

FRAUNHOFER INSTITUT FÜR BIOMEDIZINISCHE TECHNIK – IBMT
ARBEITSGRUPPE FÜR BIOMOLEKULARE NANOSTRUKTUREN

Ortsaufgelöster Aufbau von DNA-Nanostrukturen auf Glasoberflächen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Potsdam

vorgelegt von
Michael Breitenstein
geboren am 27. Februar 1981 in Cottbus

Potsdam, 21. März 2012

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - keine Bearbeitung 3.0
Deutschland

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/6185/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-61857>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-61857>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung	9
2 Motivation	11
2.1 Bedeutung von Nanostrukturen	11
2.2 Problembeschreibung	13
2.3 Lösungsansatz	14
3 Stand der Technik	17
3.1 Nanotechnologie	17
3.2 Das Rasterkraftmikroskop	22
3.3 DNA als Nanobaustein	26
3.4 PNA und ihre Funktion als Bindeglied	29
3.5 Das Bindungspaar Biotin-Neutravidin	32
3.6 Fluoreszenz als Nachweismethode	34
4 Material und Methoden	39
4.1 Methoden	39
4.1.1 Funktionalisieren der Oberfläche	39
4.1.2 DNA als Konstruktionselement	46
5 Ergebnisse und Diskussion	51
5.1 Funktionalisieren von Glasoberflächen	51
5.1.1 Epoxygruppen basierende Kopplung	51
5.1.2 Biotin-Neutravidin basierende Kopplung	54
5.1.3 AFM-gestütztes Deponieren von Neutravidin	56
5.1.4 Blocken der Oberfläche	58
5.1.5 Kontaktwinkelmessung	59
5.2 Sequenzielles Deponieren mit dem AFM	60
5.2.1 Array mit immobilisiertem Farbstoff	62
5.2.2 Array aus hybridisierten Oligonukleotiden	62
5.3 DNA-Konstruktherstellung	68
5.3.1 Test des Konstrukt-Mittelstücks	68
5.3.2 Test der Konstrukt-Ankerelemente	69
5.3.3 Test der Konstruktausrichtung	71

5.4	DNA-Nanostruktur	72
5.4.1	Aufbau der DNA-Nanostruktur	73
5.4.2	Nachweis der DNA-Nanostruktur	74
5.4.3	Ansatzpunkte zum Systemausbau	77
5.5	PNA-Funktionalisierung der DNA-Nanostruktur	80
5.5.1	Verdünnung und Binden der PNA	80
5.5.2	PNA-Bindungsnachweis	81
5.5.3	Integration der PNA in das DNA-Nanoarray	85
6	Ausblick	89
	Anhang	91
	Geräte	91
	Chemikalien	93
	Quelltexte	97
	Literaturverzeichnis	109
	Veröffentlichungen	119
	Danksagung	121
	Eidesstattliche Erklärung	123
	Stichwortverzeichnis	124

Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>engl. atomic force microscope</i>
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(-e)
BSA	<i>engl. bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl. desoxyribonucleic acid</i>
DPN	<i>engl. dip-pen nanolithographie</i>
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
HOMO	<i>engl. highest occupied molecular orbital</i>
inkl.	inklusive
isoelekt.	isoelektrisch
K	Kelvin
Konz.	Konzentration
LUMO	<i>engl. lowest unoccupied molecular orbital</i>
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
min	Minute
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	<i>engl. phosphate buffered saline</i>
R	Rest (chemische Gruppe)
RE-Wasser	Reinstwasser
rel.	relativ
RNA	<i>engl. ribonucleic acid</i>
rpm	<i>engl. revolutions per minute</i>
SNOM	<i>engl. scanning nearfield optical microscope</i>
STM	<i>engl. scanning tunneling microscope</i>
u.	und
u. a.	unter anderem
unspez.	unspezifisch
vergl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer auf DNA basierenden Nanostruktur. DNA ist der wohl geeignetste Baustein, um biologische Strukturen mit molekularen Abmaßen aufzubauen. Der Vier-Buchstaben-Code der DNA ermöglicht es, selektiv adressierbare Bindungen auf molekularer Ebene einzugehen.

Die DNA-Nanostruktur ist durch Aufspannen der DNA-Stränge zwischen definierten Fixpunkten konstruiert worden. Diese Fixpunkte wurden mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (AFM) erzeugt. Dazu wurde eine zu einem „Stift“ umfunktionierte Rasterkraftmikroskopspitze so mit der aufzutragenden „Tinte“ beladen, dass das Absetzen von Funktionsmolekülen im unteren Mikrometermaßstab möglich ist. Die Grundlagen zum Tintenauftrag mit dem AFM und die Prämisse, mindestens zwei Adress-Molekül-Spezies absetzen und immobilisieren zu können, stehen im Fokus der in dieser Arbeit entwickelten Methode. Sie ermöglicht das orts aufgelöste Immobilisieren von verschiedenen Funktionsmolekülen, wie z. B. Oligonukleotide, und bildet damit die Grundvoraussetzung um DNA zwischen zwei Punkten aufzuspannen.

Die Immobilisierung erfolgte unter Verwendung verschiedener Oberflächenfunktionalisierungstechniken. Der erste Schritt ist die Silanisierung. Der zweite Schritt ist die Biotinylierung und ist Kernpunkt eines sogenannten „Sandwichaufbaus“, der sich aus dem oberflächengebundenen Biotin, darauf abgesetztem Neutra-vidin und abschließend dem die Funktions- bzw. Adressmoleküle tragenden zweiten Biotin zusammensetzt.

Als DNA kam das 7250 Basenpaare große M13-Plasmid zum Einsatz. Es wurde so weit modifiziert, dass es linear vorliegt und an seinen beiden Enden zwei unterschiedliche Einzelstrangüberhänge besitzt. Diese wurden komplementär zu den zuvor immobilisierten Adressmolekülen, den Oligonukleotiden, präpariert, so dass durch ihre spontan stattfindende Hybridisierung eine Verbindung zur funktionalisierten Oberfläche hergestellt wurde. Entsprechend der Geometrie der Fixpunkte und den oligonukleotidvermittelten Adressen wurde damit die Ausbildung einer definierten DNA-Struktur erreicht.

Der Nachweis, dass auch wesentlich komplexere Strukturen aufgebaut und weitere

molekulare Funktionalisierungen an dieser Nanostruktur realisiert werden können, wurde an der Interaktion mit PNA (*peptide nucleic acid*) demonstriert. Diese bindet mit einer Auflösung im Basenpaarabstand (0,34 nm), also subnanometergenau, an die DNA. Sie wird in dieser Arbeit als Schlüsselement für weitaus komplexere Aufgaben verstanden.

Somit wurde ein universelles Werkzeug für den Aufbau von nanoskaligen Systemen entwickelt, welches mit geringem Aufwand in bestehende Forschungsvorhaben, bzw. aktuelle Fragestellungen, eingebunden werden kann. Die hier vorgestellte Methode zur orts aufgelösten Immobilisierung von Biomolekülen beweist ihr Potential nicht nur mit dem Aufbau von Nanostrukturen, sondern sie kann auch jegliche biotinierbare Spezies, sei es DNA, Antikörper, Enzyme oder gar ganze Zellen, gezielt immobilisieren.

2 Motivation

2.1 Bedeutung von Nanostrukturen

Warum ist es interessant, sich mit Nanostrukturen, oder mit der zielgerichteten Herstellung selbiger, zu beschäftigen? Ist der Einsatz von nanostrukturierten Systemen nur eine interessante Idee oder gehen mit diesem neuen Technologiezweig handfeste Anwendungen und Lösungskonzepte einher?

Um Objekte im Mikro- und Nanometermaßstab zu finden, muss man nicht lange suchen: So hat das menschliche Haar beispielsweise einen Durchmesser von rund $100\ \mu\text{m}$ [1], humane Leberzellen einen Durchmesser von $20 - 30\ \mu\text{m}$ [2] und humane Erythrozyten eine Größe von rund $7,5 \times 2\ \mu\text{m}$ [3]. Geht man einen Schritt weiter und betrachtet biologische Membranen, welche aus einer $6\ \text{nm}$ dicken Lipiddoppelschicht aufgebaut sind [4], befindet man sich bereits auf der molekularen Ebene. Um genau diese Größenordnung geht es.

In der breiten Öffentlichkeit werden mit dem Begriff der Nanotechnologie vor allem Oberflächenbeschichtungen und schmutzabweisende Materialien, (vergl. „Lotuseffekt“) in Verbindung gebracht. Tatsächlich ist der Einsatz von Nanostrukturen weitaus vielschichtiger und nur unter Einbezug aller klassischen wissenschaftlichen Disziplinen erklärbar.

Zur Schärfung des Blickes für die Thematik rund um den Begriff „Nano“ soll hier ein einleitender Exkurs in die Zukunft der Medizin, der Technik und der Biologie folgen.

Als mögliches Anwendungs-Szenario in der Medizin sind Nanomaschinen mit intelligenten Entscheidungsfunktionen für Diagnose und Therapie [5] ebenso denkbar, wie artifizielle Systeme zur Aufklärung bislang unzugänglicher Wirkmechanismen. Mittels der Simulation biologischer Systeme unter Einbeziehung einer realen Patientenprobe ließen sich so z. B. personalisierte Therapieansätze oder auch individuelle Medikamente maßschneiden. Ebenso könnten nanoverkapselte Wirkstoffe [6] z. B. durch ein Triggersignal genau an festgelegten Zielstrukturen freigesetzt werden oder in einem anderen Anwendungsfall gezielt die Blut-Hirn-Schranke, bedingt durch ihre

speziell angepasste Größe bzw. der genau designten Oberfläche, überwinden.

Anwendungs-Szenario in der Technik: Nanostrukturierte Materialien, welche Antireflex- [7] oder Antibeschlageigenschaften [8, 9] haben, markieren den Anfang derzeitiger Entwicklungen, hin zu intelligenten Materialien mit möglicherweise schaltbaren Eigenschaften. In der Mikroelektronik könnten bald auf Kohlenstoffnanoröhren (*carbon nanotubes*) [10, 11] basierende elektrische Schaltkreise, von der Nanotechnologie profitieren. Und ebenso erweitert die Nanotechnologie das Spektrum der von Biosensoren erfassbaren Einsatzgebiete [12].

Anwendungs-Szenario in der Biologie: Nanostrukturierte Materialien rücken immer mehr in den Fokus, wenn es um die labelfreie Detektion von Biomolekülen geht [13, 14]. Die Einzelzellanalyse [15], wie auch der gezielte Aufbau Neuronaler Netzwerke [16], sind längst keine Fiktion mehr und spiegeln die Bandbreite an praktischen Anwendungen der Nanotechnologie wider.

Aus dem Grundgedanken heraus, eine Nanostruktur mit biologischen Methoden aufzubauen, fällt die Wahl schnell auf DNA als Grundbaustein. Neben den geringen Abmaßen dieses Makromoleküls — der Durchmesser beträgt ca. 2 nm — und der sequenzbasierten Codierbarkeit, welche basenpaargenau, d. h. im Raster von 0,34 nm erfolgt, sind es vor allem die folgenden Eigenschaften, welche die DNA als Nanobaustein prädestinieren:

Die DNA ist leicht verfügbar und kann mittels der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) mit relativ geringem Aufwand vervielfältigt werden. Die vollautomatische Festphasensynthese bietet darüber hinaus inzwischen die Möglichkeit, nahezu jede beliebige DNA-Sequenz synthetisch herstellen zu lassen und sie gegebenenfalls chemisch zu modifizieren bzw. mit einem fluoreszierenden Marker oder Kopplungselement zu versehen. Durch Hybridisierungen geeigneter Bindungspartner bzw. Oligonukleotide können, wie in 3.1 auf Seite 20 dargestellt werden wird, komplexere Strukturen aufgebaut werden. Bereits in der Basensequenz ist die Sekundärstruktur codiert, was die Natur mit den Kleeblattstrukturen von RNA demonstriert.

Die umfangreichen Techniken, welche die Molekularbiologie zur Bearbeitung von DNA bereitstellt, wie z. B. das enzymatische Schneiden und Ligieren von DNA-Sequenzen, oder das Markieren und Selektieren von DNA-Abschnitten, lassen sich ebenso für die Nanostrukturierungsaufgaben verwenden. Ergänzend kommen auch alle klassischen Analyseverfahren wie die Gelelektrophorese, Fluoreszenzanalyse und Amplifikations-, Selektions- und Syntheseverfahren der Molekularbiologie zum Einsatz.

Zur Einordnung der vorliegenden Arbeit in die aktuelle Forschung sei auf themenverwandte Publikationen hingewiesen, welche zeitgleich zu dieser Arbeit erschienen: Der Aufbau von selbstorganisierten DNA-Nanostrukturen mit PNA (*peptide nucleic acid*) als Verbindungsglied von DNA-Abschnitten, wurde wegen der Fähigkeiten der PNA, mit DNA wechselwirken zu können, in [17] untersucht. In [18] wurde das DNA-Parallelogramm als Prinzip der molekularen Selbstorganisation aufgegriffen und in Betracht gezogen, dies als Basis komplexerer Strukturen zu nutzen. In [19] wird ein ganz anderer Weg zur Nanostrukturierung beschrieben: Durch das Adressieren von funktionalisierten Nanopartikeln mit Oligonukleotiden können sich diese bestimmungsgemäß aneinanderreihen und einem Bauplan folgend, komplexere Nanostrukturen ausbilden. Auch Kohlenstoffnanoröhren eignen sich, in Verbindung mit DNA als Adressmolekül, als nanoskaliges Strukturelement [20].

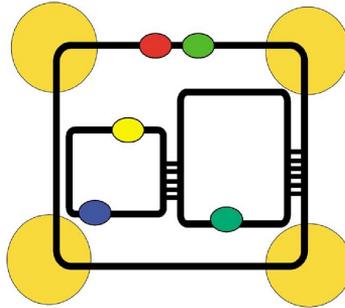


Abbildung 2.1: Strukturvorschlag einer aus Polynukleotiden bestehenden Nanostruktur (Bildquelle [21])

Die Abbildung 2.1 illustriert das in [21] vorgeschlagene Lösungskonzept zum vektoriellen Immobilisieren von DNA und lieferte den gedanklichen Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

2.2 Problembeschreibung

Stets kommt es auf die richtige Frage an. Und so soll in dieser Arbeit nicht der Frage nachgegangen werden, ob, sondern wie, bzw. unter Zuhilfenahme welcher Strategie und Werkzeuge, es möglich ist, das Biomolekül DNA zwischen zwei Punkten auf einer Oberfläche aufzuspannen. Die Idee ist, DNA mittels AFM zwischen zwei Punkten aufzuspannen, ohne auf die Gold-Thiol-Chemie angewiesen zu sein.

Bisher gelang die orts aufgelöste Nanostrukturierung von Biomolekülen vornehmlich im Kontext der Oberflächenstrukturierung [22–24] oder des Aufbaus von dreidimensionalen Nanostrukturen ohne feste Ortszuweisung, welche sich beispielsweise durch verzweigende Hybridisierungen erzeugen lassen [25–27]. In dieser Arbeit sollte eine kostengünstige und vor allem leicht auf andere Anwendungsgebiete übertragbare Methode zur biomolekularen Nanostrukturierung auf Oberflächen entwickelt werden.

Der Unterschied zu den bereits existierenden Nanostrukturierungsmethoden, welche die Immobilisierung von mehreren Biomolekülen zum Ziel haben [28–30], besteht darin, dass die hier erarbeitete Methode mit nahezu jedem Rasterkraftmikroskop ausgeführt werden kann und nicht Goldoberflächen, sondern kommerzielle Glasobjektträger als Substrat zum Einsatz kommen sollen.

Zeitgleich mit der Formulierung der Aufgabenstellung erwächst die Frage nach der Anwendung und dem Nutzen der erarbeiteten Lösung. Anwendungen die solcher Lösungen bedürfen gibt es bereits: In den letzten Jahren hat sich der Wunsch nach der Analyse von Einzelmolekülen, aber auch der Bedarf an Einzelzellanalytik herausgebildet. Erst mit der Fähigkeit, einzelne Moleküle zu handhaben, ist es möglich, ihr Wirken genauer zu studieren. So können mit dem Werkzeug der Nanostrukturierung tiefere Einblicke in die Interaktion einzelner Biomoleküle gewonnen werden.

Auch auf Nanostrukturen basierende Biosensoren oder biologische Rechnerstrukturen wie das „DNA computing“ [31] profitieren eindeutig vom Werkzeug der Nanostrukturierung. Sie stehen alle am Anfang einer spannenden Entwicklung, zu der diese Arbeit ihren Beitrag leisten soll.

2.3 Lösungsansatz

Warum wird gerade DNA bevorzugt als Baustein von Nanostrukturen eingesetzt? Die DNA ist ein leicht verfügbares Biomolekül mit einer großen Bandbreite an durchführbaren chemischen Modifikationen. Die Synthese individueller Oligonukleotide ist kommerziell ausgereift und zu einem festen Bestandteil der Biowissenschaften geworden. Der Vier-Buchstaben-Code erlaubt eindeutige Adressierungen und eröffnet den Weg zum gesteuerten Selbst-Zusammenbau (*self-assembly*) komplexerer Strukturen. Zudem ist DNA ein mechanisch relativ stabiles Biomolekül. In der Wissenschaftsdisziplin Molekularbiologie steht ein ganzes Arsenal etablierter Werkzeuge zur Bearbeitung, Modifikation und Analyse von DNA zur Verfügung. Erfolge im Metallisieren von DNA und der damit verbundene Aufbau von elektronenleitenden DNA-Strukturen, beispielsweise mittels UV-Licht induzierter Reduktion

von an der DNA angelagerten Platin-Ionen [32] oder der Reduktion von Silber-Ionen [33], stellen neue Wege in der Herstellung nanoskaliger Strukturen dar. Einzelmolekülpositionierungsverfahren bilden die Grundlage der Einzelmolekülanalyse und werden in [34–36] dargestellt.

Folgende Vorüberlegungen sind mit dem Aufbau der in der vorliegenden Arbeit angestrebten DNA-Nanostruktur verbunden:

Zum Aufspannen eines DNA-Fadens ist es notwendig, definierte und mit einer eindeutigen Adress-Sequenz versehene Ankerpunkte zu schaffen. Idealerweise sollten diese Ankerpunkte nur wenige Mikrometer auseinanderliegen und entsprechend klein sein. Eine weitere Notwendigkeit besteht darin, mindestens zwei unabhängig voneinander adressierbare Ankerpunkte zu erzeugen, um an ihnen die DNA aufspannen zu können.

Das Rasterkraftmikroskop bietet, bedingt durch seine Aktuatoren, die Möglichkeit zur Mikro- und Nanomanipulation. Das Rasterkraftmikroskop soll hier nicht als bildgebendes Verfahren, sondern als gestaltendes Werkzeug bzw. Mittel vorgestellt werden. Die Zweckentfremdung der Rasterkraftmikroskop-Spitze als Schreibfeder ist in der Literatur (siehe Kapitel 3.1) gut beschrieben, hat jedoch grundsätzlich den Nachteil, dass nur eine Substanz je Spitze abgesetzt werden kann. Ein Reinigen und Neuladen der Spitze birgt die Gefahr der Kontamination. Ein Austausch der Spitze ist unter Beibehalt der Position nicht möglich. Der Einsatz mehrerer Spitzen in Form eines Kammes oder Feldes [37–39] wie er von der Firma Nanoink Inc. angeboten wird [40, 41], ist mechanisch höchst anspruchsvoll und kostenintensiv.

Aus diesen Überlegungen wurde hier ein Verfahren entwickelt (siehe Kapitel 5.2), welches dazu in der Lage ist, durch Applikation einer einzelnen, mehrarmigen Substanz, mehrere verschiedene Funktionsmoleküle sequenziell zu immobilisieren. Die Vorteile der hier entwickelten Herangehensweise sind:

- Optimieren des Spottens nur für eine Substanz notwendig
- keine Reinigung und kein Austauschen der Spitze erforderlich
- lange und zuverlässige Oberflächenaktivität
- hohe Kopplungsgeschwindigkeit der Funktionsmoleküle
- geringe Kosten (sofern ein AFM vorhanden ist)

Sobald es möglich ist, verschiedene Funktionsmoleküle gezielt zu immobilisieren, kann der Aufbau der eigentlichen DNA-Nanostruktur erfolgen. Als Funktionsmo-

leküle sollen Oligonukleotide zum Einsatz kommen. Durch ihren eindeutigen Basencode sind sie nicht nur gezielt im Nanometermaßstab ansprechbar, sondern auch dazu in der Lage, größere, zu ihnen komplementäre Einheiten aus einer Lösung auszulesen. Um dies verwirklichen zu können, bietet es sich an, ein Plasmid so zu präparieren, dass es als Doppelstrang mit zwei unterschiedlichen, einzelsträngigen Enden vorliegt und sich entsprechend der immobilisierten, zu den Plasmidenden komplementären Oligonukleotiden ausrichtet.

3 Stand der Technik

3.1 Nanotechnologie

Das Bestreben zur Erforschung von immer kleineren Strukturen bis hin zu nanostrukturierten Molekülverbänden spiegelt sich in der Bandbreite der bislang veröffentlichten und auch kommerziell verfügbaren Methoden und Verfahren auf dem Gebiet der Nanotechnologie wieder. Sie lassen sich in zwei Kategorien einteilen, den *top-down*- und den *bottom-up*-Ansatz. Beim *top-down*-Ansatz wird die Verkleinerung durch apparative bzw. mechanisch-technologische Lösungen angestrebt, der *bottom-up*-Ansatz nutzt dagegen die Nanostrukturierung auf molekularem Wege. Die bedeutendsten Verfahren zur Nanostrukturierung sollen auf den nächsten Seiten vorgestellt werden.

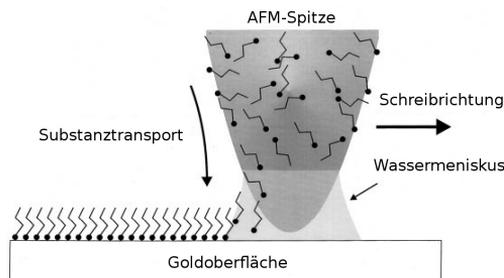


Abbildung 3.1: Klassischer Dip-Pen Versuch. Das an der AFM-Spitze physisorbierte Alkanthiol diffundiert beim Oberflächenkontakt zur Substratoberfläche und bildet eine lokal begrenzte Alkanthiol-Funktionalisierung. (Bildquelle verändert [42]).

Die Dip-Pen Nanolithographie (DPN), welche von MIRKIN *et al.* 1999 entwickelt wurde [42–45], ist das wohl bekannteste aller nanoskaligen Lithographieverfahren (im vorliegenden Zusammenhang wird *Lithographie* im Sinne des Schreibens auf eine Oberfläche verwendet). Ausgangspunkt ist eine mit der zu deponierenden Substanz beladene AFM-Spitze, mit welcher in Analogie zur tintenbeladenen Schreibfeder auf eine Oberfläche geschrieben wird. Das System ist für Goldoberflächen und Tinten auf

Thiolbasis etabliert, aber auch für SiO_x -Oberflächen geeignet und beschrieben [46].

In der Literatur ist der Begriff der Dip-Pen Nanolithographie sehr weit gefasst. So wird unter DPN allgemein das Absetzen einer chemischen Substanz mit Hilfe einer AFM-Spitze, auf einen festen Träger verstanden. Das schließt auch das elektrochemische Abscheiden von Metallen aus ihren Salzlösungen [47, 48] oder das Immobilisieren von histidinmarkierten Proteinen auf einer Nickeloberfläche [49] ein. Der klassische Ansatz beschränkt sich jedoch auf die Erzeugung von Mustern aus Monoschichten an Alkanthiolen auf Goldsubstraten [43], gefolgt von weiteren Funktionalisierungen.

Mit der DPN können gegenwärtig Auflösungen um die 50 nm erreicht werden [50, 51]. Sobald sich die AFM-Spitze der Oberfläche nähert, bildet sich zwischen Spitze und Oberfläche ein Wassermeniskus aus [52]. Dieser beeinflusst die Diffusion von der substanzbeladenen Spitze zur Oberfläche (siehe Abbildung 3.1). Der Einfluss des Wassermeniskus auf den Tintentransport wurde in der Fachliteratur (Exkurs in [41]) kontrovers diskutiert, da er im Widerspruch zu der hydrophoben Tinte (z. B. Octadecanthiol [42] oder Mercaptohexadecansäure [45]) steht. In [53] wurden Untersuchungen zum Tintentransport (am Beispiel von Octadecanthiol) bei verschiedenen hohen rel. Luftfeuchtwerten durchgeführt, unter anderem bei 0 %. Es stellte sich heraus, dass zwischen dem Tintentransport und dem luftfeuchtebeeinflussten Wassermeniskus kein unmittelbarer Zusammenhang besteht. Inzwischen wurde zwar das Vorhandensein des Wassermeniskus und seine Größenabhängigkeit als Funktion der rel. Luftfeuchte eindeutig in [54] nachgewiesen, der Form und Größe des Wassermeniskus, sowie der Hydrophobizität und Form der Spitze werden jedoch beim Substanztransport eine wesentlich größere Bedeutung zugeschrieben [55] als der rel. Luftfeuchte allein. Daraus erwächst das Bedürfnis, die DPN unter klimatisch definierten Bedingungen durchzuführen [28, 56].

Obwohl der apparative Aufwand relativ gering ist, sind die physikalischen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden und aufgeklärt [44]. Eine sehr große Herausforderung bleibt nach wie vor das Spotten mehrerer verschiedener Substanzen mittels DPN-Technik.

Weitere Möglichkeiten zur Nanostrukturierung von Oberflächen bestehen in der Anwendung von Probenoxidation [57], Fotomasken [58], nanoskaligen Stempeln [59] oder der weiter unten beschriebenen Nanopipette. Bei der Probenoxidationstechnik wird auf elektrochemischem Wege ein Metall (Pt aus PtCl_6 in [47] und Au aus AuCl_4 in [48]) auf einer häufig aus Silizium bestehenden Oberfläche abgeschieden. Gern wird auf die Quelle [60] hingewiesen, wo der gesamte Arbeitsablauf von der Probenpräparation und elektrochemischen Nanofunktionalisierung, auch das Koppeln eines

Gold-Nanopartikels an die präparierte Oberflächenstruktur beschrieben wird.

Eine weitere Möglichkeit ist das konventionelle Drucken auf einer flexiblen, stark gedehnten Stempeloberfläche, welche nach dem eigentlichen Stempelvorgang wieder entspannt wird. In der bezeichneten Art kann ein Microarray abgebildet werden, welches um ein Vielfaches kleiner ist als das als Matrize dienende, zuvor erzeugte Feld [61]. Dabei konnten Spotdurchmesser von 15 – 25 μm erreicht werden.

Eine technologisch sehr anspruchsvolle Variante zur orts aufgelösten Abgabe winzigster Substanzmengen im Bereich von wenigen Zeptolitern (erreichter Spotdurchmesser: 200 – 300 nm) bietet die Nanofountain-Mikrokanalspitze [62–64]. Der Aufbau dieser Spitze ist in Abbildung 3.2 zu sehen. In der Arbeitsgruppe ESPINOSA et al., in der diese technologische Lösung vorangetrieben wurde, entstanden, aufbauend auf diesem Konzept, ganze Spitzen-Arrays zur parallelen Erzeugung zweidimensionaler Nanoarrays. Und so verwundert es nicht, dass diese Technik bis in die kommerzielle Anwendung überführt wurde.

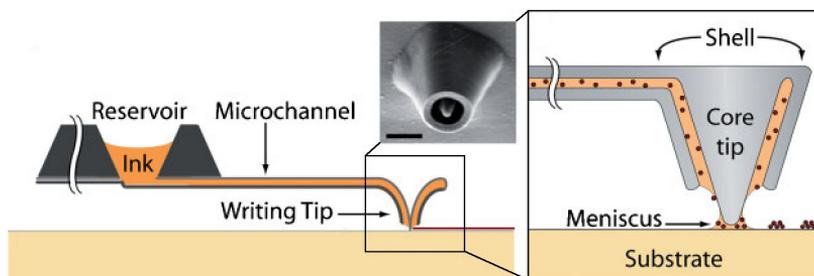


Abbildung 3.2: Nanofountain-Spitze — eine AFM-Spitze mit Tintenreservoir und Mikrokanal ermöglicht das kontinuierliche Spotten — Größe des eingblendeten Maßstabs: 2 μm (Bildquelle [64])

Besonders in Hinblick auf das Aufbringen von Reagenzien bzw. Funktionsmolekülen in biologischen Proben sei auf die Nanopipette [65–67] hingewiesen. Eine zweigeteilte Glaskapillare (siehe Abbildung 3.3), welche so fein ausgezogen ist, dass ihr Eingangsdurchmesser 100 – 125 nm beträgt, wird mit der abzuladenden Substanz und einer Elektrolytlösung gefüllt. Sobald die Spitze beschickt ist, bildet sich an ihrem Ende ein Tropfen. Dieser verbindet beide Teilkammern und bei Anlegen einer Spannung kann ein Stromfluss einsetzen. Der geringe Querschnitt limitiert die Ionenwanderung und somit den Widerstandswert, welcher typischerweise bei 100 M Ω liegt [66]. Nähert sich die gefüllte Spitze der Oberfläche an, bildet sich ein Meniskus. Entsprechend der Oberflächentopographie verändert sich der Querschnitt und folglich

der Widerstand. Ein elektronischer Regelkreis in Verbindung mit einem piezokeramischen Stellelement hält die Nanopipette auf einer konstanten Höhe von 75 – 125 nm. Zum Absetzen der Zielsubstanz wird exemplarisch fluoreszenzmarkiertes Immunglobulin durch einen elektroosmotischen Strom transportiert. Die Menge an abzusetzender Substanz kann über die angelegte Spannung, sowie über die Verweildauer der Nanopipette über der Zielstelle eingestellt werden. Der Vorgang findet in einer Elektrolytlösung, bzw. einem physiologischen Puffer statt, weswegen die Untergrenze des Spotdurchmessers dieser Methode diffusionsbedingt etwa bei 800 nm liegt.

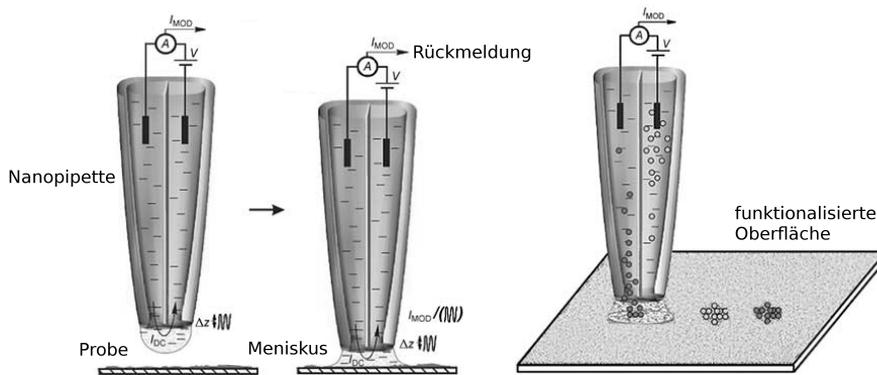


Abbildung 3.3: Nanopipette — der Stromfluss durch den zweigeteilten Pipettenkanal wird als Parameter für die Höhenregelung genutzt — das Deponieren von Substanz auf die Oberfläche erfolgt spannungsgetrieben (Bildquelle verändert [67])

Zum *bottom-up* Ansatz zählen unter anderem all die Methoden, bei denen die Fähigkeit der DNA, sich selbst zu organisieren und zu strukturieren, ausgenutzt wird. Der Einsatz von DNA als Nanostrukturelement ergibt sich aus ihren physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften: Der Basenabstand beträgt 0,34 nm und der Durchmesser der DNA-Doppelhelix ca. 2 nm (nähere Details in Kapitel 3.1 auf Seite 27). Der genetische Vier-Buchstaben-Code ermöglicht einen Adressraum von 4^n Kombinationen (4 Bausteine; n Elemente) anzusprechen.

Die Hybridisierungspartner können, wenn sie durch eine chemische Funktionsgruppe wie z. B. einem Fluoreszenzfarbstoff ergänzt wurden, ganz spezifische Aufgaben erfüllen. Mittels Einführen von chemischen Gruppen, welche als End- bzw. Startgruppe chemischer Kopplungsgruppen dienen, können Biomoleküle und DNA miteinander kombiniert werden.

Die Molekularbiologie stellt zahlreiche Werkzeuge zur zielgerichteten Bearbeitung

von DNA zur Verfügung. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (siehe Kapitel 4.1.2.1 auf Seite 46) kann ein DNA-Strang sequenzspezifisch und basengenau geschnitten werden. Das enzymatische Ligieren, also Verbinden, nahezu jeder beliebigen Sequenz kann über klebrige, d.h. einzelsträngige Überhänge (*sticky ends*), aber auch über stumpfe Enden (*blunt ends*) erfolgen.

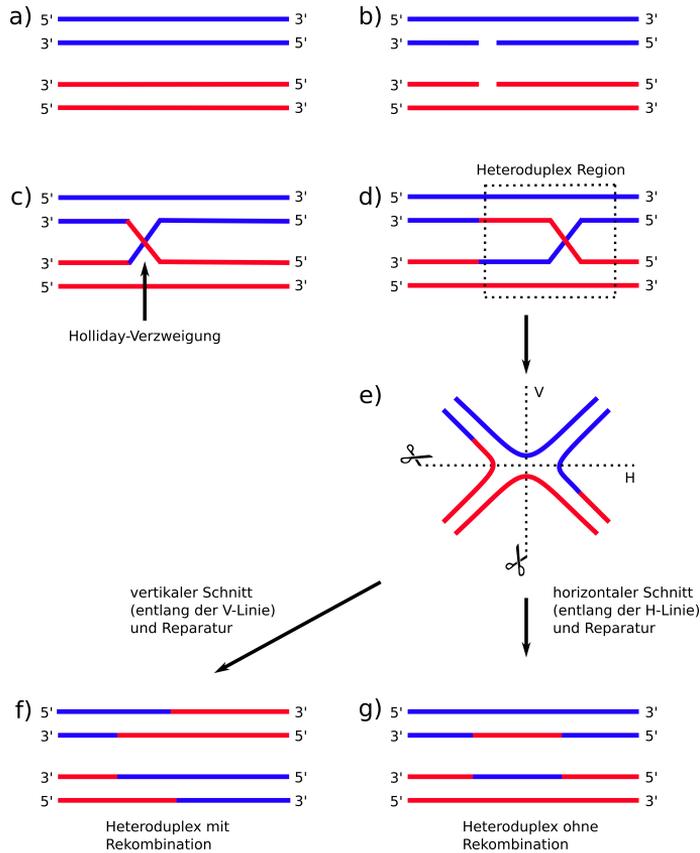


Abbildung 3.4: An homologen DNA-Sequenzen kann es unter Ausbildung einer Holliday-Struktur zum Strangaustausch kommen — dieser ist für die genetische Variabilität verantwortlich.

Ausgangspunkt des Einsatzes von DNA als nanostrukturellem Bauelement waren die 1964 von HOLLIDAY diskutierten Erkenntnisse über das Verhalten von homologer DNA während der Meiose. Die Abbildung 3.4 stellt die in diesem Zusammenhang stehende Rekombination von DNA dar. Die nach ihrem Entdecker HOLLIDAY benannte Holliday-Struktur (siehe Abbildung 3.4c) kann dann auftreten, wenn sich zwei homologe DNA-Stränge gegenüberliegen. Sie kann über den gesamten homologen Bereich

3.2 Das Rasterkraftmikroskop

wandern und schließlich wieder zerbrechen. Je nach Richtung des Strangbruches kann es so zu einer Rekombination des genetischen Materials kommen.

In den frühen achtziger Jahren veröffentlichte SEEMAN einen Artikel [68] über die Ausbildung von DNA-Knoten und DNA-Gittern und zeigte auf, dass es möglich war, DNA-Stränge so zu konstruieren, dass bei hinreichend kleiner homologer Sequenz die gleitende Wanderung ausbleibt und der entstehende Knoten fixiert ist. Folglich postulierte SEEMAN bereits 1982 den Aufbau von weitreichenden DNA-Netzwerken.

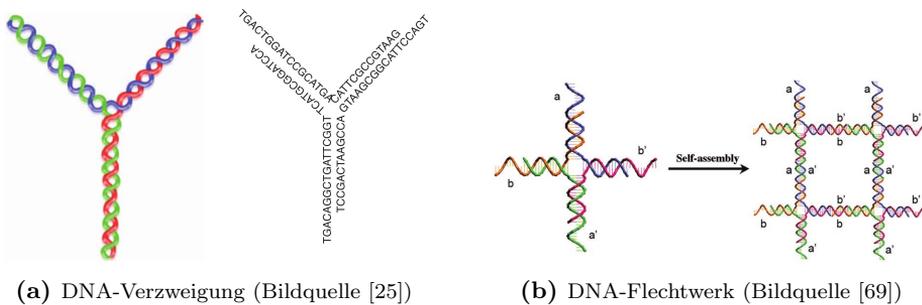


Abbildung 3.5: Darstellung der Möglichkeit, DNA zu verketteten, um DNA-Nanostrukturen zu generieren.

Da insbesondere mit der Entdeckung der Holliday-Struktur die Linearität der DNA als alleiniges Strukturmerkmal widerlegt worden war, gelang der Aufbau vielfältiger DNA- [69], wie auch RNA-Strukturen [70]. Ihnen allen ist gemein, dass sie aus einem Multihelix-Flechtwerk bestehen und aus Oktaedern, Tetraedern oder flächigen Grundgerüsten beispielsweise Röhren, Gitter oder sphärische Körper bilden können [71, 72]. Die Abbildung 3.5 zeigt entsprechende Beispiele dieses Konzepts.

3.2 Das Rasterkraftmikroskop

Wenn vom Rasterkraftmikroskop (*Atomic Force Microscope, AFM*) die Rede ist, so fällt in diesem Zusammenhang fast immer auch der Begriff des Rastertunnelmikroskops (*Scanning Tunneling Microscope, STM*). Tatsächlich besteht zwischen beiden Mikroskopen ein enger Zusammenhang.

Im IBM-Forschungslabor (Zürich) wurde um 1981/1982 von GERD BINNING und HEINRICH ROHRER das Rastertunnelmikroskop [73] entwickelt wofür beide 1986 den Nobelpreis erhielten. Das Funktionsprinzip beruht darauf, dass eine elektrisch leitfähige Spitze über eine elektrisch leitende Probenoberfläche gerastert wird. Ab

einem nur wenige Nanometer großen Abstand zwischen der im Idealfall atomar auslaufenden Metallspitze (Platin/Iridium oder Wolfram) und der zu scannenden Oberfläche fließt bei einer angelegten Messspannung ein messbarer Tunnelstrom. Dieser kommt dadurch zustande, dass sich die Elektronenwolken der Messspitze und Probenoberfläche ab einem Abstand von 1 – 2 nm zu überlappen beginnen und es den Elektronen möglich ist, zwischen diesen Atomen „durchzutunneln“ [74]. Zwischen dem Tunnelstrom und dem Abstand zur Oberfläche besteht eine exponentielle Abhängigkeit. Der gemessene Tunnelstrom liefert die für eine dreidimensionale Rekonstruktion der Oberflächentopografie nötige Höheninformation. Das dreidimensionale Bild entsteht aus der Ortsinformation der über die Oberfläche im Raster geführten Messspitze und der Höheninformation, welche aus dem Tunnelstrom gewonnen wird.

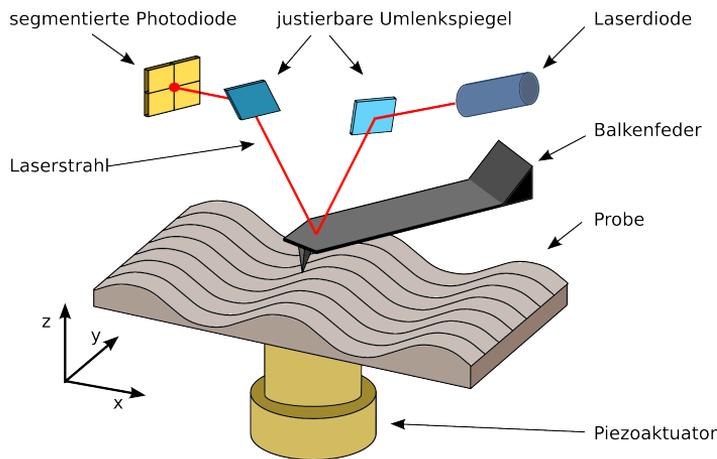


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines AFM — die mechanische Auslenkung der Balkenfeder wird mit Hilfe eines Laserstrahls und seiner Position auf einem Fotodetektor registriert — die Umlenkspiegel dienen der Strahlausrichtung und Nullstellung.

Nur wenige Jahre später, im Jahre 1986, wurde von GERD BINNING, CALVIN QUATE und CHRISTOPH GERBER [75] das Rasterkraftmikroskop vorgestellt. Es arbeitet im Grunde ähnlich wie ein Rastertunnelmikroskop: Piezostellelemente dienen dazu, die Probe Punkt für Punkt zu vermessen, und das Höhensignal wird in ein räumliches Bild am Computer übertragen. Der wesentliche Unterschied besteht jedoch darin, dass eine an einer Balkenfeder befestigte Spitze als Sonde die Oberfläche abfährt und die entsprechend der Topografie ausgelenkte Balkenfederbiegung registriert wird. Die gängigste Methode zur Ermittlung der Balkenfeder auslenkung ist

in Abbildung 3.6 dargestellt. Ein auf die spiegelnde Rückseite der Balkenfeder ausgerichteter Laserstrahl wird von der Balkenfeder reflektiert und auf einen segmentierten Fotodetektor gelenkt. Dieser Fotodetektor kann Licht mit einer örtlichen Auflösung von 1 nm detektieren [76]. Durch die Entfernung zur Balkenfeder erlaubt dies eine Auflösung im sub-nm-Bereich. Verglichen werden kann dieses Messprinzip mit einem Lichtzeiger.

Der technische Vorteil des Rasterkraftmikroskops besteht in der mikroskopischen Zugänglichkeit elektrisch nicht leitfähiger Proben. Die Mikroskopie konnte daher auf biologische Proben, unter Verzicht der aufwendigen Präparation, erweitert werden.

Die Balkenfeder besitzt je nach Dicke und Materialart eine Federkonstante um $0,1 - 1 \frac{N}{m}$ und besteht aus Silizium oder Siliziumnitrid. Sie ist auf die zu untersuchende Probe und Messmethode abgestimmt. An der Unterseite der Balkenfeder befindet sich die eigentliche Messsonde, bzw. Spitze. Sie wird durch anisotropes Ätzen hergestellt.

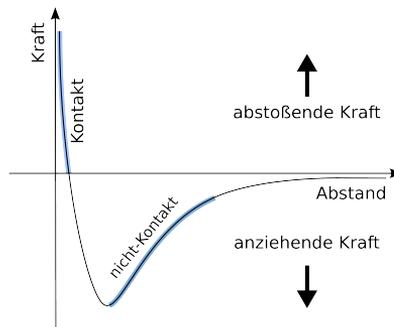


Abbildung 3.7: Lennard-Jones-Potential — Kraft-Abstands-Kurve, wie sie bei der Annäherung zweier Teilchen auftritt — hervorgehoben ist der Bereich für den Kontakt- und Nicht-Kontakt-Modus

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird zwischen zwei grundlegenden Modi unterschieden: Dem Kontakt-Modus und dem Nicht-Kontakt-Modus (vergl. Abbildung 3.7). Beim Kontakt-Modus berührt die AFM-Spitze die Probe. Die Balkenfeder hat dafür eine geringe Federkonstante, ist also eher weich. In diesem Modus kann sowohl eine konstante Höhe der Spitze zur Oberfläche vorgegeben werden als auch auf eine konstante Kräfteinwirkung auf die Spitze geregelt werden. Wird auf eine konstante Höhe geregelt, entfällt die aufwendige Nachführung und ermöglicht bei atomar flachen Oberflächen atomare Auflösungen. Die auf die AFM-Spitze wirkende Kraft liegt typischerweise im nN- und μ N-Bereich. Wenn das AFM mit einem viersegmentier-

ten Fotodetektor ausgestattet ist, kann jede Aufnahme um den Lateralkraftmodus (*Lateral Force Microscopy, LFM*) ergänzt werden. Bei dieser Form wird die laterale Verdrehung der Spitze während der Spitzenbewegung über der Oberfläche ausgewertet und gestattet Rückschlüsse auf den Reibungskoeffizienten der aktuell gescannten Stelle. Die Abbildungen 3.8 und 3.9 illustrieren die Funktionsweise.

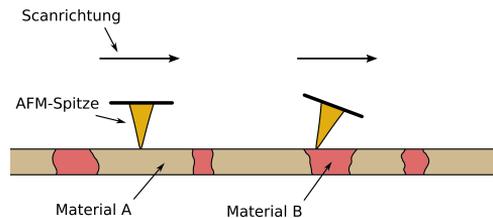


Abbildung 3.8: Darstellung des Lateralkraftmodus (LFM) — Erfolgt die Scanrichtung rechtwinklig zur Hauptachse der Balkenfeder, so kann sich diese infolge verschiedener Reibungskoeffizienten der Oberfläche verdrehen, es wirkt eine laterale Kraft.

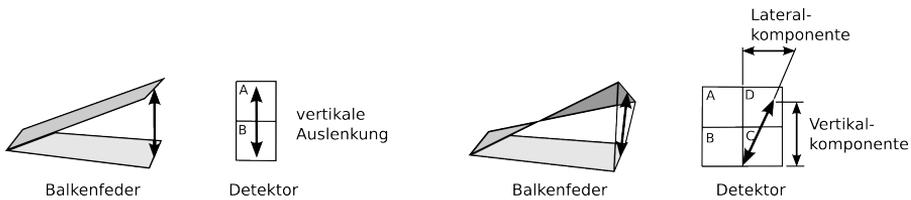


Abbildung 3.9: Messen der Spitzentorsion im Lateralkraftmodus (LFM) — Die Torsion der Balkenfeder äußert sich in einer Schräglage der Lichtspur vom Laserstrahl und kann mit Hilfe einer viersegmentierten Fotodiode detektiert werden (Bildquelle nach [76]).

Im Nicht-Kontakt-Modus besteht, wie der Name andeutet, kein oder nur ein sehr geringer Kontakt zur Oberfläche. Dieser Modus ist für sehr empfindliche Proben geeignet. Auf die Spitze wirkt nur eine sehr geringe Kraft von ca. 1 pN. Die Federkonstante der hier zum Einsatz kommenden Balkenfedern muss größer, d. h. die Federn müssen steifer sein. Bei zu weichen Balkenfedern besteht die Gefahr, die Oberfläche zu berühren oder an diese anzuschlagen. In diesem Modus wird die Balkenfeder mit ihrer Resonanzfrequenz zur Schwingung angeregt. Typische Werte liegen im Bereich von 100 – 400 kHz. Die Auslenkung der Balkenfeder kann 1 – 10 nm betragen. Die Oberflächenbeschaffenheit, d. h. das Wechselspiel von attraktiven und repulsiven Kräften bewirkt ein Dämpfen der Resonanzfrequenz. Daraus leiten sich verschiedene Varianten zur Messung ab. Das Spektrum reicht von einer einfachen Registrierung der Amplitude der entsprechend schwingungsgedämpften Balkenfeder oder Nachregelung

der Schwingung auf eine konstante Amplitude, bis hin zur Aufzeichnung der oberflächeninduzierten Phasenverschiebung zwischen dem anregenden Signal und dem von der Balkenfeder kommenden Detektionssignal.

3.3 DNA als Nanobaustein

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein Biopolymer, welches aus Desoxyribonucleotiden aufgebaut ist. Seit den drei grundlegenden Versuchen, der Entdeckung der Transformation durch den britischen Mediziner GRIFFITH (1928) [77], dem transformierenden Prinzip des Bakteriologen AVERY (1944) [78] und dem 1952 in die Geschichte eingegangenen Hershey-Chase-Experiment von HERSHEY und CHASE [79], gilt es als bewiesen, dass die DNA der Träger der genetischen Information ist. Sie wird durch identische Replikation bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Im Jahre 1953 schlugen WATSON und CRICK [80] für die Struktur der DNA eine Doppelhelix vor, welche aus zwei antiparallelen Polynucleotidsträngen besteht. Ein Polynucleotidstrang baut sich aus Mononucleotiden auf, welche über 3',5'-Phosphodiesterbrücken verknüpft sind. Ein Mononucleotid — auch als Nucleotid bekannt — setzt sich aus je einem Molekül Desoxyribose, einer Phosphatgruppe und einer Base zusammen, welche sich von den aromatischen Heterocyclen Pyrimidin oder Purin ableiten [4]. Die Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin sind N-glykosidisch an die 2-Desoxyribose gebunden (siehe Abbildung 3.10 oder auch Abbildung 3.12 auf Seite 30) und liegen im Inneren der Doppelhelix. Im Gegensatz zum Desoxyribose-Rückgrat, der Oberfläche des DNA-Moleküls, ist dieser Bereich unpolar. Die Phosphat-Reste des Desoxyribose-Rückgrats liegen außen und sind negativ geladen.

Wie in Abbildung 3.10 illustriert, steht immer einer Pyrimidinbase des einen Strangs eine Purinbase des jeweils anderen Stranges gegenüber. Das besondere Merkmal der Basenpaarung besteht darin, dass sich zwischen dem Basenpaar Adenin und Thymin zwei lineare und daher stabile Wasserstoffbrücken ausbilden (rot gekennzeichnet) und das Basenpaar Guanin und Cytosin über drei lineare Wasserstoffbrücken miteinander verbunden ist. Aufgrund dieser spezifischen Paarung entsteht durch die Basenabfolge ein eindeutiger Code.

Bei der Ribonucleinsäure (RNA) ist der Zuckerbaustein durch eine Ribose und die Pyrimidinbase Thymin durch Uracil ersetzt. Die 2'-OH-Gruppe der Ribose verhindert sterisch die Ausbildung der von der DNA bekannten doppelhelikalen Struktur.

Das DNA-Molekül kann mehrere Konformationen einnehmen, welche in Tabel-

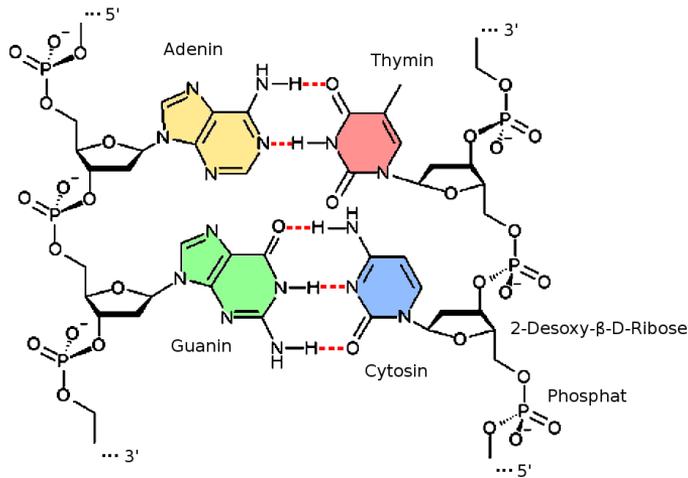


Abbildung 3.10: Ausschnitt eines DNA-Stranges mit den Basen Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin (Bildquelle verändert [81])

le 3.1 gegenübergestellt sind. Die häufigste natürlich vorkommende, die der B-Konformation, wird in Abbildung 3.11 gezeigt. In diesem Kalottenmodell ist die Geometrie der kleinen und großen Furche herausgearbeitet. Sie spielen beispielsweise für DNA-bindende Farbstoffe eine große Rolle und ermöglichen eine Unterscheidung zwischen doppelsträngiger (*double stranded DNA*, *dsDNA*) und einzelsträngiger DNA (*single stranded DNA*, *ssDNA*), und grenzen sie von der RNA ab. So bindet SYBR-Green-I bevorzugt an der kleinen Furche [82] und dient als hochempfindlicher und selektiver Farbstoff für doppelsträngige DNA.

Tabelle 3.1: Vergleich der drei Typen der DNA-Doppelhelix

	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Drehsinn der Helix:	rechts	rechts	links
Durchmesser der Helix:	2,37 nm	2,55 nm	1,84 nm
Höhe pro Basenpaar:	0,34 nm	0,29 nm	G→C 0,35 nm C→G 0,41 nm
Reste je Windung:	10,4	10,9	12,0
Länge einer Helixwindung:	3,4 nm	3,2 nm	4,5 nm
Basenneigung zur Helixachse:	$-2,0^\circ \pm 4,6^\circ$	$13,0^\circ \pm 1,9^\circ$	$8,8^\circ \pm 0,7^\circ$

Die Konformationen der DNA stehen im dynamischen Gleichgewicht. Welche der Konformation vorherrscht, hängt insbesondere von folgenden Faktoren ab: Der Nu-

kleotidsequenz, der Ionenstärke, der Umgebung und der Gegenwart von Proteinen, wie z. B. Histonen und anderen DNA-bindende Proteine.

Die A-Konformation wird in wasserarmen Lösungen beobachtet. Die Z-Konformation konnte bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden, und zwar nur dann, wenn die DNA aus einer periodischen Kette von abwechselnd Guanin und Cytosin besteht.

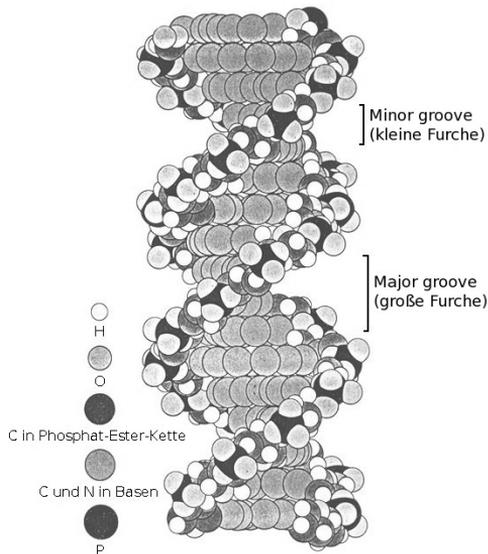


Abbildung 3.11: Karlottenmodell der DNA mit Darstellung der großen und kleinen Furche (Bildquelle verändert [83])

Eine wichtige Eigenschaft, welche Anwendung in der Gentechnik findet, ist das Auftrennen der DNA-Doppelhelix. Aufgrund dessen, dass die DNA-Doppelhelix lediglich über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten wird, ist es relativ leicht, sie mittels Erhitzen oder Inkubation in alkalischer Lösung aufzutrennen. Als Maß wird der Schmelzpunkt T_m herangezogen. Der Schmelzpunkt ist diejenige Temperatur, bei der 50 % der DNA zur einzelsträngigen Form denaturiert ist. Er ist von verschiedenen Faktoren [84] abhängig: a) Oligonukleotidkonzentration: Bei hohen Oligonukleotidkonzentrationen bevorzugt die DNA die Duplexform, was T_m erhöht. b) Salzkonzentration: Mit steigender Ionenstärke steigt auch T_m . Vor allem einwertige Kationen (z. B. Na^+) binden an die Duplexform und stabilisieren diese. c) Oligonukleotidsequenz: Sequenzen mit einem höheren GC-Anteil haben einen höheren Schmelzpunkt als solche, in denen Adenin und Thymin vorherrschen.

Die Formel 3.1 erlaubt ein Abschätzen des Schmelzpunktes für Oligonukleotidse-

quenzen [85], wobei w, x, y und z stellvertretend für die Anzahl der Basen stehen. Die Formel setzt einen pH-Wert von 7,0 und eine Oligonukleotidkonzentration von rund 50 nM voraus.

$$T_m(^\circ\text{C}) = 100,5 + 41,0 \cdot \left(\frac{yG + zC - 16,4}{wA + xT + yG + zC} \right) - \left(\frac{820,0}{wA + xT + yG + zC} \right) + 16,6 \cdot \log([Na^+]) \quad (3.1)$$

Die Adressierbarkeit und die Abmessungen im unteren Nanometermaßstab der DNA machen sie zu einem idealen Kandidaten für biomolekulare Nanostrukturierungen. Zudem sind Oligonukleotidsequenzen durch moderne Festphasensyntheseverfahren in nahezu jedem beliebigen Maßstab und chemischer Modifikation darstellbar und kommerziell erhältlich. Bemerkenswert ist auch der Umstand, dass sie auf das ca. 1,7-fache gestreckt werden kann, bevor sie ab einer auf sie einwirkenden Kraft von ca. 65 pN, auseinanderreißt [86, 87].

3.4 PNA und ihre Funktion als Bindeglied

Bei der Peptidnucleotidsäure (PNA) handelt es sich um ein DNA-Analogon, welches um 1980 vom Organochemiker OLE BUCHARDT in Kopenhagen gemeinsam mit dem Biochemiker PETER NIELSEN entwickelt wurde [88].

Im Vergleich zur DNA ist bei PNA das Desoxyribose-Phosphodiester-Rückgrat durch ein pseudo-Peptid-Rückgrat ersetzt. Hier sind N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten mit einem Amin verknüpft. Der Name Peptid-Nucleinsäure stellt den Bezug zur Festphasensynthese, dem eigentlichen Herstellungsverfahren der PNA her. Dabei sei jedoch angemerkt, dass es sich im engeren Sinne weder um ein Peptid, noch um eine Nucleinsäure handelt [89].

Was den strukturellen Vergleich zur DNA betrifft, so sind analog zur DNA, Purin- und Pyrimidin-Basen über Methylen-Carbonyl-Verbindungen an ein Grundgerüst gebunden. Dieses Grundgerüst enthält jedoch keine Pentose oder Phosphatgruppen, weswegen die PNA im Gegensatz zur DNA ungeladen ist. Die PNA besitzt eine außerordentliche thermische Stabilität und ist im Gegensatz zu DNA säurestabil, wohingegen DNA unter starker Säureeinwirkung depuriniert [90].

Laut Konvention erfolgt die Nomenklatur entsprechend der von Proteinen: Der

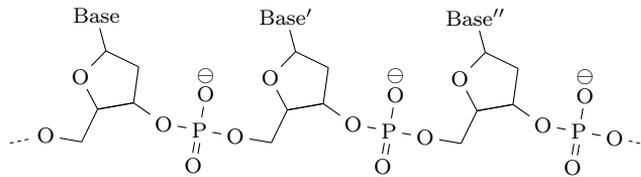


Abbildung 3.12: Ausschnitt der Strukturformel von DNA

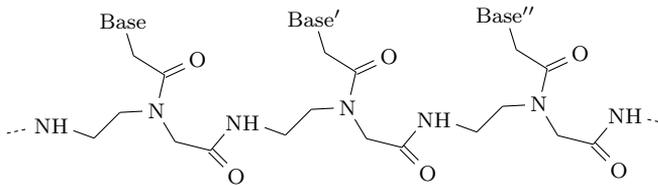


Abbildung 3.13: Ausschnitt der Strukturformel von PNA

N-Terminus steht links, der C-Terminus rechts.

Die Besonderheit dieses artifiziiellen Biomoleküls besteht darin, dass seine Basenabstände sehr gut mit denen der DNA übereinstimmen, die PNA jedoch sowohl parallel, als auch antiparallel an die DNA binden kann. Die antiparallele Orientierung wird jedoch stark bevorzugt. Im Prinzip ahmt die PNA die DNA nach und ist stärker als die DNA dazu in der Lage, sich dem Bindungspartner anzupassen. Dabei widersteht eine einzelne PNA-DNA-Bindung Kräften von 60 pN [91] und kann als irreversibel betrachtet werden.

Die elektrische Neutralität der PNA hat als Konsequenz, dass aufgrund der fehlenden Ladungsabstoßung gleichnamig geladener Teilchen, insbesondere bei geringen Ionenstärken, diese um ein Vielfaches besser an DNA binden kann als DNA an komplementäre DNA. Der Schmelzpunkt T_m ist weitgehend unabhängig von der Salzkonzentration. Die entsprechende Formel ist in Gleichung 3.2 gegeben [92].

$$T_m = 20,79 \text{ °C} + 0,83 \cdot T_{m_{DNA}} - 26,16 \cdot f_{\text{Pyrimidinanteil}} + 0,44 \cdot bp \quad (3.2)$$

Ein weiteres auffälliges Merkmal der PNA ist ihre besondere Strenge in der Diskriminierung zwischen passenden und nicht passenden Basen zum Gegenstrang. So sinkt T_m bei der Bindung von DNA-DNA bei einer Basenfehlpaarung um 4 K, bei PNA-DNA um 8 K [89] (in [90] bei einem 15-mer um 10 K). Bei steigender Ionenstärke diskriminiert sie noch stärker, soweit, dass es zu keinen Fehlpaarungen mehr kommt.

Eine Schwierigkeit in der Handhabung von PNA besteht in der geringen Was-

serlöslichkeit. Ab Längen größer als 12 bp macht sich dies störend bemerkbar. Für Abhilfe können hier Ethylenglycol-Linker, aber auch Lysinreste sorgen, welche die Wasserlöslichkeit verbessern. Erschwerend kommt hinzu, dass die PNA nur im sauren Milieu löslich ist, was jedoch durch Austausch aller Cytosinbasen durch Pseudoisocytosin, der J-Base, (entspricht einem am N3-protonierten Cytosin, siehe Abbildung 3.14) umgangen werden kann.

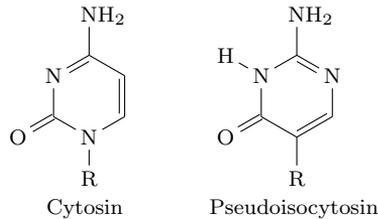


Abbildung 3.14: Strukturformeln von Cytosin und dem Analogon Pseudoisocytosin, J-Base (R = H)

Besondere Aufmerksamkeit erlangte die PNA jedoch wegen ihres Vermögens, an die DNA-Doppelhelix zu binden. Es treten die in der Abbildung 3.15 dargestellten PNA-Bindungs-Komplexe auf. Die Triplex-Invasion ist auf homopurinreiche Ziel-DNA beschränkt, denn sie beruht auf der Ausbildung der „third-strand“ Hoogsteen-Bindung (vergl. Abbildung 3.16). Die Duplex-Invasion tritt z. B. bei Homopyrimidin-PNA an Homopurin-DNA auf. Die Double-Duplex-Invasion stellt einen Spezialfall dar [93]. Hier sind Adenin und Thymin durch Diaminopurin und Thiouracil ersetzt und nur bei Verwendung von Nichtstandard-Nucleobasen möglich.

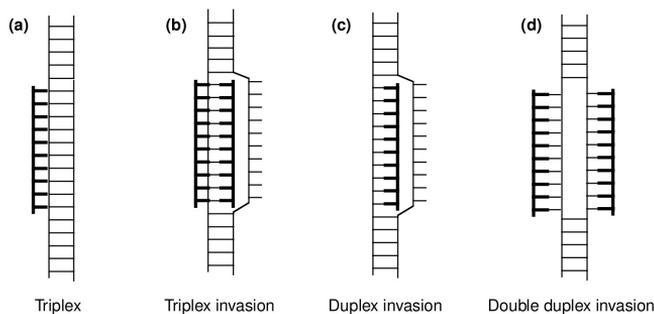


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der bei der Interaktion von PNA und DNA auftretenden Komplexe (Bildquelle [92])

Folgende Aussagen lassen sich über die Stabilität von PNA-DNA-Dimeren treffen: Pyrimidinreiche Dimere sind nur wenig beständig, wohingegen purinreiche

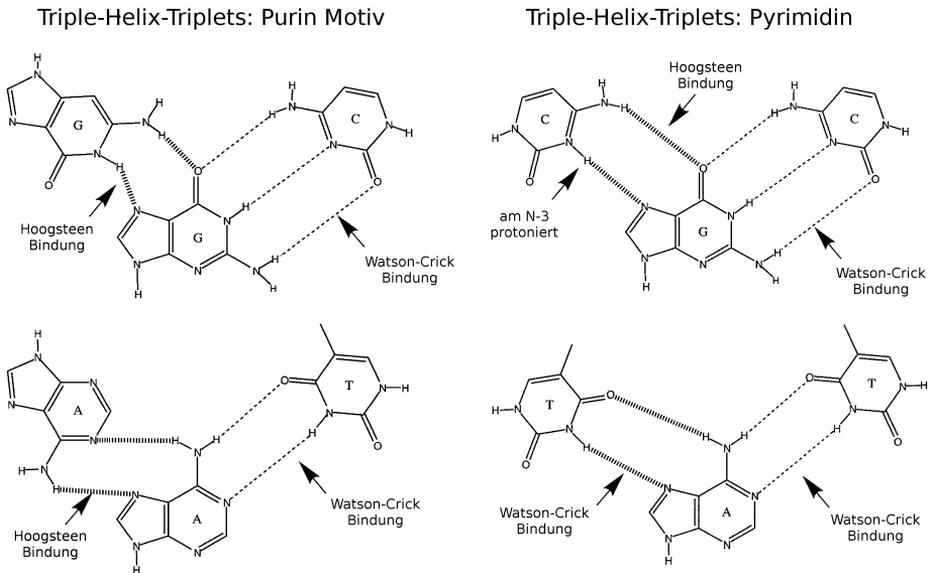


Abbildung 3.16: Purin- und Pyrimidin-Bindungsmotive der Triplex-Struktur — mittig die DNA (Bildquelle verändert [94])

PNA-DNA-Dimere stabiler sind als die korrespondierenden DNA-DNA-Paare. Bei homopyrimidin-PNA tritt jedoch eine Besonderheit auf: Sie bilden einen äußerst widerstandsfähigen PNA-DNA-Triplex.

Homopyrimidin-PNA bindet sequenzspezifisch und mit großer Effizienz an dsDNA, indem sie einen Strangaustausch-Komplex bildet (siehe Abbildung 3.17). Das Ergebnis ist eine Duplex-Invasion und es entstehen eine PNA₂-DNA-Triplex und ein einzelsträngiges DNA-Stück [95]. Die Möglichkeit zur Ausbildung der Watson-Crick- und Hoogsteen-Wasserstoffbrücken ist in Abbildung 3.16 illustriert und in Abbildung 3.17 am konkreten Fall der in dieser Arbeit verwendeten M13-Vektor-DNA dargestellt.

3.5 Das Bindungspaar Biotin-Neutraavidin

Der in allen Zellen als natürlicher Wachstumsfaktor vorkommende Cofaktor Biotin wurde bereits 1927 von BOAS und 1940 von DU VIGNEAUD entdeckt [96]. Auffallen war er, als bei übermäßigem Verzehr von rohen Eiern, Biotin-Mangelercheinungen auftraten. Diese betreffen eine Funktionseinschränkung der biotinabhängigen Carb-

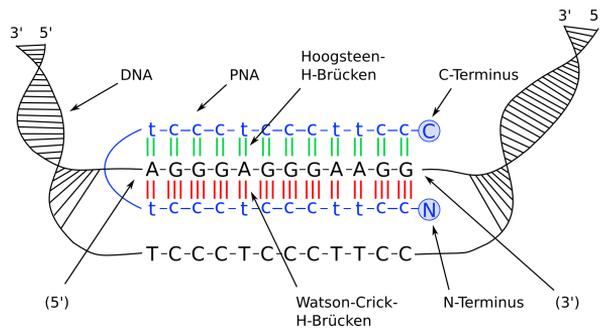


Abbildung 3.17: Darstellung eines PNA-DNA Komplexes am Beispiel der Triplex-Invasion, welches sich zwischen einem Homopyrimidin-PNA-Strang und einer Homopurin-DNA-Zielsequenz ausbilden kann.

oxylasen und beeinflussen den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel. Das in Eiern enthaltene Protein Avidin bindet das Biotin und entzieht es somit dem Organismus ähnlich einer Maskierung, so dass es für Stoffwechselvorgänge nicht mehr zur Verfügung steht.

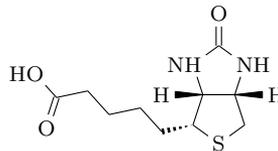


Abbildung 3.18: Strukturformel von D-Biotin

Die Interaktion zwischen Biotin und Avidin gehört mit einer Assoziationskonstante von $K_a = 10^{15} M^{-1}$ mit zu den stärksten bekannten, nichtkovalenten Bindungen [97]. Mit Hilfe rasterkraftspektroskopischer Untersuchungen wurde in [98] eine Bindungskraft zwischen Avidin und Biotin von 160 ± 20 pN ermittelt. Zum Vergleich: Die Größenordnung der Van-der-Waals-Kraft bzw. der während eines AFM-Scans im Kontakt-Modus auf die AFM-Spitze wirkenden Kraft beträgt ca. 1 pN. Diese sehr hohe Affinität erlaubt den Einsatz von Biotin und Avidin bei einer Vielzahl präparativer und bioanalytischer Methoden. Wenngleich bekannt ist, dass aus Medien komplexer Zusammensetzung eine hochselektive Isolation von Zielmolekülen möglich ist, muss man berücksichtigen, dass ein Aufbrechen dieser Bindung nur unter extremen Bedingungen wie in der Gegenwart von 6 – 8 M Guanidin bei einem pH-Wert von 1,5 realisierbar ist. Die Durchführung der Kopplung einer Zielsubstanz wird in Kapitel 4.1.1.2 auf Seite 43 näher betrachtet. Avidin besteht aus vier Untereinheiten und

ermöglicht das Binden von vier Biotinmolekülen.

Aufgrund der am Avidin gebundenen Zucker und des hohen isoelektrischen Punkts neigt Avidin zur Ausbildung unerwünschter, unspezifischer Bindungen. Mit dem bakteriellen Avidin aus *Streptomyces avidinii* oder der deglykosilierten Form, dem Neutraavidin, kann dies leicht umgangen werden. Tabelle 3.2 bietet eine Übersicht.

Tabelle 3.2: Vergleich biotinbindender Proteine (Quelle: [99, 100])

	Avidin	Streptavidin	Neutraavidin
Herkunft:	Glykoprotein aus Hühnerei	bakterielles Avidin aus <i>Streptomyces avidinii</i>	deglykosilierte Form von Avidin
Größe:	67 kDa	53 kDa	60 kDa
Zucker:	Mannose, N-Acetylglucosamin	—	—
isoelekt. Punkt:	10	6,8 – 7,5	6,3
K_a zu Biotin:	$10^{15} M^{-1}$	$10^{15} M^{-1}$	$10^{15} M^{-1}$
Spezifität:	+	++	+++
unspez. Bindung:	+++	++	+

3.6 Fluoreszenz als Nachweismethode

Um die Natur der Fluoreszenz besser zu verstehen, muss einleitend darauf eingegangen werden, warum eine Substanz als farbig wahrgenommen wird. Das menschliche Auge nimmt elektromagnetische Strahlung in einem Spektralbereich von 380 – 780 nm wahr. Die wahrgenommene Farbe einer Substanz setzt sich aus dem reflektierten und z. B. durch Fluoreszenz emittierten Licht zusammen. Eine Substanz erscheint schwarz, wenn sie die Strahlung im sichtbaren Bereich absorbiert und keinerlei Fluoreszenz vorliegt.

Das sichtbare Licht bewirkt die Anregung des Elektronensystems von Molekülen. Dabei werden Elektronen aus einem besetzten in ein unbesetztes Molekülorbital angehoben (vergl. Abb. 3.19). Bei gesättigten Verbindungen, bei denen nur σ -Verbindungen vorhanden sind, ist die dazu notwendige Energie sehr hoch (Anregung nur im UV-Bereich; $\lambda > 200$ nm). Substanzen mit einfachen π -Elektronensystemen, wie z. B. Benzol, lassen sich bei 200 – 400 nm anregen [101]. Erst ab dem Vorhandensein eines ausgedehnten π -Elektronensystems ist der Energieunterschied zwischen dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (*Lowest*

Unoccupied Molecular Orbital, LUMO) und dem höchsten besetzten Molekülorbital (*Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO*) so gering, dass sichtbares Licht zur Anregung ausreicht.

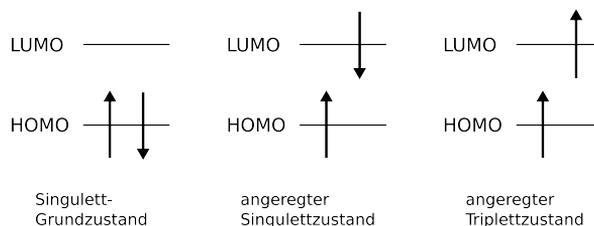


Abbildung 3.19: Elektronenspins für den Singulett- und Triplettzustand. *Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO) — Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO)*

Wie das Jablonski-Diagramm in Abbildung 3.20 zeigt, kann das Elektronensystem von Molekülen durch Energieaufnahme, d.h. hinreichende Absorption elektromagnetischer Strahlung, in einen angeregten Singulett-Zustand überführt werden. Dieser Vorgang ist sehr schnell und findet binnen 10^{-15} Sekunden statt [102]. Befindet sich das Elektron in einem höheren elektronischen Zustand als dem untersten angeregten Zustand, kann es durch Schwingungsrelaxation strahlungslos Energie abgeben, um den untersten angeregten Zustand zu erreichen. Bei Überlappen zweier Elektronenniveaus (z. B. S_1 und S_2) findet dann eine interne Umwandlung statt, wenn die Schwingungszustände des unteren Niveaus mit denen der höheren Niveaus angeregt werden können.

Die Fluoreszenz ist ein Vorgang des Übergangs vom untersten Niveau des angeregten Zustands in einen der Schwingungszustände des Grundzustands. Dabei wird elektromagnetische Strahlung in Form von Licht abgestrahlt. Dieser Vorgang ist nach $10^{-8} - 10^{-6}$ Sekunden abgeschlossen. Die Wellenlänge des dabei abgestrahlten Lichts ist zumeist größer, d.h. energieärmer, als das absorbierte Anregungslicht, mit dem die Elektronen auf die höheren Energieniveaus gebracht worden sind (Stokesverschiebung). Diese Stokesverschiebung bildet die Grundlage für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.

Zur Abgrenzung der Fluoreszenz von der Phosphoreszenz sei erwähnt, dass die Phosphoreszenz ihren Ursprung im Intersystem Crossing, beim Übergang von T_1 nach S_0 hat [103]. Übergänge bei denen Phosphoreszenz beobachtet werden kann, dauern in der Regel $10^{-3} - 10$ Sekunden. Diese Leuchterscheinung ist somit im Gegensatz zur Fluoreszenz auch noch lange nach einer Anregung beobachtbar.

Die Elektronen liegen im Grundzustand spingepaart (antiparallel) als Singulett

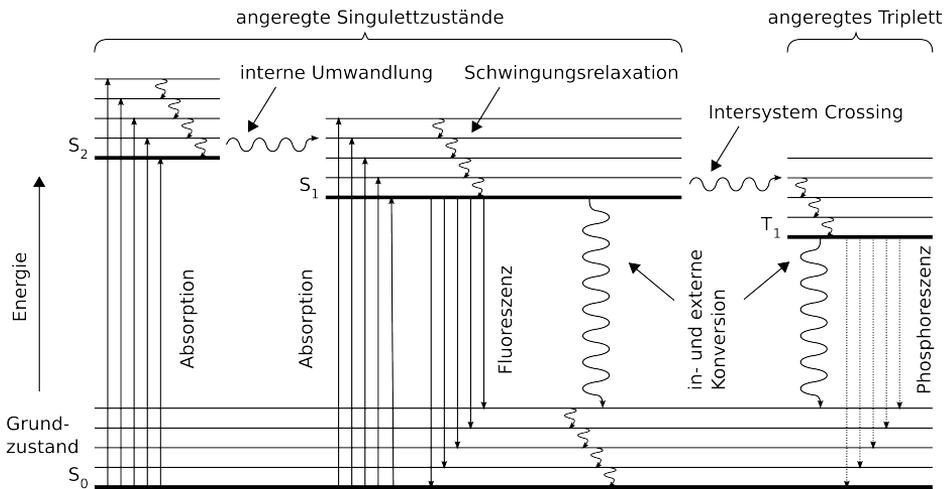


Abbildung 3.20: Jablonski-Diagramm. Dargestellt sind die Absorptions- und Emissionsvorgänge im Molekül. Es kann zwischen den Singulettzuständen (S_0 , S_1 , S_2) und den Triplettzuständen (T_1) unterschieden werden.

vor, im angeregten Triplett sind die Elektronenspins parallel ausgerichtet (siehe Abb. 3.19). Es gibt jedoch keinen Triplett-Grundzustand T_0 . Die Elektronen wären dann parallelen Spins. Da aber gemäß dem Pauli-Prinzip nie zwei Elektronen in allen Quantenzahlen (Haupt-, Neben-, Spin- und magnetische Quantenzahl) identisch sein können, müssten sich diese Elektronen bei gleichem Spin in zwei verschiedenen Orbitalen befinden [104].

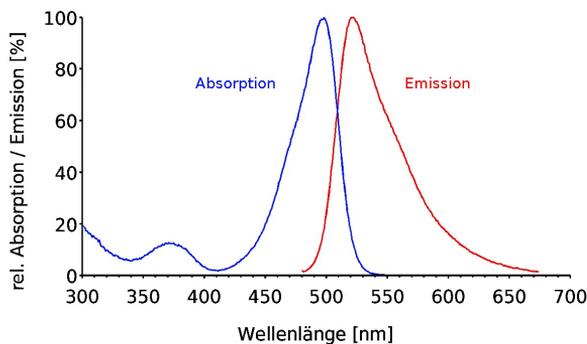


Abbildung 3.21: Absorptions- und Emissionsspektrum von SYBR-Green-I wenn es an dsDNA gebunden ist — Anregungsmaximum 494 nm; Emissionsmaximum 521 nm (Rohdaten aus: [105])

Die Fluoreszenzmikroskopie macht sich die Stokesverschiebung zunutze. Durch geschickte Wahl einer Filterpaarkombination ist es möglich, das Anregungslicht vom Emissionslicht des Farbstoffs zu trennen (vergl. Abbildung 3.21). In der Regel ist dies sehr gut durchführbar, wenn Absorptions- und Emissionsmaxima des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes genügend weit auseinanderliegen. Die Abbildung 3.22 veranschaulicht die Funktionsweise: Der fluoreszierende Stoff wird beispielsweise mit energiereichem blauem Licht, realisiert durch das erste Sperrfilter, angeregt. Das zweite Sperrfilter lässt nur den Wellenlängenbereich der Fluoreszenz passieren. Beobachtet wird in diesem Beispiel rotes, energieärmeres Licht.

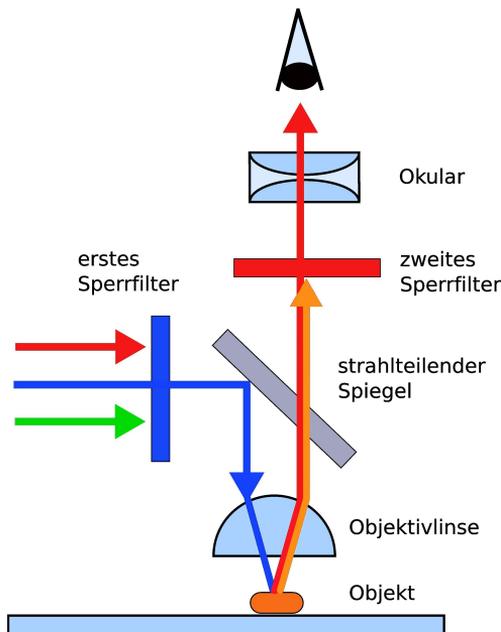


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenzmikroskopie

4 Material und Methoden

4.1 Methoden

Der Methodenteil soll alle für die Herstellung der Nanostrukturen notwendigen und bekannten Arbeitsschritte, vor allem aber das Konzept des jeweiligen Versuchsbausteins, darstellen. Jeder Arbeitskomplex wird mit einer kurzen theoretischen Einführung in das Thema eingeleitet und endet mit der hier erarbeiteten Versuchsvorschrift. Eine Übersicht der Einzelschritte bietet die Grafik in Abbildung 4.1. auf der nächsten Seite.

Neue Methoden, wie sie hier erstmals erarbeitet wurden, werden im Ergebnisteil ab Seite 60 dargestellt und diskutiert.

4.1.1 Funktionalisieren der Oberfläche

4.1.1.1 Silanisieren

Die Silanisierung ist eine Methode zur zielgerichteten Funktionalisierung von Oberflächen. Im vorliegenden Fall soll die Funktionalisierung eines Glasobjektträgers mit Aminogruppen beschrieben werden.

Die allgemeine Summenformel von oberflächenmodifizierenden Silanen lautet $R_{(4-n)}SiX_n$ ($n = 1, 2, 3$). Sie tragen eine aliphatische Gruppe R, welche eine für die jeweilige Anwendung spezifische Funktionsgruppe trägt. In Gegenwart von Wasser hydrolysieren Silane zu Silanolen $R_{(4-n)}Si(OH)_n$, welche thermisch sehr instabil sind und zu Polysiloxanen kondensieren. Diese Silanolgruppen können mit den Hydroxylgruppen der Glasoberfläche in Wechselwirkung treten, wobei sie in einer Kondensationsreaktion, d. h. unter Abspaltung von Wasser, Siloxanbrücken ausbilden.

Ein allgemeines Reaktionsschema zur Silanisierung kann der Abbildung 4.2 auf Seite 41 entnommen werden.

Für den hier vorgeschlagenen Weg bietet sich die Funktionalisierung der Glasoberfläche mit Aminogruppen an. Die Abbildung 4.3 zeigt die Formel des hierfür zum Einsatz kommenden Silans APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan). Die Abbildung 4.4

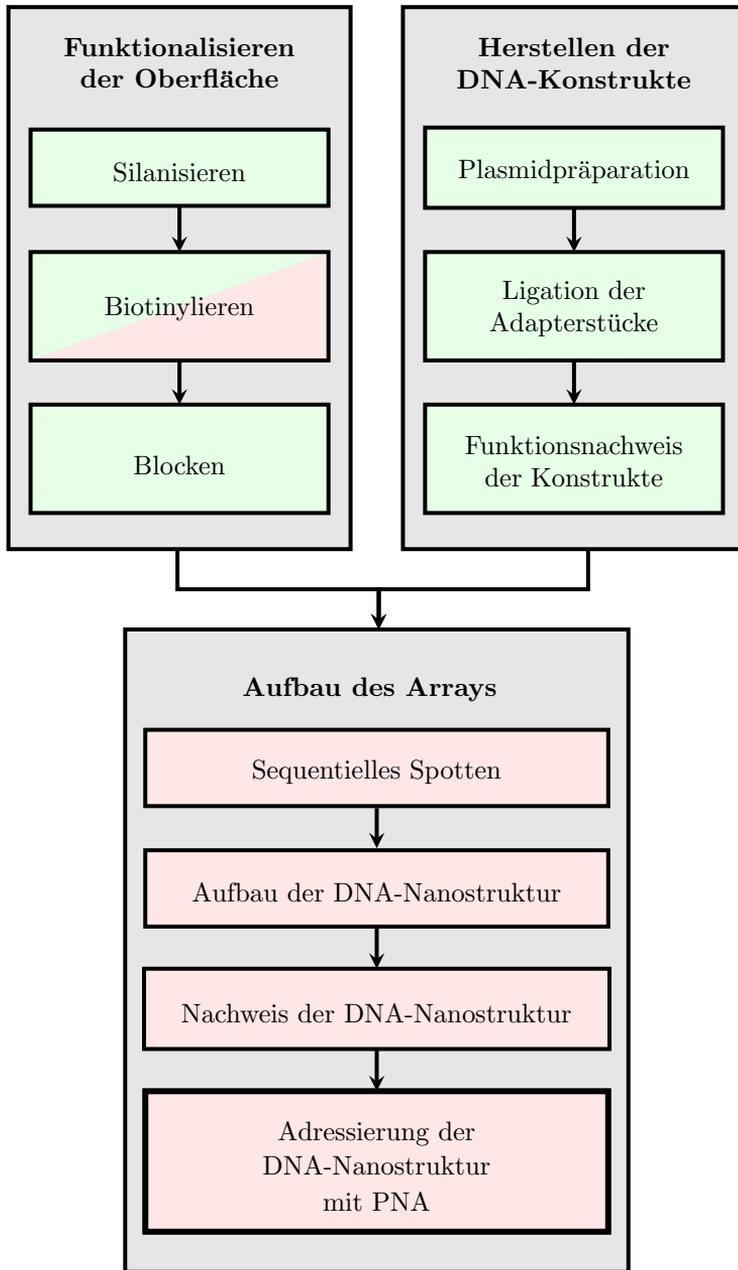


Abbildung 4.1: Versuchsablauf — auf bekannte Methoden beruhende Schritte in grün — im Rahmen dieser Arbeit erarbeitete, neue Methoden in rot

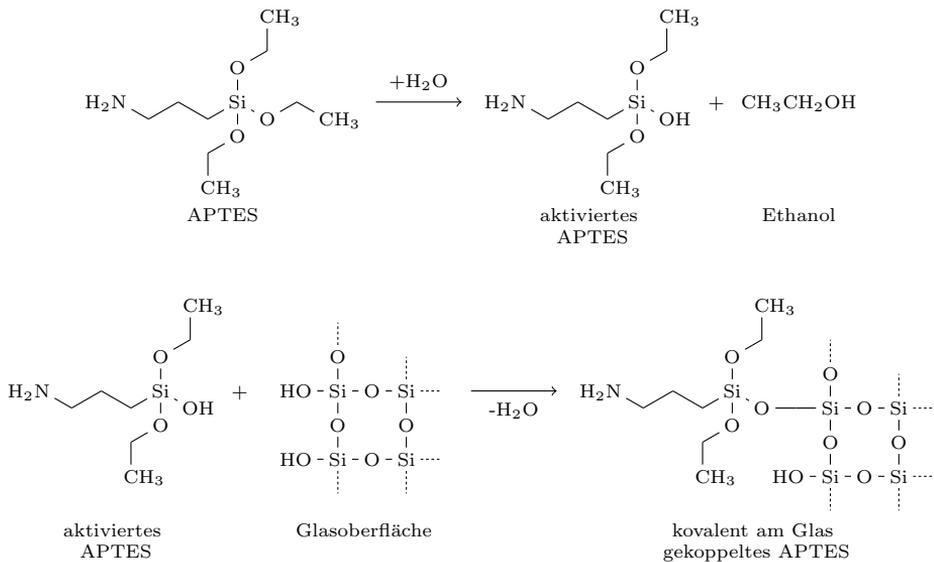


Abbildung 4.4: Reaktionsgleichung von APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) mit Glas

Durchführung: Für die Silanisierung ist es dringend notwendig, dass die zu silanisierende Glasoberfläche gründlich gereinigt wird. Bei den hier zum Einsatz kommenden Glasobjektträgern (Kalknatronglas) hat sich folgende Reinigungsprozedur bewährt: In eine Teflonhalterung wurden fünf Glasobjektträger eingespannt und in ein mit Aceton gefülltes Becherglas gestellt. Die Reinigung erfolgte für 15 Minuten im Ultraschallbad. Danach schloss sich der Reinigungsschritt mit Ethanol an. Dann wurden die Objektträger mit RE-Wasser gewaschen und für 60 Sekunden mit einer 10 M Natronlauge behandelt. Die gereinigten Objektträger wurden gründlich unter fließendem RE-Wasser abgespült und in einer Zentrifuge getrocknet (60 Sekunden bei rund $20\times g$).

Die Silanisierung der gereinigten und getrockneten Objektträger erfolgte in einem 1 l fassenden Becherglas, wobei $10\ \mu\text{l}$ APTES auf den Boden einer im Becherglas befindlichen Glaspetrischale gegeben wurde. Als Schutzgas kam Argon zum Einsatz. Das mit den Objektträgern beschickte Becherglas wurde mit Aluminiumfolie verschlossen. Die Silanisierung der Objektträger erfolgte für 60 Minuten bei $120\ ^\circ\text{C}$ im Heizschrank.

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine sogenannte Gasphasensilanisierung. Anders als bei der ethanolischen oder wässrigen Silanisierung, bei der das Silan in Ethanol bzw. Wasser vorliegt, kommt die zu silanisierende Glasoberfläche nicht mit

dem silanhaltigen Lösungsmittel in Kontakt. Der Grad einer möglichen Verunreinigung der Oberfläche ist somit gering. Der größte Vorteil der Gasphasensilanisierung ist die homogene Ausbildung der reaktiven Silanschicht. Bei den genannten Alternativmethoden besteht die Gefahr der Ausbildung eines unerwünschten Silanschichtgradientens.

4.1.1.2 Biotinylierung

Aufgrund dessen, dass die spezifische Interaktion zwischen Avidin und seinen Analoga Streptavidin und Neutravidin zu D-Biotin ausschließlich vom bicyklischen Ringsystem des D-Biotins abhängt, eignet sich die aliphatische Seitenkette des Biotins mit seiner Carboxylgruppe sehr gut für chemische Verknüpfungen zu anderen Molekülen.

So reagiert D-Biotin in Gegenwart von EDC (N-Ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid) mit primären Aminen unter Ausbildung einer Amidbindung. Der NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimid) des D-Biotins (vergl. Abbildung 4.5) reagiert sogar spontan mit Aminen (siehe hierzu Abbildung 4.6). Das NHS-Biotin stellt somit, als Biotinylierungs-Reagenz, die einfachste Art dar, andere Biomoleküle mit Aminogruppen zu modifizieren. Die Schwierigkeit in der Handhabung des NHS-Biotins besteht in seiner geringen Wasserlöslichkeit, weswegen dem Ansatz organische Lösungsmittel wie DMF (Dimethylformamid) oder DMSO (Dimethylsulfoxid) beizumischen sind. Als Alternative bietet sich Sulfo-NHS-Biotin an. Dieses Reagenz ist gut wasserlöslich und ermöglicht den Verzicht auf DMF oder DMSO (siehe Abbildung 4.5b). Sulfo-NHS-Biotin ist ein Analogon des NHS-Biotins, welches eine zusätzliche, negativ geladene Sulfonat-Gruppe am NHS-Ester trägt und somit eine erhöhte Wasserlöslichkeit des Biotins bewirkt.

Die Biotinylierung von Oberflächen ist in der Literatur wenig bekannt. Die Mengen an einzusetzenden Reagenzien können jedoch aus folgender Überlegung abgeleitet werden: Aus den Untersuchungen von WILLIAM et al. [106] geht hervor, dass der Abstand zweier benachbarter Aminogruppen ca. 0,4 – 0,8 nm beträgt. Wenn von einem mittleren Abstand von 0,5 nm ausgegangen wird, ergibt dies eine Dichte von rund $4 \cdot 10^{18}$ Aminogruppen je Quadratmeter, was einem Konzentrationsäquivalent von $6,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ entspricht. Bei bekanntem Objektträgermaß von $75 \text{ mm} \times 25 \text{ mm} \cdot 2$ Seiten und gegebener molarer Masse des einzusetzenden Sulfo-NHS-Biotin von 443 g/mol ergibt dies rund $11 \mu\text{g}$ Sulfo-NHS-Biotin je Objektträger. Dies gilt, wenn davon ausgegangen wird, dass jede oberflächengebundene Aminogrup-

pe mit einem Sulfo-NHS-Biotin in idealer 1:1 Stöchiometrie und vollständigem Stoffumsatz reagiert. In [96] wird zur Biotinylierung eines Proteins ein 12 bis 20-facher molekularer Überschuss an Biotinylierungsreagenz vorgeschlagen. Im Gegensatz zu Proteinen sind die hier angesprochenen Aminogruppen zwar nicht beweglich, was die Reaktionsgeschwindigkeit reduziert, jedoch sehr gut zugänglich und endständig. Daher wurde hier im ca. 3,6-fachen Überschuss gearbeitet. Das Sulfo-NHS-Biotin ist zwar wasserlöslich, neigt jedoch bei Anwesenheit von Wasser zur Hydrolyse. Der in Wasser gelöste NHS-Ester ist aus diesem Grunde nicht lange haltbar und muss rasch verwendet werden. Zur besseren Handhabung wurde die Stammlösung nicht wie üblich in Wasser, sondern in DMSO angesetzt. Die Hydrolyse ist in DMSO ausgeschlossen und das Reagenz kann als Lösung abgemessen zur Reaktion gebracht werden. Die Konzentration an Sulfo-NHS-Biotin in der Stammlösung betrug 20 mg/ml.

Durchführung: Direkt nach dem Silanisieren wurden die Glasobjektträger biotinyliert und anschließend zum Abkühlen in eine Corning-Versandbox gegeben. Diese diente gleichzeitig als Reaktionskammer zur Biotinylierung. In dieses Reaktionsgefäß

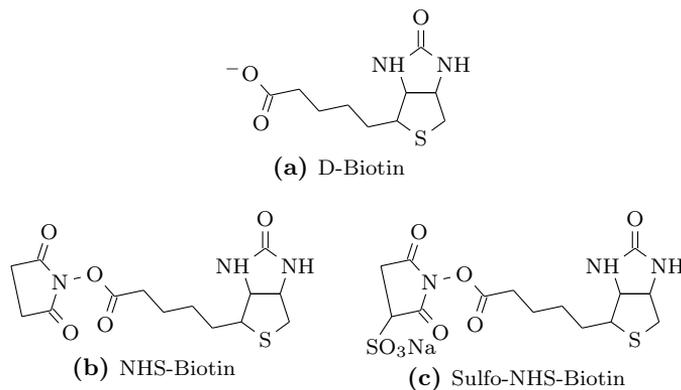


Abbildung 4.5: D-Biotin und Biotinmodifizierungen als Funktionsgruppen

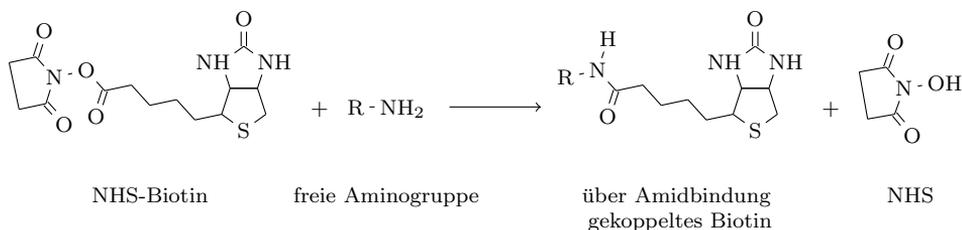


Abbildung 4.6: Kopplung des NHS-Biotins über die aktivierte Estergruppe an die freie Aminogruppe unter Ausbildung einer Amidbindung

wurden 21 ml Biotinpuffer (siehe Tabelle .5 auf Seite 96), 5 μ l Biotin-Stammlösung (20 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin in DMSO) und eine kleine Spatelspitze EDC gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Die Inkubationszeit betrug bei Raumtemperatur drei Stunden und wurde durch Waschen mit PBS-Puffer beendet.

4.1.1.3 Blocken

Die Oberfläche des Glasobjektträgers wurde biotinyliert. Durch Blocken wird erreicht, dass nur noch die auf der Oberfläche immobilisierten Biotinmoleküle mit potentiellen Bindungspartnern in Wechselwirkung treten können. Unerwünschte unspezifische Bindungen zwischen der DNA und Oberfläche beruhen zum einen auf elektrostatischen Wechselwirkungen und zum anderen, vor allem im konkreten Fall, auf den nicht abreagierten Aminogruppen der silanisierten Oberfläche. Diese Aminogruppen tragen in wässriger Lösung als sogenannte Lewis-Base, durch Anlagerung eines Protons, eine positive Ladung und wechselwirken somit mit der negativ geladenen DNA.

Zum Zwecke des Blockens stehen drei prinzipielle Verfahren zur Auswahl: a) die kovalente Kopplung, d.h. Binden eines Reaktionspartners ohne weiteres Wechselwirkungspotential. Sie kann um eine Ladungsumkehr ergänzt werden und so z. B. durch eine negative Ladung das negativ geladene DNA-Rückgrat abstoßen; b) elektrostatische Wechselwirkung — unter anderem Abschirmen positiver Ladungen mit Tensiden und c) die Passivierung durch hydrophobe Wechselwirkung — z. B. durch Adsorption größerer unpolarer Moleküle wie Casein.

Durchführung: Zunächst wurde eine 0,1 % (w/v) Blockierungs-Lösung (Blocking-Reagenz CA — Passivierung durch hydrophobe Wechselwirkung) in 100 mM Tris-Cl-Puffer frisch angesetzt. Zum Auflösen des Blockierungs-Reagenz wurde die Lösung unter Rühren auf ca. 60 °C erhitzt. Nachdem sich die Blockierungs-Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt hatte, wurden die biotinylierten Glasobjektträger für 60 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Danach konnten die geblockten Objektträger mit 100 mM Tris-Cl-Puffer und anschließend VE-Wasser abgespült und im Stickstoff-Strom getrocknet werden. Eine besondere Lagerung oder Einschweißen war nicht erforderlich.

4.1.2 DNA als Konstruktionselement

4.1.2.1 Herstellung der DNA-Konstrukte

Als Ausgangsmaterial für das DNA-Konstrukt dient das Plasmid M13mp18. Es ist ein doppelsträngiger, kovalent geschlossener zirkulärer Vektor aus 7250 Basenpaaren. Ab der Position 6217 befindet sich eine 100 bp lange Sequenz, die sogenannte *multiple cloning site* (MCS, auch Polylinker). Sie besteht aus einer Reihe von designten, nahe beieinanderliegenden Erkennungssequenzen, welche ein einmaliges Schneiden des Plasmids ermöglicht.

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, welche als Teil des bakteriellen Abwehrsystems gegen eingedrungene Bakteriophagen DNA erkennen und spalten können. Sie lassen sich in drei Typen gliedern, wobei Typ II eine besondere technologische Bedeutung zukommt. Dieser Typ schneidet innerhalb einer 4 – 8 Nukleotide umfassenden, palindromischen Basensequenz, wohingegen Typ I 1000 und Typ III 5 – 20 Nukleotid-Bausteine von der Erkennungssequenz entfernt schneiden. Durch das Schneiden entstehen, abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym, entweder glatte oder kohäsive 5'- bzw. 3'-Enden.

Ligasen kommen dann zum Einsatz, wenn zwei DNA-Enden miteinander verbunden werden sollen. Die aus dem Phagen T4 gewonnene Ligase vermag glatte als auch stumpfe DNA-Enden doppelsträngiger DNA zu verbinden, wenn dabei eine Doppelhelix gebildet werden kann. Voraussetzung für die Ligation ist eine freie OH-Gruppe am 3'-Ende der einen DNA-Kette und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der anderen. Für die Verknüpfungsreaktion ist Energie in Form von ATP erforderlich.

Durchführung: Der erste Schritt besteht darin, die zukünftigen Adapterstücke zu generieren. Hierfür wurden die Oligonukleotide M13-LF5, M13-LcF5, M13-M2-F11, M13-M2-cF11, M13-RF6, M13-RcF6, M13-M1-F10 und M13-M1-cF10 in Tris-Cl so zusammengegeben, dass ihre jeweils resultierende Konzentration 5 μ M betrug. Aus der gewählten Nomenklatur der Oligonukleotide geht hervor, welche Oligonukleotide jeweils ein Paar bilden und hybridisieren: So gehört M13-LF5 zu M13-LcF5, um M13-L5 zu bilden. Die Abbildung 4.7 zeigt den vollständigen Ablauf der Synthese. Ihr kann die Oligonukleotidpaarung entnommen werden. Die Hybridisierung wurde mit dem Aufheizen der gepaarten Oligonukleotide auf 90 °C für 5 Minuten eingeleitet. Das langsame Abkühlen bis auf Raumtemperatur erfolgte mit einer Abkühlrate von 1 K/min. Eine Basenfehlpaarung der vollständig komplementären Oligonukleotide kann des Aufheizens und langsamen Abkühlens wegen nahezu ausgeschlossen werden.

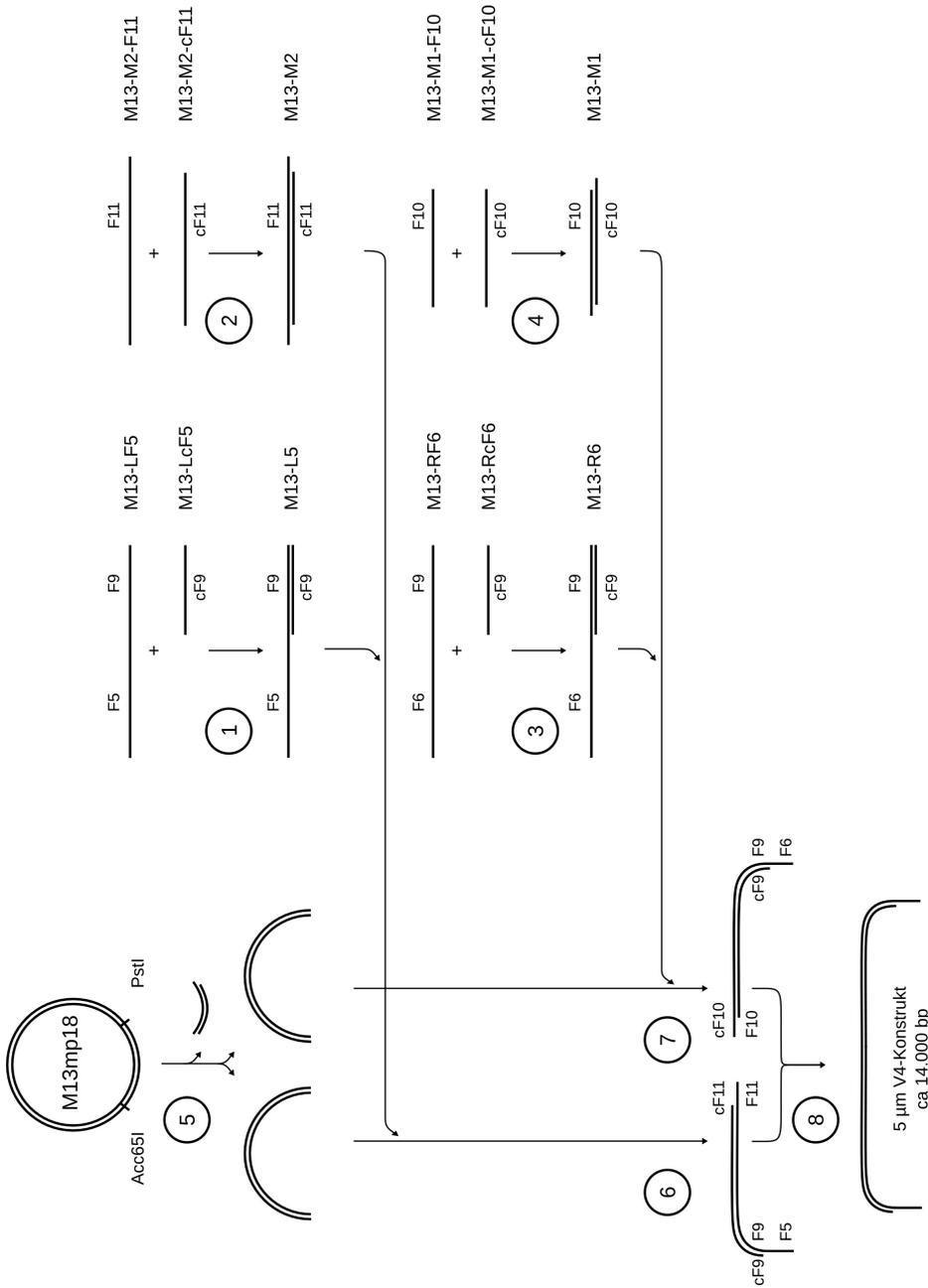


Abbildung 4.7: Syntheseweg zur Herstellung eines 5 μm langen DNA-Konstrukts, welches an seinen Enden je ein einzelsträngiges Adapterstück trägt — Punkte 1 – 4: Hybridisieren der Endstücke; Punkt 5: Erzeugen zweier unterschiedlicher Enden durch Herausschneiden eines kleinen DNA-Stücks; Punkte 6 u. 7: Ligation der Adapterstücke an die DNA; Punkt 8: Hybridisierung beider DNA-Teilstücke zu einem 5 μm langen Gesamtkonstrukt (Größenverhältnisse nicht berücksichtigt) (publiziert in [107])

M13mp18-Vektor, 12 µl NEB-Puffer-3, 4 µl Wasser, 1,2 µl BSA, 1 µl PstI, 1 µl Acc65I und 1 µl BamHI. Das zusätzliche Restriktionsenzym BamHI dient dazu, das kleine Stück von 30 bp in der Mitte zu zerteilen, um es zum einen im Reinigungsschritt noch wirksamer vom großen DNA-Strang abtrennen zu können, und zum anderen, um es so zu zerstören, dass es für den Fall des unvollständigen Entfernens in Testversuchen kein falsch positives Ergebnis liefert. Der Restriktionsverdau fand für 2 Stunden bei 37 °C statt und wurde durch Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C beendet. Das Abtrennen des unerwünschten DNA-Stücks und das gleichzeitige Entfernen der Restriktionsenzyme geschah mit dem von der Firma Bionline angebotenen Reinigungssystem „SureClean“. Eine Kontrollmessung vor und nach dem Reinigungsschritt mit dem Nanodrop-Photometer erlaubt eine Aussage über den Reinigungserfolg bzw. zur Ausbeute. Die aufgereinigte DNA wurde in 100 µl TE-III-Puffer resuspendiert und in zwei gleich große Teile aufgeteilt.

Die Ligation fand, wie in den Schritten 6 und 7 in Abbildung 4.7 dargestellt, in zwei Ansätzen A (links) und B (rechts) statt. In 50 µl des zuvor im Restriktionsverdau geschnittenen Ansatzes A wurden je 8 µl M13-L5 und M13-M2 gegeben. In den Ansatz B wurde die gleiche Menge an M13-R6 und M13-M1 hinzugefügt. Zur Unterstützung der Hybridisierung der Endstücke wurden beide Ansätze für 30 Minuten bei 40 °C, 30 Minuten bei 30 °C und anschließend 10 Minuten bei 20 °C inkubiert. Bevor die Ansätze A und B für gut 5 Minuten zum Abkühlen in den Kühlschrank (4 °C) kamen, wurden sie mit je 7,3 µl zehnfach konzentriertem Ligase-Puffer ergänzt. Anschließend wurden die Lösungen in je 6 kleinere Portionen, auf Eis stehend, aufgeteilt und zu jeder Portion je 1 µl T4-Ligase gegeben. Die Ligation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

Aufgrund der angenommenen Fragilität der erhaltenen Konstrukte wurde die Ligation nicht mittels Erhitzen, sondern durch Entzug der Ligase und der nötigen Puffersalze aus der Lösung beendet. Die Aufreinigung fand mit dem Reinigungssystem SureClean von Bionline nach Protokoll statt. Das Produkt (Konstrukt A und B) wurde in je 60 µl TE-III-Puffer aufgenommen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.1.2.2 Gelelektrophorese

Die negative Ladung des Phosphat-Zucker-Rückgrats der DNA kann bei der Gelelektrophorese zur Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente genutzt werden. Verallgemeinernd lässt sich sagen, dass die negativ geladenen Anionen zur positiv geladenen Anode und die positiv geladenen Kationen zur negativ geladenen Kathode wandern werden, wenn eine elektrische Spannung zwischen Anode und Kathode

anliegt. Dabei wandern kleinere, geladene Moleküle schneller als größere. Um die DNA, welche in diesem Fall als Anion betrachtet werden kann, sinnvoll aufzutrennen, wird sie in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit gehindert, indem man sie durch eine Gel-Matrix laufen lässt. Agarosegele sind äußerst einfach in der Handhabung und erlauben das Einstellen der Maschenweite des Gels über die Agarosekonzentration. Hochprozentige Agarosegele eignen sich somit für relativ kurze DNA-Fragmente, und niederprozentige Gele für entsprechend größere.

Die optische Auswertung des Gels erfolgt mit Hilfe der Fluoreszenzanregung des in die DNA interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid. Dabei handelt es sich um ein planares Molekül mit aromatischem Ringsystem, welches sich zwischen die in der DNA gestapelten Basenpaare einlagert.

Durchführung: Für die hier vorkommenden DNA-Längen eignet sich ein 0,5 %-iges Agarosegel: Dazu wurde 0,15 g Agarose in 30 ml TBE-Puffer kochend in der Mikrowelle aufgelöst, ein Tropfen Ethidiumbromid in die heiße Lösung getropft und die noch heiße Lösung in die Gelkammer eingebracht. Optimale Ergebnisse wurden erzielt, wenn zum Aushärten des Gels dieses bereits am Vortag angesetzt wurde. Die Beladung des Gels erfolgte gemäß der Anleitung zum Größenstandard. Bei 10 V/cm (hier 70 V) war die Auftrennung der DNA nach zwei Stunden soweit abgeschlossen, dass der hier interessante Bereich um die 14 kbp gut auswertbar gewesen ist.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Funktionalisieren von Glasoberflächen

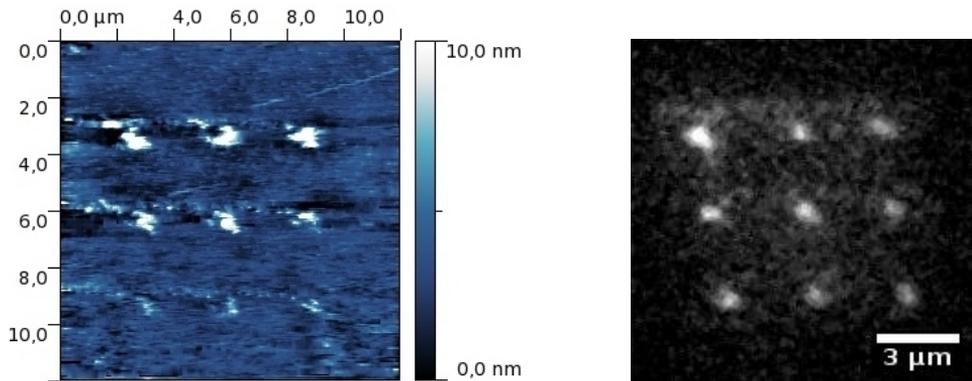
Die Grundvoraussetzung zur biomolekularen Nanostrukturierung auf Oberflächen ist die orts aufgelöste Immobilisierung von Biomolekülen, welche die Funktionsbasis der aufzubauenden Struktur darstellen. Im vorliegenden Abschnitt werden die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Versuchsreihen dargestellt, die darauf abzielen, funktionale Ankergruppen auf einen festen Träger durch Immobilisierung anzuordnen.

5.1.1 Epoxygruppen basierende Kopplung

Zu Beginn der Experimente fand die etablierte Dip-Pen Nanolithographie Anwendung (siehe Abschnitt 3.1). Ihr Grundgedanke wurde für die Aufgabenstellung angepasst.

Die Abbildung 5.1a zeigt eine AFM-Aufnahme eines 3×3 Arrays, welches unter Anwendung der Dip-Pen Nanolithographie entstand. Dafür wurde die AFM-Spitze mit einem in DMSO gelösten aminogruppenmodifizierten Oligonukleotid beladen. Die Glasoberfläche wurde mit Epoxygruppen funktionalisiert, so dass sich zwischen den Aminogruppen der Oligonukleotide und den Epoxygruppen der Oberfläche eine kovalente Bindung ausbildete. An diese wurden die zur Hybridisierung befähigten Oligonukleotide immobilisiert. Die Kontaktzeit für jeden Spot betrug hier je 2 Minuten (Reihenfolge der Auftragung in Leserichtung — Anfang: obere Reihe, linker Spot; Ende: untere Reihe, rechter Spot). Die Abbildung 5.1b zeigt die Erweiterung des Versuches, indem ein solches Array nach dem Deponieren mit einem komplementären Cy3 markierten Gegenstrang hybridisiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurde. Auch hier ist eine schrittweise Abnahme des Fluoreszenzsignals von Spot zu Spot erkennbar. Die Abbildung 5.2 zeigt die graphische Auswertung der relativen Fluoreszenzsignale der Spots dieser Abbildung und deutet auf eine Abnahme der abgegebenen bzw. immobilisierten Substanzmenge hin. Insgesamt schwankt die abgesetzte Substanzmenge sehr stark.

5.1 Funktionalisieren von Glasoberflächen



(a) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der in DMSO vorgelegten aminogruppenmodifizierten Oligonukleotide.

(b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Cy3-Gegenstrang-hybridisierung

Abbildung 5.1: Klassischer Dip-Pen-Versuch eines 3×3 Arrays mit DMSO als Tintenbasis. Benutzt wurden Corning-Glasobjektträger mit Epoxidgruppenfunktionalisierung (abgebildet sind zwei verschiedene Proben).

Wie vorangegangene Untersuchungen zeigten [108], kann die Abnahme des Spotdurchmessers über eine angepasste Oberflächen-Kontaktzeit in gewissem Maße kompensiert werden. Bei einer minimal notwendigen Kontaktzeit von 2 Minuten für den ersten Spot wüchse der Zeitbedarf für ein einzelnes aus einer Substanz bestehenden Array rapide an und würde für 9 Spots 41 Minuten in Anspruch nehmen. Der Zeitbedarf wächst bei einem Spotgrößenausgleich über die Kontaktzeit exponentiell an.

Neben der eingangs formulierten Schwierigkeit, Mehrkomponenten-Arrays mit der

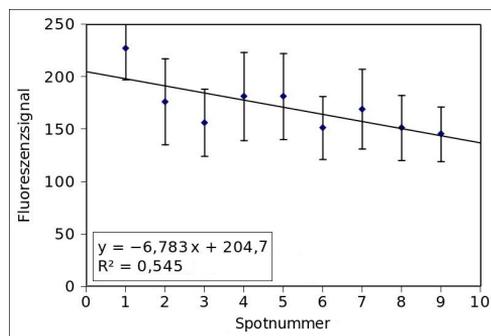


Abbildung 5.2: Auftragung der relativen Fluoreszenzsignale der Spots aus Abbildung 5.1b — Punktnummer 1 befindet sich links oben, Nummerierung in Leserichtung des Arrays

DPN herzustellen, konnte ferner die Rolle des Salzgehaltes in der Tintenlösung nicht eindeutig geklärt werden. In Abbildung 5.3 ist exemplarisch ein Versuchsergebnis dargestellt. Bei Anwesenheit von MgCl_2 in der abzusetzenden Tintenlösung kommt es unter Beibehalt aller Parameter, insbesondere der Kontaktzeit, nicht nur zu einer deutlich vermehrten Substanzabgabe und somit Spotfläche bei konstanter Kontaktzeit, sondern auch zu nicht zuordenbaren Störungen des im Anschluss gewonnenen topographischen Signals der Oberfläche.

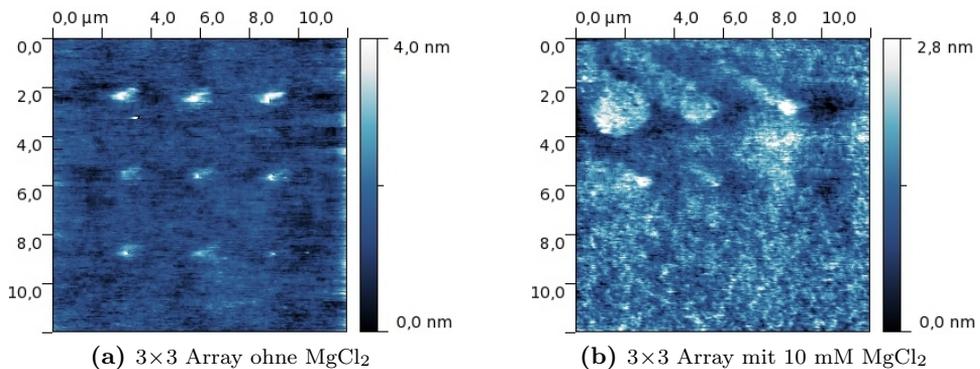


Abbildung 5.3: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen des Dip-Pen-Versuches auf Glas ohne und mit MgCl_2 in der auf DMSO basierenden Tinte

Die Notwendigkeit zur Erarbeitung eines neuen Verfahrens zur biomolekularen Nanostrukturierung ergibt sich aus dem mit der DPN einhergehenden apparativen Aufwand zur Immobilisierung mehrerer Substanzen. Hinzu kommt die aufwendige Oberflächenbehandlung und die erforderliche Einhaltung enger Klimaparameter. Zusätzlich besteht ein Bedarf an einer kostengünstigen Lösung für die Nanostrukturierung.

Das zu erarbeitende Verfahren sollte darüber hinaus dazu in der Lage sein, mit relativ geringem Aufwand, mehrere beliebige Biomoleküle im unteren Mikrometermaßstab zu positionieren und zu immobilisieren. Dabei wurde größtes Augenmerk auf die Reproduzierbarkeit gelegt, da dieses Verfahren dem eigentlichen Hauptversuch, DNA gerichtet aufzuspannen, stets vorausgehen wird. Es besteht bis zum letzten Schritt in der Prozesskette keine Möglichkeit, den erfolgreichen Aufbau des Arrays zu kontrollieren.

Schließlich stellte sich die Frage, ob es erforderlich ist, Substanzen im Nanometermaßstab abzusetzen, wenn das primäre Ziel die orts aufgelöste Immobilisierung von

DNA ist. Überdies sollte das Verfahren so robust sein, dass es bei Einhaltung einer überschaubaren Anzahl an kontrollierbaren Parametern zuverlässig arbeitet und vorhersagbare Ergebnisse liefert. Die nachgeschalteten Versuchsreihen sind hinsichtlich ihrer Reaktionsbedingungen limitiert und der Parameterraum für erfolgreiches Deponieren darf nicht zum einengenden Faktor der nachfolgenden Untersuchungen werden.

5.1.2 Biotin-Neutravidin basierende Kopplung

Zur Überwindung der in Kapitel 2.3 auf Seite 15 vorgestellten Problematik wurde die in 4.1.1.2 auf Seite 43 dargestellte Methode zur Funktionalisierung der Glasoberfläche mit Biotin erarbeitet. Eine praktikable Testreihe zur Überprüfung des Biotinylierungsvorgangs kann mit einem Biotin-Neutravidin-Biotin-Sandwichassay durchgeführt werden. Damit lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob sich Neutravidin als mehrarmiges Bindeglied für die Problemlösung eignet.

Hierzu wurden Lösungen an fluoreszenzmarkiertem Biotin zu Neutravidin, in verschiedenen Mengenverhältnissen, auf Mikroarrays hergestellt und das resultierende Fluoreszenzsignal mit einem Microarrayscanner ausgelesen. Dabei tritt Neutravidin, wie in Abbildung 5.4 gezeigt, als Bindeglied zwischen der Oberfläche und dem Fluorophor auf. Die Menge an Neutravidin ist so gewählt, dass u. a. auch Lösungen aufgetragen werden, bei denen alle vier Bindungsstellen des Neutravidins mit Biotin abgesättigt sind und das Neutravidin nicht dazu in der Lage ist, an die biotinylierte Oberfläche des funktionalisierten Trägers zu binden. Um die optimale Neutravidin-Konzentration zu ermitteln, wurde zu den Lösungen biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffs gleicher Konzentration eine variable Menge Neutravidin gegeben.

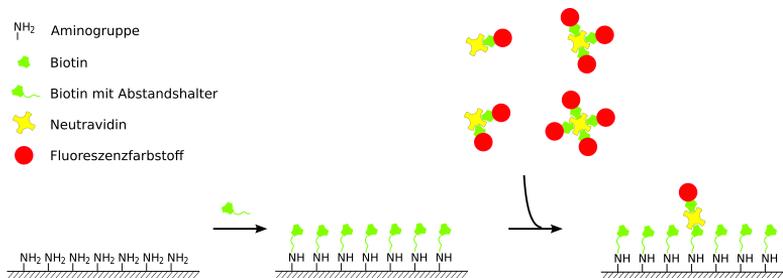


Abbildung 5.4: Veranschaulichung des Biotin-Neutravidin-Bindungstests

Die Tabelle 5.1 listet die Varianten des in Abbildung 5.4 dargestellten Tests auf. Die Vorgehensweise listet unter Variante a stellt sich wie folgt dar: Als Erstes werden mit

APTES Aminogruppen kovalent an die Oberfläche gebunden, gefolgt vom Biotinylieren mit NHS-Biotin, welches über die Aminogruppen eine Amidbindung ausbildet. Daran schließt sich das Abblocken unerwünschter Bindungen an.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5.5a zu sehen. Bei einer Neutravidinkonzentration ab 100 $\mu\text{g/ml}$ kommt es zu einer Sättigung, was der berechneten Absättigung aller vier Bindungsstellen des Neutravidins entspricht. Bei diesem Punkt lagen 100 μl einer 500 nM Biotin-Lösung und 7,5 μl einer 100 $\mu\text{g/ml}$ Neutravidin-Lösung vor.

Beim Vorgehen nach Variante b, bei der auf das Blocken verzichtet wurde, lässt sich gemäß Abbildung 5.5b feststellen, dass es neben der gewünschten Bindung zwischen Biotin und Neutravidin zu unspezifischen Bindungsereignissen kommt — erkennbar am durchgängig hohen Fluoreszenzsignal.

Die Ergebnisse bei alleiniger Silanisierung, d. h. ganz ohne weitere Funktionalisierung und ohne Blocken (Variante c), sind in Abbildung 5.5c dargestellt. Dabei zeigt sich durchgehend ein hohes Fluoreszenzsignal (man beachte die Einteilung der Ordinate im Diagramm der Abbildung 5.5c). Das bedeutet, dass es zu einer starken unspezifischen Bindung an die Oberfläche kommt.

Bei Variante d wurde nach dem Silanisieren geblockt, das Signal ist niedriger als ohne Blocken, zeigt jedoch keine einheitliche Tendenz. Wenn wie in Variante e die Biotinylierung ohne vorherige Silanisierung durchgeführt wird, so erhält man durchgängig keine Fluoreszenzsignale und ein Diagramm mit Werten auf der Basislinie (Diagramm nicht dargestellt).

Die Varianten f und g werden in der Tabelle 5.1 nur der Vollständigkeit halber aufgelistet. Ihr Beitrag zur Beantwortung der Frage, nach dem Funktionieren des Assays bzw. dem Sandwich-Aufbaus wäre nicht signifikant.

Aus dem Versuch kann geschlussfolgert werden, dass die Biotinylierung gemäß

Tabelle 5.1: Biotin-Neutravidin Bindungstest

Variante	APTES	Blocken 1	Biotin	Blocken 2
a	+	-	+	+
b	+	-	+	-
c	+	-	-	-
d	+	+	-	-
e	-	-	+	-
f	+	+	+	-
g	+	+	+	+

dem Protokoll (siehe Seite 43) funktioniert und das resultierende Fluoreszenzsignal auf der Bindung von Biotin und Neutravidin beruht. Es handelt sich demnach um ein Biotin-Neutravidin-Biotin Sandwichassay, bei dem Neutravidin als sogenannter „Linker“ fungiert. Das in Variante a beobachtete Fluoreszenzsignal ist somit auf das kombinierte Binden der oberflächengebundenen Biotinmoleküle und den biotinylierten Farbstoffmolekülen zurückzuführen.

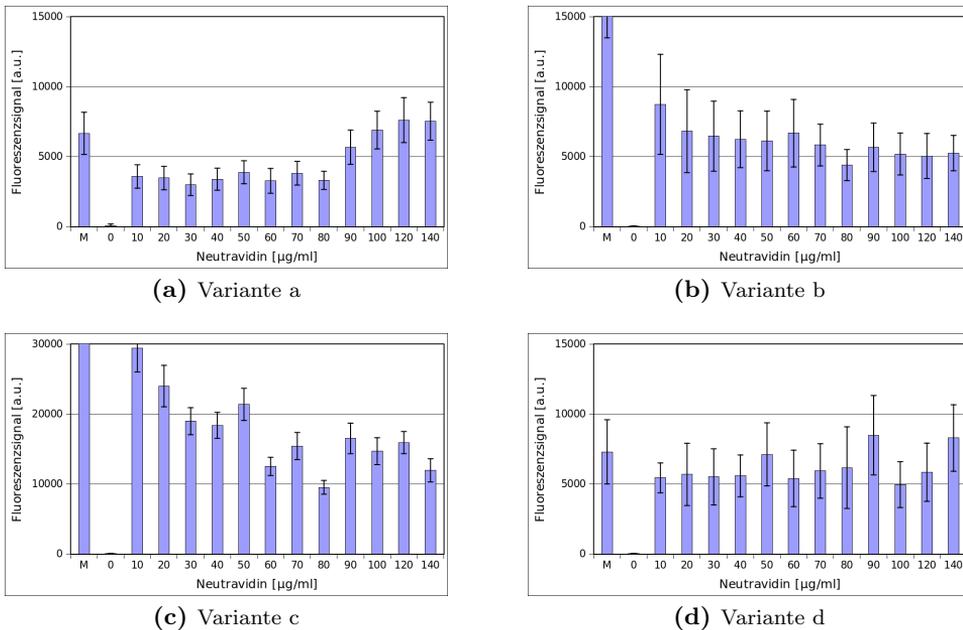


Abbildung 5.5: Fluoreszenzsignale des Biotin-Neutravidin Bindungstests — siehe Tabelle 5.1 und Erläuterungen im Text (M = Marker)

5.1.3 AFM-gestütztes Deponieren von Neutravidin

Im vorangegangenen Abschnitt wurde experimentell nachgewiesen, dass Neutravidin als Verbindungsglied zweier verschiedener Spezies eingesetzt werden kann. Die darin erarbeiteten Kenntnisse sollen jetzt, mit dem Ziel der orts aufgelösten Immobilisierung von Biomolekülen, auf das Rasterkraftmikroskop übertragen werden. Ziel ist es, einen biotinylierten Fluoreszenzfarbstoff nach dem rasterkraftmikroskopisch gestützten Deponieren von Neutravidin auf eine funktionalisierte Oberfläche zu immobilisieren.

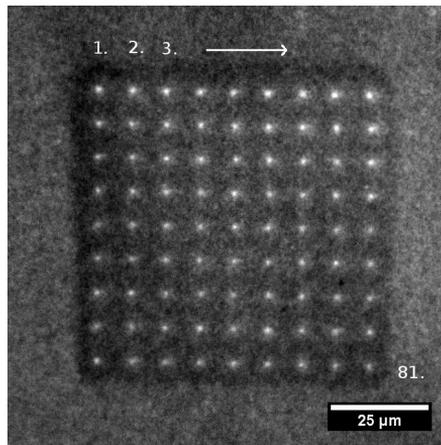


Abbildung 5.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 9×9 Array auf einem Glasobjektträger — zu sehen ist der fluoreszenzangeregte Farbstoff DY-547-Biotin — Filter ii (publiziert in [109])

Die Abbildung 5.6 zeigt ein 9×9 Array. Darin wurde auf einer biotinylierten Glasoberfläche und einer neutravidinhaltigen Tinte auf Glycerin-Basis, Neutraavidin in einem Durchgang abgesetzt (siehe Durchführung in 5.2 auf Seite 60). Anschließend wurde der biotinmarkierte Fluoreszenzfarbstoff DY-547-Biotin auf das erzeugte Feld aufgetragen, inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Der Mittelpunktabstand der Spots beträgt $9 \mu\text{m}$.

In der Mikroelektronik wird Silizium in Form von polierten Wafern als Basismaterial von integrierten Schaltkreisen benutzt. Chemisch gesehen besteht praktisch zwischen der Oberfläche des langsam durch Luftsauerstoff oxidierten Siliziums und Glas kein Unterschied. Durch thermische Oxidation oberhalb von $900 - 1100 \text{ }^\circ\text{C}$ kann die durch Diffusion limitierte Oxidation stark beschleunigt und unter Laborbedingungen zum definierten Oxidschichtaufbau an der Siliziumoberfläche genutzt werden. Die Abbildung 5.7 zeigt das Ergebnis eines Spottingversuches auf einem Siliziumwafer, welcher thermisch oxidiert und anschließend wie unter 4.1.1.2 auf Seite 43 beschrieben in gleicher Weise, analog zu einem Glasobjektträger, mit Biotin funktionalisiert wurde.

Obwohl polierte Siliziumwafer extrem glatt und nahezu frei von Störungen sind, und dadurch die Gefahr von unspezifischen Bindungen auf ein Minimum reduziert wäre, konnte das vielversprechende Ergebnis aus Abbildung 5.7 nicht auf die Verwendung von DNA ausgeweitet werden. Es ließ sich nach einer Hybridisierung keine DNA nachweisen. Der hier verwendete Wafer ist mit Phosphor n-dotiert und somit

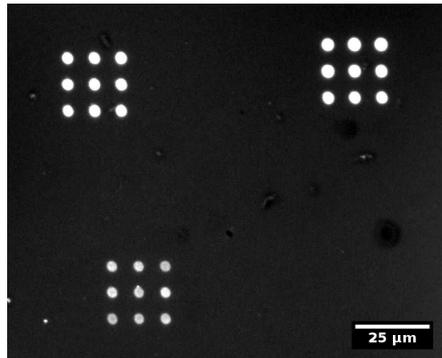


Abbildung 5.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Serie von 3×3 Arrays auf einem mit n-dotierten Silizium-Wafer (angeregter DY-547-Biotin Farbstoff — Filter ii)

wie die DNA selbst negativ geladen. Es wird jedoch angezweifelt, dass der hier vorliegende Dotierungsgrad von rund einem Donator je 10^7 Si-Atomen ausreichend ist, um einen effektiv wirksamen Abstoßungseffekt zwischen dem n-Silizium (welches zudem eine mehrere Mikrometer dicke Oxidschicht aufweist) und der DNA auszuüben. Trotz des Nichtfunktionierens mit DNA erscheint die Möglichkeit, Biomoleküle auch auf reinem Silizium zu immobilisieren interessant genug, um es an dieser Stelle der Arbeit zu erwähnen, zumal es experimentell bestätigt werden konnte.

5.1.4 Blocken der Oberfläche

Beim Blocken der Oberfläche handelt es sich um einen Arbeitsschritt, durch den gewährleistet ist, dass möglichst keine anderen als die gewünschten Bindungen zwischen den Funktionsgliedern eingegangen werden.

Prinzipiell wird immer dann geblockt, wenn eine unerwünschte Bindung unterdrückt werden soll, oder ein ungenügend abreagierte Bindungspartner, unschädlich gemacht werden soll (Näheres siehe Kapitel 4.1.1.3 auf Seite 45).

Zunächst stellte sich die Frage, an welcher Stelle des Arbeitsablaufes das Blocken zu erfolgen hat. Es kann direkt nach der Biotinylierung stattfinden, aber auch nach dem Auftragen des Neutravidins, vor oder nach jeder Inkubation des zu immobilisierenden Adressmoleküls, oder erst vor dem Auftragen des DNA-Konstrukts. Das Blocken direkt nach der Biotinylierung stellte sich dabei als günstig heraus.

Da für die Passgenauigkeit während des späteren Deponierens und Adressierens ein schonender Umgang mit der Oberfläche vorausgesetzt wird, ist dies auch aus praktischen Gründen vorteilhaft.

Getestet wurden eine 0,1 % (w/v) CA-Applichem-Lösung in 100 mM Tris-Cl, eine 1× Rotiblock-Lösung, eine 1 % (w/v) BSA-Lösung mit 0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) und eine 1 % (w/v) Blocking-Lösung der Firma Rosch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 zu sehen und untermauern die Entscheidung zugunsten des auf Casein basierenden Blocking-Reagenz von Applichem (siehe Durchführung in 4.1.1.3 auf Seite 45).

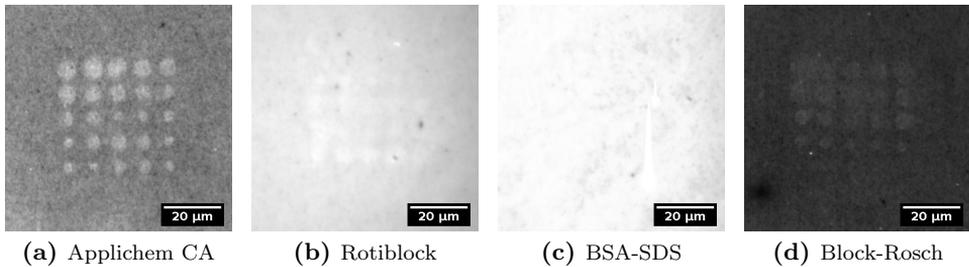


Abbildung 5.8: Vergleich verschiedener Blocking-Substanzen auf biotinylierten Glasobjektträgern — das Blocken erfolgte vor dem Absetzen von Neutravidin — Die Bilder sind in ihrer unbearbeiteten Rohfassung dargestellt, um sie untereinander vergleichen zu können.

5.1.5 Kontaktwinkelmessung

Oberflächenmodifizierungen können unter anderem mit Hilfe des Kontaktwinkels mit Wasser verfolgt werden. Die Abbildung 5.9 gibt die Veränderung des gemessenen Kontaktwinkels nach den jeweiligen Stationen der Oberflächenbehandlung wieder.

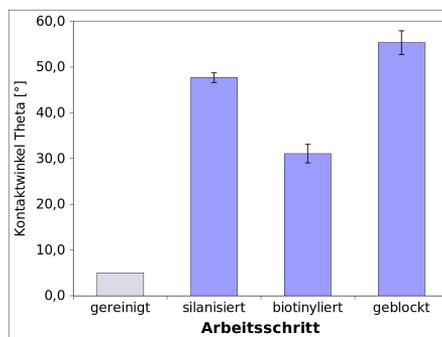


Abbildung 5.9: Kontaktwinkel der funktionalisierten Glasoberfläche an den verschiedenen Prozessstationen — gemessen mit Wasser (direkt nach der Reinigung war der Kontaktwinkel derart gering, dass er nicht bestimmbar war und auf ca. 5° geschätzt wurde)

5.2 Sequenzielles Deponieren mit dem AFM

Mit dem sequenziellen Deponieren wird ein neuer Weg in der Benutzung des Rasterkraftmikroskops, insbesondere in Hinblick auf Mikro- und Nanofunktionalisierungen, ermöglicht. Im Grunde sollte es möglich sein, die in dieser Arbeit beschriebene Technik mit jedem gängigen AFM auszuführen. Eine automatisierbare quelltextbasierte Ansteuerung des AFMs ist hierbei von Vorteil. Ferner bietet die Methode die Voraussetzung, jegliche biotinylierbare Substanz, sei es ein Biomolekül, oder ein komplexeres Arrangement, orts aufgelöst zu deponieren. Eine Anpassung an die jeweilige Aufgabenstellung bzw. Substanz entfällt, da stets nur das als Verbindungsglied dienende Neutravidin abzusetzen ist.

Das Rasterkraftmikroskop kann mit seinen piezoelektrischen Stellelementen auch als hochgenaues Positioniersystem verwendet werden. Wenn die AFM-Spitze zusammen mit einer zu applizierenden Substanz als Schreibfeder benutzt wird und diese von einem Computerprogramm angesteuert und positioniert werden kann, entsteht ein System, welches dazu in der Lage ist, Substanzmengen im Attoliter-Bereich abzugeben. Die hierbei erreichbare Auflösung ist vorrangig von der Beschaffenheit der abzusetzenden Substanz abhängig.

Der Vorgang wurde auf das Auftragen von Neutravidin reduziert und lässt sich somit kontrolliert durchführen. Als Tintenmatrix kommt Glycerin zum Einsatz. Glycerin selbst bleibt im vorliegenden Zusammenhang chemisch inaktiv und dient lediglich als schwer verdunstbares Lösungsmittel für Neutravidin.

Als AFM-Spitzen eignen sich prinzipiell alle Kontakt-Modus-Typen. Besonders erwähnenswert ist die von der Firma NanoAndMore GmbH vertriebene Spitze „DT-CONTR-SPL“, welche mit einer Diamantbeschichtung ausgerüstet ist und aufgrund der damit einhergehenden Oberflächenvergrößerung, davon ausgegangen werden kann, dass sie besonders viel Tintensubstanz aufnehmen kann. Ebenfalls geeignet ist die SNOM-Spitze der Firma Nascatec. Ihr eigentlicher Einsatzzweck ist die optische Rasternahfeldmikroskopie. Das ca. 50 nm große Loch an ihrem Spitzende macht sie zu einem zuverlässigen Deponier-Werkzeug. Es besteht eine Parallele zum Modell des Federkiels.

Erarbeitete Durchführung: Vom biotinylierten Glasobjektträger wurde im ersten Schritt ein ca. 1 – 1,5 cm breites Stück abgebrochen, um es auf dem X-Y-Tisch des AFM zu installieren. Zur Erleichterung der Fokussierung mit dem Hilfsmikroskop am AFM, als auch zum leichtesten Wiederauffinden der bearbeiteten Region unter dem Fluoreszenzmikroskop, empfiehlt es sich mit dem Diamantstift ein feines,

durchgängiges Kreuz in die Glasoberfläche zu ritzen.

Die Beladung der AFM-Spitze (bevorzugt Nascatec) erfolgte mittels Eintauchen selbiger in einem von einer Mikrokapillare geformten Lösungstropfen. Eine geeignete Zusammensetzung dieser Lösung bestand aus 20 μl Neutravidin (1 mg/ml) mit 5 μl Glycerin. Sobald nach einer optischen Kontrolle manuell gesetzter Testspots der Deponiervorgang zuverlässig funktionierte, konnte das Skript zum programmgesteuerten Absetzen der Spots gestartet werden. Begonnen wurde mit dem ersten Feld — siehe schematische Darstellung in Abbildung 5.10a (Quelltext 1 zur Steuerung auf Seite 97). Nachdem der Deponierdurchgang beendet wurde, folgte eine vierminütige Inkubation. Im Anschluss daran wurden 6 μl der Adress-Lösung A (1 μM RcF6 in TE-III) auf die bearbeitete Stelle aufgetragen und wieder für vier Minuten inkubiert. Das Entfernen dieser Lösung erfolgte mittels Waschen mit 80 μl PBS und danach mit 80 μl RE-Wasser. Es ist von großer Bedeutung, dass die Oberfläche während dieser Schritte nicht verschoben wird, um die Passgenauigkeit der Einzelarrays zu gewährleisten. Mit der Adress-Lösung B (1 μM LcF5 in TE-III; Quelltext 2 auf Seite 101) wird in gleicher Weise verfahren. Es schließt sich die dritte Adress-Lösung an, welche wie in Abbildung 5.10c ein biotinylierter Farbstoff (1 μM DY-547) sein kann. Eine Übersicht über den Vorgang des additiven Deponierens bietet Abbildung 5.11 auf Seite 63.

Das Ergebnis dieses Vorgangs ist ein strukturiertes und kompaktes Microarray. Dieses stellt, bedingt durch die am Neutravidin gekoppelten Oligonukleotide, Adressen für weitere selbstorganisierende Strukturen bereit.

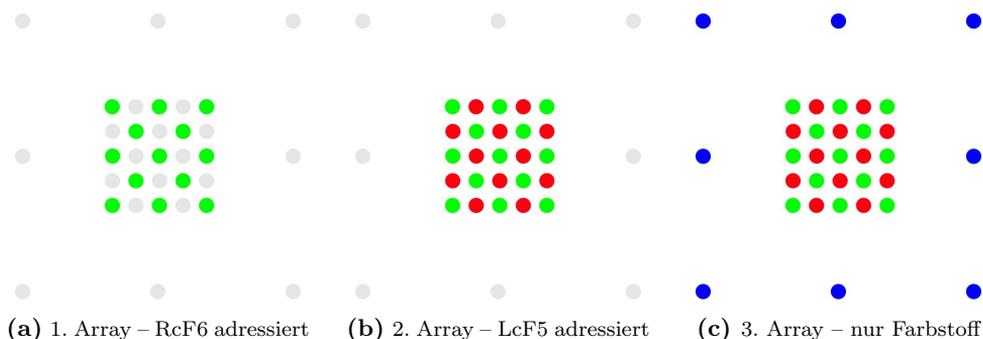


Abbildung 5.10: Spottingschema und Aufbau der Arraystruktur — Im ersten Durchgang wird das 1. Array (a) deponiert und adressiert. Es folgt das 2. Array (b), welches das erste ergänzt. Das dritte Array (c) rahmt das Gesamtarray ein und wird mit einem gut detektierbaren Farbstoff adressiert. Es dient dem Wiederauffinden und Vorfokussieren (publiziert in [107]).

5.2.1 Array mit immobilisiertem Farbstoff

Die ersten Untersuchungen fanden mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen statt. Die Abbildung 5.12 zeigt das Ergebnis des Vorgangs: Auf der biotinylierten und geblockten Glasoberfläche wurde Neutravidin deponiert. Im ersten Durchgang nur an den Positionen der Abbildung 5.12a. Nach dem Waschen der strukturierten Oberfläche wurde der biotinylierte Fluoreszenzfarbstoff DY-547 aufgetragen, so dass er an die Neutravidin-Spots binden konnte. Es folgte das erneute Deponieren von Neutravidin mit dem Ziel, das soeben erzeugte Feld zu dem in Abbildung 5.12c gezeigten Gesamtarray zu ergänzen. Nun wurde zum zweiten Mal ein biotinylierter Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen: DY-647.

Im Ergebnis erhält man ein aus zwei Teilarrays bestehendes Feld wie in Abbildung 5.12c. Die Mikroskopkamera liefert ein Schwarz-Weiß-Bild. Bei geeigneter Filterpaarkombination lässt sich die unerwünschte Anregung von mehreren Farbstoffen verhindern, so dass wie in den Abbildungen 5.12a und 5.12b zu sehen, nur der gewünschte, diskrete Farbstoff detektiert wird. Für die Abbildung 5.12c wurden beide Teilbilder eingefärbt und gemäß einer logischen ODER-Verknüpfung übereinandergelegt. Der Durchmesser der Spots beträgt rund $2\ \mu\text{m}$ und der Abstand der Spotmittelpunkte wurde auf $9\ \mu\text{m}$ festgelegt.

5.2.2 Array aus hybridisierten Oligonukleotiden

Mit den Ergebnissen des vorangegangenen Abschnitts konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Methode der sequenziellen Immobilisierung das zu leisten vermag, was eingangs hinsichtlich der Anforderungen zur orts aufgelösten Funktionalisierung besprochen und gefordert wurde.

Die logische Fortsetzung der Untersuchungen bestand in der Erweiterung der Methode auf die Hybridisierung von sequenzcodiert-fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden. Hier wurde anstelle eines biotinylierten Farbstoffes ein biotinyliertes Oligonukleotid verwendet und auf diese Weise der Spot mit Hilfe der Basenabfolge adressierbar gemacht. In Abbildung 5.13 sind die zueinander passenden und verwendeten Oligonukleotide symbolisch dargestellt.

Die Abbildung 5.14 zeigt die analog zu Abbildung 5.12 aufbereiteten Ergebnisse. Das erzeugte Feld wurde wie in 5.2.1 beschrieben, etappenweise aus Neutravidin aufgebaut und nach jedem Spotdurchgang zuerst mit dem biotinylierten Oligonukleotid LcF5, dann mit RcF6 und schließlich mit RcF2 (siehe Abbildung 5.13) adressiert. Danach konnte die Probe mit einer alle Gegenstränge beinhaltenden Hybridisierlösung

5.2.2 Array aus hybridisierten Oligonukleotiden

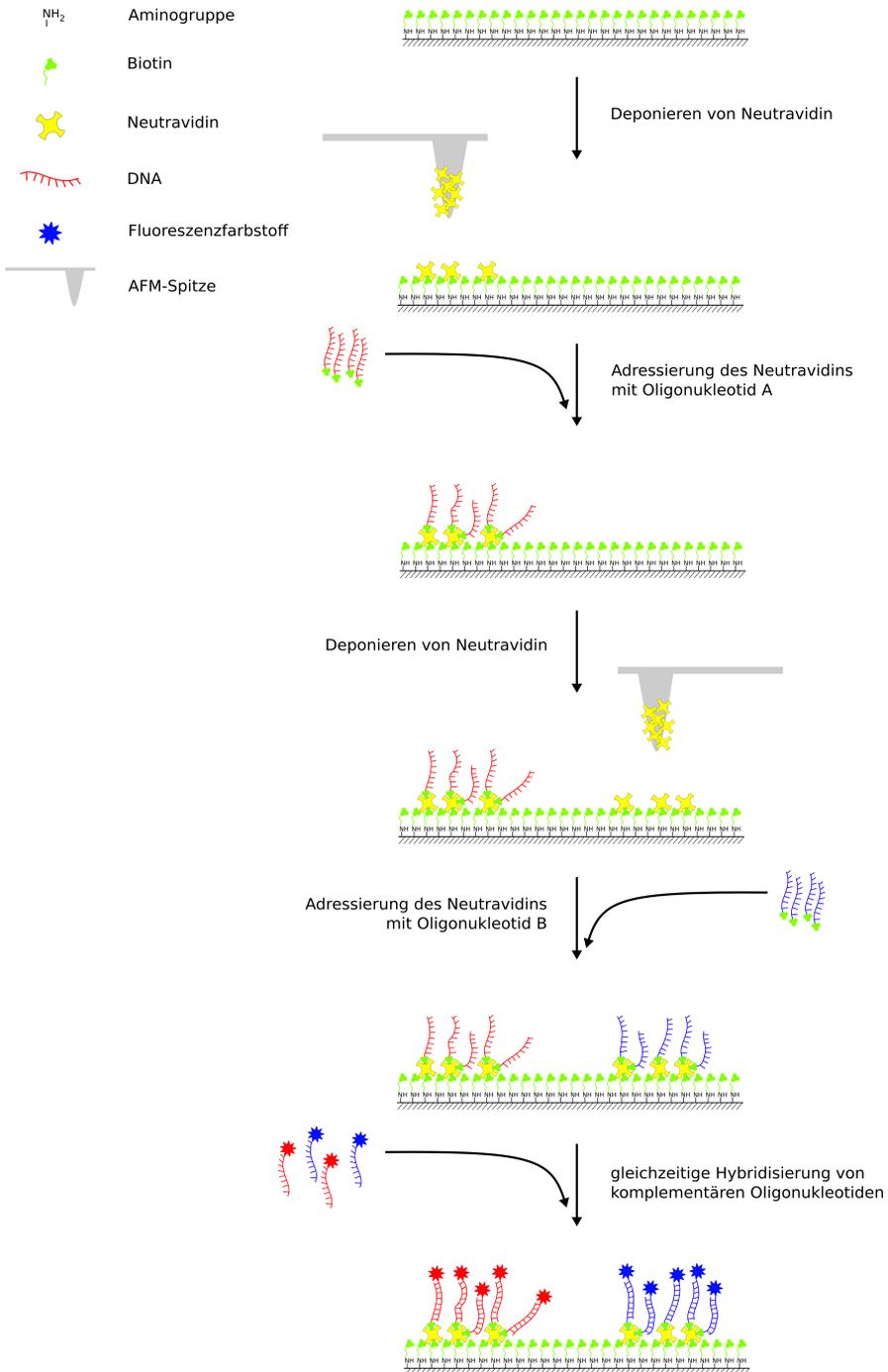
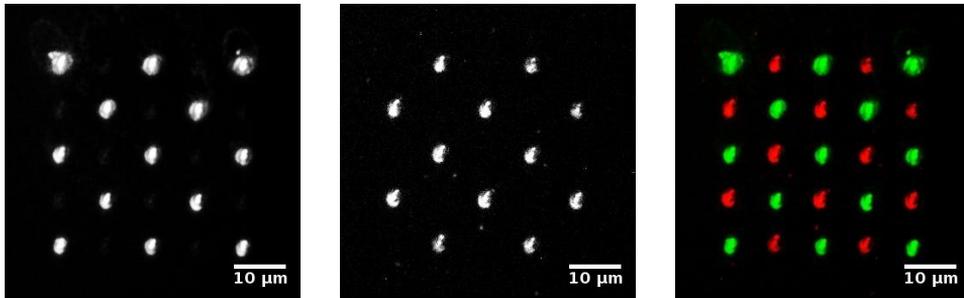


Abbildung 5.11: Schematischer Ablauf des sequenziellen Deponierens — lediglich das Verbindungsglied fungierende Neutravidin wird deponiert und anschließend gemäß Funktion adressiert (publiziert in [109]).



(a) Anregung des Farbstoffes DY-547-Btn im Grünkanal (ii) (b) Anregung des Farbstoffes DY-647-Btn im Rotkanal (iii) (c) ODER-verknüpfte Überlagerung der Teilbilder a) u. b)

Abbildung 5.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 5×5 Arrays — Teilarray a) und b) wurden sequenziell aufgebaut und in c) eingefärbt dargestellt (publiziert in [109])

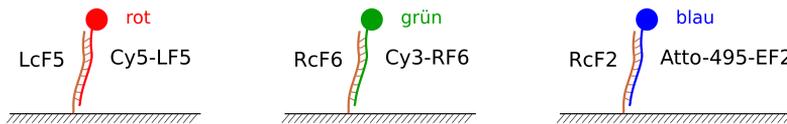


Abbildung 5.13: Paarung der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide (farbcodiert)

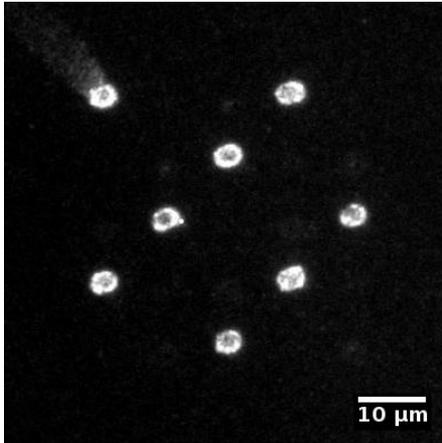
behandelt und mit der Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Die Abbildung 5.14 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 5×5 Arrays mit einem Spotmittelpunktabstand von $9 \mu\text{m}$ und einen durchschnittlichen Spotdurchmesser von ca. $2 \mu\text{m}$. Das Gesamtfeld setzt sich aus drei Teilarrays zusammen. Abbildung 5.14d stellt das Gesamtarray in den entsprechenden Falschfarben dar.

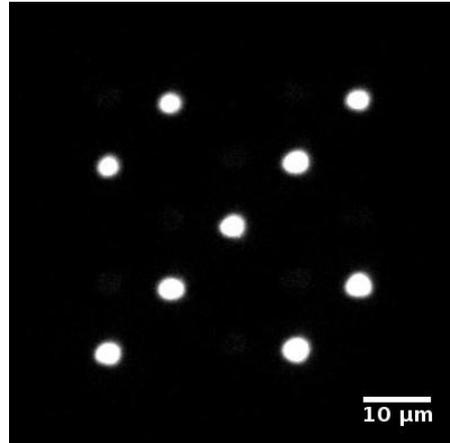
Die Möglichkeit der oligonukleotidbasierten Adressierung von Ankerpunkten auf einer Oberfläche ist Basis und Grundvoraussetzung des in dieser Arbeit verfolgten Ziels: Das ortsaufgelöste Aufspannen von DNA.

5.2.2.1 Kontamination während des Spottens

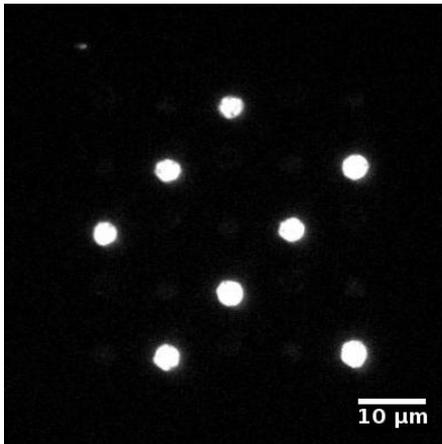
Bei dieser Methode stellt sich automatisch die Frage, wie sauber, d.h. wie frei von anderen immobilisierten Substanzen, jede einzelne Spotspezies ist. Sieht man sich das Schema der Abbildung 5.11 auf der vorherigen Seite an, fällt auf, dass jede Spottstufung der Funktionalisierung denen der darauffolgenden Schritte ausgesetzt ist. Es besteht demnach die potenzielle Gefahr der Kontamination der jeweiligen Funktionsglieder. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die passenden farbstoffbeladenen Fluoreszenzsignalintensitäten und die der Fremdpositionen bei allen drei Farbstoff-



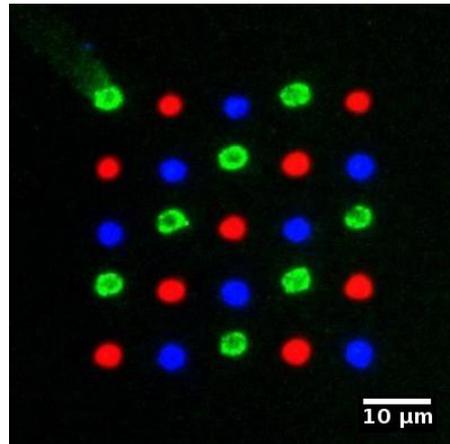
(a) Anregung des Cy3 markierten Oligonukleotids im Grünkanal — Filter ii



(b) Anregung des Cy5 markierten Oligonukleotids im Rotkanal — Filter iii



(c) Anregung des Atto495 markierten Oligonukleotids im Blaukanal — Filter i



(d) ODER-verknüpfte und eingefärbte Überlagerung der Teilbilder a), b) und c)

Abbildung 5.14: Aufnahme eines 5×5 Arrays, bestehend aus drei fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden — Teilarray a), b) und c) wurden sequenziell aufgebaut und in d) eingefärbt übereinandergelegt (publiziert in [109]).

Filterpaarkombinationen vermessen. Im Cy5-Kanal wurde beispielsweise an den Stellen der Cy3-Spots das Cy5-Signal gemessen. In den Diagrammen der Abbildung 5.15 wird die Auswertung der Rohdaten der Abbildungen 5.14a bis 5.14c gezeigt.

Die Reinheiten der Spots sind sehr gut. Im Cy5-Kanal (Anregung von Cy5) lassen sich neben den LcF5-Spots (rot) auch RcF6-Spots (grün) ausmachen, welche mit dem Cy3-Farbstoff markiert sind. Die in den RcF6-Spots gemessene Intensität beträgt jedoch nur 2,5 % der Intensität der LcF5-Spots. Daraus kann geschlossen werden, dass die RcF6-Spots (grün) mit äußerst wenig LcF5-Oligonukleotiden verunreinigt sind. Die Verunreinigung ist methodisch bedingt und kann durch die Inkubation mit der Funktionslösungen selbst, aber auch durch unzureichendes Waschen herbeigeführt worden sein.

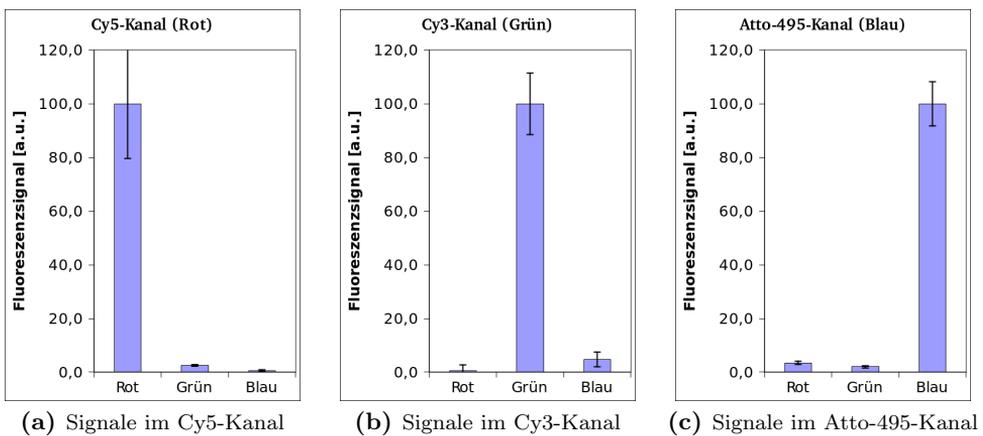


Abbildung 5.15: Im Rohdatenbild der Abbildung 5.14 gemessene Fluoreszenzsignalintensitäten (publiziert in [109])

Der Grund für die geringe Kontamination mit den jeweils nachfolgenden Spottinglösungen könnte darin liegen, dass die hohe Affinität des Biotins zum Neutravidin für ein nahezu vollständiges Absättigen aller verfügbaren Bindungsstellen sorgt. An dieser Stelle sei unterstützend das erste Array gezeigt, welches mit dieser hier beschriebenen Methode entstanden ist: Die Abbildung 5.16 zeigt ein 3×3 Array (Punktabstände $9 \mu\text{m}$), welches technisch der Abbildung 5.12 entspricht. Es zeigt aber deutlich erkennbare Aussparungen (siehe Abbildung 5.16b) an den komplementären Spots, was ein Indiz dafür ist, dass die Spots des ersten Durchlaufs (Abbildung 5.16a) während der Adressierung durch diese selbst passiviert worden sind.

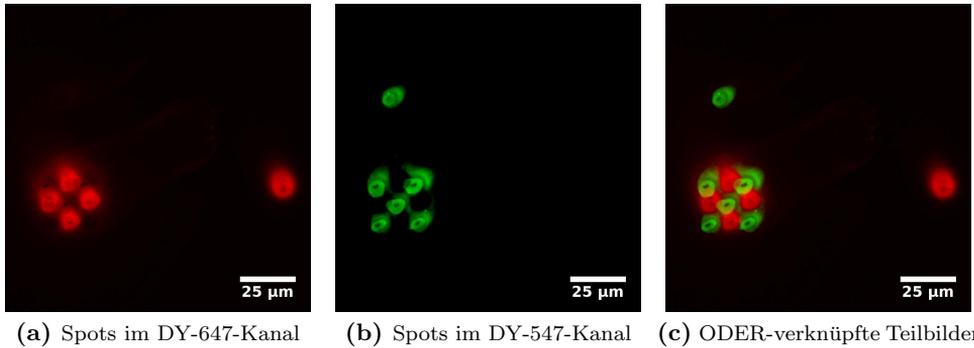


Abbildung 5.16: Erster Versuch des sequentiellen Spottens mit dem AFM — an b) ist die Eigenschaft des sich selbst blockenden Systems gut nachvollziehbar (a = 1. Durchlauf, b = 2. Durchlauf)

Die Tests zur Ermittlung der Verunreinigung der hier eingesetzten Farbstoffe ergaben einen Kontrast zwischen den Farbstoffsignalen, welcher in der gleichen Größenordnung lag wie in Abbildung 5.15. Ob die geringen Signale von den Filtern bzw. den Seitenarmen der Fluoreszenzanregung oder einer spektralen Präferenz der verwendeten Kamera herrühren wurde nicht vertiefend untersucht.

Die Kreuzkontamination der drei Spotspezies darf als sehr gering eingestuft werden. Anhand dreier Farbstoffe konnte exemplarisch gezeigt werden, dass mindestens drei biotinylierbare Biomoleküle orts aufgelöst immobilisiert werden können. Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass auch eine größere Anzahl erreicht werden kann.

5.2.2.2 Mechanische Abweichungen

Bei genauerem Betrachten der Abbildung 5.14d wird man zwischen den Teilarrays einen Versatz feststellen. In Abbildung 5.17 sind die mittleren Abstände aller Spots in x- und y-Richtung a) im Einkomponentenfeld der Abbildung 5.6, b) im Zweikomponentenfeld der Abbildung 5.12 und c) im Dreikomponentenfeld der Abbildung 5.14 aufgetragen. Zwar mitteln sich die Spotabstände heraus, aber für die Diskussion der hier direkt sichtbaren Abweichung genügt die vereinfachte Betrachtung der sich ergebenden Standardabweichung. Diese ist insbesondere im Feld der Abbildung 5.14 für die y-Richtung mit $\pm 1,2 \mu\text{m}$ verglichen zum Spotdurchmesser von ca. $2 \mu\text{m}$ relativ groß.

Die Ursache dieser Abweichungen liegt auf der Hand. Der nach jedem Spotten

erforderliche Waschschrift, welcher nach Möglichkeit berührungsfrei bzw. unter verminderter mechanischer Belastung der Probenoberfläche, erfolgen muss, wurde von Hand am AFM durchgeführt. Diese manuellen Tätigkeiten fanden in y-Richtung der Probe statt und stellen eine Fehlerquelle dar. Des Weiteren kommt es während des Hochfahrens des AFM-Kopfes für die eben beschriebenen Schritte infolge von mechanischen Toleranzen am Gerät selbst zu einem unvermeidbaren Versatz des AFM-Kopfes. Dies spielt während des normalen AFM-Betriebs keine nennenswerte Rolle.

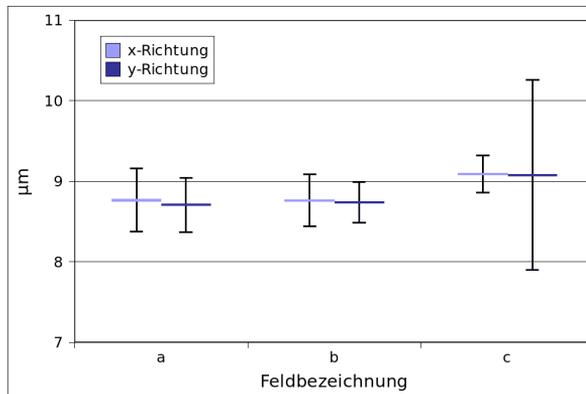


Abbildung 5.17: Mittlere Spotmittelpunktabstände und ihre Abweichungen — a: Abbildung 5.6, b: Abbildung 5.12, c: Abbildung 5.14

5.3 DNA-Konstruktherstellung

In Kapitel 4.1.2.1 auf Seite 46 findet sich eine ausführliche Darstellung der Herstellung der DNA-Konstrukte. Die Überprüfung deren Funktionstüchtigkeit soll Gegenstand des nun folgenden Abschnitts sein.

5.3.1 Test des Konstrukt-Mittelstücks

Eine erste Aussage über den Erfolg der Konstruktherstellung erhält man nach Auftrag und Auswertung der DNA-Halbbrücken (Einzelemente A und B, siehe Schritte 6 und 7 der Abbildung 4.7), sowie deren ligiertem Gesamtkonstrukt auf einem Gel. Die Länge der einzelnen Halbbrücken beträgt nach Ergänzung um die Adapterstücke 7269 bp. Für das ligierte Gesamtkonstrukt wird die doppelte Länge erwartet.

Das erhaltene Gel in Abbildung 5.18 steht in Einklang mit den Erwartungen. Für die beiden Halbbrücken, so wie sie in den später folgenden Versuchsreihen eingesetzt

werden, lässt sich eine Größe von ca. 7.000 bp ablesen. Das ligierte Gesamtkonstrukt reiht sich bei einem Wert um die 14.000 bp ein und ist ein Indiz dafür, dass zumindest das Verbindungsadapterstück (Sequenzen F10 und F11) planmäßig eingebaut wurde und beide Halbbrücken passend miteinander verbunden werden können.

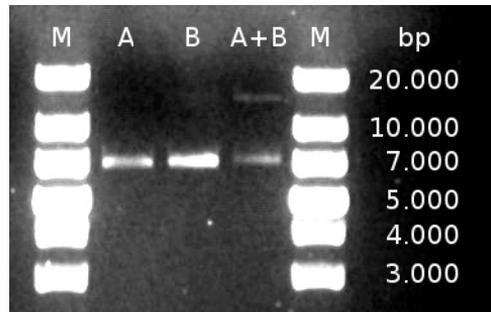


Abbildung 5.18: 0,5%-iges Agarosegel (2 h Laufzeit in TBE-Puffer); M = Größen-Marker; A = Konstrukt A; B = Konstrukt B; A+B = ligierte linke und rechte Halbbrücke

5.3.2 Test der Konstrukt-Ankerelemente

An dieser Stelle erfolgt der Funktionstest der äußeren Adapterstücke der DNA-Halbbrücken sowie der Nachweis der Adressierbarkeit der sequenziell gesetzten Spots.

Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Im ersten Test (5.19a) wird auf das vollständige Array nur das Konstrukt A gegeben. Aufgrund der Adapterstücken bindet dieses Konstrukt nur an den Spots mit der zu A komplementären Adresse. Wenn das Array mit dem DNA-anzeigenden Farbstoff SYBR-Green-I inkubiert wurde, sollten ausschließlich die A-Spots leuchten, da nur an ihnen das Konstrukt A binden kann. Die Abbildung 5.20a zeigt das Ergebnis. Zu sehen sind die A-Spots mit der angefärbten DNA. Die B-Spots blieben unbeeinflusst. Mit dem Konstrukt B wurde, wie die Abbildungen 5.19b und 5.20b zeigen, in gleicher Weise verfahren.

Es ist eine deutliche Zuordnung der DNA-Halbbrücken A und B zu den jeweiligen Spots für die Spots A und B zu erkennen, weswegen konstatiert werden darf, dass die DNA-Konstrukte wie gewünscht ihre Funktion wahrnehmen. Die konsequente Fortsetzung des Tests ist in Abbildung 5.19c dargestellt und mündet im Aufbau der angestrebten DNA-Vollbrücke.

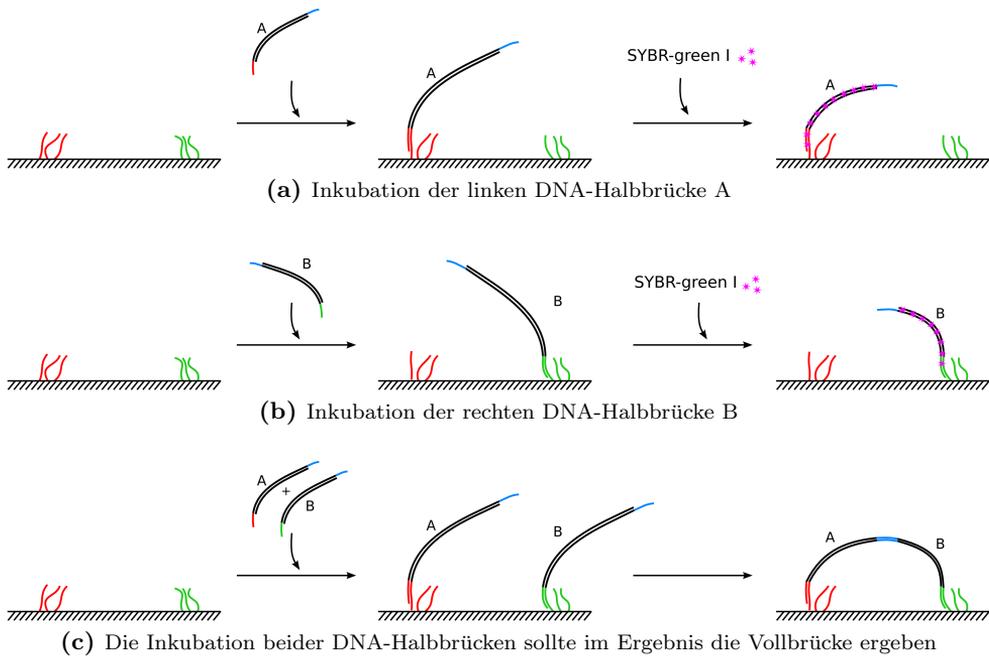
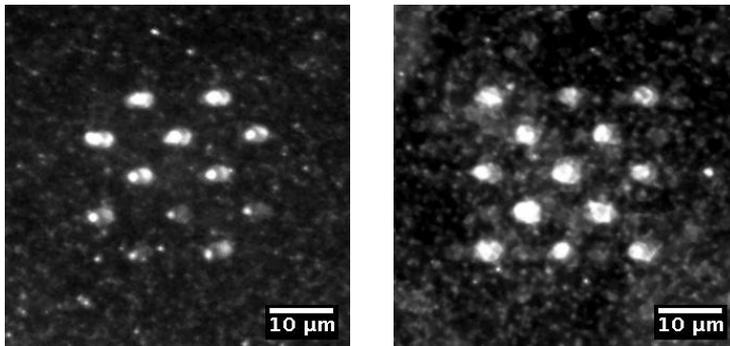


Abbildung 5.19: Durch Inkubation nur einer DNA-Halbbrücke auf das voll ausgebildete und mit LcF5-Btn und Rcf6-Btn adressierte Array wird nur eine der beiden sequenzrichtigen Seiten bedient.



(a) Anteil der A-Spots sichtbar (vergl. Abb. 5.19a)

(b) Anteil der B-Spots sichtbar (vergl. Abb. 5.19b)

Abbildung 5.20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von SYBR-green-I angefärbter DNA zweier identisch aufgebauter, jedoch verschieden, d.h. nur mit einer der beiden Halbbrücken, inkubierten Arrays — Filter i

5.3.3 Test der Konstruktausrichtung

Hier wird das DNA-Doppelkonstrukt hinsichtlich seiner Orientierung überprüft. Darüber hinaus wird das DNA-Doppelkonstrukt, bestehend aus seinen Halbbrückenelementen A und B, in seiner Gesamtheit auf Funktionstüchtigkeit getestet.

Gleich zu Anfang der Überlegungen sei auf die Abbildung 5.21 hingewiesen. Wenn vor dem Auftragen der beiden Konstrukte A und B der Marker Cy5-cF6 (F2) dem Ansatz zum Hybridisieren hinzugegeben wurde, dann ist die Konstruktsseite B mit ihm belegt. Demnach steht nur die Seite A für die folgenden Bindungen zur Verfügung. Wird diese Zusammenstellung auf einem Mikroarray-Test gegeben, auf dem außerdem komplementäre Bindungspartner für die Seiten A und B angeboten werden (LcF5-Btn für A und RcF6-Btn für B), so sollten die vorinkubierten Konstruktteile überwiegend an die Spots der Klasse A binden. Der Marker F2 generiert dann ein entsprechendes Fluoreszenzsignal, welches, wie in Abbildung 5.22 gezeigt, ausgewertet werden kann.

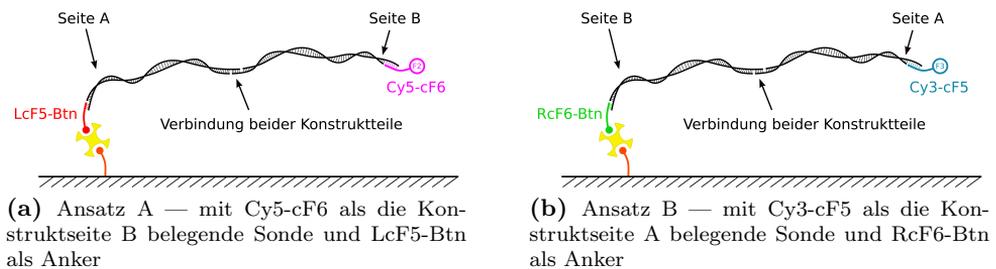


Abbildung 5.21: Schema des DNA-Konstrukttests — Zu einer sowohl das DNA-Konstrukt A als auch B enthaltenden Lösung wird in Ansatz A Cy5-cF6 gegeben. Folglich ist die Konstruktsseite B belegt und nicht mehr dazu in der Lage, z. B. an einen oberflächenimmobilisierten Bindungspartner (passende Sequenz wäre RcF6-Btn) zu hybridisieren. Die Seite A bleibt frei und kann an die aus LcF5-Btn bestehenden Spots (Spottingsschema und Zusammensetzung siehe 5.32 auf Seite 84) binden. Wenn sich nun beide Halbbrückenelemente zur DNA-Vollbrücke durch Hybridisierung verbinden, so wird aufgrund der die Konstruktsseite B belegenden Cy5-cF6-Sonde, an allen LcF5-Btn-Spots ein Fluoreszenzsignal erwartet. — Durchführung in zwei getrennten Ansätzen in konventioneller Mikroarray-Technik.

Das Ergebnis des Konstruktorientierungstests ist in Abbildung 5.22a zu sehen. Die LcF5-Btn-Spots weisen ein höheres Fluoreszenzsignal als die mit RcF6-Btn auf. Der analoge Fall ist für den Ansatz B, bei dem Cy3-cF5 als belegende Sonde eingesetzt wurde, zu beobachten (siehe Abbildung 5.22b).

Eine qualitative Aussage ist in diesem Fall ausreichend, da ein Unterschied in

den Fluoreszenzsignalen — hier um den Faktor zwei — erst dann zustande kommen kann, wenn eine Konstruktseite mit der fluoreszierenden Sonde blockiert ist, beide Halbbrücken korrekt verbunden sind und die freie, verbleibende Konstruktseite an den korrespondierenden Bindungspartner des Spots gebunden ist. Die Ergebnisse in Abbildung 5.22 lassen den Schluss zu, dass die Konstrukte korrekt aufgebaut sind, was mit den Ergebnissen aus 5.3.1 und 5.3.2 korrespondiert.

Demnach kann festgehalten werden, dass sich das DNA-Brückenkonstrukt, welches sich aus zwei DNA-Halbbrücken zusammensetzt, mit den hier dargestellten Methoden herstellen und nachweisen lässt. Ferner ist es möglich, die Orientierung des Konstruktes festzulegen.

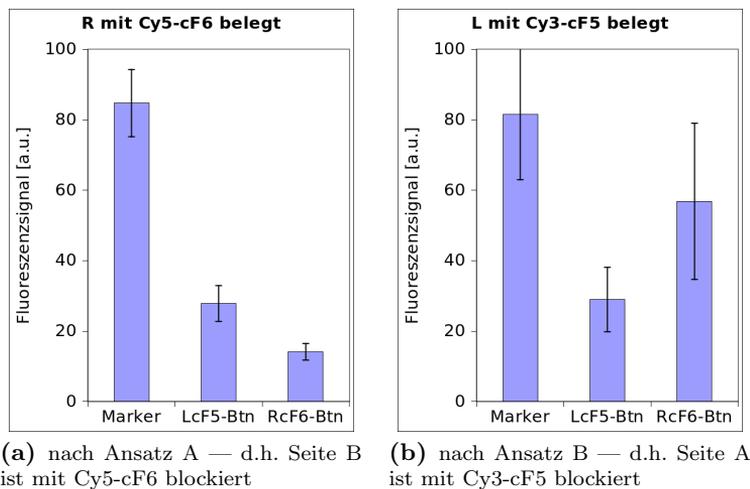


Abbildung 5.22: Das Ergebnis des DNA-Konstrukttests erlaubt auch eine Aussage über die Orientierung des Gesamtkonstrukts (publiziert in [107]).

5.4 DNA-Nanostruktur

Die drei vorangegangenen Schritte, namentlich die Funktionalisierung von Oberflächen, das sequenzielle Spotten mit dem AFM, sowie die Herstellung der DNA-Konstrukte, münden an dieser Stelle im Aufbau der DNA-Nanostruktur.

Zur Veranschaulichung, wie der Aufbau der DNA-Nanostruktur aussehen soll, sei das Augenmerk auf die Abbildung 5.23 gerichtet. Zwischen zwei Ankergruppen, den biotinylierten Oligonukleotiden LcF5 und RcF6, wird sich durch das Prinzip des gerichteten Selbstzusammenbaus (*self assembly*), ein DNA-Doppelstrang aufspan-

nen. Aufgrund der relativ großen zu überbrückenden Distanz von $4,9\ \mu\text{m}$ wurde der in 4.1.2.1 auf Seite 46 dargestellte Weg zur Gewinnung des Brückenkonstruktes gewählt. Beide DNA-Halbbrückenelemente A und B, werden gemeinsam auf das Feld gegeben. Sie ordnen sich im von den Ankergruppen vorgegebenen Raster an und bilden im Idealfall schließlich eine DNA-Brücke, wie sie in Abbildung 5.23 vorgestellt wird.

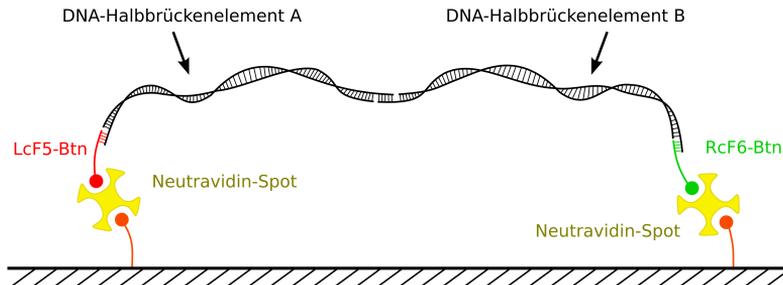


Abbildung 5.23: Modell der DNA-Brücke als Nanostruktur

5.4.1 Aufbau der DNA-Nanostruktur

Die im vorangegangenen Abschnitt unter 5.2 auf Seite 60 beschriebenen Mikroarrays bilden die Basis für den Aufbau der im folgenden beschriebenen DNA-Nanostruktur.

Erarbeitete Durchführung: Beim letzten Waschschrift wurde, nach dem Generieren des letzten Teilarrays, Wasser durch PBS-Puffer ersetzt. Es wurde so gewaschen, dass ein Rest von ca. $10\ \mu\text{l}$ PBS-Puffer auf der Objektträgeroberfläche verblieb. Die bearbeitete Region muss von diesem Flüssigkeitstropfen bedeckt bleiben, damit die DNA nicht unspezifisch an den sonst ausfallenden Puffersalzen adsorbiert. Dann wurden je $2\ \mu\text{l}$ der in 4.1.2.1 auf Seite 46 hergestellten DNA-Konstrukte (Teilstücke A und B) 1:30 in TE-III-Puffer verdünnt auf diese Stelle pipettiert. Die Hybridisierung fand in diesem $14\ \mu\text{l}$ großen Reaktionsraum statt. Geeignete DNA-Konzentrationen wurden im Vorversuch ermittelt. Hier bestehen für die Zukunft noch Optimierungsmöglichkeiten.

An dieser Stelle wird das Potenzial deutlich, das diese Methode hinsichtlich ressourcen- und materialsparender Arbeitsweise bietet. Der Materialverbrauch ist gering und das Array hochintegriert.

Um zu gewährleisten, dass der winzige Flüssigkeitstropfen (hier Reaktionsraum) während der einstündigen Hybridisierung bei $35\ ^\circ\text{C}$ nicht verdunstet, wurde die Probe

im Klimaschrank bei 85 % relativer Luftfeuchte gelagert. Die Hybridisierung erfolgte unter Lichtausschluss.

Gewaschen wurde das fertig hybridisierte Array durch mehrmaliges Eintauchen in eine PBS-Tween-Lösung und anschließend PBS-Puffer. Jetzt erfolgte das Anfärben der DNA der Probe mit SYBR-Green-I. Dazu wurde 1 μ l einer SYBR-Green-I-Lösung (10 \times in DMSO) in die Mitte des Glasobjektträgers gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Das Deckglas bewirkt zusammen mit dem geringen Volumen eine effektive Durchmischung und das SYBR-Green-I bindet an die DNA (Inkubation für ca. vier Minuten). Die Probe wurde dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Es ist zu beachten, dass die Oberfläche während der letzten Schritte, vom Moment des Auftragens der DNA-Konstrukte auf die Probenoberfläche an, zu keinem Zeitpunkt trocken war. Das verminderte die Gefahr unspezifischer Wechselwirkungen der DNA mit der Probenoberfläche, da das Phänomen des „Anbackens“ von DNA an eingetrockneten Oberflächen von vornherein vermieden wurde.

5.4.2 Nachweis der DNA-Nanostruktur

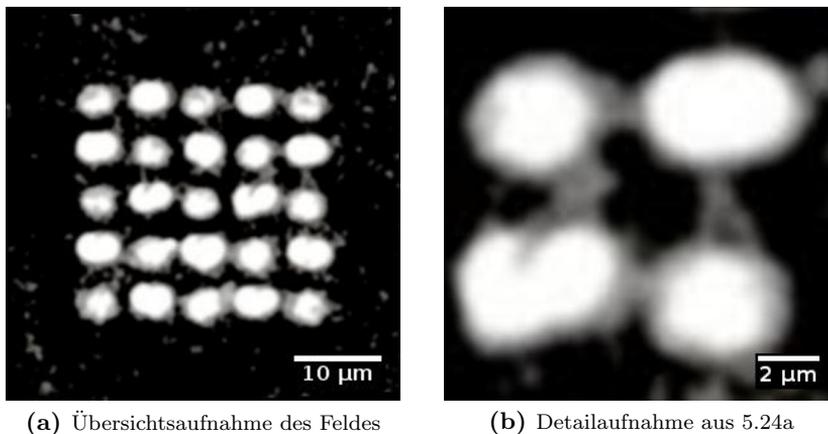
Die Herausforderung besteht darin, dass das Array (kleiner als z. B. eine humane Leberzelle) nur ein Mal je Probe vorhanden ist und der die DNA anfärbende SYBR-Green-I-Farbstoff bei Fluoreszenzanregung, insbesondere bei großen mikroskopischen Vergrößerungen, sehr rasch ausbleicht. Bei Verwendung des 40 \times Objektivs und der 100 W Quecksilberdampfampe ist bei dem gegebenen Aufbau eine Aufnahme von 100 – 200 ms mit der Kamera vier bis sechs Mal möglich. Unter Verwendung des 100 \times Objektivs und Immersionsöl sinkt die insgesamt mögliche Belichtungszahl bis zum Ausbleichen nochmals.

Um die angefärbte DNA-Struktur nicht unnötig zu belichten und um das Wiederfinden zu erleichtern, wurde ein die Struktur umrahmendes Hilfsarray eingeführt. Dieses Hilfsarray enthält den Fluoreszenzfarbstoff DY-547 (Anregungsmaximum 557 nm; Emissionsmaximum 574 nm). Die Anregungswellenlänge des SYBR-Green-I-Farbstoffes (Anregungsmaximum 494 nm; Emissionsmaximum 521 nm), welcher die DNA anfärbt, liegt weit außerhalb der grünen Hilfsarray-Anregung und bleibt hiervon unbeeinflusst. Somit ist es nicht nur möglich, das Array schadlos aufzusuchen und einzupassen, sondern auch auf die gewünschte Ebene zu fokussieren und die Anzahl der notwendigen Aufnahmen zu reduzieren. Ohne Hilfsarray würde die angefärbte DNA-Nanostruktur bereits während der Suche auf der Probe ausbleichen.

Ferner besteht die Option, verbrauchte, d.h. ausgebleichene SYBR-Green-I-Farbstoffmoleküle durch Diffusion auszutauschen, wenn die Untersuchung in Lösung durchgeführt wird und diese einen Vorrat an SYBR-Green-I vorhält. Dies birgt zwar den Nachteil eines leicht erhöhten Hintergrundsignals, eröffnet jedoch im Gegenzug dazu die Möglichkeit, eine ausgebleichene DNA-Struktur zu einem späteren Zeitpunkt wieder sichtbar zu machen.

Erarbeitete Durchführung: Der Nachweis und die Untersuchung der DNA-Nanostruktur erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Olympus BX51). Das Array wurde anhand des Hilfsarrays und seines Farbstoffs DY-547 erkannt und ausgerichtet. Die gewählte Filterpaarkombination erlaubte die Anregung bei 545 nm (± 25 nm) und die Detektion ab 605 nm. Als Lichtquelle diente eine 100 W Quecksilberdampfampe. Ein von der Mikroskopsoftware angesteuerter Lamellenverschluss gab den Lichtstrahl der Beleuchtungsquelle immer nur exakt während einer Aufnahme frei. Somit war gewährleistet, dass die Probe nicht unnötig dem Anregungslicht ausgesetzt war.

Danach wurde das Filterpaar gewechselt, um den die DNA anfärbenden SYBR-Green-I-Farbstoff sichtbar zu machen. Die verfügbaren Filter ermöglichten die Anregung bei 460 nm und die Detektion bei 510 – 550 nm.



(a) Übersichtsaufnahme des Feldes

(b) Detailaufnahme aus 5.24a

Abbildung 5.24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von SYBR-Green-I angefarbter DNA — die Spots wurden im Raster von $5,8 \mu\text{m}$ gesetzt — es sind deutliche Verbindungslinien zu erkennen — Filter i (publiziert in [107])

Da eine vollkommen gestreckte DNA sehr unwahrscheinlich ist und sich der Spotdurchmesser im Bereich von $2 - 3 \mu\text{m}$ bewegt, wurden die Spots in einem Raster von $5,8 \mu\text{m}$ gesetzt (Abstände der Spotmittelpunkte $5,8 \mu\text{m}$). Die kürzeste, zu überbrückende Distanz beträgt somit $2,8 - 3,8 \mu\text{m}$. Die Gesamtlänge des DNA-

Konstrukts, d.h. die maximal zu erwartende DNA-Länge beträgt 4,9 μm .

Der schematische Array-Aufbau kann den Abbildungen 5.25a und 5.25b entnommen werden. Nachdem das aus RcF6-Btn und LcF5-Btn bestehende Hauptarray erstellt wurde, musste es zur vereinfachten Wiederauffindung und des Vorfokussierens wegen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DY-547) eingerahmt werden. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt hatte den Vorteil, dass das Hauptarray zweifelsfrei unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgefunden und identifiziert werden konnte. Des Weiteren ermöglicht es, den Fokus sowie die richtige Positionierung des anvisierten Bereiches zu justieren, ohne das sehr rasch ausbleichende SYBR-Green-I unnötig zu belichten.

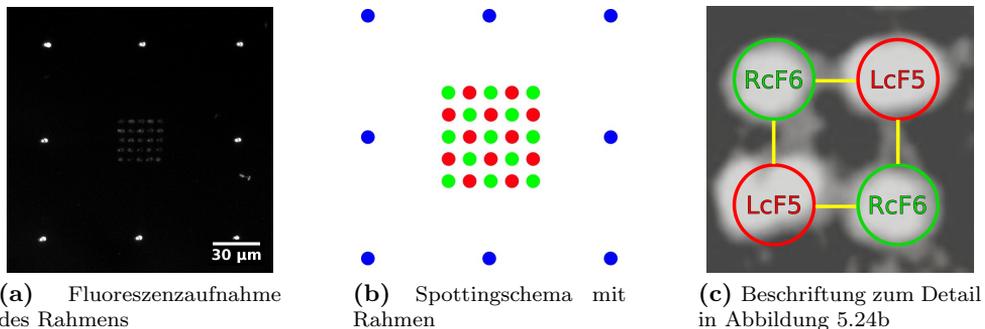


Abbildung 5.25: Details zum Aufbau des DNA-Nanoarrays

Die Abbildung 5.24 zeigt das Ergebnis. Die mit SYBR-Green-I angefärbte DNA ist deutlich zwischen den Spots zu erkennen. In der Detailvergrößerung der Abbildung 5.24b kann die „DNA-Brücke“ in Form von aufgespannter DNA gut nachvollzogen werden.

Die Abbildung 5.25c zeigt die um eine Beschriftung ergänzte Vergrößerung aus Abbildung 5.24b. Es wird nicht davon ausgegangen, dass es sich bei der gezeigten DNA-Nanostruktur zwangsläufig um einzelne DNA-Stränge handelt. Bei den Verbindungslinien handelt es sich wahrscheinlich um mehrere DNA-Stränge. Zur Beantwortung der Frage, wie viele DNA-Stränge im vorliegenden Fall an der Nanostruktur beteiligt sind, wurde versucht, die Probe mit dem AFM zu untersuchen.

Die Analyse mit dem AFM blieb erfolglos. Zum Einen gestaltete sich das Auffinden der Struktur als äußerst schwierig, da sie zum Einen mit gut 20 μm Kantenlänge z. B. die Größe einer einzelnen Eukaryotenzelle aufweist und zum Anderen keine praktischen Hilfs- oder Orientierungsstrukturen zur Verfügung standen. Dennoch gelang es

in Einzelfällen die Struktur mit dem AFM einzuscannen. Jedoch waren die gewonnenen Bilder nicht auswertbar, da die zum Aufbau der Nanostruktur erforderlichen Puffersalze das topographische Signal im AFM-Scan dominierten. Vom AFM werden lediglich die obersten Schichten einer topographisch aktiven Substanz registriert. Ein mögliches Höhensignal der DNA ist aufgrund des geringen DNA-Durchmessers im stark verrauschten Hintergrund nicht detektierbar.

Beim Betrachten der Abbildung 5.24 erkennt man deutlich, dass die DNA genau zwischen den Spots aufgespannt ist. Es bleibt jedoch die Frage, ob es sich hierbei um eine zufällige „Verknötung“ der korrespondierenden DNA-Stränge handelt. Eine nicht auf einer Hybridisierung basierenden Verbindung ist jedoch recht unwahrscheinlich, da sich die negativ geladenen DNA-Stränge zum Einen abstoßen würden und zum Anderen die Waschschritte und das Auflegen des zur Mikroskopie notwendigen Deckglases eine lose Verbindung zwischen den DNA-Konstrukten A und B leicht lösen würde. Insbesondere das Auflegen des Deckgläschens, bei dem relativ große Scherkräfte zu erwarten sind, könnte der Grund dafür sein, dass einige DNA-Brücken wieder zerstört wurden.

Wenn an der einseitig befestigten DNA keine Kraft angreift, so nimmt sie eine zufällige, auch unter „*random coil*“ bekannte Konformation ein [110], was sich in der Abbildung 5.24 im Vorhandensein der Spots äußert.

5.4.3 Ansatzpunkte zum Systemausbau

Das in dieser Arbeit dargestellte System zur biomolekularen Nanostrukturierung auf Oberflächen setzt sich aus einer Vielzahl manuell durchgeführter Arbeitsschritte zusammen. Anhand der Abbildung 5.26 soll die Notwendigkeit einer zumindest teilautomatisierten Durchführung erörtert werden.

Wie am Feld in der Abbildung 5.26a zu sehen ist, unterscheiden sich die erzeugten Spots erheblich voneinander. Das Feld setzt sich wie unter 5.10 auf Seite 61 dargestellt aus zwei sich ergänzenden Arrays zusammen. Der erste Spot des ersten Sub-Arrays befindet sich in der obersten Zeile, links außen. In Leserichtung wurde der nächste Spot gesetzt. Es folgten die nächsten Zeilen, bis der letzte Spot in der letzten Zeile, rechts außen, gesetzt wurde. Das zweite Sub-Array ergänzt das bereits erzeugte Feld. Zwischen dem Generieren beider Arrays wurde gemäß dem erarbeiteten Protokoll inkubiert und gewaschen. Eine erneute Beladung der AFM-Spitze mit Tintenlösung erfolgte nicht, da die von der AFM-Spitze aufgenommene Tintenmenge während des Beladens nicht kontrolliert werden kann und ein übermäßiges Beladen zu einer

unerwünschten Substanzabgabe führte. Ein zerstörtes Array wäre die Folge.

Glycerin, der Hauptbestandteil der hier benutzten Tinte, verdunstet erfahrungsgemäß nicht. Es konnte jedoch erstens ein Eintrocknen der AFM-Spitze und zweitens ein Verschwinden der winzigen abgesetzten Spots beobachtet werden. Wenn es nun zu einer Reduktion der an der AFM-Spitze haftenden Tintenmenge kommt, dann muss es zwangsläufig zu einer Konzentrationserhöhung der nicht flüchtigen Komponenten — hier Neutravidin — kommen. Tatsächlich kann in Abbildung 5.26a eine spotweise und somit zeitlich abhängige Signalerhöhung beobachtet werden. Die hier postulierte Konzentrationserhöhung bewirkt eine veränderte Abgabe der reaktiven Spezies und führt zu einer uneinheitlichen Belegungsichte der Spots.

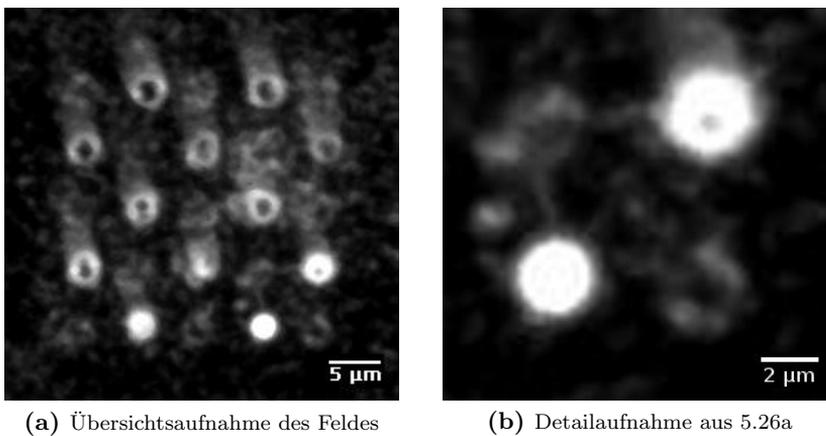


Abbildung 5.26: Mit SYBR-Green I angefärbte DNA-Nanostruktur (rechts unten) mit erheblichen Unterschieden zwischen den generierten Spots — Filter i

Wie der eben geschilderte Zusammenhang verdeutlicht, erfolgt das Absetzen der Spots nicht immer in idealer Weise, auch wenn diese einfach hanzuhabende Methode das suggerieren mag. Die Abbildung 5.27 zeigt ein Feld, welches in der Durchführung dem Feld in den Abbildungen 5.24 auf Seite 75 und 5.26 entspricht.

Auffällig ist, dass hier keine homogenen Spots, sondern kreisförmige Strukturen erzeugt wurden. Diese Erscheinung ist auch unter „Donut-Effekt“ bekannt. In nicht ganz so starker Ausprägung wird Vergleichbares auch in der Mikroarray-Technologie beobachtet und lässt sich mit der Entstehung von „Kaffeeflecken“ vergleichen [111]. Die Randregion der Spots verdunsten rascher. Die Folge ist ein vom Spotzentrum zum Spotrand gerichteter Flüssigkeitsnachtransport. Es entsteht ein zum Rand hin gerichteter Gradient [112] an Spotsubstanz.

Die in der Abbildung 5.27 gezeigten Kreisringe lassen sich mit den in [113] un-

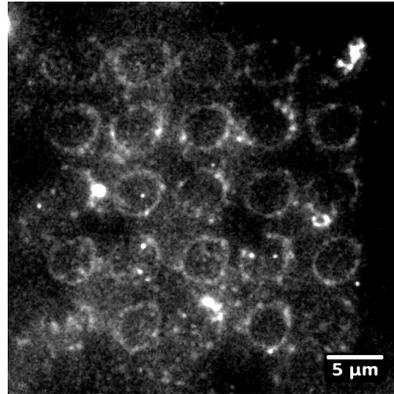


Abbildung 5.27: Feld mit auffälliger Donuts-Ausprägung der gesetzten Spots (Durchführung gemäß Protokoll — Anfärbung der DNA mit SYBR-Green I — Filter i)

tersuchten Modellen erklären. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei, dass drei Bindungsschritte erforderlich sind, um das hier gezeigte Signal der DNA zu generieren: Das Binden des mit dem AFM aufgetragenen Neutravidins als erstem Schritt, gefolgt vom Inkubieren der biotinylierten Adressoligonukleotide als zweitem und dem Hybridisieren der DNA-Konstruktelemente als drittem Schritt. Allen drei ist gemeinsam, dass sie statisch, d.h. diffusionslimitiert sind. Es fand keine aktive Durchmischung der inkubierten Lösungen statt. Die in [113] dargestellten Modellrechnungen lassen sich auf die hier beobachteten Ergebnissen anwenden: Der Donut-Effekt ist um so stärker ausgeprägt, je größer die Bindungswahrscheinlichkeit ist und je flacher der über dem Spot stehende Flüssigkeitsfilm ist. Bedingt durch das mit dünnen Flüssigkeitsfilmen einhergehende geringe Volumen (direkt über dem Spot), kommen die Bindungspartner vermehrt von der Randregion. Bei rasch erfolgender Bindung lagern sich die Bindungspartner somit vermehrt am Spotrand an und bilden das typische Donut-Spotbild. Einheitlichere Spots werden dagegen erreicht, wenn die inkubierten Bindungspartner, bedingt durch geringere Bindungswahrscheinlichkeiten, mehrere Anläufe für ein erfolgreiches Binden benötigen und daher auch das Spotzentrum erreichen können.

In der angegebenen Literatur wird vermutet, dass der Donut-Effekt bei sehr kleinen Spotdurchmessern (in der Größenordnung der Donut-Rand-Breite; wenige Mikrometer [113]) wieder abnehmen sollte, was anhand der hier vorgestellten Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden kann. Es gilt aber zu beachten, dass hier drei aufeinander aufbauende und somit verkettete Bindungsereignisse den Effekt verstärken

und eine Eins-zu-eins-Übertragung nicht möglich ist. Andererseits spricht gegen die Anwendbarkeit der „Donut-Theorie“, dass beim zweiten und dritten Schritt, dem Adressieren mit den Oligonukleotiden und dem Binden der DNA-Konstrukte, der Spotdurchmesser um ein Vielfaches kleiner ist als die Höhe der darüber stehenden Lösung.

Denkbar ist auch, dass die mechanische Belastung der Probenoberfläche durch das Annähern der AFM-Spitze den Probenunterbau, bestehend aus dem Silan mit Seitenkette und Biotin mit Seitenkette, beschädigt. Die Folge wäre eine Fehlstelle im Spotzentrum. Für eine abschließende Klärung wären weitere Untersuchungen nötig.

In Hinblick auf das Aufbauen von Nanostrukturen könnte sich die Erzeugung von Kreisringen anstelle von flächigen Spots dahingehend als vorteilhaft erweisen, als dass sich der Ort der immobilisierten Ankerelemente vorzugsweise auf der Kreislinie befindet und somit räumlich wesentlich schärfer definiert wäre. Die gezielte Reproduktion dieser geometrischen Strukturen ist jedoch aufgrund der momentan manuellen Beladung der AFM-Spitze nur eingeschränkt möglich.

5.5 PNA-Funktionalisierung der DNA-Nanostruktur

Die Fähigkeit der PNA an dsDNA binden zu können, wurde in Kapitel 3.4 auf Seite 29 erörtert. Hier wird dargestellt, wie dies technisch, mit dem Ziel die DNA-Nanostruktur gezielt und basengenau zu funktionalisieren, umgesetzt werden kann.

Wenn die PNA gebunden ist, ergeben sich vielfältige Möglichkeiten der weiteren Vorgehensweise. Um ein möglichst allgemeingültiges und frei adressierbares System zu erhalten, wurde der in Abbildung 5.28 dargestellte Aufbau gewählt. Die an die DNA bindende PNA-Sequenz wurde so verlängert, dass diese wie ein Fähnchen aus dem Bindungskomplex herausragt und ermöglicht damit einem Oligonukleotid zu binden. Da das in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme zu erwartende Signal sehr gering sein würde, wurde das die PNA bindende DNA-Oligonukleotid erweitert. Die fünf repetitiven Einheiten zur Bindung des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids dienen der Signalverstärkung (vergleiche hierzu die Abbildung 5.28).

5.5.1 Verdünnung und Binden der PNA

Die Ausbildung der PNA-DNA-Triplex (siehe Kapitel 3.4 auf Seite 32) erfolgt nur unter geringen Ionenstärken und Abwesenheit von zweiwertigen Ionen. Der PNA-Triplex-Puffer setzt sich aus 10 mM Tris-Cl und 1 mM EDTA (pH 7,4) zusammen. Bei

erfolgter Bindung kann in den gewünschten Zielpuffer mit anderer Zusammensetzung gewechselt werden.

Erarbeitete Durchführung: Die von PETER NIELSEN synthetisierte PNA-3927 wies nach dem Resuspensieren einen Absorptionswert von 1,367 ($\lambda = 260 \text{ nm}$; $d = 10 \text{ mm}$) auf. Mit dem gegebenen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 248400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ergibt sich eine Konzentration der PNA-Stammlösung von $55 \text{ }\mu\text{M}$. Zum Binden der PNA an die Konstrukte A und B wurde $2 \text{ }\mu\text{l}$ der PNA-Stammlösung mit $50 \text{ }\mu\text{l}$ PNA-Triplex-Puffer verdünnt und dies im letzten Reinigungsschritt der DNA-Konstrukt-Herstellung zum Resuspensieren des präzipitierten DNA-Konstrukts benutzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese beiden Ansätze wurden anschließend erneut mit SureClean aufgereinigt und in $100 \text{ }\mu\text{l}$ TE-III Puffer resuspensiert. Der zusätzliche Reinigungsschritt stellte sicher, dass die nicht gebundene und im Überschuss vorgelegte PNA aus den Ansätzen entfernt wurde.

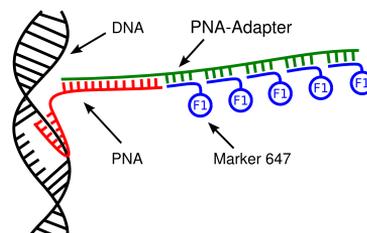


Abbildung 5.28: Prinzipskizze der an der DNA durch Triplexinvasion gebundenen PNA — mit Adapterelement aus DNA mit fünf identischen Erkennungssequenzen zur Bindung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

5.5.2 PNA-Bindungsnachweis

Die dsDNA-bindenden Eigenschaften der PNA (siehe Kapitel 3.4 auf Seite 29) ermöglichen es, die aufgespannte DNA-Brücke um weitere Bindungselemente, entsprechend mit definierten Bindungsmotiven, zu ergänzen. Ziel des im Folgenden dargestellten Versuches war es, den Nachweis des Bindens der in dieser Arbeit designten PNA zu erbringen.

Zunächst musste untersucht werden, ob und wenn ja unter welchen bevorzugten Bedingungen die PNA an das DNA-Konstrukt bindet. Die Abbildung 5.29 stellt alle wesentlichen Elemente des Versuches dar. Im sich daran anschließenden Versuch wird das zuvor erhaltene Ergebnis auf die DNA-Nanostruktur übertragen, um das Postulat zur PNA-DNA-Nanofunktionalisierung zu bestätigen.

Der Nachweis über das Binden und Adressieren der PNA wird über Fluoreszenzmarker geführt. Wie in Abbildung 5.29 dargestellt, bindet der Fluoreszenzmarker 647 (F1) als fluoreszenzmarkiertes Oligonukleodid an den PNA-Adapter. Dieser PNA-Adapter bindet wiederum an das nicht zur Triplexformation beitragende, herausragende Fähnchen der PNA und zeigt die PNA an.

Um diesen Test möglichst einfach zu halten, wurde er mit der herkömmlichen Mikroarray-Technik durchgeführt. Die Oberfläche wurde biotinyliert und flächig mit Neutravidin beladen. Aufgetragen wurden die in Abbildung 5.29 dargestellten Bestandteile: Die DNA-Konstrukte A und B, die PNA, der PNA-Adapter und ein am PNA-Adapter bindender Marker (vergl. Tabelle 5.2).

Die Bedingungen, unter denen die PNA an die DNA unter Ausbildung der PNA-DNA-Triplex bindet, wurden in 5.5.1 auf Seite 80 dargestellt. So wurde an den Stellen, an denen die PNA gemeinsam mit der DNA auftritt, die erstere unter geringen Ionenstärken an die DNA-Konstrukte gebunden und später durch einen Pufferaustausch in den gewünschten Hybridisierungspuffer (z. B. TE-Puffer III) überführt.

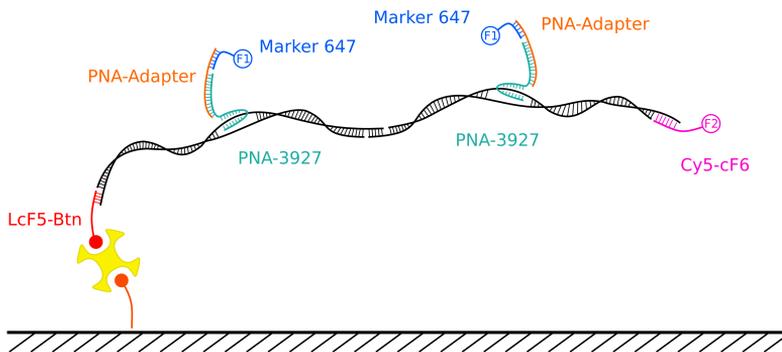


Abbildung 5.29: Nachweis des PNA-Bindungsereignisses über einen PNA bindenden Adapter mit Marker als Sonde. Auf der mit Neutravidin beschichteten Glasoberfläche wird das DNA-Doppelkonstrukt immobilisiert. In der Mitte befindet sich die homologe Verbindungsstelle, mit der beide Teilstücke verbunden sind. In Rot ist die PNA dargestellt — sie findet an jedem Teilstück des Doppelkonstrukts eine singuläre Bindestelle. Der Marker F1 (blau) kann mittels Adapteroligonukleotid (orange) mit der PNA verbunden werden. Am Ende des DNA-Doppelkonstrukts befindet sich ein weiterer Marker F2 (lila). Dieser Marker kann nur an eine der beiden endständigen Seiten binden (publiziert in [107]).

Aus den Abbildungen 5.29 und 5.30 kann abgeleitet werden, dass erst im Zusammenspiel aller Komponenten, wie dem DNA-Konstrukt, der PNA und dem DNA-Adapter mit seiner Sonde, ein Fluoreszenzsignal zustande kommen kann. Das Ergebnis in Abbildung 5.30 zeigt an, dass sich beim Fehlen der PNA (Variation 2), Fehlen

Tabelle 5.2: Zusammensetzung der gespotteten Lösungen

	PNA	PNA-Adapter
Variation 1:	+	+
Variation 2:	-	+
Variation 3:	+	-
Variation 4:	-	-

des PNA-Adapters (Variation 3) oder von beidem (Variation 4), ein bedeutend geringeres Fluoreszenzsignal ergibt, als wenn der Aufbau vollständig, wie in Abbildung 5.29 gezeigt, erfolgt.

Die Signalverstärkung durch die fünf repetitiven Bindungsstellen des PNA-Adapters kann gut nachvollzogen werden. Das Fluoreszenzsignal der korrekt zusammengesetzten Variation 1 ist größer als das des Eckpunktmarkers (Mischung aus DY547-Btn und DY657-Btn). Letzterer ist der in der Praxis häufig hervortretende Orientierungspunkt eines Arrays.

Dies lässt den Schluss zu, dass die homopyrimidin-PNA durch Triplex-Invasion an das DNA-Konstrukt bindet. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die PNA an genau der für sie vorgesehenen Bindestelle (siehe Abbildung 5.31 auf der nächsten Seite) gebunden hat.

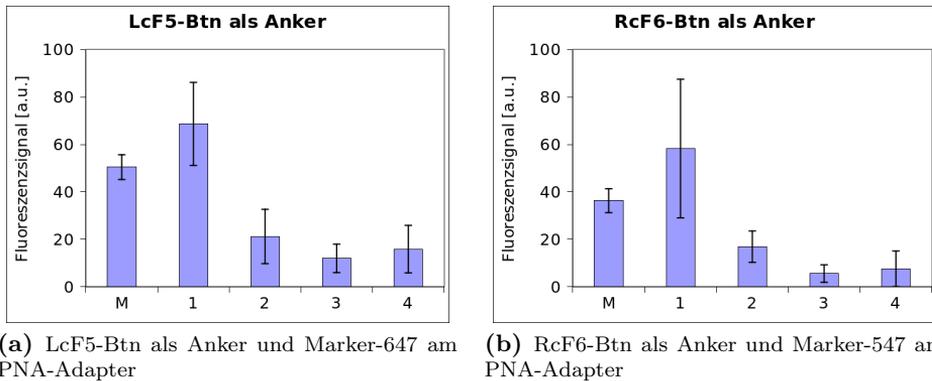


Abbildung 5.30: Die aus dem PNA-Bindungsversuch hervorgehenden Signale. Die Zahlen der Rubrikenachse entsprechen den Variationen der Tabelle 5.2 (M = Eckpunktmarker DY547-Btn und DY657-Btn) (publiziert in [107]).

Erarbeitete Durchführung: Der Versuch fand auf silanisierten Glasobjektträgern statt. Diese wurden biotinyliert und mit dem Blocking Reagenz CA geblockt

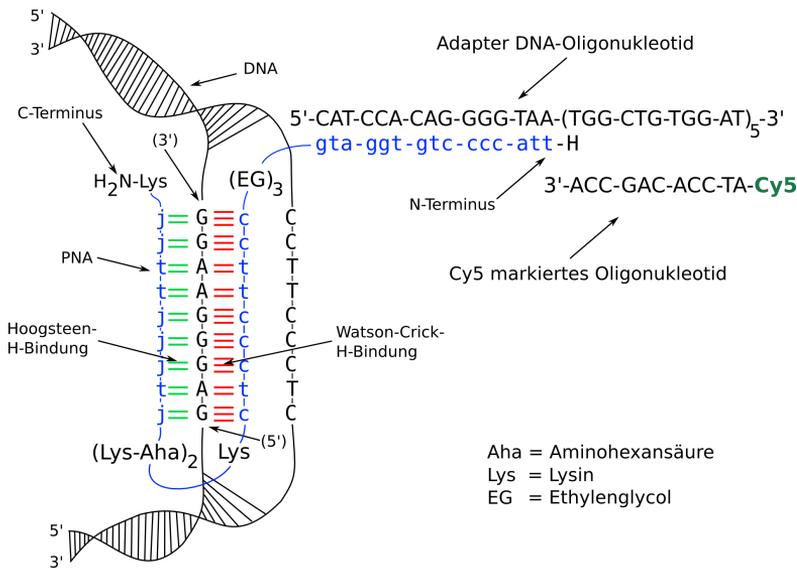


Abbildung 5.31: Schematische, sequenzrichtige Darstellung aller an der PNA-DNA-Triplexstruktur beteiligten Komponenten (publiziert in [107]).

(1 h in 0,1 %-iger (w/v) Blocking-Lösung). Gemäß dem Spottingmuster in Abbildung 5.32 wurden die in der Tabelle 5.3 aufgeführten Lösungen aufgetragen. Als Eckpunktmarker (M) kam eine Mischung aus je 500 nM DY547 und DY647 zum Einsatz. Als Nullprobe (P) wurde TE-III-Puffer verwendet. Nach dem Spotten der Chips wurden sie für eine Stunde bei 25 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde Cy5-cF6 mit und ohne Marker-547 bzw. Cy3-RS5 mit und ohne Marker-647 (jeweils 1 µM) aufgetragen und für eine Stunde bei 35 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit hybridisiert. Nach dem Waschen mit PBS-Puffer und kurzem Nachspülen mit entmineralisiertem Wasser fand die Auswertung mit dem Axon-Scanner statt.

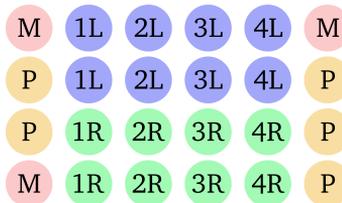


Abbildung 5.32: Spottingsschema zum PNA-Funktionstest. L und R stehen für die DNA-Seite, welche immobilisiert werden soll. Die Zahlen 1 – 4 sind stellvertretend für eine der Lösungszusammensetzungen. Der Eckpunktmarker ist mit „M“, der Puffer mit „P“ gekennzeichnet.

Tabelle 5.3: Zusammensetzung der zu spottenden Lösungen (A = Verankerung für die Konstruktsseite A; B = Verankerung für die Konstruktsseite B; 1..4 = Probenvariation)

	L	R
1:	2,7 µl A-Konstrukt mit PNA	2,7 µl A-Konstrukt mit PNA
	2,7 µl B-Konstrukt mit PNA	2,7 µl B-Konstrukt mit PNA
	2,7 µl PNA-Adapter 1 µM	2,7 µl PNA-Adapter 1 µM
	2,7 µl LcF5-Btn 1 µM	2,7 µl RcF6-Btn 1 µM
2:	2,7 µl A-Konstrukt ohne PNA	2,7 µl A-Konstrukt ohne PNA
	2,7 µl B-Konstrukt ohne PNA	2,7 µl B-Konstrukt ohne PNA
	2,7 µl PNA-Adapter 1 µM	2,7 µl PNA-Adapter 1 µM
	2,7 µl LcF5-Btn 1 µM	2,7 µl RcF6-Btn 1 µM
3:	2,7 µl A-Konstrukt mit PNA	2,7 µl A-Konstrukt mit PNA
	2,7 µl B-Konstrukt mit PNA	2,7 µl B-Konstrukt mit PNA
	2,7 µl TE-III Puffer 1x	2,7 µl TE-III Puffer 1x
	2,7 µl LcF5-Btn 1 µM	2,7 µl RcF6-Btn 1 µM
4:	2,7 µl A-Konstrukt ohne PNA	2,7 µl A-Konstrukt ohne PNA
	2,7 µl B-Konstrukt ohne PNA	2,7 µl B-Konstrukt ohne PNA
	2,7 µl TE-III Puffer 1x	2,7 µl TE-III Puffer 1x
	2,7 µl LcF5-Btn 1 µM	2,7 µl RcF6-Btn 1 µM

5.5.3 Integration der PNA in das DNA-Nanoarray

Aus den vorangegangenen Entwicklungsstufen heraus erwächst die experimentelle Kombination des DNA-Nanoarrays mit der PNA als Funktionselement. Die Grundvoraussetzungen sind der sichere und reproduzierbare Aufbau der DNA-Nanostruktur und das Einhalten der Bedingungen, unter denen die gewünschten Bindungsereignisse erfolgen. Die Abbildung 5.33 ist die konsequente Fortsetzung des in Abbildung 5.23 auf Seite 73 dargestellten Modells.

Das Bindungsmotiv der PNA, welche am prozessierten M13mp18-Plasmid an der Position 2668 binden kann, ist in Abbildung 5.31 im Detail dargestellt. An dieser Stelle wird noch einmal betont, dass die Diskriminierung der PNA zur Ausbildung der PNA-Triplex außerordentlich hoch ist und es praktisch zu keinen Basenfehlpaaungen kommt. Wie in der Abbildung 5.33 dargestellt, setzt sich die DNA-Brücke aus zwei identischen Teilen zusammen. Daher wird es bei beiden DNA-Konstrukten A und B an der Position 2668 zur Ausbildung der PNA-Triplex kommen, was zum Bereitstellen einer neuen Ankersequenz direkt an den DNA-Strängen führt. Dieser neue Ankerpunkt wird hier mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde nachgewiesen (sie-

he Abbildung 5.33). Der Abstand der neu eingeführten Bindungsstellen beträgt unter der Annahme, dass der DNA-Strang vollständig gestreckt ist, 2,44 μm (7223 bp).

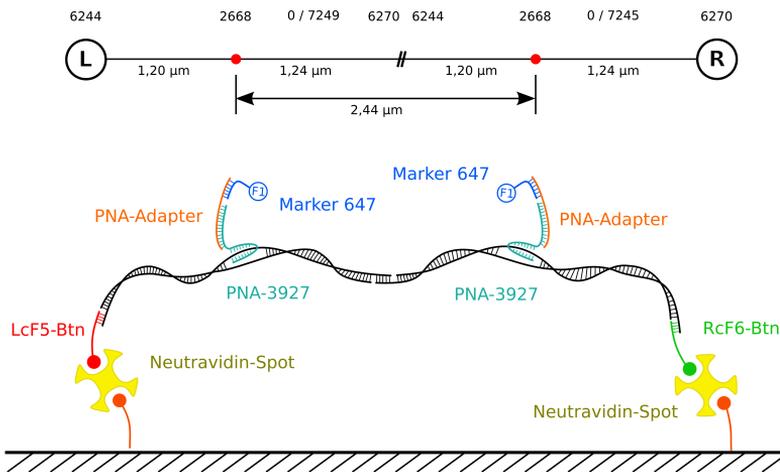


Abbildung 5.33: Modell und Dimension der PNA-funktionalisierten DNA-Brücke (Positionsangabe auf dem Plasmid in bp) (publiziert in [107])

Erarbeitete Durchführung: Die Grundlage bilden die Techniken, welche unter 5.2 auf Seite 60 und 5.4.1 auf Seite 73 beschrieben wurden. Die einzusetzenden DNA-Konstrukte tragen bereits die PNA, welche durch Austausch des Puffersystems, zweistündiges Inkubieren im PNA-Triplex-Puffer und einem zwischengeschalteten Reinigungsschritt, eingefügt worden sind (siehe hierzu 5.5.1 auf Seite 80). Nachdem das Array mit den Adresslösungen A (1 μM RcF6 in TE-III) und B (1 μM LcF5 in TE-III) erzeugt wurde, fand die Inkubation der beiden DNA-Konstrukte mit gebundener PNA im Klimaschrank bei 35 $^{\circ}\text{C}$ und 85 % Luftfeuchtigkeit statt. Die hierbei direkt auf das generierte Array aufgetragene Lösung setzte sich aus je 2 μl Konstrukt A und B inkl. PNA (1:28 mit TE-III-Puffer verdünnt), 1 μl PNA-Adapter (1 μM), 1 μl Marker-647 (1 μM) sowie 5 μl TE-III-Puffer zusammen. Das Waschen des Objektträgers, auf dem die Nanostruktur aufgebaut wurde, erfolgte in gleicher Weise wie unter 5.4.1 beschrieben: Durch wiederholtes Eintauchen in eine PBS-Tween-Lösung und schließlich PBS-Puffer. Der einzige Unterschied zum reinen Aufbau der DNA-Nanostruktur samt Nachweisführung bestand darin, dass hier auf SYBR-Green-I verzichtet werden musste.

Fügt man experimentell die gesamte Vorarbeit und die Schritte zur PNA-Nanofunktionalisierung zusammen, so erhält man die in der Abbildung 5.34 und 5.35 gezeigten Ergebnisse. Die Durchführung gleicht im Wesentlichen der zur Herstellung

des DNA-Nanoarrays in Kapitel 5.4 auf Seite 72, jedoch mit dem Unterschied, dass die DNA-Konstrukte A und B zuvor mit der PNA vorinkubiert worden sind.

In der Abbildung 5.34a fallen zunächst die vier roten Spots auf (Filter ii). Dabei handelt es sich um die gleichen Spots, wie sie in den Abbildungen 5.26 und 5.27 zu sehen sind, nur dass hier die DNA nicht mit SYBR-Green-I angefärbt wurde. Die Anfärbung dieser Spots stammt von der Erzeugung des äußeren Rahmens (siehe Abbildung 5.25a auf Seite 76). Die unter 5.2.2.1 auf Seite 64 beschriebene Kontamination der Spots bewirkt in diesem Fall die unbeabsichtigte Markierung der Spots, was hier zur Orientierung innerhalb des erzeugten Feldes ausgenutzt wurde. In diesem Fall wurde von der zwar äußerst geringen, aber dennoch detektierbaren Verunreinigung der Spots mit dem Eckpunktmarker profitiert. Das simultane Anfärben der DNA blieb erfolglos. Die grün eingefärbten und mit Pfeilen hervorgehobenen Punkte sind die am PNA-Adapter hybridisierten Marker (Filter iii). In Abbildung 5.34b sind die Abstände der zwischen den Spots befindlichen PNA-Markierungen eingetragen. Sie stimmen mit den in Abbildung 5.33 vorhergesagten Abständen überein.

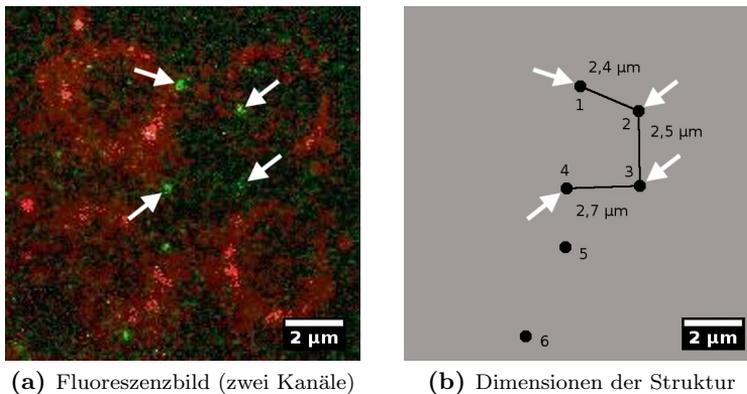


Abbildung 5.34: Falschfarbendarstellung der PNA-funktionalisierten DNA-Nanostruktur — Filter ii: Spot — Filter iii: PNA (publiziert in [107])

Die Abbildung 5.35 zeigt ein ähnliches Feld, bei dem zwischen den beiden unteren, kreisförmigen Spots zwei fluoreszierende PNA-Sonden zu sehen sind. Ihr Abstand beträgt rund 800 nm.

Wünschenswert wäre das Anfärben der DNA mit SYBR-Green-I (Filter i), parallel zum Fluoreszenzsignal der PNA, gewesen. Zur Interpretation der Abbildungen 5.34 und 5.35 können jedoch die vorangegangenen Ergebnisse hinzugezogen werden: Ausgehend von den aufgebauten DNA-Nanostrukturen in Kapitel 5.4.1 auf Seite 73 und dem geführten Nachweis zur Bindung von PNA an die immobilisierten DNA-

Konstrukte in Kapitel 5.5.2 auf Seite 81 darf an dieser Stelle der Schluss gezogen werden, dass es sich bei den diskreten Punkten zwischen den hier gezeigten Spots um die Marker an der PNA handelt, die an der DNA-Nanostruktur gebunden ist.

Der Umstand, dass hier keine flächigen Spots, sondern kreisförmige Gebilde als Ankerbereiche generiert wurden, ist für die Detektion der schwachen, auf Einzelmolekülniveau beruhenden PNA-Elemente vorteilhaft, da bei flächigen Spots das Erkennen einzelner PNA-Funktionselemente sehr schwer wäre. Ein relativ homogen verteilter Spot böte in seiner Fläche vielen DNA-Konstrukten und Teilkonstrukten die Möglichkeit, gebunden zu werden. Jedes DNA-Teilkonstrukt trägt jedoch die eingeführte PNA-Funktion und würde zu einem Fluoreszenzbild führen, in dem die Spots ein PNA-Signal generieren. Führt man sich die Abbildung 5.34a vor Augen und stellt sich vor, dass die Spots intensiv grün leuchten würden, dann ist leicht nachvollziehbar, dass die Signale zwischen den Spots kaum auszumachen wären.

An dieser Stelle kann festgehalten werden, dass die DNA-Nanostruktur um das Funktionselement der PNA erweitert werden konnte. Dies erlaubt den Schluss, dass die Adressierung mit Hilfe von PNA-Bindungsmotiven ein präzises Werkzeug darstellt, welches unter Verwendung der DNA-Arrays als Grundgerüst einen Strukturaufbau im Nanometerbereich erlaubt.

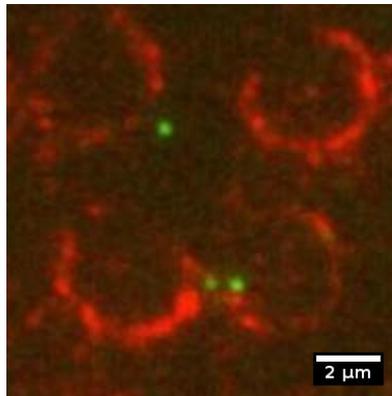


Abbildung 5.35: PNA-funktionalisierte DNA-Nanostruktur — Zwischen den beiden unteren Spots ist der fluoreszenzmarkierte PNA-Marker, grün eingefärbt, zu sehen. Der gemessene Abstand beider Punkte beträgt ca. 800 nm. (Filter ii: Spot — Filter iii: PNA)

6 Ausblick

Die Bedeutung der hier erarbeiteten Methode liegt vor allem in der Möglichkeit zur Analyse von Einzelmolekülen. Es konnte gezeigt werden, dass auch ohne Spezial- und Sonderausrüstung, d.h. ausschließlich unter Verwendung kommerziell verfügbarer Materialien, der Aufbau einer auf DNA basierenden Nanostruktur mit anschließender Nanofunktionalisierung realisierbar ist.

Bislang beruhen zahlreiche Erkenntnisse in den Lebenswissenschaften auf dem Mittelwert vieler miteinander interagierenden Moleküle. Bei Untersuchungen auf Einzelmolekülniveau würde dieser methodische Nachteil entfallen und gäbe einen weitaus tieferen Einblick in die Materie. Beispielsweise könnte man bei DNA-Interaktionsstudien unter Verwendung der DNA-Arrays als Grundgerüst den Molekülen direkt bei ihrem Wirken „zusehen“ und das Verständnis einiger Mechanismen erweitern.

Durch die Zugänglichkeit dieser neuen Methode ist auch ein Einsatz an *DNA-walkers* und ein Aufbau von Nanomaschinen denkbar. Auch Biosensoren mit artifiziellen, nanostrukturierten Enzymkaskaden oder DNA-basierende Rechnerstrukturen, kombiniert mit einer Integration in die leistungsfähige Mikroelektronik, sind vorstellbar. Ganz bewusst wurde daher die Variante zur orts aufgelösten Immobilisierung von Biomolekülen auf einen Siliziumwafer im Kapitel 5.1.3 untersucht.

Ein sehr spannendes Feld böte die Untersuchung der mRNA von Einzelzellen. Die Analyse dieser Boten- und Schlüsselsubstanz ist bisher nicht an einzelnen Zellen möglich. Zwar hat die Mikroarraytechnologie große Fortschritte, insbesondere in Hinblick auf Nachweisgrenzen und die für die Analyse notwendige Gesamtsubstanzmenge gemacht, drang aber nicht bis zur Bearbeitung einzelner Moleküle vor. Die Handhabung einzelner Moleküle könnte mit Hilfe der Nanotechnologie, insbesondere mit den gut handhabbaren DNA-Nanostrukturen gelingen und bald zu einem wertvollen Werkzeug in der Biotechnologie werden.

Das Potenzial der in dieser Arbeit vorgestellten Methode liegt vor allem in den geringen Kosten. Die notwendigen Oberflächenfunktionalisierungen lassen sich in jedem nasschemisch arbeitendem Labor realisieren. Die Oberflächenstrukturierung sollte

mit jedem Rasterkraftmikroskop möglich sein, wobei ein Übertragen der sequenziellen Deponier-Methode auf ein mechanisches Stempeln relativ leicht sein sollte und somit auch auf das Rasterkraftmikroskop verzichtet werden könnte. Generell kann die Vorgehensweise zum sequenziellen Spotten auf andere Immobilisierungsaufgaben übertragen werden.

Die Funktionalisierung der DNA-Nanostruktur mit PNA nimmt eine Schlüsselposition in Hinblick auf die Weiterentwicklung von Nanofunktionalisierungen ein. Der Einsatz der PNA, welche dazu im Stande ist, an eine doppelsträngige DNA durch Ausbildung einer Triplexstruktur zu binden, beschränkte sich hier auf fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden. Eine ganze Reihe anderer Moleküle oder idealerweise vorbereiteter Molekülverbände könnten die einfache DNA-Sonde ersetzen und zum Aufbau hochkomplexer Nanostrukturen und Nanonetzwerke führen.

Anhang

Geräte

Tabelle .1: Geräteliste

Gerät	Bezeichnung	Firma
AFM-Spitzen	DT-CONTR-SPL, 0.2 N/m	NanoAndMore GmbH,
AFM-Spitzen	50 nm Snom-Spitze	Nascatec
Alufolie	0,030 × 500 mm, 100 m/Rolle	LABOR
Feinwaage	ME235S	Satorius
Filterwürfel-Atto495 (i)	Ex BP 460 – 495, Dm 505, Em LP 510 – 550	Olympus
Filterwürfel-Cy3 (ii)	Ex BP 545/25, Dm 565, Em LP 605/70	Olympus
Filterwürfel-Cy5 (iii)	Ex BP 620/60, Dm 660, Em BP 700/75	Olympus
Gel-Dokumentation	biostep Gelsystem 8	Biostep GmbH Meinersdorfer Str. 47A, 09387 Jahnsdorf
Gelkammer	Modell: 40-0708 7 cm × 8,5 cm	Peqlab Biotechnologie GmbH
Glasobjektträger	Kalknatronglas	Menzel GmbH & Co. KG, 38116 Braunschweig
Glaspetrischalen		diverse
Heizblock	peqlab - Thriller	Clemens GmbH Dachdeckerstraße 5, 97297 Waldbüttelbrunn
Heizschrank	Typ T 6030	Heraeus Instruments, 6450 Hanau
Hg-Lampe	USH-102D; 100 W	OSRAM, GmbH, 81543 München
Kamera	1376 × 1032 Pixel, 12 bit	F-View II
Klimaschrank	Art.-Nr. 9020-0093	Binder, 78532 Tuttlingen
Kontaktwinkelmessgerät	OCA30	Dataphysics
Laborschüttler	Vortex-Genie 2 – No. G-560E	Scientific Industries Bohemia, N.Y., 11716, USA
Laborschüttler	Grant – Boekel - BFR25	Grant Instruments Ltd. Barrington, England
Lichtmikroskop	A BX51	Olympus

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle .1 – Fortsetzung – Geräteliste

Gerät	Bezeichnung	Firma
Microarrayscanner	GenePIx 4200A	Axon Instruments
Microarrayspotter	TopSpot	BioFluidiX GmbH, 79110 Freiburg
Mikrowelle	NN-E203WB	Panasonic
Objektiv	UPlanFL N; 40x/0.75	Olympus
Objektiv	UPlanFL N; 100x/1.30 Oil	Olympus
pH-Meter	inoLab pH 730	WTH 82362 Weilheim
Photometer	NanoDrop	
Pipetten		Eppendorf
Rasterkraftmikroskop	CP-II	Veeco, Santa Barbara CA, 93117 USA
Strahlunterbrecher	VS24 Shutter	Uniblitz – Bincent Associates
Spannungsquelle	E143	Consort
Teflonhalterung		Fraunhofer – IBMT
Ultraschallbad	Sonorex RK 510 H (840 W)	Bandelin Electronic Heinrich- straße 3 – 4, 12207 Berlin
Waage	LE6202P	Sartorius
Zentrifuge	Varifuge 3.0R	Heraeus Instruments, 6450 Hanau
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf

Tabelle .2: Filterwürfel

Filter	Extinktion	Spiegel	Emission
Filter i	460 – 495 nm	505 nm	510 – 550 nm
Filter ii	532 – 558 nm	565 nm	570 – 640 nm
Filter iii	590 – 650 nm	660 nm	662 – 737 nm

Chemikalien

Tabelle .3: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Name	5'-Ende	Sequenz	Lot	Synthese
M13-LF5	Phosphat	5'-gta ccg tgg aaa gtg gca atc gtg aag gtc cgg tca taa agc gat aag-3'	586673	20.04.2009
M13-RF6	Phosphat	5'-ggg gga aag tgg caa tcg tga agt cct cgc cta gtg ttt cat tg-3'	586674	20.04.2009
M13-LcF5	-	5'-ttc acg att gcc act ttc cac g-3'	586678	20.04.2009
M13-RcF6	-	5'-ttc acg att gcc act ttc cac ctg ca-3'	586679	20.04.2009
M13-M1-F10	Phosphat	5'-gta ccg gac gaa tac aaa ggc ta-3'	661640	05.11.2009
M13-M1-cF10	Phosphat	5'-ctt gcg tgt agc ctt tgt att cgt ccg-3'	661641	05.11.2009
M13-M2-F11	Phosphat	5'-cac gca agg tct gct tga ttt gga ggc tgc a-3'	661638	05.11.2009
M13-M2-cF11	Phosphat	5'-gcc tcc aaa tca agc aga-3'	661639	05.11.2009
LcF5	Biotin	5'-ctt atc gct tta tga ccg gac c-3'	586675	20.04.2009
RcF6	Biotin	5'-caa tga aac act agg cga gga c-3'	586676	20.04.2009
RcF2	Biotin	5'-gtc ggt tct aag aaa atg gcg g-3'	586677	20.04.2009
Cy5-LF5	Cy5	5'-ggg ccg gtc ata aag cga taa g-3'	586680	20.04.2009
Cy5-cF6	Cy5	5'-caa tga aac act agg cga gga c-3'	586681	20.04.2009
Cy3-RF6	Cy3	5'-gtc ctc gcc tag tgt ttc att g-3'	586682	20.04.2009
Atto495-EF2	Atto495	5'-ccg cca ttt tct tag aac cga c-3'	586683	20.04.2009
Cy3-cF5	Cy3	5'-ctt atc gct tta tga ccg gac c-3'	467870	28.04.2008
Marker-547	DY547	5'-atc cac agc ca-3'	821138	16.11.2010
Marker-647	DY647	5'-atc cac agc ca-3'	821137	16.11.2010
PNA-Adapter	-	5'-cat cca cag ggg taa (tgg ctg tgg at) ₅ -3'	821136	16.11.2010
PNA-3927	-	C-Lys-jjt tjj jtj-(Lys-Aha) ₂ -Lys ctc cct tcc-(EG) ₃ -gta ggt gtc ccc att-H	3927	14.03.2011

Tabelle .4: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	vollständiger Name	Maß	Bezugsquelle	Reinheit	Charge Lot
Block-Rosch			Novagen		M00004517
BSA	Bovines Serumalbumin	69.000 g/mol	Carl ROTH	>95 %	300159317
BSA	Bovines Serumalbumin	100x	New England Biolabs	für Molekularbiologie	0210901
Rotiblock		10x	Carl ROTH		049103315
Salmon sperm DNA	als Natriumsalz	500 - 1000 bp	AppliChem		4L002404
DY-547-Biotin		995,23 g/mol	DYOMICS		E02-04173
DY-647-Biotin		1021,27 g/mol	DYOMICS		E02-05002
Ethidiumbromid		0,025 %	Carl ROTH		409110211
SYBR-Green I		10.000x	BMA – BioWhittaker		1801-14
Aceton		58,08 g/mol	Carl ROTH	technisch	039103034
Ethanol		99 %	AppliChem	für Molekularbiologie	7R003710
Glycerin	Propan-1,2,3-triol	92,02 g/mol	AppliChem	>99,5 % Molekularbiologie	7E003853
Hellmanex II			Hellma GmbH & Co.KG		118295
Immersionsöl	437 mPa.s	d ₄ ²⁰ :1,09	Fluka		434605/1 41102
Propan-1,2-diol	Ethylenglykol	62,07 g/mol	Fluka	>99,5 %	366216/1 23197
SDS	Natriumlaurylsulfat	288,38 g/mol	Sigma-Aldrich	10 %	0001446857
Wasser	Reinstwasser	0,055 µS/cm	Satorius AG		
Wasser	VE-Wasser		Reinstwasseranlage		
Wasserstoffperoxid	Rotipuran	30 %	Carl ROTH	zur Analyse	27897842
Acc65I		10.000 U/ml	New England Biolabs	für Molekularbiologie	15
BamHI		20.000 U/ml	New England Biolabs	für Molekularbiologie	93
DNA-Hyperladder-I			Bioline	für Molekularbiologie	H1-108 I
GeneRuler 1kb Plus			Fermentas	für Molekularbiologie	00024367
Ladepuffer	DNA Ladder	6x	Fermentas	für Molekularbiologie	00024367
M13mp18 RF I DNA		100 µg/ml	New England Biolabs	für Molekularbiologie	0420812
NEB-Puffer-3		10x	New England Biolabs	für Molekularbiologie	0607
PstI		20.000 U/ml	New England Biolabs	für Molekularbiologie	40
SureClean			Bioline	für Molekularbiologie	QC-107L
T4-Ligase		400.000 U/ml	New England Biolabs	für Molekularbiologie	0980910
T4-Ligase-Puffer		10x	New England Biolabs	für Molekularbiologie	0980910

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 4 – Fortsetzung – Chemikalien

Chemikalie	vollständiger Name	Maß	Bezugsquelle	Reinheit	Charge Lot
APTES	(3-Aminopropyl)-triethoxysilane	221,37 g/mol	Sigma-Aldrich	für Molekularbiologie	BCBB2014
Biotin	d-Biotin	244,3 g/mol	Sigma-Aldrich	99 %	74H1253
Blocking Reagent CA			AppliChem		M5223J
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid	155,24 g/mol	Sigma-Aldrich		035K0576
GOPS	(3-Glycidyloxypropyl)-trimethylsilan	236,34 g/mol	Sigma-Aldrich	> 98 %	STBB3936
N-Lauroylsarcosin 20 %	C15H29NO3	293,38 g/mol	Sigma-Aldrich	20 % Molekularbiologie	125K6068
Neutravidin		60.000 g/mol	Pierce		II115097
PEG-600	HO(C ₂ H ₄ O) _n H	600 g/mol	AppliChem		61007653
Streptavidin		443,42 g/mol	Sigma-Aldrich	Streptomyces avidinii	61H6811
Sulfo-NHS-Biotin		454,54 g/mol	Thermo-Scientific		JK126151
Sulfo-NHS-LC-Biotin			Sigma-Aldrich	95 % Molekularbiologie	017K5007
Borsäure		61,83 g/mol	Sigma-Aldrich	99 %	124K0051
Essigsäure		60,05 g/mol	AppliChem	reinst Ph. Eur.	6P002304
Schwefelsäure		98,08 g/mol	Carl ROTH	>95 %	289108131
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	141,96 g/mol	AppliChem	99 %	5J005834
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	292,24 g/mol	AppliChem	99 %	5H006378
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,3 g/mol	AppliChem	99,5 % Molekularbiologie	5S001839
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure	195,2 g/mol	Sigma-Aldrich	99,5 %	37H5744
Natriumchlorid	NaCl	58,44 g/mol	Carl ROTH	>99,8 %	42681688
Natriumcitrat	tri-Natriumcitrat-dihydrat	258,07 g/mol	Carl ROTH	>99 %	A762248
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	119,98 g/mol	AppliChem	99,5 % Molekularbiologie	6E001409
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	84,01 g/mol	Merck	zur Analyse	K1287229
Natriumhydroxid		40,00 g/mol	Carl ROTH	>98 %	419110207
PBS	Dulbecco's		AppliChem		0964-1/459
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	121,14 g/mol	Carl ROTH	>99,3 %	070150010

Tabelle .5: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

Name	pH-Wert	Konz.		Zusammensetzung	
Biotinpuffer	7,4	1 ×	100 mM	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
			150 mM	NaCl	Natriumchlorid
Natriumcarbonatpuffer	7,4	1 ×	50 mM	NaHCO ₃	Natriumcarbonat
			100 mM	NaCl	Natriumchlorid
TE-Puffer I	8,0	2 ×	20 mM	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
			2 mM	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TE-Puffer II	8,0	2 ×	100 mM	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
			200 mM	NaCl	Natriumchlorid
			2 mM	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TE-Puffer III	8,0	2 ×	100 mM	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
			200 mM	NaCl	Natriumchlorid
Tris-Cl	7,4	2 ×	200 mM	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
			1200 mM	NaCl	Natriumchlorid
TBE-Puffer		10 ×	890 mM	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
			890 mM	Borsäure	
			20 mM	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PBS-Tween	7,4		10 mM	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
			2,7 mM	KCl	Kaliumchlorid
			140 mM	NaCl	Natriumchlorid
			0,05 %		Tween 20
			300 mM	NaCitrat	Natriumcitrat
			300 mM	NaCitrat	Natriumcitrat
			0,2 %	C ₁₅ H ₂₉ NO ₃	N-Lauroylsarcosin 20%
			200 mM	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
20 mM	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure			
PNA-Triplex-Puffer	7,4		10 mM	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
			1 mM	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Quelltexte

Quelltext 1: 25Punkte_A.9my_4s.in

```
0 ;=====
;
;Funktion: - es werden 13 Punkte gesetzt
;          - Abstände: 9 Mikrometer
;          - Kontaktzeit: 4 Sekunden
5 ;
;          1 3
;          5
;          7 9
;
10 ;=====
;--- Variablendefinition

let kontakt_on = 3.4000 ;Kraft für den Kontakt [nN]
let kontakt_off = -4.0000 ;Kraft für keinen Kontakt [nN]
15
sync 4900

;=====
;--- Initialisierung

20 scanner on
dac ZDAC_WAVE 0 DACHALF
esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on ;Initial-SP

25 xservo -gain 0.40 -ratio 0.80 on
yservo -gain 0.40 -ratio 0.80 on
zservo -gain 1.5 on

;=====
30 ;----- POINT1 -----
sxy -x -18.0000 -y 18.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
35 sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

40 zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT3 -----
45 sxy -x 0.0000 -y 18.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
```

```
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT5 -----
sxy -x 18.0000 -y 18.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT7 -----
sxy -x -9.0000 -y 9.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT9 -----
sxy -x 9.0000 -y 9.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT11 -----
sxy -x -18.0000 -y 0.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000
```

```
100 | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
    | sync 9100
    |
    | ;----- POINT13 -----
    | sxy -x 0.0000 -y 0.0000 -speed 22.0000
105 | sync 1100
    | approach
    | sync 3900
    |
    | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
110 | sync 4000
    |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
    | sync 9100
    |
    | ;----- POINT15 -----
115 | sxy -x 18.0000 -y 0.0000 -speed 22.0000
    | sync 1100
    | approach
    | sync 3900
    |
120 | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
    | sync 4000
    |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
125 | sync 9100
    |
    | ;----- POINT17 -----
    | sxy -x -9.0000 -y -9.0000 -speed 22.0000
130 | sync 1100
    | approach
    | sync 3900
    |
    | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
135 | sync 4000
    |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
    | sync 9100
    |
    | ;----- POINT19 -----
140 | sxy -x 9.0000 -y -9.0000 -speed 22.0000
    | sync 1100
    | approach
    | sync 3900
    |
145 | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
    | sync 4000
    |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
    | sync 9100
150 |
    | ;----- POINT21 -----
    | sxy -x -18.0000 -y -18.0000 -speed 22.0000
```

```
155   sync 1100
      approach
      sync 3900

      esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
      sync 4000

160   zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
      sync 9100

      ;----- POINT23 -----
165   sxy -x 0.0000 -y -18.0000 -speed 22.0000
      sync 1100
      approach
      sync 3900

      esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
170   sync 4000

      zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
      sync 9100

175   ;----- POINT25 -----
      sxy -x 18.0000 -y -18.0000 -speed 22.0000
      sync 1100
      approach
180   sync 3900

      esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
      sync 4000

185   zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
      sync 9100

      ;----- ENDE -----
190   dac ZDAC_WAVE 0 DACHALF
      xservo off
      yservo off
      zservo off
      esig off
      scanneron off
      quit
```

Quelltext 2: 25Punkte_B.9my_4s.in

```
0 ;=====
;
;Funktion: - es werden 12 Punkte gesetzt
;          - Abstände: 9 Mikrometer
;          - Kontaktzeit: 4 Sekunden
5 ;
;          2
;          4 6
;          8
;
10 ;=====
;--- Variablendefinition

let kontakt_on = 3.4000 ;Kraft für den Kontakt [nN]
let kontakt_off = -4.0000 ;Kraft für keinen Kontakt [nN]
15
sync 4900

;=====
;--- Initialisierung
20
scanneron on
dac ZDAC_WAVE 0 DACHALF
esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on ;Initial-SP

25
xserve -gain 0.40 -ratio 0.80 on
yserve -gain 0.40 -ratio 0.80 on
zserve -gain 1.5 on

;=====
30
;----- POINT2 -----
sxy -x -9.0000 -y 18.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
35 sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

40
zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT4 -----
45 sxy -x 9.0000 -y 18.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
50 sync 4000
```

```
zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

55 ;----- POINT6 -----
sxy -x -18.0000 -y 9.0000 -speed 22.0000
sync 1100
  approach
  sync 3900

60 esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
65 sync 9100

;----- POINT8 -----
sxy -x 0.0000 -y 9.0000 -speed 22.0000
70 sync 1100
  approach
  sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
75 sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT10 -----
80 sxy -x 18.0000 -y 9.0000 -speed 22.0000
sync 1100
  approach
  sync 3900

85 esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
90 sync 9100

;----- POINT12 -----
sxy -x -9.0000 -y 0.0000 -speed 22.0000
95 sync 1100
  approach
  sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

100 zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT14 -----
sxy -x 9.0000 -y 0.0000 -speed 22.0000
```

```
105 | sync 1100
    | approach
    | sync 3900
    |
    | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
110 | sync 4000
    |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
    | sync 9100
    |
115 | ;----- POINT16 -----
    | sxy -x -18.0000 -y -9.0000 -speed 22.0000
    | sync 1100
    | approach
    | sync 3900
120 |
    | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
    | sync 4000
    |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
125 | sync 9100
    |
    | ;----- POINT18 -----
    | sxy -x 0.0000 -y -9.0000 -speed 22.0000
    | sync 1100
130 | approach
    | sync 3900
    |
    | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
    | sync 4000
135 |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
    | sync 9100
    |
    | ;----- POINT20 -----
140 | sxy -x 18.0000 -y -9.0000 -speed 22.0000
    | sync 1100
    | approach
    | sync 3900
    |
145 | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
    | sync 4000
    |
    | zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
    | sync 9100
150 |
    | ;----- POINT22 -----
    | sxy -x -9.0000 -y -18.0000 -speed 22.0000
    | sync 1100
    | approach
155 | sync 3900
    |
    | esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
```

```
sync 4000

160 zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT24 -----
165 sxy -x 9.0000 -y -18.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
sync 3900

170 esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

175 ;----- ENDE -----
dac ZDAC_WAVE 0 DACHALF
xservo off
yservo off
zservo off
180 esig off
scanneron off
quit
```

Quelltext 3: 25Punkte_Z_Ecken_4s.in

```

0  ;=====
;
;Funktion: - es werden 8 Punkte gesetzt
;          - Abstände: 60 Mikrometer
;          - Kontaktzeit: 4 Sekunden
5  ;
;          1 2 3
;          4  6
;          7 8 9
;
10 ;=====
;--- Variablendefinition

let kontakt_on = 3.4000 ;Kraft für den Kontakt [nN]
let kontakt_off = -4.0000 ;Kraft für keinen Kontakt [nN]
15
sync 4900

;=====
;--- Initialisierung
20
scanner on
dac ZDAC_WAVE 0 DACHALF
esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on ;Initial-SP

25
xserve -gain 0.40 -ratio 0.80 on
yserve -gain 0.40 -ratio 0.80 on
zserve -gain 1.5 on

;=====
30
;----- POINT1 -----
sxy -x -60.0000 -y 60.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
35
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

40
zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT2 -----
45
sxy -x 60.0000 -y 60.0000 -speed 22.0000
sync 1100
approach
sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
50
sync 4000

```

```
zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

55 ;----- POINT3 -----
sxy -x 60.0000 -y -60.0000 -speed 22.0000
sync 1100
  approach
  sync 3900

60 esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
65 sync 9100

;----- POINT4 -----
sxy -x -60.0000 -y -60.0000 -speed 22.0000
70 sync 1100
  approach
  sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
75 sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT5 -----
80 sxy -x 0.0000 -y 60.0000 -speed 22.0000
sync 1100
  approach
  sync 3900

85 esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
90 sync 9100

;----- POINT6 -----
sxy -x 60.0000 -y 0.0000 -speed 22.0000
95 sync 1100
  approach
  sync 3900

esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
sync 4000

100 zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
sync 9100

;----- POINT7 -----
sxy -x 0.0000 -y -60.0000 -speed 22.0000
```

```
105  sync 1100
      approach
      sync 3900

      esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
110  sync 4000

      zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
      sync 9100

115  ;----- POINT8 -----
      sxy -x -60.0000 -y 0.0000 -speed 22.0000
      sync 1100
      approach
      sync 3900

120  esig -set NANO_NEWTON kontakt_on on
      sync 4000

      zHead -speed 7.0000 -dist 60.0000 -abs
125  sync 9100

      ;----- ENDE -----
      dac ZDAC_WAVE 0 DACHALF
130  xservo off
      yservo off
      zservo off
      esig off
      scanneron off
      quit
```


Literaturverzeichnis

- [1] C. R. Robbins. **Chemical and Physical Behavior of Human Hair**, Band 4. Springer-Verlag, New York, 2002.
- [2] Ken Overturf, Muhsen Al-Dhalimy, Milton Finegold, und Markus Grompe. **The Repopulation Potential of Hepatocyte Populations Differing in Size and Prior Mitotic Expansion**. *American Journal of Pathology*, 155(6):2135–2143, Dezember 1999.
- [3] Eric Ponder. **The Measurement of the Diameter of Erythrocytes**. *Experimental Physiology*, 20:29–39, Januar 1929.
- [4] Jan Koolman und Klaus-Heinrich Röhm. **Taschenatlas der Biochemie**. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Ausgabe, 1998. ISBN 3-13-759402-2.
- [5] Sripathi M Sureban, Randal May, Fadee G Mondalek, Dongfeng Qu, Sivapriya Ponnurangam, Panayotis Pantazis, Shrikant Anant, Rama P Ramanujam, und Courtney W Houchen. **Nanoparticle-based delivery of siDCAMKL-1 increases microRNA-144 and inhibits colorectal cancer tumor growth via a Notch-1 dependent mechanism**. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(40), 2011.
- [6] Anil Mahapatro und Dinesh K Singh. **Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines**. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(55), 2011.
- [7] S. Walheim, E. Schaeffer, J. Mlynek, und U. Steiner. **Nanophase-Separated Polymer Films as High-Performance Antireflection Coatings**. *Science*, 283:520–522, 1999.
- [8] Debnath Bhattacharyya, Shashank Singh, Niraj Satnalika, Ankesh Khandelwal, und Seung-Hwan Jeon. **Nanotechnology, Big things from a Tiny World: a Review**. *International Journal of u- and e- Service*, 2(3):29–37, September 2009.
- [9] Mohamed Shafick Taha Zoromba. **Preparation and Characterization of New Nanostructured Organic/Inorganic Composite Coatings for Anti-Fog Applications**. PhD thesis, Clausthal University of Technology, November 2009.
- [10] Yu Huang, Xiangfeng Duan, Yi Cui, Lincoln J. Lauhon, Kyoung-Ha Kim, und Charles M. Lieber. **Logic Gates and Computation from Assembled Nanowire Building Blocks**. *Science*, 294(5545):1313–1317, November 2001.

- [11] Adrian Bachtold, Peter Hadley, Takeshi Nakanishi, und Cees Dekker. **Logic Circuits with Carbon Nanotube Transistors.** *Science*, 294(5545):1317–1320, November 2001.
- [12] Chen Jianronga, Miao Yuqing, He Nongyueb, Wu Xiaohuaa, und Li Sijiaoa. **Nanotechnology and biosensors.** *Biotechnology Advances*, 22(7):505–518, September 2004.
- [13] Tatsuro Endo, Shohei Yamamura, Naoki Nagatani, Yasutaka Morita, Yuzuru Takamura, und Eiichi Tamiya. **Localized surface plasmon resonance based optical biosensor using surface modified nanoparticle layer for label-free monitoring of antigen–antibody reaction.** *Science and Technology of Advanced Materials*, 6:491–500, März 2006.
- [14] Qun Huo, Jimmie Colon, Adam Cordero, Jelena Bogdanovic, Cheryl H Baker, Steven Goodison, und Marianna Y Pensky. **A Facile Nanoparticle Immunoassay for Cancer Biomarker Discovery.** *Journal of Nanobiotechnology*, 9(20), 2011.
- [15] Tuan Vo-Dinh, Paul Kasili, und Musundi Wabuye. **Nanoprobes and nanobiosensors for monitoring and imaging individual living cells.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2:22–30, Oktober 2005.
- [16] Andreas Offenhäuser und Angela K. Vogt. **Defined Networks of Neuronal Cells in Vitro**, Kapitel 5, Seiten 66–76. *Nanobiotechnology*. WILEY-VCH Verlag GmbH u. Co. KGaA, 1. Ausgabe, 2004.
- [17] Peter E. Nielsen. **PNA Directed Sequence Addressed Self-Assembly of DNA Nanostructures.** *American Institute of Physics*, CP1062:13–18, 2008.
- [18] Rosita Passeri, Marco Brucalè, Giampaolo Zuccheri, und Bruno Samori. **DNA-based Parallelograms: a Retrospective or a Perspective?** *American Institute of Physics*, CP1062:58–64, 2008.
- [19] Andrea Steinbrueck, Andrea Csaki, Kathrin Ritter, Martin Leich, Michael J. Koehler, und Wolfgang Fritzsche. **Formation Of Defined Nanoparticle Constructs Containing Gold, Silver, And Gold-Silver Nanoparticles.** *American Institute of Physics*, CP1062:106–115, 2008.
- [20] C.-L. Chung, K. Nguyen, S. Lyonnais, S. Streiff, S. Campidelli, L. Goux-Capes, J.-P. Bourgoin, und A. Filoramo. **DNA Linked To Single Wall Carbon Nanotubes: Covalent Versus Non-Covalent Approach.** *American Institute of Physics*, CP1062:129–139, 2008.
- [21] Ralph Hölzel, Nenad Gajovic-Eichelmann, und Frank F. Bier. **Oriented and vectorial immobilization of linear M13 dsDNA between interdigitated electrodes - towards single molecule DNA nanostructures.** *Biosensors & Bioelectronics*, 18:555–564, 2003.

- [22] H. B. Yin, T. Brown, J. S. Wilkinson, R. W. Eason, and T. Melvin. **Submicron patterning of DNA oligonucleotides on silicon.** *Nucleic Acids Research*, 32(14), Juli 2004.
- [23] Ryan J. Kershner, Luisa D. Bozano, Christine M. Micheel, Albert M. Hung, Ann R. Fornof, Jennifer N. Cha, Charles T. Rettner, Marco Bersani, Jane Frommer, Paul W. K. Rothemund, und Gregory M. Wallraff. **Placement and orientation of individual DNA shapes on lithographically patterned surfaces.** *Nature Nanotechnology*, 220, August 2009.
- [24] Linda A. Chrisey, C. Elizabeth OFerrall, Barry J. Spargo, Charles S. Dulcey, und Jeffrey M. Calvert. **Fabrication of patterned DNA surfaces.** *Nucleic Acids Research*, 24(15):3040–3047, 1996.
- [25] Paul W. K. Rothemund. **Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns.** *Nature*, 440:297–302, März 2006.
- [26] Shawn M. Douglas, Adam H. Marblestone, Surat Teerapittayanon, Alejandro Vazquez, George M. Church, und William M. Shih. **Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno.** *Nucleic Acids Research*, 37(15):5001–5006, Juni 2009.
- [27] Jonathan R. Burns, Jurgita Zekonyte, Giuliano Siligardi, Rohanah Hussain, und Eugen Stulz. **Directed Formation of DNA Nanoarrays through Orthogonal Self-Assembly.** *Molecules*, 16:4912–4922, Juni 2011.
- [28] L. M. Demers, D. S. Ginger, S.-J. Park, Z. Li, S.-W. Chung, und C. A. Mirkin. **Direct Patterning of Modified Oligonucleotides on Metals and Insulators by Dip-Pen Nanolithography.** *Science*, 296:1836–1838, 2002.
- [29] Seunghun Hong, Jin Zhu, und Chad A. Mirkin. **Multiple Ink Nanolithography: Toward a Multiple-Pen Nano-Plotter.** *Science*, 286:523–525, 1999.
- [30] Sang Kyu Kwak, Gil Sun Lee, Dong June Ahn, und Jeong Woo Choi. **Pattern formation of cytochrome c by microcontact printing and dip-pen nanolithography.** *Materials Science and Engineering*, 24:151–155, 2004.
- [31] Chris Dwyer, Alvin R. Lebeck, und Constantin Pistol. **Energy Transfer Logic on DNA Nanostructures: Enabling Molecular-Scale Amorphous Computing.** *4th Workshop on Non-Silicon Computing*, NSC-4(ISCA), 2007.
- [32] Christiane Erler, Katrin Gunther, und Michael Mertig. **Photo-induced synthesis of DNA-templated metallic nanowires and their integration into micro-fabricated contact arrays.** *Applied Surface Science*, 255:9647–9651, 2009.
- [33] Khalid M. Abu-Salah, Anees A. Ansari, und Salman A. Alrokayan. **DNA-Based Applications in Nanobiotechnology.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (Article ID 715295), April 2010.

- [34] G. Maubach, A Csaki, D. Born, and W. Fritzsche. **Controlled positioning of a DNA molecule in an electrode setup based on self-assembly and microstructuring.** *Nanotechnology*, 14:546–550, 2003.
- [35] Wolfgang Fritzsche, Gunter Maubach, Andrea Csaki, Detlef Born, and Uwe Klenz. **Multi-Level Self Organization Process For A Parallel Fabrication Of Aligned Metal Structures In Microelectrode Gaps Using DNA And Metal Nanoparticles.** *American Institute of Physics*, CP725:9–13, 2004.
- [36] Andrea Csaki, Ch. Leiterer, A. Steinbrück, A. Wolff, and Wolfgang Fritzsche. **DNA based nanoscale construction and their microintegration via guided self-assembly for nanoelectronic application.** *American Institute of Physics*, CP1062:49–57, 2008.
- [37] Jason Haaheim und Omkar A. Nafday. **Dip Pen Nanolithography: A Desktop Nanofab Approach Using High-Throughput Flexible Nanopatterning.** *Scanning*, 30:137–150, 2008.
- [38] Steven Lenhart, Peng Sun, Yuhuang Wang, Harald Fuchs, and Chad A. Mirkin. **Massively Parallel Dip-Pen Nanolithography of Heterogeneous Supported Phospholipid Multilayer Patterns.** *Small*, 3(1):71–75, Januar 2007.
- [39] Khalid Salaita, Yuhuang Wang, Joseph Fragala, Rafael A. Vega, Chang Liu, and Chad A. Mirkin. **Massively Parallel Dip–Pen Nanolithography with 55 000-Pen Two-Dimensional Arrays.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45:7220–7223, 2006.
- [40] NanoInk Inc. **Datasheet - 2D nano PrintArray (TM).** *www.nanoink.net*, 1-847-679-NANO(6266), 2010.
- [41] J. R. Haaheim, E. R. Tevaarwerk, J. Fragala, and R. Shile. **Dip Pen Nanolithography: A Maturing Technology for High-Throughput Flexible Nanopatterning.** *Proc. SPIE*, 6556(65560T), 2007.
- [42] Richard D. Piner, Jin Zhu, Feng Xu, Seunghun Hong, and Chad A. Mirkin. **Dip-Pen Nanolithography.** *Science*, 283:661–663, 1999.
- [43] David S. Ginger, Hua Zhang, and Chad A. Mirkin. **Zur Entwicklung der Dip-Pen-Nanolithographie.** *Angew. Chem.*, 116:30–46, 2004.
- [44] Bernhard Basnar und Itamar Willner. **Dip-Pen-Nanolithographic Patterning of Metallic, Semiconductor, and Metal Oxide Nanostructures on Surfaces.** *Small*, 5, No. 1:28–44, 2009.
- [45] Chad A. Mirkin, Seunghun Hong, und Linette Demers. **Dip-Pen Nanolithography: Controlling Surface Architecture on the Sub-100 Nanometer Length Scale.** *ChemPhysChem*, 283:37–39, 2001.

- [46] L. M. Demers, D. S. Ginger, S.-J. Park, Z. Li, S.-W. Chung, und C. A. Mirkin. **Direct Patterning of Modified Oligonucleotides on Metals and Insulators by Dip-Pen Nanolithography.** *Science*, 296:1836–1838, Juni 2002.
- [47] Yan Li, Benjamin W. Maynor, und Jie Liu. **Electrochemical AFM Dip-Pen Nanolithography.** *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2105–2106, 2000.
- [48] Benjamin W Maynor, Yan Li, und Jie Liu. **Au Ink for AFM Dip-Pen Nanolithography.** *Langmuir*, 17:2575–2578, 2001.
- [49] Gunjan Agarwal, Rajesh R. Naik, und Morley O. Stone. **Immobilization of Histidine-Tagged Proteins on Nickel by Electrochemical Dip Pen Nanolithography.** *J. Am. Chem. Soc.*, 125(24):7408–7412, 2003.
- [50] Khalid Salaita, Yuhuang Wang, und Chad A. Mirkin. **Applications of dip-pen nanolithography.** *Nature Nanotechnology*, 2, März 2007.
- [51] Ramon B. Salazar, Alexander Shovsky, Holger Schönherr, und G. Julius Vancso. **Dip-Pen Nanolithography on (Bio)Reactive Monolayer and Block-Copolymer Platforms: Deposition of Lines of Single Macromolecules.** *Small*, 2(11):1274–1282, 2006.
- [52] Ruoya Ho, Jian-Yang Yuan, und Zhifeng Shao. **Hydration Force in the Atomic Force Microscope: A Computational Study.** *Biophysical Journal*, (75):1076–1083, August 1998.
- [53] P. E. Sheehan und L. J. Whitman. **Thiol Diffusion and the Role of Humidity in Dip Pen Nanolithography.** *Phys. Rev. Lett.*, 88(156104), 2002.
- [54] Brandon L. Weeks und Mark W. Vaughn. **Direct Imaging of Meniscus Formation in Atomic Force Microscopy Using Environmental Scanning Electron Microscopy.** *Langmuir*, 21(18):8096–8098, 2005.
- [55] Hyojeong Kim, Leton C. Saha, Joyanta K. Saha, und Joonkyung Jang. **Molecular Simulation of the Water Meniscus in Dip-Pen Nanolithography.** *Scanning*, (32):2–8, 2010.
- [56] Hyungil Jung, Rajan Kulkarni, und C. Patrick Collier. **Dip-Pen Nanolithography of Reactive Alkoxysilanes on Glass.** *J. Am. Chem. Soc.*, 125:12096–12097, 2003.
- [57] Benjamin W. Maynor, Shaun F. Filocamo, Mark W. Grinstaff, und Jie Liu. **Direct-Writing of Polymer Nanostructures: Poly(thiophene) Nanowires on Semiconducting and Insulating Surfaces.** *J. Am. Chem. Soc.*, 124(4):522–523, 2002.
- [58] Jae-Won Jang, Raymond G. Sanedrin, Andrew J. Senesi, Zijian Zheng, Xiaodong Chen, Seongpil Hwang, Ling Huang, und Chad A. Mirkin. **Generation of Metal Photomasks by Dip-Pen Nanolithography.** *Small*, (10):1–4, 2009.

- [59] C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J. François, und C. Vieu. **Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications.** *Journal of Nanobiotechnology*, 3(7), Juli 2005.
- [60] Daan Wouters und Ulrich S. Schubert. **Constructive Nanolithography and Nanochemistry: Local Probe Oxidation and Chemical Modification.** *Langmuir*, 19:9033–9038, August 2003.
- [61] Matthias Geissler, Emmanuel Roy, Jean-Sebastien Deneault, Melanie Arbour, Gerardo A. Diaz-Quijada, Andre Nantel, und Teodor Veres. **Stretching the Stamp: A Flexible Approach to the Fabrication of Miniaturized DNA Arrays.** *Small*, 5(22):2487–2624, November 2009.
- [62] Keun-Ho Kim, Raymond G. Sanedrin, Andrea M. Ho, Seung W. Lee, Nicolaie Moldovan, Chad A. Mirkin, und Horacio D. Espinosa. **Direct Delivery and Submicrometer Patterning of DNA by a Nanofountain Probe.** *Adv. Mater.*, 20:330–334, 2008.
- [63] Keun-Ho Kim, Nicolaie Moldovan, Changhong Ke, und Horacio D. Espinosa. **A Novel AFM Chip for Fountain Pen Nanolithography - Design and Microfabrication.** *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 782, 2003.
- [64] Owen Loh, Robert Lam, Mark Chen, Nicolaie Moldovan, Houjin Huang, Dean Ho, und Horacio D. Espinosa. **Nanofountain-Probe-Based High-Resolution Patterning and Single-Cell Injection of Functionalized Nanodiamonds.** *Small*, 5(14):1667–1674, 2009.
- [65] Kit T. Rodolfa, Andreas Bruckbauer, Dejian Zhou, Andrew I. Schevchuk, Yuri E. Korchev, und David Klenerman. **Nanoscale Pipetting for Controlled Chemistry in Small Arrayed Water Droplets Using a Double-Barrel Pipet.** *Nano Lett*, 6(2):252–257, Dezember 2005.
- [66] Liming Ying, Andreas Bruckbauer, Dejian Zhou, Julia Gorelik, Andrew Shevchuk, Max Lab, Yuri Korchev, und David Klenerman. **The scanned nanopipette: a new tool for high resolution bioimaging and controlled deposition of biomolecules.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 7:2859–2866, Juli 2005.
- [67] Kit T. Rodolfa, Andreas Bruckbauer, Dejian Zhou, Yuri E. Korchev, und David Klenerman. **Two-Component Graded Deposition of Biomolecules with a Double-Barreled Nanopipette.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44:6854–6859, 2005.
- [68] Nadrian C. Seeman. **Nucleic Acid Junctions and Lattices.** *J. theor. Biol.*, 99:237–247, 1982.
- [69] Chenxiang Lin, Yan Liu, Sherri Rinker, und Hao Yan. **DNA Tile Based Self-Assembly: Building Complex Nanoarchitectures.** *ChemPhysChem*, Seiten 1641–1647, 2006.

- [70] Peixuan Guo. **The emerging field of RNA nanotechnology.** *Nature Nanotechnology*, 5:833–842, Dezember 2010.
- [71] Jaswinder Sharma, Rahul Chhabra, Yan Liu, Yonggang Ke, und Hao Yan. **DNA-Templated Self-Assembly of Two-Dimensional and Periodical Gold Nanoparticle Arrays.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, (45):730–735, 2006.
- [72] Wenyan Liu, Hong Zhong, Risheng Wang, und Nadrian C. Seeman. **Crystalline Two-Dimensional DNA-Origami Arrays.** *Angew. Chem.*, (123):278–281, 2011.
- [73] Gerd Binnig und Heinrich Rohrer. **Gerät zur rasterartigen Oberflächenuntersuchung unter Ausnutzung des Vakuum-Tunneleffekts bei kryogenischen Temperaturen.** *Europäische Patentanmeldung*, 0 027 517 Priorität: 20:CH 8486 79, September 1979.
- [74] Heribert Stroppe. **Physik für Studenten der Natur- und Technikwissenschaft.** Fachbuchverlag Leipzig, 11. Ausgabe, 1999. ISBN 3-446-21066-0.
- [75] G. Binnig, C. F. Quate, und Ch. Gerber. **Atomic Force Microscope.** *Phys. Rev. Lett.*, 56(9):930–933, Mar 1986.
- [76] Rebecca Howland und Lisa Benatar. **A practical guide to Scanning Probe Microscopy.** *ThermoMicroscopes*, März 2000.
- [77] Fred. Griffith. **The Significance of Pneumococcal Types.** *The Journal of Hygiene*, 27(2):113–159, Januar 1928.
- [78] Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod, und Maclyn McCarty. **Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types.** *The Journal of Experimental Medicine*, 79(2):137–158, Februar 1944.
- [79] A. D. Hershey und Martha Chase. **Independent functions of viral protein and nucleic acid in the growth of bacteriophage.** *Journal of General Physiology*, 36:39–56, April 1952.
- [80] J. D. Watson und F. H. C. Crick. **Molecular Structure of Nucleic Acids.** *Nature*, (4356):737–738, April 1953.
- [81] <http://www.chemiereport.at/static/images/chemiereport/DNA1.png>. 10.02.2011.
- [82] Hubert Zipper, Herwig Brunner, Jurgen Bernhagen, und Frank Vitzthum. **Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.** *Nucleic Acids Research*, 32(12), Juli 2004.
- [83] <http://biochem118.stanford.edu/images/DNA%20Slides/02WC-B-DNA.jpg>. 15.02.2011.

- [84] Richard Owczarzy und Mark Behlke. **Calculation of Tm for Oligonucleotide Duplexes.** *Integrated DNA Technologies*, 2005.
- [85] Alejandro Panjkovich und Francisco Melo. **Comparison of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences.** *Bioinformatics*, 21(6):711–722, 2005.
- [86] Joost van Mameren, Peter Gross, Geraldine Farge, Pleuni Hooijman, Mauro Modesti, Maria Falkenberg, Gijs J. L. Wuite, und Erwin J. G. Peterman. **Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging.** *PNAS*, 106(43):18231–18236, Oktober 2009.
- [87] Hongxia Fu, Hu Chen, John F. Marko, und Jie Yan. **Two distinct overstretched DNA states.** *Nucleic Acids Research*, 38(16):5594–5600, April 2010.
- [88] Shantanu Karkare und Deepak Bhatnagar. **Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino.** *Appl Microbiol Biotechnol*, (71):575–586, März 2006.
- [89] Peter E. Nielsen und Michael Egholm. **An Introduction to Peptide Nucleic Acid.** *Current Issues Molec. Biol.*, 1(2):89–104, 1999.
- [90] Arghya Ray und Bengt Norden. **Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future.** *The FASEB Journal*, 14:1041–1060, Juni 2000.
- [91] Hagar Zohar, Craig L. Hetherington, Carlos Bustamante, und Susan J. Muller. **Peptide Nucleic Acids as Tools for Single-Molecule Sequence Detection and Manipulation.** *Nano Lett*, 10(11):4697–4701, Oktober 2010.
- [92] Peter E. Nielsen. **Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology.** *Current Opinion in Biotechnology*, 12:16–20, 2001.
- [93] Jesper Lohse, Otto Dahl, und Peter E. Nielsen. **Double duplex invasion by peptide nucleic acid: A general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA.** *PNAS*, 96(21):11804–11808, Oktober 1999.
- [94] Melissa P. Knauert und Peter M. Glazer. **Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting.** *Human Molecular Genetics*, 10(20):2243–2251, 2001.
- [95] Heiko Kuhn, Vadim V. Demidov, Maxim D. Frank-Kamenetskii, und Peter E. Nielsen. **Kinetic sequence discrimination of cationic bis-PNAs upon targeting of double-stranded DNA.** *Nucleic Acids Research*, 26(2):582–587, 1998.
- [96] Greg T. Hermanson. **Bioconjugate Techniques.** Academic Press, 2. Ausgabe, 2008. ISBN 978-0-12-370501-3.

- [97] Eleftherios P. Diamandis und Theodore K. Christopoulos. **The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology**. *Clin. Chem.*, 37(5):625–636, 1991.
- [98] S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, und K. Schulten. **Molecular Dynamics Study of Unbinding of the Avidin-Biotin Complex**. *Biophysical Journal*, 72:1568–1581, April 1997.
- [99] Angelika Fallert-Müller. **Lexikon der Biochemie**, Band 1, 2. 1. Ausgabe, 2005. ISBN 3-8274-1569-1.
- [100] **Thermo Scientific - Avidin-Biotin Technical Handbook**. www.thermo.com/perbio, März 2009.
- [101] Bernhard Schrader. **Kurzes Lehrbuch der Organischen Chemie**. Walter de Gruyter, 2. Ausgabe, 1985. ISBN 3-11-010583-7.
- [102] Peter Gründler. **Chemische Sensoren**. Springer-Verlag, 1. Ausgabe, 2004. ISBN 3-540-20984-0.
- [103] Hans Naumer und Wolfgang Heller. **Untersuchungsmethoden in der Chemie**. Wiley-VCH, 3. Ausgabe, 2002. ISBN 3-527-30863-6.
- [104] Matthias Otto. **Analytische Chemie**. Wiley-VCH, 2. Ausgabe, 2000. ISBN 3-527-29840-1.
- [105] <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/data/7567dna.txt>. 07.02.2011.
- [106] K. W. William, E. Greer, und R. W. Murray. **An X-ray photoelectron spectroscopy study of the spacing of amine groups on alkylaminesilanized tin oxide electrode surfaces**. *Nouv. J. Chim.*, 3:455–461, 1979.
- [107] Michael Breitenstein, Peter E. Nielsen, Ralph Hölzel, und Frank F. Bier. **DNA-nanostructure-assembly by sequential spotting**. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(54), 2011.
- [108] Michael Breitenstein. **Herstellung und Charakterisierung von DNA-Nanoarrays mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie**. Diplomarbeit, Universität Potsdam, Am Neuen Palais 10, 14469 Potsdam, Dezember 2007.
- [109] Michael Breitenstein, Ralph Hölzel, und Frank F. Bier. **Immobilization of different biomolecules by atomic force microscopy**. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(10), 2010.
- [110] J. K. Fisher, M. Ballenger, E. T. O'Brien, J. Haase, R. Superfine, und K. Bloom. **DNA relaxation dynamics as a probe for the intracellular environment**. *PNAS*, 160(23):9250–9255, Juni 2009.
- [111] Christian Heise. **Strukturierte Immobilisierung auf Oberflächen für BioChip-Anwendungen**. PhD thesis, Universität Potsdam, Am Neuen Palais 10, 14469 Potsdam, August 2004.

- [112] Robert D. Deegan, Olga Bakajin, Todd F. Dupont, Greg Huber, Sidney R. Nagel, und Thomas A. Witten. **Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops.** *Nature*, 389(6653):827–829, 1997.
- [113] Kris Pappaert, Heidi Ottevaere, Hugo Thienpont, Paul Van Hummelen, und Gert Desmet. **Diffusion limitation: a possible source for the occurrence of doughnut patterns on DNA microarrays.** *BioTechniques*, 41:609–616, November 2006.

Veröffentlichungen

Michael Breitenstein, Alexander Christmann, Ralph Hölzel und Frank F. Bier. **Preparation of Nano-Arrays by an Atomic Force Microscope.** *AIP Conf. Proc.*, 1062: 43 – 48, 2008

Michael Breitenstein, Ralph Hölzel und Frank F. Bier. **Immobilization of different biomolecules by atomic force microscopy.** *Journal of Nanobiotechnology*, 8(10), 2010

Matthias Griebner, Michael Breitenstein, Sebastian Hoppe, Frank F. Bier, Eva Ehrentreich-Förster, Markus von Nickisch-Rosenegk. **Microarrays - Tendenzen in der Analytik.** *Analytik News*, 17, 19.03.2010

Michael Breitenstein, Peter E. Nielsen, Ralph Hölzel und Frank F. Bier. **DNA-nanostructure-assembly by sequential spotting.** *Journal of Nanobiotechnology*, 9(54), 2011

Danksagung

Jede so umfangreiche Arbeit kann mit einer spannenden Reise durch unbekanntes Terrain verglichen werden. Als derjenige, bei dem alle Reiseberichte und Expeditionsergebnisse zusammenlaufen, danke ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Frank F. Bier für die Zurverfügungstellung der von mir genutzten Ausrüstung und den Reiseschwerpunkt. Bei Herrn PD Dr. Ralph Hölzel möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit sowie bei der Hilfestellung bei der Entwirrung so mancher von mir in englischer Sprache verfassten Satzkonstruktion bedanken. Auch danke ich ihm für die fachliche Beratung während des Schreibens dieser Arbeit.

Hervorheben möchte ich die Erfahrungen, die mir Alexander Christmann im Umgang mit dem Rasterkraftmikroskop weitergegeben hat. Seine scharfsinnigen Analysen haben mir unter anderem geholfen, die Orientierung nicht zu verlieren, wenn ich mich fachlich verrannt hatte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter E. Nielsen für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und Synthese der PNA bedanken. Er schaffte es, das von mir ersonnene, komplizierte PNA-Molekül in idealer Weise zu synthetisieren und bereitzustellen. Häufig ist es so, dass man in seinen Überlegungen nach und nach etwas konstruiert, das schnell auf dem Papier dargestellt ist, während die Praxis viel komplexer ist als die Zeichnung suggerierte.

Für die von mir manchmal doch sehr spontan notwendigen Spottingaufträge gilt Michaela Schellhase mein ganz spezieller Dank. Bei der Betrachtung meiner zahlreichen „Suchbilder“, auf denen immer wieder die heiß begehrten Strukturen zu finden sein sollten, hatten wir zuweilen einen Riesenspaß.

Bei Frau Dr. Eva Ehrentreich-Förster fand ich stets ein offenes Ohr und hatte immer die Gelegenheit zur objektiven Betrachtung der sich während des Arbeitens ergebenden Fragestellungen.

Die Arbeit in der AG Molekularbiologie unter der Leitung von Herrn Dr. Markus von Nickisch-Rosenegk war zielorientiert und sehr angenehm. Und so möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Dr. Markus von Nickisch-Rosenegk, Martina Obry, Sebastian Hoppe und Stefanie Arnold ganz herzlich für die uneingeschränkte Hilfe und Beratung

bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Michael Franke für sein Vertrauen bedanken, sowie bei Jörg Dietrich und Andreas Kalender, welche alle kleineren und größeren Computerprobleme auf herrlich unkomplizierte Weise und ohne großes Aufblasen im Nu behoben haben.

Außerdem möchte ich mich beim gesamten IBMT für die wirklich angenehme Arbeitsatmosphäre und die erkenntnisreiche und bereichernde Zeit bedanken. Es hat mir viel Freude bereitet, in einem solch hervorragenden Arbeitsumfeld arbeiten zu dürfen.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich von ganzem Herzen für alles Liebe und Gute bedanken. Die Reise hat erst begonnen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Ferner versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Berlin, 21. März 2012

Michael Breitenstein

Stichwortverzeichnis

A		Biotinpuffer 45
Absorption 35		Strukturformel 33
Adapterstücke generieren 46		Biotinylierung 43
Adenin 26		Durchführung 44
AFM 22, 23		Inkubationszeit 45
Kontakt-Modus 24		Blocken 45, 55, 58
Modell 23		Durchführung 45
Nicht-Kontakt-Modus 25		bottom-up 17
AFM-Aufnahme 52, 53		Brücke 73
AFM-Spitze 60		
Agarosegel 50		C
Amidbindung 43, 55		Chemikalien-Liste 94
Aminogruppen 39, 55		Cytosin 26
Abstand der Aminogruppen 43		
Anode 49		D
Anregungslicht 35		Desoxyribose 26
APTES 39, 55		Diamantstift 60
Array 62		Dimethylformamid 43
Farbstoff 64		Dimethylsulfoxid 43
Oligonukleotid 65		Dip-Pen Nanolithographie 17, 51
Arrayaufbau 61, 76		DMSO-Nanoarray 52
Avidin 33, 34		DNA 20, 26
		Furchen 28
B		Gel 68
Balkenfeder 23		Gitter 22
Basenpaarung 26		Halbbrücke 68, 69, 73
Bindungen, unspezifische 45		Konformationen 27
Biotin 32, 43		Modell 27, 32
Biotin-Stammlösung 44, 45		Modell Brücke 73

Rekombination	21	Gelkammer	50
Schmelzpunkt T_m	28	Geräte-Liste	91
Strukturformel	30	Glaskapillare	19
Vollbrücke	71	Glasoberfläche	41, 57
DNA-Konstruktherstellung	46	Reinigung	42
Adapterstücke	68	Glycerin	60, 78
Durchführung	46	Guanin	26
Schema-Ablauf	47		
Schema-Sequenz	48	H	
Test Ankerelemente	69	Hilfsarray	74
Test Konstruktausrichtung	71	Holliday-Struktur	21
Test Mittelstück	68	Hoogsteen-Bindung	31
Donut-Effekt	78	Hybridisierung	47, 62
Doppelhelix	26	auf der Oberfläche	73
Duplex-Invasion	32	Konstruktherstellung	46
DY-547-Farbstoff	62, 74	Hydrolyse	44
DY-647-Farbstoff	62		
		I	
E		Immersionsöl	74
Eckpunktmarker	83, 87	Intersystem Crossing	35
EDC	43	Ionenstärke	80
Elektronenniveaus	35	isoelektrischer Punkt	34
Elektronenspin	35		
Energieniveau	35	J	
Ethidiumbromid	50	Jablonski-Diagramm	36
F		K	
Federkonstante	24, 25	Kathode	49
Fluoreszenz	34, 35	Kondensationsreaktion	39
Fluoreszenzfarbstoff	62	Kontaktwinkel	59
Fluoreszenzmikroskop	37	Kontaktzeit	51
Fotodetektor	25	Kontamination	64, 87
Funktionalisierung	39, 86	Kopplungsreaktionen	41
Furche, kleine, große	27	kovalente Kopplung	45
		Kreisring	78
G		L	
Gelelektrophorese	49	Lateralkraftmodus	<i>siehe</i> LFM

BamHI	49	Triplett	36
PstI	48	Triplex	80, 82
Restriktionsverdau	48	Triplex-Invasion	31, 83
Ribonucleinsäure	26	Triplexstruktur	84
Ribose	26	Tunnelstrom	23
S		U	
Sandwichassay	54	Überschuss	44
Schwarz-Weiß-Bild	62	Uracil	26
Sequenzielles Deponieren		V	
Schema	63	Van-der-Waals-Kraft	33
Sequenzielles Spotten	60	Vektor	46
Signalverstärkung	80, 83	Versatz	67
Silan	39	Versuchsablaufsplan	40
Silanisierung	39	Verunreinigung	67, 87
Durchführung	42	Vier-Buchstaben-Code	20
Silizium	57	W	
Singulett	35	Wafer	57
Spin	36	Waschen	45, 74
Spotdurchmesser	64, 67, 75	Wassermeniskus	18
Spotmittelpunktabstand	62, 64, 68	Wasserstoffbrücken	26, 28
Spotten	60	Wechselwirkung	45
Spottingschema	84		
Stempel	19		
STM	22		
Stokesverschiebung	35		
Streptomyces avidinii	34		
Stromfluss	19		
SYBR-Green-I	27, 69, 74, 87		
Spektrum	36		
T			
T4-Ligase	49		
T4-Phage	46		
Thymin	26		
Tintenmatrix	60		
top-down	17		