
**Dynamische AFM – Kraftspektroskopie
an Desoxyribonukleinsäure im
frequenz-modulierten Modus mit
konstanter Anregung**

Dissertation

zur Erlangung des Titels
Doktor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von:

Dipl. Phys. Sebastian Horstmeier,
geboren in Bünde

FAKULTÄT FÜR PHYSIK
UNIVERSITÄT BIELEFELD

Oktober 2013

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte von Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben habe,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Vermittlungstätigkeiten oder für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Zustandekommen oder dem Inhalt der Dissertation stehen,
- ich die Dissertation oder wesentliche Teile davon nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich weder die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Diese Arbeit ist gedruckt auf alterungsbeständigem Papier gemäß DIN - ISO 9706.

Bielefeld, 10. Oktober 2013

Unterschrift

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Peter Reimann

„Es ist nicht genug, zu wissen, man muss es auch anwenden; es ist nicht genug, zu wollen, man muss es auch tun.“

Johann Wolfgang von Goethe (aus: Wilhelm Meisters Wanderjahre)

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von
Herrn **Prof. Dr. Dario Anselmetti**
in der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften
der Fakultät für Physik
der Universität Bielefeld

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
2. Theoretische Grundlagen	10
2.1. Das Rasterkraftmikroskop	10
2.1.1. Aufbau und Funktion	10
2.1.2. Die Betriebsmodi	14
2.1.3. Der Q-Faktor	18
2.1.4. Q-Control	21
2.1.5. Bestimmung der Federkonstanten mittels thermischen Rauschens	22
2.1.6. Einzelmolekül-Kraftspektroskopie	25
2.2. Polymermodelle	27
2.2.1. Die Gauß-Kette	28
2.2.2. Die Freigelenkige Kette	29
2.2.3. Die wurmartige Kette	29
2.3. Desoxyribonukleinsäure	30
2.3.1. Aufbau und Konformation	30
2.3.2. Lambda-DNA	34
2.3.3. Kraftinduzierte Phasenübergänge eines B-DNA-Moleküls	35
2.4. Theoretische Berechnung der Resonanzfrequenz- änderung im FM-AFM Modus	43
2.5. Berechnung der Kräfte aus den Resonanzfrequenzänderungen	47
2.6. Berechnung der Energiedissipation	50
3. Material und Methoden	54
3.1. Das Multimode 8 AFM	54
3.2. Das QFM-Modul	57
3.3. Präparation	59
3.3.1. Der DNA-Digest	59
3.3.2. Substrate	60

3.3.3. Messpuffer	60
3.3.4. Präparation der DNA	60
3.4. Cantilever	62
3.4.1. Reinigung der Cantilever	63
3.5. Durchführung der Messungen	63
3.6. Datenauswertung	66
3.7. Datenglättung	67
4. Messergebnisse	70
4.1. Wechselwirkung AFM-Spitze-Oberfläche	70
4.2. Dynamische DNA Kraftspektroskopie-Experimente	79
5. Diskussion der Ergebnisse	94
6. Zusammenfassung und Ausblick	97
Anhang	100
A. Literatur	101
B. Abbildungsverzeichnis	113
C. Danksagung	117

1. Einleitung

„*Der Bauplan des Lebens*“ ist eine häufig benutzte metaphorische Beschreibung, wenn die Rede von Desoxyribonukleinsäure-Molekülen (kurz: DNA) ist. Dieser Ausdruck kommt nicht von ungefähr, denn jegliches, bis dato bekannte, irdische Leben basiert in seiner stark diversifizierten Form auf einem einzigen Mechanismus, in dem DNA die Hauptrolle spielt.

Die Informationen über ein Lebewesen, vom simplen Archaeobakterium bis hin zum Menschen, sind in diesen langkettigen, doppelsträngigen Polynukleotiden gespeichert. In eukaryotischen Zellen ist die DNA hauptsächlich im Zellkern, ein kleiner Teil in den Mitochondrien, lokalisiert. Von der Körpergröße über die Haar- und Augenfarbe bis hin zur genetischen Disposition von bestimmten Krankheiten sind alle Merkmale eines Lebewesens in diesem Molekül als bestimmte Abfolge von vier organischen Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) codiert.

Das Rätsel um die Struktur von DNA-Molekülen wurde im Jahre 1953 von den beiden Molekularbiologen Francis H. C. Crick und James D. Watson im Jahre 1953 gelöst. In dem von ihnen publizierten Nature-Artikel veröffentlichten sie als erste die Doppelhelix-Struktur der DNA. Für diese und die darauf folgenden Arbeiten erhielten die beiden zusammen mit Maurice H. F. Wilkins im Jahre 1962 den Nobelpreis für Medizin.

Das menschliche Genom besteht aus etwa 3 Milliarden Basenpaaren. Dies entspricht ca. 23000 unterschiedlichen Genen. Aneinander gereiht wäre die gesamte DNA eines Menschen ca. 1,8 Meter lang. Damit trotz dieser Länge die DNA in einem nur wenige Mikrometer großen Zellkern Platz findet, muss die DNA komprimiert und gefaltet werden. Dies geschieht im Zellkern mit Hilfe von Chromatinproteinen, von denen die Histone die prominentesten Vertreter sind. Dabei handelt es sich um „Faltungshelfer“, um die sich DNA-Doppelstränge aufwinden. Wird DNA im Rahmen der Genexpression abgelesen, muss die DNA wieder entwunden werden. Dementsprechend wird DNA im Zellkern ständig gebogen, gedehnt und gedreht. Daher sind, für ein gründliches Verständnis dieser biologischen Prozesse, die mechanischen Charakteristika von DNA-Molekülen von größtem Interesse. Ein weiterer, aktueller Forschungsschwerpunkt ist die DNA-Sequenzierung. Das Auslesen der Erbinformationen und deren Interpretation stellen einen Ansatzpunkt im Kampf ge-

gen und dem tiefer gehenden Verständnis von genetisch bedingten Krankheiten, wie z. B. einigen Krebsformen, dar. Auch in diesem Kontext ist ein detailliertes Verständnis der DNA-Eigenschaften von großer Bedeutung.

Erste erfolgreiche Kraftspektroskopie-Experimente an einzelnen DNA-Molekülen wurden von Smith et al. 1992 durchgeführt. Mit Hilfe einer magnetischen Pinzette konnte eine externe Kraft an die DNA angelegt und somit mechanoelastische Eigenschaften bei der Dehnung beobachtet werden. In den darauffolgenden Jahren wurden eine Vielzahl von Kraftspektroskopieexperimenten an DNA durchgeführt. Dafür wurden ebenfalls andere Technologien, wie z. B. AFM-Kraftspektroskopie oder Optische Pinzetten benutzt.

Im Laufe der vergangen zwei Jahrzehnte wurden, aufbauend auf diesen Experimenten, eine Vielzahl von Modellen entwickelt, die versuchen, das Antwortverhalten von DNA auf extern angelegte Kräfte zu erklären. Bislang konnte jedoch kein Modell sämtliche, bei der Dehnung von DNA auftretenden Aspekte in ausreichender Weise erklären.

In dieser Arbeit sollen, nach der erfolgreichen Implementierung des neuen Messmodus, der auf Arbeiten von Ebeling et al. zurückgeht, in einen vorhandenen Messaufbau, mit Hilfe einer besonderen Form der AFM-Kraftspektroskopie weitere Informationen über den Prozess der DNA-Dehnung gesammelt werden. Diese sollen dazu beitragen, zusätzliche Informationen zu sammeln, um so ein klareres Bild der mechanoelastischen Eigenschaften zu erlangen bzw. schon existierende Modelle der DNA-Dehnung zu überprüfen.

Dazu wird ein Rasterkraftmikroskop in einem selbstangeregten, dynamischen Modus mit konstanter Anregung betrieben und auf diese Weise Kraftspektroskopie-Experimente an λ -DNA Fragmenten durchgeführt. Der spezielle Messmodus bietet die Möglichkeit, neben der konservativen Kraft parallel die Energiedissipation pro Cantileverschwingungszyklus zu messen. Aus diesem zusätzlichen Datenkanal sollen weitere Informationen über nicht-konservative Effekte, wie z. B. Strukturänderungen während der Krafteinwirkung, gewonnen werden.

Diese Arbeit ist in vier Kapitel eingeteilt. Nach der Einleitung folgt der theoretische Hintergrund der Arbeit. In dem Kapitel wird nach den Grundlagen über die Rasterkraftmikroskopie und Eigenschaften der DNA der mathematische Formalismus zur Auswertung der Experimente dargestellt. Im Kapitel „Material und Methoden“ wird der verwendete Messaufbau und das verwendete Material sowie die angewendeten Prozeduren zur Präparation und Durchführung der Messungen vorgestellt. Im darauf folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen vorgestellt und diskutiert. Im abschließenden Kapitel wird die Arbeit zusammengefasst und ein Ausblick auf mögliche, zukünftige Arbeiten gegeben.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Das Rasterkraftmikroskop

Das Rasterkraftmikroskop (*engl.* Atomic Force Microscope, AFM) wurde im Jahre 1986 vom deutschen Physiker Gerd Binnig, dem schweizer Physiker Christoph Gerber und dem US-amerikanischen Ingenieur Calvin Quate erfunden [BQG86]. Als Grundlage dieser Entwicklung diente das Rastertunnelmikroskop (*engl.* Scanning Tunneling Microscope, STM), das zuvor von G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber und E. Weibel 1982 am IBM Zürich Research Laboratory in Rüschlikon, Schweiz entwickelt wurde [Bin+82] und die exponentielle Abhängigkeit eines Tunnelstroms zwischen einer Messsonde und der zu untersuchenden Oberfläche ausnutzt.

2.1.1. Aufbau und Funktion

Beim AFM handelt es sich um ein Rastersondenmikroskop, das für die Analyse von Oberflächentopographien entwickelt wurde. Anders als beim zuvor entwickelten Rastertunnelmikroskop muss die Oberfläche dabei nicht elektrisch leitend sein.

Als Sonde dient bei dieser Technologie eine sehr feine Spitze, die an einem Ende eines Federbalkens (*engl.* Cantilever) angebracht ist. Diese Spitze, die meist eine Pyramidenform mit einer Höhe im Bereich 10-20 Mikrometer besitzt, hat an ihrem spitzen Ende einen Krümmungsradius von typischerweise 5-20 Nanometern. Der Federbalken ist ca. 100-300 Mikrometer lang, 20-80 Mikrometer breit und 1-10 Mikrometer dick. Der Cantilever mit Spitze wird als Einheit durch bestimmte Ätztechniken aus einem Substratmaterial, hauptsächlich Silizium oder Siliziumnitrid, hergestellt. Am anderen Ende des Federbalkens befindet sich der Substratchip. Dieser größere Chip ermöglicht dabei eine bessere Handhabung als der winzige Cantilever alleine und dient außerdem der Befestigung des Cantilevers in dem Cantileverhalter [BM07; Haf07].

Das Funktionsprinzip eines AFM hat viele Analogien zu dem eines Profilometers. Die Spitze wird in die unmittelbare Nähe der Oberfläche gebracht. Die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe wird dann Punkt für Punkt von der Spitze erfasst, indem diese entlang

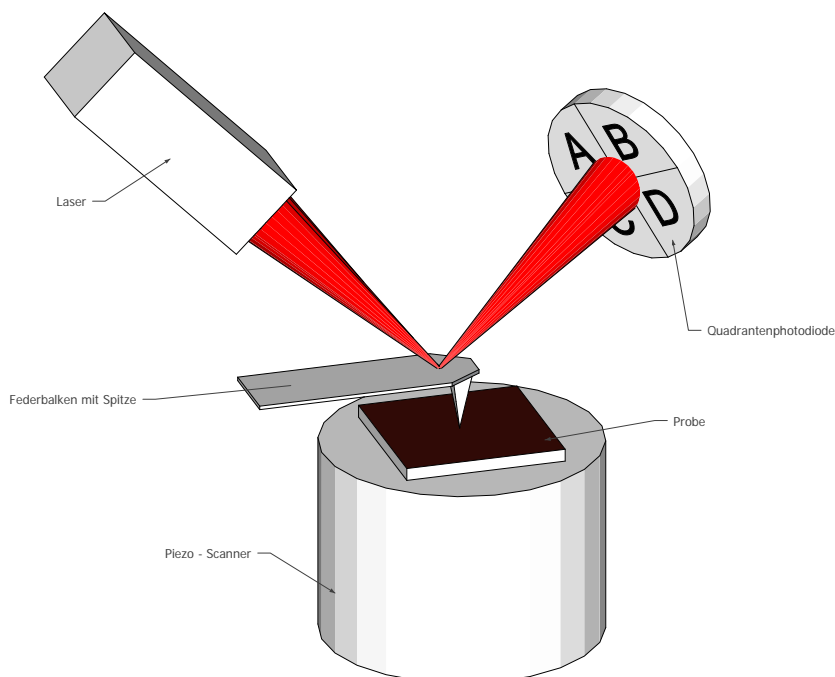


Abbildung 2.1. – Schema der Funktionsweise eines AFM. Die Probe liegt auf dem Piezo-Scanner auf, die Auslenkung des Federbalkens wird mit dem Lichtzeigerprinzip detektiert. Quelle: [Adr13], bearbeitet

der Oberfläche rastert. Die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe kann durch ein sogenanntes Lennard-Jones-Potential beschrieben werden. Das Lennard-Jones-Potential hat im einfachsten Fall die Form

$$V_{LJ}(r) = \varepsilon \cdot \left\{ \left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - 2 \cdot \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right\}. \quad (2.1)$$

Es setzt sich zum einen zusammen aus einem Term, der die attraktiven van-der-Waals-Kräfte, die durch Wechselwirkungen zwischen induzierten Dipolen entstehen [Isr11], beschreibt und reziprok proportional zur sechsten Potenz des Abstands zweier Körper ist und zum anderen aus einem Term, der die repulsiven, auf der Pauli-Abstoßung beruhende Kräfte beschreibt. Die Pauli-Abstoßung ist bedingt durch die aus der Quantenmechanik bekannte Pauli-Regel, nach der keine zwei oder mehr Elektronen den gleichen Satz Quantenzahlen besitzen dürfen. Daher stoßen sich die Atom- bzw. Molekülorbitale zweier Atome bzw. Moleküle ab [Isr11]. Dieser Term wird als reziprok proportional zur zwölften Potenz des Abstands angenommen [Isr11; Gie+07].

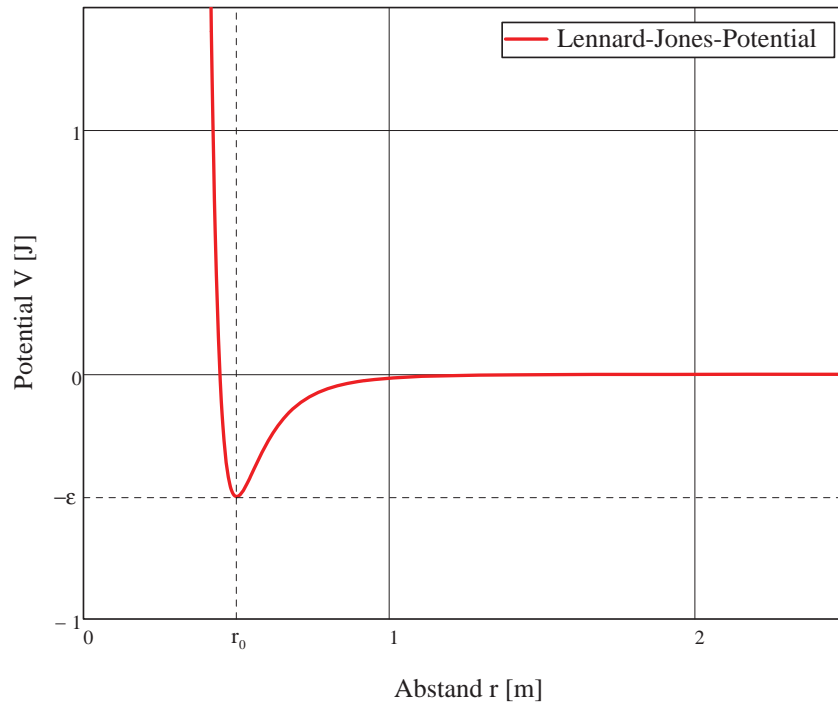


Abbildung 2.2. – Form des Lennard-Jones-Potentials, Parameter: $\varepsilon = 0,5\text{J}$, $r_0 = 0,5\text{m}$

In Abbildung (2.2) ist ein Lennard-Jones-Potential mit beliebig gewählten Parametern dargestellt. Für sehr kleine Abstände überwiegen die Abstoßungskräfte, für große Abstände die Anziehungskräfte, die im unendlichen verschwinden. Bei dem Gleichgewichtsabstand r_0 besitzt das Potential ein Minimum mit dem Betrag ε . Abstoßungs- und Anziehungskräfte heben sich hier auf, die Nettokräfte sind null.

Die punktweise Detektion der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe wird realisiert, indem die Probe unter der ruhenden Spitze bewegt wird. Diese Rasterbewegung wird durch einen Scanner ermöglicht, dessen zentrale Bauteile piezoelektrische Keramikelemente sind. Die Funktion dieser Elemente basiert auf dem inversen piezoelektrischen Effekt¹. Wird an einem Piezokristall eine elektrische Spannung angelegt, so verformt sich der Kristall proportional zu der elektrischen Spannung. Ein AFM-Scanner ermöglicht eine Bewegung in allen drei Raumrichtungen (benannt mit x - , y - und z -Richtung, wobei die z -Richtung die Koordinate senkrecht zur Oberfläche ist) [BM07].

¹Der direkte Piezoeffekt beschreibt die Entstehung einer elektrischen Spannung an einem Piezokristall aufgrund einer elastischen Verformung des Kristalls. Die Verformung sorgt für eine Verschiebung von Ladungsschwerpunkten in der Kristallstruktur und somit für eine elektrische Spannung.

Die Wahl des Signals, aus welchem die Topographie der Oberfläche rekonstruiert wird, ist abhängig vom Messmodus (siehe Kapitel 2.1.2). Beim ursprünglichem Modus, dem sogenannten Contact-Mode, wird die Spitze in direkten Kontakt mit der Probe gebracht. Dabei wird der Federbalken ausgelenkt. Diese Auslenkung Δz ist in erster Näherung gemäß dem Hookeschem Gesetz

$$F = -k \cdot \Delta z \quad (2.2)$$

proportional zu der Wechselwirkungskraft F zwischen Probe und Spitze. Der Proportionalitätsfaktor k ist dabei die Federkonstante des Federbalkens. Sie hängt von Material und Geometrie des Federbalkens ab. Sie nimmt üblicherweise Werte von 0,001 bis $200 \frac{N}{m}$ an. Die Wahl der Cantilever-Härte wird durch die Art der Anwendung sowie die Beschaffenheit der Probe bestimmt.

Die Detektion der Auslenkung des Federbalkens kann auf verschiedene Arten passieren. Beim weltweit ersten, von Binnig et al. gebauten AFM wurde die Messung der Auslenkung des Federbalkens mit Hilfe eines Rastertunnelmikroskops realisiert [BQG86]. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Verwendung von Piezokristallen, die, aufgebracht auf dem Federbalken, eine elektrische Spannung erzeugen. Eine dritte Methode stellt die kapazitive Messmethode dar. Hierbei dient der Federbalken als eine Elektrode eines Kondensators. Die Auslenkung des Federbalkens entspricht der Änderung des Plattenabstandes des Kondensators, die wiederum mit der Änderung der Kapazität einhergeht [BM07].

Die geläufigste Methode zur Messung der Auslenkung ist das sog. Lichtzeigerprinzip [MA90]. Auf das freie Ende des Federbalkens wird ein Laserstrahl fokussiert und das reflektierte Licht von einer Quadrantenphotodiode detektiert (siehe Abbildung 2.1). Durch Auslenkung des Federbalkens wandert der Lichtkegel auf der Photodiode, was sich in der Änderung der Differenzsignale der Quadranten bemerkbar macht [BM07].

Die laterale Auflösung, also die kleinstmöglichen detektierbaren Strukturmerkmale, sind abhängig von der Schärfe, sprich dem Krümmungsradius, der Spitze. Je feiner die Spitze, desto feiner die abbildbaren Details [Haf07].

Bei der AFM-Aufnahme ist zu beachten, dass das erstellte Bild eine Faltung der Oberflächentopographie mit der Spitzenstruktur ist. Somit müsste, um ein wirklichkeitsgetreues Bild der Oberfläche zu erhalten, die Spitzengeometrie durch eine Entfaltungsoperation aus dem Bild herausgerechnet werden. Dazu müsste jedoch die Spitzengeometrie bekannt sein, was in den seltensten Fällen der Fall ist. Dieser Umstand führt bei manchen Messungen zu immer wieder auftretenden Strukturmerkmalen, die Aufgrund spezieller Spitzengeometrien (z.B. Doppelspitzen) entstehen. Diese werden „Spitzenartefakte“ genannt und können

Messergebnisse unbrauchbar machen.

Die Regelung der Scanbewegung durch einen PID-Regler ist ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der Erstellung einer AFM-Aufnahme. Allgemein gesprochen ist es die Aufgabe des AFM-Bedieners, situationspezifisch eine gute Kombination aus den Regelparametern des PID-Reglers (Integral- und Proportional-Gain), der Scangeschwindigkeit sowie dem Setpoint-Signal zu finden, um akzeptable Aufnahmen zu erstellen [BM07].

2.1.2. Die Betriebsmodi

Wie im vorherigen Kapitel bereits angedeutet, existieren verschiedene Methoden, mit einem AFM Aufnahmen einer Oberflächentopographie zu erstellen. Diese sollen im Folgenden beschrieben werden.

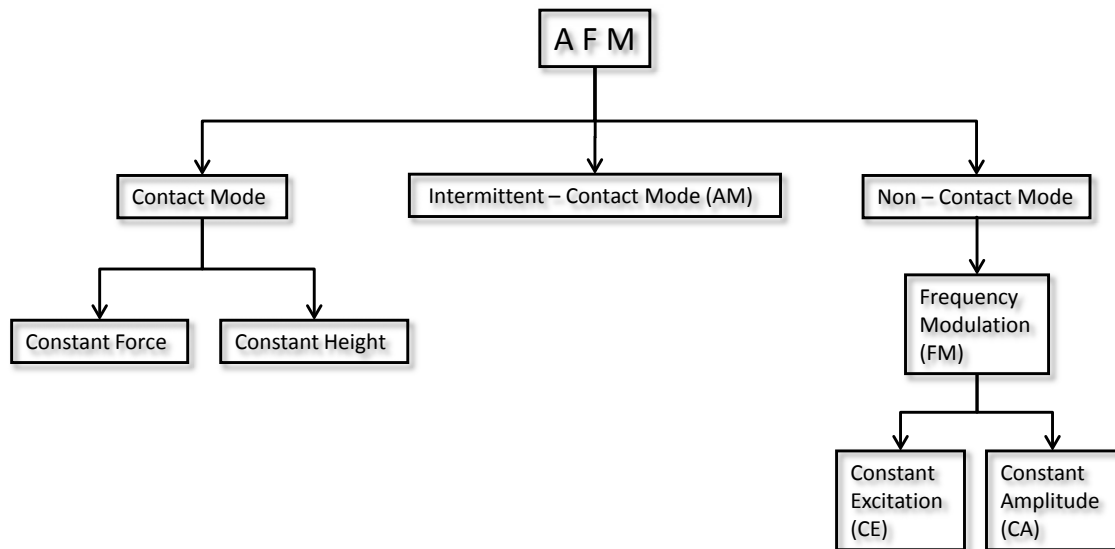


Abbildung 2.3. – Darstellung der Zusammenhänge der im folgenden Text beschriebenen Betriebsmodi eines AFM. Zusätzlich zu den hier aufgeführten Modi existieren zahlreiche weitere, die z.T. auch andere Wechselwirkungen als Grundlage haben, wie z.B. die magnetische Wechselwirkung beim MFM (Magnetic Force Microscope)

Der Contact-Mode

Der einfachste Modus eines AFM ist der sogenannte Contact-Mode, bei dem die Spitze in direkten Kontakt mit der Oberfläche gebracht wird. Dabei wirken zwischen der Oberfläche und der Spitze Kräfte, die durch das Lennard-Jones-Potential zusammengefasst, beschrieben werden können.

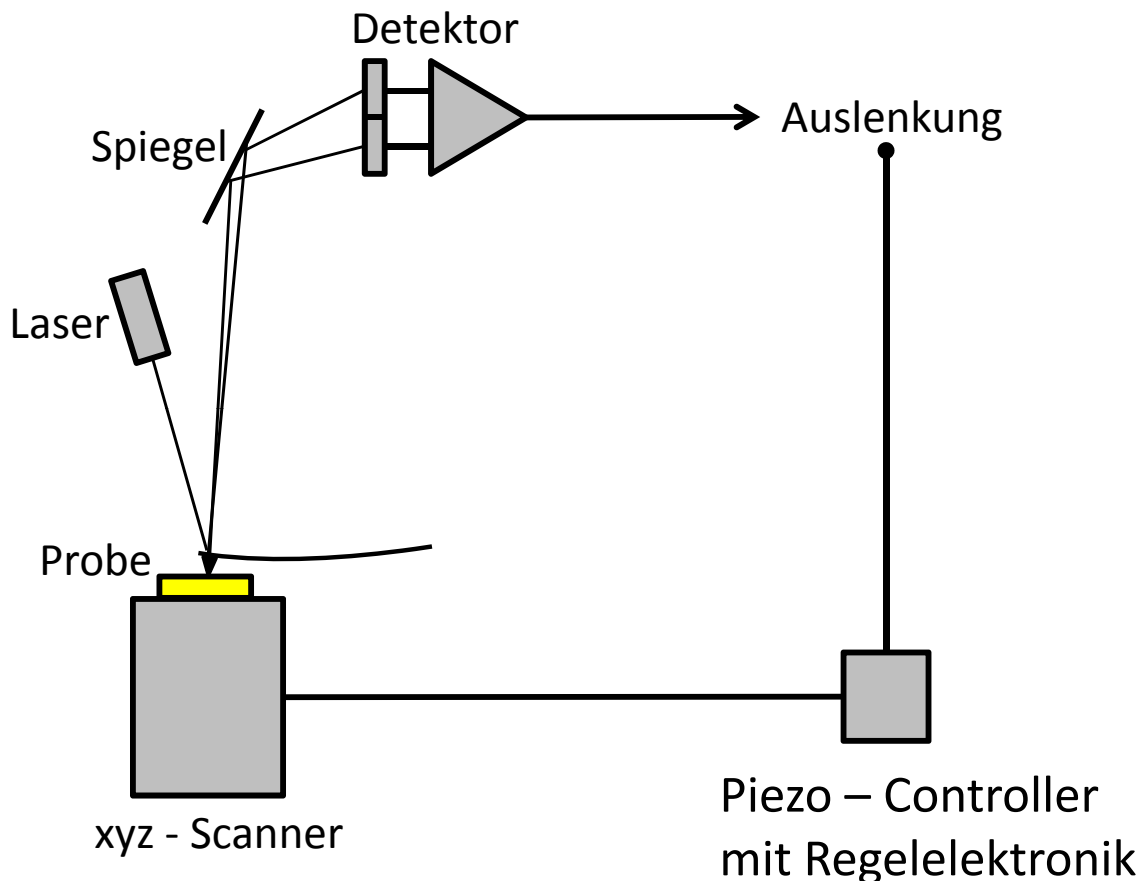


Abbildung 2.4. – Schema einer Contact-Mode-Elektronik. Die Auslenkung des Cantilevers dient entweder direkt als Topographiesignal (Constant-Height-Modus) oder aber als Feedback-Signal im Constant-Force-Modus, Quelle: erstellt in Analogie zu Abbildung 1 aus [Sch+07].

Durch den Kontakt der Spitze mit der Oberfläche wird der Federbalken ausgelenkt. Diese Auslenkung wird detektiert und entweder direkt als Topographiesignal verarbeitet oder als Regelparameter für eine Rückkopplungsschleife verwendet.

Im **Constant-Height-Modus** wird die Spitze mit dem Scanner an die Oberfläche ange nähert, bis eine bestimmte Auslenkung (der sog. Setpoint) detektiert wird. Der Scanner verbleibt während der Messung in dieser Position. Während des Rasterns der Oberfläche

wird der Federbalken der Topographie entsprechend ausgelenkt. Auf diese Weise wird für jeden Punkt die Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze detektiert, woraus schließlich das Topographie-Bild erstellt wird.

Im **Constant-Force-Modus** wird, im Gegensatz zum Constant-Height-Modus, die Auslenkung des Federbalkens und somit die wirkende Kraft zwischen Spitze und Probe konstant gehalten. Ein PID-Regelkreis passt während der Messung ständig die z -Position der Spitze in der Form an, dass die Kraft konstant bleibt. Die z -Position wird für jeden Punkt aufgenommen, woraus im Anschluss die Topographie-Aufnahme erstellt wird. Dieses Prinzip ist im Vergleich zum Constant-Height-Modus schonender für Probe und Spitze, da stets die gleiche Kraft zwischen Probe und Spitze wirkt. Diese Kraft kann durch Wahl des Setpoints dem zu vermessenden System angepasst werden. [BM07]

Der Intermittent-Contact-Mode

Der Intermittent-Contact-Mode (auch Amplitude Modulation-Mode, kurz AM-Mode, oder Tapping-Mode[®] genannt), ist ein dynamischer Modus. Der Cantilever wird während der Messung durch einen weiteren Piezokristall zum Schwingen angeregt. Der Anregungspiezokristall sitzt dabei meist direkt unter dem Substratchip, an dem der Cantilever hängt [GP02; SAF07; BM07].

Die Oszillation, die im Folgenden als eine erzwungene, harmonische und gedämpfte Schwingung angesehen wird, ist charakterisiert durch die Frequenz und die Amplitude. Bei hinreichend kleinen Amplituden, wie sie beim Intermittent-Contact-Modus auftreten, kann die Cantileveroszillation in guter Näherung als harmonisch angesehen werden [Tam+01; HES06; HS06; SAF07]. Die Grundmode eines schwingenden Cantilevers besitzt eine Resonanzfrequenz abhängig von Material, Geometrie und umgebenen Medium. Diese liegt bei üblichen Cantilevern, die in diesem Modus benutzt werden (z.B. dem TAP 300 von Budget Sensors, gemäß Herstellerangaben $k=40\frac{N}{m}$), in Luft bei ca. 300 Kilohertz.

Der Cantilever wird nahe seiner Resonanzfrequenz zum oszillieren angeregt. In diesem schwingenden Zustand wird der Cantilever an die Oberfläche angenähert. Gelangt die Spitze in den Bereich der Wechselwirkung mit der Oberfläche, so ändern sich die Resonanzbedingungen der Cantileveroszillation. Es tritt eine Phasenverschiebung zwischen Anregung und der Cantileverschwingung auf. Zudem nimmt die Amplitude der Cantileveroszillation ab. Diese Amplitudenänderung wird in diesem Modus als Regelparameter verwendet. Die Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze wird durch eine Regelung während des Scans konstant gehalten, indem die z -Position dauernd angepasst wird. Diese z -Positionen werden für die Punkte der Oberfläche aufgenommen und anschließend als Re-

konstruktionsgrundlage der Topographie benutzt [GP02; SAF07].

Im Vergleich zum Contact-Mode ist dieser Messmodus schonender zu Spitze und Probe, da sowohl keine lateralen Kräfte auftreten als auch die Kontaktzeit zwischen Probe und Spitze kleiner ist. Im Vergleich zum Contact-Mode können auch weichere Proben vermessen werden [SAF07].

Non-Contact-Mode

Im Non-Contact-Mode (auch Frequency-Modulation-Mode, kurz FM-Mode) berührt die Spitze die Oberfläche nicht. Sie überstreicht nur den attraktiven Teil des Wechselwirkungspotentials zwischen Spitze und Probe [Alb+91; AKF96; Anc+98; GP02; SAF07].

Im Unterschied zum Intermittent-Contact-Mode wird beim Non-Contact-Mode der Cantilever durch Selbstanregung zum Schwingen gebracht. Das Oszillationssignal des Cantilevers, der anfangs bei seiner Resonanzfrequenz schwingt, wird gemessen.

Ein Phasenschieber verschiebt das Signal um 90° , welches anschließend verstärkt wird und als Anregungssignal für den Anregungspiezokristall benutzt wird.

Auf diese Weise schwingt der Cantilever stets bei seiner aktuellen Resonanzfrequenz. Ändern sich die Resonanzbedingungen, so ändern sich auch die Resonanzfrequenz und Amplitude. Die Änderung der Resonanzfrequenz geschieht dabei unmittelbar. Daher ist dieser Messmodus besonders geeignet für Messungen im Ultrahochvakuum, wo Cantilever wegen fehlender externer Dämpfung einen sehr großen Q-Faktor (siehe Kapitel 2.1.3) haben, was zu Problemen bzgl. der Messzeit bei Messungen im Intermittent-Contact-Mode führt.

Dabei besteht die Möglichkeit, die Schwingungsamplitude des Cantilevers zusätzlich mit einer weiteren Feedbackschleife konstant zu halten, in dem die Amplitude des Anregungspiezokristalls angepasst wird. Dieser Modus heißt **Constant-Amplitude Mode (CA-Mode)** [HGS03; AKF96; Anc+98; SAF07].

Eine zweite Möglichkeit ist eine konstante Anregungsamplitude des Anregungspiezokristalls. In diesem Falle ändert sich zusätzlich zur Resonanzfrequenz auch die Amplitude. Der Modus heißt **Constant-Excitation Mode (CE-Mode)** [HGS03; SAF07].

Die Resonanzfrequenzänderung ist abhängig vom Kraftgradienten zwischen Spitze und Probe, also den konservativen Kräften, wohingegen die Amplitudenänderung nur von der Energiedissipation, den nicht-konservativen Effekten, abhängt. Durch den Modus der konstanten Anregung ist es somit möglich, konservative und nicht-konservative Effekte voneinander entkoppelt zu vermessen. Dieser Modus liegt dieser Arbeit zugrunde.

Mit ihm werden die kraftspektroskopischen Messungen an den DNA-Molekülen durchgeführt [HGS03; Sch+05].

Auch bildgebend kann dieser Modus eingesetzt werden. Durch die sich ändernde Amplitude ist dieser Modus besonders schonend zu der Probe. Speziell weiche Proben können so effektiver vermessen werden [Anc+98; HGS03; HA05; SAF07].

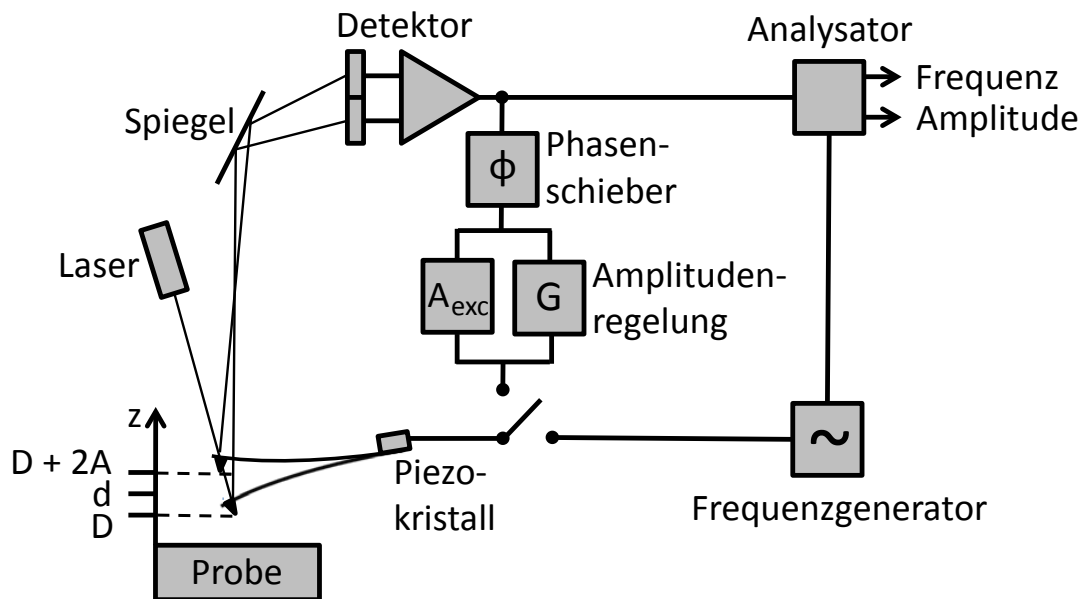


Abbildung 2.5. – Schematischer Aufbau einer Non-Contact-Elektronik. Befindet sich der Schalter in der Zeichnung in der oberen Position, so arbeitet das AFM im selbstangeregten Modus (FM-Mode), der Analysator misst Amplitude und Resonanzfrequenz. In der unteren Stellung arbeitet das AFM im fremdangeregten Modus (AM-Mode), ein Frequenzgenerator treibt den Anregungspiezokristall an. Der Analysator misst Amplitude und Phasenverschiebung, Quelle: erstellt in Analogie zu Abbildung 1 aus [Sch+07].

2.1.3. Der Q-Faktor

Die dynamischen Modi stellen andere Ansprüche an einen Cantilever als der Contact-Mode. Ist für den Contact-Mode ein weicher Cantilever von Vorteil, so ist in einem dynamischen Modus das Schwingungsverhalten von großer Bedeutung. Cantilever mit großer Resonanzfrequenz und hohem Gütefaktor, auch Qualitätsfaktor oder kurz Q-Faktor genannt, sind hier besser geeignet. Dieser Q-Faktor ist eine Eigenschaft eines gedämpften Oszillators und beschreibt seine Fähigkeit, eine äußere Schwingungserregung in eine Oszillation umzuwandeln. Diese Fähigkeit ist abhängig von der Dämpfung des Oszillators [Tam+01; GP02; RG03; HES06; HS06].

Dämpfungsmechanismen sind zum einen die intrinsische Dämpfung, erzeugt durch Dissipationen im Oszillatormaterial selbst, und zum anderen die äußere Dämpfung durch Reibung des Oszillators mit dem umgebenen Medium. Somit ist der Q-Faktor gleichzeitig ein Maß für die Dämpfung. Ein ungedämpfter Oszillator hätte einen unendlich großen Q-Faktor. Je kleiner der Q-Faktor, desto größer die Dämpfung des Oszillators [Tam+01; GP02; RG03; HES06; HS06].

Die Bewegungsgleichung eines harmonischen, gedämpften und angeregten Oszillator ergibt sich zu

$$m_{\text{eff}} \cdot \ddot{z}(t) + \alpha \cdot \dot{z}(t) + k \cdot z(t) = F_d \cdot \cos(\omega t) \quad (2.3)$$

mit der effektiven Masse des Cantilever/Spitze Systems m_{eff} , dem Dämpfungskoeffizienten α , der Federkonstante k , der Amplitude F_d und der Kreisfrequenz ω . Aus ihr lässt sich der Ausdruck für die Amplitude A des Oszillators in Abhängigkeit der Frequenz der äußeren Anregung ω herleiten zu

$$A(\omega) = \frac{A_d \cdot Q \cdot \omega_0^2}{\sqrt{\omega^2 \omega_0^2 + Q^2 (\omega_0^2 - \omega^2)}} \quad (2.4)$$

mit der Amplitude A_d der externen Anregung.

Die Phasenverschiebung zwischen äußerer Anregung und Oszillatorschwingung berechnet sich nach

$$\varphi(\omega) = \arctan \left(\frac{\omega \omega_0}{Q (\omega_0^2 - \omega^2)} \right). \quad (2.5)$$

Beide Abhängigkeiten sind in Abbildung (2.6) graphisch dargestellt. Der Q-Faktor errechnet sich aus dem Resonanzpeak des Frequenzspektrums des Oszillators gemäß folgender Formel

$$Q = \frac{\omega_0}{\omega_2 \left(\frac{A_0}{\sqrt{2}} \right) - \omega_1 \left(\frac{A_0}{\sqrt{2}} \right)} \quad (2.6)$$

mit der Resonanzfrequenz ω_0 und den beiden Frequenzen $\omega_{1,2}$, bei denen die Amplitude auf den $\sqrt{2}$ ten Teil abgefallen ist, ω_2 rechts vom Peak, ω_1 links vom Peak. In Abbildung (2.6a) ist zu erkennen, dass mit abnehmendem Q-Faktor die Breite des Resonanzpeaks zunimmt.

Je breiter der Resonanzpeak ist, desto schwächer reagiert die Amplitude auf Änderungen der Resonanzbedingungen. Dies ist der Grund, warum große Q-Faktoren bei Messungen im

Intermittent-Contact-Mode wünschenswert sind [Tam+01; GP02; RG03; HES06; HS06]. Eine weitere Größe, die durch den Betrag des Q-Faktors beeinflusst wird, ist die Zeit, die die Amplitude eines von außen angeregten, harmonischen Oszillators benötigt, um in einen neuen Gleichgewichtszustand zu gelangen, der durch neue Resonanzbedingungen definiert wird.

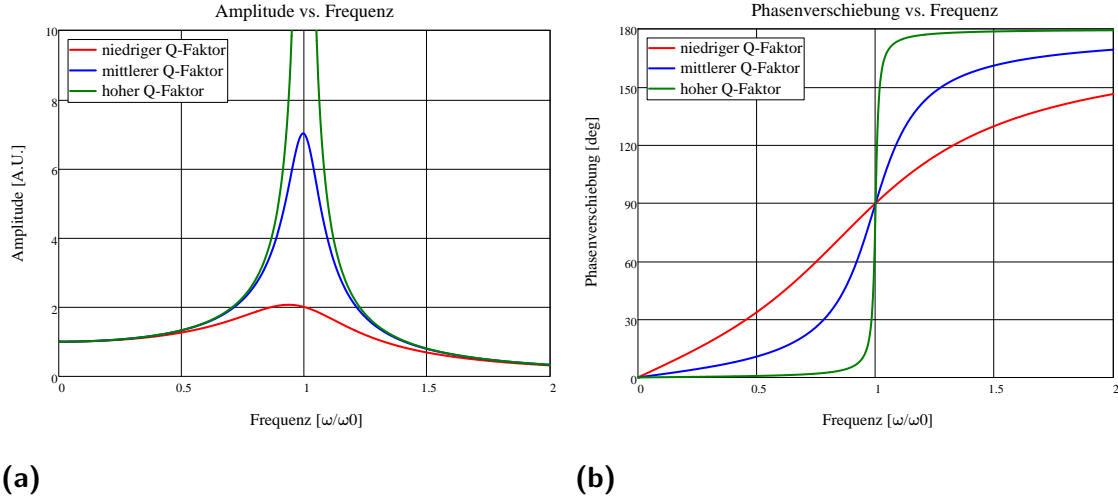


Abbildung 2.6. – Amplituden und Phasenverschiebungen in Abhängigkeit der auf die Resonanzfrequenz normierten Anregungsfrequenz für drei verschiedene Oszillatoren mit verschiedenen Q-Faktoren.

Das Erreichen einer neuen Gleichgewichtsamplitude ist proportional zum Exponentialfaktor

$$A_{\text{neu}} = A_{\text{alt}} \cdot e^{-\frac{\omega_0 t}{2Q}}. \quad (2.7)$$

Dadurch wird eine Zeitkonstante

$$\tau = \frac{2Q}{\omega_0} \quad (2.8)$$

definiert, nach der die Amplitude auf den $\frac{1}{e}$ -ten Teil der alten Amplitude abgefallen ist. An ihr ist ersichtlich, dass mit großem Q-Faktor die benötigte Zeit zum Erreichen des neuen Gleichgewichtszustands groß ist. Bei Messungen im Ultrahochvakuum, wo Q-Faktoren Werte von mehreren 10000 annehmen können, liegen die Zeitkonstanten im Bereich von einigen Millisekunden. Bei großen Q-Faktoren muss dementsprechend die Scangeschwindigkeit angepasst werden, was mitunter zu langen Bildaufnahmezeiten führen kann. Ein weiterer Nachteil in dem Zusammenhang ist das Driften der Probe und der Apparatur,

bedingt durch thermische Fluktuationen, die bei langen Aufnahmezeiten die Auswertung der Aufnahmen beträchtlich erschweren bzw. unmöglich machen [SAF07; GP02; HES06; HS06; RG03].

2.1.4. Q-Control

Q-Control bezeichnet eine Technologie, die es ermöglicht, den effektiven Q-Faktor eines Cantilevers in einem der dynamischen Modi zu kontrollieren und zu verändern. Somit kann zum Beispiel bei Messungen in Flüssigkeiten, bei denen der Q-Faktor durch die große viskose Dämpfung des Mediums sehr klein ist, der Q-Faktor erhöht werden, was zu sensitiveren Messungen führt.

Um die Q-Control-Technologie anwenden zu können, ist eine zusätzliche Elektronik vonnöten. Dabei wird die Elektronik des AFM im AM-Modus (Abbildung 2.5) so verändert, dass sie dem Schema in Abbildung (2.7) entspricht [HTM00; RG03; HES06; HS06].

Ähnlich wie bei der Elektronik für den Non-Contact-Mode, wird hier das Oszillationssignal des Cantilevers von der Quadrantenphotodiode um ebenfalls 90° phasenverschoben, von einem variablen Verstärker verarbeitet und dann dem Anregungssignal des externen Funktionsgenerators mithilfe eines elektronischen Addierers überlagert.

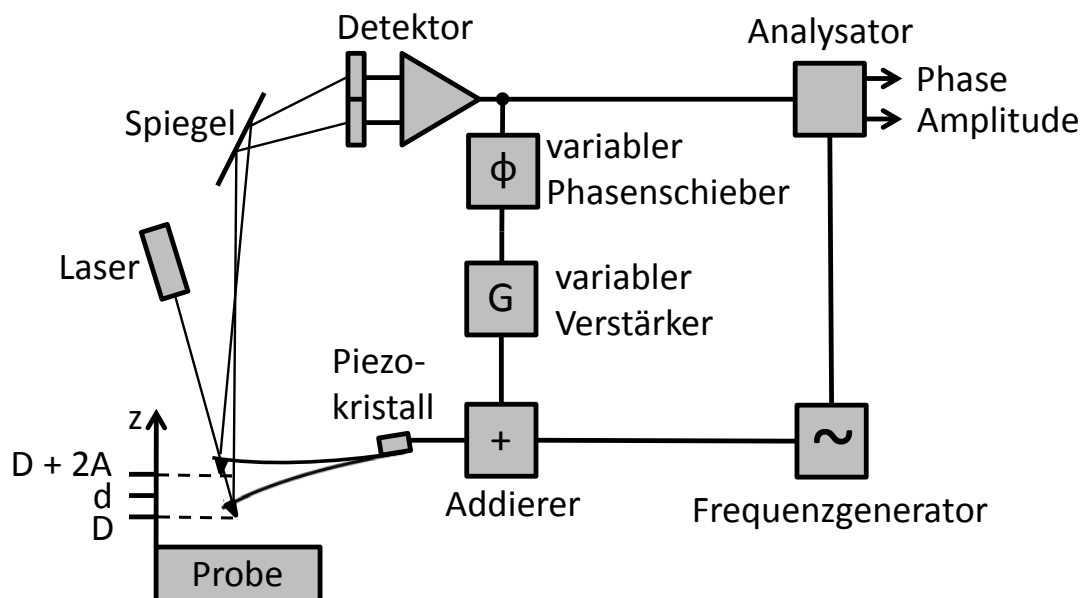


Abbildung 2.7. – Schema einer AFM-Elektronik mit implementiertem Q-Control, Quelle: erstellt in Analogie zu Abbildung 1 aus [Sch+07].

Diese Änderung lässt sich mathematisch durch eine modifizierte Differentialgleichung

der Cantileverbewegung beschreiben. Sie lautet

$$m_{\text{eff}} \cdot \ddot{z}(t) + \alpha \cdot \dot{z}(t) + k \cdot z(t) = F_d \cdot \cos(\omega t) + G \cdot e^{i\phi} \cdot z(t) \quad (2.9)$$

mit dem variablen Verstärkungsfaktor G und der Phasenverschiebung ϕ , die am Phasenschieber eingestellt wird. Wird die Phasenverschiebung auf 90° bzw $\frac{\pi}{2}$ eingestellt, so gilt

$$e^{i\phi} \cdot z(t) = \pm \frac{\dot{z}(t)}{\omega}. \quad (2.10)$$

Dies reduziert die Differentialgleichung (2.9) zu

$$m_{\text{eff}} \cdot \ddot{z}(t) + \alpha_{\text{eff}} \cdot \dot{z}(t) + k \cdot z(t) = F_d \cdot \cos(\omega t), \quad (2.11)$$

wobei für α_{eff} gilt:

$$\alpha_{\text{eff}} = \alpha \pm \frac{G}{\omega}. \quad (2.12)$$

Für den effektiven Q-Faktor gilt

$$Q_{\text{eff}} = \frac{m_{\text{eff}} \cdot \omega}{a_{\text{eff}}}, \quad (2.13)$$

daher wirkt sich eine Änderung des Verstärkungsfaktors G direkt auf den effektiven Q-Faktor des Systems aus [HTM00; RG03; HES06; HS06].

2.1.5. Bestimmung der Federkonstanten mittels thermischen Rauschens

Zur erfolgreichen, quantitativen Analyse von AFM-Aufnahmen sowie Kraftspektroskopieexperimenten ist es zwingend erforderlich, die Federkonstante des benutzten Cantilevers so genau wie möglich zu kennen. Herstellerangaben, die zudem häufig einen großen Wertebereich für die Federkonstante angeben, weichen nicht selten stark von den tatsächlichen Werten ab. Neben Kalibrationsmethoden, die die Federkonstante mittels Geometrie und Materialeigenschaften [ND94; Sad+95; SCM99], Verwendung einer Kalibrationsfeder [GWM96] oder Verstimmung der Cantileverschwingung durch ein bekanntes Zusatzgewicht [Cle+93] bestimmen, hat sich die sogenannte „Thermal Tune Methode“, die Kalibration der Cantileverfederkonstante durch Analyse des thermischen Rauschspektrums, etabliert. Diese Methode, die auf Hutter und Bechhoefer [HB93] zurückgeht, ist auch in der verwen-

deten Software implementiert und soll im Folgenden vorgestellt werden.

Durch thermische Fluktuationen (Brownsche Bewegung) des umgebenden Mediums wird ein Cantilever ohne weitere externe Anregung zum Schwingen angeregt. Für die Hamiltonfunktion eines als harmonischen Oszillator angenommenen Cantilevers mit der Masse m , der Resonanzfrequenz ω_c , dem Impuls p und Auslenkung q gilt

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_c^2 q^2. \quad (2.14)$$

Gemäß dem Äquipartitionstheorem entspricht jedem Freiheitsgrad der Bewegung aufgrund der thermischen Fluktuationen gerade im Mittel die Energie $\frac{1}{2}k_B T$, es gilt somit

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega_c^2 q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T, \quad (2.15)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante darstellt und T die Temperatur des Mediums. Die Bewegung q wird als eindimensionale Oszillation in z -Richtung angenommen.

Für den harmonischen Oszillator gilt

$$\omega_c^2 = \frac{k}{m}. \quad (2.16)$$

Somit berechnet sich die Federkonstante zu

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (2.17)$$

Die mittlere quadratische Cantileverauslenkung $\langle q^2 \rangle$ lässt sich aus der spektralen Leistungsdichte (*engl.* Power Spectral Density) der Cantileverschwingung bestimmen. Sie gibt die Leistung der Cantileverschwingung pro Frequenzintervall in Abhängigkeit der Frequenz an. Die Form dieser Funktion entspricht einem Lorentz-Profil mit dem Peak bei der Resonanzfrequenz. Für gewöhnlich wird die spektrale Leistungsdichte aufgenommen und die Daten an das Lorentz-Profil angefitet. Die Integration der spektralen Leistungsdichte über das Frequenzspektrum des Resonanzpeaks ergibt dann den gesuchten Wert für die mittlere quadratische Cantileverauslenkung $\langle q^2 \rangle$.

Butt und Jaschke führten für diese Methode zwei Korrekturen ein [BJ95], die sich gemeinsam in einem Vorfaktor äußern. Unter genauerer Betrachtung verhalten sich Cantilever nicht exakt wie harmonische Oszillatoren. Unter Verwendung von Balkentheorie zur Berechnung des genaueren Verhaltens ergibt sich ein Korrekturfaktor, der in Gleichung (2.17) eingeht. Mit ihm berechnet sich die Federkonstante gemäß

$$k = 0,971 \cdot \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (2.18)$$

Die zweite, von Butt und Jaschke eingeführte Korrektur berücksichtigt Effekte, die bei AFMs auftreten, die auf dem Lichtzeigersystem basieren. Die mit dem Lichtzeigersystem gemessenen Auslenkungen entsprechen nicht den realen Auslenkungen des Cantilevers. Dies liegt an der Abhängigkeit der gemessenen Auslenkung vom Winkel der Verbiegung, nicht der realen Auslenkung. Da der Winkel der Auslenkung jedoch von der Mode des Cantilevers abhängt, ist auch hier eine Korrektur angebracht.

Damit ergibt sich effektiv, d.h. beide Korrekturen mit inbegriffen, ein gemeinsamer Korrekturfaktor, mit dem sich die Federkonstante wie folgt berechnet:

$$k = 0,817 \cdot \frac{k_B T}{\langle q^{*2} \rangle}, \quad (2.19)$$

wobei q^* die vom Lichtzeigersystem gemessene Auslenkung bezeichnet.

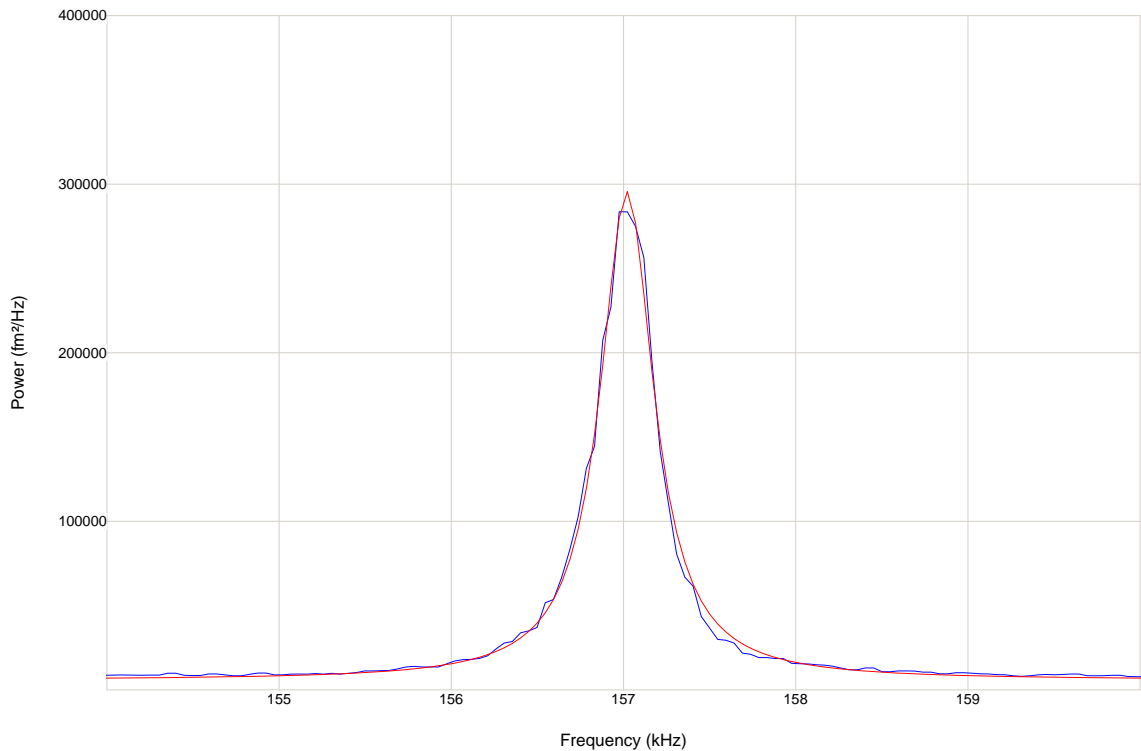
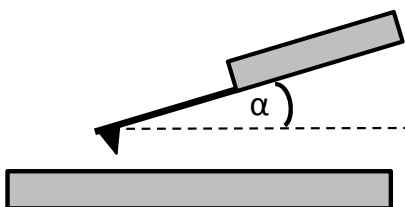


Abbildung 2.8. – Spektrale Leistungsdichte eines *Nanosensors* NCLR Cantilevers (blaue Linie). Ebenfalls eingezeichnet ist der Lorentz-Fit (rote Linie).

Dieser Korrekturfaktor wurde für balkenförmige Cantilever berechnet. Für V-förmige Cantilever ergeben sich andere Korrekturfaktoren. Finite-Elemente-Berechnungen für V-förmige Cantilever wurden von Stark et al. [SDH01] durchgeführt, deren Ergebnisse zeigen, dass die Unterschiede relativ gering sind.



Eine dritte Korrektur muss eingeführt werden, wenn der Cantilever nicht parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist. Dies ist meistens der Fall, da Cantilever in Cantileverhalterungen meist unter einem Winkel eingebaut werden. Wird der Winkel zwischen Cantilever und Oberfläche mit α bezeichnet, so gilt für

die Federkonstante:

$$k = 0,817 \cdot \frac{k_B T \cos^2(\alpha)}{\langle q^{*2} \rangle}. \quad (2.20)$$

2.1.6. Einzelmolekül-Kraftspektroskopie

Im Allgemeinen ist die Kraftspektroskopie ein Verfahren, mit dessen Hilfe es möglich ist, Wechselwirkungen zwischen einzelnen Molekülen sowie das Verhalten einzelner Moleküle unter externer Krafteinwirkung zu analysieren, wie z.B. die Wechselwirkungskräfte von Rezeptor-Liganden-Paaren, die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen bei Proteinfaltungen oder das Dehnungsverhalten von Biopolymeren.

Soll die Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen untersucht werden, so werden diese beiden Moleküle einander angenähert, bis sie miteinander interagieren können. Daraufhin werden sie dann wieder voneinander getrennt. Die während dieses Vorgangs auftretenden Kräfte sind von Interesse.

Ist es das Verhalten eines einzelnen Moleküls (z. B. eines Polymers) unter der Einwirkung von äußeren Kräften, das untersucht werden soll, so wird das Molekül beiden Enden fixiert gestreckt. Der auftretende Kraftverlauf ist hier Gegenstand der Messung.

Mit einem AFM ist es möglich, solche einzelmolekularen Kraftmessungen durchzuführen. Diese Technik geht zurück auf die Arbeit von Florin, Moy und Gaub, die im Jahre 1994 einen AFM Cantilever benutzten, um die Bindungskräfte zwischen Avidin- und Biotinmolekülen quantitativ zu untersuchen [MFG94; FMG94].

Dazu werden auf einem Substrat die Rezeptormoleküle immobilisiert. Eine AFM-Spitze wird mit Liganden funktionalisiert. Sowohl Immobilisation als auch Funktionalisierung werden je nach Molekül mit spezifischen Linker-Kits durchgeführt.

Der Kraftverlauf in Abhängigkeit der Distanz von der Oberfläche wird in einer sogenannten Kraft-Distanz-Kurve aufgenommen.

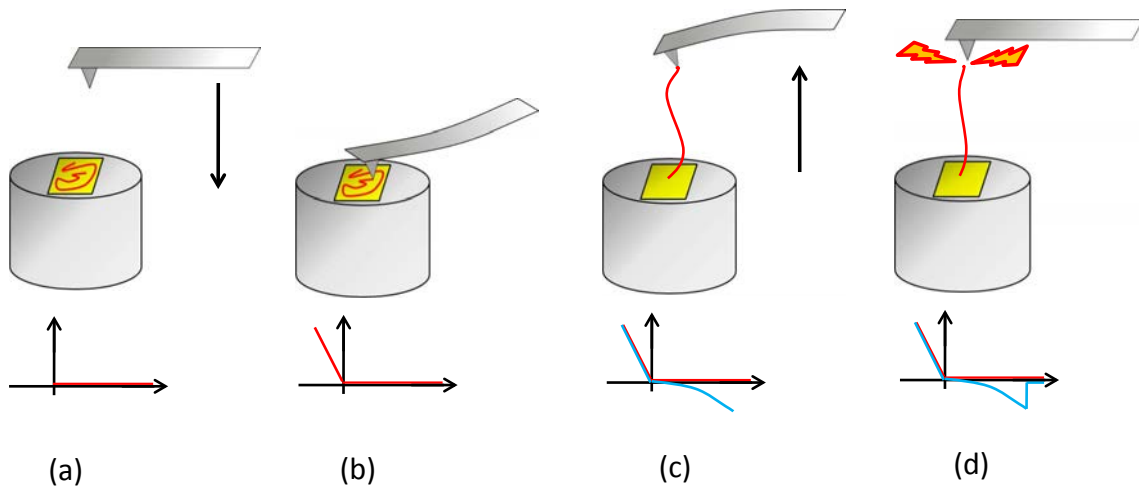


Abbildung 2.9. – Die Phasen einer einzelnen Kraft-Distanz-Kurve: (a) Die Spitze nähert sich der Oberfläche (b) Die Spitze drückt mit einer definierten Kraft auf die Oberfläche (c) Die Spitze wird mit einer definierten Geschwindigkeit von der Oberfläche weggezogen, durch die Bindung wird der Federbalken ausgelenkt (d) Die Bindung reißt, der Federbalken springt unmittelbar zurück in die Nullstellung. Repulsive Kräfte sind willkürlich mit positivem, attraktive mit negativem Vorzeichen versehen

Im Falle der Untersuchung der Bindungskraft eines Ligand-Rezeptor-Systems werden sehr viele Kraft-Distanz-Kurven (mehrere Hundert bis mehrere Tausend) aufgenommen. Aus jeder einzelnen Kurve wird die Abrisskraft bestimmt. Anschließend werden die relativen Häufigkeiten der Abrisskräfte in Abhängigkeit der Abrisskräfte in einem Histogramm aufgetragen und die wahrscheinlichste Abrisskraft ermittelt. Solche wahrscheinlichsten Abrisskräfte werden für einige verschiedene *Loading-Rates*² bestimmt. Aus der Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Abrisskraft von der Loading-Rate können mit Hilfe des von Bell, Evans und Ritchie entwickelten Modells die Dissoziationsratenkonstante k_{off} und die Reaktionslänge x_{β} berechnet werden, die die Bindung charakterisieren [Bel78; ER97].

²Die Loading-Rate charakterisiert die zeitliche Kraftentwicklung auf den Komplex. Sie berechnet sich als Produkt aus der effektiven Federkonstante und der Rückziehggeschwindigkeit. Da auch Moleküle elastisch sind, entspricht ihnen eine Federkonstante. Somit ergibt sich die effektive Federkonstante aus der Federkonstante des Federbalkens und der Federkonstante der Moleküle. Sie wird aus der Kraft-Distanz-Kurve bestimmt als Steigung der Kurve kurz vor dem Abriss.

Bell, Evans und Ritchie leiteten im Rahmen der Ratentheorie Kramers den Ausdruck für die wahrscheinlichste Abrisskraft in Abhängigkeit der *Loading-Rate* zu

$$F_{\max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \cdot \ln \left(\frac{r \cdot x_\beta}{k_B \cdot T \cdot k_{\text{off}}} \right) \quad (2.21)$$

her.

Soll das Verhalten eines Moleküls (hauptsächlich langkettige Moleküle, z. B. Polymere) unter der Einwirkung einer äußeren Kraft untersucht werden, so wird jenes Molekül auf dem Substrat immobilisiert. Dies kann wiederum end-spezifisch durch bestimmte Linker-Moleküle geschehen. Die AFM-Spitze wird dem anderen Molekülende entsprechend funktionalisiert. Befindet sich die AFM-Spitze in Kontakt mit der Oberfläche, so bindet das Ende des Moleküls an die Spitze. Beim Zurückziehen wird das Molekül gedehnt. Die Dehnung wird auch hier in Form einer Kraft-Distanz-Kurve aufgenommen. Das Molekül wird so lange gedehnt, bis die Bindung an Spitze oder Oberfläche dissoziiert bzw. das Molekül selber zerreißt. Die Bindungsstärken der Linker-Systeme sollten dementsprechend auf das zu untersuchende Molekül abgestimmt sein.

Zur Analyse der Kraft-Distanz-Kurven von Dehnungen langkettiger Polymermoleküle existieren verschiedene Modelle, aufbauend auf verschiedenen Annahmen, die Aufschluss über verschiedene Größen zur Charakterisierung von Struktur und Konformation der Moleküle geben (siehe Kapitel 2.2).

2.2. Polymermodelle

Werden Polymere, die aus einer Vielzahl miteinander verbundener Monomere bestehen, gedehnt, so sind hauptsächlich zwei Phänomene für die dabei auftretenden Kräfte verantwortlich.

Ein ausreichend langes Polymer liegt im Gleichgewicht als statistische Knäuel vor. Dieses Gleichgewicht ist ein dynamisches Gleichgewicht, da das Polymer aufgrund der Brownschen Molekularbewegung ständig fluktuiert. Wird das Polymer gedehnt, so wird die Anzahl an Konformationen, die das Polymer einnehmen kann, reduziert. Dies geht mit einer Verringerung der Konformationsentropie einher. Daher ist bei kleinen Auslenkungen hauptsächlich die *entropische Elastizität* während der Dehnung für die auftretenden Kräfte verantwortlich.

Bei großen Auslenkungen treten Spannungen im Molekülrückgrat auf. Kräfte wirken direkt auf Bindungen in Zugrichtung. Bindungswinkel können verändert werden, konformationsstabilisierende Wechselwirkungen wie z.B. intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen

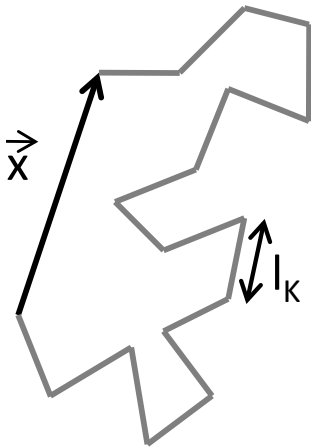
oder elektrostatische Bindungen können aufbrechen. Als Beispiel sei hier das Verhalten von B-DNA unter Dehnung (siehe vorheriges Kapitel) angeführt. Auf solche Effekte zurückzuführende Kräfte werden unter den Begriff *enthalpische Elastizität* zusammengefasst. Die auftretenden Kräfte sind physikalisch aus der Änderung der freien Helmholtz-Energie A zu berechnen:

$$F = \left(\frac{\partial A}{\partial l} \right)_T = \left(\frac{\partial U}{\partial l} \right)_T - T \left(\frac{\partial S}{\partial l} \right)_T = -k_B T \left(\frac{\partial \ln Z_r}{\partial l} \right)_T. \quad (2.22)$$

Dabei ist l die End-zu-End-Distanz, U die Freie Energie, S die Entropie, Z_r die konfigurative Zustandssumme und T die Temperatur, die während der Dehnung als konstant angenommen wird [Jan+00].

2.2.1. Die Gauß-Kette

Um die Kräfte, die beim Dehnen eines Polymer-Moleküls auftreten, beschreiben zu können, wurden einige Modelle entwickelt, die diese Kräfte in Abhängigkeit der End-zu-End-Distanz beschreiben. Dabei bezeichnen die beiden Enden gerade diese Positionen in der Molekülkette, zwischen denen die Kraft auftritt bzw. gemessen wird.



Das einfachste Modell ist das Modell der Gauß-Kette. Das Molekül wird als eine Kette angesehen, die in eine bestimmte Anzahl von gleich langen, geradlinigen, starren Gliedern aufgeteilt ist. Diese Glieder sollen statistisch unabhängig voneinander sein. Die Länge der End-zu-End-Distanz, in der nebenstehenden Graphik als \vec{x} bezeichnet, ist normalverteilt mit dem Mittelwert null. Diese Annahme ist analog zum Random-Walk-Ansatz.

Die Streckung der Molekülkette bedeutet eine gerichtete Vergrößerung der End-zu-End-Distanz. Der Random-Walk-Charakter der Molekül-Kette bleibt erhalten, wenn die Auslenkung sehr viel kleiner bleibt als die Konturlänge L . Für dieses Modell gilt für die Kraft, die bei einer der Auslenkung \vec{x} auftritt, der folgende Ausdruck:

$$\vec{F}(\vec{x}) = \frac{3k_B T}{l_K L} \cdot \vec{x}. \quad (2.23)$$

Dabei bezeichnet die Größe l_K die Kuhn-Länge. Sie ist ein Parameter, der die Steifigkeit der Molekülkette beschreibt und dient als Fit-Parameter, wenn eine gemessene Kraft-Distanz-Kurve gemäß dieses Modells approximiert werden soll. Wie zu sehen ist, ist die

Abhängigkeit der Kraft von der Auslenkung linear, die Molekülkette verhält sich nach diesem Modell wie eine lineare Feder analog zum Hookeschen Gesetz [Jan+00].

2.2.2. Die Freigelenkige Kette

Die Freigelenkige Kette (*engl.* Freely-Jointed-Chain, FJC) ist ein weiteres Modell, das das Modell der Gauß-Kette insofern erweitert, als dass der Random-Walk-Charakter bei großer Streckung nicht mehr erhalten bleibt, weil sich die Kettenglieder hierbei bevorzugt in Richtung der wirkenden Kraft ausrichten und somit statistisch nicht mehr unabhängig sind.

Die Kettenglieder sind durch frei bewegliche Gelenke miteinander verbunden. In diesem Modell ergibt sich für den Zusammenhang zwischen End-zu-End-Distanz und dabei auftretender Kraft der folgende Ausdruck [Bue79]:

$$x(F) = L \cdot \left[\coth \left(\frac{F \cdot l_K}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{F \cdot l_K} \right]. \quad (2.24)$$

Sowohl die Gauß-Kette als auch das FJC-Modell berücksichtigen nur Effekte, die auf den Rückgang der Konformationsentropie beruhen. Da im Allgemeinen jedoch Moleküle bzw. Monomere elastisch sind, muss der Einfluss der enthalpischen Elastizität berücksichtigt werden. Dies geschieht beim FJC-Modell am einfachsten phänomenologisch. Wird jedem Monomer eine effektive Federkonstante zugeordnet, die die intramolekularen Effekte (Änderungen in Bindungswinkeln, Streckungen des Rückgrats etc.) während des Streckens beschreibt, so wird Ausdruck (2.24) erweitert zu [SCB96]

$$x(F) = L \cdot \left[\coth \left(\frac{F \cdot l_K}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{F \cdot l_K} \right] \cdot \left(1 + \frac{F}{\kappa \cdot L} \right), \quad (2.25)$$

wobei κ die effektive Monomerfederkonstante darstellt. Die effektive Federkonstante K des gesamten Polymers, bestehend aus n Monomeren, ist demnach $K = \frac{\kappa}{n}$.

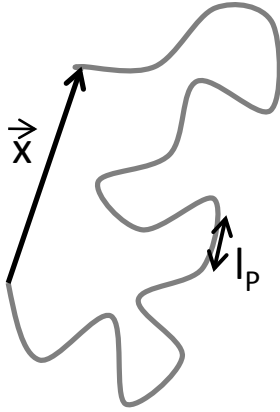
Zu beachten ist hier, dass nur Beiträge der Dehnungselastizität berücksichtigt werden. Ein Modell, das auch die Biegeelastizität beachtet, ist das im nächsten Kapitel beschriebene Modell der wurmartigen Kette [Jan+00].

2.2.3. Die wurmartige Kette

Die wurmartige Kette (*engl.* Worm-Like-Chain, WLC) ist ein Polymermodell, bei dem das Polymer als ein Faden mit konstanter Biegesteifigkeit angesehen wird [MS95].

In dieses Modell gehen neben den entropischen Beiträgen auch die enthalpischen Beiträge

ein, die zunächst nur auf die Biegeelastizität zurückzuführen sind. Der Ausdruck für die Kraft-Auslenkungs-Relation lautet



$$F(x) = \frac{k_B T}{l_P} \cdot \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right]. \quad (2.26)$$

Der in diesem Modell auftretende Parameter l_P ist die sogenannte Persistenzlänge, die, ähnlich der Kuhn-Länge, ein Maß für die Steifigkeit des Moleküls ist. Die Persistenzlänge ist die Größenskala, auf der das Molekül als noch nahezu geradlinig angesehen werden kann.

Ein Ausdruck, der zudem noch die Dehnungselastizität

berücksichtigt, lautet:

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_P} \cdot \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L} + \frac{F}{\Phi} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{F}{\Phi} - \frac{1}{4} \right]. \quad (2.27)$$

Dabei stellt Φ die spezifische Steifigkeit des Polymers dar. Diese Größe, die die Dimension einer Kraft besitzt, ergibt sich aus der effektiven Federkonstante des Polymers K gemäß $\Phi = K \cdot L$ und ist somit unabhängig von der Konturlänge des Polymers.

Das Worm-Like-Chain-Modell eignet sich sehr gut zur Beschreibung von DNA-Kraftkurven bei Kräften bis ca. 35pN [Jan+00].

2.3. Desoxyribonukleinsäure

Die Desoxyribonukleinsäure (*engl.* Deoxyribonucleic acid, DNA) ist ein Biopolymer und Träger der gesamten Erbinformation eines Lebewesens.

2.3.1. Aufbau und Konformation

Die Struktur von DNA-Molekülen wurde von den beiden Molekularbiologen Francis H. C. Crick und James D. Watson im Jahre 1953 beschrieben [WC53]. Für diese und die darauf erfolgten Leistungen erhielten die beiden zusammen mit Maurice H. F. Wilkins im Jahre 1962 den Nobelpreis für Medizin.

Bei DNA handelt es sich um ein doppelsträngiges Polymer. Ein Einzelstrang besteht aus Monomeren, den sogenannten Nukleotiden. Ein Nukleotid wiederum besteht aus drei Untereinheiten, einem Phosphatrest, einem Zuckeranteil (bei diesem handelt es sich bei der

DNA um die desoxygenierte Form der Ribose) und einer von vier organischen Basen. Untereinheiten, die nur aus der Desoxyribose und der Base bestehen, werden Nucleoside genannt.

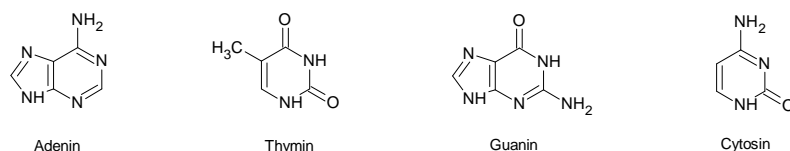


Abbildung 2.10. – Die zweidimensionalen Strukturen der vier Basen. (Quelle: Graphik erstellt mit ACD/ChemSketch 12.01)

Bei den vier Basen handelt es sich um die Purinbasen³ Adenin oder Thymin bzw. die Pyrimidinbasen⁴ Guanin oder Cytosin.

Somit existieren vier verschiedene Nucleotide, die sich über Phosphodiesterbindungen zu einem Einzelstrang formieren. Dabei verbinden sich der Phosphatrest des einen Nucleotids mit dem Zucker eines zweiten Nucleotids unter Wasserabspaltung.

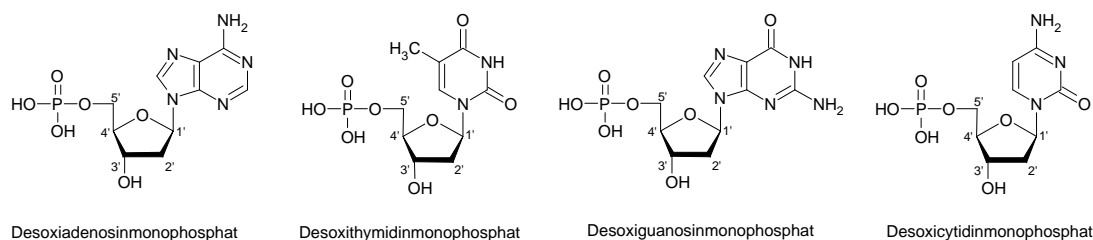


Abbildung 2.11. – Die zweidimensionalen Strukturen der vier Nucleotide mit Nummerierung der Kohlenstoffatome der Ribose. Der Phosphatrest bindet am 5'-Kohlenstoffatom, die Base am 1'-Kohlenstoffatom. Dieser Nummerierung entsprechend wird dem DNA-Einzelstrang ein 3'-Ende bzw. ein 5'-Ende und damit eine Richtung zugeordnet. (Quelle: Graphik erstellt mit ACD/ChemSketch 12.01)

DNA liegt unter Normalbedingungen als Doppelstrang vor. Zwei Einzelstränge liegen mit den Basen zueinander gegenüber, die Richtungen der Einzelstränge sind gegenläufig. Das heißt, der eine Einzelstrang läuft vom 3'-Ende zum 5'-Ende, der andere genau umgekehrt. Dabei wechselwirken die Basen der beiden unterschiedlichen Stränge durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander.

³Purinbase ist eine Bezeichnung für eine Gruppe von organischen Verbindungen. Dabei handelt es sich um Heteroaromaten. Der Name leitet sich von der Stammverbindung Purin ab.

⁴Pyrimidinbase ist ebenfalls eine Bezeichnung für eine Gruppe von organischen Verbindungen. Dabei handelt es sich wie bei den Purinbasen ebenfalls um Heteroaromaten. Der Name leitet sich von der Stammverbindung Pyrimidin ab.

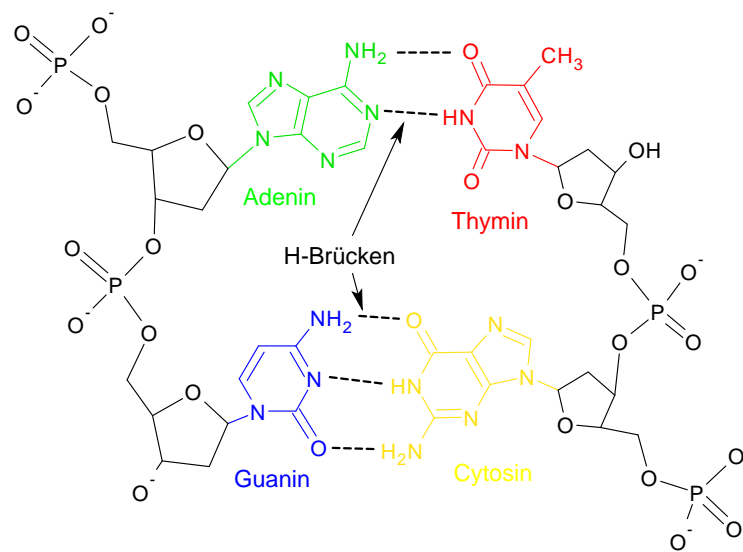


Abbildung 2.12. – Zweidimensionale Struktur eines DNA-Fragments. Die jeweils komplementären Basen der Nukleotide sind zueinander gerichtet, Wasserstoffbrückenbindungen sind ausgebildet und halten die zwei Einzelstränge zusammen. Die Phosphatreste sind nach außen gerichtet und bilden das sogenannte Phosphatrückgrat. Es ist unter neutralem pH-Wert ($pH = 7$) deprotoniert, also negativ geladen. (Quelle: Graphik erstellt mit ACD/ChemSketch 12.01)

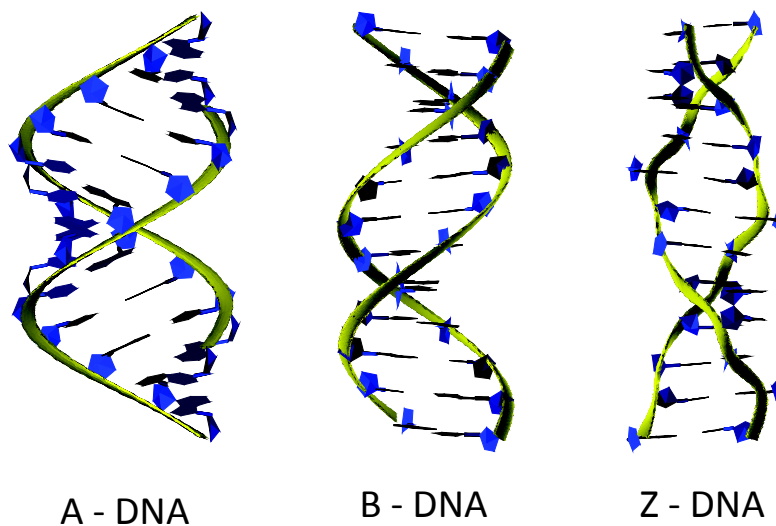
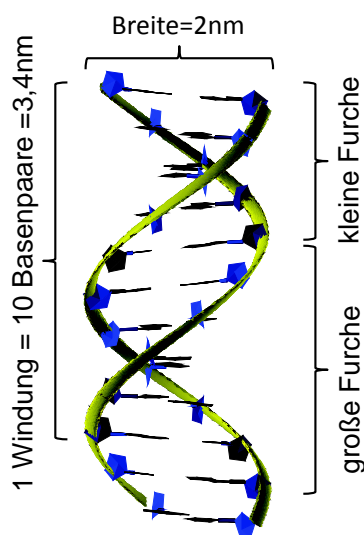


Abbildung 2.13. – Vergleich der drei unterschiedlichen DNA-Konformationen. Während A- und B-DNA rechtsgängige Helices sind, ist Z-DNA linksgängig. (Quelle: Erstellt mit der Software VMD mit Hilfe von Strukturdateien aus [Gla13])

Da aufgrund ihrer Strukturen nur Adenin mit der Base Thymin wechselwirkt (die beiden Basen können zwei Wasserstoffbrückenbindungen untereinander ausbilden) sowie Guanin nur mit Cytosin eine sogenannte Basenpaarung eingeht (dieses Basenpaar kann drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden), sind die beiden Einzelstränge komplementär.



In neutraler Umgebung, d.h. bei einem pH-Wert von sieben, ist der Phosphatrest jeden Nukleotids deprotoniert. Demzufolge ist das sogenannte Phosphatrückgrat der DNA negativ geladen. Streng genommen ist die DNA dann keine Säure mehr. Die Bezeichnung „Säure“ bezieht sich auf einen ungeladenen Zustand. Es existieren drei unterschiedliche Konformationen der DNA, die A-, B- und Z-DNA (siehe Abbildung 2.13). Von diesen drei Konformationen ist die B-DNA die häufigste. So liegen die humane DNA sowie tierische DNA in B-DNA-Form vor. Die im experimentellen Teil dieser Arbeit verwendete λ -Phagen-DNA, kurz λ -DNA, ist ebenfalls eine B-DNA.

Die Breite eines B-DNA-Moleküls, bei dem es sich um eine rechtsgängige Helix handelt, beträgt ca. 2 Nanometer. Da die helikale Windung pro Basenpaar 36° beträgt, ist die Anzahl der Basenpaare pro ganzer Windung 10. Die Ganghöhe einer ganzen Windung beträgt 3,4 Nanometer. Dementsprechend entspricht einem Basenpaar die Ganghöhe von 0,34 Nanometern. (siehe auch links nebenstehende Abbildung, erstellt mit der Software VMD mit Hilfe von einer Strukturdatei aus [Gla13]))

Als Folge der helikalen Windung und der strukturellen Eigenschaften der Nukleotide entstehen die sogenannte große Furche (*engl.* major groove) sowie die kleine Furche (*engl.* minor groove), die sich an der Außenseite der DNA entlang winden. Dabei beträgt die Breite der großen Furche 2,2nm, die der kleinen 1,2nm.

In den Furchen sind die Basen von außen zugänglich. Sequenzspezifisch bindende Proteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren⁵, binden demzufolge hauptsächlich in den Furchen, speziell der großen Furche, weil dort die Basen besser zugänglich sind, als in der kleinen Furche.

⁵Bei Transskriptionsfaktoren handelt es sich um DNA-bindende Proteine, die die Transkription der DNA durch die RNA-Polymerase initiieren

2.3.2. Lambda-DNA

Bei der λ -DNA handelt es sich um die DNA des λ -Phagen (auch Phage lambda oder Bakteriophage lambda genannt). Der Lambda-Phage ist ein Virus, das *Escherichia coli*-Bakterien infiziert.

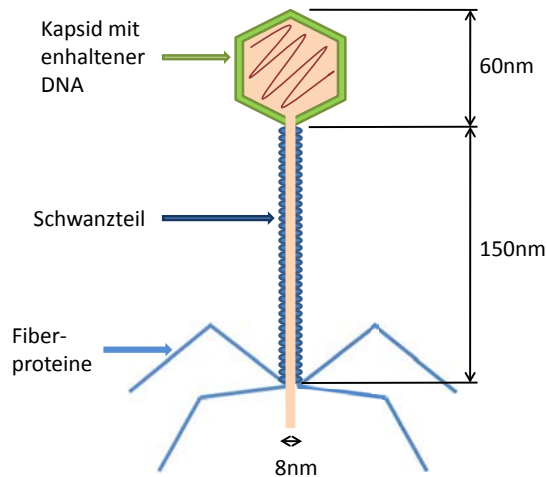


Abbildung 2.14. – Schematischer Aufbau der Bakteriophage Lambda

Das Virus besteht aus einem Kopfteil, einem Schwanzteil und vier Fibern am unteren Ende. Der Kopfteil hat eine ikosaedrische Form mit einer Ausdehnung von ca. 60 Nanometer und besteht aus 72 Kapsomeren.

Der Schwanz hat eine Länge von ca. 150 Nanometern und eine Breite von ca. acht Nanometern.

Bei der DNA des Virus, die sich im Kapsid befindetet, handelt es sich um eine 48502 Basenpaare große, doppelsträngige B-DNA. Sie hat demnach eine Konturlänge von ca. 16,4 Mikrometer. Die vollständige Genomsequenz ist seit 1982 [San+82] bekannt.

An den beiden Enden der λ -DNA sind kurze, einzelsträngige Abschnitte zu finden, die komplementär zueinander sind. Sie dienen der Rezirkularisierung der Phagen-DNA nach Injektion in den Wirt. Sie werden als homologe Bindeenden, kohäsive Enden oder auch klebrige Enden (*engl.* sticky ends) bezeichnet.

Die für diese Arbeit verwendete DNA ist λ -DNA, die durch das Restriktionsenzym *BstEII* zerschnitten wurde. Restriktionsenzyme sind Proteine, die sich an definierte DNA-Sequenzen anlagern und den Strang dort zerschneiden. Sie dienen unter anderem Bakterien zur Phagenabwehr. Restriktionsenzyme erkennen Fremd-DNA und machen diese dann unschädlich.

BstEII ist ein Restriktionsenzym des *Bacillus stearothermophilus*. Es zerschneidet die λ -

DNA in 14 Fragmente. Die Länge der Einzelfragmente erstreckt sich von ca. 39 Nanometern bis ca. 2,9 Mikrometern.

2.3.3. Kraftinduzierte Phasenübergänge eines B-DNA-Moleküls

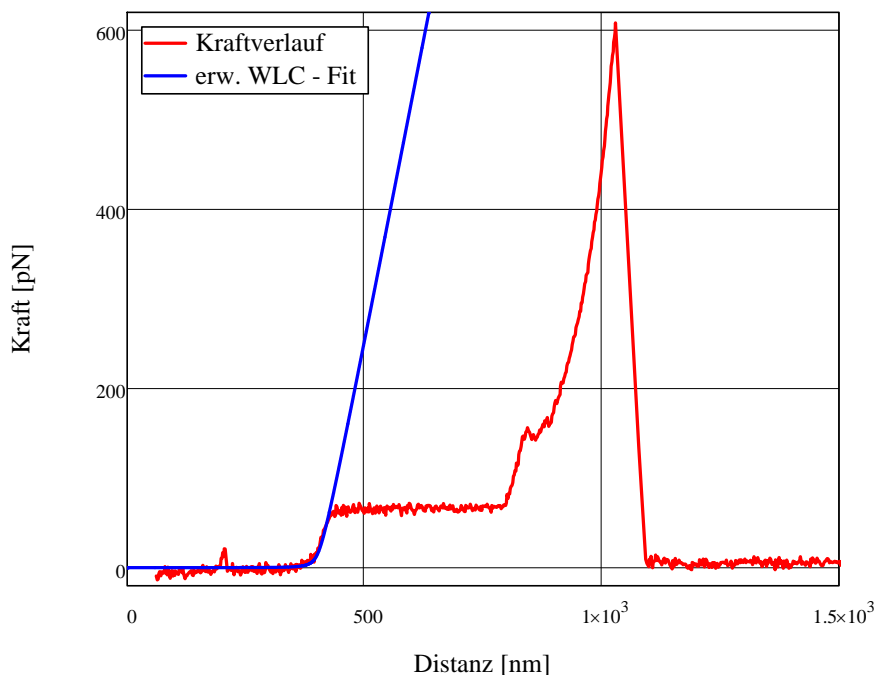


Abbildung 2.15. – Gemessene Kraft-Distanz-Kurve eines DNA-Moleküls. Diese Kurve wurde im statischen Kraftspektroskopie-Modus, also mit ruhendem Cantilever, gemessen. Dafür wurde ein weicher Cantilever (Bruker MSCT, C , $k = 0.01 \frac{N}{m}$) benutzt. Die Auslenkung des Cantilevers ist aus den Daten herausgerechnet. Ebenfalls eingezeichnet ein erweiterter WLC-Fit. Für die Persistenzlänge ergibt sich aus dem Fit ein Wert von $l_P = 48 \pm 3 \text{ nm}$, für das Elastizitätsmodul Φ ergibt ein Wert von $1120 \pm 176 \text{ pN}$. Diese Werte stimmen sehr gut mit Literaturwerten aus [Bou+99] überein.

Wird ein DNA-Molekül im Rahmen eines Kraftspektroskopieexperiments gestreckt, so zeigt die Dehnungskurven einen charakteristischen Verlauf, wie er in Abbildung (2.15) beispielhaft zu sehen ist.

Anfangs wird die DNA bei der Streckung bis etwas mehr als ihre Konturlänge (bis die Kraft ca. 35 pN beträgt) gedehnt. Bis hierhin verhält sich die DNA wie ein statistisches Knäuel. Diese Dehnung kann im Rahmen des erweiterten WLC-Modells sehr gut beschrieben werden. Bei weiterer Dehnung erreicht der Kraftverlauf bei ca. 65 pN ein Plateau. Bei

nahezu konstanter Kraft lässt sich das DNA-Molekül bis auf das ca. 1,7 fache ihrer Konturlänge dehnen. Im weiteren Verlauf steigt die Kraft an, bis bei ca. 150pN ein zweites, jedoch viel kürzeres Plateau zu beobachten ist (siehe Abbildung (2.15)). Das generelle Auftreten dieses Plateaus, seine Länge und die Kraft, bei der es auftritt, ist jedoch, anders als beim ersten Plateau, abhängig von der Ziehgeschwindigkeit und dem Anteil an Guanin-Cytosin-Basenpaaren des DNA-Strangs. Abbildung (2.15) zeigt das Strecken von λ -DNA mit einem Adenin-Thymin / Guanin-Cytosin-Basenpaarverhältnis von ca. 1 zu 1. In diesem Falle liegt das Plateau bei ca. 150pN. Nach diesem zweiten Plateau steigt die Kraft wieder an. Dieses Kraftregime nach dem zweiten Plateau ähnelt sehr dem Kraftverlauf eines einzelsträngigen DNA-Moleküls (kurz ssDNA, für single strand-DNA).

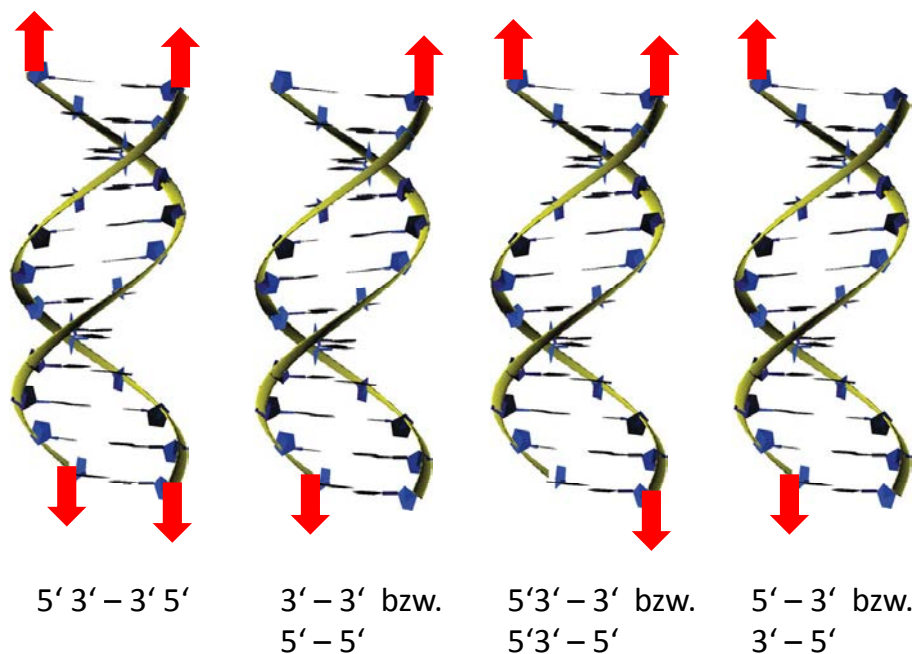


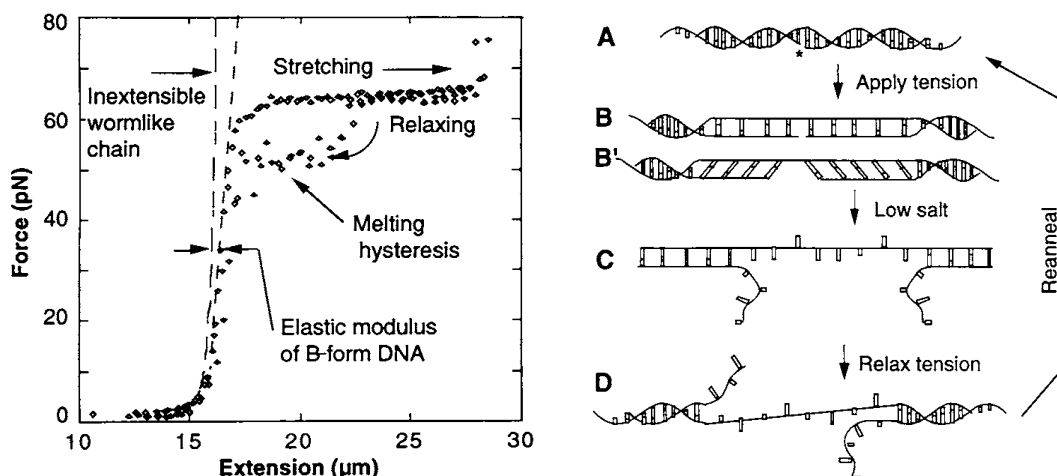
Abbildung 2.16. – Die verschiedenen Möglichkeiten, wie an einem DNA-Molekül gezogen werden kann. Entweder wird an beiden oder nur an einem Strangende pro Seite gezogen. Erstellt mit der Software VMD mit Hilfe von einer Strukturdatei aus [Gla13]

Da DNA ein doppelsträngiges Molekül ist, existieren verschiedene Möglichkeiten, wie ein Molekül mit beiden Enden jeweils bindet. Dabei können die Enden jeweils entweder mit beiden Strangenden oder nur mit einem Strangende binden (siehe Abbildung 2.16). Wird ein DNA-Molekül an jeweils beiden Enden an beiden Strängen gezogen und sind beide Stränge ohne Strangbruch, so unterscheidet sich die Kraft-Distanz-Kurve von dem oben gezeigten Profil. Das erste Plateau liegt nicht bei einer Kraft von etwa 65pN, sondern

ist bei ca. 100-110pN zu finden [Gro+11]. Solche Ereignisse sind jedoch sehr selten, da in DNA-Molekülen sehr häufig Strangbrüche existieren. Daher soll zunächst nur die gängige Kraft-Distanz-Kurve erläutert werden.

Detaillierte Modelle zur Erklärung des Kraftverlaufs bei Streckexperimenten von doppelsträngiger DNA sind Gegenstand sehr vieler Veröffentlichungen in der Fachliteratur. Viele verschiedene Erklärungsansätze sind eingeführt worden. Einige sollen folgend kurz erläutert werden.

Smith et al. veröffentlichten 1996 ein Modell, mit dem sie die von ihnen gemachten DNA-Dehnungsexperimente zu erklären versuchten [SCB96]. Mit einer Optischen Pinzette haben Smith et al. DNA-Moleküle bis zu Kräften jenseits des ersten Kraftplateaus gedehnt und anschließend wieder relaxieren lassen.



(a) Der Kraftverläufe der Dehnung und anschließenden Relaxation unterscheiden sich in der ersten Hälfte des Kraftplateaus. Eine Hysterese ist zu beobachten.

(b) Skizzen der DNA-Strukturen in verschiedenen Phasen eines Kraftzyklus.

Abbildung 2.17. – Beide Abbildungen entnommen aus [SCB96]

Dabei stellten sie, neben dem bereits oben beschriebenen Kraftverlauf, bei der Relaxation einen im Vergleich zur Dehnung teilweise anderen Kraftverlauf fest (siehe Abbildung 2.17a). Des Weiteren fanden sie heraus, dass dieser Hystereseeffekt umso ausgeprägter war, je niedriger die Ionenkonzentration des Messpuffers war. Ein weiteres Ergebnis ihrer Messungen war, dass die Form der Hysterese abhängig vom DNA-Molekül war. Bei mehrmaliger Dehnung und Relaxation ein und desselben Moleküls hatte die Hysterese nahezu immer die gleiche Form. Die Hysteresen zweier verschiedener Moleküle waren jedoch unterschiedlich.

Aufbauend auf diesen Messergebnissen formulierten Smith et al. die Hypothese, dass der Kraftverlauf einer DNA-Streckung mit einem strukturellen Übergang der DNA von der B-DNA zur sogenannten S-DNA („S“ wie „Stretched“) zu erklären sei. Dieser Hypothese zufolge entwinden sich die Einzelstränge voneinander, die Abstände der Basenpaare nehmen zu, jedoch bleiben die Basenpaarungen zunächst intakt. Diese neue Struktur ist in Abbildung (2.17b) unter B bzw. B' skizziert. B und B' sind mögliche Alternativstrukturen der S-DNA-Form. Der Übergang von der B-zur S-DNA-Struktur ist ein hochkooperativer Prozess. Dies bedeutet, dass während der Strukturänderung S-DNA-Bereiche innerhalb der B-DNA-Bereiche entstehen, die mit zunehmender Dehnung immer größer werden.

Des Weiteren wird in diesem Erklärungsansatz davon ausgegangen, dass mindestens ein Strang einen Bruch (2.17b, beim Sternchen) aufweist. Ein Bruch eines Strangs würde auch das Dehnungsverhalten der DNA bei Kräften jenseits der 65pN erklären, weil dann effektiv nur noch ein einziger Strang gedehnt wird. Dementsprechend wäre das Dehnungsverhalten von einzelsträngiger DNA zu beobachten.

Gemäß diesem Bild würden sich bei weiterer Dehnung die Stränge vom Punkt des Strangbruchs aus voneinander lösen, die Basenpaare brechen auf (siehe 2.17b, C). Hier wird, in Analogie zum thermischen Schmelzen⁶ von kraftinduziertem Schmelzen gesprochen. Der Effekt ist bei hoher Ionenkonzentration geringer, da die positiven Ionen sich stabilisierend an das negativ geladene Rückgrat der DNA anlagern. Bei anschließender Relaxation rekombinieren die voneinander gelösten Stränge. Diese Rekombination beansprucht jedoch einige Zeit (Sekunden bis Minuten)[SCB96]. Nicht voneinander gelöste Bereiche des Doppelstrangs gehen wieder in die B-DNA-Struktur zurück (2.17b, D). Mit der langwierigen Rekombination der beiden Einzelstränge zu einem Doppelstrang wird im Rahmen der Theorie von Smith et al. [SCB96] das Auftreten der Hysterese erklärt.

Aufbauend auf diesem Modell kann die Existenz des ersten Kraftplateaus erklärt werden. Lebrun et al. [LL96] sowie Kosikov et al. [Kos+99] konnten dementsprechende Computersimulationen vorweisen. Jedoch versagt dieses Modell beim Versuch, die Kraft und die Länge des Plateaus vorauszusagen. Zudem kann dieses Modell das Auftreten des zweiten Plateaus nicht erklären.

Im Laufe der Zeit wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Experimente an dsDNA (double strand-DNA) ausgeführt.

Rief et al. zeigten 1999, dass der Wert der Kraft, bei der das Kraftplateau zu beobachten ist, zudem abhängig von der Basenpaarzusammensetzung ist [RCG99]. Sie konnten zei-

⁶Thermisches Schmelzen bezeichnet den Effekt, bei dem die Basenpaare eines DNA-Doppelstrangs bei einer bestimmten Temperatur „aufbrechen“ und sich zwei Einzelstränge bilden. Solche Experimente wurden 1957 von Rice et al. durchgeführt [RD57].

gen, dass dsDNA, die nur aus GC-Basenpaaren besteht, ein Plateau bei ebenfalls ca. 65pN aufweist, genau wie λ -DNA. Das zweite Plateau jedoch ist bei Kräften um die 300pN zu finden. Im Gegensatz dazu ermittelten Rief et al. den Betrag der Kraft des ersten Plateaus bei dsDNA, die ausschließlich aus AT-Basenpaaren bestand, zu 35pN. Außerdem war bei dieser Art DNA kein zweites Plateau zu beobachten.

Rief et al. sahen ebenfalls den Strukturübergang von der B-DNA zur S-DNA als Grund für das erste Plateau. Das Auftreten des zweiten Plateaus betrachteten sie als Folge des kraftinduzierten Schmelzens. Nach Erreichen des Plateauendes sei ihrer Meinung nach das Schmelzen zu 100 Prozent abgeschlossen. Rekombination beider Einzelstränge beim Relaxieren ergeben wieder die Hysterese-Effekte. Das Auftreten des zweiten Plateaus bei ca. 150pN bei λ -DNA im Vergleich zu ca. 300pN bei Doppelsträngen, die zu 100 Prozent aus GC-Basenpaaren bestehen, erklären Rief et al. mit einem teilweise auftretenden Schmelzen schon während des ersten Plateaus.

Bei Doppelsträngen, die vollständig aus AT-Basenpaaren bestehen, liegt das erste Plateau bei ca. 35pN und ein zweites ist nicht zu beobachten, woraus geschlossen wurde, dass bei dieser Art DNA das Schmelzen schon während des ersten Plateaus stattfindet (d.h. schon bei viel kleineren Kräften) und abgeschlossen wird und somit kein zweites Plateau zu beobachten ist. Dieser Umstand hat seinen Ursprung in der Tatsache, dass Adenin und Thymin nur durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander wechselwirken, wohingegen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen untereinander ausbilden. Da λ -DNA ein AT-GC-Verhältnis von etwa 1 zu 1 besitzt, gingen Rief et al. davon aus, dass die AT-Basenpaare der λ -DNA schon während des ersten Plateaus aufbrechen und der Rest des Doppelstranges dann bei ca. 150pN nach dem zweiten Plateau vollständig dissoziiert ist.

Williams et al. konnten 2001 zeigen, dass die Lage und die Länge des ersten Kraftplateaus abhängig vom pH-Wert des verwendeten Messpuffers ist [Wil+01a]. Im pH-Wert-Intervall von vier bis neun bleibt die Kraft während des Plateaus nahezu konstant, bei pH-Werten darüber bzw. darunter sinkt der Wert der Kraft, bei der das Kraftplateau zu beobachten ist. Zudem verzeichnet der Kraftverlauf während des Plateaus einen stärkeren Anstieg, d.h. die Kraft bleibt nicht mehr so konstant, wie im pH-Bereich von vier bis neun. Williams et al. zeigten 2001 ebenfalls, dass die Kraft des ersten Plateaus stark temperaturabhängig ist [Wil+01b]. Wäre das Plateau jedoch bedingt durch den Strukturwechsel von B-zu S-DNA, so dürfte die Lage des Plateaus nicht temperaturabhängig sein, da es sich lediglich um eine Restrukturierung der Bindungen handeln würde.

Wenner et al. legten 2002 die Abhängigkeit der Lage des ersten Kraftplateaus von der Ionenkonzentration dar [Wen+02]. Mit sinkender Ionenkonzentration sinkt auch der Wert

der Kraft des ersten Plateaus und die Persistenzlänge der DNA nimmt zu. Dies wird erklärt durch die Abnahme an Gegenionen, die die negative Ladung des DNA-Rückgrats abschirmen können. Somit wird die DNA steifer. Des Weiteren stoßen sich die negativen Ladungen stärker ab, was das Strecken der DNA erleichtert, sodass die Kraft abnimmt. Dieses zusätzliche Wissen über DNA führte zu einer neuen Hypothese über das Dehnungsverhalten von DNA. Die Arbeitsgruppe um Bloomfield erarbeitete im Jahre 2001 ein weiteres Modell für das Auftreten der Plateaus [RB01a; RB01b; Wil+01a].

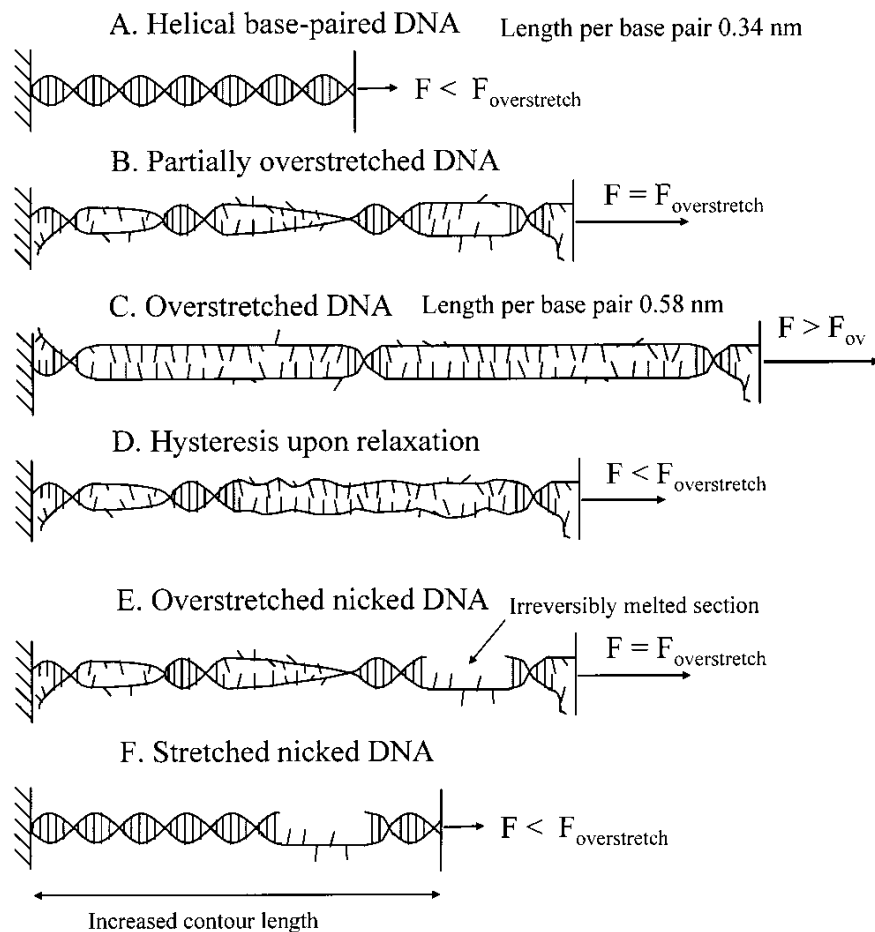


Abbildung 2.18. – Phasen während der Streckung eines B-DNA-Moleküls gemäß des Modells von Bloomfield et al., Graphik entnommen aus [Wil+01a]

Gemäß des Modells von Bloomfield et al. ist das erste Plateau während der Überstreckung von B-DNA nicht auf den Strukturübergang von B-DNA zur S-DNA zurückzuführen. Vielmehr tritt dieses Plateau aufgrund des kraftinduzierten Schmelzens auf. Bei kleinen Dehnungskräften bleibt die Helixstruktur zunächst erhalten (siehe Abbildung

2.18, A). Bei weiterer Dehnung und Kräften um 65pN setzt ein Prozess ein, bei dem der Großteil der Basenpaare domänenweise aufbricht. Dieser Prozess, der, laut Modell, in einem Quasi-Gleichgewicht stattfinden soll und bei dem diese Domänen ihre helikale Struktur verlieren, ist kooperativ, was bedeutet, dass schon entstandene, „aufgeschmolzene“ Domänen eher wachsen, als dass sich neue aufgeschmolzene Domänen ausbilden. Somit bleiben zunächst einige wenige, kurze nicht-geschmolzene Domänen übrig (siehe Abbildung 2.18, B).

Wächst die Kraft weiter über 65pN hinaus, so verlässt der Prozess den Bereich des Quasi-Gleichgewichts. Die wenigen kurzen, noch nicht aufgeschmolzenen Domänen trennen sich ebenfalls auf. Dies erklärt den Umstand, dass nach dem Ende des ersten Plateaus die Kraft bei zunehmender Streckung wieder stark ansteigt (siehe Abbildung 2.18, C).

Bei der starken Überstreckung können einige Domänen irreversibel geschmolzen sein, so z.B. durch Auftreten von Strangbrüchen. Zudem geht dieses Modell auch davon aus, dass die Rekombinierung der Basenpaare, die zusätzlich in der richtigen Sequenz passieren muss, teilweise relativ lange braucht. Dies soll dem Modell zufolge das Auftreten der Hysterese beim Relaxieren erklären. Zudem erklärt dieses Modell das Auftreten einer größeren Konturlänge der DNA nach der Dehnung durch irreversibel geschmolzene DNA-Teilbereiche (siehe Abbildung 2.18, D, E, F).

Im Jahre 2009 konnten van Mameren et al. mit einer Kombination aus Optischer Pinzette, Fluoreszenzmikroskopie und Mikrofluidik experimentell zeigen, dass beim Überdehnungsvorgang von DNA ein kooperativer Übergang von dsDNA zur ssDNA stattfindet, ohne dass sich zuvor die Struktur im Rahmen eines B-S-Übergangs ändert [Mam+09]. Dies visualisierten van Mameren et al., indem sie in verschiedenen, mit einer Optischen Pinzette erzeugten Dehnungsphasen ssDNA-bindende bzw. dsDNA-bindende Farbstoffmoleküle an das gedehnte Molekül anbinden ließen. Anschließend konnten sie mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Farbstoffverteilung entlang des DNA-Moleküls beobachten. Auf diese Weise zeigten sie, dass, wenn DNA in der 3'-3'-Anbindung (siehe Abbildung 2.16) gedehnt wird, das erste Plateau auf ein kraftinduziertes Schmelzen des Doppelstrangs zurückzuführen ist. Dieses Schmelzen beginnt an den freien 5'-Enden der Einzelstränge oder aber, wenn vorhanden, an Strangbrüchen mitten in den Strängen. Von dort „ribbelt“ die DNA dann auf und die dabei entstehenden freien Einzelstränge bilden ein statistisches Knäuel. Dieser Vorgang ist ebenfalls kooperativ. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die beiden Einzelstränge nicht komplett voneinander lösen und auch bei Kräften jenseits der 65pN immer noch einige Hundert Basenpaare bestehen bleiben. Dies wird damit erklärt, dass die Energie, die benötigt wird, ein Basenpaar zu trennen, abhängig von der Steifigkeit des DNA-Moleküls ist. Mit zunehmender Dehnung brechen immer

mehr Basenpaare auf und der DNA-Strang wird flexibler. Damit steigt die zur Trennung eines Basenpaars benötigte Energie. Dieser Effekt konnte auch schon von Bockelmann et al. 1997 gezeigt werden [BEH97]. In dieser Arbeit wurden die Einzelstränge eines dsDNA-Strangs vom selben Ende her reißverschlussförmig auseinander gezogen. Es konnte gezeigt werden, dass mit abnehmender Steifigkeit des DNA-Moleküls die zur Trennung der Basenpaare benötigte Energie wächst.

Wird DNA in der 5'3'-3'5'-Kombination auseinander gezogen, tritt das erste Plateau erst bei ca. 110pN auf, vorausgesetzt, es existieren keine Strangbrüche in den beiden Einzelsträngen. Van Mameren et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass es sich bei diesem Phasenübergang ebenfalls um ein kraftinduziertes Schmelzen handelt. Dieses Schmelzen beginnt in diesem Fall in einem zufälligen Bereich im DNA-Molekül, der reich an AT-Basenpaaren ist [ZMZ04], und breitet sich von dort durch das Molekül aus.

Die Ergebnisse von van Mameren et al. widerlegen teilweise das Modell von Smith et al., wonach der Strukturübergang von B-DNA zu S-DNA für das Auftreten des Plateaus verantwortlich ist.

Gross et al. zeigten im Jahre 2011 unter Zuhilfenahme einer Optischen Pinzette mit extrem hoher Kraftauflösung, dass zum einen das erweiterte WLC-Modell den Kraftverlauf der DNA-Streckung nur bis ca. 35pN ausreichend genau beschreibt und zum anderen der 65pN-Phasenübergang der DNA keinen glatten Verlauf nimmt, sondern ein Sägezahnmuster aufweist, wenn DNA in einer 5'3'-3'- bzw. 5'3'-5'-Konfiguration gedehnt wird [Gro+11]. Dieses Sägezahnmuster war bei unterschiedlichen DNA-Molekülen, die jedoch die gleiche Basenpaarsequenz besaßen, sehr ähnlich, was zu dem Schluss führt, dass die Form des Sägezahnmodells von der Basenpaarsequenz abhängt. Das Problem der signifikanten Abweichung der Kraftkurve vom erweiterten WLC-Modell bei Kräften über 35pN bis hin zum Beginn des Sägezahnmodells bei ca. 65pN konnten Groß et al. lösen, indem sie zusätzlich zur linearen Dehnung des DNA-Moleküls eine Zunahme der Konturlänge des DNA-Strangs verursacht durch kraftinduziertes Entwinden der Doppelhelix mit in das erweiterte WLC-Modell einbezogen. Dieses neue Modell, twistable Worm like Chain (tWLC)-Modell genannt, kann den Kraftverlauf bishin zum beginnenden Schmelzen der Doppelhelix sehr gut beschreiben. Zusätzliche Parameter wie die Verwindungssteifigkeit C und die Dreh-Dehnungs-Kopplung $g(F)$ gehen in dieses Modell mit ein. Die Auslenkung in Abhängigkeit der angelegten Kraft berechnet sich diesem Modell nach zu

$$x(F) = L \cdot \left(1 - \frac{1}{2} \cdot \sqrt{\frac{k_B T}{F \cdot l_P} + \frac{F \cdot C}{-g(F)^2 + \Phi \cdot C}} \right). \quad (2.28)$$

Das Sägezahnmuster während des Plateaus kann mit einem pulsartigen Aufbrechen der

Basenpaare erklärt werden. Ähnliche „Stick-slip“-Effekte konnten schon bei Experimenten beobachtet werden, bei denen die Einzelstränge eines dsDNA-Moleküls vom selben Ende her auseinander gezogen wurden [BEH97]. Basierend auf dem neuen tWLC-Modell und unter Verwendung statistisch physikalischer Modelle zur Modellierung von DNA-Schmelzprozessen konnten Gross et al. das Sägezahnmuster einer bestimmten Basenpaarsequenz mathematisch simulieren. Diese Simulation stimmt hervorragend mit einem gemessenen Sägezahnmuster dieser Basenpaarsequenz überein. Gross et al. konnten zeigen, dass eine partielle Entwindung einen Beitrag zum Dehnungsverhalten von dsDNA liefert. Darauf aufbauend entwickelten sie ein mathematisches Modell, mit dem der Phasenübergang von dsDNA bei einer Kraft von 65pN quantitativ verstanden werden kann.

2.4. Theoretische Berechnung der Resonanzfrequenzänderung im FM-AFM Modus

Im FM-AFM-Modus oszilliert der Cantilever stets bei seiner aktuellen Resonanzfrequenz. Die Resonanzfrequenz ändert sich in Abhängigkeit der Wechselwirkungen, die auf den Cantilever einwirken. Dies sind z.B. die sich ändernden Oberflächenwechselwirkungen, die ein Cantilever während des Annäherns an die Oberfläche erfährt.

Die Anregung bei der aktuellen Resonanzfrequenz wird durch eine Rückkopplungsschleife (*engl.* feedback-loop) erreicht. Das Schwingungssignal des Cantilevers wird gemessen, um 90° phasenverschoben, verstärkt und als Anregungssignal für den Cantilever benutzt.

Ändert sich die effektive Kraft auf den Cantilever, so ändern sich auch die Resonanzbedingungen und somit die Resonanzfrequenz. Dies ist die Grundlage der dynamischen Kraftspektroskopie im FM-Modus, wie sie in dieser Arbeit angewendet wird. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass durch Messung der Resonanzfrequenzänderung die momentan wirkende Kraft auf den Cantilever bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Resonanzfrequenzänderung von der momentan wirkenden Kraft wird die Annahme gemacht, dass die Änderung der Resonanzbedingungen nur sehr klein ist und somit das Modell eines schwach gestörten, harmonischen Oszillators angenommen werden kann. Der Ausdruck für die Resonanzfrequenzänderung wurde erstmalig von Franz Giessibl 1997 hergeleitet [Gie97]. Diese Herleitung wird im folgenden skizziert.

Der Cantilever mit der Federkonstante k und der effektiven Masse m^* habe die Resonanzfrequenz f_0 und oszilliere mit der Amplitude A_0 . Der kleinste Abstand der Spitze zur

Oberfläche, also der Abstand des unteren Umkehrpunktes zur Oberfläche, werde mit d bezeichnet. Die Auslenkung des Cantilevers sei $z(t)$. Der aktuelle Abstand der Spitze zur Oberfläche $q(t)$ ergibt sich dann zu

$$q(t) = z(t) + d + A_0. \quad (2.29)$$

Für den ungestörten Cantilever gilt die folgende Hamiltonfunktion:

$$H_0 = \frac{p^2}{2 \cdot m^*} + \frac{k \cdot z(t)^2}{2} \quad (2.30)$$

Die ungestörte Bewegung entspricht einer harmonischen Oszillation

$$z(t) = A_0 \cdot \cos(\omega_0 \cdot t) \quad (2.31)$$

mit der Resonanzkreisfrequenz

$$\omega_0 = 2\pi \cdot f_0 \quad (2.32)$$

sowie der Resonanzfrequenz

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{m^*}} \quad (2.33)$$

und der Periodendauer

$$T_0 = \frac{1}{f_0}. \quad (2.34)$$

Der Impuls

$$p(t) = m^* \cdot \frac{dz(t)}{dt} \quad (2.35)$$

berechnet sich so zu

$$p(t) = -m^* \cdot A_0 \cdot 2 \cdot \pi \cdot f_0 \cdot \sin(\omega_0 \cdot t) \quad (2.36)$$

Eine Kraft F_{ts} , die auf den Cantilever wirkt, sorgt für eine Störung. Die Hamiltonfunktion der Störung ergibt sich aus dem Potential V_{ts} dieser Kraft:

$$\Delta H = V_{ts}. \quad (2.37)$$

Für die gesamte Hamiltonfunktion ergibt sich somit

$$H = H_0 + \Delta H. \quad (2.38)$$

Um einen Ausdruck für die Frequenzänderung zu bekommen, wird zunächst eine Variablentransformation unternommen. Die Impuls- und Auslenkungsvariablen (p, z) werden in Wirkung- und Phasenverschiebungsvariablen (J, β) transformiert gemäß folgender Vorschriften:

$$z(t) = \sqrt{\frac{2 \cdot f_0 \cdot J}{k}} \cdot \sin[2\pi(f_0 \cdot t + \beta)] \quad (2.39)$$

$$p(t) = \sqrt{\frac{k \cdot J}{2 \cdot \pi^2 \cdot f_0}} \cdot \cos[2\pi(f_0 \cdot t + \beta)] \quad (2.40)$$

Ein Vergleich von Gleichung (2.31) mit Gleichung (2.39) ergibt für den ungestörten Fall ($V_{ts} = 0$)

$$J = \frac{k \cdot A_0^2}{2 \cdot f_0} \quad (2.41)$$

$$\beta = \frac{1}{4}. \quad (2.42)$$

Ist eine Störung vorhanden ($V_{ts} \neq 0$), so lassen sich die zeitlichen Änderungen von J und β gemäß den hamiltonschen Bewegungsgleichungen berechnen

$$\frac{dJ}{dt} = -\frac{\partial H}{\partial \beta} \quad (2.43)$$

$$\frac{d\beta}{dt} = \frac{\partial H}{\partial J}. \quad (2.44)$$

Erfährt der Cantilever im dem Intervall $-A_0 \leq z(t) \leq A_0$ durch die Störung, verglichen zur ungestörten Situation, einen nur sehr kleinen Störpotentialgradienten (d.h. ist die von extern wirkende Störkraft sehr klein zur anregenden Kraft, gilt also

$$\max \left[\left| \frac{\partial H_0(z(t))}{\partial z(t)} \right| \right] \gg \max \left[\left| \frac{\partial \Delta H(z(t))}{\partial z(t)} \right| \right], \quad (2.45)$$

so kann die Bewegung des Cantilevers weiterhin als näherungsweise harmonisch angesehen werden. Die Frequenz dieser Oszillation hat sich durch die Störung und den damit

einhergehenden, veränderten Resonanzbedingungen geändert.

Die neue Frequenz berechnet sich gemäß $f = f_0 + \Delta f$. Des Weiteren gilt, dass näherungsweise die Änderung der Gesamthamiltonfunktion nur auf die Änderung des Störpotentials zurückzuführen ist.

Es gilt

$$\frac{\partial H}{\partial J} \approx \frac{\partial V_{\text{ts}}}{\partial J} \quad (2.46)$$

d.h. die ungestörte Hamiltonfunktion ist bezüglich ihrer Wirkung konstant.

Die Frequenzänderung Δf berechnet sich dann gemäß

$$\Delta f = \left\langle \frac{d\beta}{dt} \right\rangle = \left\langle \frac{\partial V_{\text{ts}}}{\partial J} \right\rangle = \left\langle \frac{\partial V_{\text{ts}}}{\partial z(t)} \cdot \frac{\partial z(t)}{\partial J} \right\rangle \quad (2.47)$$

Die spitzen Klammern bedeuten die zeitliche Mittlung der Argumente. Sie erstreckt sich über eine ganze Periodendauer. Aus Gleichung (2.39) folgt für den ungestörten Fall

$$\frac{\partial z(t)}{\partial J} = \frac{z(t)}{2 \cdot J} = \frac{f_0}{k \cdot A_0^2} \cdot z(t). \quad (2.48)$$

Gleichung (2.48) eingesetzt in das Ergebnis von Gleichung (2.47) liefert

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{1}{k \cdot A_0^2} \cdot \langle F_{\text{ts}}(q(t)) \cdot z(t) \rangle. \quad (2.49)$$

Um verschiedene Messungen mit unterschiedlichen Cantilevern vergleichen zu können, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Frequenzänderung der Resonanzfrequenz auf die Resonanzfrequenz des ungestörten Cantilevers zu normieren.

Mit den Gleichungen (2.29) und (2.31) ergibt sich die normierte Frequenzänderung zu

$$\frac{\Delta f}{f_0} \quad (2.50)$$

$$= -\frac{1}{k \cdot A_0^2 \cdot T_0} \cdot \int_0^{T_0} F_{\text{ts}}(z(t) + d + A_0) \cdot z(t) dt \quad (2.51)$$

$$= -\frac{1}{k \cdot A_0^2 \cdot T_0} \cdot \int_0^{T_0} F_{\text{ts}}[A_0 \cdot \cos(2\pi f_0 t) + d + A_0] \cdot A_0 \cdot \cos(2\pi f_0 t) dt \quad (2.52)$$

$$= -\frac{1}{k \cdot A_0 \cdot T_0} \cdot \int_0^{T_0} F_{\text{ts}}\{d + A_0 \cdot [1 + \cos(2\pi f_0 t)]\} \cdot \cos(2\pi f_0 t) dt \quad (2.53)$$

Gleichung (2.53) kann mit Hilfe einer Substitution vereinfacht werden. Wird

$$u \equiv \cos(2\pi f_0 t) \quad (2.54)$$

gesetzt, so ergibt sich für das Differential unter Verwendung des trigonometrischen Pythagoras

$$dt = -\frac{1}{2\pi f_0 \cdot \sqrt{1-u^2}} du. \quad (2.55)$$

Einsetzen in Gleichung (2.53) und Anpassung der Integralgrenzen liefert

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{1}{k \cdot A_0 \cdot \pi} \cdot \int_{-1}^1 F_{ts} [d + A_0 \cdot (1 + u)] \cdot \frac{u}{\sqrt{1-u^2}} du \quad (2.56)$$

Dieser Ausdruck beschreibt die normierte Resonanzfrequenzänderung in Abhängigkeit der auf den Cantilever wirkenden Kraft. Sie ist gültig für alle Amplituden und wurde unter der Annahme hergeleitet, dass das Wechselwirkungspotential genügend klein ist, sodass anharmonische Beiträge zur Bewegung des Cantilevers vernachlässigt werden können. Mathematisch betrachtet ist Gleichung (2.56) die Faltung der Kraft F_{ts} mit einer Gewichtsfunktion.

2.5. Berechnung der Kräfte aus den Resonanzfrequenzänderungen

Die Messgrößen, die bei dynamischen Kraftspektroskopie-Experimenten im FM-AFM Modus aufgenommen werden, sind die Resonanzfrequenzveränderungen sowie die momentanen Schwingungsamplituden ($\Delta f, A$) in Abhängigkeit des Abstandes d zur Oberfläche.

Wird im FM-AFM-Modus die Amplitude der Cantileveroszillation durch eine Rückkopplungsschleife konstant gehalten, so wird vom Constant-Amplitude-Mode (CA-Mode) gesprochen. Eine verstärkte Anregung des Cantilevers gleicht die Dämpfung durch externe Kräfte aus. Nur die Resonanzfrequenz der Cantileveroszillation ändert sich.

Eine andere Betriebsart des FM-AFM-Modus ist der sogenannte Constant-Excitation-Modus. Die Intensität der Anregung des Cantilevers bleibt während der gesamten Messung konstant. Dadurch ändern sich aufgrund der äußeren Wechselwirkungen sowohl Amplitude als auch Resonanzfrequenz.

Um einen Ausdruck zur Berechnung der Kraft aus $(\Delta f, A)$ -Daten zu bekommen, muss

Gleichung (2.56) invertiert werden. Für diese nicht triviale Aufgabe wurden mehrere Strategien entwickelt. Im Folgenden soll jedoch die Methode von J. Sader et. al. näher erläutert werden [SJ04a; SJ04b]. Basierend auf dieser Methode werden auch die Messwerte im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet.

Zunächst wird die Kraft $F_{\text{ts}}(z)$ ausgedrückt als

$$F_{\text{ts}}(z) = \int_0^{\infty} L^{-1}\{F_{\text{ts}}(z)\} \cdot e^{-\lambda z} d\lambda \quad (2.57)$$

Dieser Ausdruck stellt eine Laplace-Transformation dar, wobei $L^{-1}\{F_{\text{ts}}(z)\}$ die inverse Laplace-Transformation von $F_{\text{ts}}(z)$ repräsentiert. Die Laplace-Transformation bzw. die inverse Laplace-Transformation sind definiert als

$$L\{Y(\lambda)\} = \int_0^{\infty} Y(\lambda) \cdot e^{-\lambda z} d\lambda \quad (2.58)$$

$$L^{-1}\{Y(z)\} = \frac{1}{2\pi i} \int_{c-i\infty}^{c+i\infty} Y(z) \cdot e^{\lambda z} dz, \quad c \in \mathbb{R}. \quad (2.59)$$

Einsetzen von Gleichung(2.57) in Gleichung (2.56) führt zu

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{1}{kA_0} \cdot \int_0^{\infty} L^{-1}\{F_{\text{ts}}(z)\} \cdot T(\lambda A_0) \cdot e^{-\lambda z} d\lambda \quad (2.60)$$

wobei

$$T(\lambda A_0) = I_1(\lambda A_0) \cdot e^{-\lambda A_0} \quad (2.61)$$

mit $I_1(\lambda A_0)$ der modifizierten Besselfunktion erster Ordnung darstellt.

Gleichung (2.60) lässt erkennen, dass sich die normierte Frequenzänderung und die Kraft F_{ts} im Laplace-Raum lediglich in der Funktion $T(kA_0)$ unterscheiden. Dieser Umstand ermöglicht die exakte Invertierung von Gleichung (2.56).

Die Kraft in Abhängigkeit der inversen Laplace-Transformation der Frequenzänderung kann ausgedrückt werden als

$$F_{\text{ts}}(z) = L\left\{\frac{kA_0}{T(\lambda A_0)} \cdot L^{-1}\left\{\frac{\Delta f}{f_0}\right\}\right\}. \quad (2.62)$$

Gleichung (2.62) stellt eine Invertierung von Gleichung (2.56) dar. Jedoch ist der prak-

tische Nutzen dieser Formulierung mit der Laplace-Transformation eher gering, da die numerische Berechnung der Laplace-Transformation sehr aufwändig und langwierig ist. Um einen handhabbareren Ausdruck zu bekommen, wird die Funktion $T(x)$ durch eine Padé-Approximation ausgedrückt:

$$T(x) = \frac{x}{2} \cdot \left(1 + \frac{1}{8} \sqrt{x} + \sqrt{\frac{\pi}{2}} x^{\frac{3}{2}} \right)^{-1}. \quad (2.63)$$

Um $F_{ts}(z)$ aus der Resonanzfrequenzänderung konkret zu berechnen, werden die Eigenschaften des fraktionales Integrals nach Liouville sowie der fraktionales Ableitung nach Liouville ausgenutzt.

Das fraktionales Integral der Ordnung α nach Liouville ist definiert als

$$I_-^\alpha \varphi(\lambda) = \frac{1}{\Gamma(\alpha)} \cdot \int_\lambda^\infty \varphi(t) \cdot (t - \lambda)^{\alpha-1} dt \quad (2.64)$$

und die dementsprechende fraktionales Ableitung als

$$D_-^\alpha \varphi(\lambda) = \frac{(-1)^n}{\Gamma(n - \alpha)} \cdot \frac{d^n}{d\lambda^n} \int_\lambda^\infty \frac{\varphi(t)}{(t - \lambda)^{\alpha-n+1}} dt \quad (2.65)$$

mit der Gamma-Funktion $\Gamma(\alpha)$. Die Ordnung $\alpha > 0$ kann jede beliebige reelle Zahl sein. Die Zahl n ist definiert als $n = [\alpha] + 1$, wobei $[\alpha]$ der Integer-Teil von α ist.

Mit Hilfe der Definitionen (2.64) und (2.65) können die Laplace-Transformationen in Gleichung (2.62) umformuliert werden. Benutzung der Padé-Approximation für $T(\lambda A_0)$ (2.63) ergibt schließlich

$$F_{ts}(z) = 2 \cdot k \cdot \int_z^\infty \left[1 + \frac{A_0^{\frac{1}{2}}}{8\sqrt{\pi \cdot (t - z)}} \right] \cdot \Omega(t) - \frac{A_0^{\frac{3}{2}}}{\sqrt{2 \cdot (t - z)}} \cdot \frac{d\Omega(t)}{dt} dt \quad (2.66)$$

wobei $\Omega(t)$ die normierte Resonanzfrequenzänderung darstellt.

Ausdruck (2.66) ist eine näherungsweise Invertierung von Gleichung (2.56). Die Qualität der Näherung ist bestimmt durch die Güte der Approximation von $T(\lambda A_0)$. Der Fehler der Padé-Approximation ist für alle Werte von λA_0 kleiner als fünf Prozent. Daher ist der Fehler bei der Invertierung ebenfalls in diesem Größenbereich.

Integration von Ausdruck (2.66) über z , wieder unter Zuhilfenahme der Ausdrücke (2.64) und (2.65), führt zu einer Formel für das Potential der Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze, sie lautet

$$U_{ts}(z) = 2 \cdot k \cdot \int_z^\infty \Omega(t) \cdot \left[(t-z) + \frac{\sqrt{A_0}}{4} \cdot \sqrt{\frac{t-z}{\pi}} + \frac{A_0^{\frac{3}{2}}}{\sqrt{2 \cdot (t-z)}} \right] dt. \quad (2.67)$$

2.6. Berechnung der Energiedissipation

Eine weitere Größe, die durch die Verwendung des Constant-Excitation-FM-AFM-Modus bestimmt werden kann, ist die Energiedissipation pro Schwingungszyklus. Neben konservativen Wechselwirkungen erfährt die Oszillation weitere dissipative Effekte, wie z. B. die Dämpfung, die durch die Auslenkung des Cantilevers (intrinsische Dämpfung) und die Reibung im Umgebungsmedium (externe Dämpfung) verursacht wird. Die Summe aller Effekte führt zu einem Energieverlust des Oszillators. Dieser bewirkt eine Verkleinerung der Schwingungsamplitude.

Im Folgenden soll die Herleitung eines Ausdrucks zur Berechnung der Energiedissipation aus den Amplitudenänderungen anhand der Arbeit von Anczykowski et al. [Anc+99] skizziert werden.

Befindet sich die Cantileveroszillation in einem dynamischen Gleichgewicht, so wird dem System gerade soviel Energie zugeführt, wie es durch dissipative Effekte verliert. Der mittlere Leistung \bar{P}_{in} , die zum Aufrechterhalten der Schwingungsamplitude nötig ist, setzt sich, wie oben beschrieben, zusammen aus der mittleren dissipativen Leistung \bar{P}_0 und der mittleren Leistung der Spitze-Probe-Wechselwirkung \bar{P}_{ts} .

$$\bar{P}_{in} = \bar{P}_0 + \bar{P}_{ts} \quad (2.68)$$

Die Leistung \bar{P}_{in} wird durch den Anregungspiezokristall in die Cantilerveroszillation eingebracht. Die Schwingung des Cantilevers sei beschrieben durch den Ausdruck $z(t)$, die Oszillation des Anregungspiezokristalls sei $z_d(t)$. Die eingespeiste Leistung berechnet sich als Produkt aus der Kraft, die der Anregungspiezokristall auf den Cantilever ausübt und seiner Geschwindigkeit.

$$\bar{P}_{in} = F_d(t) \cdot \dot{z}_d(t) = k[z(t) - z_d(t)] \cdot \dot{z}_d(t) \quad (2.69)$$

Dabei sei k die Federkonstante des Cantilevers.

Des Weiteren wird angenommen, dass der Anregungspiezokristall eine harmonische Oszillation gemäß

$$z_d(t) = A_d \cdot \cos(\omega t), \quad (2.70)$$

ausführt, wobei A die Amplitude und ω die Kreisfrequenz der Piezo-Schwingung darstellt. Die Auslenkung des Cantilevers aus der Ruhelage kann dann beschrieben werden mit

$$z(t) = A \cdot \cos(\omega t - \varphi). \quad (2.71)$$

Hier bezeichnet A die Amplitude und $0 \leq \varphi \leq \pi$ die Phasenverschiebung der Cantileverauslenkung.

Mit den Ausdrücken (2.70) und (2.71) kann aus (2.69) die mittlere Leistung \bar{P}_{in} berechnet werden. Sie ergibt sich zu

$$\bar{P}_{in} = \frac{1}{T} \cdot \int_0^T P_{in}(t) dt = \frac{1}{2} \cdot k \cdot \omega \cdot A_d \cdot A \cdot \sin(\varphi) \quad (2.72)$$

An Ausdruck (2.72) ist zu erkennen, dass die maximale Leistung bei einer Phasenverschiebung von $\varphi = 90^\circ$ übertragen wird.

Die zwei hauptsächlichen Dämpfungsmechanismen sind die intrinsische Dämpfung des Cantilevers, die durch seine Auslenkung entsteht und auf das Bestreben des Cantilevermaterials, der Auslenkung entgegenzuwirken, beruht und der Dämpfung der Oszillation im Umgebungsmedium, bedingt durch Reibungskräfte zwischen Cantilever und Medium. Beiden Dämpfungen können Dämpfungskoeffizienten α_1 und α_2 zugeordnet werden. Des Weiteren ist zu bemerken, dass beide Dämpfungen geschwindigkeitsabhängig sind. Die Leistungsverluste, verursacht durch die beiden Dämpfungsmechanismen, berechnen sich gemäß

$$P_{01}(t) = |F_{01}(t) \cdot \dot{z}(t)| = |\alpha_1 \cdot [\dot{z}(t) - \dot{z}_d(t)] \cdot \dot{z}(t)| \quad (2.73)$$

bzw.

$$P_{02}(t) = |F_{02}(t) \cdot \dot{z}(t)| = |\alpha_2 \cdot \dot{z}(t)^2| \quad (2.74)$$

Aus den Ausdrücken (2.73) und (2.74) lassen sich die über eine Schwingung gemittelten Leistungsverluste berechnen zu

$$\bar{P}_{01}(t) \quad (2.75)$$

$$= \frac{1}{T} \cdot \int_0^T P_{01}(t) dt \quad (2.76)$$

$$= \frac{1}{\pi} \alpha_1 \omega^2 A \left[(A - A_d \cos(\varphi)) \arcsin \left(\frac{A - A_d \cos(\varphi)}{\sqrt{A^2 + A_d^2 - 2AA_d \cos(\varphi)}} \right) + A_d \sin(\varphi) \right] \quad (2.77)$$

bzw.

$$\bar{P}_{02}(t) = \frac{1}{T} \cdot \int_0^T P_{02}(t) dt \quad (2.78)$$

$$= \frac{1}{2} \cdot \alpha_2 \cdot \omega^2 \cdot A^2 \quad (2.79)$$

Unter der Annahme, dass die Schwingungsamplitude des Cantilevers sehr viel größer ist als die Anregungsamplitude des Anregungspiezokristalls, $A \gg A_d$, kann Ausdruck (2.77) in guter Näherung in eine Form analog zu Ausdruck (2.79) gebracht werden. Somit ergibt sich für die Größe \bar{P}_0 , als Summe der gemittelten Leistungsverluste der beiden Dämpfungsmechanismen der Ausdruck

$$\bar{P}_0 = \frac{1}{2} \cdot \alpha \cdot \omega^2 \cdot A^2, \quad \text{mit } \alpha = \alpha_1 + \alpha_2. \quad (2.80)$$

Der effektive Dämpfungskoeffizient α kann durch die experimentell zugänglichen Größen Q , der Q-Faktor des Cantilevers, k , der Federkonstante des Cantilevers und ω_0 , der Resonanzkreisfrequenz des frei oszillierenden Cantilevers ausgedrückt werden. Es gilt

$$\alpha = \frac{k}{Q \cdot \omega_0}. \quad (2.81)$$

Mit Hilfe dieser Definition folgt für den gemittelten Leistungsverlust durch die Spitze-Probe-Wechselwirkung

$$\bar{P}_{\text{tip}} = \bar{P}_{\text{in}} - \bar{P}_0 = \frac{1}{2} \frac{k \cdot \omega}{Q} \cdot \left[Q \cdot A_d \cdot \sin(\varphi) - A^2 \cdot \frac{\omega}{\omega_0} \right] \quad (2.82)$$

Im FM-AFM-Modus oszilliert der Cantilever stets bei seiner Resonanzfrequenz. Die

Phasenverschiebung ist zwecks maximalen Leistungsübertrags auf $\varphi = 90^\circ$ eingestellt. Des Weiteren gilt für die Anregungsamplitude

$$A_d = \frac{A_0}{Q} \quad (2.83)$$

mit der freien Amplitude der Cantileverschwingung, d.h. der Cantileverschwingung ohne Probe-Spitze-Wechselwirkung.

Mit diesen Bedingungen reduziert sich Ausdruck (2.82) zu

$$\bar{P}_{\text{tip}} = \frac{1}{2} \frac{k\omega_0}{Q} [A_0 A - A^2] \quad (2.84)$$

Ausdruck (2.84) beschreibt den über eine Schwingungsperiode gemittelten Leistungsverlust, der auf die Probe-Spitze-Wechselwirkung zurückzuführen ist. Aus ihm folgt für die Energie, die pro Schwingung aufgebracht werden muss

$$\Delta E(A) = \pi \cdot k \cdot \left(\frac{A A_0}{Q} - \frac{A^2}{Q} \right) \quad (2.85)$$

Dieser Ausdruck erlaubt die Berechnung der Energiedissipation aus den gemessenen Werten der Amplitude.

3. Material und Methoden

3.1. Das Multimode 8 AFM

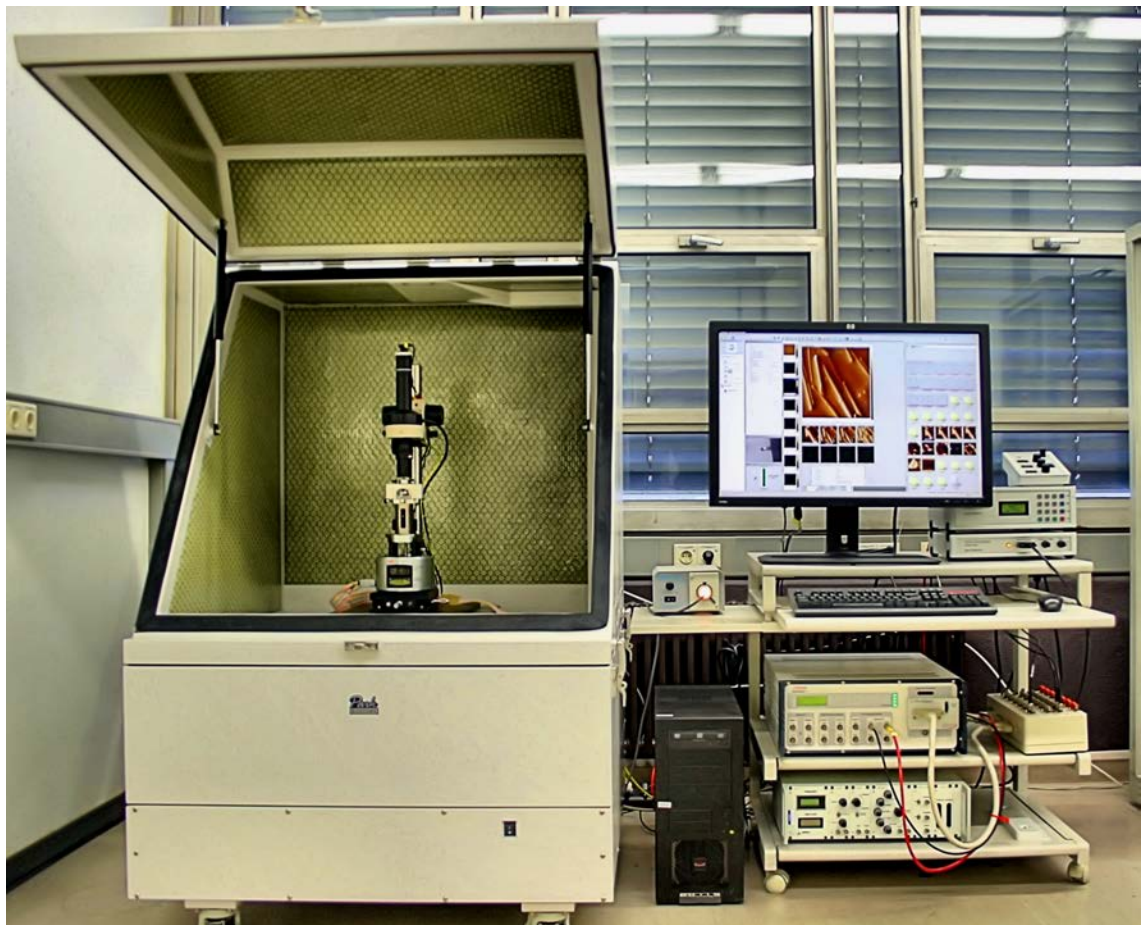


Abbildung 3.1. – Aufnahme des gesamten Messaufbaus.

Sowohl die kraftspektroskopischen Messungen als auch alle Abbildungen von Oberflächentopographien wurden mit dem Multimode 8 der Firma BRUKER gemacht.

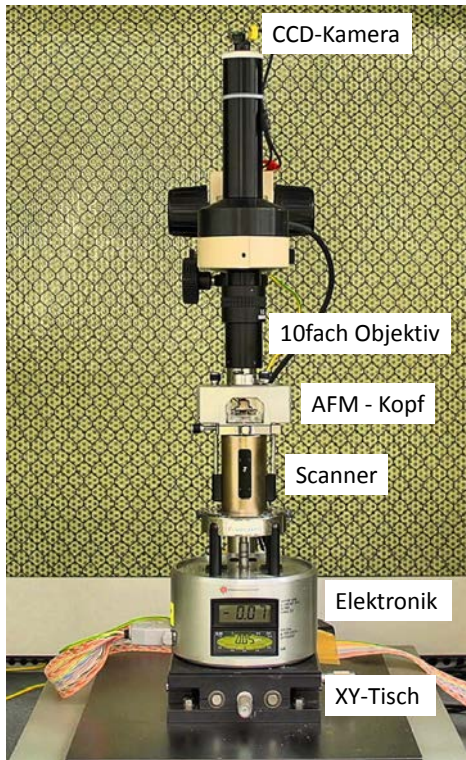


Abbildung 3.2. – Aufbau des AFMs

reich von $5,4\mu\text{m}$ hat. Durch regelmäßige Kalibrationen konnte der Fehler in der Scanbewegung unter 2% gehalten werden.

Das AFM wird mit einem Nanoscope V-Controller betrieben, der über die Nanoscope Version 8.16-Software gesteuert wird.

Das AFM besteht aus einem AFM-Kopf, in dem die Laser-Diode als auch der Quadrantenphotodetektor integriert ist. Der Aufbau des Kopfes ist in Abbildung (3.3) gezeigt.

Dieser Kopf liegt auf einem in der Scannereinheit integrierten Dreibein auf. Dieses Dreibein lässt sich mit Hilfe eines Schrittmotors in der Höhe verstellen, sodass damit der AFM-Kopf und somit der Cantilever dem Substrat, das magnetisch auf dem Piezo-Element des Scanners befestigt ist, grob angenähert werden kann. Das Piezo-Element mit dem Substrat ragt dabei durch ein Loch im XY-Tisch des AFM-Kopfes.

Für Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der J-Scanner benutzt, der einen z -Scanbereich

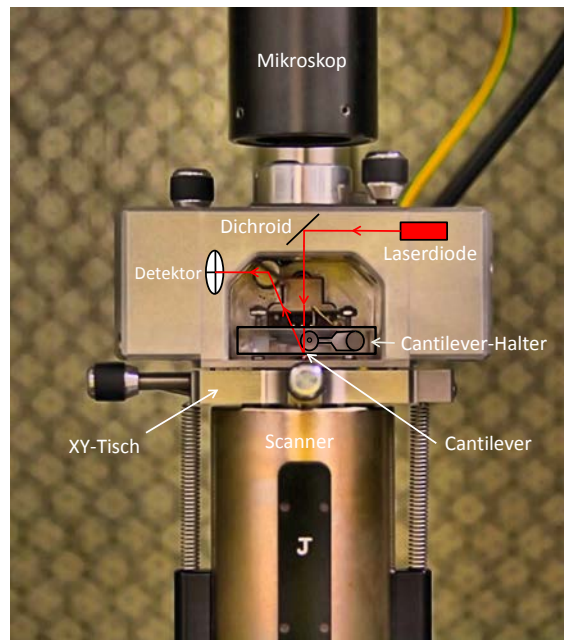


Abbildung 3.3. – Der Multimode AFM-Kopf mit eingebautem Cantileverhalter. Eingezeichnet sind die ungefähre Lage von Laserdiode, Quadrantenphotodetektor sowie der Lichtweg des Laser-Strahls. Nicht skizziert sind Strahlaufweitung und -fokussierung. Des Weiteren sind zur besseren Erkennung die Umriss des Cantileverhalters mit den Bohrungen eingezeichnet.

Vor der Messung wird die Laserdiode auf den vorderen Teil des Cantilevers justiert. Dies wird beobachtet durch das Mikroskop, das eine 10fache Vergrößerung ermöglicht. Durch anschließende Justage des Umlenkspiegels sowie der Detektorposition wird der maximal mögliche Summensignalpegel eingestellt und das Differenzsignal in die Nulllage gebracht. Daraufhin kann das sogenannte Cantilever-Tuning durchgeführt werden, bei dem die Anregung des Cantilevers bzgl. Resonanzfrequenz und Schwingungsamplitude eingestellt wird. Dies geschieht softwareseitig.

Um das gesamte AFM vor externen Schwingungen zu schützen, steht das AFM auf einem aktiven Dämpfungstisch. Dabei handelt es sich um den TS-150 der Firma TABLE STABLE. Dieser Vibrationsisolator dämpft Vibrationen im Frequenzbereich von 0,7-200Hz dynamisch, Frequenzen von 200-1000Hz passiv. Die Dämpfung liegt dabei nach Herstellerangaben im Bereich von ca. -45dB .

Zusätzlich zum aktiven Vibrationsisolator steht die gesamte Apparatur, inklusive dem Vibrationsisolator, in einer Schallschutzbox der Firma PARK, die durch eine schwere Granit-Bodenplatte zusätzlichen Schutz vor externen Schwingungen bietet.

3.2. Das QFM-Modul



- (a) QFM Modul. Der Drehschalter rechts unten dient zum Umstellen zwischen regulärem Tapping-Modus und dem CE-Modus. Über das Tastenfeld wird am Modul u.a. die freie Resonanzfrequenz eingestellt.
- (b) Remote Control, mit dem obersten Drehknopf wird das Q-Control (de)aktiviert, mit dem Drehknopf mit der Beschriftung „Phase Shift“ lässt sich die Phasenverschiebung einstellen. Mit dem „Feedback Amplitude“-Schalter wird die Intensität des Q-Controls geregelt, der Drehknopf „Drive Amplitude“ regelt die Amplitude der Anregungsspiezschwingung.

Abbildung 3.4. – Fotografie des QFM-Controllers mit der Remote-Control-Einheit.

Zur Implementierung des Constant-Excitation-Modus ist zusätzliche Hardware erforderlich. Dabei handelt es sich um das QFM-Modul der Firma NANOANALYTICS, *Münster, Deutschland*. Diese Zusatzelektronik ermöglicht den Betrieb des AFMs im FM-Modus mit konstanter Anregung (Constant-Excitation) mit und ohne aktiviertem Q-Control sowie im AM-Modus mit aktiviertem Q-Control. Bei deaktiviertem QFM-Modul arbeitet das AFM wie gewohnt.

Das QFM-Modul besteht zum einen aus einer Q-Control-Elektronik (siehe Kapitel (2.1.4)). Im Unterschied zu einer reinen Q-Control-Elektronik ist es beim QFM-Modul möglich, mit

Hilfe eines Schalters, wie er in der schemenhaften Abbildung (2.5) zu erkennen ist, den externen Funktionsgenerator abzukoppeln (obere Schalterstellung), sodass der Cantilever nur noch durch sein eigenes, phasenverschobenes Feedback zum Oszillieren angeregt wird. Dazu ist ein weiterer Amplituden-Controller im Selbstanregungskreis eingebaut (in der Abbildung 2.5 A_{exc} genannt), mit der die Amplitude des Anregungspiezokristalls gewählt werden kann und während der Messung konstant hält (\rightarrow constant excitation). Dieser zusätzliche Controller ist deaktiviert, wenn sich der Schalter in der unteren Stellung befindet (AM-Modus).

Um die Funktion des QFM-Moduls herzustellen, muss das Schwingungssignal des Cantilevers in die Elektronik eingekoppelt werden. Dies geschieht über eine Break-Out-Box, die in das D-Sub 37 Kabel zwischen Controller und AFM eingebracht ist. Von der Break-Out-Box wird dieses Signal vom AFM kommend über ein BNC-Kabel in das QFM-Modul eingespeist. Dort wird es phasenverschoben, verstärkt und über die Break-Out-Box wieder über ein weiteres BNC-Kabel dem AFM zugeführt und dient so als Anregungssignal des Cantilevers. Auf diese Weise wird der Constant-Excitation-Modus bzw. die Q-Control-Funktion (oder beide Funktionen parallel) ermöglicht (je nach Schalterstellung).

Zum anderen besteht das QFM-Modul aus einem Frequenzdetektor. Relativ zu einer zuvor definierten Referenzfrequenz bestimmt der Frequenzdetektor die Frequenzverschiebung und gibt ein proportionales Spannungssignal aus, welches gemessen wird. Zudem misst das QFM-Modul ebenfalls die Schwingungsamplitude des Cantilevers. Beide Signale werden in zwei externe analoge Eingänge des Nanoscope 5 Controllers eingespeist und mit der Nanoscope Software als zwei weitere Kanäle gemessen.

3.3. Präparation

3.3.1. Der DNA-Digest

Nr. des Fragments	Länge in Basenpaaren	Länge in μm
1	8454	2,874
2	7242	2,462
3	6369	2,165
4	5686	1,933
5	4822	1,639
6	4324	1,47
7	3675	1,249
8	2323	0,79
9	1929	0,655
10	1371	0,466
11	1264	0,43
12	702	0,239
13	224	0,076
14	117	0,039

Tabelle 3.1. – Längen der unterschiedlichen DNA-Fragmente einer BstEII-Ladder in absteigender Reihenfolge. Entnommen dem beiliegenden Datenblatt.

Als Proben-DNA wird eine kommerzielle DNA-Ladder der Firma SIGMA-ALDRICH, *Saint Louis, Missouri, USA*, verwendet. Dabei handelt es sich um λ -DNA, die durch das Restriktionsenzym BStEII verdaut wurde und dabei in 14 unterschiedlich lange DNA-Fragmente zerschnitten wurde (siehe Kap. 2.3.2). Die Längen der unterschiedlichen Fragmente sind in Tabelle (3.1) aufgeführt.

Die Konzentration von DNA in der von SIGMA-ALDRICH gelieferten Stammlösung beträgt $484 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$. Die DNA ist in TRIS HCl-Puffer¹ gelöst und im tiefgefrorenen Zustand geliefert worden. Diese Stammlösung wird dann mit TRIS HCl-Puffer auf eine Konzentration von $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ verdünnt. Anschließend wird die verdünnte Lösung in Portionen á $50 \mu\text{l}$ aufgeteilt und wieder tiefgefroren bei einer Temperatur von -25°C . Das Aufteilen der Lösung in kleine Portionen hat den Vorteil, dass zu Beginn der Präparation für eine Messung nur die DNA-Lösungsmenge aufgetaut werden muss, die auch verwendet wird.

¹TRIS HCl-Puffer ist eine Lösung aus 10mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), 150mM Natriumchlorid und 1mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat, die mit Hilfe von Salzsäure (HCl) auf den gewünschten pH-Wert (hier: pH = 8) eingestellt wird (durch Titration)).

3.3.2. Substrate

Als Substrate für die Messungen werden sogenannte Template-Stripped-Gold-Substrate (kurz: TSG-Substrate) verwendet. Dabei handelt es sich um Gold-Substrate, die eine sehr geringe Rauheit aufweisen. Durch ein Verfahren, das Hegner et al. 1993 publizierten, können Goldoberflächen mit atomar glatten Bereichen, die Größen von mehreren Quadratmikrometern haben können, produziert werden [HWS93]. An diese Prozedur angelehnt werden die TSG-Substrate für die Messungen in dieser Arbeit hergestellt.

Dabei wird zunächst ein Substrat, bestehend aus dem atomar flachen Schichtsilikat MICA, für ca. 20 Stunden im Vakuum ($p=10^{-5}$ mbar) ausgeheizt. Nach einer ausreichenden Abkühlphase wird dann eine ca. 200nm dicke Goldschicht, gefolgt von einer ca. 20nm dicken Chromschicht, auf das MICA aufgesputtert. Auf diese Chromschicht² wird dann ein Deckgläschen mit einem niedrigviskosen Zwei-Komponenten-Epoxy-Kleber geklebt. Nach dessen Aushärtung kann sodann für die Präparation das Deckgläschen mitsamt der Schichten von dem MICA abgezogen werden, sodass die atomar glatte Oberfläche zum Vorschein kommt. Die Substrate werden erst kurz vor ihrer Verwendung vom MICA abgezogen. Auf dem MICA klebend können die so hergestellten Substrate mehrere Monate ohne Qualitätsverlust unter Normalbedingungen gelagert werden.

3.3.3. Messpuffer

Als Puffer, der während der Messungen eingesetzt wird, dient PBS-Puffer (PBS = Phosphate Buffered Saline *engl.* = Phosphat gepufferte Salzlösung). Dabei handelt es sich um eine Lösung aus 140mM Natriumchlorid (NaCl), 10mM Phosphat in Form von HPO_4^{2-} und H_2PO_4^- sowie 3mM Kaliumchlorid (KCl). Der pH-Wert dieser Lösung liegt bei $\text{pH}=7,4$. Der Phosphatpuffer wird hergestellt unter Verwendung einer PBS-Tablette des Herstellers MERCK, Darmstadt, Deutschland. In dieser Tablette befinden sich bereits alle Komponenten in richtiger Konzentration. Sie muss lediglich noch in der richtigen Menge deionisiertem Wassers aufgelöst werden. Hierfür wird Milli-Q Wasser aus einer Entsalzungsanlage der Firma MILLIPORE mit einem spezifischem Widerstand von $18,2\text{M}\Omega\text{cm}$ verwendet. Obige Angaben über den Puffer sind dem beiliegendem Datenblatt entnommen.

3.3.4. Präparation der DNA

Nach Abziehen eines TSG-Substrats vom MICA wird dieses mit der Glasseite auf ein Metallplättchen geklebt. Dieses Metallplättchen dient der späteren magnetischen Halterung

²Die Chromschicht dient als haftvermittelnde Schicht zwischen Kleber und der Goldschicht.

auf dem AFM-Scanner. Auf die Goldoberfläche wird ein $50\mu\text{l}$ großer Tropfen der $100\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ DNA-Lösung aufgebracht. Über Nacht wird das Substrat samt Tropfen in einer feuchten Umgebung in einem Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert. Die feuchte Umgebung wird durch eine verschlossene Petri-Schale realisiert, die mit feuchtem Reinraumpapier ausgelegt war. So kann sich die DNA über Nacht auf der Goldoberfläche anlagern, ohne dass der Tropfen verdampft.

Jeweils kurz vor Beginn der einzelnen Messungen werden die TSG-Substrate, auf denen sich über Nacht die DNA-Moleküle auf die Oberfläche anlagern konnten, aus dem Kühlschrank genommen und mit PBS-Puffer gespült. Dies entfernt DNA-Moleküle, die sich nicht an die Oberfläche angelagert haben. Nach dem Trocknen des unterseitigen Metallplättchens wird das Substrat mit dem Metallplättchen auf die magnetische Halterung des AFM-Scanners platziert. Der zuvor mit dem Cantilever bestückte Cantileverhalter wird anschließend in das AFM verbaut.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse andere Methoden zur Präparation der DNA getestet, die bei quasistatischen AFM-Kraftspektroskopieexperimenten erfolgreich die Wahrscheinlichkeiten für verwertbare Kraftkurven erhöhen. Diese Methoden basieren auf dem Versuch, spezifische Bindungen zwischen DNA und Substratoberfläche sowie DNA und Cantilever herzustellen. So wurden beispielsweise die spezifischen Bindungen zwischen Streptavidin und Biotin³ bzw. DIG⁴ und Anti-DIG⁵ versuchsweise benutzt, um die oben genannten spezifischen Wechselwirkungen herzustellen, um auf diese Weise eine größere Anzahl an Bindeereignissen zu erwirken. Für diese Zwecke wurden Substrate und Cantilever jeweils speziell funktionalisiert. Zudem wurde spezielle λ -DNA benutzt, die an beiden Strangenden mit funktionalen Gruppen ausgestattet war, um so an die funktionalisierte Oberfläche bzw. den funktionalisierten Cantilever spezifisch zu binden. Motiviert waren diese Versuche durch den Umstand, dass die Anzahl an Ereignissen, bei denen DNA gleichzeitig unspezifisch sowohl an Spitze als auch an der Oberfläche bindet und somit eine erfolgreiche Kraftkurve liefert, sehr gering war. Diese Anzahl ist schon bei quasistatischen AFM-Kraftspektroskopieexperimenten sehr klein. Durch die Tatsache, dass bei dem hier verwendeten Messmodus der Cantilever hochfrequent oszilliert, wird diese schon ohnehin kleine Anzahl nochmals stark reduziert. Somit sollte mit der Verwendung

³(Strept)avidin und Biotin bilden die stärkste, nicht-kovalente Bindung aus, die bislang bekannt ist.

⁴DIG, die Kurzform für Digoxigenin, ist ein Cardenolid, das in den Blättern des roten Fingerhuts vorkommt. Es wurde von Hölte et al. 1990 erstmals verwendet, um RNA nicht-radioaktiv zu markieren [HK90].

⁵Anti-DIG ist das antigenbindende Fragment des polyklonalen Schafs-IgG Antikörpers, der durch Immunisierung mit DIG gewonnen wird [HK90].

spezifischer Wechselwirkungen eine höhere Ausbeute an verwertbaren Kurven erzielt werden. Diese Strategie führte jedoch nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Viele verschiedene Präparationsprozeduren und Materialchargen wurden getestet. Bei keiner wurde auch nur eine verwertbare Kurve erlangt. Über die Gründe kann nur spekuliert werden. Da der Hauptunterschied zu der quasistatischen AFM-Kraftspektroskopie die hochfrequenten Oszillationen des Cantilevers sind, liegt es nahe, dass diese Schwingungen für das Versagen dieser Versuche verantwortlich sind. Es ist möglich, dass durch die zusätzliche Dynamik keine stabilen Wechselwirkungen zustande kommen können.

Schlussendlich führten nur Messungen basierend auf der unspezifischen Wechselwirkung zu verwertbaren Ergebnissen. Dementsprechend reduziert war die Ausbeute der Messungen.

3.4. Cantilever

Die Wahl der Cantilever war bei dieser Arbeit ein entscheidender Faktor. Zum einen darf der Cantilever nicht zu hart sein, da sonst die Kraftauflösung für die parallel aufgenommene Kraft zu schlecht ist. Zum anderen muss das Oszillationsverhalten stabil genug sein, um in diesem dynamischen Modus gute Ergebnisse zu erzielen. Dieses stabile Oszillationsverhalten hängt von der Güte des Cantilevers ab. Je größer der Q-Faktor eines Cantilevers ist, desto besser ist sein Oszillationsverhalten. Daher stellte sich die Wahl des richtigen Cantilevers als Gratwanderung heraus. Es wurden in dieser Arbeit viele verschiedene Cantilever mit unterschiedlichen Kraftkonstanten, Geometrien und bestehend aus verschiedenen Materialien getestet. Letztendlich haben sich zwei Cantilever als am zweckmäßigsten herausgestellt.

Zum einen der Cantilever NCLR-100 der Firma NANOSENSORS, *Neuchatel, Schweiz*. Dieser rechteckige Cantilever besteht aus positiv dotiertem Silizium und ist laut Herstellerangabe $225 \pm 5 \mu\text{m}$ lang, $38 \pm 5 \mu\text{m}$ breit und $7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ dick. Seine Resonanzfrequenz liegt laut Datenblatt zwischen 170-210 kHz in Luft. Die Federkonstante soll laut Datenblatt zwischen 31 und $71 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ liegen. Dieser Cantilever eignet sich besonders für die Messungen in Luft.

Ein zweiter, in dieser Arbeit verwendeter Cantilever ist der BL-AC40TS-C2 der Firma OLYMPUS, *Tokyo, Japan*. Auch bei diesem Modell handelt es sich um einen rechteckigen Cantilever. Der Federbalken besteht aus Siliziumnitrid, die Spitze aus Silizium. Laut Datenblatt ist der Cantilever $38 \mu\text{m}$ lang, $16 \mu\text{m}$ breit und $0.2 \mu\text{m}$ dick (Fehlertoleranzen sind nicht angegeben). Die angegebene Resonanzfrequenz in Luft beträgt 75-145kHz, 17-45kHz in Flüssigkeit. Die Federkonstante liegt laut Hersteller im Intervall von 0,02 bis $0.14 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Diese Cantilever eignen sich besonders für die Kraftspektroskopie-Messungen an der DNA

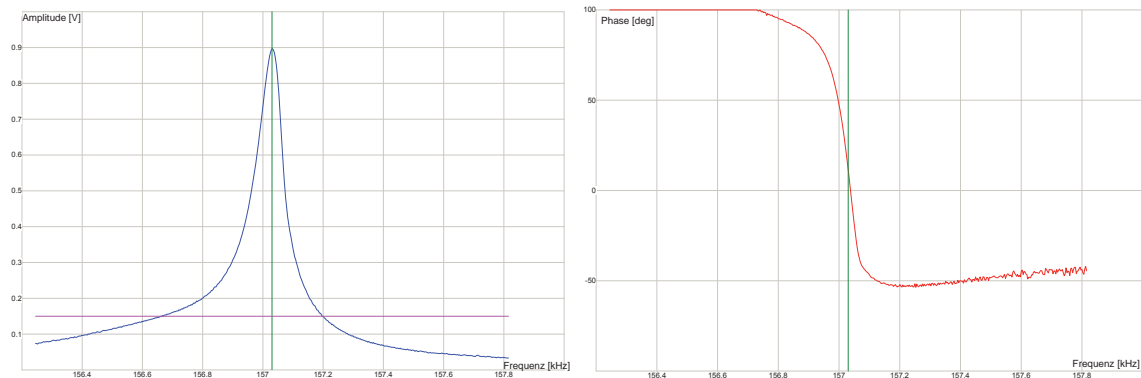
in Flüssigkeit, da seine Federkonstante eine ausreichende Kraftauflösung ermöglicht, wobei sich sein Oszillationsverhalten aufgrund seiner relativ kleinen Länge als ausreichend stabil herausgestellt hat.

3.4.1. Reinigung der Cantilever

Vor dem Einbau in den Cantileverhalter des AFMs werden die Cantilever gereinigt. Dazu werden die Cantilever aus der Verpackung zunächst für einige Minuten in ein Aceton-Bad gegeben. Hierzu wird hochreines Aceton p. a. der Firma VWR, *Radnor, Pennsylvania, USA*, verwendet. Anschließend wird der Cantilever für einige Minuten in hochreinen Ethanol p. a. (ebenfalls von VWR) getaucht, gefolgt von einem Bad in Milli-Q Wasser. Danach wird der Cantilever für einige Minuten in konzentrierter Salpetersäure p. a. (ebenfalls von VWR) gelagert. Daran angeschlossen folgt ein weiterer Spülgang mit Milli-Q Wasser. Zur Trocknung wird der Cantilever an Luft gelagert, sodass die Feuchtigkeit verdunsten kann. Ist die Feuchtigkeit vollständig verdunstet, wird der so gereinigte Cantilever direkt vor Beginn der Messung in den Cantileverhalter montiert.

3.5. Durchführung der Messungen

Nachdem sowohl das Substrat als auch der Cantilever nach erfolgreicher Präparation in das AFM eingebaut worden sind, wird mit dem Schrittmotor des AFM-Scanners eine grobe Annäherung des Cantilevers an die Oberfläche ausgeführt. Als nächstes wird durch die Zuführungsöffnungen in dem Cantileverhalter mit Hilfe einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle eine kleine Menge PBS-Messpuffer zwischen Goldoberfläche und Cantileverhalter appliziert. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Pufferflüssigkeit über den Rand des Substrats fließt und womöglich einen Kurzschluss im AFM-Scanner verursacht. Für die Messungen in dieser Arbeit wird kein abdichtender O-Ring aus Gummi verwendet. Daher ist besondere Vorsicht geboten.



- (a) Amplitudensignal (blaue Kurve) in Volt der Cantileverschwingung in Abhängigkeit der Frequenz. Die Anregungsfrequenz ist auf die Resonanzfrequenz eingestellt.
- (b) Phasensignal in Grad (rote Kurve), gemittelt, in Abhängigkeit der Frequenz.

Abbildung 3.5. – Amplituden- und Phasensignal eines gestimmten Cantilevers im AM-Modus

Nach Anschalten der Laserdiode wird der Laserfokus mit Hilfe der Laser-Stellschrauben auf den vorderen Bereich des Cantilevers platziert. Im Anschluss daran wird durch Justage des Umlenkspiegels und der Detektorposition (ebenfalls durch Stellschrauben) das maximal mögliche Summensignal eingestellt und das Differenzsignal auf Null gesetzt. Nach dieser Justage kann dann softwareseitig die Cantileverschwingung eingestimmt werden.

Abbildungen (3.5a) und (3.5b) zeigen die nach erfolgreicher Stimmung der Cantileverschwingung im fremdangeregten Modus. Als Cantilever dient ein NANOSENSORS NCLR Cantilever, der in Luft gestimmt wird.

Ist die Resonanzfrequenz des Cantilevers eingestellt, so wird anschließend die Q-Control Funktion des QFM-Moduls aktiviert und mit dessen Hilfe die richtige effektive Phasenverschiebung von 90° zwischen Anregung und Cantileverschwingung eingestellt. Dabei ist darauf zu achten, dass dies sehr sorgfältig geschieht, damit anschließend, wenn der selbstangeregte Modus mit konstanter Anregung aktiviert wird, der Cantilever tatsächlich im selbstangeregten Modus oszilliert. Zudem ist die richtige Phasenverschiebung essentiell für die exakte Entkopplung von konservativen und dissipativen Wechselwirkungen, die getrennt voneinander detektiert werden sollen. Nach erfolgreicher Einstellung der Q-Control-Parameter und Bestimmung des Q-Faktors, der für anschließende Berechnungen benötigt wird, kann der selbstangeregte Modus durch Betätigen des Wahlschalters am QFM-Modul aktiviert werden.

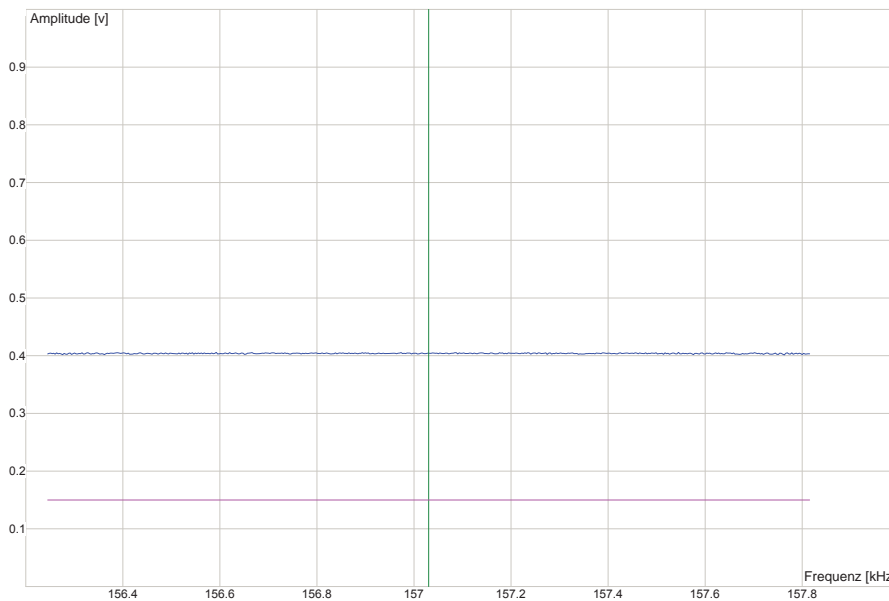


Abbildung 3.6. – Amplitudensignal (blaue Kurve) in Volt der Cantileverschwingung in Abhängigkeit der Frequenz im CE-Modus.

Abbildung (3.6) zeigt das Amplitudensignal nach Umschalten in den CE-Modus. Da der Cantilever in diesem Modus selbstangeregt oszilliert und somit seine eigene Anregungsfrequenz definiert und unabhängig von dem externen Signalgenerator ist, ist die Amplitude in der Abbildung über alle Frequenzen konstant.

Ist ein für die Annäherung passender Amplitudenbetrag eingestellt worden, wird mit Hilfe des werksseitigen Annäherungsalgorithmus der Cantilever an die Oberfläche angenähert. Nach erfolgreicher Annäherung kann der Kraftspektroskopie-Modus in der Software aktiviert werden und nach Einstellung aller Kraftkurven-Parameter Kraftkurven aufgenommen werden. Kraftkurvenparameter sind unter anderem

- Verfahrenweg
- maximale Kontaktkraft beim Annähern (maximale Auslenkung des Cantilevers im Kontakt)
- Verweildauer der Spitze auf der Oberfläche nach Annäherung
- Annäherungsgeschwindigkeit
- Rückziehgeschwindigkeit
- Anzahl der Datenpunkte pro Kraftkurve.

Messungen an DNA-Molekülen werden in dieser Arbeit nach folgendem Protokoll ausgeführt:

Die schwingende Spitze wird an die Oberfläche angenähert, bis die Maximalnettoauslenkung⁶, die in der Nanoscope Software als Tapping Mode Deflection (TM Defl.) bezeichnet wird und als Feedback-Signal eingestellt wird, erreicht ist. Daraufhin verbleibt die Spitze für eine Verweildauer von 5 Sekunden auf der Oberfläche. In dieser Zeit wird der DNA die Gelegenheit gegeben, unspezifisch an den Cantilever zu binden. Nach dieser Verweildauer wird der Cantilever den gesamten Verfahrensweg zurückgezogen. Im Falle einer erfolgreichen Bindung eines DNA-Moleküls an den Cantilever und unter der Voraussetzung, dass dieses DNA-Molekül mit dem anderen Ende unspezifisch mit der Substratoberfläche verbunden bleibt, wird das DNA-Molekül gedehnt. Diese Dehnung macht sich an den Verläufen der Frequenzshift- und Amplitudensignale sowie an der Nettoauslenkung des Cantilevers, die ebenfalls parallel aufgenommen wird, bemerkbar. Diese drei Kanäle werden als elektrische Spannungen aufgenommen.

Das Prinzip dieser Messungen ist analog zu Messungen, die Ebeling et al. an Dextran-Molekülen durchführten [EOH09]. In dieser Arbeit wird zusätzlich die Nettoauslenkung des Cantilevers gemessen.

3.6. Datenauswertung

Um aus den gemessenen Rohdaten den Kraftverlauf und die Energiedissipation bzw. aus der Nettoauslenkung die Kraft rekonstruieren zu können, müssen die gemessenen Spannungssignale in die gewünschten Größen umgerechnet werden. Um aus dem Spannungssignal des gemessenen Frequenzshifts den Frequenzshift in Hertz zu berechnen, ist der Proportionalitätsfaktor zwischen Spannung und Frequenzshift in Hertz erforderlich. Dieser wird am QFM-Modul durch Auswahl des Messbereichs eingestellt und ist somit hardwareseitig vorgegeben.

Der Proportionalitätsfaktor zwischen Amplituden-Spannung und Amplitude in Nanometern kann an einer Amplituden-Distanz-Kurve als Steigung des Signalverlaufs im Kontaktbereich mit der Substratoberfläche abgelesen werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass bei einer bestimmten Annäherung des oszillierenden Cantilevers im Kontaktbereich an die Oberfläche die Amplitude der Schwingung um gerade den Betrag dieser Distanz abnimmt.

Die Kraft in Newton kann aus dem Nettoauslenkungssignal mit Hilfe des Proportionali-

⁶Nettoauslenkung = Auslenkung nach Herausfiltern der Schwingung, dieses Signal entspricht der auftretenden Kraft

tätsfaktors zwischen Nettoauslenkung in Volt und Nettoauslenkung in Metern berechnet werden. Dieser Faktor wird ebenfalls an einem Signalverlauf als Steigung im Kontaktbereich einer Kraft-Distanz-Kurve abgelesen. Mit Hilfe der Kraftkonstanten des Cantilevers, die durch die Thermal-Tune-Methode bestimmt wird, kann aus der Auslenkung in Nanometern die Kraft in Newton berechnet werden. Alle Proportionalitätsfaktoren sowie die Federkonstante des Cantilevers werden am Ende der Messreihen ermittelt.

Aus den Frequenzshift- und Amplitudenverläufen können unter Verwendung des mathematischen Formalismus, der in Kapitel 2.5 vorgestellt wird, die Wechselwirkungspotentiale und Kräfte rekonstruiert werden, die während einer Kraftkurve auftreten. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines selbst programmierten Algorithmus durchgeführt, der eine Umsetzung des mathematischen Formalismus auf diskrete Messwerte darstellt. Dazu wurde das Computeralgebrasystem MathCad 14.0 der Firma PTC verwendet. Die so berechneten Kraftverläufe können anschließend mit den parallel gemessenen Kraftverläufen verglichen werden.

Eine weitere Größe, die speziell aus dem Amplitudenverlauf berechnet werden kann, ist die Energiedissipation pro Schwingungszyklus (vgl. Kapitel 2.6). Damit wird die Energie beschrieben, die bei einem Schwingungszyklus durch nicht-konservative Wechselwirkungen verloren geht.

3.7. Datenglättung

Um die gemessenen Daten der Frequenz- und Amplitudenänderungen mit den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen mathematischen Methoden analysieren zu können, müssen diese Daten geglättet werden. Gleichung (2.66) zeigt, dass die Kraft und das Wechselwirkungspotential an einer bestimmten Distanz z_0 proportional zu dem Integral der Frequenzänderung über die Distanz bis gerade zu dieser Distanz z_0 sind. Zudem geht das Amplitudensignal in die Berechnung mit ein. Verrauschte Signale der Amplituden- und Frequenzänderung würden daher die Berechnung der Kräfte und Wechselwirkungspotentiale stark verfälschen. Zudem wäre der resultierende Kraftverlauf ebenfalls stark verrauscht.

Besagtes Rauschen resultiert aus verschiedenen Quellen. Da die Messungen in Luft oder Flüssigkeit stattfinden, ist thermisches Rauschen ein Teil des Rauschspektrums. Weitere Quellen sind elektronisches Rauschen, Intensitätsschwankungen der Laserdiode⁷, Schall aus der Umgebung sowie Schwingungen des Gebäudes.

⁷durch Verwendung einer Low-Noise-Laserdiode wird dieser Rauschanteil reduziert

Um die Beeinträchtigungen durch das Rauschen zu reduzieren, werden die Daten geglättet. In dieser Arbeit wird zur Glättung der Daten die Kern-Regression verwendet. Jeder Punkt der geglätteten Kurve wird dargestellt als lokal gewichteter Durchschnitt der Nachbarpunkte. Die Gewichtungsfunktion, auch Kern genannt, kann dabei verschiedene Formen annehmen. Die Anzahl Nachbarpunkte, die zur Bestimmung des Durchschnitts einbezogen werden, hängt von der Bandbreite des Kerns ab. Diese Bandbreite ist daher ein Parameter, von dem die Intensität der Glättung abhängt. Er muss sinnvoll gewählt werden, um Über- bzw. Unterglätten zu vermeiden.

Mathematisch lässt sich die Glättung der Daten bestehend aus den Punkten (x_i, y_i) mit folgender Formel beschreiben

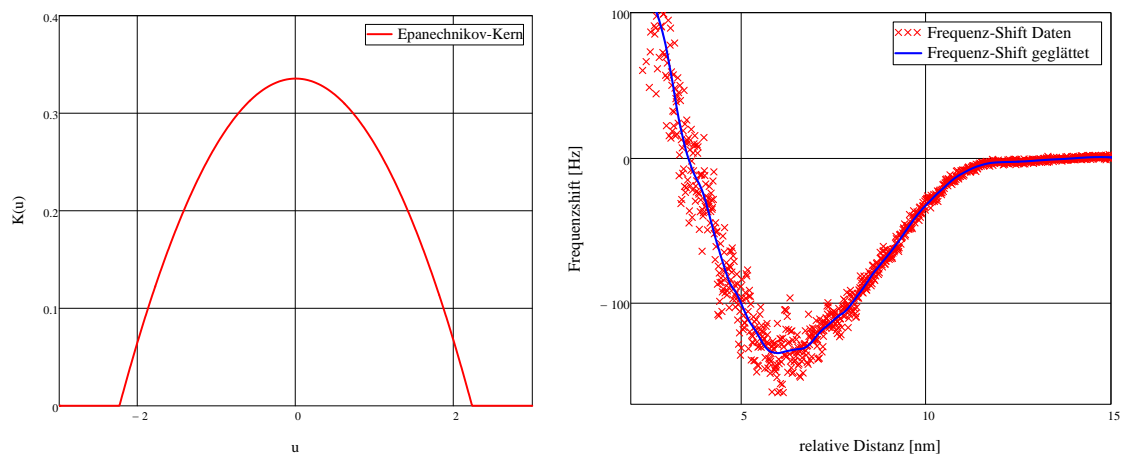
$$y'_i = \frac{\sum_{j=1}^n K\left(\frac{x_i - x_j}{b}\right) y_j}{\sum_{j=1}^n K\left(\frac{x_i - x_j}{b}\right)}. \quad (3.1)$$

Die y'_i stellen den geglätteten Datensatz dar. Die Funktion $K(u)$ ist die Kern-Funktion, die Größe b ist die Bandbreite. Zur Glättung der Daten in dieser Arbeit hat sich der Epanechnikov-Kern als am zweckmäßigsten herausgestellt [Epa69]. Dieser Kern wird beschrieben durch die Gleichung

$$K(u) = \begin{cases} \frac{3}{4\sqrt{5}} \left(1 - \frac{u^2}{5}\right), & \text{falls } |u| \leq \sqrt{5} \\ 0, & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.2)$$

Für diesen Kern gilt:

$$\int_{-\infty}^{\infty} K(u) du = 1. \quad (3.3)$$



(a) Graphische Darstellung der Gleichung (3.2) (b) Effekt der Glättung

Abbildung 3.7. – Form des Epanechnikov-Kerns und Effekt der Glättung auf einen Datensatz.

Der Vorteil dieser Kern-Funktion ist die Minimierung der mittleren quadratischen Abweichung des zugehörigen Kerndichteschätzers [Epa69].

4. Messergebnisse

4.1. Wechselwirkung AFM-Spitze-Oberfläche

Mit Hilfe der dynamischen Kraftspektroskopie im Constant-Excitation Modus kann die Wechselwirkung einer AFM-Spitze mit einer Oberfläche untersucht werden.

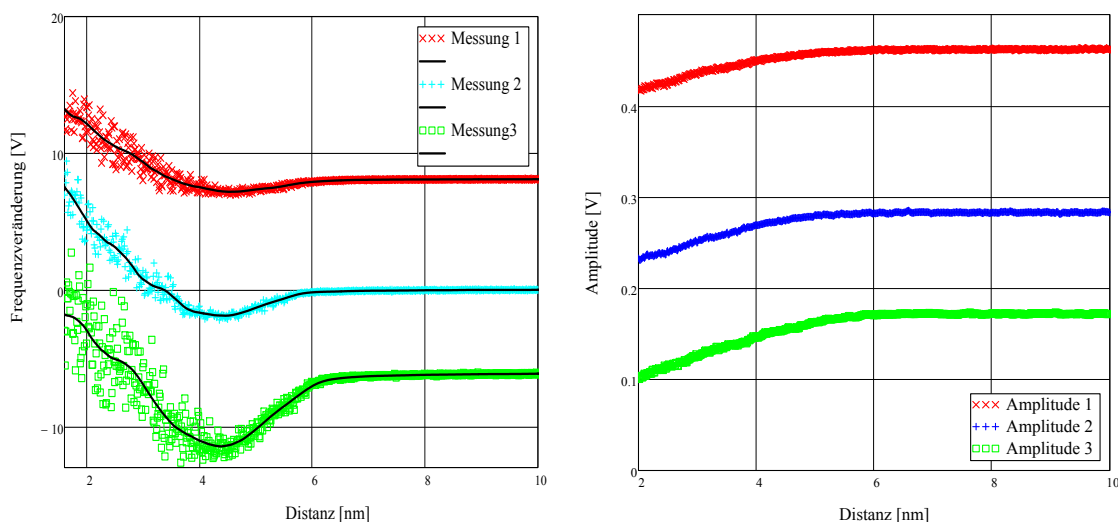
Nähert sich eine AFM-Spitze einer Oberfläche, so erreicht sie zunächst den Bereich der attraktiven Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche. Diese attraktiven Kräfte sind zum einen auf van-der-Waals-Kräfte sowie zum anderen auf Coulomb-Kräfte zurückzuführen. Bei geerdeter Oberfläche und geerdetem Cantilever werden die Effekte basierend auf den Coulombkräften minimiert.

Bei weiterer Annäherung an die Oberfläche dringt die Spitze in einen Bereich einer repulsiven Wechselwirkung ein. Diese abstoßenden Kräfte beruhen auf der Pauli-Abstoßung. Kombiniert durchläuft die Spitze somit ein Wechselwirkungspotential, das von der Form her an ein Lennart-Jones-Potential erinnert.

Wird eine solche Kraft-Distanz-Kurve mit einem ruhenden, d.h. nicht schwingendem Cantilever, im Rahmen einer quasistatischen Kraftspektroskopiemessung in Luft aufgenommen, so ist dieser Kraftverlauf aufgrund von sogenannten Snap-In-Effekten nicht zu beobachten. Diese Snap-In-Effekte resultieren aus sehr großen Kapillarkräften zwischen Spitze und Oberfläche, die aufgrund eines dünnen Kondensatfilms auf der Oberfläche auftreten. Durch diese attraktiven Kräfte springt die Spitze bei einer bestimmten Distanz zur Oberfläche unmittelbar auf die Oberfläche. Beim Zurückziehen verbleibt die Spitze zunächst auf der Oberfläche, da die gleichen Kräfte die Spitze auf der Oberfläche „festkleben“. Erst wenn der z-Piezo genügend weit von der Oberfläche weggefahren ist, reicht die Rückstellkraft aus, dass sich die Spitze lösen kann. Daraufhin springt sie unmittelbar in ihre Gleichgewichtslage zurück. Solche Adhäsionsphänomene sind häufig zu beobachten. Durch Verwendung des dynamischen Modus können solche Adhäsionseffekte verhindert werden. Im Folgenden werden Ergebnisse von Messungen der Wechselwirkung zwischen einer un-funktionalisierten Gold-Oberfläche und einer Silizium-Spitze in Luft vorgestellt. Diese Ergebnisse sollen zunächst die Funktionalität sowohl des Messprinzips als auch des Auswerte-

algorithmus bestätigen. Dafür wurde ein frisches TSG-Goldsubstrat als Probenoberfläche und ein gründlich gereinigter Nanosensors NCLR-100 Cantilever benutzt. Dieser Cantilever ist laut Herstellerangabe $225 \pm 5\mu\text{m}$ lang, $38 \pm 5\mu\text{m}$ breit und $7 \pm 0,5\mu\text{m}$ dick. Die Resonanzfrequenz des bei dieser Messung benutzten Exemplars an Luft beträgt $164,406\text{kHz}$. Die Federkonstante wurde mit Hilfe der Thermal-Tune-Methode zu $41,8\frac{\text{N}}{\text{m}}$ bestimmt. Der Gütefaktor Q des Cantilevers beträgt 525.

Gezeigt werden zwei Messreihen von Frequenzveränderungen und Amplitudenverläufe von jeweils drei verschiedenen Annäherungs-Kraft-Distanz-Kurven, die sich in den freien Amplituden unterscheiden. Über die analogen Eingänge am Nanoscope 5-Controller werden die Spannungen der Frequenzänderungen und Amplitudenverläufe vom QFM-Modul in Abhängigkeit der relativen Distanz der Spitze zur Oberfläche aufgenommen.



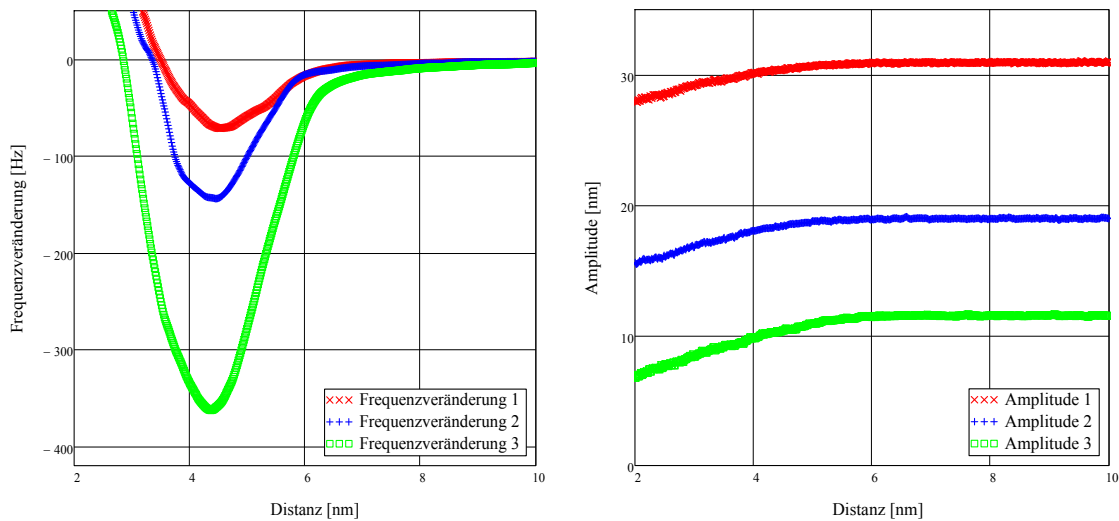
(a) Originaldaten der Frequenzveränderungen mit den zugehörigen geglätteten Verläufen der ersten Messreihe, zu besserer Unterscheidung mit Offsets aufgetragen **(b)** Originaldaten der Amplitudenverläufe. Die Daten benötigen keine Glättung.

Abbildung 4.1. – Die originalen Spannungsdaten der Frequenzshift- bzw. Amplitudenveränderungskanäle der ersten Messreihe.

Abbildung (4.1a) zeigt die gemessenen Spannungsdaten der Frequenzänderung (farbige Signale) und die mit der in Kapitel (3.7) vorgestellten Methode geglätteten Daten (schwarze Kurven) der ersten Messreihe. Um die Messungen besser voneinander unterscheiden zu können, wurden die Daten mit Offsets aufgetragen. Wie zu erkennen ist, besitzen die Signale der Frequenzänderungen, wie zuvor bereits erwähnt, die Verläufe, die an ein Lennard-Jones-Potential erinnern. Zudem ist zu erkennen, dass das Rauschen der Signale mit

zunehmender Annäherung an die Oberfläche zunimmt.

Abbildung (4.1b) zeigt die gemessenen Spannungsverläufe der Amplitudenentwicklung. In größerer Entfernung oszilliert der Cantilever mit der freien Amplitude. Beim Annähern an die Oberfläche nimmt die Amplitude dann aufgrund der zunehmenden Wechselwirkung proportional zur Distanz ab. Die Daten brauchen keine Glättung, da sie von vornherein sehr rauscharm sind.



- (a) Die aus den Spannungsdaten berechneten Frequenzänderungen in Hertz. Die Daten wurden mit einem Messbereich von $75 \frac{Hz}{V}$ aufgenommen.
- (b) Die aus den Spannungsdaten berechneten Amplitudenverläufe in Nanometern. Der Umrechnungsfaktor wurde zu $67 \frac{nm}{V}$ bestimmt.

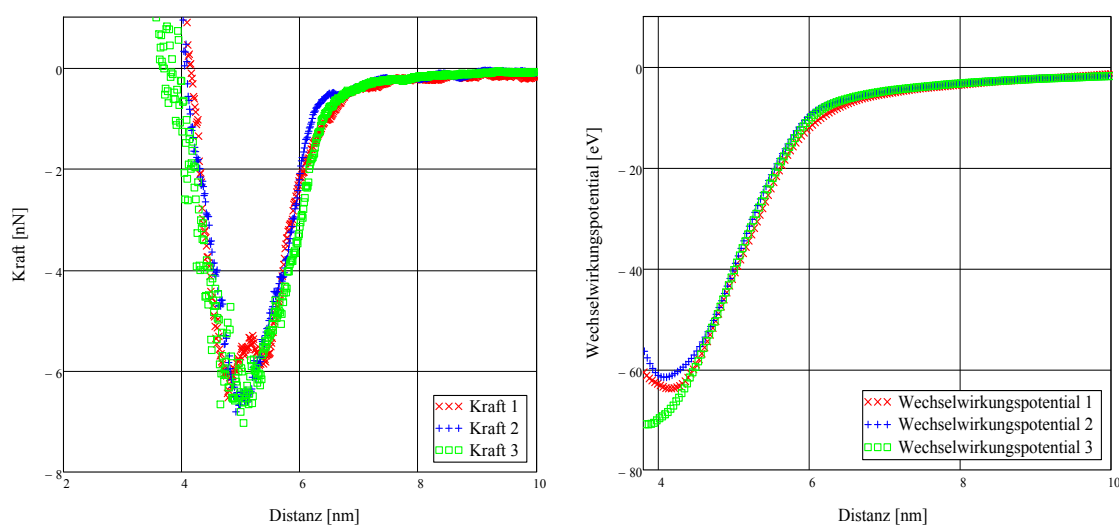
Abbildung 4.2. – Die aus den Spannungsdaten der ersten Messreihe berechneten Größen in deren korrekten Einheiten.

In den Graphiken (4.2a) bzw. (4.2b) sind jeweils die geglätteten Frequenzänderungen bzw. Amplitudenverläufe in den umgerechneten Einheiten zu sehen. Die Kurven der geglätteten Frequenzänderungen sind ohne Offset aufgetragen. Die drei jeweiligen Kurven wurden bei unterschiedlichen freien Schwingungsamplituden aufgenommen. Für Messung 1 (rote Kurven) betrug die freie Amplitude $A_1=31.0nm$, die freie Amplitude der zweiten Messung (blaue Kurven) betrug $A_2=19.0nm$. Bei der dritten Messung (grüne Kurven) betrug die freie Amplitude $A_3=11,5nm$.

Abbildung (4.2a) zeigt, dass mit abnehmender freier Amplitude die Beträge der Frequenzänderungen bei den jeweiligen Distanzen zunehmen. Da alle drei Kurven an dem selben Punkt der Oberfläche mit nur einigen Sekunden Zeitdifferenz im Zuge einer Messreihe aufgenommen wurden, sollten die aus den Frequenzänderungen und Amplitudenverläufen

rekonstruierten Wechselwirkungspotentiale und Kräfte im Rahmen eines Fehlers identisch sein.

Aus den in den Graphiken (4.2a) und (4.2b) dargestellten Daten wurden mit dem selbstverfassten Computerprogramm die resultierenden Kräfte und Wechselwirkungspotentiale gemäß des mathematischen Formalismus aus Kapitel (2.5) berechnet. Dieses Computerprogramm benutzt im wesentlichen die Gleichungen (2.66) und (2.67). Da es sich bei den Daten um diskrete Datenpunkte handelt, müssen die Integrale aus den Gleichungen numerisch berechnet werden.



(a) Die aus den Frequenzshifts und Amplitudenverläufen rekonstruierten Kräfte der ersten Messreihe

(b) Die aus den Frequenzshifts und Amplitudenverläufen rekonstruierten Wechselwirkungspotentiale der ersten Messreihe

Abbildung 4.3. – Die mathematisch rekonstruierten Kraft- und Potentialverläufe der ersten Messreihe.

In den Abbildungen (4.3a) und (4.3b) sind diese berechneten Kräfte bzw. Wechselwirkungspotentiale der ersten Messreihe aufgetragen. Wie diese Abbildungen zeigen, liegen die Potential- und Kraftverläufe der verschiedenen drei Messungen im Rahmen der Messgenauigkeit übereinander. Die attraktiven Adhäsionskräfte haben ihr Maximum bei allen drei Messungen bei ca. 6nN. Danach erreicht die Spitze den repulsiven Bereich der Pauli-Abstoßung. Der Kraftverlauf ist bei allen drei Messungen im Rahmen des Fehlers gleich. Wie die Daten aus Abbildung (4.1a) erkennen lassen, treten in sehr großer Nähe des Cantilevers zur Oberfläche nicht näher qualifizierbare Effekte auf, die einen untypischen Verlauf der Signale verursachen. Ein Vergleich der aus diesen Datenbereichen berechneten Potentiale bzw. Kräfte zeigt signifikante Unterschiede der Kraft bzw. Potentialverläufe in diesem

Bereich. Darüber hinaus wächst das Rauschen speziell des Frequenzänderungssignals stark an. Die im Vergleich zur Amplitude sehr große Nähe des Cantilevers zur Oberfläche lässt die Spitze, speziell im unteren Umkehrpunkt, stark mit der Oberfläche wechselwirken. Dabei auftretende Effekte führen zu dieser Signalentwicklung bei weiterer Annäherung. Eine dritte Größe, die aus dem Amplitudenverlauf mit Hilfe der Gleichung (2.85) berechnet werden kann, ist die Energiedissipation der Cantileveroszillation pro Schwingungszyklus. Sie ist in folgender Abbildung dargestellt.

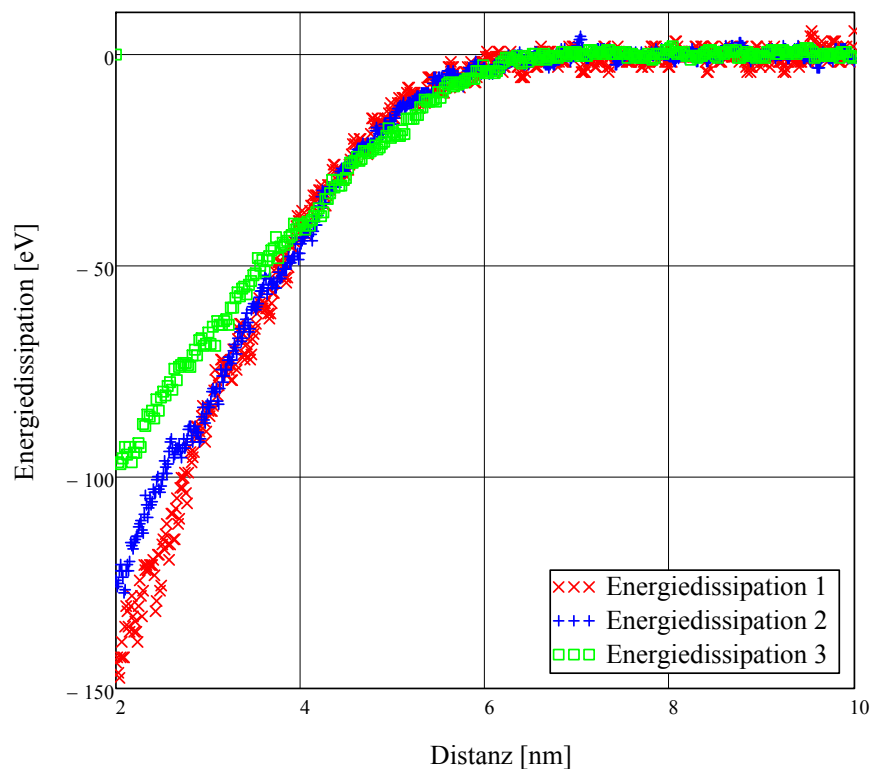
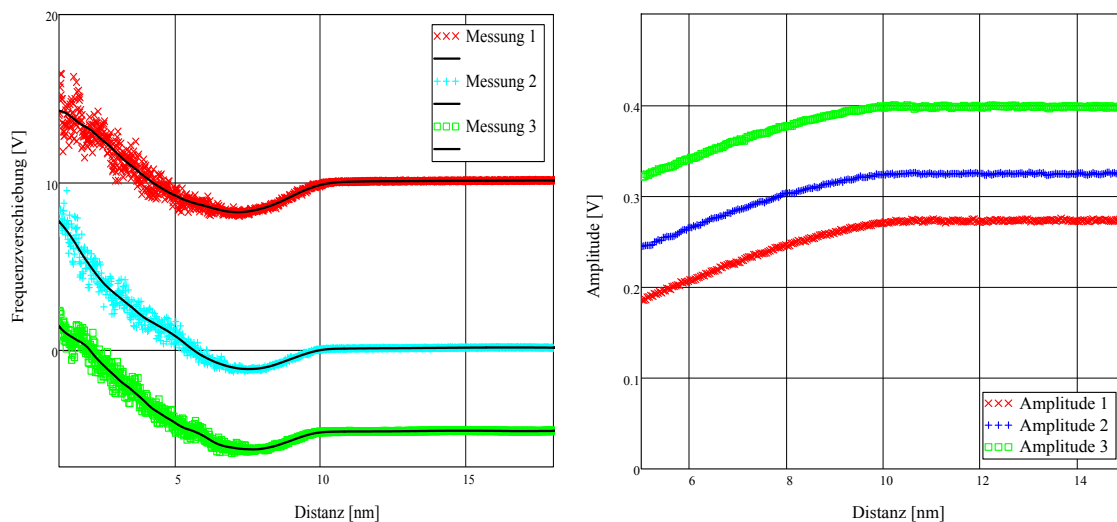


Abbildung 4.4. – Aus den Daten aus Abbildung 4.2b errechnete Energiedissipation pro Schwingungszyklus

Abbildung (4.4) lässt erkennen, dass auch die pro Schwingungszyklus dissipierte Energie bis zu dem Bereich, wo oben erwähnte Unregelmäßigkeiten auftauchen, für alle drei Messungen den gleichen Verlauf zeigt.

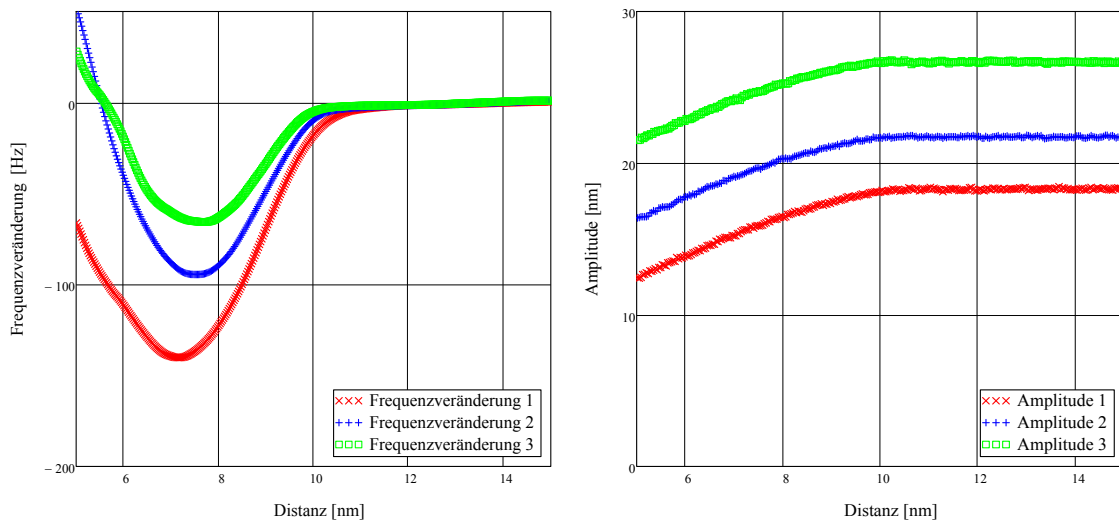
Eine zweite Messreihe wurde an einem anderen Punkt der Goldoberfläche durchgeführt. An diesem neuen Punkt wurden ebenfalls mit dem gleichen Cantilever Kraft-Distanz-Kurven bei verschiedenen freien Schwingungsamplituden aufgenommen.



(a) Originaldaten der Frequenzveränderungen mit den zugehörigen geglätteten Verläufen der zweiten Messreihe, zu besserer Unterscheidung wieder mit Offsets aufgetragen (b) Originaldaten der Amplitudenverläufe der zweiten Messreihe. Auch diese Daten benötigen keine Glättung.

Abbildung 4.5. – Die originalen Spannungsdaten der Frequenzshift- bzw. Amplitudenveränderungskanäle der zweiten Messreihe

Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in den Abbildungen (4.5a) und (4.5b) zu sehen. Aufgetragen sind in Abbildung (4.5a) wieder die ursprünglich gemessenen Spannungen der Frequenzänderungen, die zur besseren Differenzierung wieder mit Offsets versehen sind, sowie die aus der in Kapitel (3.7) vorgestellten Methode resultierenden Glättungen, die offsetbereinigt in Abbildung (4.6a) übereinander gelegt sind. In Abbildung (4.5b) sind die Amplitudenveränderungen in Volt dargestellt. Die Form der Kurven ist analog zu denen der ersten Messreihe.



- (a) Die aus den Spannungsdaten der zweiten Messreihe berechneten Frequenzveränderungen in Hertz. Die Daten wurden ebenfalls mit einem Messbereich von $75 \frac{\text{Hz}}{\text{V}}$ aufgenommen.
- (b) Die aus den Spannungsdaten der zweiten Messreihe berechneten Amplitudenverläufe in Nanometern. Der Umrechnungsfaktor war wieder $67 \frac{\text{nm}}{\text{V}}$.

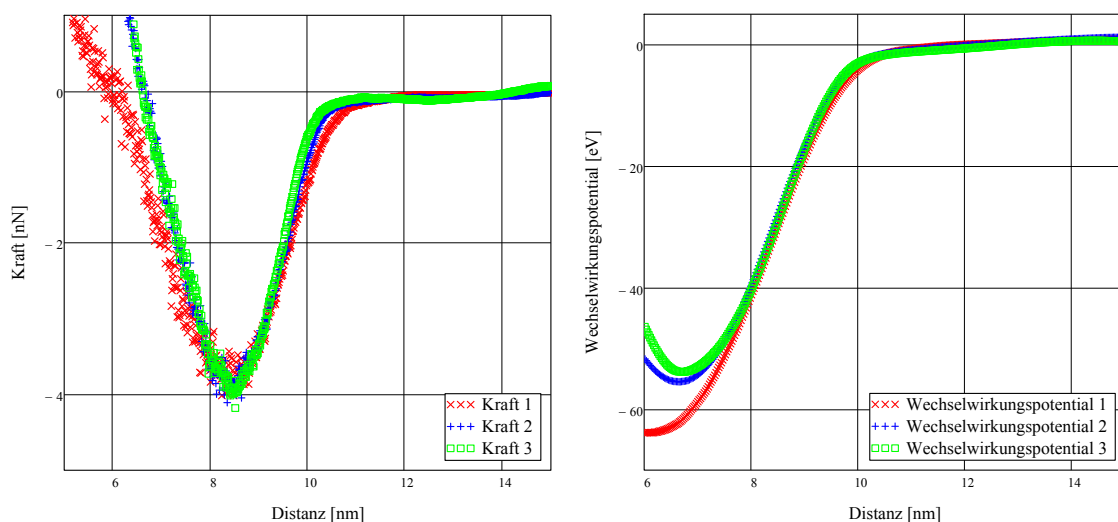
Abbildung 4.6. – Die aus den Spannungsdaten der zweiten Messreihe berechneten Größen in deren korrekten Einheiten.

In den Abbildungen (4.6a) und (4.6b) sind die geglätteten Frequenzänderungen bzw. Amplitudenverläufe der zweiten Messreihe in den umgerechneten Einheiten zu sehen. Die Kurven der geglätteten Frequenzveränderungen sind ohne Offset aufgetragen.

Für Messung 1 (rote Kurven) betrug die freie Amplitude $A_1=18,3\text{nm}$, die freie Amplitude der zweiten Messung (blaue Kurven) betrug $A_2=21,7\text{nm}$. Bei der dritten Messung (grüne Kurven) betrug die freie Amplitude $A_3=26,7\text{nm}$.

In den Graphiken (4.7a) und (4.7b) sind die Ergebnisse der mathematischen Rekonstruktion der Kräfte bzw. Wechselwirkungspotentiale aus den Daten der zweiten Messreihe dargestellt. Diese Abbildungen lassen erkennen, dass sich auch bei dieser Messreihe die aus den gemessenen Daten berechneten Kräfte und Potentiale bei den unterschiedlichen freien Amplituden in guter Übereinstimmung gleichen. Der maximale Betrag der attraktiven Adhäsionskräfte liegt bei dieser Messreihe bei ca. 4nN . Zu erklären ist der Unterschied der maximalen Beträge der Adhäsionskräfte der beiden Messreihen mit der unterschiedlichen Lokalisation der Messpunkte auf der Substratoberfläche. An dem Punkt der zweiten Messreihe herrschen im Vergleich zum Punkt der ersten Messreihe teilweise andere Verhältnisse auf der Oberfläche. Zu nennen wären unter anderem statistische Fluktuationen in der Dicke des an der Oberfläche kondensierten Wasserfilms oder Unterschiede im Cou-

lombpotential an den beiden Punkten. Im Bezug der Größenordnung passen beide Messung konsistent zusammen.



- (a) Die aus den Frequenzshifts und Amplitudenverläufen der zweiten Messreihe rekonstruierten Kräfte der zweiten Messreihe. (b) Die aus den Frequenzshifts und Amplitudenverläufen der zweiten Messreihe rekonstruierten Wechselwirkungspotentiale der zweiten Messreihe.

Abbildung 4.7. – Die mathematisch rekonstruierten Kraft- und Potentialverläufe der zweiten Messreihe.

Zudem passen diese Werte im Vergleich zu Werten, die von anderen Arbeitsgruppen unter ähnlichen Bedingungen gemessen und veröffentlicht wurden. So veröffentlichten Schmutz et al. in ihrer Arbeit [Sch+07] Adhäsionskräfte zwischen einer AFM-Spitze und einer Mica-Oberfläche¹ im Bereich von 7nN. Diese Messung wurde im Ultrahochvakuum ausgeführt. Ein Vergleich der Größenordnung liefert Übereinstimmung.

¹Mica, oder auch Glimmer genannt, ist ein Schichtsilikat. Einzelne Schichten weisen eine atomar glatte Oberfläche auf und werden daher bei AFM-Messungen vorzugsweise als Substrat verwendet.

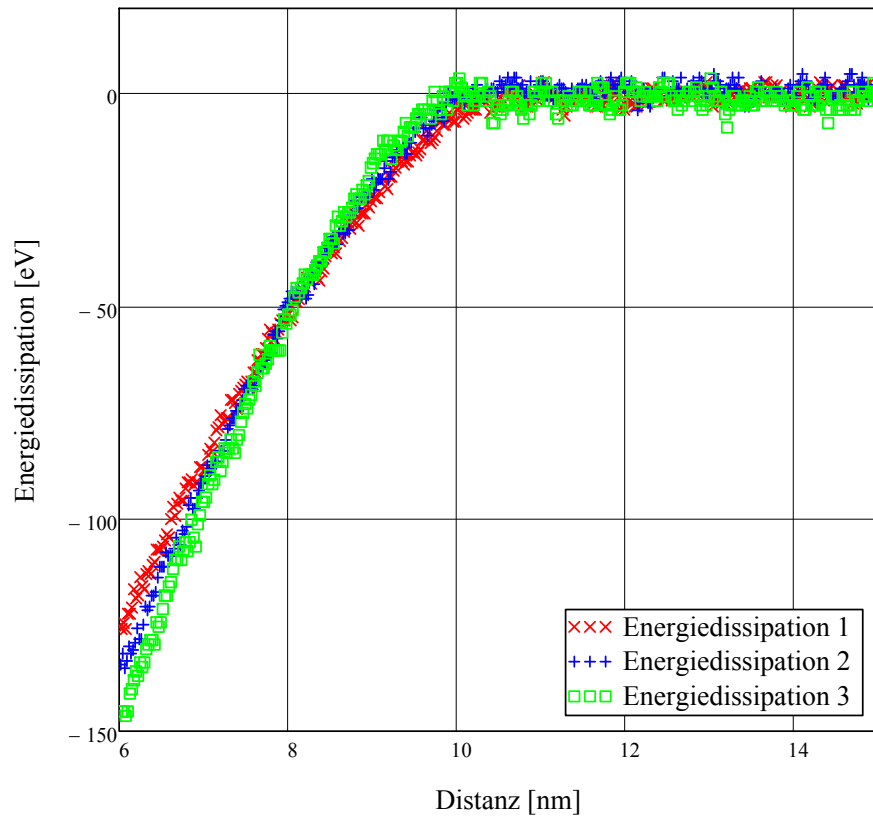


Abbildung 4.8. – Energiedissipation pro Schwingungszyklus der zweiten Messreihe

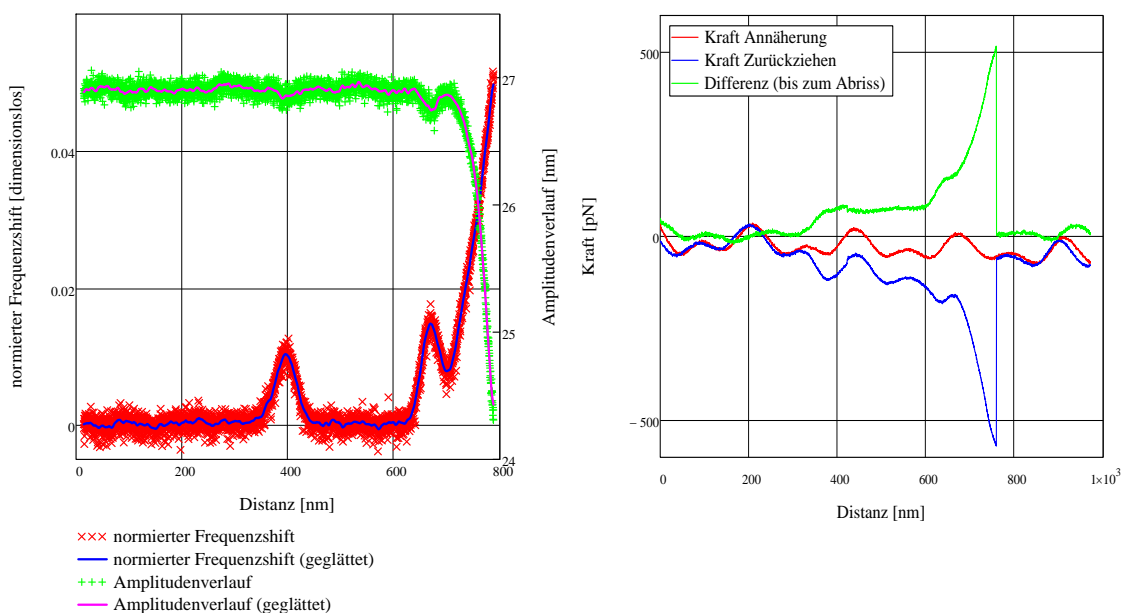
Abbildung (4.8) zeigt die berechneten Verläufe der Energiedissipationen pro Schwingungszyklus der einzelnen Messungen der zweiten Messreihe. Auch hier ist im Rahmen des Fehlers eine gute Übereinstimmung zu erkennen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Setup reproduzierbare Messungen und der Auswerte-Algorithmus plausible Ergebnisse hervorbringt.

4.2. Dynamische DNA Kraftspektroskopie-Experimente

Im Folgenden werden die Ergebnisse diverser CE-Kraftspektroskopie-Experimente an DNA vorgestellt. Alle Experimente wurden mit dem Cantilever BL-AC40TS-C2 der Firma OLYMPUS, Tokyo, Japan in PBS-Puffer unter neutralen pH-Bedingungen durchgeführt. Die Kraftkonstanten der Cantilever wurde mittels der Thermal-Tune-Methode zu $0,06-0,12 \frac{N}{m}$ bestimmt. Die Resonanzfrequenzen lagen im Bereich 33-35kHz, der Q-Faktor der verwendeten Cantilever lag im Bereich 130. Die Annäherungs- und Rückziehgeschwindigkeiten betragen bei allen Messungen $100 \frac{nm}{s}$. Durch diese relativ kleine Geschwindigkeit konnte das Rauschen der Signale verringert werden.

Gemessen wurden die Frequenzänderungen, Amplitudenänderungen und die Nettoverbiegungen des Cantilevers in Form des TM-Deflection-Signals in Abhängigkeit der Piezoposition. Frequenzshift, Amplituden und TM-Deflection wurden zunächst wieder als Spannungen aufgenommen und im Anschluß in die jeweiligen, korrekten Einheiten umgerechnet.



(a) Gemessene Frequenzshift- und Amplitudenverläufe einer DNA-Kraftkurve, freie Amplitude 26,9nm

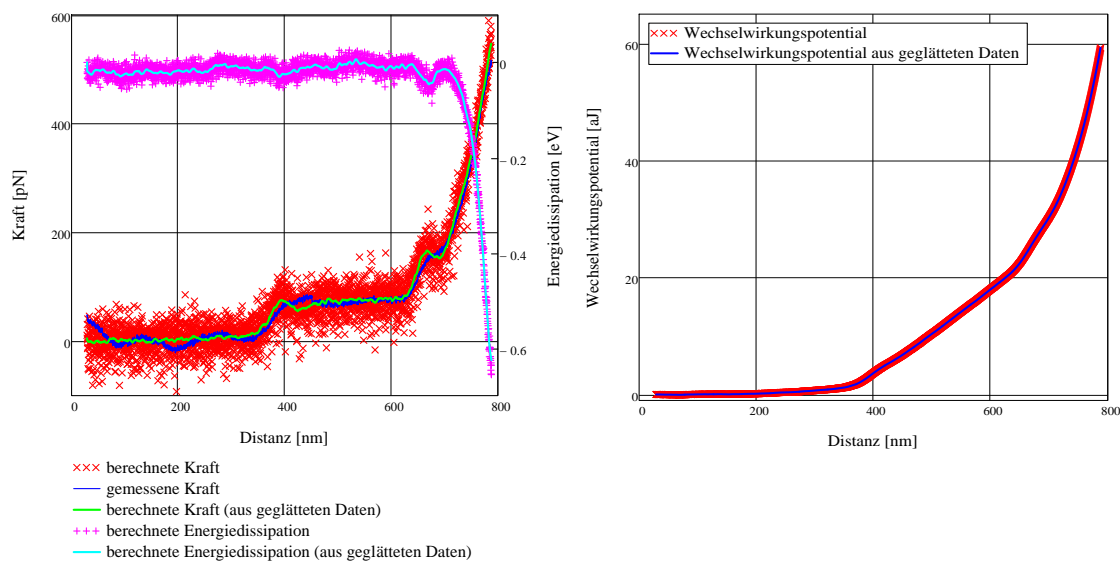
(b) Parallel gemessene Kraft. Zu sehen sind Annäherung und Zurückziehen

Abbildung 4.9. – Ergebnisse der ersten Messung.

Abbildung (4.9a) zeigt die Frequenzshift- und Amplitudensignale einer Messung an

DNA. Die Originaldaten sind soweit aufbereitet, dass der Frequenzshift als ein auf die freie Resonanzfrequenz normierter Frequenzshift (dimensionslos) und die Amplitude in Nanometer angegeben ist. Des Weiteren sind der Bereich der Kurve, in dem sich die Spitze in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche befindet (die Daten um die Distanz null), und der Bereich nach dem Abriss des DNA-Moleküls von der Spitze nicht aufgetragen. Da der Cantilever in unmittelbarer Nähe der Oberfläche einer sehr starken Wechselwirkung und demzufolge einer starken Störung unterworfen ist, sind die Daten beider Kanäle in diesem Bereich stark verrauscht. Die Daten nach dem Abriss sind nicht mehr von Interesse. In dem Bereich geht der Frequenzshift wieder auf null zurück und das Amplitudensignal nimmt den Wert der freien Amplitude an. Neben den ursprünglichen Daten sind ebenfalls die geglätteten Daten aufgetragen. Zur Rekonstruktion der Kraft aus den Frequenzshift- und Amplitudendaten werden nur die Datenpunkte aus dem hier abgebildeten Bereich verwendet.

Abbildung (4.9b) zeigt den Verlauf der aus der Nettoauslenkung (eine um die Oszillation bereinigte Auslenkung) berechneten Kraft bei Annäherung und Zurückziehen. Bei Betrachtung dieser Kurven fällt als aller erstes ein beträchtliches periodisches und niederfrequentes Störsignal auf, das den Kraftverläufen in beiden Richtungen überlagert ist. Da das Störsignal in der Kurve der Annäherung und das Störsignal in der Kurve der Rückbewegung nahezu identisch sind, können als Ursache Interferenzeffekte angenommen werden. Dieser Effekt tritt bei allen Messungen mit diesem Cantilever auf. Da der Cantilever verhältnismäßig klein ist, trifft sehr viel auf die Goldoberfläche, die dieses Licht wiederum reflektiert. Dieses von der Substratoberfläche reflektierte Licht interferiert dann auf dem Detektor mit dem vom Cantilever reflektiertem Licht. Trotz ausgiebiger Justiersuche von Laser- und Detektorposition konnte dieser Effekt nicht vollständig minimiert werden. Um dennoch aus den Rückziehkurven einen brauchbaren Kraftverlauf zu erhalten, muss dieses Störsignal aus den Rückziehkurven eliminiert werden. Dafür wird von der Rückziehkurve die Annäherungskurve subtrahiert. Dabei wird ausgenutzt, dass die Störsignale in beiden Richtungen annähernd gleich sind. Leichte Differenzen, die der Piezohysterese geschuldet sind, konnten so minimiert werden. Durch die Subtraktion beider Kurven resultiert ein Kraftverlauf, der geeignet ist, um mit dem Kraftverlauf verglichen zu werden, der aus den Frequenzshift- und Amplitudensignalen rekonstruiert wird.



(a) Rekonstruierte und gemessene Kraft sowie (b) Wechselwirkungspotential, das mit dem die berechnete Energiedissipation.

mathematischen Formalismus berechnet wurde.

Abbildung 4.10. – Ergebnisse der mathematischen Rekonstruktion.

Abbildungen (4.10a) und (4.10b) zeigen den aus den in Abbildung (4.9a) dargestellten Daten mathematisch rekonstruierten Kraftverlauf der Messungen an DNA in PBS-Puffer mit der dazugehörigen Energiedissipation bzw. das rekonstruierte Potential. Zudem ist zu Vergleichszwecken der gemessene, vom Störsignal weitgehend bereinigte, Kraftverlauf ebenfalls eingezeichnet. Es ist zu erkennen, dass der rekonstruierte Kraftverlauf im Rahmen der Messungenauigkeiten sehr gut mit dem gemessenen, bereinigten Kraftverlauf übereinstimmt. In beiden Fällen ist das Kraftplateau bei ca. 65pN klar zu sehen. Ein zweites Kraftplateau bei ca. 150pN ist ebenfalls in beiden Kurven zu sehen. Des Weiteren lässt Abbildung (4.10a) erkennen, dass im Energiedissipationssignal bis zum Beginn des ersten Plateaus keine signifikanten Veränderungen zu finden sind. Zu Beginn des ersten Plateaus ist ein leichter Dip zu erahnen, der jedoch sofort wieder auf das Ausgangsniveau ansteigt und unverändert bis zum Beginn des zweiten Plateaus bleibt. Auf Höhe des zweiten Plateaus ist ein deutlicherer Dip zu beobachten, der wieder von einem Anstieg gefolgt ist, bis es danach der Dehnung des Moleküls entsprechend bis zum Abriss absinkt. Das kurzzeitige Absinken während des zweiten Plateaus lässt erkennen, dass dort Energie dissipiert, also nicht-konservative Effekte stattfinden.

Abbildung (4.10b) zeigt das berechnete Wechselwirkungspotential, sowohl aus den ungeglätteten als auch aus den geglätteten Daten. Die Ableitung dieses Potentials entspricht

dem rekonstruierten Kraftverlauf aus Abbildung (4.10a).

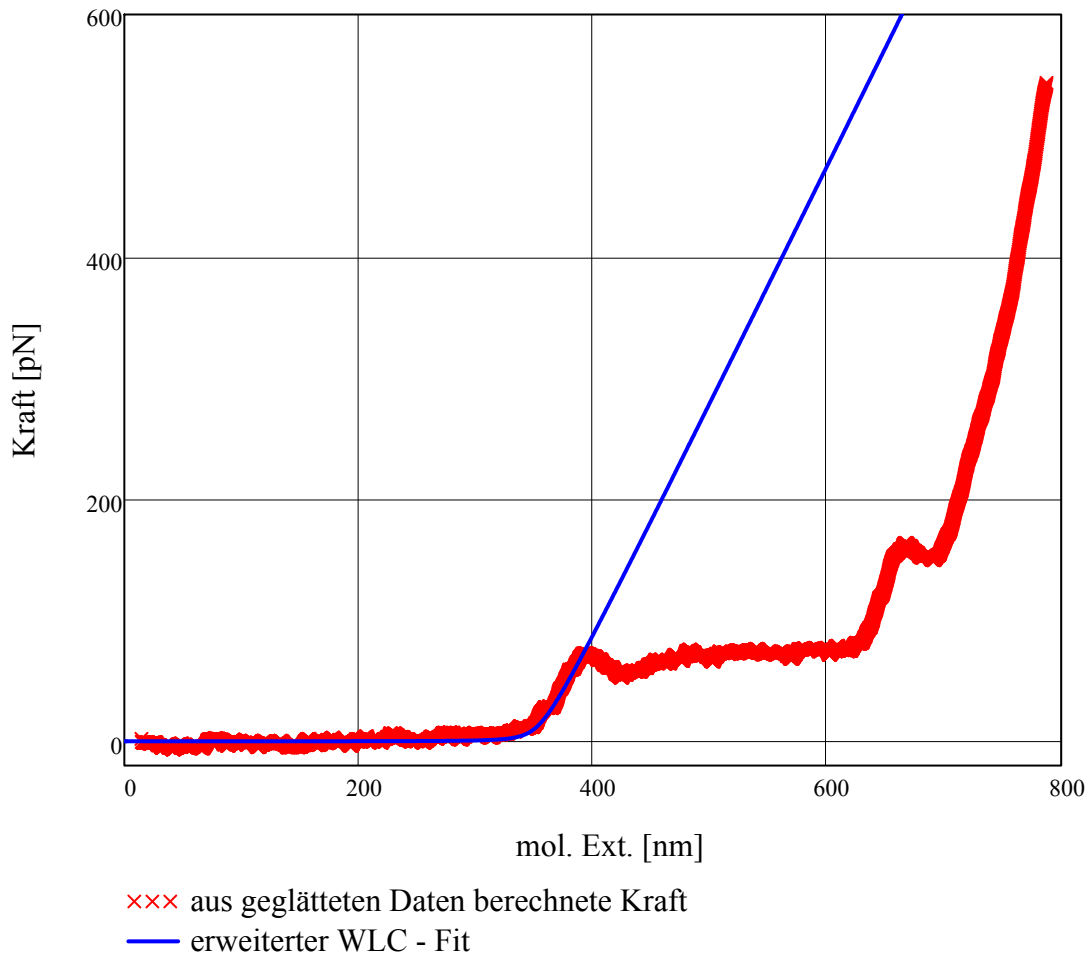
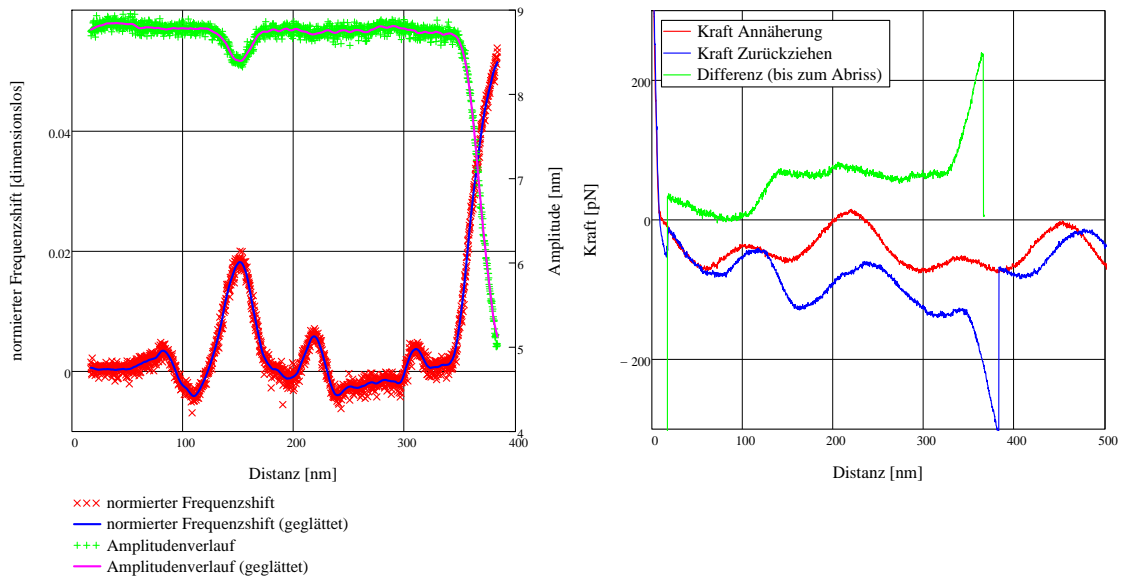


Abbildung 4.11. – Kraftverlauf, berechnet aus dem geglätteten Datensatz, mit erweitertem WLC-Fit.

Abbildung (4.11) zeigt den aus den geglätteten Daten rekonstruierten Kraftverlauf. Die Daten bis zu Kräften von ca. 35pN wurden mit dem erweiterten Worm-Like-Chain-Modell (Gleichung 2.27) gefittet. Als Fitparameter dienen die Persistenzlänge l_P , die Konturlänge L und das Dehnungselastizitätsmodul Φ , das ein Maß für die Steifigkeit der DNA darstellt. Je größer der Betrag des Dehnungselastizitätsmoduls ist, desto steifer ist das DNA-Molekül. Der Fit ergab die Werte $l_P = 48 \pm 3\text{nm}$, $L = 361 \pm 7\text{nm}$ und $\Phi = 710 \pm 113\text{pN}$. Der Wert für die Persistenzlänge stimmt sehr gut mit Angaben aus der Literatur zusammen, wo von Persistenzlängen von etwa 40-50nm gesprochen wird [Bou+99]. Der Wert des Dehnungselastizitätsmoduls liegt jedoch um einen Faktor von fast 2 unter dem Wert, der

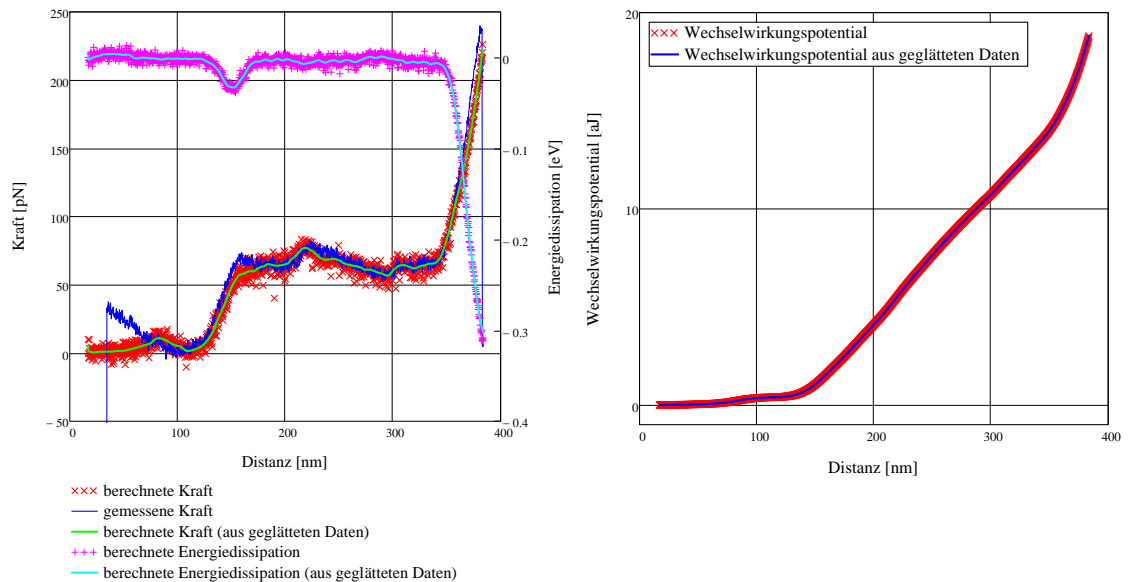
mit einer statischen Kraftspektroskopiemessung bestimmt wurde (siehe Abbildung 2.15) bzw. den Literaturwerten, bei denen von 1200-1300pN unter physiologischen Bedingungen gesprochen wird [Bou+99].

Im Folgenden werden die Ergebnisse eines weiteren Experiments vorgestellt.



(a) Gemessene Frequenzshift- und Amplitudenverlauf-Daten einer zweiten DNA-Kraftkurve, freie Amplitude 8,8nm

(b) Parallel gemessene Kraft der zweiten Kurve. Zusehen sind wieder Annäherung und Zurückziehen. Auch hier ist das Störsignal augenscheinlich.



(c) Rekonstruierte und gemessene Kraft sowie die berechnete Energiedissipation der zweiten Kraftkurve.

(d) Wechselwirkungspotential der zweiten Kraftkurve, das wieder mit dem mathematischen Formalismus berechnet wurde.

Abbildung 4.12. – Ergebnisse der zweiten Messung.

Abbildung (4.12a) gibt die gemessenen Daten der Frequenzänderungen und Amplitudenverläufe der zweiten Messung wieder mit den dazugehörigen Glättungen in dem relevanten Bereich. Abbildung (4.12b) gibt die Daten der parallel gemessenen Nettoauslenkung wieder. Auch hier wurde wieder wegen des Störsignals die Differenz der Hin- und Rückkurve gebildet, um einen Kraftverlauf zu erlangen, der vergleichbar mit dem rekonstruierten Kraftverlauf ist.

Abbildung (4.12c) zeigt, dass auch bei dieser Messung die rekonstruierte Kraft sehr gut mit der parallel gemessenen Kraft übereinstimmt. Auch hier ist wieder das Plateau bei ca. 65pN zu beobachten, ein zweites Plateaus ist nicht zu erkennen. Bei dieser Messung ist im Signal der Energiedissipation im Bereich des Anstiegs zum ersten Plateau ein im Vergleich zur ersten Messung deutlicher Abfall gefolgt von einem Anstieg auf das Ausgangsniveau zu erkennen. In diesem Bereich finden nicht-konservative Effekte statt. Während des Plateaus ist keine signifikante Änderung der Energiedissipation zu beobachten, bis das Signal ab dem Ende des Plateaus wieder dem Kraftverlauf entsprechend abfällt.

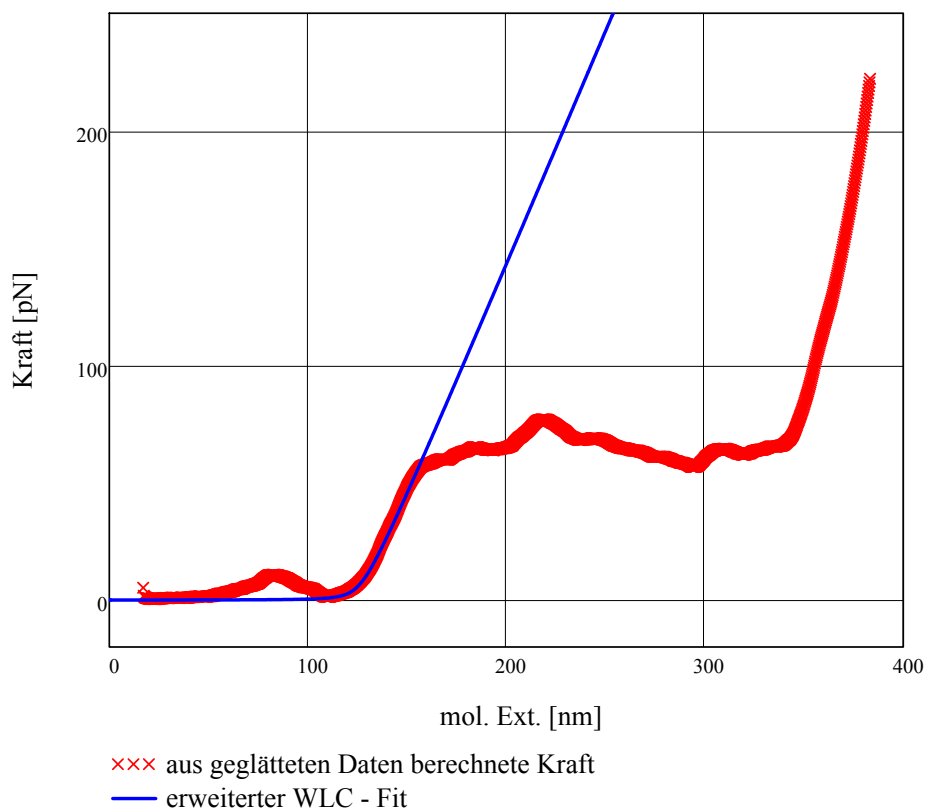
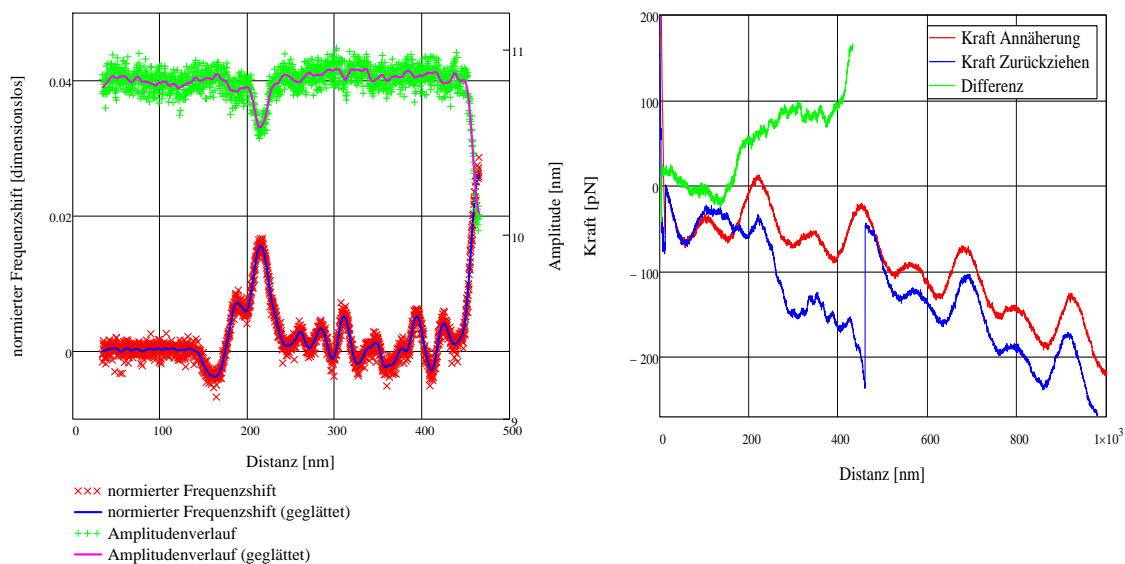


Abbildung 4.13. – Kraftverlauf aus dem zweiten geglätteten Datensatz mit erweitertem WLC-Fit.

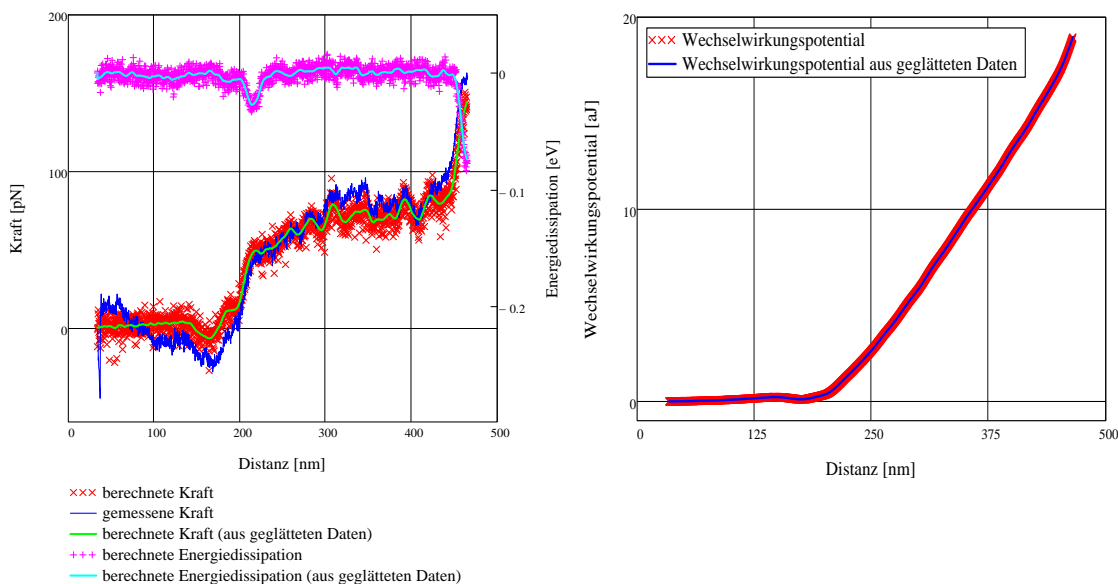
Abbildung (4.13) zeigt den zweiten, rekonstruierten Kraftverlauf mit einem erweiterten WLC-Fit. Die Parameters dieses Fits waren $l_P = 47 \pm 2\text{nm}$, $L = 130 \pm 3\text{nm}$ und $\Phi = 260 \pm 51\text{pN}$. Auch bei diesen Werten ist zu bemerken, dass die Persistenzlänge wieder gut zu den Literaturwerten aus [Bou+99] passt, das Dehnungselastizitätsmodul jedoch wieder sehr viel kleiner als der Literaturwert aus [Bou+99] ist.

Die Ergebnisse einer dritten Messung sind nachfolgend dargestellt.



(a) Gemessene Frequenzshift- und Amplitudenverlauf-Daten einer dritten DNA-Kraftkurve, freie Amplitude 10,8nm

(b) Parallel gemessene Kraft der dritten Kurve. Zu sehen sind wieder Annäherung und Zurückziehen sowie die Differenz.



(c) Rekonstruierte und gemessene Kraft sowie die berechnete Energiedissipation der dritten Messung.

(d) Wechselwirkungspotential der dritten Messung.

Abbildung 4.14. – Ergebnisse der dritten Messung.

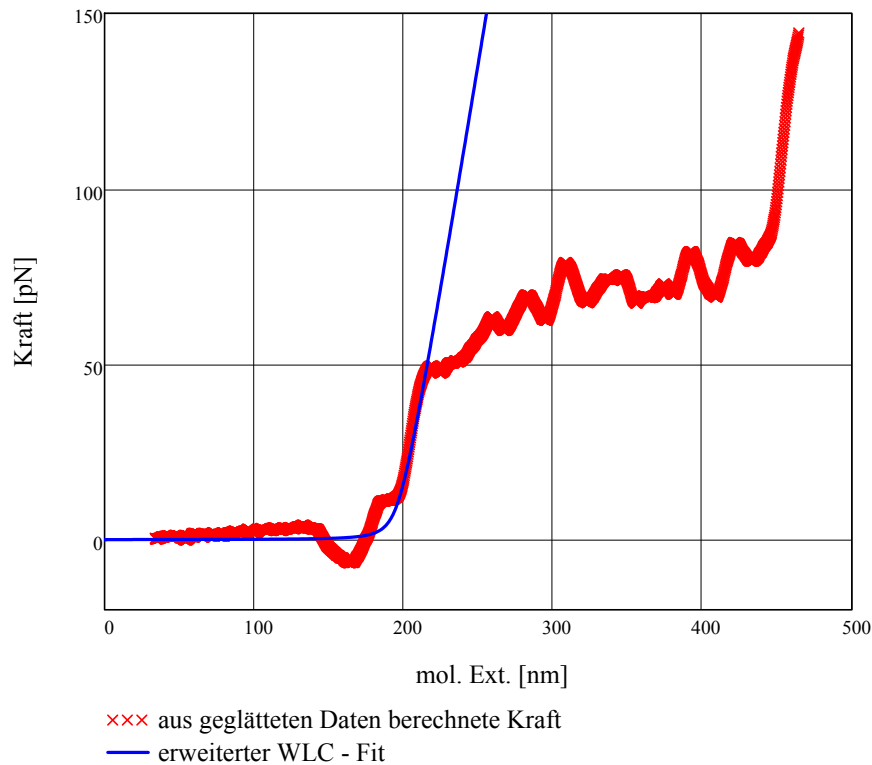
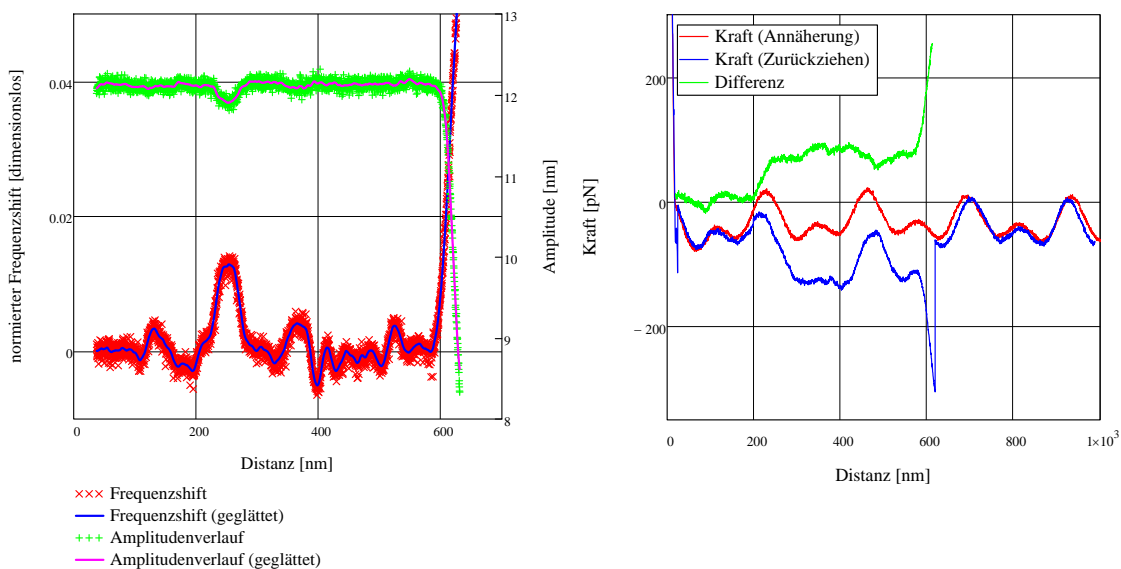


Abbildung 4.15. – Kraftverlauf aus den geglätteten dritten Datensatz mit erweitertem WLC-Fit.

Abbildung (4.14a) zeigt die gemessenen Daten der Frequenzänderungen und Amplitudenverläufe der dritten Messung mit den dazugehörigen Glättungen. Abbildung (4.14b) gibt die Daten der parallel gemessenen Nettoauslenkung wieder. Auch hier wurde die Differenz der Hin- und Rückkurve gebildet, um einen vergleichbaren Kraftverlauf zu erlangen. Auch bei dieser Messung stimmen die rekonstruierte Kraft und parallel gemessene Kraft sehr gut überein, wie in Abbildung (4.14c) zu sehen ist. Das Plateau bei ca. 65pN ist klar zu erkennen, ein zweites Plateaus ist nicht vorhanden. Auch bei dieser Messung ist im Signal der Energiedissipation im Bereich des Anstiegs zum ersten Plateau ein deutlicher Dip im Signal zu erkennen. Während des Plateaus ist keine signifikante Änderung der Energiedissipation zu beobachten, bis das Signal ab dem Ende des Plateaus wieder dem Kraftverlauf entsprechend abfällt.

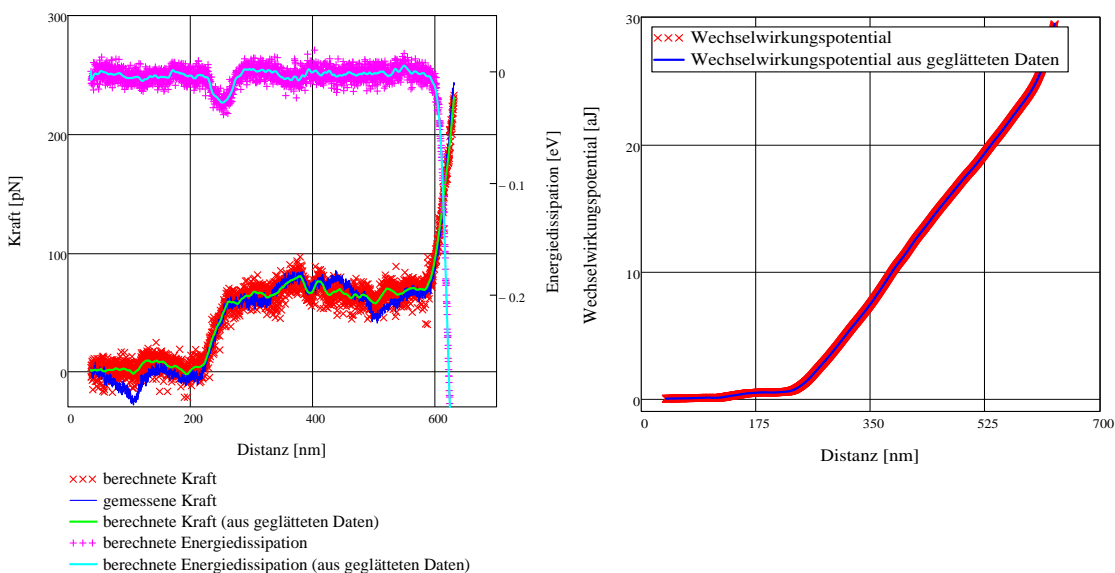
Abbildung (4.15) zeigt den dritten, rekonstruierten Kraftverlauf mit einem erweitertem WLC-Fit. Die Parameters dieses Fits waren $l_p = 52 \pm 2\text{nm}$, $L = 201 \pm 7\text{nm}$ und $\Phi = 530 \pm 124\text{pN}$. Auch hier der gleiche Sachverhalt: zum Literaturwert passende Persistenzlänge, jedoch ein viel kleineres Dehnungselastizitätsmodul [Bou+99].

Die Ergebnisse einer vierten Messung sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.



(a) Gemessene Frequenzshift- und Amplitudenverlauf-Daten einer vierten DNA-Kraftkurve, freie Amplitude 12,2nm

(b) Parallel gemessene Kraft der vierten Kurve. Zu sehen sind wieder Annäherung und Zurückziehen sowie die Differenz.



(c) Rekonstruierte und gemessene Kraft sowie die berechnete Energiedissipation der vierten Messung.

(d) Wechselwirkungspotential der vierten Messung.

Abbildung 4.16. – Ergebnisse der vierten Messung.

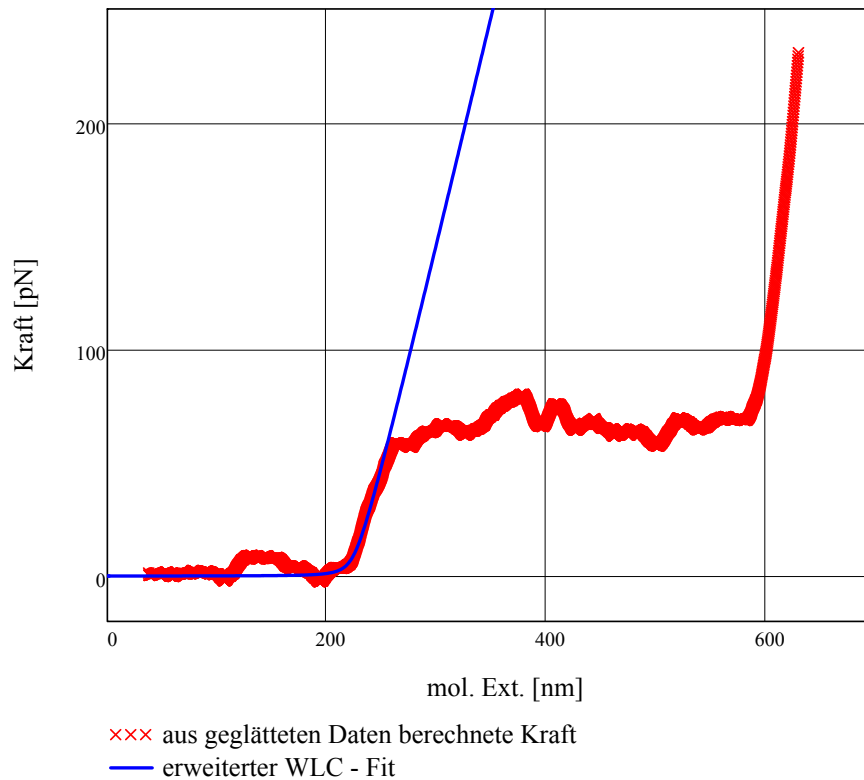


Abbildung 4.17. – Kraftverlauf aus den geglätteten vierten Datensatz mit erweitertem WLC-Fit.

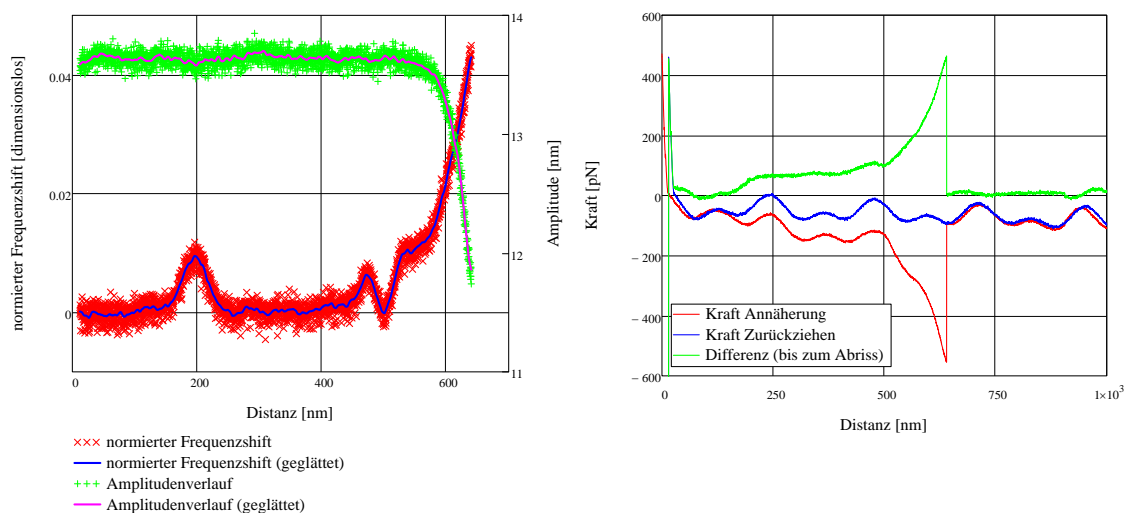
Abbildung (4.16a) zeigt die gemessenen Daten der Frequenzänderungen und Amplitudenverläufe der vierten Messung. Die dazugehörigen Glättungen sind ebenfalls eingezeichnet. Abbildung (4.16b) gibt die Daten der parallel gemessenen Nettoauslenkung wieder. Auch hier wurde die Differenz der Hin- und Rückkurve gebildet, um einen vergleichbaren Kraftverlauf zu erlangen.

Die rekonstruierte Kraft und die parallel gemessene Kraft zeigen im Rahmen des Fehlers wieder eine gute Übereinstimmung, wie in Abbildung (4.16c) erkennen lässt. Das Plateau bei ca. 65pN ist klar zu erkennen, ein zweites Plateaus ist nicht zu beobachten. Der Verlauf der Energiedissipation zeigt im Bereich des Anstiegs zum ersten Plateau wieder einen deutlicher Abfall des Signals mit anschließendem Anstieg auf das ursprüngliche Niveau bei null. Während des Plateaus bleibt der Verlauf der Energiedissipation konstant bei null, bis das Signal ab dem Ende des Plateaus wieder dem Kraftverlauf entsprechend abfällt.

Abbildung (4.17) zeigt den vierten, rekonstruierten Kraftverlauf mit einem erweitertem WLC-Fit. Die Parameters dieses Fits waren $l_P = 49 \pm 2\text{nm}$, $L = 231 \pm 3\text{nm}$ und $\Phi = 470 \pm 93\text{pN}$. Die Vergleiche dieser Fitparameter mit den jeweiligen Literaturwerten erge-

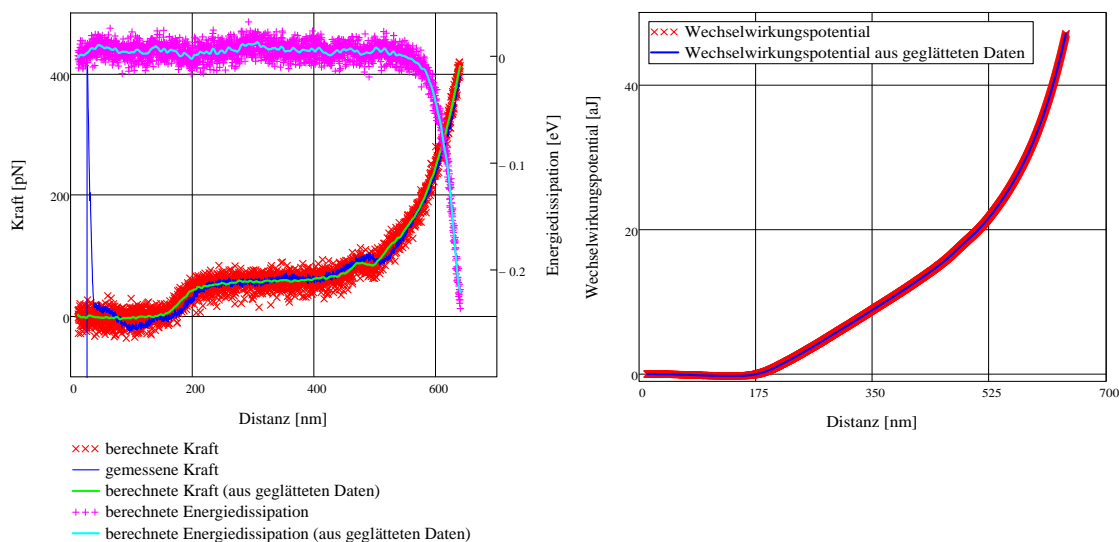
ben ähnliche Ergebnisse wie die drei Messungen zuvor.

Die Ergebnisse einer fünften Messung werden nachfolgend vorgestellt.



(a) Gemessene Frequenzshift- und Amplitudenverlauf-Daten einer fünften DNA-Kraftkurve, freie Amplitude 13,7nm

(b) Parallel gemessene Kraft der fünften Kurve. Zu sehen sind wieder Annäherung und Zurückziehen sowie die Differenz.



(c) Rekonstruierte und gemessene Kraft sowie die berechnete Energiedissipation der fünften Messung.

(d) Wechselwirkungspotential der fünften Messung.

Abbildung 4.18. – Ergebnisse der fünften Messung.

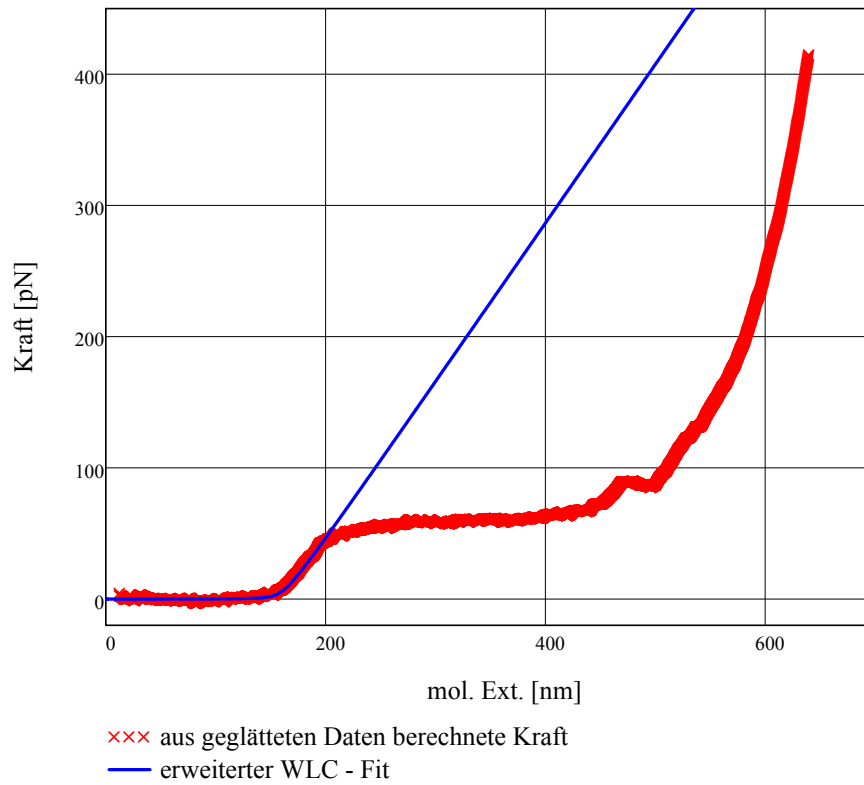


Abbildung 4.19. – Kraftverlauf aus dem fünften geglätteten Datensatz mit erweitertem WLC-Fit.

Abbildung (4.18a) zeigt die gemessenen Daten der Frequenzänderungen und Amplitudenverläufe der fünften Messung. Die dazugehörigen Glättungen sind ebenfalls eingezeichnet. Abbildung (4.18b) gibt die Daten der parallel gemessenen Nettoauslenkung wieder. Auch hier wurde die Differenz der Hin- und Rückkurve gebildet, um einen vergleichbaren Kraftverlauf zu erlangen.

Die im Rahmen des Fehlers gute Übereinstimmung der rekonstruierte Kraft mit der parallel gemessene Kraft ist auch in Abbildung (4.18c) zu beobachten. Das Plateau bei ca. 65pN ist wieder klar zu erkennen. Ein zweites Plateau könnte kurz nach dem ersten Plateau vermutet werden. Eine ähnliche Struktur ist zu erkennen. Jedoch tritt diese Struktur bei einer Kraft von ca. 90pN auf, woraus geschlossen werden kann, dass es sich nicht um das zweite Plateau der DNA im eigentlichen Sinne handelt. Diese Plateaus werden im Allgemeinen bei Kräften um 150pN beobachtet. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Struktur um ein zufälliges Ereignis handelt, das nicht näher klassifiziert werden kann. Der Verlauf der Energiedissipation zeigt im gesamten Verlauf ein konstantes Verhalten. Im Bereich des Anstiegs zum ersten Plateau kann, wie bei der ersten Messung,

allenfalls ein leichter Dip erahnt werden. Während des Plateaus bleibt der Verlauf der Energiedissipation ebenfalls konstant bei null, bis das Signal ab dem Ende des Plateaus dem Kraftverlauf entsprechend abfällt.

Abbildung (4.19) zeigt den zweiten, rekonstruierten Kraftverlauf mit einem erweiterten WLC-Fit. Die Parameters dieses Fits waren $l_P = 53 \pm 4\text{nm}$, $L = 165 \pm 4\text{nm}$ und $\Phi = 200 \pm 33\text{pN}$. Auch diese Parameterkombination bestätigt die Tendenz der vorherigen Vergleiche zu den Literaturwerten aus [Bou+99].

5. Diskussion der Ergebnisse

Werden alle dynamischen Kraftspektroskopiemessungen an DNA miteinander verglichen, so kann zunächst festgestellt werden, dass bei allen Messungen die Dehnungselastizitätsmodule, die als Fitparameter des erweiterten WLC-Modells auftreten, signifikant unter den Literaturwerten liegen, die bei quasistatischen Dehnungsexperimenten an DNA beobachtet wurden [Bou+99] und die ebenfalls bei quasistatischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden (siehe Abbildung 2.15).

Eine Abhängigkeit der Elastizitätsmodule von anderen Größen wie z.B. der Konturlänge oder der freien Amplitude kann bei diesen fünf Ereignissen nicht erkannt werden.

Der Hauptunterschied der in dieser Arbeit verwendeten Methode zu quasistatischen AFM-Kraftspektroskopieexperimenten ist die Oszillation des Cantilevers. Dieser Sachverhalt legt nahe, dass die zusätzliche Dynamik des oszillierenden Cantilevers die Elastizität von dsDNA-Molekülen herabsetzt. Diskutiert werden muss dieser Sachverhalt vor dem Hintergrund, dass die Oszillation des Cantilevers zu hochfrequenten Streckungen und Relaxationen der DNA führt. Das dabei zusätzlich auftretende Aufbrechen der Basenpaare und der damit verbundene Rückgang der stabilisierenden Stapelwechselwirkungen sowie dem Aufbrechen zusätzlich stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen setzt die Elastizitäten im Vergleich zu quasistatischen Experimenten dementsprechend herab.

Werden die Verläufe der Energiedissipationen betrachtet, so fällt auf, dass bei den beiden Messungen mit den größeren freien Amplituden ($>13\text{nm}$) praktisch keine Energiedissipationen zu beobachten und allenfalls zu erahnen sind. Bei den anderen drei Messungen (freie Amplituden $<13\text{nm}$) sind Energiedissipationen von einem Betrag von ca. 30meV pro Schwingungszyklus zu beobachten. Diese Energiedissipationen treten nur während des Übergangs zum ersten Plateau auf. Während des Plateaus sind keine weiteren Beiträge zur Energiedissipation zu beobachten.

Die Energiedissipation beschreibt den Unterschied in den auf die Spitze wirkenden Kraftverläufen während der Hin- und Zurückbewegung der Spitze in einem Schwingungszyklus. Unterscheiden sich die Kraftverläufe (durch nicht-konservative Effekte), so entspricht dies einer Energiedifferenz. Diese geleistete Arbeit entspricht der Energiedissipation.

Übertragen auf die Energiedissipationsverläufe der Messungen bedeutet dies, dass während

des Beginns des Übergangs zum ersten Plateau dissipative Effekte auftauchen, die reproduzierbar nachgewiesen werden können. In diesen Bereichen unterscheiden sich dementsprechend die Kraftverläufe während der Hin- bzw Rückbewegung in einem Schwingungszyklus. Unterschiede im Kraftverlauf bei Hin- und Rückbewegungen während der Dehnung von dsDNA sind auch mit statischen Kraftspektroskopiemethoden zu beobachten (\rightarrow Hysterese). Diese Hysteresen sind ebenfalls während des Übergangs zum bzw. zu Beginn des ersten Plateaus zu beobachten [SCB96]. Daher kann daraus geschlossen werden, dass die Effekte, die verantwortlich für das Auftreten der Energiedissipationen im Rahmen dieser Messungen sind, womöglich die gleichen Effekte sind, die das Auftreten der Hysterese bei statischen Kraftspektroskopieexperimenten verursachen.

Nach dem Modell von Williams et al. [Wil+01a] sind das zum einen irreversibel geschmolzene Domänen im DNA-Molekül und zum anderen die Tatsache, dass die Rekombination der Basenpaare beim Relaxieren sehr lange braucht [RB01a]. Die zweite der beiden genannten Tatsachen könnte zudem dafür verantwortlich sein, dass bei den beiden Messungen mit den größten Amplituden keine signifikanten Energiedissipationen zu beobachten sind. Eine große Amplitude bei gleicher Frequenz bedeutet eine höhere Bahngeschwindigkeit der Spitze. Bei großen Amplituden ist diese Geschwindigkeit der Spitze so groß, dass die im Vergleich dazu langsame Rekombination nicht mehr stattfinden kann. Dem Modell entsprechend fände somit auf der Zeitskala der Cantileverschwingung keine Rekombination zu einem Doppelstrang statt. Dies würde zum Ausbleiben dissipativer Effekte führen. Die Streckung des Polymers wäre nur enthalpischer Natur.

Die Frage, warum nur zu Beginn des ersten Plateaus Energiedissipationen zu beobachten sind, bei größerer molekularer Extension während des Plateaus jedoch keine Dissipationen messbar sind, lässt sich hiermit nur modellhaft erklären.

Würde Energiedissipation während des Plateaus gemessen, so wäre dies gleichbedeutend mit der Detektion irreversibel geschmolzener Domänen durch die Oszillation des Cantilevers in der Größenordnung der Amplitude. Zudem ist auch hier die Zeitskala, auf der die Detektion der Energiedissipation stattfinden muss, vorgegeben durch die Schwingungsfrequenz des Cantilevers (ca. 30-35kHz). Nach Rouzina und Bloomfield braucht die Rekombination der Basenpaare beim Relaxieren sehr lange. In ihrer Arbeit [RB01a] berichten sie von 3 bis 3000 Basenpaare pro Sekunde. Dies legt die mögliche Interpretation nahe, dass die Detektion der Energiedissipation bedingt durch die zeitliche Skala zu keinem Ergebnis führt.

Im Bereich des Plateaunsets sind nur wenige Basenpaare bereits geschmolzen. Der DNA-Strang liegt noch relativ geordnet als Doppelstrang vor. Rekombinationen in diesem Bereich können daher schneller stattfinden. Somit besteht aus zeitlicher Sicht hier die Mög-

lichkeit, die Energiedissipation zu messen, was zu den in dieser Arbeit gemessenen Ergebnissen führt.

Daher sind unter diesen Annahmen die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten Experimente konsistent mit den bereits zuvor publizierten Ergebnissen und Modellen [SCB96; RCG99; Wil+01a; Mam+09; Gro+11].

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bestehendes, kommerzielles Rasterkraftmikroskop um einen neuen Messmodus erweitert und darauf aufbauend eine neuartige Form von dynamischen Kraftspektroskopieexperimenten an einzelnen DNA-Molekülen durchgeführt.

Ein Multimode V-AFM wurde mit einem QFM-Modul kombiniert, um auf diese Weise einen selbstangeregten Frequency-Modulation-Modus (FM-Modus) mit konstanter Anregung zu ermöglichen. Im Gegensatz zu dem regulären Amplitude-Modulation-Modus (auch Tapping-Modus genannt) oszilliert der Cantilever, durch eine spezielle Feedback-Schleife ermöglicht, selbstangeregt und somit immer bei seiner aktuellen Resonanzfrequenz. Die Amplitude der Anregung durch den Anregungspiezokristall wird konstant gehalten, lediglich die Frequenz der Anregung ändert sich der aktuellen Resonanzfrequenz des Cantilevers entsprechend. Dies bedeutet, dass sowohl die Schwingungsamplitude der Cantileverschwingung als auch die Resonanzfrequenz je nach äußerer Wechselwirkung variiert. Die Resonanzfrequenzänderung relativ zu der freien Resonanzfrequenz des Cantilevers sowie die Amplitudensignale können vom QFM-Controller abgegriffen und aufgenommen werden. Mit dieser Technologie lassen sich Topographie-Bilder erstellen. Die Abhängigkeit der Amplitude ist bei diesem Modus, im Gegensatz zum Tapping-Modus, sehr viel sensibler bezüglich der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe. Daher ist die mechanische Belastung der Probe deutlich kleiner, was bedeutet, dass dieser Modus besonders für die Abbildung von weichen Proben geeignet ist.

Neben dem Abbilden kann dieser Modus jedoch ebenfalls dazu verwendet werden, dynamische Kraftspektroskopieexperimente durchzuführen. Dies stellt den Kern dieser Arbeit dar. Nach erfolgreicher Implementierung des QFM-Moduls in das vorhandene Multimode V-AFM wurden zunächst Kraftkurven auf reinen, unfunktionalisierten Goldsubstratoberflächen aufgenommen. Ein sehr großer Vorteil der Kraftspektroskopieexperimente in diesem Modus ist das Ausbleiben von sogenannten Snap-to-Contact-Effekten. Die Ursachen dieser Effekte, die hauptsächlich bei Kraftspektroskopieexperimenten an Luft auftreten, sind unter anderem Adhäsion und elektrostatische Effekte. Da an Luft immer ein dünner Wasserfilm auf den Substratoberflächen angelagert ist, treten bei der Annäherung der Spitze an die Oberfläche bei bestimmten Abständen Adhäsionskräfte auf, die die Spitze dann

unmittelbar auf die Oberfläche ziehen. Beim Zurückziehen sind diese Kräfte dann verantwortlich für ein längeres Verbleiben der Spitze auf der Oberfläche trotz Zurückfahrens des z-Piezos. Die Spitze „klebt“ an der Oberfläche, bis die Auslenkung und somit die Kraft des Cantilevers groß genug ist, um sich von der Oberfläche zu lösen. Danach springt die Spitze unmittelbar zu der aktuellen Position, zu der der z-Piezo bereits gefahren ist. Diese Effekte erschweren somit die Vermessung des Wechselwirkungsbereichs in unmittelbarer Nähe der Oberfläche. Durch Verwendung des neuen Modus konnten jedoch Kraftspektroskopiekurven aufgenommen werden, bei denen dieser Effekt ausblieb. Dabei wurden der Resonanzfrequenzshift und die Amplitude der Cantileverschwingung aufgenommen. Mit einem selbst programmierten Algorithmus konnte aus diesen beiden gemessenen Kanälen der Kraftverlauf rekonstruiert werden. Der Bereich in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche konnte somit ebenfalls vermessen werden. Der Kraftverlauf im zunächst attraktiven Wechselwirkungsbereich konnte ebenso gemessen werden wie der anschließende repulsive Bereich. Diese Messungen wurden mit verschiedenen Cantilevern bei verschiedenen freien Amplituden durchgeführt und lieferten in sich konsistente Ergebnisse. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit vergleichbaren Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [Sch+07] lieferten eine gute Übereinstimmung. Damit konnte zunächst gezeigt werden, dass sowohl der Versuchsaufbau funktioniert als auch die Auswertung mit Hilfe des selbst geschriebenen Programms konsistente Ergebnisse liefert.

Darauf aufbauend wurden die Einzelmolekül-Kraftspektroskopieexperimente durchgeführt. Die Dehnung einzelner dsDNA-Moleküle ist seit den grundlegenden Arbeiten von Smith et al. von 1992 immer wieder Gegenstand von experimentellen als auch theoretischen Arbeiten. Aufgrund der herausragenden Rolle von DNA als Biomolekül ist das Verständnis der mechanoelastischen sowie thermodynamischen Charakteristika von DNA von außerordentlichem Interesse. Verschiedenste Modelle des Verhaltens von DNA unter Dehnung wurden entwickelt. Aktuell kann jedoch kein Modell alle bisher beobachteten Merkmale erklären. Die kraftspektroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit sollen zum Verständnis beitragen.

Damit DNA mit Hilfe eines AFM gestreckt werden kann, muss das DNA-Molekül an einem Ende an einer AFM-Spitze und mit dem anderen Ende an einer Substratoberfläche fest anbinden. Während dieser Arbeit wurden mehrere verschiedene Protokolle getestet, dies mittels spezifischer Bindungen zu erreichen. Hintergrund dieser Versuche war es, die Wahrscheinlichkeit für verwertbare Kraftkurven zu erhöhen. Leider führte keine Versuchsreihe zu den gewünschten Ergebnissen. Während dieser Messungen konnten mit keinem Protokoll verwertbare Kurven gemessen werden, woraus geschlossen wird, dass die verwendeten Präparationsprotokolle einen gegenteiligen Effekt haben. Über die Gründe kann

nur spekuliert werden. Am wahrscheinlichsten sind die Gründe in der Cantileverschwingung zu suchen. Sie stellt den Hauptunterschied zu quasistatischen AFM-Kraftspektroskopieexperimenten dar. Die Frequenzen der Cantileverschwingungen liegen im Bereich 10^4 bis 10^5 Hertz. Die Assoziationskonstanten der spezifischen Bindungen liegen im Bereich $k_{\text{on}} = 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ein Vergleich lässt darauf schließen, dass die spezifischen Bindungen aufgrund der Größenordnung der Schwingungsfrequenz nicht genügend Zeit für eine stabile Ausbildung der Bindung haben.

Somit wurde die konventionelle Methode unter Ausnutzung zufälliger, unspezifischer Bindungen zur Präparation der DNA verwendet. Geringe Binderaten im Zusammenhang mit unspezifischen Wechselwirkungen machen es schwer, eine ausreichende Menge an Daten aufzunehmen. Durch den Effekt des oszillierenden Cantilevers wird diese Menge nochmals reduziert ist, was die Anzahl verwertbarer Kurven, die im Laufe dieser Arbeit aufgenommen werden konnten, nochmals reduziert.

Neben der passenden Präparation ist auch die Wahl der Cantilever ein wichtiger Faktor. Ziel der Experimente war neben der Aufnahme der Resonanzfrequenz- und Amplitudenänderungen auch die parallele Aufnahme der Nettoauslenkung und somit der direkten Kraft. Die parallel aufgenommene Kraft kann dann mit der aus den anderen beiden Kanälen rekonstruierten Kraft verglichen werden. Neben der konservativen Kraft ermöglicht die Aufnahme der Amplitudenänderung die Berechnung der Energiedissipation pro Schwingungszyklus. Diese Energiedissipation liefert weitere Informationen über den Dehnungsvorgang. Damit jedoch solche Messungen erfolgreich durchgeführt werden können, muss der benutzte Cantilever einige Kriterien erfüllen. Der Cantilever muss sich durch einen hohen Q-Faktor bei einer möglichst großen Resonanzfrequenz auszeichnen damit seine Dämpfung klein ist. Im Laufe der Arbeit wurden viele verschiedene Cantilever getestet, bis schließlich ein Cantilevertyp gefunden wurde, der diese Messungen ermöglichte.

Unter Verwendung der passenden Cantilever und mit dem „richtigen“ Präparationsprotokoll konnten schließlich bei verschiedenen Messreihen Messkurven aufgenommen werden, die sich auswerten ließen und nach der Auswertung mit dem selbst programmierten Algorithmus einen schlüssigen Kraftverlauf lieferten. Die rekonstruierten Kraftverläufe dieser Messungen stimmten im Rahmen eines Messfehlers sehr gut mit den parallel gemessenen Kräften überein, was für die Funktionalität der Methode spricht. Somit konnten die Ziele, den Messmodus zu implementieren, eine Auswertealgorithmus zu erstellen und Einzelmolekül-Kraftspektroskopieexperimente an DNA erfolgreich durchzuführen, erreicht werden. Die Frage nach neuen Einblicken in die Natur des Phasenübergangs eines DNA-Moleküls durch Analyse der Energiedissipation pro Schwingungszyklus konnte nicht abschließend geklärt werden. Zwar können die gemessenen Energiedissipationsverläufe konsistent mit

schon existierenden theoretischen Modellen der Phasenübergänge bei dsDNA-Molekülen erklärt werden, neue Erkenntnisse ließen sich aus den Kurven bislang leider nicht extrahieren.

In der in dieser Arbeit vorgestellten Methode der Kraftspektroskopie liegt ein großes Potential, neue Erkenntnisse über das mechanoelastische und thermodynamische Verhalten von, im Allgemeinen, Biopolymeren zu erhalten. Ein Nachteil, der nicht verschwiegen werden sollte, ist die große Empfindlichkeit der Methode gegenüber äußeren Störungen, wie z.B. Erschütterungen oder Schall.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus zeitlichen Gründen selbstverständlich nicht alle Präparationsmethoden getestet werden. In diesem Bereich bestehen für zukünftige Anwendungen noch einige Möglichkeiten der Optimierung des Verfahrens, um die Ausbeute von verwertbaren Kurven zu erhöhen. Des Weiteren kann durch die weiterführende Suche und anschließende Wahl von noch geeigneteren Cantilevern der Messprozess verbessert werden und unter Umständen die Auflösung sowohl der Kraft als auch der Energiedissipation verbessert werden. Dies würde die Möglichkeit bieten, Effekte während des Überstreckens von dsDNA im Signal der Energiedissipation zu finden, die bisher noch nicht aufgelöst werden konnten.

Ein weiterer Punkt für zukünftige Entwicklungen ist die theoretische Untermauerung der experimentellen Ergebnisse. Die Form der in dieser Arbeit aufgenommenen und rekonstruierten Kraftverläufe weicht teilweise von der Form von Kraftverläufen, die in anderen Veröffentlichungen [Bou+99; RCG99] publiziert wurden, ab. Deutlich macht dies der Vergleich der Fitparameter des erweiterten WLC-Modells (Persistenzlänge, Elastizitätsmodul). Der Einfluss der Cantileveroszillation und der damit zusätzlichen Dynamik auf das Dehnungsverhalten von dsDNA ist ein Punkt, der theoretischer Analyse bedarf. Aufbauend auf solchen Ergebnissen könnten die CE-Kraftkurven qualitativ und quantitativ effektiver analysiert werden.

In dieser Arbeit wurden die Grundlagen für die Durchführung und Auswertung kraftspektroskopischer, im Constant-Excitation-Modus durchführbarer Messungen an dsDNA geschaffen. Nach einer ausführlichen Suche der passenden Rahmenbedingungen für die Messungen an dsDNA konnte die Funktionalität der Methode anhand erfolgreich aufgenommener Kurven gezeigt werden.

A. Literatur

- [Adr13] Username: Adrian. *General schematic of an AFM*. Mai 2013. URL: <http://sketchup.google.com/3dwarehouse/%20download?mid=65a40f3d33578bb47c923bcf4b00c71e&rtyp=s8&fn=general+AFM+schematic&ctyp=other&ts=1298789922000>.
- [AKF96] B. Anczykowski, D. Krüger und H. Fuchs. „Cantilever dynamics in quasinoncontact force microscopy: Spectroscopic aspects“. In: *Physical Review B* 53.23 (1996), S. 15485–15488. DOI: 10.1103/PhysRevB.53.15485.
- [Alb+91] T. R. Albrecht u. a. „Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity“. In: *Journal of Applied Physics* 69.2 (1991), S. 668–673. DOI: 10.1063/1.347347.
- [Anc+98] B. Anczykowski u. a. „Analysis of the interaction mechanisms in dynamic mode SFM by means of experimental data and computer simulation“. In: *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 66 (1998), S. 885–889. DOI: 10.1007/s003390051261.
- [Anc+99] B. Anczykowski u. a. „How to measure energy dissipation in dynamic mode atomic force microscopy“. In: *Applied Surface Science* 140.3–4 (1999), S. 376–382. ISSN: 0169-4332. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4332\(98\)00558-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4332(98)00558-3).
- [ARB98] Amir Ahsan, Joseph Rudnick und Robijn Bruinsma. „Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition“. In: *Biophysical Journal* 74.1 (1998), 132–137. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77774-4.
- [Ash+86] A. Ashkin u. a. „Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles“. In: *Optical Letters* 11.5 (Mai 1986), S. 288–290. DOI: 10.1364/OL.11.000288.

- [Ash97] Arthur Ashkin. „Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94.10 (1997), S. 4853–4860.
- [BBS03] Carlos Bustamante, Zev Bryant und Steven B. Smith. „Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics“. In: *Nature* 421.6921 (2003), S. 423–427. DOI: 10.1038/nature01405.
- [BEH97] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet und F. Heslot. „Molecular Stick-Slip Motion Revealed by Opening DNA with Piconewton Forces“. In: *Physical Review Letters* 79 (22 Dez. 1997), S. 4489–4492. DOI: 10.1103/PhysRevLett.79.4489.
- [Bel78] GI Bell. „Models for the specific adhesion of cells to cells“. In: *Science* 200.4342 (1978), S. 618–627. DOI: 10.1126/science.347575.
- [Bin+82] G. Binnig u. a. „Tunneling through a controllable vacuum gap“. In: *Applied Physics Letters* 40.2 (1982), S. 178–180. DOI: 10.1063/1.92999.
- [BJ95] H. - J. Butt und M. Jaschke. „Calculation of thermal noise in atomic force microscopy“. In: *Nanotechnology* 6.1 (1995), S. 1. DOI: 10.1088/0957-4484/6/1/001.
- [BM07] Bharat Bhushan und Othmar Marti. „Scanning Probe Microscopy – Principle of Operation, Instrumentation, and Probes“. In: *Springer Handbook of Nanotechnology*. Hrsg. von Bharat Bhushan. Springer Berlin Heidelberg, 2007, S. 591–636. ISBN: 978-3-540-29855-7. DOI: 10.1007/978-3-540-29857-1_22.
- [BMW00] Carlos Bustamante, Jed C. Macosko und Gijs J. L. Wuite. „Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one“. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1.2 (2000), S. 130–136. DOI: 10.1038/35040072.
- [Bou+99] C. Bouchiat u. a. „Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from forceextension measurements“. In: *Biophysical Journal* 76 (1999), S. 409–413.

-
- [BQG86] G. Binnig, C. F. Quate und C. Gerber. „Atomic Force Microscope“. In: *Physical Review Letters* 56.9 (1986), S. 930–933. DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
- [Bue79] F. Bueche. *Physical Properties of Polymers*. R. E. Krieger Publishing Company, 1979. ISBN: 9780882758336.
- [Bus+00] Carlos Bustamante u. a. „Single-molecule studies of DNA mechanics“. In: *Current Opinion in Structural Biology* 10.3 (2000), S. 279–285. ISSN: 0959-440X. DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00085-3.
- [Cal+09] Christopher P. Calderon u. a. „Quantifying DNA melting transitions using single-molecule force spectroscopy“. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* 21.3 (2009), S. 034114. DOI: 10.1088/0953-8984/21/3/034114.
- [Cla+00] Hauke Clausen-Schaumann u. a. „Mechanical Stability of Single DNA Molecules“. In: *Biophysical Journal* 78.4 (2000), 1997–2007. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76747-6.
- [Cle+93] J. P. Cleveland u. a. „A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy“. In: *Review of Scientific Instruments* 64.2 (1993), S. 403–405. DOI: 10.1063/1.1144209.
- [Clu+96] Philippe Cluzel u. a. „DNA: An Extensible Molecule“. In: *Science*. New Series 271.5250 (1996), S. 792–794. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.271.5250.792.
- [EOH09] D. Ebeling, F. Oesterhelt und H. Hölscher. „Dynamic force spectroscopy of single chainlike molecules using the frequency-modulation technique with constant-excitation“. In: *Applied Physics Letters* 95.1 (2009), S. 013701. DOI: 10.1063/1.3152771.
- [Epa69] V. Epanechnikov. „Non-Parametric Estimation of a Multivariate Probability Density“. In: *Theory of Probability and Its Applications* 14.1 (1969), S. 153–158. DOI: 10.1137/1114019.
- [ER97] E. Evans und K. Ritchie. „Dynamic strength of molecular adhesion bonds“. In: *Biophysical Journal* 72.4 (1997), S. 1541–1555. ISSN: 0006-3495. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78802-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78802-7).

- [ERM95] E. Evans, K. Ritchie und R. Merkel. „Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces“. In: *Biophysical Journal* 68.6 (1995), 2580—2587. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80441-8.
- [Eva+91] E. Evans u. a. „Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. II. Mechanical energies to separate large contact areas“. In: *Biophysical J* 59.4 (1991), S. 849–860. DOI: 10.1016/S0006-3495(91)82297-4.
- [FMG94] EL Florin, VT Moy und HE Gaub. „Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs“. In: *Science* 264.5157 (1994), S. 415–417. DOI: 10.1126/science.8153628.
- [Fu+10] Hongxia Fu u. a. „Two distinct overstretched DNA states“. In: *Nucleic Acids Research* 38.16 (2010), S. 5594–5600. DOI: 10.1093/nar/gkq309.
- [Gie+07] Franz Giessibl u. a. „Noncontact Atomic Force Microscopy and Related Topics“. In: *Springer Handbook of Nanotechnology*. Hrsg. von Bharat Bhushan. Springer Berlin Heidelberg, 2007, S. 651–678. ISBN: 978-3-540-29855-7. DOI: 10.1007/978-3-540-29857-1_24.
- [Gie97] Franz J. Giessibl. „Forces and frequency shifts in atomic-resolution dynamic-force microscopy“. In: *Phys. Rev. B* 56 (24 Dez. 1997), S. 16010–16015. DOI: 10.1103/PhysRevB.56.16010.
- [GKB91] P. Gleyzes, P. K. Kuo und A. C. Boccaro. „Bistable behavior of a vibrating tip near a solid surface“. In: *Applied Physics Letters* 58.25 (1991), S. 2989–2991. ISSN: 0003-6951. DOI: 10.1063/1.104690.
- [Gla13] Glactone. Aug. 2013. URL: http://chemistry.gsu.edu/Glactone/PDB/DNA_RNA/dna.html.
- [Got+99] B. Gotsmann u. a. „Conservative and dissipative tip-sample interaction forces probed with dynamic AFM“. In: *Physical Review B* 60.15 (1999), S. 11051–11061. DOI: 10.1103/PhysRevB.60.11051.
- [GP02] Ricardo García und Rubén Pérez. „Dynamic atomic force microscopy methods“. In: *Surface Science Reports* 47.6-8 (2002), S. 197–301. ISSN: 0167-5729. DOI: 10.1016/S0167-5729(02)00077-8.

-
- [Gro+11] Peter Gross u. a. „Quantifying how DNA stretches, melts and changes twist under tension“. In: *Nat Phys* 7.9 (2011), S. 731–736. ISSN: 1745-2473. DOI: 10.1038/nphys2002.
- [GWM96] Christopher T Gibson, Gregory S Watson und Sverre Myhra. „Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy“. In: *Nanotechnology* 7.3 (1996), S. 259. DOI: 10.1088/0957-4484/7/3/014.
- [HA05] H. Hölscher und B. Anczykowski. „Quantitative measurement of tip-sample forces by dynamic force spectroscopy in ambient conditions“. In: *Surface Science* 579.1 (2005), S. 21–26. ISSN: 0039-6028. DOI: DOI: 10.1016/j.susc.2005.01.026.
- [Haf07] Jason Hafner. „Probes in Scanning Microscopies“. In: *Springer Handbook of Nanotechnology*. Hrsg. von Bharat Bhushan. Springer Berlin Heidelberg, 2007, S. 637–650. ISBN: 978-3-540-29855-7. DOI: 10.1007/978-3-540-29857-1_23.
- [HAS02] H. Hölscher, W. Allers und U. D. Schwarz. „Atomen auf den Zahn gefühlt: Dynamische Rasterkraftmikroskopie“. In: *Physik in unserer Zeit* 33.4 (2002), S. 178–182. ISSN: 1521-3943. DOI: 10.1002/1521-3943(200207)33:4<178::AID-PIUZ178>3.0.CO;2-4.
- [HB93] Jeffrey L. Hutter und John Bechhoefer. „Calibration of atomic-force microscope tips“. In: *Review of Scientific Instruments* 64.7 (1993), S. 1868–1873. DOI: 10.1063/1.1143970.
- [HES06] H. Hölscher, D. Ebeling und U. D. Schwarz. „Theory of Q-Controlled dynamic force microscopy in air“. In: *Journal of Applied Physics* 99.8 (2006), S. 084311. DOI: 10.1063/1.2190070.
- [HGS03] H. Hölscher, B. Gotsmann und A. Schirmeisen. „Dynamic force spectroscopy using the frequency modulation technique with constant excitation“. In: *Physical Review B* 68.15 (2003), S. 153401. DOI: 10.1103/PhysRevB.68.153401.
- [Hig+05] Michael J. Higgins u. a. „Frequency modulation atomic force microscopy: a dynamic measurement technique for biological systems“. In: *Nanotechnology* 16.3 (2005), S. 85. DOI: 10.1088/0957-4484/16/3/016.

- [HK90] Hans-Joachim Höltnke und Christoph Kessler. „Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection“. In: *Nucleic Acids Research* 18.19 (1990), S. 5843–5851. DOI: 10.1093/nar/18.19.5843.
- [HMW07] R. G. Haverkamp, A. T. Marshall und M. A. K. Williams. „Model for stretching elastic biopolymers which exhibit conformational transformations“. In: *Physical Review E* 75.2 (2007), S. 021907. DOI: 10.1103/PhysRevE.75.021907.
- [Höl+01] H. Hölscher u. a. „Measurement of conservative and dissipative tip-sample interaction forces with a dynamic force microscope using the frequency modulation technique“. In: *Physical Review B* 64.7 (2001), S. 075402. DOI: 10.1103/PhysRevB.64.075402.
- [Höl02] Hendrik Hölscher. „Q-controlled dynamic force spectroscopy“. In: *Surface Science* 515.2-3 (2002), S. 517–522. ISSN: 0039-6028. DOI: DOI : 10.1016/S0039-6028(02)01971-4.
- [HS06] H. Hölscher und U. D. Schwarz. „Q-controlled amplitude modulation atomic force microscopy in liquids: An analysis“. In: *Applied Physics Letters* 89.7 (2006), S. 073117. ISSN: 00036951. DOI: 10.1063/1.2336723.
- [HSW99] H. Hölscher, U. D. Schwarz und R. Wiesendanger. „Calculation of the frequency shift in dynamic force microscopy“. In: *Applied Surface Science* 140.3-4 (1999), S. 344–351. ISSN: 0169-4332. DOI: DOI : 10.1016/S0169-4332(98)00552-2.
- [HTM00] A. D. L. Humphris, J. Tamayo und M. J. Miles. „Active Quality Factor Control in Liquids for Force Spectroscopy“. In: *Langmuir* 16.21 (2000), S. 7891–7894. DOI: 10.1021/1a000766c. eprint: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/1a000766c>.
- [HWS93] Martin Hegner, Peter Wagner und Giorgio Semenza. „Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy“. In: *Surface Science* 291.1-2 (1993), S. 39–46. ISSN: 0039-6028. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0039-6028\(93\)91474-4](http://dx.doi.org/10.1016/0039-6028(93)91474-4).

-
- [HYZ99] Z. Haijun, Z. Yang und O.-Y. Zhong-Can. „Bending and Base-Stacking Interactions in Double-Stranded DNA“. In: *Physical Review Letters* 82 (1999), S. 4560–4563. DOI: 10.1103/PhysRevLett.82.4560.
- [Isr11] Jacob Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. Revised Third Edition. University of California, Santa Barbara: Elsevier, Juni 2011. ISBN: 978-0-12-391927-4.
- [Jan+00] Andreas Janshoff u. a. „Kraftspektroskopie an molekularen Systemen – Einzelmolekülspektroskopie an Polymeren und Biomolekülen“. In: *Angewandte Chemie* 112.18 (2000), S. 3346–3374. ISSN: 1521-3757. DOI: 10.1002/1521-3757(20000915)112:18<3346::AID-ANGE3346>3.0.CO;2-S.
- [KAF97] D. Krüger, B. Anczykowski und H. Fuchs. „Physical properties of dynamic force microscopies in contact and noncontact operation“. In: *Annalen der Physik* 509.5 (1997), S. 341–363. ISSN: 1521-3889. DOI: 10.1002/andp.19975090502.
- [Kos+99] Konstantin M. Kosikov u. a. „DNA stretching and compression: large-scale simulations of double helical structures“. In: *Journal of Molecular Biology* 289.5 (1999), S. 1301–1326. ISSN: 0022-2836. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2798>.
- [Lég+99] J. F. Léger u. a. „Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule“. In: *Phys. Rev. Lett.* 83.5 (1999), S. 1066–1069. DOI: 10.1103/physrevlett.83.1066.
- [LL96] Anne Lebrun und Richard Lavery. „Modelling Extreme Stretching of DNA“. In: *Nucleic Acids Research* 24.12 (1996), S. 2260–2267. DOI: 10.1093/nar/24.12.2260.
- [LLL99] Y. Z. Liu, S. H. Leuba und S. M. Lindsay. „Relationship between Stiffness and Force in Single Molecule Pulling Experiments“. In: *Langmuir* 15.24 (1999), 8547–8548. ISSN: 0743-7463. DOI: 10.1021/la990267f.
- [MA90] G. Meyer und N. M. Amer. „Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical - beam - deflection atomic force microscope“. In: *Applied Physics Letters* 57.20 (1990), S. 2089. DOI: 10.1063/1.103950.

- [Mam+09] Joost van Mameren u. a. „Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.43 (2009), 18231–18236. DOI: 10.1073/pnas.0904322106.
- [MFG94] Vincent T. Moy, Ernst-Ludwig Florin und Hermann E. Gaub. „Adhesive forces between ligand and receptor measured by AFM“. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 93 (1994), S. 343–348. ISSN: 0927-7757. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)02933-4](http://dx.doi.org/10.1016/0927-7757(94)02933-4).
- [MS95] John F. Marko und Eric D. Siggia. „Stretching DNA“. In: *Macromolecules* 28.26 (1995), S. 8759–8770. DOI: 10.1021/ma00130a008.
- [ND94] Jonas M. Neumeister und William A. Ducker. „Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers“. In: *Review of Scientific Instruments* 65.8 (1994), S. 2527–2531. DOI: 10.1063/1.1144646.
- [Ohl07] Benjamin Ohler. „Cantilever spring constant calibration using laser Doppler vibrometry“. In: *Review of Scientific Instruments* 78.6 (2007), S. 063701. DOI: 10.1063/1.2743272.
- [Pop+01] Lisa H. Pope u. a. „Force-induced melting of a short DNA double helix“. In: *European Biophysics Journal* 30 (1 2001), S. 53–62. ISSN: 0175-7571. DOI: 10.1007/s002490000107.
- [RB01a] Ioulia Rouzina und Victor A. Bloomfield. „Force-Induced Melting of the DNA Double Helix: 1. Thermodynamic Analysis“. In: *Biophysical Journal* 80.2 (2001), S. 882–893. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76067-5.
- [RB01b] Ioulia Rouzina und Victor A. Bloomfield. „Force-Induced Melting of the {DNA} Double Helix. 2. Effect of Solution Conditions“. In: *Biophysical Journal* 80.2 (2001), S. 894–900. ISSN: 0006-3495. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76068-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76068-7).
- [RCG99] Matthias Rief, Hauke Clausen-Schaumann und Hermann E. Gaub. „Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules“. In: *Nature Structural Biology* 6.4 (1999), S. 346–349. DOI: 10.1038/7582.

-
- [RD57] Stuart A. Rice und Paul Doty. „The Thermal Denaturation of Desoxyribose Nucleic Acid“. In: *Journal of the American Chemical Society* 79.15 (1957), S. 3937–3947. DOI: 10.1021/ja01572a001.
- [RFG98] Matthias Rief, Julio M. Fernandez und Hermann E. Gaub. „Elastically Coupled Two-Level Systems as a Model for Biopolymer Extensibility“. In: *Physical Review Letters* 81.21 (Nov. 1998), S. 4764–4767. DOI: 10.1103/PhysRevLett.81.4764.
- [RG03] Tomas R. Rodriguez und Ricardo Garcia. „Theory of Q control in atomic force microscopy“. In: *Applied Physics Letters* 82.26 (2003), S. 4821. ISSN: 00036951. DOI: 10.1063/1.1584790.
- [Rie+97] Matthias Rief u. a. „Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy“. In: *Science* 275.5304 (1997), S. 1295–1297. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.275.5304.1295.
- [Sad+95] John E. Sader u. a. „Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers“. In: *Review of Scientific Instruments* 66.7 (1995), S. 3789–3798. DOI: 10.1063/1.1145439.
- [SAF07] André Schirmeisen, Boris Anczykowski und Harald Fuchs. „Dynamic Modes of Atomic Force Microscopy“. In: *Springer Handbook of Nanotechnology*. Hrsg. von Bharat Bhushan. Springer Berlin Heidelberg, 2007, S. 737–766. ISBN: 978-3-540-29855-7. DOI: 10.1007/978-3-540-29855-7_27.
- [San+82] F. Sanger u. a. „Nucleotide sequence of bacteriophage λ -DNA“. In: *Journal of Molecular Biology* 162.4 (1982), S. 729–773. ISSN: 0022-2836. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90546-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(82)90546-0).
- [Sar+01] A. Sarkar u. a. „Structural transitions in DNA driven by external force and torque“. In: *Physical Review E* 63.5 (2001), S. 051903. DOI: 10.1103/PhysRevE.63.051903.
- [SB94] K. Svoboda und S. M. Block. „Biological Applications of Optical Forces“. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23 (1994), S. 247–285. DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.001335.

- [SCB96] Steven B. Smith, Yujia Cui und Carlos Bustamante. „Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules“. In: *Science*. New Series 271.5250 (1996), S. 795–799. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.271.5250.795.
- [Sch+05] A. Schirmeisen u. a. „Dynamic force spectroscopy using the constant-excitation and constant-amplitude modes“. In: *Nanotechnology* 16.3 (2005), S. 13–17. DOI: 10.1088/0957-4484/16/3/003.
- [Sch+07] J.-E. Schmutz u. a. „Mapping the tip-sample interactions on DPPC and DNA by dynamic force spectroscopy under ambient conditions“. In: *Ultramicroscopy* 107.10-11 (2007), S. 875–881. ISSN: 0304-3991. DOI: DOI:10.1016/j.ultramicro.2007.04.015.
- [SCM99] J. Sader, J. W. M. Chon und P. Mulvaney. „Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers“. In: *Review of Scientific Instruments* 70.10 (1999), S. 3967–3969. DOI: 10.1063/1.1150021.
- [SDH01] Robert W. Stark, Tanja Drobek und Wolfgang M. Heckl. „Thermomechanical noise of a free v-shaped cantilever for atomic-force microscopy“. In: *Ultramicroscopy* 86.1–2 (2001), S. 207–215. ISSN: 0304-3991. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991\(00\)00077-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991(00)00077-2).
- [SFB92] S. B. Smith, L. Finzi und C. Bustamante. „Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads“. In: *Science* 258.5085 (1992), S. 1122–1126. DOI: 10.1126/science.1439819.
- [SGK10] A.R. Singh, D. Giri und S. Kumar. „Force induced melting of the constrained DNA“. In: *Journal of Chemical Physics* 132.23 (2010), S. 235105–235105. DOI: 10.1063/1.3427587.
- [SJ04a] John E. Sader und Suzanne P. Jarvis. „Accurate formulas for interaction force and energy in frequency modulation force spectroscopy“. In: *Applied Physics Letters* 84.10 (2004), S. 1801–1803. DOI: 10.1063/1.1667267.

-
- [SJ04b] John E. Sader und Suzanne P. Jarvis. „Interpretation of frequency modulation atomic force microscopy in terms of fractional calculus“. In: *Phys. Rev. B* 70 (1 Juli 2004), S. 012303. DOI: 10.1103/PhysRevB.70.012303.
- [SM09] Mogurampelly Santosh und Prabal K Maiti. „Force induced DNA melting“. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* 21.3 (2009), S. 034113. DOI: 10.1088/0953-8984/21/3/034113.
- [SN03] C. Storm und P.C. Nelson. „Theory of high-force DNA stretching and overstretching“. In: *Physical Review E* 67.5 (2003), S. 051906. DOI: 10.1103/PhysRevE.67.051906.
- [Str+99] T. Strunz u. a. „Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules“. In: *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96.20 (1999), S. 11277–11282. DOI: 10.1073/pnas.96.20.11277.
- [Sul+00] T. Sulchek u. a. „High-speed tapping mode imaging with active Q control for atomic force microscopy“. In: *Applied Physics Letters* 76.11 (2000), S. 1473–1475. ISSN: 1077-3118. DOI: 10.1063/1.126071.
- [Tam+01] J. Tamayo u. a. „High-Q Dynamic Force Microscopy in Liquid and Its Application to Living Cells“. In: *Biophysical Journal* 81.1 (2001), S. 526–537. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75719-0.
- [TG96] J. Tamayo und R. García. „Deformation, Contact Time, and Phase Contrast in Tapping Mode Scanning Force Microscopy“. In: *Langmuir* 12.18 (1996), S. 4430–4435. DOI: 10.1021/1a9601891.
- [THM00] Javier Tamayo, Andrew D. L. Humphris und Mervyn J. Miles. „Piconewton regime dynamic force microscopy in liquid“. In: *Applied Physics Letters* 77.4 (2000), S. 582. DOI: 10.1063/1.127051.
- [Vin05] AlexanderE. Vinogradov. „Genome size and chromatin condensation in vertebrates“. In: *Chromosoma* 113.7 (2005), S. 362–369. ISSN: 0009-5915. DOI: 10.1007/s00412-004-0323-3.
- [WC53] J. D. Watson und F. H. C. Crick. „Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid“. In: *Nature* 171.4356 (1953), S. 737–738. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/171737a0.

- [Wen+02] Jay R. Wenner u. a. „Salt Dependence of the Elasticity and Overstretching Transition of Single DNA Molecules“. In: *Biophysical Journal* 82.6 (2002), 3160—3169. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75658-0.
- [Wil+01a] Mark C. Williams u. a. „Effect of pH on the Overstretching Transition of Double-Stranded DNA: Evidence of Force-Induced DNA Melting“. In: *Biophysical Journal* 80.2 (2001), 874—881. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76066-3.
- [Wil+01b] Mark C. Williams u. a. „Entropy and Heat Capacity of DNA Melting from Temperature Dependence of Single Molecule Stretching“. In: *Biophysical Journal* 80.4 (2001), S. 1932–1939. ISSN: 0006-3495. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76163-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76163-2).
- [WRB02] Mark C. Williams, Ioulia Rouzina und Victor A. Bloomfield. „Thermodynamics of DNA Interactions from Single Molecule Stretching Experiments“. In: *Accounts of Chemical Research* 35.3 (2002), S. 159–166. DOI: 10.1021/ar010045k.
- [WRM09] Mark C. Williams, Ioulia Rouzina und Micah J. McCauley. „Peeling back the mystery of DNA overstretching“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.43 (2009), S. 18047–18048. DOI: 10.1073/pnas.0910269106.
- [ZMZ04] Yan Zeng, Awrasa Montrichok und Giovanni Zocchi. „Bubble Nucleation and Cooperativity in DNA Melting“. In: *Journal of Molecular Biology* 339.1 (2004), S. 67–75. ISSN: 0022-2836. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.072>.

B. Abbildungsverzeichnis

2.1.	Schema der Funktionsweise eines AFM. Die Probe liegt auf dem Piezo-Scanner auf, die Auslenkung des Federbalkens wird mit dem Lichtzeigerprinzip detektiert. Quelle: [Adr13], bearbeitet	11
2.2.	Form des Lennard-Jones-Potentials, Parameter: $\varepsilon = 0,5\text{J}$, $r_0 = 0,5\text{m}$	12
2.3.	Darstellung der Zusammenhänge der im folgenden Text beschriebenen Betriebsmodi eines AFM. Zusätzlich zu den hier aufgeführten Modi existieren zahlreiche weitere, die z.T. auch andere Wechselwirkungen als Grundlage haben, wie z.B. die magnetische Wechselwirkung beim MFM (Magnetic Force Microscope)	14
2.4.	Schema einer Contact-Mode-Elektronik. Die Auslenkung des Cantilevers dient entweder direkt als Topographiesignal (Constant-Height-Modus) oder aber als Feedback-Signal im Constant-Force-Modus, Quelle: erstellt in Analogie zu Abbildung 1 aus [Sch+07].	15
2.5.	Schematischer Aufbau einer Non-Contact-Elektronik. Befindet sich der Schalter in der Zeichnung in der oberen Position, so arbeitet das AFM im selbstangeregten Modus (FM-Mode), der Analysator misst Amplitude und Resonanzfrequenz. In der unteren Stellung arbeitet das AFM im fremdangeregten Modus (AM-Mode), ein Frequenzgenerator treibt den Anregungspiezokristall an. Der Analysator misst Amplitude und Phasenverschiebung, Quelle: erstellt in Analogie zu Abbildung 1 aus [Sch+07].	18
2.6.	Amplituden und Phasenverschiebungen in Abhängigkeit der auf die Resonanzfrequenz normierten Anregungsfrequenz für drei verschiedene Oszillatoren mit verschiedenen Q-Faktoren.	20
2.7.	Schema einer AFM-Elektronik mit implementiertem Q-Control, Quelle: erstellt in Analogie zu Abbildung 1 aus [Sch+07].	21
2.8.	Spektrale Leistungsdichte eines <i>Nanosensors</i> NCLR Cantilevers (blaue Linie). Ebenfalls eingezeichnet ist der Lorentz-Fit (rote Linie).	24

2.9. Die Phasen einer einzelnen Kraft-Distanz-Kurve: (a) Die Spitze nähert sich der Oberfläche (b) Die Spitze drückt mit einer definierten Kraft auf die Oberfläche (c) Die Spitze wird mit einer definierten Geschwindigkeit von der Oberfläche weggezogen, durch die Bindung wird der Federbalken ausgelenkt (d) Die Bindung reißt, der Federbalken springt unmittelbar zurück in die Nullstellung. Repulsive Kräfte sind willkürlich mit positivem, attraktive mit negativem Vorzeichen versehen	26
2.10. Die zweidimensionalen Strukturen der vier Basen. (Quelle: Graphik erstellt mit ACD/ChemSketch 12.01)	31
2.11. Die zweidimensionalen Strukturen der vier Nukleotide mit Nummerierung der Kohlenstoffatome der Ribose. Der Phosphatrest bindet am 5'-Kohlenstoffatom, die Base am 1'-Kohlenstoffatom. Dieser Nummerierung entsprechend wird dem DNA-Einzelstrang ein 3'-Ende bzw. ein 5'-Ende und damit eine Richtung zugeordnet. (Quelle: Graphik erstellt mit ACD/ChemSketch 12.01)	31
2.12. Zweidimensionale Struktur eines DNA-Fragments. Die jeweils komplementären Basen der Nukleotide sind zueinander gerichtet, Wasserstoffbrückenbindungen sind ausgebildet und halten die zwei Einzelstränge zusammen. Die Phosphatreste sind nach außen gerichtet und bilden das sogenannte Phosphatrückgrat. Es ist unter neutralem pH-Wert ($pH = 7$) deprotoniert, also negativ geladen. (Quelle: Graphik erstellt mit ACD/ChemSketch 12.01)	32
2.13. Vergleich der drei unterschiedlichen DNA-Konformationen. Während A- und B-DNA rechtsgängige Helices sind, ist Z-DNA linksgängig. (Quelle: Erstellt mit der Software VMD mit Hilfe von Strukturdateien aus [Gla13]) . .	32
2.14. Schematischer Aufbau der Bakteriophage Lambda	34
2.15. Gemessene Kraft-Distanz-Kurve eines DNA-Moleküls. Diese Kurve wurde im statischen Kraftspektroskopie-Modus, also mit ruhendem Cantilever, gemessen. Dafür wurde ein weicher Cantilever (Bruker MSCT, C, $k = 0.01 \frac{N}{m}$) benutzt. Die Auslenkung des Cantilevers ist aus den Daten herausgerechnet. Ebenfalls eingezeichnet ein erweiterter WLC-Fit. Für die Persistenzlänge ergibt sich aus dem Fit ein Wert von $l_P = 48 \pm 3 \text{nm}$, für das Elastizitätsmodul Φ ergibt ein Wert von $1120 \pm 176 \text{pN}$. Diese Werte stimmen sehr gut mit Literaturwerten aus [Bou+99] überein.	35

2.16. Die verschiedenen Möglichkeiten, wie an einem DNA-Molekül gezogen werden kann. Entweder wird an beiden oder nur an einem Strangende pro Seite gezogen. Erstellt mit der Software VMD mit Hilfe von einer Strukturdatei aus [Gla13]	36
2.17. Beide Abbildungen entnommen aus [SCB96]	37
2.18. Phasen während der Streckung eines B-DNA-Moleküls gemäß des Modells von Bloomfield et al., Graphik entnommen aus [Wil+01a]	40
3.1. Aufnahme des gesamten Messaufbaus.	54
3.2. Aufbau des AFMs	55
3.3. Der Multimode AFM-Kopf mit eingebautem Cantileverhalter. Eingezeichnet sind die ungefähre Lage von Laserdiode, Quadrantenphotodetektor sowie der Lichtweg des Laser-Strahls. Nicht skizziert sind Strahlaufweitung und -fokussierung. Des Weiteren sind zur besseren Erkennung die Umriss des Cantileverhalters mit den Bohrungen eingezeichnet.	56
3.4. Fotografie des QFM-Controllers mit der Remote-Control-Einheit.	57
3.5. Amplituden- und Phasensignal eines gestimmten Cantilevers im AM-Modus	64
3.6. Amplitudensignal (blaue Kurve) in Volt der Cantileverschwingung in Abhängigkeit der Frequenz im CE-Modus.	65
3.7. Form des Epanechnikov-Kerns und Effekt der Glättung auf einen Datensatz.	69
4.1. Die originalen Spannungsdaten der Frequenzshift- bzw. Amplitudenveränderungskanäle der ersten Messreihe.	71
4.2. Die aus den Spannungsdaten der ersten Messreihe berechneten Größen in deren korrekten Einheiten.	72
4.3. Die mathematisch rekonstruierten Kraft- und Potentialverläufe der ersten Messreihe.	73
4.4. Aus den Daten aus Abbildung 4.2b errechnete Energiedissipation pro Schwingungszyklus	74
4.5. Die originalen Spannungsdaten der Frequenzshift- bzw. Amplitudenveränderungskanäle der zweiten Messreihe	75
4.6. Die aus den Spannungsdaten der zweiten Messreihe berechneten Größen in deren korrekten Einheiten.	76
4.7. Die mathematisch rekonstruierten Kraft- und Potentialverläufe der zweiten Messreihe.	77
4.8. Energiedissipation pro Schwingungszyklus der zweiten Messreihe	78
4.9. Ergebnisse der ersten Messung.	79

4.10. Ergebnisse der mathematischen Rekonstruktion.	81
4.11. Kraftverlauf, berechnet aus dem geglätteten Datensatz, mit erweitertem WLC-Fit.	82
4.12. Ergebnisse der zweiten Messung.	84
4.13. Kraftverlauf aus dem zweiten geglätteten Datensatz mit erweitertem WLC- Fit.	85
4.14. Ergebnisse der dritten Messung.	87
4.15. Kraftverlauf aus den geglätteten dritten Datensatz mit erweitertem WLC- Fit.	88
4.16. Ergebnisse der vierten Messung.	89
4.17. Kraftverlauf aus den geglätteten vierten Datensatz mit erweitertem WLC- Fit.	90
4.18. Ergebnisse der fünften Messung.	91
4.19. Kraftverlauf aus dem fünften geglätteten Datensatz mit erweitertem WLC- Fit.	92

C. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite standen.

Zunächst möchte ich meinen Dank Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti aussprechen, der mir sein Vertrauen entgegenbrachte und mir die Gelegenheit gab, in seiner Arbeitsgruppe meine Arbeit durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Peter Reimann danke ich für diverse hilfreiche Diskussionen über die theoretische Deutung meiner Ergebnisse sowie die Bereitschaft, meine Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Frau Dr. Katja Tönsing war stets eine sehr hilfreiche Ansprechpartnerin für fachliche und organisatorische Fragen. Auch ihr gebührt mein Dank.

Einen sehr großen Dank richte ich an die Herren Dr. Volker Walhorn und Dr. Andy Sischka, die mir während der gesamten Zeit als Doktorand in allen technischen und fachlichen Belangen tatkräftig unter die Arme gegriffen haben. Außerdem danke ich beiden für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Herrn Dipl. Ing. Christoph Pelargus bedanke ich mich für zusätzliche technische und fachliche Unterstützung, speziell im IT- und Datenerfassungsbereich.

Frau Helene Schellenberg gebührt mein Dank für die Unterstützung im Bereich Probenpräparation.

Für viele nützliche Literaturtipps und die Beantwortung sämtlicher Fragen im biotechnologischen Bereich danke ich Herrn Dr. Dominik Greif.

Für die Erledigung bürokratischer und organisatorischer Aufgaben spreche ich den Frauen Gaby Krome und Karin Lacey meinen Dank aus.

Herrn Dr. Thorsten Bergmann, Herrn Dr. Sebastian Zünkeler, Frau Dipl. Phys. Mareike Dieding und Frau M.Sc Ying Wang, die längere Zeit meine Bürokollegen waren, spreche ich meinen Dank aus für die sehr angenehme, fröhliche und freundschaftliche Büroatmosphäre, die so manches Mal über das eine oder andere Motivationstief hinweggeholfen hat und für angeregte Diskussionen, die teilweise einige neue und gute Ideen hervorgebracht haben.

Zudem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und

C. Danksagung

angewandte Nanowissenschaften“ für die sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitatmosphäre „auf D1“.

Den Mitarbeitern der mechanischen und elektronischen Werkstätten danke ich für die stets kompetente Umsetzung meiner Pläne.

Der DFG danke ich für die Finanzierung meiner Stelle im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 613 „Physik von Einzelmolekülprozessen und molekularer Erkennung in organischen Systemen“.

Ein besonderer Dank geht an meine gesamte Familie, die mir das Studium erst ermöglicht hat und auch während meiner Doktorarbeit immer verlässlich an meiner Seite stand.