

# **DNA-BASIERTE MOLEKULARE NANOKONSTRUKTION**

Ein Modellbeispiel und Applikationen unter Verwendung von  
DNA/DNA- und DNA-Nanopartikel-Komplexen  
in planartechnischer Umgebung

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

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

von Diplombiologin **Andrea Csáki**  
geboren am 26. Oktober 1967 in Nagykőrös

**Gutachter:**

**Prof. Dr. Hans-Peter Saluz**

*Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena  
Beutenbergstr. 11, D-07745 Jena*

**Prof. Dr. J. Michael Köhler**

*Technische Universität Ilmenau  
Weimarer Straße, D-98684 Ilmenau*

**Prof. Dr. Frank Bier**

*Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik  
A. Scheunert-Allee 114-116, D-14558 Bergholz-Rehbrücke*

**Tag des Rigorosums:**

14. Juli 2003

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

2. Oktober 2003

*„Je planmäßiger ein Mensch vorgeht, desto wirksamer vermag ihn der Zufall zu treffen.“*

*Friedrich Dürrenmatt*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>KAPITEL 1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>NANOBIOTECHNOLOGIE</b>	<b>2</b>
1.2.1	DNA-NANOTECHNOLOGIE	3
1.2.2	SELBSTORGANISIERENDE MONOSCHICHTEN	8
1.2.3	GOLD-NANOPARTIKEL UND KOLLOIDALE METALL-FILME	12
<b>1.3</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>15</b>
<b>KAPITEL 2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>16</b>
2.1.1	SUBSTRATE UND SCHICHTMATERIALIEN	16
2.1.2	CHEMIKALIEN	16
2.1.3	BIOLOGISCHE PROBEN	17
2.1.4	GERÄTE	18
<b>2.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>18</b>
2.2.1	BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG PLANARER FLÄCHEN	18
2.2.1.1	Vorbehandlung der Oberflächen	18
2.2.1.2	Herstellung der Substrate und Chips	18
2.2.1.3	Funktionalisierung von Siliziumoxidflächen	20
2.2.1.4	Funktionalisierung von Goldoberflächen	22
2.2.2	BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN	24
2.2.2.1	Herstellung der DNA-Nanopartikel-Komplexe	24
2.2.2.2	Herstellung der DNA-Nanopartikel-Komplexe mit Schutzligand	25
2.2.2.3	Verstärkung des Nanopartikel-Signals mit Silberabscheidung	26
2.2.3	DNA-TECHNIKEN	26
2.2.3.1	Hybridisierung	26
2.2.3.2	Ligation	27
2.2.3.3	Formierung von Triplexstrukturen	27
2.2.3.4	Enzymatische Prozessierung langkettiger DNA	28
2.2.3.5	Linearisierung der $\lambda$ -DNA	28
2.2.3.6	Immobilisierung von Nukleinsäuren	28
2.2.3.7	Streckung langer Nukleinsäurestränge	29
2.2.4	MOLEKULARE NANOKONSTRUKTIONEN	29
2.2.4.1	Immobilisierung von Nukleinsäure-Komplexen	30
2.2.4.2	Nanopartikel-Markierung von Nukleinsäurekomplexen	32
2.2.4.3	Immobilisierung von DNA-Nanopartikel-Komplexen = Nanopartikel-Markierung von Biochips	33

2.2.5	APPLIKATIONEN DER NANOPARTIKEL-MARKIERUNG	36
2.2.5.1	Nanopartikel-Markierung von Mikrochemotopen	36
2.2.5.2	Bestimmung der optischen Nachweisgrenzen der Nanopartikel-Markierung	37
2.2.5.3	Markierung durch Formierung von Triplexstrukturen	38
2.2.6	CHARAKTERISIERUNGSMETHODEN	39
2.2.6.1	Molekularbiologische Nachweistechiken	39
2.2.6.2	Spektroskopie	39
2.2.6.3	Mikroskopie	40
<b>KAPITEL 3      ERGEBNISSE</b>		<b>42</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON PLANAREN OBERFLÄCHEN</b>	<b>42</b>
3.1.1	PASSIVIERUNG VON SILIZIUMOXIDOBERFLÄCHEN	42
3.1.2	FUNKTIONALISIERUNG VON GOLDOBERFLÄCHEN	42
3.1.2.1	Aktivierung und Aufreinigung der Thiol-Oligonukleotide	42
3.1.2.2	Thiol-Oligonukleotid SAMs	43
<b>3.2</b>	<b>BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN</b>	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>MOLEKULARE NANOKONSTRUKTIONEN</b>	<b>47</b>
3.3.1	IMMOBILISIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE	47
3.3.1.1	Immobilisierte kurze synthetische Nukleinsäure-Komplexe	47
3.3.1.2	Affinitätsimmobilisierung langkettiger DNA	49
3.3.1.3	Adressierte einseitige Affinitätsimmobilisierung langkettiger DNA	50
3.3.2	NANOPARTIKEL-MARKIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE	50
3.3.2.1	Ergebnisse des Farbttests	50
3.3.2.2	Endmarkierung von langen DNA-Strängen	51
3.3.2.3	Sequenzspezifische Markierung des DNA-Stranges	53
3.3.2.4	Direktmarkierung der DNA	53
3.3.3	IMMOBILISIERTE NANOPARTIKEL-KOMPLEXE – CMFs	55
3.3.3.1	Signal-Rausch-Verhältnis	56
3.3.3.2	Einfluss der Kettenlänge und der Bindungsreihenfolge auf die Nanopartikeldichte	57
3.3.3.3	Abhängigkeit des Signals von der Bindegruppendichte auf der Ebene der SAM	57
3.3.3.4	Quantifizierung des Signals auf der Linkerebene	59
3.3.3.5	Quantifizierung des Signals auf der Markierungsebene	60
3.3.3.6	Reversibilität der Nanopartikel-Markierung auf Goldoberflächen	60
3.3.3.7	Adressierte Affinitätsimmobilisierung der Komplexe auf Gold-Mikrostrukturen	61
<b>3.4</b>	<b>NANOPARTIKEL-MARKIERUNG FÜR BIOCHIPS</b>	<b>64</b>
3.4.1	NANOPARTIKEL-MARKIERUNG VON MIKROCHEMOTOPEN	64
3.4.1.1	Signal-Rausch-Verhältnis	65
3.4.1.2	Signalstärke in Abhängigkeit von der Bindegruppendichte auf den Oberflächen	65
3.4.1.3	Verdünnung auf Linkerebene	68

3.4.1.4	Signalstärke in Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration	69
3.4.2	BESTIMMUNG DER OPTISCHEN NACHWEISGRENZE DER NANOPARTIKEL-MARKIERUNG	72
3.4.2.1	Empfindlichkeit des optischen Nachweises	72
3.4.2.2	Nachweis einzelner Bindeereignisse - Einzelpartikelnachweis	72
3.4.3	MARKIERUNG DURCH FORMIERUNG VON TRIPLEXSTRUKTUREN	73

## **KAPITEL 4      DISKUSSION** **75**

---

<b>4.1</b>	<b>BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON PLANAREN OBERFLÄCHEN</b>	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN</b>	<b>75</b>
<b>4.3</b>	<b>MOLEKULARE NANOKONSTRUKTIONEN</b>	<b>77</b>
4.3.1	IMMOBILISIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE	77
4.3.2	NANOPARTIKEL-MARKIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE	79
4.3.3	IMMOBILISIERTE NANOPARTIKEL-KOMPLEXE – CMFs	80
<b>4.4</b>	<b>NANOPARTIKEL-MARKIERUNG FÜR BIOCHIPS</b>	<b>83</b>

## **KAPITEL 5      ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK** **87**

---

<b>5.1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>87</b>
<b>5.2</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>90</b>

## **ANHANG** **92**

---

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>TABELLEN</b>	<b>III</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE</b>	<b>XX</b>
PUBLIKATIONEN	XX
TAGUNGSBAND-BEITRÄGE	XX
VORTRÄGE	XXI
POSTER	XXI
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>XXII</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>XXIII</b>
PERSÖNLICHE DATEN	XXIII
AUSBILDUNG	XXIII
<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>XXIV</b>

# **Kapitel 1**

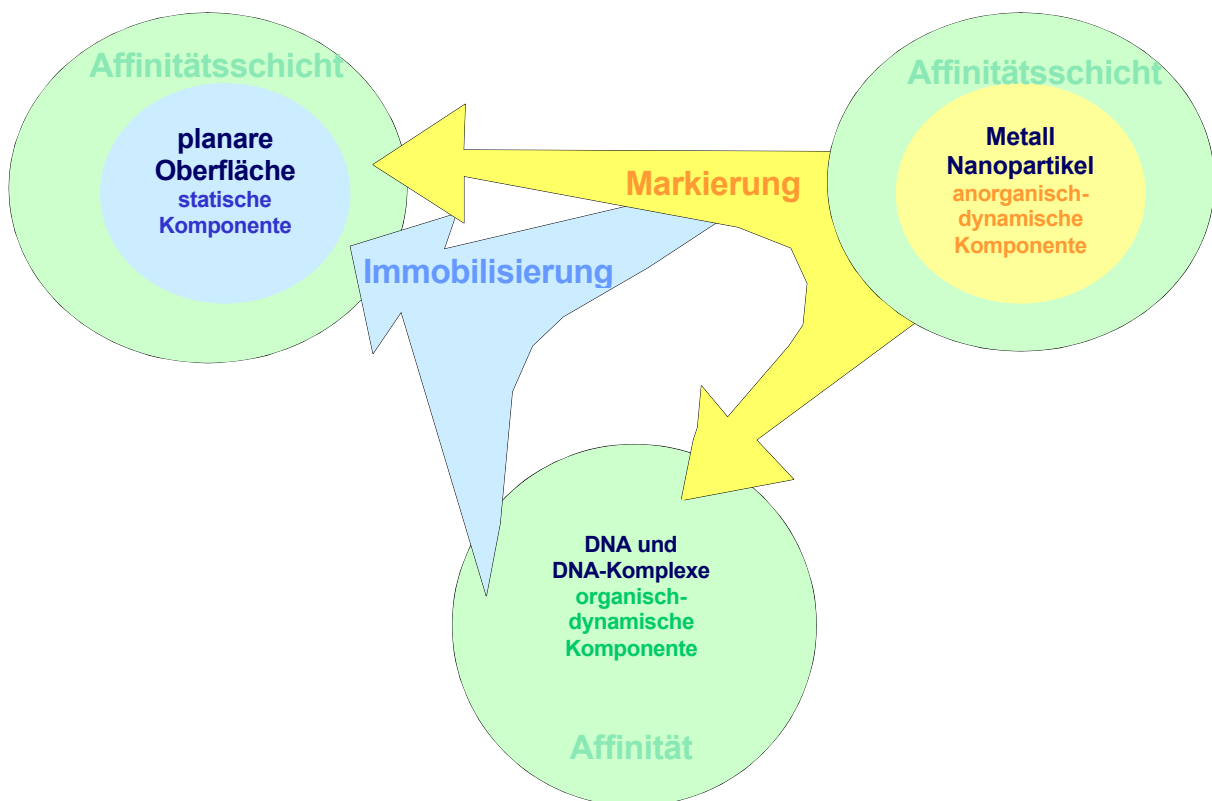
# **EINLEITUNG**

## 1.1 EINFÜHRUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist die Erarbeitung und Charakterisierung eines Systems als Modellbeispiel für molekulare Nanokonstruktionen. Durch Verwendung einfacher Komponenten und Techniken wird ein reproduzierbares System entwickelt und erprobt. Das Beispiel soll die Machbarkeit eines solchen Systems zeigen und für nanobiotechnologische Anwendungen erproben.

Die Komponenten des Systems sind Planarsubstrate (Chips), metallische Nanopartikel und Nukleinsäuren. Das Grundprinzip der Konstruktion basiert auf der **Selbstorganisation** von Nukleinsäuren auf Oberflächen und der Bindung verschiedener Komponenten durch die Affinität der Nukleinsäuren. Die Komponenten wurden mit Schichten selbstorganisierender einzelsträngiger DNA-Moleküle (Oligonukleotide) an ihren Oberflächen biologisch funktionalisiert. Diese Funktionsschichten wurden so gewählt, dass die einzelnen Komponenten durch die vorhandene Affinität (chemische Komplementarität) spezifisch miteinander verknüpft werden können. Die Lokalisierung dieser Verknüpfung ist durch die Auswahl der Sequenzen programmierbar.

Eine wichtige Voraussetzung für die Erstellung eines nanobiotechnologischen Baukastensystems war die Erarbeitung der Grundtechniken für die Funktionalisierung der Komponenten und die Konstruktion. Dabei konnte aus dem reichen methodischen Fundus der Planar- und Beadtechniken, sowie Techniken supramolekularer Konstrukte gewählt werden. In einem semiempirischen Prozess sollten diese Techniken schließlich zusammengeführt und die Teilprozesse erprobt werden.



**Abb. 1:** Basisschema der möglichen Grundkombinationen der Systemkomponenten.

Die Auswahl der Materialien des Systems erfolgte unter Berücksichtigung einfacher Prinzipien. Planare Oberflächen, hauptsächlich Gold, werden in der Mikroelektronik verbreitet als Elektroden-



material verwendet. Diese Substrate wirken im System als statische Komponente. Die Affinitätsschicht auf ihrer Oberfläche wurde mit selbstorganisierenden Monoschichten (SAMs) erzeugt. Metall-Nanopartikel aus kolloidalen Goldlösungen mit einer Affinitätsschicht aus selbstorganisierenden Thiol-Oligonukleotiden fungieren als anorganisch-dynamische Komponente des Systems. Nucleinsäuren bilden schließlich die organisch-dynamische Komponente des Systems. Diese Moleküle wurden so gewählt bzw. erzeugt, dass sie die gewünschte Affinität in sich bergen. Die Kombination der Komponenten liefert vielfältige Immobilisierungs- und Markierungsvarianten. Das Basisschema sowie die möglichen Grundkombinationen der Komponenten sind in Abbildung 1 dargestellt.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Prinzipien wird in der Arbeit ein nanobiotechnologisches Baukastensystem entwickelt.

## 1.2 NANOBIOLOGIE

Die Nanobiotechnologie, in welcher diese Arbeit angesiedelt ist, ist einer der jüngsten Zweige der Nanotechnologie mit ausgesprochen interdisziplinärem Charakter. Die Nanotechnologie selbst blickt ebenfalls auf einen relativ kurzen Entwicklungszeitraum zurück, obwohl die Wurzeln dieses Wissenschaftszweiges bis in die 60er Jahre zurückgehen. Mit dem visionären Vortrag von R. Feynman ("There is plenty of room at the bottom" 1959, Feynman 1961) wurde das Vordringen in neue, kleinere, sogar bis in atomare Dimensionen vorausgesagt. Durch eine Kompletierung der bis dahin ausschließlich verfolgten "top-down"-Strategien in der Technologie der Herstellung nanoskaliger Strukturen um "bottom-up"-Techniken seit den 80er Jahren öffnete sich die Nanotechnologie in Richtung der Biomoleküle.

Biologische Makromoleküle bieten die Möglichkeit zur Selbstorganisation und tragen durch eine hohe Dichte an Funktionsgruppen eine große Informationskapazität in sich. Die Verwendung von Biomolekülen als Template für nanoskalige Konstruktionen wird als *Bio2Nano*-Ansatz (Bio- zu Nanotechnologie, Wevers 2002) der Nanobiotechnologie bezeichnet. Ein anderer Ansatz der Nanobiotechnologie entstand aus dem Bedarf an neuen Techniken für die moderne Diagnostik und Biochip-Technologien. Durch die Miniaturisierung von Biochips und Array-Techniken erhöhte sich der Bedarf an der Entwicklung neuartiger Systeme für die molekulare Diagnostik (Bier und Kleinjung 2001). Diese Strategie, auch als *Nano2Bio* bekannt (Nano- zu Biotechnologie), beinhaltet die nanotechnologische Entwicklung von Methoden und Komponenten für biologische Systeme.

Die gemeinsamen Eigenschaften nanobiotechnologischer Konstruktionstechniken sind die Nanoskaligkeit in mindestens zwei Dimensionen (Wevers 2002), die Biomoleküle als Bestandteil und das Potenzial zur gezielten Herstellung von Nanokonstrukten. Diese Eigenschaften werden beispielsweise durch die Verwendung von Nucleinsäuren als Biomolekül realisierbar (Seeman 1998, Niemeyer 1999, Csaki et al. 2002, Seeman 2003).

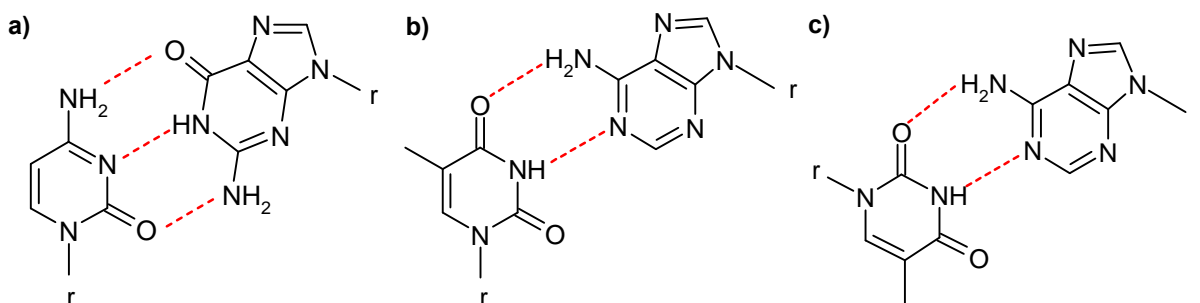
Nucleinsäuren zeichnen sich gegenüber anderen Supramolekülen durch ihre definierte Kettenlänge, Molekulargewicht und Molekularaufbau aus (Köhler et al. 2001a). Die schwachen Wechselwirkungen zwischen ihren Einzelsträngen verhelfen den Molekülen zu einer supramolekularen Qualität. Die Kombination der Elemente ist durch einfache Faktoren regulierbar. Die mechanische Stabilität,

hohe Löslichkeit und die gute Prozessierbarkeit der Nukleinsäuren ist schließlich ausschlaggebend für die Befähigung dieser Supramoleküle für Nanokonstruktionen.

Unter den Nukleinsäuren besitzen DNA-Moleküle (*deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure) die beste chemische und enzymatische Stabilität. DNA-Moleküle werden daher in verschiedenen Strategien der Nanotechnologie verwendet. Einerseits fungieren sie in Form kurzer synthetischer DNA-Einzelstränge als Affinitätsschicht auf Festkörper- und Partikel-Oberflächen (siehe 1.2.2 und 1.2.3), andererseits sind sie selbst Gegenstand von Nanokonstruktionen (1.2.1).

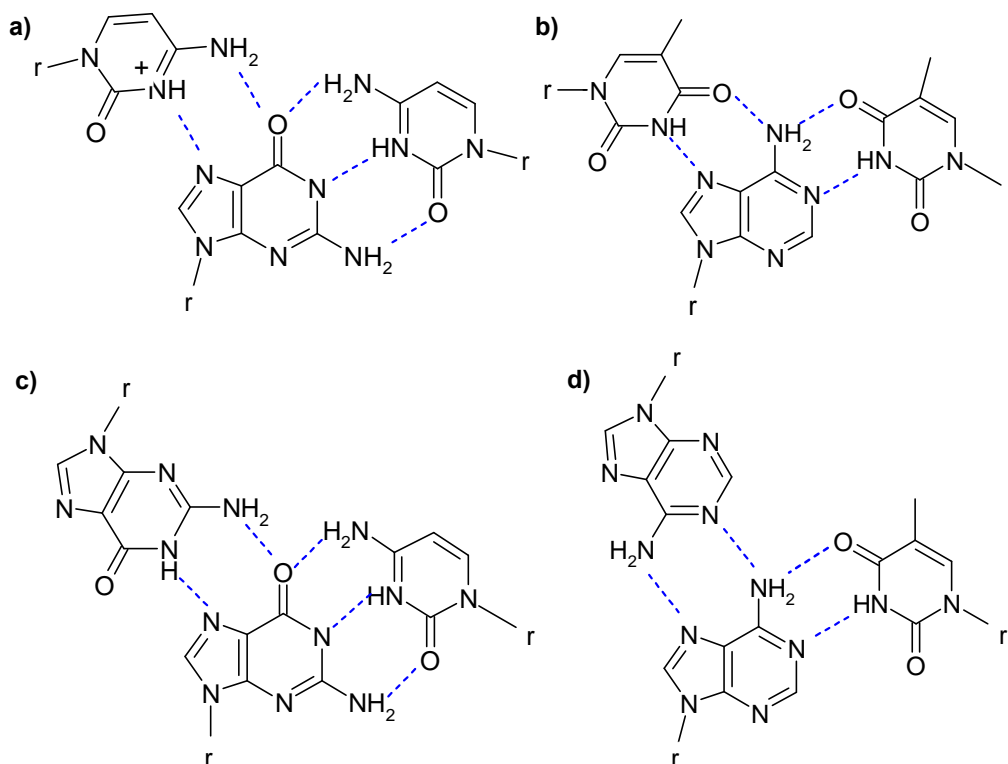
### 1.2.1 DNA-NANOTECHNOLOGIE

DNA ist ein mechanisch stabiles, vielseitig verwendbares Biopolymer mit der Fähigkeit zur Selbstorganisation. Der in ihrer Struktur enthaltene Informationsgehalt ist durch die Anordnung der Funktionsgruppen – die Basenabfolge – definiert. Diese Anordnung ist bei vielen genomischen Molekülen bekannt (*human genome organization*, HUGO Cantor 1990) und für synthetische Sequenzen frei programmierbar. Die Selbstorganisation der DNA wird in einem spezifischen Vorgang, der Hybridisierung, realisiert. Unter Hybridisierung versteht man eine nichtkovalente Bindung antiparalleler Nukleinsäure-Einzelstränge durch die Verknüpfung ihrer heterocyclischen Basen (A, T, C, G) mittels Wasserstoffbrücken. Diese Basenpaarungen sind hochspezifisch. Die Reaktion ist ein selbstorganisierender Vorgang der molekularen Erkennung, welcher zu einem energetisch-günstigen Zustand des Systems führt und dessen Spezifität lateral orts aufgelöst wirkt. Die Hybridisierung komplementärer Einzelstränge resultiert in Doppelhelix-Strukturen. In der Abbildung 2 sind mögliche Basenpaarungen nach Watson und Crick (Watson und Crick 1953) dargestellt.



**Abb. 2:** Mögliche Watson-Crick-Basenpaarungen. **a)** G-C Basenpaar, **b)** A-T Basenpaar, **c)** reversed A-T Basenpaar.

Neben diesen Nukleinsäure-Hybridduplexen können in speziellen Fällen auch Triplex-Strukturen gebildet werden. Diese entstehen durch die Bindung zwischen einem Einzelstrang und einem Doppelstrang. Der Einzelstrang bindet in diesem Fall mit Hoogsteen-Wasserstoffbrücken an Homopurinbereiche. Dabei können zwei Motive entstehen: pyr-pur-pyr (a) und pur-pur-pyr (b). Im Falle (a) erfolgt die Bindung des pyr-Einzelstranges parallel an den Homopurin-Bereich des Doppelstranges. Die Bindung kann nur nach einer Protonierung des Cytosins erfolgen, daher wird diese Reaktion durch niedrige pH-Werte begünstigt. Bei (b) wird dagegen der erste Homopurin-Strang antiparallel zum zweiten Homopurin-Strang in der Furche gebunden. Diese Reaktion ist pH-unabhängig.



**Abb. 3:** Hoogsteen-Basenpaarung. **a-b)** Wasserstoffbrücken im pyr-pur-pyr-Motiv. **c-d)** Basenpaarung im pur-pur-Motiv. **a)** C<sup>+</sup>GC. **b)** TAT. **c)** GGC. **d)** AAT.

Die Assoziation und Reassoziaton zweier Nukleinsäurestränge in Lösungen ist eine dynamische Gleichgewichtsreaktion zweiter Ordnung (Wetmur und Davidson 1968). Zwischen einem immobilisierten Target und der Probe in flüssiger Phase verläuft die Hybridisierung annähernd mit einer Kinetik erster Ordnung (Meinkoth und Wahl 1984). Die Hybridisierung erfolgt demnach in Abhängigkeit von der Komplexität und der eingesetzten Konzentration der Probe. Die Halbwertszeit der Reaktion lässt sich mit folgenden Gleichungen beschreiben:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k \cdot c} \quad \text{Meinkoth und Wahl 1984}$$

$$k = k_n \sqrt{LN}^{-1} \quad \text{Wetmur und Davidson 1968}$$

Dabei ist  $L$  die Probenlänge,  $N$  die Komplexität der Probe,  $k$  die Hybridisierungskonstante erster Ordnung in [ $\text{liter} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $k_n$  die Nukleationskonstante und  $c$  die eingesetzte Probenkonzentration.  $k_n$  hat einen Wert von  $3,5 \times 10^5$  bei einer Natriumionen-Konzentration von 0,4-1,0 M, einem pH-Wert zwischen 5 und 9 und einer Temperatur von 25°C unter  $T_m$  für Oligonukleotide kleiner als 14 nt.

Die Selbstorganisation einzelsträngiger DNA-Moleküle ermöglicht eine technologische Ausführung von Algorithmen. Diese Möglichkeit ist die Basis für alternative Computing-Ideen in der Nanotechnologie (Adleman 1994, Roweis und Winfree 1999, Frutos et al. 1997, Rink 1997, Winfree 1998, Cox et al. 1999, Reed und Tour 2000, Liu et al. 2000, Ogihara und Ray 2000). Der DNA-Computer zeichnet sich durch günstige Dimensionen ( $1 \text{ Bit} = 1 \text{ nm}^3$ ), hohe Leistungsfähigkeit und hohe "Re-

chengeschwindigkeit" aus. Die Grenzen dieser Techniken werden hauptsächlich durch die langsame und aufwändige Extraktion des Rechenergebnisses gesetzt.

DNA-Moleküle zeichnen sich durch viele günstige Eigenschaften aus, welche eine nanobiotechnologische Anwendung begünstigen. Wichtig sind dabei die guten mechanischen Eigenschaften des Moleküls (Baumann et al. 1997). Die Dimension genomischer DNA ist zwar sehr asymmetrisch (Durchmesser 2 nm, Länge zwischen  $10^3$ - $10^6$  nm), was eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Scherkräften vermuten lässt, dennoch sind diese Moleküle sehr widerstandsfähig gegenüber mechanischen Eingriffen. Diese Stabilität der DNA-Moleküle wurde mit Hilfe von neuartigen mikroskopischen Methoden und Techniken der Einzelmolekül-Manipulation weitestgehend untersucht (Smith et al. 1992, Bustamante et al. 1994, Bensimon et al. 1995, Essevaz-Roulet et al. 1997, Stigter und Bustamante 1998, Clausen-Schaumann et al. 2000). Lange DNA-Moleküle wurden Belastungen, wie Kapillarkräften (Thundat et al. 1994, Bensimon et al. 1995) oder Scherkräften (Wang et al. 1998, LeDuc et al. 1999, Haber und Wirtz 2000, Ye et al. 2000) ausgesetzt, sie wurden im elektrischen Feld gestreckt (Zimmermann und Cox 1994, Washizu und Kurosawa 1990, Bakajin et al. 1998, Asbury und Engh 1998, Namasivayam et al. 2002) und mit Hilfe von optischen Pinzetten und/oder Mikrobeads gezogen (Strick et al. 1996, Shivashankar und Libchaber 1997, Strick et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Experimente deuten auf eine hohe mechanische Belastbarkeit der DNA-Moleküle hin.

Durch das Strecken mit Kapillarkräften können Informationen über die Konformation der Moleküle und auch über die Wechselwirkung der Moleküle mit den Oberflächen gewonnen werden. Aus den ermittelten Längen können z.B. die Adhäsionskräfte der Moleküle zur Oberfläche ermittelt werden:

$$F_{\perp} = E \cdot A \left( \frac{l}{l_0} - 1 \right) \quad \text{Bensimon et al. 1995}$$

Dabei ist  $F_{\perp}$  die perpendicular zur Oberfläche wirkende Adhäsionskraft,  $E$  der *Young-Modulus*,  $A$  der Durchmesser des Moleküls,  $l_0$  die Länge des Moleküls in ungestrecktem und  $l$  in gestrecktem Zustand.

Die Persistenzlänge der DNA-Moleküle ( $P$ ) ist unter physiologischen Bedingungen für eine ssDNA ca. 1 nm (Tinland et al. 1997) und für dsDNA ca. 80 nm (Bednar et al. 1994;  $\ddot{e}$ -DNA bei 1,86 mM  $\text{Na}^+$   $86,2 \pm 4,9$  nm und bei 186 mM  $\text{Na}^+$   $54 \pm 3,3$  nm, Baumann et al. 2000). Diese Länge hängt in erster Linie von der Temperatur ab.

$$P = \frac{EA}{k_B T} \quad \text{Baumann et al. 1997}$$

Dabei ist  $k_B$  die *Boltzmann-Konstante* und  $T$  die absolute Temperatur.

Die Struktur der Moleküle in Lösungen ist über die Salzkonzentration der Ansätze regulierbar. Bei hohen Konzentrationen einwertiger Kationen im Puffer ist die Persistenzlänge der Moleküle klein. Mehrwertige Kationen wirken schon in niedriger Konzentration ähnlich. Die torsionale Strukturänderung durch Salze wirkt sich auf den Windungswinkel der Moleküle mit  $0,2^\circ$  pro nt aus (Jett et al.

2000). Die Wirkung der thermalen Fluktuation auf die Spiralisierung beträgt ca.  $4^\circ$  pro nt (Crothers et al. 1992).

Der Ansatz der Strukturminimierung in der Nanotechnologie fordert immer dünnere Bauelemente. DNA ist dafür wegen ihrer Dimension und Stabilität gut geeignet. Die Moleküle werden daher in Template-Ansätzen für die Herstellung nanotechnischer Bauelemente verwendet (Seeman 1998). Die molekulare Konstruktionstechnik basiert auch auf dem hochspezifischen Reißverschlussprinzip der Hybridisierung. Dieses ermöglicht die Bildung von Überstrukturen, welche in allen drei Dimensionen genutzt werden können:

- Eindimensionale Konstrukte bilden Gerüste für die Positionierung oder sind Templates für die Nanodraht-Herstellung (Coffer et al. 1992, Braun et al. 1998, Ford et al. 2001, Storm et al. 2001, Richter et al. 2000, 2001b, 2002, Monson und Woolley 2002, Keren et al. 2002).
- Zweidimensionale Konstrukte sind Arrays und Schaltelemente (Winfree et al. 1998, LaBean et al. 2000).
- Dreidimensionale Gebilde, z.B. Würfel, dienen als nanomechanische Bauelemente (Seeman 1990, 1991, 1998, 2003, Winfree et al. 1998b, Niemeyer 2002).

DNA-Moleküle besitzen interessante elektrische Eigenschaften. Eine solche Eigenschaft ist die Leitfähigkeit (Lewis et al. 1997, Kelley et al. 1997, Kelley 1998, Kelley et al. 1999a, Porath et al. 2000). Über kurze Distanzen scheint eine dsDNA Elektronen zu leiten (Kelley et al. 1997, Kelley 1998, Kelley et al. 1999a, Kelley et al. 1999b, Wan et al. 1999) oder ist ein Halbleiter (Porath et al. 2000). Konstrukte mit langen DNA-Molekülen sind teils völlig isolierend (Braun et al. 1998, de Pablo 2000, Richter 2000, 2001, 2002), sind oberhalb 40 nt Isolator (Storm et al. 2001) oder leitend (Fink und Schöneberger 1999, Cai et al. 2000). Diese Eigenschaft der Moleküle ist aber noch weitestgehend ungeklärt und hängt oft vom Versuchsaufbau und den Versuchsbedingungen ab. Darum spielen Konstrukte mit spezifischer Bindung der Moleküle eine große Rolle. Eine Affinitätsbindung ist somit eine Voraussetzung für weitere Anwendungen von DNA-Molekülen in der Nanoelektronik.

Ein wichtiges Argument für die Verwendung von DNA in der Nanotechnologie ist die, durch die Entwicklung molekularbiologischer Techniken bedingte, breite methodische Basis und die mögliche enzymatische Prozessierung. Den molekularbiologischen Methoden ist die Parallelität im Ansatz inhärent. Die fortgeschrittene Entwicklung der Molekularbiologie ermöglicht außerdem eine günstige synthetische Herstellung bzw. Vervielfältigung von DNA-Molekülen (PCR: *polymerase chain reaction*, Saiki et al. 1985, Mullis 1990).

Nicht nur die Nanotechnologie profitiert von diesen Wechselwirkungen der verschiedenen Wissenschaften. In den frühen 90-er Jahren entstanden durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Biologie, Chemie, Physik, Mathematik, Computerwissenschaft und Ingenieurwissenschaften **Mikroarray-Techniken** (Skena et al. 1995, Skena 2003). Mikroarray-Technologien basieren auf Affinitäts-Assays in hochparallelisierter Form. Diese Hochdurchsatz-Systeme (*high throughput*) werden mit miniaturisierten Molekül-Bibliotheken in lateraler Anordnung auf planaren Trägermaterialien realisiert. Die Elemente und Prinzipien der Array-Technologien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Probe	Oligonukleotide (8-25 nt), cDNA (200-1500bp)	
Chip-Herstellungsprinzip	Photolithographie, $\mu$ CP, $\mu$ WP, NCP	
Aufbringen der Probe	in-situ, ex-situ	
Target-Molekül	cDNA, RNA	
Assay	Hybridisierung (Spezifität zwischen Probe und Target)	
Markierung	Fluoreszenz, Radioaktivität, Lumineszenz, Enzyme, Polymere, Metall-Partikel	
Signal-Erfassung	vorwiegend optisch	
Informationsverarbeitung	Bildverarbeitung	
Anwendungsgebiet	Sequenzierung	Sequenzierung durch Hybridisierung (SBH)
	Gen-Expressionsanalyse	Differenzielle Expressionsanalyse Pharmakogenomics
	Mutationsscreening	<i>single nucleotide polymorphism</i> (SNP)

**Tabelle 1:** Elemente und Prinzipien der Mikroarray-Techniken.

Für die Anbindung von Nukleinsäuren auf Biochips wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden fertig synthetisierte Moleküle durch unspezifische Wechselwirkungen oder mit Hilfe ihrer Endmodifizierungen auf dem Substrat immobilisiert ("*off-line*": postsynthetische Immobilisierung von Oligonukleotiden, Eggers et al. 1994, Dubiley et al. 1997, O'Donnell et al. 1997, O'Donnell und Köster 1999). Eine andere Alternative ist die *in-situ* Synthese (auch "*on-chip*" Synthese genannt, Maskos und Southern 1992, O'Donnell und Köster 1999). Durch Initiatorgruppen auf der Oberfläche werden die Oligonukleotide dabei stufenweise mittels Festphasensynthese aufgebaut. Durch systematische Studien (Khrapko et al. 1989, Fodor et al. 1991, Maskos und Southern 1992) wurde die das Hauptprinzip bildende molekulare Erkennungsreaktion der Hybridisierung auf Oberflächen untersucht. Die Signal-Erfassung der Hybridisierungsereignisse auf den Mikroarrays erfolgt mit markierten Sonden. Die verbreitetste Technik der Markierung ist die Verwendung von Fluoreszenz-Sonden (Weier et al. 1991, Yu et al. 1994).

Die Spezifität der Hybridisierungsreaktion wird technologisch außer in den Mikroarray-Techniken auch in der **Hybridisierungssensorik** genutzt. Moderne spektroskopische Methoden ermöglichen die Entwicklung eine Vielfalt an Techniken der Sensorik (Bier und Fürste 1996). Diese Techniken basieren auf unterschiedlichen Auslesemechanismen der auf den immobilisierten affinen Schichten erfolgten Hybridisierung. Der Ablauf der Hybridisierung zwischen Oligonukleotid-Schichten und einem Target kann mit Hilfe von spektroskopischen Techniken verfolgt werden (z.B. Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektroskopie = SPRS, Peterlinz und Georgiadis 1997). Die Kinetik solcher Reaktionen folgt demnach einem diffusionsbedingten Langmuir-Verlauf:

$$\Gamma = \Gamma_{\max} \left[ 1 - \exp(-k\sqrt{t}) \right] \quad \text{Peterlinz und Georgiadis 1997}$$

Dabei ist  $\tilde{A}$  die Bedeckungsdichte,  $\tilde{A}_{\max}$  die Sättigungsbdeckung,  $t$  ist die Zeit in [h]. Die Hybridisierungskonstante  $k$  wurde für Oligonukleotid-Schichten aus 25mer mit komplementären Oligonukleotiden mit  $2,31 \pm 0,05 \text{ h}^{-1/2}$  bestimmt. Die Diffusionskonstante komplementärer Oligonukleotide war  $8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ , das Plateau wurde in diesem Fall nach einer Stunde erreicht.

In dieser Arbeit wurden DNA-Moleküle als **organisch-dynamische Elemente** in den Konstruktionstechniken benutzt oder als **Affinitätsschicht** auf den anderen Komponenten verwendet. Die Konstruktion der Produkte wurde durch Hybridisierungsreaktionen einzelsträngiger Bereiche verwirklicht. Die Affinitätsschichten wurden aus synthetischen Oligonukleotiden in Form einer selbstorganisierenden Monoschicht auf den Oberflächen erzeugt. Die Ausbildung und die Eigenschaften solcher Funktionsschichten werden im folgenden Punkt behandelt.

### 1.2.2 SELBSTORGANISIERENDE MONOSCHICHTEN

Funktionalisierte Oberflächen können durch Anlagerung molekularer Dünnschichten erzeugt werden. Die Anlagerung kann entweder mit LB-Techniken (*Langmuir-Blodgett-Techniken*) oder als SAMs (*self assembly monolayer* = selbstorganisierende Monoschichten) erfolgen. SAMs sind thermodynamisch stabile, hochgeordnete, zweidimensionale monomolekulare Filme auf Festkörperoberflächen (Sagiv 1979, Nuzzo und Allara 1983, Bain et al. 1989, Ulman 1991, Dubois und Nuzzo 1992, Xia und Whitesides 1995, 1998, Chechik et al. 2000, Schwartz 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden Organothiole auf Goldoberflächen und Organosilane auf Oxidflächen angewendet.

Die Funktionalisierung von Goldoberflächen mit selbstorganisierenden Thiol-Oligonukleotid-Schichten (Nuzzo und Allara 1983) ist eine der Basistechniken dieser Arbeit. Dafür werden kurze synthetische, mit Alkylthiol-Spacern modifizierte Oligonukleotide eingesetzt. Diese Schichten besitzen ähnliche Eigenschaften wie die SAMs aus Alkanthiolen. Die Immobilisierung der Alkanthiole auf die Gold-Substrate basiert auf der hohen Bindungsaffinität zwischen Schwefel und Gold. Die Bindungsstärke beträgt ca. 28 kcal/mol (im Vergleich C-C-Bindung: 83 kcal/mol). Nach der Chemisorption entsteht eine regelmäßige Überstruktur. Das Verhältnis zwischen Schwefel und Gold beträgt 3 zu 1. Ihre Gitterebenen sind zueinander um 30° verdreht.

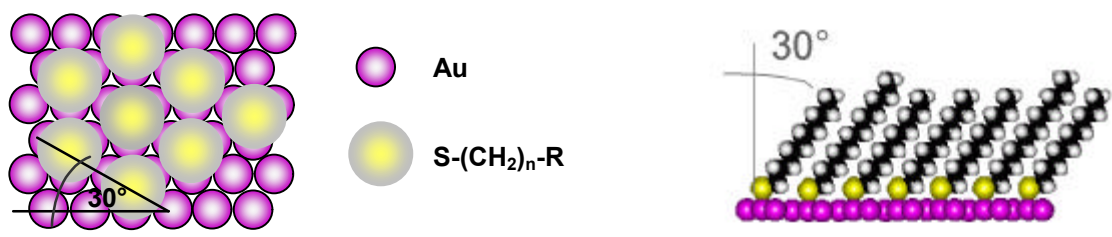
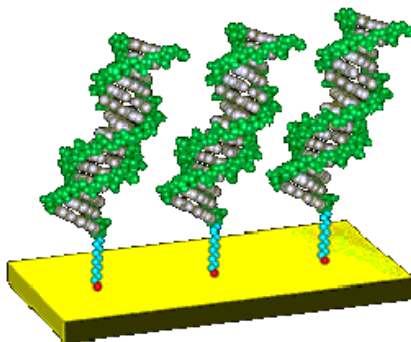


Abb. 4: Thiol-Oligonukleotid-SAMs auf Goldoberflächen.

Die Ketten neigen sich um 60° zur Oberfläche, wie aus der Modellierung (Bonner 1998) und verschiedenen Charakterisierungsmethoden, wie SPR und Neutron-Reflektivitätsstudien (Peterlinz und Georgiadis 1996), zu ersehen ist. Die Wechselwirkung zwischen den Alkylketten gewährleistet die Stabilität der Selbstorganisation.

Abweichend von Alkylthiol-SAMs sind Thiol-Oligonukleotid-Schichten nicht spontan geordnet. Durch die unspezifische Adsorption der Moleküle auf Goldoberflächen (Beebe 1995) ist bei diesen Schichten nicht mit einer spontanen Selbstorganisation der Ketten zu rechnen. Die Moleküle liegen eher abgeflacht auf den Oberflächen (Schichtdicke 3 nm, Herne und Tarlov 1997). Durch die nachträgliche Inkubation kurzer Alkylthiole werden die Oligonukleotide aufgerichtet und ordnen sich. Die Ketten solcher Mischschichten haben ebenfalls eine Neigung von 60° zur Oberfläche. Dadurch

ergab sich bei Neutron-Reflektivitätsstudien eine Schichtdicke von 7,5 nm für SAMs aus 25mer Thiol-Oligonukleotiden mit 1 nm MCH statt 8,5 nm (Levitcky et al. 1998). Für kürzere Thiol-Oligonukleotide (16mer) wurde mit Ellipsometrie eine Schichtdicke von 1,5 nm gemessen (Fritz et al. 2000). Dieser Wert deutet ebenfalls auf eine Neigung der Ketten zur Oberfläche. Für dsDNA sieht der Schichtaufbau ähnlich aus. Dabei wurden für ein 15mer Schichtdicken von 4,5 nm gemessen, statt der theoretisch erwarteten 5,1 nm (Kelley 1998). Diese Schichtdicke deutet ebenfalls auf eine Neigung der Moleküle von 60° zur Oberfläche.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung einer dsDNA-Schicht einer Goldoberfläche (Kelley 1998).

Der Platzbedarf der Oligonukleotide variiert in Abhängigkeit von der Kettenlänge. Der effektive Durchmesser der einzelsträngigen Moleküle in SAMs wurde mit 1,2-1,4 nm bzw. 1,9 nm bestimmt (Mucic et al. 1998 und Fritz et al. 2000). Für doppelsträngige DNA liegt der Wert bei 3 nm (Levitcky et al. 1998).

Die Ausbildung von Organothiold-Monolagen auf Au(111)-Substraten erfolgt in zwei Stufen: Einer schnellen Adsorption der Moleküle zur Oberfläche folgt eine längere Organisationsphase (Bain et al. 1989). Bei optimalen Voraussetzungen können die Immobilisierungsvorgänge mit der Langmuir-Adsorptionsgleichung erster Ordnung beschrieben werden. Die Voraussetzungen dafür sind, dass jedes Molekül die gleiche Affinität zur Oberfläche hat, die Bindungen unabhängig und gleichstark sind und die Bindestellen gleichmäßig besetzt sind (dünne Lösungen):

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max} \cdot K_{\text{ads}} \cdot c}{1 + K_{\text{ads}} \cdot c} \quad \text{Mbindyo et al. 2001}$$

Dabei ist  $\tilde{\Gamma}$  der Bedeckungsgrad,  $\tilde{\Gamma}_{\max}$  die Sättigungsbedeckung,  $K_{\text{ads}}$  die Gleichgewichtskonstante der Adsorption und  $c$  die Ausgangskonzentration der eingesetzten Oligonukleotid-Lösung.  $K_{\text{ads}}$  liegt bei Thiol-modifizierten Oligonukleotiden um eine Potenz höher als bei nicht modifizierten ( $1,8 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  gegenüber  $3,7 \pm 1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  im Falle eines 36mer mit 5'-Fluoreszein-Modifizierung, Heaton et al. 2001). Die theoretisch maximale Bedeckung einer Fläche mit an Kopfgruppen gebundenen Oligonukleotiden und die in der Praxis ermittelte Bedeckungsdichten sind in der Tabelle 2 aufgeführt.



Referenz	Charakterisierungsmethode	Oligos	theor. $\tilde{A}_{\max}$	$\tilde{A}$
			[Moleküle/cm <sup>2</sup> ]	
Herne und Tarlov 1997	Röntgen-Elektronen-Spektroskopie (XPS), Ellipsometrie, <sup>32</sup> P-Radioaktiv-Markierung	25mer		5,7 x 10 <sup>12</sup>
Peterlinz und Georgiadis 1997	Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPRS)	ssDNA		9 x 10 <sup>12</sup>
		ssDNA/MCH		5,2±0,8 x 10 <sup>12</sup>
		dsDNA/MCH		2,2 x 10 <sup>12</sup>
Steel et al. 1998	Zyklovoltammetrie (CV), Radioaktiv-Markierung	20mer	1-10 x 10 <sup>12</sup>	10 x 10 <sup>12</sup>
		25mer		6 x 10 <sup>12</sup>
	CV, Radioaktiv-Markierung	ds25mer	3,2 x 10 <sup>12</sup>	
Levitcky et al. 1998	Neutronen-Reflektivitäts-Studien (SLD-Profil)	25mer		6 x 10 <sup>12</sup>
Kelley 1998	Elektrochemische Rasterkraft-Mikroskopie (EC-AFM)	ds15mer		1-1,25 x 10 <sup>12</sup>
Wang et al. 1999	XPS, CV, Elektrochemische Quarz Mikrobalance Untersuchung (EQCM)	ss25mer		7,8 x 10 <sup>12</sup>
		ds350mer		6,0 x 10 <sup>11</sup>
Steel et al. 2000	CV, Chronocoulometrie (CC)	8-48mer	6-9 x 10 <sup>13</sup>	
		8mer		6 x 10 <sup>12</sup>
		48mer		7 x 10 <sup>11</sup>
		< 24mer		3-4 x 10 <sup>13</sup>
Georgiadis et al. 2000	In situ SPRS	Modell	~ 1 x 10 <sup>14</sup>	
Fritz et al. 2000	XPS, Ellipsometrie	16mer		2 x 10 <sup>13</sup>
Peterson et al. 2001	SPRS	ssDNA		11±0,2 x 10 <sup>12</sup>
		dsDNA		3 x 10 <sup>12</sup>

**Tabelle 2:** Vergleich der theoretisch maximalen und der in Versuchen ermittelten realen Bedeckungsdichten der Thiol-Oligonukleotid-SAMs aus der Literatur.

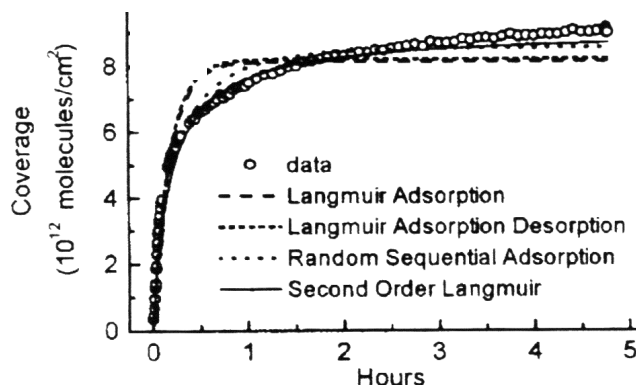
Die Bedeckungsdichten für Oligonukleotide variieren zwischen 10<sup>11</sup> und 10<sup>14</sup> Molekülen pro cm<sup>2</sup>. Der Wert von 1 x 10<sup>14</sup> Moleküle/cm<sup>2</sup> (Georgiadis et al. 2000) gilt als Obergrenze der maximalen Bedeckungsdichte. Dieser Wert wurde unter Berücksichtigung der Adsorption, der Desorption und der Diffusion der Moleküle in der Kinetik der Thiol-Oligonukleotid-SAM Bildung ermittelt:

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = J(t) \left( 1 - \frac{\Gamma(t)}{\Gamma_{\max}} \right) - k \Gamma(t) \quad \text{Georgiadis et al. 2000}$$

$$J(t) = -D \frac{\partial c(x,t)}{\partial x} \Big|_x \lim_0 \quad \text{Georgiadis et al. 2000}$$

Dabei ist  $\tilde{A}(t)$  die zeitabhängige Bedeckung der SAMs,  $c$  die Konzentration der eingesetzten DNA-Lösung,  $x$  die Entfernung von der Oberfläche,  $J(t)$  die zeitabhängige Diffusion in Richtung der Oberfläche,  $D$  die Diffusionskonstante der Oligonukleotide und  $k$  die Desorptionsrate erster Ordnung. Dieses optimierte Adsorptionsmodell, das sog. ADD-Modell (Georgiadis 2000), entspricht den ermittelten Adsorptionswerten von Oligonukleotid-SAMs auf Gold-Oberflächen (Abbildung 6). Geor-

giadis ermittelte für  $D$  einen Wert von  $1,4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ , für  $k$   $324 \text{ h}^{-1}$  und für  $\tilde{A}_{\text{max}}$   $1 \times 10^{14}$  Moleküle/ $\text{cm}^2$ .



**Abb. 6:** Vergleich der Adsorptionsmodelle mit den tatsächlichen Bedeckungsdichten an Oligonukleotid-SAMs auf Goldoberflächen (Georgiadis et al. 2000).

Die Bedeckungsdichte ist außerdem von der Kettenlänge der Thiol-Oligonukleotide abhängig (Steel et al. 2000). Bei höherer Basenzahl ist mit einer niedrigeren Bedeckungsdichte zu rechnen. Die Ursache dieses Effekts liegt im gyrationbedingten Platzbedarf der Oligonukleotide. Bei hohen Salzkonzentrationen ist der hydrodynamische Radius eines Einzelstranges  $R_g = 0,38 \sqrt{N}$  nm, wobei  $N$  die Basenzahl ist (Tinland et al. 1997). Daneben hängt die Bedeckungsdichte auch von der Inkubationsdauer und dem verwendeten Puffer ab (siehe Methoden).

Thiol-Oligonukleotid-SAMs auf planaren Goldflächen wurden in der Entwicklung markierungsfreier DNA-Sensoren mit elektrochemischer Transduktion des Signals (Wang et al. 1999) und in der nanomechanischen Signalermittlung (Fritz et al. 2000) verwendet. Außer diesen Ansätzen bietet die Verbindung der SAM-Techniken mit speziellen rasterkraftmikroskopischen Methoden neuartige Applikationsmöglichkeiten für Strukturierungsmethoden der Nanolithographie. Mit Hilfe von mit Alkanthiolen benetzten AFM-Spitzen können feine Strukturen geschrieben werden (Piner 1999). Diese sog. "dip-pen"-Lithographie (DPN, Piner et al. 1999, Hong et al. 1999, 2000) ist auch mit thiolisierten Oligonukleotiden (Demers et al. 2002) durchführbar. Bei dieser Strukturierung ist zwar eine nanoskalige Positionierung der Strukturen möglich, sie ist aber wegen ihrer seriellen Durchführung nur bedingt für technologische Ansätze geeignet.

Eine parallele Technik für die Strukturierung könnte aus der Verbindung von klassischer photolithographischer Strukturherstellung und der Selbstorganisation der Schichten gewonnen werden. Die SAMs werden auf den Mikrostrukturen (oder dazwischen) erzeugt. Durch die Auswahl des Layouts und die Variation der Immobilisierungsparameter können definierte Mengen an Zielobjekten an diese Fläche gebunden werden. Dieser Ansatz wird auch in dieser Arbeit verfolgt. Über die Quantifizierung der Dichten der gebundenen Objekte sollte in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Faktoren eine reproduzierbare Methode für die Immobilisierung der Zielobjekte gefunden werden.

Bei dem Applikationsbeispiel der Nanopartikel-Markierung wurden andere Substrattypen als in der Konstruktionen verwendet. Da die Affinitätsbindung der Komponenten auch hier nach demselben Prinzip wie bei den Goldoberflächen funktionieren sollte, wurde hier der Aufbau der SAMs mit Organosilanen verwirklicht. Organosilane sind weit verbreitete Moleküle in Oberflächenmodifizie-

rungs-Techniken auf Glas und Silizium-Substraten. Durch die Vielfalt der wählbaren funktionellen Endgruppen ist es möglich, nahezu beliebige Moleküle auf Organosilan-modifizierten-Oberflächen zu immobilisieren. Die Reaktion ist eine Wechselwirkung zwischen den freien Hydroxylgruppen der Substrate und der reaktiven Kopfgruppen (-Cl, -(CH<sub>3</sub>), -O(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)) der Organosilane. Die Funktionalisierung mit Silanen ist eine der Basistechniken für die Herstellung von Biochips. Unter Verwendung einer inerten Organosilan-Endgruppe können außerdem Oberflächen gezielt geschützt werden (Passivierung). Das wird bei mikrostrukturierten Chips angewendet, um Reaktionsräume voneinander zu trennen, oder um unspezifische Bindungen der Nukleinsäuren auf dem Substrat zu verhindern.

### 1.2.3 GOLD-NANOPARTIKEL UND KOLLOIDALE METALL-FILME

Gold-Nanopartikel aus kolloidalen Lösungen sind als **anorganisch-dynamische Komponente** wichtiger Bestandteil des Baukastensystems. Diese Komponente des Systems wurde mit einer Affinitätsschicht aus Thiol-Oligonukleotiden auf Grundlage der zuvor beschriebenen SAM-Techniken funktionalisiert.

Kolloid-Systeme bestehen definitionsgemäß aus einem homogenen Dispergiermedium und einem darin feinteilig dispergierten Stoff. Der Stoff in diesem Zustand ist im engeren Sinne das Kolloid, die dispergierten Teilchen sind kolloidale Teilchen oder Kolloidteilchen. Kolloidale Systeme bilden mit ihrer Teilchengröße zwischen 1-500 nm einen Übergang zwischen richtigen Lösungen (homogene Systeme = "mikroskopische disperse Systeme", Ostwald 1924) und grob dispersen (heterogenen = quasikolloiden) Systemen.

Die in der Arbeit verwendeten Nanopartikel sind Kolloidteilchen in wässrigen Lösungen. Die Herstellung des sog. Goldsol erfolgt über die Reduktion von Tetrachloroaurat-Ionen mit unterschiedlichen Reduktionsmitteln. Die Größe der hergestellten Partikel ist abhängig vom verwendeten Puffersystem, von der Inkubationstemperatur und den Konzentrationsverhältnissen. Die als Komponente verwendeten Partikel wurden im Natriumcitratssystem hergestellt (Turkevich et al. 1951, Frens 1973, Grabar et al. 1995, 1996a, 1996b). Diese sog. Citrat-Kolloide gehören nach der Art der Wechselwirkung ihrer Teilchen und ihren Struktureigenschaften zu den Dispersionskolloiden (nach Staudinger, Szánthó 1989). Sie sind monodispers (je nach Konzentration der Ausgangssubstanzen mit einem Durchmesser von 12-64 nm), isometrisch und entsprechend der Teilchenverteilung statistisch homogene Systeme.

In den Goldsolen bildet sich auf der Kolloid-Oberfläche eine elektrochemische Doppelschicht aus Goldkationen und Citratanionen. Diese erzeugt eine *Coulombsche*-Abstoßung zwischen den Partikeln (Schmid und Bradley 1994) und stabilisiert dadurch das System gegenüber der *van-der-Waals*-Anziehung der Partikel. Diese sog. Ladungsstabilisierung (DLVO Theorie, Dörfler 2002) zeichnet die unmodifizierte Gold-Kolloid-Lösung aus. Die elektrochemische Doppelschicht ist bezüglich der Citratanionen lösungsbedingt diffus. Diese Ladungswolke hält den nötigen Abstand zwischen zwei Partikeln aufrecht. Die Abstoßungskräfte überwiegen die interpartikulären Anziehungskräfte und das System befindet sich im Gleichgewicht. Die Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichts in der Lösung (z.B. durch Salzzugabe) führt zu einer Abnahme des diffusen Teils der Dop-

pelschicht. Wenn der Durchmesser der Ladungswolke eine kritische Grenze unterschreitet, überwiegen die Anziehungskräfte die Abstoßungskräfte. Die Dispersion zerfällt und die Lösung koagulierte. Dieser Vorgang (irreversible Koagulation) kann durch Veränderung der Temperatur, des pH-Wertes oder des Salzgehaltes ausgelöst werden (z.B. liegt der Flockungsschwellwert der Elektrolytkoagulation eines Goldsols durch NaCl bei 24 mM, Dörfler 2002). Die Substitution der Anionen der Kolloid-Hülle mit ungeladenen Teilchen führt zum selben Resultat.

Die Verwendung bestimmter organischer Ligand-Moleküle trägt zur Stabilisierung der Lösung bei. Der Substituent, meist ein Polymer, bewirkt eine sterische Stabilisierung. In diesem Fall wirkt zwischen den Teilchen eine entropische Abstoßung. Eine Koagulation ist nur dann zu erwarten, wenn die Liganden-Hülle penetriert werden kann oder eine Mosaikhaftung (defektive Adhäsion) der Liganden-Moleküle vorhanden ist. Die Koagulation eines sterisch stabilisierten Kolloids ist meist irreversibel.

Die kolloidalen Gold-Lösungen zeigen eine deutliche Plasmonbande. Das Absorptionsmaximum liegt für Citrat-Kolloide bei 520 nm. Dieses entspricht dem Wert der Dipolresonanz, welcher durch eine kollektive Schwingung der Leitungselektronen bestimmt wird. Der Auslöser ist der elektrische Feldvektor der Lichteinstrahlung oder andere elektromagnetische Oszillationen. Die makroskopisch verfolgbare Konsequenz der partiellen Löschung dieser Schwingung ist die Änderung der Farbe.

Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums bei dichten Lösungen korreliert mit dem Partikeldurchmesser, bei niedrigeren Teilchenkonzentrationen ist sie davon unabhängig (Schmitt et al. 1996). So kann man aus der Farbe konzentrierter Lösungen Schlussfolgerungen über den Partikeldurchmesser ziehen oder die unterschiedlichen Farben für Markierungstechniken mit Kolloiden ausnutzen. Nach Addition bestimmter Liganden verschiebt sich das Absorptionsmaximum in Richtung größerer Wellenlängen (Skupin 2001). Bei der Aggregation der Partikel verändert sich das Absorptionsspektrum. Es kommt zu einer Aufspaltung des Absorptionsmaximums. Dieser Effekt wird durch die Resonanzkopplung zweier Partikel parallel zur Interpartikelachse verursacht (Schmitt et al. 1999, Mayya et al. 1996).

Kolloidale Gold-Nanopartikel werden in elektronenmikroskopischen Techniken für unterschiedliche Applikationen als Marker verwendet. Nach der ersten biologisch orientierten Anwendung für den Nachweis des endothelialen Transports (Palade 1960) folgten die ersten Konjugationen mit Biomolekülen, wie Lektin (Horisberger et al. 1975) und Antikörpern (Faulk und Taylor 1971, Tanaka et al. 1991). Die Bindung der Biomoleküle auf die Kolloid-Oberfläche erfolgt, ähnlich wie eine SAM-Bildung auf planaren Oberflächen, in mehreren Stufen. Zuerst binden die Biomoleküle durch elektrostatische Wechselwirkung auf die Oberfläche und verdrängen dabei die Citrathülle. Später folgt eine chemische Bindung, z.B. eine Thiol-Gold-Kopplung, zwischen dem Partikel und dem Biomolekül.

Oligonukleotide wurden erstmals für elektronenmikroskopische Techniken im Zusammenhang mit Streptavidin konjugierten Gold-Nanopartikeln mit Biotinylierung verwendet. Später folgte eine Anwendung dieser Komplexe für Markierungen von DNA-Molekülen und eine Charakterisierung mittels Rasterkraftmikroskopie (Shaiu et al. 1993a, 1993b). Vergleichbar zu planaren Substraten kön-

nen Kolloidteilchen auch mit Thiol-modifizierten Oligonukleotiden konjugiert werden (Mirkin et al. 1996, Alivisatos et al. 1996). Die Verwendung von Oligonukleotiden als Liganden-Molekül auf Gold-Kolloid-Partikeln ermöglicht deren biologische Funktionalisierung und stabilisiert diese. Der Komplex aus Nanopartikel und Oligonukleotid wird im weiteren **anorganisch-dynamische Komponente** genannt und ist seiner Funktion nach primär eine Sonde (oder *probe, eng.*).

Die Anwendung von DNA-Nanopartikel-Komplexen als sequenzspezifische Sonde wurde erstmals in Lösung erprobt (Mirkin et al. 1996, Alivisatos et al. 1996, Elghanian et al. 1997, Storhoff et al. 1998, Mucic et al. 1998). Dabei wurden Nanopartikel mit nichtkomplementären Oligonukleotiden durch die Verwendung eines Linkers hybridisiert. Die so entstandenen Cluster zeichneten sich durch interessante optische Eigenschaften aus (z.B. Farbe). Die optischen Eigenschaften der DNA-vermittelten Nanocluster-Bildung sind von der Länge des eingesetzten Linkers abhängig (Storhoff et al. 2000, Lazarides und Schatz 2000). In den Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden linkerfreie Systeme auf diesen Effekt hin untersucht. Als Resultat konnte eine Farbveränderung durch Hybridisierung nachgewiesen werden.

Eine Verbindung der DNA-Nanopartikel-Komplexe mit planaren Techniken war ein Teilziel dieser Arbeit. Die durch Hybridisierung der Affinitätsschichten entstandenen kolloidale Metall-Filme (CMFs = *colloid metal films*) werden dabei charakterisiert (Csáki et al. 2001).

Die Bindungsmethode für planare Techniken auf Nukleinsäure-Basis wird als DDI (*dna directed immobilization*, Niemeyer et al. 1999) bezeichnet. Diese Technik ermöglicht eine Kopplung der Elemente für unterschiedliche Substrattypen. Voraussetzung dafür ist ein adäquater, an die Oberfläche angepasster Aufbau der Funktionsschicht aus Oligonukleotiden. Die interessanten optischen Eigenschaften der Nanopartikel-Sonden auf transparentem Material, wie es die meisten Biochips sind, eröffnen neue Wege auch für das *high-throughput screening* (HTS). Eine Nanopartikel-Markierung für Biochip-Technologien mit optischer Signal-Erfassung wird am Applikationsbeispiel der Nanopartikel-Markierung behandelt (Reichert et al. 2000). Dabei wurde der Einsatz einer Nanopartikel-Sonde auf mikrostrukturierten Oberflächen demonstriert.

Mit der Entwicklung der scanometrischen Detektion (Taton et al. 2000) wurde eine Möglichkeit für eine einfache Detektion der Nanopartikel-Signale geschaffen. Dabei wurden Nanopartikel-markierte Glas-Biochips nach einer Silberverstärkungsreaktion mit Hilfe eines Tischscanners quantifiziert. Die ermittelte Grauwertstufe dient als messbarer Wert der Dichte der gebundenen Nanopartikel.

Die Möglichkeit, das Volumen der Partikel zu vergrößern und damit das optische Signal zu verstärken, führte zu neuen Aspekten der Markierung. In der Applikation der Nanopartikel-Markierung wurde auch ein Einzelnachweis von spezifischen Bindungen angestrebt. Diese Technik sollte ebenfalls für Einzelmolekül-Techniken anwendbar sein.

Die Leitfähigkeit metallischer Nanopartikel eröffnet neben diesen Techniken auch neue Alternativen für die Diagnostik. Eine spezifische Bindung der Nanopartikel-Sonden auf Oligonukleotid-SAMs im Elektrodenspalt und eine nachträgliche Silberabscheidung am Partikel kann bei angelegter Spannung zu einer Absenkung des Widerstandes führen. Dieser Effekt wurde für einen einfachen Hybridisierungsnachweis ausgenutzt (Möller et al. 2001, Park et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wird die Präparation Oligonukleotid-konjugierter Gold-Nanopartikel methodisch untersucht und deren möglicher Einsatz in einem nanobiotechnologischen Baukastensystem untersucht. Außerdem wird eine Anwendung von DNA-Nanopartikel-Komplexen als molekulare Marker für Chiptechniken erprobt.

### 1.3 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist die methodische Entwicklung eines Beispielsystems der molekularen Nanotechnologie auf der Basis von Nukleinsäuren. Das System beinhaltet drei Komponenten, ein gemeinsames Bindungsprinzip und drei resultierende Prozesse. Die statischen Elemente des Systems sind hauptsächlich Substrate mit Goldoberflächen. Die dynamischen Elemente des Systems sind metallische Nanopartikel und Nukleinsäuren. Alle Elemente werden mit einer algorithmisch gewählten Affinitätsschicht überzogen oder tragen selbst eine Affinität in sich. Die Verknüpfung der Elemente erfolgt durch biomolekulare Erkennung (Hybridisierung) zwischen den Affinitätsschichten.

Das System wurde unter Berücksichtigung folgender Aspekte geplant:

- Zwischen den Komponenten soll es eine einfache aber spezifische und stabile Bindung geben, jeweils möglichst mit der gleichen Bindungsweise.
- Die Kombination der Komponenten soll durch einfache Faktoren (z.B. Temperatur) steuerbar sein.
- Die Reaktionen sollen hochparallel durchführbar sein.
- Die Konstrukte sollen sich im Nanometerbereich anordnen.
- Das System soll erweiterungsfähig sein und die Komponenten eventuell auch austauschbar.

Die Arbeit beinhaltet vier große Themenkreise. Im ersten Teil der Arbeit steht die Entwicklung und Optimierung der Techniken für die **Funktionalisierung planarer Oberflächen** mit Oligonukleotid-SAMs im Mittelpunkt. Diese Methode ist die Voraussetzung für die Umsetzung der bisher verwendeten Techniken für molekularbiologische Ansätze und supramolekulare Konstruktionen in planar-technischer Umgebung. Im zweiten Teil werden die Methoden und Ergebnisse der **Kolloid-Modifizierung** behandelt. Die DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden als neue Elemente der Nanotechnologie in den Konstruktionen eingesetzt. Die Methoden der Präparation und des Einsatzes dieser Komponenten bilden die zweite Voraussetzung für die Erstellung des Baukastens. Als dritter und umfangreichster Teil der Arbeit werden die durch Verknüpfung der Elemente entstandenen **molekularen Nanokonstruktionen** behandelt. Diese sind die als Produkt aus der Konstruktion gewonnenen immobilisierten Nukleinsäure-Komplexe, kolloidalen Metall-Filme und Nanopartikel-markierten Nukleinsäure-Komplexe. Der Nachweis und die Charakterisierung dieser Produkte sollte die Machbarkeit der angewendeten Techniken nachweisen und dadurch die Realisierung des nanobiotechnologischen Baukastensystems auf Nukleinsäure-Basis untersetzen. Als letzter Punkt wird eine **Anwendung der Nanopartikel-Markierung auf Biochips** mit optischer Detektion und deren Empfindlichkeit bis hin zum Einzelpartikel-Nachweis behandelt.

## **Kapitel 2**

## **MATERIALIEN UND METHODEN**

## 2.1 MATERIALIEN

### 2.1.1 SUBSTRATE UND SCHICHTMATERIALIEN

Die verwendeten Chip-Klassen lassen sich anhand ihrer Trägermaterialien und ihres Schichtaufbaus gemäß dem folgenden Schema einteilen:

Chip-Klassen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Chip	Bindeschicht	Kation <sup>2+</sup>	Thiol			Silan	Silan mikrostrukturiert	Thiol		Thiol			
	Schichtmaterial		Au	Au				Au		Au	Au mikrostrukturiert		
	Trägermaterial	Glimmer				Glas			Ti Hftsch.		Ti Haftschicht		
Substrat										SiO <sub>2</sub>			
										Silizium			

**Tabelle 3:** Einteilung der Chip-Klassen nach Schichtaufbau und Material-Eigenschaften. Die verschiedenen Trägermaterialien und darauf aufbauende Substrate mit den entsprechenden Bindeschichten wurden in zwölf Chip-Klassen eingeteilt. Verwendete Abkürzungen: **SiO<sub>2</sub>**: Siliziumoxid; **Ti Hftsch.**: Titan-Haftschicht; **Au**: Gold, gesputtert; **L 1-3**: verschiedene Layout-Typen, **Thiol**: Thiol-Endgruppen der Funktionalisierungsmoleküle

#### Glimmer

In der Arbeit wurde Glimmer in Standard- und *Hi-grade*-Qualität von der Plano Planet GmbH (Wetzlar) benutzt, teils auch mit Goldbeschichtung (Chip-Klasse 2 und 3).

#### Glas

Für die Chip-Klassen 4, 5 und 7 wurden Objektträgerstreifen (Karl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) der Größe 4 x 25 mm benutzt. Für die Chips der Klasse 6 wurden Biochips aus 4-Zoll-Glaswafern (Schott Glaswerke, Jena) mit mikrostrukturierten Chemotops, geeignet für die *"on-chip"*-Synthese, verwendet (Reichert et al. 2000).

#### Silizium

Für die Herstellung der Mikrochips der Klassen 9-12 und für Vorarbeiten zur Oberflächenfunktionalisierung (Chip-Klasse 8) wurden 4-Zoll-Wafer mit thermisch oxidierten Oberflächen von der SICO Wafer GmbH (Jena) verwendet.

#### Schichtmaterialien

Zur Beschichtung der Substrate und als Elektrodenmaterial wurde Gold auf einer Haftschicht aus Titan verwendet. Die Chips wurden im IPHT auf der Basis im Handel erhältlicher Trägermaterialien hergestellt. Zur Herstellung solcher Chips (Klasse 9-12) siehe Abschnitt 2.2.1.2.

Für die Fotolithografie und als Schutzschicht beim Sägen wurde der Lack AZ 1514H (Clariant International Ltd., Muttenz, CH) eingesetzt.

### 2.1.2 CHEMIKALIEN

Die verwendete Chemikalien (Tabelle 24 im Anhang) wurden von den Firmen VWR International GmbH (Merck, Dresden), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Karl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Clariant International Ltd. (Muttenz, CH), MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot),





misch gesehen sollte der Spacer inert sein, am besten eine Alkylkette. Die optimale Kettenlänge sollte bei 40 Kohlenstoffeinheiten (6,16 nm, Shchepinov et al. 1997, 1999) und noch höher (Afanassiev et al. 2000) liegen.

Die Oligonukleotide S<sub>2nc</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>150</sub>, N<sub>7</sub>, L<sub>17\*</sub>, L<sub>17nc</sub>, L<sub>117\*</sub> und L<sub>k\*</sub> wurden von Jena-BioScience (Jena) bezogen. Alle F-Oligos wurden am Institut für Virologie der FSU (Jena) synthetisiert (E. Birch-Hirschfeld). Die Oligonukleotide S<sub>3</sub>, O<sub>3</sub> und O<sub>31</sub> wurden von BioTeZ (Berlin) hergestellt. S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> wurden sowohl von Jena-BioScience als auch von BioTeZ bezogen.

### **Polynukleotide**

*Bakteriophage- $\phi$*  (MBI Fermentas, St.Leon-Rot), isoliert aus *Escherichia coli* Stamm GM 119 (rm-, dam-, dcm-), 300 mg/ml, gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA  
 *$\phi$* -DNA *Eco130I* Abbau-Marker, 0,5 mg/ml in TE Puffer (pH 7.6) (MBI Fermentas)

### **Enzyme**

*T4*-Polynukleotid Kinase Kit (10 U/ $\mu$ l) von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot)

*T4*-Ligase Kit (5 U/ $\mu$ l) von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot)

Alkalische Phosphatase (*Kälberdarm*) Kit (1 U/ $\mu$ l) von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot)

## **2.1.4 GERÄTE**

Die für die Probenvorbereitung, Charakterisierung und Datenverarbeitung verwendeten Geräte sind im Anhang (Tabelle 26) aufgelistet.

## **2.2 METHODEN**

### **2.2.1 BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG PLANARER FLÄCHEN**

Die Oberflächen der Chips wurden mit einer Oligonukleotid-SAM als Affinitätsschicht biologisch modifiziert (funktionalisiert). Dazu wurden die Oligonukleotide direkt oder mit entsprechenden Bindungstechniken auf die Chip-Oberflächen immobilisiert.

#### **2.2.1.1 Vorbehandlung der Oberflächen**

Die Trägermaterialien wurden vor der Chipherstellung einem Reinigungsschritt unterzogen. Die fertigen Chips wurden vor dem Aufbau der Bindschicht und vor der Funktionalisierung wie in Abbildung 7 vorbehandelt. Gründliche Reinigungs- und Aktivierungsschritte waren eine wichtige Voraussetzung für die folgenden oberflächenchemischen Reaktionen.

Die Waschschrte wurden, soweit nicht anders angegeben, immer unter gleichmäßiger Bewegung auf einem Taumler für jeweils 5 min durchgeführt. Goldoberflächen wurden nach dem Ätzprozess für 5 min bei 150°C ausgeheizt und innerhalb von 15 min für die SAM-Herstellung weiterverwendet.

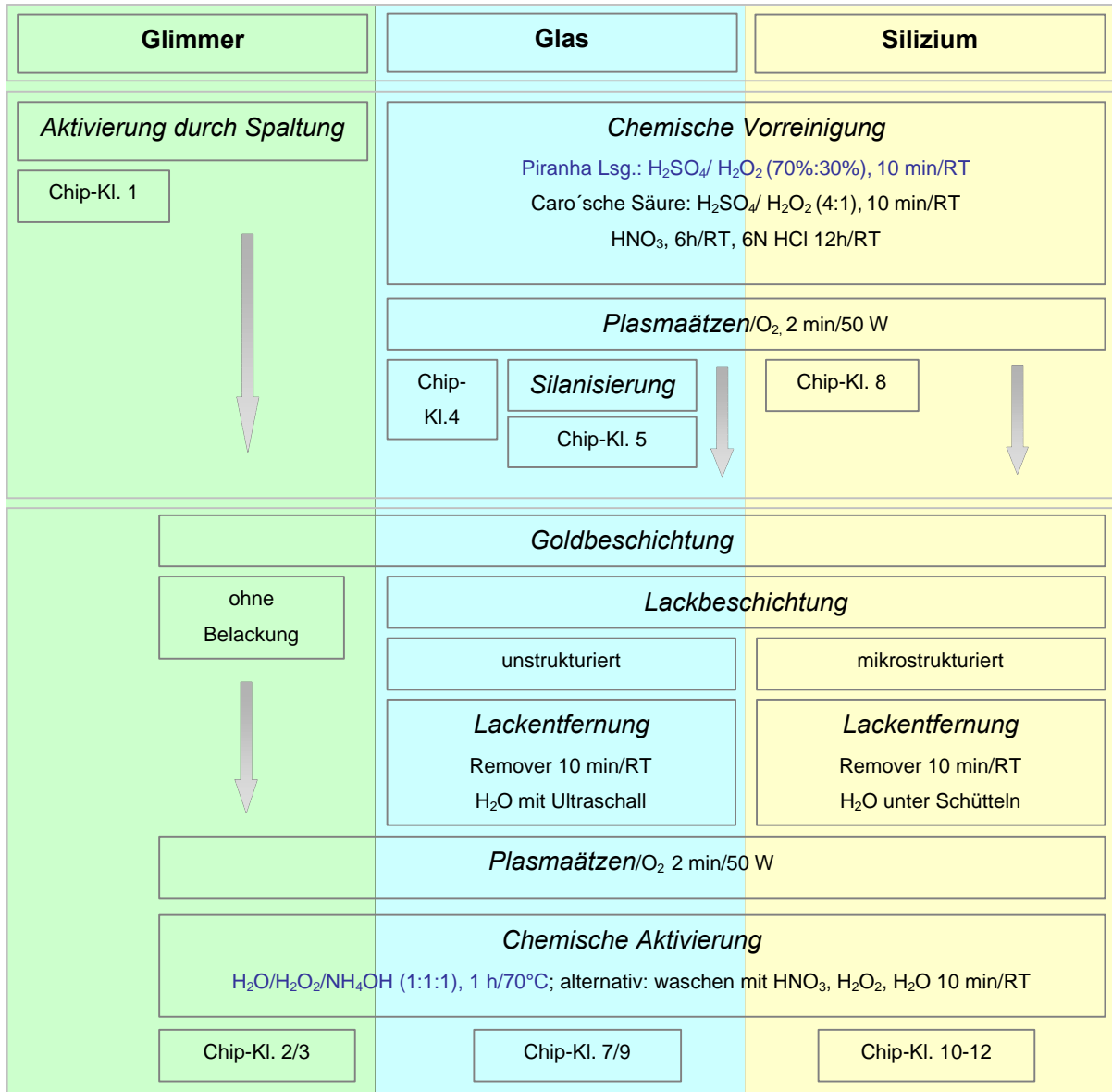
#### **2.2.1.2 Herstellung der Substrate und Chips**

##### **Schichtsysteme auf Glimmer**

Gold wurde mit (Klasse 3) oder ohne (Klasse 2) Titanhaftschrift in den Stärken 10 nm auf frisch gespaltenen Glimmer gesputtert.

**Schichtsysteme auf Glas**

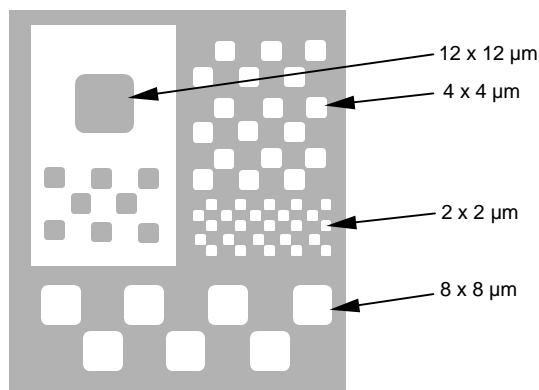
Gold wurde vergleichbar zu Chips in der Mikroelektronik über eine Titanhaftschrift in Stärken von 200 nm auf gereinigte Objektträger gesputtert. Unter Verwendung von Schutzlack wurden die Objektträger in 4 mm breite Streifen gesägt. Zum Entfernen des Lackes wurden die Chips jeweils 10 Minuten mit Remover-Lösung und Wasser gewaschen.



**Abb. 7:** Schema der Probenvorbereitung. Aktivierungs- und Reinigungsprozesse vor und während der Chip-Herstellung. Herausgehoben wurden die Schritte der Vorbehandlung. **Blau:** Die meistens angewendeten Alternativen.

**Herstellung von mikrostrukturierten Chips der Klasse 6**

Die Chips wurden am IPHT hergestellt. Dabei wurden in einer Octadecyltrichlorsilan-Schicht (ODTS) 3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan(GOPS)-Mikrochemotopen erzeugt (Layout in Abbildung 8). Diese wurden mit Ethylenglykol als Spacer konjugiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide nach der Standard-Phosphoramidit-Synthese stufenweise aufgebaut (Durchführung der "on-chip"-Synthese am Institut für Virologie an der FSU, Dr. E. Birch-Hirschfeld).



**Abb. 8:** Layoutausschnitt der Chip-Klasse 6. Die grauen Flächen repräsentieren die Mikrochemotope mit der Oligonukleotid-SAM, (63,06% der Fläche). Helle Flächen sind mit ODTS geschützt.

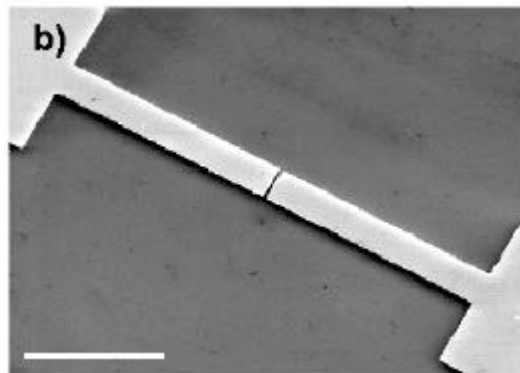
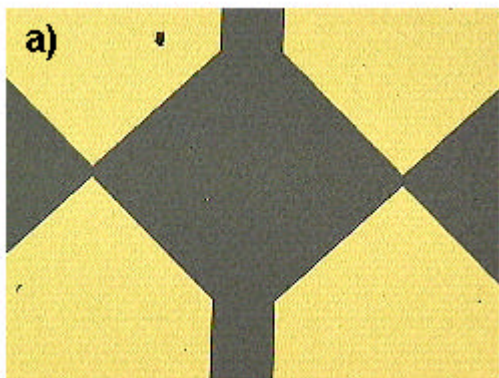
### Herstellung von mikrostrukturierten Chips der Klassen 10-12

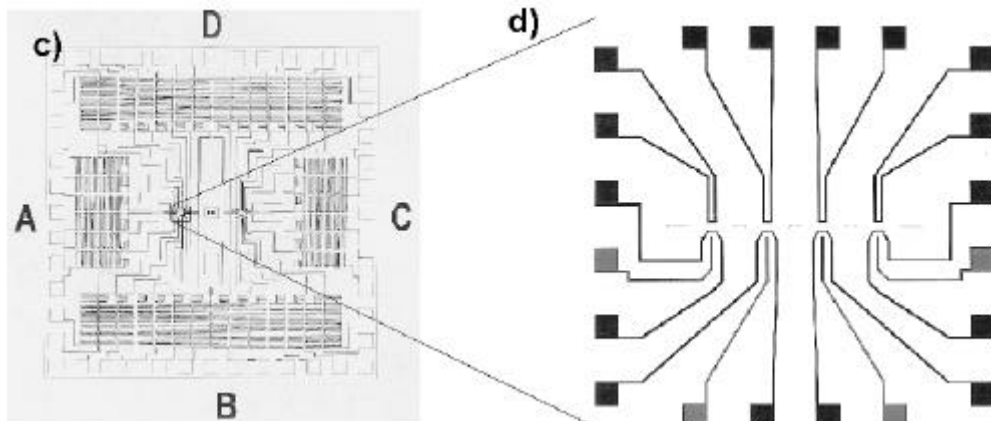
Mittels Standard-Photolithographie (Moreau 1988, Bowden 1994, Fuller 2000) wurden Mikrostrukturen auf der Substratoberfläche erzeugt (Layout in Abbildung 9). Der Schichtaufbau war bei allen Chip-Klassen analog: der thermisch oxidierte Siliziumwafer wurde mit einer 3-5 nm Haftschrift aus Titan und 200 nm Gold besputtert. Nach der photolithographischen Beschichtung und Belichtung wurden die Strukturen entwickelt und geätzt.

Die einzelnen Chips wurden abweichend vom Standard-Prozess für Mikrochips erst nach einer Passivierung der Flächen außerhalb der Elektroden (2.2.1.3) und anschließender Schutzlack-Beschichtung vereinzelt. Zur Lackentfernung siehe 2.2.1.1.

#### 2.2.1.3 Funktionalisierung von Siliziumoxidflächen

Die Siliziumoxidflächen wurden mit selbstorganisierenden Silanschichten funktionalisiert. Silane können durch ihre verschiedenen Ankergruppe auf unterschiedlichen Substraten verwendet werden. Ankergruppen mit Halogeniden eignen sich aufgrund ihrer hohen Reaktivität gut für schnelle Reaktionen. Dem gegenüber bilden Methoxy- oder Ethoxygruppen eine homogenere Monoschicht. So wurde für die Passivierung der Oberflächen ein Chlorosilan und für die Bindschicht der Oligonukleotid-Funktionalisierung ein Ethoxysilan ausgewählt. Die Auswahl der Kopfgruppe bestimmt die Funktionalität und chemischen Eigenschaften der entstehenden Schicht. Für die Erzeugung einer inerten Schicht wurden Methylgruppen verwendet. Diese verhindern eine unerwünschte Absorption von Molekülen. Für die Immobilisierung aminomodifizierter Oligonukleotide wurde ein Silan mit einer Aminogruppe als Kopfgruppe ausgewählt.

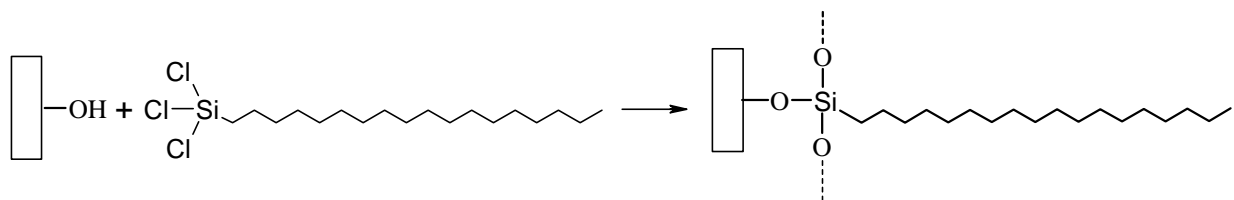




**Abb. 9:** Layouttypen der Klassen 10-12: **a)** Mikroskopische Aufnahme der Chip-Klasse 10 (L1), 2 x 2-Elektrodensystem mit 12 µm Elektrodenspalt, Außenmaße 2 x 2 mm. **b)** REM-Aufnahme der Chip-Klasse 11 (L2), 2-Elektrodensystem mit 2 µm Elektrodenspalt, Außenmaße 12 x 12 mm. **c)** Übersichtsaufnahme und **d)** Ausschnitt der Chip-Klasse 12 (L3), 4 x 2-Elektrodensystem mit 3 µm Elektrodenspalt, auf Chip 2 x vorhanden, Gate-Elektroden grau markiert, Außenmaße 12,8 x 12,8 mm.

### Passivierung von Siliziumoxid-Oberflächen

Die Silanisierung mit Octadecyltrichlorsilan (Abbildung 10) wurde bei den Chips der Klassen 10-12 verwendet. Die Moleküle bilden auf der Oxidoberfläche eine geschlossene Monolage (Vallant et al. 1998) und verhindern eine unerwünschte unspezifische Adsorption (Fritzsche et al. 1999).



**Abb. 10:** Passivierungsreaktion auf aktivierten  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen mit ODTS.

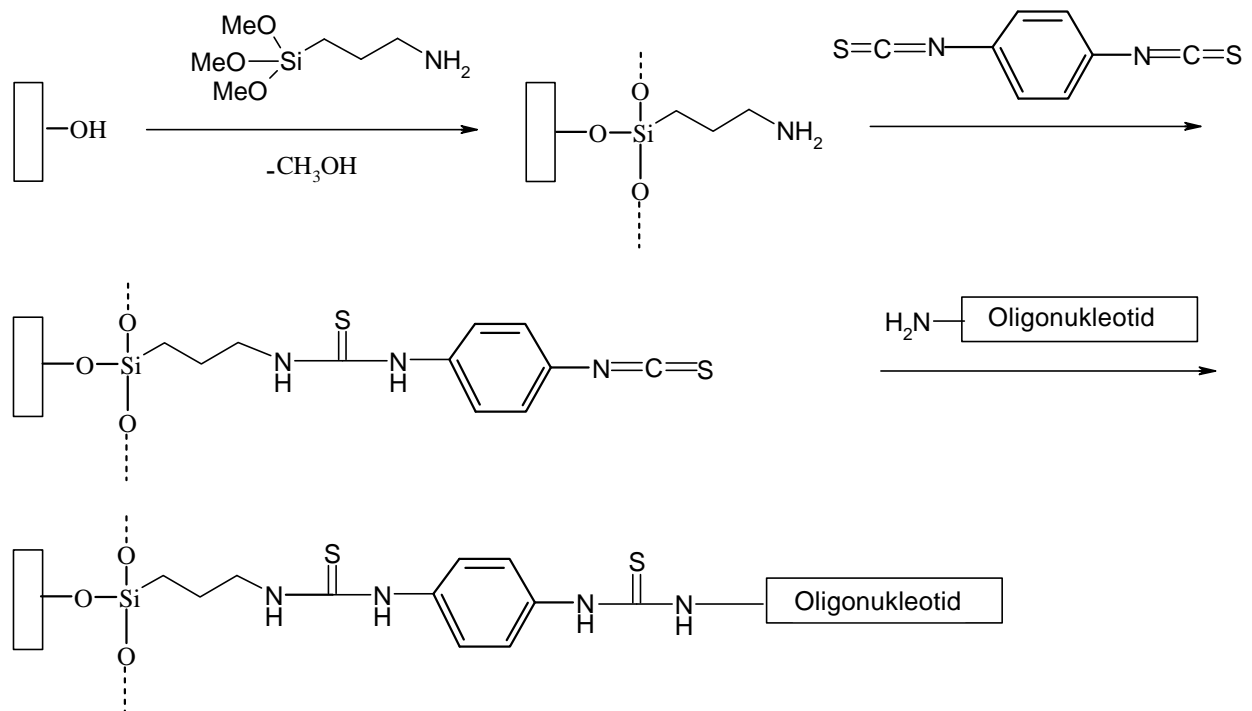
Die vorbehandelten Proben (Aktivierung nicht älter als 30 min!) wurden bei 80-100°C ausgeheizt. Trockenes Toluol wurde in einem zweistufigen Prozess unter Schutzatmosphäre wasserfrei hergestellt und dient der Reaktion als Lösungsmittel. Die Proben wurden in 1 mM ODTS/Toluol im Reaktor für 2 h bei 40°C unter Schutzgas (Argon) und permanentem Rühren inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend bei Raumtemperatur über Nacht weitergeführt. Diesem Prozess folgte ein vierstufiges Waschen der Proben: zweimal mit trockenem Toluol, einmal mit Ethanol und anschließend einmaliges exzessives Waschen mit Wasser. Die einzelnen Stufen wurden auf dem Taumler durchgeführt, ein Waschen im Ultraschallbad wirkte destruktiv!

Eine Charakterisierung des Passivierungseffektes der Silanisierungsreaktion wurde durch Überprüfung der Benetzungseigenschaften mittels wässrigem Medium durchgeführt. Eine Charakterisierung der mikrostrukturierten Oberflächen durch Kontaktwinkelmessung (Makkonen 2000) war aufgrund der zu geringen Dimension der räumlich begrenzten Areale nicht möglich.

### Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan

Vorgereinigte Proben der Klasse 5 wurden mit 1% 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) in Azeton für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Abbildung 11). Nach fünffachem Waschen mit Azeton, jeweils 5 Minuten, wurden die Proben bei 110°C 45 min getrocknet. Dem folgte eine zweistündige

Inkubation mit dem Crosslinker p-Phenylendiisothiocyanat (PDC, 2%) in 10% Pyridin/N,N-Dimethylformamid (DMF). Die Substrate wurden mit Methanol und Azeton gewaschen und getrocknet. Die Lagerung der so hergestellten Proben erfolgte im Exsikkator.



**Abb. 11:** Silanisierungsreaktion auf aktivierten  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen mit APTES und anschließender Ankopplung der Oligonukleotide.

### 2.2.1.4 Funktionalisierung von Goldoberflächen

#### Aktivierung der Thiol-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, welche auf dem Trägermaterial CPG gebunden geliefert wurden, mussten zuerst vom Support abgespalten werden. Die Abspaltung wurde mit der Standard-Methode durchgeführt: mit 50 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) in Ammoniumhydroxyd (28%) bei 55°C für 16 Stunden und 600 rpm. Der Reaktionsansatz wurde nach der Inkubation kurz abzentrifugiert.

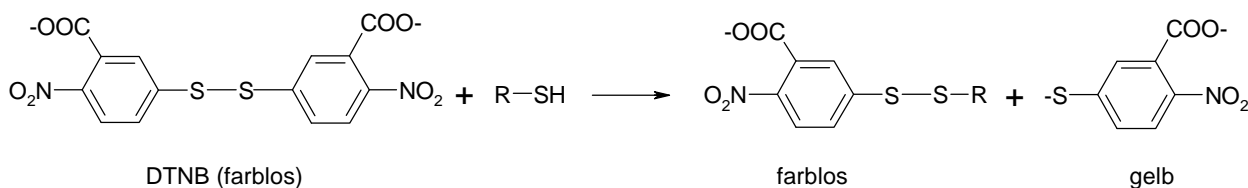
#### Aufreinigung der Thiol-Oligonukleotide

Thiolmodifizierte Oligonukleotide wurden mittels Gelfiltration an Nap-10 Säulen (Pharmacia) aufgereinigt. Dabei wurde das DTT aus der Lösung entfernt. Als Äquilibrierungslösung und Eluant wurde Wasser verwendet, da in den späteren Phasen wie z.B. der Ligandierung auch minimale Salzreste störend sind (Vorversuche). Die Fraktionen für die Chromatographie wurden entgast und sofort (!) weiterverwendet oder wieder eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung der Fraktionen erfolgte photometrisch (2.2.6.2). Bei älteren Lösungen wurde auch ein Aktivitätstest der Thiolgruppe ( $t_{1/2(\text{SH})} = 18 \text{ h}$ ) mit *Ellmans'*-Reagenz (DTNB, Abbildung 12) durchgeführt (Riddles et al. 1979).

#### Herstellung von SAMs aus Thiol-Oligonukleotiden

Die Inkubationsbedingungen wurden in einem semiempirischen Prozess auf der Basis von SAM- und Sensortechniken ausgewählt und optimiert. Die Auswahl der optimalen Inkubationsumstände für möglichst maximalen Bedeckungsdichten basiert auf Neutronen-Reflektivitäts-Studien (Levitcky et al. 1998), SPR Spektroskopie (Georgiadis et al. 2000), XPS (Peterlinz und Georgiadis 1997, Fritz

et al. 2000) und elektrochemischen Untersuchungen (Kelley 1998, Heaton et al. 2001) von Oligonukleotid-SAMs. Eine Auflistung der verschiedenen Inkubationstypen ist in Tabelle 27 im Anhang dargestellt.



**Abb. 12:** Farbreaktion von Ellmans'-Reagenz mit einem organischen Thiol-Molekül.

Gute Resultate wurden mit folgendem Inkubationsweg erzielt: Die vorbehandelte Goldoberfläche wurde mit 1  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid in 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,7) funktionalisiert. Der Thiol-Oligonukleotid-SAM wurde je nach Anwendung entweder als Tropfeninkubation auf die Oberfläche gebracht oder die Substrate wurden komplett in die Lösung getaucht und mit einer Dauer von 180 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein zweiter Immobilisierungsschritt mit 1 mM wässriger Mercaptohexanol(MCH)-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine Erhöhung der Hybridisierungsrate zu erreichen (Herne und Tarlov 1997, Mbindyo et al. 2001). Im Vergleich zu Hybridisierungsreaktionen von Targetmolekülen mit klassischen Oligonukleotid-SAMs (4-13%, Maskos und Southern; 1992, 9-76%, Chrisey et al. 1996), betragen die Hybridisierungsraten solcher Mischschichten nahezu 100% (Herne und Tarlov 1997, Levitcky et al. 1998). Die Verwendung von MCH sollte die Selbstorganisation der Nukleotidketten in der Schicht ermöglichen und eine optimale Beweglichkeit gewährleisten. Die Proben wurden nach der Immobilisierung dreimal mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die so erzeugten SAMs können unter Lichtabschluss bei 4°C für längere Zeit gelagert werden. Vor der Weiterverwendung müssen diese Proben erst hydratiert werden (Fritz et al. 2000).

Die theoretische Dichte der Thiol-Oligo-SAMs wurde unter Berücksichtigung des Flächenbedarfs der Oligonukleotidmoleküle auf der Oberfläche ermittelt (Tabelle 5). Vorausgesetzt wurde eine zylindrische Molekülform der Oligonukleotide, welche mit der Stirnfläche (Kreisfläche) an der Oberfläche bindet. Auf einem SAM ordnen sich diese Zylinder dicht nebeneinander an und die Molekülachse ist gegenüber der Oberflächen-Ebene geneigt. Als theoretische Randbedingung für eine Berechnung der Dichten solcher Schichten wurden eine homogene Verteilung der Moleküle auf einer glatten unendlichen Fläche (ideale Voraussetzung) angenommen. Im idealen Fall (Au 111) ordnen sich in einer Alkanthiol-SAM die Schwefelatome hexagonal an (Ulman 1991). Ihre Distanz beträgt 0,497 nm. Der für ein Molekül benötigte Platz beträgt somit 2,14  $\text{nm}^2$  (Ulman 1991), mehr als man aus dem Atomradius des Schwefels ableiten würde. So muß man bei SAMs aus Thiol-Oligonukleotiden auch mit einer niedrigeren Dichte rechnen. In der Tabelle 5 sind die Werte der berechneten Dichten und Flächen der Thiol-Oligonukleotide pro Flächeneinheit aufgelistet.

Die Werte nach der Korrektur unter Berücksichtigung der SAM-Theorie sind Maximalangaben, berechnet aus der Distanz zweier Schwefelatome von Alkanthiol-SAM auf Goldoberflächen (Ulman 1991). Nach Steel et al. (1999) und Levitcky et al. (1998) sind die effektiven Oberflächenbedeckungen durch Oligonukleotid-SAMs noch geringer. Die Moleküle haben einen größeren Radius

(dsDNA:  $r = 1$  nm, Steel et al. 1999) und zusätzlich noch eine Hydrathülle (0,5 nm  $\varnothing$ , Steel et al. 1999).

	ssDNA	dsDNA
Radius des Moleküls	0,6 - 0,7 nm	1 nm
Stirnfläche des Moleküls	1,13 nm <sup>2</sup>	3,14 nm <sup>2</sup>
theoretische maximale Dichte entsprechend der Geometrie [Moleküle/cm <sup>2</sup> ]	$8,85 \times 10^{13}$	$3,18 \times 10^{13}$
Moleküle/cm <sup>2</sup> (Ulman 1991)	$< 5 \times 10^{13}$	
effektiver Platzbedarf (Steel et al. 1999)	$\sim 17$ nm <sup>2</sup>	$\sim 30$ nm <sup>2</sup>
effektive Dichte [Moleküle/cm <sup>2</sup> ] (Steel et al. 1999)	$\sim 6 \times 10^{12}$	$\sim 3,3 \times 10^{12}$

**Tabelle 5:** Theoretisch ermittelte Werte der  $\tilde{A}_{\max}$  der Thiol-Oligonukleotid-SAMs.

### Passivierung der Goldoberflächen

Für die Passivierung der Goldoberflächen wurde ein SAM aus Alkanthiolen verwendet. Die Proben wurden nach der Vorreinigung ähnlich wie Thiol-Oligonukleotid-SAMs (siehe oben) behandelt.

## 2.2.2 BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN

Durch die Oligonukleotid-Modifizierung der Partikel erhalten diese, wie die planaren Substrate, eine Affinitätsschicht. Dazu wurden die kolloidalen Goldlösungen mit thiol-modifizierten Oligonukleotiden konjugiert. Die so hergestellten DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden in Konstruktionen oder für Markierungsversuche eingesetzt.

### 2.2.2.1 Herstellung der DNA-Nanopartikel-Komplexe

Die frisch gereinigten oder aufgetauten und gereinigten Thiol-Oligos wurden in einem sechsfachen Überschuss auf unkonjugierte kolloidale Goldlösung gegeben. Die Eigenschaften der kolloidalen Nanopartikel und die in Abhängigkeit davon eingesetzten Oligonukleotidmengen sind in der Tabelle 6 aufgeführt. Detailliertere Informationen über die Partikeleigenschaften befinden sich in Tabelle 28 im Anhang.

Partikel-durchmesser [nm]	Konzentration	Partikel/ml	Anzahl Oligos/ kolloidales Partikel	Mol Oligo/ 1 ml Goldlösung
	entspricht jeweils 1,0 OD <sub>525</sub>			
15	2,3 nM	$1,4 \times 10^{12}$	130	0,303 nmol
30	0,333 nM	$2,0 \times 10^{11}$	520	0,173 nmol
60	43,3 pM	$2,6 \times 10^{10}$	2080	0,09 nmol

**Tabelle 6:** Eigenschaften der Nanopartikellösungen und der eingesetzten Oligonukleotidmengen. Die Konzentrationen wurden in der Arbeit jeweils mit dem OD-Wert angegeben.

Nach einer 18- (min. 16-) stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Lösung stufenweise (!) unter ständigem Mischen auf 0,1 M Natriumchlorid in Phosphatpuffer eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz 48 (min. 40) Stunden bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Nach Ablauf der Ligandierung wurden die DNA-Nanopartikel-Komplexe 3 bis 5 mal mit 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) gewaschen. Dazu wurden die Lösungen zentrifugiert und das



ölige Pellet stufenweise (!) in Puffer wiederaufgenommen. Die eingesetzte Zentrifugalkraft wurde in Abhängigkeit von den Partikeldurchmessern empirisch ermittelt (Tabelle 7).

Partikeldurchmesser [nm]	Drehzahl [Umdrehung/min]	rel. Zentrifugalbeschleunigung [ x g]	Zeit [min]
15	12000	13684	10
30	8000	6082	6
60	6000	3421	6

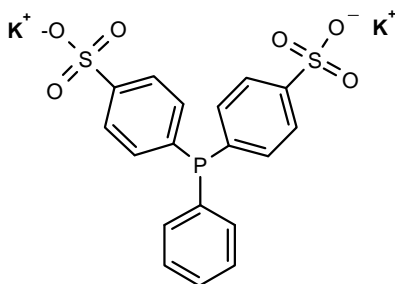
**Tabelle 7:** Empirisch ermittelte Werte für das Zentrifugieren in Abhängigkeit von den Partikelgrößen (Zentrifugation mit *UniCen* bei Raumtemperatur).

Die Bedeckungsdichten der Oligonukleotide auf den Oberflächen der Nanopartikel wurden aus der Messung des Überstandes nach der Ligandierung oder mit gelelektrophoretischen Verfahren ermittelt. Die gereinigten DNA-Nanopartikel-Komplexe können bei Raumtemperatur ca. ein halbes Jahr weiterverwendet werden. Vor einer Markierungsreaktion wurde die aktuelle Konzentration (Extinktion bei 525 nm) bestimmt und die gewünschte Konzentration durch Verdünnen bzw. Einkonzentrieren mittels Zentrifugation eingestellt. In den Versuchen sind die Konzentrationen der DNA-Nanopartikel-Komplexe jeweils in Optischer Dichte bei 525 nm ( $OD_{525}$ ) angegeben. Dieser Wert kann bei 30 nm Partikeln mit dem Faktor  $3,33 \times 10^{10}$  in Molarität umgerechnet werden (Herstellerangabe). Für die Quantifizierungsversuche wurden Sonden mit 30 nm Partikeln verwendet.

Die Charakterisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Stabilität wurde außerdem durch das Verfolgen der Farbveränderung bei Zugabe von Natriumchlorid geprüft.

#### 2.2.2.2 Herstellung der DNA-Nanopartikel-Komplexe mit Schutzligand

Für die sterische Stabilisierung von kolloidalen Goldlösungen wurde der Ligand SPPD (Abbildung 13) ausgewählt (Loweth et al. 1999). Dieser Ligand sollte auf seinen Stabilisierungseffekt überprüft werden. Durch die Verwendung von Stabilisatoren könnte das Verhältnis von Oligonukleotid zu Nanopartikel genauer reguliert werden.



**Abb. 13:** Strukturformel des Bis (p-sulfonatophenyl)phenylphosphindihydrat-Dikaliumsalzes (SPPD); Ligandierungsreagenz für die Stabilisierung der kolloidalen Goldlösungen.

1 ml Goldlösung wurde mit 0,1-0,2 mg SPPD bei Raumtemperatur für 10 h gerührt. Durch Zugabe festen Natriumchlorids wurde die Lösung gefällt. Die Lösung wurde abzentrifugiert (Drehzahl siehe Tabelle 7) und das Pellet in 0,25% SPPD-Lösung wieder aufgenommen. Nach einer Methanolfäl-

lung wurde der Ansatz nochmals zentrifugiert und das Pellet wieder in 0,25%-ige SPPD-Lösung gegeben.

Der vorstabilisierten Nanopartikel-Lösung wurde eine diskrete Menge Oligonukleotid zugesetzt und anschließend wie im Punkt 2.2.2.1 weiterbehandelt.

### 2.2.2.3 Verstärkung des Nanopartikel-Signals mit Silberabscheidung

Immobilisierte DNA-Nanopartikel-Komplexe können mit einer für die Elektronen-Mikroskopie entwickelten Silber-Redoxreaktion vergrößert werden. Dazu wurden Initiator und Enhancer eines Silberfärbungskits (SEKL 15) in gleichen Volumina miteinander gemischt und auf die Proben gegeben. Die Inkubation wurde für 2-15 min bei Raumtemperatur und Schütteln durchgeführt. Gestoppt wurde die Reaktion durch gründliches Spülen mit Wasser.

## 2.2.3 DNA-TECHNIKEN

### 2.2.3.1 Hybridisierung

Die Bestimmung der anzuwendenden Hybridisierungstemperatur erfolgte in der Regel mit der berechneten Schmelztemperatur ( $T_m$ ) (*Vector NTI Suite 6*, Informax) unter Berücksichtigung der Salz- und Oligonukleotidkonzentration. Für Lösungsansätze kleiner als 50 Basen wurde eine Temperatur ca.  $5^\circ\text{C}$  unter  $T_m$  gewählt, für Hybride zwischen 50-5000 Basen  $25^\circ\text{C}$  unter  $T_m$  (Wetmur und Davidson 1968). Für die Hybridisierung auf Oberflächen wurde eine empirische Formel angewendet (Fotin et al. 1998), welche die Diffusion der Moleküle mit berücksichtigt:

$$T_{\text{chip}} = 1,2 T_m - 27,8^\circ\text{C} \quad \text{Fotin et al. 1998}$$

Bei der Durchführung der Hybridisierungsreaktionen galt das Prinzip der möglichst hohen Stringenz, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Bei einem mehrstufigen Hybridisierungsprozess wurden die Oligonukleotid- und die Salzkonzentration so gewählt, dass die aufeinander folgenden Prozessschritte mit immer niedrigerer Hybridisierungstemperatur durchführbar waren. Dadurch sollte eine Destabilisierung der schon erzeugten Konstrukte verhindert werden.

Die Durchführung des Hybridisierungsprozesses erfolgte bei Lösungen und kleineren Biochips in Reaktionsgefäßen im Thermomixer, bei den größeren Chips in den dafür konstruierten Feuchtkammern im Heizblock oder im Hybridisierungs-ofen unter geregelter Temperierung und Schütteln. Die Hybridisierungsschritte in planaren Umgebungen wurden mit einem Prähybridisierungsschritt eingeleitet. Dieser wurde bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur im jeweiligen Hybridisierungspuffer für 30 min durchgeführt. Die Länge der Hybridisierungsschritte bei einer konstanten Temperatur wurde zwischen 60-180 min gewählt. Diese Inkubationsart wird in der Arbeit als Hybridisierungstyp 1 bezeichnet.

In den Fällen, wo keine genaue Schmelztemperatur ermittelt werden konnte (z.B. bei Gemischen und Parallelversuchen), wurde nach einer 10 minütigen Denaturierungsphase ( $85^\circ\text{C}$ ) ein Temperaturgefälle zwischen  $85^\circ\text{C}$  und Raumtemperatur über längere Zeit (z.B. über Nacht) durchlaufen (Hybridisierungstyp 2). Ausnahmen von diesen allgemeinen Regeln werden im konkreten Fall vermerkt. Als Hybridisierungspuffer wurde bei reinen Nukleinsäurekonstrukten eine 1 M Natriumchlorid-

rid/TE, pH 7,0 (Herne und Tarlov 1997) oder 5 x SSC (Fritz et al. 2000) gewählt. Für die Hybridisierung mit DNA-Nanopartikel-Komplexen wurde 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) verwendet. Auf den Hybridisierungsschritt folgte bei den Chips ein mehrstufiger zunehmend stringenter Waschprozess, um die ungebundenen oder unspezifisch hybridisierten Oligonukleotide zu entfernen. Dazu wurden die folgenden Alternativen angewendet:

Waschalternative 1:

1 x SSC, 0,1% SDS / 0,1 x SSC,  
0,1% SDS / 0,1 x SSC / Wasser

Waschalternative 2:

1x SSC, Tween 20 / 0,1 x SSC,  
Tween 20 / 0,1 x SSC / Wasser

Die Proben wurden nach dem Waschen im Stickstoffstrom getrocknet. Die Lagerung der Proben erfolgte unter Lichtausschluss bei 4°C.

### 2.2.3.2 Ligation

Um die Stabilität der durch die Hybridisierung miteinander verknüpften Oligonukleotide bzw. Fragmente als Konstrukt zu erhöhen wurde teilweise dieser enzymatische Schritt durchgeführt. Die 5'-Phosphatgruppen wurden dabei mit den 3'-OH-Gruppen kovalent miteinander verbunden (Pheiffer und Zimmerman 1983). Der Ligationsansatz und die Konditionen wurden in Abhängigkeit davon, ob eine Reaktion in Lösung oder eine Reaktion auf planare Oberfläche durchgeführt wurde, unterschiedlich gewählt:

Ansatz für Lösung:

Gesamtvolumen 20 µl

x µl	λ-DNA (50-200 ng, dephosphoryliert)
5 µl	phosphorylierter Linker (600 ng-1 µg)
2 µl	10 x Ligase Puffer
auf 19 µl	Wasser
1 µl	T4 DNA Ligase (5 U/µl)
Inkubation	1 h / 22°C
Inaktivierung	10 min / 65°C

Ansatz für planares Substrat:

Gesamtvolumen 20 µl pro Chip – bei einer Behandlung von ca. 50-400 ng Oligo

x µl	λ-DNA (0,2-0,5 pmol Enden, dephosphoryliert)
2 µl	10 x Ligase Puffer
auf 19 µl	Wasser
1 µl	T4 DNA Ligase (5 U/µl)
Inkubation	2 h / 22°C (37°C)
Inaktivierung	10 min / 65°C

### 2.2.3.3 Formierung von Triplexstrukturen

Neben der üblichen Hybridisierung, aus der eine Doppelhelixstruktur resultiert, wurden auch Versuche zur Hybridisierung zwischen dsDNA und Oligonukleotid in Form einer Triplexstruktur durchgeführt. Dieses ist eine Alternative zur Doppelstrangmanipulation. Der Hybridisierungsschritt erfolgte in diesem Fall bei einer niedrigen Temperatur (25°C), um die Bildung thermodynamisch weniger stabiler Komplexe (Triplex) zu begünstigen. Die Planung hierzu geeigneter Oligonukleotide, energetische Berechnungen und die Ermittlung der Hybridisierungstemperatur erfolgte durch H. Schütz (FSU). Die sonstigen Konditionen der Hybridisierung waren mit denen der üblichen Hybridisierung identisch.

### 2.2.3.4 Enzymatische Prozessierung langkettiger DNA

#### Dephosphorylierung der DNA

Um eine Rezirkularisierung oder Konkatemerisierung der  $\lambda$ -DNA oder von Fragmenten zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit der *CIAP* dephosphoryliert (Ahmad und Huang 1981).

Ansatz: Gesamtvolumen 50 $\mu$ l	
x $\mu$ l	$\lambda$ -DNA (1-20 pmol Enden)
5 $\mu$ l	Puffer D
auf 49 $\mu$ l	Wasser
1 $\mu$ l	<i>CIAP</i> (1U/ $\mu$ l)
Inkubation	1 h / Raumtemperatur
Inaktivierung	10 min / 65°C

#### Phosphorylierung der DNA

*T4* Polynukleotid-Kinase wurde zur 5'-Phosphorylierung verwendet (Sambrook et al. 1989).

Ansatz: Gesamtvolumen 20 $\mu$ l	
x $\mu$ l	dephosphorylierte DNA (1-20 pmol 5'-Enden)
2 $\mu$ l	10 x Puffer A
auf 19 $\mu$ l	Wasser
1 $\mu$ l	<i>T4</i> PNK (10 U/ $\mu$ l)
Inkubation	30 min / 37°C
Inaktivierung	1 $\mu$ l 0,5 M EDTA (pH 8,0)

#### Reinigung der DNA

Auf kommerziell erhältliche suspensionshaltige Reinigungskits für Nucleinsäuren wurde in der Arbeit verzichtet. In den Vorversuchen zeigte sich, dass diese Techniken eine erhebliche Partikel-Verunreinigung der Lösungen verursachen und so die mikroskopische Charakterisierung der einzelnen Moleküle oder Komplexe verhindern. Um die Proteine (Enzyme) aus den Reaktionsansätzen abzutrennen, wurde eine Extraktion mit einem Phenol/Chloroform Gemisch mit nachträglicher Fällung nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

### 2.2.3.5 Linearisierung der $\lambda$ -DNA

Für einen effektiven Einsatz des dsDNA-Moleküls der Bakteriophage- $\lambda$  wurde dieses linearisiert (Haber und Wirtz 2000). Die zirkuläre Konformation des Moleküls konnte mit einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C und einer darauffolgenden raschen Abkühlung auf Eis (Alternativ: -20°C, 1 h) verhindert werden.

### 2.2.3.6 Immobilisierung von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren oder Nucleinsäure-Komplexe mit Nanopartikeln wurden durch Physisorption auf verschiedene Oberflächen gebunden. Damit wurde ihre Charakterisierung ermöglicht. Diese Immobilisierungswege sind nicht Teil einer Nanokonstruktion.

Nucleinsäuren haben eine hohe Affinität für unterschiedliche Substrattypen. Für eine adsorptive Bindung der DNA eignen sich Siliziumoxidflächen (Fritzsche et al. 1999), Goldoberflächen (Beebe 1995) und auch unbehandelter Glimmer. Dazu wurden Tropfen von DNA-Lösung auf diese Substrate (Chip-Klassen 1- 4 und 7- 9) aufgetragen und nach einer Einwirkzeit von 10 min im Stickstoffstrom abgeblasen und getrocknet.

Für die Charakterisierung der Nukleinsäuren und deren Nanopartikel-Komplexe wurden diese auf Glimmer (Chip-Klasse 1) durch elektrostatische Bindung immobilisiert und mit dem AFM untersucht. Dabei wurden zwei Protokolle angewendet.

*Protokoll nach Li et al. 1998:* Dieses Protokoll berücksichtigt die Trägheit der langen Fragmente.

5  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , pH 5,5-7,0) wurden auf den Randbereich der Glimmerstücke aufgetragen. Nach 1-2 min Einwirken bei Raumtemperatur wurde der Tropfen langsam mit Stickstoff in einem  $45^\circ$  Winkel abgeblasen. Theoretisch erwartete Länge bei  $\ddot{\epsilon}$ -DNA:  $14,6 \pm 1,7 \mu\text{m}$  also ca. 89% der B-Konformation.

*Protokoll nach Cherny et al. 1998 (modifiziert):*

5  $\mu\text{l}$  DNA (1-3  $\text{ng}/\mu\text{l}$  in 1-5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 5 mM HEPES) wurde für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Strecken der DNA wurden die Proben dann getrocknet. Um hohe Verluste durch Umpuffern zu vermeiden, wurde bei einigen Ansätzen auf HEPES verzichtet.

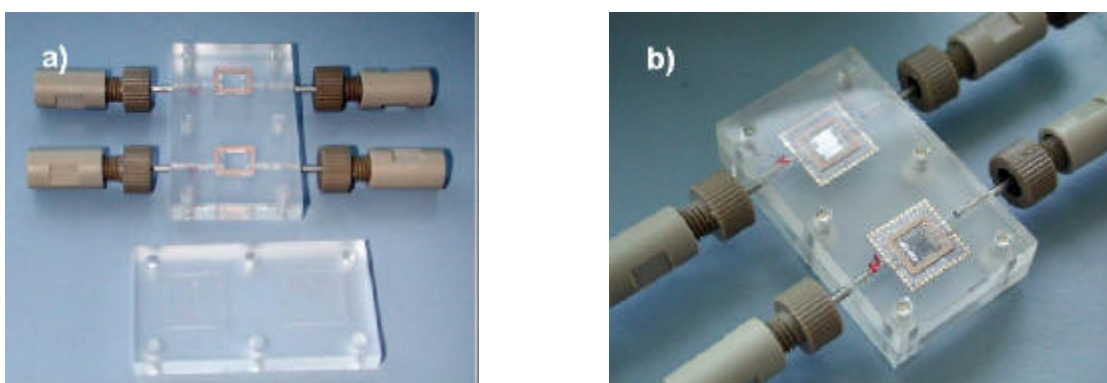
### 2.2.3.7 Streckung langer Nukleinsäurestränge

#### Meniskus Methode

Proben mit DNA-Tropfen auf der Oberfläche wurden in Schrägstellung auf eine saugfähige Vliesunterlage gestellt. Der Tropfen wurde langsam (!) von oben in einem Winkel von  $45^\circ$  (Li et al. 1998) abgeblasen.

#### Streckung in Mikrodurchflusskammer

Diese Streckmethode wurde bei einseitig immobilisierter  $\ddot{\epsilon}$ -DNA auf den Mikroelektronik-Chips (Chip-Klasse 12) angewendet. Die Chips wurden in einer dafür konstruierten Durchflusskammer (Abbildung 14) befestigt und eine Peristaltik-Pumpe angeschlossen. Nach 2 Minuten Spülen mit Wasser mit einer Durchflussrate von 1  $\text{ml}/\text{min}$  wurde die Probe aus der Kammer entfernt und getrocknet.

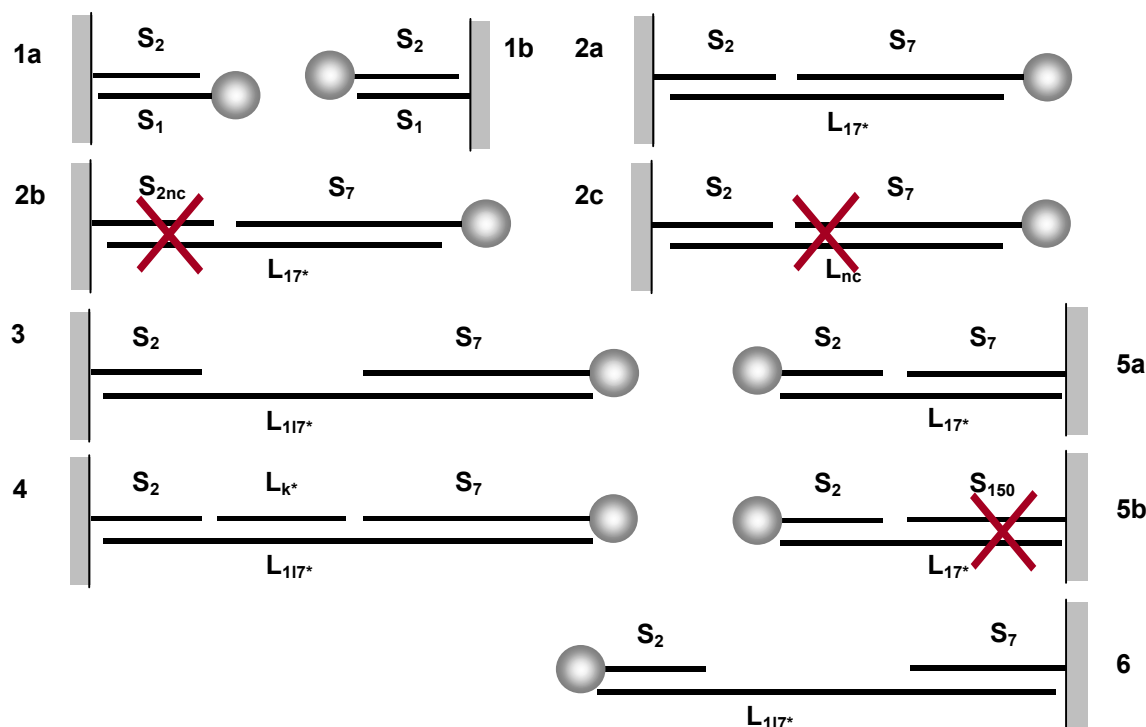


**Abb. 14:** Die zur Streckung langer DNA benutzte Mikrodurchflusskammer. Höhe der Kammer: 100  $\mu\text{m}$ ; Innendurchmesser der Teflonschläuche: 0,5 mm, HPLC-Standard-Fluidikanschlüsse.

## 2.2.4 MOLEKULARE NANOKONSTRUKTIONEN

Die Idee der Vereinigung der Techniken und Elemente der molekularen Nanotechnologie in einem Modellsystem war das Ziel dieser Arbeit. Dabei wurden Gold als Schichtmaterial, Gold-Nanopartikel und einfache synthetische bzw. teilweise manipulierte Nukleinsäure-Komplexe miteinander verknüpft. Die Immobilisierung und Verknüpfung der Elemente sollte durch algorithmisch

gewählte Selbstorganisation zwischen der Oligonukleotid-Affinitätsschicht oder infolge der eigenen Affinität der Elemente erfolgen. Die daraus resultierenden einzelnen Versuche sind in den Schemata 1 und 2 abgebildet (Abbildungen 15 und 16 auch auf den Einlageblatt).



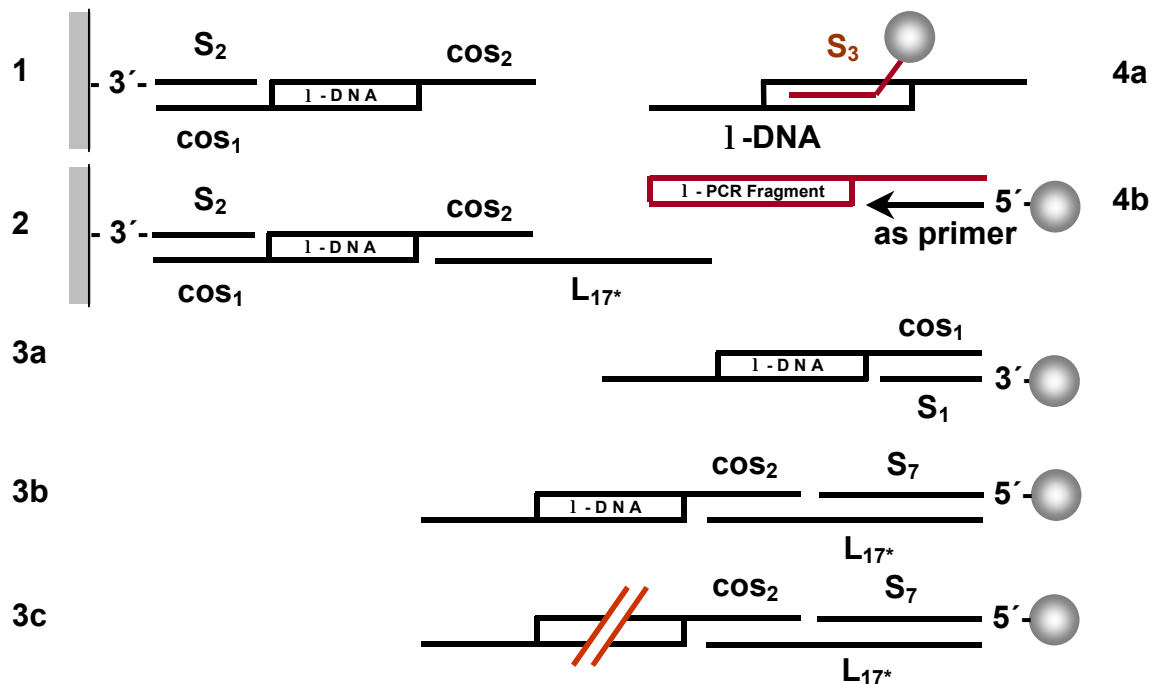
**Abb. 15:** Hybridisierungsschema 1 - Basissystem für die Immobilisierung synthetischer Nukleinsäure-Komplexe und deren Markierung. Dargestellt sind die Oligonukleotidsequenzen der stufenweise aufgebauten Komplexe. Die Kettenlänge im gestreckten Zustand beträgt bei 1 12b (4 nm), bei 2 und 5 37b (12,6 nm) und bei 3,4 und 6 100b (34 nm).  $L_k^*$  bei 4 wurde zur Stabilisierung ausgewählt. Die rote Kreuze zeigen die verhinderte Bindung wegen Nichtkomplementarität.

In den Versuchen wurden Chips mit Goldoberflächen (Chip-Klassen 2, 3, 7, 9, 10 und 12) als statische Komponente (siehe Kapitel 1) mit einer Affinitätsschicht aus Oligonukleotiden (2.2.1) verwendet. DNA-Nanopartikel-Komplexe und kurze synthetische DNA-Komplexe oder manipulierte lange DNA bildeten die anderen Elemente des Systems.

#### 2.2.4.1 Immobilisierung von Nukleinsäure-Komplexen

##### Immobilisierung von kurzen synthetischen Nukleinsäure-Komplexen und deren eindimensionale Verlängerung

Oligonukleotide wurden auf  $S_2$  oder  $S_7$  Oligonukleotid/MCH Monolagen der Chips der Klassen 2, 3, 7 und 9 immobilisiert (Hybridisierungsschema 1.2-1.6). Die Charakterisierung erfolgte direkt mit dem Rasterkraftmikroskop, indirekt durch die Bestimmung der Schmelztemperaturen und Farbtests in parallelen Lösungsansätzen (2.2.4.3), sowie durch Markierung mit Nanopartikeln (siehe 2.2.4.2). Die Schmelzkurven-Bestimmung wurden entsprechend den Schemata 1.2.a bzw. 1.5.a und mit ca. 0,3 OD<sub>260</sub> des Oligonukleotides in 100 mM Natriumchlorid durchgeführt. Getestet wurden die Komponenten einzeln, paarweise und im gesamten Hybridisierungsansatz.



**Abb. 16:** Hybridisierungsschema 2 - Immobilisierung genomischer Nukleinsäure-Komplexe, deren Manipulierung und Markierung. Die dargestellten Längen der Nukleinsäuren sind nicht maßstabgerecht.

### Affinitätsimmobilisierung langkettiger DNA

*Probenreihe A:* Genomische Nukleinsäure wurde mit dem Schema 2.1 auf Chips der Klasse 9 immobilisiert. Dazu wurden die mit  $S_2$  (5'-phosphoryliert) funktionalisierten Chips in 100  $\mu$ l *I*-DNA (0,5 pM, linearisiert, dephosphoryliert) bei 65°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden sie über Nacht abgekühlt. Das Hybridisierungsprodukt wurde für 2 h bei 37°C ligiert. Als Kontrolle der Ligationseffizienz wurden Proben bei 85°C für 2 h erhitzt.

*Probenreihe B:* (Schema 2.2) *I*-DNA (0,15 nM linearisiert, dephosphoryliert) wurde mit  $L_{17^*}$  hybridisiert (10 min, 65°C) und anschließend ligiert (2 h, 37°C). Der Ligationsansatz wurde nach dem Stoppen der Reaktion auf Chips der Klassen 3 und 9 mit  $S_2$ -SAM-Funktionalisierung gegeben und bei 23,7°C für 2 h immobilisiert.

Nach der Immobilisierung in den Varianten A und B folgte eine Streckung nach der Meniskus-Methode und das Trocknen der Proben. Die Charakterisierung der immobilisierten Moleküle erfolgte mit dem Rasterkraftmikroskop.

### Adressierte einseitige Affinitätsimmobilisierung langkettiger DNA

Chips der Klasse 12 wurden mit einer  $S_2$ /MCH Mischschicht modifiziert (Schema 2.1). Die Proben wurden in 1 ml  $\bar{\epsilon}$ -DNA (250 ng/ml) mit verschiedenen Natriumchlorid Konzentrationen (0-100 mM) nach dem Hybridisierungstyp 2 über Nacht inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Chips ohne einzutrocknen in die Durchflusskammer überführt und mit Wasser (Durchflussrate: 1 ml/min) für 10 Minuten gewaschen. Die Auswertung erfolgte nach dem Trocknen (in Fließrichtung (!), mit Stickstoffstrom) mit dem Rasterkraftmikroskop.

### 2.2.4.2 Nanopartikel-Markierung von Nukleinsäurekomplexen

#### Farbtest – reversible sequenzspezifische Bindung zwischen DNA-Nanopartikel-Komplexen

Oligonukleotid-Komplexe  $S_1$ -30 nm +  $S_2$ -30 nm,  $S_1$ -30 nm +  $S_7$ -30 nm,  $S_2$ -30 nm +  $S_7$ -30 nm (ca. 2 OD<sub>525</sub>) wurden nach dem Hybridisierungstyp 2 hybridisiert (Schemata 1.1.a, b und 1.2.a). Tropfen des hybridisierten Komplexes wurden auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Bei Temperierung der Platten wurde die Farbveränderung verfolgt.

#### Endmarkierung von langen DNA-Strängen

##### Endmarkierung von *I*-DNA

*Probe A:* Die einfachste Markierung erfolgte durch einen Hybridisierungsschritt nach dem Schema 2.3.a. *I*-DNA (linearisiert, dephosphoryliert, 0,8 pmol Enden) wurde mit ca. zehnfachem Überschuss an  $S_1$ -30 nm Komplex (10 pmol) nach dem Hybridisierungstyp 2 inkubiert. Das Produkt wurde ungereinigt mittels Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert und auf Chips der Klasse 1 wie in 2.2.3.6 beschrieben für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung gebunden.

*Probe B:* Eine zweistufige optimierte Markierung der *I*-DNA wurde nach dem Hybridisierungsschema 2.3.b durchgeführt. 2,5 pmol dephosphorylierte *I*-DNA wurde mit einer equimolaren Menge an  $L_{17^*}$  ligiert. Nach der Reaktion erfolgte als Kontrolle eine gelelektrophoretische Charakterisierung des Produkts. Der Ligationsansatz (150 pM) wurde in einem zweiten Hybridisierungsschritt bei 60°C mit der zweifachen Menge an  $S_7$ -30 nm-Nanopartikel-Komplex inkubiert. Das Produkt wurde ungereinigt auf Chips der Klasse 1 gebunden (Immobilisierung nach 2.2.3.6). Die Streckung der Moleküle erfolgte mittels der Meniskus-Methode. Die Proben wurden mit dem AFM ausgewertet, wobei mehrere Zonen der Chip-Oberflächen abgebildet wurden.

##### Endmarkierung von definierten DNA Fragmenten

$S_7$ -30 nm Komplex (2 OD<sub>525</sub>) wurde mit  $L_{117^*}$  im Verhältnis 1:100 bei 44,7°C für 2 h inkubiert. Der Komplex wurde durch dreimaliges Zentrifugieren von überflüssigem Linker gereinigt. Ein 19329 bp langes Fragment (0,156 pmol) aus dem Verdau von *I*-DNA mit *Eco*130 *I* wurde wie im Schema 2.3.c abgebildet damit im Verhältnis 1:3 bei 40,6°C für 2 h hybridisiert. Das Produkt wurde auf Chips der Klasse 1 immobilisiert (nach 2.2.3.6) und mit dem AFM charakterisiert.

#### Sequenzspezifische Markierung des DNA-Stranges

Eine sequenzspezifische Markierung durch partielle Duplexbindung wurde mit der *I*-DNA nach dem Schema 2.4.a durchgeführt. 1 µl *I*-DNA Stammlösung (18 amol Enden) wurde linearisiert und mit 30 µl  $S_3$ -30 nm-Komplex (1 OD<sub>525</sub>, ~10 amol) versetzt. Nach einer 10 minütigen Denaturierungsphase bei 90°C kühlte der Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur ab. Nach der Markierung wurden die Proben durch Zentrifugieren (2.2.2) gereinigt, mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und auf Chips der Klasse 1 aufgetragen. Die Proben wurden mit dem AFM charakterisiert.

#### Direktmarkierung von DNA

12 kb PCR-Produkt wurde mit 5'-thiolisiertem antisense Primer hergestellt (Hegner et al. 1993). Der Ansatz (mit einer Konzentration von ca. 320 ng/µl, ungereinigt) wurde mit 30 nm kolloidaler Goldlösung wie im Schema 2.4.b endmarkiert. Der Prozess war vergleichbar mit dem Prozess in 2.2.2.1.



300  $\mu\text{l}$  Kolloidlösung (1 OD<sub>525</sub>) wurde mit 30  $\mu\text{l}$  gereinigtem PCR Ansatz 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Beim Versalzungsschritt wurde ein Zehntel des Ansatzes auf Salzempfindlichkeit geprüft. Nach 48 h wurde der Ansatz mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt, 5 min auf Chips der Klasse 1 immobilisiert, gestreckt, gewaschen und mit dem Rasterkraftmikroskop charakterisiert.

### 2.2.4.3 Immobilisierung von DNA-Nanopartikel-Komplexen = Nanopartikel-Markierung von Biochips

DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden auf der Chipoberfläche durch Hybridisierungsschritte verknüpft (Liste der Proben und Probenreihen in Tabelle 8). Die so erzeugte, mehr oder weniger geschlossene Schicht der Nanopartikel auf der Oberfläche bildet einen sog. kolloidalen Metall-Film (CMF).

Pr.Nr./R.	Hybridisierungsschema	Hybridisierungsweg	T <sub>hyb1</sub>	T <sub>hyb2</sub>
1	1.1.a	S <sub>2</sub> +S <sub>1</sub> -30nm	-	49,7
2	1.2.a	(S <sub>2</sub> + L <sub>17'</sub> ) + S <sub>7</sub> -30 nm	72,6	59,8
3	1.2.a	S <sub>2</sub> + (L <sub>17'</sub> + S <sub>7</sub> -30 nm)	68	49,7
4	1.2.a/b	(S <sub>2</sub> /S <sub>2nc</sub> + L <sub>17'</sub> ) + S <sub>7</sub> -30 nm	72,6	59,8
5	1.2.a/c	(S <sub>2</sub> + L <sub>17'</sub> /L <sub>nc</sub> ) + S <sub>7</sub> -30 nm	72,6	59,8
6	1.3	(S <sub>2</sub> + L <sub>117'</sub> ) + S <sub>7</sub> -30 nm	72,6	59,8
7	1.3	S <sub>2</sub> + (L <sub>117'</sub> + S <sub>7</sub> -30 nm)	68	49,7
8	1.4	(S <sub>2</sub> + L <sub>117'</sub> + L <sub>k'</sub> ) + S <sub>7</sub> -30 nm	72,6	59,8
9	1.5.a	(S <sub>7</sub> + L <sub>17'</sub> )+ S <sub>2</sub> -30 nm	81,6	49,7
10	1.5.a/b	(S <sub>7</sub> /S <sub>150</sub> + L <sub>17'</sub> )+ S <sub>2</sub> -30 nm	81,6	HT 2
11	1.6	(S <sub>7</sub> + L <sub>117'</sub> )+ S <sub>2</sub> -30 nm	81,6	49,7
K <sub>0</sub>	1.1.a, ohne SAM	∅ + 30 nm	HT 2	
K <sub>1</sub>	1.1.a	S <sub>2</sub> + 30 nm	HT 2	
K <sub>2</sub>	1.1.a, ohne SAM	∅ + S <sub>1</sub> -30 nm	HT 2	
K <sub>3</sub>	1.1.a	S <sub>2</sub> + S <sub>3</sub> -30 nm	HT 2	

**Tabelle 8:** Hybridisierungsschritte der Probentypen zur Immobilisierung von DNA-Nanopartikel-Komplexen. **S<sub>2</sub>-30 nm** und **S<sub>7</sub>-30 nm** sind S<sub>2</sub> und S<sub>7</sub> funktionalisierte 30 nm kolloidale Goldlösungen (auch Nanopartikelsonde genannt). Die Prozesse wurden als Zweischrittprozess realisiert. Die erste Schritt wurde jeweils geklammert. **Pr.Nr./R.:** Probennummer/Probenreihe; **K:** Kontroll Proben; **HT 2:** Hybridisierungstyp 2.

Diese Reaktion, welche sich auch als Markierung eignet, wurde auf Affinität, Signal-Kontrast-Verhältnis, Sequenzspezifität und Empfindlichkeit untersucht.

Die Quantifizierung der Signalstärke der Nanopartikel-Markierung mit variablen Kontrollen (auf drei Ebenen: SAM-Ebene, Linkerebene, Markierungsebene) wurde bei den Chips der Klassen 2, 3, 7 und 9 durchgeführt. Diese boten eine homogene Oberfläche mit verschiedenen Rauigkeitsstufen. Die erzeugten Proben wurden einer mikroskopischen, einer REM- und einer AFM-Charakterisierung unterzogen. Bei der rasterkraftmikroskopischen Charakterisierung wurden die Partikeldichten der Proben ermittelt. Die Kalkulation des Mittelwertes der pro Flächeneinheit immobilisierten Partikel erfolgte aus den handermittelten Werten von 16 Quadraten (jeweils 1 x 1  $\mu\text{m}$ ). Stark verschmutzte oder nicht homogene Quadrate wurden dabei in der Regel ersetzt oder nicht berücksichtigt.

Die theoretisch maximale Bedeckungsdichte ( $\tilde{A}_{\max}$ ) innerhalb eines kolloidalen Metall-Filmes (CMF) kann aus der Geometrie der Objekte abgeleitet werden (Werte für  $\tilde{A}$  in Tabelle 9). Randbedingungen dafür sind eine homogene Verteilung der Partikel, und wie bei den SAMs, eine glatte und unendliche Fläche. Bei der dichtesten Anordnung ordnen sich die Kugeln hexagonal an. Dabei füllen sie 90,7% ( $\pi/2\sqrt{3}$ ) der gegebenen Oberfläche aus (korrigierte Partikeldichte).

	15 nm Ø	30 nm Ø	60 nm Ø
<b>theoretischer Platzbedarf</b>	177 nm <sup>2</sup>	707 nm <sup>2</sup>	2827 nm <sup>2</sup>
<b>Partikel/cm<sup>2</sup></b>	5,66 x 10 <sup>11</sup>	1,41 x 10 <sup>11</sup>	3,54 x 10 <sup>10</sup>
<b>Partikel/cm<sup>2</sup>, korrigiert</b>	5,13 x 10 <sup>11</sup>	1,28 x 10 <sup>11</sup>	3,2 x 10 <sup>10</sup>
<b>Partikel/µm<sup>2</sup>, korrigiert</b>	5133	1283	321

**Tabelle 9:** Theoretisch ermittelte Werte für  $\tilde{A}_{\max}$  der CMFs aus Gold-Nanopartikeln.

Der theoretisch ermittelte  $\tilde{A}_{\max}$  entspricht demjenigen Wert, welcher maximal möglich wäre, wenn man die Bindung auf die Oligonukleotid-SAMs nicht berücksichtigt.

### Signal-Rausch-Verhältnis

Für die Bestimmung der Qualität eines Nanopartikelsignals eines markierten Chips wurden die Bereiche innerhalb und außerhalb der Tropfeninkubation untersucht. Für die Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses innerhalb einer Messreihe wurden komplette Proben parallel inkubiert und charakterisiert. In beiden Fällen wurden als Kontrolle reine Goldoberflächen, passivierte Oberflächen und die Markierungseffizienz auf nichtkomplementären Oligonukleotid-SAMs als Vergleich herangezogen.

### Abhängigkeit des Signals von der Bindegruppendichte auf der Ebene der SAM

Für die Quantifizierung der Abhängigkeit der Signalstärke von der SAM-Dichte wurde der Funktionalisierungsschritt mit einer Mischung aus zwei Thiol-Oligonukleotiden durchgeführt. Um einen größeren Konzentrationsbereich zu charakterisieren, wurde in der Mischung eine logarithmische Verdünnungsreihe verwendet.

*Probenreihe 10:* Schemata 1.5.a und b. Die Chipoberflächen wurden mit einem S<sub>7</sub>/S<sub>150</sub> Gemisch (1 µM in 1 M KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)-Puffer, pH 3,8) für 48 h bei 4°C funktionalisiert. Der Linker wurde während einer 180 minütigen Inkubation bei 81,6°C auf den SAM hybridisiert. Der Markierungsschritt erfolgte nach dem Hybridisierungstyp 2 mit einer Ausgangstemperatur von 65°C.

*Probenreihe 4:* Schemata 1.2.a und b. Frisch abgespaltene und aufgereinigte S<sub>2</sub> und S<sub>2nc</sub> (siehe 2.2.1.4) wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen (0-100% S<sub>2</sub> in S<sub>2nc</sub>, Endkonzentration 1 µM) auf die Chip-Oberfläche inkubiert. Die Nanopartikel-Markierung erfolgte in zwei Stufen. In der ersten Stufe wurde der L<sub>17\*</sub> Linker (1 µM in 1M Natriumchlorid/TE, pH 7,0) bei 72,6°C für 180 min hybridisiert. Die mit Nanopartikeln markierte Sonde (2 OD<sub>525</sub> S<sub>7</sub>-30 nm in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0) wurde bei allen Proben vergleichbar nach dem Hybridisierungstyp 1 bei 59,8°C für 180 min immobilisiert.

### Quantifizierung des Signals auf der Linkerebene

*Probenreihe 5:* Die Proben wurden nach den Hybridisierungsschemata 1.2.a und b behandelt. Die Stärke des Signals wurde auf der Linkerebene über die Mischung der komplementären und nichtkomplementären Linkersequenzen ( $L_{17^*}/L_{nc}$ ) im ersten Hybridisierungsschritt eingestellt. Das Linkergemisch (1  $\mu$ M in 1M Natriumchlorid/TE, pH 7,0) wurde bei 72,6°C für 180 min auf die Chips immobilisiert. Die Markierung mit 2 OD<sub>525</sub> S<sub>7-30</sub> nm in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) erfolgte nach dem Hybridisierungstyp 1 bei 59,8°C für 180 min.

### Quantifizierung des Signals auf der Markierungsebene

*Probenreihe 1:* In den Vorversuchen wurden nach dem Hybridisierungsschema 1.1.a Verdünnungsreihen in relativ hohen Konzentrationsbereichen (OD<sub>525</sub> 1-5) durchgeführt. Bei der parallelen Untersuchung des Einsatzes unterschiedlicher Sondenkonzentrationen wurde der Hybridisierungstyp 2 angewendet.

*Probenreihe 2:* Die Herstellung der eigentlichen Proben erfolgte nach dem Hybridisierungsschema 1.2.a. Die verwendete Konzentration der Sonden lag zwischen 0,01 und 3,0 OD<sub>525</sub>. Die Hybridisierung erfolgte auch hier nach dem Hybridisierungstyp 2.

### Reversibilität der Nanopartikel-Markierung

Für die Applikation der Nanopartikel-Markierung bestand die Frage nach der Umkehrbarkeit des Prozesses. Um diese Reversibilität zu überprüfen, wurden Proben bei 85°C für 2 h, mit 10% SDS bei Raumtemperatur für 1-2 h, oder eingetrocknete Proben mit 10% SDS bei 95°C für 1-2 h inkubiert.

### Adressierte Affinitätsimmobilisierung der Komplexe auf Gold-Mikrostrukturen

Durch Verwendung mikrostrukturierter Substrate sollte eine adressierte Immobilisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe in dem durch Passivierung geschützten Elektrodenspalt verhindert werden.

*Probenreihe 1:* Chips der Klasse 10 wurden, wie im Hybridisierungsschema 1.1.b dargestellt, behandelt. Nach der Funktionalisierung der Oberflächen mit S<sub>1</sub> wurde S<sub>2</sub>-60nm Komplex (ca. 1 OD in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0) nach dem Hybridisierungstyp 2 inkubiert. Anschließend wurde die Partikelanzahl pro Flächeneinheit auf den Elektroden und im Spalt ermittelt (siehe Charakterisierung).

Komponente	Proben Nr.				
	1	2	3	4	5
1 $\mu$ M S <sub>2</sub> immobilisiert	+	+			
1 mM MCH	+				
2 mM Cysteamin (Wirde et al. 1999)		+	+	+	
1 $\mu$ M L <sub>17*</sub> in 1M Natriumchlorid/TE pH 7,0	+	+	+		
2 OD S <sub>7-30</sub> nm in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer pH 7,0	+	+	+	+	+

**Tabelle 10:** Eigenschaften der Proben aus der Probenreihe 2.

*Probenreihe 2:* Proben der Chip-Klasse 12 wurden im zweistufigen Prozess des Hybridisierungsschemas 1.2.a markiert. Bei diesem Versuch wurde auch ein Vergleich von Mischschichten

aus zwei verschiedenen Alkanthiolen und dem Thiol-Oligonukleotid auf ihre Affinität zum Nanopartikel-Komplex vorgenommen. Tabelle 10 zeigt die Eigenschaften der Proben.

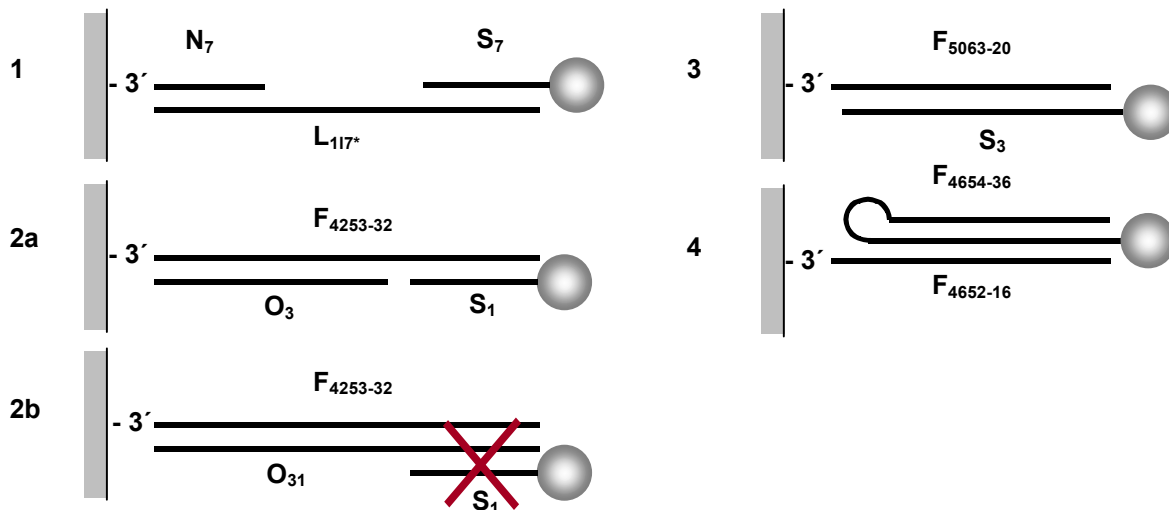
Die Hybridisierungstemperaturen betragen beim Linker 72,6°C für 120 min und für die Markierung 58,7°C für 120 min.

#### *Elektrische Hybridisierung - Probenreihe 1:*

Chips der Klasse 11 wurden mit S<sub>2</sub> (1 µM) funktionalisiert (Schema 1.1.b). Die Elektroden wurden mit einer Spannungsquelle (*SourceMeter 2400*) verbunden. Ein Tropfen S<sub>1</sub>-30 nm-Komplex (2 µl) wurde so über dem Elektrodenspalt plaziert, dass eine leitfähige Brücke entstand. Anschließend wurde eine konstante Stromstärke von 100 nA zwischen den Elektroden angelegt. Die Veränderungen wurden optisch mit einem Mikroskop verfolgt und nach dem Waschen und Trocknen der Proben auch rasterkraftmikroskopisch ausgewertet.

### 2.2.5 APPLIKATIONEN DER NANOPARTIKEL-MARKIERUNG

Für das Modellsystem einer Biochip-Markierung wurden hauptsächlich Chips der Klassen 4, 5 und 6 (2.1.1) verwendet. Die Oligonukleotid-SAMs wurden entweder auf Mikrochemotopen mit "on-chip"-Synthese erzeugt oder lagen unstrukturiert vor. Die Markierung wurde mit DNA-Nanopartikel-Komplexen ("Sonde" = Nanopartikel-markiertes Oligonukleotid, z.B. "S<sub>1</sub>-30 nm") vorgenommen. Die gebundenen Komplexe wurden anschließend sowohl rasterkraftmikroskopisch als auch mit optischer Mikroskopie ausgewertet.



**Abb. 17:** Hybridisierungsschema 3 - Nanopartikel-Applikationen für Biochips. 1: Für die Ermittlung der optischen Eigenschaften und Nachweisgrenzen der Nanopartikel-Markierung und für den Einzelpartikelnachweis angewendetes Hybridisierungsschema. 2: Schema der Proben der Linkerebene. 3: Schema für die Oberflächen- und die Markierungsebene. 4: Hybridisierungsschema für die Markierung durch Triplexbildung.

#### 2.2.5.1 Nanopartikel-Markierung von Mikrochemotopen

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des Signals von den einzelnen Quantifizierungsebenen wurde nach den Schemata 3.2a/b und 3.3 durchgeführt.

##### **Signal-Rausch-Verhältnis**

Die Stärke des Signals bei der Markierung wurde über die Bestimmung der Partikelanzahl pro Flächeneinheit auf den Mikrostrukturen mit SAMs ermittelt. Der Hintergrund wurde zwischen den

Mikrochemotopen gemessen. Für die einzelnen Proben wurde aus diesen Werten das Signal-Rausch-Verhältnis berechnet.

### **Signalstärke in Abhängigkeit von der Bindegruppendichte an Oberflächen**

Die Dichte der bindefähigen Funktionsgruppen wurde mit einer definierten Mischung aus Ethylen-glykol und Ethanol eingestellt. Danach wurden die Oligonukleotid-SAMs, nach der Festphasen-Phosphoramidit-Methode, im Synthetiser erzeugt. Die Markierung wurde wie im Hybridisierungsschema 3.3 mit 2 OD<sub>525</sub> S<sub>3</sub>-30 nm in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) nach dem Hybridisierungstyp 2 durchgeführt.

### **Verdünnung auf Linkerebene**

Die Festlegung der Signalstärke erfolgte in diesem Fall auf der Stufe des Linkers (Schemata 3.2.a und b). Eine komplementäre unkonjugierte Sequenz (O<sub>31</sub>) sollte die Markierung mit Nanopartikel-Komplex verhindern, wohingegen eine andere Sequenz (O<sub>3</sub>) die Hybridisierung des Komplexes ermöglichen sollte. Unterschiedliche Mischungen beider Oligonukleotide (insgesamt 1 µM in 1M Natriumchlorid/TE, pH 7,0) wurden im ersten Hybridisierungsschritt 90 min bei 79°C auf dem Chip immobilisiert. Nach einem schrittweisen Umpuffern wurden die Chips in einer zweiten Stufe mit S<sub>1</sub>-30 nm (2 OD<sub>525</sub> in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0) für 3 h bei 45°C hybridisiert.

### **Signalstärke in Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration**

Die Chips wurden vergleichbar zum Hybridisierungsschema 3.3 mit verschiedenen Konzentrationen (OD<sub>525</sub> 0,5/1,0/2,0) von S<sub>3</sub>-30 nm in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 nach dem Hybridisierungstyp 2 inkubiert.

#### **2.2.5.2 Bestimmung der optischen Nachweisgrenzen der Nanopartikel-Markierung**

Für die Ermittlung der optischen Eigenschaften und Nachweisgrenzen der Nanopartikel-Markierung als Biochip-Marker wurden die Chip-Klassen 4 und 5 eingesetzt. Zur Verstärkung des optischen Signals wurde die Silberabscheidung wie in Punkt 2.2.2.3 beschrieben durchgeführt.

### **Empfindlichkeit des optischen Nachweises**

Für die Reaktion wurde vorgereinigtes Glassubstrat (Chip-Klasse 5) nach der im Punkt 3.1.1 beschriebenen Methode mit APTES modifiziert. 3'- oder 5'-aminomodifizierte Oligonukleotide (2 mM in 100 mM Natrium-Hydrogenkarbonat, pH 8,0) wurden in der Feuchtkammer auf die Proben aufgetragen und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach diesem Immobilisierungsschritt wurden die Proben einmal mit 1% Ammoniaklösung und dreimal mit Wasser gewaschen und getrocknet.

In einer ersten Hybridisierungsreaktion erfolgte das Anknüpfen der Linkersequenz (siehe Hybridisierungsschema 3.1). Dazu erfolgte eine Inkubation mit Linker (1 µM in 1 M Natriumchlorid/TE Puffer, pH 7,0) für 10 Minuten bei 72°C und anschließendes langsames Abkühlen auf 52°C. Die ungebundenen Linker wurden mit der Waschalternative 1 (siehe Punkt 2.2.3.1) entfernt.

Zur Markierung der Proben-Oligonukleotide wurde für die komplementären 30 nm Goldsonden der Konzentrationsbereich zwischen 0,0001 und 0,5 OD<sub>525</sub> gewählt. Durch eine solche Verdünnung sollte eine möglichst geringe Bedeckungsdichte erzielt werden, um so die unteren Grenzen eines

optischen Nachweises austesten zu können. Die zweite Hybridisierungsreaktion wurde mit einer 20-minütigen Inkubation bei 52°C eingeleitet, welcher eine langsame Abkühlung über Nacht folgte. Nach der Reaktion wurden die Proben wie im Punkt 2.2.3.1 gespült.

Die getrockneten Chips wurden nach der mikroskopischen Kontrolle in der Mitte mit einem Filzstiftkreuz markiert. Dieses Kreuz diente als Justierpunkt auf der Probe. Die rasterkraftmikroskopische Charakterisierung der Proben erfolgte links vom Kreuz, jeweils mit einer Übersichtsaufnahme und einer Detailaufnahme für die Quantifizierung der Sonden. Die optische Auswertung erfolgte mikroskopisch ebenfalls links vom Kreuz, so dass dieses nicht mehr im Blickfeld war. Die Silberverstärkung wurde anschließend nach 2.2.2.3 für 2 bis 5 min durchgeführt. Dieser folgte eine erneute optische Auswertung. Für die Quantifizierung der Absorption mussten alle Aufnahmen die gleichen Belichtungszeiten und Belichtungsstärken aufweisen.

#### **Nachweis einzelner Bindeereignisse - Einzelpartikelnachweis**

Für die Vorversuche zum Einzelnachweis der Nanopartikel-Markierung wurde eine unspezifische Immobilisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe durchgeführt. Unmodifizierte Oligonukleotide wurden auf vorgereinigtes Glassubstrat der Chip-Klasse 4 in verschiedenen Zeitregimes aufgebracht. Dieser Immobilisierungsweg basiert auf der hohen unspezifischen Adsorption der Nukleinsäuren auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen, welche schon in den Vorversuchen (Fritzsche et al. 1999) nachgewiesen werden konnte. Es wurde eine relativ niedrige Konzentration der Sonde (~ 0,2 OD<sub>525</sub>) von 10 min bis 72 h bei Raumtemperatur auf den Proben inkubiert, mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Eine Markierung mit Filzstiftkreuz erfolgte, ähnlich wie oben, zum Wiederfinden einzelner Sonden vor und nach der Signalverstärkung. Nach der optischen und rasterkraftmikroskopischen Kontrolle wurden diejenigen Proben mit einer relativ geringen Menge an gebundenen Nanopartikeln ausgewählt. An charakteristischen Stellen (nahe der Kreuzmarkierung) wurden mehrere Übersichts- und Detailaufnahmen mit dem 50-er und 100-er Objektiv, sowie mit dem AFM angefertigt. Nach der Silberverstärkung wurden die selben Stellen erneut aufgenommen.

Zum Nachweis spezifischer Bindungen von Einzelpartikeln wurde aus den im vorherigen Punkt hergestellten Proben eine mit sichtbar niedriger Bedeckungsrate ausgewählt und, wie oben beschrieben, vor und nach der Silberreaktion detailliert charakterisiert.

#### **2.2.5.3 Markierung durch Formierung von Triplexstrukturen**

Auf Chips der Klasse 6 wurde an der FSU am Institut für Virologie (Dr. Birch-Hirschfeld) mittels "on-chip"-Synthese das Oligonukleotid F<sub>4652-16</sub> aufgebaut. Komplementäre Hairpin-bildende Oligonukleotide F<sub>4654-36</sub> (Schema 3.4) wurden mit Gold-Nanopartikeln wie im Punkt 2.2.2 beschrieben markiert. Für die Kontrolluntersuchung und die Duplexbildung wurde der Hybridisierungsweg 2 gewählt. Die eigentlichen Proben wurden wie in 2.2.5.1. behandelt. Beide Proben wurden mit 100 µl F<sub>4654-36</sub>-30 nm Nanopartikel-Komplex (2 OD<sub>525</sub> in 0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0) hybridisiert, gewaschen und anschließend mit dem AFM ausgewertet.

## 2.2.6 CHARAKTERISIERUNGSMETHODEN

### 2.2.6.1 Molekularbiologische Nachweistechiken

#### Gelelektrophorese

Die Bestimmung der Fragmentgrößen nach dem Verdau oder der Konstruktbildung und die Ermittlung der Bedeckungsdichten der DNA auf Nanopartikeln wurde in Agarosegelen durchgeführt. Aus der ermittelten Laufstrecke konnte man auf die Eigenschaften, wie Molekulargewicht und Wanderungsgeschwindigkeit, schließen.

Die Konzentrationen der verwendeten Gele lagen zwischen 0,5 und 3%. Die Durchführung erfolgte nach Sambrook 1989. Bei der Auftrennung von DNA-Nanopartikel-Komplexen wurde die konzentrierte Lösung (zwischen 1 und 5 OD<sub>525</sub>) mit einer geringen Menge an GLP aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 50 oder 100 V bei einer Dimension von 12 cm (Stromstärke 80-120 mA, Feldstärke 1-6 V/cm).

Die Färbung der DNA-Banden erfolgte nach Sambrook 1989. Die Detektion erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem *EasyWin32* von Herolab. Die Länge der Nukleinsäuren wurde unter Einbeziehung eines Längenstandards aus den Laufstrecken im Gel ermittelt.

#### Silberfärbung der Gele

Diese Reaktion wurde zum Nachweis der DNA-Nanopartikel-Komplexe eingesetzt. Wegen seiner schwachen Hintergrundfärbung wurde dazu das Silberfärbungs-Kit (SEKL 15) verwendet. Initiator und Enhancer wurden in gleichen Volumina gemischt und auf die Gele gegeben. Das Blocken der Reaktion erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit mit Wasser.

### 2.2.6.2 Spektroskopie

#### UV/VIS Spektroskopie

Die Spektroskopie wurde als Standardmethode für die Konzentrationsbestimmung und auch für die Ermittlung zeitlicher Reaktionsabläufe und Schmelzkurven verwendet. Dazu wurden das Spektrophotometer *V-530* (Jasco, Maryland, MD) und der *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, NC) verwendet. Das Spektrophotometer *V-530* ist ein Zweikanal-Spektrophotometer mit temperierbarem Probenhalter für detaillierte Messungen. Das *Nanodrop ND-1000* wurde wegen seiner küvettenfreien Arbeitsweise und der geringen Messvolumina eingesetzt.

Für die Ermittlung der Konzentration der Oligonukleotidproben und der in Lösung erzeugten DNA- und DNA-Nanopartikel-Konstrukte wurde die Absorption der Proben gemessen. Als Referenz diente immer das jeweilige Lösungsmittel. Die Absorptionswerte wurden für DNA bei 260 nm und für DNA-Nanopartikel-Komplexe bei 525 nm ermittelt. Für die Nanopartikellösungen konnten die Konzentrationen aufgrund der Herstellerangaben (siehe Tabelle 6) in Molaritäten umgerechnet werden, jedoch wurde in der Arbeit meist der OD-Wert verwendet.

Für die Bestimmung und die Kontrolle der Schmelztemperaturen der Nukleinsäurekomplexe wurde die temperaturabhängige Änderung der Absorption bei 260 nm gemessen. Dazu wurden die Komponenten des Komplexes (maximal drei Sequenzen) equimolar eingesetzt. Die summarische Endkonzentration der drei Oligonukleotide lag in einem Bereich von 0,1-1,0 OD<sub>260</sub>. Nach der Ermittlung

einer theoretischen Schmelztemperatur wurden die Elemente des Komplexes miteinander gemischt, in Reaktionsgefäßen vorhybridisiert und anschließend entgast. Die darauffolgenden Schritte erfolgten im Spektrophotometer in abgedichteten Mikroküvetten. Für die vollständige Entgasung musste noch ein Aufschmelzen, Wiederabkühlen und Entgasen unter den gleichen Umständen erfolgen, damit während der Messung keine Bläschenbildung auftrat. Anschließend konnte eine Schmelzkurve aufgenommen werden (Messbereich von 30-85°C, Heizrate 2°C/min).

Die Auswertung der sigmoiden Schmelzkurven erfolgte unter Verwendung der Spektrum-Analyse-Funktionalität der Geräte-Software. Dazu musste eine Glättung der Kurve vorgenommen werden, um lokale Schwankungen zu minimieren. Die Software gibt in der ersten Näherung die Wendepunkte an.

### 2.2.6.3 Mikroskopie

#### Optische Mikroskopie

Die optischen Aufnahmen und Lichtintensitätsmessungen erfolgten mit einem Mikroskop vom Typ *Axiotech* (Zeiss, Jena) und einer CCD Kamera von Typ *Sensicam* (PCO, Kehlheim) im Auflicht- und Durchlichtmodus. Die Auswertung der Grauwertstufen wurde mit der Software *Scion Image for Windows Beta 4.0.2* (Scion Corporation, Fredrick, MD) durchgeführt. Die Grauwerte von jeweils vier, 20 x 20 Pixel großen Quadraten wurden in der Bildmitte gemessen. Im Auflichtmodus wurde die Intensität der Reflektion als Signalwert benutzt. Im Durchlichtmodus wurde als Signal der Grauwert verwendet. Die Absorptionsbestimmung erfolgte mit einem CCD-Messplatz für orts- und zeitaufgelöste Extinktionsmessungen für Chipbauelemente. Der gemessene Wellenlänge-Bereich lag zwischen 575-625 nm, als Referenz wurde Luft gemessen.

#### Rasterelektronenmikroskopie

DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden mit REM voruntersucht. Dazu wurden die Proben, entgegen den üblichen Verfahren, nicht mit Gold besputtert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem *Jeol JSM 6700 F* (Jeol, Zaventem, Belgien) und wurden anschließend in Bilddateien exportiert.

#### Rasterkraftmikroskopie

Die Charakterisierung der Oberflächentextur planarer Substrate und immobilisierter Konstrukte wurde mit dem Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscopy*, AFM, Binnig et al. 1986) durchgeführt. Dazu wurde ein *NanoScope III* mit einem *Dimension 3100* Messkopf (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) mit  $\text{Si}_3\text{N}_4$  *NCH-W* Spitzen von Nanosensors (Neuchatel, Schweiz; Spitzendurchmesser < 10 nm, Kraftkonstante der Biegearme 42 N/m) verwendet. Die Messungen erfolgten im *Tapping*-Modus nach dem Eintrocknen der Proben an Luft. Die Resonanzfrequenz der Spitze lag um 330 kHz. Die Scanrate für weiche Objekte und biologische Proben lag meist um 1,11 Hz (und mit weniger Kraft um Destruktivität zu verhindern), für Nanopartikel bei 0,5 Hz. Die Einstellung der durch die Spitze ausgeübten Kraft wurde mit dem Sollwert-Parameter der Amplitude reguliert. Die gewählte Dimension der Aufnahmen richtete sich nach dem jeweiligen Untersuchungsobjekt und erfolgte in der Regel mit der höchstmöglichen Auflösung (512 x 512 Punkte). Es wurde meist nur



---

eine Topographieaufnahme gescannt, bei schwer aufzulösenden Proben erfolgte auch eine Darstellung der Auslenkung.

Die Auswertung der Scandaten wurde mit der Software Nanoscope *SPM 442R8* (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Scandaten geglättet. Die Größe der liegenden Objekte wurde aus dem vertikalen Maß der Aufsicht bestimmt, wobei die Verfälschung der z-Werte berücksichtigt werden musste, die durch die Glättung der Scanzeilen zueinander verursacht wurde. Um diese Fehler auszuschließen, wurde für die Höhenmessung der Objekte ein Schnitt bei konstantem y-Wert angestrebt. Zur Ermittlung der Objektdichten auf der Oberfläche bei homogener Verteilung wurde die Partikelanalyse der Software benutzt.

Die Bilder wurden nach der Datenaufnahme und Teilauswertung in Bilddateien exportiert und weiterverwendet. Die jeweilige Höhenscala der Aufnahmen wurde mit *Microsoft Photoeditor* geschnitten und für die Präsentation in die Ergebnis-Bilder eingefügt, ebenso wie der Maßstab.

Bei inhomogener Verteilung der Objekte wurde für die Bestimmung der Objektdichten auch eine manuelle Auszählung durchgeführt. Dabei wurde über das Bild ein Mikrometerraster gelegt und die durchschnittliche Anzahl der Objekte pro  $\mu\text{m}^2$  ermittelt.

Die Längen von DNA-Molekülen wurden mit der Bildanalyse-Software *Scion Image for Windows Beta 4.0.2* (Scion Corporation, Fredrick, MD) ermittelt.

## **Kapitel 3**

## **ERGEBNISSE**

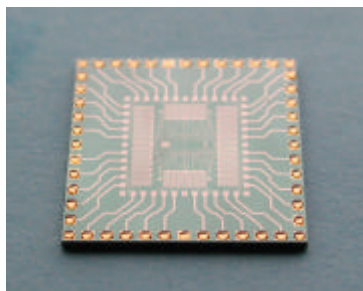
Die Entwicklung und Optimierung der Methoden der biologischen Funktionalisierung der Komponenten bilden eines der Ziele dieser Arbeit. Daher sind die in der Methodik liegende Erkenntnisse ein wesentlicher Bestandteil der Ergebnisse. Die in diesem Kapitel vorgestellten Methoden zeichnen sich im Optimierungsprozess durch ihre Reproduzierbarkeit und gutes Handling aus.

### 3.1 BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON PLANAREN OBERFLÄCHEN

Auf der Basis der erprobten Methoden für die Herstellung funktioneller Monoschichten auf Festkörperoberflächen (siehe 1.2.2) wurde eine gezielte Passivierung von Elektrodenspalt-Flächen (Siliziumoxid) und eine Funktionalisierung von Goldoberflächen mit Thiol-Oligonukleotiden durchgeführt.

#### 3.1.1 PASSIVIERUNG VON SILIZIUMOXIDOBERFLÄCHEN

Nach einer Passivierungsreaktion der nichtmetallischen Bereiche der Chip-Klassen 10-12 wurden diese hydrophob. Nach Benetzung der Chips mit wässrigen Medien blieben die Tropfen der Lösung nur auf den Elektrodenflächen haften. Die Oberflächen des Elektrodenspalts wurden gegenüber wässrigen Medien, wie z.B. Oligonukleotidlösungen, sichtbar geschützt. Dieses war eine wichtige Voraussetzung für die adressierte Immobilisierung.



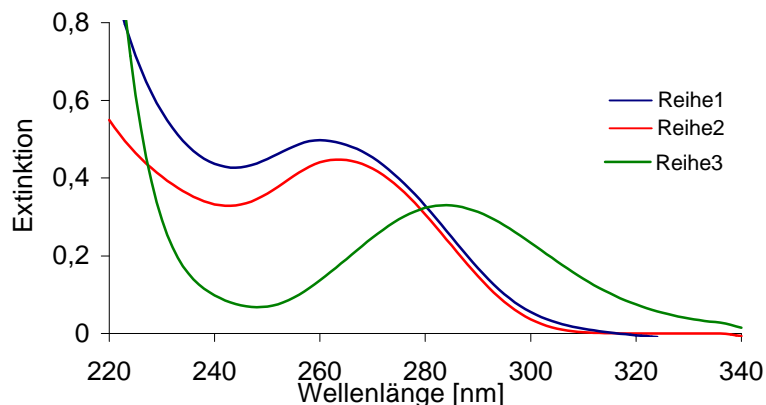
**Abb. 18:** Benetzte Probe (Chip-Klasse 12). Die Wassertropfen konzentrieren sich auf den Elektroden. Zum Zeitpunkt der Aufnahme sind aufgrund der schnellen Verdunstung nur noch die größeren Elektrodenflächen benetzt.

#### 3.1.2 FUNKTIONALISIERUNG VON GOLDOBERFLÄCHEN

##### 3.1.2.1 Aktivierung und Aufreinigung der Thiol-Oligonukleotide

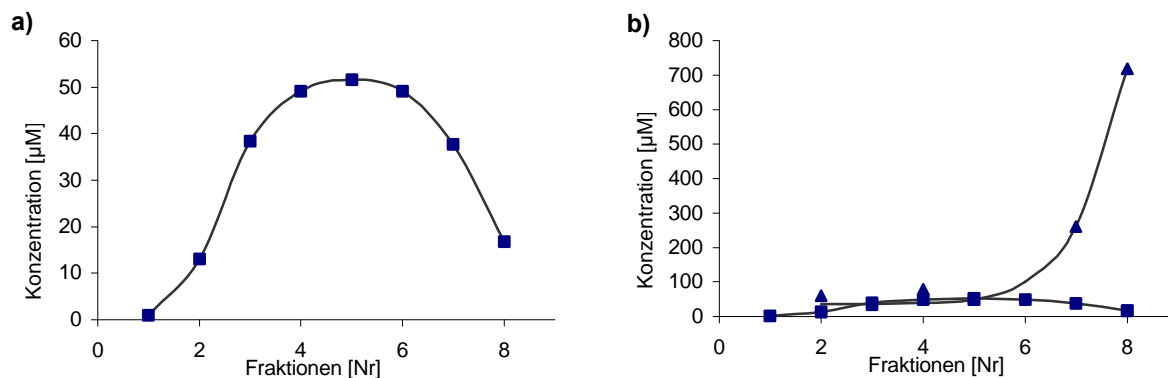
Die frisch aktivierten Oligonukleotide wurden mittels Gelfiltrationschromatographie von Salzen gereinigt. Die Absorptionsspektren der Fraktionen und die Form der Absorptionsmaxima gaben einen Hinweis auf die Reinheit der Oligonukleotide. Bei den späteren Fraktionen überlagert ein zweiter Peak, welcher vom 1,4-Dithiothreitol (DTT) stammte, denjenigen der Oligonukleotide, d.h. die Trennung der Oligonukleotide vom DTT ist bei den späteren Fraktionen unvollständig. In der Abbildung 19 sind unterschiedliche Fraktionen mit ihren Spektren gegenübergestellt. Frühe Fraktionen (gute Trennung) zeichnen sich durch einen steileren Kurvenverlauf am Maximum aus, spätere Fraktionen (mit DTT-Anteil) sind dort meist breitschultriger.

Die Aufreinigung der Oligonukleotide konnte anhand der Trennungsdiagramme (Verhältnis zwischen Konzentration und Eluationszeit) kontrolliert werden. Bei einem glockenförmigen Diagramm wurde die Trennung als gut angenommen (Abbildung 20a).



**Abb. 19:** Vergleichende Darstellung der Absorptionsspektren. **Reihe 1:** frühe Fraktion, reines Thiol-Oligonukleotid ( $Abs_{max}$ : 262 nm), **Reihe 2:** späte Fraktion, Thiol-Oligonukleotid mit DTT-Anteil ( $Abs_{max}$ : 260 nm), **Reihe 3:** reines DTT ( $Abs_{max}$ : 284 nm)

Der Thiol-Gehalt der Fraktionen wurde mit dem DTNB-Test (2.2.1.4) bestimmt. Die Konzentration entsprach nur bei den frühen Fraktionen derjenigen der Oligonukleotide. Bei späteren Fraktionen setzte sich die gesamte Thiol-Konzentration aus einem Oligonukleotid- und einem DTT-Anteil zusammen. Fraktionen ab dem zweiten Drittel der Trennung hatten sogar einen höheren Thiol-Gehalt, als aus der verwendeten Oligonukleotidkonzentration folgen würde. Dieser Fakt weist auf einen hohen DTT-Anteil hin. Da DTT in den meisten Reaktionen mit den Thiol-Oligonukleotiden konkurriert, wurden nur diejenigen Fraktionen für die Versuche verwendet, die vor dem Maximum des Trennungsdiagramms lagen.



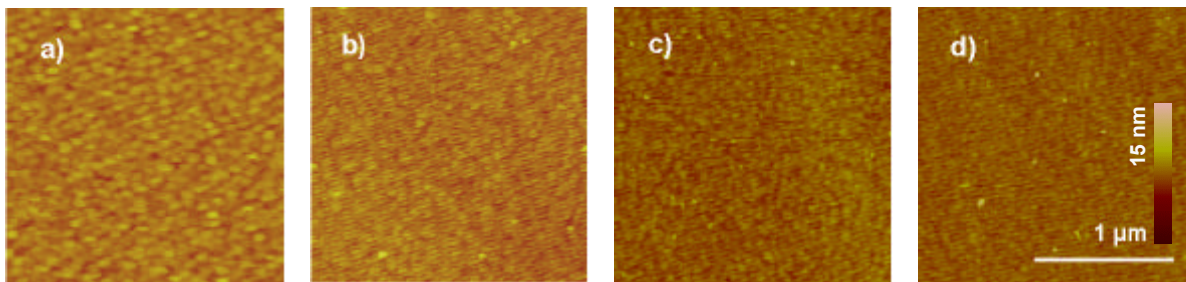
**Abb. 20:** Auftrennung der Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie, Konzentration der Oligonukleotide. Da die einzelnen Fraktionen gleiche Volumina hatten, entspricht die X-Achse der zeitliche Trennung. **a)** Oligonukleotid-Konzentration. **b)** Gesamt-Thiol-Konzentration der Fraktionen (zusammengesetzt aus der aktiven Thiolgruppe der Oligonukleotide und dem DTT-Anteil).  $\square$ : Thiol-Gehalt der Fraktionen;  $\triangle$ : Oligonukleotid-Konzentration der Fraktionen.

### 3.1.2.2 Thiol-Oligonukleotid SAMs

Durch die Herstellung von Thiol-Oligo-SAMs sollten planare Flächen biologisch funktionalisiert werden. Da in der Arbeit auf schon etablierte Methoden auf dem Gebiet der SAM-Herstellung zurückgegriffen wurde und die sehr kleinen Strukturen der Elektroden herkömmliche Methoden, wie Randwinkelmessung und Ellipsometrie, ausschlossen, wurde auf diese verzichtet. Bei der Charakterisierung der funktionalisierten Oberflächen wurde die Rasterkraftmikroskopie angewendet. Für die Ermittlung der Oberflächenbedeckung wurden außerdem indirekte Methoden, wie die Bestimmung

der Konzentration des Überstandes, verwendet. Einen Hinweis auf die Dichte der Thiol-Oligonukleotid-Schichten bot außerdem die Nanopartikel-Markierung (siehe 3.2.4.2).

Bei der AFM-Charakterisierung der Proben konnten keine Unterschiede zwischen reinen Substratoberflächen (vgl. Abbildung 21a) und mit Thiol-Oligonukleotid beladenen Flächen festgestellt werden. Selbst bei SAMs auf den Chip-Klassen 2 und 3 konnten keine deutlichen morphologischen Unterschiede zu reinen Goldoberflächen detektiert werden. Die nach DNA-Immobilisierung beobachtete Abrundung der scharfen Korngrenzen könnte aber als mikroskopischer Hinweis auf die Anwesenheit der DNA gedeutet werden (Niemeyer et al. 1999).



**Abb. 21:** AFM-Aufnahmen von reinen Goldoberflächen vor und nach der Thiol-Oligonukleotid-Modifizierung. **a)** Goldoberfläche; **b)** Goldoberfläche mit Oligonukleotid-SAM; **c)** Mischschicht; **d)** dsDNA auf Goldoberfläche.

Bei der indirekten Bestimmung der Bedeckungsdichten durch Ausmessen des Überstandes bei der Thiol-Oligonukleotid-Funktionalisierung von Proben der Chip-Klasse 9 wurde ein höherer Verbrauch gemessen als die theoretisch notwendige Konzentration. Nach den Messungen waren bei einem 12mer Oligonukleotid  $9 \times 10^{13}$  Moleküle/cm<sup>2</sup> gebunden. Dieser hohe Wert kann eine Folge von rauen Substratoberflächen (größere Oberfläche) oder unspezifischer Bindung am Reaktionsgefäß bzw. den Chip-Rückseiten sein.

### 3.2 BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN

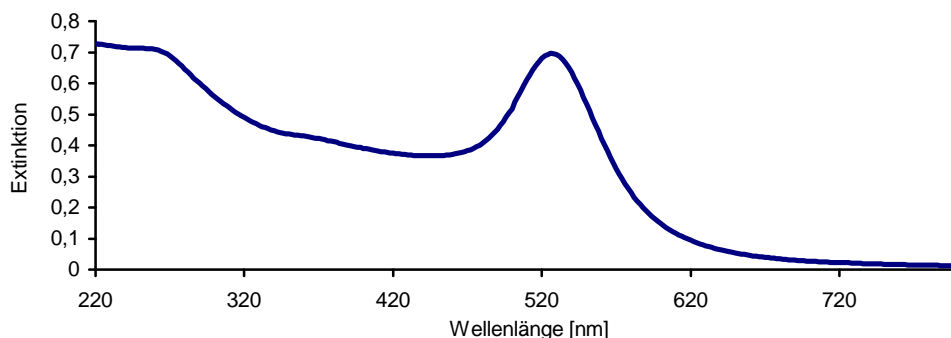
Eines der wichtigsten Elemente in der vorgeschlagenen molekularen Nanokonstruktionstechnik sind die mit Oligonukleotiden modifizierten Gold-Nanopartikel. Die Funktionalisierung der kolloidalen Gold-Lösung mit Oligonukleotiden (Konjugation) erwies sich dabei als kritischer Schritt. Es wurde eine empirische Optimierung des Herstellungsprozesses mit folgendem Resultat durchgeführt:

- In der Konjugationsreaktion wurde wegen der zu kurzen Halbwertszeit der Thiol-Gruppen unter neutralen Bedingungen immer ein Überschuss an Oligonukleotiden eingesetzt. Eine Entgasung der Thiol-Oligonukleotid-Lösungen wurde wegen der Oxidation der Thiol-Gruppen immer durchgeführt.
- Die Einsalzung wurde stufenweise durchgeführt, da ansonsten die salzempfindliche Kolloid-Lösung irreversibel koagulierte.
- Die Veränderung der Lösungsfarbe diente als Monitor des kolloidalen Zustandes.

Die Konzentration und der Zustand der fertigen DNA-Nanopartikel-Komplexe wurde spektrophotometrisch kontrolliert (Abbildung 22). Die Absorptionsmaxima der verschiedenen Proben lagen bei einem stabilen Komplex bei 525 nm (bei 30 nm Ø).

Bei der Koagulation der kolloidalen Lösung verschob sich das Maximum auf 700 nm. Die Unempfindlichkeit der Komplexe gegenüber Salzen erhöhte sich durch den Stabilisierungseffekt der Oligo-

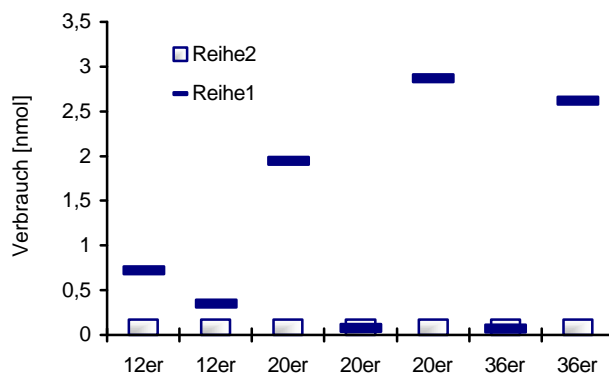
nukleotide im Vergleich zur unkonjugierten Nanopartikel-Lösung (z.B. bei 30 nm Partikeln von 0,01 M auf 0,4 M). Oberhalb eines Grenzwertes der Salzkonzentration fielen, trotz dieser Stabilisierung, die DNA-Nanopartikel-Komplexe aus. Dieser Vorgang erwies sich als irreversibel.



**Abb. 22:** Absorptionsspektrum eines DNA-Nanopartikel-Komplexes (30 nm  $\varnothing$ ).

Die Ausbeuten an Komplexen im Präparationsprozess lagen zwischen 70% und 80%. Der hohe Verlust war auf den Einsalzungsschritt und den Verlust während der Reinigung zurückzuführen.

Eine spektroskopische Ermittlung der Bedeckungsdichten der Partikel-Oberflächen mit Oligonukleotiden erwies sich als relativ schwierig. Unkonjugierte Kolloid-Lösungen zeigten eine hohe Eigenabsorption um 260 nm. Die reale Oberflächenbedeckung der Thiol-Oligonukleotide auf den Partikeloberflächen wurde aus dem Verbrauch an Oligonukleotiden des Konjugierungsansatzes ermittelt. Der Verbrauch an Oligonukleotiden für die Konjugation der 30 nm Partikel lag meist über dem theoretisch Notwendigen (Abbildung 23). So konnte keine exakte Oberflächenbedeckung mit dieser Methode ermittelt werden.



**Abb. 23:** Theoretischer (**Reihe 2:** □) und gemessener (**Reihe 1:** ▬) Verbrauch an Thiol-Oligonukleotiden während der Komplexherstellung mit 30 nm Goldpartikeln. Die ermittelten zu hohen Werte deuten auf unspezifische Bindungen der Oligonukleotide, vermutlich an den Wänden der Reaktionsgefäße.

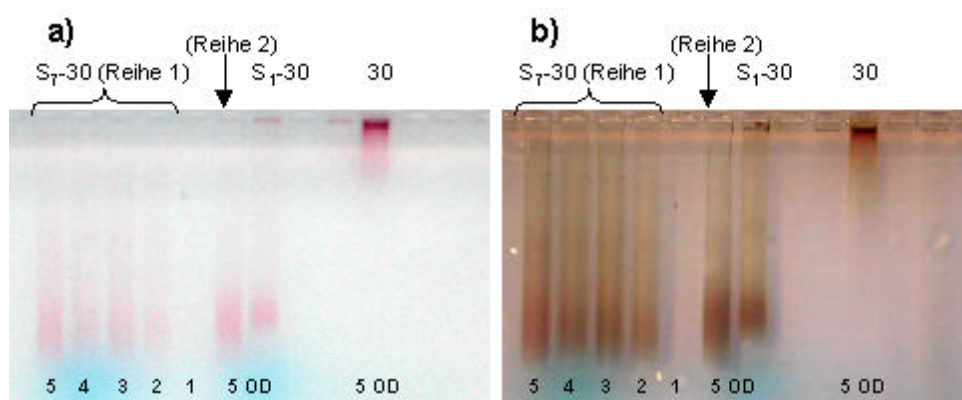
Bei Überständen mit einem Verbrauch unterhalb des theoretischen Wertes konnte der prozentuale Anteil der maximalen Bedeckungsdichte berechnet werden. Demnach wurde 42,8%, 43,9% bzw. 48,78% der maximalen Bedeckungsdichte erreicht. Die Werte waren von Ansatz zu Ansatz unterschiedlich, um daraus einen Zusammenhang, z.B. von der Länge der Oligonukleotide, ableiten zu können. Die anderen Partikelgrößen zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Stabilität der hergestellten DNA-Nanopartikel-Komplexe blieb über einen längeren Zeitraum (3 Monate bis zu 1 Jahr) erhalten. Eine Verwendung des Stabilisators SPPD bewirkte bei größeren

Nanopartikeln nur einen bedingten Stabilisierungseffekt (bei 30 nm Partikeln unterhalb 0,5 M Natriumchlorid). Eine Charakterisierung mittels stabilisierter DNA-Nanopartikel-Komplexe mit einem definierten Oligonukleotid-Nanopartikel-Verhältnis wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, ist aber für weitere Anwendungen interessant.

DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden zum Teil mit Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert (Abbildungen 24 und 25). Die Komplexe und auch die unkonjugierten Nanopartikel waren im konzentrierten Zustand sichtbar. Durch die rote Farbe konnte der Verlauf verfolgt werden. Mit einer nachträglichen Silberverstärkung der Partikel konnten auch niedrigere Konzentrationen nachgewiesen werden. Die verstärkten Banden waren dunkelgrau. Die Empfindlichkeit der Detektion der Sonden war bei ungefärbten Gelen 10 fmol, mit der Silberverstärkung ca. 5 fmol.

Konjugierte Partikel hatten gegenüber unkonjugierten Partikeln im elektrischen Feld veränderte Laufeigenschaften. Unkonjugierte kolloidale Gold-Lösung unterlag in den Gelen einer Koagulation (Salzempfindlichkeit der unkonjugierten Partikel 15 nm: 0,05 M; 30 nm: 0,01 M; 60 nm: 0,004 M). Es konnte nur eine breite Zone, mit gradueller Abflachung der Intensität vom Startpunkt aus, detektiert werden. Die Breite dieser Zone war von der Partikelgröße abhängig: kleinere Partikel hatten eine längere Koagulationszone. Konjugierte Nanopartikel bildeten in den Gelen dagegen eine deutliche Bande. Die Länge der Bande in der Laufrichtung, welche im Vergleich zu reiner DNA größer war, deutete auf eine Verteilung der Bedeckungsdichten durch Oligonukleotide auf den Nanopartikeln hin.



**Abb. 24:** Aufnahmen eines 3%-iges Agarose-Gels, vor (a) und nach (b) der Silberverstärkung. Nach der Verstärkung waren die Banden im Gel deutlicher hervorgehoben.  $S_{N_r}$ -30: DNA-Nanopartikel-Komplex. 30: unkonjugierte Nanopartikel. OD: Konzentration im Absorptionswert bei 525 nm.

zur Konjugation verwendetes Oligonukleotid	Partikelgröße	Laufstrecke
25mer	30 nm	1240 bp
12mer	30 nm	1500 bp
20mer	15 nm	484 bp

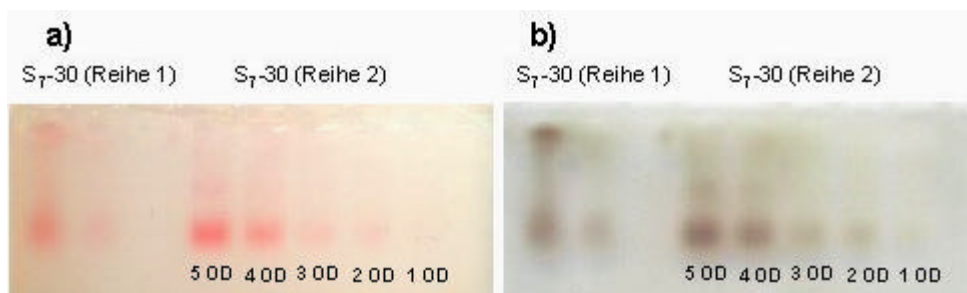
**Tabelle 11:** Ergebnisse der Charakterisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe mit Agarose-Gelelektrophorese.

Durch gelelektrophoretische Auftrennung wurden DNA-Nanopartikel-Komplexe auf ihre Masse untersucht. Die Messwerte wurden in der Mitte des Densitogramms der Bande genommen. Die er-

mittelten Laufstrecken in Bezug auf den Molekulargewichts-Standard ergaben die in Tabelle 11 aufgeführten Werte.

Desweiteren wurde geprüft, inwiefern die eingesetzte Konzentration an Konjugat sich auf die Laufeigenschaften auswirkt. Dabei konnte kein Einfluss nachgewiesen werden. Die Laufstrecken waren bei allen Konzentrationen identisch.

Ein Unterschied ergab sich beim Vergleich von DNA-Nanopartikel-Komplexen mit gleichem Oligonukleotidtyp und Partikelgröße aber verschiedenem Präparationsdatum. Bei gleichem Maximum zeichneten sich die älteren Proben (Reihe 1 in Abbildung 25) durch eine breitere Verteilung der Laufgeschwindigkeit aus.



**Abb. 25:** Aufnahmen von 3%-igem Agarose-Gel, vor (a) und nach (b) der Silberverstärkung.  $S_{Nf-30}$ : DNA-Nanopartikel-Komplex; OD: Konzentration in Absorptionswert bei 525 nm. **Reihe 1:** älterer Ansatz. **Reihe 2:** neuerer Ansatz.

Eine kürzere Dauer der Elektrophorese war für die Bandenbildung günstiger. Bei längerem Lauf waren zwar die Banden gespreizter, aber auch die Auftrennung der verschiedenen Konjugate war schlechter ausgeprägt.

### 3.3 MOLEKULARE NANOKONSTRUKTIONEN

In der Arbeit wurden mittels DNA-Techniken unterschiedliche Komponenten des Nanokonstruktionsystems zusammengeführt. Die Verknüpfung der Elemente wurde über die Hybridisierung der Affinitätsschichten realisiert. Durch die Immobilisierung der Nukleinsäuren entstanden immobilisierte DNA-Komplexe. DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden für eine positionierte Markierung von genomischen Nukleinsäuren genutzt. Durch die Immobilisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe entstanden kolloidale Metall-Filme (CMFs). Diese Immobilisierung wurde auch als alternative Markierung für Biochips im Betracht gezogen und wird im nächsten Absatz als Applikationsbeispiel behandelt.

#### 3.3.1 IMMOBILISIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE

Mit der Zusammenführung von Oligonukleotid-modifizierten Chips mit DNA bzw. DNA-Komplexen wurden die Moleküle oder Komplexe immobilisiert.

##### 3.3.1.1 Immobilisierte kurze synthetische Nukleinsäure-Komplexe

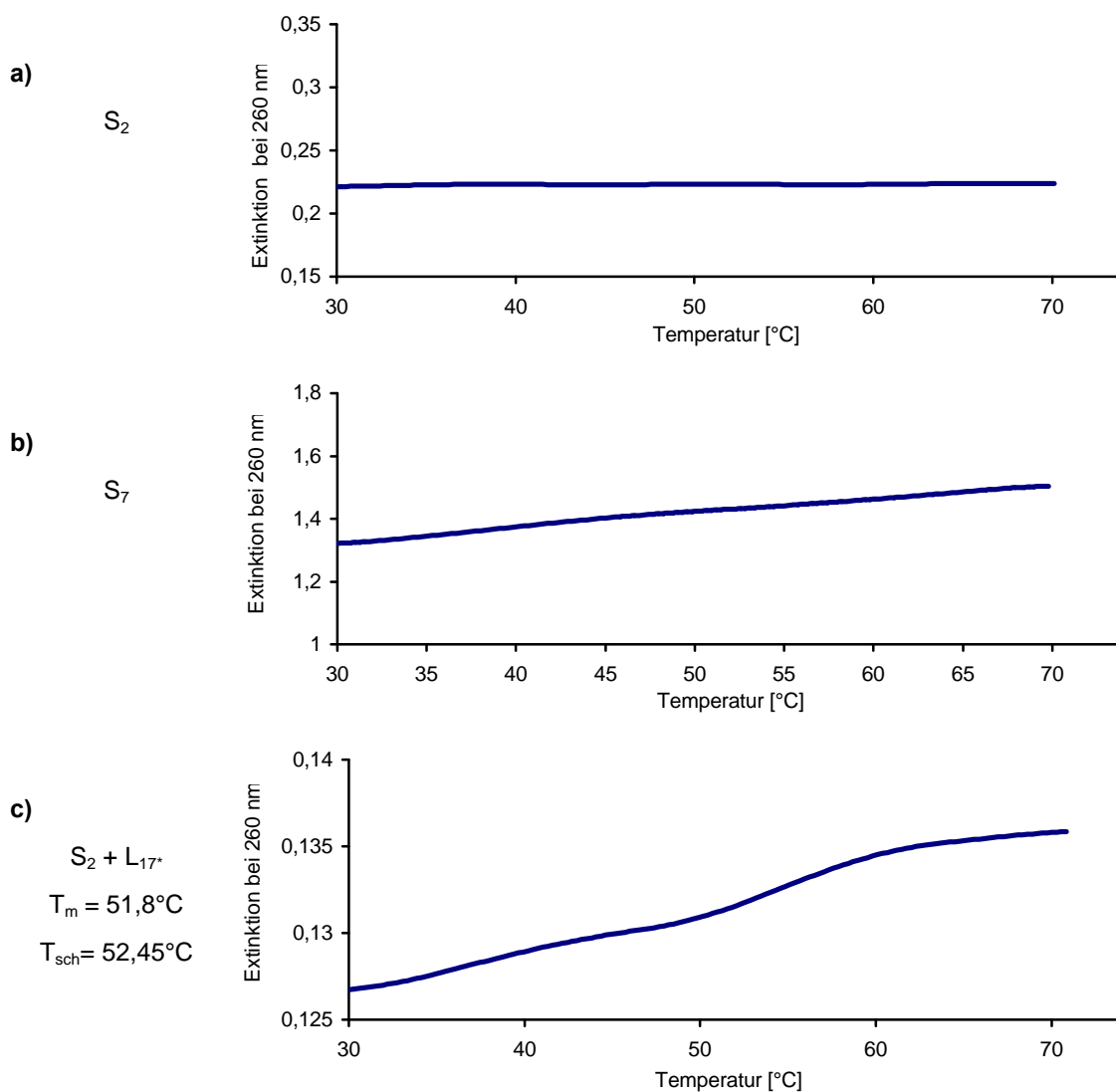
Die Hybridisierung immobilisierter Oligonukleotide konnte mit dem AFM nicht nachgewiesen werden. Es wurden nur geringfügige Unterschiede sichtbar. Darum wurden für die Charakterisierung indirekte Methoden eingesetzt.

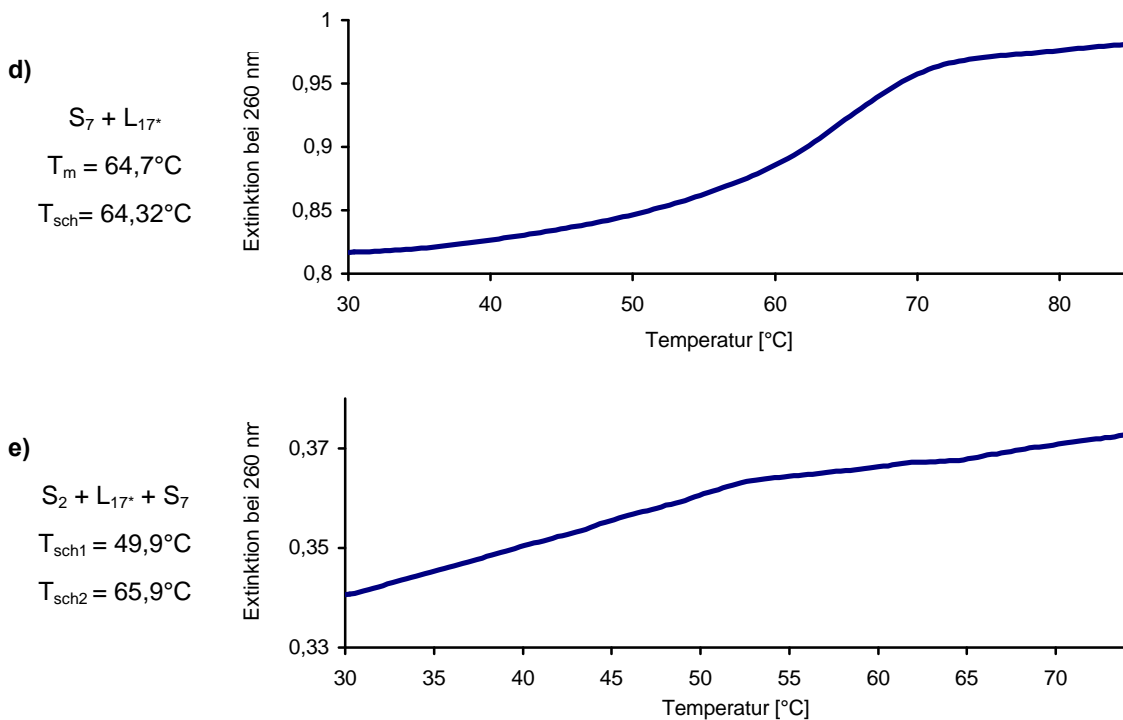


Die einzelnen Komponenten des Systems (die Oligonukleotide) wurden miteinander hybridisiert und das Produkt einer Schmelzkurvenbestimmung unterzogen. Das diente einerseits der Bestimmung der tatsächlichen Schmelztemperatur, andererseits aber auch der Kontrolle der Dimerisierung und Hairpinbildung der Oligonukleotide.

Ein Umschlagpunkt in der Schmelzkurve wies auf ein Aufschmelzen der Wasserstoffbrücken innerhalb des Moleküls hin. Der Anstieg der Extinktion bei 260 nm deutete auf einen Übergang der Strukturen von doppelsträngiger DNA zur einzelsträngigen DNA hin. Demnach sollten die Kontrollproben (Oligonukleotide alleine oder nicht komplementäre Sequenzen zusammen) keine sigmoiden Kurven haben.

Die Oligonukleotide  $S_2$ ,  $S_7$  und  $L_{17^*}$  zeigten keine Umschlagpunkte in der Schmelzkurve, was darauf hindeutet, dass keine Dimere oder Hairpinloops gebildet wurden. Für die Komplexe  $S_2$  mit  $L_{17^*}$  und  $S_7$  mit  $L_{17^*}$  ergaben sich Schmelztemperaturen von  $52,45^\circ\text{C}$  bzw.  $64,32^\circ\text{C}$ . Der komplexe Ansatz aus  $S_2$ ,  $S_7$  und  $L_{17^*}$  zeigte zwei Umschlagpunkte, jeweils in der Nähe der Schmelzpunkte von  $S_2 + L_{17^*}$  und  $S_7 + L_{17^*}$ . Dieses Ergebnis entsprach den theoretisch erwarteten. Die entsprechenden Schmelzkurven sind in Abbildung 26 dargestellt.





**Abb. 26:** Schmelzkurven der Komponenten des Hybridisierungsschemas 1.2.a. **a)** Kontrolle  $S_2$ ; **b)** Kontrolle  $S_7$ ; Diese Kontrollen zeigten zwar während der Schmelzkurven-Bestimmung keine Wendepunkte, eine kontinuierliche Zunahme der Extinktion ist aber deutlich ablesbar. Eine mögliche Ursache dafür war die Verdunstung aus dem Probenraum. **c)**  $S_2 + L_{17^*}$ ; **d)**  $S_7 + L_{17^*}$ ; **e)**  $S_2 + L_{17^*} + S_7$ .  $T_{sch}$ : ermittelte Schmelztemperatur.

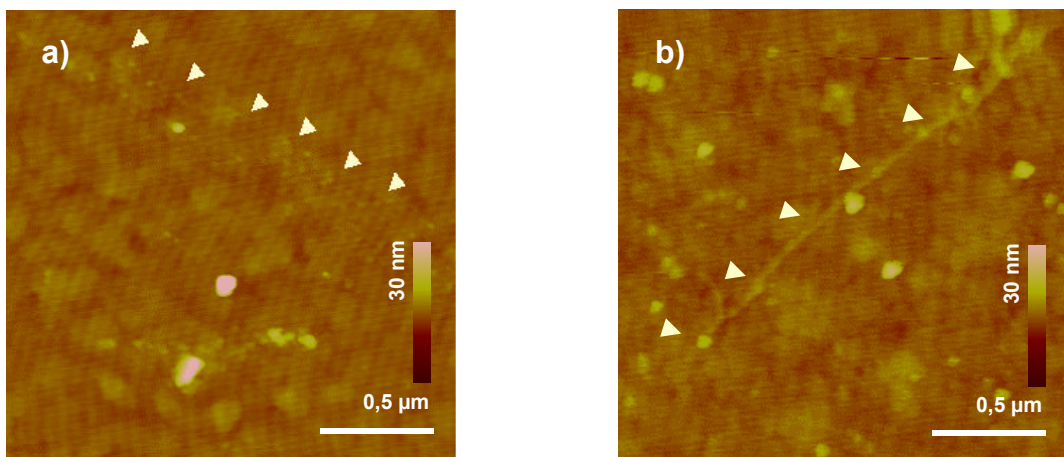
Eine Charakterisierung mittels Farbtest wurde mit der Nanopartikel-markierten Komponente des Schemas 1.2.a (Kapitel 2) durchgeführt. Dieser Versuch wird in 3.3.2.1 behandelt.

Ein dritter möglicher Charakterisierungsweg mittels Nanopartikel-Markierung der Oligonukleotid-SAMs auf den Chipoberflächen wird im Punkt 3.3.3 beschrieben.

### 3.3.1.2 Affinitätsimmobilisierung langkettiger DNA

Die Charakterisierung der mittels Hybridisierung auf Gold-Oberflächen immobilisierten langkettigen DNA zeigte nicht den erwarteten Erfolg. Bei beiden Probenreihen wurde eine über den DNA-Durchmesser hinausgehende Rauigkeit der Flächen detektiert (4,5-5 nm). Die Beschaffenheit herkömmlicher Mikroelektroden erschwert die rasterkraftmikroskopische Detektion der DNA-Moleküle (Abbildung 27a). Selbst eine Immobilisierung auf extra glatten Goldschichten (Chip-Klasse 3) zeigte keine Ergebnisse und auch die Rauigkeit der auf Glimmer gesputterten Goldschichten war noch zu hoch (1,6 nm ohne und 3,9 nm mit Haftschrift).

Bei der *Probenreihe B* (Abbildung 27b) wurden lediglich einige wenige Stellen mit Molekülen gegenüber reinen Goldoberflächen oder Thiol-Oligonukleotid-SAMs detektiert. Ihre Identifizierung war aber mit herkömmlichen Charakterisierungsmethoden nicht möglich.



**Abb. 27:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der *Probenreihe A* (a, nach Schema 2.1) und *B* (b, nach Schema 2.2). Die mit den Pfeilen markierten Stellen weisen fädige Strukturen auf.

### 3.3.1.3 Adressierte einseitige Affinitätsimmobilisierung langkettiger DNA

Die Verwendung mikrostrukturierter Substrate als statische Komponente erwies sich gegenüber den unstrukturierten Chips als vorteilhaft. Durch die Behandlung der Chips wurden die Elektroden Oligonukleotid-modifiziert. Die Siliziumoxidschicht wurde mit ODTS passiviert (2.3.2.6). Eine Immobilisierung der langen Nucleinsäuren wurde lediglich auf den Goldoberflächen erwartet.

Für die Charakterisierung wurde die Elektrodenspalte ausgewählt, weil die Elektrodenoberflächen für eine Detektion zu rau waren (siehe 3.3.1.2).

Die Immobilisierung der DNA wurde mittels Hybridisierung in verschiedenen Puffern durchgeführt. Bei höheren Salzkonzentrationen wurden im Elektrodenspalt 60-80 nm große kristalline Verunreinigungen beobachtet. Als einzige positive Probe erwies sich die Probe, welche mit 0,1 mM Natriumchlorid hergestellt wurde. Bei dieser Probe konnten die erwarteten gestreckten DNA-Moleküle beobachtet werden.

Die  $\alpha$ -DNA Moleküle sollten mit ihren  $\text{cos}_1$ -Enden einseitig an die  $\text{S}_2/\text{MCH}$  Mischschicht immobilisiert werden. Aufgrund der einseitigen Anknüpfung sollten die Moleküle, welche auf der Elektrode gebunden waren, durch die Wirkung des Durchflusses in den Elektrodenspalt gestreckt werden. Die Orientierung des in Abbildung 28c und d gezeigten detektierten Stranges entsprach annähernd dieser Richtung. Der kritische Punkt war in dieser Präparation das Entnehmen des Substrates aus der Durchflusskammer und das damit verbundene vorzeitige Austrocknen der Probe. So konnten auch eventuelle temporäre Positiv-Proben durch die Präparation als negative Proben erscheinen.

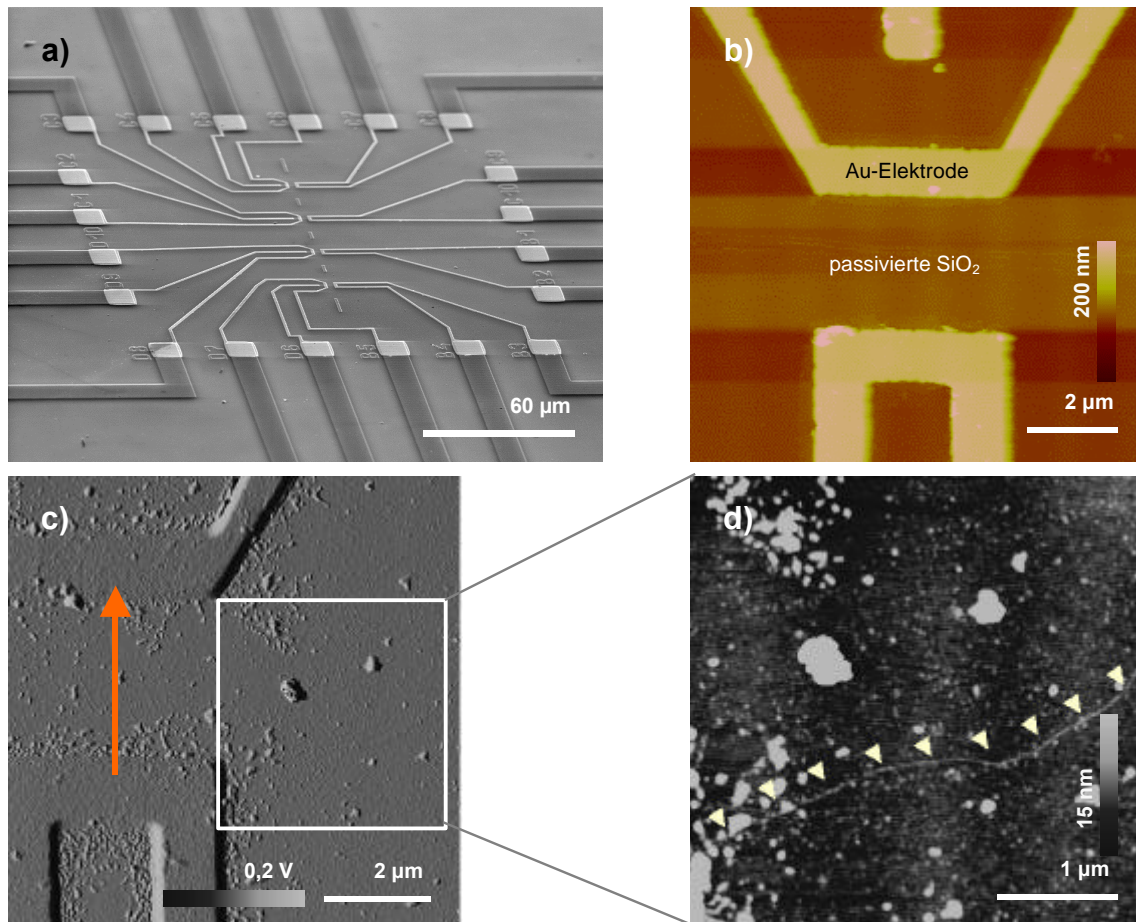
## 3.3.2 NANOPARTIKEL-MARKIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE

### 3.3.2.1 Ergebnisse des Farbtests

Dieser Test wurde als Kontrolle zur Überprüfung von spezifischen/unspezifischen Bindungen im Hybridisierungssystem angewendet. Die Erzeugung einer definierten Distanz zwischen zwei Partikeln in der kolloidalen Lösung mittels Oligonukleotidbrücke sollte veränderte Lichtemissionseigenschaften hervorrufen (Storhoff et al. 1998).

Die Nanopartikel mit Oligonukleotiden ohne Komplementarität ( $\text{S}_1 + \text{S}_7$  und  $\text{S}_2 + \text{S}_7$ ) blieben rötlich, wohingegen komplementäre Oligonukleotide ( $\text{S}_1 + \text{S}_2$ ) nach der Hybridisierungsreaktion zu der er-

warteten blau-violett Färbung der Areale führten. Die Farbveränderung deutete auf eine erfolgreiche Hybridisierung hin.



**Abb. 28:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Chip-Klasse 12 mit immobilisiertem und gestrecktem DNA-Strang nach Schema 2.1. **a)** REM-Übersichtsaufnahme des Feinelektroden-Bereiches. **b)** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Elektroden-Anordnung vor der Inkubation. **c)** AFM-Aufnahme eines auf die Elektrode immobilisierten e-DNA Moleküls. Der rote Pfeil zeigt die Fließrichtung des Waschprozesses in der Durchflußkammer. **d)** Ausschnitt aus dem Bereich c). Die gelben Pfeile zeigen auf den DNA-Strang.

### 3.3.2.2 Endmarkierung von langen DNA-Strängen

Die Detektion markierter DNA-Proben (2.2.4.3 aus Kapitel 2) erfolgte nach der Physisorption oder elektrostatischen Bindung an glatte Substratoberflächen. Dabei wurden folgende Probleme festgestellt:

- Durch die Dimension der langen Moleküle (nur ca. 1 nm Durchmesser im eingetrockneten Zustand) konnten diese relativ schwer detektiert werden.
- Die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung bei vergleichbaren Konzentrationen und Inkubationsbedingungen war niedrig.
- Bei Proben auf Chip-Klasse 1 verursachten die Magnesiumsalze ein hohes Rauschniveau.
- Die Streckung der DNA-Stränge war nicht immer vollständig.

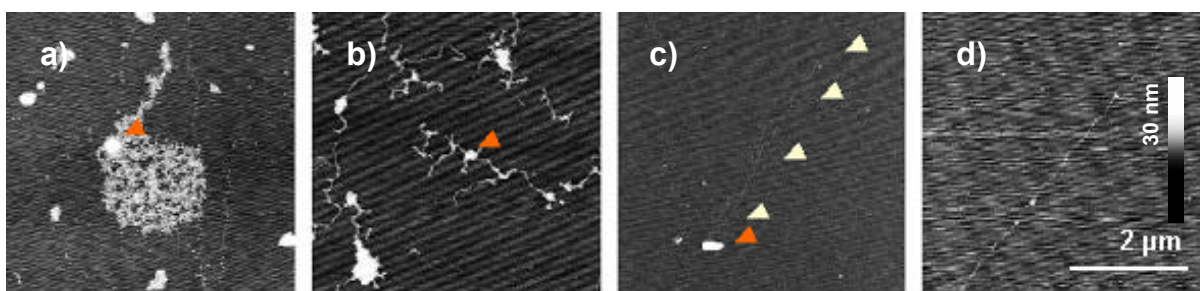
- Die Detektion Nanopartikel-markierter Moleküle war nur mit zwei verschiedenen Scanraten und Amplituden-Sollwert-Einstellungen durchführbar. Sonst wurde, anstatt eines Nanopartikels oder eines DNA-Moleküls, nur ein Artefakt sichtbar.

Trotz dieser Schwierigkeiten konnten Nanopartikel-markierte Einzelmoleküle nachgewiesen werden.

### Endmarkierung von $\epsilon$ -DNA

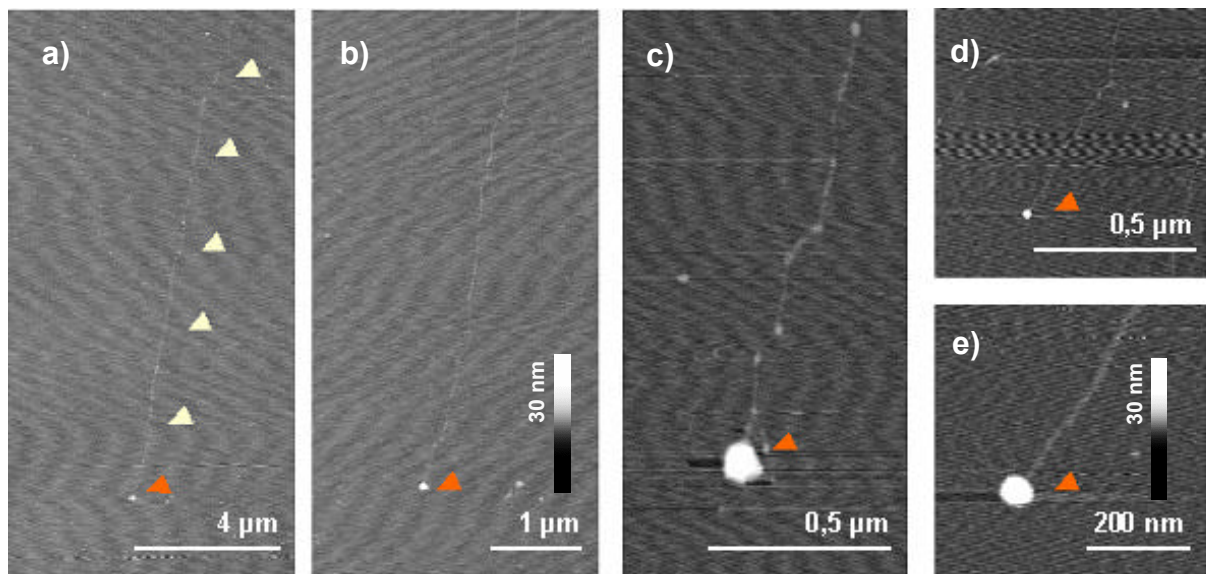
*Probe A:* Dieser Versuch lieferte unzureichende Ergebnisse für eine Markierung mit Nanopartikeln. Die Proben (Schema 2.3.a) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, eine Bande der markierten  $\epsilon$ -DNA konnte aber nicht nachgewiesen werden. Sichtbar waren nur die Sonden. Auf den immobilisierten Proben der Chip-Klasse 1 konnten ebenfalls keine Moleküle detektiert werden.

*Probe B:* Die Stabilisierung der Komplexe durch die Ligation erwies sich als eine effektive Methode zur Endmarkierung von DNA-Strängen. So wurden (nach Schema 2.3.b) viele markierte Moleküle erzeugt. In verschiedenen Zonen der Probe lagen unterschiedlich viele linearisierte Moleküle (Abbildung 29a-d). Die Zone, welche im Inkubationsbereich des Lösungstropfens lag (Abbildung 29a), zeichnete sich durch geknäulte Objekte in der Umgebung eines Nanopartikels aus. Die ermittelte Höhe der Objekte ( $0,93 \pm 0,23$  nm) lässt auf DNA schließen. In der Laufrichtung des Tropfens lagen ausgestreckte Moleküle mit endständigen Nanopartikeln (Abbildung 29c). Die Moleküle hingen in Fließrichtung an den Nanopartikeln. Schließlich folgte eine Zone unmarkierter gestreckter Moleküle (Abbildung 29d). Teilweise war die Konzentration der Moleküle so hoch, dass diese sich gegenseitig überlappten, was die Zuordnung einzelner Moleküle verhinderte.



**Abb. 29:** Nanopartikel-markierte  $\epsilon$ -DNA Moleküle (Schema 2.3.b). **a) – d)** Unterschiedliche Zonen immobilisierter Nanopartikel-markierter  $\epsilon$ -DNA Moleküle. Laufrichtung der Streckung von links nach rechts. **a)** Geknäulte DNA um einen Nanopartikel (roter Pfeil). **b)** Superspiralisierte Moleküle (roter Pfeil zeigt einen Nanopartikel). **c)** Zone der gestreckten markierten Moleküle. **d)** DNA-Moleküle ohne Markierung, gestreckt.

Der Übergang der Nanopartikel zum DNA-Strang wurde mit detaillierten Aufnahmen dokumentiert (Abbildung 30). Die maximalen Längen der Moleküle ( $14,1 \mu\text{m}$ ) entsprachen der erwarteten Dimension. Das Verhältnis der Nanopartikel zu gebundenen DNA-Molekülen war überwiegend 1:1.



**Abb. 30:** Ausgewählte  $\lambda$ -DNA Moleküle mit Nanopartikel-Markierung (Schema 2.3.b). Verschiedene Ausschnitte eines immobilisierten markierten Moleküls. **a) – c)** Molekül 1; **d) – e)** Molekül 2. Der rote Pfeil zeigt das Nanopartikel, die gelben Pfeile den DNA-Strang.

### Endmarkierung von definierten DNA-Fragmenten

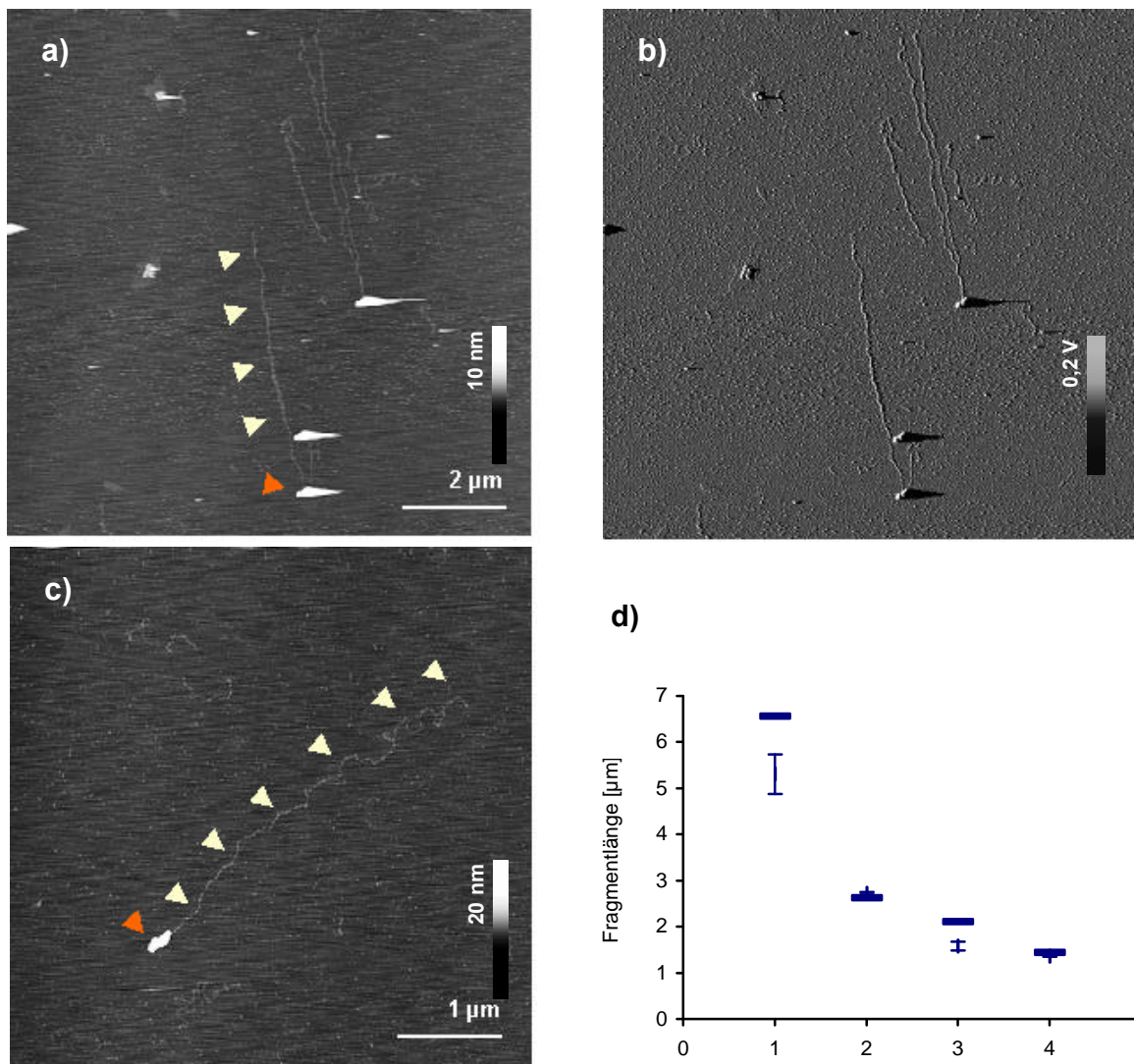
Aus dem Verdau der  $\lambda$ -DNA mit *Eco130 I* wurden die 19329 bp langen Fragmente mit  $\text{cos}_2$ -Ende endständig markiert (Schema 2.3.c). Der komplette Ansatz wurde inkubiert und auf die Oberflächen von Chips der Klasse 1 aufgetragen. Die Fragmente mit entsprechender Länge konnten detektiert werden, wobei nicht alle Moleküle die Markierung trugen (Abbildung 31a-c). Bei dieser Fragmentlänge wurden auch mehrere gebundene DNA-Stränge pro Partikel beobachtet. Es wurde aber keines der anderen Fragmente des Verdau unspezifisch markiert. Durch die Ermittlung der Längen konnten die Fragmente mit spezifischer Markierung (erwartete Länge 6,57  $\mu\text{m}$ ) von den anderen Fragmenten unterschieden werden (siehe Abbildung 31d).

#### 3.3.2.3 Sequenzspezifische Markierung des DNA-Stranges

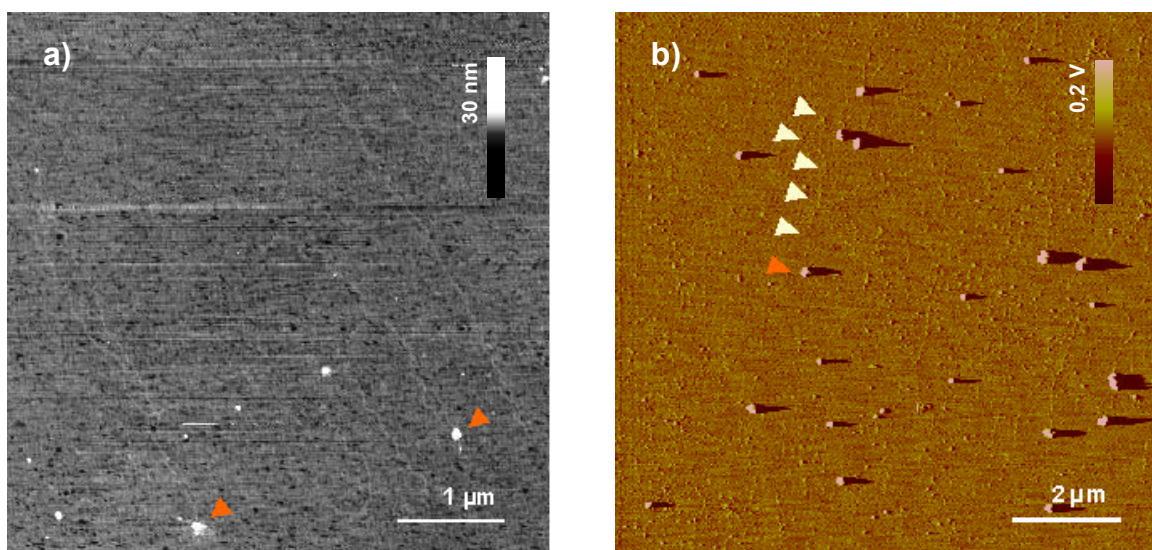
Die ausgewählte Sequenz ist 100%-ig komplementär zu einem definierten Abschnitt der  $\lambda$ -DNA (nt:26382 bis nt:26401, Schema 2.4.a). Durch die gewählten Inkubationsbedingungen sollten die  $\text{S}_3$ -funktionalisierten Nanopartikel so gebunden werden, dass zwei unterschiedlich lange Abschnitte (7,5  $\mu\text{m}$  und 8,97  $\mu\text{m}$ ) entstehen. Eine Bindung entlang der  $\lambda$ -DNA konnte nachgewiesen werden (Abbildung 32a), die genaue Position konnte jedoch nicht bestimmt werden. Durch den stark veräuschten Hintergrund der Proben wurde eine exakte Längenmessung verhindert. Die DNA-Moleküle konnten teilweise nicht deutlich genug aufgelöst werden.

#### 3.3.2.4 Direktmarkierung der DNA

Durch den Einsatz Thiol-modifizierter PCR-Primer wurden kolloidale Nanopartikel direkt an die aktiven Thiol-Gruppen langer DNA-Moleküle gebunden (Schema 2.4.b). Die DNA-Stränge lagen in Fließrichtung ausgestreckt und waren sichtbar an Nanopartikeln immobilisiert (Abbildung 32b). Pro Partikel waren bis zu zwei Stränge angebunden.



**Abb. 31:** Nanopartikel-markierte  $\epsilon$ -DNA-Fragmente (19329 bp) nach Schema 2.3.c. **a)** Topographie-Aufnahme. **b)** Amplituden-Aufnahme wie a). **c)** Topographie-Aufnahme. **d)** Vergleich der Fragmentlängen mit den theoretisch berechneten Werten. —: Theoretische Längen nach B-Konformation. —: ermittelte Werte. Fragment 1: 19329 bp. Fragment 2: 7743 bp. Fragment 3: 6223 bp. Fragment 4: 4254 bp. Der rote Pfeil zeigt das Nanopartikel, die gelben Pfeile den DNA-Strang.

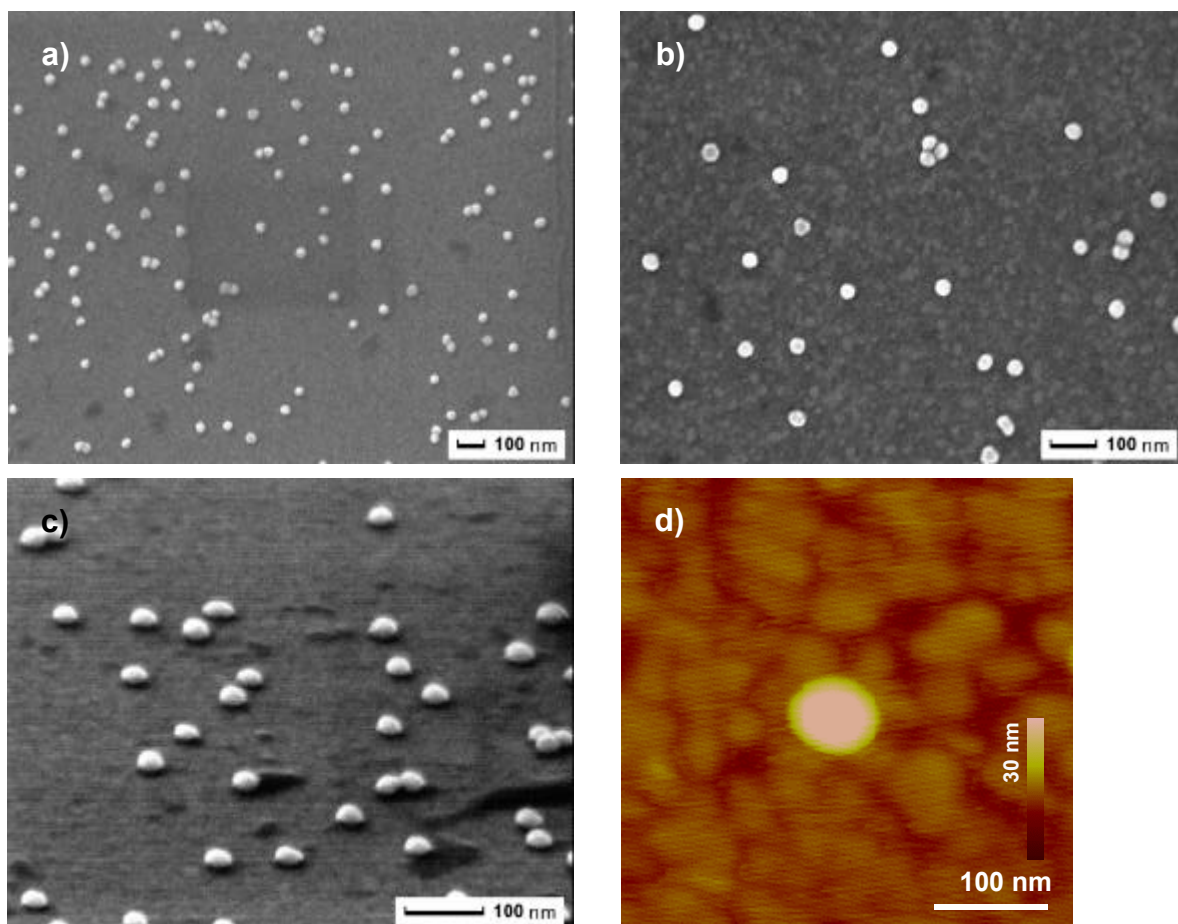


**Abb. 32:** **a)** Sequenzspezifisch-markierte  $\epsilon$ -DNA Moleküle nach Schema 2.4.a. Die Pfeile zeigen die Nanopartikel an, welche entlang des Stranges sitzen. **b)** Nanopartikel-markierte 12 kb PCR-Fragmente der  $\epsilon$ -DNA (Schema 2.4.b). Mit Pfeilen verdeutlicht wurde ein ausgewählter Strang mit Nanopartikel-Markierung.

### 3.3.3 IMMOBILISIERTE NANOPARTIKEL-KOMPLEXE – CMFs

Kolloidale Metall-Filme wurden durch Hybridisierung zwischen der Oligonukleotid-Affinitätsschicht der Nanopartikel und den Chip-Oberflächen hergestellt. Die Eigenschaften der immobilisierten DNA-Komplexe wurden mit dem Licht-, dem Rasterelektronen-, sowie dem Rastertkraftmikroskop untersucht. Die Proben erschienen bei der mikroskopischen Kontrolle als allgemein inhomogen. Darum wurden immer nur die Teile der Proben untersucht, welche eine größere Homogenität aufwiesen und möglichst auf der Probenmitte lagen.

Die scheinbare mikroskopische Inhomogenität hatte aber keinen wesentlichen Einfluss auf die Markierungsdichte. Das konnte mit REM-Übersichts-Aufnahmen bestätigt werden. Die REM-Charakterisierung zeigte eine homogene Verteilung der Nanopartikel auf größeren Bereichen der Proben. Dabei spielte es auch keine Rolle, ob die Proben im Reinraum oder im normalen Labor präpariert bzw. ob die DNA-Nanopartikel-Komplexe auf den Chip-Klassen 2 und 3 oder auf der Chip-Klasse 9 immobilisiert wurden.



**Abb. 33:** REM-Aufnahme spezifisch immobilisierter Nanopartikel. **a)** und **b)** DNA-Nanopartikel-Komplexe auf Goldoberflächen; **c)** Im Winkel zur Substratoberfläche gefertigte Aufnahme eines CMF. **d)** AFM-Aufnahme eines immobilisierten 30 nm-DNA-Nanopartikel-Komplexes auf Goldoberfläche mit Oligonukleotid-SAM.

Detaillierte rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 33a-c) präsentierten ebenfalls eine relativ homogene Verteilung individueller DNA-Nanopartikel-Komplexe auf der Probenoberfläche. Perspektivisch aufgenommene Bilder der Proben zeigten deutlich die Form der Nanopartikel und die Beschaffenheit der Oberfläche (Abbildung 33c). Mit dem Rastertkraftmikroskop waren die



gebundenen Nanopartikel auch als einzelne Objekte detektier- und quantifizierbar. Die Form und die gemessenen Größen der gebundenen Objekte entsprachen denjenigen der verwendeten Nanopartikel (Abbildung 33d).

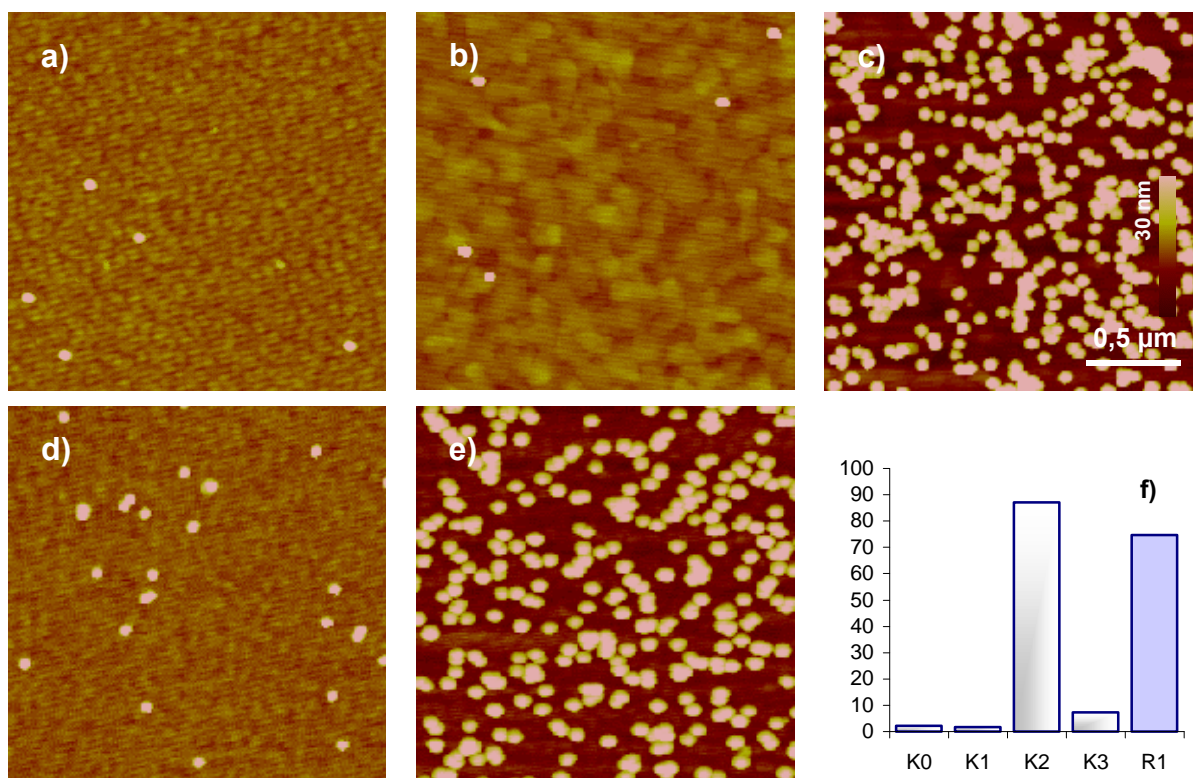
Eine Detektion der gebundenen Partikel wurde als positives Signal betrachtet. Durch die Auszählung der Anzahl der immobilisierten Nanopartikel anhand der AFM-Aufnahmen wurden deren Dichten ermittelt.

Die kolloidalen Metall-Filme wurden über die Bestimmung ihrer Partikel-Dichten quantifiziert. Über die Variation der verschiedenen Parameter im Immobilisierungsprozess wurde untersucht, wie sich diese auf die Bedeckungsdichte auswirken. In erster Linie wurde dabei überprüft, wie man eine definierte Bedeckungsrate reproduzierbar einstellen kann (siehe 3.3.3.1-5).

### 3.3.3.1 Signal-Rausch-Verhältnis

Als negative Kontrolle zur Ermittlung der Partikeldichte dienten parallel inkubierte Proben der  $K_0$ ,  $K_1$ ,  $K_2$  und  $K_3$  aus Tabelle 8 (Kapitel 2) oder die Bereiche außerhalb des Inkubationsbereiches auf dem gleichen Chip. Dabei wurden bei sonst gleichen Inkubationsbedingungen die folgenden Resultate ermittelt:

- Unkonjugierte Nanopartikel wurden nur unspezifisch auf Goldoberflächen gebunden ( $K_0$  aus Tabelle 8, Abbildung 34a).



**Abb. 34:** Kontrollproben zur Immobilisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe. a)  $K_0$ , b)  $K_1$ , c)  $K_2$ , d)  $K_3$ , e) Positive Probe aus der *Reihe 1*. f) Vergleich der Nanopartikeldichten.

- Unkonjugierte Nanopartikel belegten die Oligonukleotid/MCH-Mischschicht mit einer geringen Dichte ( $K_1$  aus Tabelle 8, Abbildung 34b).

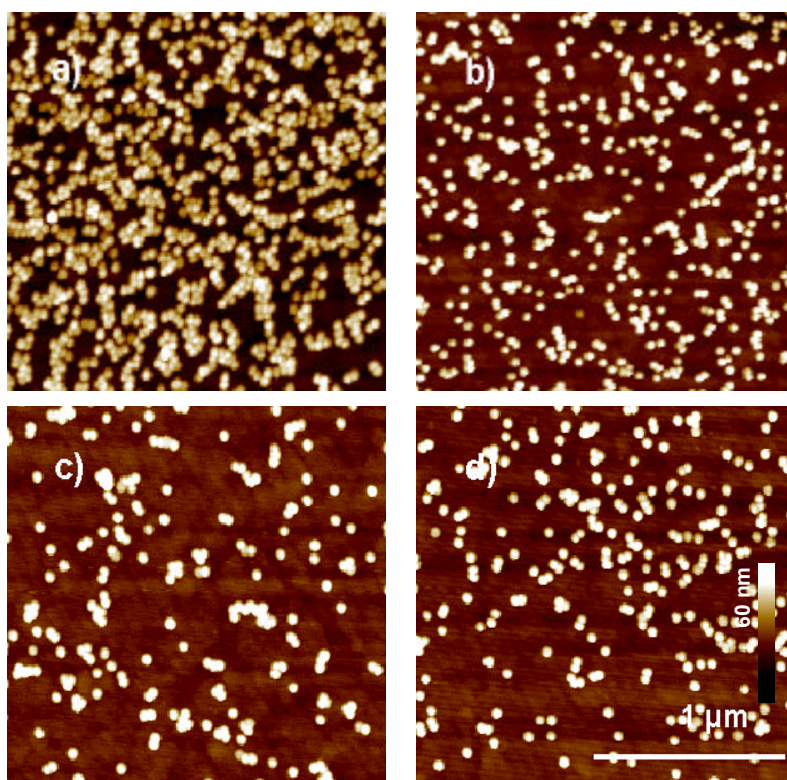
- Konjugierte Nanopartikel hatten eine sehr hohe Affinität zu den Goldoberflächen ( $K_2$  aus Tabelle 8, Abbildung 34c).
- Die Dichte von konjugierten, nicht-komplementären Nanopartikeln auf der Oligonukleotid/MCH-Mischschicht war relativ gering ( $K_3$  aus Tabelle 8, Abbildung 34d).

Außer den konjugierten Nanopartikeln auf reinen Goldoberflächen erreichte bei der eingesetzten Nanopartikel-Konzentration von  $2 \text{ OD}_{525}$  keine der Negativ-Kontrollen das Niveau der positiven Proben (Abbildung 34e und f).

Einen weiteren Hinweis auf die Spezifität der Nanopartikelbindung auf ein Thiol-Oligonukleotid-SAM lieferten die Ergebnisse der mikrostrukturierten Proben. Diese werden in 3.3.3.7 ausgewertet.

### 3.3.3.2 Einfluss der Kettenlänge und der Bindungsreihenfolge auf die Nanopartikeldichte

Aus dem Vergleich der *Probenreihen 2* und *6* konnten Hinweise auf den Einfluss der Kettenlängen auf die Nanopartikeldichte abgeleitet werden. Die Dichte ist von der Länge der verwendeten Linker abhängig. Bei längeren Linkern wurden weniger Nanopartikel immobilisiert, als bei den kürzeren (Abbildung 35a mit  $252 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  gegenüber  $128,9 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  im Abbildung 35b).



**Abb. 35:** Bindung der DNA-Nanopartikel-Komplexe in Abhängigkeit von der Kettenlänge und der Inkubationsreihenfolge. **a)** *Probe 2* (Schema 1.2.a), **b)** *Probe 6* (Schema 1.3), **c)** *Probe 3* (Schema 1.2.a), **d)** *Probe 7* (Schema 1.3).

Die unterschiedliche Reihenfolge der Hybridisierungsschritte hat ebenfalls einen Einfluss auf die Anzahl der gebundenen Nanopartikel. Ein Vergleich der *Proben 2* und *3* bzw. *6* und *7* zeigte, dass ein schrittweiser Aufbau der Komplexe von der Oberfläche her, zu einer höheren Nanopartikeldichte führt (Abbildung 35a mit  $252 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  gegenüber  $61,1 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  in Abbildung 35c bzw.  $128,9 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  in Abbildung 35b gegenüber  $70,4 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  in Abbildung 35d).

Der Vergleich der *Proben 9* und *11* lieferte ein im Trend ähnliches Ergebnis, allerdings nicht ganz so deutlich wie in den 3'-Systemen.

Eine Verlängerung der Ketten von 14,89 nm (12,58 nm L<sub>17\*</sub> und 2,31 Spacer) auf 36,31 nm (34 nm L<sub>117\*</sub> und 2,31 nm Spacer) bewirkte eine Senkung der Hybridisierungseffizienz um 49%. Der Ablauf mit der Hybridisierung zwischen dem Linker und der Sonde als ersten Schritt bewirkte eine noch größere Absenkung der Effizienz (um 76%).

### 3.3.3.3 Abhängigkeit des Signals von der Bindegrippendichte auf der Ebene der SAM

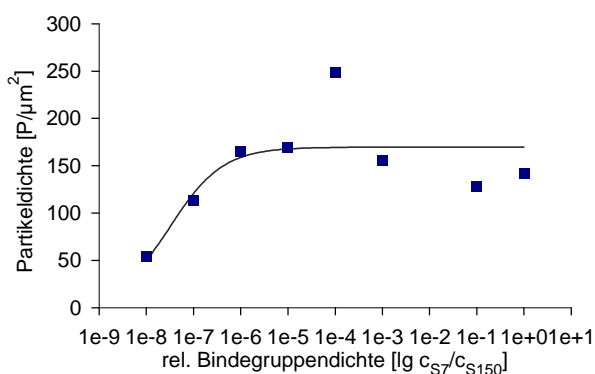
Durch eine Mischung zweier Thiol-Oligonukleotide mit unterschiedlicher Sequenz in einem SAM wurden definierte Bindegrippendichten auf den Chipoberflächen erzeugt. Wenn beide Oligonukleotide die gleiche Affinität zur Oberfläche besitzen, hängt die Dichte der gebundenen DNA-Nanopartikel-Komplexe nur von der eingesetzten Konzentration der bindenden Sequenz ab.

*Probenreihe 10:* Bei diesen Proben wurden ein 25mer als bindendes Oligonukleotid (S<sub>7</sub>) und ein 30mer für die Nanopartikelbindung als nichtkomplementäre Sequenz (S<sub>150</sub>) eingesetzt (Schema 1.5.a/b).

Mit steigendem Anteil S<sub>7</sub> konnte eine höhere Partikeldichte detektiert werden. Die Korrelation des Nanopartikel-Signals zur relativen Bindegrippendichte ist im Bereich von 1,0E<sup>-08</sup> bis 1,0E<sup>-5</sup> logarithmisch, darüber hinaus zeigt der Verlauf eine Sättigung (Tabelle 12 und Abbildung 36).

2,0 OD <sub>525</sub> S <sub>2</sub> -30 nm	relative theoretische Bindegrippendichte – lg c <sub>S7</sub> /c <sub>S150</sub>							
	1,0E-08	1,0E-7	1,0E-6	1,0E-5	1,0E-04	1,0E-03	1,0E-01	1,0E+00
P/μm <sup>2</sup>	54	113,5	165,5	169,5	249	155,5	127,5	141,75

**Tabelle 12:** Partikeldichten der *Probenreihe 10* (Schema 1.5.a/b).



**Abb. 36:** Abhängigkeit der Nanopartikeldichte von der relativen Bindegrippendichte (Schema 1.5.a/b).

*Probenreihe 4:* Durch die Mischung zweier 12mer Oligonukleotide (S<sub>2</sub>/S<sub>2nc</sub>, Schema 1.2.a/b) wurde der Affinitätsunterschied durch die Längendifferenz der Moleküle im SAM eliminiert. Es wurde parallel eine Probenreihe auf den Chip-Klassen 2 und 9 inkubiert. Bei beiden konnten keine klaren Trends, die auf einen Zusammenhang zwischen dem Anteil der bindenden Oligonukleotide und dem Nanopartikel-Signal deuten würden, ermittelt werden (Tabelle 13).

2,0 OD <sub>525</sub> S <sub>7-30</sub> nm	relative theoretische Bindegrippendichte – lg c <sub>s2</sub> /c <sub>snc</sub>									
	1,0E-10	1,0E-09	1,0E-08	1,0E-7	1,0E-6	1,0E-5	1,0E-04	1,0E-03	1,0E-02	1,0E-01
Chip-Kl. 2 [P/μm <sup>2</sup> ]	15,31	14,38	3,94	25	24,75	4,18	18	13,25	8,06	30,8
Chip-Kl. 9 [P/μm <sup>2</sup> ]	2,25	35,06	23,19	65,69	33,94	31,5	6,13	7,43	8,06	28,69

Tabelle 13: Partikeldichten der Probenreihe 4 (Schema 1.2.a/b).

### 3.3.3.4 Quantifizierung des Signals auf der Linkerebene

*Probenreihe 5:* Mit der Variation der Parameter der relativen Linkerkonzentration, durchgeführt mit einer Mischung von L<sub>17</sub>\*/L<sub>nc</sub>, wurde die Partikeldichte definiert eingestellt. Beide Sequenzen hatten die gleiche Länge, wodurch Affinitätsunterschiede minimiert wurden.

Auch hier wurde eine positive Abhängigkeit zwischen der relativen Konzentration des bindenden Linkers und der Stärke des Nanopartikel-Signals (ausgedrückt in Partikeldichten, Tabelle 14) erwartet. Dieser Zusammenhang konnte auf beiden Chip-Arten, allerdings in unterschiedlichen Dimensionen, nachgewiesen werden. Die CMFs auf den glatten Oberflächen waren gegenüber denjenigen mit größerer Rauigkeit signalmäßig schwächer belegt. Die Proben der Chip-Klasse 9 hatten die dichtesten CMFs.

2,0 OD <sub>525</sub> S <sub>7-30</sub> nm	relative Linkerkonzentration - lg c <sub>L17</sub> */c <sub>Lnc</sub>									
	1,0E-10	1,0E-09	1,0E-08	1,0E-7	1,0E-6	1,0E-5	1,0E-04	1,0E-03	1,0E-02	1,0E-01
Chip-Kl. 2 [P/μm <sup>2</sup> ]	22,56	37,75	6,88	9,31	16,88	8,25	11,44	6	7,56	72,06
Chip-Kl. 9 [P/μm <sup>2</sup> ]	3,31	3,12	9,62	2,44	8,43	17,44	14,06	10,25	10,69	649

Tabelle 14: Partikeldichten der Probenreihe 5 (Schema 1.2.a/c).

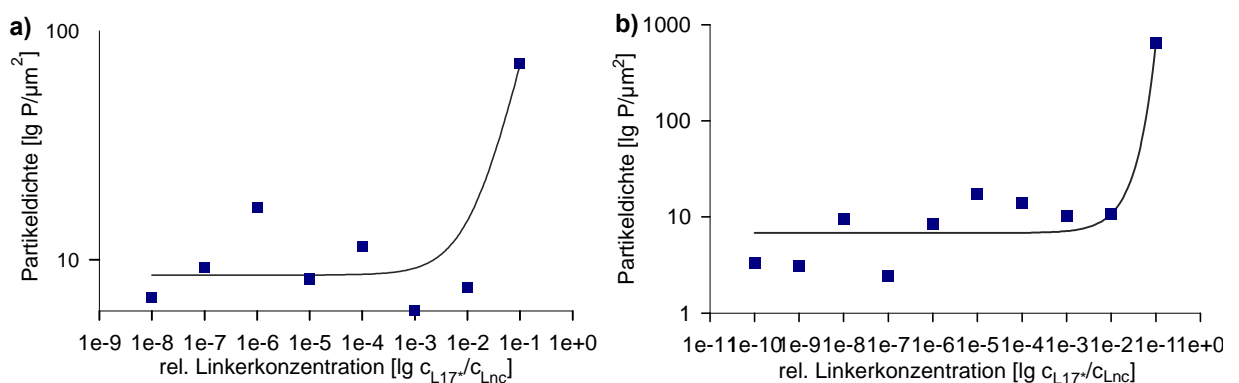


Abb. 37: Abhängigkeit der Nanopartikeldichte von der Linkerebene (Schema 1.2.a/c). a) Probenreihe 5 auf der Chip-Klasse 2. b) Probenreihe 5 auf Chip-Klasse 9.

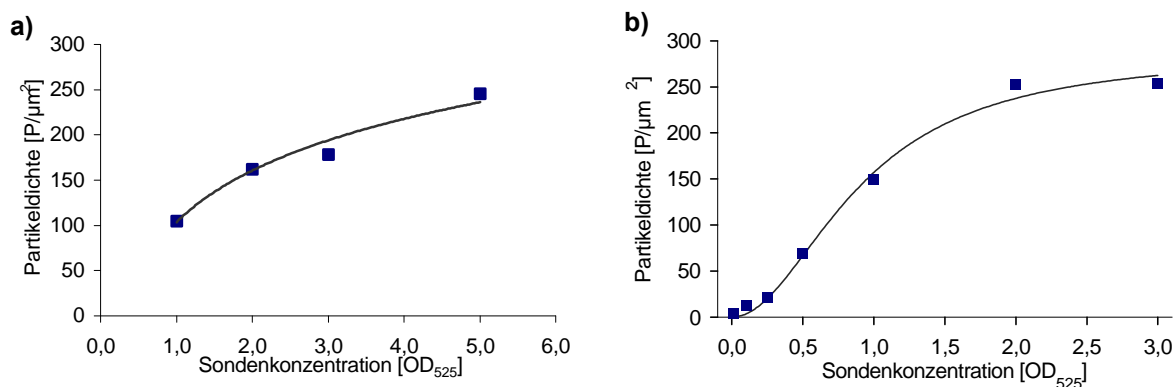
Der Kurvenverlauf der Abbildung 37 deutet auf einen positive Zusammenhang zwischen der eingesetzten relativen Linkerkonzentration und der Nanopartikeldichte.

### 3.3.3.5 Quantifizierung des Signals auf der Markierungsebene

*Probenreihe 1:* Bei der Anwendung höher konzentrierter Sonden ergab sich eine annähernd logarithmische Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten Konzentration der Nanopartikel-Sonde (Abbildung 38a).

OD <sub>525</sub>	1	2	3	4	5
	S <sub>1-30 nm</sub>				
Partikeldichte [P/μm <sup>2</sup> ]	104,94	162,06	178,19	-	245,25

**Tabelle 15:** Partikeldichten der *Probenreihe 1* in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration (Schema 1.1.b).



**Abb. 38:** Abhängigkeit der Nanopartikeldichte auf der Markierungsebene. **a)** *Probenreihe 1* (Schema 1.1.b). **b)** *Probenreihe 2* (Schema 1.2.a).

*Probenreihe 2:* Durch die Anwendung niedrigkonzentrierter Sonden konnte der für die Markierung günstigste Anwendungsbereich identifiziert werden (Abbildung 33b). Mit Lösungen unterhalb ~ 30 pM (< 0,1 OD) gelangt man bei der Auswertung in den Bereich des Rauschens. Bei eingesetzten Sondenkonzentrationen oberhalb ~ 600- 700 pM deutet der Verlauf der Kurve auf eine Sättigung der Partikeldichte um ca. 250 Partikel/μm<sup>2</sup>, was einer Oberflächendeckung von ca. 20 % des theoretisch ermittelten Wertes entspricht.

OD <sub>525</sub>	0,01	0,1	0,25	0,5	1	2	3
	S <sub>7-30 nm</sub>						
Partikeldichte [P/μm <sup>2</sup> ]	3,1875	12,75	21,6	68,75	149,2	252	253
AFM Aufnahmen							

**Tabelle 16:** Partikeldichten der *Probenreihe 2* in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration. Bilder jeweils 2 x 2 μm (Schema 1.2.a).

### 3.3.3.6 Reversibilität der Nanopartikel-Markierung auf Goldoberflächen

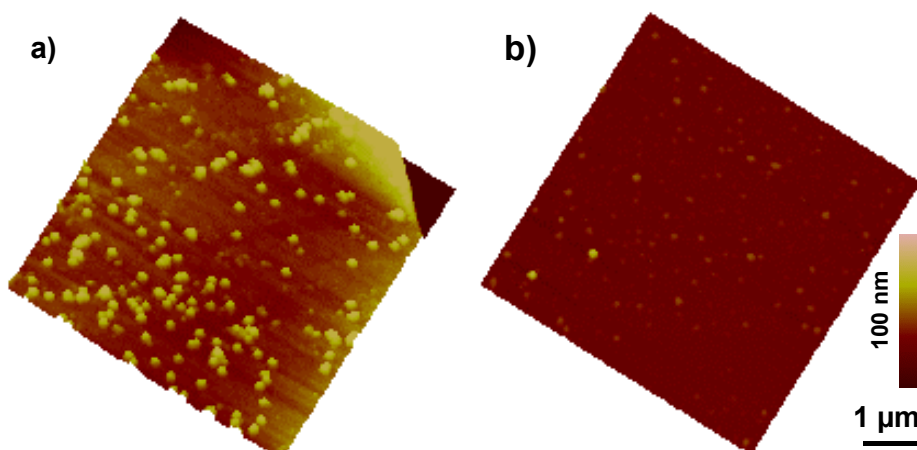
*Probenreihe 1:* Zur Klärung der Frage nach der Reversibilität der Immobilisierung durch Hybridisierung bei kolloidalen Metall-Filmen wurden parallel inkubierte Proben einem Abschmelzen unterzogen. Die Proben wurden nach der Hybridisierung und den Waschprozessen nicht ge-

trocknet, sondern parallel zur Charakterisierung der eigentlichen Proben einer, die Doppelhelix destabilisierenden, Inkubation unterzogen (2.2.4.3). Nach diesem Schritt wurden keine quantitativen Unterschiede zu den Originalproben festgestellt.

Auch die eigentlichen Proben wurden nach einem Rehydratisierungsschritt dissoziativ behandelt. Eine Veränderung der Partikeldichte konnte auch bei diesen Proben nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine enge Wechselwirkung zwischen den Nanopartikeln und der Goldoberfläche, da sich die Irreversibilität nur auf Goldoberflächen zeigte.

### 3.3.3.7 Adressierte Affinitätsimmobilisierung der Komplexe auf Gold-Mikrostrukturen

*Probenreihe 1:* Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der mit einem Hybridisierungsschritt (nach Schema 1.1.b) hergestellten Proben (Abbildung 39) zeigten eine differenzierte Bindung der DNA-Nanopartikel-Komplexe. Die Komplexe wurden hauptsächlich auf den Gold-elektroden detektiert, im Elektrodenspalt und auf den ODTs-geschützten Oberflächen wurden nur wenige Objekte beobachtet. Den auf den spezifischen Bindungsflächen gemessenen 7,37 Nanopartikeln pro  $\mu\text{m}^2$  stehen 0,125 Partikel pro  $\mu\text{m}^2$  auf den unspezifischen Bindungsflächen gegenüber.



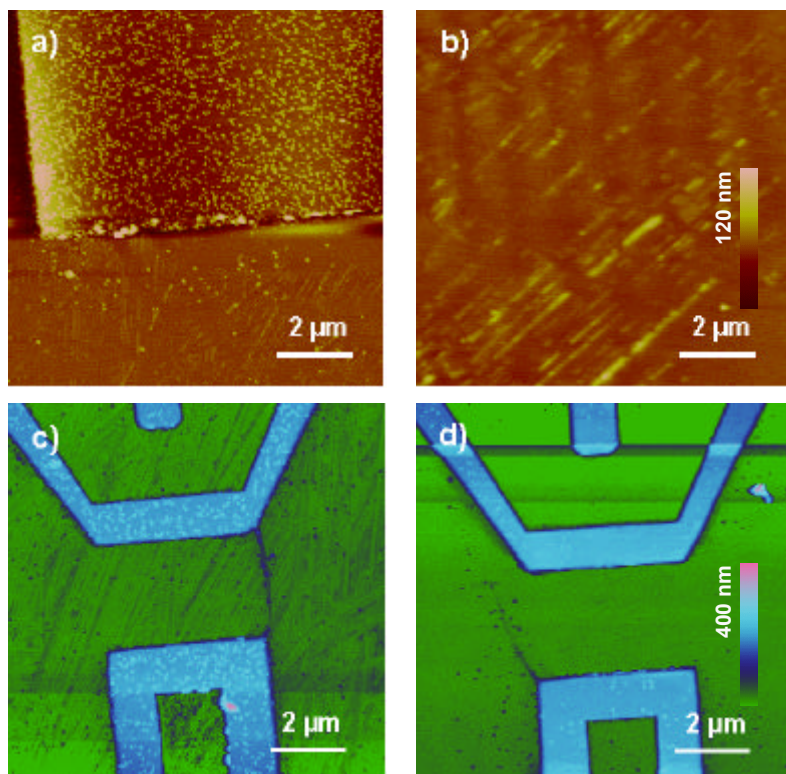
**Abb. 39:** Adressierte Immobilisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe. Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der Proben der Chip-Klasse 10 (Schema 1.1.b) zeigen Ausschnitte der Elektrodenoberfläche (a) und des Elektrodenspalts (b).

*Probenreihe 2:* Eine adressierte Immobilisierung mit dem Linkersystem wurde hier mit Hilfe unterschiedlicher Oberflächeneigenschaften der Mikrostrukturen auf einem Chip verwirklicht (Tabelle 10, Schema 1.2.a). Durch die Passivierung der Elektrodenspalt-Oberflächen (Siliziumoxid) mit ODTs wurde eine Bindung der DNA-Komplexe nur auf die Elektroden-Oberflächen möglich. Ein Unterschied in der Partikeldichte zwischen Elektrode und Spalt wurde in allen Fällen detektiert, allerdings in unterschiedlichen Größenordnungen. In Abbildung 40 sind Positiv- und Kontroll-Proben nebeneinander dargestellt.

*Probe 1:* Diese Probe (Abbildung 40a) entspricht der Standard-SAM-Herstellung. Durch die Anwendung einer Mischschicht konnte eine große Anzahl an gebundenen Komplexen auf der Elektrode erreicht werden. Im Elektrodenspalt wurden Dichten unter  $0,12 \text{ Partikel}/\mu\text{m}^2$  gemessen.

*Probe 2:* Bei dieser Probe (Abbildung 40b) wurde in der Mischschicht Cysteamin, anstatt MCH verwendet. Diese Reagenz kann auch für unspezifische Nukleinsäure-Bindung eingesetzt

werden (Wirde et al. 1999). Die mit Cysteamin modifizierte Probe zeigte zwar auf der Goldoberfläche eine hohe Partikeldichte, allerdings war auch die unspezifische Bindung der Partikel im Elektrodenspalt hoch ( $\sim 3 \text{ P}/\mu\text{m}^2$ ).

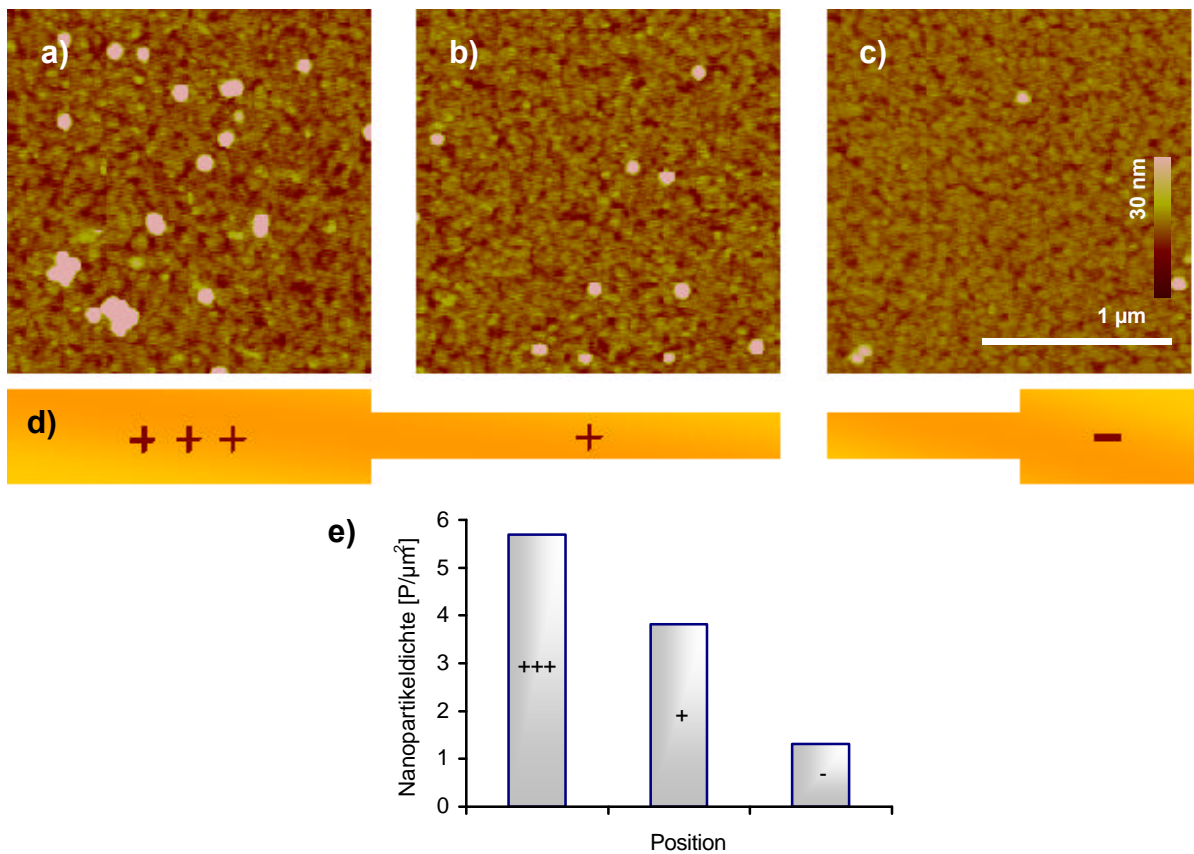


**Abb. 40:** Adressierte Immobilisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe (Schema 1.2.a). Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Proben: **a)** *Probe 1*. **b)** *Probe 2*. **c)** Falschfarben-3D-Darstellung der *Probe 1*. **d)** Falschfarben-3D-Darstellung der *Probe 4*.

*Probe 3:* Ohne die Verwendung einer Thiol-Oligonucleotid SAM wurde nur eine geringe Anzahl an gebundenen Komplexen detektiert, sowohl auf der Elektrode, als auch im Spalt ( $\sim 0,001 \text{ P}/\mu\text{m}^2$ ).

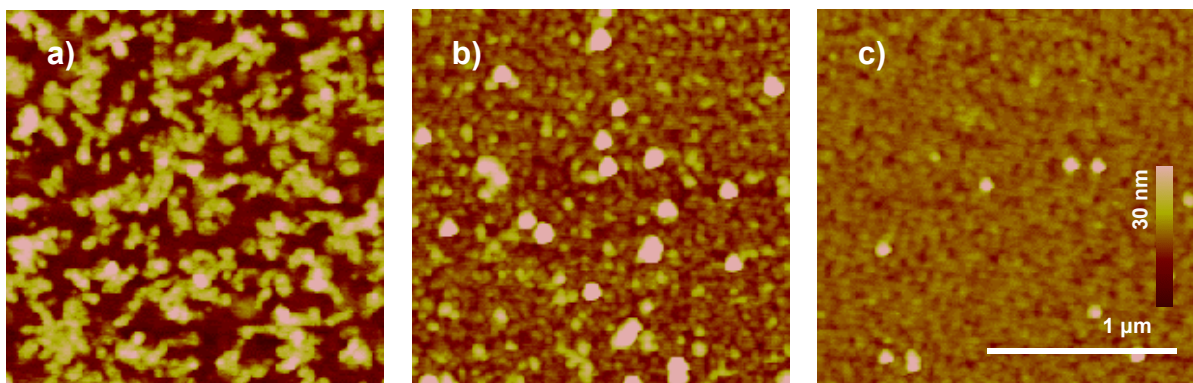
Die *Proben 4* (Abbildung 40d) und *5* lieferten ein ähnliches Signal- und Rauschniveau ( $\sim 0,002 \text{ P}/\mu\text{m}^2$ ).

*Elektrische Hybridisierung - Probenreihe 1:* Die gezielte Immobilisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe auf eine Elektrodenseite der Chip-Klasse 11 wurde mit einem orientierten Aufbau des elektrischen Feldes versucht (2.2.4.3). Die angelegte Spannung erzeugte im Falle unmodifizierter Nanopartikel einen Konzentrationsgradienten im Lösungstropfen, welcher über den Farbverlauf verfolgt werden konnte. Die rötliche Verfärbung konzentrierte sich nach ca. einer Minute auf der positiven Elektrodenseite. Der Konzentrationsgradient spiegelt sich auch auf den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wieder (Abbildung 41a-c).



**Abb. 41:** Adressierte Immobilisierung durch elektrische Hybridisierung. Kontrolle: Unkonjugierte Nanopartikel-Komplexe im elektrischen Feld auf Oligonukleotid-SAM. **a)** Positiv-ganz links. **b)** Positiv-links. **c)** negativ-ganz rechts. **d)** Schema der Elektroden und der Felddaufbau. Der Tropfen wurde auf dem gesamten Bereich platziert. **e)** Nanopartikeldichten an den unterschiedlichen Positionen.

Konjugierte Nanopartikel verhielten sich ähnlich. Auch hier wurde ein Farbgradient beobachtet. Bei den üblichen Hybridisierungsbedingungen konnte man auf den AFM-Aufnahmen des positiven Pols durch abgelagerte Salze allerdings keine Partikel detektieren (Abbildung 42a).



**Abb. 42:** Adressierte Immobilisierung durch elektrische Hybridisierung von DNA-Nanopartikel-Komplexen auf komplementären Oligonukleotid-SAMs (Schema 1.1.b). **a)** Positive Seite bei hoher Salzkonzentration (0,1 M). Sichtbar sind nur Salzkristalle. **b)** positive Seite und **c)** negative Seite bei minimaler Salzkonzentration.

Die störenden Salze konnten auch nicht von der Oberfläche gewaschen werden. Wiederholte Versuche unter Verwendung einer minimalen Salzkonzentration (Abbildung 42b und c) lieferten schließlich einen sauberen Hintergrund. So wurde ein Unterschied zwischen der Anzahl immobilisierter DNA-Nanopartikel-Komplexe festgestellt: Auf der positiven Seite lagen  $6,2 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  gegenüber  $4 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  auf der negativen Seite. Nahe dem positiven Pol verklumpten die Partikel teilweise miteinander.

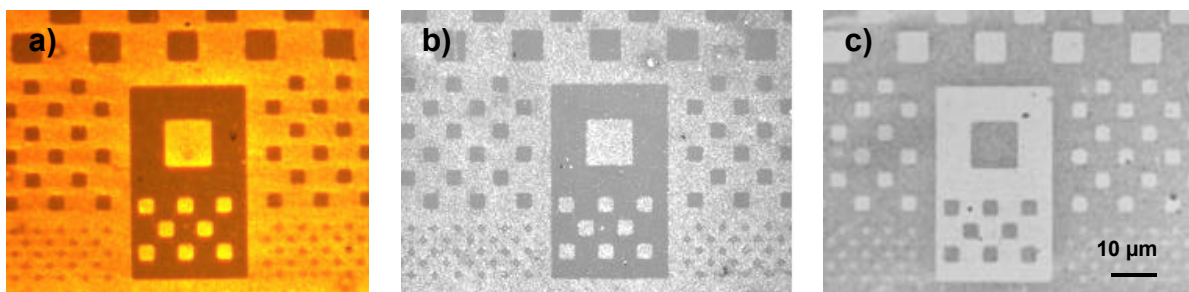


der, was die Auszählung erschwerte. Auch häuften sich trotz der niedrigen Salzkonzentration die Ablagerungen auf dieser Seite.

### 3.4 NANOPARTIKEL-MARKIERUNG FÜR BIOCHIPS

#### 3.4.1 NANOPARTIKEL-MARKIERUNG VON MIKROCHEMOTOPEN

Die Charakterisierung der Nanopartikel-markierten Proben zeigte eine erfolgreiche Markierung der Oligonukleotid SAMs. Die Mikrochemotope wurden durch die gebundenen Nanopartikel sichtbar. Mit Hilfe optischer Mikroskopie konnte eine Färbung der Chemotope beobachtet werden, welche durch Kanteneffekte der Lichtreflexion noch verstärkt wurde. Bei Auflicht-Aufnahmen (Abbildung 43a) erschienen die markierten Stellen gelb-orange, die Zwischenräume waren dunkelbraun. Bei Durchlicht-Aufnahmen (Abbildung 43c) waren die Mikrochemotope dunkel (grau), wohingegen nicht markierte Bereiche als helle Felder zu sehen waren. Einzelne Nanopartikel konnten mit dieser Methode nicht aufgelöst werden.



**Abb. 43:** Optische Aufnahmen von Nanopartikel-markierten Chips der Klasse 6 bei hoher Markierungsintensität. **a)** Auflicht-Farbaufnahme eines markierten Biochips. **b)** Schwarz-weiß Darstellung der Auflicht-Aufnahme eines markierten Biochips. **c)** Durchlicht Aufnahme (schwarz-weiß) eines markierten Biochips. Die Kanten und Mikrochemotope sind in allen Fällen gut sichtbar.

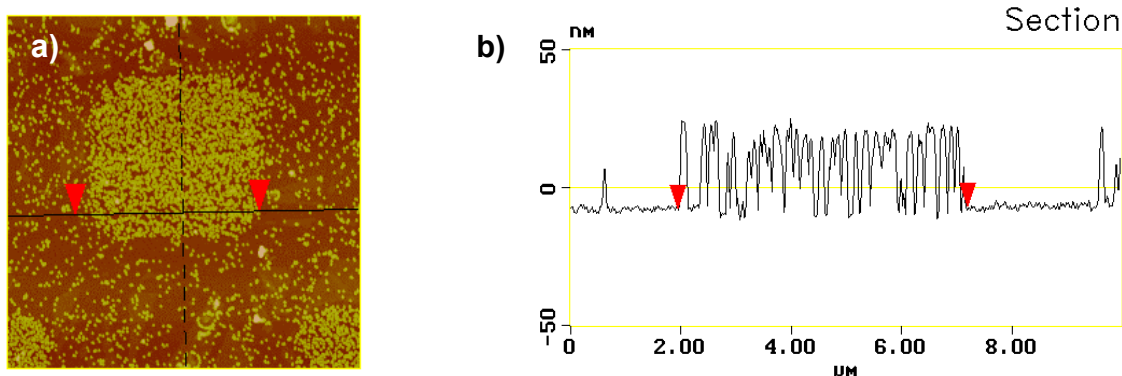
Bei erwartetem schwachen Signal und bei den Kontroll-Proben konnte man die Strukturen, wenn überhaupt, nur schwach erkennen (Abbildung 44b und c). Das erschwerte auch die topologische Zuordnung der Strukturen.



**Abb. 44:** Optische Aufnahmen von Nanopartikel-markierten Chips der Klasse 6 und der Kontroll-Versuche. **a)** Auflicht-Aufnahme eines mit komplementären Sonden markierten Chips. **b)** Kontrolle 1: Durchlicht-Aufnahme eines mit unmodifizierten Gold-Nanopartikeln markierten Chips. **c)** Kontrolle 2: Markierter Chip mit nicht komplementärer Sonde.

Die Auslesegeschwindigkeit des optischen Signals der Nanopartikel-Markierung wurde mit einer Belichtungszeitreihe (1-30 ms) von Auflichtaufnahmen untersucht. Dazu wurden Proben mit hohen Bedeckungsdichten auf dem Areal der  $4 \times 4 \mu\text{m}$  Mikrochemotope verwendet. Selbst bei einer Belichtungszeit von 1 ms konnte dabei noch ein Signal detektiert werden (Köhler et al. 2001a).

Bei der Charakterisierung mittels AFM wurden Aufnahmen der Mikrochemotopie erstellt. Die Chemotopie zeichneten sich durch eine hohe Dichte an gebundenen DNA-Nanopartikel-Komplexen aus (Abbildung 45a und b).



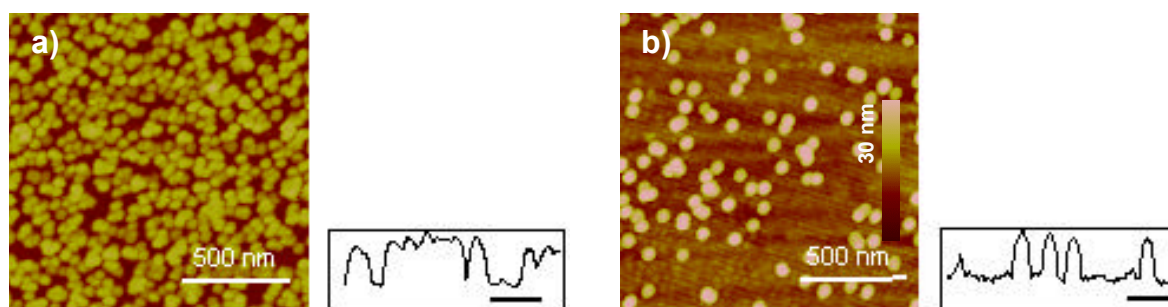
**Abb. 45:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer 4 x 4 µm Mikrostruktur (a). Die Nanopartikel bilden eine fast geschlossene Fläche im Mikrochemotop. Schnitt durch eine Mikrostruktur (b).

Durch rasterkraftmikroskopische Charakterisierung konnte auch die genaue Anzahl der gebundenen Nanopartikel pro µm<sup>2</sup> Chipfläche ermittelt werden. Die Nanopartikeldichte wurde als die eigentliche Signalstärke in die Quantifizierung einbezogen.

Die Dichten der auf einer Oberfläche mit "on-chip"-Synthese hergestellten Oligonukleotid-SAMs lagen nach dem ersten Hybridisierungsschritt bei  $\sim 2 \times 10^{11}$  Moleküle/cm<sup>2</sup> (Angaben aus dem Hybridisierungsergebnis der Fluoreszenz-markierten Sonden, Reichert 2003). Die Konzentration der Oligonukleotide im SAM liegt eine Größenordnung höher (ssDNA an GOPS/Glas Oberflächen mit Standard-Phosphoramidit Chemie  $\sim 6,6 \times 10^{12}$  Moleküle/cm<sup>2</sup>, O'Donnell und Köster 1999).

#### 3.4.1.1 Signal-Rausch-Verhältnis

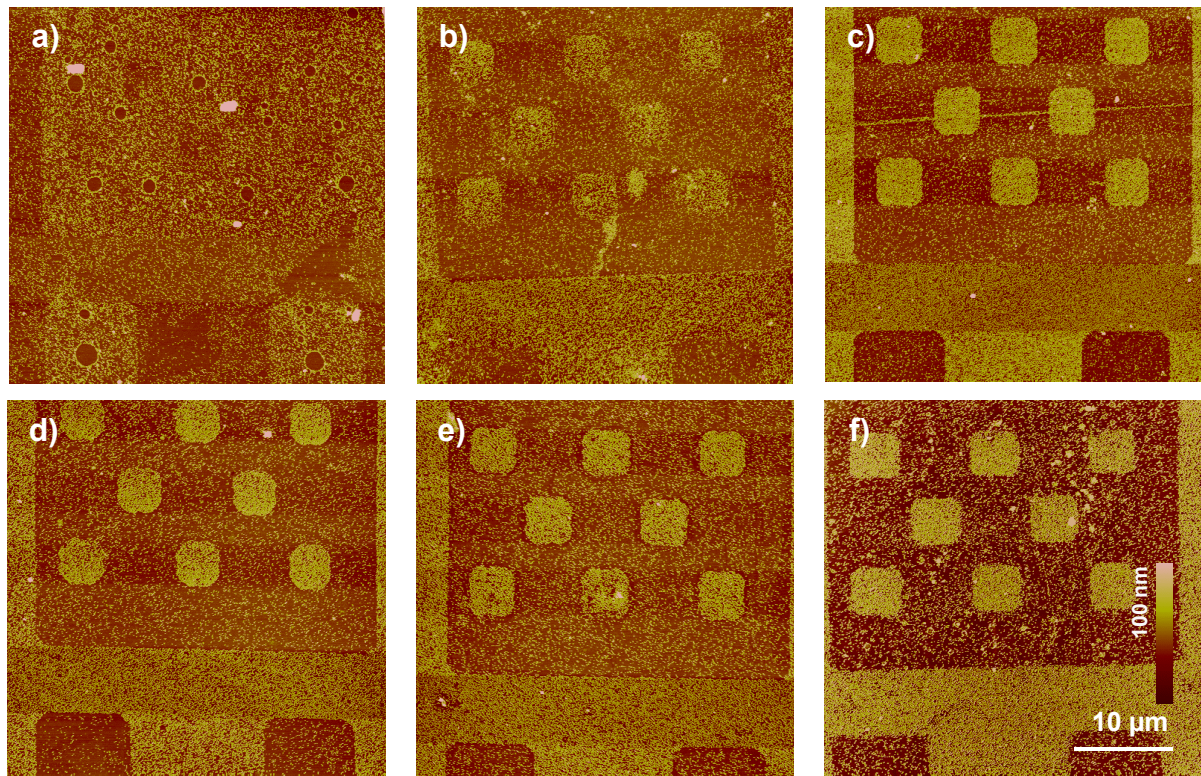
Die Signalstärke der Nanopartikel-Markierung wurde durch Auszählung der Nanopartikel pro Flächeneinheit innerhalb der spezifisch bindenden Strukturen (möglichst mittig) ermittelt. Der Wert für den Hintergrund wurde außerhalb der Strukturen (in großer Entfernung von den Kanten) quantifiziert. Die ermittelten Werte werden bei den einzelnen Versuchen angegeben.



**Abb. 46:** Detailaufnahmen einer markierten Mikrostruktur (a) und der ODTS-geschützten Flächen (b) bei hohen Bedeckungsdichten. Rechts von den jeweiligen AFM-Aufnahmen sind Schnitte dargestellt.

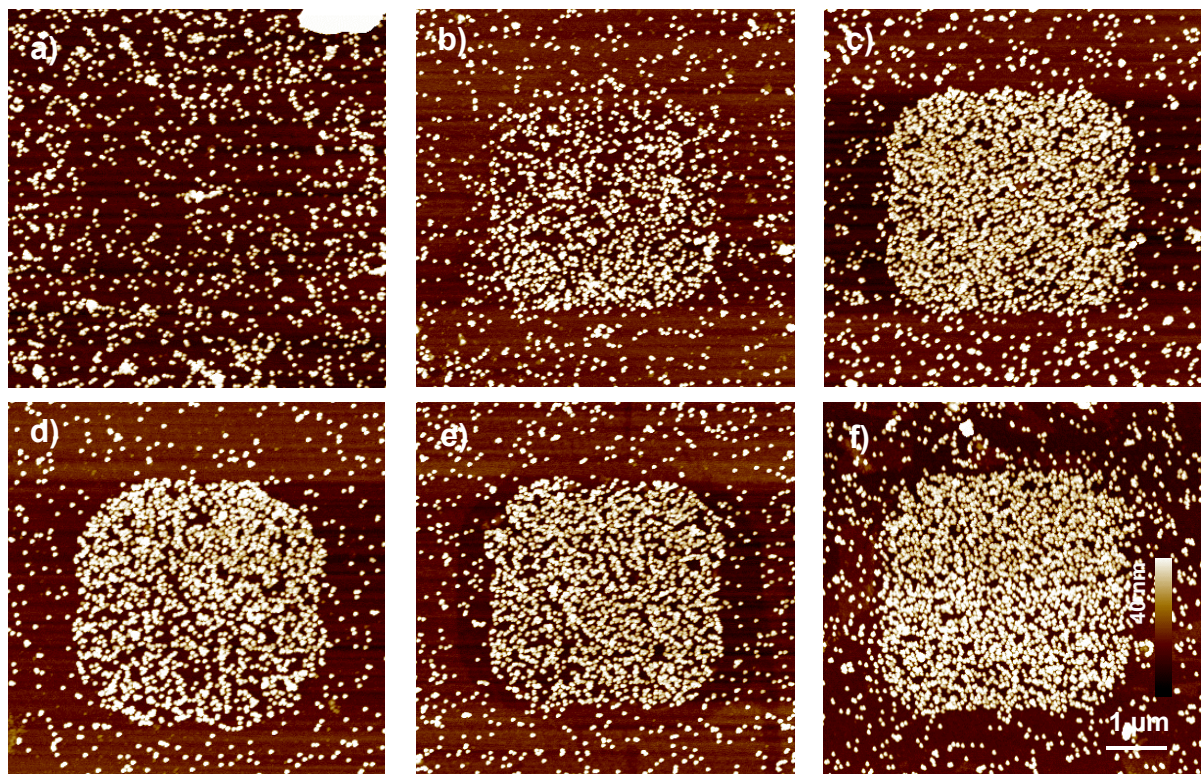
#### 3.4.1.2 Signalstärke in Abhängigkeit von der Bindegrippendichte auf den Oberflächen

Die Ergebnisse der AFM Charakterisierung werden mit einer Reihe von Übersichtsaufnahmen dargestellt. Die Aufnahmen (Abbildung 47a-f) zeigen mit wachsender Bindegrippendichte eine immer höhere Nanopartikeldichte, was sich in immer kontrastreicherer Strukturgrößen widerspiegelt.



**Abb. 47:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen Nanopartikel-markierter Chips (Schema 3.3) – Verdünnung auf der Oberflächen-Ebene, von a) bis f) steigender relativer Anteil der Bindegruppen.

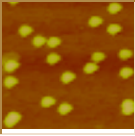
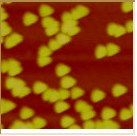
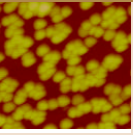
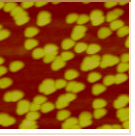
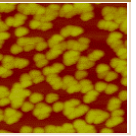
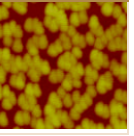
Bei einer näheren Betrachtung der einzelnen Mikrochemotope wird die Hervorhebung der Strukturen aus dem Hintergrund mit steigenden Bindegruppendichten immer deutlicher (Abbildung 48a-f).



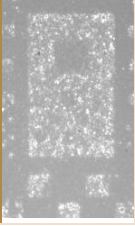
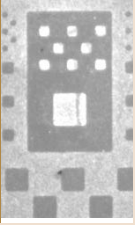
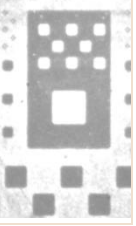
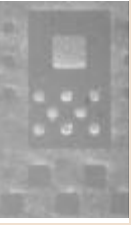
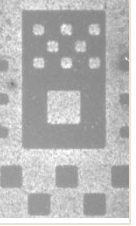
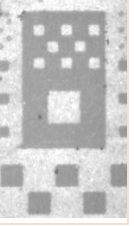

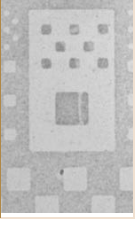
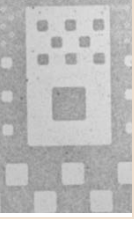
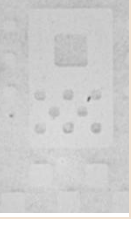
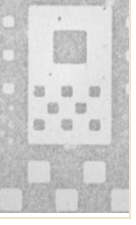

**Abb. 48:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen Nanopartikel-markierter 4 x 4 µm Mikrochemotope (Schema 3.3) – von a) bis f) steigender relativer Anteil der Bindegruppen.

Im Tabelle 17 sind die durch Auszählung ermittelten Werte für die Mikrochemotopie und die ODTS geschützten Flächen sowie die entsprechenden AFM-Aufnahmen vergleichend dargestellt. Die Quantifizierung des Signals zeigt, dass das Nanopartikel-Signal mit den Bindegruppendichten positiv korreliert.

Die optischen Aufnahmen (in der Tabelle 18) lieferten ähnliche Ergebnisse wie die rasterkraftmikroskopischen Bilder. Es konnte die gleiche Tendenz erkannt werden, wenn auch nicht so ausgeprägt. In der Quantifizierung wurde der Lichtstärkewert der Auflichtaufnahmen einbezogen. Dieser verursachte allerdings durch unterschiedliche Reflektionseffekte eine Streuung der Werte innerhalb der Reihe.

2,0 OD <sub>525</sub> S <sub>3</sub> -30 nm	relative Bindegruppendichte – c <sub>OH</sub> /c <sub>CH<sub>3</sub></sub>					
	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
<b>Spezifische Bindung</b> [P/μm <sup>2</sup> ]	18	76	130	89	140	154
<b>Hintergrund</b> [P/μm <sup>2</sup> ]	43,4	10,3	10,3	10,4	14,4	11,4
						

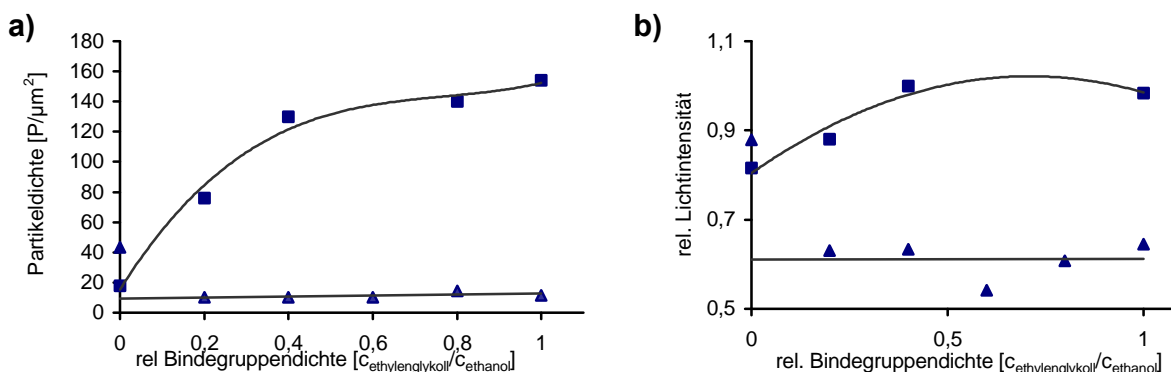
**Tabelle 17:** Abhängigkeit der Partikeldichte von der relativen Bindegruppenkonzentration (Schema 3.3). Die Bildausschnitte aus AFM-Aufnahmen zeigen eine Fläche von jeweils 1 μm<sup>2</sup>.

2,0 OD <sub>525</sub> S <sub>3</sub> -30 nm	relative Bindegruppendichte – c <sub>OH</sub> /c <sub>CH<sub>3</sub></sub>					
	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
<b>Auflicht</b>						
<b>Durchlicht</b>						

**Tabelle 18:** Abhängigkeit der Grauwertstufe von der relativen Bindegruppenkonzentration (Schema 3.3). Die Bildausschnitte sind jeweils 50 μm breit.

Im Verhältnis zu den Partikeldichten auf den spezifischen Bindestellen zeigten sich die ermittelten Hintergrundwerte als relativ gering (9,5 P/μm<sup>2</sup> und 0,611 relative Lichtstärke). Eine Ausnahme davon waren die Proben mit einer Bindegruppendichte von 0. Hier wurde eine Umkehrung des Mar-

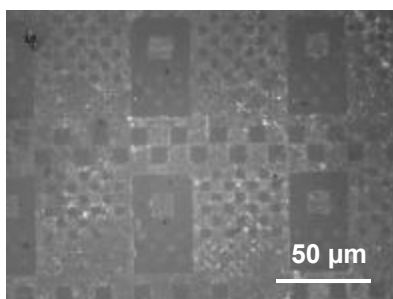
kierungssignals beobachtet. Dieser Effekt der Umkehrung wurde bei Markierungen unterhalb eines bestimmten Grenzwertes für die Bindeguppenkonzentration auch bei anderen Versuchsreihen mit der Chip-Klasse 6 beobachtet.



**Abb. 49:** Abhängigkeit der Signalstärke von der Bindegrippendichte auf den Oberflächen (Schema 3.3). : Partikeldichte auf der spezifischen Bindefläche. : Hintergrundwerte (Tendenzlinie ohne Ausreißer).

### 3.4.1.3 Verdünnung auf Linkerebene

Die mikroskopische Charakterisierung dieser Probenreihe zeigte einige ungleichmäßig markierte Stellen. Die Quantifizierung wurde deswegen nur in den homogenen Bereichen vorgenommen. Ein Teil der Proben wies gar keine Mikrostrukturen auf. Eine mögliche Fehlerquelle liegt in der parallelen Synthese auf jeweils zwei Chips, wobei die mikrostrukturierten Oberflächen ungewollt teilweise verdeckt wurden. Zu dieser Probenreihe wurden optische Aufnahmen gefertigt, welche aber nicht weiter quantifiziert wurden (Abbildung 50).

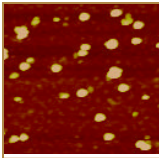
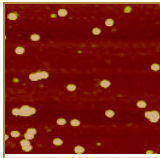
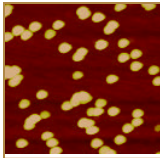
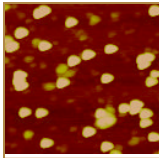
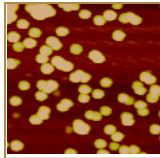
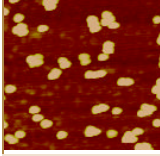
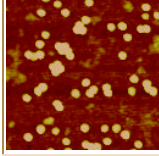
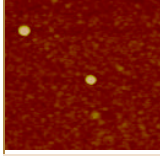
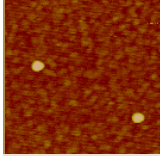
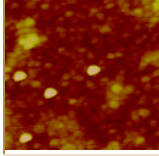
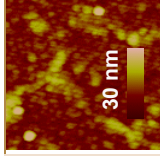


**Abb. 50:** Auflichtaufnahme von mit  $S_1$ -30 nm-markierten Chips der Klasse 6 (Schema 3.2.a/b).

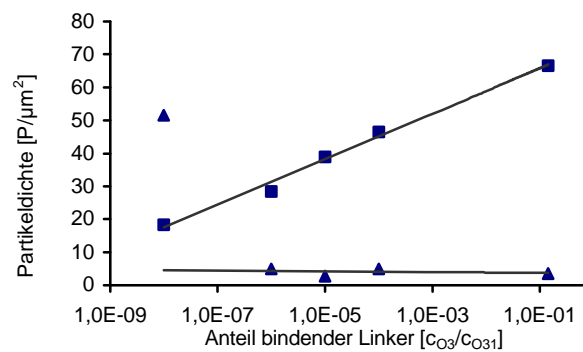
Die Charakterisierung der Proben erfolgte mit dem AFM. Dabei wurden Übersichtsaufnahmen und Detailaufnahmen im Bereich der  $9 \times 9 \mu\text{m}$  Chemotope angefertigt (Tabelle 19).

Bei den vermessungsfähigen Proben wurde eine positive Korrelation zwischen der eingesetzten  $O_3$ -("bindenden" Linker)-Konzentration und der Signalstärke beobachtet, d.h. bei den höheren  $O_3$ -Konzentrationen war die Dichte der gebundenen Nanopartikel höher. Das Rauschniveau ergab mit Ausnahme extrem großer Verdünnungen des bindenden Linkers einen konstanten Wert um 3,5 Partikel pro  $\mu\text{m}^2$ .

Auch bei diesem Versuch wurde eine Umkehrung des Signals durch eine Erhöhung der Hintergrundwerte festgestellt. Unterhalb von  $10^{-8}$  der relativen Linkerkonzentration bindender Oligonukleotide erhöhte sich das Hintergrundsignal der Partikeldichten auf Werte, die einer spezifische Bindung entsprechen würden.

2,0 OD <sub>525</sub> S <sub>3</sub> -30 nm rel. Bgrd: 1,0	Anteil bindender Linker - c <sub>O3</sub> /c <sub>O31</sub>					
	0	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,14
Spezifische Bindung [P/μm <sup>2</sup> ]	7,75	18,3	28,5	39	46,5	66,5
	-					
Hintergrund [P/μm <sup>2</sup> ]	49,75	51,6	4,9	2,75	4,88	3,6
						

**Tabelle 19:** Zusammenhang zwischen der Nanopartikeldichte und der Linkerkonzentration (Schema 3.2.a/b). Ergebnisse der AFM-Charakterisierung. Bgrd: Bindegrippendichte.



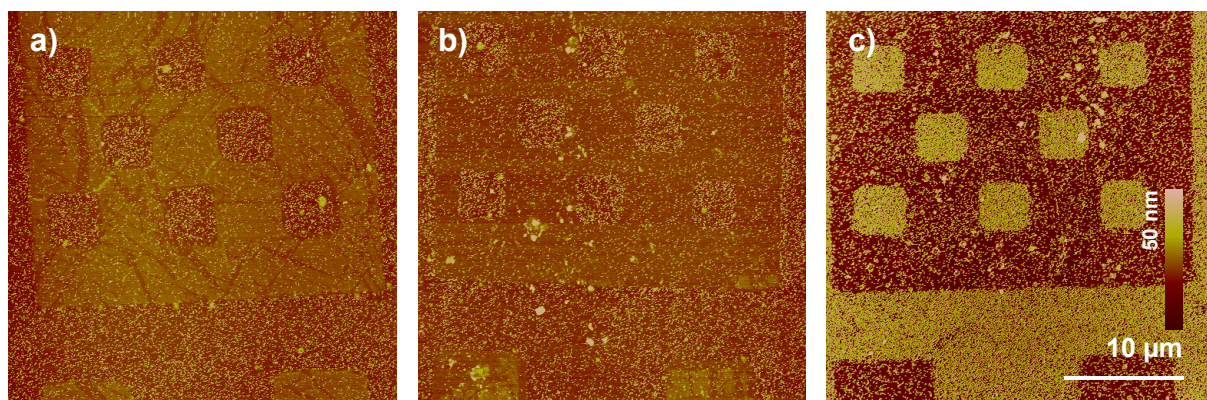
**Abb. 51:** Abhängigkeit des Nanopartikel-Signals von der Verdünnung auf Linkerebene (Schema 3.2.a/b). : Partikeldichten an der spezifischen Bindeseite. : Hintergrundwerte (Tendenzlinie ohne Ausreißer).

### 3.4.1.4 Signalstärke in Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration

Nach dem Hybridisierungsschema 3.3 (2.2.5) erstellte Proben wurden parallel einer AFM- und einer optischen Charakterisierung unterworfen.

Die AFM-Übersichtsaufnahmen (Abbildung 52a-c) zeigen, dass die Strukturen bei allen drei Proben erkennbar waren, jedoch mit unterschiedlichem Kontrast. Bei hoher Sondenkonzentration wurde ein stärkerer Kontrast festgestellt (Abbildung 52c), als bei den niedrigeren Konzentrationen (Abbildung 52a).

Bei der maximalen Bindegrippendichte auf der Oberfläche wurden in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten DNA-Nanopartikel-Komplexe die in der Tabelle 20 aufgelisteten Nanopartikelmengen detektiert.



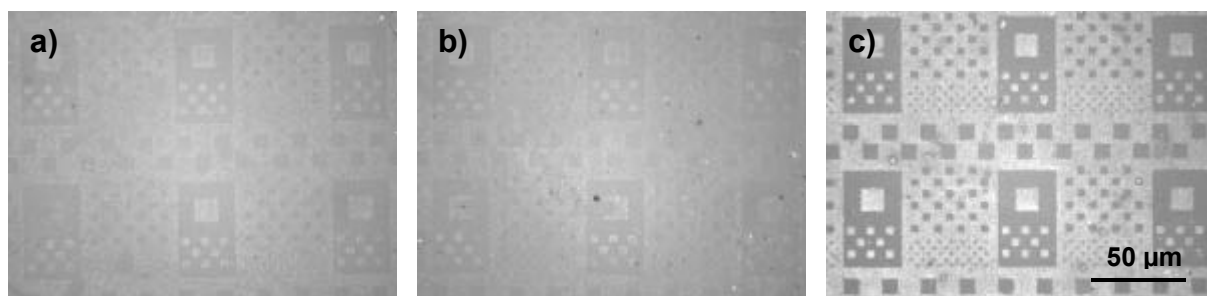
**Abb. 52:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Proben des Schemas 3.3. Von a) bis c) mit steigender Konzentration der eingesetzten Sonden.

rel. Bindegruppendichte: 1,0		0,5 OD <sub>525</sub>	1,0 OD <sub>525</sub>	2,0 OD <sub>525</sub>	K: 2,0 OD <sub>525</sub>
		S3-30 nm			
Spezifische Bindung	Partikeldichte [P/μm <sup>2</sup> ]	15	23	154	1,6
	AFM-Aufnahmen 1 x 1 μm Höhe 100 nm				
Hintergrund	Partikeldichte [P/μm <sup>2</sup> ]	4,5	6,6	11,4	1,5
	AFM-Aufnahmen 1 x 1 μm Höhe 100 nm				

**Tabelle 20:** Partikeldichten der Proben in Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration (Schema 3.3). Werte der AFM-Charakterisierung.

Die optischen Aufnahmen zeigten dieselben Resultate wie die Charakterisierung mittels Rasterkraftmikroskop. Die Mikrostrukturen waren bei höheren Konzentrationen der DNA-Nanopartikel-Komplexe deutlicher zu erkennen (Abbildung 53).

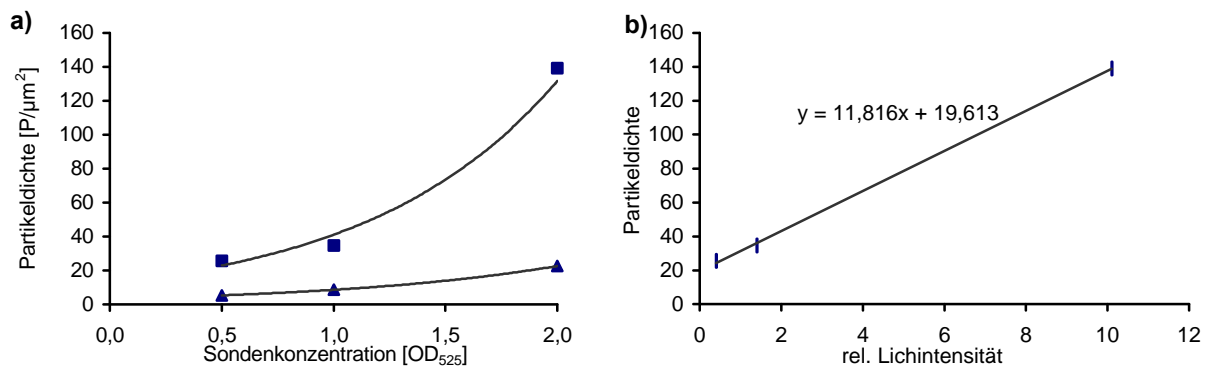
Bei der optischen Auswertung des Nanopartikel-Signals wurde auch die relative Lichtstärke in % des Aufricht-Grauwertes ermittelt (Tabelle 21).



**Abb. 53:** Mikroskopische Auflichtaufnahmen der Proben des Schemas 3.3.

rel. Bindegruppendichte: 1,0		0,5 OD <sub>525</sub>	1,0 OD <sub>525</sub>	2,0 OD <sub>525</sub>	K: 2,0 OD <sub>525</sub>	K: 2,0 OD <sub>525</sub>
		S <sub>3</sub> -30 nm			30 nm	S <sub>3nc</sub> -30 nm
Relative Lichtstärke- werte [%]	Spezifische Bindung	0,4	1,4	10,1	-	1,0
	Hintergrund	0,1	1,0	2,0	-	0,9
Auflichtaufnahme						
Durchlichtaufnahme						

**Tabelle 21:** Relative Lichtstärkewerte in % bei Auflicht-Aufnahmen in Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration sowie optische Aufnahmen der Proben (Schema 3.3).



**Abb. 54:** Signalstärke in Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration (Schema 3.3). Vergleich der Werte aus der AFM- und der mikroskopischen Charakterisierung. □: Partikeldichte auf der spezifischen Bindeseite. ▴: Hintergrundwerte. ◆: Partikeldichte in Abhängigkeit von der gemessenen rel. Lichtintensität.









Ein Erhöhung der Sondenkonzentration verursachte einen starken Anstieg der Signalstärke sowohl in der Partikeldichte, als auch im Wert der relativen Lichtintensität auf den Mikrochemotopen, sowie einen leichten Anstieg des Hintergrundwertes. Der Vergleich der Signale aus den beiden Charakterisierungsformen ergibt einen linearen Zusammenhang. Aus dem Anstieg dieser Geraden kann ein Umrechnungsfaktor von einem Signal-Typ in den anderen ermittelt werden.



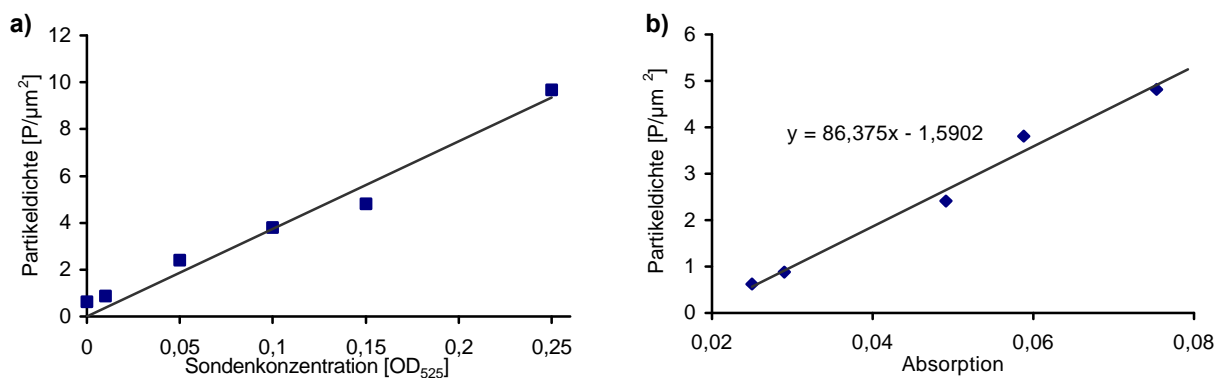
### 3.4.2 BESTIMMUNG DER OPTISCHEN NACHWEISGRENZE DER NANOPARTIKEL-MARKIERUNG

#### 3.4.2.1 Empfindlichkeit des optischen Nachweises

Die Proben waren bei der mikroskopischen Kontrolle in der Nähe der Ränder relativ inhomogen. Darum erfolgte die Quantifizierung jeweils in der Probenmitte. Die Partikeldichte zeigte im stark verdünnten Bereich eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration (siehe Tabelle 22 und Abbildung 55). Die optische Auswertung zeigte in diesem Bereich ihre Empfindlichkeitsgrenze. Für eine bessere Empfindlichkeit der optischen Detektion wurden die Proben silberverstärkt. Die Absorption wurde nach der Verstärkung bestimmt. Anhand von AFM-Aufnahmen wurden die Partikelgrößen vor und nach der Silberverstärkung ermittelt. Vor der Reaktion lag der Durchschnitt bei 30 nm, danach bei 150 nm.

<b>OD<sub>525</sub></b>	<b>0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,15</b>	<b>0,2</b>	<b>0,25</b>
<b>Partikeldichte [P/μm<sup>2</sup>]</b>	0,62	-	0,88	2,41	3,81	4,82	3,48	9,67
<b>Absorption</b>	0,02499	-	0,0289	0,0491	0,0588	0,0753	-	0,0792
<b>Durchlichtaufnahmen nach der Silberverstärkung</b>								

**Tabelle 22:** Partikeldichten und quantifizierte Graustufenwerte der Durchlichtaufnahmen der Proben (Schema 3.1).



**Abb. 55:** Abhängigkeit der Partikeldichten und der Absorption von der eingesetzten Sondenkonzentration der Proben ohne Ausreißer (Schema 3.1). □: Partikeldichte in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration. ♦: Partikeldichte in Abhängigkeit von der Absorption der Proben.

Die Abhängigkeit der detektierten Absorption von der eingesetzten Nanopartikel-Konzentration zeigt die gleiche Tendenz wie die Abhängigkeit der Menge der gebundenen Nanopartikel von der Konzentration. Unterhalb einer Sondenkonzentration von 0,01 OD (3,33 pM) sind die Nanopartikel als individuelle Objekte erkennbar.

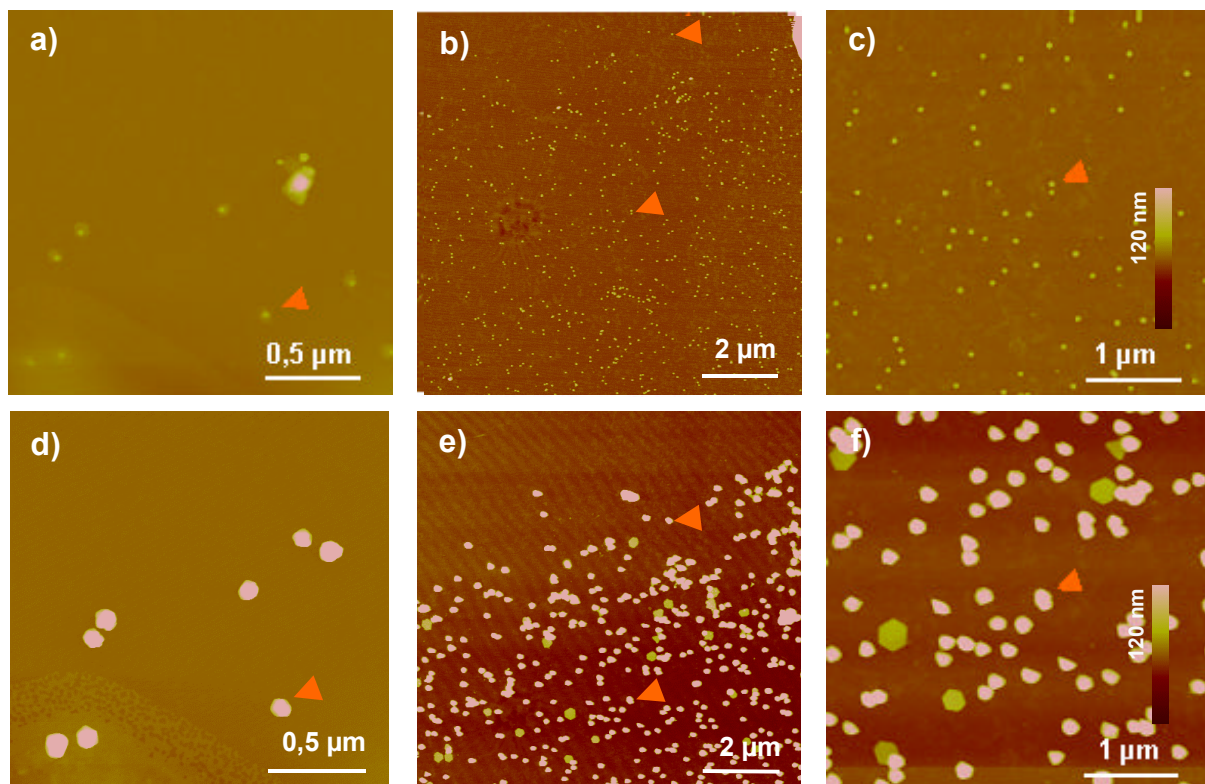
#### 3.4.2.2 Nachweis einzelner Bindeereignisse - Einzelpartikelnachweis

Anhand von rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 56a-f) wurde nach der Silberverstärkung ein definierter Zuwachs der Nanopartikel-Durchmesser detektiert (Abbildung 56d-f). Dieser lag bei 150 nm. Auf den Detailaufnahmen wurden individuelle Nanopartikel wiedergefunden.

Nur ein geringer Anteil der Partikel wurde während der Verstärkungsreaktion von der Probe geschwemmt. Die Reaktion selbst lieferte keinen Hintergrund und es wurden keine Salzablagerungen gefunden. Beim Vergleich der unspezifisch und spezifisch gebundenen Sonden gab es ebenfalls keine sichtbaren Unterschiede.

Optisch konnten vor der Silberreaktion (außer gelegentlichen Verunreinigungen) nahe der Markierungskreuze keine individuellen Objekte erkannt werden (Abbildung 57a und c).

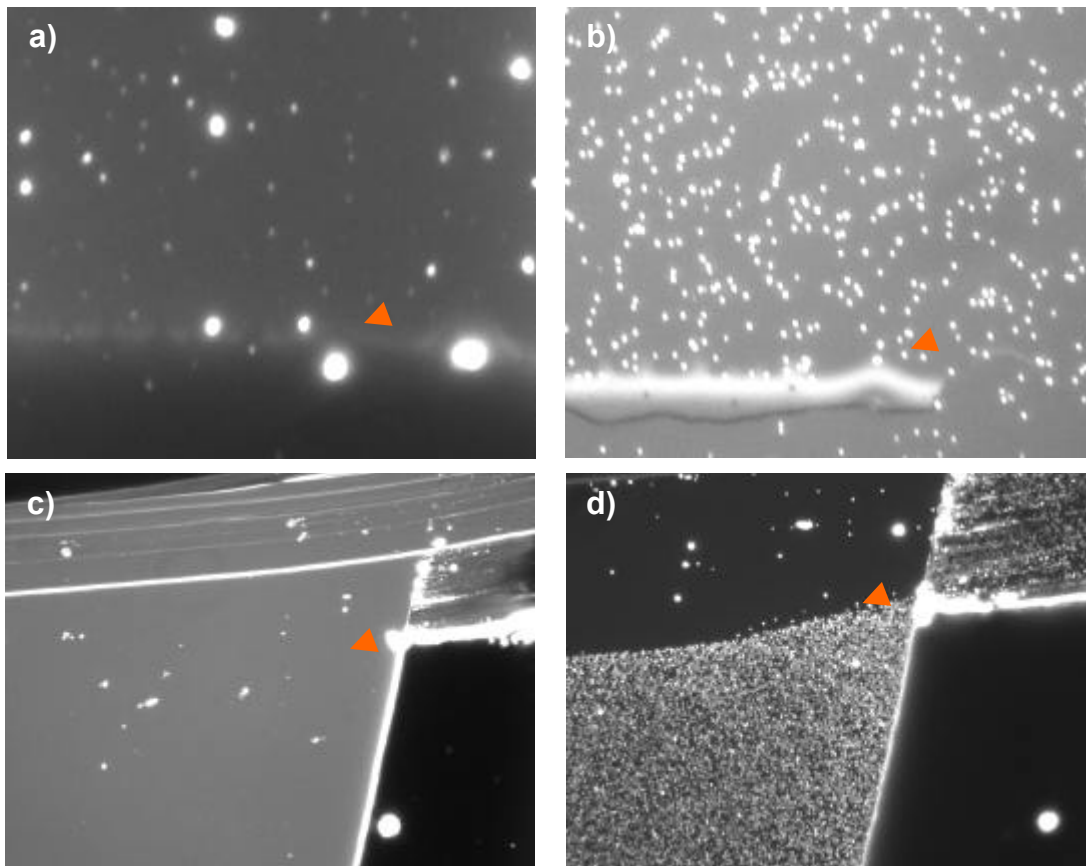
Nach der Verstärkung wurden schon bei einer 500fachen Vergrößerung die Nanopartikel sichtbar, vor allem bei den niedrigen Bedeckungsdichten (Abbildung 57b und d). Es war auch ohne Bildverarbeitung möglich, ein ausgewähltes Partikel wiederzufinden.



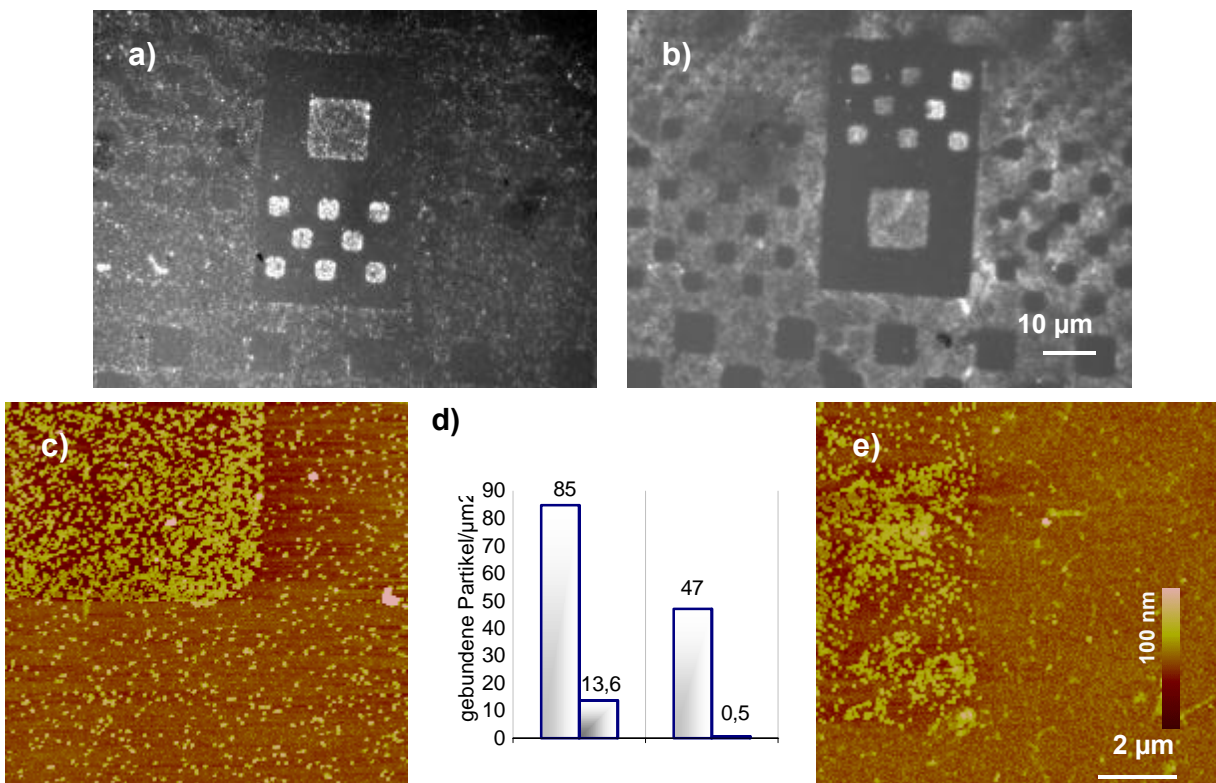
**Abb. 56:** Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung individueller DNA-Nanopartikel-Komplexe (Schema 3.1). **a)** und **d)** unspezifisch immobilisierte Probe; **b)**, **c)**, **e)** und **f)** spezifisch gebundene Probe. **a)** bis **c)** vor der Silberverstärkung; **d)** bis **f)** nach der Verstärkung.

### 3.4.3 MARKIERUNG DURCH FORMIERUNG VON TRIPLEXSTRUKTUREN

Durch verschiedene Inkubationsbedingungen, verschiedene Kinetiken und energetische Unterschiede, wurde bei diesem Versuch eine geringere Bindungseffizienz der Nanopartikel-Komplexe bei der Triplexformierung erwartet, als bei den Duplexen. Diese geringere Bindungseffizienz konnte nachgewiesen werden. Die Nanopartikeldichten auf den Mikrochemotopen waren entsprechend unterschiedlich. Die Bindung durch Triplexstrukturen lieferte bei niedrigeren Hybridisierungstemperaturen und längeren Reaktionszeiten ca. 55% der Dichte, welche bei höheren Temperaturen und kürzerer Reaktionsdauer für die Duplexstrukturen erreicht wurde.



**Abb. 57:** Optische Aufnahmen der Proben vor (a und c) und nach der Verstärkungsreaktion (b und d); a) und b) unspezifisch immobilisierte Probe; c) und d) spezifisch gebundene Probe (Schema 3.1).



**Abb. 58:** Vergleich der Proben mit Duplex- und Triplexformierung. a) und c) Auflicht- und AFM-Aufnahmen der Chips der Klasse 6 mit Nanopartikel-Markierung durch Duplexstruktur (Schema 3.3). b) und e) Auflicht- und AFM-Aufnahme der Chips mit Triplex-Markierung (Schema 3.4). d) Vergleich der Partikeldichten innerhalb (jeweils links) und außerhalb (jeweils rechts) der Mikrochemotope.

## **Kapitel 4**

## **DISKUSSION**

## 4.1 BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON PLANAREN OBERFLÄCHEN

Durch den gezielten Aufbau von SAMs auf planaren Oberflächen wurde eine orts aufgelöste Funktionalisierung mit Oligonukleotiden erzeugt. Dabei wurden gezielt bestimmte Stellen eines Substrates mit einer spezifischen Funktion, andere mit einer Schutzfunktion versehen. Mikrostrukturierte Chips boten dazu differenzierte, durch die photolithographische Strukturierung vorgegebene, Muster mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften in lateral getrennten Lokalisationen. Diese teilweise orts aufgelöste Oberflächenmodifizierung wurde unter Verwendung der im Mittelpunkt der Arbeit stehenden Nanopartikel-Markierung charakterisiert.

Die Funktionalisierung der Oberflächen mit Oligonukleotid-SAMs basierte auf erprobten Methoden der SAM-Technik. Ein kritischer Punkt war dabei die Handhabung der Thiol-Oligonukleotide. Die Methode der Aufreinigung der Thiol-Oligonukleotide und der Auswahl der zu verwendenden Fraktionen war ein wichtiges Element bei der erfolgreichen Monolagenherstellung. Durch die Verwendung eines ausreichenden Überschusses an Thiol-Oligonukleotiden, der Kontrolle der Thiol-Aktivität der eingesetzten Fraktionen und einer ausgewählten Inkubation wurde eine hohe Bedeckungsdichte mit SAMs erwartet. Demnach sollten die Dichten im Idealfall zwischen  $6 \times 10^{12}$  (Steel et al. 1999) und  $8,85 \times 10^{13}$  Moleküle/cm<sup>2</sup> (2.2.1.4) liegen. Die verschiedenen Literaturwerte (siehe Tabelle 1) sind auf unterschiedliche Inkubationsparameter und Oberflächenrauigkeiten zurückzuführen. Die in der Arbeit auf indirekte Weise ermittelten hohen Werte für die Bedeckungsdichten ( $9 \times 10^{13}$  Moleküle/cm<sup>2</sup>) wurden durch unspezifische Adsorption Thiol-modifizierter Oligonukleotide an den Gefäßwänden verursacht. Die tatsächlichen Dichten liegen vermutlich darunter. Eine direkte Ermittlung der Bedeckungsdichten mit anderen Charakterisierungsmethoden war unter den gegebenen Umständen nicht möglich, wird aber für ~~Das~~ ~~Optimierungskomplex~~ ~~das~~ Bild eines Oligonukleotid-SAM zeigte **keine signifikanten Unterschiede** gegenüber reinen Goldoberflächen. Lediglich die Abrundung der Korn Grenzen deutete auf eine Anwesenheit von Oligonukleotiden. Das entspricht auch den Beobachtungen anderer Gruppen (Niemeyer et al. 1999), ist jedoch kein eindeutiger Hinweis auf das Vorhandensein der SAMs, da dieser Effekt auch durch eine veränderte Geometrie der Abtastspitze erklärt werden kann. Eine Charakterisierung mit Techniken der Sensorik (SPRS, Georgiadis et al. 2000, EQCM, Wang et al. 1999) war zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, wird aber für weitere Arbeiten geplant.

Eine biologische Funktionalisierung planarer Oberflächen wurde in dieser Arbeit durch die Bildung von SAMs realisiert. Dabei wurden **assemblierte heterogene und quervernetzte homogene Monoschichten** verwendet. Das Prinzip der Selbstorganisation ist mit der gezielten Auswahl der Monoschicht-aufbauenden Moleküle auf unterschiedliche Substrattypen übertragbar. Entscheidend für die Funktionalität der Oberfläche war die verwendete Sequenz der Oligonukleotide im SAM.

## 4.2 BIOLOGISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN

DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden durch eine Thiol-Oligonukleotid-Modifizierung kolloidaler Gold-Lösungen hergestellt (Mirkin et al. 1996). Die Funktionalisierung war vergleichbar mit der

Erzeugung von SAMs auf planaren Oberflächen. Der Herstellungsprozess beinhaltet mehrere kritische Faktoren. Einer davon war, wie auch bei der planaren SAM-Herstellung, die **Aktivität der Thiol-Gruppen**. Im Falle der Herstellung der Komplexe spielte die Fraktionsauswahl, die Inkubationsdauer und die Entgasung der Lösungen eine wesentliche Rolle.

Die Bedeckungsdichten der mit Oligonukleotiden konjugierten Nanopartikel konnten mit indirekten Methoden nur unzureichend charakterisiert werden. Die Werte überschritten meist den tatsächlichen Verbrauch. Dieser zu hohe Verbrauch an Oligonukleotiden deutete auf einen Verlust von Molekülen durch unspezifische Bindung an der Gefäßwand hin. Insgesamt kann man aber von einer Bedeckungsdichte unter dem theoretisch ermittelten Wert ausgehen. Eine mögliche Alternative für die Bestimmung der genauen Anzahl der pro Partikel gebundenen Oligonukleotide wäre die gelelektrophoretische Charakterisierung vorstabilisierter Partikel (Zanchet et al. 2001, siehe auch Absatz Agarose-Gelelektrophorese).

Da die **Farbe** der DNA-Nanopartikel-Komplexe (resultierend in den Absorptionsspektren) als Monitor des kolloidalen Zustandes diente und eine unzureichende Bedeckung der Nanopartikel zu einer irreversiblen Koagulation der Lösung führte, wurden die stabilen DNA-Nanopartikel-Komplexe als ausreichend bedeckt angesehen. Diese Komplexe waren für einen langen Zeitraum **stabil** (3 Monate bis zu 1 Jahr) und hatten eine ausreichende **Beständigkeit** gegenüber hohen Salzkonzentrationen und pH-Veränderungen.

Die gelelektrophoretische Charakterisierung der Komplexe zeigte eine **Stabilisierung** der kolloidalen Goldlösung durch die Oligonukleotid-Modifizierung. Unkonjugierte Nanopartikel litten in den Gelen unter partieller Koagulation, was durch die Salzkonzentration und den pH-Wert der Matrix verursacht wurde. Kleinere Partikel zeigten dabei eine größere Stabilität als größere, was sich in der Länge der Koagulationsstrecke widerspiegelte. Konjugierte Partikel zeigten keine Koagulation in den Gelen und konnten aufgetrennt werden.

Die unterschiedlichen Laufstrecken zwischen verschiedenen Ansätzen gleichen Oligonukleotidtyps und die Breite der Banden deuteten auf einen **unterschiedlichen Bedeckungsgrad** der Oberflächen mit Oligonukleotid-Molekülen hin. Bei gleichen Maxima waren die Banden unterschiedlich breit.

Zwischen unterschiedlich langen Oligonukleotiden konnte eine **Differenz in der Laufgeschwindigkeit** detektiert werden. Partikel mit kürzeren Oligonukleotiden liefen langsamer, als die mit längeren Ketten. Das impliziert, dass die höhere Beladung der Partikeloberfläche mit kürzeren Oligonukleotiden gegenüber der größeren Anzahl der Basen bei längeren Oligonukleotiden im Laufverhalten dominiert.

Einen Einfluss der pro Partikel insgesamt gebundenen Basenanzahl auf die Laufgeschwindigkeit der Sonde ist ohne Zweifel anzunehmen. Vorstabilisierte Partikel scheinen, durch ihre Ligandenhülle, gegenüber den in Gelen herrschenden Faktoren widerstandsfähiger zu sein und schneller als die Oligonukleotid-konjugierten Partikel zu laufen (Zanchet et al. 2001). Die hier verwendete diskrete Menge an Oligonukleotid-Liganden verringerte offenbar definiert die Geschwindigkeit der Komplexe (Leiter!).

Im Falle von vergleichbaren Bedeckungsdichten und gleichgroßen Nanopartikeln können vermutlich sogar Unterschiede von nur einer Base des gebundenen Targets mit dieser Technik nachgewiesen werden. Durch die relativ hohe Bedeckungsdichte mit größeren Partikeln tritt ein Verstärkungseffekt auf, was den Nachweis erleichtert.

Die **Partikelgröße** bewirkte ebenfalls einen Unterschied im Laufverhalten der DNA-Nanopartikel-Komplexe. Komplexe mit kleinerem Partikel-Durchmesser hatten eine höhere Laufgeschwindigkeit, als solche mit größerem Durchmesser.

Die eingesetzte **Konzentration** von DNA-Nanopartikel-Komplexen hatte **keine Auswirkung** auf die Laufstrecke, sondern ausschließlich auf die Signalintensität.

Die Empfindlichkeit der Detektion von DNA-Nanopartikel-Komplexen liegt ohne Verstärkung bei **10 fmol** Oligonukleotid, mit Verstärkung bei **5 fmol**. Dieser Wert ist vergleichbar mit den Werten aus Nanopartikel-markierten Proben gespottet auf Dünnschichtplatten (10 fmol -Elghanian et al. 1997).

Insgesamt steht mit dieser Technik ein gutes Werkzeug für die Charakterisierung der Komplexe zur Verfügung. Außer der Gelelektrophorese führt keine der verwendeten Methoden zur einer ausreichenden Charakterisierung der Komplexe. Die spektroskopische Untersuchung liefert über die Bedeckungsdichten der Partikel-Oberflächen, wegen der überlappenden Absorptionsmaxima, keinen quantifizierbaren Extinktionswert (Loweth et al. 1999). Die gelelektrophoretische Charakterisierung bietet dagegen eine Möglichkeit zur Ermittlung genauer Partikel-Oligonukleotid-Verhältnisse.

Eine Optimierung des Herstellungsprozesses und der Bestimmung der Bedeckungsdichten auf der Partikel-Oberfläche kann unter Verwendung von Stabilisatoren durchgeführt werden. Durch die Anwendung von **SPPD als Ligand** vor der Konjugation mit Thiol-modifizierten Oligonukleotiden könnte eine **höhere Stabilität** der Komplexe erreicht werden. Eine genaue Charakterisierung dieser Komplexe steht aber noch aus. Ein Vorteil der stabilisierten Komplexe ist die Möglichkeit einer genauen Einstellung des Oligonukleotid-Nanopartikel Verhältnisses. Bei einem Verhältnis von 1:1 zwischen Oligonukleotid und Partikel könnten die Bindungsereignisse genauer quantifiziert werden.

### 4.3 MOLEKULARE NANOKONSTRUKTIONEN

Der Kernteil der Arbeit beschäftigte sich mit der Herstellung molekularer Nanokonstruktionen. Dabei wurden Teilprodukte des Baukastensystems erstellt und charakterisiert. Auf komplexe Strukturen wie 2D- und 3D-DNA-DNA-Konstrukte wurde verzichtet. Es wurde hauptsächlich die Herstellung einfacher Konstrukte, wie 1D-Kettenverlängerungen und einfache Markierungen, erprobt.

#### 4.3.1 IMMOBILISIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE

DNA-Moleküle wurden durch ihre Affinität zu den Oligonukleotid-SAMs auf planare Oberflächen immobilisiert. Einen indirekten Hinweis auf die **Bindungsspezifität** lieferte die Schmelzkurvenbestimmung der in den Lösungsansätzen eingesetzten Sequenzen. Diese kann in einem parallelen Versuch wichtige Informationen über die Bindung liefern und dient dadurch als Charakterisierung der effektiven Bindung in planarer Anordnung. Weitere Informationen können nur unter Verwendung

von markierungsfreien Charakterisierungsmethoden (Nelson et al. 2001) oder mit Hilfe von markierten Sonden (Csáki et al. 2002) gewonnen werden.

Die **Affinitätsimmobilisierung langer DNA wurde durch Ligation** der Oligonukleotid-SAM und dem cos-Ende der  $\ddot{e}$ -DNA **stabilisiert**. Dies war eine notwendige Voraussetzung für eine stabile Bindung der Moleküle auf die Oberflächen.

Eine Charakterisierung der gebundenen DNA-Komplexe erwies sich als relativ problematisch. Eine Detektion mit Fluoreszenz-Farbstoffen im Elektrodenspalt ist zwar möglich (Braun et al. 1998, Storm et al. 2001, Richter 2001a), die Färbung verändert aber die Struktur des Moleküls und ist dadurch nicht für jede Zielstellung geeignet. Die rasterkraftmikroskopische Detektion spezifisch immobilisierter DNA-Moleküle verändert zwar nicht deren Struktur, ist aber relativ aufwändig, uneffektiv und abhängig von der Oberflächenrauigkeit. Auf den Goldoberflächen konnte dadurch nur gelegentlich ein  $\ddot{e}$ -DNA-Molekül detektiert werden. Der Durchmesser von dsDNA-Molekülen von nur ca. 1 nm im eingetrockneten Zustand erschwert die Charakterisierung zusätzlich. Lediglich eine **Adressierung** der Immobilisierung an Gold-Strukturkanten führte zur gewünschten Detektion.

Im weniger rauhen **Elektrodenspalt** konnten schließlich gebundene Einzelmoleküle detektiert werden. Ein wichtiges Kriterium war hierbei die **Salzkonzentration** der benutzten Hybridisierungspuffer. Eine zu hohe Salzkonzentration führte zu einer clusterartigen Verunreinigung der Proben. Ein anderer wichtiger Faktor war der Einsatz der Durchflusskammer nach der Bindung. Diese realisierte die **Streckung** und **Orientierung** einseitig gebundener langer DNA-Stränge. Eine derartige Immobilisierung in lateraler Anordnung kann man auch für komplexere DNA-Konstrukte verwenden. Das Kriterium dafür ist lediglich ein partieller (und für die Bindung frei verfügbarer) Einzelstrang im Konstrukt.

Die Vorteile der Verwendung der **Planartechnik** bestehen in der Möglichkeit der lateralen Positionierung und der Ausbildung homogener Schichten (Köhler et al. 2001a). Idealsubstrate für die Nanotechnologie sind planparallele Substrate mit Arealen unterschiedlicher chemischer Natur. Die Möglichkeit der Parallelisierung und der an allen Punkten identischen Distanz zur Detektionseinheit bei Planartechniken ermöglicht außerdem eine technologische Realisierung der Bauelement-Herstellung, sowie ein einfaches Auslesen von Informationen.

Durch die Auswahl des verwendeten **Layouts der Mikrostrukturen** und nach Quantifizierung der statistischen Verteilung der Bindungsdichten können die Zielmoleküle gezielt in Elektroden-Anordnung positioniert werden. Erste Versuche mit der Zielsetzung nanotechnologische Bauelemente z.B. für Einzelelektronen-Transistoren (SET - *single electron tunneling*) technologisch umzusetzen, wurden mit dem im Versuch 2.2.4.1 verwendeten Aufbau teilweise realisiert (Maubach et al. 2003). Die Dimension der Elektroden (Bindefläche:  $4 \times 1 \mu\text{m}$ ) ermöglichte eine gezielte Immobilisierung individueller DNA-Moleküle ( $\ddot{e}$ -DNA) in planarer Anordnung. Pro Elektroden-Paar wurde jeweils genau ein Doppelstrang gebunden (mit einer Effizienz von 6 aus 32 Versuchen) und über den Elektrodenspalt gespannt. Solch ein Aufbau in Kombination mit weiteren Konstruktionsschritten oder einer gezielten Markierung mittels DNA-Nanopartikel-Komplexen ergibt zahlreiche technologische Variationen für die Nanoelektronik. Die DNA-Moleküle können bei der Umsetzung eine Mat-



rix-Funktion, als statisches Gerüst mit dem Potenzial zur nanometergenauen Positionierung, erfüllen. Eine andere Möglichkeit besteht in der Erstellung dynamischer Systeme, wie z.B. schaltbare DNA-Aggregate.

### 4.3.2 NANOPARTIKEL-MARKIERTE NUKLEINSÄURE-KOMPLEXE

Der Einsatz der DNA-Nanopartikel-Komplexe als Farbttest-Hybridisierungsnachweis in Verbindung mit kurzen Linkersystemen wurde schon in der Einleitung erwähnt (Mirkin et al. 1996, Alivisatos et al. 1996). Dieses System konnte auch bei der direkten Hybridisierung zweier DNA-Nanopartikel-Komplexe angewendet werden. Eine Hybridisierung zwischen komplementäre Sequenzen tragenden Nanopartikeln führte zur **reversiblen Farbveränderung** der Lösung. Die Verschiebung der Absorptionsmaxima in Richtung höherer Wellenlängen wird durch die definierte Annäherung der Partikel verursacht.

Desweiteren wurde eine **Nanopartikel-Markierung an langen DNA-Strängen** durchgeführt, zunächst ohne, dann mit Stabilisierung durch Ligation. Die Endmarkierungen der  $\epsilon$ -DNA-Moleküle an ihren cos-Enden wurden mit Agarose-Gelelektrophorese und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert. Eine erfolgreiche Markierung der Moleküle konnte in den Gelen nicht nachgewiesen werden. Die Ursachen für das Fehlen des Signals waren vermutlich die im elektrischen Feld herrschenden Kräfte, sowie eine unterhalb der Nachweisgrenze liegende Konzentration markierter Moleküle. Entweder wurden die Moleküle durch die Wirkung des elektrischen Feldes von der Nanopartikeloberfläche abgerissen und/oder die Konzentration der freigesetzten  $\epsilon$ -DNA lag unter der Nachweisgrenze oder es war nur ein geringer Anteil an markierten Molekülen vorhanden.

Eine **enzymatische kovalente Verknüpfung** des Rückgrats der DNA-Stränge verhalf diesen zu einer höheren Stabilität. So konnten mit dem Rasterkraftmikroskop durch Kapillarkräfte gestreckte markierte Moleküle auf den Glimmeroberflächen detektiert werden. Die Moleküle wiesen eine **Länge** von ca. **85% der B-Konformation** auf. Dieser Wert entspricht dem Erwartungswert für auf Glimmer gestreckte DNA-Moleküle (Thundat et al. 1994). Die markierten Moleküle lagen nur im zentralen Teil der Proben gestreckt vor, so dass diese ausreichend charakterisiert werden konnten. Ein Teil der Moleküle blieb in der Markierungsreaktion ohne Nanopartikel oder diese wurden beim Strecken durch Kapillarkräfte von der Partikel-Oberfläche abgerissen.

**Definierte Fragmente aus dem Gemisch eines Restriktionsverdau** wurden nach dem gleichen Prinzip **markiert**. Die Spezifität der Bindung der Moleküle an DNA-Nanopartikel-Komplexe konnte mit einer rasterkraftmikroskopischen Charakterisierung nachgewiesen werden. Fragmente ohne das entsprechende cos-Ende wurden nicht markiert. Diese Methode ermöglicht eine Separation spezifischer DNA-Moleküle aus einem Gemisch und eignet sich dadurch für Nano2Bio-Ansätze.

Die **sequenzspezifische Markierung** entlang eines einzelnen DNA-Stranges konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Die Lage der gebundenen Nanopartikel deutet jedoch auf eine Bindung entlang des Moleküls hin. Eine Nachweis der sequenzspezifischen Bindung sollte durch die Verwendung alternativer Charakterisierungsmethoden im weiteren erfolgen.

Eine der Verwendung von DNA-Nanopartikel-Komplexen vergleichbare Markierung ist auch mittels biotinierten Oligonukleotiden in Verbindung mit Streptavidin-Goldpartikeln möglich (Shaiu et

al. 1993a, b, Maeda et al. 1999). Diese Versuche zeigten eine ähnliche Effizienz der Markierung. Dabei wurden 15% der Moleküle spezifisch markiert (Maeda et al. 1999). Insgesamt muss man von einer relativ niedrigen Effizienz der sequenzspezifischen Markierung ausgehen. Eine mögliche Ursache für diese Uneffizienz der Bindung liegt in der sterischen Hinderung der Hybridisierung durch die Größe des Nanopartikels. Auch kann ein unzureichendes Aufschmelzen der Doppelstränge bei großen DNA-Molekülen für diesen Effekt verantwortlich sein.

Eine mögliche Alternative der sequenzspezifischen Markierung langer DNA-Moleküle bietet die Markierung durch Ausbildung von Triplex-Strukturen auch in invasiver Form (Bukanov et al. 1998, LaBean 2000, Keren et al. 2002), die Markierung mit DNA-Analogen wie PNA (Nielsen 1999), das Labeling durch die Verwendung markierter Interkalatoren und die Möglichkeit der enzymatischen Manipulation in Verbindung mit Nanopartikeln (Taylor et al. 2000).

Die **direkte Markierung eines mit thiolisiertem Primer hergestellten PCR-Fragmentes** konnte erfolgreich gezeigt werden. Die Direktanbindung von PCR-Fragmenten auf Nanopartikel ermöglicht deren verbreitete Anwendung in der molekularen Diagnostik. Durch die direkte Markierung von PCR-Produkten können diese gezielt in Mikroarray-Techniken als "*probe*" eingesetzt werden.

Die Nanopartikel-Markierung von DNA-Molekülen ist für molekulare Konstruktionstechniken geeignet, birgt aber auch ein großes Potenzial für die molekulare Diagnostik und Einzelmolekül-Techniken in sich. Parallele Ansätze sind in beiden Fällen möglich. Eine Optimierung dieser Markierungstechnik bedarf noch der Charakterisierung der markierten Moleküle. Für die nanobiotechnologischen Konstruktionstechniken besteht dieses Problem jedoch nicht. Durch ein Anknüpfen der Moleküle an definierte Mikrostrukturen (siehe 4.3.1), also durch die Option der Positionierung, wird eine Charakterisierung ermöglicht. Ein wesentlicher Vorteil der Markierung mittels Nanopartikeln liegt in den mechanischen und physikalischen Eigenschaften dieser Objekte begründet. Eine Nanopartikel-Markierung ist formstabil und dauerbeständig. Eine nanotechnologische Umsetzung von Konstrukten mit Partikel-Markierung ist demnach gut vorstellbar. Durch die Leitfähigkeit der Metall-Partikel können auch nanoelektronische Aufbauten, z.B. mit einer Schaltfunktion umgesetzt werden.

### 4.3.3 IMMOBILISIERTE NANOPARTIKEL-KOMPLEXE – CMFs

Eine spezifische Bindung von DNA-Nanopartikel-Komplexen auf Oligonukleotid-Affinitätsschichten der statischen Komponenten des Systems führte zur Ausbildung von **kolloidalen Metall-Filmen** (CMFs) auf den Oberflächen. Das Nanopartikel auf der Substratoberfläche ist das eigentliche Signal der spezifischen Bindung und wurde vorrangig mit dem AFM charakterisiert. Anhand von REM-Aufnahmen konnten CMFs auch über größere Bereiche charakterisiert werden. Diese zeigten, trotz vorhandener Verunreinigungen, eine homogene Verteilung der Kolloide auf der Oberfläche.

Die rasterkraftmikroskopische Charakterisierung liefert einen, in den Partikeldichten enthaltenen, genauen Wert des Nanopartikel-Signals. Dieses Signal wurde zunächst auf seine Spezifität hin überprüft. Die Kontrollen wiesen auf unspezifische Bindungen unter dem Niveau des tatsächlichen Signals (Csáki et al. 2001) hin. DNA-Nanopartikel-Komplexe zeigten lediglich zu reinen Goldoberflächen

chen eine erhöhte Affinität. Die Ursache dieser hohen Bindungsaffinität liegt vermutlich in der unspezifischen Wechselwirkung zwischen den Stickstoffatomen der DNA und der Goldoberfläche (Beebe 1995). Da man aber bei der Funktionalisierung der Goldoberflächen von intakten SAMs ausgehen kann, können unspezifische Anbindungen ausgeschlossen werden.

Die Anzahl der gebundenen Partikel pro Flächeneinheit wurde in der Arbeit in Abhängigkeit von variierenden Parametersätzen in verschiedenen Ebenen der Markierung bestimmt. Das Ziel dieser Quantifizierung war die reproduzierbare Erzeugung von bestimmten Partikeldichten.

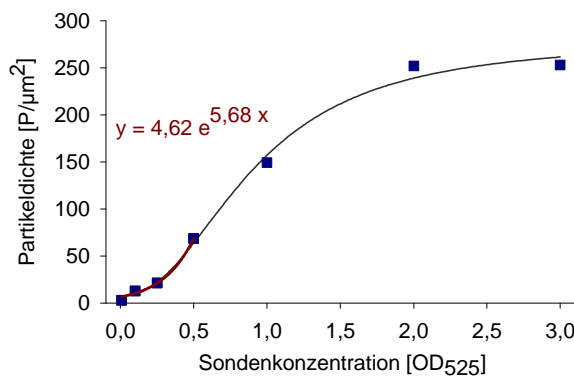
Der serielle Aufbau der immobilisierten Ketten wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen langen Linkersequenzen durchgeführt, um diese miteinander zu vergleichen. Eigenschaften wie **Kettenlänge** und **Bindungsreihenfolge** sollten sich in den Partikeldichten widerspiegeln. Eine längere Kette bewirkte eine Senkung der Bindungseffizienz. Ein Vergleich mit Literaturwerten bestätigt die gefundene Abhängigkeit der Bedeckungsdichte von den Längen der SAM-bildenden Moleküle (Steel et al. 2000). Das Absinken der Signalstärke hängt demnach mit der **Länge** der Moleküle zusammen. Eine **Inkubationsreihenfolge**, in dem die Hybridisierung der DNA-Nanopartikel-Komplexe mit dem Linker als erster Schritt durchgeführt wird, bewirkte ebenfalls eine drastische Reduktion der Hybridisierungseffektivität. Die Ursache dieses Effektes liegt vermutlich in der sterischen Behinderung des zweiten Hybridisierungsschrittes.

Die erste Ebene im Prozess der Quantifizierung bildete die **SAM-Ebene**. Durch die Mischung zweier Thiol-Oligonukleotide (bindende und nichtbindende) in verschiedenen Mischungsverhältnissen während der Ausbildung der Monolage sollte eine Dichte für die Markierung vordefiniert werden. Die Resultate zeigten in erster Näherung einen positiven Zusammenhang zwischen den Partikeldichten und der Konzentration bindender Thiol-Oligonukleotide. Dieser Effekt wird lediglich durch eine Sättigung der Flächen mit Nanopartikeln begrenzt. Durch die Verwendung zweier, in der Länge identischer, Sequenzen sollte diese Quantifizierung weiter verfeinert werden. In diesem Fall konnte kein positives Ergebnis erzielt werden. Dafür könnte die unterschiedliche Thiol-Aktivität der Oligonukleotide verantwortlich gewesen sein.

Durch definierte Mischung zweier Linker-Sequenzen bei gleicher SAM-Dichte und Konzentration der eingesetzten Sonden wurde die Linkerebene quantifiziert. Dabei konnte eine **positive Abhängigkeit der Partikeldichte von der relativen Konzentration bindender Linker** nachgewiesen werden (Abbildung 37). Mit einer dekadisch-seriellen Verdünnungsreihe der relativen Linkerkonzentration wurde ein breiter Messbereich abgedeckt. Jedoch könnten mit einer Verfeinerung des Bereichs der relativen Linkerkonzentration zwischen 0,1 und 0,01 noch weitere Informationen über den genauen Zusammenhang zwischen Parameter und Produkt gewonnen werden.

Eine Quantifizierung des Signals auf der **Markierungsebene** wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Sonde durchgeführt. Die Signalstärke zeigte in Abhängigkeit von der eingesetzten Sondenkonzentration für einen breiten Konzentrationsbereich einen sigmoidalen Verlauf. Dieser Verlauf entspricht Hybridisierungsreaktionen auf Festkörperoberflächen (Mbindyo et al. 2001, Nelson et al. 2001). Bei niedriger Konzentration verläuft die Kurve annähernd linear. Die Erhöhung der Sondenkonzentration bewirkt einen **exponentiellen Anstieg** der Partikeldichte [2], was auf einen **koopera-**

**tiven Effekt** der anorganisch-dynamischen Komponente bei der Hybridisierung hinweist. Dieser wurde unter den gegebenen Umständen (3.3.2.5) mit einer Rate von 5,68 bestimmt. Bei hohen Konzentrationen flacht die Kurve ab, was auf eine Sättigung der Partikeldichte deutet. Die maximale Partikeldichte beträgt **ca. 250 Partikel/ $\mu\text{m}^2$**  (bei einer Sondenkonzentration über 600-700 pM). Diese bildet für die Hybridisierung unter den bestehenden Inkubationsbedingungen die Sättigungsgrenze.



**Abb. 59:** Abhängigkeit der Partikeldichten von der eingesetzten Sondenkonzentration. Rotmarkiert ist die Abhängigkeit der Partikeldichten von der eingesetzten Sondenkonzentration bei geringen Sondenkonzentrationen.

Die Abhängigkeit der Partikeldichte von der eingesetzten Sondenkonzentration kann mit folgenden Gleichungen beschrieben werden:

$$\frac{d\Gamma}{dc} = k \cdot \Gamma \frac{\Gamma_{\max} - \Gamma}{\Gamma_{\max}} \quad [1]$$

bei kleinen Sondenkonzentrationen: 
$$\frac{d\Gamma}{dc} = k \cdot \Gamma \quad [2]$$

Die maximale Partikeldichte entspricht einer 20%-igen Bedeckung der Oberfläche mit Nanopartikeln bezogen auf das geometrisch mögliche Maximum (es wurden niemals mehr als ca. 40% der geometrisch möglichen Dichte erreicht!). Der **reale Platzbedarf** eines 30 nm DNA-Nanopartikel-Komplexes beträgt demnach rund **4000 nm<sup>2</sup>** (gegenüber den theoretischen 707 nm<sup>2</sup>). Unter der Voraussetzung, dass auf den Oberflächen ein idealer SAM erzeugt wurde, wurde pro 240 Oligonukleotiden im SAM ein DNA-Nanopartikel-Komplex immobilisiert. Ein so hoher effektiver Platzbedarf der DNA-Nanopartikel-Komplexe gegenüber dem theoretisch ermittelten bei spezifischer Bindung auf einen Oligonukleotid-SAM wurde auch bei anderen Gruppen beobachtet (Taton et al. 2000b, für 13 nm Nanopartikel 357 nm<sup>2</sup> anstatt 133 nm<sup>2</sup>).

Die Hybridisierungsreaktion zeigte unter den gegebenen Bedingungen einen **irreversiblen** Verlauf. Keine der verwendeten Methoden führte zu einer Dissoziation der Doppelstränge zwischen den Komponenten. Dieser Effekt kann mit der Partikelgröße zusammenhängen. Durch die Partikelgröße von 30 nm könnten mehrere Bindungen zwischen den Komponenten generiert worden sein. Die tatsächliche Anzahl der Bindungen zwischen einem DNA-Nanopartikel-Komplex und der Affinitätsschicht der Oberfläche konnte mit den verwendeten Methoden nicht ermittelt werden.

Die Markierung der Oligonukleotid-Affinitätsschichten auf Festkörperoberflächen mit DNA-Nanopartikel-Komplexen konnte entsprechend der vorgegebenen Mikrostrukturierung und den da-

mit verbundenen differenzierten Oberflächeneigenschaften gezeigt werden. Die Komplexe wurden auf den Elektroden **positioniert immobilisiert**. Der Schutz durch die ODTs-Silanisierung verhinderte unspezifische Bindungen im Elektrodenspalt. Der Aufbau einer Affinitätsschicht ist aber ebenso auf den Oberflächen des Elektrodenspalts möglich (Möller et al. 2000a, b).

Die **adressierte Immobilisierung der Komplexe mit Hilfe eines elektrischen Feldes** zeigte einen Konzentrationsgradienten mit steigender Partikeldichte in Richtung des positiven Pols. Nachteile dieser Methode liegen in der Unspezifität der Bindung (auch reine Goldpartikel zeigten im elektrischen Feld ein ähnliches Verhalten) und in der Clusterbildung der Puffersalze. Ein gradueller Konzentrationsverlauf kann dennoch für die Positionierung der Immobilisate verwendet werden (Bhat et al. 2002).

Die Resultate der Immobilisierung von DNA-Nanopartikel-Komplexen lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

- Durch die Bindung von DNA-Nanopartikel-Komplexen auf Affinitätsschichten der statischen Komponenten durch Hybridisierung werden **CMFs erzeugt**.
- Eine **Spezifität der Bindung** gegenüber den Kontrollen ist gewährleistet. So sind DNA-Nanopartikel-Komplexe für Markierungsreaktionen in Planar-Techniken geeignet.
- Die Reproduzierbarkeit der Herstellung von CMFs hängt von der relativen **Konzentration der bindenden Linkersequenz** und der **eingesetzten Sondenkonzentration** ab. Die Rolle der SAM-Ebene sollte mit optimierten Verfahren weiter untersucht werden.
- Eine **Positionierung** der Immobilisate ist durch Selbstorganisation in Verbindung mit klassischer Strukturherstellung möglich. Dieser Effekt resultiert in einer definierten horizontalen Anordnung immobilisierter Komplexe.

Eine reproduzierbare Einstellung von Bindeereignissen ist eine wichtige Voraussetzung für die technologische Umsetzung von Nanokonstruktionen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden können in einer erweiterten Form verfeinert und statistisch untersucht werden. Eine auf einer solchen Statistik basierende Dichteeinstellung, welche parallel mit Nanopartikel-Markierung charakterisiert wird, ermöglicht den präzisen und quantitativen Aufbau von Affinitätsschichten. So können molekulare Konstrukte definiert in einer planartechnischen Umgebung umgesetzt werden. Denkbar ist dies in Form sukzessiver Kettenverlängerung oder einer postkonstruktiven Affinitätsimmobilisierung.

#### 4.4 NANOPARTIKEL-MARKIERUNG FÜR BIOCHIPS

In dem Applikationsbeispiel der Nanopartikel-Markierung wurden Oligonukleotid-Filme auf Biochip-Oberflächen mit DNA-Nanopartikel-Komplexen markiert. Die Verwendung transparenter Substrate für die Chip-Herstellung ermöglichte eine alternative parallelisierte Erfassung des Nanopartikel-Signals durch optische Charakterisierungsmethoden. Die Signal-Erfassung durch das Rasterkraftmikroskop ist hingegen wegen ihrer seriellen Durchführung relativ zeitaufwändig. Eine AFM-Detektion der Partikeldichten liefert aber in jedem Fall einen genaueren Signalwert.

Die Markierung von Mikrochemotopen mit DNA-Nanopartikel-Komplexen wurde vergleichbar zu den Oligonukleotid-SAMs auf Gold-Oberflächen realisiert. Eine **Veränderung der Lichtdurchlässigkeit** und der Farbe lieferte einen Hinweis auf die erfolgreiche Bindung der Partikel auf den Mikrochemotopen. Die Strukturen der photolithographisch erzeugten Affinitätsareale wurden nach einer erfolgreichen Markierung mikroskopisch sichtbar. Optische Aufnahmen der Chips lieferten sowohl im Auflicht- als auch im Durchlichtmodus einen Hinweis auf das Vorhandensein von CMFs auf der Oberfläche. Die Anlagerung von Nanopartikeln erhöhte in den markierten Bereichen die Reflektion im Auflicht und senkte die Lichtdurchlässigkeit im Durchlicht. Im Auflichtmodus wurde daher die relative Lichtintensität der Proben bestimmt, im Durchlichtmodus die Extinktion. Die Absorption erwies sich gegenüber dem Auflichtmodus, wegen dessen problematischer Reflektionseffekte, für eine Quantifizierung als besser geeignet.

Die Geschwindigkeit der Signal-Erfassung ist ein wesentlicher Vorteil der optische Detektion von Hybridisierungsereignissen. Schon bei 1 ms Belichtungszeit bietet diese einen sicheren Hinweis auf das Vorhandensein der Komplexe (Köhler et al. 2001b).

Die Kontrollversuche, unter Verwendung von reinen Nanopartikeln sowie nichtkomplementären DNA-Nanopartikel-Komplexen, zeigten eine **Spezifität der Markierung** durch komplementäre Oligonukleotide auf Biochips. In optischen Aufnahmen waren die Mikrochemotope nicht erfassbar. Die ermittelten Partikel-Dichten der Kontroll-Proben lagen weit unter dem Niveau der positiven Proben.

Das **Signal-Rausch-Verhältnis** wurde aus den Werten der spezifischen Bindeflächen und der passivierten Oberflächen ermittelt. Der Hintergrundwert war absolut gesehen innerhalb einer Reihe konstant. Bei extremen Verdünnungen überschritt dieser aber den eigentlichen Signal-Wert. Dieser Effekt konnte noch nicht geklärt werden, ist aber vermutlich auf kinetische Unterschiede in der Bindung der DNA-Nanopartikel-Komplexe und in der unspezifischen Adsorption zwischen den Mikrochemotopen zurückzuführen (Reichert 2003). In den Versuchen wurde keine Blockierung angewendet, der Rauschwert ergab sich aus dem durch den Schichtaufbau bedingten chemischen Unterschied zwischen Mikrochemotop und passivierter Oberfläche. So wurden unspezifische Bindungen auf den passivierten Flächen nicht gezielt unterbunden. Eine diesbezügliche Optimierung würde zu einem Absinken des Hintergrundsignals führen.

Die **Quantifizierung des Nanopartikel-Signals** wurde bei der Markierung auf Mikrochemotopen ähnlich wie auf den Goldoberflächen durchgeführt. Molekularbiologische Relevanz hatten hier die Linker- und die Markierungsebene. Ziel war bei beiden der quantitative Test des Einsatzes der Nanopartikel-Markierung.

Die Quantifizierung der **Linker-Ebene** wurde mit einer Mischung bindender und nichtbindender Linker durchgeführt. In Abhängigkeit von der relativen Konzentration des bindenden Linkers veränderte sich auch der Wert des Nanopartikel-Signals. Zwischen dem Signal und der relativen Linkerkonzentration war eine positive logarithmische Korrelation zu verzeichnen.

Die **eingesetzte Sondenkonzentration** wirkte sich definiert auf die Nanopartikeldichte aus, vergleichbar zu den Proben auf Goldoberflächen. Eine positive Korrelation zwischen der Dichte und

der eingesetzten Sonden-Menge konnte nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Signalstärke der rasterkraftmikroskopischen Messung mit der optischen Detektion ergab einen linearen Zusammenhang. Durch den gezeigten Zusammenhang zwischen relativer Lichtintensität und Partikeldichte (hier  $y = 11,8 x + 19,6$ , wobei  $y$  die Partikeldichte und  $x$  die Lichtintensität ist) können die Werte ineinander umgerechnet werden. Demnach ist eine Quantifizierung der Proben anhand der Grauwerte, was auch technologisch parallelisiert durchführbar und durch einfache Signal-Erfassung kostengünstig ist, denkbar. Es empfiehlt sich dazu eine parallel durchgeführte Markierung mit bekannter Konzentrationen als Kalibrierung. Eine Erstellung von **Kalibrierungs-Standards** ist im Falle von CMFs möglich. Dabei ist, im Gegensatz zu anderen Markierungstypen, auch mit einer Langzeitstabilität solcher Standards zu rechnen. Eine Optimierung des Messaufbaus und der mikroskopischen Bildaufnahme sollten eine Quantifizierung zudem vervollständigen.

Die Bestimmung der **optischen Nachweisgrenze** der Nanopartikel-Markierung wurde durch Einstellen der eingesetzten Sondenkonzentration auf niedrige Konzentrationsbereiche ausgetestet. Dieser Bereich liefert einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Sondenkonzentration und Partikeldichte. Das optische Signal wurde für diese niedrigen Konzentrationen mit einer Silberverstärkung potenziert, so dass noch eine Quantifizierung möglich war. Der Vergleich der Nanopartikeldichten aus der rasterkraftmikroskopischen Messung und der entsprechenden Absorption ergibt, dass beide Messverfahren ähnliche Ergebnisse liefern. Die Fehlerquellen im Vergleich der beiden Charakterisierungswege lagen in der Ungenauigkeit der manuellen Bearbeitung des optischen Signals. Der Vergleich der Nanopartikeldichten mit den Werten der optischen Lichtdurchlässigkeit liefert ebenfalls einen quantifizierbaren Zusammenhang beider Signalarten. Die Absorption bietet, vergleichbar zur relativen Lichtstärke reflektiver Aufnahmen, sogar eine bessere Qualität des Signals.

Der **Nachweis von Einzelpartikeln** wurde an definierten Stellen der Proben durchgeführt. Sowohl unspezifisch adsorbierte DNA-Nanopartikel-Komplexe, als auch die durch Affinitätsbindung immobilisierten Komplexe konnten vor und nach einer Silberverstärkungsreaktion charakterisiert werden. Eine optische Charakterisierung war erst nach der Verstärkungsreaktion ab ca. 80-100 nm Partikel-Durchmesser möglich. Bei niedrigen eingesetzten Sondenkonzentrationen ( $< 3,33 \text{ pM}$ ) und der daraus resultierenden niedrigen Nanopartikeldichte waren die vergrößerten Partikel einzeln auflösbar. Das Hintergrundrauschen der Verstärkung war minimal.

Diese Technik bietet für den Nachweis von Einzelpartikeln eine einfache Methode und ist auch von Seiten der Signal-Erfassung relativ einfach. Die interessanten optischen Effekte vergrößerter Nanopartikel werden weiter untersucht.

Die Biochip-Markierung durch **Formierung von Triplexstrukturen** wurde durch ausgewählte Inkubationsbedingungen realisiert. Eine nahe dem erwarteten Wert liegende Partikeldichte konnte detektiert werden. Die Ausbildung eines Triplex liegt gegenüber Duplexen auf niedrigerem Energieniveau. Die daraus resultierenden niedrigeren Bindungsdichten (40% der Dichten von Duplexen, Riccelli et al. 2001), konnten auch bei der Nanopartikel-Bindung beobachtet werden. Ein Versuch

der Signalrelevanz der Triplex-Bindung unter Diskriminierung der Duplex-Formation wäre für die Diagnostik interessant.

Die Nanopartikel-Markierung wurde mit den oben behandelten Applikationsbeispielen für eine Tauglichkeit für Nano2Bio Ansätze geprüft. Die Vorteile einer Markierung mit DNA-Nanopartikel-Komplexen gegenüber herkömmlichen Markierungsmethoden werden in der Tabelle 24 zusammengefasst.

Markierung	Fluoreszenz-Markierung	Radioaktiv-Markierung	Lumineszenz-Markierung	Enzym-Markierung	Polymer-Markierung	Metall-Partikel
Eigenschaften						
Signal	Fluoreszenz	Radioaktivität	Chemilumineszenz	Farbe	Farbe	Farbe
Signal-Erfassung	+	+	++	++	++	+++
Empfindlichkeit	5 pM	100 fg	250 amol	5 pM	++	10 fM (5 fM)
Spezifität der Markierung	+++	+++	+++	+++	+++	++
Beständigkeit des Signals	+	+	+	+	+++	+++
Auslesegeschwindigkeit	+	+	+	++	+	+++
Reproduzierbarkeit	+	+		++	+	++
Herstellung	+++	+	+	++	+++	+
Handhabung	++	+	++	+	+++	+++
Umweltrelevanz	+	+	+	++	+++	+++
Wirtschaftlichkeit	++	+	++	++	+++	+++

**Tabelle 23:** Vergleich unterschiedlicher Sondentechniken für den Hybridisierungsnachweis.

Eine wesentlicher Vorteil der Nanopartikel-Markierung gegenüber herkömmlichen Markierungsmethoden ist das einfache Wesen des Signals. Das Ergebnis wird in einfachen *ja/nein*-Antworten ausgedrückt, was falsche Interpretationen in der Auswertung ausschließt. Die Markierung unterliegt keinem Alterungsprozess oder Ausbleichmechanismen, wie das z.B. bei der Fluoreszenz-Markierung der Fall ist. Es können bei Bedarf leicht normierte Standards erstellt werden. Durch die Verwendung kleinerer Partikel-Durchmesser könnte die Sensitivität der Markierung noch erhöht werden. Die Handhabung der Sonden ist einfach und die Auslese-Apparate kostengünstig. Die optische Detektion der Nanopartikel-Signale ist schnell, sie benötigt nur Millisekunden (Köhler et al. 2001b). Die Nanopartikel-Markierung ist damit eine Alternative für herkömmliche Markierungsmethoden und bietet durch die vielseitigen Charakterisierungsmethoden auch neuartige Signalerfassungsmöglichkeiten.



## **Kapitel 5**

## **ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK**

## 5.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In der Arbeit wurde eine Machbarkeitsstudie eines nanobiotechnologischen Baukastensystems mit molekularen Techniken erstellt. Molekulare Nanokonstruktionen wurden durch die Verknüpfung statischer Komponenten, anorganisch-dynamischer Komponenten sowie organisch-dynamischer Komponenten durch Affinitätsschichten (selbstorganisierenden Monoschichten, SAMs) erzeugt.

Die **Affinitätsschichten** wurden in Form von heterogenen SAMs (Organothiol-Mischschichten auf Gold-Oberflächen) und homogenen quervernetzten SAMs (Organosilane auf Siliziumoxid-Oberflächen) erzeugt. Diese Schichten weisen direkt oder durch einen zusätzlichen Bindungsschritt eine mit Oligonukleotiden realisierte vorprogrammierte Funktionalisierung auf.

Die Bedeckungsdichte von Thiol-Oligonukleotid SAMs wurde über indirekte Nachweismethoden mit  $9 \times 10^{13}$  Molekülen/cm<sup>2</sup> bestimmt. Eine rasterkraftmikroskopische Charakterisierung solcher Schichten zeigte gegenüber reinen Goldoberflächen kein signifikant verändertes Erscheinungsbild der Oberfläche.

In dem untersuchten molekularen Baukastensystem spielten kolloidale Gold-Nanopartikel als anorganisch-dynamische Komponente eine wesentliche Rolle. Durch eine der Herstellung von SAMs vergleichbare Oligonukleotid-Modifizierung der Partikel können auch diese für Konstruktionen eingesetzt werden. Oligonukleotide wirken dabei sterisch stabilisierend auf die Kolloide. Eine Charakterisierung der **DNA-Nanopartikel-Komplexe** kann mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Die Komplexe zeigten gegenüber unkonjugierten Partikel-Lösungen veränderte Laufeigenschaften, was auf den Stabilisierungseffekt der Oligonukleotid-Modifizierung zurückgeführt werden kann. Auch eine Abhängigkeit des Laufverhaltens von der Partikelgröße konnte detektiert werden. Die Nachweisgrenze der elektrophoretischen Charakterisierung von DNA-Nanopartikel-Komplexen lag bei 10 fmol, nach einer spezifischen Silber-Verstärkung bei 5 fmol.

Die Verknüpfung der System-Komponenten wurde über Selbstorganisation, d.h. Hybridisierung der komplementären Funktionsschichten, realisiert und resultiert in drei Prozessen:

- **Immobilisierung von DNA und DNA-Komplexen**
- **Nanopartikel-Markierung von DNA und DNA-Komplexen**
- **Immobilisierung von DNA-Nanopartikel-Komplexen oder Nanopartikel-Markierung von planaren Oberflächen**

Die Hybridisierung von DNA und DNA-Komplexen mit der Oligonukleotid-SAM tragenden planaren Oberfläche führte zu **immobilisierten Komplexen**. Diese Bindung und deren Spezifität kann in parallelen Ansätzen mit Schmelzkurven-Bestimmung, mit Nanopartikel-basierten Farbttests sowie mit einer Nanopartikel-Markierung kontrolliert werden. Durch die Funktionalisierung der Oberflächen auf der Basis klassisch hergestellter Mikrostrukturen wird eine spontane laterale Anordnung der Bindschichten in parallelen Ansätzen möglich. Diese ermöglicht eine adressierte Affinitätsimmobilisierung der Moleküle und Komplexe. Wichtige Vorausset-

zungen dafür sind ein spezifischer Oligonukleotid-SAM, eine durch Ligierung stabilisierte Immobilisierung der langen DNA-Konstrukte, eine adäquate Streckung der Moleküle und eine niedrige Salzkonzentration. Die Immobilisierung von wenigen Zielmolekülen in planarer Anordnung kann mit einer definierten Einstellung der Dichten der Zielmoleküle erreicht werden. Die Dichte der Immobilisate hängt von den Bindungsebenen und der je Ebene eingesetzten relativen Konzentration der Bindeglieder ab.

Die sequenzspezifische Bindung von DNA-Nanopartikel-Komplexen an definierten Stellen einer DNA führt zur gezielten **Markierung** des Moleküls. In der Arbeit konnte eine gezielte Endmarkierung von genomischer dsDNA sowie eine Fang-Markierung von speziellen Fragmenten einer Molekülmischung gezeigt werden. Eine direkte Ankopplung von PCR-Fragmenten konnte ebenso nachgewiesen werden. Eine sequenzspezifische Markierung von DNA-Molekülen wurde zwar nicht mit Sicherheit belegt, konnte aber vermutlich ebenfalls realisiert werden. Ein wichtiger Faktor der zur Stabilität dieser Markierung beiträgt ist die enzymatische Stabilisierung der Bindung. Ein Einsatz von Nanopartikel-Sonden als Markierung ist demnach sowohl in Einzelmolekül-Techniken als auch in anderen molekularen Techniken möglich.

Die **Immobilisierung** von metallischen Nanopartikeln mit Oligonukleotid-Affinitätsschicht auf komplementären Oberflächen erzeugt **kolloidale Metall-Filme** (CMFs). Hybridisierungs-CMFs können ebenfalls in parallelen Ansätzen positioniert an Mikrostrukturen gebunden werden. Dabei zeigte die gezielte Funktionalisierung von Gold-Oberflächen in Kombination mit der Passivierung der Siliziumoxid-Oberflächen die besten Resultate. Eine elektrische Hybridisierung von Nanopartikeln in mikrostrukturierter Umgebung erzeugte einen Gradienten in den Partikeldichten. Durch die Möglichkeit einer positionierten und spezifischen Anordnung der Nanopartikel können diese als Markierungselement in planaren Techniken eingesetzt werden.

In der Arbeit wurden erste umfassende Quantifizierungsversuche zur **Nanopartikel-Markierung** durchgeführt. Demnach resultiert das Nanopartikel-Signal quantitativ aus den Bindungsebenen (SAM-Ebene, Linker-Ebene und Markierungsebene, sowie Inkubationsreihfolge und verwendeten Längen der Konstrukte) und ist gezielt durch diese regulierbar. Eine positive Abhängigkeit der gebundenen Nanopartikel-Dichte von der Konzentration der eingesetzten Bindemoleküle oder DNA-Nanopartikel-Komplexe konnte in allen Fällen nachgewiesen werden. Bei dem Einsatz unterschiedlicher Sondenkonzentrationen wurde ein Kooperationseffekt der DNA-Nanopartikel-Komplexe bei der Hybridisierung im Bereich niedriger Konzentrationen (hier mit einer Rate von 5,68) nachgewiesen. Eine Sättigung der Oberflächen bei ca. 250 Partikel/ $\mu\text{m}^2$  (für 30 nm große Partikel, bei einer Sondenkonzentration über 600-700 pM) auf Goldsubstraten kann angenommen werden. Damit ist der reale Platzbedarf eines solchen Partikels ca. 4000  $\text{nm}^2$  (gegenüber den theoretischen 707  $\text{nm}^2$ ), was bei idealen SAMs einer Bindung von 1 Partikel pro 240 Oligonukleotiden der planaren Affinitätsschicht entspricht.

Nanopartikel-Sonden sind auf verschiedenen Oberflächentypen anwendbar, so eignen sie sich auch für **Biochip-Techniken**. Die Spezifität der Markierung ist nur durch die adäquate Affini-

tätsschicht bedingt. Eine Biochip-Markierung konnte auch durch Formierung von Triplexstrukturen mit ausgewählten Inkubationsbedingungen realisiert werden. Die Markierung von Biochips kann mit der Detektion des Vorhandenseins der Nanopartikel gemessen werden. Für die Charakterisierung stehen mehrere Methoden zu Verfügung. Die Detektion des einzelnen Partikels mit dem Rasterkraftmikroskop liefert ein genaues, orts aufgelöstes Signal. Die Quantität der CMFs kann mit der Anzahl der gebundenen Nanopartikel pro Flächeneinheit (**Nanopartikeldichte**) beschrieben werden. Optische Eigenschaften der Sonden auf transparenten Chips ermöglichen eine einfache Detektion der spezifischen Bindungen. Goldpartikel absorbieren zum Teil den durchdringenden Lichtstrahl. Man kann die Qualität und Quantität eines Signals ohne aufwändige Auswerteeinheit, nur durch optische Aufnahmen oder mit einfacher Absorptionsmessung, ermitteln. Allerdings sind für weitere Anwendungen noch statistische Untersuchungen des Zusammenhangs der Nanopartikeldichte und der Absorption mit Aufstellung von Standards, sowie die Konstruktion eines optimierten optischen Messaufbaus notwendig. Der Kontrast des optischen Signals wird durch eine mikrostrukturierte Anordnung der Bindeflächen noch weiter verstärkt. Die **Empfindlichkeit** der Nanopartikel-Markierung kann mit Hilfe einer Silberverstärkung weiter erhöht werden. Diese führt zu einem definierten und homogenen Zuwachs der Partikeldurchmesser. Das vergrößerte Partikel ist ab einem Durchmesser von 80-150 nm auch einzeln optisch sichtbar, so dass bei dem verwendeten Versuchsaufbau unterhalb einer Sondenkonzentration von 3,33 pM die Detektion von einzelnen Nanopartikeln realisiert werden konnte. Die Empfindlichkeit der Nanopartikel-Markierung variierte je nach Versuchsaufbau bis hin zu 33,3 fM Sondenkonzentration. Diese Spezifität ist aber wegen der noch fehlenden Optimierung nur ein vorläufiger Richtwert.

Das vorgestellte nanobiotechnologische System ermöglicht mit einfachen Komponenten und Techniken einen definierten Aufbau von Molekülkonstrukten aus DNA und DNA-Nanopartikel-Komplexen in planarer Anordnung. Die Komponenten des Systems sind austauschbar, da die Spezifität der Verknüpfung nur durch die vorgewählte Affinitätsschicht bedingt ist.

Ein wesentliches Element dieser Arbeit besteht in dem Versuch molekularbiologische Konstruktionstechniken, planare Mikrostruktur-Technologien und die – aus Mikroarray-Technologien oder Sensorik bekannten – Immobilisierungstechniken zusammenzuführen. Die technologische Basis molekularbiologischer Methoden wurde teilweise in einer planaren Umgebung umgesetzt. Diese Umsetzung der auf Selbstorganisation basierenden "bottom-up"-Techniken (molekulare Konstruktion) in den mikrostrukturierten Kontext aus der "top-down"-Tradition ermöglicht neuartige technologische Ansätze. Der molekulare Ansatz liefert das Bindungsprinzip der Konstruktion für eine technologische Umsetzung. Dieser Prozess wird nur durch die ausgewählte Sequenz der Moleküle bedingt und ist durch einfache Faktoren, wie z.B. Temperatur, regulierbar. Die mikrostrukturierte Basis dient als vordefiniertes Koordinatensystem für die Immobilisierung der Konstrukte. Nicht zu vernachlässigen ist die vordefinierte Dimension der Mikrostrukturen, was die quantitative Bindung der molekularen Konstrukte ermöglicht.

## 5.2 AUSBLICK

DNA-basierte molekulare Techniken haben sich inzwischen als eigenständige Richtung der Nanobiotechnologie entwickelt. Die zahlreichen Veröffentlichungen auf diesem Gebiet in den letzten Jahren beweisen die Aktualität der nukleinsäurebasierten molekularen Nanokonstruktion. Bei deren Nutzung in der Nanobiotechnologie kommen dabei beide Ansätze zur Anwendung:

### 1. Bio2Nano-Ansätze

### 2. Nano2Bio-Ansätze

Im ersten Ansatz können unter Verwendung molekularer Baukastensysteme "*bottom-up*"-Techniken realisiert werden. Der wichtigste Faktor ist dabei die positionierte Immobilisierung der Konstrukte. Dadurch wird ein definierter Messaufbau für die Charakterisierung von Moleküleigenschaften, wie z.B. die Leitfähigkeit, ermöglicht.

Mittels nanometergenauer Markierung mit DNA-Nanopartikel-Komplexen werden Manipulierungsmöglichkeiten bereitgestellt. Durch das Absenken der Dimension der verwendeten Partikeldurchmesser und durch die Verwendung von Stabilisatoren könnte die Empfindlichkeit einer solchen Markierung weiter erhöht werden. Auch eine positionierte Markierung mit anderen Partikelarten und Enzymen ist mit einer Affinitätsbindung vorstellbar. Dabei könnten ganze Enzymkaskaden untersucht werden.

Im Mittelpunkt der Konstruktionstechnik steht aber ohne Zweifel das Produkt dieses Systems, das **Nanokonstrukt**. Nanokonstrukte können als Bauelemente in der Nanoelektronik (Maubach et al. 2003, Csáki et al. 2002), als Nanowires (Ford 2001, Storm 2001, Richter 2000, 2001, 2002, Keren et al. 2002) und in der Nanomechanik (Fritz 2000, Niemeyer 2002) dienen. Durch die Umsetzung solcher Konstrukte in planartechnische Umgebungen ist außerdem eine hochparallelisierte technologische Umsetzung möglich.

Die Basis für Nano2Bio-Ansätze wurde in der Arbeit durch das Applikationsbeispiel für eine neuartige Markierungsmethode gelegt. DNA-Nanopartikel-Komplexe können in Sondentechniken der molekularen Diagnostik eingesetzt werden. Eine Anwendung ist sowohl für Mikroarray-Techniken, als auch in der Hybridisierungsdiagnostik denkbar. Die Nanopartikel-Markierung zeichnet sich durch ihre Stabilität, Reproduzierbarkeit, Umweltverträglichkeit und vielseitige Alternativen der Detektion aus. Das Anwendungspotenzial der Nanopartikel-Markierung liegt vor allem in der medizinischen Diagnostik und ist durch die Verwendung kostengünstiger Auslese-Apparate auch der Laborforschung zugänglich. Eine elektrische Signal-Erfassung wurde inzwischen mit einem kompletten "*readout*"-System verwirklicht (Urban et al. 2003).

Die optischen Eigenschaften der DNA-Nanopartikel-Komplexe bieten nicht nur eine einfache Detektion des Signals auf transparenten Biochips, sondern ermöglichen (durch die Silberverstärkung) auch hochempfindliche Nachweistechiken.

Die Verwendung der Nanopartikel-Markierung in Einzelmolekültechniken als sequenzspezifische Sonde oder Fänger ermöglicht eine bessere Untersuchung von Biomolekülen.

Die optische Detektion in planaren Sondentechniken, gekoppelt mit alternativen mikroskopischen Methoden, ermöglicht neue Anwendungen in der Nanophotonik. Gold-Nanopartikel können außerdem in der Hybridisierungssensorik zur Verstärkung des Signals eingesetzt werden.

Das beschleunigte Tempo in der Forschung auf dem Gebiet der molekularen Nanotechnologie deutet auf das zu erwartende Potenzial in diesem interdisziplinären Feld hin. Dabei werden DNA-basierte Baukasten-Systeme und Applikationen mit DNA-Nanopartikel-Komplexen in Zukunft eine wichtige Rolle spielen.

## **ANHANG**

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskop ( <i>atomic force microscope</i> )
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Gold
bp	Basenpaar(e)
CC	Chronocoulometrie
CIAP	Alkalische-Phosphatase isoliert aus Kälberdarm ( <i>calf intestinal phosphatase</i> )
CMF	kolloidale Metall-Film ( <i>colloid metal film</i> )
CPG	Trägermaterial für Synthese ( <i>controlled pore glass</i> )
CV	Zyklovoltammetrie
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPN	<i>dip-pen nanolithography</i>
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTNB	Bis-(4-nitrophenyl)-Disulfit-3,3'-Dicarbonsäure (5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure))
DTT	1,4-Dithiothreit
EC-AFM	Elektrochemische Rasterkraftmikroskopie
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatrium
EQCM	Elektrochemische Quartz-Mikrobalance-Untersuchung
GLP	Gel-Loading-Puffer
GOPS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
MCH	1-Mercaptohexanol
μCP	kontaktierendes Druckverfahren für die Herstellung von Mikrostrukturen ( <i>microcontact printing</i> )
μWP	nasschemisches Masken-Verfahren für die Herstellung von Mikroarrays ( <i>micro wet printing</i> )
nt	Nukleotid
NCP	nichtkontaktierendes Druckverfahren für die Mikroarray-Herstellung ( <i>non-contact printing</i> )
OD	Optische Dichte
ODTS	Octadecyltrichlorsilan
PDC	p-Phenylendiisothiocyanat
PEG	Polyethylenglycol
PNK	Polynukleotid-Kinase Enzym



---

RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfate
SET	Einzelelektronen Transistor ( <i>single electron transistor</i> )
SiO <sub>2</sub>	Siliziumoxid
SPPD	Bis (p-sulfonatophenyl) phenylphosphindihydrat-Dikaliumsalz
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz ( <i>surface plasmon resonance</i> )
SPRS	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie
SSC	Natriumcitrat-Puffer ( <i>sodium salt citrate</i> )
ssDNA	Einzelsträngige DNA
T <sub>hyb</sub>	Hybridisierungstemperatur
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
Ti	Titan
Triton-X	Polyethylenglycol-tert-octylphenylether
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
XPS	Röntgen-Elektronen-Spektroskopie

## TABELLEN

**Tabelle 24:** Chemikalienliste

Name	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
1,4-Dithiothreit	für Molekularbiologie, zur Analyse	Roth
1-Aminopropan-2-ol, Dipropylenglycolmonomethylether, Isomerengemisch (Remover Lösung)		Clariant
1-Mercaptohexanol	reinst, > 97%	Merck
2-Propanol	zur Synthese	Merck
3-Aminopropyltriethoxysilan	reinst, ~ 96%	Fluka
6 x Blau/Orange GLP	für Molekularbiologie	Sigma
6 x GLP Typ I	für Molekularbiologie	Sigma
8-Hydroxychinolin	zur Analyse	Merck
Aceton	zur Analyse	Merck
Ammoniak	25% zur Analyse	Sigma
Bis-(4-nitrophenyl)-Disulfit-3,3'-Dicarbon-säure (5,5'-Dithiobis 2-nitrobenoesäure)	zur Analyse	Aldrich
Bis (p-sulfonatophenyl) phenylphosphindihydrat-Dikaliumsalz	reinst, > 97%	Strem Chemicals
Borsäure	für Molekularbiologie	Merck
Chloroform	für Molekularbiologie	Aldrich
Citronensäure-Monohydrat	zur Analyse	Merck
Cysteamin	zur Analyse	Fluka
di-Natriumhydrogenphosphat	wasserfrei, zur Analyse	Merck
Essigsäure	100% (Eisessig), reinst	Sigma
Ethanol	absolut reinst für Molekularbiologie	Merck
Ethanol	reinst, 96%	Roth
Ethidumbromid	95%	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat	zur Analyse	Merck
Glycerin	zur Analyse	Merck
Gold-Kolloid Lösungen (unkonjugiert, 15, 30, 60 nm Ø)		Plano
Kaliumchlorid	zur Synthese, reinst	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	MicroSelect, für Molekularbiologie	Fluka

Name	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
LI-Silberfärbungs-Kit, SEKL 15		Plano
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	für Molekularbiologie, > 99,0%	Sigma
Methanol	zur Analyse	Roth
N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]	reinst, für Molekularbiologie	Sigma
N-[Aminopropyl]-1,4-butadien-diamin Trihydrochlorid	für Molekularbiologie	Sigma
Natriumacetat-Trihydrat	reinst	Merck
Natriumchlorid	für Molekularbiologie	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	zur Analyse	Merck
Natrium-Dodecylsulfat	~ 96%	Merck
N,N-Dimethylformamid	reinst, > 99%	Aldrich
Octadecyltrichlorsilan	reinst	Fluka
Phenol	zur Synthese	Aldrich
Polyethylenglycol		Plano
Polyethylenglycol-tert-octylphenylether	für Molekularbiologie	Fluka
p-Phenylendiisothiocyanat	reinst, > 98%	Fluka
Pyridin	reinst, > 99%	Aldrich
Rotisol	Ethanol wasserfrei 94%, Aceton 5%, Methylethylketon 1% (v/v)	Roth
Salpetersäure	65% zur Analyse	Merck
Salzsäure	37% zur Analyse	Merck
Schwefelsäure	96%	Roth
Silicon Elastomer - Sylgard 184		Dow Corning
Spermidin	für Molekularbiologie	Sigma
Toluol	getrocknet zur Analyse	Merck
Top Vision Agarose LE GQ	für Molekularbiologie	MBI Fermentas
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	für Molekularbiologie, > 99,5%	Merck
tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat	zur Analyse	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	purissimum, > 99,9%	Sigma
Tween-20	zur Analyse	Fluka
Wasserstoffperoxyd	30% zur Analyse	Merck
Zinkchlorid	für Molekularbiologie, > 98%	Sigma

**Tabelle 25:** Mehrkomponentige Lösungen und Puffer

1 mM DTNB	1mM DTNB in 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0 !), entgast	(Riddles et al. 1979)
1 M DTT	1M DTT in 10 mM Natrium-Azetat Puffer (pH 5,2)	(Sambrook et al. 1989)
1M Natriumchlorid/TE (pH 7,0)	1M Natriumchlorid, 1 x TE (pH 7,4)	(Sambrook et al. 1989)
0,1 M Natriumphosphat Puffer (pH 7,0)	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (57,7 ml)/1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (42,3 ml) pro 1000 ml	(Sambrook et al. 1989)
0,1 M Natriumchlorid/Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0)	0,1 M Natriumchlorid, 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0	(Storhoff et al. 1998)
Phenol/Chloroform Lösung	500 g Phenol, 500 ml Chloroform, 200 ml Wasser, 0,5 g Hydroxychinolin	
Puffer A von MBI Fermentas	500 mM Tris-HCl (pH 7,6 bei 25°C), 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA (10 x T4 PNK Reaktionspuffer)	
Puffer D von MBI Fermentas	0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 M MgCl <sub>2</sub> (10 x CIAP Reaktionspuffer)	
20 x SSC-Puffer (pH 7,0)	3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat, pH mit 10 N NaOH eingestellt	(Sambrook et al. 1989)
50 x TAE (pH 8,2-8,4)	2 M TRIS, Eisessig, 50 mM EDTA (pH 8,0)	(Sambrook et al. 1989)
5 x TBE (pH 8,2-8,4)	0,45 M TRIS, Borsäure, 10 mM EDTA (pH 8,0)	(Sambrook et al. 1989)
TRIS-Hydrochlorid (pH 7,4/ 7,6/ 8,0)	1M TRIS, Salzsäure	(Sambrook et al. 1989)
TE (pH 7,4/7,6/8,0)	10 mM TRIS-Hydrochlorid (pH 7,4/ 7,6/ 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)	(Sambrook et al. 1989)
T4-Ligase Puffer von MBI Fermentas	400 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM DTT, 5 mM ATP, (pH 7,8 bei 25°C), (10 x Ligase Puffer)	

Tabelle 26: Geräte

<b>Probenvorbereitung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durchflusskammer (Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e. V., Heiligenstadt)</li> <li>• <i>IPC</i> Peristaltik-Pumpe (Ismatec GmbH, Weilheim)</li> <li>• <i>Thermomixer Comfort</i> (Eppendorf GmbH, Köln)</li> <li>• Heizblock <i>T 15</i></li> <li>• Hybridisierungsöfen <i>HB-1000</i> (UVP Inc., Upland, CA)</li> <li>• Horizontale Gelelektrophoresekammer (OWL Scientific, Woburn, MA)</li> <li>• Spannungsquelle <i>SourceMeter2400</i> (Keithley Instruments GmbH, Germering)</li> </ul>
<b>Charakterisierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gel-Dokumentationssystem (Herolab GmbH, Wiesloch)</li> <li>• <i>Nanodrop ND-1000</i> Spektrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, NC.)</li> <li>• Spektrophotometer <i>V-530</i> (Jasco, Maryland, MD) mit thermostatisierbarer Probenkammer</li> <li>• <i>Jenatech</i> Mikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena)</li> <li>• <i>Axiotech 100</i> Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena) mit CCD Kamera Sensicam (PCO Computer Optics, Kehlheim)</li> <li>• CCD-Messplatz für orts- und zeitaufgelöste Extinktionsmessungen für Chipbauelemente</li> <li>• Digital Scanning Mikroskop <i>DCM 960</i> (Carl Zeiss GmbH, Jena)</li> <li>• <i>Jeol JSM 6700 F</i> Rasterelektronenmikroskop (Jeol Europe B.V., Zaventem, Belgien)</li> <li>• Rasterkraftmikroskop <i>NanoScope III</i> Kontroller mit einem <i>Dimension 3100</i> Messkopf (Digital Instruments, Santa Barbara, CA)</li> </ul>
<b>Datenverarbeitung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gel-Dokumentationssoftware <i>EasyWin32</i> (Herolab GmbH, Wiesloch)</li> <li>• Bildanalyse der optischen Mikroskopie: <i>Scion Image for Windows Beta 4.0.2</i> (Scion Corporation, Fredrick, Maryland, USA)</li> <li>• Steuerung, Datenaufnahme und Datenverwaltung von <i>Nanodrop ND-1000</i>: <i>OOIBase 32</i> (Ocean Optics, Duiven, Niederlande) und <i>Nanoscript</i></li> <li>• Steuerung, Datenaufnahme und Datenverwaltung von <i>NanoScope III</i>: <i>SPM 442R8</i> (Digital Instruments, Santa Barbara, CA)</li> </ul>

**Tabelle 27:** Vergleich der Inkubationsbedingungen bei der SAM-Bildung aus der Literatur.

Inkubationstyp	Charakterisierungsmethode	Referenz
1,0 $\mu\text{M}$ HS-ssDNA in 1,0 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0-24 h (120 min) / 60 min in 1 mM MCH	XPS, Ellipsometrie, $^{32}\text{P}$ -Radiomarkierungsexperimente	Herne und Tarlov 1997
	SPRS	Peterlinz und Georgiadis 1997
	CV, Radiomarkierungsexperimente	Steel et al. 1998
	ESPR	Heaton et al. 2001
1,0–1,9 $\mu\text{M}$ HS-ssDNA in 1,0 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,7) 90 min / 5 min in 1 mM MCH	Neutronen-Reflektivitäts-Studien (SLD-Profil)	Levitcky et al. 1998
0,1 mM HS-ssDNA in 50 mM Phosphat Puffer (pH 7,0) und 0,1 M $\text{MgCl}_2$ für 1-12 h	EC-AFM	Kelley 1998
1 mM HS-ssDNA in 1,0 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5 h / 1 mM MCH 12h	SPRS	Georgiadis et al. 1999
HS-ssDNA 48 h bei 4°C	XPS, CV, EQCM	Wang et al. 1999
1 $\mu\text{M}$ HS-ssDNA in 1,0 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,0) 5 min - 20 h / 10 mM Natriumchlorid, 5 mM TRIS (pH 7,4) 5 min / 1 mM MCH 1 h / 10 mM Natriumchlorid, 5 mM TRIS (pH 7,4) 5 min	CV, CC	Steel et al. 2000
1 mM HS-ssDNA in 1,0 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5 h / 1 mM MCH 12 h	In situ SPRS	Georgiadis et al. 2000
40 $\mu\text{M}$ HS-ssDNA in 50 mM TAE und 25% EtOH 20 min	XPS, Ellipsometrie	Fritz et al. 2000
7 $\mu\text{l}$ Tropfen HS-ssDNA, über Nacht		Niemeyer 2000
10 mM MHA in EtOH, HS-ssDNA mit Crosslinker EDC/NHS auf Carboxylgruppen	SPR	He et al. 2000
5 $\mu\text{M}$ HS-ssDNA 3 h / ohne oder mit 1 h in 1 mM MCH	Spektroskopie	Mbindyo et al. 2001
1 mM HS-ssDNA in 1.0 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ >10 h / 1 mM MCH 1-2 h	SPRS	Peterson et al. 2001

**Tabelle 28:** Eigenschaften der kolloidalen Gold-Partikel in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser. Die schwarz hervorgehobenen Werte sind aus der Literatur zitiert.

Referenz	Ø [nm]	Au-Atome	MW [Dalton]	A [nm <sup>2</sup> ]	V [nm <sup>3</sup> ]	Kolloid : Oligo
Nanoprobes/EMS	0,8	15	3000	2	0,3	-
Nanoprobes	1,4	55	11000	6,158	1,437	1:1 (3)
Nanoprobes	3	785	156700	28,3	14,14	1 :5
Nanoprobes	5	3636	727200	78,5	65,45	1 :14
EMS-Aurion	6	6500	1,3 x 10 <sup>6</sup>	113	113	1:20
Nanoprobes/EMS	10	30 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>6</sup>	315	525	1:58
Nanoprobes/EMS	15	100 x 10 <sup>3</sup>	20 x 10 <sup>6</sup>	710	1770	1:130
Demers et al. 2000	16	121 x 10 <sup>3</sup>	24 x 10 <sup>6</sup>	804	2144	1:159
EMS-Aurion	25	470 x 10 <sup>3</sup>	92 x 10 <sup>6</sup>	1970	8200	1:360
Nanoprobes	30	785 x 10 <sup>3</sup>	157 x 10 <sup>6</sup>	2827	14137	1:520
	60	9 x 10 <sup>6</sup>	1,8 x 10 <sup>9</sup>	11310	113097	1:2080

---

## LITERATURVERZEICHNIS

- Adleman**, L. M. 1994. Molecular computations of solutions to combinatorial problems. *Science* 266: 1021-1024
- Afanassiev**, V., V. Hanemann und S. Wöfl. 2000. Preparation of DNA und protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Res.* 28: e66-e71.
- Ahmad**, Z. und K. P. Huang. 1981. Dephosphorylation of rabbit skeletal muscle glycogen synthase (phosphorylated by cyclic AMP-independent synthase kinase 1) by phosphatases. *J. Biol. Chem.* 256: 757-760.
- Alivisatos**, A. P., K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr. und P. G. Schultz. 1996. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature* 382: 609-611.
- Asbury**, C. L. und G. v. d. Engh. 1998. Trapping of DNA in Nonuniform Oscillating Electric Fields. *Biophys. J.* 74: 1024-1030.
- Bain**, C. D., E. B. Troughton, Y.-T. Tao, G. M. Whitesides und R. G. Nuzzo. 1989. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 321.
- Bakajin**, O. B., T. A. J. Duke, C. F. Chou, S. S. Chan, R. H. Austin und E. C. Cox. 1998. Electrohydrodynamic Stretching of DNA in Confined Environments. *Phys. Rev. Lett.* 80: 2737-2741.
- Baumann**, C. G., S. B. Smith, V. A. Bloomfield und C. Bustamante. 1997. Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 6185-6190.
- Baumann**, C. G., V. A. Bloomfield, S. B. Smith, C. Bustamante, M. D. Wang und S. M. Block. 2000. Stretching of Single Collapsed DNA Molecules. *Biophys. J.* 78: 1965-1978.
- Bednar**, j., P. Furrer, A. Stasiak, J. Dubochet, E. Egelman und A. D. Bates. 1994. The twist, write overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. Possible implications for DNA structure in vivo. *J. Mol. Biol.* 235: 825-847.
- Beebe**, T. P. 1995. Thiol Labeling of DNA for Attachment to Gold Surfaces. *Pat. Nr.-5,472,881.*
- Bensimon**, D., A. J. Simon, V. Croquette und A. Bensimon. 1995. Stretching DNA with a Receding Meniscus: Experiments and Models. *Phys. Rev. Lett.* 74: 4754-4757.
- Bhat**, R. R., D. A. Fischer und J. Genzer. 2002. Fabricating Planar Nanoparticle Assemblies with Number Density Gradients. *Langmuir* 18: 5640-5644.
- Bier**, F. F. und J. P. Fürste. 1996. Nucleic acid based sensors. Seiten 97-120 in F. W. Scheller, F. Schubert und J. Fedrowitz, eds. *Frontiers in Biosensorics I, Fundamental Aspects.* Birkhäuser Verlag, Basel.
- Bier**, F. F. und F. Kleinjung. 2001. Feature-size limitations of microarray technology-a critical review. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 371: 151-156.
- Binnig**, G., C.F. Quate und C. Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56: 930-933.
- Bonner**, T. 1998. Rechnungen zur Kraftmikroskopie an selbstorganisierenden Monoschichten. *PhD Thesis.* Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Universität, Basel, Basel.



- 
- Bowden, M. J.** 1994. *Introduction to Microlithography*. in L. F. Thomson, C. G. Willson und M. J. Bowden, eds. ACS, Washington.
- Braun, E., Y. Eichen, U. Sivan und G. Ben-Yoseph.** 1998. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature* 391: 775-778.
- Brust, M., M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin und R. Whyman.** 1994. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 801.
- Brust, M., J. Fink, D. Bethell und D. J. Schiffrin.** 1995. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.:* 1655.
- Bukanov, N. O., V. V. Deminov, P. E. Nielsen, and M. D. Frank-Kamenetskii.** 1998. PD-loop: A complex of duplex DNA with an oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5516-5520.
- Bustamante, C., D. A. Erie und D. Keller.** 1994. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 750-760.
- Cai, L., H. Tabata und T. Kawai.** 2000. Self-assembled DNA networks and their electrical conductivity. *Appl. Phys. Lett.* 77: 3105-3106.
- Cai, L. T., H. Tabata und T. Kawai.** Probing Electrical Properties of oriented DNA by conducting probe AFM. *Eight foresight conference on molecular nanotechnology*.
- Cantor, C. R.** 1990. Orchestrating the Human Genome Project. *Science* 248: 49-51.
- Chechik, V., R. M. Crooks und C. J. M. Stirling.** 2000. Reactions and Reactivity in Self-Assembled Monolayers. *Adv. Mater.* 12: 1161-1171.
- Cherny, D. I., A. Fourcade, F. Svinarchuk, P. E. Nielsen, C. Malvy und E. Delain.** 1998. Analysis of Various Sequence-Specific Triplexes by Electron and Atomic Force Microscopies. *Biophys. J.* 74: 1015-1023.
- Chrisey, L. A., G. U. Lee und C. E. O'Ferrall.** 1996. Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Res.* 24: 3032-3039.
- Clausen-Schaumann, H., M. Rief, C. Tolksdorf und H. E. Gaub.** 2000. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophys. J.* 78: 1997-2007.
- Coffer, J. L., S. R. Bigham, R. F. Pinizzotto und H. Yang.** 1992. Characterization of quantum-confined CdS nanocrystallites stabilized by deoxyribonucleic acid (DNA). *Nanotechnology* 3: 69-76.
- Cox, C. J., D. S. Cohen und A. D. Ellington.** 1999. The complexities of DNA computation. *Trends in Biotechnology* 17: 151-154.
- Crothers, D. M., J. Drak, J. D. Kahn und S. D. Levene.** 1992. DNA bending, flexibility, and helical repeat by cyclization kinetics. *Methods Enzymol.* 212: 3-29.
- Csáki, A., R. Möller, W. Straube, J. M. Köhler und W. Fritzsche.** 2001. DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 29: E81.
- Csáki, A., R. Möller und W. Fritzsche.** 2002a. Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2: 187-193.
- Csáki, A., G. Maubach, D. Born, J. Reichert und W. Fritzsche.** 2002b. DNA-based molecular nanotechnology. *Single. Mol.* 3: 275-280.

- 
- de Pablo, P. J. M., H., F. Colchero, J. Gómez Herrero, P. Herrero, A. M. Baró, P. Ordejón, J. M. Soler und E. Artacho.** 2000. Absence of dc-Conductivity in 1-DNA. *Phys. Rev. Lett.* 85: 4992-4996.
- Demers, L. M., C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, 3rd, R. L. Letsinger, R. Elghanian und G. Viswanadham.** 2000. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Anal. Chem.* 72: 5535-5541.
- Demers, L. M., D. S. Ginger, S. J. Park, Z. Li, S. W. Chung und C. A. Mirkin.** 2002. Direct patterning of modified oligonucleotides on metals and insulators by dip-pen nanolithography. *Science* 296: 1836-1838.
- Dörfler, H.-D.** 2002. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Dubiley, S., E. Kirillov, Y. Lysov und A. Mirzabekov.** 1997. Fractionation, phosphorylation and ligation on oligonukleotide microchips to enhance sequencing by hybridisation. *Nucleic Acids Res.* 25: 2259-2265.
- Dubois, L. und R. G. Nuzzo.** 1992. Synthesis, structure and properties of model organic surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43: 437-463.
- Eggers, M. D., M. E. Hogan, R. K. Reich, J. B. Lamture, D. J. Ehrlich, M. A. Hollis, B. B. Kosicki, T. Powdrill, K. L. Beattie, S. R. Smith, R. S. Varma, R. Gangadharan, A. Mallik, B. E. Burke und D. Wallace.** 1994. A Microchip for Quantitative Detection of Molecules Utilizing Luminescent and Radioisotope Reporter Groups. *Biotechniques* 17: 516-524.
- Elghanian, R., J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger und C. A. Mirkin.** 1997. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* 277: 1078-1081.
- Essevaz-Roulet, B., U. Bockelmann und F. Heslot.** 1997. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 11935-11940.
- Faraday, M.** 1857. Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. R. Soc. London* 147: 145.
- Faulk, W. P. und G. M. Taylor.** 1971. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8: 1081.
- Feynman, R.** 1961. There's plenty of room at the bottom. Page 282-296 in H. Gilbert, ed. *Miniaturization.* Reinhold Publishing Corporation, New York.
- Fink, H.-W. und C. Schöneberger.** 1999. Electrical conduction through DNA molecules. *Nature* 398: 407-410.
- Fodor, S. P., J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu und D. Solas.** 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-773.
- Ford, W. E., O. Harnack, A. Yasuda und J. M. Wessels.** 2001. Platinated DNA as Precursors to Templated Chains of Metal Nanoparticles. *Adv. Mat.* 13: 1793-1798.

- Fotin**, A. V., A. L. Drobyshev, D. Y. Proudnikov, A. N. Perov und A. D. Mirzabekov. 1998. Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Res.* 26: 1515-1521.
- Frens**, G. 1973. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solutions. *Nature Phys. Sci.* 241: 20.
- Fritz**, J., M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H. J. Güntheroth, C. Gerber und J. K. Gimzewski. 2000. Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics. *Science* 288: 316-318.
- Fritzsche**, W., A. Csáki, R. Möller, R. Bickel, S. Senz, J. Langer und J. M. Köhler. 1999. Electrical measurements on single molecules. Pages 81-91. *Recent Research Developments in Vacuum Science & Technology*.
- Frutos**, A. G., Q. Liu, A. J. Thiel, A. M. W. Sanner, A. E. Condon, L. M. Smith und R. M. Corn. 1997. Demonstration of a word design strategy for DNA computing on surfaces. *Nucleic Acids Res.* 25: 4748-4757.
- Fuller**, G. E. 2000. *Handbook of semiconductor manufacturing technology*. Seite 461 in M. Dekker, ed., New York.
- Georgiadis**, R. M., K. A. Peterlinz und A. W. Peterson. 1999. Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*
- Georgiadis**, R. M., K. A. Peterlinz und A. W. Peterson. 2000. Quantitative Measurements and Modelling of Kinetics in Nucleic Acid Monolayer Films Using SPR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3166-3173.
- Grabar**, K. C., R. G. Freeman, M. B. Hommer und M. J. Natan. 1995. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* 67: 735-743.
- Grabar**, K. C., P. C. Smith, M. D. Musick, J. A. Davis, D. G. Walter, M. A. Jackson, A. P. Guthrie und M. J. Natan. 1996a. Kinetic Kontroll of Interparticle Spacing in Au Colloid-Based Surfaces: Rational Nanometer-Scale Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 1148-1153.
- Grabar**, K. C., K. J. Allison, B. E. Baker, R. M. Bright, K. R. Brown, R. G. Freeman, A. P. Fox, C. D. Keating, M. D. Musick und M. J. Natan. 1996b. Two-Dimensional Arrays of Colloidal Gold Particles: A Flexible Approach to Macroscopic Metal Surfaces. *Langmuir* 12: 2353-2361.
- Haber**, C. und D. Wirtz. 2000. Shear-Induced Assembly of lambda -Phage DNA. *Biophys. J.* 79: 1530-1536.
- He**, L., M. D. Musick, S. R. Nicewarner, F. G. Salinas, S. J. Nekovic, M. J. Natan und C. D. Keating. 2000. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9071-9077.
- Heaton**, R. J., A. W. Peterson und R. M. Georgiadis. 2001. Electrostatic surface plasmon resonance: direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 3701-3704.
- Hegner**, M., P. Wagner und G. Semenza. 1993. Immobilizing DNA on gold via thiol modification for atomic force microscopy imaging in buffer solutions. *FEBS letters* 336(3): 452-456.

- 
- Herne**, T. M. und M. J. Tarlov. 1997. Characterisation of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8916-8920.
- Hong**, S. und C. A. Mirkin. 2000. A Nanoplotter with Both Parallel and Serial Writing Capabilities. *Science* 288: 1808-1812.
- Hong**, S., J. Zhu und C. A. Mirkin. 1999. Multiple Ink Nanolithography: Toward a Multiple-Pen Nano-Plotter. *Science* 286: 523-525.
- Horisberger**, M., J. Rosset und H. Bauer. 1975. Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscope. *Experientia* 31: 1147.
- Jett**, S. D., D. I. Cherny, V. Subramaniam und T. M. Jovin. 2000. Scanning force microscopy of the complexes of p53 core domain with supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 299: 585-592.
- Kelley**, S. O., J. K. Barton, N. M. Jackson und M. G. Hill. 1997. Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode. *Bioconjug. Chem.* 8: 31-37.
- Kelley**, S. O., J. K. Barton, N. M. Jackson, L. D. McPherson, A. B. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen und M. G. Hill. 1998. Orienting DNA Helices on Gold Using Applied Electric Fields. *Langmuir* 14: 6781-6784.
- Kelley**, S. O., E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson und M. G. Hill. 1999a. Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acids Res.* 27: 4830-4837.
- Kelley**, S. O., N. M. Jackson und J. K. Barton. 1999b. Weitreichender Elektronentransfer durch DNA-Filme. *Angew. Chem.* 111: 991-996.
- Keren**, K., M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan und E. Braun. 2002. Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules. *Science* 297: 72-75.
- Khrapko**, K. R., Y. P. Lysov, A. A. Khorlyn, V. V. Shick, V. L. Florentiev und A. D. Mirzabekov. 1989. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett.* 256: 118-122.
- Köhler**, J. M. 2001a. *Nanotechnologie. Eine Einführung in die Nanostrukturtechnik*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Köhler**, J. M., A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, W. Straube und W. Fritzsche. 2001b. Selective labeling of oligonucleotide monolayers by metallic nanobeads for fast optical readout of DNA-chips. *Sens. and Act.* 76: 166-172.
- LaBean**, T. H., H. Yan, J. Kopatsch, F. Liu, E. Winfree, J. H. Reif und N. C. Seeman. 2000. Construction, Analysis, Ligation, and Self-Assembly of DNA Triple Crossover Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 1848-1860.
- Lazarides**, A. A. und G. C. Schatz. 2000. DNA-linked metal nanosphere materials: Fourier-transform solutions for the optical response. *J. Chem. Phys.* 112: 2987-2994.
- LeDuc**, P., C. Haber, G. Bao und D. Wirtz. 1999. Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow. *Nature* 399: 564-566.
- Levitky**, R., T. M. Herne, M. J. Tarlov und S. K. Satija. 1998. Using Self-Assembly To Control the structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 9787-9792.

- 
- Lewis, F. D., T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield und M. R. Wasielewski.** 1997. Distance-dependent electron transfer in DNA hairpins. *Science* 277: 673-676.
- Li, J. W., C. L. Bai, C. Wang, C. Zhu, Z. Lin, Q. Li und E. Cao.** 1998. A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 26: 4785-4786.
- Liu, Q., L. Wang, A. G. Frutos, A. E. Condon, R. M. Corn und L. M. Smith.** 2000. DNA computing on surfaces. *Nature* 403: 175-179.
- Lorkowski, S., G. Lorkowski und P. Kullen.** 2000. Biochips: Das Labor in der Streichholzschachtel. *Chemie in unserer Zeit* 34: 356-373.
- Loweth, C., W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos und P. G. Schultz.** 1999. DNA als Gerüst zur Bildung von Aggregaten aus Gold-Nanokristallen. *Angew. Chem.* 111: 1925-1930.
- Maeda, Y., T. Nakamura, K. Uchimura, T. Matsumoto, H. Tabata und T. Kawai.** 1999. Controlled conjugation of nanoparticles with single stranded DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (2): 494-496.
- Makkonen, L.** 2000. On the methods to determine surface energies. *Langmuir* 16: 7669-7672.
- Maskos, U. und E. M. Southern.** 1992. Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised *in situ*. *Nucleic Acids Res.* 20: 1679-1684.
- Maubach, G., A. Csáki, D. Born und W. Fritzsche.** 2003. Controlled positioning of one individual DNA molecule in an electrode setup based on self-assembly and microstructuring. *Nanotechnology* 14: 546-550.
- Mayya, K. S., V. Patil und M. Sastry.** 1996. *Langmuir* 12: 3604.
- Mbindyo, J., B. D. Reiss, B. R. Martin, C. D. Keating, M. J. Natan und T. E. Mallouk.** 2001. DNA-Directed Assembly of Gold Nanowires on Complementary Surfaces. *Adv. Mat.* 13: 249-254.
- Meinkoth, J. und G. Wahl.** 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138: 267-284.
- Mirkin, C. A., R. L. Letsinger, R. C. Mucic und J. J. Storhoff.** 1996. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382: 607-609.
- Möller, R., A. Csáki, J. M. Köhler und W. Fritzsche.** 2000a. DNA probes on chip surfaces studied by scanning force microscopy using specific binding of colloidal gold. *Nucleic Acids Res.* 28.
- Möller, R., A. Csáki, J. M. Köhler und W. Fritzsche.** 2000b. Metal deposition on gold nanobeads for DNA-chip technology. *SPM Workshop*, Hannover.
- Möller, R., A. Csáki, J. M. Köhler und W. Fritzsche.** 2001. Electrical classification of the concentration of bioconjugated metal colloids after surface adsorption and silver enhancement. *Langmuir* 17: 5426-5430.
- Moreau, W. M.** 1988. *Semiconductor Lithography*. Plenum Press, New York.
- Mucic, R. C., J. J. Storhoff, C. A. Mirkin und R. L. Letsinger.** 1998. DNA-Directed Synthesis of Binary Nanoparticle Network Materials. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 12674-12675.
- Mullis, K. B.** 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56-61, 64-65.

- Namasivayam, V., R. G. Larson, D. T. Burke und M. A. Burns.** 2002. Electrostretching DNA Molecules Using Polymer-Enhanced Media within Microfabricated Devices. *Anal. Chem.* 74: 3378-3385.
- Nelson, B. P., T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman und R. M. Corn.** 2001. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Anal. Chem.* 73: 1-7.
- Nielsen, P. E.** 1999. Applications of peptide nucleic acids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(1): 71-75.
- Niemeyer, C. M.** 1999a. Progress in "engineering up" nanotechnology devices utilizing DNA as a construction material. *Appl. Phys. Lett.* 68: 119-124.
- Niemeyer, C. M., L. Boldt, B. Ceyhan und D. Blohm.** 1999b. DNA-Directed immobilization: efficient, reversible, and site-selective surface binding of proteins by means of covalent DNA-streptavidin conjugates. *Anal. Biochem.* 268: 54-63.
- Niemeyer, C. M.** 2000. Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 609-618.
- Niemeyer, C. M.** 2002. Nanomechanische Bauelemente auf DNA-Basis. *Angew. Chem.* 114: 3933-3938.
- Nuzzo, R. G. und D. L. Allara.** 1983. Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 4481-4483.
- O'Donnell, M. J., K. Tang, H. Köster, C. L. Smith und C. R. Cantor.** 1997. High density, covalent attachment of DNA to silicon wafers for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 2438-2443.
- O'Donnell, M. J. und H. Köster.** 1999. *Miniaturized arrays for DNA analysis.* Seiten 399-415 in J. M. Köhler, T. Mejevaia und H. P. Saluz, eds. *Microsystems Technology: A powerful tool for biomolecular studies.* Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Ogihara, M. und A. Ray.** 2000. DNA computing on a chip. *Nature* 403: 143-144.
- Ostwald, W.** 1924. *Practical colloid chemistry.* Dutton Verlag, New York.
- Palade, G. E.** 1960. Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries. *Anat. Rec.* 136: 254.
- Park, S.-J., T. A. Taton und C. A. Mirkin.** 2002. Array-Based Electrical Detection of DNA with Nanoparticle Probes. *Science* 295: 1503-1506.
- Peterlinz, K. A. und R. M. Georgiadis.** 1996. In Situ Kinetics of Self-Assembly by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Langmuir* 12: 4731-4740.
- Peterlinz, K. A. und R. M. Georgiadis.** 1997. Observation of Hybridisation and dehybridisation of Thiol-Tethered DNA Using Two-Color Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 3401-3402.
- Peterson, A. W., R. J. Heaton und R. M. Georgiadis.** 2001. The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* 29: 5163-5168.
- Pheiffer, B. H. und S. B. Zimmerman.** 1983. Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribo-oligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res.* 11: 7853-7871.

- 
- Piner, R. D., J. Zhu, F. Xu, S. Hong und C. A. Mirkin.** 1999. Dip-Pen Nanolithography. *Science* 283: 661-663.
- Porath, D., A. Bezryadin, S. de Vries und C. Dekker.** 2000. Direct measurement of electrical transport through DNA molecules. *Nature* 403: 635-638.
- Reed, M. A. und J. M. Tour.** 2000. Rechnen mit Molekülen. *Spektrum der Wissenschaft* August: 38-45.
- Reichert, J., A. Csáki, J. M. Köhler und W. Fritzsche.** 2000. Chip-based optical detection of DNA hybridization by means of nanobead labeling. *Anal. Chem.* 72: 6025-6029.
- Reichert, J.** 2003. Herstellung und Charakterisierung lateral mikrostrukturierter molekularer Monofilme auf Silicium- und Glas-Chipoberflächen für die Anwendung in Bio-Chips. *PhD Thesis.* Friedrich Schiller Universität Jena, Jena.
- Riccelli, P. V., F. Merante, K. T. Leung, S. Bortolin, R. L. Zastawny, R. Janeczko und A. S. Benight.** 2001. Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic Acids Res.* 29: 996-1004.
- Richter, J., R. Seidel, R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, J. Plaschke und H. K. Schackert.** 2000. Nanoscale Palladium Metallization of DNA. *Adv. Mat.* 12: 507-510.
- Richter, J.** 2001a. Erzeugung und Charakterisierung von Nanostrukturen auf DNA Ein Biotemplat-Ansatz. *PhD Thesis.* Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften. Technische Universität Dresden, Dresden.
- Richter, J., M. Mertig, W. Pompe, I. Mönch und H. K. Schackert.** 2001b. Construction of highly conductive nanowires on a DNA template. *Appl. Phys. Lett.* 78: 536-539.
- Richter, J., M. Mertig, W. Pompe und H. Vinzelberg.** 2002. Low-temperature resistance of DNA-templated nanowires. *Appl. Phys. A.*
- Riddles, P. W., R. L. Blakeley und B. Zerner.** 1979. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)- a reexamination. *Anal. Biochem.* 94: 75-81.
- Rink, J.** 1997. Geschüttelt, nicht gerührt. *CT* 7: 112-117.
- Rivetti, C., M. Guthold und C. Bustamante.** 1996. Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.* 264: 919-932.
- Roweis, S. und E. Winfree.** 1999. On the reduction of errors in DNA computation. *J. Comput. Biol.* 6: 65-75.
- Sagiv, J.** 1979. *J. Isr. Chem.* 18: 339.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd Ed.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis und P. O. Brown.** 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.

- Schena, M.** 2003. *Microarray analysis*. Wiley-Liss Verlag, Hoboken, New Jersey.
- Schmid, G.**(ed.) und J. S. Bradley. 1994. *Clusters and Colloids*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Schmitt, J., P. Mächtle, D. Eck, H. Möhwald und C. A. Helm.** 1996. *Langmuir* 12: 3256.
- Schmitt, J., P. Mächtle, D. Eck, H. Moehwald und C. A. Helm.** 1999. Preparation and Optical Properties of Colloidal Gold Monolayers. *Langmuir* 15: 3256-3266.
- Schwartz, D. K.** 2001. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52: 107-137.
- Seeman, N. C.** 1990. De novo design of sequences for nucleic acid structural engineering. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 8: 573-581.
- Seeman, N. C.** 1991. The use of branched DNA for nanoscale fabrication. *Nanotechnology* 2: 149-159.
- Seeman, N. C.** 1998. DNA nanotechnology: novel DNA constructions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27: 225-248.
- Seeman, N. C.** 2003. DNA nanotechnology. *Materials Today*: 24-30.
- Shaiu, W.-L., J. Vesenka, D. Jondle, E. Henderson und D. D. Larson.** 1993a. Visualization of Circular DNA Molecules Labeled with Colloidal Gold Spheres using Atomic Force Microscopy. *J. Vac. Sci. Technol. A.* 11: 820-823
- Shaiu, W. L., D. D. Larson, J. Vesenka und E. Henderson.** 1993b. Atomic force microscopy of oriented linear DNA molecules labeled with 5nm gold spheres. *Nucleic Acids Res.* 21: 99-103.
- Shepchinov, M. S., S. C. Case-Green und E. M. Southern.** 1997. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.* 25: 1155-1161.
- Shepchinov, M. S., K. U. Mir, J. K. Elder, M. D. Frank-Kamenetski und E. M. Southern.** 1999. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res.* 27: 3035-3041.
- Shivashankar, G. V. und A. Libchaber.** 1997. Single DNA molecule grafting and manipulation using a combined atomic force microscope and an optical tweezer. *Appl. Phys. Lett.* 71: 3727-3730.
- Skupin, M.** 2001. Synthese von Diamido-Bolaamphiphilen und Synthese von porphyrinhaltigen Lücken in Monoschichten auf Gold. *PhD Thesis*. Freien Universität Berlin, Berlin.
- Smith, S. B., L. Finzi und C. Bustamante.** 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* 258: 1122-1126.
- Steel, A. B., T. M. Herne und M. J. Tarlov.** 1998. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Anal. Chem.* 70: 4670-4677.
- Steel, A. B.** 1999. Electrostatic interactions of redox cations with surface-immobilized and solution DNA. *Bioconjug. Chem.* 10: 419-423.
- Steel, A. B., R. L. Levicky, T. M. Herne und M. J. Tarlov.** 2000. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.* 79: 975-981.
- Stigter, D. und C. Bustamante.** 1998. Theory for the Hydrodynamic and Electrophoretic Stretch of Tethered B-DNA. *Biophys. J.* 75: 1197-1210.



- Storhoff, J. J., R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin und R. L. Letsinger.** 1998. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 1959-1964.
- Storhoff, J. J., A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger und G. C. Schatz.** 2000. What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? *J. Am. Chem. Soc.* 122: 4640-4650.
- Storm, A. J., J. van Noort, S. de Vries und C. Dekker.** 2001. Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale. *Appl. Phys. Lett.* 79: 3881-3883.
- Szánthó, F.** 1989. *Kolloidika*. Tankönyvkiadó, Budapest.
- Tanaka, K., A. Mitsushima, N. Yamagata, Y. Kashima und H. Takayama.** 1991. Direct visualization of colloidal gold-bound molecules and a cell-surface receptor by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy. *J Microsc* 161 ( Pt 3): 455-461.
- Taton, T. A., C. A. Mirkin und R. L. Letsinger.** 2000a. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 289: 1757-1760.
- Taton, T. A., R. C. Mucic, C. A. Mirkin und R. L. Letsinger.** 2000b. The DNA-mediated formation of supramolecular mono- and multilayered nanoparticle structures. *J. Am. Chem. Soc.*
- Taylor, J. R., M. M. Fang und S. Nie.** 2000. Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Anal. Chem.* 72: 1979-1986.
- Templeton, A. C., W. P. Wuelving und R. W. Murray.** 2000. Monolayer-protected cluster molecules. *Acc. Chem. Res.* 33: 27-36.
- Thundat, T., D. P. Allison und R. J. Warmack.** 1994. Stretched DNA structures observed with atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 22: 4224-4228.
- Tinland, B., A. Pluen, J. Sturm und G. Weill.** 1997. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules* 30: 5763-5765.
- Turkevich, J., P. C. Stevenson und J. Hiller.** 1951. *Discuss. Faraday Soc.* 11: 55.
- Ulman, A.** 1991. *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*. Academic Press, Boston.
- Urban, M., R. Möller und W. Fritzsche.** 2003. A paralleled readout system for an electrical DNA-hybridization assay based on a microstructured electrode array. *Rev. Sci. Instrum.* 74: 1077-1081
- Vallant, T., H. Brunner, U. U. Mayer, H. Hoffmann, T. Leitner, R. Resch und J. G. Friedbacher.** 1998. Formation of Self-Assembled Octadecylsiloxane Monolayers on Mica and Silicon Surfaces Studied by Atomic Force Microscopy and Infrared Spectroscopy. *Phys. Chem. B* 102: 7190-7197.
- Wan, C., T. Fiebig, S. O. Kelley, C. R. Treadway, J. K. Barton und A. H. Zewail.** 1999. Femtosecond dynamics of DNA-mediated electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96: 6014-6019.
- Wang, W., J. Lin und D. C. Schwartz.** 1998. Scanning Force Microscopy of DNA Molecules Elongated by Convective Fluid Flow in an Evaporating Droplet. *Biophys. J.* 75: 513-520.
- Wang, J., R. Rivas, M. Jiang und X. Zhang.** 1999. Electrochemically Induced Release of DNA from Gold Ultramicroelectrodes. *Langmuir* 15: 6541-6545.

- 
- Washizu**, M. und O. Kurosawa. 1990. Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures. *IEEE Trans. Ind. Appl.* 26: 1165-1172.
- Watson**, J. D. und F. H. C. Crick. 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737-738
- Weier**, H. U., J. N. Lucas, M. Poggensee, R. Se graves, D. Pinkel und J. W. Gray. 1991. Two-color hybridization with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allow unambiguous discrimination between symmetrical and assymetrical translocations. *Chromosoma* 100: 371-376.
- Wetmur**, J. G. und N. Davidson. 1968. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 31: 349-370.
- Wetten**, R. L., J. T. Khoury, M. M. Alvarez, S. Murthy, I. Vezmar, Z. L. Wang, P. W. Stephens und U. Landman. 1996. *Adv. Mater.* 8: 428.
- Wevers**, M. und D. Wechsler. 2002. *Nanobiotechnologie I: Grundlagen und Anwendungen molekularer, funktionaler Systeme*. VDI-Technologiezentrum, Düsseldorf.
- Winfree**, E. 1998a. Simulations of Computing by Self-Assembly. *PhD Thesis*. California Institute of Technology, Pasadena, Californien.
- Winfree**, E., F. Liu, L. A. Wenzler und N. C. Seeman. 1998b. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature* 394: 539-544.
- Wirde**, M., U. Gelius und L. Nyholm. 1999. Self-Assembled Monolayers of Cystamine and Cysteamine on Gold Studied by XPS and Voltammetry. *Langmuir* 15: 6370-6378.
- Xia**, Y. und G. M. Whitesides. 1995. Use of Controlled Reactive Spreading of Liquid Alkanethiol on the Surface of Gold To Modify the Size of Features Produced by Microcontact Printing. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3274-3275.
- Xia**, Y. und G. M. Whitesides. 1998. Soft lithography. *Angewandte Chemie* 37: 550-575.
- Ye**, J. Y., K. Umemura, M. Ishikawa und R. Kuroda. 2000. Atomic Force Microscopy of DNA Molecules Stretched by Spin-Coating Technique. *Anal. Biochem.* 281: 21-25.
- Yu**, H., J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, S. Mujumdar und A. S. Waggoner. 1994. Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 22: 3226-3232.
- Zanchet**, D., C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion und A. P. Alivisatos. 2001. Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. *Nano Letters* 1: 32-35.
- Zimmermann**, R. M. und E. C. Cox. 1994. DNA stretching on functionalized gold surfaces. *Nucleic Acids Res.* 22: 492-497.

---

## WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

### PUBLIKATIONEN

- Csáki, A., R. Möller, W. Straube, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2001. DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 29 (16): E81.
- Csáki, A., R. Möller und W. Fritzsche. 2002a. Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2 (2): 187-93.
- Csáki, A., G. Maubach, D. Born, J. Reichert und W. Fritzsche. 2002b. DNA-based molecular nanotechnology. *Single. Mol.* 3 (5-6): 275-280.
- Csáki, A., P. Kaplanek und W. Fritzsche. 2003. Optical detection of individual nanoparticle labels after metal enhancement. *Nanotechnology* (eingereicht).
- Fritzsche, W., A. Csáki, J. Reichert, R. Möller und J. M. Köhler. 2001. New colloidal gold-based detection scheme for DNA chip technology. *European Microscopy and Analysis 7*: 5-7.
- Köhler, J. M., A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, W. Straube und W. Fritzsche. 2001. Selective labeling of oligonucleotide monolayers by metallic nanobeads for fast optical readout of DNA-chips. *Sens. Actuators* 76: 166-172.
- Maubach, G., A. Csáki, D. Born und W. Fritzsche. 2003. Controlled positioning of one individual DNA molecule in an electrode setup based on self-assembly and microstructuring. *Nanotechnology* 14: 546-550.
- Möller, R., A. Csáki, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2000. DNA probes on chip surfaces studied by scanning force microscopy using specific binding of colloidal gold. *Nucleic Acids Res.* 28 (20e91).
- Möller, R., A. Csáki, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2001. Electrical classification of the concentration of bioconjugated metal colloids after surface adsorption and silver enhancement. *Langmuir* 17: 5426-5430.
- Reichert, R., A. Csáki, R. Möller, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2000. Chip-based optical detection of DNA hybridization by means of nanobead labeling. *Anal. Chem.* 72 (24): 6025-6029.

### TAGUNGSBAND-BEITRÄGE

- Csáki, A., R. Möller, J. Reichert, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2001. Microstructured colloidal metal films: nanostructures based on specific (bio) chemical interactions. in "*Micro- and Nanostructures of Biological Systems.*" (Ed. by H.-J. Hein & G. Bischoff): 76-91. Shaker Verlag, Aachen.
- Fritzsche, W., A. Csáki und R. Möller. 2002. Nanoparticle-Based Optical Detection of Molecular Interactions for DNA-Chip Technology. *SPIE* 4626: 17-22
- Fritzsche, W., G. Maubach, D. Born, J. M. Köhler und A. Csáki. 2002. A Construction Scheme For a SET Devices Based on Self-Assembly of DNA and Nanoparticles. *AIP Conference Proceedings* 640: DNA-Based Molecular Construction (Jena, May 2002, ed. W. Fritzsche): 73-82.

- Zhang, G.-J., R. Möller, A. Csáki und W. Fritzsche. 2002. Optical Detection of DNA Constructs based on Nanoparticles and Silver Enhancement. *AIP Conference Proceedings* 640: DNA-Based Molecular Construction (Jena, May 2002, ed. W. Fritzsche): 13-21
- Reichert, R., A. Csáki, W. Fritzsche und J. M. Köhler. 2002. Charakterisierung mikrostrukturierter Chip-Oberflächen mit Hilfe von Farbstoffmolekülen und Nanopartikeln. *Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt – Biosensorik und Zellkulturtechnik*, (D. Beckmann, M. Meister, S. Heiden, R. Erb) Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin.

## VORTRÄGE

- Csáki, A., G. Maubach, R. Möller, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2001. DNA-Konstruktionen an Oberflächen. *Digital Instruments - Usermeeting*, 10.-11.4.2001, Göttingen.
- Csáki, A., R. Möller, G. Maubach, J. Reichert, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2002. Nanopartikel-Markierung für Biochip-Technologien. *Workshop Chemische und biologische Mikrolabortechnik*, 20.-22.2.2002, Ilmenau.

## POSTER

- Csáki, A., R. Möller, W. Straube, J. Reichert, J.M. Köhler und W. Fritzsche. 2000. Konzentrationsabhängigkeit und Sequenzspezifität einer Goldpartikel-basierten DNA-Markierung *Workshop Mikro-und Nanostrukturen biologischer Systeme*, 4.-5.10.2000, Halle.
- Csáki, A., R. Möller, W. Straube, J. Reichert, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2000. Concentration dependance and sequence specificity of DNA chip labeling by gold nanoparticles. *3rd World Congress on cellular and molecular biology* (Jena 8.-11.10.2000), Abstract in: *Cellular and Molecular Biology* 46 (2000), Nr. 39.
- Csáki, A., G. Maubach, R. Möller, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2001. DNA-based constructions on gold surfaces. Conference on Applied Science *Molecular Nanotechnology 2001*, 5.-7.09.2001, Augustusburg.
- Csáki, A., G. Maubach, R. Möller, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2002. DNA-based constructions on gold surfaces. *Spring school on single molecules in physics, chemistry and biology* (VW Stiftung), 8.-12.04.2002, Hofgeismar.
- Csáki, A., G. Maubach, D. Born, J. M. Köhler und W. Fritzsche. 2002. Construction of DNA and DNA/gold nanoparticle complexes. *3. Int. Symposium on physics, chemistry and biology with single molecules*, 22.-25.09.2002, Tutzing.
- Csáki, A., P. Kaplanek und W. Fritzsche. 2003. Optical detection of individual nanoparticle labels after metal enhancement. *Bioconjugated Nanoparticles in Molecular Diagnostics and Therapy. Intern. Symposium*, 22.-24.05.2003, Jena.

Außerdem als Koautor 17 Tagungsbeiträge (2000: 7, 2001: 1, 2002: 9) und 12 Posters (2000: 5, 2001: 4, 2002: 2, 2003: 1), davon 17 bei internationalen Tagungen.

---

## DANKSAGUNG

Vielen Dank ...

... möchte ich all denen sagen, die mich während meiner Arbeit unterstützt und begleitet haben. Ein besonderes "Dankeschön" an:

*Prof. Dr. rer. nat. habil. Hans Peter Saluz* für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Betreuung, seine fachliche Unterstützung und sein anhaltendes, förderndes Interesse.

*Dr. rer. nat. Wolfgang Fritzsche* für die Betreuung meiner Arbeit, seine fachliche und seelisch-moralische Unterstützung, welche ich auch "gnadenlos" in Anspruch genommen habe.

*Prof. Dr. rer. nat. habil. J. Michael Köhler*, der mit Initiative, Ideen und stetiger Unterstützung den Fortgang meiner Arbeit begleitet hat.

*Dr. rer. nat. Gunter Maubach* für die ständige Diskussionsbereitschaft über Themen aller Art, der kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und die produktiven Raucherpausen.

*Jörg Reichert*, der durch seine fachliche Kompetenz und produktive Zusammenarbeit bei den Applikationsversuchen der Nanopartikel-Markierung zur Hilfe kam.

*Andrea Steinbrück* und *Pia Kaplanek*, die freundlicherweise bei den Quantifizierungsversuchen eine Menge "Sisyphusarbeit" geleistet haben.

*Dr. rer. nat. Thomas Henkel* für die bei der ortsaufgelösten Extinktionsmessung sensitiver Proben gebotene Hilfe.

*Dr. rer. nat. Eckhard Birch-Hirschfeld* für die Durchführung der "on-chip"-Synthese und seine stets hilfsbereite Offenheit.

*Dr. rer. nat. Holger Schütz* für die Berechnungen und Planung der Triplex-Versuche.

*Franka Jahn* für die Erstellung der REM-Aufnahmen und die auf dem Gebiet der Bildbearbeitung gebotene Hilfe.

*Margitta Sossna*, *Katrin Kandera* und *Horst Porwol* für die Herstellung der Substrate.

das "Spaßbüro" *Robert Möller* und *Uwe Klenz* für Diskussionen und die Bereicherung des Arbeitsklimas.

die Damen *Anett Sondermann* und *Grit Festag*, für die lustige Zeit, die wir gemeinsam in einem Büro verbracht haben.

die Mitglieder der *Abteilung Biotechnische Mikrosysteme des IPHT*, die mit einer angenehmen Atmosphäre, guter Laune und einer großen Portion Geduld meinem Thema und meiner Persönlichkeit entgegen kamen.

die Leitung des IPHT, die meine Arbeit am Institut ermöglicht haben.

die DFG, welche mit einem Projekt (Fr 1348/1-4) die finanzielle Basis für diese Arbeit bereitstellte.

...und nicht zuletzt an meine Familie für die Unterstützung. Besonderer Dank gilt *Ralf*, meinem Mann, für seine mit viel Humor und Ironie gezeigte Geduld und seine Hilfe meine stilistischen Entgleisungen zu korrigieren.

---

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Andrea Csáki  
Geburtsdatum: 26.Okt.1967  
Geburtsort: Nagykőrös (Republik Ungarn)  
Nationalität: ungarisch  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

### AUSBILDUNG

1974-1978 Grundschole, Dunavarsány  
1978-1982 János Arany Oberschole, Nagykőrös  
1982-1986 János Arany Gymnasium, Nagykőrös  
20.06.1986 Allgemeine Hochschulreife

1986-1991 Studium "Biologie- und Chemie-Lehramt" an der Wissenschaftlichen Universität Attila József, Szeged (Ungarn)  
17.06.1991 Staatsexamen in den Fächern Biologie- und Chemie-Lehramt  
Titel der Diplomarbeit: "Untersuchung aeroallergener Pilzsporen"

1992-1999 Studium Biologie (Diplom) an der Friedrich Schiller Universität Jena  
1994-1996 Erziehungsurlaub  
02.11.1999 Diplomprüfung Biologie  
Titel der Diplomarbeit: "Positionierte Immobilisierung von Nukleinsäure-Molekülen und Nanopartikeln auf mikrostrukturiertem Gold-Substrat in planarer Anordnung" an der Friedrich Schiller Universität Jena und am IPHT Jena

seit 4/2000 Promotion an der Friedrich Schiller Universität Jena und am IPHT Jena

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

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

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