Kontrastübertragungsfaktor KF

$$(2.10) \quad KF = \frac{\text{Bildkontrast}}{\text{Objektkontrast}}.$$

Der Kontrastübertragungsfaktor ist eine weitere Auflösungsgrenze. Er ist abhängig von der Größe der zu übertragenden Strukturen und geht bei Strukturabständen x von

$$(2.11) \quad x \approx \frac{\lambda}{2 \cdot A}$$

gegen null.

Die genannten Kriterien zeigen, daß das Auflösungsvermögen eines Mikroskops nicht durch eine scharfe Grenze definiert ist. Vielmehr nimmt die Unterscheidbarkeit von Struktureinheiten deutlich ab und wird von einem kritischen Auflösungsbereich begrenzt [52].

2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Werden die zu untersuchenden Objekte fluoreszenzgefärbt oder ihre Eigenfluoreszenz ausgenutzt, ist eine starke Kontrasterhöhung möglich. Fluoreszierende Moleküle sind nach Ausblendung des Anregungslichts selbstleuchtende Objekte auf dunklem Hintergrund, wodurch die Beobachtung kleinster Strukturen möglich wird. Die Erkennbarkeit eines selbstleuchtenden Objekts ist unabhängig von seinen Abmessungen. Sie ist im Gegensatz zu der oben beschriebenen Auflösungsgrenze für die Unterscheidung zwischen zwei Objekten nur durch seine Leuchtintensität begrenzt. Damit ist die Darstellung selbst einzelner Moleküle, die in ihren Abmessungen weit unter der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegen, möglich. Der Durchmesser der DNA-Doppelhelix beträgt z.B. 2,4 nm, sie wäre ohne den Einsatz von Fluoreszenztechniken nicht sichtbar. Im Gegensatz dazu bestimmt das Auflösungsvermögen des Mikroskops jedoch den scheinbaren Durchmesser des Moleküls von 200-500 nm.

Mit gekühlten CCD-Kameras, die eine Sensitivitätsgrenze von 10-100 Photonen besitzen, ist die Aufnahme kontrastreicher Fluoreszenzbilder von Objekten bis zur beugungsbedingten Auflösungsgrenze des Mikroskops möglich. Kommen für die Bildaufnahme intensivierte CCD-Kameras, mit denen der Nachweis einzelner Photonen möglich ist, zum Einsatz, wird die Detektion einzelner fluoreszierender Moleküle möglich.

Durch den Einsatz spezifisch bindender Fluoreszenzfarbstoffe ist die Darstellung definierter Strukturbestandteile eines Objekts möglich. Eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse erfolgt durch die Verwendung von zwei oder mehreren spezifisch bindenden Farbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsbereichen. So lassen sich z.B. ausgewählte Rezeptoren einer Zelle durch die Färbung mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachweisen [53].

In Abbildung 2.9 sind zwei Beispiele fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen dargestellt. Abbildung 2.9 a zeigt den Zeitverlauf der Relaxation eines 39 μm langen einzelnen DNA-Moleküls, Abbildung 2.9 b die 3-fach Fluoreszenzfärbung eines Maus-Fibroblasten.

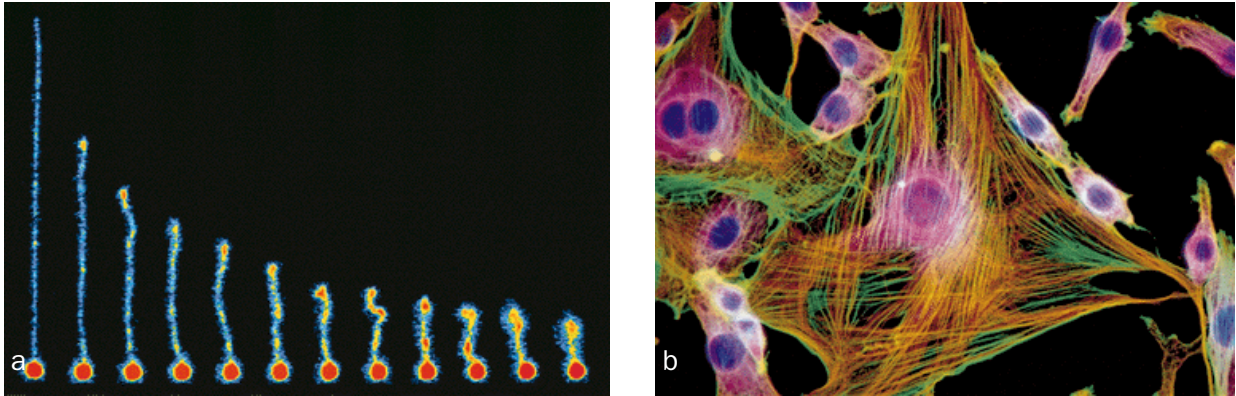


Abbildung 2.9 a: *Relaxation eines 39 µm langen, mit YOYO-1 gefärbten DNA-Moleküls in Intervallen von 4,5 s. Das DNA-Molekül ist am unteren Ende an eine 1 µm große Mikrokugel gebunden und im hydrodynamischen Fluß gestreckt [54].* b: *Aceton-permeabilisierter und formaldehyd-fixierter Maus-Fibroblast. Die 3-fach Fluoreszenzfärbung erfolgte mit F-actin spezifischem BODIPY FL phalloidin, mit einem monoclonalen Maus Anti-Tubulin-Antikörper in Konjugation mit einem monoclonalen Texas Red gefärbten Ziege Anti-Maus-IgG (H+L) Antikörper und mit DAPI [55].*

2.5.4 Bildverstärkung und CCD-Kameras

Die Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder stellt besonders an die Lichtempfindlichkeit der Kamera hohe Anforderungen. Steht die Aufgabe, die Fluoreszenz einzelner markierter Moleküle aufzunehmen, ist der Einsatz eines Bildverstärkers notwendig. Er verstärkt das vorhandene Licht bis zu einem Faktor von 100.000 bei mehrstufigen Einheiten und ermöglicht damit sogar den Nachweis einzelner Photonen.

In Bildverstärkern der ersten Generation wird das aufzunehmende Objekt über das Objektiv auf eine Photokatode abgebildet. Aus dieser Photokatode werden Elektronen herausgelöst, die in einer Vakuumröhre vervielfacht werden. Diese Elektronen treffen auf einen Phosphorschirm und regen diesen zum Leuchten an. Die Lichtverstärkung beträgt etwa 100.

Bei Bildverstärkern der zweiten Generation wird die Vakuumröhre durch eine Mikrokanalplatte ersetzt. Die Führung der Elektronen erfolgt in einer Vielzahl kleiner Kanäle, in der sie durch Sekundärelektronenvervielfachung vermehrt werden. Jeder Kanal stellt einen Photomultiplier dar. Die Verstärkung erreicht Werte bis 10.000.

In der dritten Generation erfolgt der Einsatz von Gallium-Arsenid als Photokatode. Die hierbei erreichte Empfindlichkeitssteigerung ist jedoch auf einen Spektralbereich von 600-900 nm begrenzt.

Um ein nutzbares Ausgangssignal bei einer gegebenen Anzahl eintreffender Photonen zu erhalten, muß sich die Anzahl der erhaltenen Signal-Elektronen von der Anzahl der vorhandenen

Rausch-Elektronen abheben. Die Rausch-Elektronen verteilen sich dabei auf die folgenden Quellen:

- Photonenrauschen, entspricht der Wurzel aus der Anzahl der Signal-Elektronen
- CCD-Rauschen, entsteht in den CCD-Kanälen durch den Transfer, den Dunkelstrom usw.
- Verstärkerrauschen, die Rausch-Elektronen des Ausgangsverstärkers.

Als Beispiel erzeugt ein System aus 1-stufigem Bildverstärker (Verstärkung 1000x, Quanteneffizienz 15%, Wirkungsgrad 75%), hocheffizienter optischer Kopplung (Abbildungswirkungsgrad 20%) und empfindlicher CCD-Kamera (Quantenwirkungsgrad 40%) aus einem eintreffenden Photon 80 Signal-Elektronen bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 4,6. Das System wäre für den Nachweis einzelner Photonen geeignet [56].

2.6 Optische Pinzette

2.6.1 Aufbau

Die optische Pinzette oder die optische Falle ist ein stark fokussierter Laserstrahl, mit dem durch Lichtdruck Kräfte auf dielektrische Partikel übertragen werden können. Die Partikel werden im Fokus des Laserstrahls berührungslos gehalten oder bewegt. Die Größe der manipulierbaren Partikel reicht vom atomaren Bereich, in dem einzelne Atome oder Moleküle gehalten und damit gekühlt werden können, über das Einfangen von Kolloiden und Aerosolen bis zu Partikeln in der Größenordnung von 50 μm . Vor allem im biologischen Bereich ist damit die berührungslose Fixierung oder die gezielte Bewegung einzelner Zellen möglich. Die obere Größe der manipulierbaren Partikel ist durch die vorhandene Kraftübertragung begrenzt und direkt abhängig von der eingesetzten Laserenergie.

2.6.2 Kraftwirkung

Die Wirkungsweise der optischen Pinzette unterteilt sich in zwei Bereiche. Sind die Partikel kleiner als die Lichtwellenlänge, liegt Rayleigh-Streuung der Übertragung der Kräfte zugrunde, sind die Partikel gleich oder größer der Lichtwellenlänge, tritt Mie-Streuung auf. Der Rayleigh-Bereich basiert auf einer Dipolanregung der Partikel, die als molekulare Antennen wirken. Es treten sowohl Streukräfte in Richtung des einfallenden Laserlichts als auch Gradientenkräfte in Richtung des Intensitätsgradienten des Lichts auf. Letztere fixieren die Partikel im Fokus des Laserstrahls. Der Bereich der Mie-Streuung, der bei den in dieser Arbeit verwendeten 1 μm Latex-Kugeln zu Grunde liegt, lässt sich mit Hilfe der Strahlenoptik und dem Strahlungsdruck des Lichts erklären. Die Voraussetzung sind transparente Partikel mit einem größeren

Brechungsindex als das umgebende Medium, was für Latex ($n = 1,65$) in Wasser ($n = 1,33$) gegeben ist. Als Lichtquelle werden oftmals IR-Laser eingesetzt, da biologische Medien in diesem Spektralbereich eine hohe Transparenz besitzen und eine Schädigung des Materials somit vermieden wird. Die technische Realisierung (Abschnitt 3.11) kann mit einem über einen Lichtleiter in das Mikroskop eingekoppelten Nd-YAG-Laser (1.064 nm , $P \approx 1 \text{ W}$) erfolgen. Voraussetzung für die notwendige starke Fokussierung ist ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur ($1,3-1,4$) [57].

Die qualitative Beschreibung der auftretenden Kräfte ist in Abbildung 2.10 dargestellt. Die einfallenden Strahlen (schwarze Pfeile) werden an der Grenzfläche zwischen Kugel und umgebendem Medium gebrochen. Die dadurch hervorgerufene Richtungsänderung der Strahlen entspricht einer Impulsänderung der Photonen und überträgt einen Impuls p auf die Kugel. Der Impuls eines Photons ist durch

$$(2.12) \quad p = m \cdot c = E/c$$

gegeben, wobei m die relativistische Masse des Photons, c die Lichtgeschwindigkeit und E die Energie eines Photons angibt. Bei vollständiger Absorption der Photonen ($\gamma = 1$) von der Kugel ist die durch die Impulsänderung der Photonen übertragene Kraft F durch

$$(2.13) \quad F = dp/dt = \gamma \cdot P/c$$

gegeben, wobei P die Leistung des Lichtstrahls (Energie pro Zeit) und γ den Faktor des Impulsübertrags darstellt. Bei vollständiger Reflexion der Photonen erfolgt ein doppelter Impulsübertrag mit $\gamma = 2$. Ein Teil der bei der optischen Pinzette auftretenden Kräfte entsteht durch Absorption und Reflexion der Photonen an und in der Kugel. Diese sind jedoch unerwünscht, da sie die Kugel aus dem Fokus des Laserstrahls heraus treiben. Der genutzte Teil der Kräfte (rote Pfeile in Abbildung 2.10) resultiert aus der durch die Brechung der Lichtstrahlen hervorgerufenen Impulsänderung. Diese bewegen bzw. halten die Kugel im Fokus des Laserstrahls [58,59].

Abbildung 2.10 a zeigt die rücktreibenden Kräfte in transversaler x-y-Richtung. Die durch die ungleichen Brechungswinkel hervorgerufene resultierende Kraft wirkt in Richtung des Laserfokus. In Abbildung 2.10 b sind die wirkenden Kräfte für eine Kugel oberhalb des Fokuspunkts in axialer z-Richtung dargestellt. Die Kugel bewegt sich nach unten in Richtung des Fokus. Befindet sich die Kugel im Gegensatz dazu unterhalb des Fokus, spiegeln sich die Kräfte und bewirken ein Aufsteigen der Kugel bis zum Fokuspunkt [60].

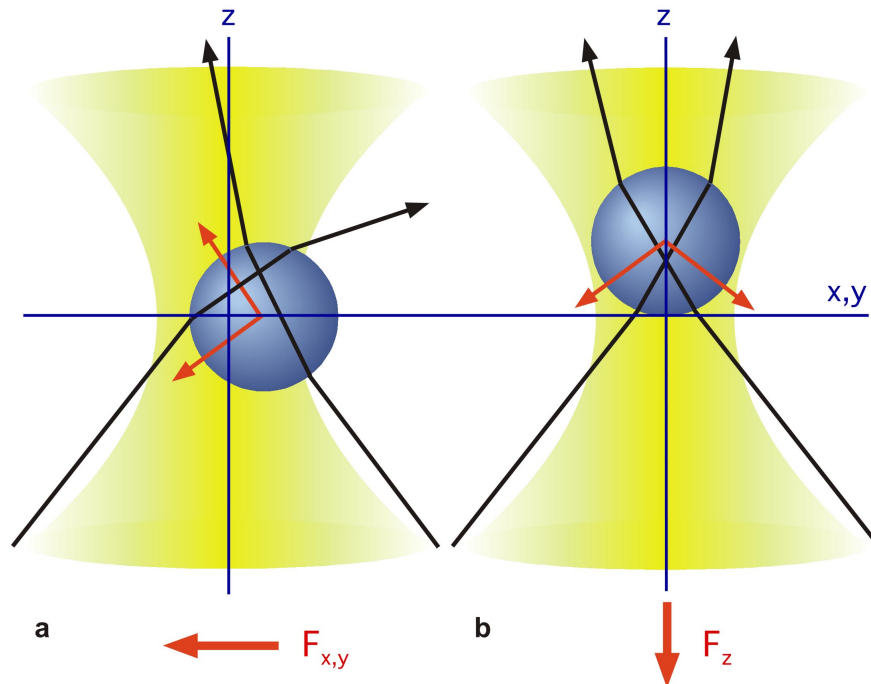


Abbildung 2.10: Die durch Brechung des Lichts hervorgerufenen Kräfte halten die Mikrokugel im Fokus des Laserstrahls.

a: Entstehung der transversalen Kräfte, b: Entstehung der axialen Kräfte.

Die transversalen rücktreibenden Kräfte werden durch das gaussförmige Intensitätsprofil des Laserlichts verstärkt. Die höhere Intensität achsennaher Strahlen führt dort zu einer stärkeren resultierenden Kraft als bei der Brechung achsenferner Strahlen. Es entsteht somit eine weitere rücktreibende Kraft in x-y-Richtung zur Achse des Laserstrahls [61].

Die durch die optische Pinzette übertragbare Kraft ist direkt durch die Laserintensität bestimmt. Weitere Abhängigkeiten sind durch die Fokussierung des Laserstrahls, die Größe und den Brechungsindex der Partikel, den Brechungsindex des umgebenden Mediums und die Laserwellenlänge gegeben. Die maximal übertragbaren transversalen Kräfte liegen üblicherweise im Bereich bis zu 50 pN, die axialen Kräfte sind hingegen deutlich kleiner.

2.7 Mikroinjektion und Diffusion

2.7.1 Mikroinjektion der Enzymmoleküle

Betrachtet wird die Injektion des Enzym-Reaktionspuffer-Gemischs als Strömung durch eine Mikrokapillare, wobei der Druck p und die Injektionszeit t bekannt sind. Feste Parameter sind der Innendurchmesser der Kapillarspitze ($d = 0,5 \mu\text{m}$ [62]) und die Länge ($l = 25 \mu\text{m}$, im

Mikroskop gemessen), nach der sich dieser Durchmesser vergrößert. Das Enzym-Puffer-Gemisch besteht nach der Vorbereitung der Restriktionsendonukleasen (Abschnitt 3.3.3) aus ca. 0,4% Glycerin ($\eta_{\text{Gl}} = 1,53 \text{ Nsm}^{-2}$) in 99,6% H_2O ($\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 10^{-3} \text{ Nsm}^{-2}$) und den enthaltenen Salzen, da die zwei durchgeführten Waschschriffe die Konzentration des Glycerins von ursprünglich 10% (20 μl Enzym mit 50% Glycerin + 100 μl H_2O) um jeweils 20% verringert haben [63]. Für die Viskosität ergibt sich damit $\eta = 7 \cdot 10^{-3} \text{ Nsm}^{-2}$.

Die Injektion erfolgt unter einem Druck von $p = 50 \text{ kPa}$ für eine Zeitspanne $t = 30 \text{ s}$ (Abschnitt 3.10) Bei einer laminaren Strömung durch die Kapillare ergibt sich ein parabolisches Strömungsprofil. Mit dem Gesetz von *Hagen-Poiseulle* folgt das in der Zeit t bei konstantem Druck p injizierte Volumen V [64]

$$(2.14) \quad V = \frac{\pi \cdot d^4 \cdot p}{128 \cdot \eta \cdot l} \cdot t = 10^{-14} \text{ m}^3 = 10 \text{ pl.}$$

Dieser Wert konnte experimentell in Abschnitt 4.1.6 bestätigt werden.

2.7.2 Diffusion der Enzymmoleküle

Die injizierten Enzymmoleküle bewegen sich auf Grund ihrer kinetischen Energie auf regellosen Bahnen in der Pufferlösung. Diese *Brownsche Molekularbewegung* setzt sich aus Translationen und Rotationen mit ständig wechselnden Richtungen zusammen. Der in der Beobachtungszeit t zurückgelegte Weg x wird durch die quadratisch gemittelte Verschiebung $\overline{x^2}$ ausgedrückt und ist abhängig von der Temperatur, der Größe der Teilchen und der Viskosität der Lösung.

Das umgebende Medium ist das in Abschnitt 2.7.1 beschriebene mikroinjizierte Enzym-Puffer-Gemisch. Seine Viskosität beträgt $\eta = 7 \cdot 10^{-3} \text{ Nsm}^{-2}$.

Der Durchmesser der Enzymmoleküle errechnet sich aus ihrer Molekülmasse (Sma I und EcoR I: $\text{MW} = 30 \text{ kgmol}^{-1}$ bzw. $m = 5 \cdot 10^{-23} \text{ kg}$, Tabelle 2.1) und der durchschnittlichen Dichte eines Enzyms ($\rho = 1,4 \cdot 10^3 \text{ kgm}^{-3}$). Er beträgt $d = 4 \text{ nm}$, wenn die Form des Enzyms als eine Kugel angenähert wird ($V = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d^3$).

Mit der Boltzmann-Konstante ($k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) und Temperatur ($T = 293 \text{ K}$) folgt aus der Formel von *Einstein und Smoluchowski* [65]

$$(2.15) \quad \overline{x^2} = \frac{k \cdot T}{\pi \cdot \eta \cdot d} \cdot t = 5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{s}^{-1} \cdot t = 50 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \cdot t.$$

Der quadratisch gemittelte zurückgelegte Weg $\overline{x^2}$ ist in einem Diffusionsprozeß proportional zur Zeit t . Bei Einführung der Diffusionskonstante D ergibt sich für die Enzyme Sma I und EcoR I in dem gegebenen Puffer der folgende Wert

$$(2.16) \quad D = \overline{x^2} / 3t = 17 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}.$$

Ein Vergleich mit aus der Literatur bekannten Diffusionskonstanten von Proteinen ähnlicher Größe bestätigt die Richtigkeit dieser Abschätzung. Myoglobin mit einem Molekulargewicht von $MW = 17 \text{ kgmol}^{-1}$ ($m = 3 \cdot 10^{-23} \text{ kg}$) besitzt einen Durchmesser von $d = 3,5 \text{ nm}$ und eine auf die gegebene Viskosität ($\eta = 7 \cdot 10^{-3} \text{ Nsm}^{-2}$) umgerechnete Diffusionskonstante von $D = 16 \text{ } \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ($D = 112 \text{ } \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ in H_2O). Für Hämoglobin mit dem $MW = 64,5 \text{ kgmol}^{-1}$ ($m = 10^{-22} \text{ kg}$) ist ein Durchmesser von $d = 5,5 \text{ nm}$ und eine Diffusionskonstante von $D = 11 \text{ } \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ($D = 74 \text{ } \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ in H_2O) angegeben [66].

2.7.3 Freie Weglänge und Diffusionszeit

Nach Mikroinjektion der Enzymmoleküle in die Umgebung des DNA-Moleküls bewegen sich diese auf regellosen Bahnen und treffen zufällig mit der DNA zusammen. Die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens ist durch die Konzentration der Enzymmoleküle, ihren Durchmesser und die Größe der DNA gegeben. In einem ersten Schritt soll die freie Weglänge der diffundierenden Enzymmoleküle zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zusammenstößen mit der DNA berechnet werden.

Die Konzentration der Enzymmoleküle wurde in Abschnitt 4.1.6 bestimmt. Sie beträgt nach abgeschlossener Injektion ($t = 30 \text{ s}$) $c = 6 \cdot 10^4 \text{ pl}^{-1}$ und soll im betrachteten Zeitraum als konstant angesehen werden. Der Durchmesser eines Enzymmoleküls beträgt $d_{\text{Enz}} = 4 \text{ nm}$ (Abschnitt 2.7.2).

Um die starke Asymmetrie des DNA-Moleküls in Betracht zu ziehen, soll für die Rechnung das Lambda-DNA-Molekül ($l_{\text{DNA}} = 16 \text{ } \mu\text{m}$, $d_{\text{DNA}} = 2,4 \text{ nm}$) in eine Kette aus $n = 7.000$ Kugeln mit dem Durchmesser des Moleküls zerlegt werden.

Die mittlere freie Weglänge x der Enzymmoleküle bis zum Zusammentreffen mit einer Kugel der zerlegten DNA ergibt sich aus dem Stoßquerschnitt beider Teilchen [65]

$$x = \frac{1}{c \cdot \frac{\pi}{4} (d_{\text{DNA}} + d_{\text{Enz}})^2} = 500 \text{ } \mu\text{m}. \quad (2.17)$$

In Gleichung (2.15) wurde der Zusammenhang zwischen dem mittleren quadratischen Diffusionsweg der Enzymmoleküle und der dafür benötigten Zeit angegeben ($\overline{x^2} = 50 \text{ } \mu\text{m}^2\text{s}^{-1} \cdot t$). Daraus ergibt sich die bei einer freien Weglänge von $x = 500 \text{ } \mu\text{m}$ in Gleichung (2.17) benötigte Zeit t zwischen aufeinanderfolgenden Zusammenstößen. Diese ist die mittlere benötigte Zeit für ein Zusammentreffen zwischen einem Enzymmolekül und einer Kugel des zerlegten DNA-Moleküls. Für ein Zusammentreffen mit dem gesamten DNA-Molekül ($n = 7.000$ Kugeln) folgt damit

$$t = \frac{1}{n} \cdot \frac{x^2}{50 \text{ } \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}} \approx 1 \text{ s}. \quad (2.18)$$

3 Materialien und Methoden

3.1 Katalog der Geräte und optischen Materialien

- Bildbearbeitungsprogramm Scion Image, National Institutes of Health, USA
- Digitalmanometer GDH 14 AN, Greisinger Electronic, Regenstauf
- Emissionsfilter BP 520 nm, FWHM = 10, T = 70%, Sperr-OD = 4, Omega Optical, PhotoMed, Seefeld
- Laser DPY 421, Nd-YAG, cw, 1064 nm, Adlas, Lübeck
- Laser Spectra-Physiks 2018, Ar-Kr-Ionen, cw, 488 nm, Spectra-Physics, Mountain View, Kalifornien, USA
- Lichtleiter 1064 nm, BTO Bungert, Weil der Stadt
- Lichtleiter 488 nm, BTO Bungert, Weil der Stadt
- Magnetrührgerät Ikamg RCT, IKA Labortechnik, Staufen
- Mikroinjektor CellTram Oil 5176, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
- Mikromanipulator MCL-3, Märzhäuser, Wetzlar
- Mikroskop Axiovert 135 M, Zeiss, Jena
- Mikroskopie-Deckgläser 24x60 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig
- Mikroskopobjektiv, Plan-Neofluar 100x1,30 Oil, Zeiss, Jena
- Mikroskoptisch mit Motorsteuerung MCU 26, Zeiss, Jena
- Monitor PVM 1442-QM, Sony
- Optisches Leistungsmeßgerät Fieldmaster, Coherent, Dieburg
- Sammellinse bi-konvex 40 mm, Linos Photonics, Göttingen
- Sammellinse plan-konvex 40 mm, Linos Photonics, Göttingen
- Spektrometer DU 640, Beckmann, USA
- Sterilwerkbank, SterilGardHood, Baker Company, Sanford, Maine, USA
- Strahlteiler Reflexion 488 nm und 1064 nm, Transmission 520 nm, AF Analysentechnik, Tübingen
- Strahlteiler Reflexion 488 nm, Transmission 1064 nm, AF Analysentechnik, Tübingen
- Streuplatte, Glasbläserwerkstadt, IMB, Jena
- Thermomixer 5436, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
- Vakuumpumpe CP 3, Millipore, Eschborn
- Verschluß UniBlitz T 132, Optilas, Puchheim
- Video-Digitalisierungskarte Scion Image CG-7, Scion Corporation, Fredrick, Maryland, USA
- Videokamera C 2400, Bildverstärker C 2400-30H, Steuerteil M 4314, Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching am Ammersee
- Videorecorder SVO-9500 MDP, Sony Deutschland, Berlin

- Vortexer VF 2, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
- Wasserreinigungssystem Milli-Q Plus, Millipore, Eschborn
- Zentrifuge Biofuge 28RS, Heraeus Instruments, Gera

3.2 Katalog der biologischen und chemischen Materialien

- Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Antifade, Appligene Oncor, Heidelberg
- Argon, Hausversorgung, IMB Jena
- BioNick Labeling System dNTP Mix, Life Technologies, Gaithersburg, USA
- 3'-Bio-5'-Phos-12-Oligonukleotid, Interactiva Biotechnologie, Ulm
- Biotin-16-2',3'-dideoxy-uridin-5'-triphosphat, Roche Diagnostics, Mannheim
- Biotinyliertes Oligonukleotid 5'-Biotin-NH-(T)₂₅-3', Promega, Mannheim
- Dithiothreitol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- DNA Farbstoff PicoGreen, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
- DNA Farbstoff SYBRGreen, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
- DNA Farbstoff TOTO-1 iodine, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
- DNA Farbstoff YOYO-1 iodine, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
- DNA Tailing Kit, Boehringer Mannheim, Mannheim
- Glucose, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Glucose-Oxidase, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Katalase, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Lambda-DNA, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Latex-Mikrokugeln mit Streptavidin beschichtet, 1 µm, Polysciences, Eppelheim
- Latex-Mikrokugeln mit Streptavidin beschichtet, 2 µm, Polysciences, Eppelheim
- 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Microcon Zentrifugationsfilter YM-10, NMWL = 10.000 Dalton, Millipore, Eschborn
- Microcon Zentrifugationsfilter YM-100, DS-NCO = 125 BP, Millipore, Eschborn
- Mikroinjektionskapillaren Sterile Femtotips II, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
- Poly-L-Lysin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Restriktionsendonuklease Apa I und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Restriktionsendonuklease EcoR I und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Restriktionsendonuklease Mfe I und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Restriktionsendonuklease Mlu I und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

- Restriktionsendonuklease Pvu I und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Restriktionsendonuklease Sma I und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Sterile Filter Millex-HA 0,45 µm, Millipore, Eschborn
- Stickstoff, Hausversorgung, IMB Jena
- T4-DNA-Ligase und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- T4-Polynukleotid-Kinase und zugehöriger Reaktionspuffer, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
- Terminale Transferase und zugehöriger Reaktionspuffer, Boehringer Mannheim, Mannheim
- Ultrafree-MC Zentrifugationsfilter 0,22 µm, Millipore, Eschborn
- Vektor pRevTet-Off, Clontech Laboratories, Heidelberg
- Vektor pRevTet-On, Clontech Laboratories, Heidelberg

3.3 Vorbereitung der Präparation

Bereits geringe Verunreinigungen der Proben verhindern ein erfolgreiches Experiment. So bewirkt z.B. eine Kontamination mit Nukleasen den vorzeitigen Verdau der DNA oder mit fluoreszierenden Molekülen den Anstieg der Hintergrundfluoreszenz. Alle Präparationsarbeiten erfolgen daher unter einer Sterilwerkbank.

3.3.1 Reinigung und Entgasung des H₂O

Für die nachfolgenden Präparationen findet ausschließlich gereinigtes H₂O Verwendung. In einem Wasserreinigungssystem gefiltertes H₂O wird autoklaviert (20 min, 120°C) und steril filtriert. Aus dem in den Schritten 3.5 bis 3.8 verwendeten H₂O wird zusätzlich gelöstes O₂ entfernt und durch N₂ ersetzt. Dafür wird N₂ für 3 h im Vakuum (- 85 kPa) in das H₂O eingeleitet. Gleichzeitiges Rühren des H₂O mit einem Magnetrührgerät dient dem schnelleren Gasaustausch.

3.3.2 Linearisierung von pRevTet-On/-Off

Beide Vektoren (pRevTet-On und pRevTet-Off) liegen in der gelieferten Lösung in zyklischer Form vor. Sie müssen für die nachfolgenden Experimente an einer Stelle enzymatisch geschnitten und damit linearisiert werden. Die Linearisierung erfolgt mit der Restriktionsendonuklease Pvu I und dem Ansatz [67]:

- 0,8 µl ($5 \cdot 10^{10}$ Moleküle) des jeweiligen Vektors (500 ng/µl)
- 1 µl Pvu I (5 U/µl)

- 1 µl Reaktionspuffer (10 x Konzentrat)
- 1 µl BSA (10 µg/ml)
- 6 µl H₂O

für 60 min bei 37°C im Thermomixer. Das Enzym wird anschließend 20 min bei 80°C ebenfalls im Thermomixer deaktiviert.

3.3.3 Vorbereitung der Restriktionsendonukleasen

Für die Enzym-Mikroinjektionen kommen die Restriktionsendonukleasen Apa I, Sma I, EcoR I, Mlu I und Mfe I zur Anwendung. Ein Austausch des Puffers in der gelieferten Lösung ist notwendig, da der hohe Anteil an Glycerin (50%) durch seine Viskosität eine Mikroinjektion unmöglich macht. Die Enzyme werden in dem jeweils empfohlenen und mitgelieferten Reaktionspuffer aufgenommen und anschließend zur Entfernung von Mikropartikeln filtriert.

20 µl der entsprechenden Restriktionsendonuklease werden in Microcon-YM-30-Röhrchen in 100 µl H₂O aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 10.000g, 4°C). Der Waschschrift wird ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wird der Überstand in 20 µl einer 1:1 Verdünnung des jeweils entsprechenden Reaktionspuffers in H₂O aufgenommen.

Das Enzym-Puffer-Gemisch wird abschließend in Ultrafree-MC Zentrifugenröhrchen (Ø = 0,22 µm) filtriert (5 min, 5.000g, 4°C).

3.3.4 Reinigung der Objektträger

Die als Objektträger verwendeten Mikroskopie-Deckgläser werden zur Entfernung von Detergenzien und anderen Verunreinigungen mit entionisiertem H₂O für jeweils 1 Minute beidseitig abgespült und durch abblasen mit Argon oder Stickstoff getrocknet.

3.4 Biotinylierung der DNA

Die Biotinylierung der DNA ermöglicht eine Kopplung an Mikrokugeln. Wird ein Ende der DNA mit einem Biotin-Molekül markiert, kann dieses an die Streptavidin-Beschichtung einer Mikrokugel binden. Für die Biotinylierung werden vier verschiedene Methoden auf ihre Effizienz und Anwendbarkeit untersucht.

3.4.1 Hybridisierung eines biotinylierten Oligonukleotids an verlängerte DNA

Im ersten Teil erfolgt die Synthese einer poly-A-Verlängerung an die DNA [68]. Der zweite Teil dient der Biotinylierung der DNA durch die Hybridisierung mit einem zu der Verlängerung

komplementären biotinylierten Oligonukleotid. Wie in [16] gezeigt, ermöglicht diese Methode den Nachweis, daß die beobachteten Reaktionen am einzelnen DNA-Molekül erfolgen (Abschnitt 4.1.4). Der Nachteil dieser relativ aufwendigen Biotinylierung ist ihre geringe Ausbeute und eine dadurch oftmals später nicht erfolgte Kopplung der DNA an die Mikrokugeln. Für die Synthese werden:

- 0,5 µl ($5 \cdot 10^9$ Moleküle) DNA (500 µg/ml)
- 1 µl dATP (2,5 mM)
- 6 µl CoCl_2 (5 mM)
- 7 µl H_2O
- 4 µl Tailing Puffer
- 1 µl Terminale Transferase (50 U/µl)

für 30 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die anschließende Deaktivierung der Reaktion erfolgt mit 5 µl EDTA (0,2 M).

Ein zweifacher Waschschrift in Microcon-YM-100 Zentrifugationsfiltern (500g, 10 min) dient der Abtrennung von überschüssigem dATP und dem Pufferwechsel in 25 µl NaCl+TE-Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8). Daran anschließend erfolgt die Biotinylierung. Dem Ansatz wird:

- 1 µl ($5 \cdot 10^{10}$ Moleküle) des biotinylierten Oligonukleotids 5'-Biotin-NH-(T)₂₅-3' (80 nM)

zugegeben und dieser anschließend für 10 min bei 65°C im Thermomixer erhitzt. Die Hybridisierung erfolgt durch Abkühlen innerhalb von 1-2 h im Wasserbad bis auf Raumtemperatur.

3.4.2 Ligation eines biotinylierten Oligonukleotids an einen DNA-Überhang

Die Biotinylierung der DNA erfolgt mit einem biotinylierten Oligonukleotid, welches zu einem der beiden 12 Nukleotide langen Überhänge der Lambda-DNA komplementär ist [69]. Die Methode ermöglicht die gezielte Auswahl eines DNA-Endes, das Problem der Ausbeute bei der Kopplung zwischen DNA und Mikrokugel bleibt jedoch weiterhin bestehen. In einem ersten Teil wird die DNA dephosphoriliert, der zweite Teil zeigt die Ligation des Oligonukleotids an den DNA-Überhang [70]. Dafür werden:

- 12 µl H_2O
- 2 µl Reaktionspuffer (10 x Konzentrat)
- 5 µl ($5 \cdot 10^{10}$ Moleküle) Lambda-DNA (500 µg/ml)
- 1 µl Alkaline Phosphatase (10 U/µl)

für 60 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die anschließende Deaktivierung des Enzyms erfolgt für 60 min bei 65°C ebenfalls im Thermomixer. Für die Ligation des biotinylierten Oligonukleotids werden [71]:

- 5 µl H₂O
- 1 µl Reaktionspuffer (10 x Konzentrat)
- 2 µl (5·10⁹ Moleküle) der dephosphorierten DNA aus dem 1. Schritt
- 1 µl (5·10¹⁰ Moleküle) 3´Bio-5´Phos-12-Oligonukleotid (80 nM)
- 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl)

für 3 h bei 21°C im Thermomixer inkubiert. Der Ansatz wird anschließend mit 15 µl H₂O aufgefüllt.

3.4.3 Synthese eines biotinylierten DNA-Überhangs

Die Biotinylierung erfolgt durch eine Verlängerung der DNA mit einer Mischung aus Biotin-14-dATP, dATP, dCTP, dGTP und dTTP [72]. Die terminale Transferase fügt die Nukleotide in einer statistischen Folge an die DNA an. Sie muß gestoppt werden, wenn im Mittel ein Ende der DNA biotinyliert ist. Die Methode ermöglicht analog zu 3.4.1 verschieden lange Überhänge, ist jedoch leichter zu handhaben und zeigt eine höhere Ausbeute. Eine geringe Anzahl an Mikrokugeln gekoppelter DNA-Moleküle wurde in den meisten Fällen im späteren Experiment beobachtet. Für die Biotinylierung werden:

- 11 µl H₂O
- 4 µl Reaktionspuffer (10 x Konzentrat)
- 1 µl CoCl₂ Lösung (25 mM)
- 0,5 µl (5·10⁹ Moleküle) Lambda-DNA (500 µg/ml)
- 1 µl (10¹² Moleküle) dNTP-Mix (400 nM: dCTP, dGTP, dTTP und 200 nM: dATP, Biotin-14-dATP)
- 2 µl Terminale Transferase (25 U/µl)

für 15 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die anschließende Deaktivierung der Reaktion erfolgt mit 5 µl EDTA (0,2 M) auf Eis.

3.4.4 Biotinylierung der DNA mit Biotin-16-ddUTP

Die Biotinylierung erfolgt durch die Kopplung eines Biotin-16-ddUTP-Moleküls an die DNA [72]. Die Methode zeigt eine relativ hohe Effizienz und Zuverlässigkeit. Die Stöchiometrie und Reaktionszeit muß so gewählt sein, daß nach Möglichkeit nur ein Biotin-Molekül pro DNA bindet. Es werden:

- 12 μl H_2O
- 4 μl Reaktionspuffer (5 x Konzentrat)
- 1 μl CoCl_2 Lösung (25 mM)
- 0,5 μl ($5 \cdot 10^9$ Moleküle) Lambda-DNA (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. 1 μl der linearisierten Vektoren aus Abschnitt 3.3.2
- 1 μl ($5 \cdot 10^{11}$ Moleküle) Biotin-16-2',3'-dideoxy-uridin-5'-triphosphat (800 nM)
- 1 μl Terminale Transferase (25 U/ μl)

für 20 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die anschließende Deaktivierung der Reaktion erfolgt mit 5 μl EDTA (0,2 M) auf Eis.

3.5 Inkubation der DNA mit Minor-Groove-Bindern

Für eine gezielte Strukturveränderung der DNA wurde diese mit den Minor-Groove-Bindern SN6113 bzw. Netropsin inkubiert. Es werden:

- 93 μl H_2O (Abschnitt 3.3.1)
- 5 μl ($1 \cdot 10^9$ Moleküle) der biotinylierten DNA aus Abschnitt 3.4
- 1 μl SN6113 (1 mM) bzw. 1 μl Netropsin (1 mM)

für 30 min bei 21°C inkubiert. Daran anschließend erfolgt die Färbung der DNA ohne weitere Zugabe von H_2O .

3.6 Färbung der DNA

Die Markierung der DNA erfolgt mit den Fluoreszenzfarbstoffen TOTO-1, YOYO-1, SYBRGreen und PicoGreen. Aus der jeweiligen Ausgangskonzentration (TOTO-1: 1 mM, YOYO-1: 1 mM, SYBRGreen: unbekannt, PicoGreen: unbekannt) werden durch eine 1:25-Verdünnung mit H_2O (Abschnitt 3.3.1) Stammlösungen hergestellt [73].

Die Konzentration der Farbstoffe während der DNA-Färbung wurde für eine optimale Fluoreszenzintensität in Abschnitt 4.1.2 optimiert. Es werden:

- 5 μl ($1 \cdot 10^9$ Moleküle) der biotinylierten DNA aus Abschnitt 3.4
- 2 μl der jeweiligen Farbstoffstammlösung
- 93 μl H_2O (Abschnitt 3.3.1)

für 30 min bei 21°C im Dunkeln inkubiert.

3.7 DNA-Streckung mit Poly-L-Lysin

5 μl gefärbte DNA ($5 \cdot 10^7$ Moleküle) aus Abschnitt 3.6, ohne vorherige Biotinylierung, werden mit 45 μl H_2O (Abschnitt 3.3.1) aufgefüllt. Davon werden 5 μl mit 2 μl des Fluoreszenzstabilisators „Antifade“ auf einem Mikroskopdeckglas gemischt und mit 2 μl Poly-L-Lysin (5 mg/ml) überschichtet. Der Flüssigkeitstropfen wird schnell mit einem Deckglas abgedeckt.

3.8 Bindung der DNA an Mikrokugeln

DNA-Moleküle sollen einzeln und mit einem Ende jeweils an eine Mikrokugel gebunden werden. Dafür werden:

- 5 μl ($5 \cdot 10^7$ Moleküle) der gefärbten DNA aus Abschnitt 3.6
- 0,5 μl mit Streptavidin beschichtete Latex-Mikrokugeln ($10^7 \mu\text{l}^{-1}$, $\varnothing = 1 \mu\text{m}$ für Lambda-DNA und pRevTet-On, $\varnothing = 2 \mu\text{m}$ für pRevTet-Off)

für 10 min bei 21°C im Dunkeln inkubiert. Der Ansatz wird anschließend mit 50 μl entgastem H_2O (Abschnitt 3.3.1) aufgefüllt.

3.9 Mikroskopische Beobachtung

Auf dem gereinigten Mikroskopdeckglas (Abschnitt 3.3.4) werden:

- 5 μl ($5 \cdot 10^6$ Moleküle) der DNA aus Abschnitt 3.8
- 2 μl Fluoreszenzstabilisator „Antifade“

in einem Tropfen gut gemischt. Die anschließende Beobachtung im Hellfeld zeigt die Mikrokugeln, nach Umschalten in den Fluoreszenzmodus erscheinen die gefärbten DNA-Moleküle. Ein Wechsel zwischen beiden Modi ermöglicht die Suche einer Mikrokugel mit angekoppeltem DNA-Molekül, das daraufhin mit der optischen Pinzette gehalten und gezielt bewegt werden kann. Das angekoppelte DNA-Molekül steht für die weitere Analyse zur Verfügung (Abbildung 3.1).

3.10 Streckung der DNA und Mikroinjektion der Restriktionsendonukleasen

Eine Mikrokugel mit einem angekoppelten DNA-Molekül wird mit der optischen Pinzette gehalten. Die Streckung des DNA-Moleküls erfolgt durch eine gleichmäßige Bewegung des Mikroskoptisches mit einer Geschwindigkeit von ca. $80 \mu\text{m/s}$. Die Bewegung darf nicht zu schnell erfolgen, damit die Mikrokugel nicht aus der optischen Pinzette gerissen wird. Die

resultierende Bewegung zwischen der gehaltenen DNA und dem bewegten Puffer bewirkt eine hydrodynamische Kraft, die das Molekül streckt. Ein Stop der Bewegung führt zu einer Relaxation der DNA in ihre globuläre Form. Weiterhin wird die Spitze einer Injektionskapillare mit einem Mikromanipulator ca. 10 μm vor der Mikrokugel und dem angekoppelten DNA-Molekül positioniert. Den schematischen Aufbau zeigt Abbildung 3.1.

Die Mischung aus Restriktionsendonuklease und Reaktionspuffer wird unter Beobachtung der gestreckten DNA im Fluoreszenzmodus injiziert. Die Injektion erfolgt für 30 s unter einem relativen Druck von 50 kPa (0,5 bar).

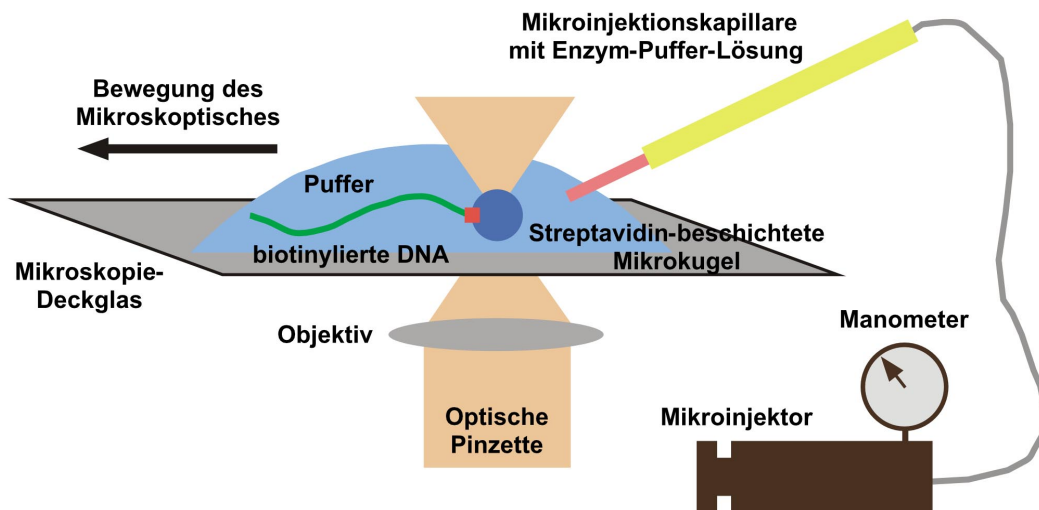


Abbildung 3.1: Die Mikrokugel wird im Fokus der optischen Pinzette gehalten und die angekoppelte DNA durch hydrodynamische Kräfte gestreckt. Gleichzeitig erfolgt die Mikroinjektion der Restriktionsendonuklease zusammen mit dem entsprechenden Reaktionspuffer.

3.11 Experimenteller Aufbau

Abbildung 3.2 zeigt den experimentellen Aufbau. Die Grundlage bildet ein inverses Mikroskop, das mit einer motorisierten Steuerung der x-y-Achse des Mikroskoptisches und der z-Achse des Objektivs ausgestattet ist. Als Objektiv dient ein Plan-Neofluar 100x1,30 Oil. Die Hellfeld-Mikroskopie erfolgt unverändert mit der vorhandenen Halogenlampe.

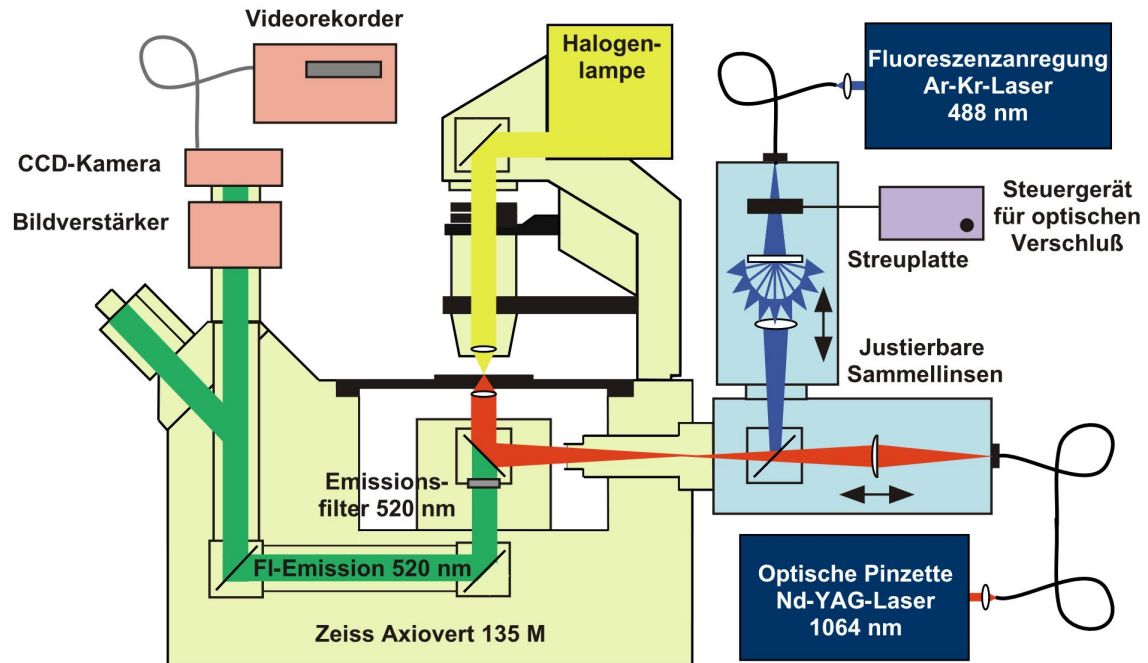


Abbildung 3.2: Aufbau des Mikroskops und Einkopplung der beiden Laser für die optische Pinzette und die Fluoreszenzanregung. Das ausgekoppelte Fluoreszenzsignal wird verstärkt, mit einer CCD-Kamera aufgenommen und einem Videorecorder gespeichert.

In das Mikroskop wird ein Nd-YAG-Laser (1.064 nm) als optische Pinzette eingekoppelt. Die Einkopplung erfolgt zur Vermeidung von Vibrationen der Laserkühlung über einen Lichtleiter. Eine plan-konvexe Sammellinse (40 mm, plane Seite zum Laser) ist über eine Mikrobank in z-Richtung justierbar und dient der Einstellung der Fokusebene der optischen Pinzette. Diese muß mit der Beobachtungsebene des Mikroskops übereinstimmen, um die gehaltenen Objekte scharf abbilden zu können [74]. Die Strahlungsintensität, gemessen am Objektiv, beträgt 4 mW.

Für die Fluoreszenzanregung wird, ebenfalls über einen Lichtleiter, ein Ar-Kr-Laser (488 nm) eingekoppelt. Im Strahlengang befindet sich eine Streuplatte, die das im Laserlicht enthaltene Speckle-Muster entfernt. Dieses Intensitätsmuster entsteht im Laser durch die Interferenz teilweise kohärenter Strahlen mit geringen zeitlichen und räumlichen Fluktuationen und verhindert eine gleichmäßige Objektausleuchtung. Die Streuplatte wird direkt durch das aus der Faser austretende Laserlicht beleuchtet und zerstreut das Muster, hat jedoch den Nachteil relativ hoher Intensitätsverluste. Eine bi-konvexe Sammellinse (40 mm) bildet die Streuplatte in die Beobachtungsebene des Mikroskops ab und leuchtet diese aus. Die Strahlungsintensität, gemessen am Objektiv, beträgt 350 μ W.

Die Zusammenführung des Strahlengangs der optischen Pinzette mit dem Strahlengang der Fluoreszenzanregung erfolgt über einen Strahlteiler, der eine Reflexion bei 488 nm und eine Transmission bei 1.064 nm besitzt. Ein weiterer Strahlteiler (Reflexion: 488 nm und 1.064 nm, Transmission: 520 nm) dient der Auskopplung der Fluoreszenzemission. Diese wird zusätzlich

mit einem 520 nm BP-Filter von Resten des Anregungslichts getrennt und nach unten aus dem Anregungsstrahlengang ausgekoppelt. Das Fluoreszenzbild kann direkt betrachtet werden oder gelangt über einen optischen Verstärker auf eine CCD-Kamera. Es kann auf einem Monitor dargestellt und mit einem VHS-Videorecorder aufgenommen werden.

3.12 Bildaufnahme, Digitalisierung und Auswertung

Die interessanten Abschnitte der auf Videoband aufgenommenen Sequenzen werden für die weitere Bildverarbeitung und Auswertung digitalisiert. Ein G3 Power Macintosh mit interner Videodigitalisierungskarte zusammen mit dem Bildbearbeitungsprogramm „Scion Image“ ermöglicht die Transformation des Videosignals in einen Stapel aus Einzelbildern im TIF-Format. Der vorhandene Arbeitsspeicher begrenzt die Anzahl der Bilder, die ohne Unterbrechung digitalisiert werden können, auf ca. 1.500 (300x400 Pixel, 8-bit Graustufen). Das entspricht bei 25 Hz Bildfolgefrequenz einer Zeitspanne von 60 s.

In dem vorliegenden Bildstapel werden jeweils zwei aufeinanderfolgende Einzelbilder pixelweise gemittelt. Die Bildfolgefrequenz von 25 Hz mit einer Zeitauflösung von 40 ms pro Einzelbild bleibt erhalten. Nach einer Kontrastverstärkung erfolgt die Selektion von Einzelbildern bzw. Bildsequenzen für die weitere Darstellung. Eine deutlichere Anschaulichkeit wird durch die Umwandlung der Graustufen in Falschfarben erreicht.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der Experimente

4.1.1 Konzentration der DNA

In einem ersten Experiment wurde die optimale Konzentration der DNA-Moleküle für die Darstellung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Abbildung 4.1 zeigt eine Konzentrationsreihe einzelner DNA-Moleküle in freier Lösung.

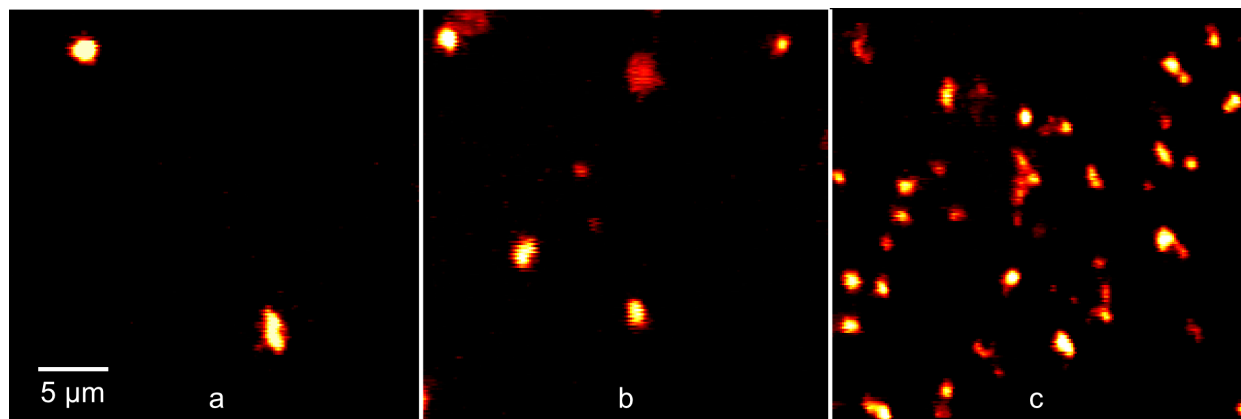


Abbildung 4.1: Fluoreszenzaufnahmen globulärer DNA-Moleküle verschiedener Konzentration in freier Bewegung. Die Färbung erfolgte mit SYBRGreen. a: 10^5 Moleküle/ μl , b: 10^6 Moleküle/ μl , c: 10^7 Moleküle/ μl

Die weiteren Experimente wurden mit einer DNA-Konzentration von 10^6 Molekülen/ μl (Abbildung 4.1 b) durchgeführt. Da für die folgende Kopplung einzelner DNA-Moleküle an Mikrokugeln eine ca. 10%-ige Ausbeute erreicht werden konnte, darf die Konzentration der DNA nicht zu gering sein, um Mikrokugeln mit gekoppelter DNA zu finden. Andererseits stört eine zu hohe DNA-Konzentration die Beobachtung des ausgewählten DNA-Moleküls.

4.1.2 Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Fluoreszenzfärbung wurden die mit einem Ar-Ionen-Laser bei 488 nm anregbaren DNA-Farbstoffe TOTO-1, YOYO-1, SYBRGreen und PicoGreen auf ihre Fluoreszenzintensität, ihre

Ausbleichzeit und die Inhibition nachfolgender Enzymreaktionen untersucht. Die Absorptionsmaxima von TOTO-1 (514 nm) und PicoGreen (502 nm) sind bereits relativ weit von 488 nm entfernt, beide Farbstoffe wurden jedoch mit in die Charakterisierung aufgenommen. Die 4 Farbstoffe zeigen zusammengefaßt die folgenden Eigenschaften:

- Die Farbstoffe TOTO-1/YOYO-1 und SYBRGreen/PicoGreen bilden analog zu ihrer molekularen Struktur (Abschnitt 2.4.2) zwei Gruppen mit jeweils vergleichbaren Fluoreszenzintensitäten und Ausbleichzeiten.
- TOTO-1 und YOYO-1 zeigen deutlich stärkere Fluoreszenzintensitäten und längere Ausbleichzeiten als SYBRGreen und PicoGreen.
- Der enzymatische Verdau gefärbter DNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI und anschließender Auftragung im Gel zeigte nur bei SYBRGreen und PicoGreen die erwarteten Restriktionsmuster. Dieses nach [16,42] erwartete Ergebnis konnte bestätigt werden.
- Der Vergleich zwischen SYBRGreen und PicoGreen zeigte für SYBRGreen geringfügig höhere Fluoreszenzintensitäten.

Für die weiteren Experimente wurde SYBRGreen verwendet, da die fluoreszenzintensiveren Farbstoffe TOTO-1 und YOYO-1 für die weiteren Enzymreaktionen nicht verwendet werden konnten.

Weiterhin wird die optimale Farbstoffkonzentration für eine Färbung mit SYBRGreen bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität (DNA-Fluoreszenz minus Hintergrund-Fluoreszenz) der Moleküle in Abhängigkeit von der Konzentration des Farbstoffes zeigt Abbildung 4.2. Eine Färbung mit 0,08% SYBRGreen (die Ausgangskonzentration wird vom Hersteller nicht angegeben) lieferte die stärkste Fluoreszenzintensität. Die weiteren Färbeparameter (30 min, 21°C, im Dunkeln) sind unverändert dem Produktdatenblatt [42] entnommen.

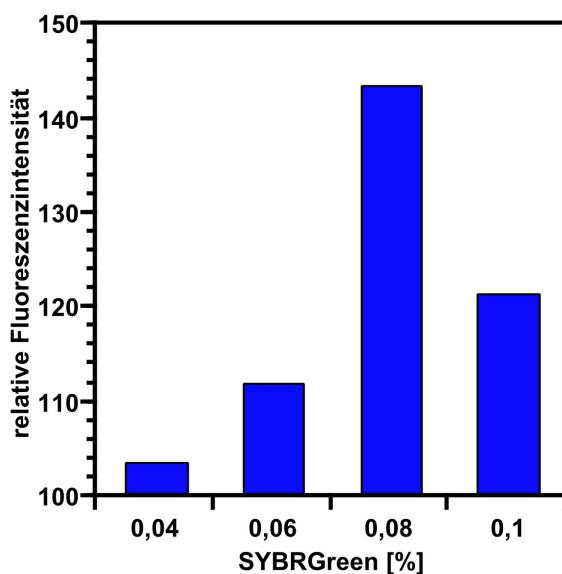


Abbildung 4.2: *Relative Fluoreszenzintensität (nach Hintergrundsubtraktion) einzelner globulärer DNA-Moleküle in Abhängigkeit von der SYBRGreen-Konzentration. Die x-Achse zeigt die Konzentration in % der Ausgangslösung, da die molare Konzentration vom Hersteller nicht angegeben wird.*

4.1.3 Charakterisierung der Fluoreszenzstabilisatoren

Um ein schnelles Ausbleichen der DNA-Fluoreszenz zu verhindern, hat sich neben der Entgasung des für die Präparation verwendeten H₂O (Abschnitt 3.3.1) und der Fluoreszenzanregung mit einer Laser-Spektrallinie (Abschnitt 3.11) der Einsatz eines effektiven Fluoreszenzstabilisators als notwendig erwiesen. Als Fluoreszenzstabilisatoren wurden Glucoseoxidase, Mercaptoethanol, Dithiothreitol und ein Antifade-Kit untersucht:

- Glucoseoxidase (0,1 mg Glucoseoxidase + 0,018 mg Katalase + 2,3 mg Glucose auf 1 ml Puffer [45]) zeigte eine um den Faktor 1,5-2 verlängerte Ausbleichzeit.
- 2-Mercaptoethanol und Dithiothreitol (jeweils 1% [46]) zeigen eine um den Faktor 2-3 verlängerte Ausbleichzeit.
- „Antifade“ (Inhalt wird vom Hersteller nicht angegeben, es handelt sich wahrscheinlich um p-Phenylendiamin in ca. 90% Glycerin [47]) zeigt eine um den Faktor 15 verlängerte Ausbleichzeit und zusätzlich eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

Für die weiteren Experimente wurde der Fluoreszenzstabilisator „Antifade“ verwendet. Abbildung 4.3 zeigt die Verlängerung der Ausbleichzeit in Abhängigkeit von der Konzentration des Fluoreszenzstabilisators. Die Ausbleichzeit gibt hier die Zeit an, bis die beobachteten DNA-Moleküle sich nicht mehr von der Hintergrundfluoreszenz abheben. Eine Mischung der DNA-Probe mit dem Stabilisator im Verhältnis 5:2 zeigt das beste Resultat.

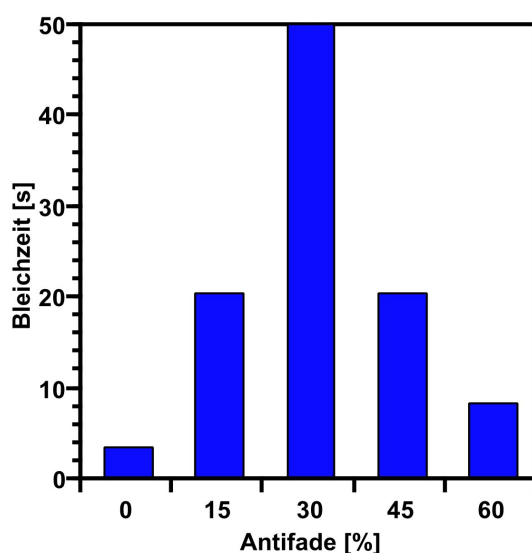


Abbildung 4.3: *Abhängigkeit der Ausbleichzeit einzelner globulärer DNA-Moleküle von der Konzentration des Fluoreszenzstabilisators.*

Da die Ausbleichzeit von weiteren Faktoren, wie der O₂-Konzentration im Puffer und der Optimierung des Aufbaus abhängig ist, schwankt sie zwischen verschiedenen Präparationen. In späteren Experimenten wurden teilweise deutlich längere Ausbleichzeiten bis ca. 5 min erreicht.

4.1.4 Biotinylierung der DNA

Für die spätere Kopplung der DNA an eine Mikrokugel muß ein Biotin-Molekül an genau ein Ende des DNA-Moleküls gebunden werden. Bei der Bindung von Biotin an beide Enden der DNA bildet diese eine Schlaufe an der Mikrokugel und eine freie Streckung des Moleküls ist nicht mehr möglich. Für die Biotinylierung der DNA wurden die in Abschnitt 3.4 aufgeführten Methoden auf ihre Effizienz und Reproduzierbarkeit untersucht:

- Die Hybridisierung eines biotinylierten Oligonukleotids an verlängerte DNA [16] ermöglicht eine Variation des Abstands zwischen Biotin und DNA. Bei einer beobachteten Enzymreaktion am DNA-Molekül handelt es sich damit um die Reaktion an einem einzelnen DNA-Molekül, da bei einem Bündel mehrerer Moleküle mit jeweils unterschiedlichen Abständen die Erkennungssequenzen der Moleküle verklebt wären und keine Reaktion erfolgen sollte [16]. Der Nachteil dieser Technik ist eine relativ aufwendige Präparation und eine geringe Ausbeute der Biotinylierung.
- Die Ligation eines biotinylierten Oligonukleotids an einen der beiden Lambda-DNA-Überhänge ermöglicht die gezielte Auswahl einer Seite der DNA zur Bindung an die Mikrokugel. In einem weiteren Schritt wäre damit die Markierung beider DNA-Enden mit unterschiedlichen Substanzen, z.B. Biotin und Digoxigenin, und damit die Anbindung unterschiedlicher Kugeln an beide DNA-Enden möglich. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß sie auf Lambda-DNA bzw. DNA mit überhängenden Enden beschränkt ist.
- Die Synthese eines biotinylierten DNA-Überhangs mit einer Mischung aus Biotin-dATP, dATP, dCTP, dGTP und dTTP ist eine Alternative zur ersten Methode. Sie ermöglicht ebenfalls eine Variation der Verlängerungen der DNA, zeigt aber eine größere Ausbeute der Biotinylierung. Die Reaktionsbedingungen und -zeiten müssen so gewählt werden, daß möglichst nur ein Biotin-Molekül pro DNA-Molekül gebunden wird.
- Die Biotinylierung der DNA mit Biotin-16-ddUTP erweist sich als die einfachste und unkritischste Methode zur Biotinylierung von DNA. Die Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, daß die meisten DNA-Moleküle Biotin nur an einem Ende gebunden haben. Unter optimalen Bedingungen konnten nach dem anschließenden Kopplungsschritt bei ca. 10% der Mikrokugeln einzelne, mit einem Ende angebundene DNA-Moleküle beobachtet werden.

4.1.5 Konzentration der Reaktionspuffer

Die Injektion des Reaktionspuffers erfolgt zusammen mit der jeweiligen Restriktionsendonuklease. Für die Reaktion benötigt das Enzym eine geeignete Ionenkonzentration im Puffer. Eine zu geringe Konzentration verhindert die Reaktion, eine zu hohe Ionenkonzentration bewirkt ein schnelles Ausbleichen der Fluoreszenz und einen Kollaps des DNA-Moleküls.

- Bei Injektion eines 1x konzentrierten Reaktionspuffers konnten keine enzymatischen Reaktionen an dem jeweiligen gestreckten DNA-Molekül beobachtet werden. Der Reaktionspuffer verteilt sich durch Diffusion anscheinend so stark, daß die Ionenkonzentration für den Ablauf der Enzymreaktion nicht ausreicht.
- Die Mikroinjektion eines 5x konzentrierten Reaktionspuffers ermöglicht die Streckung des DNA-Moleküls bei noch guter Fluoreszenzstabilität. Die Ionenkonzentration ist ausreichend für den Ablauf von Enzymreaktionen am gestreckten DNA-Molekül.
- Injektion eines 10x konzentrierten Reaktionspuffers führt zu einem Kollaps des DNA-Moleküls und zu einem schnellen Ausbleichen des Farbstoffs. Die Beobachtung von Reaktionen ist nicht möglich.

Abbildung 4.4 zeigt das Verhalten gestreckter DNA-Moleküle nach Injektion eines 5x konzentrierten und eines 10x konzentrierten Reaktionspuffers.

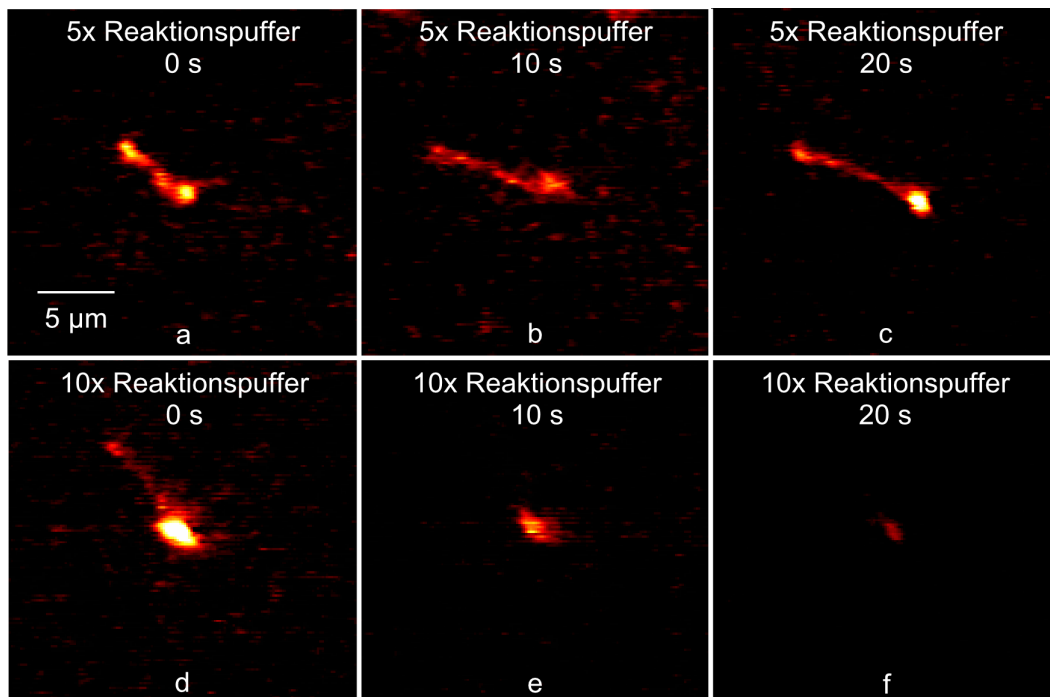


Abbildung 4.4: Ausbleichen und Kollaps der DNA in Abhängigkeit von der Konzentration des mikroinjizierten Reaktionspuffers. a-c: 5x konz. Reaktionspuffer, d-f: 10x konz. Reaktionspuffer

4.1.6 Konzentration und Diffusion der Restriktionsendonukleasen

Bei zu geringer Anzahl der mikroinjizierten Enzymmoleküle läuft in der Zeit bis zum Ausbleichen des beobachteten DNA-Moleküls keine Reaktion ab. Bei zu hoher Konzentration der

Enzymmoleküle ist in den folgenden Experimenten die beobachtete Reaktion nicht auf die Interaktion der DNA mit einem oder einigen wenigen Enzymmolekülen begrenzt.

Aus der Konzentration c der Enzymmoleküle in der Umgebung des DNA-Moleküls folgt ihre freie Diffusionszeit bis zu einem zufälligen Zusammentreffen eines Enzymmoleküls mit dem DNA-Molekül:

- Die Injektion des Enzym-Reaktionspuffer-Gemischs erfolgt für 30 s bei einem Druck von 50 kPa (0,5 bar). Aus Gleichung (2.14) im Abschnitt 2.7.1 ergibt sich damit ein injiziertes Volumen von $V = 10$ pl. Dieser Wert konnte experimentell durch eine mikroskopische Messung der Injektion in einem Öltropfen bestätigt werden.
- Eine Konzentrationsbestimmung der für die Mikroinjektion verwendeten gewaschenen und filtrierten Enzyme (Abschnitt 3.3.3) wird auf einem Comassi-gefärbten Proteingel durchgeführt. Der Vergleich mit einem BSA-Protein-Standard liefert eine Konzentration für Sma I und EcoR I von $c = (3 \pm 1) \cdot 10^{-9}$ g/ μ l. Mit einer Molekülmasse von $m = 5 \cdot 10^{-20}$ g/Molekül für beide Enzyme ergibt sich eine Konzentration von $c = (6 \pm 2) \cdot 10^{10}$ Molekülen/ μ l im Enzym-Reaktionspuffer-Gemisch.
- Daraus folgt die Anzahl der injizierten Enzymmoleküle zu $n = (6 \pm 2) \cdot 10^5$, die sich durch auftretende Verluste (z.B. Haftung an der Wand der Kapillare und eine gewisse Anzahl inaktiver Enzymmoleküle) weiter verringert.
- Das injizierte Enzymvolumen von $V = 10$ pl verteilt sich durch Diffusion (Abschnitt 2.7.2) in der Umgebung des DNA-Moleküls. Gleichung (2.15) zeigt, daß ein Enzymmolekül innerhalb einer angenommenen Beobachtungszeit von 20 s einen Weg von 30 μ m zurücklegt. Das DNA-Molekül ist damit vollständig in eine Enzymwolke eingeschlossen. Die Konzentration der Enzymwolke verringert sich damit weiterhin, soll jedoch für die folgende Betrachtung als konstant angenommen werden.
- Die Diffusion der Enzymmoleküle ist die Voraussetzung für ein Zusammentreffen mit der DNA. Im Abschnitt 2.7.3 ist die Häufigkeit der Zusammenstöße zwischen einem Enzymmolekül und der DNA auf Grund ihres Stoßquerschnitts berechnet. Mit einer Enzymkonzentration von $c = 6 \cdot 10^4$ pl⁻¹ ergibt Gleichung (2.18) eine Zeit von $t = 1$ s. Diese Zeit verlängert sich durch die geringere Konzentration tatsächlich vorhandener Enzymmoleküle ($t \sim c^{-2}$).
- Die thermische Bewegung des DNA-Moleküls erhöht die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens mit einem Enzymmolekül. Die größere Bewegung des freien DNA-Endes bewirkt dort einen größeren Wirkungsquerschnitt σ ($\sigma \sim x^2$, x : Abstand vom fixierten Ende) als am fixierten Ende. Die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens ist dadurch am freien DNA-Ende größer als am dem Ende, das mit der Mikrokugel fixiert ist.

4.2 Handhabung einzelner DNA-Moleküle

In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Methoden zur Darstellung und Handhabung einzelner DNA-Moleküle untersucht. Neben der freien Bewegung eines einzelnen DNA-Moleküls wird die Unterscheidung zwischen einzelnen und mehreren DNA-Molekülen gezeigt.

4.2.1 Einzelne Moleküle

In einem ersten Experiment zur Streckung einzelner DNA-Moleküle wird gefärbte DNA mit Poly-L-Lysin (Abschnitt 3.7) überschichtet und schnell mit einem Deckglas abgedeckt [75]. Die durch die Abdeckung mit dem Deckglas entstehende Strömung streckt die DNA-Moleküle und der Druck heftet sie an die Glasoberfläche. Poly-L-Lysin lagert sich an die DNA und bewirkt ihre Versteifung. Abbildung 4.5 zeigt ein Beispiel für auf diese Art gestreckte und fixierte DNA-Moleküle.

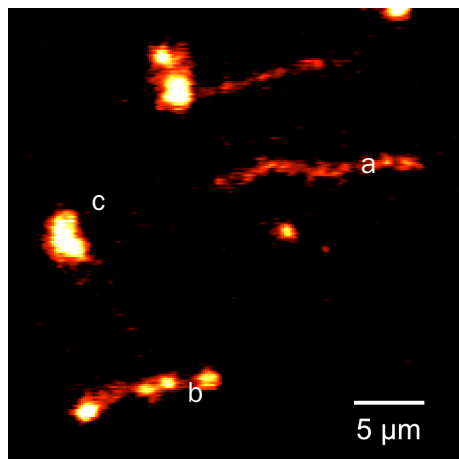


Abbildung 4.5: Einzelne DNA-Moleküle an der Oberfläche eines Mikroskopie-Deckglases. a: komplett gestreckt b: teilweise gestreckt c: nicht gestreckt

Das gleichmäßig gestreckte Molekül (Abbildung 4.5 a) zeigt relativ genau die erwartete Konturlänge von 16 µm. Das Molekül b besitzt stärker fluoreszierende Bereiche, die dort eine geringere Streckung andeuten. Das Molekül ist dadurch nur auf eine Länge von 10 µm gestreckt. Das stark fluoreszierende Moleküle c ist kaum gestreckt und in seiner globulären Form abgebildet.

4.2.2 Freie Bewegung einzelner Moleküle

In allen folgenden Experimenten wird die optische Pinzette zur Handhabung einzelner DNA-Moleküle eingesetzt. Die gefärbte (Abschnitt 3.6) und an Mikrokugeln gebundene DNA (Abschnitt 3.8-3.9) befindet sich in einem offenen Tropfen auf einem Mikroskopie-Deckglas (Abbildung 3.1). Ein Umschalten zwischen dem Fluoreszenzmodus (Abbildung 4.6 a-g) und dem

Durchlichtmodus (Abbildung 4.6 h) ermöglicht die Suche nach einer Mikrokugel mit angekoppeltem DNA-Molekül. Eine solche Mikrokugel wird daraufhin mit der optischen Pinzette gehalten. Die Bewegung des Mikroskoptisches und damit des Mediums, welches das DNA-Molekül umgibt, erzeugt einen hydrodynamischen Fluß. Durch die auftretenden Reibungskräfte kann das DNA-Molekül bis an seine Konturlänge gestreckt werden. Abbildung 4.6 a-g zeigt die Bewegung und Streckung eines einzelnen DNA-Moleküls. Der stärker leuchtende Spot an der Position der Mikrokugel deutet einen längeren, um die Kugel gewickelten Teil des DNA-Moleküls oder kleine fluoreszierende DNA-Bruchstücke, die sich direkt an die Kugel angelagert haben, an.

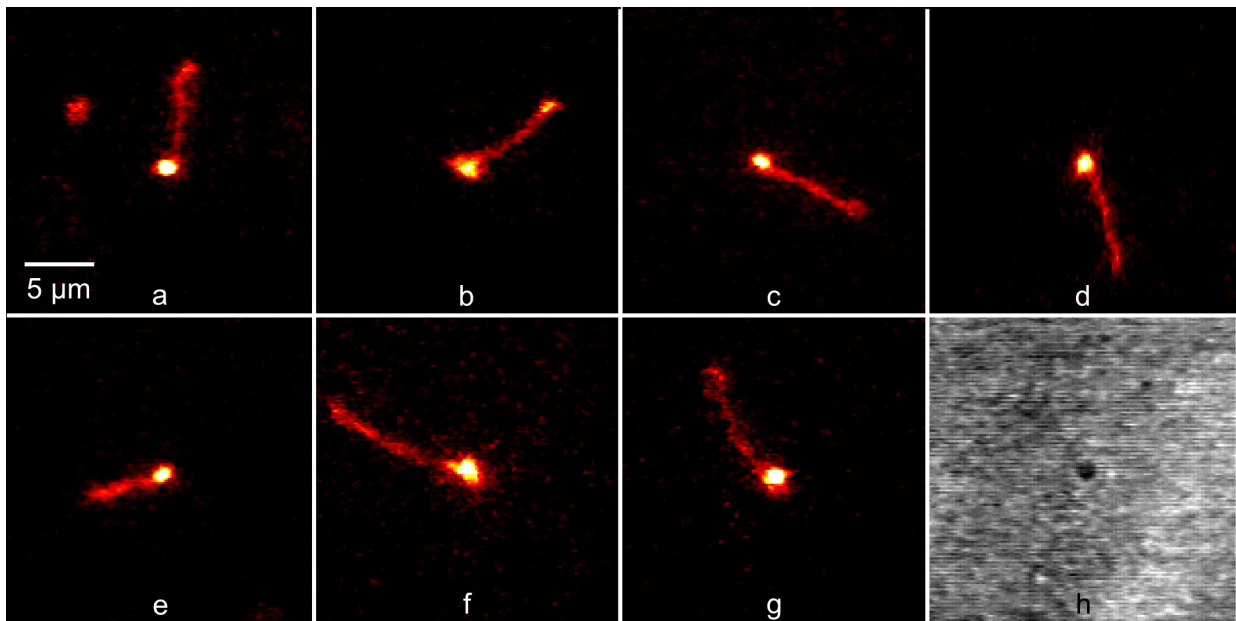


Abbildung 4.6 a-g: Freie Bewegung eines einzelnen, an eine Mikrokugel gekoppelten DNA-Moleküls.

h: Durchlichtaufnahme der mit der optischen Pinzette gehaltenen Mikrokugel, $\varnothing = 1 \mu\text{m}$.

4.2.3 Unterscheidung zwischen einem und mehreren Molekülen

Abbildung 4.7 zeigt die direkte fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung zwischen einem (a), zwei (b) und drei Molekülen (c) bzw. einem Cluster aus DNA (d). Einzelne DNA-Moleküle lagern sich unter den gegebenen physikalisch-chemischen Bedingungen im Normalfall nicht aneinander. Abbildung 4.7 b zeigt deutlich, wie sich zwei im hydrodynamischen Fluß nach links gestreckte DNA-Moleküle voneinander abstoßen. Derselbe Effekt bewirkt bei globulären Molekülen (Abbildung 4.1), daß die Moleküle nicht verklumpen. Es ist anzunehmen, daß die Abstoßung durch die negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats hervorgerufen wird.

Abbildung 4.7 e zeigt ein Konkatomer aus mindestens 3 aneinander ligierten DNA-Molekülen. Die Abbildung 4.7 macht deutlich, daß es sich in den nachfolgend gezeigten Aufnahmen von DNA-Molekülen um Untersuchungen an einzelnen Molekülen handelt.

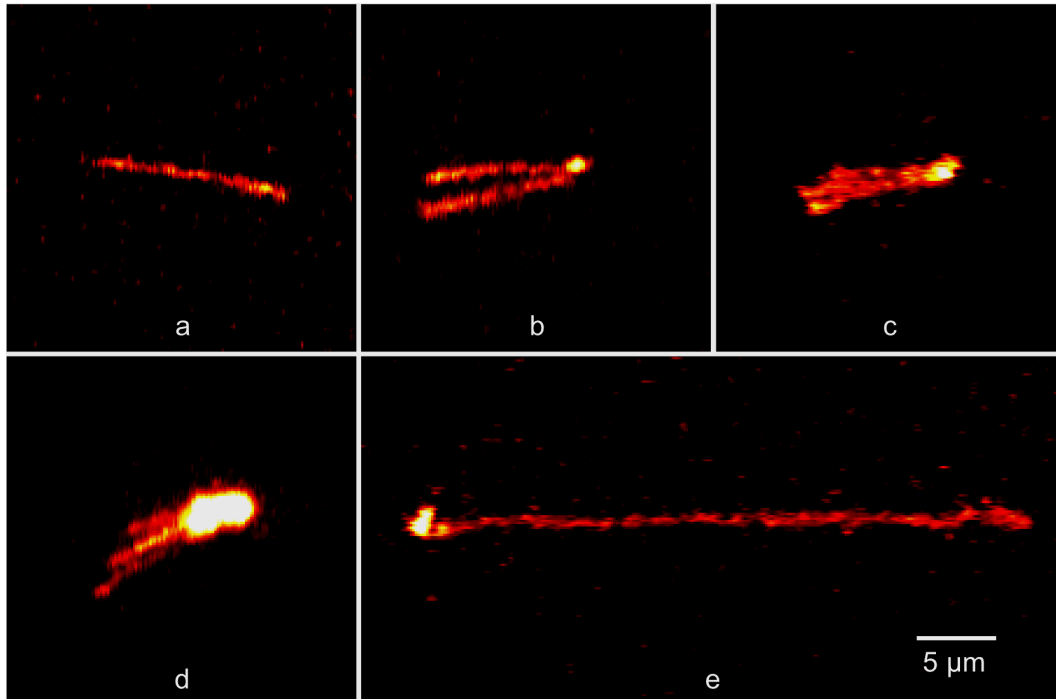


Abbildung 4.7: Fluoreszenzaufnahmen von DNA-Molekülen. a: einzelnes DNA-Molekül, b: zwei DNA-Moleküle, c: drei DNA-Moleküle, d: DNA-Cluster, die Enden von 3 Molekülen sind sichtbar, e: Konkatomer aus mindestens drei zusammenhängenden DNA-Molekülen

4.3 Strukturveränderungen von DNA-Molekülen

4.3.1 Streckung und Relaxation eines Moleküls

Ein DNA-Molekül, das an eine Mikrokugel gekoppelt ist, wird mit der optischen Pinzette gehalten und im hydrodynamischen Fluß durch die Bewegung des Mikroskoptisches gestreckt. Nach dem Stoppen der Bewegung bewirken die im Molekül auftretenden Entropie- und Enthalpiekräfte (Abschnitt 2.2) eine Relaxation in seine globuläre Form. Die Aufnahme eines solchen Relaxationsprozesses und die entsprechenden Zeiten zeigt Abbildung 4.8.

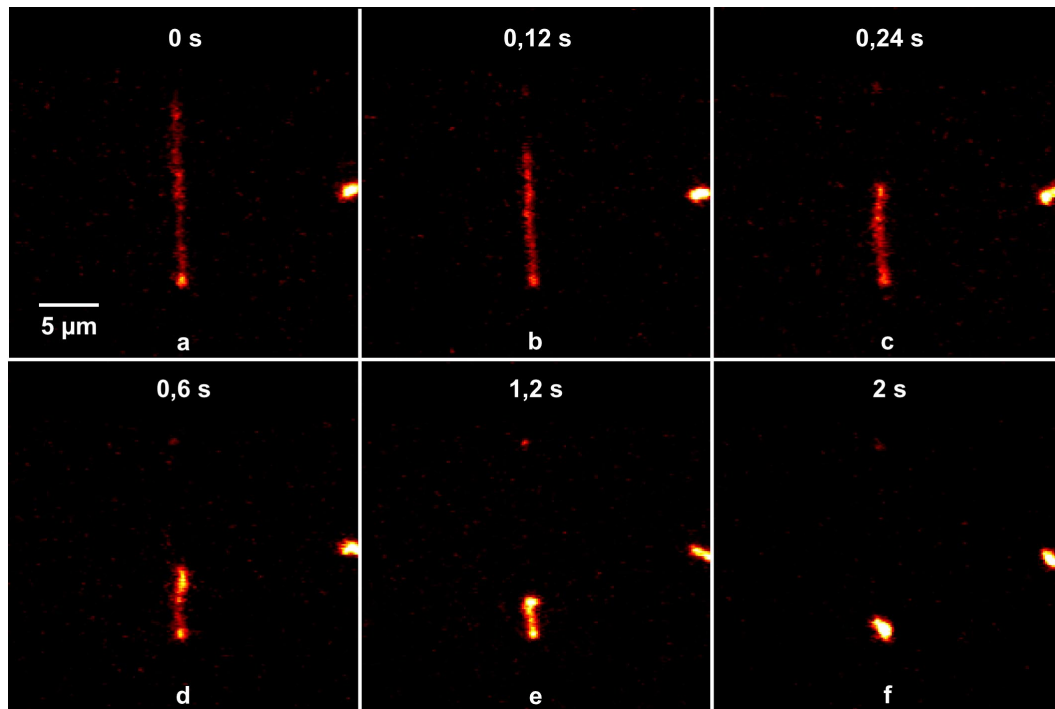


Abbildung 4.8: Relaxation eines einzelnen, bis an seine Konturlänge gestreckten DNA-Moleküls mit den entsprechenden Zeiten.

Die gemessenen Werte für die Konturlänge, die Relaxationszeit und die Größe des globulären Moleküls sind charakteristisch für die Ionenstärke des Puffers oder lassen Rückschlüsse auf Veränderungen der DNA-Struktur durch angelagerte kleinere Moleküle zu [76].

4.3.2 Einfluß von Minor-Groove-Bindern

Im folgenden Experiment wird der Einfluß von Minor-Groove-Bindern auf Veränderungen der DNA-Struktur untersucht. Es wird erwartet, daß die Minor-Groove-Binder Netropsin und SN6113 zu einer Verkürzung der Konturlänge der DNA und einer Verringerung ihrer Elastizität führen (Abschnitt 2.3.5). Für eine Auswertung werden die Relaxationsabläufe von 5 gestreckten unveränderten DNA-Molekülen, 4 zusätzlich mit SN6113 inkubierten und 5 mit Netropsin inkubierten DNA-Molekülen verglichen (Abschnitt 3.5).

Die Relaxationsabläufe liefern die Konturlänge, die Relaxationszeit und die globuläre Ausdehnung jedes DNA-Moleküls. Die Relaxationszeit eines DNA-Moleküls ist dabei ein Maß für seine Elastizität. Abbildung 4.9 zeigt die Relaxation der gestreckten Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit. Jede Kurve repräsentiert ein einzelnes Molekül.

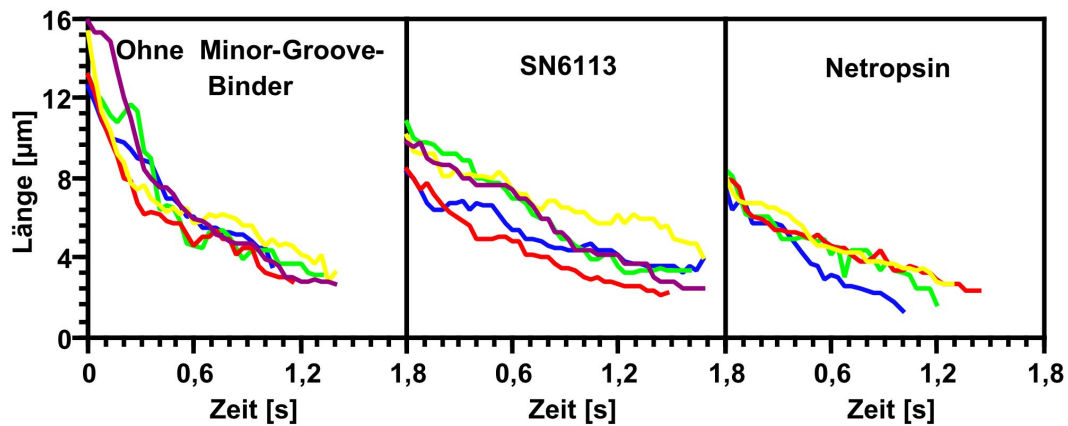


Abbildung 4.9: Relaxation einzelner gestreckter DNA-Moleküle. a: SYBRGreen gefärbte DNA. b: Gefärbte DNA mit SN6113 inkubiert. c: Gefärbte DNA mit Netropsin inkubiert.

Die in Abbildung 4.9 gemessenen Relaxationsverläufe werden für jede Gruppe von DNA-Molekülen gemittelt. Das Ergebnis ist Abbildung 4.10 dargestellt.

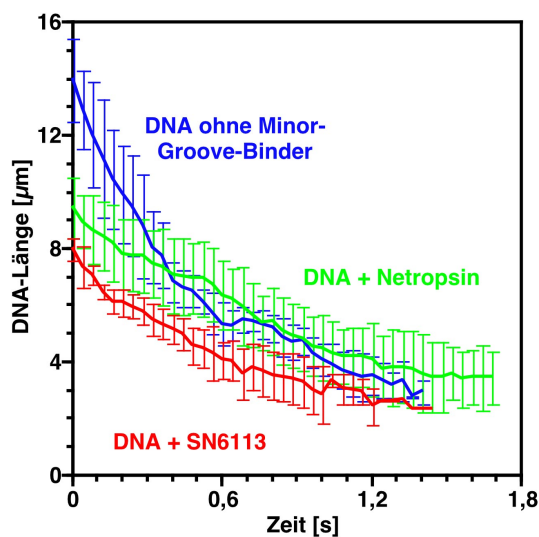


Abbildung 4.10: Veränderung von DNA-Molekülen durch Inkubation mit Minor-Groove-Bindern. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Relaxation veränderter DNA werden mit unveränderter DNA verglichen.

Aus Abbildung 4.10 ergeben sich die in Tabelle 4.1 aufgeführten Werte für Konturlänge, Relaxationszeit und Ausdehnung des globulären Moleküls von SYBRGreen-gefärbter DNA und ihre Veränderungen durch Inkubation mit Minor-Groove-Bindern.

	Konturlänge [μm]	Relaxationszeit [s]	Ausdehnung der globulären DNA [μm]
DNA ohne Minor-Groove-Binder	$15 \pm 1,5$ ($\pm 10\%$)	$1,3 \pm 0,2$ ($\pm 15\%$)	$3,1 \pm 0,4$ ($\pm 13\%$)
DNA + SN6113	$8 \pm 0,4$ ($\pm 5\%$)	$1,2 \pm 0,2$ ($\pm 17\%$)	$2 \pm 0,6$ ($\pm 30\%$)
DNA + Netropsin	$9,5 \pm 1$ ($\pm 11\%$)	$1,6 \pm 0,1$ ($\pm 6\%$)	$3,2 \pm 0,9$ ($\pm 21\%$)

Tabelle 4.1: Änderung von Konturlänge, Relaxationszeit und globulärer Ausdehnung der DNA durch Inkubation mit den Minor-Groove-Bindern SN6113 und Netropsin

Beide Minor-Groove-Binder führen zu einer Verkürzung der Konturlänge der DNA, SN6113 verkürzt die DNA stärker als Netropsin. Die Verkürzung durch SN6113 ist im Gegensatz zur Veränderung durch Netropsin auch in der globulären Form des Moleküls sichtbar. Netropsin führt weiterhin zu einer Versteifung der DNA und damit zu einer geringeren rücktreibenden Kraft, was in einer verlängerten Relaxationszeit zum Ausdruck kommt. Ein Einfluß von SN6113 auf die Relaxationszeit ist nicht feststellbar.

Die Inkubation der DNA mit Minor-Groove-Bindern ist ein geeignetes Modell, um Veränderungen an der Struktur der DNA auf Einzelmolekülebene durch Messung von Konturlänge und Relaxationszeit sichtbar zu machen.

4.4 Enzymreaktionen an einzelnen DNA-Molekülen

In den folgenden Experimenten werden Enzymreaktionen an einzelnen DNA-Molekülen beobachtet und analysiert. Der unspezifische Verdau eines globulären DNA-Moleküls wird gezeigt. Weiterhin werden die Reaktionen der Restriktionsendonukleasen Apa I mit einer Erkennungssequenz, Sma I mit drei Erkennungssequenzen und EcoRI mit fünf Erkennungssequenzen auf Lambda-DNA an gestreckten Molekülen untersucht.

4.4.1 Globuläre Moleküle

Ohne Wirkung einer äußeren Kraft liegen DNA-Moleküle in der Pufferlösung in globulärer Form vor, und ihre thermische Bewegung ist direkt im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Ihre Ausdehnung ist abhängig von der umgebenden Ionenkonzentration und zeigt mit wachsender Konzentration die Tendenz sich zusammenzuziehen.

In Abbildung 4.11 ist der Verdau eines einzelnen globulären DNA-Moleküls in eine Anzahl von Fragmenten aufgenommen. Das Molekül ist frei in der Lösung und wird von einer Endonuklease, eventuell DNase I, die durch eine Verunreinigung in die Probe gelangt ist,

verdaut. Die Abbildung zeigt, daß bereits geringe Verunreinigungen der Präparation mit Nukleasen die spätere Beobachtung ausgewählter Enzymreaktionen unmöglich machen.

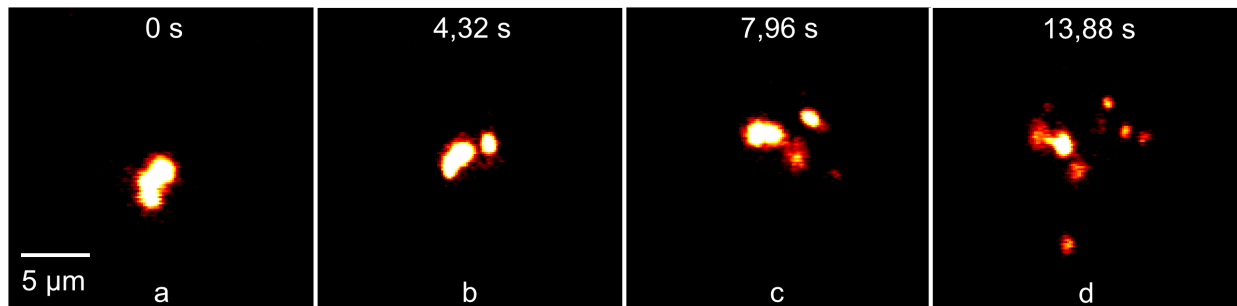


Abbildung 4.11: Unspezifischer Verdau eines globulären DNA-Moleküls.

Der Verdau globulärer Moleküle mit den Restriktionsendonukleasen Sma I und EcoR I wird ebenfalls durchgeführt und zeigt, daß die Beobachtung der ablaufenden Restriktion möglich ist. Verglichen mit der Reaktion eines Enzyms am gestreckten Molekül sind die Restriktionszeiten jedoch länger.

4.4.2 Apa I

Ein DNA-Molekül ist an eine Mikrokugel gekoppelt und wird mit der optischen Pinzette gehalten. Die Bewegung des Mikroskoptisches erzeugt einen hydrodynamischen Fluß, der das DNA-Molekül streckt. Der experimentelle Aufbau ist in Abschnitt 3.10 beschrieben. Das Gemisch aus der Restriktionsendonuklease Apa I und dem entsprechenden Reaktionspuffer wird in Richtung der gestreckten DNA injiziert. Abbildung 4.12 a-c zeigt den Ablauf der enzymatischen Reaktion. Nach 20 s Injektionszeit erscheint der erwartete Schnitt auf dem DNA-Molekül. Das geschnittene DNA-Fragment treibt in dem hydrodynamischen Fluß mit.

In Abbildung 4.12 d sind die Restriktionskarte mit der erwarteten Position der Erkennungsstelle von Apa I auf Lambda-DNA zusammen mit den entsprechenden Längen auf einem gestreckten Molekül dargestellt. Das Verhältnis der Längen der beiden DNA-Fragmente beträgt ca. 1:4 und stimmt mit dem aus der Restriktionskarte erwarteten Wert überein.

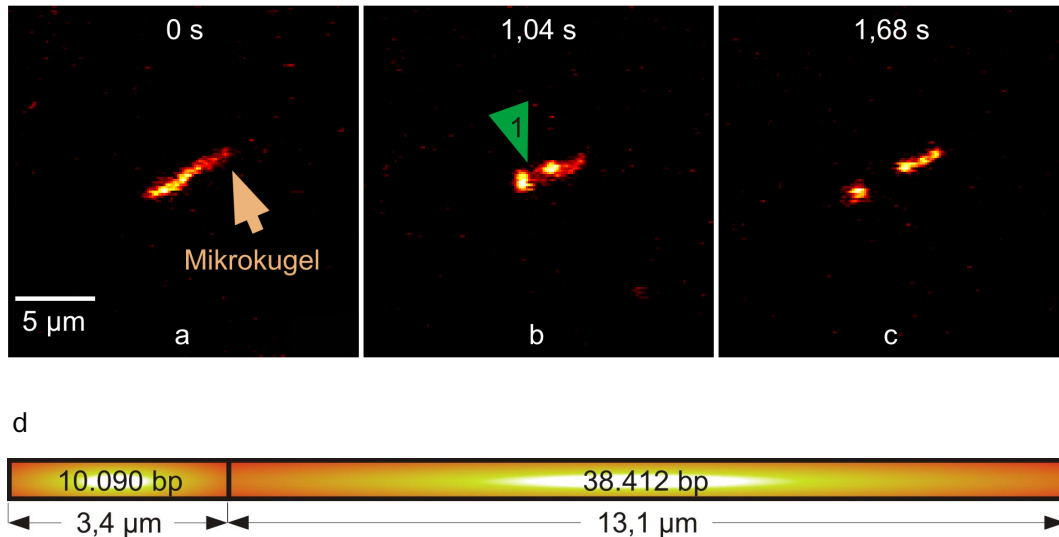


Abbildung 4.12 a-c: Enzymatischer Schnitt der Restriktionsendonuklease Apa I auf einem einzelnen DNA-Molekül. d: Restriktionskarte von Apa I an Lambda-DNA.

4.4.3 Sma I

Bei der enzymatischen Restriktion eines Lambda-DNA-Moleküls mit Sma I werden 3 Schnittstellen erwartet. Das Experiment wird an 10 individuellen Molekülen durchgeführt, die jeweils mit einem Ende an der Mikrokugel fixiert, im hydrodynamischen Fluß gestreckt werden. Dabei zeigen 6 Moleküle das vollständige Restriktionsmuster. Bei diesen Molekülen verlaufen die einzelnen enzymatischen Schnitte unerwarteterweise jeweils vom freien Ende des DNA-Moleküls schrittweise in Richtung des gebundenen DNA-Endes. Die 4 unvollständig geschnittenen Moleküle zeigen bei 1 Molekül 2 Schnitte und bei 3 Molekülen jeweils 1 Schnitt. Die ersten Restriktionen bei jedem Molekül erscheinen nach einer Injektionszeit des Enzyms zwischen 10-30 s.

Abbildung 4.13 a-f zeigt das Beispiel einer vollständigen Restriktion und Abbildung 4.13 g die zugehörige Restriktionskarte von Sma I an Lambda-DNA mit 3 Schnittstellen.

Die Restriktionsfolgen aller 10 im Sma I Experiment analysierten DNA-Moleküle sind in Abschnitt 6, Abbildung 6.1, dargestellt. Das erste Bild zeigt das jeweilige Molekül in gestreckter Form vor Beginn der ersten Restriktion, die folgenden Bilder zeigen die beobachteten Restriktionsstellen und die seit Auftreten der ersten Schnittstelle abgelaufene Zeit. Eine Bestimmung der Fragmentlängen durch Messung ihrer Fluoreszenzintensität (Abschnitt 2.4.5) erfolgt für die vollständig geschnittenen Moleküle in Abschnitt 4.5.

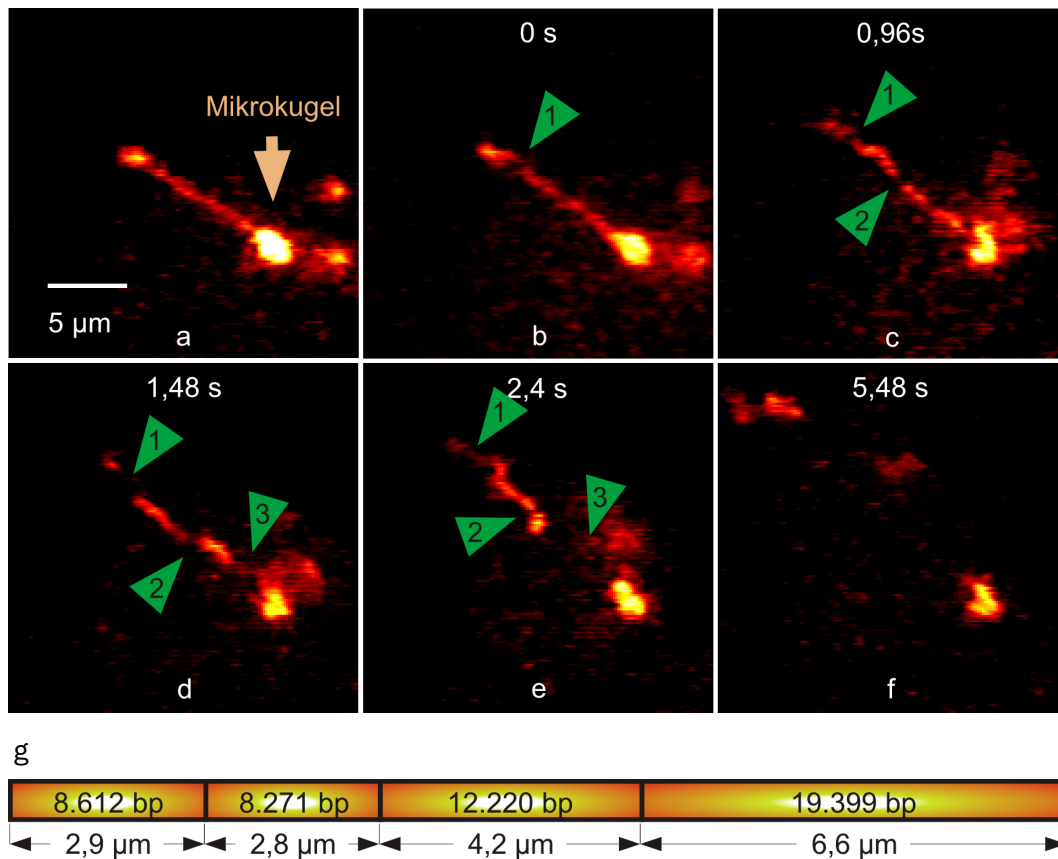


Abbildung 4.13 a-f: Vollständiger enzymatischer Verdau eines Lambda-DNA-Moleküls mit Sma I. Alle 3 erwarteten Restriktionen werden in 6 von 10 durchgeführten Experimenten beobachtet. g: Restriktionskarte von Sma I an Lambda-DNA.

4.4.4 EcoR I

Bei der Restriktion mit EcoR I werden 5 Schnittstellen erwartet. Das Experiment wird ebenfalls an 10 individuellen Molekülen durchgeführt, hier weisen 5 Moleküle ein vollständiges Restriktionsmuster auf. Bei einem dieser Moleküle ist allerdings die 4. Restriktionsstelle von einem DNA-Cluster überdeckt, da die 5. Restriktionsstelle jedoch wieder erscheint, wurde es den vollständig geschnittenen Molekülen zugeordnet. Ein weiteres Molekül zeigt 4 Schnittstellen, 2 Moleküle zeigen 3 Schnittstellen und jeweils 1 Molekül zeigt 2 bzw. 1 Schnittstelle. Analog zur Restriktion mit Sma I erfolgen bei allen Molekülen mit einem vollständiges Restriktionsmuster die einzelnen Schnitte vom freien Ende des DNA-Moleküls schrittweise in Richtung des gebundenen DNA-Endes. Die erste Restriktion erscheint bei den einzelnen Molekülen nach einer Injektionszeit des Enzyms zwischen 10-30 s.

In Abbildung 4.14 a-f ist das Beispiel einer vollständigen Reaktion von EcoR I an Lambda-DNA dargestellt. Abbildung 4.14 g zeigt die zugehörige Restriktionskarte mit den 5 erwarteten Schnittstellen und ihren korrespondierenden Längen auf dem gestreckten Molekül.

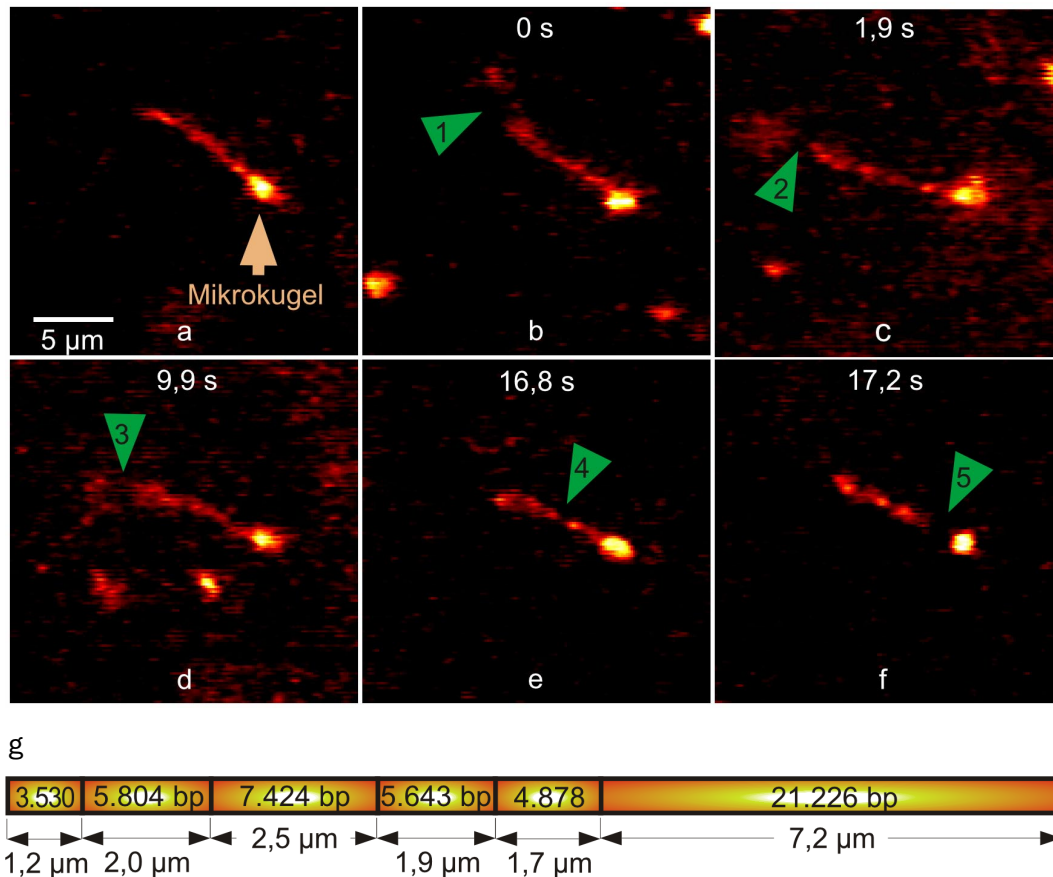


Abbildung 4.14 a-f: Vollständiger enzymatischer Verdau eines Lambda-DNA-Moleküls mit EcoR I. Alle 5 erwarteten Schnitte wurden in 5 von 10 durchgeführten Restriktionsexperimenten beobachtet. g: Restriktionskarte von EcoR I an Lambda-DNA.

Die Restriktionsfolgen aller 10 im EcoR I Experiment analysierten DNA-Moleküle sind in Abschnitt 6, Abbildung 6.2, dargestellt. Die Tafel zeigt die jeweils beobachteten Schnittstellen und gibt die Zeit seit Erscheinen des ersten Schnittes an.

4.5 Analyse der Restriktionsfragmente

Die Länge der Fragmente der in den Restriktionsexperimenten mit Sma I (Abschnitt 4.4.3) und EcoR I (Abschnitt 4.4.4) geschnittenen DNA-Moleküle wird im folgenden bestimmt. Die Auswertung beschränkt sich auf die vollständig geschnittenen Moleküle. Nur bei ihnen ist die eindeutige Zuordnung der geschnittenen Fragmente zu ihren Entsprechungen aus der Restriktionskarte gegeben. Bei den übrigen Moleküle ist durch die verschiedenen möglichen Varianten der unvollständigen Schnitte die eindeutige Zuordnung der Fragmente nicht möglich. Die Länge der DNA-Fragmente errechnet sich nach Gleichung (2.4) aus ihren Fluoreszenzintensitäten nach Abzug der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz und ist in Abschnitt 2.4.5 dargestellt.

4.5.1 Sma I

Abbildung 4.15 zeigt die Längen der Restriktionsfragmente der 6 vollständig mit Sma I geschnittenen DNA-Moleküle. Die grünen Balken stellen die Mittelwerte der jeweils gleichen Fragmente und ihre Standardabweichungen dar. Die blauen Balken geben zum Vergleich die aus der Restriktionskarte erwarteten Fragmentlängen an.

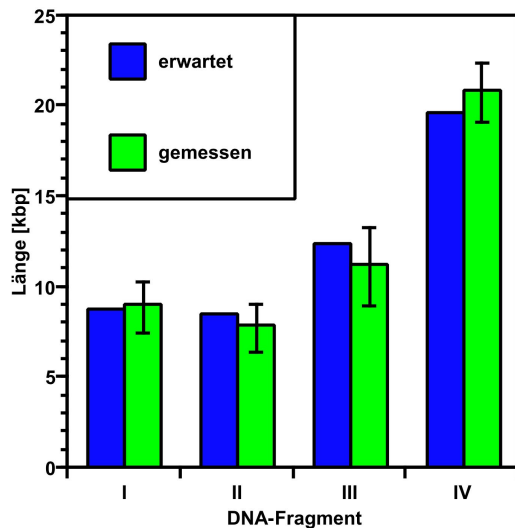


Abbildung 4.15: Analyse der Restriktionsfragmente von Sma I an 6 individuellen DNA-Molekülen.

Die gemessenen und die erwarteten Werte sind nochmals in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

	gemessene Länge [bp]	erwartete Länge [bp]
Fragment 1	9.000±1.400 (±16%)	8.612
Fragment 2	8.000±1.300 (±17%)	8.271
Fragment 3	11.000±2.200 (±20%)	12.220
Fragment 4	21.000±1.600 (±8%)	19.399

Tabelle 4.2: Gemessene Fragmentlängen der 6 vollständig mit Sma I geschnittenen DNA-Moleküle und ihr Vergleich mit den erwarteten Werten.

Die Längen der Restriktionsfragmente bei der Reaktion mit Sma I stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den erwarteten Werten der Restriktionskarte überein. Die Meßwerte ergeben einen mittleren Fehler von ±15%. Ein zufälliger enzymunspezifischer Verdau der DNA kann damit ausgeschlossen werden.

4.5.2 EcoR I

Abbildung 4.16 zeigt die analoge Analyse der Restriktionsfragmente für die 5 vollständig mit EcoR I geschnittenen DNA-Moleküle. Die grünen Balken geben wiederum die Mittelwerte der Meßwerte der jeweiligen DNA-Fragmente mit ihren Standardabweichungen und die blauen Balken den Vergleich mit den Erwartungen aus der Restriktionskarte an.

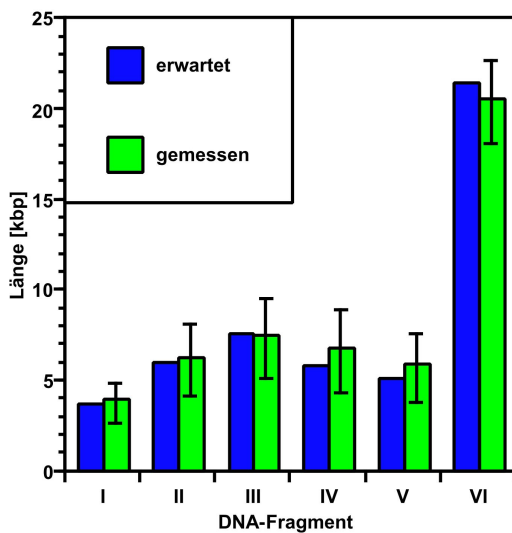


Abbildung 4.16: Analyse der Restriktionsfragmente von EcoR I an 5 individuellen DNA-Molekülen.

Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

	gemessene Länge [bp]	erwartete Länge [bp]
Fragment 1	4.000±1.100 (±30%)	3.530
Fragment 2	6.000±2.000 (±33%)	5.804
Fragment 3	7.000±2.200 (±30%)	7.424
Fragment 4	7.000±2.300 (±35%)	5.643
Fragment 5	6.000±1.900 (±34%)	4.878
Fragment 6	20.000±2.300 (±11%)	21.226

Tabelle 4.3: Gemessene Fragmentlängen der 5 vollständig mit EcoR I geschnittenen DNA-Moleküle und Vergleich mit den erwarteten Werten.

Analog zur Reaktion mit Sma I zeigt sich auch hier die Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den erwarteten Fragmentlängen. Die Bestimmung der Fragmentlängen durch

Messung ihrer Fluoreszenzintensität ist damit anwendbar und liefert richtige Ergebnisse. Ebenfalls kann ein zufälliger enzymunspezifischer Verdau der DNA ausgeschlossen werden. Die Meßwerte ergeben eine Fehlergrenze von ca. $\pm 30\%$, zusammen mit den Ergebnissen der Sma I Restriktion fällt auf, daß die Meßfehler mit kleiner werdenden Fragmentlängen zunehmen.

4.5.3 Zeitverlauf der Restriktionsschritte

Die vollständig geschnittenen DNA-Moleküle (6 mit Sma I und 5 mit EcoR I) zeigen eine schrittweise Abfolge der Restriktionsschritte vom freien Ende zum gebundenen Ende des Moleküls. In Abschnitt 6, Abbildung 6.3, ist in einer Tafel von Einzelbildern ein Ausschnitt von 1,4 s aus einer Restriktionsfolge an einem DNA-Molekül dargestellt. Die Restriktion erfolgt mit Sma I und zeigt zwei im Abstand von 0,88 s erscheinende Schnittstellen.

Jede Kurve in Abbildung 4.17 repräsentiert den zeitlichen Ablauf der Restriktion mit Sma I bzw. EcoR I für jeweils ein vollständig geschnittenes Molekül, die Punkte markieren die Schnittstellen. Die Restriktionen mit Sma I verlaufen innerhalb einer deutlich kürzeren Zeitspanne als die Restriktionen mit EcoR I.

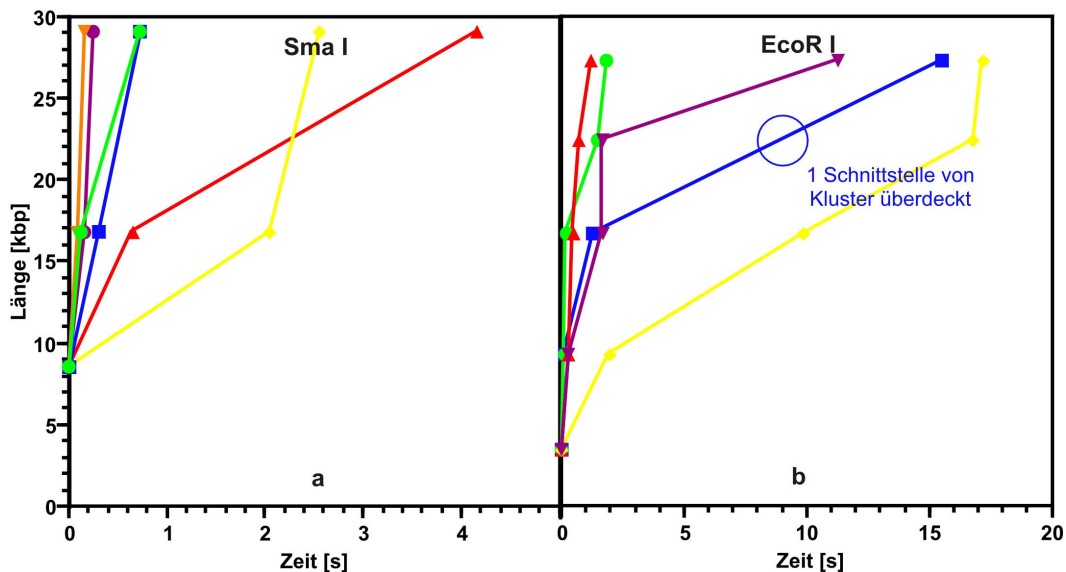


Abbildung 4.17: Zeitverlauf der vollständig abgelaufenen Restriktionen an jeweils einem einzelnen DNA-Molekül. a: mit Sma I b: mit EcoR I

Die bei etwa der Hälfte der Moleküle beobachtete schrittweise und vollständige Abfolge der einzelnen Restriktionsschritte entlang des DNA-Moleküls läßt erkennen, daß der Restriktionsprozeß nicht ausschließlich durch ein zufälliges Auftreffen der räumlich in der Lösung diffundierenden Enzymmoleküle auf seine Zielsequenz der DNA zustande kommen kann.

4.5.4 Geschwindigkeit der Restriktionsschritte

Die Geschwindigkeit eines einzelnen Restriktionsschritts ergibt sich aus der Länge des Fragments und der seit Erscheinen des vorangegangenen Schnitts abgelaufenen Zeit. Sie wird durch den Anstieg der Kurven in Abbildung 4.18 für jedes einzelne Fragment dargestellt. Sma I zeigt insgesamt eine etwa um den Faktor 2 schnellere Restriktionsfolge als EcoR I. In beiden Diagrammen, sowohl für Sma I als auch für EcoR I, lassen sich die Restriktionsgeschwindigkeiten in eine größere Anzahl schnell aufeinanderfolgender Schnitte (grüne Markierung) und in eine geringere Anzahl langsam aufeinanderfolgender Schnitte (blaue Markierung) unterteilen.

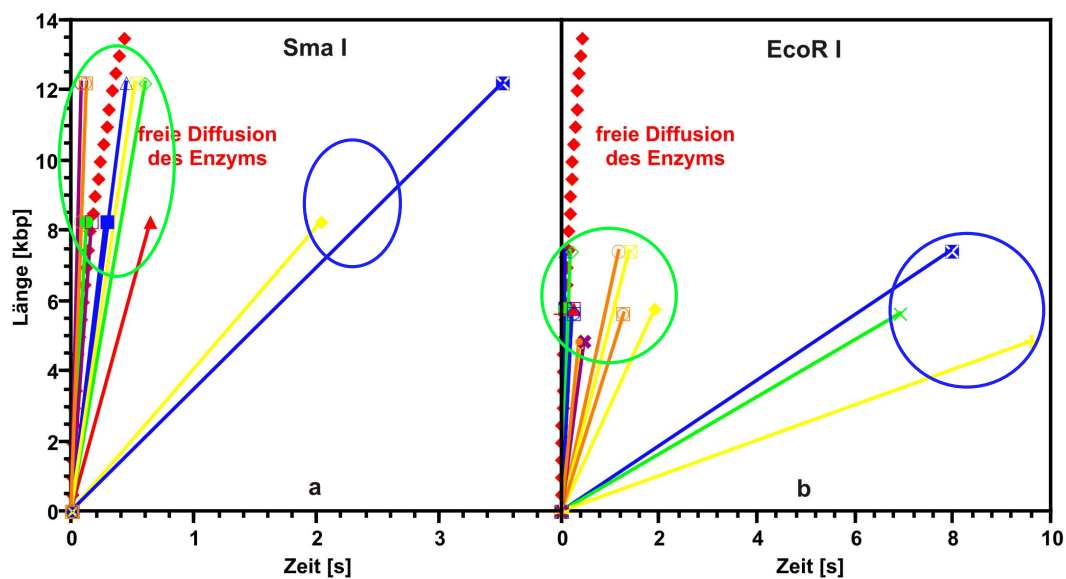


Abbildung 4.18: Geschwindigkeit der einzelnen Restriktionsschritte. Es tritt eine schnelle Schnittfolge (grüne Markierung) und eine langsame Schnittfolge (blaue Markierung) auf. Zum Vergleich ist die Diffusionsgeschwindigkeit der Enzymmoleküle im Puffer gepunktet dargestellt. Die unterschiedliche Zeitachse für beide Enzyme ist zu beachten. a: Sma I b: EcoR I

Die mittleren Zeiten zwischen aufeinanderfolgenden Schnitten sind für die schnelle und für die langsame Restriktionsfolge in Tabelle 4.4 aufgeführt.

	Sma I	EcoR I
schnelle Restriktionsschritte	0,3 s (10 Schnitte)	0,5 s (16 Schnitte)
langsame Restriktionsschritte	3 s (2 Schnitte)	8 s (3 Schnitte)

Tabelle 4.4: Mittlere Zeiten für die schnelle und für die langsame Restriktionsfolge.

Die roten Punkte in Abbildung 4.18 geben die Diffusion freier Enzymmoleküle im umgebenden Medium (Abschnitt 2.7.2) an. Diese liegt damit in der selben Größenordnung wie die gemessenen schnellen Restriktionsfolgen der Enzymschnitte.

Die Geschwindigkeiten (Kilobasenpaare pro Sekunde) der in Abbildung 4.18 dargestellten einzelnen Restriktionsschritte werden im folgenden auf ihre Geschwindigkeitsverteilung analysiert. Abbildung 4.19 zeigt die Anzahl der auftretenden Schnitte in einzelnen Geschwindigkeitsintervallen. Die lineare Geschwindigkeitsachse ergibt im Gegensatz zur Darstellung der Geschwindigkeit als Anstieg der Weg-Zeit-Kurven eine Häufung der Schnitte im langsamen Bereich. Die Häufigkeit der schnellen Schnitte fällt mit zunehmender Geschwindigkeit ab. Ein Problem für eine statistische Auswertung und Interpretation der Verteilung ist die begrenzte Anzahl analysierter Moleküle und damit die geringe Anzahl von Meßwerten.

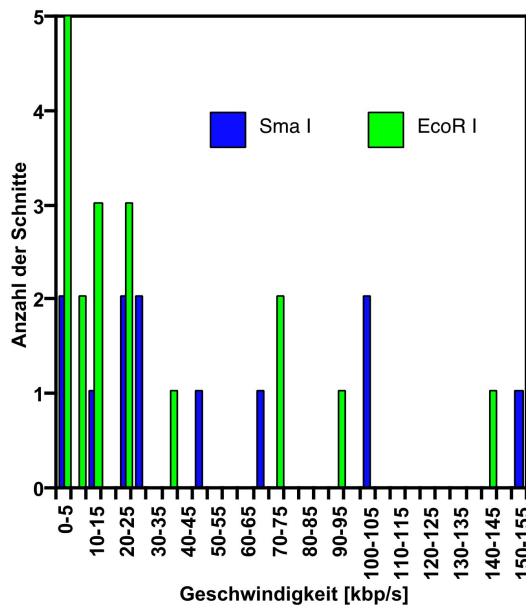


Abbildung 4.19: Geschwindigkeitsverteilung der einzelnen Restriktionsschritte. Es zeigt sich eine Häufung im Bereich von 0-30 kbp/s, die mit zunehmender Geschwindigkeit abnimmt.

Die Verteilung wird durch eine mittlere Geschwindigkeit und eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit charakterisiert. Die in Tabelle 4.5 angegebenen Werte stellen nur eine Abschätzung dar, da für eine genauere Berechnung eine größere Anzahl von Meßwerten erforderlich wäre. Die Reaktion von Sma I an Lambda-DNA verläuft etwa doppelt so schnell wie die Reaktion von EcoR I.

	Sma I	EcoR I
wahrscheinlichste Restriktionsgeschwindigkeit	20 kbp/s (7 $\mu\text{m/s}$)	10 kbp/s (3 $\mu\text{m/s}$)
mittlere Restriktionsgeschwindigkeit	50 kbp/s (17 $\mu\text{m/s}$)	30 kbp/s (10 $\mu\text{m/s}$)

Tabelle 4.5: Abschätzung der Restriktionsgeschwindigkeiten von Sma I und EcoR I.

4.6 Unterscheidung einzelner DNA-Moleküle

Die durch eine Analyse der DNA-Fragmente erhaltene Restriktionskarte ermöglicht die Zuordnung verschiedener, sich nur in wenigen Basenpaaren unterscheidender DNA-Moleküle. Dafür ist eine Restriktionsendonuklease notwendig, deren Zielsequenz auf der DNA durch die vorhandene Mutation verändert ist.

Als Modell dienen die linearisierten Vektoren pRevTet-On (7.649 bp, 2,6 μm) und pRevTet-Off (7.847 bp, 2,7 μm), die sich nur in einigen wenigen Mutationen unterscheiden. Die pRevTet-On-DNA besitzt eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease Mlu I (3.867 bp), jedoch keine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease Mfe I. Im Gegensatz dazu hat pRevTet-Off eine Erkennungsstelle für Mfe I (4.654 bp), aber keine Erkennungsstelle für Mlu I (Abschnitt 2.3.3). Eine mikroskopische Unterscheidung beider Moleküle anhand ihrer Länge ist nicht möglich.

Aus einem Gemisch beider Moleküle werden nacheinander einzelne DNA-Moleküle ausgewählt. Zur Kontrolle der Restriktionsanalyse ist pRevTet-On an 1 μm Mikrokugeln und pRevTet-Off an 2 μm Mikrokugeln gekoppelt. Im Durchlichtmodus des Mikroskops ist damit eine Unterscheidung beider Sorten DNA in der Mischung möglich.

In einem ersten Experiment erfolgt die Zuordnung des Moleküls nach der Auswertung einer Restriktion mit Mlu I, im zweiten Experiment dient die Restriktionsendonuklease Mfe I der Unterscheidung.

4.6.1 Analyse mit Mlu I

Die Analyse mit Mlu I wird an 6 pRevTet-On-Molekülen und 11 pRevTet-Off-Molekülen, die durch die Größe der angekoppelten Mikrokugeln in der Mischung unterschieden werden, durchgeführt. Bei 5 der 6 untersuchten pRevTet-On-Moleküle zeigt sich nach Mikroinjektion von Mlu I die erwartete Schnittstelle, und das geschnittene DNA-Fragment bewegt sich mit der hydrodynamischen Strömung mit. Bei keinem der pRevTet-Off-Moleküle wurde, wie erwartet, eine Schnittstelle beobachtet.

Abbildung 4.20 a-e zeigt den Zeitverlauf des enzymatischen Schnitts mit Mlu I an einem der analysierten pRevTet-On-Moleküle. In Abbildung 4.20 f ist die zur Identifikation an das Molekül gekoppelte 1 μm Kugel und in Abbildung 4.20 g die zugehörige Restriktionskarte dargestellt.

Abbildung 4.21 stellt die Auswertung der jeweiligen Fragmentlängen aller mit Mlu I geschnittenen DNA-Moleküle graphisch dar.

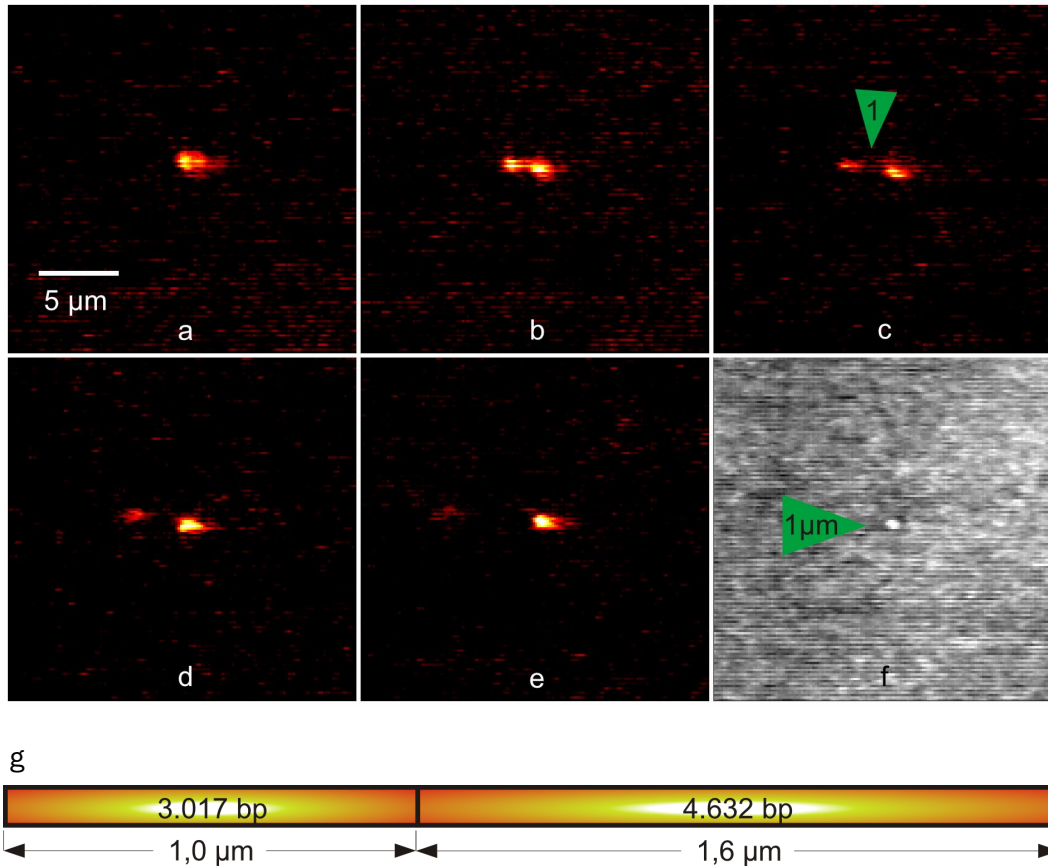


Abbildung 4.20 a-e: Enzymatischer Schnitt von pRevTet-On nach Injektion von Mlu I.
 f: Durchlichtaufnahme der zur Identifikation an das DNA-Molekül gekoppelten 1 µm Mikrokugel.
 g: Restriktionskarte von Mlu I an pRevTet-On.

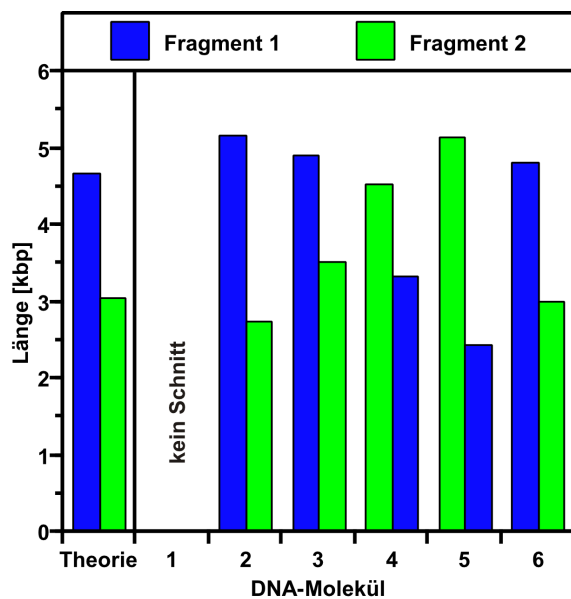


Abbildung 4.21: Fragmentlängen der Restriktionsanalyse von Mlu I an pRevTet-On. 5 der 6 analysierten Moleküle zeigen die erwartete Schnittstelle.

Die zugehörigen Mittelwerte der Fragmentlängen von Molekül 2 bis 6 sind in Tabelle 4.6. angegeben.

	gemessene Länge [bp]	erwartete Länge [bp]
Fragment 1	4.800±200 (±4%)	4.632
Fragment 2	3.000±400 (±13%)	3.017

Tabelle 4.6: Mittelwerte der gemessenen Fragmentlängen der mit Mlu I geschnittenen pRevTet-On-Moleküle und Vergleich mit den erwarteten Längen. Das nicht geschnittene Molekül ist nicht berücksichtigt.

Bis auf ein pRevTet-On-Molekül, bei dem der erwartete Schnitt mit Mlu I nicht auftritt, ist eine eindeutige Zuordnung der analysierten DNA-Moleküle durch die Auswertung der Restriktionsfragmente möglich. Die gemessenen Längen stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den erwarteten Werten überein.

In Abschnitt 6, Abbildung 6.4, sind die Zeitfolgen aller mit Mlu I geschnittenen pRevTet-On-Moleküle dargestellt. Die nicht geschnittenen Moleküle (Mlu I an pRevTet-Off) zeigt die Tafel in Abbildung 6.6.

4.6.2 Analyse mit Mfe I

Die Analyse mit Mfe I erfolgt an 6 pRevTet-On-Molekülen und 5 pRevTet-Off-Molekülen, die in der Mischung wiederum durch die Größe der angekoppelten Mikrokugeln unterschieden werden. Die pRevTet-On-Moleküle besitzen nach der Restriktionskarte keine Schnittstelle, wie erwartet konnte bei keinem Molekül eine enzymatische Reaktion beobachtet werden. Im Gegensatz dazu sollte nach Injektion von Mfe I an pRevTet-Off eine Schnittstelle auftreten. Alle 5 untersuchten Moleküle zeigen diese erwartete Restriktionsstelle.

In Abbildung 4.22 a-e ist der enzymatische Schnitt mit Mfe I an einem pRevTet-Off-Molekül und die Entfernung des geschnittenen Fragments von der restlichen DNA dargestellt. Abbildung 4.22 f zeigt die an das Molekül gekoppelte 2 µm Mikrokugel und Abbildung 4.22 g die zugehörige Restriktionskarte.

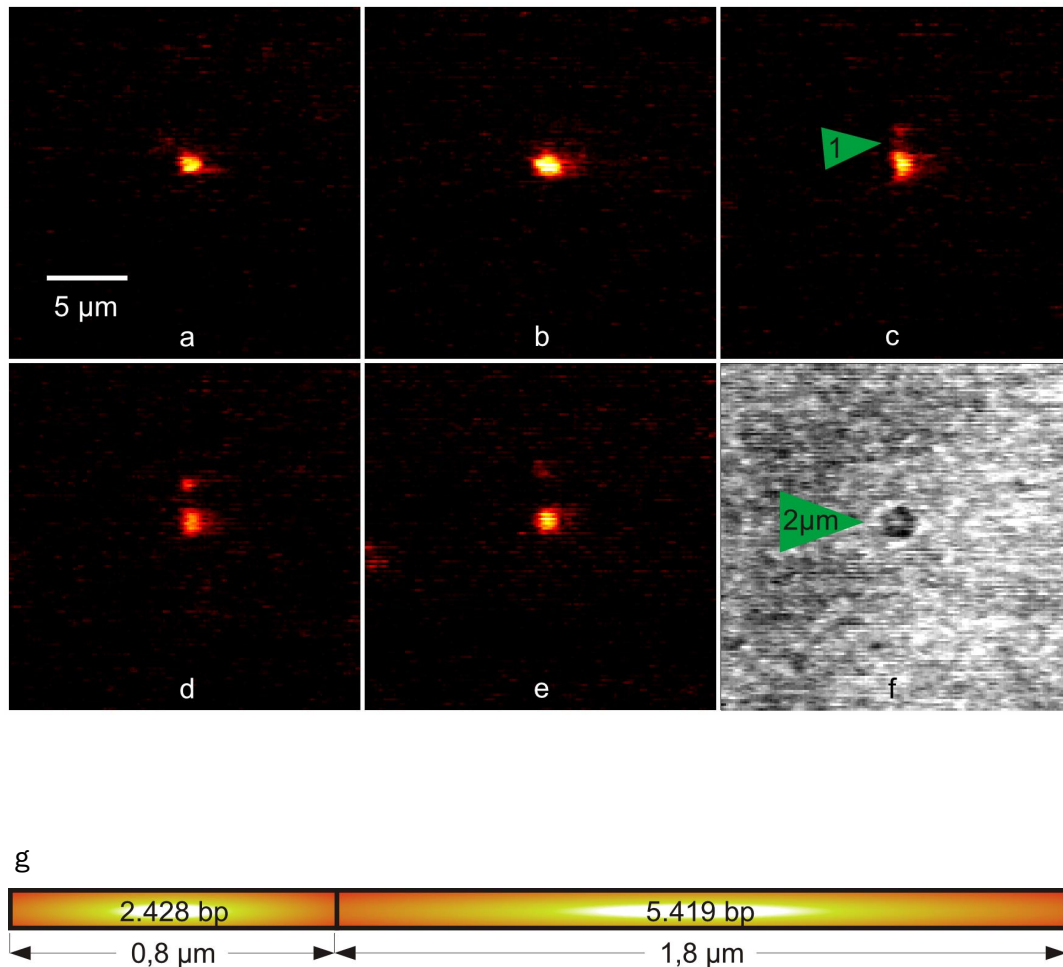


Abbildung 4.22 a-e: *Enzymatischer Schnitt von pRevTet-Off nach Injektion von Mfe I.*
 f: *Durchlichtaufnahme der zur Identifikation an das DNA-Molekül gekoppelten 2 µm Mikrokugel.*
 g: *Restriktionskarte von Mfe I an pRevTet-Off.*

In Abbildung 4.23 erfolgt die graphische Auswertung der Fragmentlängen der mit Mfe I geschnittenen pRevTet-Off-Moleküle. Die Auswertung ist nur an Molekül 1-3 möglich, Molekül 4 und 5 zeigen eine im Verhältnis zu starke Fluoreszenz an der Mikrokugel. Das deutet auf weitere an die Mikrokugel gebundene DNA-Moleküle, Fragmente oder Cluster hin. Eine Messung der Fragmentlängen ergibt für diese beiden Moleküle keine Übereinstimmung mit der Restriktionskarte. Hierbei wird eine Grenze dieses Meßverfahrens deutlich.

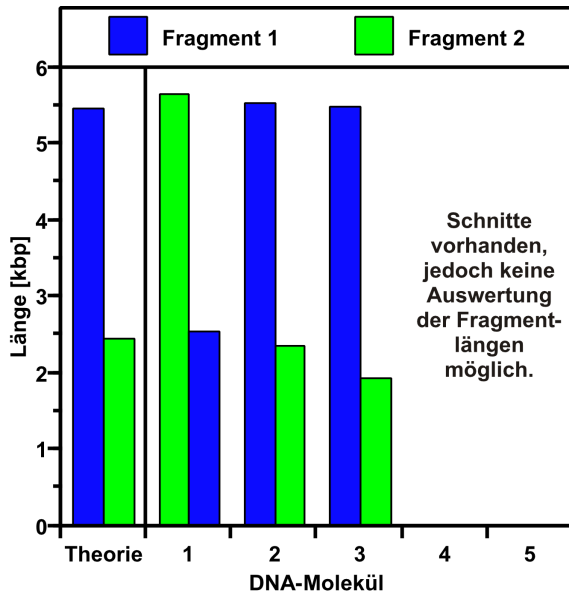


Abbildung 4.23: Fragmentlängen der 5 mit *Mfe I* geschnittenen *pRevTet-Off*-Moleküle. Die Auswertung ist nur an 3 von 5 Molekülen möglich.

Die entsprechenden Mittelwerte der Fragmentlängen der Moleküle 1-3 sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

	gemessene Länge [bp]	erwartete Länge [bp]
Fragment 1	5.600±200 (±4%)	5.419
Fragment 2	2.300±230 (±10%)	2.428

Tabelle 4.7: Mittelwerte der an 3 Molekülen gemessenen Fragmentlängen. Die Analyse erfolgt mit *Mfe I* an *pRevTet-Off* und zeigt den Vergleich mit den erwarteten Längen.

Die Beobachtung der Restriktionsfragmente ermöglicht die eindeutige Zuordnung aller mit *Mfe I* analysierten Moleküle. Die Bestimmung der Fragmentlängen ist jedoch nur für 3 der 5 analysierten Moleküle sinnvoll. Diese stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den erwarteten Längen überein.

In Abschnitt 6, Abbildung 6.5, sind die Zeitsequenzen der Restriktionen von *pRevTet-Off* mit *Mfe I* dargestellt. Die mit *Mfe I* analysierten *pRevTet-On*-Moleküle (keine Schnittstellen) zeigt Abbildung 6.6.

5 Diskussion

Die Kopplung einzelner DNA-Moleküle an eine Mikrokugel und das Halten dieser Kugel mit der optischen Pinzette sind die Voraussetzungen für die Auswahl eines individuellen Moleküls (Abschnitt 4.2). Wird dieses im hydrodynamischen Fluß gestreckt, können nicht nur seine mechanischen Eigenschaften untersucht werden. Es ist auch die direkte Beobachtung enzymatischer Reaktionen möglich. Als geeignete Methode zur Beobachtung der DNA-Moleküle und der an ihnen ablaufenden Reaktionen hat sich die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie erwiesen. Allerdings ist eine Beeinflussung der gemessenen Reaktionsabläufe durch die Fluoreszenzmarkierung der DNA nicht auszuschließen. Es erfolgt z.B. eine vollständige Inhibition der Enzymreaktion von Apa I, Sma I und EcoR I durch eine Markierung der DNA mit YOYO-1 oder TOTO-1. Wird der Einfluß der Fluoreszenzmarkierung durch eine geeignete Wahl der Fluorophore, z.B. durch Verwendung des Farbstoffes SYBRGreen, möglichst gering gehalten, öffnet die verwendete Technik den Weg zu einer direkten, räumlich und zeitlich aufgelösten Analyse von Reaktionen an einzelnen DNA-Molekülen.

5.1 Streckung und Relaxation

Die Messung von Konturlänge und Relaxationszeit eines einzelnen DNA-Moleküls liefert Informationen über die auf molekularer Ebene wirkenden Kräfte und Elastizitäten [6,23] und zeigt Veränderungen der DNA durch die umgebende Ionenkonzentration [8]. In der selben Weise ist eine Aussage über Strukturveränderungen am einzelnen Molekül durch DNA-bindende Substanzen möglich (Abschnitt 4.3).

In der pharmazeutischen Forschung wird der Einsatz der Minor-Groove-Binder SN6113 und Netropsin als Anti-Leukämie-Medikamente untersucht. Die durch sie hervorgerufene Veränderung der DNA-Struktur und der daraus resultierende Einfluß auf die Interaktion der DNA mit Proteinen ist daher für die Erforschung ihrer Wirkungsweise von Bedeutung [37].

Der Nachweis einer Veränderung der DNA-Moleküle erfolgte durch den Vergleich von Konturlänge und Relaxationszeit mit SN6113 inkubierter DNA, mit Netropsin inkubierter DNA und unveränderter DNA. Es konnte eine Verkürzung der Konturlänge der DNA für beide Substanzen (SN6113: 15 μm auf 8 μm und Netropsin: 15 μm auf 9,5 μm) nachgewiesen werden. Die Inkubation mit SN6113 wird außerdem durch eine stärkere Knäuelung der DNA in ihrer globulären Form deutlich. Weiterhin wird eine Versteifung der DNA durch den Einfluß von Netropsin erwartet [37]. Gemessen wurde eine Verlangsamung der Relaxationszeit der DNA von 1,3 s auf 1,6 s nach Inkubation mit Netropsin. Den schematischen Verlauf der Relaxation der Moleküle von ihrer komplett gestreckten bis zu ihrer globulären Form zeigt Abbildung 5.1. Der Zusammenhang zwischen der molekularen Struktur und fluoreszenzmikroskopisch zugänglichen Größen, wie Konturlänge und Relaxationszeit des DNA-Moleküls, wird deutlich.

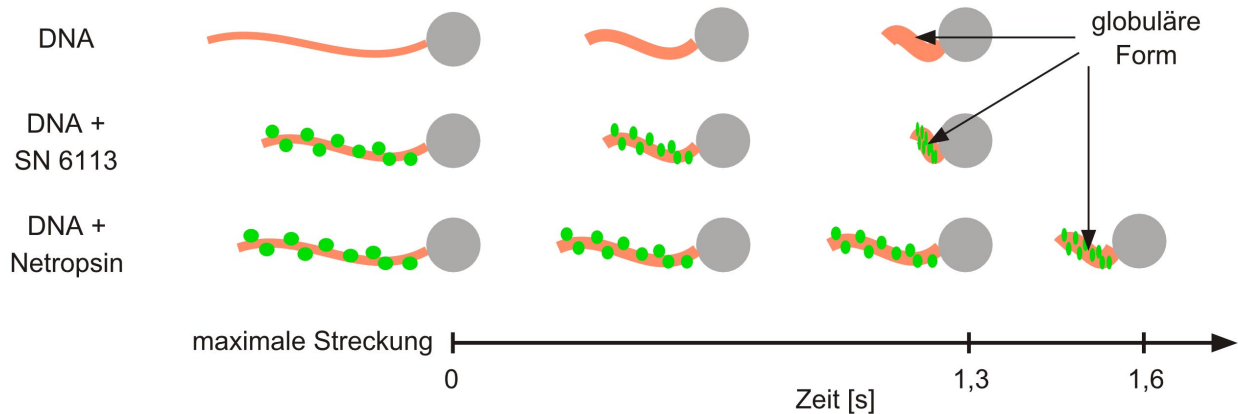


Abbildung 5.1: Relaxation gestreckter DNA-Moleküle in ihre globuläre Form. Die Veränderung der DNA durch Inkubation mit den Minor-Groove-Bindern SN6113 bzw. Netropsin wird deutlich.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Parameter Konturlänge und Relaxationszeit beschreiben die biomechanischen Eigenschaften eines DNA-Moleküls und erlauben, den Einfluß von DNA-bindenden kleineren Molekülen auf einfache Weise zu quantifizieren.

5.2 Analyse der Restriktionsfragmente

Wird ein ausgewähltes DNA-Molekül mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten, ergibt sich aus der Messung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Fragmente ihre Länge. Bei Vernachlässigung von Quenchingprozessen und einer homogenen Verteilung der Fluorophore entlang der DNA [42] ist die Intensität der Fragmente proportional zu ihrer Länge (Abschnitt 2.4.5). Es ergibt sich damit eine Restriktionskarte für das mit dem jeweiligen Enzym geschnittene Molekül (Abschnitt 4.4 und 4.5).

Die Restriktion mit Apa I (eine erwartete Schnittstelle) erfolgte aufbauend auf [17] und zeigte sowohl den einen erwarteten Schnitt als auch eine Übereinstimmung der gemessenen mit den erwarteten Fragmentlängen.

Die Restriktion mit Sma I (drei erwartete Schnittstellen) erfolgte an 10 DNA-Molekülen, wobei bei 6 Molekülen alle 3 erwarteten Schnitte, d.h. ein vollständiges Restriktionsmuster, beobachtet wurde. Die Analyse der Fragmentlängen erfolgte ausschließlich an den vollständig geschnittenen Molekülen, da bei den unvollständig geschnittenen Moleküle keine eindeutige Zuordnung der jeweiligen Fragmente möglich war. Die Fragmentlängen liegen in einem Fehlerbereich von $\pm 15\%$ und stimmen mit den erwarteten Werten überein.

Die Restriktion mit EcoR I (fünf erwartete Schnittstellen) erfolgte ebenfalls an 10 DNA-Molekülen, bei 5 Molekülen erschien ein vollständiges Restriktionsmuster. Die Analyse der Fragmentlängen wurde ebenfalls nur mit diesen 5 Molekülen durchgeführt. Sie zeigte die Übereinstimmung mit der erwarteten Restriktionskarte, in diesem Fall mit einem Fehlerbereich

von $\pm 29\%$. Der hier auftretende größere Fehler kann durch die kleineren Fragmentlängen des EcoR I Experiments begründet sein.

Die bei der Restriktionsanalyse zur Unterscheidung zwischen pRevTet-On-DNA und pRevTet-Off-DNA gemessenen Werte liegen in einem Fehlerbereich von $\pm 8\%$ und stimmen ebenfalls mit den erwarteten Längen überein. Analog zu Sma I und EcoR I zeigen auch hier die kürzeren Fragmente einen größeren Fehler. Bei zwei Molekülen der pRevTet-Off Analyse ergeben die gemessenen Fragmentlängen deutlich zu große Werte für das an der Mikrokugel verbleibende DNA-Fragment. Eine Erklärung dafür dürften weitere, an die Mikrokugel angelagerte DNA-Fragmente oder Moleküle liefern, die bei der geringen Länge der pRevTet-DNA einen relativ großen Einfluß haben. Eine Bestimmung der Fragmentlängen ist in diesem Fall nicht möglich.

Die Übereinstimmung zwischen den gemessenen Fragmentlängen und den nach den entsprechenden Restriktionskarten erwarteten Werten bestätigt, daß die Fluoreszenzmessung der DNA-Fragmente ihre Länge repräsentiert und es sich bei den analysierten DNA-Fragmenten nicht um einen unspezifischen Verdau des Moleküls handelt.

5.3 Zeitliche Abfolge der Restriktion

Die direkte Beobachtung des Zeitverlaufs einer enzymatischen Reaktion mit mehreren Schnittstellen an einem gestreckten DNA-Molekül erlaubt Einblicke in den Mechanismus der DNA-Enzym-Reaktion. Die Enzyme Sma I und EcoR I zeigen dabei das *a priori* nicht notwendigerweise erwartete Ergebnis einer schrittweisen Restriktionsfolge. Es ergeben sich die folgenden Ergebnisse:

- Bei der Hälfte der analysierten Moleküle (6 der 10 mit Sma I und 5 der 10 mit EcoR I geschnittenen Moleküle) erscheinen alle erwarteten Schnittstellen in einer geordneten Abfolge.
- Die Schnitte erfolgen vom freien Ende des DNA-Moleküls in Richtung seines gebunden Endes, entgegen der Richtung des hydrodynamischen Flusses.
- Die in Abbildung 4.18 dargestellten einzelnen Restriktionsschritte ermöglichen eine Unterteilung in schnell aufeinanderfolgende Schnitte (0,3 s für Sma I und 0,5 s für EcoR I) und langsam aufeinanderfolgende Schnitte (3 s für Sma I und 8 s für EcoR I).
- Die Geschwindigkeitsverteilung in Abbildung 4.19 zeigt eine relativ breite Streuung der Restriktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Schritte von 0,5-150 kbp/s mit einer Häufung bei 20 kbp/s für Sma I bzw. 10 kbp/s für EcoR I und einem Mittelwert bei 50 kbp/s für Sma I bzw. 30 kbp/s für EcoR I.

Aus der Konzentration der in der Umgebung des DNA-Moleküls vorhandenen Enzymmoleküle läßt sich die mittlere Zeitdauer zwischen aufeinanderfolgenden Zusammenstößen eines beliebigen Enzymmoleküls mit dem DNA-Molekül berechnen. Abschnitt 4.1.6 gibt die Bestimmung der Konzentration der injizierten Enzymmoleküle an. Daraus folgt in der Umgebung

des DNA-Moleküls eine lokale Enzymkonzentration von $c = 6 \cdot 10^4$ Molekülen/pl. In Abschnitt 2.7.3 ist die Berechnung der mittleren Zeit zwischen aufeinanderfolgenden Zusammenstößen dargestellt und es ergibt sich mit Gleichung (2.18) ein Wert von ca. 1 s. Eine Verlängerung dieser Zeitspanne durch auftretende Verluste bei der Mikroinjektion des Enzyms oder eine Anzahl inaktiver Enzymmoleküle ist wahrscheinlich (Abschnitt 4.1.6). Die Zeit gibt an, daß unter den gegebenen Voraussetzungen höchstens einmal pro Sekunde ein Enzymmolekül zufällig und an einer beliebigen Stelle mit der DNA zusammentrifft.

5.3.1 Auffinden der Zielsequenz des Enzyms auf der DNA

Im folgenden soll die Frage beantwortet werden, ob:

- eine Restriktionsendonuklease aus ihrer räumlichen Diffusion in der Umgebung eines DNA-Moleküls heraus genau auf ihre Erkennungssequenz auf der DNA treffen muß, um das Molekül zu schneiden oder
- eine zunächst zufällige sequenzunspezifische Bindung des Enzyms an die DNA mit einer anschließenden linearen Diffusion entlang des Moleküls bis zum Zusammentreffen mit einer Erkennungssequenz möglich ist.

Soll das frei in der Lösung diffundierende Enzymmolekül für einen Schnitt genau mit seiner Erkennungssequenz auf dem DNA-Molekül zusammentreffen, wäre eine entsprechend große Anzahl an Kontakten zwischen Enzymmolekülen und DNA notwendig. Bei einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 10 kbp und einem möglichen „Einrastmechanismus“ zwischen Enzym und DNA von ± 1 bp (entspricht 3 erlaubten Möglichkeiten) wären für das Auffinden einer Erkennungssequenz ca. 3.000 (= 10 kbp/3) Zusammenstöße zwischen Enzym und DNA notwendig. Bei 3.000 notwendigen Kontakten und einer Geschwindigkeit von 1 Kontakt je Sekunde würden daraus Restriktionszeiten in der Größenordnung von einer Stunde folgen. Weiterhin wäre in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit, eine vollständige geordnete Restriktionsfolge zu beobachten, verschwindend gering. Tatsächlich wurde jedoch bei etwa der Hälfte der Moleküle eine solche Restriktionsfolge beobachtet. Dieses Modell der DNA-Enzym-Interaktion ist damit nicht haltbar.

Ist hingegen eine sequenzunspezifische Bindung eines Enzymmoleküls an die DNA möglich, ist nur ein Kontakt zwischen beiden notwendig, und die dafür benötigte Zeit liegt in der Größenordnung von 1 Sekunde. Daraufhin erfolgt eine lineare Diffusion des Enzymmoleküls entlang der DNA bis zum Auffinden seiner Zielsequenz.

Zur Abschätzung der Geschwindigkeit einer gebundenen linearen Diffusion entlang der DNA soll Gleichung (2.15) aus Abschnitt 2.7.2 dienen. Sie ergibt bei einer mittleren Fragmentlänge von 10 kbp ($x = 3,4 \mu\text{m}$) eine Diffusionszeit von 0,2 s. Die Gleichung beschreibt zwar die Geschwindigkeit einer freien räumlichen Diffusion im Puffer, das Ergebnis gibt jedoch einen unteren Grenzwert für die lineare Diffusion an, die langsamer verlaufen wird. Ein in der Literatur beschriebenes, allerdings nur bedingt übertragbares Analogon zeigt die longitudinale Diffusion

von Proteinen entlang von Muskelfasern. Dabei ergibt sich eine Abnahme ihrer Diffusionsgeschwindigkeit im Vergleich zur räumlichen Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins in H_2O um den Faktor 6-9 [66].

Im Vergleich dazu liegen die Mittelwerte der beobachteten schnellen Restriktionszeiten in einem Bereich von 0,3-0,5 s (Abschnitt 4.5.4) und stimmen in der Größenordnung mit der oben berechneten linearen Diffusionszeit von 0,2 s überein. Das Modell einer sequenzunspezifischen Bindung des Enzyms an die DNA, gefolgt von einer linearen Diffusion bis zum Auffinden seiner Zielsequenz, erklärt die beobachteten Ergebnisse.

Der Unterschied zwischen beiden Modellen ist in Abbildung 5.2 skizziert. Die großen zeitlichen Unterschiede werden deutlich.

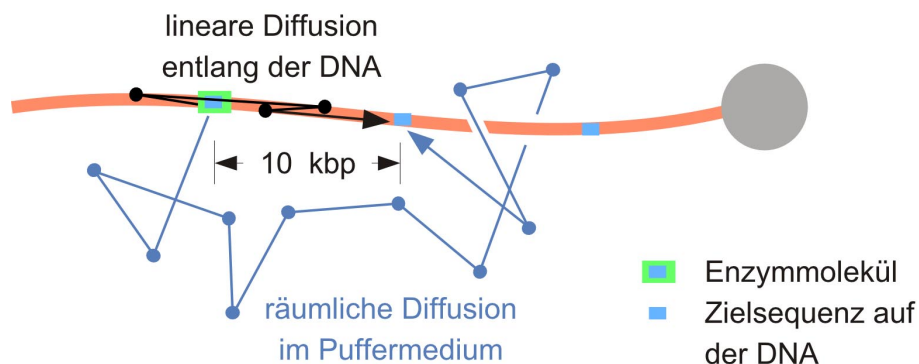


Abbildung 5.2: Gestrecktes DNA-Molekül mit der Zielsequenz des Enzyms. Das Enzymmolekül hat sequenzspezifisch an die DNA gebunden und kann sich an ihr durch eine lineare Diffusion bis zum Auffinden seiner Zielsequenz bewegen. Für eine räumliche Diffusion zur exakten Auffindung einer Zielsequenz läge die benötigte Zeitspanne in der Größenordnung einer Stunde.

5.3.2 Restriktionsstart und schrittweise Restriktionsfolge

Für beide in Abschnitt 5.3.1 genannten Mechanismen kann die erste Bindung eines Enzymmoleküls und damit der Reaktionsstart an einer beliebigen Stelle des DNA-Moleküls erfolgen. Im Gegensatz dazu zeigt die Hälfte der beobachteten DNA-Moleküle eine vollständige und schrittweise Restriktion, angefangen am freien Ende der DNA in Richtung ihres gebundenen Endes.

Durch die thermische Bewegung des DNA-Moleküls vergrößert sich sein Wirkungsquerschnitt, und die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zwischen Enzym und DNA nimmt mit dem Abstand von der Mikrokugel zu (Abbildung 5.3). Der Wirkungsquerschnitt des DNA-Moleküls ist proportional zum Quadrat der Entfernung vom fixierten Ende ($\sigma \sim x^2$). Die

höhere Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens am freien DNA-Ende ist eine Erklärung für die häufig dort erfolgende Bindung eines Enzyms.

Es ergibt sich damit der folgende, in Abbildung 5.3 skizzierte Reaktionsmechanismus: Nach einer Bindung an die DNA hat das Enzymmolekül die Möglichkeit, sich an ihr, analog einer Schiene, entlang zu bewegen. Das Enzym findet eine Schnittstelle auf dem DNA-Molekül und schneidet die DNA. Für den weiteren Ablauf ergeben sich zwei Möglichkeiten:

- Das Enzym verbleibt auf dem an die Mikrokugel gebundenen DNA-Fragment und bewegt sich auf ihm durch lineare Diffusion weiter. Nach ca. 0,2 s findet es die nächste Schnittstelle und schneidet dort erneut. Dieser Prozeß entspricht den schnellen beobachteten Restriktionsfolgen (0,3 s bei Sma I und 0,5 s bei EcoR I).
- Das Enzymmolekül verbleibt auf dem geschnittenen Fragment oder fällt von der DNA ab. Ein freies Enzymmolekül aus der Lösung muß durch räumliche Diffusion sequenzunspezifisch auf die DNA treffen und an sie binden. Dieser Vorgang ist analog dem Start der Reaktion und die benötigte Zeit liegt in der Größenordnung von 1 s. Daraufhin erfolgt die lineare Diffusion des Enzyms bis zur nächsten Schnittstelle. Dieser Prozeß entspricht den langsamen beobachteten Schnittfolgen (3 s bei Sma I und 8 s bei EcoR I).

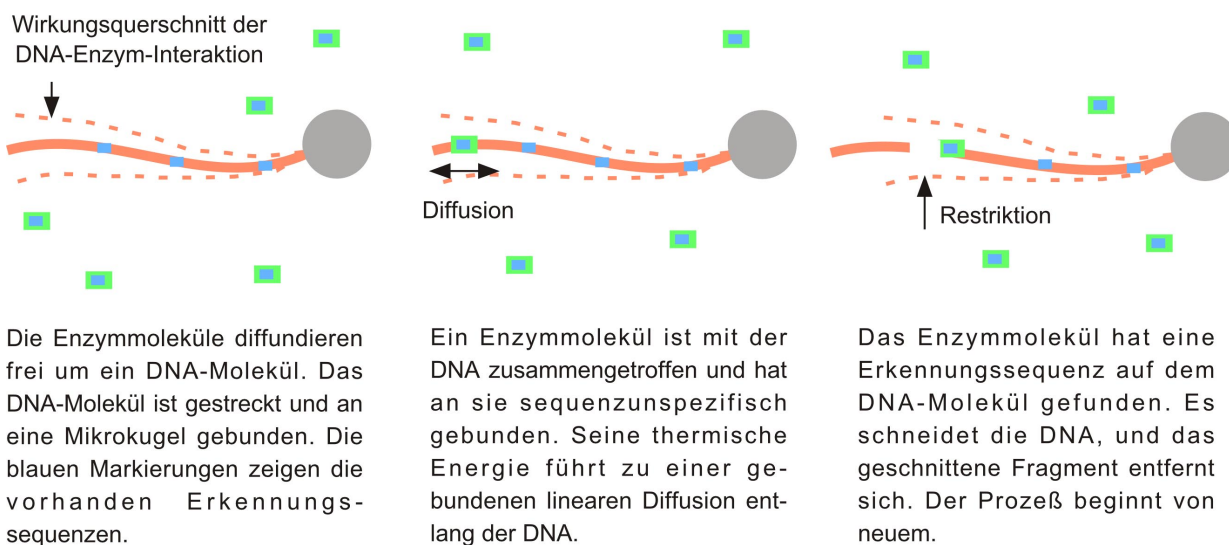


Abbildung 5.3: *Mechanismus der beobachteten schrittweisen Reaktionsfolge.*

Bindet das Enzymmolekül bei seinem ersten Zusammentreffen mit der DNA in der Mitte oder in der Nähe des mit der Mikrokugel fixierten Endes, wären nur wenige Schnitte beobachtbar und eine Zuordnung der DNA-Fragmente nicht möglich. Das trifft auf die unvollständig geschnittenen DNA-Moleküle (4 von 10 für Sma I und 5 von 10 für EcoR I) zu.

Ein Enzymmolekül kann während seiner linearen Diffusion entlang der DNA von dieser abfallen, ein langsamer Restriktionsschritt ist die Folge. Bindet zu einem bereits vorhandenen

Enzymmolekül ein weiteres an einer anderen Stelle an die DNA und schneiden diese an aufeinanderfolgenden Restriktionsstellen, ist eine sehr schnelle Schnittfolge zu beobachten. Erfolgen die Schnitte hingegen an entfernten Stellen, ist ein unvollständig geschnittenes Molekül das Ergebnis. Alle drei Möglichkeiten wurden beobachtet und sind in Abschnitt 4.5 aufgeführt.

Da es sich bei einer linearen Bewegung des Enzyms entlang der DNA auf Grund seiner thermischen Energie um eine statistische Bewegung handelt, ergeben sich für den einzelnen Restriktionsschritt keine festen Geschwindigkeiten, sondern eine Verteilungsfunktion. Die in Abbildung 4.19 (Abschnitt 4.5.4) auftretende breite Streuung der Restriktionsgeschwindigkeiten von 0,5-150 kbp/s erklärt sich damit.

5.3.3 Vergleich der Restriktionsgeschwindigkeiten

Die gemessenen Restriktionsgeschwindigkeiten für Sma I und EcoR I liegen in einem Bereich von 0,5-150 kbp/s (0,2-50 $\mu\text{m/s}$), mit einer wahrscheinlichsten Geschwindigkeit bei 10-20 kbp/s (3-7 $\mu\text{m/s}$). Die etwa um den Faktor zwei schnellere Restriktionsgeschwindigkeit von Sma I gegenüber EcoR I kann in strukturellen Unterschieden beider Enzyme und daraus folgenden unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Enzyme an die DNA begründet liegen. Die Struktur von Sma I ist jedoch nicht bekannt, ein Vergleich der Strukturen beider Enzyme und eine Erklärung der Unterschiede auf dieser Basis ist derzeit nicht möglich.

Ein bekanntes, prozessiv arbeitendes Enzym ist DNA-Polymerase, das die DNA-Replikation katalysiert. Die Katalysegeschwindigkeiten reichen von 10 bp/s bei DNA-Polymerase I [77], über 300 bp/s bei T7-DNA-Polymerase [78] bis zu 1000 bp/s bei dem DNA-Polymerase-III-Holoenzym [77]. Die Arbeitsweise der DNA-Polymerase ist jedoch nur bedingt mit einer linearen Diffusion einer Restriktionsendonuklease entlang der DNA zu vergleichen. Die Polymerase addiert schrittweise Desoxyribonukleotide an das freie 3'-OH-Ende der zu verlängernden DNA und bezieht daraus die Energie, die für ihre Bewegung notwendig ist.

Ein weiteres prozessiv arbeitendes Enzym ist RecBCD, eine DNA-Helikase und Exonuklease. Bei der Reaktion eines Enzymmoleküls an einem DNA-Molekül wurde eine Entwindung und Abspaltung der Basenpaare mit einer Geschwindigkeit von 1.000 bp/s gemessen. Die Reaktion benötigt ATP als Energiequelle [79].

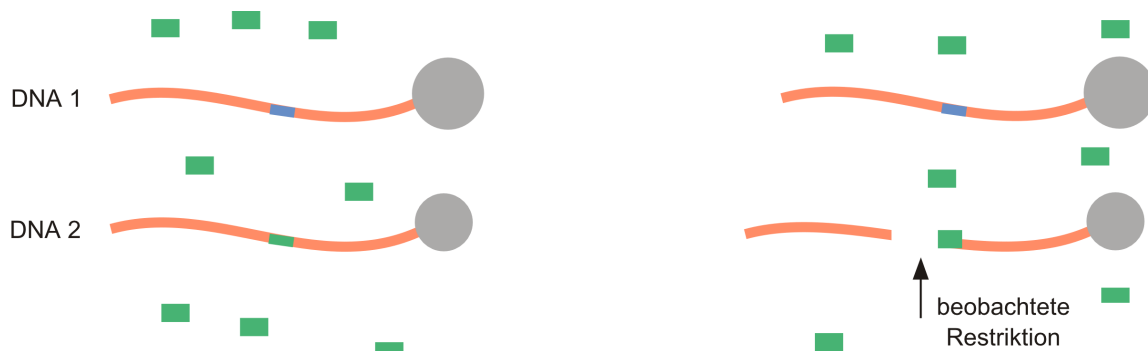
Im Gegensatz dazu bewegt sich die Restriktionsendonuklease ungerichtet entlang der DNA und stoppt, wenn es eine Erkennungssequenz gefunden hat. Die Energiequelle einer solchen Bewegung ist die thermische Energie des Enzymmoleküls. Eine mögliche zusätzliche Energiequelle ist die bei einer erfolgten Restriktion frei werdende Bindungsenergie der DNA.

5.4 Unterscheidung einzelner DNA-Moleküle

Die Restriktion eines DNA-Moleküls mit einem bekannten Enzym ermöglicht seine Identifizierung auf Grund seines charakteristischen Fragmentmusters. Genauso können zwei nahezu analoge DNA-Moleküle, die sich nur in einigen wenigen Mutationen unterscheiden, eindeutig zugeordnet werden. Für die Restriktion ist ein Enzym notwendig, dessen Erkennungssequenz auf einem der beiden DNA-Moleküle durch die Mutation verändert ist und dieses Molekül dort nicht schneidet (Abschnitt 4.6).

Für die Auswahl des Enzyms muß die Sequenz der DNA oder zumindest die Sequenz der mutierten Stellen bekannt und ein Enzym mit dieser Erkennungssequenz verfügbar sein. Mit einer zunehmenden Auswahl an Enzymen wird die Methode für eine immer größere Anzahl an Mutationen anwendbar. Bei der hier gezeigten Analyse kam die Mutation, die der Unterscheidung der DNA diente, nur einmal auf ihr vor.

Abbildung 5.4 zeigt die Unterscheidung des gestreckten DNA-Moleküls nach Mikroinjektion der Restriktionsendonuklease. Je nach dem, ob auf dem Molekül ein Schnitt auftritt oder nicht, erfolgt seine Zuordnung.



Zwei DNA-Moleküle, die sich nur in einer Mutation unterscheiden, sind zu ihrer Kennzeichnung an Mikrokugeln unterschiedlicher Größe gekoppelt und gestreckt. Eine Restriktionsendonuklease, die nur die Mutation auf DNA 2 spezifisch schneidet, wird injiziert.

Die Endonuklease bindet an seine spezifische Erkennungssequenz auf DNA 2 und schneidet. DNA 1 wird nicht geschnitten. Durch die direkte Beobachtung der Restriktion im Fluoreszenzmikroskop ist die Unterscheidung beider Moleküle gegeben.

Abbildung 5.4: Unterscheidung von zwei DNA-Molekülen durch ihre verschiedenen Mutationen.

Im Gegensatz zu Techniken, wie z.B. „Optical Mapping“ [80], die nur eine Analyse der Reaktionsprodukte im Gel erlauben, erfolgt hier eine direkte Beobachtung der Reaktionskinetik. Ebenso ist eine vorangehende Mikropräparation zur Auswahl eines definierten Moleküls möglich. „Molecular Combing“ [81], eine Technik, die mit markierten Sonden arbeitet, erlaubt zwar die gleichzeitige Analyse einer größeren Anzahl von Molekülen, ist jedoch auf Grund ihres

Auflösungsvermögens auf eine Sequenzlänge im oberen Kilobasenbereich begrenzt. Eine Suche nach Mutationen weniger Basenpaare ist nicht möglich.

Als Modell-DNA für das gezeigte Experiment wurde das DNA-Paar pRevTet-On und pRevTet-Off gewählt. Die Restriktion erfolgte mit den Endonukleasen Mlu I und Mfe I. Die Enzyme besitzen wechselseitig entweder eine oder keine Schnittstelle auf dem jeweiligen DNA-Molekül.

Das Experiment wurde nacheinander mit beiden Restriktionsenzymen an einer Mischung aus beiden Molekülsorten durchgeführt, wobei für die visuelle Kontrolle pRevTet-On durch 1 µm und pRevTet-Off durch 2 µm Mikrokugeln markiert war. Aus der Mischung wurden 17 DNA-Moleküle mit Mlu I analysiert. Das Ergebnis zeigt 16 richtig zugeordnete und 1 falsch zugeordnetes Molekül. Bei dem falsch zugeordneten Molekül wurde die erwartete Schnittstelle nicht beobachtet. Anschließend erfolgte die Analyse von 11 Molekülen mit Mfe I. Diese 11 Moleküle wurden vollständig richtig zugeordnet. Insgesamt ergab sich bei 27 Molekülen ein falsches negatives Ergebnis und damit eine Fehlerrate von ca. 4%. Diese läßt sich in zukünftigen Anwendungen sicherlich minimieren, jedoch nicht ausschließen.

Die Ursachen für den erwarteten, jedoch nicht aufgetretenen Schnitt können einerseits durch eine zu geringe Menge injizierten Enzyms oder keine ausreichende Konzentration des Reaktionspuffers begründet sein. Andererseits kann eine Verklumpung auf der DNA oder eine Bindung des DNA-Moleküls mit beiden Enden an die Mikrokugel die Erklärung sein. Bei der geringen Länge der DNA-Moleküle von 2,6 µm kann die Streckung eines Moleküls nicht wie bei Lambda-DNA direkt beobachtet werden.

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt das Potential, das in dieser Methode zur Unterscheidung einzelner DNA-Moleküle liegt.

5.5 Ausblick

Der direkte Zugang zur Individualität einzelner DNA-Moleküle und ihrer Analyse spielt eine immer bedeutendere Rolle. Die Handhabung einzelner DNA-Moleküle, die Untersuchung von Reaktionsmechanismen an einzelnen Molekülen und die Unterscheidung verschiedener Moleküle auf Grund ihres Restriktionsmusters bilden dafür die Grundlage. Für weiterführende Arbeiten ergeben sich folgende Ziele:

Die gezeigte „ja-nein-Entscheidung“ zwischen verschiedenen DNA-Molekülen bekannter Sequenzen stellt die Grundlage für weiterreichende Analysemethoden dar, die eine Suche nach gewünschten Sequenzabschnitten auf einem einzelnen DNA-Molekül erlauben. Denkbar wäre der Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden, z.B. fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide, die sequenzspezifisch an die DNA hybridisieren. Diese Sonden sind für beliebige Zielsequenzen synthetisierbar, und die Detektion ihrer Bindung an das DNA-Molekül kann durch ihre Markierung erfolgen.

Darauf aufbauend könnte die direkte Sequenzanalyse eines einzelnen DNA-Moleküls erfolgen. Der gezeigte Aufbau, in dem das zu analysierende Molekül an eine Mikrokugel

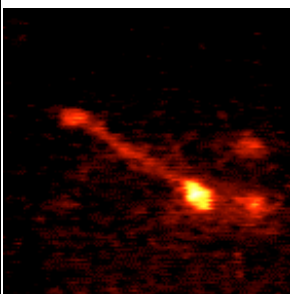
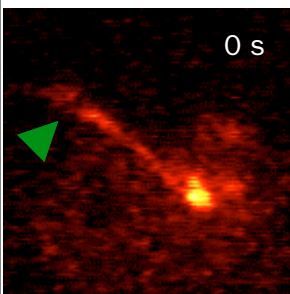
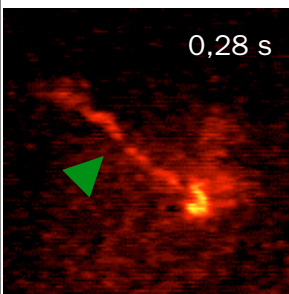
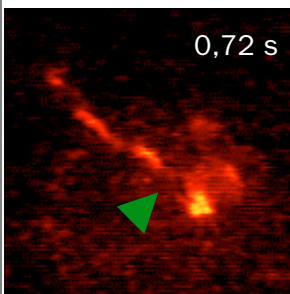
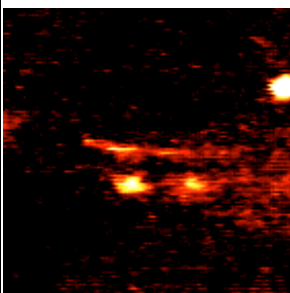
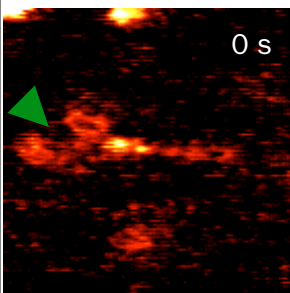
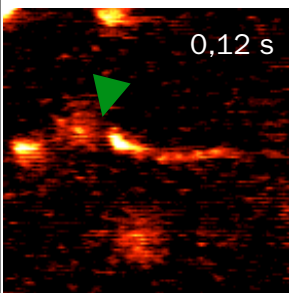
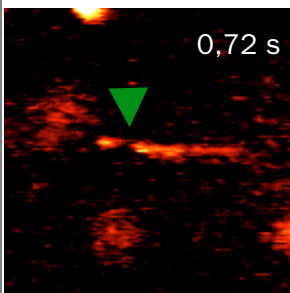
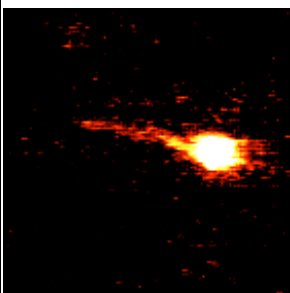
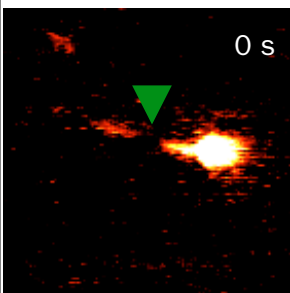
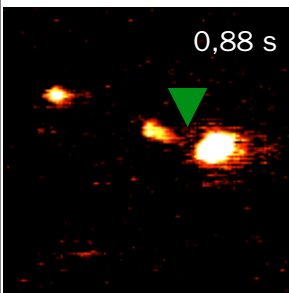
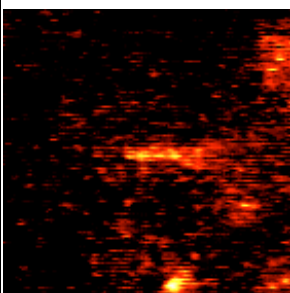
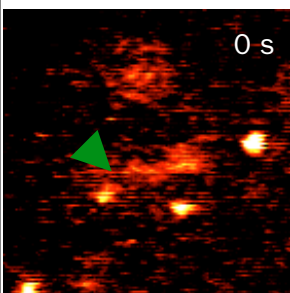
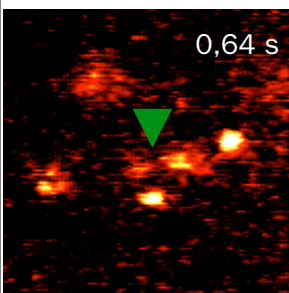
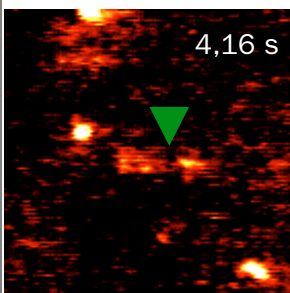
gekoppelt, mit der optischen Pinzette gehalten und im Fluß gestreckt wird, wäre dafür eine geeignete Grundlage. Nach Zugabe einer Exonuklease, die am freien Ende des DNA-Moleküls schrittweise Basenpaare abspaltet, müßten diese geordnet in einer nachfolgenden Einheit analysiert werden.

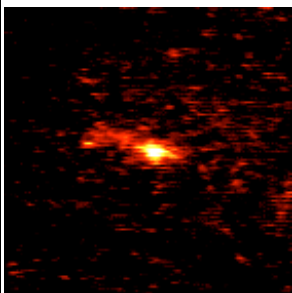
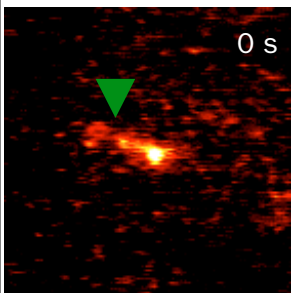
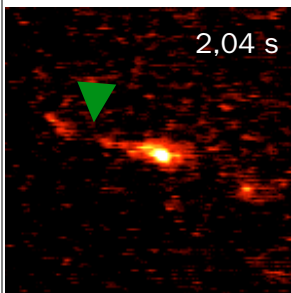
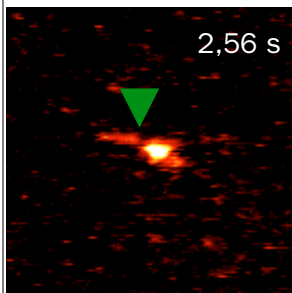
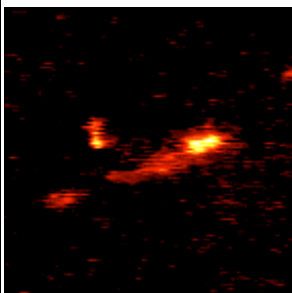
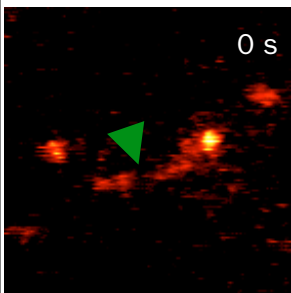
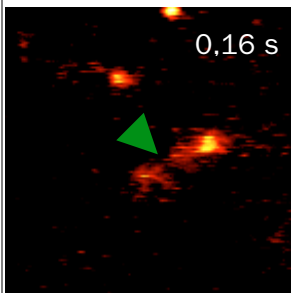
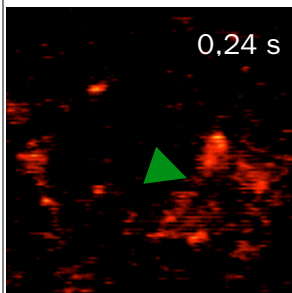
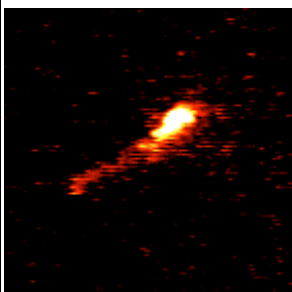
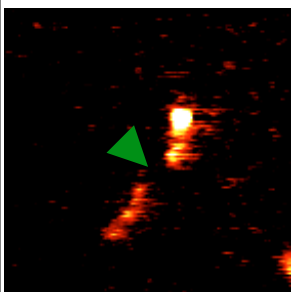
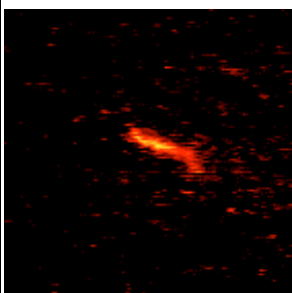
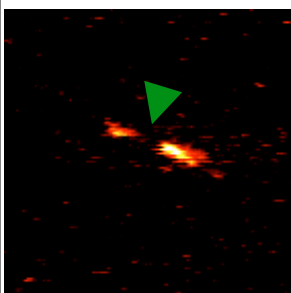
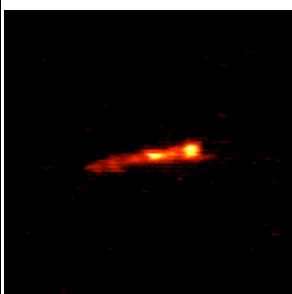
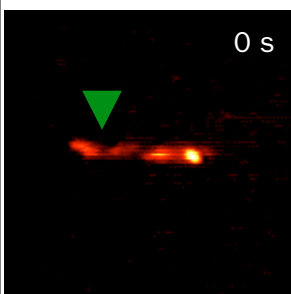
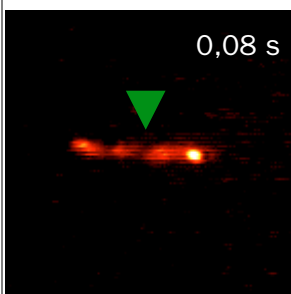
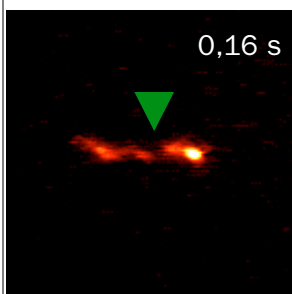
Die dargestellten Techniken benötigen für ihre Anwendung hochentwickelte Mikropräparationstechniken, die den Zugriff auf einen speziellen, zu analysierenden DNA-Abschnitt erlauben. Die interessierende DNA muß dafür gezielt aus den Chromosomen einer gegebenen Zelle, z.B. unter Anwendung von Laser-Mikrodissektionstechniken, herausgelöst werden [82,83]. Eine darauffolgende Kopplung des ausgewählten DNA-Fragments an eine Mikrokugel ermöglicht die weitere Handhabung und Zuführung zu Einzelmolekülanalysen.

Die Entwicklung dieser Techniken liefert nicht nur weiterreichende Informationen über Reaktionsmechanismen auf molekularer Ebene. Sie ermöglicht auch einen wichtigen Schritt in Richtung einer sensitiveren und differenzierteren klinischen Diagnostik oder der Ursachenforschung genetisch bedingter Erkrankungen.

6 DNA-Restriktionstafeln

6.1 Lambda-DNA + Sma I

Nr.	Ausgangsmolekül	1. Schnitt	2. Schnitt	3. Schnitt
1		 0 s	 0,28 s	 0,72 s
2		 0 s	 0,12 s	 0,72 s
3		 0 s	 0,88 s	kein Schnitt
4		 0 s	 0,64 s	 4,16 s

5		 0 s	 2,04 s	 2,56 s
6		 0 s	 0,16 s	 0,24 s
7		 0 s	kein Schnitt	kein Schnitt
8		 0 s	kein Schnitt	kein Schnitt
9		 0 s	 0,08 s	 0,16 s

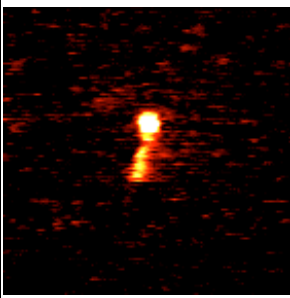
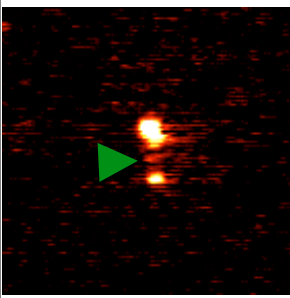
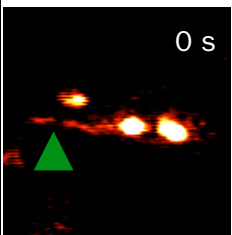
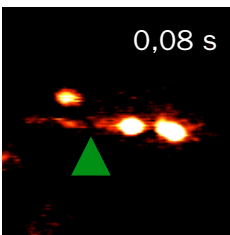
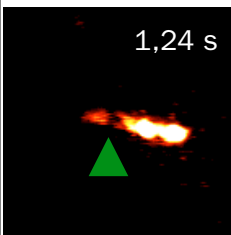
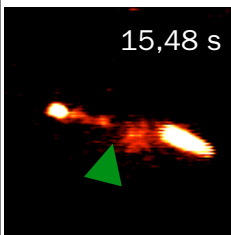
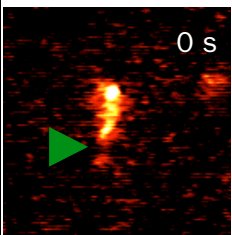
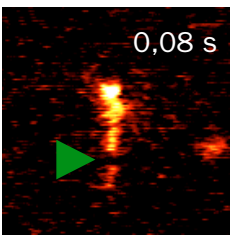
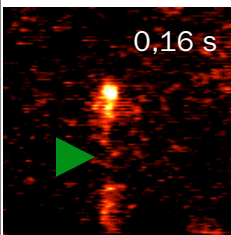
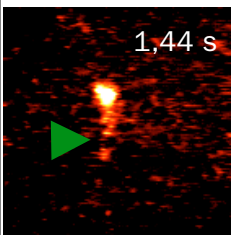
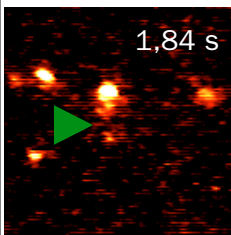
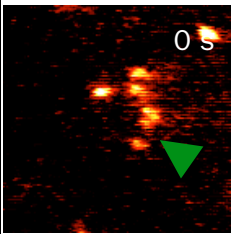
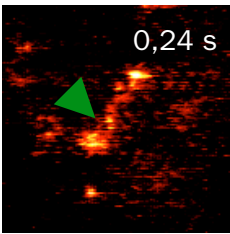
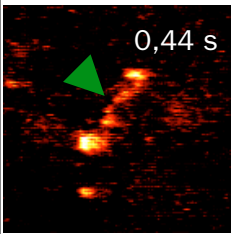
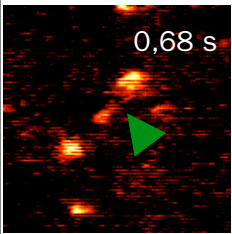
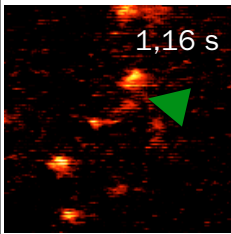
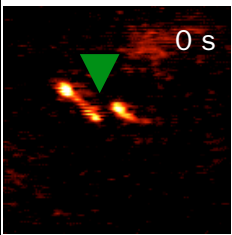
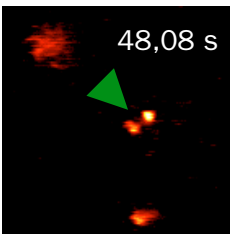
10			kein Schnitt	kein Schnitt
----	---	---	--------------	--------------

Abbildung 6.1: *Sma I* Restriktion von 10 verschiedenen Lambda-DNA-Molekülen. Bei 6 Molekülen erscheinen alle 3 erwarteten Schnittstellen.

6.2 Lambda-DNA + EcoR I

Nr.	1. Schnitt	2. Schnitt	3. Schnitt	4. Schnitt	5. Schnitt
1				von DNA-Cluster überdeckt	
2					
3					
4			kein Schnitt	kein Schnitt	kein Schnitt

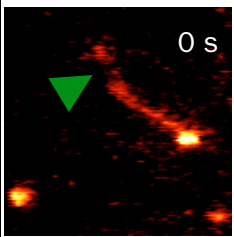
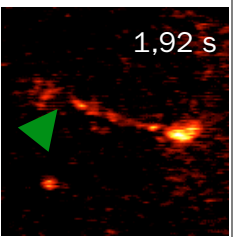
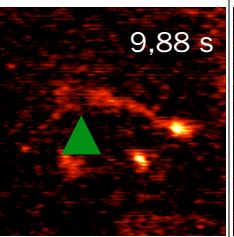
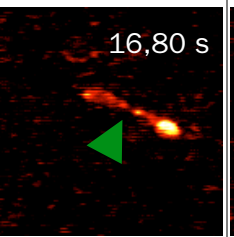
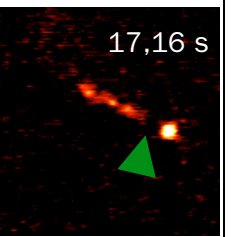
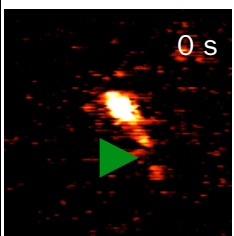
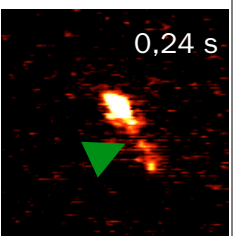
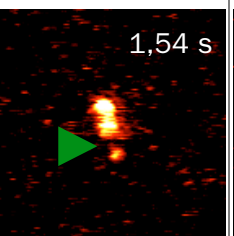
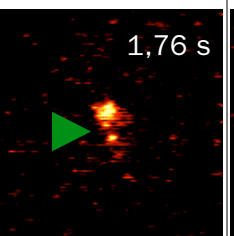
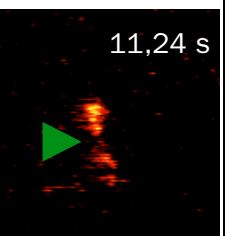
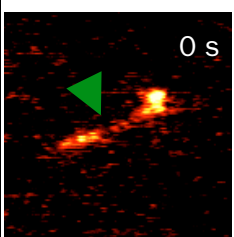
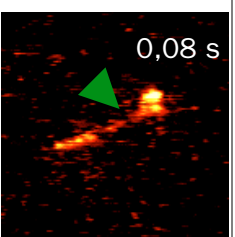
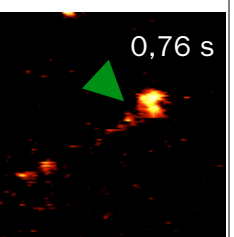
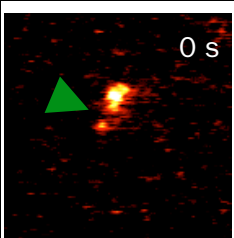
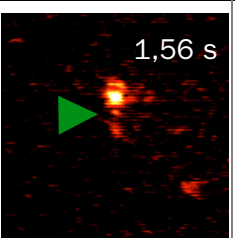
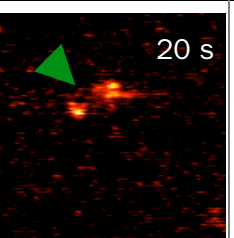
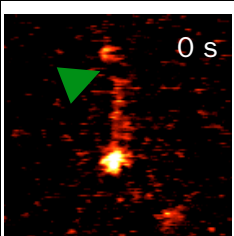
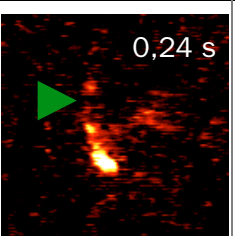
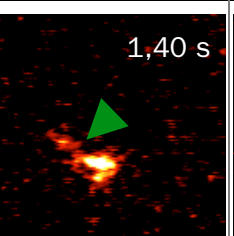
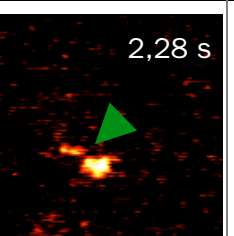
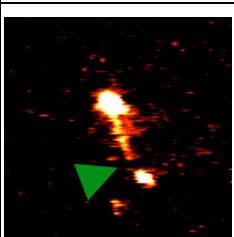
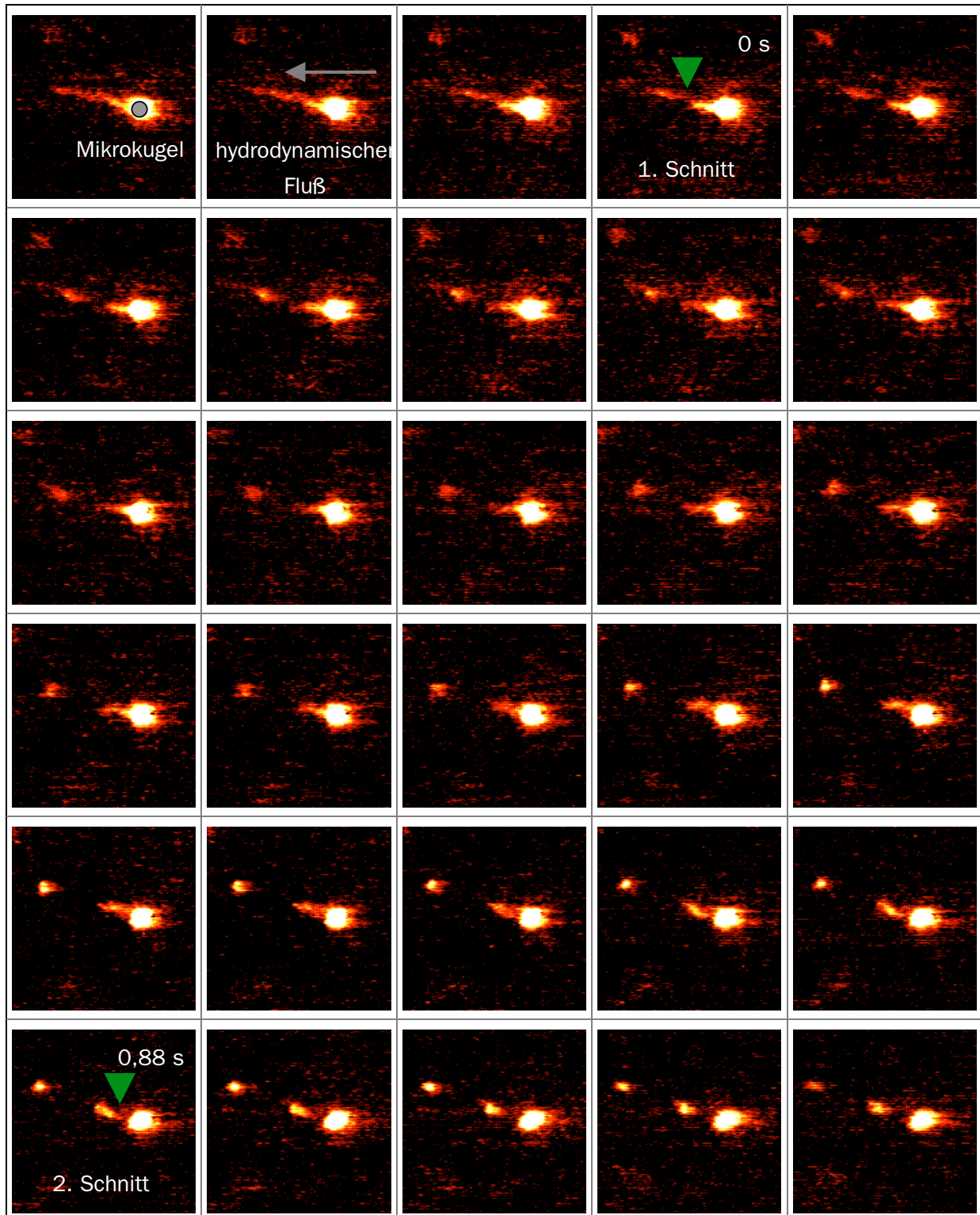
5	 0 s	 1,92 s	 9,88 s	 16,80 s	 17,16 s
6	 0 s	 0,24 s	 1,54 s	 1,76 s	 11,24 s
7	 0 s	 0,08 s	 0,76 s	kein Schnitt	kein Schnitt
8	 0 s	 1,56 s	 20 s	kein Schnitt	kein Schnitt
9	 0 s	 0,24 s	 1,40 s	 2,28 s	kein Schnitt
10	 0 s	kein Schnitt	kein Schnitt	kein Schnitt	kein Schnitt

Abbildung 6.2: *EcoR I* Restriktion von 10 verschiedenen DNA-Molekülen. Bei 5 Molekülen erscheinen alle erwarteten Schnittstellen in einer geordneten Reihenfolge. Bei Molekül 1 ist Schnitt 4 von einem DNA-Cluster überdeckt, Schnitt 5 erscheint wieder. Es wurde daher als vollständig geschnittenes Molekül in die Auswertung in Abschnitt 4.5 mit aufgenommen.

6.3 Zeitverlauf einer Restriktionsfolge



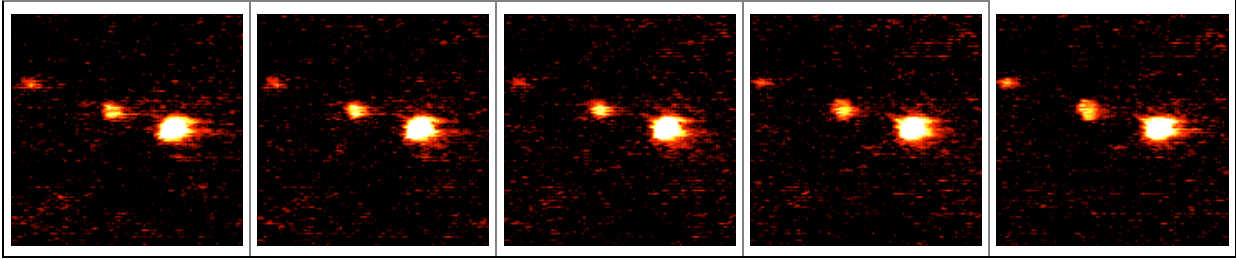
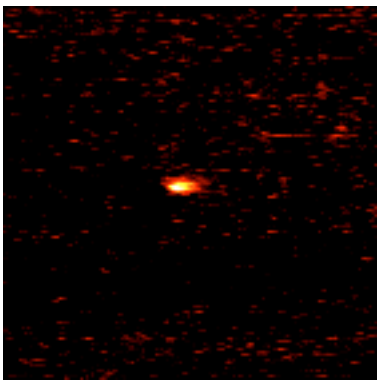
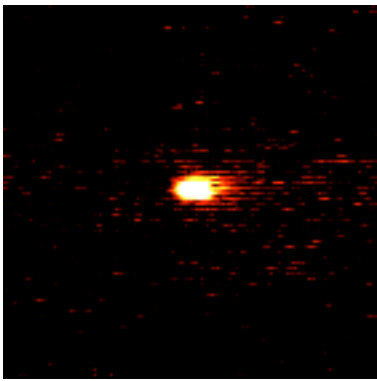
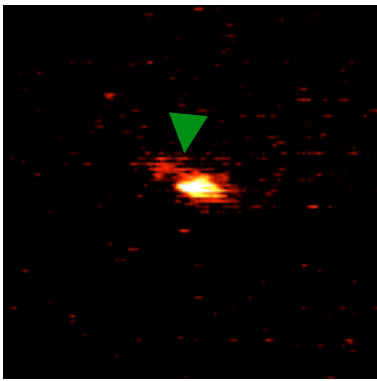
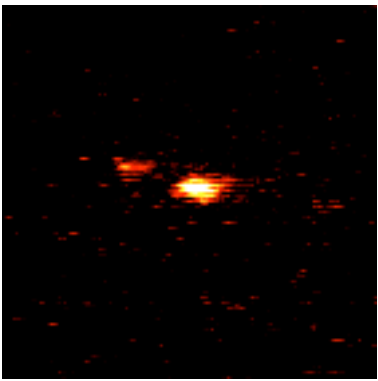


Abbildung 6.3: Zeitverlauf einer Restriktionsfolge von zwei im Abstand von 0,88 s aufeinanderfolgenden Schnitten, aufgenommen mit einer Bildfolgefrequenz von 25 Hz (Videofrequenz). Das Beispiel zeigt eine Reaktion von *Sma* I.

6.4 pRevTet-On + Mlu I

Nr.	Ausgangsmolekül	Schnitt	Fragmente
1		kein Schnitt	--
2			

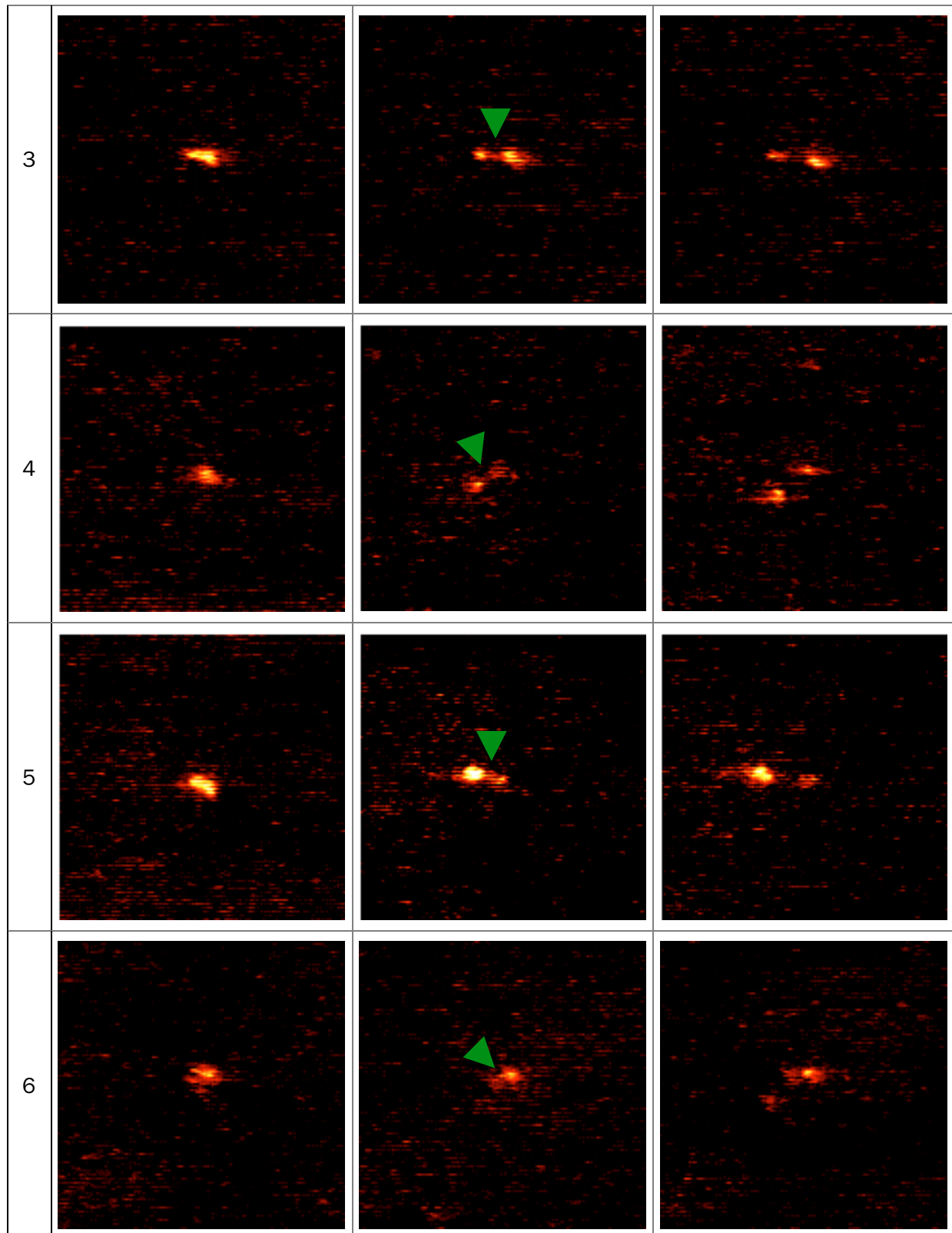
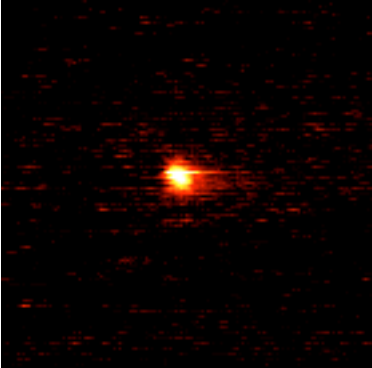
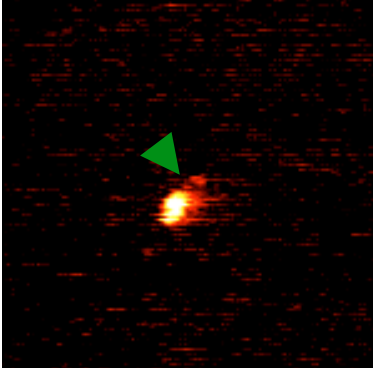
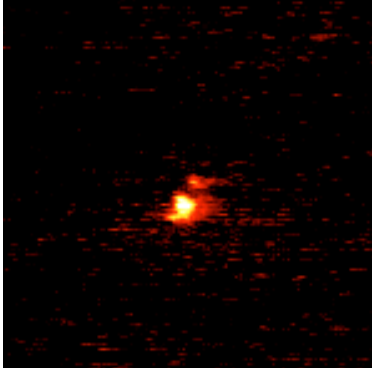
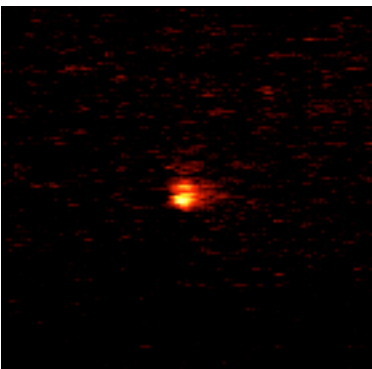
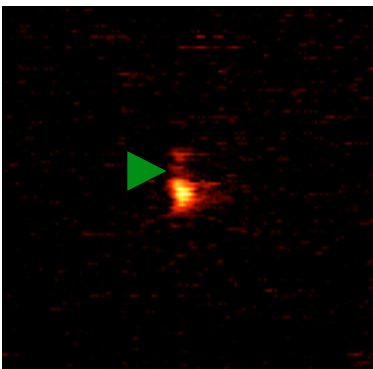
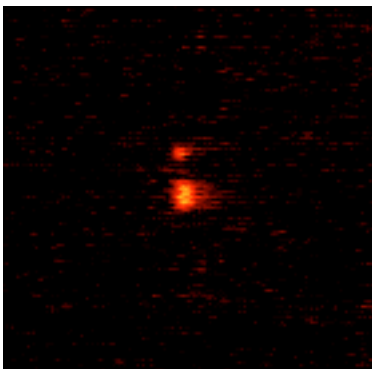
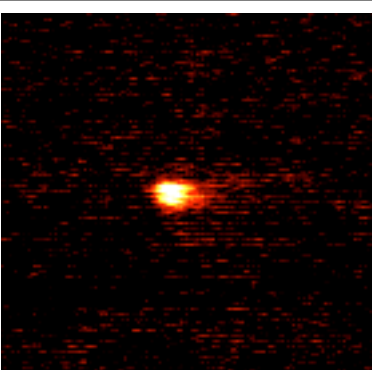
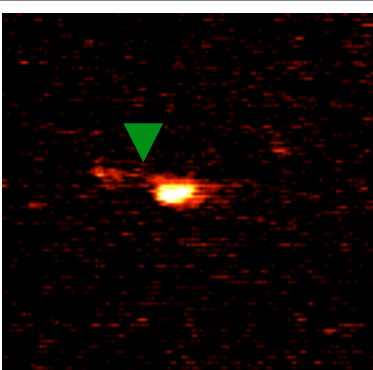
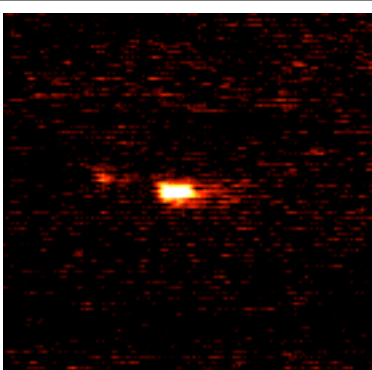
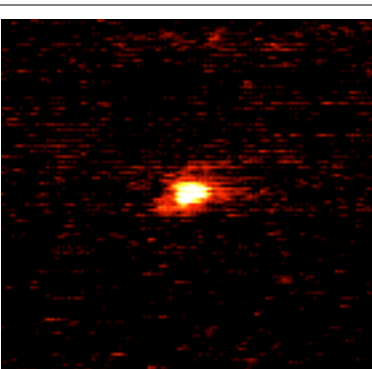
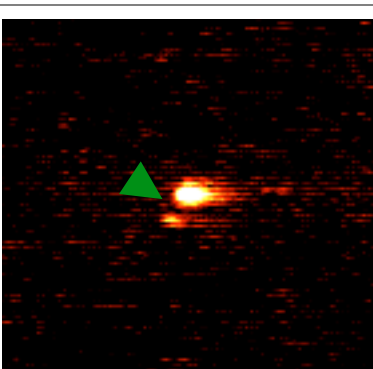
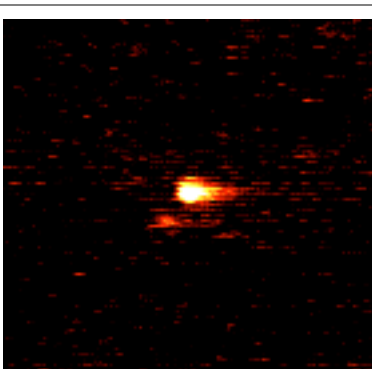


Abbildung 6.4: Restriktionsanalyse von pRevTet-On mit Mlu I. Bei 5 von 6 analysierten Molekülen erscheint die erwartete Schnittstelle. Die richtige Zuordnung war nur bei diesen 5 Moleküle möglich.

6.5 pRevTet-Off + Mfe I

Nr.	Ausgangsmolekül	Schnitt	Fragmente
1			
2			
3			
4			

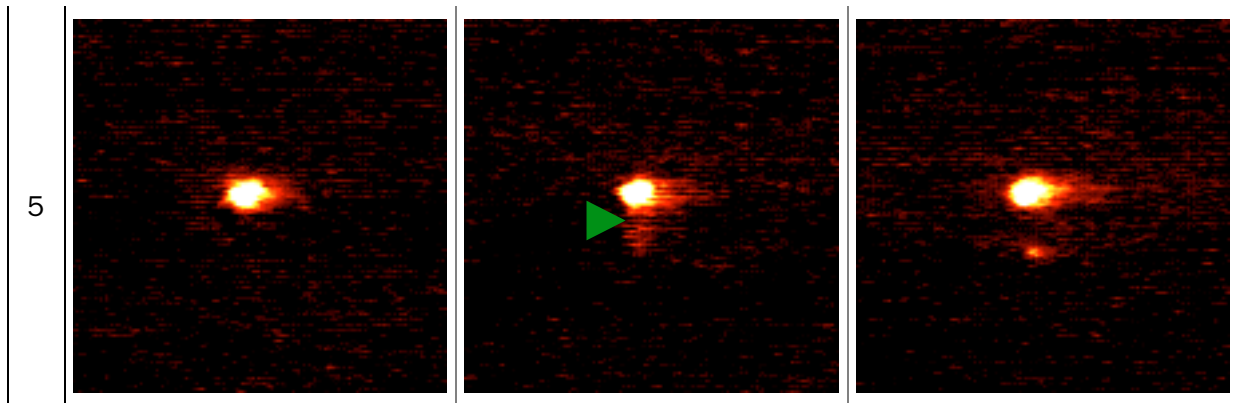


Abbildung 6.5: Restriktionsanalyse von pRevTet-Off mit Mfe I. Bei allen 5 analysierten Molekülen erscheint die erwartete Schnittstelle und ermöglicht die richtige Zuordnung.

6.6 pRevTet-On + Mfe I und pRevTet-Off + Mlu I

Nr.	pRevTet-On + Mfe I			pRevTet-Off + Mlu I		
	Start	30 s	60 s	Start	30 s	60 s
1						
2						
3						
4						

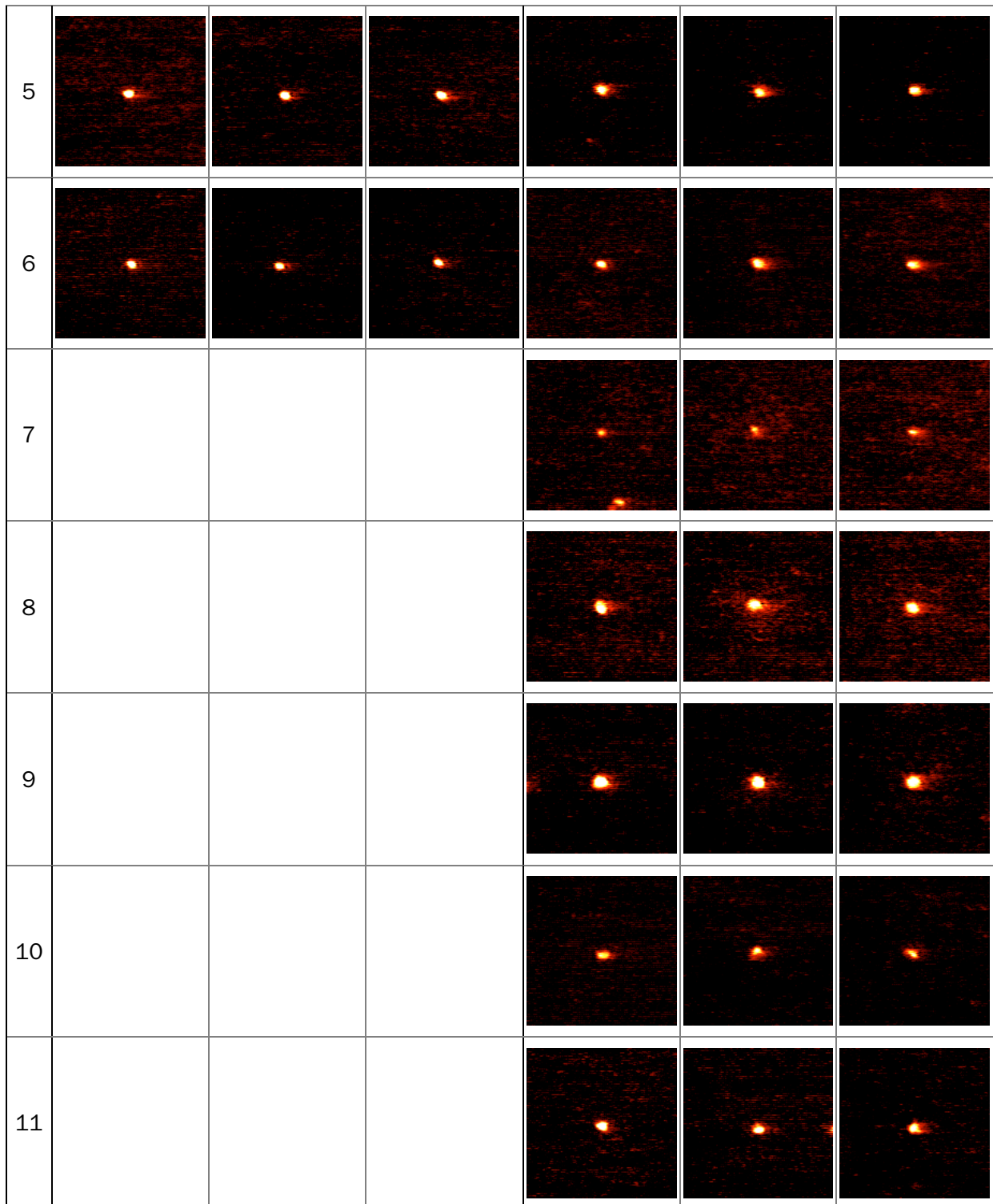


Abbildung 6.6: Restriktionsanalyse von *pRevTet-On* mit *Mfe I* und von *pRevTet-Off* mit *Mlu I*. Es erscheint bei keinem der analysierten Moleküle eine Schnittstelle. Die richtige Zuordnung aller Moleküle ist damit gegeben. Die dargestellte Zeitsequenz umfaßt 60 s.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Stryer, L. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York* (1991) 85
- [2] Greulich, K. O. Micromanipulation by Light in Biology and Medicine. *Birkhäuser Verlag* (1999) 159-161
- [3] König, K., Göhlert, A., Liehr, T., Loncarevic, I. F., Riemann, I. Two-Photon Multicolor FISH: A Versatile Technique to Detect Specific Sequences within Single DNA Molecules in Cells and Tissues. *Single Molecules* 1 (2000) 41-51
- [4] Quake, S. R., Babcock, H. and Chu, S. The Dynamics of Partially Extended Single Molecules of DNA. *Nature* 388 (1997) 151-154
- [5] Allemand, J. F., Bensimon, D., Lavery, R., Croquette, V. Stretched and overwound DNA forms a Pauling like structure with exposed bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 14152-14157
- [6] Wang, M. D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., Block, S. M. Stretching DNA with Optical Tweezers. *Biophysical Journal* 72 (1997) 1335-1346
- [7] Bouchiat, C., Wang, M. D., Allemand, J.-F., Strick, T., Block, S. M. and Croquette, V. Estimating the Persistence Length of a Worm-like Chain Molecule from Force-extension Measurements. *Biophysical Journal* 76 (1999) 409-413
- [8] Baumann, C. G., Smith, S. B., Bloomfield, V. A., Bustamante, C. Ionic Effects on the Elasticity of Single DNA Molecules. *Proc. Natl. Acad. USA* 94 (1997) 6185-6190
- [9] Dapprich, J. Single-Molecule DNA Digestion by Lambda-Exonuclease. *Cytometry* 36 (1999) 163-168
- [10] Bennink, M., Schäfer, O. D., Kanaar, R., Sakata-Sogawa, K., Schins, J. M., Kanger, J. S., Grooth, B. G., Greve, J. Single-Molecule Manipulation on Double-Stranded DNA Using Optical Tweezers: Interaction Studies of DNA With RecA and YOYO-1. *Cytometry* 36 (1999) 200-208
- [11] Wang, M. D., Schnitzer, M. J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., Block, S. M. Force and Velocity Measured for Single Molecules of RNA Polymerase. *Science* 282 (1998) 902-907
- [12] Yan, X., Grace, W. K., Yoshida, T. M., Habbersett, R. C., Velappan N., Jett, J. H., Keller, R. A., Marrone, B. L. Characteristics of Different Nucleic Acid Staining Dyes for DNA Fragment Sizing by Flow Cytometry. *Analytical Chemistry* 71.24 (1999) 5470-5480
- [13] Lai, Z., Jing, J., Aston, C., Clarke, V., Apocada, J., Dimalanta, E. T., Carucci, D. J., Gardner, M. J., Mishra, B., Anatharaman, T. S., Paxia, S., Hoffmann, S., Venter, J. C., Huff, E., Schwartz, D. E. A Shotgun Optical Map of the entire *Plasmodium falciparum* Genome. *Nature Genetics* 23 (1999) 309-313
- [14] Harada, Y., Funatsu, T., Murakami, K., Nonoyama, Y., Ishihama, A., Yanagida, T. Single-Molecule Imaging of RNA Polymerase-DNA Interactions in Real Time. *Biophysical Journal* 76 (1999) 709-715

- [15] Vale, R. D., Funatsu, T., Pierce, D. W., Romberg, L., Harada, Y., Yanagida, I. Direct Observation of Single Kinesin Molecules Moving along Microtubules. *Nature* 380 (1996) 451
- [16] Hoyer, C. UV-induzierte Enzymreaktionen an einzelnen DNA Molekülen und ihre Handhabung unter dem Fluoreszenzmikroskop. *Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena* (1996)
- [17] Hoyer, C., Monajembashi, S., Greulich, K. O. Laser Manipulation and UV Induced Single Molecule Reactions of Individual DNA Molecules. *Journal of Biotechnology* 52 (1996) 65-73
- [18] Greulich, K. O. Micromanipulation by Light in Biology and Medicine. *Birkhäuser Verlag* (1999) 172-179
- [19] Stryer, L. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York* (1991) 73-90, 677-710
- [20] Lewin, B. Gene. *VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim* (1991) 61-95
- [21] Podtelezhnikov, A. A., Cozzarelli, N. R., Vologodskii, A. V. Equilibrium Distributions of Topological States in Circular DNA: Interplay of Supercoiling and Knotting. *Proc. Natl. Acad. USA* 96.23 (1999) 12974-12979
- [22] Ebert, G. Biopolymere. Teubner *Studienbücher Stuttgart* (1993) 29-32
- [23] Smith, S. B., Cui, Y., Bustamante, C. Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science* 271 (1996) 795-799
- [24] Zhou, H-X. Calculation of Translational Friction and Intrinsic Viscosity. I. General Formulation for Arbitrarily Shaped Particles. *Biophysical Journal* 69 (1995) 2286-2297
- [25] Stigter, D., Bustamante, C. Theory for the Hydrodynamic and Electrophoretic Stretch of Tethered B-DNA. *Biophysical Journal* 75 (1998) 1197-1210
- [26] Smith, S. B., Finzi, L., Bustamante, C. Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA Molecules by Using Magnetic Beads. *Science* 258 (1992) 1122-1126
- [27] Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D., Smith, S. Entropic elasticity of λ -phage DNA. *Science* 265 (1994) 1599-1600
- [28] Cantor, C. R., Schimmel, P. R. Biophysical Chemistry, Part III (The Behavior of Biological Macromolecules). *W. H. Freeman and Company, New York* (1980) 1019-1039
- [29] Gerthsen, C., Kneser, H. O., Vogel, H. Physik. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York* (1989) 768-769
- [30] Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, R., Lavery, R., Viovy, J. L., Chastenay, D., Caron, D., Caron, F. DNA: An Extensible Molecule. *Science* 271 (1996) 792-794
- [31] Wang, M. D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., Block, S. M. Stretching DNA with Optical Tweezers. *Biophysical Journal* 72 (1997) 1335-1346
- [32] Stryer, L. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York* (1991) 131-133, 841-845, 895-896
- [33] pRevTet System, User Manual, *Clontech, Heidelberg*

- [34] pRevTet-On Vector Information, *Clontech, Heidelberg*
- [35] pRevTet-Off Vector Information, *Clontech, Heidelberg*
- [36] Stryer, L. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York* (1991) 130-131, 686-687
- [37] Kittler, L., Baguley, B. C., Löber, G., Waring, M. J. Sequence-specific Interactions of Minor Groove Binders with Restriction Fragments of cDNAs for H Tau 40 Protein and MAP Kinase 2. A Qualitative and Quantitative Footprint Study. *J. Molec. Recog.* 12 (1999) 121-130
- [38] Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Plenum Press, New York* (1983)
- [39] Bergmann, Schaefer. Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 6 (Festkörper). *Walter de Gruyter, Berlin New York* (1993) 627-628
- [40] Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. *Molecular Probes*.
<http://www.probes.com/handbook/sections/0800.html> (15.10.2000)
- [41] Product Information Sheet — Dimeric Cyanine Nucleic Acid Stains. *Molecular Probes*.
<http://www.probes.com/media/pis/mp03600.pdf> (15.10.2000)
- [42] Product Information Sheet — SYBRGreen I Nucleic Acid Gel Stain. *Molecular Probes*.
<http://www.probes.com/media/pis/mp07567.pdf> (15.10.2000)
- [43] Product Information Sheet — PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent and Kits. *Molecular Probes*. <http://www.probes.com/media/pis/mp07581.pdf> (15.10.2000)
- [44] Retting, W., Strehmel, B., Schrader, S., Seifert, H. Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York* (1999) 193-240
- [45] Kishino, A., Yanagida, T. Force Measurements by Micromanipulation of a Single Actin Filament by Glass Needles. *Nature*. 334 (1988) 74-76
- [46] Bustante, C. Direct Observation and Manipulation of Single DNA Molecules Using Fluorescence Microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* 20 (1991) 415-446
- [47] Krenik K.D., Kephart G.M., Offord K.P., Dunnette S.L., Gleich, G.J. Comparison of Antifading Reagents Used in Immunofluorescence. *J. Immunol. Methods*. 117 (1989) 91-97
- [48] Product Data – Antifade. *Appligene ONCOR, Heidelberg*
- [49] Beyer, H., Riesenberger, H. Handbuch der Mikroskopie. *Verlag Technik Berlin* (1988) 24-45
- [50] Inoué, S. Video Microscopy. *Plenum Press New York* (1986) 111-122
- [51] Michel, K. Die Grundzüge der Theorie des Mikroskopes. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart* (1964) 89-100
- [52] Monajembashi, S. Laserstrahl und optische Pinzette für zell- und molekularbiologische Anwendungen an der Auflösungsgränze der Lichtmikroskopie. *Dissertation, Ruprecht-Karl-Universität, Heidelberg* (1991)
- [53] Retting, W., Strehmel, B., Schrader, S., Seifert, H. Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York* (1999) 417-438
- [54] Perkins, T. Department of Physics, Stanford University. Homepage *Molecular Probes*.
<http://www.probes.com/servlets/photo?fileid=g000465&id=9> (30.10.2000)

- [55] Kramer, J., Wells, S. Molecular Probes. Homepage *Molecular Probes*.
<http://www.probes.com/servlets/photo?fileid=g000453&id=18> (30.10.2000)
- [56] PCO CCD-Imaging, *PCO Computer Optics GmbH, Kehlheim* (1997)
- [57] Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., Chu, S. Observation of a Single-beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. *Optics Letters* 11 (1986) 288-290
- [58] Greulich, K. O. Micromanipulation by Light in Biology and Medicine. *Birkhäuser Verlag* (1999) 75-96
- [59] Gerthsen, C., Kneser, H. O., Vogel, H. Physik. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York* (1989) 568-570
- [60] Ashkin, A. Forces of a Single-beam Gradient Laser Trap on a Dielectric Sphere in the Ray Optics Regime. *Biophys. J.* 61 (1992) 569-582
- [61] Greulich, K. O. Lasermikrosonden und Laserspektroskopie *Physik in unserer Zeit* 24.4 (1993) 170-175
- [62] Produkte und Applikationen für das Labor 1999. *Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg*
- [63] Desalting and Buffer Exchange with MICROCON, CENTRICON and CENTRIPREP Centrifugal Concentrators. *Millipore, Eschborn*
- [64] Gerthsen, C., Kneser, H. O., Vogel, H. Physik. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York* (1989) 102-103
- [65] Gerthsen, C., Kneser, H. O., Vogel, H. Physik. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York* (1989) 205-207
- [66] Papadopoulos, S., Jürgens, K. D., Gros, G. Protein Diffusion in Living Skeletal Muscle Fibers: Dependence on Protein Size, Fiber Type and Concentration. *Biophysical Journal* 79 (2000) 2084-2094
- [67] Datenblatt Pvu I, *New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus*
- [68] Datenblatt DNA Tailing Kit, *Boehringer Mannheim, Mannheim*
- [69] Zimmermann, R. M., Cox, E. C. DNA Stretching on Functionalized Gold Surfaces. *Nucleic Acids Research* 22.3 (1994) 492-497
- [70] Datenblatt Alkaline Phosphatase, *New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus*
- [71] Datenblatt T4 DNA Ligase, *New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus*
- [72] Datenblatt Terminale Transferase, *Boehringer Mannheim, Mannheim*
- [73] Informationsblatt Nucleic Acid Gel Stain, *Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen*
- [74] Hoffmann, A., Meyer zu Hörste, G., Pilarczyk, G., Monajembashi, S., Uhl, V., Greulich, K. O. Optical Tweezers for Confocal Microscopy. *Applied Physics B* 71 (2000) in press.
- [75] Endlich, N. Beobachtung und Manipulation von einzelnen DNS-Molekülen im Lichtmikroskop. *Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg* (1993)
- [76] Kosikov, K. M., Gorin, A. A., Zhurkin, V. B., Olson, W. K. DNA Stretching and Compression: Large-scale Simulations of Double Helical Structures. *J. Mol. Biol.* 289 (1999) 1301-1326
- [77] Stryer, L. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York* (1991) 701

-
- [78] Maier, B., Bensimon, D., Croquette, V. Replication by a Single DNA Polymerase of a Stretched Single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. USA* 97.22 (2000) 12002-12007
- [79] Bianco, P. R., Brewer, L. R., Corzett, M., Balhorn, R., Yeh, Y., Kowalczykowski, S. C., Baskin, R. J. Processive Translocation and DNA Unwinding by RecBCD Enzyme Molecules. *Nature* 409 (2001) 374-378
- [80] Wang, Y.-K., Hufe, E. J., Schwartz, D. C. Optical Mapping of Site-Directed Cleavages on Single DNA Molecules by the RecA-assisted Restriction Endonuclease Technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 165-169
- [81] Herrick, J., Bensimon, A. Imaging of Single DNA Molecule: Applications to High-Resolution Genomic Studies. *Chromosome Research* 7 (1999) 409-423
- [82] Greulich, K. O., Monajembashi, S., Celeda, D., Endlich, N., Eickhoff, H., Hoyer, C., Leitz, G., Weber, W., Scheef, J., Rüterjans, H. Laser Microtreatment for Genetic Manipulations and DNA Diagnostics by a Combination of Microbeam and Photonic Tweezers (Laser Microbeam Trap). *Progress in Biomedical Optics, SPIE* 2328 (1994) 152-160
- [83] Schütze, K., Becker, I., Becker, K.-F., Thalhammer, S., Stark, R., Heckl, W. M., Böhm, M., Pösl, H. Cut out or Poke in - The Key to the World of Single Genes: Laser Micro-manipulation as a Valuable Tool on the Look-out for the Origin of Disease. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 14 (1997) 1-8

8 Anhang

8.1 Wissenschaftliche Beiträge

8.1.1 Auszeichnungen

- Best Paper Award. Laser Optics for Young Scientists. 26.-30. Mai 2000, St. Petersburg, Russland

8.1.2 Publikationen

- Schäfer, B., Nasanshargal, B., Monajembashi, S., Gemeinhardt, H., Greulich, K. O., Uhl, V. Study of Single-Molecule Dynamics and Reactions with Classic Light Microscopy. *Cytometry* 36.3 (1999) 209-216
- Schäfer, B., Gemeinhardt, H., Uhl, V., Greulich, K. O. Single Molecule DNA Restriction Analysis in the Light Microscope. *Single Molecules* 1 (2000) 33-40
- Greulich, K. O., Pilarczyk, G., Hoffmann, A., Meyer zu Hörste, G., Schäfer, B., Uhl, V., Monajembashi, S. Micromanipulation by Laser Microbeam and Optical Tweezers: From Plant Cells to Single Molecules. *Journal of Microscopy* 198.3 (2000) 182-187
- Greulich, K. O., Schäfer, B., Monajembashi, S. Taking Light Pressure Serious: Light as a Quasimechanical Microtool. *SPIE Proceedings*. im Druck
- Greulich, K. O., Hoffmann, A., Meyer zu Hörste, G., Pilarczyk, G., Schäfer, B., Monajembashi, S. Multilaser Microscopy: From Plant Cell Biology via Single Molecules to Cancer Research. *Journal of Biomedical Optics, Special Issue LALS 2000*. Manuskript eingereicht
- Schäfer, B., Gemeinhardt, H., Greulich, K. O. Fluorescence Microscopy of Single Molecule DNA Restriction Reactions Using Optical Tweezers. Manuskript eingereicht

8.1.3 Vorträge

- Schäfer, B., Kittler, L., Gemeinhardt, H., Uhl, V., Greulich, K. O. Relaxation of Individual DNA Molecules Described by a Harmonic Oscillator Modell. 5th International Workshop on Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences. 29. September - 1. Oktober 1999, Berlin

- Schäfer, B., Gemeinhardt, H., Uhl, V., Greulich, K. O. Untersuchungen von Enzymreaktionen an individuellen DNS Molekülen mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Chemische Physik, CP 4.3. 13.-16. März 2000, Potsdam
- Schäfer, B., Gemeinhardt, H., Uhl, V., Greulich, K. O. Single Molecule DNA Restriction Analysis. Laser Optics for Young Scientists. 26.-30. Mai 2000, St. Petersburg, Russland
- Schäfer, B., Gemeinhardt, H., Uhl, V., Greulich, K. O. Discrimination of Different Individual DNA Molecules by Single Molecule Restriction. 6th International Workshop on Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences. 27.-29. September 2000, Berlin

8.1.4 Poster

- Schäfer, B., Uhl, V., Greulich, K. O. Investigation of Single DNA Molecules Using a Fluorescence Microscope and Optical Tweezers. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Chemische Physik Symposium Einzelmolekülspektroskopie, CP 11.2. 9.-13. März 1998, Bayreuth
- Schäfer, B., Uhl, V., Gemeinhardt, H., Greulich, K. O. Untersuchung der Elastizität individueller DNS-Moleküle im Fluoreszenzmikroskop. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Chemische Physik, CP 30.5. 22.-26. März 1999, Münster
- Schäfer, B., Uhl, V., Greulich, K. O. Laser Microtechniques to Study the Elasticity of Single DNA Molecules and their Interaction with Enzymes and Minor Groove Binders. Symposium: New Trends in Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules. 14.-16. Juli 1999, Wiesbaden
- Schäfer, B., Gemeinhardt, H., Uhl, V., Greulich, K. O. Discrimination of Different Individual DNA Molecules by Single Molecule Restriction. World Congress on Cellular and Molecular Biology, WA: LH2. 8.-15. Oktober 2000, Jena

8.1.5 Tagungsbeiträge als Koautor

- Uhl, V., Schäfer, B., Pilarczyk, G., Greulich, K. O. Beobachtung der Reaktion individueller Moleküle im Lichtmikroskop. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Symposium Einzelne Atome, Ionen und Moleküle. 9.-13. März 1998, Konstanz
- Uhl, V., Schäfer, B., Pilarczyk, G., Greulich, K. O. Laseranalytik der Reaktion individueller Makromoleküle. Incom, Sondersymposium Laseranalytik und Sensorik. 25. März 1998, Düsseldorf
- Uhl, V., Schäfer, B., Pilarczyk, G., Greulich, K. O. Single Molecule Manipulation and Single Molecule Reactions. Analytica Conference 98. 21.-24. April 1998, München, Vortrag 23 10 95

- Uhl, V., Schäfer, B., Pilarczyk, G., Greulich, K. O. Single Molecule Nucleic Acid Restriction Reactions Observed in the Fluorescence Microscope. Twelfth Symposium of the Protein Society. 17. Juli 1998, Bethesda, MD, USA
- Uhl, V., Schäfer, B., Nasanshargal, B., Pilarczyk, G., Monajembashi, S., Greulich, K. O. Single Molecule Biochemistry in the Light Microscope. Jahrestagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie. 27.-30. September 1998, Jena
- Schäfer, B., Uhl, U., Pilarczyk, G., Greulich, K. O. A Direct View on DNA: Single DNA Molecules in the Light Microscope. Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik. 4-6 Oktober 1998, Jena
- Greulich, K. O., Schäfer, B., Pilarczyk, G., Uhl, V. Die unbegrenzte Vielfalt von DNA Molekülen: Experimenteller Zugang durch Einzelmolekültechniken. Jahrestagung der Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibnitz. 17. November 1998, Jena
- Uhl, V., Nasanshargal, B., Schäfer, B., Gemeinhardt, H., Monajembashi, S., Greulich, K. O. Untersuchung von Einzelmolekülreaktionen im klassischen Lichtmikroskop. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Chemische Physik. 22.-26. März 1999, Münster, Poster CP 22.6
- Uhl, V., Schäfer, B., Nasanshargal, B., Kittler, L., Greulich, K. O. Micromanipulation by Light and Image Processing for the Observation of Single Molecule Reactions. Focus on Microscopy. 11.-15. April 1999, Heidelberg
- Schäfer, B., Kittler, L., Monajembashi, S., Uhl, V., Gemeinhardt, H., Greulich, K. O. Optical Tweezers as Microtool for Analysis of Individual DNA Molecules and their Interaction with the Antibiotic Netropsin and the Antileukaemic SN6113. Laser 99. 14.-18. Juni 1999, München
- Uhl, V., Schäfer, B., Nasanshargal, B., Kittler, L., Greulich, K. O. Single-Molecule Biochemistry in the Light Microscope: Facts and Perspectives. Single Molecule Analysis and Emerging Applications. 19.-20. August 1999, Boston, USA
- Schäfer, B., Hoffmann, A., Rapp, A., Monajembashi, S., Greulich, K. O. Multilaser Microscopy: From Cell Biology via Single Molecules to Cancer Research. 8th International Conference on Laser Applications in Life Science (LALS 2000). 13.-18. August 2000, Waseda University, Tokyo, Japan
- Greulich, K. O., Monajembashi, S., Hoffmann, A., Meyer zu Hörste, G., Nasanshargal, B., Schäfer, B. Laser Microbeam and Optical Tweezers: From the Last Decade to the Future. World Congress on Cellular and Molecular Biology, 8.-15. Oktober 2000, Jena, Vortrag MD: LH1

8.2 Lebenslauf

8.2.1 Persönliche Daten

Name: Bürk Schäfer
Geburtsdatum: 31. Mai 1968
Geburtsort: Frankfurt (Oder)
Eltern: Herbert und Inge Schäfer
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

8.2.2 Ausbildung

1975-1983: Grundschule in Frankfurt (Oder)
1983-1987: Spezialschule mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung in Frankfurt (Oder), Abschluß mit Abitur
1987-1989: Militärdienst
1989-1990: Physikstudium an der Technischen Universität Chemnitz
1990-1995: Physikstudium an der Universität Regensburg
1992-1993: Auslandsaufenthalt, Physikstudium an der Universität Glasgow, GB
1995-1997: Diplomarbeit am Klinikum der Universität Regensburg, Erwerb des Diploms
seit 1997: Promotion am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena bei Prof. Dr. Karl Otto Greulich

8.3 Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Karl Otto Greulich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Materialien, die Gewährung weitreichender Freiheiten zur selbständigen wissenschaftlichen Arbeit, verbunden mit seinem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit, seiner Diskussionsbereitschaft und den vielfältigen Möglichkeiten, die er mir zur Präsentation meiner Arbeit ermöglichte.

Danken möchte ich Herrn Dr. Volker Uhl für seine persönliche Betreuung und Hilfestellung sowie für seine Unterstützung bei immer wieder auftauchenden Fragen und Problemen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Dank gilt Frau Dr. Shamci Monajembashi für ihre Hilfe bei experimentellen und technischen Fragen, vor allem zum Beginn der Arbeit.

Ich danke Frau Helgard Gemeinhardt für ihre Mühe bei der Durchführung der DNA-Präparationen.

Weiterhin danke ich Kent Söe für seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft auf biochemischem Gebiet sowie Anja Hoffmann, Anja Mohrdieck, Batulga Nasanshargal, Heike Dittmar und allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die angenehme und interessante Arbeitsatmosphäre.

Danken möchte ich Susann, für so Vieles.

8.4 Erklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) beworben und weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des o.g. akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.

Jena, den 7. Februar 2001