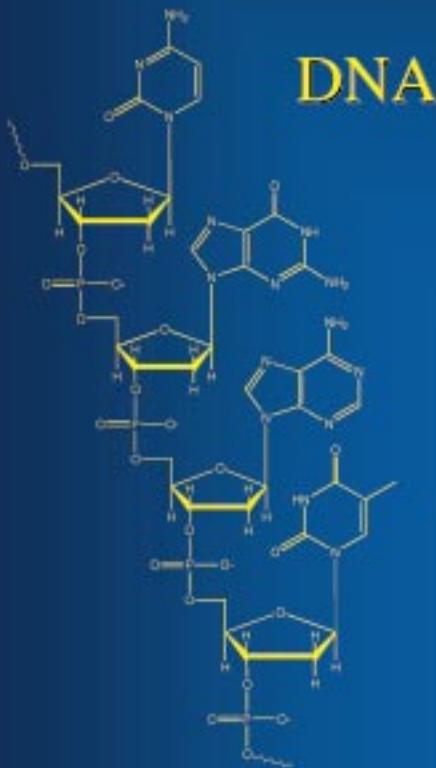
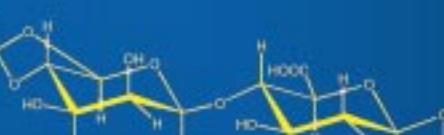
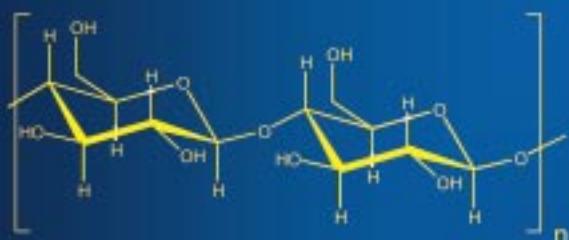
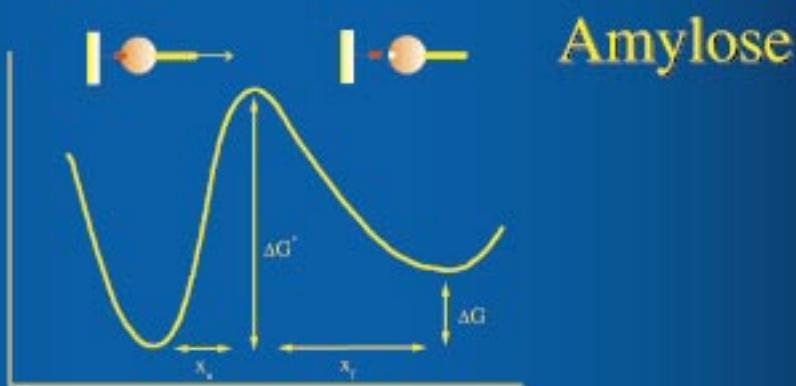
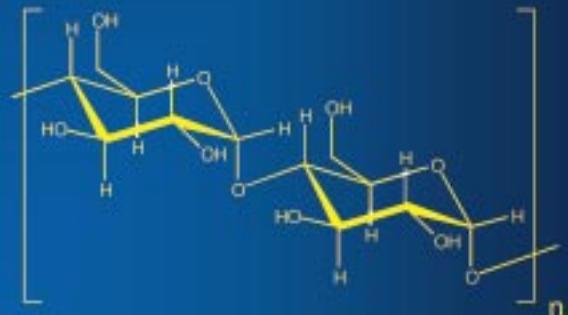


# Kraftspektroskopie

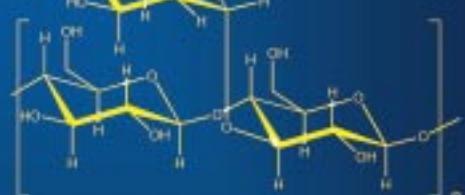
wurmartige Kette



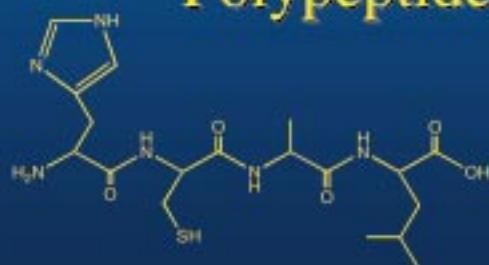
$$F(x) = \frac{k_B T}{\ell_p} \cdot \left[ \frac{1}{4} \cdot (1 - x/L)^{-2} + x/L - \frac{1}{4} \right]$$



Xanthan



Polypeptid



## Kraftspektroskopie an molekularen Systemen – Einzelmolekülspektroskopie an Polymeren und Biomolekülen

**Andreas Janshoff, Marcus Neitzert, York Oberdörfer und Harald Fuchs\***

Wie wechselwirken Moleküle miteinander? Was geschieht bei der Bindung eines Neurotransmitters an einen ligandengesteuerten Ionenkanal? Wie erkennen Antikörper Antigene? Für das Leben sind molekulare Erkennungsreaktionen von zentraler Bedeutung: Bei der Enzymkatalyse, bei der Replikation und Transkription des genetischen Codes oder beim Zusammenspiel der zellulären Strukturen und auch bei zahlreichen Prozessen des Stoffwechsels ist es entscheidend, dass Moleküle spezifisch miteinander in Wechselwirkung treten. Konventionelle Methoden wie die Kalorimetrie liefern zwar hoch präzise Aussagen über Bindungsenthalpien, es sind jedoch Durchschnittswerte, gemittelt über ein ganzes Ensemble von Mole-

külen ohne Aussage über die Dynamik des Erkennungsprozesses. Aber welche Kräfte treten auf, wenn sich einzelne molekulare Partner begegnen und eine Bindung eingehen? Seit einigen Jahren stehen mit dem Rasterkraftmikroskop und der Kraftspektroskopie Methoden zur Verfügung, um Kräfte zwischen Grenzflächen mit hoher Präzision zu messen – angefangen von kolloidalen Wechselwirkungen bis hin zur Interaktion einzelner Moleküle. Auch die Manipulation individueller Moleküle ist mit der Kraftspektroskopie möglich. Dadurch werden mechanische Eigenschaften auf molekularer Ebene messbar. Das Experimentieren mit Einzelmolekülen ist keine exklusive Domäne der Kraftspektroskopie, derartige Untersuchungen sind auch

mit dem Oberflächenkraftapparat, der Laserpinzette oder per Mikropipetten-Technik möglich. Die Kraftspektroskopie hat sich jedoch als ein besonders vielseitiges Verfahren erwiesen. Die Intention dieser Übersicht ist eine kritische Bewertung der aktuellen Entwicklung der statischen Kraftspektroskopie. Der Schwerpunkt liegt dabei auf Experimenten zu inter- und intramolekularen Wechselwirkungen – von „einfachen“ elektrostatischen Kräften, über Ligand-Rezeptor-Systeme bis zu Dehnungsmessungen an Einzelmolekülen.

**Stichwörter:** DNA-Erkennung • Kraftspektroskopie • Polymere • Rastersondenverfahren

### 1. Einleitung: mikroskopische Kräfte

*Geschrieben steht:*

*Im Anfang war der Sinn.*

*Bedenke wohl die erste Zeile,  
dass deine Feder sich nicht übereile!*

*Ist es der Sinn,  
der alles wirkt und schafft?*

*Es sollte stehn:*

*Im Anfang war die Kraft!*

Johann Wolfgang von Goethe (1749–1832), Faust I

Die physikalische Maßeinheit für Kraft ist benannt nach Sir Isaac Newton (1643–1727), der mit seinen Axiomen diese Größe erstmals mathematisch präzise beschrieb. Bereits

Newton interessierte sich nicht nur für die über große Entfernungen wirkenden Gravitationskräfte, sondern auch – seiner Zeit weit voraus – für mikroskopische Kräfte: „The parts of all homogeneal hard bodies stick together very strongly. I had rather infer from their cohesion, that their particles attract one another by some force ...“. Nach heutigem Verständnis sprach Newton schon damals von intermolekularen Kräften. Der Aktionsradius dieser Kräfte liegt im mikroskopischen Bereich, mit Reichweiten von einem Mikrometer bis zu einigen Ångström. Intermolekulare Kräfte bestimmen die Eigenschaften von Gasen, das Verhalten kolloidaler Lösungen, das Wachstum von Kristallen und die Wechselwirkung von Biomolekülen. Nicht nur die Reichweite solcher Kräfte ist mikroskopisch, sondern auch ihr Betrag ist sehr klein verglichen mit Kräften, die uns im Alltag begegnen. Ihre Stärke beträgt im Allgemeinen nur Bruchteile eines Nanonewtons. Solche Kräfte direkt zu messen ist eine experimentelle Herausforderung und erst seit Ende der siebziger Jahre mit der Erfindung des Oberflächenkraftapparats (Surface Force Apparatus, SFA)<sup>[1]</sup> möglich geworden. Dabei werden die Kräfte zwischen zwei transparenten, ato-

[\*] Prof. Dr. H. Fuchs, Dr. A. Janshoff, Dr. M. Neitzert, Y. Oberdörfer  
Physikalisches Institut  
Westfälische Wilhelms-Universität  
Wilhelm-Klemm-Straße 10, 48149 Münster (Deutschland)  
Fax: (+49) 251-8333602  
E-mail: fuchsh@nwz.uni-muenster.de

mar glatten und über Kreuz angeordneten zylindrischen Glimmeroberflächen, die mit dem zu untersuchenden System bedeckt sind, mit Hilfe optischer Interferenzmethoden gemessen. Die Kraftauflösung dieses Verfahrens beträgt ca. 10 nN und die vertikale Auflösung 0.1 nm. Nachteile dieser Methode sind die Beschränkung auf atomar glatte, transparente Substrate und die fehlende laterale Auflösung. Außerdem ist wegen der Größe der Platten der Einfluss von Kontaminationen beträchtlich.

Mit der Entwicklung des Rasterkraftmikroskops (Atomic Force Microscope, AFM) Mitte der achtziger Jahre<sup>[2]</sup> stand erstmals ein Instrument zur Verfügung, das sich nicht nur durch eine enorme Kraftauflösung bis in den Piconewton-

Bereich, sondern auch durch eine bis dahin unerreichte laterale und vertikale Auflösung auszeichnete. In Arbeitsgebieten, in denen eine In-situ-Abbildung von Oberflächen mit Submikrometerauflösung gefordert ist, wie in den Material- und Biowissenschaften, nimmt die Rasterkraftmikroskopie mittlerweile einen festen Platz ein. Die Vielseitigkeit der Methode beruht auf der großen Zahl an kontrastbildenden Materialeigenschaften. So können neben der Topographie Elastizitätsmodule, Reibungskoeffizienten, chemische Gruppen, Oberflächenladungen und Energieverluste bei der Oszillation der Tastfeder ortsauflöst abgebildet werden.

Neben der statischen Kraftspektroskopie, die Gegenstand dieser Übersicht ist, ist die dynamische Kraftspektroskopie zu



A. Janshoff



M. Neitzert



Y. Oberdörfer



H. Fuchs

*Andreas Janshoff, geboren 1966, studierte zunächst Biologie und dann Chemie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Nach dem Diplom im Jahre 1994 schloss er 1997 mit der Promotion über die Biofunktionalisierung von Goldoberflächen und deren Anwendung in der Bioanalytik ab, die er am Institut für Biochemie unter der Leitung von Hans-Joachim Galla anfertigte. In der Arbeitsgruppe von M. Reza Ghadiri am Scripps Research Institute in La Jolla, Kalifornien, arbeitete er 1½ Jahre an rasterkraftmikroskopischen Analysen von Lipidmembranen, bevor er 1999 zur Arbeitsgruppe von Harald Fuchs an das Physikalische Institut der Universität Münster wechselte, um dort seine Habilitation in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie zu beginnen. Sein Forschungsgebiet umfasst die Entwicklung neuartiger Sensoren auf der Basis mikrostrukturierter Oberflächen, den Einsatz akustischer Sensoren zur Aufklärung biochemischer Fragestellungen und kraftspektroskopische Studien an Komponenten der extrazellulären Matrix.*

*Marcus Neitzert wurde 1967 in Barcelona, Spanien, geboren. 1986 zog er nach Deutschland und studierte Physik an der Universität Heidelberg. Nach einem Forschungsaufenthalt in den USA am Laboratory for Surface Science and Technology der University of Maine wechselte er 1994 an die Universität Münster. Dort promovierte er 1999 im Arbeitskreis von Harald Fuchs über kraftspektroskopische Experimente an Biopolymeren. Er arbeitet nun als Wissenschaftsjournalist in der Pressestelle der Deutschen Physikalischen Gesellschaft.*

*York Oberdörfer wurde 1973 in Hamm-Heessen geboren. 1993 begann er mit dem Studium der Physik an der Universität Münster. 1999 erwarb er das Diplom und promoviert derzeit in der Gruppe von Harald Fuchs auf dem Gebiet der Kraftspektroskopie an Biopolymeren.*

*Harald Fuchs, geboren 1951, studierte Physik an der Universität Saarbrücken. Nach der Diplomarbeit in Theoretischer Physik war er bis 1980 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut der Universität Saarbrücken und arbeitete dort an Transportprozessen in biologischen Membranen. 1982 promovierte er bei H. Gleiter an der Universität Saarbrücken über nanokristalline Systeme. Bis 1984 war er wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Werkstoffphysik. Während seines Postdoc-Aufenthalts von 1984 bis 1985 bei IBM Rüschlikon in der Gruppe von Binnig und Rohrer beschäftigte er sich mit der Rastertunnelmikroskopie. Von 1985 bis 1993 war er Leiter einer Forschungsgruppe der BASF AG. 1993 erhielt er einen Ruf auf den Lehrstuhl für Experimentalphysik an der Universität Münster und wurde 1998 Direktor am Physikalischen Institut dieser Universität. 1994 wurde er mit dem Philip-Morris-Forschungspreis für seine Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Nanostrukturierung ausgezeichnet. Thematische Schwerpunkte sind Nanotechnologie, organische/anorganische Grenzflächen und die Entwicklung neuartiger Rastersondenmethoden.*

nennen, bei der die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe aus dem Amplitudensignal sowie der Frequenz- und Phasenverschiebung der Schwingung der Tastfeder berechnet wird.<sup>[3]</sup>

Zu einem neuen Werkzeug für Material- und Biowissenschaftler hat sich das Kraftmikroskop durch die chemische Funktionalisierung der Rastersonde entwickelt. Erstmals ist es dadurch möglich, die Kräfte zwischen einzelnen Molekülen lokal zu messen. Ein Meilenstein auf diesem Gebiet war sicherlich die unmittelbare Beobachtung des Bindungsbruchs in einem einzelnen Streptavidin-Biotin-Komplex im Jahr 1994 durch die Gruppen von Gaub<sup>[4]</sup> und Colton.<sup>[5]</sup> Die quasistatische Kraftspektroskopie hat sich so als eine neue Form der Einzelmolekülspektroskopie etabliert und viele Anwendungsgebiete gefunden. Hervorzuheben ist, dass nicht nur statische Informationen gewonnen werden, sondern auch dynamische, z.B. bei der Trennung einzelner Ligand-Rezeptor-Paare durch Anlegen einer externen Kraft mit verschiedenen Zuggeschwindigkeiten. Aus diesen Messungen ergeben sich Informationen über die Dynamik des Bindungsbruchs in nichtkovalenten Komplexen und damit über die Energiebarriere, die es beim Bindungsbruch zu überwinden gilt. Als weiteres eigenständiges Arbeitsgebiet hat sich die Konformationsanalyse an einzelnen Polymersträngen und Biomolekülen entwickelt. Dabei werden langkettige Moleküle wie DNA, künstliche Polymere, Polysaccharide und faserartige Proteine durch gezielte äußere Krafteinwirkung Faltungs-Entfaltungscyclen unterworfen. Die damit verbundene Kraft-Abstands-Charakteristik kann mit Hilfe statistischer Polymermodelle zur Konformationsanalyse verwendet werden.<sup>[6]</sup> Im Wesentlichen stehen so mit der Rasterkraftmikroskopie und den verwandten Techniken Methoden zur Verfügung, die sowohl die abbildende und spektroskopische Charakterisierung von Oberflächen auf molekularer Ebene als auch die Manipulation von Einzelmolekülen ermöglichen.

## 2. Allgemeine Grundlagen: das Kraftmikroskop als Sensor molekularer Kräfte

Seit der Erfindung (1986) durch Binnig, Quate und Gerber<sup>[2]</sup> hat sich die Kraftmikroskopie von einer hauptsächlich abbildenden Technik<sup>[7-9]</sup> zu einer Methode weiterentwickelt, mit der sich molekulare Kräfte an Grenzflächen im Detail untersuchen lassen.<sup>[4, 5]</sup> Die Tastfeder (engl. cantilever) des Mikroskops agiert dabei als Sensor, der auf die lokale Wechselwirkung zwischen Messspitze und Probe reagiert (Abbildung 1).

Wird die Tastspitze des Kraftmikroskops an die Probenoberfläche heran und anschließend wieder von ihr weggefahren, lässt sich durch Detektion der Federauslenkung die „Kraftkurve“, die Abhängigkeit der Kraft von der Verschiebung des Piezostellglieds, aufzeichnen.<sup>[10]</sup> Die wirksame Kraft  $F$  lässt sich mit dem Hooke-Gesetz aus der Federauslenkung  $z_F$  ermitteln [Gl. (1)]. Die Kraftauflösung (unter Atmosphä-

$$F = kz_F \quad (1)$$

renbedingungen) liegt heute im Bereich von Piconewton und ist durch das thermische Rauschen der Tastfeder be-

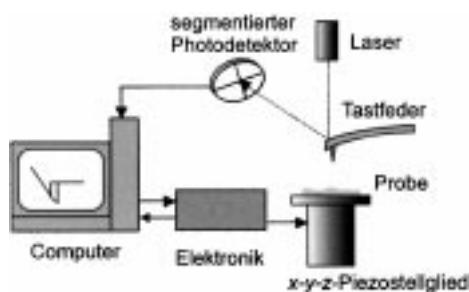


Abbildung 1. Schema eines Kraftmikroskops mit Lichtzeiger-Detektion. Die Auslenkung der Tastfeder wird über die Ablenkung eines Laserstrahls gemessen. Die Probe ist auf einem piezoelektrischen Stellglied montiert (positionierbar in allen drei Raumrichtungen). Damit lässt sich die Tastfeder über die Probe heben und senken ( $z$ -Piezostellglied), aber auch lateral über die Oberfläche rastern ( $x$ - $y$ -Piezostellglied). Es existieren zwei Betriebsmodi: Beim Konstante-Höhe-Modus setzt keine Regelung ein, und die Federauslenkung wird detektiert (bei sehr glatten Probenoberflächen), während beim Konstante-Kraft-Modus das  $z$ -Piezostellglied eventuelle Federauslenkungen durch eine Veränderung der  $z$ -Position kompensiert.

grenzt.<sup>[11, 12]</sup> Die Dauer des gesamten Messvorgangs (Hin- und Rückweg) liegt üblicherweise im Sekundenbereich. In einigen Fällen hat die Rückspur der Messkurven eine komplexe Form, die Rückschlüsse auf die Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze zulässt (Abbildung 2). Aber auch die Kurve für die Annäherung birgt Informationen über Oberflächenkräfte.

Die Wechselwirkungen reichen von Van-der-Waals-Wechselwirkungen im nN-Bereich (Abbildung 2A) bis zu entropischen Kräften von wenigen 100 pN – letztere treten beim Strecken eines zwischen Spitzenspitze und Substrat eingespannten Einzelmoleküls auf (Abbildung 2E). Die Art der Wechselwirkungen ist demnach stark abhängig von den experimentellen Bedingungen, z.B. vom Spitzens- und Probenmaterial sowie von chemischen Modifizierungen der Oberflächen und des umgebenden Mediums. Daher ist es auch grundsätzlich möglich, im rasternden Betrieb Oberflächen chemisch sensitiv abzubilden.<sup>[13-19]</sup> Je nach Messmedium dominieren andere Wechselwirkungen den Verlauf der experimentellen Kraftkurven. So werden bei Messungen an Luft die allgegenwärtigen Van-der-Waals-Kräfte im Allgemeinen von stärkeren Kapillarkräften überlagert, die eine Folge der Kondensation von Wasserdampf im Bereich des Spitzens-Probe-Kontakts (Kapillarkondensation) sind. Diese Kapillarkräfte sind bei Messungen in Flüssigkeiten vernachlässigbar.

Von besonderer Bedeutung sind kraftspektroskopische Messungen in wässriger Umgebung, da nur dort biologische Prozesse und Einzelmoleküle, z.B. Nucleinsäuren und Proteine, in situ untersucht werden können. Dabei kommt der Funktionalisierung von Spitzenspitze und Probe eine entscheidende Bedeutung zu. In wässrigen Medien sind häufig elektrostatische Kräfte<sup>[20-23]</sup> maßgebend; diese können sowohl attraktiv als auch repulsiv sein (Abbildung 2B, C) – in Abhängigkeit von der Oberflächenladung, der Ionenstärke und dem pH-Wert. Außer elektrostatischen Wechselwirkungen sind bei Molekülen mit entsprechenden funktionellen Gruppen über kurze Distanzen wirkende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen<sup>[11, 24-26]</sup> sowie bei Ligand-Rezeptor-Systemen (Abbildung 2D) hochspezifische, kom-

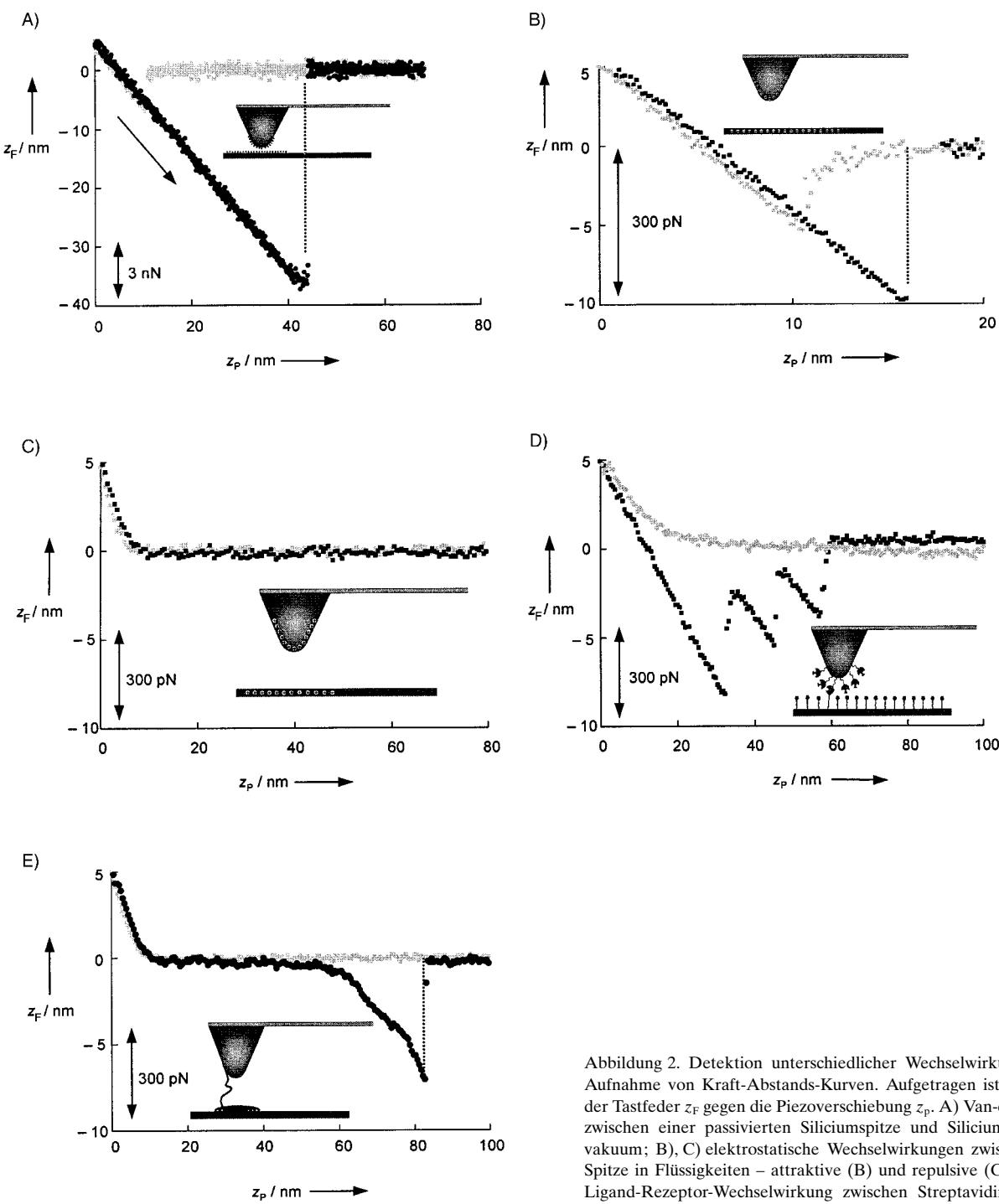


Abbildung 2. Detektion unterschiedlicher Wechselwirkungen durch die Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven. Aufgetragen ist die Auslenkung der Tastfeder  $z_F$  gegen die Piezoverschiebung  $z_p$ . A) Van-der-Waals-Kräfte zwischen einer passivierten Siliciumspitze und Silicium im Ultrahochvakuum; B), C) elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Probe und Spalte in Flüssigkeiten – attraktive (B) und repulsive (C); D) spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zwischen Streptavidin-funktionalisierter Spalte und biotinylierter Oberfläche; E) Entfaltung eines langkettigen Einzelmoleküls mit Hilfe des Kraftmikroskops. Attraktive Kräfte werden durch negative und repulsive durch positive Auslenkungen dargestellt. Die hellgrauen Kurven stehen für die Annäherung der Spalte an das Substrat.

plexen Kombinationen unterschiedlicher Bindungstypen und kovalenter Bindungen von Bedeutung.<sup>[4, 5, 27–30]</sup>

Mit der Kraftspektroskopie können Kräfte zwischen Probe und Spalte räumlich eng begrenzt untersucht werden. Die obere Grenze ist dabei durch den Kontaktradius zwischen Tastspalte und Substrat gegeben, der typischerweise etwa zehn Nanometer beträgt,<sup>[31, 32]</sup> die untere liegt bei Einzelmolekülen und Atomverbänden.

## 2.1. Kraft-Abstands-Kurven

Die Auslenkung der Tastfeder ist ein Maß für die Wechselwirkungskraft. Der Zusammenhang zwischen Federauslenkung und Spalte-Probe-Abstand ist in Abbildung 3 A gezeigt, wobei  $s = l + d - |z_F|$  gilt. Nach Gleichung (1) bewirken attraktive Kräfte ( $F < 0$ ) eine negative Federauslenkung ( $z_F < 0$ ). Bei einer Verschiebung der Probe ( $\Delta z_p$ ), hervor-

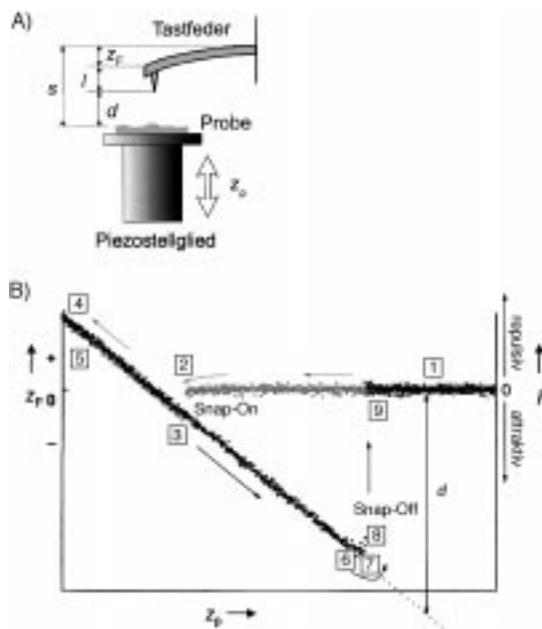


Abbildung 3. A) Relevante Parameter zur Berechnung des Zusammenhangs zwischen Probenverschiebung  $z_p$  und Federauslenkung  $z_F$ :  $l$  ist die Länge der Tastspitze,  $d$  der Abstand zwischen Tastspitze und Probe. B) Einfache Kraftkurve; die Zahlen und Pfeile veranschaulichen den Verlauf der Messung. Für eine ausführliche Beschreibung siehe Text.

gerufen durch eine Auslenkung des Piezostellglieds, gilt:  $\Delta s = \Delta z_p$ <sup>[33]</sup> Daraus folgt die Beziehung  $\Delta z_p = \Delta d - \Delta z_F$  (es gilt  $z_F < 0$  bei attraktiven Kräften und  $\Delta l = 0$ ). Die Steigung einer Kraftkurve ergibt sich gemäß Gleichung (2) mit  $\Delta z_F$  als

$$\frac{\Delta z_F}{\Delta z_p} = \left( \frac{1}{k/F'(d) - 1} \right) \quad (2)$$

Änderung der Federauslenkung und  $\Delta z_p$  als Änderung der Proben- bzw. Stellgliedverschiebung.  $k$  ist die Federkonstante der Tastfeder und  $F'(d)$  der Kraftgradient, eine Funktion des Spitz-Probe-Abstands  $d$ . Gleichung (2) liefert ein Stabilitätskriterium ( $k/F'(d) - 1 \neq 0$ ). An den Messkurven von Abbildung 3B sollen die Vorgänge bei Annäherung und Rückzug der Spitze erläutert werden.

Ist die Tastnadel weit von der Probenoberfläche entfernt, wirken keine Kräfte, und die Tastfeder wird nicht ausgelenkt (1). Bei Annäherung an das Substrat machen sich allmählich attraktive Oberflächenkräfte bemerkbar. Wächst der positive Kraftgradient auf die Größe der Federkonstante an ( $F'(d) = k$ ), kommt es gemäß Gleichung (2) zu einer mechanischen Instabilität, bekannt als Snap-On (2). Die Tastspitze tritt nun abrupt (2 → 3) in repulsiven Kontakt mit der Probe, wobei die Oberfläche deformiert wird. Selbst bei einer unendlich steifen Tastfeder ist ein Snap-On auf atomarer Skala immer vorhanden, da der Gradient der Oberflächenkräfte bei hinreichend kleinem Abstand (1–2 Å) größer wird als der Gradient der elastischen Rückstellkraft.<sup>[34]</sup> Die Nettokraft ist zwar negativ, dennoch wirken jetzt auch abstoßende Kräfte<sup>[35]</sup> auf die Tastspitze. Die Verbiegung der Tastfeder wird im Verlauf (3 → 4) durch die Viskoelastizität der Unterlage bestimmt.<sup>[36]</sup> Die Anwendung des Kraftmikroskops reicht hier von Eindruckmessungen an Elastomeren<sup>[37]</sup> oder dünnen organischen Schichten<sup>[38]</sup> bis zu mechanischen Expe-

rimenten an einzelnen Zellen.<sup>[39]</sup> Eine quantitative Bestimmung des Elastizitätsmoduls ist jedoch im Allgemeinen schwierig, da hierfür die Kontaktfläche genau bekannt sein muss.<sup>[40, 41]</sup> Dies ist aber selten der Fall, da zum einen die Spitzengeometrie von einer Tastfeder zur nächsten stark variiert und zum anderen die Adhäsion zwischen Spitze und Probe den Kontaktradius stark beeinflusst.

Bei weiterer Probenverschiebung wächst der Druck, den die Spitz auf die Oberfläche ausübt. Im Fall einer harten Unterlage ( $|F(d)| \gg k$ ) konvergiert die Steigung der Kraftkurve gegen  $-1$  (4), Probenverschiebung und Federauslenkung sind proportional zueinander ( $\Delta z_p = -\Delta z_F$ , da hier gilt  $z_p = -z_F$ ). Entlang dieser Kontaktgeraden ändert sich der Spitz-Probe-Abstand nicht mehr. Dies ist z.B. bei Glas oder passiviertem Silicium der Fall. Bei Kraftmikroskopen mit Lichtzeiger-Detektion wird diese Tatsache in der Regel genutzt, um die Federauslenkung zu eichen, also um das Photodetektorsignal (Spannung) in eine Auslenkung umzurechnen.

Mit dem Zurückfahren des  $z$ -Piezostellglieds nehmen repulsive Kontaktkräfte kontinuierlich ab (5 → 6). Die Trennung von der Probenoberfläche findet mit dem „Snap-Off“ (8) statt. Dieser erfolgt knapp hinter dem Minimum der Kurve (7) – an dieser Stelle wird die maximale attraktive Kraft (Adhäsionskraft) gemessen. Nach den gängigen Kontaktmodellen<sup>[37, 42]</sup> ist die Adhäsionskraft  $F_{\text{Adh}}$  proportional zum Spitzradius und zur Grenzflächenenergie zwischen Spitz und Probe. Wie der Snap-On, so ist auch der Snap-Off durch eine mechanische Instabilität ( $F(d) = k$ ) gekennzeichnet; die Verbindung zur Probenoberfläche wird schlagartig unterbrochen (8 → 9). Im Bereich des Kurvenminimums (7) reagiert die Tastfeder extrem empfindlich auf Störungen, wie das thermische Rauschen oder Gebäudeschwingungen. Deshalb tritt der Snap-Off häufig schon am Minimum ein. Durch die Prozesse Snap-On und Snap-Off werden weite Bereiche des attraktiven Wechselwirkungspotentials übersprungen und sind damit experimentell nicht zugänglich. Dies ist bei weicheren Federkonstanten stärker ausgeprägt als bei härteren. Bei Messungen in Flüssigkeiten können unter geeigneten Bedingungen die Adhäsionskraft und damit die Snap-On/Off-Prozesse nahezu verschwinden. Die Wechselwirkung zwischen Tastspitze und Probe ist dann im Wesentlichen repulsiv.

Eine Kraftkurve zeigt die gemessene Kraft aufgetragen gegen die Verschiebung des  $z$ -Piezostellglieds. Zur quantitativen Bestimmung der Kraft muss die Federkonstante der Tastfeder möglichst genau bestimmt werden. Das eleganteste Kalibrierungsverfahren ist die Messung der Spektraldichte des thermischen Rauschens der Tastfeder. Die Bestimmung der mittleren Resonanzschwingungsamplitude ermöglicht dann die Berechnung der Federkonstante.<sup>[43]</sup> Häufig ist die Kraft als Funktion des Spitz-Probe-Abstands aussagekräftiger. Die Verschiebung des Stellglieds lässt sich in einen Spitz-Probe-Abstand umrechnen, indem man von der Federauslenkung die Kontaktgerade<sup>[44]</sup> subtrahiert – man erhält nach dieser Normierung eine Kraft-Abstands-Kurve. Über den Spitz-Probe-Abstand lassen sich z.B. Dehnungslängen von Polymeren direkt messen und Elastizitäten einzelner Molekülketten bestimmen.<sup>[45]</sup>

In einer Kraftkurve müssen Hin- und Rückweg nicht übereinander liegen (Hysterese). Die in diesem Fall eingeschlossene Fläche spiegelt die Energie wider, die die Tastfeder beim Durchlaufen eines Cyclus an Probe und Umgebung abgibt. Die Hysterese ist ein Maß für die Viskosität der Probe. Beim Snap-On wird der Probe Deformationsenergie zugeführt. Wird die Probe zurückgefahren und die Tastfeder auf der Oberfläche gehalten, wird durch das Anspannen der Tastfeder mechanische Energie gespeichert. Mit dem Ablösen von der Probenoberfläche wandelt sich diese hauptsächlich in Schwingungsenergie der Tastfeder um.

### 3. Wechselwirkungen zwischen Sonde und Probe

#### 3.1. Kräfte im Vakuum

Van-der-Waals-Kräfte wirken zwischen allen Teilchen über eine Entfernung im Nanometerbereich. Sie entstehen durch das Zusammenspiel von permanenten und induzierten oder fluktuiierenden Dipolmomenten und zeigen eine  $1/r^6$ -Abstandsabhängigkeit für zwei punktförmige Teilchen. Zwischen identischen Teilchen ist die Wechselwirkung im Vakuum stets attraktiv. Zwischen Teilchen unterschiedlicher Zusammensetzung, eingebettet in ein drittes Medium, können die Kräfte allerdings auch repulsiv sein.<sup>[20, 37]</sup> Eine einzelne Van-der-Waals-Bindung ist relativ schwach, ihre Energie liegt in der Größenordnung von  $-1 \text{ kJ mol}^{-1}$ , das entspricht ca.  $10 \text{ meV}$  pro Molekül.<sup>[20]</sup>

Die Wechselwirkungsenergie zwischen ausgedehnten Strukturen, z.B. einer Spalte und einer Probe, ist im Kugel-Platte-Modell für kleine Abstände  $d$  zwischen Probe und Spalte durch Gleichung (3) gegeben.<sup>[46]</sup>  $H$  steht für die

$$W(d) = -HR/6d \quad (3)$$

konventionelle Hamaker-Konstante (im Vakuum gilt typischerweise  $H \approx 10^{-19} \text{ J}$ ).<sup>[20]</sup> Abbildung 4 zeigt eine numerische Simulation der Wechselwirkung einer Siliciumspitze mit einer Siliciumprobe im Ultrahochvakuum. Die Spalte-Probe-Wechselwirkung  $F(d)$ , die in die numerische Simulation der Kraftkurve eingeht, wurde über den Ansatz von Muller-Yushchenko-Derjaguin/Burgess-Hughes-White (MYD/BHW) bestimmt. Dieses Modell beschreibt den gesamten Verlauf des Potentials. Ausgangspunkt ist auch hier die Van-der-Waals-Wechselwirkung.<sup>[47]</sup> Aus der gemessenen Adhäsionskraft lässt sich die Grenzflächenenergie des Kompositen (Si/SiO<sub>2</sub>) zu  $\gamma \approx 90 \text{ mJ m}^{-2}$  abschätzen. Dieser Messwert liegt in der bei Van-der-Waals-Kräften erwarteten Größenordnung. Für reines Silicium ist die Grenzflächenenergie mit ca.  $1200 \text{ mJ m}^{-2}$ <sup>[48]</sup> deutlich größer, da hier über nicht abgesättigte Bindungen („dangling bonds“) kovalente Bindungen entstehen können.<sup>[49]</sup>

#### 3.2. Kräfte an Luft

Die dominierende adhäsive Kraft bei Messungen an Luft ist die Kapillar- oder Meniskuskraft. Die experimentelle Kraft-

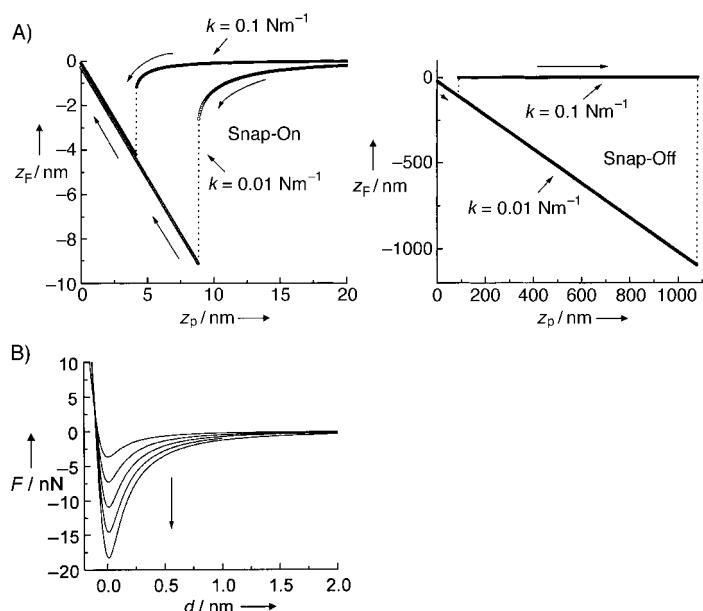


Abbildung 4. Einfluss der Federkonstanten und des Spitzenradius auf den Verlauf der Kraftkurven. A) Simulierte Kraftkurven (Probenannäherung) bei unterschiedlichen Federkonstanten  $k$  (MYD/BHW-Potential, Spitzenradius  $R = 30 \text{ nm}$ ). B) Wechselwirkung einer Siliciumspitze und einer Siliciumunterlage gemäß MYD/BHW-Theorie (dieser liegen Van-der-Waals-Kräfte zugrunde).<sup>[3]</sup> Elastizitätsmodul  $Y = 179 \text{ GPa}$ , Hamaker-Konstante  $H = 2.5 \times 10^{-19} \text{ J}$ . Mit Zunahme des Spitzenradius  $R$  (Pfeil) wird das Potential tiefer, außerdem nimmt die Reichweite zu.

kurve weist eine starke Hysterese auf, die Adhäsionskräfte sind erheblich größer als die attraktiven Kräften bei der Annäherung. Die Adhäsionskraft beträgt ca.  $10 - 100 \text{ nN}$  und ist somit größer als alle anderen Kräfte. Grundsätzlich hängt die Kapillarkraft von den Oberflächenspannungen von Probe, Spalte und Flüssigkeit sowie dem Spitzenradius, der Luftfeuchtigkeit und der Dicke des Wasserfilms ab. Quantitative Messungen werden daher meist im Vakuum, in trockener Gasatmosphäre oder direkt in Flüssigkeiten durchgeführt. Neben der dominierenden Kapillarkraft treten beim Anlegen einer Spannung zwischen einer leitfähigen Spalte und einer Probe Coulomb-Kräfte in Erscheinung. Sie dienen meist zur Ermittlung der Form der Spalte.<sup>[50]</sup>

#### 3.3. Elektrostatische Kräfte in wässrigen Lösungen

Van-der-Waals-Kräfte sind in wässriger Lösung schwächer als im Vakuum.<sup>[20, 51, 52]</sup> Dies liegt an der hohen Dielektrizitätskonstante von Wasser ( $\epsilon \approx 80$ ) – die Van-der-Waals-Wechselwirkung ist elektrodynamischen Ursprungs und wird daher von den Wasserdipolen abgeschirmt. Obwohl schwach, sind Van-der-Waals-Kräfte zwischen gleichartigen Teilchen, auch in Elektrolyten, stets attraktiver Natur. Kolloidale Partikel aggregieren und fallen aus, sofern ausschließlich Van-der-Waals-Kräfte vorhanden sind. Gelöste Teilchen tragen allerdings im Allgemeinen Ladungen auf ihrer Oberfläche, aus denen abstoßende Kräfte resultieren, die eine Zusammenlagerung unterdrücken können. Beispielsweise verfügen die roten Blutkörperchen über negative Oberflächenladungen, die sie vor einer Agglutinierung schützen.<sup>[53]</sup>

Diese elektrostatischen Kräfte sind von der Ionenkonzentration und dem pH-Wert der Lösung abhängig. Vereinfacht lässt sich sagen, dass der pH-Wert den Ladungszustand der Oberflächen beeinflusst, während sich die Zahl der Ionen in Lösung auf die Reichweite des elektrischen Feldes auswirkt. Abbildung 5 zeigt schematisch den Potentialverlauf an einer Grenzschicht. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Oberflächen in Flüssigkeiten lassen sich klassisch mit Hilfe der Poisson-Boltzmann-Gleichung beschreiben,<sup>[54]</sup> die das Potential und die Ladungsdichte der Gegenionen an jedem Ort  $x$ , der sich nicht auf der Oberfläche befindet, wiedergibt.

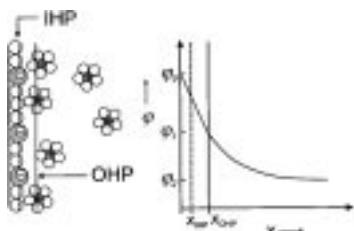


Abbildung 5. Links: Modell der elektrochemischen Doppelschicht nach Stern. Die Doppelschicht (Helmholtz-Schicht) ist durch einen linearen Potentialabfall bis zur äußeren Helmholtz-Schicht (OHP) gekennzeichnet und geht anschließend in die diffuse Doppelschicht (Gouy-Chapman-Schicht) über. Die Grenzlinie bei der inneren Helmholtz-Schicht (IHP) verläuft durch die Zentren der auf der Elektrode spezifisch adsorbierten Ionen (hier negativ geladen). Solvatisierte Ionen aus der Lösung können sich der Elektrode wegen der endlichen Ausdehnung dieser adsorbierten Ionen nur bis zur OHP nähern, wobei die Grenzlinie durch die Zentren der solvatisierten Ionen verläuft. Rechts ist der Verlauf des Potentials  $\varphi$  in den entsprechenden Regionen gezeigt.

Die Theorie von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeck (DLVO)<sup>[20, 52, 54]</sup> behandelt das Zusammenspiel von elektrostatischen Wechselwirkungen (aufgrund von Ladungsverteilung der oben beschriebenen Art) und den nur über kleine Entfernungen wirkenden Van-der-Waals-Kräften. Erst durch die Etablierung des Oberflächenkraftapparats (Surface Force Apparatus) konnten viele der auftretenden Oberflächenkräfte auch experimentell untersucht werden, z.B. attraktive Van-der-Waals-Kräfte, repulsive elektrostatische Doppelschichtkräfte, Solvatisierungs- und Strukturkräfte, Hydratisierungskräfte, sterische Wechselwirkungen und hydrophobe Kräfte. Derartige Wechselwirkungen sind auch bei Kraftspektroskopie-Messungen in Elektrolyten präsent.<sup>[21, 22, 55–59]</sup>

Für die aus der Annäherung geladener Oberflächen (z.B. Spitz und Probe) resultierende Kraft  $F$  als Funktion des Abstands  $d$  gilt näherungsweise (für  $d > \kappa$ ) Gleichung (4).<sup>[21, 60]</sup>  $\phi_s$  und  $\phi_p$  sind die Oberflächenladungen von

$$F(d) \propto \phi_s \phi_p \exp(-d/\kappa) \quad (4)$$

Spitze bzw. Probe, und  $\kappa$  ist die Debye-Länge, die ein Maß für die Reichweite des elektrischen Feldes<sup>[61]</sup> oder die Ausdehnung der elektrostatischen Doppelschicht ist.<sup>[54]</sup> Je nach Ladungszustand der Oberflächen ist die Situation komplex.<sup>[62]</sup> Im symmetrischen Fall, d.h., es überlappen zwei identische Doppelschichten, wirkt eine repulsive (weitreichende) Wechselwirkung, deren Ursprung jedoch nicht elektrostatisch ist.<sup>[63]</sup>

Eine elektrostatische Wechselwirkung würde in dieser Situation stets eine Assoziation begünstigen. Tatsächlich ist der Effekt entropischer Natur. Die Dissoziation von Oberflächenmolekülen und die Abgabe von Ionen an die Lösung geschehen unter Entropiezunahme. Bei Annäherung der beiden Doppelschichten werden die Ionen (gegen die Entropie) zurück an die Oberflächen gedrängt. Die Folge ist ein osmotischer Druck – es macht sich eine abstoßende Kraft bemerkbar.

In der DLVO-Theorie wird die gesamte Wechselwirkung im Wesentlichen als eine Überlagerung von exponentieller Abstoßung und attraktiver Van-der-Waals-Kraft beschrieben. Dabei dominiert die Van-der-Waals-Wechselwirkung bei kleinen Abständen unterhalb von etwa 5 nm.<sup>[64]</sup> Sinkt die Debye-Länge aufgrund einer Erhöhung der Ionenkonzentration, so nimmt auch die weitreichende Abstoßung ab, und die Wechselwirkung wird insgesamt attraktiv.

Bei ungleich geladenen Oberflächen<sup>[52, 65, 66]</sup> ist die Wechselwirkung je nach Verhältnis der Ladungen attraktiv oder repulsiv. Sind die Ladungen entgegengesetzt gleich, ist die Wechselwirkung attraktiver Natur. Abbildung 6 zeigt die Bereiche attraktiver und repulsiver Wechselwirkung bei

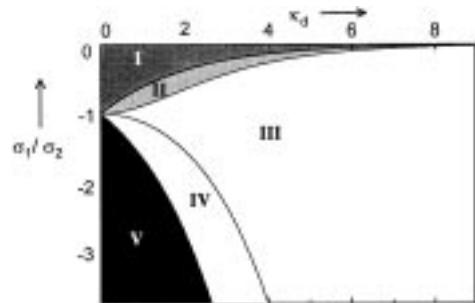


Abbildung 6. Regionen attraktiver und repulsiver Wechselwirkung als Funktion der Debye-Länge  $\kappa_d$  und des Verhältnisses der Ladungsdichten  $\sigma$  der sich annähernden Oberflächen.<sup>[62]</sup> I: Repulsion mit beiden Oberflächenpotentialen positiv; II: Attraktion mit beiden Oberflächenpotentialen positiv; III: Attraktion mit unterschiedlichen Vorzeichen der Oberflächenpotentiale; IV: Attraktion mit beiden Oberflächenpotentialen negativ; V: Repulsion mit beiden Oberflächenpotentialen negativ.

planaren, ungleich geladenen Oberflächen in Abhängigkeit vom Verhältnis der Ladungen. Die über große Entfernungen wirkenden elektrostatischen Wechselwirkungen lassen sich ortsaufgelöst mit Hilfe der Kraftspektroskopie erfassen. Zu den Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Kraftspektroskopie von elektrochemischen Doppelschichten zählen die Arbeiten von Butt et al.<sup>[21, 53, 67]</sup> Sie konnten erstmals den Einfluss des pH-Werts und der Ionenstärke auf das Oberflächenpotential mit Hilfe der ortsaufgelösten Rasterkraftmikroskopie demonstrieren. Abbildung 7 zeigt die experimentell erhaltenen Kraftkurven (Annäherung) für eine Siliciumnitrid-Spitze auf einem selbstorganisierten Film aus 3-Sulfanylpropionsäure, chemisorbiert an Gold, in Abhängigkeit von der Ionenstärke.<sup>[68]</sup> Bei einer KCl-Konzentration von 100 mM hat die Debye-Länge bereits so stark abgenommen, dass die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte überwiegen und eine Anziehung sichtbar wird (Abbildung 7A). Dieser Zustand wird auch in der numerischen Simulation richtig wiedergegeben (Abbil-

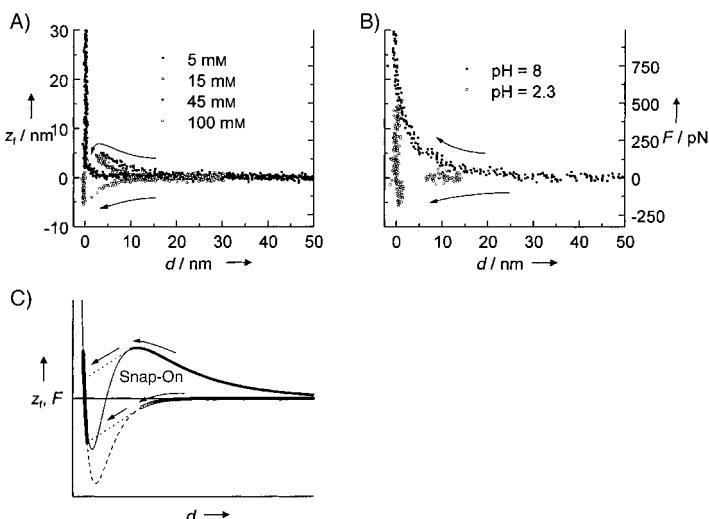


Abbildung 7. Kraftspektroskopische Analyse elektrostatischer Wechselwirkungen (nur Annäherungskurven sind dargestellt).  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Spitze in Wechselwirkung mit einem selbstorganisierten Film (3-Sulfanylpropionsäure) bei pH 7.7: Spitze und Probe sind negativ geladen. A) Variation der Ionenkonzentration (KCl). Vor dem Snap-On zeigt sich die Veränderung des elektrischen Feldes besonders deutlich. Die elektrostatische Repulsion bei niedrigen Ionenkonzentrationen ist deutlich ausgeprägt. Bei 45 mM findet der Snap-On so dicht an der Oberfläche statt, dass sich der Sprung nicht mehr auflösen lässt. B) Variation des pH-Werts bei niedriger Ionenkonzentration. Bei pH 8 sind Spitze und Probe negativ geladen; es resultiert eine repulsive Wechselwirkung, während bei pH 2.3 die Wechselwirkung attraktiv ist. C) Numerische Simulation der Kraft-Abstands-Kurven (qualitativ) mit zugrunde liegender Wechselwirkungskraft (Überlagerung von Van-der-Waals-Wechselwirkungen und exponentieller Abstoßung) für niedrige (—) und hohe Ionenkonzentration (---).

dung 7C). Ebenfalls dargestellt ist der Einfluss des pH-Werts der Lösung auf die Oberflächenladung. Sind beide Oberflächen negativ geladen (pH 8), ist bei einer Ionenstärke von 5 mM die Repulsion dominierend. Bei pH 2.3 überwiegt die Anziehung (Abbildung 7B). Mit dieser Methode lassen sich Oberflächenpotentiale ortsaufgelöst abbilden und Oberflächenladungen z.B. von Biomembranen wie der Purpumembran von *Halobacterium salinarium* bestimmen.<sup>[67]</sup>

### 3.4. Solvatisierungskräfte

Kommen sich zwei Oberflächen bis auf wenige Nanometer nahe, lassen sich die auftretenden Kräfte nicht länger zufriedenstellend mit Hilfe von Kontinuumstheorien wie den attraktiven Van-der-Waals- und den repulsiven Doppelschichtkräften beschreiben. Die aufgrund der molekularen Struktur der Flüssigkeit auftretenden Nahkräfte werden unter den Begriffen Solvatisierungs- oder Strukturkräfte zusammengefasst.<sup>[20]</sup> Dabei spielt die geometrische Anordnung der Lösungsmittelmoleküle an der Festkörperoberfläche die entscheidende Rolle. Die anziehenden Wechselwirkungen zwischen den Molekülen des Lösungsmittels und der Festkörperoberfläche führen zur Bildung von quasidiscreten Moleküllagen. Im Fall einer zwischen zwei Festkörpern eingeschlossenen Flüssigkeit kommt es bei der Annäherung zu Umorientierungen, die in den meisten Fällen eine exponentiell abklingende oszillierende Kraft hervorrufen. Aber

auch monoton abklingende attraktive oder repulsive Komponenten können, abhängig von der Form der Moleküle und dem Wechselwirkungspotential mit der Oberfläche, auftreten. Eine besondere Form der Solvatisierungskraft ist die in wässrigen Lösungen beobachtbare repulsive Hydratisierungskraft. Sie beschreibt die Kraft, die nötig ist, um die Hydrathülle von Oberflächenmolekülen aufzubrechen und so die Spitze näher an die Probe zu bringen. Bei der Annäherung von zwei Lipiddoppelschichten aus zwitterionischen Phospholipiden werden nur über sehr kurze Entfernnungen (1–2 nm) wirkende Kräfte entropischer Natur als Folge der Überlappung von Kopfgruppen und hydrophoben Ketten beobachtet. Von diesen Hydratisierungskräften sterischen Ursprungs sind solche zu unterscheiden, die durch die Adsorption von hoch geladenen, hydratisierten Ionen hervorgerufen werden. So konnte Butt zeigen, dass exponentiell abklingende repulsive Kräfte mit einer Abklinglänge von ca. 3 nm auftreten, wenn man die klassische Doppelschicht-Repulsion durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{SrCl}_2$  ausschaltet.<sup>[69]</sup>

### 3.5. Chemische Kraftmikroskopie (CFM)

Unter diesem Begriff versteht man eine Form der Kraftspektroskopie, bei der die Rastersonde und die Substratoberfläche so derivatisiert werden, dass sich die Wechselwirkung zwischen bestimmten funktionellen Gruppen eindeutig unterscheiden lässt. Bei den immobilisierten Molekülen handelt es sich häufig um niedermolekulare Verbindungen, die – um die Interpretation der Ergebnisse zu vereinfachen – meist nur eine funktionelle Gruppe tragen.<sup>[13, 14]</sup> Die Fragestellungen, die sich mit der CFM bearbeiten lassen, reichen von der ortsaufgelösten Bestimmung von Oberflächenenergien bis zur lokalen Bestimmung von pK-Werten über die Messung von Adhäsionskräften. Die Funktionalisierung wird meist über eine Goldbeschichtung der Sonden- und Probenoberfläche und anschließende Chemisorption thiolisierter Moleküle erreicht. Alternativ kommt auch die klassische Silanchemie, mit Mono- und Trialkoxysilanen sowie Trichlorsilanen, zum Einsatz. Bei der CFM spielt die Umgebung (Gasraum, Elektrolytkonzentration, pH) eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe der Kraftspektroskopie in trockenen Gasen konnte folgende Sequenz der Adhäsionskräfte zwischen Amino- und Carboxy-terminierten Gruppen entsprechend der Bindungsstärke ermittelt werden:  $\text{COOH}/\text{NH}_2 > \text{COOH}/\text{COOH} > \text{NH}_2/\text{NH}_2$ .<sup>[70]</sup> Es existiert eine Reihe von Daten zu unterschiedlichen Wechselwirkungen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Wasser und Gasen. Der interessierte Leser sei auf die umfassende Übersicht von Noy et al.<sup>[70]</sup> verwiesen.

Grundsätzlich sind die Adhäsionskräfte zwischen Gruppen, die Wasserstoffbrückenbindungen bilden können, größer als die zwischen Gruppen, die dazu nicht in der Lage sind. Besonders interessant ist diese Variante der Kraftmikroskopie bei der Bestimmung von hohen Oberflächenenergien, z.B. von Carbonsäure-Monoschichten, die sich nicht konventionell mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen erfassen lassen.

Die theoretische Basis für die Bestimmung von Oberflächenenergien aus Adhäsionskräften liefern mechanische

Kontaktmodelle.<sup>[71]</sup> Bereits 1881 beschrieb H. Hertz die Deformation zweier elastischer, sphärischer Körper, jedoch ohne Berücksichtigung der Adhäsion.<sup>[72]</sup> Von Johnson, Kendall und Roberts (JKR-Modell) stammt ein analytisches Kontaktmodell, das die Adhäsion berücksichtigt.<sup>[73]</sup> Als Vereinfachung wird bei diesem Modell angenommen, dass die Adhäsion ausschließlich über die Grenzflächenenergie eingeht, was Kräfte impliziert, die nur bei direktem Kontakt der Festkörper wirksam werden. Derjaguin, Muller und Toporov (DMT-Modell) wählten für ihren Ansatz ein abstandsabhängiges Potential.<sup>[74]</sup> Als Vereinfachung nahmen sie jedoch an, dass die Verformung der Oberfläche außer von den äußeren Kräften noch von einer Adhäsionskraft abhängt, die sich aus der Integration über die Hertz-Form der Oberfläche ergibt. Eine vollständige Lösung für den Kontakt zweier ideal elastischer, adhäsiver, kugelförmiger Körper liefert das MYD/BHW-Modell.<sup>[75]</sup> In erster Näherung werden die Oberflächenkräfte beispielsweise durch ein Lennard-Jones-Potential beschrieben. Als Schlussfolgerung aus dem MYD/BHW-Modell ergibt sich, dass die Ablösekraft nicht unabhängig von der Elastizität der Kontaktkörper ist und zwischen den Grenzwerten des DMT- und JKR-Modells liegt. Abhängig von der Elastizität der Körper und den attraktiven Kräften ist sowohl ein mechanisch stabiles (DMT-Modell) als auch ein „Jump-to-contact“-Verhalten (JKR-Modell) bei der Annäherung möglich.<sup>[3]</sup>

Für die meisten Zwecke ist eine Beschreibung im JKR- oder DMT-Modell hinreichend genau. Während das JKR-Modell besonders für die Beschreibung des Kontakts weicher, sehr adhäsiver Körper mit großen Radien geeignet ist, findet das DMT-Modell bei gegenteiligen Merkmalen Verwendung. Aus JKR- und DMT-Modell ergibt sich für das Kugel-Platte-Modell eine direkte Proportionalität zwischen Adhäsionskraft und Adhäsionsenergie  $W_{ad}$  ( $F \propto R W_{ad}$ ), mit  $W_{ad} = \gamma_{SM} + \gamma_{TM} - \gamma_{ST}$ . Dabei bezeichnen  $\gamma_{ST}$ ,  $\gamma_{TM}$  und  $\gamma_{SM}$  die freien Oberflächenenergien mit M für Medium, S für Probe, T für Rastersonde und R den Spitzenradius. Große Adhäsionskräfte ergeben sich also aus einer starken Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze. Um  $\gamma_{ST}$  zu erhalten, werden zuerst Spitze und Probe gleichartig funktionalisiert und so  $\gamma_{TM}$  und  $\gamma_{SM}$  ermittelt. Anschließend lässt sich  $\gamma_{ST}$  durch Messung der Adhäsionskraft zwischen unterschiedlich präparierten Spitzen und Proben bestimmen.<sup>[76]</sup>

Die freie Oberflächenergie reflektiert den Ionisierungszustand der Moleküle auf der Oberfläche. Daher kann man prinzipiell den Ladungszustand in Abhängigkeit vom pH-Wert in der Lösung über Kontaktwinkelmessungen bestimmen und daraus den pK-Wert der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche ableiten. Dies lässt sich lokal mit Hilfe von Adhäsionsmessungen auch bei hohen Oberflächenenergien, bei denen die Kontaktwinkelmessungen versagen, durch entsprechend funktionalisierte CFM-Sonden realisieren. Eine Titration der Adhäsionskräfte bei COOH-funktionalisierter Spitze und Probe zeigt Abbildung 8.<sup>[70]</sup> Der so ermittelte pK-Wert der Oberfläche von ca. 5.5 stimmt mit den Werten in Lösung gut überein, sodass Nachbargruppeneffekte vernachlässigt werden können.

Grundlage der hier beschriebenen Bestimmung von Oberflächenenergien sind makroskopische Modelle, welche die

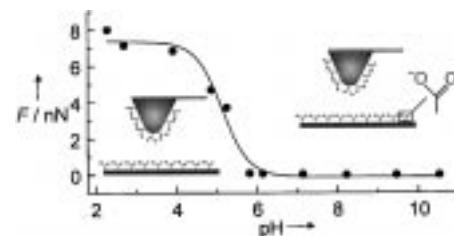


Abbildung 8. Adhäsionskraft  $F$  zwischen einer mit 3-Sulfanylpropionsäure funktionalisierten Rastersonde und einem gleichartig derivatisierten Substrat in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Bei  $pH = pK$  der immobilisierten Carbonsäure sinkt die Adhäsionskraft rasch ab, da die Wasserstoffbrückenbindungen als Folge der Deprotonierung nicht mehr zur Adhäsionskraft beitragen.<sup>[70]</sup>

diskrete Natur des Kontaktproblems nicht berücksichtigen. Bei großen Kräften können sowohl spontane atomare Umordnungsprozesse als auch plastische Deformationen eine Rolle spielen; letztere können auch bei sehr kleinen Kräften bereits auftreten. Aber auch die Annahme ideal glatter Oberflächen, wie von den Kontaktmodellen gefordert, ist in der Realität nicht erfüllt. Bereits geringe Rauigkeiten von wenigen Nanometern verringern die Adhäsion signifikant.

#### 4. Kraftspektroskopie von Molekülerkennungsreaktionen

Solche Erkennungsreaktionen auf der Basis von nicht-kovalenten Bindungen sind in der Natur von entscheidender Wichtigkeit. Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen spielen eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Basenpaaren und damit dem Aufbau der Watson-Crick-DNA-Doppelhelix, enzymkatalysierten Reaktionen, Antigen-Antikörper-Reaktionen, Hormonwirkungsketten, bei der Reizweiterleitung, der initialen Infektion durch Viren und Bakterien, Entzündungsreaktionen, bei der Muskelbewegung, der Adhäsion und Migration von Zellen und beim Zusammenhalt des Cytoskeletts. In der Regel handelt es sich bei den beteiligten Bindungskräften um eine Kombination aus elektrostatischen, hydrophoben und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen, die von den äußeren Bedingungen, wie Ionenstärke und pH, abhängen. Für den Biowissenschaftler ist neben thermodynamischen und kinetischen Parametern besonders das komplexe Zusammenspiel dieser Kräfte wichtig, um einen Einblick in die Struktur-Funktions-Beziehungen der Biomoleküle zu erhalten.

Anwendungsbeispiele sind Untersuchungen zur Auswirkung von Punktmutationen (Austausch einer Aminosäure) auf die Spezifität und Bindungsstärke von Proteinen. Die Kraftspektroskopie kann als wirksame komplementäre Technik zu etablierten integralen Verfahren angesehen werden. Durch die statistische Analyse von Bindungsbruchereignissen ist es möglich, außer über die Bindungsstärke auch etwas über die Form der Energiebarriere des Übergangs vom gebundenen in den freien Zustand zu lernen. Begleitend zu den Experimenten ist eine Reihe von Moleküldynamik(MD)-Rechnungen durchgeführt worden, die erheblich zum Verständnis der Prozesse auf molekularem Niveau beigetragen

haben.<sup>[77]</sup> Evans und Richie konnten durch Monte-Carlo-Simulationen (smart Monte-Carlo) der dynamischen Bindungsdissoziation unter Einwirkung einer externen Kraft die Lücke zwischen MD-Rechnung und Experiment schließen.<sup>[78]</sup>

Bei einem typischen Experiment zur Untersuchung von Molekülerkennungsreaktionen wird die Rastersonde mit einem der Bindungspartner und das Substrat mit dem entsprechenden komplementären Molekül funktionalisiert. Dabei ist es wichtig, dass die Bindungen zum Substrat und zur Spitze um Größenordnungen stärker sind als die zu untersuchende Bindung. Im Wesentlichen gibt es, wie schon bei der chemischen Kraftmikroskopie beschrieben, zwei dominierende Techniken, die auf der Chemisorption von Thiolen auf Gold und von Silanen auf Siliciumdioxid beruhen. Die kovalente oder quasikovalente Bindung an das Substrat stellt sicher, dass die schwächere, nichtkovalente Bindung zwischen den zu untersuchenden Biomolekülen zuerst reißt. Die Kopplung der Biomoleküle an die immobilisierten Moleküle erfolgt über kovalente Verknüpfungen mit Hilfe etablierter Biokonjugationsreaktionen, wie der Verknüpfung von Aminen mit festkörpergestützten, aktivierten Carbonsäuren oder Aldehyden. Anschließend wird über das *z*-Piezostellglied die funktionalisierte Probe in Kontakt mit der Spitze gebracht und diese dann mit konstanter Zuggeschwindigkeit wieder zurückgezogen. Moderne Kraftmikroskope lassen eine vollständige Kontrolle dieses Vorgangs zu, von der Dauer des Kontakts mit der Oberfläche bis zur Zuggeschwindigkeit. Das Ablösen der Spitze erfolgt meist nicht in einem Schritt, wie er mit der mechanischen Instabilität erklärbar ist, sondern über mehrere diskrete Einzelereignisse, die fortlaufenden Bindungsbrüchen der Biomoleküle zuzuordnen sind. Im Fall des letzten Abrissereignisses ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich nur noch um eine oder einige wenige Bindungen zwischen Probe und Spitze handelt, besonders groß. Im Idealfall bricht nur eine einzelne Bindung des Ligand-Rezeptor-Paars.

Der Datenaufnahme schließt sich eine statistische Analyse an, bei der die Häufigkeit der Abrisskräfte gegen die Abrisskräfte selbst aufgetragen wird und aus den auftretenden Maxima die Abrisskraft des jeweiligen Ligand-Rezeptor Paars bestimmt wird. Die Kraft, welche bei Bindungsbruchereignissen am häufigsten gemessen wird, wird als Stärke der Bindung bezeichnet. Aber auch Verteilungen, die bei höheren Kräften auftreten, können aussagekräftig sein, sofern sich das Maximum der Verteilung mit  $nF$  (ganzzahliges Vielfaches  $n$  der Bindungskraft  $F$ ) beschreiben lässt (siehe Abbildung 13B – die Schulter bei 556 pN spiegelt das gleichzeitige Aufbrechen zweier Bindungen wider). Kommt es bei einer Messung zum gleichzeitigen Aufbrechen zweier oder mehrerer gleicher, spezifischer Bindungen, muss sich auch die gemessene Kraft in gleicher Weise vervielfachen.<sup>[97]</sup>

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass alternativ zur Auflösung einzelner Bindungsbrüche auch die Bindungsstärke mit Hilfe der Poisson-Statistik ermittelt werden kann. Dieses Verfahren wurde von Beebe und Mitarbeitern eingeführt und ermöglicht es, mit Hilfe relativ weniger Kraftkurven und geringer Kraftauflösung Bindungsbruchereignisse zu analysieren.<sup>[79]</sup>

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Abrisskräfte und ihre Abhängigkeit von der Zuggeschwindigkeit des Federbalzens lassen sich durch ein einfaches Kinetikmodell erklären. Das im Folgenden dargestellte Modell gilt auch für die erzwungene Entfaltung von Polymeren, wie sie in Abschnitt 5 behandelt wird. Aus diesem Grund wird die Betrachtung sehr allgemein gehalten.

#### 4.1. Kinetik der Trennung eines Ligand-Rezeptor-Paars

Die Lebensdauer nichtkovalerter Bindungen ist ohne die Einwirkung äußerer Kräfte ausgesprochen groß. zieht man jedoch an einem oder beiden Bindungspartnern mit einer äußeren Kraft über einen hinreichend langen Zeitraum, so wird das Bindungspotential durch thermische Fluktuationen überwunden und die Bindung aufgebrochen. Die folgende Betrachtung wird zeigen, dass molekulare Adhäsions- und Kohäsionskräfte nicht nur von der Bindungsenthalpie, sondern auch von der Zuggeschwindigkeit abhängen.

Betrachtet man ein Bindungspaar unter externer Zugkraft, so liegt anschaulich eine unendliche Verdünnung der Bindungspartner vor – das System ist weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt, und aus kinetischer Sicht ist die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion verschwindend klein und somit nur noch die Zerfallsgeschwindigkeit von Bedeutung –, d.h., die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Rückreaktion zum Komplex ist bei Trennung der Reaktionspartner nahezu null. Die Stärke der Bindung bei Anwendung einer externen Kraft resultiert also aus der kinetischen Stabilität der Bindung. Anders als bei thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen hängt die Stärke einer Bindung bei Einwirkung einer externen Kraft von der Zuggeschwindigkeit ab. Die äußere Kraft senkt die Aktivierungsbarriere für die Dissoziation allmählich ab, bis thermische Fluktuationen auf der Zeitskala des Experiments zu einer Überschreitung der Aktivierungsenergie führen. Ein einfaches Modell der Bindungsdissoziation unter Einwirkung einer externen Kraft, das auf der Theorie des Übergangszustands basiert, stammt von Bell.<sup>[80]</sup> Bell nahm an, dass die Gibbs-Enthalpie des Übergangszustands,  $\Delta G^*$ , durch die externe Kraft auf den Wert  $\Delta G^* - Fx_u$  abgesenkt wird;  $F$  ist die mechanische externe Kraft und  $x_u$  die Potentialbreite des gebundenen Zustands.

Mit dem in Abbildung 9 dargestellten Zweizustandsmodell lassen sich im Wesentlichen alle Beobachtungen bei kraft-

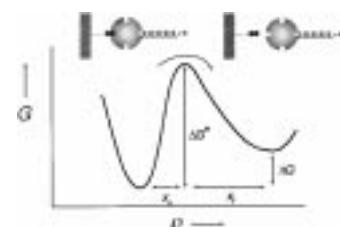


Abbildung 9. Klassisches Zweizustandsmodell des Bindungsbruchs eines Ligand-Rezeptor-Paars (linke Darstellung) und der Entfaltung eines Polymeren (rechte Darstellung) sowie zugehöriges Reaktionspotential.  $\Delta G^*$  ist die Gibbs-Aktivierungsenergie, die beim Bindungsbruch überwunden werden muss,  $\Delta G$  die Gibbs-Bindungsenthalpie,  $x_u$  die Potentialbreite des gebundenen und  $x_f$  die des getrennten Zustands.

spektroskopischen Experimenten erklären. Analog zum radioaktiven Zerfall oder zu einer monomolekularen Reaktion lässt sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Bindung nach der Zeit  $t$  aufgebrochen ist, durch Gleichung (5) angegeben.  $k_{\text{off}}$

$$p_{\text{off}} = 1 - \exp\left(-\int_0^t k_{\text{off}}(t') dt'\right) \quad (5)$$

ist die Zerfallsgeschwindigkeit. Der entscheidende Unterschied zu kinetischen Prozessen ohne Einwirkung einer externen Kraft ist der Umstand, dass  $k_{\text{off}}$  hier von der Zeit abhängt [Gl. (6)].  $x_u$  repräsentiert in diesem Modell die

$$k_{\text{off}} = \nu_0 \exp\left(-\frac{1}{k_B T}(\Delta G^* - \int_0^{x_u} F(t) dx)\right) = \alpha \exp\left(\frac{F x_u}{k_B T}\right) \quad (6)$$

Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Abrisskräfte von der Beschaffenheit des Potentials,  $\nu_0$  bezeichnet die Frequenz der Bindung und  $\alpha$  die Zerfallsgeschwindigkeit ohne externe Kraft. Die Zeitabhängigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass die externe Kraft zeitabhängig ist:  $F(t) = kv t$ . Dabei bezeichnet  $v$  die Zuggeschwindigkeit und  $k$  die Federkonstante der Tastfeder.

Aus Gleichung (6) wird deutlich, dass die Zerfallsgeschwindigkeit exponentiell mit der externen Kraft und damit mit der Zuggeschwindigkeit wächst, während die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion exponentiell mit der externen Kraft fällt. Die Wahrscheinlichkeitsdichte  $w$ , dass bei Applikation einer zeitlich zunehmenden Kraft die Bindung aufbricht, ist durch Gleichung (7) gegeben.  $w(F)$  beschreibt die

$$w(F) = \frac{dp_{\text{off}}}{dF} = \frac{\alpha}{kv} \exp\left(\frac{F x_u}{k_B T} \left( \frac{k_B T}{kv x_u} \alpha \left(1 - \exp\left(\frac{F x_u}{k_B T}\right)\right) \right)\right) \quad (7)$$

Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Abrisskräfte; die Abhängigkeit dieser Funktion von der angelegten Kraft wird üblicherweise in Form eines Histogramms wiedergegeben. Das Maximum der Verteilung ist gemäß der Definition identisch mit der Abrisskraft der Bindung [Gl. (8)]. Eine Erhöhung der Zuggeschwindigkeit äußert sich in einer Verschiebung der Verteilung zu höheren Kräften, wie Abbildung 10 illustriert.

$$F = \frac{k_B T}{x_u} \ln\left(\frac{x_u}{k_B T \nu_0} - kv\right) + \frac{\Delta G^*}{x_u} \quad (8)$$

Die Breite der Verteilung hängt dabei von der Potentialbreite  $x_u$  und der thermischen Energie ab. Eine stark erweiterte Analyse der dynamischen Stärke molekularer Bindungen stammt von Evans und Richie.<sup>[78]</sup> Während bei Bell die gesamte Energietopologie in einem Parameter  $x_u$  zusammengefasst ist, schlagen Evans und Ritchie ein Modell vor, in dem die Bindungsbrüche als duktil oder spröde klassifiziert werden können. Unter Berücksichtigung molekularer Reibungseffekte (intrinsische und hydrodynamische

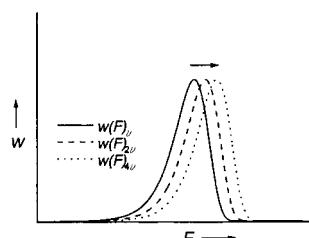


Abbildung 10. Numerische Simulation der Wahrscheinlichkeitsdichte  $w$  als Funktion der angelegten Kraft  $F$  für drei Zuggeschwindigkeiten (in Pfeilrichtung zunehmend). Nach Gleichung (7) wächst die Abrisskraft logarithmisch mit der Zuggeschwindigkeit.

Dämpfungserscheinungen) wird die Zerfallsgeschwindigkeit allgemein durch Gleichung (9) erfasst, wobei  $g(F)$  und  $\Delta\Delta E^*(F)$  die Deformation des Potentials durch die äußere Kraft bzw. molekulare Reibungserscheinungen beschreiben. Die Verteilung der Wahrscheinlichkeitsdichte wird so bei größeren Zuggeschwindigkeiten breiter und zu höheren Bindungskräften verschoben.

$$k_{\text{off}} = \alpha g(F) \exp\left(-\frac{\Delta\Delta E^*(F)}{k_B T}\right) \quad (9)$$

## 4.2. Wasserstoffbrückenbindung und DNA-Basen-Paarung

Die Molekülerkennungsreaktion par excellence ist die Basenpaarung in der DNA-Doppelhelix. Von Colton und Mitarbeitern stammen erste kraftspektroskopische Messungen zur Bestimmung der Bindungsstärke der Basenpaarung mit Einzelstrang-funktionalisierten Rastersonden und Substraten.<sup>[81]</sup> Die Rastersonden wurden dazu mit Kieselgelkugeln (Durchmesser 60–120 µm), die sich durch Silanverbindungen derivatisieren lassen, versehen. Die Spitze wurde über Trimethoxysilane kovalent mit Oligonukleotiden der Sequenz (ACTG)<sub>5</sub> functionalisiert und die Probenoberfläche mit solchen der Sequenz (CAGT)<sub>5</sub>. Auf diese Weise konnten sich theoretisch 20, 16, 12, 8 und 4 Basenpaare bilden. Lee et al.<sup>[24]</sup> fanden vier Populationen mit Kraftmaxima bei 1.52, 1.11, 0.83 und 0.48 nN. Die Adhäsionskraft zwischen nichtkomplementären Basenpaaren betrug 0.38 nN. Die gemessenen Kräfte entsprachen demnach einzelnen Doppelstrangbrüchen mit 20, 16 und 12 Basenpaarungen (das Maximum bei 0.48 nN wird zu den unspezifischen Wechselwirkungen gezählt). Die Zuggeschwindigkeit lag zwischen 0.1 und 10 nm s<sup>-1</sup>. Ferner wurden DNA-Doppelhelix-Brüche durch das Verbrücken von C<sub>20</sub>-Einzelsträngen auf der Spitze und der Probe mit unterschiedlich langen Poly(I)-Einzelsträngen untersucht (Abbildung 11).<sup>[81]</sup>

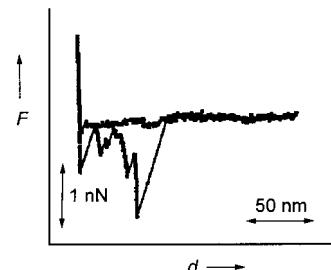


Abbildung 11. Beobachtung der kraftinduzierten Trennung einer DNA-Doppelhelix. Die Probenoberfläche wurde dazu mit Cytidin (C<sub>20</sub>) functionalisiert und anschließend mit Poly(I) hybridisiert. Die Spitze wurde ebenfalls mit C<sub>20</sub> derivatisiert, sodass eine Verbrückung der beiden Cytosineinzelstränge mit Poly(I) bei der Annäherung möglich wurde.<sup>[81]</sup>

Die Gruppe von Lieber bestimmte die Bindungsstärke zwischen komplementären DNA-Strängen (14 Bp) zu 0.45 nN.<sup>[82]</sup> Boland und Ratner wählten einen grundsätzlichen Ansatz, um die Bindungsstärke einzelner Basenpaarungen, wie die von Adenin und Thymin sowie von Cytosin und

Guanin, direkt zu quantifizieren.<sup>[83]</sup> Ausgehend von hoch definierten, selbstorganisierten Filmen der Sulfanylderivate der Basen Adenin (A), Cytosin (C) und Thymin (T) sowie der Guanin-analogen Base 2-Amino-6-hydroxy-8-sulfanylpurin (G) auf kristallinem Gold untersuchten sie die Wechselwirkung mit entsprechend komplementär funktionalisierten Rastersonden. Insgesamt 16 Kombinationen wurden bezüglich ihrer attraktiven Kräfte quantifiziert. Bei der Annäherung der Spitze wurde eine mittlere attraktive Wechselwirkung von 0.63 nN für A-T und von 1.08 nN für G-C gemessen, während die Abrisskräfte der zurückziehenden Tastfeder 3.24 nN für A-T und 3.10 nN für G-C betragen (unterschiedliche unspezifische Adhäsionskräfte). Es zeigte sich, dass in der Verteilung der attraktiven Kräfte diskrete Inkremente von 54 pN aufraten, die vermutlich jeweils der Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung entsprechen. Eine einfache Abschätzung ergibt bei einem Abstand der Moleküle von 0.2 nm aus der Enthalpie der Wasserstoffbrückenbindung von 1.8 kcal mol<sup>-1</sup> einen Wert von 125 pN für das A-T-Basenpaar. Das Bild wird etwas komplizierter, wenn man neben der herkömmlichen, stärkeren Watson-Crick-Basenpaarung auch die Hoogsteen-Basenpaarungen A-A, G-G, C-C, T-T und A-G einbezieht. Florin et al. weisen auf eine Abhängigkeit der Adhäsionskräfte von der Dauer des Kontakts einer Poly-dT-funktionalisierten Spitze mit einer Poly-dA-beschichteten Probe hin.<sup>[84]</sup> Das Maximum der Adhäsion wird erst nach ca. 2 min Kontakt erreicht. Dies lässt sich mit langsamem Reorientierungen von partiell hybridisierten DNA-Doppelsträngen interpretieren.

Einer neueren Arbeit von Rief et al.<sup>[85]</sup> zufolge, die das Aufreißen von Einzelstrang-Haarnadelschleifen untersuchten, beträgt die Stärke einer Haarnadelschleife, die aus abwechselnden A-T-Basenpaarungen besteht, 9 pN; bei einer alternierenden G-C-Sequenz ist der Wert 20 pN. Bei der Versuchsdurchführung wurde das Schmelzen einer Doppelhelix durch die externe Kraft erzwungen und so die Bildung von Haarnadelschleifen der getrennten Einzelstränge ermöglicht. Das Aufreißen der Haarnadelschleife findet unter den experimentellen Bedingungen im quasithermodynamischen Gleichgewicht (voll reversibel) statt – also unabhängig von der Dauer der Krafteinwirkung. Dies bedeutet, dass die Knüpfung neuer Basenpaare und das Aufreißen viel schneller sind als das vollständige Durchlaufen einer Kraftkurve. Einen ähnlichen Kraftbereich für das Entfalten doppelsträngiger DNA geben Essevaz-Roulez et al. an (10–15 pN).<sup>[86]</sup>

Strunz et al. untersuchten die Dynamik des Bindungsbruchs komplementärer DNA Strände bei verschiedenen Zuggeschwindigkeiten (16–4000 pNs<sup>-1</sup>) unter physiologischen Bedingungen.<sup>[87]</sup> Dabei wurde die DNA-Doppelhelix jeweils am 5'-Ende über eine Polyethylenglycol(PEG)-Kette an das Substrat und die Spitze gebunden, um unspezifische Bindungen, die näher am Substrat entstehen, zu unterdrücken. Abhängig von der Zahl der Basenpaarungen fanden Strunz et al. einen für ein Zweizustandsmodell zu erwartenden Zusammenhang zwischen der am häufigsten gemessenen Kraft, ermittelt aus einer Beschreibung der statistischen Bindungsbruchereignisse mit einer Gauß-Verteilung, und dem Logarithmus der Zuggeschwindigkeit. Die Elastizität (ca. 2 pN nm<sup>-1</sup>) des Moleküls ändert sich dabei mit der

Zunahme der Basenpaarungen nur moderat. Das kooperative Aufbrechen der Doppelhelix hängt über den Frequenzfaktor  $\nu_0$  von der Zahl der Basenpaarungen ab, da sich die Zahl der Freiheitsgrade mit der Länge der Doppelhelix vergrößert. Strunz et al. konnten zeigen, dass die Kraft, die notwendig ist, um die Doppelhelix aufzuschmelzen, bei langen DNA-Strängen gegen einen Wert von ca. 1.2  $k_b T / 0.7 \text{ Å}$  (70 pN) konvergiert. Dieser Wert ist unabhängig von der Zuggeschwindigkeit. Des Weiteren sei auf zwei Arbeiten von Bockelmann et al. hingewiesen, die das Auftreten einer sequenzabhängigen molekularen Haft-Gleit-Bewegung beim Auseinanderziehen von DNA-Doppelhelices beobachteten.<sup>[88, 89]</sup> Sie verglichen die von ihnen an  $\lambda$ -Pagen-DNA ermittelte Energie (1.9 kcal mol<sup>-1</sup>) mit der aus klassischen Schmelzexperimenten (1.5 kcal mol<sup>-1</sup> für A-T und 3 kcal mol<sup>-1</sup> für G-C<sup>[90]</sup>) und wiesen darauf hin, dass neben der Wasserstoffbrückenbindung die Basenstapelung einen entscheidenden Beitrag zur Stabilität von DNA-Doppelsträngen leistet.

Dass mit Hilfe der Kraftspektroskopie auch Unterschiede in der Chiralität von niedermolekularen organischen Verbindungen sensitiv detektiert werden können, zeigten McKendry et al. am Beispiel der Wechselwirkung einer mit Acetylphenylglycin (T) funktionalisierten Spalte mit einem mit Mandelsäure (M) beschichteten Substrat.<sup>[91]</sup> Die Substanzen wurden durch Gold-Thiol-Chemie immobilisiert und die Probe zusätzlich durch Mikrokontakteprägen strukturiert. Mehrere Kombinationen von enantiomerenreinen Paaren und Racematen wurden bezüglich ihrer Abrisskräfte quantifiziert. Die stärkste Wechselwirkung ergab sich jeweils bei T(S)/M(R)- und M(S)/T(R)-Enantiomerenpaaren (1.1 nN). Diese Ergebnisse deuten bereits an, dass die lokale Kraftspektroskopie im Prinzip auch für das Screening in der Arzneimittelforschung von Interesse ist.

### 4.3. Ligand-Rezeptor-Systeme proteinogenen Ursprungs

Nichtkovalente Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen von Proteinen sind für Immunologen, Physiologen und Biochemiker gleichermaßen von großem Interesse. Dabei sind zum einen Kenntnisse der beteiligten Kräfte und zum anderen die Bestimmung der Gesamtstärke der Bindung für das Verständnis der Wechselwirkung von Proteinen mit hoch- und niedermolekularen Verbindungen von Bedeutung. Untersucht werden können z.B. die Auswirkungen von Punktmutationen im aktiven Zentrum und die Form des Bindungspotentials. Eine Reihe nichtkovalerer Ligand-Rezeptorkomplexe, wie Antigen-Antikörper, Biotin-Streptavidin/Avidin und P-Selectin-Glycoprotein, wurde bisher mit der Kraftspektroskopie untersucht (Tabelle 1).

Die ersten Messungen wurden am klassischen Ligand-Rezeptor-System Streptavidin-Biotin durchgeführt (Abbildung 12) und stammen von den Arbeitsgruppen Gaub<sup>[4]</sup> und Colton.<sup>[5]</sup> Abbildung 12 A zeigt eine Kraftkurve, wie sie beim Zurückziehen der Streptavidin-funktionalisierten Tastfeder von einer biotinylierten Oberfläche (BBSA) typischerweise erhalten wird. Werden die freien Streptavidin-Bindungsstellen

Tabelle 1. Bindungsparameter von Antikörper-Antigen-Komplexen.

Komplexkomponenten	$F$ [pN]	$\Delta G$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$v$ [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ]
IgG (Ziege), biotinyliertes BSA <sup>[95]</sup>	$111.5 \pm 98.6$	–	–
Einzelstrang-Fv (Wildtyp), Fluorescein <sup>[12]</sup>	$50 \pm 4$	$-50.8$	1
Einzelstrang-Fv (His(H58)-Ala), Fluorescein <sup>[12]</sup>	$40.3 \pm 3$	$-44.8$	1
humanes Serumalbumin (HSA), polyklonales anti-HSA <sup>[27]</sup>	$240 \pm 48$	–	–
Biotin, Avidin <sup>[4, 93, 96]</sup>	$170 - 280$	–	–
Streptavidin, Biotin <sup>[5]</sup>	$340 \pm 120$	–	–
Hb-A1c-Antikörper, anti-Hb-A1c-Antikörper <sup>[97]</sup>	$278 \pm 83$	–	$<2$
<i>Microniona prolifera</i> (MAF), anti-MAF <sup>[30]</sup>	50	–	–
Adhäsionsmolekül (ICAM-1), anti-ICAM-Antikörper (F10.2) <sup>[151]</sup>	$100 \pm 50$	–	–

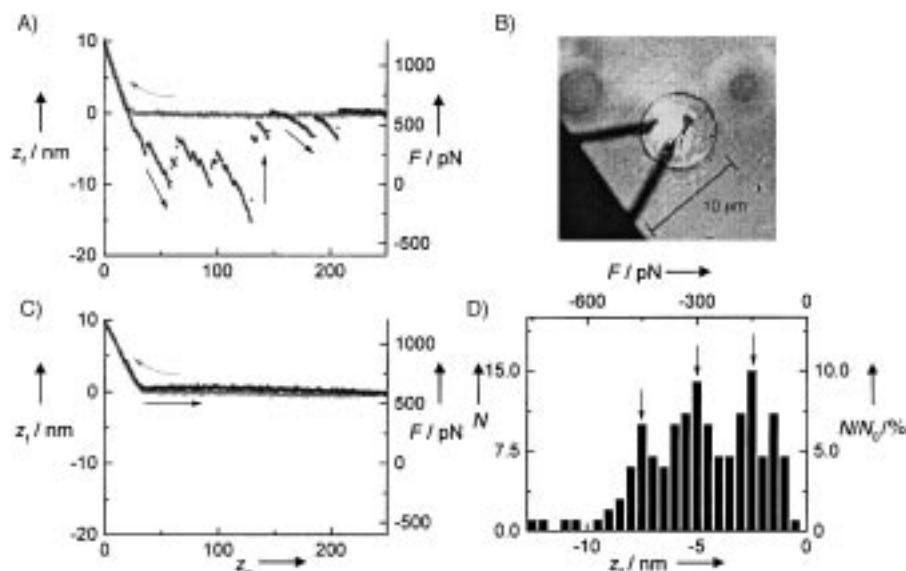


Abbildung 12. A) Typische Kraftkurve einer Streptavidin-funktionalisierten Messspitze in Wechselwirkung mit einem Biotin-derivatisiertem Substrat. Das Ablösen der Tastfeder geschieht in mehreren Schritten, wobei jeweils diskrete Bindungen zwischen Probe und Spitz gelöst werden. Die Messspitze wurde zuvor mit biotinyliertem Rinderserumalbumin (BBSA) beschichtet und anschließend mit Streptavidin inkubiert. Als Substrat dienten biotinylierte Agarose-Kugeln, adsorbiert auf Glas. B) Optische Aufnahme einer V-förmigen Tastfeder über einer Agarose-Kugel. C) Kontrollmessung, bei der Biotin zur Lösung hinzugegeben wurde und so die Streptavidin-Bindungstaschen kompetitiv besetzt wurden. Es sind keine Bindungsbrüche mehr zu beobachten. D) Häufigkeitsverteilung der Abrisskräfte im Biotin-Streptavidin-System. Das Histogramm weist drei Maxima im Abstand von 150 pN auf – entsprechend dem Aufbrechen von einer, zwei bzw. drei Ligand-Rezeptor-Bindungen.<sup>[68]</sup>

len durch in Lösung befindliches Biotin blockiert, sind keine Abrisskräfte mehr zu beobachten (Abbildung 12 C).<sup>[68]</sup>

Der Untersuchung des Bindungsbruchs unter Einwirkung einer äußeren mechanischen Kraft kommt im Fall der Selectin-Glycoprotein- und -lipid-Wechselwirkung eine besondere Bedeutung zu, da dieser Vorgang eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion im menschlichen Körper spielt. Auf ein Entzündungssignal hin rollen Leukozyten im Blutstrom das Endothel entlang, wobei ihre Adhäsion über eine spezielle Art von Lektinen, die Selectine, vermittelt wird, die von den Endothelzellen exprimiert werden. Diese Bewegung, ausgelöst durch eine äußere Kraft, den Blutstrom, kann durch ein kraftspektroskopisches Experiment nachgestellt werden. Das P-Selectin der Endothelzellen bindet an den Liganden, den P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) der Leukozyten. Die Bindungsdomänen befinden sich dabei weit entfernt von der Zellmembran an den aminoterminalen Enden der Polypeptidketten. Fritz et al. untersuchten dieses System anhand rekombinanter Chimären mit konstanter IgG-

Region mit Hilfe der Kraftspektroskopie.<sup>[92]</sup> Die Spitzen ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) und das Substrat (Glas) wurden zunächst silaniert und anschließend mit Avidin beschichtet, das als Verankerung für das biotinylierte PSGL-1/IgG (Spitze) und das biotinylierte P-Selectin (Substrat) diente. Die Autoren bestimmten in einer umfassenden Studie neben der Bindungsstärke des Komplexes in Abhängigkeit von der Zuggeschwindigkeit der Tastfeder ( $F = 110 - 165$  pN) auch die Adhäsionswahrscheinlichkeit als Funktion der Kontaktzeit. Es zeigte sich, dass die Bindungskraft erwartungsgemäß logarithmisch mit der Zuggeschwindigkeit steigt [Gl. (8)] und dass, anders als bei Antigen-Antikörper- und Streptavidin-Biotin-Reaktionen, die Adhäsionswahrscheinlichkeit exponentiell mit der Kontaktzeit sinkt. Die Potentialbreite des Komplexes wurde zu 0.25 nm bestimmt, die Zerfallsgeschwindigkeit ohne die Einwirkung einer externen Kraft beträgt  $0.022 \text{ s}^{-1}$ . Nach einer Monte-Carlo-Simulation werden die

Abrisskräfte hauptsächlich durch die Zerfallskonstante des Komplexes bestimmt, die wiederum exponentiell mit der angelegten Kraft skaliert [Gl. 8].<sup>[92]</sup> Die Geschwindigkeit der Bindungsbildung beeinflusst die Abrisskraft zwar kaum, dafür aber die Adhäsionswahrscheinlichkeit. Die Ergebnisse beweisen, wie wichtig die Kinetik des Vorgangs ist und dass Bindungskräfte eine Funktion der Lebensdauer eines Komplexes sind. Eine Abhängigkeit der Bindungskraft und Adhäsionswahrscheinlichkeit von der Zuggeschwindigkeit bedeutet, dass die Geschwindigkeitskonstanten im gleichen Zeitfenster liegen wie die experimentelle Zuggeschwindigkeit.

Allgemein hängt der Erfolg kraftspektroskopischer Experimente maßgeblich von zwei Faktoren ab, der Kraftauflösung, im besten Fall begrenzt durch das thermische Rauschen der Tastfeder, und der Funktionalisierung von Spitz und Substrat. Bei der Derivatisierung von Oberflächen sollte nicht vergessen werden, dass die meisten Wechselwirkungen, die mit Hilfe der Kraftspektroskopie untersucht werden

sollen, in natürlichen Systemen ungehindert in Lösung ablaufen und nicht durch sterische Prozesse auf Oberflächen beeinflusst werden. Die Immobilisierung der Bindungspartner muss also möglichst flexibel gestaltet werden. Betrachtet man z.B. die Beweglichkeit eines sondengebundenen Antikörpers, so ist diese wegen seiner Länge von nur einigen 10 Å sehr stark eingeschränkt. Erhöhen kann man die Beweglichkeit – und damit die Bindungswahrscheinlichkeit –, indem man den Antikörper über einen Abstandshalter an der Sonde oder Probe befestigt. So immobilisierten Hinterdorfer et al.<sup>[27]</sup> den Antikörper polyklonales anti-Human-Serumalbumin (anti-HSA) kovalent über ein 8 nm langes PEG-Derivat an ihre Messsonde und ermittelten dann die Bindungskraft zwischen HSA und anti-HSA zu  $F = (240 \pm 48)$  pN. Ludwig et al.<sup>[93]</sup> funktionalisierten eine  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Messsonde mit Avidin über ein zuvor adsorbiertes, biotinyliertes Rinderserumalbumin, um unter anderem die Bindungscharakteristik von Avidin nicht durch die Adsorption und die damit verbundenen Denaturierungserscheinungen zu verändern. Mit dieser Anordnung wurde eine Bindungskraft des Biotin-Avidin-Komplexes von  $F = 200$  pN bestimmt.<sup>[94]</sup> Ros et al.<sup>[12]</sup> silanierten ihre Messsonde mit Aminopropyltriethoxysilan und hatten so die Möglichkeit, das als Antigen dienende Fluorescein (Fluor-NHS5000) zu immobilisieren. Sie bestimmten auf diese Weise die Bindungskraft und die Gibbs-Enthalpie der Bindung von Fluorescein an Einzelstrang-F<sub>v</sub>(Wildtyp)-Fragmente ( $F = (50 \pm 4)$  pN,  $\Delta G = -50.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) sowie an Einzelstrang-F<sub>v</sub>(His(H58)-Ala-Mutanten)-Fragmente ( $F = (40.3 \pm 3)$  pN,  $\Delta G = -44.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Dammer et al. konnten durch Verwendung der Thiol-Gold-Chemie mit Hilfe aktiverter Carbonsäuren ein System aus anti-Biotin-Immunglobulinen (ABIO) und Biotin-BSA (BBSA) bezüglich der Bindungskraft untersuchen.<sup>[12, 95]</sup>

Als Substrate werden neben Gold vielfach Glimmer und Silicium verwendet, da sie atomar flach sind und mit Hilfe von Silanen derivatisiert werden können.<sup>[12, 17]</sup> Bei der Funktionalisierung des Substrats müssen mögliche unspezifische Wechselwirkungen zwischen den sondengebundenen Komplexen und der funktionalisierten Oberfläche berücksichtigt und entsprechende Kontrollexperimente angeschlossen werden. Eine Möglichkeit, die unspezifischen Wechselwirkungen zu minimieren, ist die Anbindung von Proteinen auf Agarose-Kügelchen. Von diesen Polymerkugeln ist bekannt, dass unspezifische Wechselwirkungen stark unterdrückt werden.<sup>[4, 93, 96]</sup> Zur Kontrolle der unspezifischen Adsorption bieten sich zwei Möglichkeiten an. Zum einen kann die spezifische Bindung durch Zugabe des freien komplementären Liganden in das Medium kompetitiv gehemmt werden,<sup>[4, 27, 30, 127]</sup> zum anderen kann durch quantitatives Entfernen eines Bindungspartners die Wechselwirkung vermieden werden.<sup>[1]</sup> In beiden Fällen sollte das Maximum im Kraftspektrum verschwinden, wenn dieses das Aufbrechen einer spezifischen Bindung repräsentiert. Kräfte, die dann noch im Spektrum zu sehen sind, sind unspezifischer Natur und bilden einen Untergrund, der sich in der Kraftspektroskopie kaum vermeiden lässt. Typische Kraftspektren sind in Abbildung 13 zu sehen. In diesem Beispiel wurde mit Hilfe einer Blockade sowohl die Bindungskraft zwischen Hb-A1c-Antikörpern und ihren komplementären Antigenen zu  $F = (278 \pm 83)$  pN be-

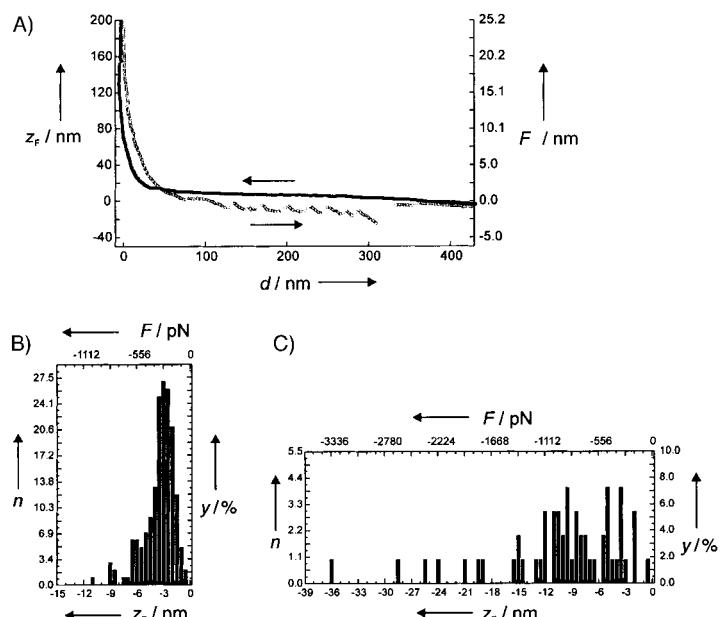


Abbildung 13. Kraftkurven und Histogramme für das Brechen von Bindungen in einem Antigen-Antikörper-Komplex. A) Typische Kraftkurven für längere Filamente, die zunächst gedeckt werden und anschließend bei einer definierten Kraft von der Spitze abreißen. B) Histogramm aus 171 Kurven (171 von 300 Kraftkurven zeigten Bindungsbrüche an). Die Zahl der Abrisse (als  $n$  und in Form der prozentualen Häufigkeit der einzelnen Abrisse ( $y$ )) ist als Funktion der Abrisslänge und der Abrisskraft dargestellt. C) Kontrollexperiment mit einer Spalte, deren Antigen durch frei in Lösung befindlichen Antikörper blockiert wurde. Das Histogramm zeigt die letzten Abrisse von Kurven, die mit einer mit freiem Antikörper blockierten Spalte aufgenommen wurden. Nur noch 55 von 300 Kurven wiesen dabei Ereignisse auf.<sup>[97]</sup>

stimmt als auch die Spezifität der Bindung durch Zugabe von freiem Antikörper nachgewiesen.<sup>[97]</sup>

Ein weiterer kritisch zu betrachtender Punkt ist eine mögliche Veränderung der Bindungseigenschaften von Proteinen auf einer Oberfläche. Es kann sich dabei um geringfügige Konformationsänderungen handeln, die bei der Adsorption auftreten, aber auch um eine vollständige Denaturierung der Proteine.

#### 4.4. Kovalente Bindungen

Zur Bestimmung der Stärke von kovalenten Bindungen mit Hilfe der Kraftspektroskopie muss das Probenmolekül richtig verankert werden. Zu den wenigen Bindungstypen der meisten Polymere kommen durch die Verankerung an der Substratoberfläche oder der Tastspitze heterogene Bindungen hinzu. Entweder muss daher die interessierende Bindung das schwächste Glied der Kette sein oder Schwachstellen im Molekül, wie sie an der Verankerung am Substrat oder an der Spitze auftreten, müssen durch Parallelisierung der schwächeren Bindungen kompensiert werden. Dies ist zum Beispiel bei der Verwendung von Trichlorsilanen durch Quervernetzung gewährleistet. Bisher ist erst eine Arbeit bekannt, die dieses experimentell schwierige Problem für zwei Bindungstypen ansatzweise gelöst hat. Grandbois et al. verankerten eine Amylosekette kovalent zwischen Rastersonde und

Substrat und konnten so die Bindungsstärke einer Si-C-(2 nN) und Au-S-Bindung (1.4 nN) ermitteln.<sup>[98]</sup> Die Verankerung war chemisch auf beiden Seiten identisch, um die Analyse zu vereinfachen. Im Fall der Si-C-Bindung wurden Glasoberfläche und Spitze mit *N*-(3-Trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamin funktionalisiert und mit 3-(3-Dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimid (EDC) aktivierte, carboxymethylierte Amylose zunächst kovalent an das Substrat gebunden und bei Berührung mit der Spitze zwischen Substrat und Spitze eingespannt.

Da Amylose einen im Zeitfenster reversiblen konformativen Übergang bei 275 pN aufweist, der somit nicht von der Zuggeschwindigkeit abhängt, lassen sich ohne Eichung der Tastfeder die wirkenden Kräfte bestimmen. Bei der Bestimmung der Stärke der Au-S-Bindung wurde analog verfahren. Die Amylosekette wurde kovalent an einem Cysteamin-Film auf dem Goldsubstrat befestigt, während die Verankerung an der Spitze wieder über Silane realisiert wurde. Da in beiden Fällen multiple irreversible Abrisse auftraten, jedoch nur eine einzelne Polymerkette gedehnt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass sich der Bindungsbruch an einer der Verankerungsgruppen an der Spitze ereignet hatte; nur dort waren multiple Bindungsbruchereignisse möglich. Bei einer Silanverankerung sind es vier verschiedene Bindungen, deren Vorkommen auf die Verankerung beschränkt ist: Si-O, Si-C, C-C und C-N. Aus einem Vergleich mit den Ergebnissen von Dichtefunktionalrechnungen folgt, dass der Bruch der Si-C-Bindung am wahrscheinlichsten ist. Bei der Au-S-Bindung bleibt Raum für Spekulationen. Während klar ist, dass die beobachteten Ereignisse auf die Goldverankerung zurückzuführen sind, bleibt offen, ob Goldatome aus dem metallischen Verband extrahiert werden oder ob tatsächlich die Au-S-Bindung gebrochen wird.

## 5. Intramolekulare Wechselwirkungen: Tauziehen an langkettenigen Einzmolekülen

Die biologische Aktivität von Proteinen ist stets mit einer speziellen Struktur des Moleküls verbunden. Die Polypeptidkette faltet sich nicht zufällig, vielmehr sorgen intramolekulare Wechselwirkungen für eine besondere Konformation des Moleküls, die für die biologische Funktion essentiell ist. Die Proteinstruktur lässt sich mit Hilfe des Circulardichroismus, der IR-Spektroskopie, der Röntgenstrukturanalyse und der NMR-Spektroskopie, die thermodynamische Stabilität mittels der Kalorimetrie untersuchen. Da die Form der Energiehyperfläche jedoch im Allgemeinen unbekannt ist, müssen die intramolekularen Kräfte, die eine Proteinstruktur zusammenhalten, direkt gemessen werden. Dies leistet die Kraftspektroskopie, und zwar am einzelnen Molekül. Dabei wird das Polymer auf einem Substrat verankert und mit der Sonde spezifisch oder unspezifisch aufgenommen und anschließend durch den Rückzug der Sonde gedehnt. Anders als bei der Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen kann man zumeist auf eine besondere Vorbehandlung der Tastspitze verzichten, da die interessierenden Kräfte meist kleiner sind als bei Bindungsbrüchen.<sup>[45, 99, 100]</sup>

Aussagefähige, statistisch signifikante Ergebnisse erhält man erst, wenn viele Messkurven an einzelnen Molekülen aufgenommen werden. Um entscheiden zu können, ob ein Effekt reproduzierbar ist oder ein Artefakt vorliegt, sind häufig langwierige Messreihen nötig. Kombiniert man Daten aus dem Experiment mit passenden Modellen und Computersimulationen, dann lässt sich eine ganze Reihe mikroskopischer Parameter bestimmen. Hierzu gehören mechanische Größen wie die Elastizität eines Moleküls und thermodynamische Parameter wie die Energieschwelle zwischen unterschiedlichen Molekülkonformationen. Auch können konformative Änderungen im Molekülgerüst detektiert werden. Dieser Abschnitt beginnt mit einer allgemeinen Diskussion mehrerer Polymermodelle.<sup>[101]</sup>

### 5.1. Thermodynamik von Polymeren

Schon eine einzelne Polymerkette mit einigen hundert bis vielen tausend Monomereinheiten muss angesichts der großen Zahl an Freiheitsgraden nach Methoden der statistischen Physik beschrieben werden. Da im Experiment meistens von einem Polymer ausgegangen wird, das in einem flüssigen Medium gelöst ist, kann man die Umgebung als Wärmebad auffassen. Somit finden alle Vorgänge bei konstanter Temperatur *T* statt – das Polymermolekül lässt sich als kanonisches Ensemble beschreiben. Wie reagiert ein solches Molekül auf den Zug des Kraftmikroskops? Konkret gefragt: Welche Kräfte treten dabei auf?

Wird ein langes Molekül gestreckt, sind zwei Phänomene von Bedeutung, die beide einer Dehnung der Kette entgegenwirken.<sup>[102, 103]</sup> Zunächst, bei kleinen Auslenkungen, dominieren entropische Effekte. Insbesondere wenn das Polymer im ungestörten Zustand als Zufallsknäuel vorliegt, ist es durch die Brown'sche Molekularbewegung einer ständigen Fluktuation unterworfen. Tatsächlich treten bei jedem hinreichend langen Molekül solche Schwankungen auf. Ein Beispiel dafür ist die DNA. Sie ist relativ starr und kann auf einer Längenskala unterhalb von 0.05 µm als gerade angesehen werden.<sup>[102, 104]</sup> Im Experiment werden jedoch meist DNA-Bruchstücke verwendet, die mehrere Mikrometer lang sind.<sup>[105, 106, 108]</sup> Über solche Dimensionen betrachtet verhält sich DNA wie ein Zufallsknäuel, bei dessen Auseinanderziehen die Zahl der Konformationen, die das Molekül einnehmen kann, drastisch eingeschränkt wird. Dieser Verlust an Konformationsentropie spiegelt sich in der „entropischen Elastizität“ wider.<sup>[102]</sup>

Erst große Auslenkungen verspannen das Molekülrückgrat, wobei Bindungen entlang der Zugrichtung belastet werden. Dann spricht man von „enthalpischer Elastizität“.<sup>[102, 107]</sup> Konkret können Bindungswinkel verbogen<sup>[45]</sup> und unter anderem Salz- sowie intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden.<sup>[99, 108]</sup> Solche Vorgänge führen letztlich zu einer Konformationsänderung des gesamten Moleküls.<sup>[108]</sup> Ein Beispiel dafür ist der Übergang von DNA aus der *B*- in die überdehnte *S*-Form.<sup>[102, 106, 108]</sup> Auch einige Polysaccharide wechseln ihre Konformation, wenn sie großen Zugkräften ausgesetzt sind.<sup>[45, 99, 109, 110]</sup>

Kraft-Abstands-Kurven von Polymeren können bei unterschiedlichen Randbedingungen gemessen werden. Zum einen kann die Länge des Moleküls konstant gehalten werden und die Kraft gemessen werden, die notwendig ist, um die Länge zu halten. Dieser Vorgang ist vom thermodynamischen Gesichtspunkt ein isotherm-isochorer Prozess, wenn man das Volumen mit der Länge gleichsetzt und den Druck mit der Kraft. Zum anderen kann bei gegebener Kraft die Länge des Moleküls gemessen werden. Dies ist ein isotherm-isobarer Prozess.<sup>[111]</sup>

Unabhängig vom genauen mikroskopischen Mechanismus gilt für die Kraft  $F$ , mit der ein Polymer auf eine Streckung in  $x$ -Richtung reagiert, bei einem isotherm-isochoren Prozess Gleichung (10).<sup>[103]</sup> Maßgeblich ist also die Änderung der

$$\begin{aligned} F &= \left( \frac{\partial A}{\partial l} \right)_T = \left( \frac{\partial U}{\partial l} \right)_T - T \left( \frac{\partial S}{\partial l} \right)_T \\ &= -kT \left( \frac{\partial \ln Z_r}{\partial l} \right)_T \end{aligned} \quad (10)$$

freien Helmholtz-Energie  $A$ . Dabei wird die Ableitung unter isothermen Bedingungen betrachtet, angedeutet durch den Index  $T$ .  $Z_r$  ist die konfigurative Zustandssumme einer Kette mit festem Abstand zwischen den Enden. Drückt man die Helmholtz-Energie durch die innere Energie  $U$  und die Entropie  $S$  aus, beschreibt der erste Summand den energetischen Beitrag zur Kraft, der zweite den Einfluss der Entropie.<sup>[103]</sup> Wird ein Molekül gedehnt, dann führt dies im Allgemeinen zur Reduktion der Entropie durch die Einschränkung der möglichen Konfigurationseinstellungen. Die Änderung der inneren Energie spielt bei Streckungen über die Konturlänge des Moleküls eine wichtige Rolle, und zwar wächst die Energie bei der Streckung. Aus beiden Anteilen folgt eine attraktive – positive – Kraft. Im rein entropischen Bereich bleibt von der rechten Seite von Gleichung (10) nur noch der zweite Summand übrig.<sup>[102]</sup> Es lässt sich zeigen, dass in diesem Fall die Kraft direkt proportional zur Temperatur ist.<sup>[103]</sup>

## 5.2. Polymermodelle der statistischen Mechanik

Wie sieht die Funktion  $F(x)$  konkret aus, also jene Messgröße, die bei einer Kraft-Abstands-Kurve direkt bestimmt werden kann? Möchte man  $F(x)$  analytisch berechnen, ist eine mathematische Modellierung des realen Moleküls nötig (Abbildung 14). Aus der großen Zahl an Modellen<sup>[103, 112–116]</sup> (Tabelle 2) haben sich zwei Ansätze besonders bewährt: die freigelenkige und die wurmartige Kette. Zunächst wird das Modell der Gauß-Kette behandelt. Die resultierenden Kraftgesetze sind in Abbildung 15 zusammengefasst.

### 5.2.1. Die Gauß-Kette (GC)

Geht man von einem Zufallsknäuel aus, lässt sich die Konformation eines Polymerfadens mit Hilfe des Random-Walk-Ansatzes beschreiben.<sup>[117, 118]</sup> Die zugrunde liegende Verteilungsfunktion<sup>[119]</sup> ist dann gaußförmig;<sup>[102, 103, 112–114]</sup> dies

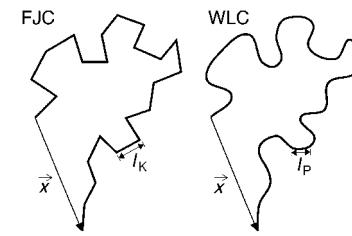


Abbildung 14. Schematische Darstellung von Polymermodellen. Die freigelenkige Kette (freely jointed chain, FJC) besteht aus  $n$  starren Segmenten (der Kuhn-Länge  $l_K$ ), die über frei drehbare Gelenke aneinander gekoppelt sind. Ersetzt man diese Kettenglieder durch elastische Federn (Federkonstante  $\kappa$ ), lassen sich enthalpische Effekte berücksichtigen (FJC<sup>+</sup>). Zum Vergleich ist die wurmartige Kette (wormlike chain, WLC) abgebildet, d.h. die Beschreibung des Polymers als unregelmäßig gekrümmte Faser, die jedoch auf der Skala der Persistenzlänge  $l_P$  gerade erscheint. Mit der Einführung einer spezifischen Steifigkeit  $\Phi$  wird das Rückgrat der Kette dehnbar (WLC<sup>+</sup>). Der Abstandsvektor  $\vec{x}$  verbindet Anfang und Ende der Polymerkette.

Tabelle 2. Elastizitätsmodelle für Polymere.

Modell	Kraftgesetz	Fit-Parameter
freigelenkige Kette nichtdehnbar (FJC)	$x(F) = L \left[ \coth \left( \frac{Fl_K}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fl_K} \right]$	$l_x$
dehnbar (FJC <sup>+</sup> )	$x(F) = L \left[ \coth \left( \frac{Fl_K}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fl_K} \right] \left( 1 + \frac{F}{\kappa L} \right)$	$l_K, \kappa$
wurmartige Kette nichtdehnbar (WLC)	$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right]$	$l_p$
dehnbar (WLC <sup>+</sup> )	$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L + \Phi} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{F}{\Phi} - \frac{1}{4} \right]$	$l_p, \Phi$

gilt unabhängig von der tatsächlichen Struktur des Moleküls. Beim Auseinanderziehen des Knäuels bleibt der Random-Walk-Charakter erhalten, sofern die Zugstrecke  $x$  viel kleiner ist als die Konturlänge  $L$  des Moleküls. Die Konturlänge ist die Länge des vollkommen gestreckten Polymers ohne Dehnung seines molekularen Rückgrats.<sup>[100, 113, 120]</sup> Bei der Kraftspektroskopie koppelt die Messspitze in der Regel rein zufällig an das Molekül, d.h., sie bindet nicht zwangsläufig an ein Ende des Polymerstrangs.<sup>[99]</sup> Deswegen steht  $L$  für jenen Längenabschnitt des Moleküls, der sich überhaupt strecken lässt, und nicht für die Gesamtlänge des Polymerfadens.<sup>[121]</sup> Die Variable  $x$  bezeichnet den Abstand zwischen Spitze und Substrat. Unter der Voraussetzung  $x \ll L$  ergibt sich für die Abstandscharakteristik der Kraft Gleichung (11). Der Verlauf ist linear in  $x$ , d.h., ein Polymer verhält sich nach dem Gauß-Modell wie eine elastische Feder. Dabei ist  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $l_K$  die Kuhn-Länge – ein empirisches Maß für die Steifigkeit des Moleküls.

$$F(x) = 3 \frac{k_B T x}{l_K L} \quad (11)$$

### 5.2.2. Die freigelenkige Kette

Bei größerer Streckung richten sich die Kettenabschnitte nicht mehr mit gleicher Wahrscheinlichkeit in alle Raumrichtungen aus. Da sich das Molekül bevorzugt entlang der äußeren Kraft orientiert, sind die Voraussetzungen für einen

Random Walk nicht mehr gegeben. Eine solche Situation lässt sich mit dem FJC-Modell beschreiben. Hier wird das Polymer in  $n$  starre Segmente der Länge  $l_K$  unterteilt, die über frei bewegliche Gelenke miteinander verbunden sind (Abbildung 14).

Die Theorie liefert für die Streckung als Funktion der Zugkraft  $F$  den Ausdruck (12). Dabei ist  $\mathbf{L}$  die Langevin-

$$x(F) = L[\coth\left(\frac{Fl_K}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{Fl_K}] = L \mathbf{L}\left(\frac{Fl_K}{k_B T}\right) \quad (12)$$

Funktion,<sup>[122]</sup> und für die Konturlänge gilt  $L = nl_K$ . Im Grenzfall großer  $n$  lässt sich Gleichung (12)<sup>[123]</sup> in Form von Gleichung (13) schreiben.  $\mathbf{L}^{-1}$  bezeichnet hier die inverse Langevin-Funktion.<sup>[124]</sup> Bei kleinen Auslenkungen ( $x \ll L$ ) folgt das Verhalten weiterhin dem Hooke-Gesetz.<sup>[125]</sup> Für große Auslenkungen ( $x < L$ ) ist der Verlauf jedoch nicht-linear (Abbildung 15).

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_K} \mathbf{L}^{-1}\left(\frac{x}{L}\right) \quad (13)$$

Da sich die einzelnen Glieder der Polymerkette unabhängig voneinander orientieren können, beschreibt das FJC-

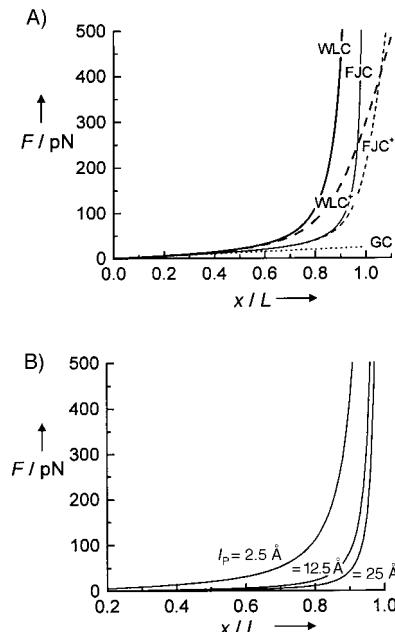


Abbildung 15. A) Vergleich der Kraftgesetze verschiedener Polymermodelle: die Gauß-Kette (GC), die freigelenkige Kette (FJC), die wurmartige Kette (WLC) sowie die enthalpischen Erweiterungen FJC<sup>+</sup> und WLC<sup>+</sup>. Die signifikante Biegefestigkeit des WLC-Polymers führt dazu, dass eine messbare Rückstellkraft deutlich früher einsetzt als beim FJC-Modell. Da sich die Segmente des FJC-Polymers unabhängig voneinander ausrichten können, ist diese Kette besonders flexibel – beim Entwinden des Zufallsknäuels werden vorhandene Schleifen des Polymerstrangs fast ohne Aufwand gerade gezogen. Schließen die Modelle eine endliche Steifigkeit des Polymers ein, so führt dies zu einem langsameren Anstieg der Kraft bei großen Auslenkungen. Dies ist eine Folge der Elastizität der Kette, die nun über die Konturlänge hinaus dehnbar ist. Modellparameter:  $T = 293.15 \text{ K}$ ,  $l_K = 5 \text{ \AA}$ ,  $l_p = 2.5 \text{ \AA}$ ,  $\kappa = 50 \text{ Nm}^{-1}$ ,  $\Phi = 2500 \text{ pN}$ . B) Kraft-Abstands-Kurve gemäß dem WLC-Modell. Mit Zunahme der Persistenzlänge  $l_p$  lässt sich die Kette leichter strecken (geringere Rückstellkraft bei gleicher Auslenkung). Die Tendenz sich zu knäulen ist reduziert, und daher wird es einfacher, das Polymer gerade zu ziehen. Man beachte, dass das WLC-Polymer nicht über die Konturlänge hinaus gestreckt werden kann.

Modell flexible Moleküle besonders gut. Beispiele hierfür sind Oligonukleotide,<sup>[24]</sup> Polydimethylsiloxan<sup>[126]</sup> und Polymethacrylat<sup>[116]</sup> (Tabelle 3).

Tabelle 3. Mechanische Parameter verschiedener Moleküle nach dem FJC-Modell.

Polymer	Kuhn-Länge [Å]
Polyinosin <sup>[24]</sup> in wässriger Lösung	3.0
Polydimethylsiloxan <sup>[126]</sup> in Heptan	2.5 ± 0.4
Polymethacrylsäure <sup>[116]</sup> in wässriger Lösung	3.3 ± 0.5

### 5.2.3. Ein erweitertes FJC-Modell: Kombination von entropischer und enthalpischer Elastizität

Wie die Form der Kraftgesetze andeutet, berücksichtigen Gauß-Kette und FJC-Modell ausschließlich entropische Effekte (siehe Abschnitt 5.1). Weil elastische Verformungen vernachlässigt werden, lässt sich die Polymerkette nicht über die Konturlänge hinaus strecken – ein Zustand, der dann erreicht wird, wenn alle Kettenglieder kollinear in eine Richtung zeigen. Bei großen Auslenkungen verhält sich das Molekül nicht wie eine ideale Feder, der Gauß-Ansatz ist also ungültig. Das gleiche gilt für das FJC-Modell, da nach Gleichung (13) die Kraft für  $x = L$  divergiert. Ein solches Molekül wäre unendlich starr. Das ist nicht realistisch, denn bei genügend großer Zugkraft werden Bindungswinkel verändert und Bindungslängen gedehnt, das molekulare Gerüst also insgesamt gestreckt. Eine exakte Beschreibung dieses Vorgangs sollte intramolekulare Potentiale und die konkrete Struktur des Polymers berücksichtigen. In aller Regel ist man dann auf eine Computersimulation angewiesen.<sup>[45]</sup> Mit einem phänomenologischen Ansatz geht es einfacher: Modelliert man das Polymer durch  $n$  identische, elastische Federn, die hintereinandergeschaltet sind, dann lässt sich das FJC-Modell gemäß Gleichung (14) erweitern<sup>[108]</sup>. Dabei ist  $\kappa$  die Feder-

$$x(F) = L \mathbf{L}\left(\frac{Fl_K}{k_B T}\right) \left(1 + \frac{F}{\kappa L}\right) \quad (14)$$

konstante eines Kettengliedes, ein Parameter, der sich mit der Kraftspektroskopie direkt bestimmen lässt. Typische Werte für reale Polymere liegen oberhalb von  $1 \text{ Nm}^{-1}$ . Zum Vergleich: Die Federkonstante eines Kraftmikroskop-Sensors beträgt  $0.1 – 0.01 \text{ Nm}^{-1}$ . Der Zusatzterm in Gleichung (14) bewirkt bei großen Auslenkungen ( $x \sim L$ ) einen linearen Anstieg der Kraft, da die Kette elastisch nachgibt. In Abbildung 15 wird deutlich, dass es nun möglich ist, das Polymer über die Konturlänge hinauszustrecken.

Dieses erweiterte FJC-Modell (FJC<sup>+</sup>) hat sich zur Beschreibung von sehr unterschiedlichen Molekültypen als sinnvoll erwiesen (siehe Tabelle 4 und 6). Hierzu gehören diverse Biopolymere, darunter Polysaccharide<sup>[110]</sup> und Ligand-Rezeptor-Komplexe,<sup>[127]</sup> aber auch synthetische Polymere wie Polystyrol<sup>[128]</sup> und Polyvinylalkohol<sup>[129]</sup> (Tabelle 4).

### 5.2.4. Die wurmartige Kette

Betrachtet man ein Polymer als homogenen Faden konstanter Biegefestigkeit, führt dies zum Modell von Kratky und

Tabelle 4. Mechanische Parameter verschiedener Moleküle nach dem erweiterten FJC-Modell ( $FJC^+$ ).

Polymer	Kuhn-Länge [Å]	Segment-elastizität [ $N\text{ m}^{-1}$ ]
Polystyrol <sup>[128]</sup> in Toluol	12.2	2.1
Polyvinylalkohol <sup>[129]</sup> in wässriger Lösung	6.2	17
Polyethylenglycol <sup>[100]</sup> in Hexadecan	7	150
P-Selectin/PSGL-1 <sup>[127]</sup> in wässriger Lösung	7 ± 1	0.8 ± 0.2

Porod.<sup>[130]</sup> Da sich die Konformation des Moleküls durch eine kontinuierliche Raumkurve beschreiben lässt, spricht man auch von der wurmartigen Kette. Obwohl in diesem Ansatz entropische *und* enthalpische Beiträge einfließen,<sup>[109]</sup> ist die Zuglänge auf die Konturlänge begrenzt.<sup>[131]</sup> Zur Beschreibung der Kraft-Abstands-Charakteristik<sup>[132]</sup> liefert Näherungsformel (15)<sup>[105, 133]</sup> hinreichend genaue Ergebnisse im Kraftbereich bis zu einigen 100 pN. Ähnlich wie die Kuhn-Länge ist

$$F(x) = \frac{(k_B T)^2}{B} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right] = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right] \quad (15)$$

auch die Persistenzlänge  $l_p$  ein Maß für die Flexibilität des Moleküls.  $B$  bezeichnet das Biegemodul des Polymerstrangs.<sup>[134]</sup> Auf der Skala der Persistenzlänge bleibt die Ausrichtung der Kette erhalten, unterhalb der Persistenzlänge erscheint das Polymer linear.<sup>[135]</sup> Anders ausgedrückt: Je größer die Persistenzlänge, desto stärker hat das Molekül die Tendenz, sich *nicht* zu knäueln. Streng genommen ist die Persistenzlänge abhängig von der angelegten Kraft.<sup>[109, 136–138]</sup> So lässt sich das Verhalten rekombinanter Titinfragmente bei kleinen Kräften mit einer Persistenzlänge von 8 Å beschreiben, während oberhalb von 50 pN eine Persistenzlänge von 4 Å angemessen ist (siehe Tabelle 7). Die WLC-Theorie hat sich sowohl bei DNA und Polymethacrylat bewährt als auch bei Muskel- und Adhäsionsproteinen (Tabelle 5). Für sehr kleine Auslenkungen ( $x \ll L$ ) verwischt der Unterschied zwischen WLC- und FJC-Modell, denn die Verteilungsfunktion des End-zu-End-Abstands des Moleküls ist gaußförmig. Somit hängen (bei geringen Kräften) Kuhn- und Persistenzlänge auf einfache Weise zusammen:  $l_K = 2l_p$ .<sup>[139]</sup>

Tabelle 5. Mechanische Parameter verschiedener Moleküle nach dem WLC-Modell.

Polymer	Persistenzlänge [Å]
Polydimethylsiloxan <sup>[126]</sup> in Heptan	2.3 ± 0.2
Polymethacrylsäure <sup>[116]</sup> in wässriger Lösung	2.8 ± 0.5
Proteoglycan <sup>[30]</sup> in wässriger Lösung	4.8

Die beschriebenen Modelle sind unabhängig vom molekularen Aufbau des betrachteten Polymers. Das WLC-Modell geht sogar von einem Kontinuum ohne Feinstruktur aus. Deshalb ist für gewöhnlich kein einfacher Zusammenhang zwischen den Modellparametern  $l_p$  und  $l_K$  und realen Strukturgrößen wie Bindungslängen oder der Länge einer Monomereinheit gegeben. Im Fall der DNA beträgt  $l_p$  etwa 500 Å und ist somit um ein Vielfaches größer als die Ganghöhe der Doppelhelix (34 Å) oder der Durchmesser des Moleküls (25 Å). Dagegen liegen bei Dextran – einem Polysaccharid – Kuhn-Länge (ca. 4.4 Å) und Monomerlänge (ca. 5 Å) sehr

dicht beieinander.<sup>[110]</sup> Da die Struktur eines Polymers vom Medium abhängt, in dem es gelöst ist, gilt dies ebenfalls für Kuhn- und Persistenzlänge. Welcher Ansatz zur Beschreibung der Messdaten am besten geeignet ist, muss im Einzelfall empirisch entschieden werden. Die Modellparameter sind entsprechend anzupassen.

### 5.2.5. Ein erweitertes WLC-Modell: enthalpische Dehnung

Möchte man neben der Biege- auch die Dehnungselastizität der wurmartigen Kette berücksichtigen, muss das WLC-Modell erweitert werden [Gl. (16)]. Der Parameter  $\Phi$  ist die spezifische Steifigkeit des Polymers.<sup>[140]</sup> Mit Gleichung (16) lässt sich beispielsweise das Verhalten von DNA bei höheren Kräften besser beschreiben als mit dem klassischen WLC-Modell.<sup>[141]</sup>

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L} + \frac{F}{\Phi} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{F}{\Phi} - \frac{1}{4} \right] \quad (16)$$

### 5.2.6. Polymere mit modularer Substruktur: ein Zweizustandsmodell

Kraftinduzierte Konformationsübergänge sind meist mit einer Änderung der Molekülrückgratlänge verbunden. Spontan findet ein solcher Strukturwechsel nicht statt, da er energetisch ungünstig ist. Ohne äußere Kraft liegt das Polymer also im Grundzustand vor. Am Beispiel der Moleküle Titin, Tenascin und Spectrin konnte jedoch gezeigt werden, dass eine externe Kraft zu einer sukzessiven Entfaltung von Proteindomänen führt. Dabei gehen die Untereinheiten des Moleküls nacheinander von einer gefalteten (der Länge  $l_1$ ) in eine gestreckte Konformation (der Länge  $l_2$ ) über.

Geht man vom FJC-Modell aus, bleibt beim Strecken des Polymers die Gesamtzahl der  $n$  Untereinheiten zwar konstant, doch kann nun jedes der Segmente (unabhängig voneinander) im Zustand 1 oder im Zustand 2 vorliegen (Abbildung 16):  $n = n_1(F) + n_2(F)$ .<sup>[106]</sup> Damit wird die Konturlänge zu einer Funktion der angelegten Kraft:  $L(F) = n_1(F)l_1 + n_2(F)l_2$ . Sind die Messkurven reversibel (d.h., tritt keine Hysterese auf), dann befindet sich das Gesamtsystem im thermodynamischen Gleichgewicht. Der Strukturwechsel findet schnell statt, auf einer Zeitskala deutlich unterhalb des experimentellen Zeitfensters (typischerweise im Sekundenbereich). Eine Behandlung der Reaktionskinetik ist in diesem Fall nicht erforderlich, da der Endzustand – das thermodynamische Gleichgewicht – quasi sofort erreicht wird. Für die Verteilung der Zustände gilt deshalb:  $n_2/n_1 = \exp(-\Delta G(F)/k_B T)$ . Die Energie  $\Delta G$  ist abhängig von der äußeren Kraft, die eine kontinuierliche Reduktion der Barriere für den Konformationsübergang bewirkt:  $\Delta G(F) = (E_2 - E_1) + F(l_2 - l_1)$ . Im Fall des erweiterten FJC-Modells [Gl. (14)] führt dieser Ansatz zum Aus-

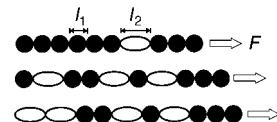


Abbildung 16. Ausschnitt einer Polymerkette, deren Untereinheiten in zwei Zuständen unterschiedlicher Länge ( $l_1$  und  $l_2$ ) vorliegen können. Eine äußere Kraft  $F$  begünstigt den Übergang vom Zustand 1 in den gestreckten Zustand 2. Diese Konformationsänderung geschieht rein zufällig entlang der Kette.

druck (17). Als relevante Längenskala tritt abermals die Konturlänge auf:  $n = L/l_K$  bei  $F=0$ .

$$\begin{aligned} x(F) &= L(F) \mathbf{L} \left( \frac{Fl_K}{k_B T} \right) \left( 1 + \frac{F}{\kappa L} \right) \quad (17) \\ &= \frac{L}{l_K} \left( \frac{l_1}{\exp(-\Delta G(F)/k_B T) + 1} + \frac{l_2}{\exp(+\Delta G(F)/k_B T) + 1} \right) \mathbf{L} \left( \frac{Fl_K}{k_B T} \right) \left( 1 + \frac{F}{\kappa_L} \right) \end{aligned}$$

Abbildung 17 zeigt am Beispiel von Polyethylenglycol die Anwendbarkeit der Theorie. Bei diesem Polymer lässt sich ein durch Kraft-Einwirkung induzierter reversibler Strukturwechsel in wässriger Lösung nachweisen.<sup>[100]</sup> Mit Hilfe des obigen Ansatzes kann die Energiebarriere zwischen den-

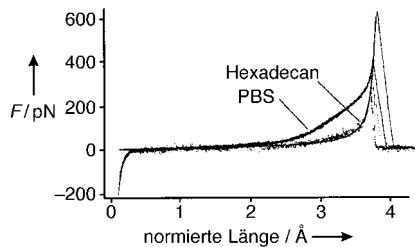


Abbildung 17. Einzelne PEG-Moleküle, gelöst in Hexadecan oder PBS-Puffer, funktionalisierter mit einer Sulfanyl- und einer Butoxygruppe auf einem Goldsubstrat. Dargestellt ist eine Reihe normierter Messkurven (Zugkräfte werden hier positiv gezählt). Entlang der Abszisse ist die relative Auslenkung multipliziert mit der Monomerlänge aufgetragen. Im wässrigen Medium nimmt PEG eine helicale Konformation an, die unter Krafteinwirkung in einen gestreckten Zustand übergeht. Das Dehnungsverhalten bei niedrigen Kräften lässt sich mit dem modularen FJC<sup>+</sup>-Modell [Gl. (17)] gut beschreiben. Dagegen fehlen im organischen Lösungsmittel (Hexadecan) die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, die den helicalen Zustand stabilisieren. Hier ist das enthalpische FJC-Modell angemessen.<sup>[100]</sup>

beiden Zuständen, der all-*trans*- (*ttt*) und der *ttg*-Konformation der Monomere, zu  $E_2 - E_1 = (3.0 \pm 0.3) k_B T$  bestimmt werden. In organischen Lösungsmitteln, wie Hexadecan, sind Wasserstoffbrückenbindungen nicht mehr wirksam, und die PEG-Filamente lassen sich mit dem enthalpischen FJC-Modell (FJC<sup>+</sup>) beschreiben. Dieser Wert für die Energiebarriere liegt in der Größenordnung von quantenmechanisch vorausgesagten. Mit einem ähnlichen Ansatz, jedoch ausgehend vom WLC-Modell, ist es möglich, die Faltungskinetik von Proteinen quantitativ zu analysieren.

In vielen Fällen ist die Streckung der Moleküle ein irreversibler Vorgang, erkennbar an einer ausgeprägten Hysterese zwischen Annäherung und Rückzug. Bei starker Asymmetrie des Potentials, d.h., wenn die Potentialbreite für die Entfaltung viel kleiner ist als die für die Rückfaltung, ergeben sich sehr unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten für den Faltungs- und den Entfaltungsvorgang. Dabei ist z.B. im Fall von Titin, einem Muskelprotein, die Rückfaltung so wenig wahrscheinlich, dass es sich um einen vollständig irreversiblen Vorgang handelt. Die Potentialbreite  $x_u$  der Entfaltung ist sehr klein (0.3 nm), während die der Faltung,  $x_f$ , sehr groß ist (15 nm).<sup>[109]</sup> Beim Anlegen einer äußeren Kraft wird die Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung verschwindend klein, wie aus Abbildung 18 A zu entnehmen ist. Damit hängt die Entfaltungskraft von der Zuggeschwindig-

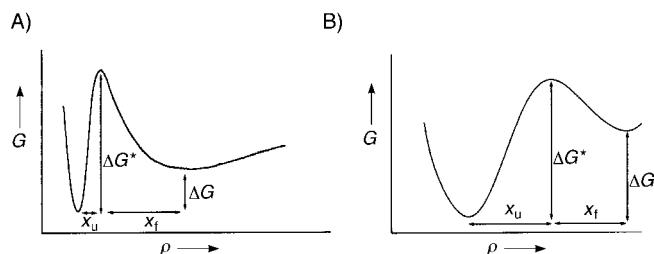


Abbildung 18. Schematische Darstellung des Zweizustandsmodells der Entfaltung von Polymeren. A) Ein asymmetrisches Potential resultiert in einer irreversiblen Entfaltung/Streckung des Polymers (z.B. Titin) im Zeitfenster des Experiments. B) Ein symmetrisches Potential, wie bei Dextranfilamenten, bewirkt eine reversible Konformationsänderung bei den Expansions- und Kompressionszyklen.

keit ab – eine geringere Zuggeschwindigkeit resultiert in geringeren Entfaltungskräften. Dieses Verhalten entspricht dem bei den Bindungsbruchexperimenten mit Ligand-Rezeptor-Paaren.

### 5.2.7. Ein Kriterium für den Nachweis von Einzelmolekülen

Wie bereits angesprochen, ist die Interpretation von Kraft-Abstands-Kurven nicht immer einfach. Bei Experimenten mit Polymeren bleiben häufig mehrere „Filamente“ an der Tastfeder haften, die sich erst mit Zurückziehen der Messsonde nacheinander ablösen. Ähnlich wie bei der Untersuchung spezifischer Wechselwirkungen ist auch in diesem Fall die Statistik aus vielen Messungen ausschlaggebend. Doch wie lässt sich entscheiden, ob es sich bei einem beobachteten Filament tatsächlich um ein individuelles Molekül handelt?

Die beschriebenen Modelle haben eine Gemeinsamkeit: Im Grunde genommen ist die Kraft  $F(x)$  nicht von der Auslenkung  $x$ , sondern vom Quotienten  $x/L$  abhängig. Es scheint einleuchtend, dass die Elastizität eines unverzweigten Polymers mit dessen Länge skaliert. Je größer die Konturlänge, desto weicher sollte das Molekül sein. Folglich werden zwei Polymere der gleichen chemischen Substanz, aber verschiedener Länge auch unterschiedliche Dehnungskurven aufweisen. Dennoch sind die intrinsischen Eigenschaften (parametrisiert durch  $l_K$ ,  $\kappa$ ,  $\Phi$  oder  $l_p$  usw.) unabhängig von der Länge des jeweiligen Moleküls. Demgemäß lassen sich unterschiedlich lange Polymere der gleichen Sorte durch eine gemeinsame Kurve  $F(x/L)$  beschreiben. In dieser Darstellung wird die gemessene Kraft  $F$  über die normierte Auslenkung  $x/L$  aufgetragen (Abbildung 19). Die Kraft-Abstands-Kurven von Filamenten unterschiedlicher Länge können auf diese Weise sinnvoll verglichen werden. Eine Übereinstimmung der normierten Kurven ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Messkurven in der Tat monomolekulare Eigenschaften widerspiegeln.

Diese Vorgehensweise erfordert die Bestimmung der Konturlänge  $L$  für jedes einzelne Filament, d.h. die Anpassung der Parameter eines Polymermodells an die Messkurven. Weniger aufwändig ist folgende Art der Normierung: Eine gegebene Kraft-Abstands-Kurve des Filaments a,  $F_a(x)$ , wird umgeformt in  $F_a(x/x_a^*)$ , mit der Bedingung:  $F_a(x_a^*) = F^*$ . Prinzipiell kann die Kraft  $F^*$  willkürlich vorgegeben werden.

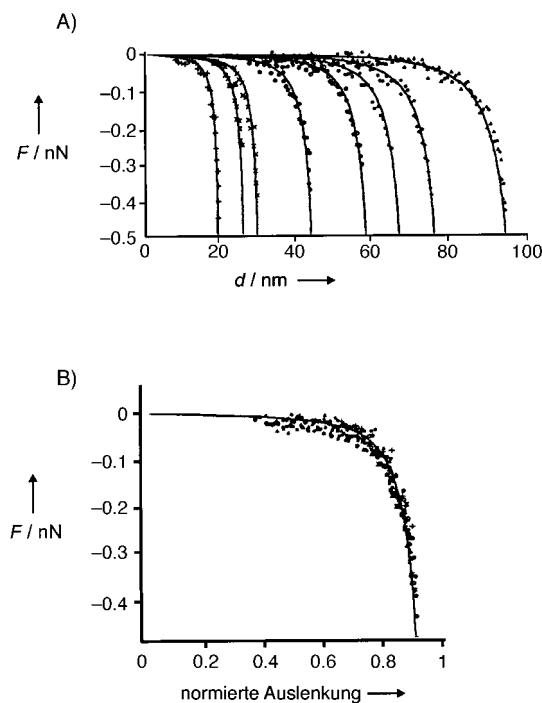


Abbildung 19. A) Kraft-Abstands-Kurven von Polymethacrylat-Filamenten unterschiedlicher Konturlänge mit Kurvenanpassung gemäß dem WLC-Modell. B) Durch die Normierung der Kraftkurven wird deutlich, dass es sich wirklich um Einzelmoleküle einer Klasse handelt. Der Kontaktverlust erfolgt nach einer Streckung auf ca. 90% der Konturlänge.<sup>[116]</sup>

Zweckmäßig ist es jedoch, ihren Wert möglichst groß zu wählen und in den Bereich eines Konformationsübergangs zu legen (sofern ein solcher auftritt). Aus den experimentellen Daten ist dann einzige  $x_a^*$  zu bestimmen. Diese Methode kann nun auf ein Filament b angewendet werden; dabei wird die spezielle Kraft  $F^*$  für alle Filamente gleich gewählt ( $F^* = F_a(x_a^*) = F_b(x_b^*) = \dots$ ). Lassen sich derart normierte Messdaten ( $F_a(x/x_a^*)$ ,  $F_b(x/x_b^*)$ , ...) zu einer gemeinsamen Kurve überlagern, dann gehören die entsprechenden Filamente alle

derselben Klasse an, wobei es sich um sehr definierte supramolekulare Strukturen oder tatsächlich um einzelne Polymermoleküle handeln kann. Diese Form der Normierung ist weitgehend modellunabhängig, Voraussetzung ist lediglich, dass die Kraft von der relativen Auslenkung  $x/L$  abhängt.<sup>[142]</sup>

Die Bestimmung molekularer Kräfte auf dem Niveau von Einzelmolekülen birgt eine Reihe von Schwierigkeiten. Neben messtechnischen Hürden wie der zuverlässigen und standardisierten Bestimmung von Federkonstanten der Tastfeder und der begrenzten Zuggeschwindigkeit spielt die Oberflächenchemie sicherlich die wichtigste Rolle beim Auftreten von kontroversen Ergebnissen. So werden in manchen Fällen je nach Derivatisierung der Oberfläche unterschiedliche Bindungskräfte für die gleichen molekularen Bindungsbruchereignisse ermittelt. Auch die Untergrundadhäsion und die wechselnden oder veränderlichen Spitzenradien können einen Einfluss haben. Insbesondere zur Bindungskraft der DNA-Doppelhelix existieren mehrere scheinbar kontroverse Daten. Bei der Bestimmung der Elastizität von Polymeren kann eine Kontamination von Spülze oder Substrat zu irreführenden Ergebnissen führen.

### 5.3. Polysaccharide

Die mechanischen Eigenschaften vieler Polysaccharide lassen sich mit dem erweiterten FJC-Ansatz modellieren. Eine Übersicht der Messungen an unterschiedlichen Molekülen zeigt Tabelle 6.

Experimente mit Dextran, einem Polysaccharid aus  $\alpha 1 \rightarrow 6$ -verknüpften Glucose-Monomeren, zeigen, wie gut sich die Kraftspektroskopie zur Untersuchung molekularmechanischer Prozesse eignet. Typisch für die Dehnung von Dextran ist eine Schulter in der Kraft-Abstands-Kurve.<sup>[45]</sup> Diese wird durch eine reversible Strukturänderung hervorgerufen; das Molekül wird dabei steifer. Amylose, ein Polysaccharid aus  $\alpha 1 \rightarrow 4$ -verknüpften Pyranose-Monomeren, zeigt ein ähnliches Verhalten. Der Kraftbereich unterhalb des Konforma-

Tabelle 6. Molekulare Parameter verschiedener Polysaccharide in wässriger Lösung.  $E_2 - E_1$ : Energiebarriere zwischen zwei Konformationen des Moleküls;  $\Delta x_u$ ,  $\Delta x_f$ : Breite des Potentialbergs für das Entfalten bzw. Falten,  $v$ : Zuggeschwindigkeit.

Polymer	Kuhn-Länge [Å]	Konformationsübergang bei $F^*$ ( $v \approx 1 \mu\text{m s}^{-1}$ )	Segmentelastizität [ $\text{N m}^{-1}$ ]
Dextran <sup>[45, 109]</sup> (nativ)	–	700–850 pN (reversibel) $E_2 - E_1 = 13.2 k_B T$ (C5-C6-Bindungsflip) $\Delta x_u = \Delta x_f = 0.32 \text{ \AA}$	$8 \pm 1 (F < F^*)$ $40 \pm 10 (F > F^*)$
Dextran <sup>[110]</sup> (nativ)	4.4 ( $F < F^*$ ) 5.7 ( $F > F^*$ )	(850 ± 140) pN (reversibel) $E_2 - E_1 = 18.6 k_B T$ (Sessel → Wanne) $\Delta x_u + \Delta x_f = 1.284 \text{ \AA}$	$14.6 \pm 2.7 (F < F^*)$
Dextran <sup>[45]</sup> (carboxymethyliert)	$6 \pm 0.5 (F < F^*)$	250–350 pN (reversibel)	$6.7 (F < F^*)$ 17 ( $F > F^*$ )
Dextran <sup>[110]</sup> (Periodat-Oxidation)	$2 \pm 0.26$	–	$34.2 \pm 8.3$
Amylose <sup>[110, 152]</sup> (nativ)	4.5 ( $F < F^*$ ) 5.4 ( $F > F^*$ )	(275 ± 45) pN (reversibel) $E_2 - E_1 = 7.7 k_B T$ (Sessel → Wanne) $\Delta x_u + \Delta x_f = 0.44 \text{ \AA}$	$5.6 \pm 0.8 (F < F^*)$
Amylose <sup>[110]</sup> (Periodat-Oxidation)	$1.8 \pm 0.25$	–	$34 \pm 7.3$
Pullulan <sup>[110]</sup> (nativ)	4.5	–	$10.2 \pm 0.93$
Pullulan <sup>[110]</sup> (Periodat-Oxidation)	$2 \pm 0.15$	–	$47.8 \pm 5$
Xanthan <sup>[99]</sup> (nativ)	–	400 pN (irreversibel)	$5 \pm 0.5$
Xanthan <sup>[99]</sup> (denaturiert)	–	–	$5 \pm 0.5$
Cellulose <sup>[99]</sup> (carboxymethyliert)	–	–	$5 \pm 0.5$

tionsübergangs wird vom erweiterten FJC-Modell gut wiedergegeben (Tabelle 6). Die gesamte Dehnungscharakteristik von Dextran kann anhand von Monte-Carlo-Simulationen sehr genau reproduziert werden, außerdem lassen sich die Gleichgewichtskonstante  $K$  und die zugehörige Energiebarriere für den Konformationsübergang (Abbildung 18 B) bestimmen:  $E_2 - E_1 = 13.2 k_B T = k_B T \ln K$ .<sup>[109]</sup>

Was geschieht während dieses erzwungenen Konformationswechsels auf mikroskopischer Ebene? Moleküldynamiksimulationen weisen auf eine Deformation im Bereich der O-glykosidischen Bindung hin. Jedes Glucose-Monomer erfährt dabei einen Längenzuwachs um 0.6 Å, das sind ca. 10 %. Dadurch kommt das „Plateau“ in der Messkurve zustande, bei dem sich die Polymerkette ausdehnt, die Kraft jedoch nur langsam ansteigt (Abbildung 20). Dieser Vorgang ist vollständig reversibel: Bei Entlastung des Moleküls nehmen die entsprechenden Bindungswinkel wieder ihre Ausgangswerte an.

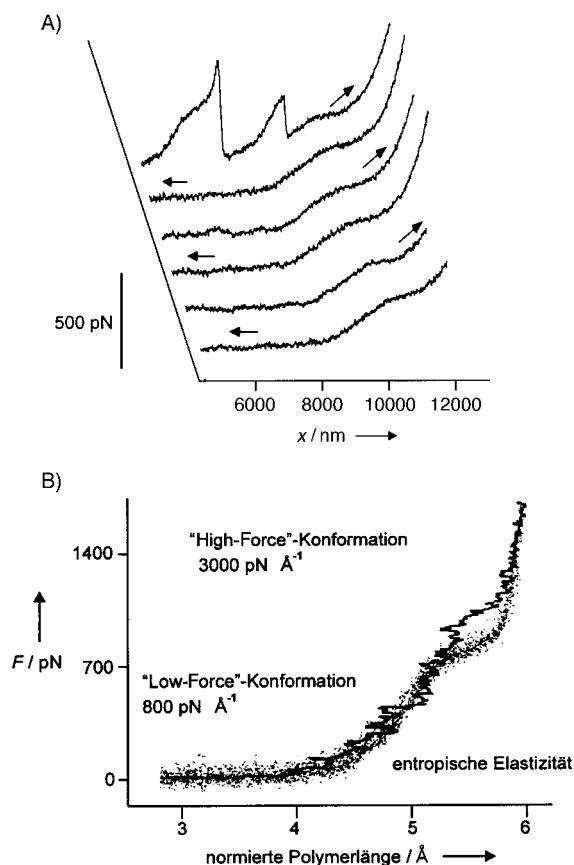


Abbildung 20. A) Aufeinander folgende Kraftmessungen an carboxymethyliertem Dextran. Bei der ersten Kurve reißen zunächst zwei kurzketige Moleküle ab. Das verbleibende Molekül kann danach mehrfach gestreckt und wieder entspannt werden, ohne dass der Kontakt verloren geht. Die charakteristische „Schulter“ bei einer Kraft von etwa 300 pN markiert einen Konformationsübergang der Polysaccharatkette. Hintereinander aufgezeichnete Messkurven sind deckungsgleich. Dies zeigt, dass der Strukturwechsel im thermodynamischen Gleichgewicht erfolgt (Zuggeschwindigkeit ca.  $1 \mu\text{ms}^{-1}$ ,  $x$  = Dehnung der Polymerkette). B) In der normierten Darstellung kommt der Einzelmolekülcharakter nativer Dextranfilamente zum Vorschein, die Kurven zeigen alle denselben Verlauf ( $x/L$  wurde hier mit der Länge eines Dextran-Monomers multipliziert). Der Strukturübergang tritt bei etwa 700 pN auf. Die dunkle Kurve ist das Ergebnis einer Moleküldynamikrechnung.<sup>[6, 45, 110]</sup>

Bei diesem Konformationsübergang scheint die Konformation der monomeren Pyranose eine entscheidende Rolle zu spielen. Diskutiert wird ein *trans-gauche*-Übergang der O-glykosidischen Bindung beim  $\alpha 1 \rightarrow 6$ -glycosidischen Dextran und ein Übergang von der Sessel- in eine gestreckte Wannenkonformation<sup>[143]</sup> bei der  $\alpha 1 \rightarrow 4$ -verknüpften Amylose, um die Streckung des Moleküls zu kompensieren. So zeigen Ab-initio-Rechnungen, dass durch die Krafteinwirkung der Wechsel von einer Sessel- in eine energetisch ungünstige Wannenkonformation erzwungen wird. Die hiermit verbundene Energiebarriere beträgt  $E_2 - E_1 = 18.6 k_B T$ .<sup>[110]</sup> Dieser Wert liegt im Bereich des anfangs erwähnten Monte-Carlo-Resultats (siehe oben).

Nach chemischer Spaltung (Periodat-Oxidation) der Pyranose verschwindet die typische Schulter in der Kraft-Abstands-Kurve, es findet keine Konformationsänderung mehr statt.<sup>[110]</sup> Dextran, Amylose und Pullulan, deren Monomere über unterschiedliche Kohlenstoffatome der Pyranose verknüpft sind, zeigen dann ein nahezu identisches Verhalten (Tabelle 6). Durch das Öffnen des Zuckerringes werden diese Polymere insgesamt steifer. Dieser Befund verdeutlicht den Einfluss der Ringstruktur auf die mechanischen Eigenschaften der Zuckermoleküle.

Ein Beispiel für ein Polysaccharid mit irreversibler Konformationsübergang ist Xanthan<sup>[99]</sup> (Abbildung 21). Im nativen Zustand liegt dieses Polymer in einer helicalen Konformation vor, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen stabilisiert wird. Durch Krafteinwirkung kommt es offenbar

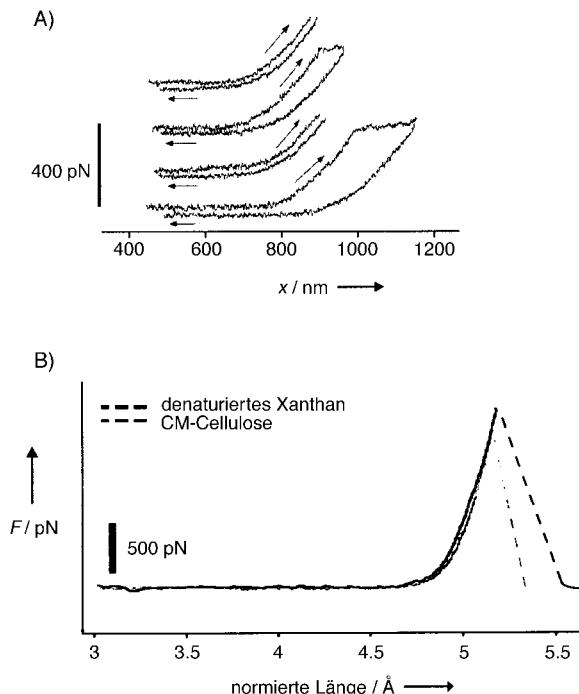


Abbildung 21. A) Mehrere Kraft-Abstands-Kurven von natürlichem Xanthan, direkt nacheinander aufgenommen, ohne Verlust des molekularen Kontakts.<sup>[99]</sup> Die Dehnung  $x$  des Polymers wurde dabei allmählich erhöht, bis bei einer Kraft von etwa 400 pN ein Plateau auftrat. Daran schloss sich eine Hysterese zwischen Hin- und Rückweg an: Auf der Zeitskala des Experiments findet der Konformationsübergang folglich im thermodynamischen Ungleichgewicht statt. B) Denaturiertes Xanthan und Carboxymethylcellulose zeigen nahezu identische Eigenschaften. Die normierte Länge ist hier mit der Länge eines Glucose-Monomers multipliziert.<sup>[99]</sup>

zur Entfaltung der Sekundärstruktur. Denaturiertes Xanthan, das keine helicale Konformation mehr hat, zeigt diesen Konformationsübergang in der Kraft-Abstands-Kurve nicht.<sup>[99]</sup> Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit zu Carboxymethylcellulose, die wie denaturiertes Xanthan ebenfalls ein  $\beta 1 \rightarrow 4$ -Glc-Gerüst aufweist.<sup>[99]</sup>

#### 5.4. Polynucleotide

Wegen ihrer biologischen Relevanz und des komplexen mechanischen Verhaltens ist DNA seit jeher ein beliebtes Objekt von Studien mit der Laserpinzette und anderen Methoden der Mikromanipulation.<sup>[144]</sup> Insbesondere die optische Pinzette – das Molekül wird in einem Laserstrahl eingefangen – ist hier eine etablierte Technik. Aus diesem Grund gibt es auf diesem Gebiet bislang nur wenige Untersuchungen mit dem Kraftmikroskop.<sup>[24, 85, 87]</sup> Ein Vorteil der Kraftspektroskopie ist gewiss, dass hohe Kräfte bis in den Bereich von Nanonewton ausgeübt werden können, was mit den konventionellen Methoden schwierig ist. Ob diese experimentelle Entwicklung zu grundlegend neuen Erkenntnissen führen wird, bleibt abzuwarten. Die meisten Studien mit den herkömmlichen Techniken richten sich auf den Kraftbereich unterhalb von etwa 100 pN – hier finden bereits markante Strukturveränderungen in der DNA statt.<sup>[85, 86, 88, 89, 108]</sup> Tatsache ist außerdem, dass die Kraftspektroskopie erst in jüngerer Zeit die notwendige Empfindlichkeit erreicht hat, um solche Effekte nachzuweisen zu können. Dieser Abschnitt gibt einen allgemeinen Überblick über die Mechanik der DNA und stellt einige neuere Ergebnisse hervor, die mit dem Kraftmikroskop gewonnen wurden.

Die Mechanik der DNA ist nicht nur von akademischem Interesse. In der Zelle müssen aktive Gene zwecks Replikation, Regulation und Transkription zugänglich sein, obwohl die DNA im Allgemeinen auf komplizierte Art gefaltet und verpackt ist. Die mechanischen Eigenschaften dieses Biopolymers sind deshalb von großer biochemischer Bedeutung. Eine isolierte Nucleotidfaser verhält sich wie eine entropische (dehnbare) Kette, die zeigen Kraftmessungen an Polyinosin und Einzelstrang-DNA (ssDNA).

Die Natur von doppelsträngiger DNA (dsDNA) ist, infolge der Substruktur des Moleküls, weitaus komplizierter (siehe die Übersicht von Austin et al.<sup>[102]</sup>). Wegen der Doppelhelixstruktur ist dsDNA ein recht starres Molekül und weniger flexibel als ssDNA. Üblich sind Experimente mit  $\lambda$ -Phagen-DNA. Konformationsänderungen treten hier bei weitaus geringeren Kräften auf als bei den bisher untersuchten Polysacchariden (Abschnitt 5.3), was eine entsprechend empfindliche Instrumentierung erforderlich macht.

Unterhalb von 60 pN beschreibt der (erweiterte) WLC-Ansatz das mechanische Verhalten von DNA am besten. Bei größerer Zugbelastung verändern sich die Eigenschaften aber deutlich. Native dsDNA liegt im Allgemeinen in der *B*-Konformation vor, bei Kräften um 65 pN findet jedoch ein Übergang in die *S*-Form (*S*: stretched) statt. Diese Umwandlung tritt sehr schnell ein, innerhalb eines schmalen Kraftfensters von etwa 5 pN; dies deutet auf einen Prozess von hoher Kooperativität hin. Ab diesem Punkt kann das Molekül

fast auf das Doppelte der Konturlänge gestreckt werden (Abbildung 22).<sup>[85]</sup> Bemerkenswert ist, dass bereits Anfang der fünfziger Jahre über eine solche Eigenschaft der DNA spekuliert wurde, noch bevor es gelang, den genauen Aufbau des Moleküls aufzuschlüsseln.

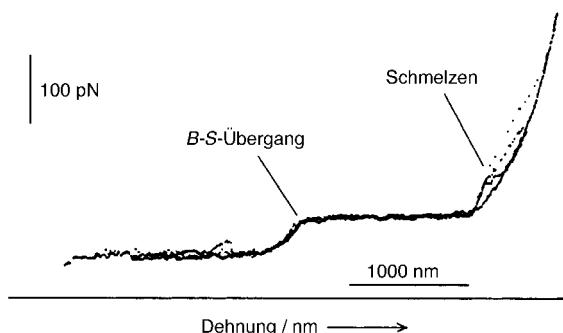


Abbildung 22. Überlagerung mehrerer Dehnungskurven von  $\lambda$ -Phagen-DNA, aufgenommen bei unterschiedlichen Zuggeschwindigkeiten ( $0.15\text{--}3\,\mu\text{m s}^{-1}$ ). Die Konturlänge des Moleküls beträgt etwa 2  $\mu\text{m}$ . Bei 65 pN tritt ein Konformationswechsel von der *B*- in die *S*-Form ein. Danach kann die DNA auf über 3  $\mu\text{m}$  gedehnt werden, ohne dass die Rückstellkraft messbar zunimmt. Ab etwa 150 pN trennen sich die beiden Nucleotidstränge voneinander (Schmelzen). Die Kraft, bei der dieser Vorgang einsetzt, hängt von der Zuggeschwindigkeit ab. Es handelt sich um einen irreversiblen Prozess. Trotz des partiellen Schmelzens der dsDNA (Hysterese) bildet sich bei Entspannung wieder der *B*-Zustand heraus. Dies erkennt man an einer Überlappung von Hin- und Rückweg im Abschnitt unmittelbar vor dem *B*-*S*-Übergang. Selbst nach dem Erreichen des eigentlichen Schmelzübergangs kann dies geschehen; es ist aber nicht zwangsläufig der Fall.<sup>[85]</sup>

In der *S*-Form kommt es möglicherweise zu einer Entspiralisierung der Doppelhelix. Léger et al. konnten zeigen, dass die Lage der Übergangsplateaus vom *B*- in den *S* Zustand von der Änderung der Windungszahl abhängt. Mehrere DNA-Strukturen konnten so charakterisiert werden.<sup>[145]</sup> In der offenen Geometrie der *S*-DNA sind die Basenpaare leichter zugänglich als in der *B*-Form. Daher könnte dieser Zustand physiologisch relevant sein, um den genetischen Code der DNA abzulesen. Noch sind die genaue Struktur und die Ursache der hohen Kooperativität des Übergangs nicht restlos aufgeklärt. Moleküldynamiksimulationen weisen daraufhin, dass im gestreckten Zustand zwei Strukturen möglich sind.<sup>[146]</sup> Anhand von Dehnungskurven ist es schwer, die beiden Konformationen zu unterscheiden, denn hinsichtlich ihrer Deformationsenergie sind sie nahezu identisch. Für den Reaktionsweg ist von Bedeutung, an welchem Strang der Doppelhelix die äußere Kraft ansetzt und ob sich das Molekül während der Streckung frei drehen kann. In einem solchen Fall wird die Helix vollständig entspiralisiert. Ist dagegen eine Rotation um die Helixachse blockiert, verändert sich die Ausrichtung der Basenpaare. Unter Zug werden sie zur Längsachse geneigt (bei der *B*-Konformation stehen sie senkrecht dazu), gleichzeitig nimmt der Helixdurchmesser ab. Es gibt Hinweise, dass zumindest die flache, bandartige Struktur unter physiologischen Bedingungen auftreten kann. Eine solche Konformation könnte durch DNA-bindende Proteine stabilisiert werden.

Zum Schmelzen, d.h. zum Aufbrechen der Doppelhelixstruktur, kommt es erst bei Kräften um ca. 150 pN. Sowohl der

Übergang von der *B*- in die *S*-Konformation als auch der Schmelzprozess sind von der Sequenz der beteiligten Nucleotidstränge abhängig. Duplex-Poly(dA-dT)- und Duplex-Poly(dG-dC)-DNA weisen selbstkomplementäre Basensequenzen auf. Nach dem Schmelzübergang können beim anschließenden Relaxieren Haarnadelstrukturen auftreten, wie sie für RNA typisch sind. Auch solche Konformationen lassen sich mit der Kraftspektroskopie untersuchen. Von Rief et al. stammen Untersuchungen zur Reversibilität der einzelnen Phasenübergänge.<sup>[85]</sup> Dabei zeigte sich, dass der Konformationsübergang von der *B*- in die *S*-Form im Zeitfenster des Experiments (Zuggeschwindigkeiten im Bereich von  $\mu\text{m s}^{-1}$ ) vollständig reversibel ist und die Schwellenkraft nicht von der Zuggeschwindigkeit abhängt. Der Schmelzprozess hingegen ist von der Zuggeschwindigkeit abhängig (Hystereseverhalten), was auf irreversible Vorgänge hinweist.

## 5.5. Polypeptide und Proteine

Viele Proteine sind darauf ausgelegt, mechanischen Belastungen standzuhalten: Actin und Myosin<sup>[147]</sup> steuern die Muskelkontraktion, Bindegewebe und Knorpel verdanken ihre Stabilität Proteinen der extrazellulären Matrix wie Laminin, Kollagen, Vimentin, Fibronectin und Proteoglykanen.<sup>[148]</sup> Einzelne Zellen können sich mittels elastischer Ankerproteine auf ihrer Oberfläche fortbewegen. So ist bekannt, dass Leukozyten – vom Blutstrom vorangetrieben – an Gefäßwänden entlangrollen. Dabei wird der molekulare Kontakt zwischen ihnen und dem Endothel über Proteine vermittelt, die während des Rollvorgangs gestreckt werden. Die Elastizität dieser Moleküle beruht auf ihrer Struktur und auf intramolekularen Wechselwirkungen, die diese stabilisieren. Von Proteinen weiß man, dass es sich mit Ausnahme gelegentlicher Disulfidbrücken in der Regel um nichtkovalente Wechselwirkungen handelt. Besonders wichtig sind Salz- und Wasserstoffbrücken sowie der hydrophobe Effekt. Einzelne Bindungsarten kann die Kraftspektroskopie (noch) nicht unterscheiden. Doch immerhin lassen sich die kollektiven Kräfte messen, die individuelle Proteindomänen in Form halten.

Bisher wurden lineare Muskel- und Adhäsionsproteine, wie Titin (Abbildung 23) und Tenascin, untersucht, die aus globulären Untereinheiten aufgebaut sind. Wird ein solches Molekül gespannt, dann entfalten sich nach und nach die Proteindomänen: die weniger stabilen zuerst, die stabilsten zuletzt. Immer wenn die Tertiärstruktur an einer Stelle unter Krafteinwirkung aufbricht, wächst die Konturlänge des Polypeptids schlagartig an (Abbildung 24B). Weil das Molekül nachgibt, nimmt der Zug an der Tastfeder plötzlich ab. Da sich dieser Vorgang beim Entfalten jeder Proteindomäne wiederholt, zeigt die Kraft-Abstands-Kurve ein auffälliges Sägezahnprofil (Abbildung 24A). Ein solches Verhalten wurde bei mehreren nativen und rekombinanten Proteinen beobachtet, darunter Titin, Tenascin und Spectrin.

Der erzwungene Strukturwechsel ist in hohem Maße kooperativ, und es treten keine Zwischenzustände auf. Deshalb lässt sich der Vorgang, ähnlich wie der Bruch einer Ligand-Rezeptor-Bindung (Abbildung 18) oder die Konfor-

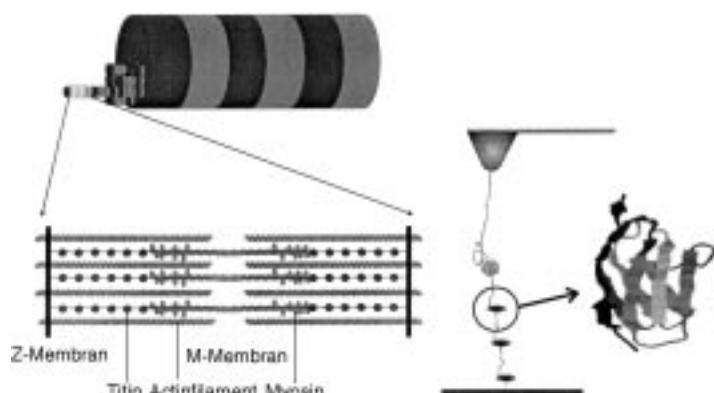


Abbildung 23. Titin, das wohl am besten untersuchte elastische Filament, stammt aus dem Sarkomer der gestreiften Muskulatur und sorgt für die elastische Verankerung und Zentrierung der Myosinfilamente. Titin ist mit 3000 kD eines der größten Proteine überhaupt. Es besteht aus Tandem-Fibronectin-III(FN3)- und strukturell verwandten Immunglobulin(Ig)-Domänen (konstanter Bereich). Die FN3-Domänen bestehen im Wesentlichen aus 98–102 Aminosäuren und bilden aus sieben  $\beta$ -Faltblatt-Peptidketten eine  $\beta$ -Fass-Struktur. Die Ig-Domänen weisen die gleiche Struktur auf. Die elastische Streckung der I-Bande, die im gestreckten Muskel das Vierfache der ursprünglichen Länge beträgt, lässt sich durch reversible Faltung und Entfaltung der FN3- und Ig-Domänen erklären.

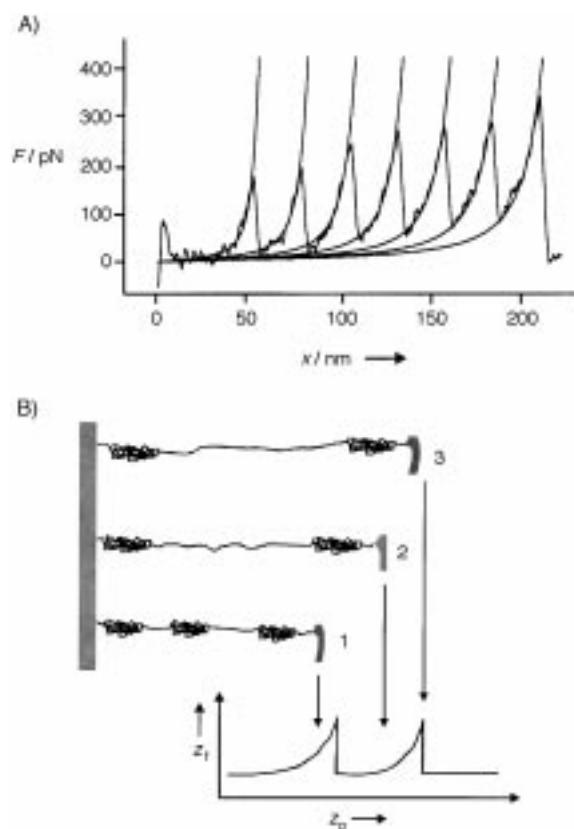


Abbildung 24. A) Kraftinduzierte Konformationsänderung eines rekombinanten Titinfragments. Sieben Ig-Domänen entfalten sich sukzessive, ohne dass sich die Messspitze vom Molekül oder das Molekül vom Substrat löst. Die Teilkurven lassen sich mit dem WLC-Modell beschreiben ( $l_p = 4 \text{ \AA}$ ), wobei die Konturlänge um jeweils  $280 \text{ \AA}$  zunimmt.<sup>[152]</sup> B) Schematische Beschreibung des Prozesses. Der zu einzelnen Domänen aufgewickelte Polypeptidstrang wird nach und nach „entknäult“. Die Tastspitze liest das Molekül auf und spannt es (1). Wenn eine Domäne entfaltet (2), nimmt der Spitze-Probe-Abstand plötzlich zu. Der frei gewordene Polypeptidstrang wird so lange gerade gezogen (2–3), bis die Zugkraft einen Schwellenwert erreicht und eine weitere Domäne „aufbricht“.<sup>[152]</sup>

mationsänderung eines Polysaccharids wie Dextran (Abbildung 20), durch ein Zweizustandsmodell beschreiben. Der physikalische Mechanismus ist stets derselbe: Durch die Zugkraft der Tastspitze wird der Potentialberg, der Faltung und Entfaltung voneinander trennt, abgesenkt, und zwar so weit, dass thermische Fluktuationen den Strukturübergang herbeiführen können. Eine Rückfaltung des Moleküls ist im Titin-Fall nahezu ausgeschlossen, da wegen der starken Asymmetrie des Potentials,  $x_f \gg x_u$ , die Rückfaltungsgeschwindigkeit bei Einwirkung einer externen Zugkraft verschwindend gering ist. Der gestreckte Polypeptidstrang müsste sich gegen den Zug der Tastspitze um eine Länge von über 100 Å wieder zusammenziehen. Somit findet die Konformationsänderung nicht im thermodynamischen Gleichgewicht statt. Zum Vergleich: Die Konformationsänderung bei Dextran entspricht nur einer Dehnung von 0.32 Å, sodass die Umwandlung bei Zugkräften von einigen  $\mu\text{m s}^{-1}$  noch im thermodynamischen Gleichgewicht stattfindet. Für Dehnungsmessungen, die nicht im thermodynamischen Gleichgewicht durchgeführt werden, hat dies folgende Konsequenzen:

1) Auf der Zeitskala des Experiments ist die Rückfaltung des Moleküls sehr langsam. Weil der Endzustand – das thermodynamische Gleichgewicht – nicht augenblicklich erreicht wird, spielt die Kinetik der Reaktion eine Rolle. Folglich ist die Kraft, bei der die Entfaltung stattfindet, von der Zuggeschwindigkeit abhängig (Abbildung 25 A).

2) Hin- und Rückweg der Kraft-Abstands-Kurve sind unterschiedlich (Hysteresis), denn der Strukturwechsel ist auf der Zeitskala des Experiments irreversibel (Abbildung 25 B).

Eine reversible Dehnung und Stauchung wurde beispielsweise für quervernetztes Polylysin bei pH 7 nachgewiesen (Abbildung 26).<sup>[68]</sup> Über einen Zeitraum von einer Minute konnte das Molekül reversibel entspannt und gedehnt werden. Am Ende der Kraftkurve 72 trat eine irreversible Überdehnung auf – die Faser wurde danach weicher (geringere Persistenzlänge). Die komplexe Reaktionskinetik kann mit Hilfe von Computermodellen beschrieben werden. Wird die Simulation an die Messdaten angepasst, lassen sich thermodynamische Parameter des Konformationsübergangs berechnen (Tabelle 7), insbesondere die Breite der Potentialbarriere und die Entfaltungsgeschwindigkeit. Findet der Konformationswechsel im thermodynamischen Gleichgewicht statt, wie es im Zeitfenster des Experiments bei Dextran der Fall ist, lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten nicht getrennt bestimmen.

Da die Kraftspektroskopie selbst geringfügige Variationen in der Zahl der Aminosäuren pro Domäne nachweisen kann, treten grundlegende Unterschiede in der Proteinstruktur umso deutlicher hervor. Dies belegt der Vergleich von Spectrin und Titin. Spectrin ist aus  $\alpha$ -Helixbündeln zusammengesetzt, die Titin-Domänen haben hingegen eine  $\beta$ -Fass-Struktur. Beide Moleküle denaturieren bei ähnlicher Temperatur, d.h., ähnlich sind auch die jeweiligen Aktivierungsenergien der Entfaltung. Dennoch fallen die Entfaltungskräfte von Spectrin viel geringer aus als die von Titin. Der Grund dafür liegt im unterschiedlichen Verlauf des Faltungs-Entfaltungs-Potentials: Bei Spectrin ist die Energiebarriere zwar

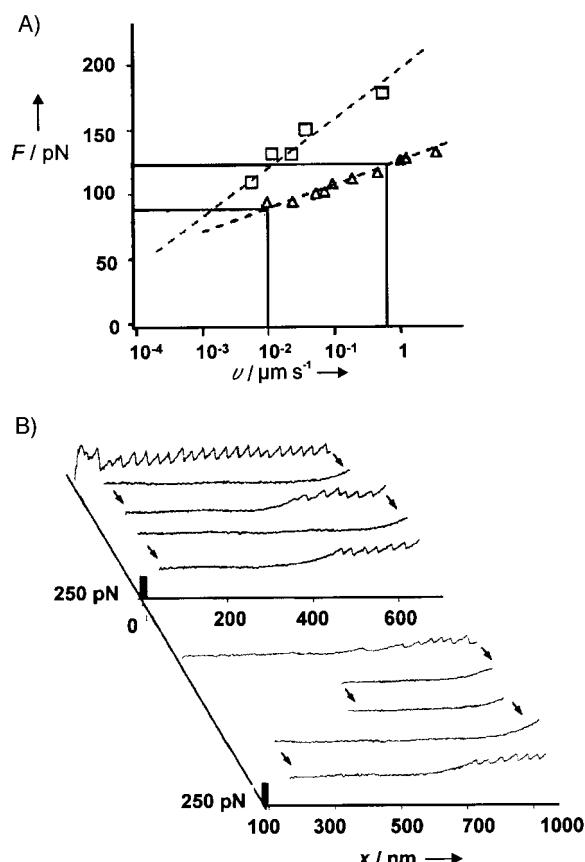


Abbildung 25. A) Entfaltungskraft als Funktion der Zuggeschwindigkeit (halblogarithmische Darstellung). Aufgetragen sind Messwerte für natives Titin ( $\square$ ) und Tenascin-Fibronectin ( $\triangle$ ), ein rekombinantes Protein ähnlicher Struktur. Die gestrichelten Geraden sind die Ergebnisse einer Computersimulation.<sup>[156]</sup> B) Bei aufeinander folgenden Kraftmessungen an Titin sind Hin- und Rückweg verschieden; auf der Zeitskala des Experiments ist der Konformationsübergang demnach irreversibel. Weil die Rückfaltung des Moleküls nur sehr langsam erfolgt, zeigt die erste Dehnungskurve mehr Domänenentfaltungereignisse als die nachfolgenden. Erst bei längerer Wartezeit zwischen Hin- und Rückweg würde sich das anfängliche Sägezahnprofil wieder vollständig zurückbilden. Die angelegte Kraft verhindert die Rückfaltung in die ursprüngliche Molekülstruktur; nur wenn das Molekül entspannt wird, kehrt das Sägezahnprofil wieder.<sup>[152]</sup>

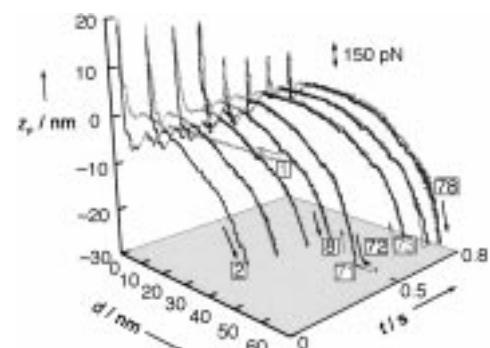


Abbildung 26. Reversible Entfaltungs-Faltungs-Cyclen eines Polylysinmoleküls (goldbedampfte  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Spitze auf Goldsubstrat mit thiolisiertem Poly-L-Lysin, pH 7, Zuggeschwindigkeit  $100 \text{ nm s}^{-1}$ ). Die Zahlen geben die Reihenfolge der Messungen wieder. Eine Überdehnung des Moleküls nach der Aufnahme von 72 Kraft-Abstands-Kurven äußert sich in einer Abnahme der Kettensteifigkeit. Das Polylysin wurde mit Iminothiolan derivatisiert, um ein gute Haftung der Moleküle auf dem Gold zu erzielen.<sup>[68]</sup>

Tabelle 7. Molekulare Parameter einiger Proteine in wässriger Lösung. Immunglobulin(Ig)-, Bestandteil von Titin (aus dem Skelettmuskel), und Fibronectin-III-Domänen (FnIII), Bestandteil von Tenascin (einem extrazellulären Matrixprotein), sind von ähnlicher Struktur ( $\beta$ -Fass); dagegen besteht Spectrin, welches das Cytoskelett der roten Blutkörperchen stabilisiert, aus  $\alpha$ -helicalen Untereinheiten. Vom nichtlinearen  $\alpha_2$ -Macroglobulin liegen nur wenige kraftspektroskopische Daten vor.  $\alpha_u$ ,  $\alpha_f$  [s]: Entfaltungs- bzw. Faltungsgeschwindigkeit ohne äußere Kraft,  $\Delta x_u$ ,  $\Delta x_f$  [ $\text{\AA}$ ]: Breite der Entfaltungs- bzw. Faltungsbarriere,  $v$ : Zuggeschwindigkeit.

Polypeptid	Persistenzlänge [ $\text{\AA}$ ]	Konformationsübergang (Domänenentfaltung) $v = 0.01 - 0.5 \text{ }\mu\text{s}^{-1}$	Konturlängenzuwachs [ $\text{\AA}$ ]
Ig-Peptid <sup>[137, 138, 152]</sup> (rekombinantes Titinfragment), Titin <sup>[109, 152]</sup> (nativ)	8 (< 50 pN) 4 (> 50 pN)	130 pN/190 pN $\alpha_u = 0.3 \times 10^{-4}$ , $\alpha_f = 2$ $\Delta x_u = 3$ , $\Delta x_f > 150$	266 280
FnIII-Peptid <sup>[153]</sup> (rekombinantes Tenascinfragment), Tenascin <sup>[153]</sup> (nativ)	4.2 ± 2.2 (> 50 pN)	ca. 90 pN/150 pN $\alpha_u = 4.6 \times 10^{-4}$ , $\alpha_f = 3$ $\Delta x_u = 3$ , $\Delta x_f = 10$	285 ± 40
FnIII-Peptid <sup>[137]</sup> (rekombinantes Tenascinfragment)	8 (< 50 pN) 4 (> 50 pN)	ca. 90 pN/160 pN $\alpha_u = 0.3 \times 10^{-4}$ $\Delta x_u = 5.5$	286 ( $l_p = 4 \text{ }\text{\AA}$ )
Spectrin <sup>[138]</sup> (nativ)	8 (< 50 pN)	< 25 pN/ca. 30 pN $\alpha_u = 0.3 \times 10^{-4}$ $\Delta x_u = 17 \pm 5$	317 ± 3
$\alpha_2$ -Macroglobulin <sup>[29]</sup>	Steifigkeit: ca. 15 mNm <sup>-1</sup> , ca. 65 mNm <sup>-1</sup>		

ähnlich hoch wie bei Titin, aber fast sechsmal so breit (Tabelle 7) – der Faltungszustand von Spectrin ist folglich flacher und ausgedehnter als der von Titin.

Die einzelnen  $\alpha$ -helicalen Bündel von Spectrin werden im Wesentlichen durch schwache hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten, die  $\beta$ -Fass-Domänen von Titin zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. So ergeben sich aus den verschiedenen Tertiärstrukturen unterschiedliche Entfaltungskräfte, die das Kraftmikroskop direkt nachweisen kann. Ob die unterschiedliche Mechanik von Titin und Spectrin auch eine physiologische Bedeutung hat, ist zur Zeit noch unbekannt.

## 6. Fazit und Ausblick

*Wo rohe Kräfte sinnlos walten,  
da kann sich kein Gebild gestalten.*

Friedrich von Schiller (1759–1805), *Lied von der Glocke*

Dieses Zitat von Schiller hätte im Sinne kraftspektroskopischer Experimente eigentlich lauten müssen „Wo rohe Kräfte sinnlos walten, da kann sich kein Gebilde falten“, da bei Einwirkung großer Kräfte und hoher Zuggeschwindigkeiten Molekülkomplexe zwar gebrochen und Polymere entfaltet werden können, Rückbindungen und -faltungen jedoch in höchstem Maße unwahrscheinlich werden. Bereits mit dem einfachen Modell von Bell<sup>[80]</sup> lassen sich viele Beobachtungen kraftspektroskopischer Experimente qualitativ verstehen. So ist hervorzuheben, dass Reversibilität der Konformationsänderungen von Einzelmolekülen keineswegs ausgeschlossen ist, sondern vielmehr von der Topologie des Potentials und der Zuggeschwindigkeit der Tastfeder abhängt. Prominente Beispiele für reversible Prozesse sind der Konformationsübergang bei Dextran von der Sessel- zur Wannen-

form durch Einwirkung einer äußeren Kraft sowie der Wechsel von der  $B$ - in die  $S$ -Konformation der DNA-Doppelhelix. Irreversible Prozesse zeichnen sich durch eine Hysterese in der Kraft-Abstands-Kurve zwischen Annäherung und Rückzug, eine Abhängigkeit der Kraft, bei der der Konformationsübergang stattfindet, von der Zuggeschwindigkeit sowie ein asymmetrisches Potential aus. Beispiele für irreversible Entfaltungen von Polymeren sind bestimmte modulare Proteine wie das Muskelprotein Titin, Spectrin aus dem Cytoskelett der Erythrozyten und Tenascin, ein extrazelluläres Matrixprotein. An diesen Beispielen wurde eindrucksvoll demonstriert, dass die Kinetik eines klassischen Zweizustandsmodells kombiniert mit Elastizitätsmodellen für Polymere nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Ergebnisse liefern kann.

Die Kraftmikroskopie hat sich somit zu einem Werkzeug entwickelt, das mit relativ einfachen Mitteln eine Fülle an Informationen zur Mechanik von Einzelmolekülen liefert. Diese reichen von Konformationsübergängen über Biegemodule, Bindungskräfte und Geschwindigkeitskonstanten

bis zu Informationen über die Potentialform. Welche Perspektiven für die Zukunft sich ergeben, zeigen erste Experimente von Müller, bei denen nicht nur Faltung- und Entfaltungscyclen von Bakteriorhodopsin aus immobilisierter Purpurmembran kraftspektroskopisch analysiert wurden, sondern auch die Proteine in der Membran hochauflösend abgebildet wurden.<sup>[149]</sup> Dabei zeigte sich, dass tatsächlich einzelne Helices aus dem Verband entfernt wurden. Neben Experimenten an isolierten Systemen existieren bereits erste Untersuchungen an lebenden Zellen. Von besonderem Interesse ist hier die Quantifizierung von Adhäsionskontakten zwischen Zellen.<sup>[150]</sup>

Die Experimente betonen die große Stärke der Rasterkraftmikroskopie, die in der einzigartigen Kombination einer hochauflösend abbildenden mit einer manipulierenden Technik besteht. Die Übertragbarkeit dieser Techniken auf synthetische Systeme wie Polymere liefert zudem neue Perspektiven für die mechanische und chemische Charakterisierung polymerer Systeme auf molekularer Skala.

*Unser Dank gilt Bernd Gotsmann und Claudia Steinem für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die vielen hilfreichen Diskussionen.*

Eingegangen am 6. Dezember 1999 [A 373]

- [1] J. N. Israelachvili, D. Tabor, *Proc. R. Soc. London A* **1972**, 331, 19.
- [2] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930.
- [3] a) D. Krüger, B. Anczykowski, H. Fuchs, *Ann. Phys.* **1997**, 6, 341;  
b) B. Anczykowski, B. Gotsmann, J. P. Cleveland, H. Fuchs, V. B. Elings, *Appl. Surf. Sci.* **1999**, 140, 376; c) B. Gotsmann, C. Seidel, B. Anczykowski, H. Fuchs, *Phys. Rev. B* **1999**, 60, 11051; d) B. Gotsmann, C. Schmidt, C. Seidel, H. Fuchs, *Eur. Phys. J. B* **1998**, 4, 267.
- [4] E.-L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, 264, 415.
- [5] G. U. Lee, D. A. Kidwell, R. J. Colton, *Langmuir* **1994**, 10, 354.

- [6] „Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen“: M. Rief, Dissertation, München, **1997**.
- [7] H. Heinzelmann, E. Meier, H. Rudin, H.-J. Güntherodt, *Force Microscopy in Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods* (Hrsg.: R. J. Behm), Kluwer-Academic, Amsterdam, **1990**.
- [8] M. Radmacher, R. W. Tillman, M. Fritz, H. E. Gaub, *Science* **1992**, 257, 1900.
- [9] H. G. Hansma, J. H. Hoh, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, 23, 115.
- [10] B. Capella, P. Baschieri, C. Frediani, P. Miccoli, C. Ascoli, *IEE Eng. Med. Bio.* **1997**, March/April, 58.
- [11] J. H. Hoh, J. P. Cleveland, C. B. Prater, J.-P. Revel, P. K. Hansma, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4917.
- [12] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, L. Tiefenauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 7402.
- [13] C. D. Frisbie, L. F. Rozsnyai, A. Noy, M. S. Wrighton, C. M. Lieber, *Science* **1994**, 265, 2071.
- [14] S. Akari, D. Horn, H. Keller, W. Schrepp, *Adv. Mater.* **1995**, 7, 549.
- [15] C. E. H. Berger, K. O. van der Werf, R. P. H. Kooyman, B. G. de Groot, J. Greve, *Langmuir* **1995**, 11, 4128.
- [16] J. L. Wilbur, H. A. Biebuck, J. C. MacDonald, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1995**, 11, 825.
- [17] M. Ludwig, W. Dettmann, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **1997**, 72, 445.
- [18] G. Bar, S. Rubin, A. N. Parikh, B. I. Swanson, T. A. Zawodzinski, Jr., M.-H. Whangbo, *Langmuir* **1997**, 13, 373.
- [19] E. W. van der Vegt, G. Hadziianou, *J. Phys. Chem.* **1997**, 101, 9563.
- [20] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 2. Aufl., Academic Press, London, **1991**.
- [21] H.-J. Butt, *Biophys. J.* **1991**, 60, 777.
- [22] W. A. Ducker, T. J. Senden, R. M. Pashley, *Nature* **1991**, 353, 239.
- [23] A. Marti, G. Hähner, N. D. Spencer, *Langmuir* **1995**, 11, 4632.
- [24] G. U. Lee, L. A. Chrisey, R. J. Colton, *Science* **1994**, 266, 771.
- [25] T. Boland, B. D. Ratner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 5297.
- [26] L. A. Wenzler, G. L. Moyes, L. G. Olson, J. M. Harris, T. P. Beebe, Jr., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2855.
- [27] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3477.
- [28] L. A. Wenzler, G. L. Moyes, G. N. Raikar, R. L. Hansen, J. M. Harris, T. P. Beebe, Jr., *Langmuir* **1997**, 13, 3761.
- [29] K. Mitsui, M. Hara, A. Ikai, *FEBS Lett.* **1996**, 385, 29.
- [30] J. Fritz, D. Anselmetti, J. Jarchow, X. Fernandez-Busquets, *J. Struct. Biol.* **1997**, 119, 165.
- [31] M. Heuberger, G. Dietler, L. Schlapbach, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1996**, 14, 1250.
- [32] A. Vinckier, P. Gervasoni, F. Zaugg, U. Ziegler, P. Lindner, P. Groscurth, A. Plückthun, G. Semenza, *Biophys. J.* **1998**, 74, 1.
- [33] Definitionsgemäß ist  $\Delta z_p < 0$ , wenn sich das Piezostellglied auf die Tastfeder zubewegt.
- [34] J. B. Pethica, A. P. Sutton, *J. Vac. Sci. Technol. A* **1988**, 6, 2400.
- [35] Mikroskopisch handelt es sich um eine Überlappung der elektrostatischen Wellenfunktionen von Spitze und Probe, also um eine Abstoßung aufgrund des Pauli-Prinzips. Makroskopisch bestimmen elastische Rückstellkräfte das Verhalten in diesem Bereich.
- [36] Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Tastnadel nicht deformiert wird. Wenn gleich auf atomarer Skala ein Transfer von Spitzennmaterial auf die Probe stattfinden kann, so ist die genannte Bedingung trotzdem meist erfüllt, da die üblichen Spitzen aus  $\text{Si}_3\text{N}_4$  und oxidiertem Silicium recht hohe Elastizitätsmodule (>150 GPa) aufweisen. Für besonders kritische Anwendungen sind Tastfedern mit Diamantspitzen gebräuchlich.
- [37] N. A. Burnham, R. J. Colton, *Force Microscopy in Scanning Tunneling Microscopy and Spectroscopy* (Hrsg.: D. A. Bonnell), VCH, Weinheim, **1993**, S. 191–294.
- [38] M. Mate, *Phys. Rev. Lett.* **1992**, 68, 3323.
- [39] M. Radmacher, M. Fritz, C. M. Kacher, J. P. Cleveland, P. K. Hansma, *Biophys. J.* **1996**, 70, 556.
- [40] S. R. Cohen, G. Neubauer, G. M. McClelland, *J. Vac. Sci. Technol. A* **1990**, 8, 3449.
- [41] B. Bhushan, V. N. Koinkar, *Appl. Phys.* **1994**, 64, 1653.
- [42] D. Krüger, B. Ańczykowski, H. Fuchs, *Ann. Phys. (Leipzig)* **1997**, 6, 341.
- [43] J. L. Hutter, J. Bechhoefer, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, 64, 1868.
- [44] Entlang dieser Geraden ist die Steigung  $-1$  und  $\Delta d = 0$ . Da sich außerdem der Spitz-Probe-Abstand nicht ändert, setzt man üblicherweise auf der Kontaktgeraden  $d = 0$ .
- [45] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub, *Science* **1997**, 275, 1295–1297.
- [46] Hier sind Proben- und Spitzennmaterial identisch.
- [47] Die MYD/BHW-Theorie berücksichtigt nicht nur Oberflächenkräfte, sondern auch die durch sie hervorgerufenen Deformationen im Material.<sup>[3]</sup>
- [48] W. Mönch, G. Ertl, *Semiconductor Surfaces and Interfaces*, 2. Aufl., Springer, Berlin, **1995**.
- [49] Unterschiede in der Austrittsarbeit von Probe- und Spitzennmaterial können zu einem Kontaktpotential führen. Ein elektrisches Feld im Spalt zwischen Spitze und Probe kann sich auch aufgrund von Ladungen ausbilden, die auf den Oberflächen gebunden sind („patch charges“). Als Ursache der Abweichungen bei größeren Abständen sind elektrostatische Kräfte jedoch unwahrscheinlich, da sich die Messdaten gut durch eine  $1/d^2$ -Anpassung beschreiben lassen. Elektrostatische Kräfte würden einen langsameren Abfall hervorrufen ( $\propto 1/d$ ).
- [50] H. W. Hao, A. M. Baró, J. J. Saenz, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1991**, 9, 1323.
- [51] Dies zeigt z.B. die Hamaker-Konstante für  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , ein geläufiges Spitzennmaterial bei der Kraftspektroskopie:  $H(\text{Luft, Vakuum}) = 16.71 \times 10^{-20} \text{ J}$ ,  $H(\text{Wasser}) = 6.07 \times 10^{-20} \text{ J}$ .
- [52] R. J. Hunter, *Foundations of Colloid Science, Vol. I*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
- [53] H.-J. Butt, E. K. Wolf, S. A. C. Gould, B. D. Northern, C. M. Peterson, P. K. Hansma, *J. Struct. Biol.* **1990**, 105, 54.
- [54] A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, 5. Aufl., Wiley, New York, **1990**.
- [55] A. L. Weisenhorn, P. Maivald, H.-J. Butt, P. K. Hansma, *Phys. Rev. B* **1992**, 45, 45.
- [56] P. Kékicheff, S. Marcelja, T. J. Senden, V. E. Shubin, *J. Chem. Phys.* **1993**, 99, 6098.
- [57] T. J. Senden, C. J. Drummond, P. Kékicheff, *Langmuir* **1994**, 10, 358.
- [58] T. J. Senden, C. J. Drummond, *Colloids Surf. A* **1995**, 94, 29.
- [59] A. Marti, G. Hähner, N. D. Spencer, *Langmuir* **1995**, 11, 4632.
- [60] X.-Y. Lin, F. Creuzet, H. Arribart, *J. Chem. Phys.* **1993**, 97, 7272.
- [61] Nicht nur die gelösten Ionen, sondern auch die polaren Wassermoleküle schwächen das elektrische Feld ab.
- [62] V. A. Parsegian, D. Gingell, *Biophys. J.* **1972**, 12, 1192.
- [63] Die Wechselwirkung, die bei der Überlappung von Doppelschichten entsteht, wird allgemein als elektrostatisch bezeichnet.
- [64] Bei geringen Abständen können auch Effekte auftreten, die von der endlichen Ausdehnung der Moleküle des Lösungsmittels herrühren. Allgemein spricht man hier von Lösungs- oder Strukturkräften.
- [65] J. Gregory, *J. Colloid Interface Sci.* **1975**, 51, 44.
- [66] D. McCormack, S. L. Carnie, D. Y. Chan, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 169, 177.
- [67] H.-J. Butt, *Biophys. J.* **1992**, 63, 578.
- [68] „Kraftspektroskopie: Von der van-der-Waals-Wechselwirkung zur Mechanik von Einzelmolekülen“: M. Neitzert, Dissertation, Münster, **1999**.
- [69] H.-J. Butt, *Biophys. J.* **1991**, 60, 1438.
- [70] A. Noy, D. V. Vezenov, C. M. Lieber, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1997**, 27, 381–421.
- [71] B. Capella, G. Dietler, *Surf. Sci. Rep.* **1999**, 34, 1.
- [72] H. Hertz, *J. Reine Angew. Math.* **1881**, 92, 156.
- [73] K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts, *Proc. R. Soc. London A* **1971**, 324, 301.
- [74] B. V. Derjaguin, V. M. Müller, Y. P. Toporov, *J. Colloid Interface Sci.* **1975**, 53, 314.
- [75] a) V. M. Müller, V. S. Yushenko, B. V. Derjaguin, *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, 77, 91; b) B. D. Hughes, L. R. White Quart, *J. Mech. Appl. Math.* **1979**, 32, 445.
- [76] Zu beachten ist bei der Verwendung von Kontaktmodellen, dass die Messung der Oberflächenergie  $\gamma_{ST}$  von der elastischen Verformung von Spitze und Probe abhängt und damit unabhängige Messungen von  $\gamma_{ST}$  strenggenommen nicht realisierbar sind.
- [77] a) H. Grubmüller, B. Heymann, P. Tavan, *Science* **1996**, 271, 997; b) B. Heymann, H. Grubmüller, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 303, 1.

- [78] E. Evans, K. Ritchie, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1541.
- [79] T. Han, J. M. Williams, T. P. Beebe, Jr., *Anal. Chim. Acta* **1995**, 307, 365.
- [80] G. I. Bell, *Science* **1978**, 200, 618.
- [81] G. U. Lee, L. A. Chrisey, R. J. Colton, *Science* **1994**, 266, 771.
- [82] A. Noy, D. V. Vezenov, J. F. Kayyem, T. J. Meade, C. Lieber, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 519.
- [83] T. Boland, B. D. Ratner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 5297.
- [84] E.-L. Florin, M. Rief, H. Lehmann, M. Ludwig, C. Dormmair, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 895.
- [85] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 346.
- [86] B. Essevaz-Roulez, U. Bockelmann, F. Heslot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 11935.
- [87] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schäfer, H. J. Güntherodt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11277.
- [88] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, F. Heslot, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 79, 4489.
- [89] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, F. Heslot, *Phys. Rev. E* **1998**, 58, 2386.
- [90] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, L. A. Marty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 3746.
- [91] R. McKendry, M. E. Theoclitou, T. Rayment, C. Abell, *Nature* **1998**, 391, 566.
- [92] J. Fritz, A. G. Katopodis, D. Anselmetti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12283.
- [93] M. Ludwig, V. T. Moy, M. Rief, E.-L. Florin, H. E. Gaub, *Microsc. Microanal. Microstruct.* **1994**, 5, 321.
- [94] Zum Vergleich: Florin et al.<sup>[4]</sup> bestimmten eine Bindungskraft von  $F = 170 \text{ pN}$ ; Moy et al.<sup>[6]</sup> erhielten sogar  $F = 280 \text{ pN}$ . Dieses Beispiel unterstreicht, dass zur Interpretation von auf diese Art bestimmten Bindungskräften die Angabe der Zuggeschwindigkeiten unerlässlich sind.
- [95] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, H.-J. Güntherodt, *Biophys. J.* **1996**, 70, 2437.
- [96] V. T. Moy, E. L. Florin, H. E. Gaub, *Colloids Surf.* **1994**, 93, 343.
- [97] „Kraftspektroskopie an Antikörper-Antigen-Systemen am Beispiel des Hb-A1c-Antikörpers“: Y. Oberdörfer, Diplomarbeit, Münster, **1999**.
- [98] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Science* **1999**, 283, 1727.
- [99] H. Li, M. Rief, F. Oesterhelt, H. E. Gaub, *Adv. Mater.* **1998**, 3, 316.
- [100] F. Oesterhelt, M. Rief, H. E. Gaub, *New J. Phys.* **1999**, 1, 6.1–6.11.
- [101] In diesem Abschnitt werden – anders als bisher – attraktive Kräfte als positiv angesehen. Diese Vorgehensweise orientiert sich an der vorherrschenden Konvention in der Literatur.
- [102] R. H. Austin, J. P. Brody, E. C. Cox, T. Duke, W. Volkmuth, *Phys. Today* **1997**, 50, 32.
- [103] L. R. G. Treloar, *The Physics of Rubber Elasticity*, 3. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **1975**.
- [104] C. Bouchiat, M. D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, V. Croquette, *Biophys. J.* **1999**, 76, 409.
- [105] J. F. Marko, E. D. Siggia, *Macromolecules* **1995**, 28, 8759.
- [106] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, F. Caron, *Science* **1996**, 271, 792.
- [107] T. Odijk, *Macromolecules* **1995**, 28, 7016.
- [108] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, *Science* **1996**, 271, 795.
- [109] M. Rief, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 81, 4764.
- [110] P. E. Marszalek, A. F. Oberhauser, Y.-P. Pang, J. M. Fernandez, *Nature* **1998**, 396, 661.
- [111] H. J. Kreuzer, R. L. C. Wang, M. Grunze, *New J. Phys.* **1999**, 1, 21.1
- [112] P. J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Hanser, München, **1988**.
- [113] G. Strobl, *The Physics of Polymers*, 2. Aufl., Springer, Berlin, **1997**.
- [114] M. Doi, S. F. Edwards, *The Theory of Polymer Dynamics*, Oxford University Press, Oxford, **1998**.
- [115] L. Harnau, P. Reineker, *New J. Phys.* **1999**, 1, 3.1–3.6.
- [116] C. Ortiz, G. Hadzioannou, *Macromolecules* **1999**, 32, 780.
- [117] H. Jensenius, G. Zocchi, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 79, 5030.
- [118] S. Chandrasekhar, *Rev. Mod. Phys.* **1943**, 15, 1.
- [119] Diese Verteilungsfunktion gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Abstandsvektor  $\vec{x}$  in ein gegebenes Volumenelement zeigt.
- [120] H.-G. Elias, *An Introduction to Polymer Science*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, **1997**.
- [121] Es ist durchaus möglich, dass beim Zurückziehen der Tastspitze Knoten angezogen werden, wenn der Polymerfaden entsprechend vorliegt.
- [122] Der zugrunde liegende Formalismus taucht auch bei der Beschreibung des Paramagnetismus auf sowie bei der Orientierung eines Dipols im elektrischen Feld.
- [123] Für eine numerische Auswertung von Messdaten wird zumeist die Streckung  $x(F)$  über die gemessene Kraft aufgetragen und die Parameter von Gleichung (12) mit Hilfe nichtlinearer Kurvenanpassung ermittelt.
- [124] Während Gleichung (12) eine exakte Lösung darstellt, ist Gleichung (13) nur eine Näherungsformel für große  $n$ . Im Experiment ist diese Annahme meist hinreichend erfüllt. Man beachte, dass bei der Kraftspektroskopie in der Regel der Abstand  $x$  variiert und die hieraus resultierende Kraft  $F$  gemessen wird; diese Vorgehensweise entspricht Gleichung (13). Neuere instrumentelle Entwicklungen mit magnetisch angetriebenen Tastspitzen erlauben es jedoch, die Kraft frei vorzugeben (A. Schemmel, H. E. Gaub, *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, 70, 1313).
- [125] Im Grenzfall  $Fl_K \ll k_B T$  oder  $x \ll L$  geht Gleichung (13) des FJC-Modells in Gleichung (11) des GC-Modells über.
- [126] T. J. Senden, J.-M. di Meglio, P. Auroy, *Eur. Phys. J. B* **1998**, 3, 211.
- [127] J. Fritz, A. G. Katopodis, F. Kolbinger, D. Anselmetti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12283.
- [128] H. Kikuchi, N. Yokoyama, T. Kajiyama, *Chem. Lett.* **1997**, 11, 1107.
- [129] H. Li, W. Zhang, X. Zhang, J. Shen, B. Liu, C. Gao, G. Zou, *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, 19, 609.
- [130] O. Kratky, G. Porod, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1949**, 68, 1106.
- [131] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 6185–6190.
- [132] J. Kovac, C. G. Crabb, *Macromolecules* **1982**, 15, 537.
- [133] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, S. B. Smith, *Science* **1994**, 265, 1599.
- [134] Bei einem homogenen Stab (Flächenträgheitsmoment  $I$ , Durchmesser  $Q$ ) ist der Zusammenhang zwischen Biegemodul  $B$  und Elastizitätsmodul  $Y$  wie folgt:  $B = IY = (\pi/32)Q^4Y$ .
- [135] S. B. Smith, L. Finzi, C. Bustamante, *Science* **1992**, 258, 1122.
- [136] C. Bouchiat, M. D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, V. Croquette, *Biophys. J.* **1999**, 76, 409.
- [137] M. Rief, M. Gautel, A. Schemmel, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **1998**, 75, 3008.
- [138] M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, H. E. Gaub, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 553.
- [139] Bei einer Gauß-Kette folgt für den thermodynamischen Mittelwert des Quadrates des Abstandsvektors  $\langle \vec{x}^2 \rangle = L l_K = 2 L l_p$ .
- [140] Die spezifische Steifigkeit  $\Phi$  hat die Dimension einer Kraft und ergibt sich aus der Federkonstante der gesamten Kette:  $K = \Phi/L$ . Dieser Ansatz ist analog zu  $K = \kappa/n$  im Fall des FJC-Modells. Wie die Segmentelastizität  $\kappa$  ist auch  $\Phi$  eine von der Konturlänge unabhängige Größe; es gilt:  $\Phi = \kappa/(n/L)$ . Die Zahl der Segmente pro Längeneinheit  $n/L$  ist für alle Polymere eines Typs identisch.
- [141] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S. M. Block, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1335.
- [142] Die Auswertung von Gleichung (16) in Form des zugehörigen Polynoms (linke Seite) – (rechte Seite) = 0 ist nicht unproblematisch, da von den drei Lösungen für  $F$  nur eine physikalisch sinnvoll ist.
- [143] H. Li, M. Rief, F. Oesterhelt, H. E. Gaub, X. Zhang, J. Shen, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 305, 197.
- [144] a) A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu, *Opt. Lett.* **1986**, 11, 288; b) E.-L. Florin, A. Pralle, J. K. H. Hörber, E. H. K. Stelzer, *J. Struct. Biol.* **1997**, 119, 202.
- [145] J. F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, J. F. Marko, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, 83, 1066.
- [146] M. W. Konrad, J. I. Bolonick, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10989.
- [147] K. Kitamura, M. Tokunaga, A. H. Iwane, T. Yanagida, *Nature* **1999**, 397, 129.
- [148] U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, G. M. Misevic, *Science* **1996**, 267, 1173.

- [149] D. Müller, Vortrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Biophysik, Ulm, **1999**.
- [150] M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, H. E. Gaub, *Nature Cell Biology* **2000**, 2, 313.
- [151] O. H. Willemsen, M. M. E. Snel, K. O. van der Werf, B. G. de Grooth, J. Greve, P. Hinterdorfer, H. J. Gruber, H. Schindler, Y. van Kooyk, C. G. Figdor, *Biophys. J.* **1998**, 75, 2220.
- [152] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Science* **1997**, 276, 1109.
- [153] A. F. Oberhauser, P. E. Marszalek, H. P. Erickson, J. M. Fernandez, *Nature* **1998**, 339, 181.