

Gezielte Mikro- und Nanointegration von DNA und DNA-Superstrukturen in mikrostrukturierte Chiplayouts

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biochemiker **Andreas Wolff**

geboren am 03. November 1977 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich S. Schubert

2. PD Dr. Wolfgang Fritzsche

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.12.2008

The line it is drawn

The curse it is cast

The slow one now

Will later be fast

As the present now

Will later be past

The order is rapidly fadin'

And the first one now will later be last

For the times they are a-changin'.

(Bob Dylan, *The Times They are A-Changin'*)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Molekulare Nanotechnologie	1
1.2.1 DNA	4
1.2.2 Metall-Nanopartikel	6
1.2.3 Funktionalisierte Substrate	6
1.3 DNA-basierte molekulare Konstruktion	7
1.4 Mikro-Nano-Integration von DNA	8
1.4.1 Bewegte Grenzflächen.....	11
1.4.2 Dielektrophorese	13
1.5 Funktionalisierung der integrierten DNA-Strukturen	14
1.6 Zielstellung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Substrate	19
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Biologische Proben	20
2.1.4 Geräte	21
2.2 Methoden	21
2.2.1 Herstellung der mikrostrukturierten Chips	21
2.2.2 Modifizierung der Substratoberflächen.....	22
2.2.2.1 Aktivierung der Substrate	22
2.2.2.2 Silanisierung	23
2.2.3 DNA-Techniken	24

2.2.3.1	DNA-Linearisierung	24
2.2.3.2	Immobilisierung und Strecken der DNA	24
2.2.3.3	G-Wire Assemblierung	26
2.2.4	Funktionalisierung	27
2.2.4.1	Nanopartikel-induzierte Funktionalisierung	27
2.2.4.2	Direkte Silberabscheidung unter UV-Licht	27
2.2.4.3	Sequenzspezifische Markierung mit Streptavidin-Gold	28
2.2.4.4	Fluoreszenzmarkierung	28
2.2.5	Charakterisierungsmethoden	29
2.2.5.1	Optische Mikroskopie („ <i>in-situ Imaging</i> “)	29
2.2.5.2	Rasterelektronenmikroskopie	30
2.2.5.3	Rasterkraftmikroskopie	30
3	Ergebnisse und Diskussion	32
3.1	Integration von Lambda-DNA	32
3.1.1	Immobilisierung auf Glimmer	32
3.1.2	Immobilisierung auf Glas und Silizium	33
3.1.2.1	Eintrocknende Tropfen	33
3.1.2.2	Einfluss von Tropfengröße und DNA-Konzentration	33
3.1.3	Integration in Mikrostrukturen	38
3.1.3.1	Tropfenmethode	38
3.1.3.2	Dielektrophorese	41
3.2	Integration von DNA-Superstrukturen (<i>G-Wires</i>)	50
3.2.1	Einfluss der Immobilisierungsdauer	52
3.2.2	Einfluss der Ionenkonzentration	54
3.2.3	Stabilität	56
3.2.4	Strukturaufklärung und Autoorientierung von <i>G-Wires</i>	57
3.2.5	Immobilisierung von <i>G-Wire</i> Strukturen auf Silizium	59
3.2.5.1	Silizium mit additionaler Funktionalität	59
3.2.5.2	Silizium mit intrinsischer Funktionalität (Versetzungnetzwerke)	60
3.2.6	Integration von <i>G-Wire</i> -Strukturen in mikrostrukturierte Substrate	62
3.3	Funktionalisierung von DNA-Strukturen	64
3.3.1	Metallisierung	64

3.3.1.1	Nanopartikel-induzierte Metallisierung	64
3.3.1.2	Direkte Silberabscheidung unter UV-Licht	66
3.3.2	Sequenzspezifische Markierung mit Streptavidin-Gold	67
3.3.3	Fluoreszenzmarkierung	69
3.4	Korrelative Charakterisierung integrierter Nanostrukturen	72
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie	72
3.4.2	Rasterkraftmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie	75
3.4.3	Rasterkraftmikroskopie und Dunkelfeldmikroskopie	76
4	Zusammenfassung und Ausblick	78
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	78
4.2	Ausblick	80
	Literaturverzeichnis	82
	A Anhang	I
A.1	Bildnachweis	I
A.2	Abkürzungsverzeichnis	II
A.3	Tabellen	III
A.4	Wissenschaftliche Beiträge	VI
A.4.1	Publikationen	VI
A.4.2	Poster	VII
A.4.3	Vorträge	VIII
A.5	Danksagung	IX
A.6	Lebenslauf	X
	Selbständigkeitserklärung	XI

1 Einleitung

1.1 Einführung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Erarbeitung von Methoden für die gezielte Integration von DNA-Molekülen in Mikrostrukturen sowie deren Funktionalisierung für nanobiotechnologische Anwendungen, beispielsweise in Bioanalytik und Nanoelektronik. Eine solche Anwendung wäre z.B. ein Nanodraht und dessen Herstellung aus molekularen Bausteinen unter Verwendung reproduzierbarer Techniken. Dabei erfolgt die Integration von „*bottom-up*“ Strukturen in „*top-down*“ Peripherien mittels „*guided self-assembly*“ Prozessen. Die Bausteine für derartige molekulare Nanokonstruktionen können mikrostrukturierte Planarsubstrate (Chips), Nucleinsäuren und metallische Nanopartikel sein. Auf dem Prinzip der Selbstorganisation können diese Bausteine in einem nanoskaligen Baukastensystem kombiniert werden. Voraussetzung ist die Erarbeitung von Grundtechniken für die Integration der DNA in mikrostrukturierte Substrate. Dabei spielt die gezielte Manipulation von einzelnen DNA-Molekülen eine wichtige Rolle. Das präzise Positionieren der DNA ist die Grundvoraussetzung für die Verwendung als Matritze bei der molekularen Nanokonstruktion. Daran schließt sich eine Funktionalisierung, beispielsweise durch Metallisierung der integrierten DNA-Strukturen, an. Dazu wurden verschiedene Methoden getestet und zusammengeführt. Die verschiedenen Schritte konnten durch korrelative Charakterisierungsmethoden kontrolliert werden, teilweise direkt während der Prozesse durch „*in-situ real-time Imaging*“.

1.2 Molekulare Nanotechnologie

Eine Besonderheit der Nanotechnologie ist ihr fachübergreifendes Zusammenspiel vieler spezialisierter Fachgebiete der Naturwissenschaften. Dabei verschwimmen die Grenzen der

verschiedenen Disziplinen zunehmend, weshalb man auch von einer konvergenten Technologie spricht. Als theoretischer Begründer der Nanotechnologie wird Richard P. Feynman angesehen. Mit seiner Rede „*There is a plenty of Room at the Bottom*“ vor der American Physical Society 1959 erkannte er das Potential in atomaren bzw. nanometergrossen Dimensionen (1-100 nm) für neue technische Anwendungen [Feynman, 1961].

Später grenzte Eric Drexler den Begriff der Nanotechnologie weiter ein [Drexler, 1986]. Er verstand unter molekularer Nanotechnologie die Manipulation von einzelnen Molekülen sowie deren selbstorganisierte Assemblierung zu größeren Funktionseinheiten (Nanorobotern). Seine Überzeugung, dass sich aus den Bausteinen der Materie nach dem Legostein-Prinzip neue Welten erschaffen lassen, ist sicher eine kühne Vision. Dennoch beschäftigt sich die Nanotechnologie seitdem mit Strukturen in Nanometer-Dimensionen für technische Anwendungen. Mit der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops 1982 durch Gerd Binnig und Heinrich Rohrer konnte erstmals auch unter Umgebungsbedingungen visuell in diesen „Nanokosmos“ vorgedrungen werden [Binnig et al., 1986]. 1989 gelang es Don Eigler mit einem modifizierten Rastertunnelmikroskop 35 Xenonatome zu einem IBM Logo aufzureihen [Eigler and Schweizer, 1990]. Seitdem wurden viele neue Werkzeuge und Methoden zur Herstellung und Manipulation submikroskopisch kleiner Strukturen entwickelt [Bachmann, 1998]. Die Herstellung solcher Nanostrukturen mit Methoden und Ansätzen aus der Mikrosystemtechnik, wie z.B. der Photolithographie, wird als „*top-down*“ Ansatz bezeichnet. Verwendet man biologische Bausteine und Materialien unter Ausnutzung von Bauplänen und Organisationssprinzipien der Natur zur Realisierung biofunktionaler Materialien und biomolekularer Konstrukte, spricht man von molekularer Nanotechnologie. Dieser auf der molekularen Ebene beginnende Ansatz wird gleichzeitig als „*bottom-up*“ Ansatz bezeichnet. Dabei kann man zwischen zwei Konzepten unterscheiden: *Nano2Bio* nutzt die Nanotechnologie, um biologische Strukturen zu analysieren und zu manipulieren [Bier and Kleinjung, 2001], während das *Bio2Nano* Konzept biologische Strukturen zur Herstellung technischer Nanosysteme nutzt [Wevers and Wechsler, 2002].

Dabei spielt vor allem die Entwicklung und Etablierung von Basistechnologien eine entscheidende Rolle, die eine Realisierung neuer kleiner Nanofunktionseinheiten ermöglicht. Diese werden zur Entwicklung neuer Detektionsprinzipien für Biochiptechniken, nanoskaliger Einheiten für Nanoelektronik und -mechanik, Plasmonik sowie Photonik eingesetzt. Das Grundprinzip dieses „Werkzeugkastens“ stellt die Selbstorganisation biofunktionalisier-

ter Bausteine für einen „*bottom-up*“ Aufbau dar. Durch die hohe selektive Bioaffinität soll die parallele und kostengünstige Integration dieser Bausteine in technologische „*top-down*“ Peripherien ermöglicht werden.

Bei den Bausteinen handelt es sich um Nukleinsäuren und metallische Nanopartikel, bei den technologischen „*top-down*“ Peripherien meist um Planarsubstrate mit unterschiedlichen Funktionalisierungen. Diese Bausteine werden, wie in Abbildung 1.1 gezeigt, über molekulare Wechselwirkungen kombiniert. Die Funktionalisierung der Substrate kann dabei chemisch oder physikalisch (photolithographisch) erfolgen. Einen ganz anderen Ansatz stellt die intrinsische Funktionalisierung dar, z.B. durch Versetzungsnetzwerke an der Grenzfläche zwischen zwei Siliziumwafern.

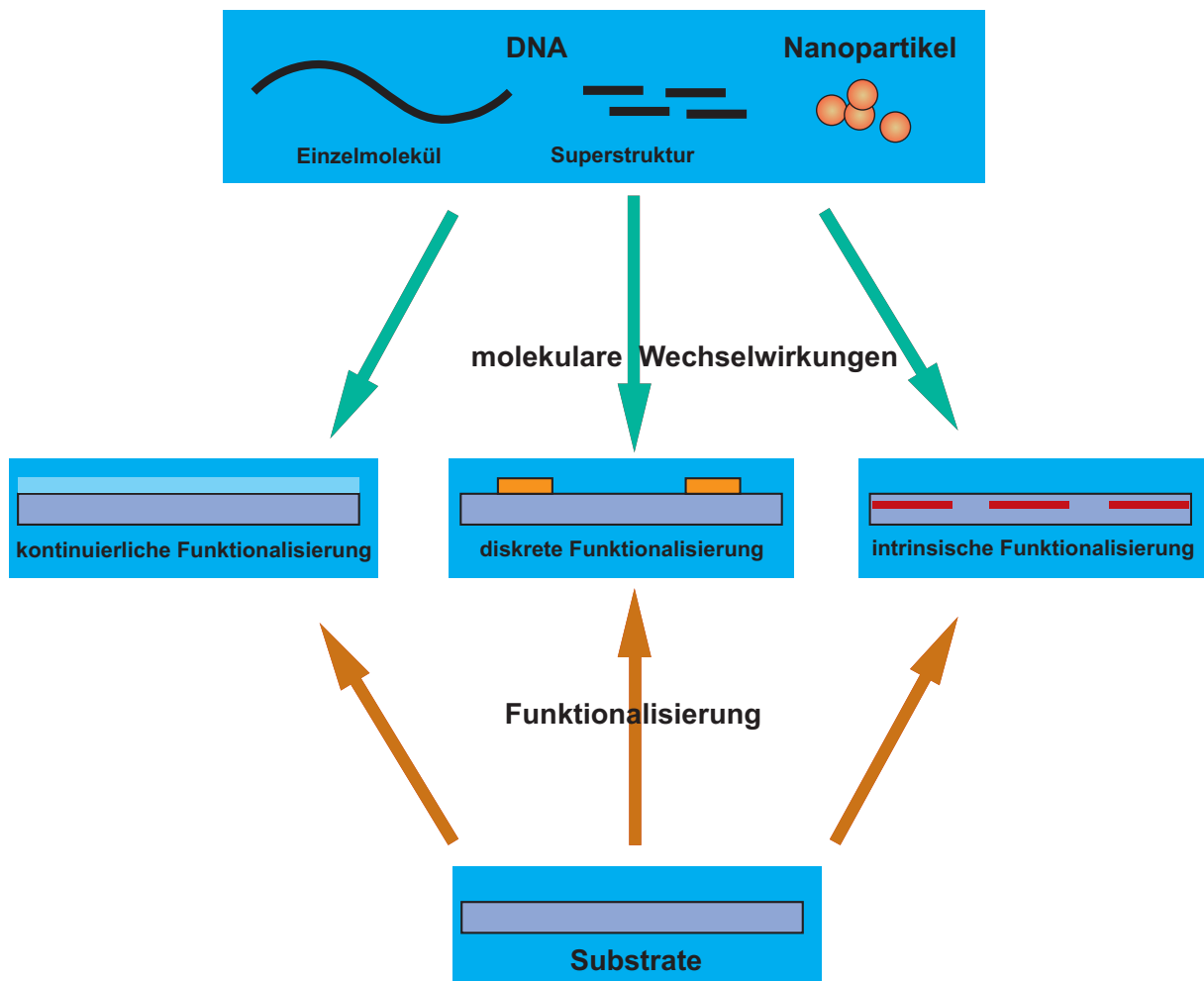


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der nanotechnologischen Bausteine und der Substratfunktionalisierung.

1.2.1 DNA

DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist ein Biopolymer, das die genetische Information aller Lebewesen und der DNA-Viren speichert. Ein DNA-Molekül liegt meist als Doppelstrang aus zwei antiparallelen und komplementären Strängen vor, die durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen Adenin (A) und Thymin (T) oder drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin (G) und Cytosin (C) (*Watson-Crick* Basenpaarungen) verbunden sind. Die Vielzahl der Wasserstoffbrückenbindungen, verbunden mit den Wechselwirkungen der Aromaten führt zu einem stabilen aber thermisch leicht zu manipulierenden Molekül. Weitere Eigenschaften wie mechanische, physikalische und chemische Stabilität sowie die Fähigkeit zur Selbstorganisation machen es zu einem wichtigen Molekül für die molekulare Nanotechnologie. Letzteres ermöglicht durch sequenzspezifische Hybridisierung eine subnanometergenaue Positionierung. Dabei wird an einem einzelsträngigen DNA-Molekül ein komplementärer DNA-Einzelstrang angelagert und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweils komplementären Nukleinbasen ausgebildet.

Desweiteren sind eine Reihe von Methoden etabliert, die es ermöglichen, DNA synthetisch herzustellen und zu manipulieren. So können durch Polymerase-Kettenreaktions-Techniken (PCR) große Mengen an DNA gezielt vervielfältigt werden. Ein „Enzymwerkzeugkasten“ (Polymerasen, Restriktionsenzyme, Ligasen usw.) ermöglicht es, DNA zu schneiden oder zusammenzufügen und weitere hochspezifische, nachträgliche Bearbeitungen durchzuführen. So kann DNA in gewünschter Länge, Form und Basenabfolge konstruiert werden. Die sequenzspezifische Adressierung im Subnanometerbereich macht DNA zu einer interessanten Matritze bei der Herstellung von Nanodrähten sowie zur Überbrückung und Anbindung im Nanometerbereich [Niemeyer, 2000, Mbindyo et al., 2001].

Zusätzlich zu der Einzelstrang- oder Doppelstrangstruktur kann DNA, in Abhängigkeit von Salzgehalt und pH-Wert, auch nicht-*Watson-Crick* Basenpaarungen eingehen. So entstehen bei der sogenannten *Hoogsteen*-Basenpaarung DNA-Triple-Stränge durch „Paarungen“ von TAT und CGC. Eine weitere Sonderform stellen die G-Quartette (G = Guanin) dar. Diese sind aus der Natur bei Telomeren und in Aptameren bekannt. Telomere bezeichnen die Chromosomen-Enden, die einen hohen G-Gehalt aufweisen (Sequenz wird dabei mehrere tausend mal wiederholt). Durch die bedingte Faltungsstruktur dieser Enden wird die DNA vor dem vorzeitigen Abbau geschützt. Kurze DNA-Stränge (Oligonukleotide) mit hohem

Guaningehalt können eine analoge DNA-Superstruktur, die sogenannten *G-Wires*, bilden. Diese sind sehr rigide Strukturen und denaturieren selbst bei 95 °C und unter Einfluss von 8 M Harnstoff nicht [Marsh and Henderson, 1994]. Dabei hat sich das Oligonukleotid mit der Sequenz GGGGTTGGGG (Telomersequenz von Nematoden) als günstige Matrize für die Assemblierung von *G-Wires* erwiesen [Marsh et al., 1995]. In Anwesenheit von Kationen ordnen sich vier Guanine quadratförmig in einer Ebene an. Es werden von jedem Guanin aus vier Wasserstoffbrücken gebildet. Abbildung 1.2 zeigt die verschiedenen Möglichkeiten der *G-Wire* Assemblierung. Dabei können zwei Oligonukleotide eine Schleife ausbilden oder sich vier Oligonukleotide aneinander lagern. Aufgrund der Unterbrechung der beiden „Guaninblöcke“ durch die zwei Thymine ist auch eine versetzte Zusammenlagerung möglich, so dass sich immer wieder neue Stränge überlappt anlagern können. Es entstehen lange DNA-Superstrukturen, die eigentlichen *G-Wires*.

Diese DNA-Superstrukturen sind wegen ihrer chemischen, physikalischen und mechanischen Stabilität und der Fähigkeit zur Bindung von Metallionen ein interessantes Material für die molekulare Nanotechnologie.

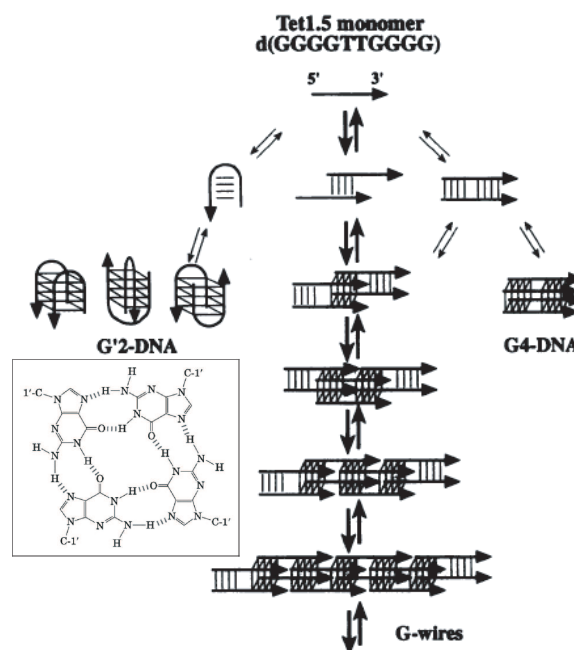


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der G-Wire-Bildung nach Marsh 1995 [Marsh et al., 1995].

1.2.2 Metall-Nanopartikel

Metall-Nanopartikel sind monokristalline Verbände aus Einzelatomen. Sie sind in Größen von ca. ein bis mehrere hundert Nanometern synthetisierbar. Dabei sind Gold- und Silbernanopartikel am weitestens verbreitet. Beide zeigen Plasmonenabsorption im sichtbaren Spektrum des Lichtes. Diese und weitere Eigenschaften sind dabei größenabhängig, weshalb Nanopartikel ein einstellbares Werkzeug z.B. für Biosensoren darstellen. Sie werden erfolgreich zum Anfärben von biologischen Proben und zur Visualisierung biologischer Kompartimente verwendet [Faulk and Taylor, 1971]. So lassen sich Metall-Nanopartikel mit DNA-Molekülen modifizieren und gezielt zu komplexen Mustern und dreidimensionalen Anordnungen positionieren [Niemeyer, 1999, Mirkin, 2000, Steinbrück et al., 2008]. Die Bio-konjugation kann dabei über einfache Adsorption oder mit dem in der Molekularbiologie sehr weit verbreiteten und etablierten Biotin-Avidin System [Shaiu et al., 1993] erfolgen. Eine ebenfalls sehr effiziente Methode ist die Anbindung von Thiol-modifizierten Oligonukleotiden an Goldoberflächen [Alivisatos et al., 1996, Mirkin et al., 1996, Elghanian et al., 1997, Loweth et al., 1999, Demers et al., 2000]. Desweiteren stellen Metall- oder Halbleiter-Partikel aktive Komponenten bei der Integration in elektrische Anordnungen und Schaltkreise sowie zur Metallisierung von DNA dar [Eichen et al., 1998]. So ist z.B. eine Realisierung von Einzelelektronentransistoren vorstellbar [Klein et al., 1997].

Die Metall-Nanopartikel stellen den wichtigsten Baustein bei der Funktionalisierung von integrierten DNA-Strukturen dar. Mit ihnen ist es z.B. möglich, eine elektrische Leitfähigkeit oder eine verbesserte Visualisierung der DNA-Moleküle zu erzielen.

1.2.3 Funktionalisierte Substrate

Eine Integration von DNA-Molekülen setzt die gezielte Funktionalisierung der eingesetzten Substrate voraus (siehe Basisschema in Abbildung 1.1). Die DNA benötigt Affinitätspunkte, an die sie sich bevorzugt binden und an denen die genaue Adressierung bzw. Positionierung erfolgen kann. Diese Funktionalisierung kann chemisch oder physikalisch erfolgen. Bei der chemischen Funktionalisierung werden durch gezieltes Anbinden von funktionellen Gruppen die Oberflächeneigenschaften der Substrate in Form von funktionellen Monolagen „*self assembled monolayer*“ (SAM) modifiziert. So ist es z.B. möglich, durch Aufbringen von Silanen die Substratoberflächen zu hydrophobisieren. Alternativ kann eine positiv gelade-

ne Gruppe eingeführt werden, die die Bindung von DNA-Molekülen über elektrostatische Wechselwirkungen fördert (siehe 1.3.1).

Photolithographisch können Metalle u.a. auf Glas oder Silizium strukturiert werden. Die Auflösung des Strukturierungsprozesses liegt momentan um die 30 nm. Dieses erlaubt z.B. die parallele Strukturierung von schmalen Goldstrukturen auf Silizium, welche ebenfalls zur Anheftung von DNA genutzt werden können.

Durch direktes Waferbonden ist zwischen zwei Siliziumscheiben die Generierung von Versetzungsnetzwerken möglich [Lasky et al., 1985, Lasky, 1986, Shimbo et al., 1986]. Diese bilden elektrische Streufelder im Bereich von 10^3 V/cm. Wenn diese unmittelbar unter der Oberfläche lokalisiert sind, könnten Coulomb-Wechselwirkungen mit geladenen Biomolekülen ermöglicht werden. Durch die Verdrehung und Verkipfung der beiden Kristallgitter während des Bondens kann die Struktur und die Dimension des Versetzungsnetzwerkes eingestellt werden. Die Möglichkeit der DNA-Anbindung auf derartig funktionalisierten Substraten sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Ziel war es, die im Silizium lokalisierten geladenen Versetzungsmuster auf der Oberfläche der Substrate zur Anbindung von DNA-Superstrukturen zu nutzen.

1.3 DNA-basierte molekulare Konstruktion

Ausgehend von den erwähnten Eigenschaften der DNA und der Metall-Nanopartikel ist es möglich, im „*bottom-up*“ Ansatz diskrete oder auch periodische Nanostrukturen mit kontrollierter Topologie aufzubauen. Durch sequenzspezifische Bindungsstellen sind eindimensionale bis hin zu dreidimensionalen Konstruktionen möglich. Eindimensionale Konstrukte bilden Gerüste für die Positionierung oder stellen Templates für die Nanodraht-Herstellung dar [Coffer et al., 1992, Braun et al., 1998, Ford et al., 2001, Storm et al., 2001, Richter et al., 2000, Richter et al., 2001, Richter et al., 2002, Monson and Woolley, 2002, Keren et al., 2002, Csaki et al., 2003]. 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, Seeman, 1991, Seeman, 1998, Seeman, 2003, Winfree, 1998, Niemeyer, 2002].

Ziel dieser molekularen Konstruktionen ist die Fertigung neuer miniaturisierter Anordnungen mit technischem Einsatzpotential. Dabei bieten solche Konstrukte, wie Einzelelektronentransistoren [Andres et al., 1996, Klein et al., 1996], Nanopartikel-basierte molekulare Schalter [Liu et al., 2001] oder Bauteile für die Computer-Industrie (computing devices) [Orlov et al., 1997] bestehend aus Nanodrähten, Nanoröhren oder Nanokristallen, neue elektrische oder auch magnetische Eigenschaften, die es ermöglichen das Problem immer kleinerer und schnellerer Schaltkreise zu lösen. Die Integration von Enzymen [Heller, 1992, Willner et al., 1993, Willner et al., 1996, Bardea et al., 1997], Antikörpern [Bardea et al., 2000, Stefan et al., 2000, Warsinke et al., 2000] oder DNA [Wang et al., 1999, Patolsky et al., 2001, Patolsky et al., 2002] in elektronische Elemente verspricht ein großes Potential für die Entwicklung von bioelektronischen Systemen wie Biosensoren [Willner et al., 2000, Willner et al., 2002] oder künstlichen Organen [Prokop, 2001].

1.4 Mikro-Nano-Integration von DNA

Der Prozess zur Fertigung einer einfachen Nanostruktur, wie z.B. die eines Nanodrahtes, erfordert folgende Schritte (Abb 1.3): Ausgehend von dem Baustein DNA und dem Substrat, in diesem Falle ein mikrostrukturierter Siliziumchip, ist eine geeignete Manipulationsmethode zur präzisen Positionierung der DNA in den Mikropalt notwendig. Das integrierte Biomolekül kann nun weiter funktionalisiert (hier metallisiert) werden, um beispielsweise einen elektrisch leitenden Draht zu bilden.

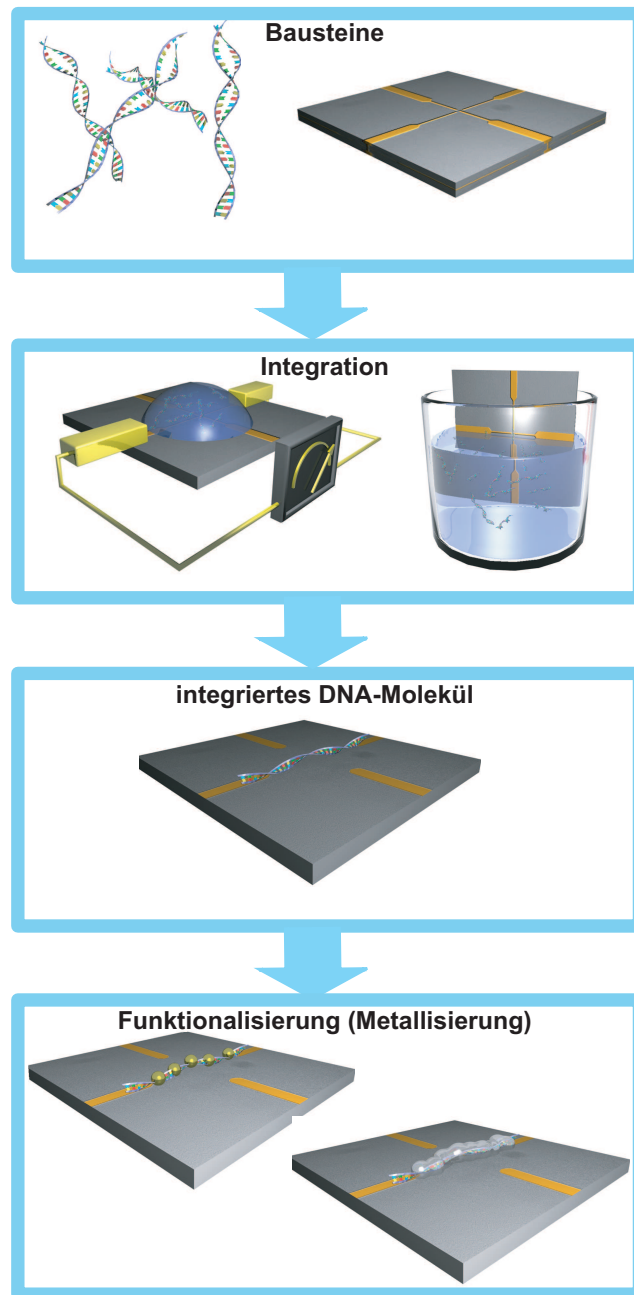


Abb. 1.3: Schematischer Ablauf der Integration und Funktionalisierung von DNA.

Der wichtigste und zugleich auch diffizilste Schritt einer solchen Biomolekül-Integration für nanoelektronische Anwendungen (z.B. als Nanodraht) ist die gezielte Positionierung auf den planaren Substraten. Dabei besteht die Notwendigkeit der Ausrichtung der DNA-Moleküle, ausgehend von einem adressierten Punkt. Im Falle von langer DNA ist zusätzlich ein Strecken der Moleküle notwendig. Die DNA-Stränge müssen dabei von der „*random coil*“ Konformation in Lösung (physiologischer Zustand) in die gestreckte Form auf dem Substrat überführt werden. Die dabei benötigten Kräfte müssen gezielt auf die DNA-Moleküle in Lösung wirken

und eine Wechselwirkung mit den Substrat-Oberflächen ermöglichen. Elegante Methoden zur gerichteten und hoch präzisen Manipulation von DNA sind dabei die magnetische [Smith et al., 1992] und die optische Pinzette [Perkins et al., 1994, Hoyer et al., 1996]. Dabei ist jedoch ein hoher apparativer Aufwand nötig und die Moleküle können nur seriell manipuliert werden. Methoden, die mechanische Kräfte nutzen, wie z.B. bei eintrocknenden Tropfen, sind mit einfacheren Mitteln zu bewerkstelligen. Sie ermöglichen zusätzlich eine hochparallele Integration. Durch Nutzen von Kräften in elektrischen Feldern, wie bei der Dielektrophorese, ist ebenfalls eine hocheffiziente und präzise Manipulation von DNA möglich [Washizu and Kurosawa, 1990]. Durch Parallelschaltungen ist dabei eine parallele Integration, wie bei den mechanische Verfahren, vorstellbar. Die folgende Tabelle fasst noch einmal die Verfahren zur DNA-Manipulation und Mikro-Integration zusammen.

Kraft	Methoden	
magnetisch	magnetische Pinzette	[Smith et al., 1992]
optisch	Laser-Pinzette	[Perkins et al., 1994]
bewegte Grenzfläche	eintrocknender Tropfen	[Bensimon et al., 1994, Bensimon et al., 1995] [Jing et al., 1998]
	kontrollierte Meniskusbewegung	[Otohe and Ohtani, 2001] [Michalet et al., 1997]
	bewegtes Glassubstrat	[Yokota et al., 1997]
	Tropfen im Gasstrom	[Li et al., 1998]
	Schleudern („ <i>spin-coating</i> “)	[Yokota et al., 1999]
elektrostatisch	Flüssigkeitsstrom	[Braun et al., 1998]
	Dielektrophorese	[Washizu and Kurosawa, 1990] [Hölzel and Bier, 2003]

Tab. 1.1: Methoden der DNA-Integration.

Dabei müssen diese Methoden ausreichend Kraft ausüben, um eine Wechselwirkung zwischen DNA und den Substrat-Oberflächen zu ermöglichen, wobei sekundäre Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielen. Diese treten zwischen räumlich benachbarten, nicht kovalent verbundenen Atomen auf. Sie haben einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur (Konfor-

mation) von Molekülen, insbesondere von Makromolekülen. Sekundäre Wechselwirkungen sind schwache Wechselwirkungen im Bereich bis 40 kJ/mol [Mortimer, 1996] und können kollektiv zu starker Bindung zwischen Molekülen führen. Die drei entscheidendsten Formen dieser intermolekularen Wechselwirkungen sind:

1) **Dipol-Dipol-Kräfte** entstehen zwischen polaren Molekülen. Dabei kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiven und negativen Bereichen der Moleküle.

2) **Van der Waals / London Kräfte** bezeichnen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen ungeladenen Molekülen. Durch die Bewegung von Elektronen kommt es zu fluktuierenden momentanen Dipolen in den Molekülen. Dies kommt vor allem in vielatomigen Molekülen mit einer ausgedehnten leicht polarisierbaren Elektronenwolke vor. Dadurch entstehen kurzzeitig stärker negativ geladene Bereiche in einem Molekül. Dies kann in Nachbarmolekülen ebenfalls einen synchronen Dipol induzieren.

3) **Wasserstoffbrückenbindungen** entstehen wenn Wasserstoffatome an kleine elektronegative Atome, wie z.B. Stickstoff, gebunden sind. Dadurch kommt es zu einem erhöhten positiven Ladungsanteil am Wasserstoff. Dieser kann nun mit einem freien Elektronenpaar eines elektronegativen Atoms eines anderen Moleküls wechselwirken.

Wechselwirkungen, welche die Immobilisierung und Positionierung auf den Substratoberflächen ermöglichen, können in gerichtete und ungerichtete Wechselwirkungen unterschieden werden. Letztere ist auf Diffusion zurückzuführen, während die gerichteten in elektrostatische (z.B. Dielektrophorese) und mechanische (z.B. bewegte Grenzflächen) unterschieden werden können.

1.4.1 Bewegte Grenzflächen

Ein Vielzahl der mechanischen Methoden nutzt die Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit zum Immobilisieren von Biomolekülen, vor allem im Fall von DNA. Entscheidend dabei ist, dass Nukleinsäuren eine hohe Affinität für unterschiedliche Substratoberflächen aufweisen. Dies ermöglicht eine adsorptive Bindung der DNA an Siliziumoxidflächen [Fritzsche et al., 1999], Goldoberflächen [Beebe, 1995] und Glimmer [Hansma et al., 1991, Vesenka et al., 1992]. Letzterer konnte als Standardsubstrat für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von DNA etabliert werden. Das Ausnutzen der Trägheit von langen DNA-Molekülen im Flüssigkeitsstrom bzw. im zurückweichenden Meniskus ermöglicht durch Tropfeninkubation und

anschliessendes Trocknen im Luftstrom, DNA auf Glimmer-Oberflächen zu immobilisieren und auszurichten [Li et al., 1998]. Weitere geeignete Methoden sind das als molekulares „*Combing*“ bezeichnete Herausziehen von Substraten aus DNA-Lösungen, wodurch die Moleküle in Zugrichtung gestreckt werden [Michalet et al., 1997, Michalet, 2001]. Das Eintrocknen von Tropfen auf der Substrat-Oberfläche führt zu radial gestreckten DNA-Strängen an der Tropfenperipherie und einer hohen DNA-Konzentration im Tropfenzentrum [Bensimon et al., 1994, Bensimon et al., 1995, Jing et al., 1998]. Bei dieser Methode wird, wie bereits erwähnt, die Grenzfläche zwischen dem Tropfen der DNA-Lösung und Luft zum Strecken der Moleküle genutzt. Dabei wird das Ende eines DNA-Stranges auf dem Substrat fixiert, während sich das andere Ende noch in Lösung befindet. Durch das Zurückweichen des Flüssigkeitsrandes wird dieses freie Ende immer weiter vom fixierten Ende entfernt. Durch die Abnahme der Dimension des Tropfens kommt mit der Zeit auch dieses Ende mit dem Substrat in Kontakt und wird dort fixiert (Abb. 1.4).

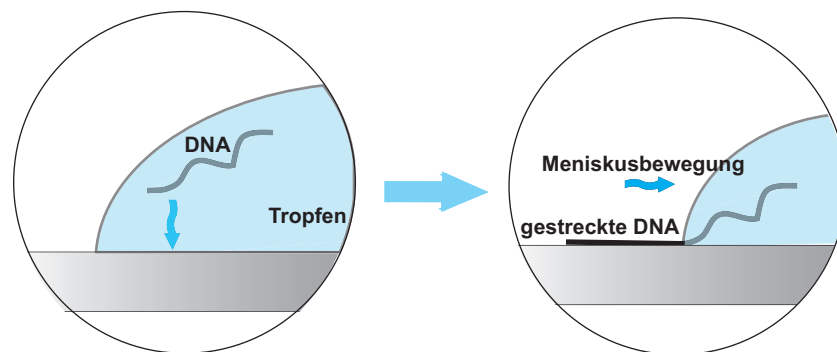


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der DNA-Immobilisierung mittels eintrocknenden Tropfens.

Um ein Anhaften der DNA an Glas- oder Siliziumoberflächen zu realisieren, muss eine gezielte Funktionalisierung der Substrate durchgeführt werden. Diese kann eine positive Ladung bereitstellen, so dass sich das negativ geladene Rückgrat der DNA (insbesondere die teilweise unhybridisierten Enden) an diese anlagern und durch elektrostatische Wechselwirkungen festgehalten werden können. Die am weitesten verbreiteten Modifikationen von Oberflächen für derartige Anwendungen sind Organosilane wie APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) [Fang and Hoh, 1998], ODTS (Octadecyltrichlorosilan) [Vallant et al., 1998] sowie PMMA (Polymethylmethacrylat) [Gueroui et al., 2002]. Dabei stellt nur die APTES-Funktionalisierung positiv geladene Gruppen zur Verfügung.

Für die Integration von DNA in Mikroelektrodenpalten werden kurze DNA-Sequenzen auf den Elektroden immobilisiert. Diese sind komplementär zu den Enden der Ziel-DNA, die anschließend dort hybridisieren kann. Dabei können die Elektrodenpalte effektiv mit Mikrometer-langen DNA-Molekülen überspannt werden [Braun et al., 1998]. Ebenfalls möglich ist das Ausnutzen der negativ geladenen DNA-Enden mit positiv geladenen Elektrodenoberflächen [Maubach et al., 2003]. Dabei ist es möglich, den parallelen Prozess des eintrocknenden Tropfens auf Mikrostrukturen zu übertragen und so DNA in Elektrodenpalten aufzuspannen [Maubach and Fritzsche, 2004]. Die DNA folgt dabei in einem „*guided self-assembly*“ den Elektrodenanordnungen und überbrückt auch die Elektrodenpalte.

Diese Kombination von „*top-down*“ Strukturen und „*bottom-up*“ Techniken wird auch in dieser Arbeit verfolgt.

1.4.2 Dielektrophorese

Durch Anlegen eines alternierenden elektrischen Feldes an elektrisch kontaktierbaren Mikrostrukturen ist es möglich, direkten Einfluss auf die DNA-Moleküle in Lösung zu nehmen. Bei diesem als Dielektrophorese bezeichneten Prozess kann ein inhomogenes elektrisches Feld zur Translationsbewegung von ungeladenen, polarisierbaren Objekten genutzt werden. In dem von Herbert Pohl [Pohl, 1951] beschriebenen Prozeß werden auf beiden Seiten eines Objektes Partialladungen erzeugt, wobei die Nettoladung meist null bleibt. Der im Teilchen induzierte Dipol kann verschiedene, elektrokinetische Effekte wie Rotation, Deformation oder, wie im hier gewünschten Fall, die gerichtete Bewegung der DNA auslösen. Dafür muss sich die DNA in einem Medium befinden, welches weniger polarisierbar ist als sie selbst. In einem räumlich inhomogenen Feld, wie es in einem Elektrodenspalt vorliegt, bewegt sich ein polarisiertes DNA-Molekül in Richtung der höchsten Feldintensität an den Elektrodenkanten (positive Dielektrophorese). Ein zweiter Effekt ist die Ausrichtung der DNA-Stränge entlang der Feldlinien. Ausschlaggebend dabei ist, dass die beiden Enden der DNA in die Bereiche höherer Feldstärken an den Elektroden gezogen werden, was zu einer Ausrichtung entlang der Längsachse der DNA führt [Washizu and Kurosawa, 1990]. Hinzu kommt eine zirkuläre Bewegung der sich in der Lösung befindlichen Ionen, welche zusätzlich die Streckung und Ausrichtung der bereits an die Elektroden gebundenen DNA begünstigt [Lin et al., 2005].

Die dielektrophoretische Kraft wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$F(\text{DEP}) = \frac{1}{2} a \cdot d(E^2)$$

(a: Polarisierbarkeit des Objektes (in Phase), d: Elektrodenabstand, E: Mittelwert der Feldstärken)

Die Bewegung und Assemblierung von Partikeln [Pohl, 1951] und Zellen [Pohl and Crane, 1971] durch dielektrophoretische Kräfte konnte demonstriert werden. Washizu und Mitarbeiter konnten als erstes die Eignung von Dielektrophorese zur Streckung von DNA in Elektrodenanordnungen zeigen und beschrieben die bereits erwähnten Effekte der dielektrischen Anziehung der Moleküle zu den Elektrodenkanten sowie die elektrostatische Ausrichtung [Washizu and Kurosawa, 1990]. Weiterführende Arbeiten ermöglichten die DNA-Längenbestimmung sowie den Nachweis von Nukleaseaktivitäten mit dieser Methode. Dabei wurde ein Feld von 10^6 V/m und eine Frequenz von 1 MHz verwendet [Washizu et al., 1995]. Applikationen von oszillierenden und nicht oszillierenden Feldern ermöglichen das Bewegen von eingefangenen DNA-Molekülen auf Goldelektroden und erlauben so die Manipulationen von kleinsten DNA-Konzentrationen [Asbury and Engh, 1998].

Entscheidend für den Dielektrophoreseprozess ist neben den auftretenden elektrischen Feldern und Frequenzen auch die Geometrie der verwendeten Elektroden. So konnte der Einfluss der Elektrodenform auf die Präzision der DNA-Positionierung gezeigt werden [Dewarrat et al., 2002]. Vierpolelektroden-Anordnungen mit Spaltgrößen zwischen 3 und 100 Mikrometern konnten zum Einfangen von DNA und Proteinen genutzt und die Moleküle anschließend elektrisch charakterisiert werden [Zheng et al., 2004].

1.5 Funktionalisierung der integrierten DNA-Strukturen

Im letzten Schritt kann die positionierte und ausgerichtete DNA metallisiert werden, um die für Bauelemente wie Drähte oder Resistoren nötige elektrische Leitfähigkeit zu ermöglichen. DNA ist nur über sehr kurze Distanzen elektrisch leitfähig [Kelley et al., 1997, Kelley et al., 1998]. Lange DNA-Moleküle oberhalb 40 Basenpaare sind Isolatoren [Storm et al., 2001]. Lediglich bei Vorhandensein einer Hydrathülle konnten elektrische Messungen an 600 nm langen DNA-Molekülen beschrieben werden, mit der Schlussfolgerung, dass DNA durch

die p-Elektronen der Basen gute Halbleitereigenschaften besitzt [Fink and Schöneberger, 1999]. Zum anderen zeigten lichtinduzierte Elektronentransfer-Experimente eine schwache makroskopische Leitfähigkeit von DNA-Filmen [Okahata et al., 1998, Cai et al., 2000].

Das Entfernen der DNA umgebenden Wasserhülle führt zu reduzierter Leitfähigkeit. Diese ist gleichzeitig sehr stark temperaturabhängig [Tran et al., 2000]. Die Berechnung der elektronischen Struktur und direkte Messungen an auf Glimmer immobilisierter DNA des *Bakteriophagen Lambda* (Lambda-DNA) zeigte Werte von 10^6 Ohm/cm [de Pablo et al., 2000]. Mittels Elektrostatischer Rasterkraftmikroskopie konnte ebenfalls das isolierende Verhalten von DNA im Gegensatz zu Kohlenstoff-Nanoröhren („*carbon nanotubes*“) nachgewiesen werden [Bockrath et al., 2002]. Elektrische Messungen an DNA zwischen Gold- oder Platinelektroden mit Abständen von 40 bis 500 nm konnten ebenfalls dieses Verhalten bestätigen [Storm et al., 2001]. Konsens besteht darüber, dass ein möglicher Ladungstransport nur über die Basenpaarungen mit ihren p-Orbitalen stattfindet [Grinstaff, 1999]. Da also native DNA für elektrische Schaltkreise eher ungeeignet ist, muss eine zusätzliche Funktionalisierung mit Materialien durchgeführt werden, um die gewünschten Eigenschaften, wie z.B. die Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit zu erzielen.

Diese auch als Metallisierung bezeichnete Funktionalisierung kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Die erste Möglichkeit ist die direkte Metallisierung der DNA durch Metallionenkomplexe an den Basen. Diese Ionen dienen als Keime für weitere Metallisierungsschritte. Die zweite Variante ist eine Nanopartikel-vermittelte Metallisierung am negativ geladenen Rückgrat der DNA.

Tabelle 1.2 führt verwendete Metalle auf, die bei Nanodrähten Anwendung finden. Diese sind Vertreter der ersten und achten Nebengruppe des Periodensystems der Elemente, weisen eine sehr gute Leitfähigkeit auf und sind als Edelmetalle leicht chemisch zu reduzieren. Ziel ist es, die Metallcluster oder Metall-Nanopartikel an die DNA in einer Perlenketten-ähnlichen Anordnung anzubinden. Aus diesen können in einem nächsten Schritt durch weitere Metallabscheidung durchgehende und leitfähige Strukturen erzeugt werden. Dabei werden Clustergrößen im Bereich des DNA-Durchmessers verwendet, was für dünne und homogene Drähte Voraussetzung ist. Allein die Anbindung von kationischen Goldkolloiden oder Cadmiumsulfid-Clustern (CdS) an das negativ geladene Rückgrat der DNA, führte noch nicht zu leitenden Drähten, da der Abstand der Partikel zueinander zu groß ist [Torimoto et al., 1999]. Durch anschließendes Wachstum solcher CdS-Cluster war es allerdings möglich, aus

einer Anordnung von halbleitenden Nanopartikeln einen Nanodraht entlang der DNA zu formen [Coffer et al., 1996].

Es konnte auch die selektive lokale Anlagerung von Silberionen durch einen Silber-Natriumionen-Austausch genutzt werden, um die DNA mit Keimbildungszentren für eine anschließende Silberabscheidung zu bestücken. So war das Erzeugen von 12 μm langen und 100 nm breiten „Metalldrähten“ zwischen zwei Elektroden möglich [Braun et al., 1998]. Auch Palladium konnte erfolgreich an solchen DNA-Strukturen zu einer kontinuierlichen Hülle abgeschieden werden [Duguid et al., 1993, Richter et al., 2001]. Dabei ähnelt die Anlagerung des Palladium-Komplexes dem des bekannten *cis*-Platins, welches zur Krebstherapie eingesetzt wird. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Nebengruppenelemente und deren Verwendung für die Nanodrahtherstellung.

Metall	Nebengruppe		Drahtdurchmesser in nm	Widerstand in Ohm
Gold	I	[Keren et al., 2003]	50 -100	25
Silber	I	[Braun et al., 1998]	100	7000000
Kupfer	VIII	[Monson and Woolley, 2003]	3	
Platin	VIII	[Mertig et al., 2002]		
Palladium	VIII	[Richter et al., 2000, Richter et al., 2001]	20	

Tab. 1.2: Übersicht der zur Funktionalisierung verwendeten Metalle.

Nachdem die Oberfläche der DNA mit den angelagerten Metallkomplexen oder Nanopartikeln aktiviert ist, können diese als Keim und Katalysator für den folgenden Reduktionsschritt dienen. Dies führt, wie bereits erwähnt, zur Erzeugung von homogenen Drähten, bei denen die Lücken zwischen den Metallkomplexen geschlossen sind. Im Fall von Palladium wurde von Richter und Mitarbeitern ein Mix aus Natriumcitrat, Milchsäure und Dimethylaminborat verwendet. Es konnten Drähte mit einem Durchmesser von 50 nm erzeugt werden [Richter et al., 2000, Richter et al., 2001]. Reduktionsmittel können u.a. auch Natriumborohydrat oder Hydrochinon zur Reduktion von Silbernitrat oder Silberacetat [Hacker et al., 1991] sowie

die Anwendung von Tetrachloroaurat mit Hydroxylamin [Weizmann et al., 2001, Weizmann et al., 2004] sein. Auch ein, dem Entwickeln von Fotos vergleichbarer Prozess, mit einer sauren Lösung von Hydrochinon und Silberionen unter Lichtausschluss kann zur Silberabscheidung verwendet werden [Birrell et al., 1986, Holgate et al., 1983]. Die Abscheidung von Kupfer aus einer Kupfernitratlösung führte zu Drähten mit nur 3 nm Durchmesser. Dabei wird Kupfer (II) elektrostatisch an die DNA gebunden, welches durch Ascorbinsäure reduziert wird. Diese dünnen Kupferdrähte konnten als elektrische Verbindungen in integrierten Schaltkreisen fungieren [Monson and Woolley, 2003].

Eine weitere einfache Methode ist die elektrostatische Bindung von Ligand-stabilisierten Nanopartikeln entlang des DNA-Rückgrates [Warner and Hutchison, 2003]. Positiv geladene Goldnanopartikel konnten an DNA-Molekülen, die einen Elektrodenspalt überbrücken, gebunden werden und zeigen so das Potential nanoskaliger Bausteine an einem biomolekularen Gerüst für eine entsprechende Nanolithographie [Maubach et al., 2005].

1.6 Zielstellung

Das Potential verschiedener Methoden zur gezielten Positionierung von DNA-Molekülen auf strukturierten Oberflächen soll untersucht und demonstriert werden. Dabei sollen die „*bottom-up*“ Strukturen (DNA) in die „*top-down*“ Peripherien (mikrostrukturierte Substrate) mittels „*guided self-assembly*“ integriert werden, wodurch eine Kombination von „*top-down*“ und „*bottom-up*“ realisiert wird. Die Optimierung der Parameter soll durch direkte Kontrolle mittels *in-situ real-time Imaging* entwickelt werden. Zur Charakterisierung der erzeugten Strukturen kommen verschiedene ultramikroskopische Methoden, wie Fluoreszenzmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Dunkelfeldmikroskopie zum Einsatz, die bis hinab auf Einzelpartikel- bzw. Einzelmolekülniveau zueinander korreliert werden sollen.

Ziel ist die Integration von DNA-Einzelmolekülen oder DNA-Superstrukturen mit anschließender Funktionalisierung durch Metallisierung für nanobiotechnologische Anwendungen (Bioanalytik, Nanoelektronik).

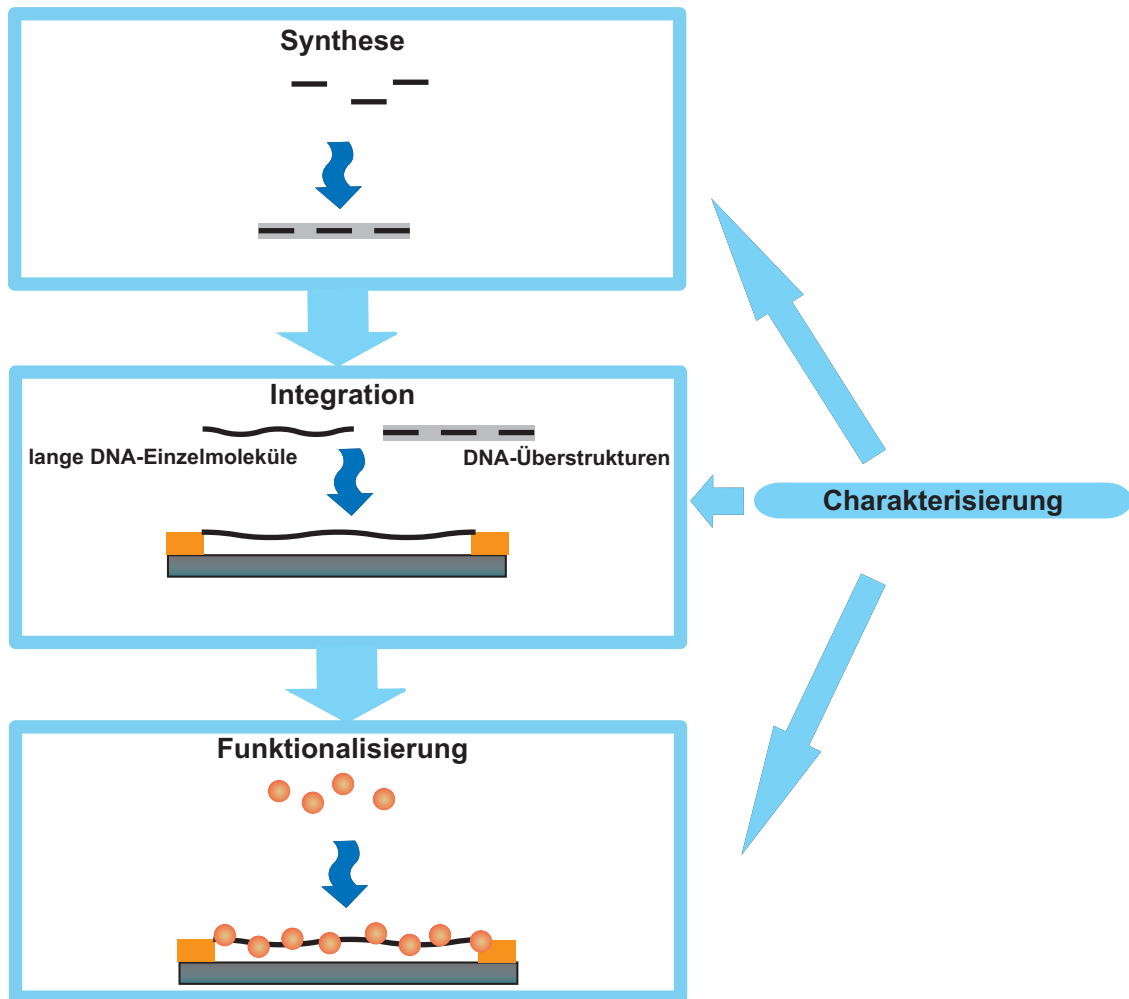


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Zielstellung der Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substrate

Es wurden folgende Trägermaterialien für die Immobilisierung von DNA-Molekülen und DNA-Superstrukturen verwendet:

Glimmer

Glimmer ist als Schichtsilikat aufgrund seiner Eigenschaften (biokompatibel, atomar glatt) das Standardsubstrat zur Charakterisierung von *G-Wires* und anderen DNA-Strukturen. Für technische Anwendungen ist Glimmer jedoch nur begrenzt nutzbar. Zur Anwendung kam Glimmer in Standard- und *Hi-grade*-Qualität von der Plano Planet GmbH (Wetzlar).

Glas

Es wurden Objektträger (Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) sowie 4-Zoll-Glaswafern (SCHOTT Jenaer Glas GmbH, Jena) verwendet.

Silizium

Für die Herstellung der Mikrochips und für Vorversuche wurden mit Bor dotierte 4-Zoll-Wafer mit einer thermischen Oxidschicht von 1000 nm (p-Si) sowie Phosphor dotierte 4-Zoll-Wafer mit einer nativen Oxidschicht von wenigen nm (n-Si) verwendet (Si-Mat, Landsberg am Lech).

Die Siliziumchips mit der intrinsischen Funktionalisierung wurden vom MPI für Mikrostrukturphysik in Halle durch direktes Waferbonden hergestellt. Dazu wurden zwei glatt polierte Siliziumwafer der Orientierung 100 bei Raumtemperatur zusammen gebracht und anschließend getempert. An der Korngrenze entstanden (je nach Orientierung der Wafer zueinander)

Schraubenversetzungen. Diese erzeugten das gewünschte Streufeld zur elektrostatischen Anziehung der DNA.

Schichtmaterialien

Als Elektrodenmaterial wurde Gold (100 nm) auf einer Haftschrift (3-5 nm) aus Titan verwendet. Die Chips wurden im IPHT auf der Basis im Handel erhältlicher Trägermaterialien hergestellt. Für die Photolithografie und als Schutzschicht beim Sägen wurde der Lack AZ 1514H (Clariant International Ltd., Muttenz, CH) eingesetzt.

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien (Tabelle A.1 im Anhang) wurden von den Firmen VWR International GmbH (Merck, Dresden), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Clariant International Ltd. (Muttenz, CH), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Fluka Chemie AG (Buchs, CH), Dow Corning GmbH (Wiesbaden), Strem Chemicals Inc. (Newburyport, MA), Plano W. Plannet GmbH (Wetzlar) und der Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Unter Wasser wird in der Arbeit dreifach destilliertes, deionisiertes und filtriertes (Spritzenvorsatzfilter mit 0,22 µm Porengröße, Millipore GmbH, Eschborn) Wasser verstanden. Die Liste der verwendeten mehrkomponentigen Lösungen sowie der Pufferlösungen befindet sich im Anhang (Tabelle A.2).

2.1.3 Biologische Proben

DNA-Oligonukleotide

Zur Assemblierung der G-Wire Überstrukturen wurde ein 10 Basen langes Oligonukleotid (G4) sowie ein am 5'-Ende mit Biotin markiertes Oligonukleotid (G4B5) von Jena Bioscience GmbH (Jena) verwendet.

Sequenz: 5' -GGGGTTGGGG- 3'

DNA-Polynukleotide

DNA des *Bakteriophagen Lambda* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) isoliert aus *E.coli* Stamm GM2163 (dam-, dcm-) 0,3 mg/mL gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM EDTA. Sie wird im weiteren Verlauf Lambda-DNA genannt.

2.1.4 Geräte

Die für die Probenbearbeitung, Charakterisierung und Datenauswertung verwendeten Geräte sind im Anhang (Tabelle A.3) aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der mikrostrukturierten Chips

Mittels Standard-Photolithographie [Moreau, 1988, Bowden, 1994, Fuller, 2000] wurden Mikrostrukturen auf den Substratoberflächen erzeugt. Dazu wurden die thermisch oxidierten Siliziumwafer mit einer 3-5 nm Haftsicht aus Titan und 200 nm Gold besputtert. Nach der photolithographischen Beschichtung und Belichtung wurden die Strukturen entwickelt und geätzt. Die Chips wurden nach anschließender Schutzlack-Beschichtung vereinzelt. Abbildung 2.1 zeigt die beiden verwendeten Elektrodenlayouts.

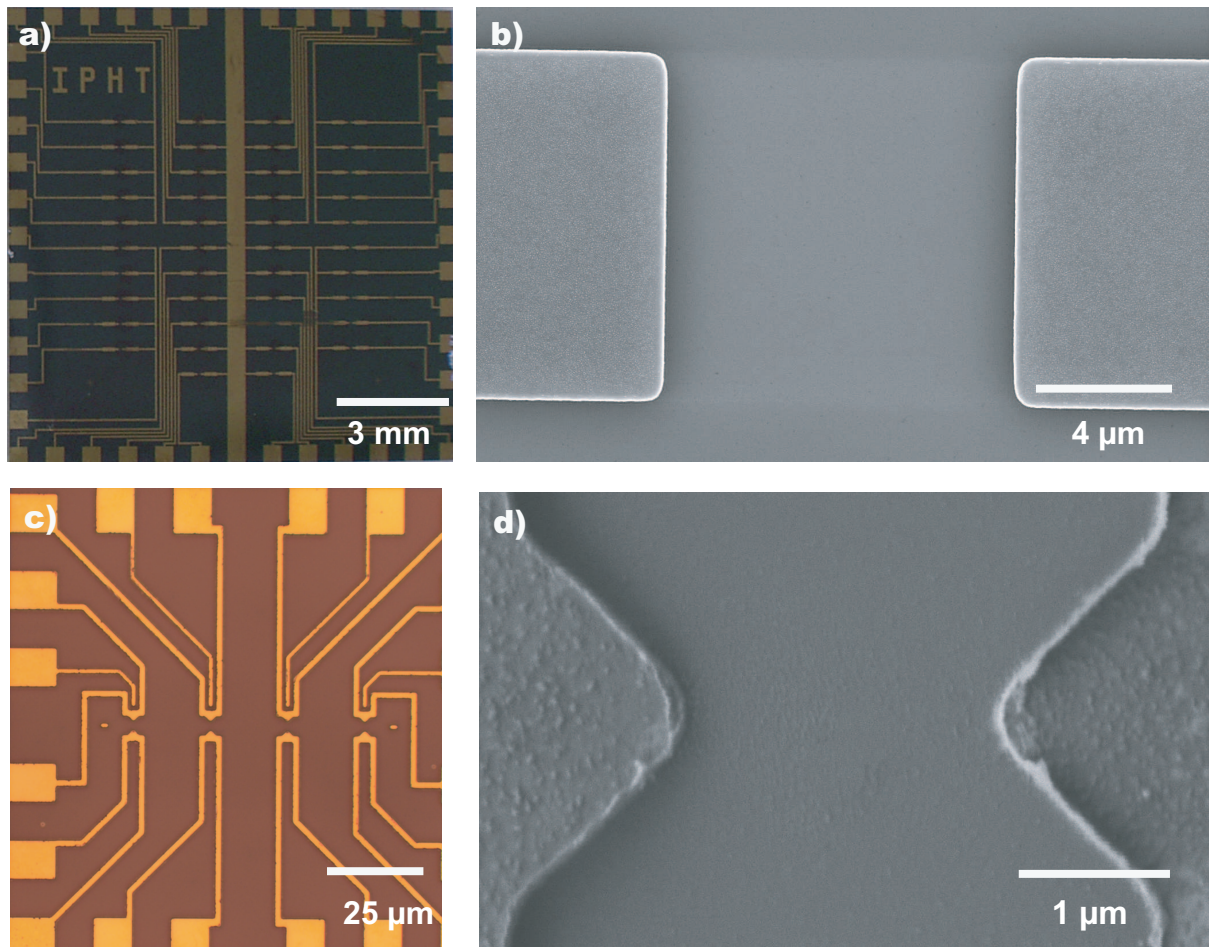


Abb. 2.1: Verwendete Chiplayouts. Anordnung mit 42 Elektrodenspalten von jeweils 10 μm Weite hergestellt mit Photolithographie. (a) Lichtmikroskopische Aufnahme, (b) REM-Aufnahme. Elektronenstrahl-lithographisch hergestellter Chip mit Feldern zu jeweils 4 Elektrodenspalten von 2 μm Weite. (c) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Feldes, (d) REM-Aufnahme.

2.2.2 Modifizierung der Substratoberflächen

2.2.2.1 Aktivierung der Substrate

Die vereinzelt mikrostrukturierten Chips sowie die unstrukturierten Si-Chips wurden zum Entfernen des Schutzlackes jeweils 10 Minuten in Removerlösung, Wasser, Aceton, Ethanol und Wasser gewaschen. Daran schloß sich bei den mikrostrukturierten Chips ein Sauerstoff-Plasmareinigungsschritt von 2 x 6 Minuten bei 50 Watt an. Die Si-Chips wurden für eine Stunde bei 70 °C in einer Mischung (1:1:1) aus Ammoniak, Wasserstoffperoxid und Wasser aktiviert, mit Wasser gespült und direkt weiterverwendet. Ziel dieser Reinigungs- und Aktivierungsschritte ist die Realisierung sauberer und glatter Oberflächen, die eine Anbindung

von Organosilanen ermöglichen. Voraussetzung dafür sind die bei diesen Schritten erzeugten freien Hydroxylgruppen auf den Substratoberflächen.

Bei der Aktivierung von Siliziumsubstraten mit intrinsischer Funktionalität kam zur Generierung von hydrophoben Oberflächen eine Flusssäure-Behandlung (HF-Dip) zur Anwendung. Dazu wurde die Flusssäure 1:5 mit Wasser verdünnt und die Siliziumchips für drei Minuten darin inkubiert.

2.2.2.2 Silanisierung

Die Oberflächenmodifizierungen mit Silanen sollen die Immobilisierung der DNA ermöglichen sowie deren gezielte Positionierung auf den Substraten erleichtern. Desweiteren wird ein Spreiten der DNA-Tropfen minimiert. Dies kann durch das Aufbringen von positiv geladenen Aminogruppen des 3-Aminopropyltriethoxysilans (APTES), die eine Anheftung des negativ geladenen DNA-Rückgrats ermöglicht, sowie durch hydrophobe Methylgruppen des Polydimethylsiloxans (PDMS) erfolgen. Dadurch erfolgt eine Diskriminierung in unterschiedlich affine Bereiche für eine DNA-Integration. Die Bindung des Silans beruht auf der Wechselwirkung zwischen den freien Hydroxylgruppen der Substrate und den aktivierbaren Kopfgruppen ($-\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)$) des Organosilans. Die elektropositiven Siliziumatome werden dabei von den Hydroxylgruppen nukleophil angegriffen. Es resultiert eine kovalente Bindung des Silans auf der Oberfläche. Diese wurden meist in Gasphase auf die Substratoberflächen aufgebracht. Dazu wurden die aktivierten Chips in einem Becherglas mit 2 L Volumen bei 60-80 °C für 15 Minuten inkubiert. Dabei wurden 3,4 µL APTES auf ein Uhrglas zu den Substraten gegeben [Yokota et al., 1997].

Die Modifikation mit PDMS erfolgte in Petrischalen, die mit dem Silikon-Elastomer *Sylgard 184* beschichtet und ausgehärtet wurden. Die Substrate wurden über Nacht in die Petrischalen gelegt. Dabei binden die sich noch in der Gasphase befindlichen PDMS-Monomere auf die Substratoberflächen und hydrophobisieren diese.

2.2.3 DNA-Techniken

2.2.3.1 DNA-Linearisierung

Das durch seine komplementären Enden zum Zirkularisieren neigende Lambda-DNA-Molekül wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C und anschließende schnelle Abkühlung linearisiert.

2.2.3.2 Immobilisierung und Strecken der DNA

Zur Realisierung immobilisierter und gestreckter DNA-Moleküle kamen verschiedenen Methoden zur Anwendung. Diese beruhen auf Physisorption der DNA auf den verschiedenen Oberflächen. Die geeigneten Techniken werden je nach Substrat im Folgenden vorgestellt.

Die geschnittenen Glimmerstücke wurden durch Spaltung aktiviert. Dabei werden die zwischen den einzelnen Schichten gelagerten Kaliumionen zum Teil entfernt (siehe Schema Abb. 2.2a). Es entstehen so negativ geladene Gitterlücken. Eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Glimmersubstrates ist in Abbildung 2.2b gezeigt. Durch anschließende Inkubation mit 2 mM Magnesiumchloridlösung werden die Lücken mit Magnesiumionen besetzt. Durch ihre 2-fach positive Ladung ist dabei eine zusätzliche elektrostatische Bindung des negativ geladenen Rückgrats der DNA möglich und können so Substrat und DNA verbrücken. Dabei können die Magnesiumionen die Gitterlücken in unterschiedlichen Abständen besetzen.

Die DNA wurde in 5 µL große Tropfen (Lambda-DNA Konzentration: 2 ng/µL, pH 8,0) auf den Randbereich der Glimmerstücke aufgetragen und für 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine saugfähige Vliesunterlage gestellt, mit 1 mL Wasser in einem Winkel von 45° gespült und mit Stickstoff trocken geblasen (Abb. 2.2c) [Li et al., 1998, Cherny et al., 1998].

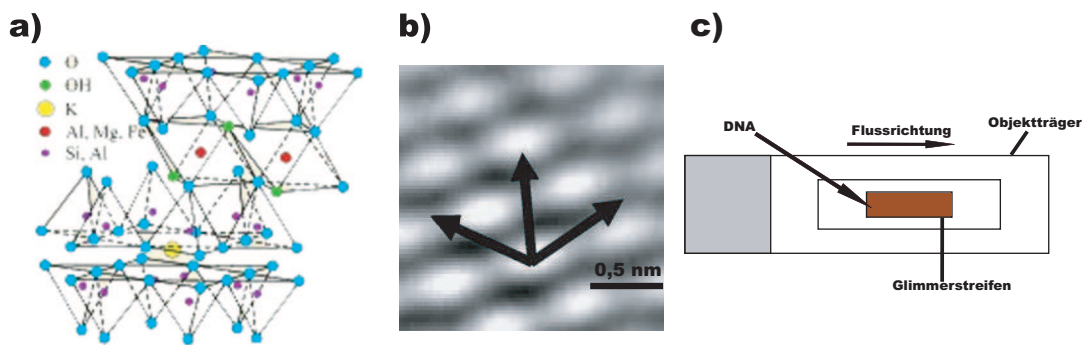


Abb. 2.2: a) Schematische Darstellung des Schichtsilikats Glimmer [1]. b) Hochoauflösende AFM-Aufnahme einer Glimmeroberfläche [Vesenka et al., 2007]. Die Gitterlücken sind als dunkle Bereiche zu erkennen. c) Schematische Darstellung des Auftragens der DNA auf Glimmer.

Die Immobilisierung der *G-Wires* beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Magnesium-vermittelten Bindung auf Glimmer. Die Pfeile in Abbildung 2.2b geben die bevorzugte Ausrichtung der *G-Wires* auf dem Glimmer an. Dabei werden die „*next nearest neighbor*“ Kaliumlücken durch die Magnesiumionen im Puffer der DNA-Superstrukturen besetzt. Es wurde ein 4 μL Tropfen in einem mit Folienschreiber gezeichneten Kreis plaziert und für 10 Sekunden bis 4 Minuten inkubiert. Danach erfolgte ein Spülen der Proben mit 1 mL Wasser und Trocknung unter Stickstoffstrom.

Auf den Glas- und Siliziumsubstraten mit hydrophoben oder positiv geladenen Oberflächen kamen verschiedene Immobilisierungsmethoden zur Anwendung. Die Methode des eintrocknenden Tropfens („*receding meniscus*“) gehört zu den Techniken des „*molecular Combing*“ zum Strecken und Binden von DNA-Molekülen auf Substratoberflächen. Dabei binden die DNA Stränge meist mit ihren stärker negativ geladenen Enden an die Oberflächen und die Kraft des zurückweichenden Flüssigkeitsmeniskus der DNA Lösung wird zum Strecken genutzt. Diese Methode wurde kombiniert mit mikrostrukturierten Substraten angewendet mit dem Ziel, DNA-Moleküle adressiert auf den Elektroden zu binden und über die 10 μm bzw. 2 μm Elektrodenspalte zu spannen. Dazu wurden, wie auch auf den Glas und Siliziumsubstraten, 0,1 - 5 μL Tropfen auf die Substrate aufgetragen und bei Raumtemperatur eingetrocknet (Studie, Ergebnisse nicht veröffentlicht). Bei den Mikrostrukturen wurden die Tropfen asymmetrisch auf den Bereich der Elektrodenspalte in der Mitte des Chips aufgesetzt. Die Konzentration der DNA wurde zwischen 0,6 ng/mL und 600 ng/mL variiert.

Auf den mikrostrukturierten Chips kam neben der oben beschriebenen „*receding meniscus*“ Methode die Dielektrophorese von DNA zur Anwendung. Dabei wurde das elektrische Wechselfeld an die Elektroden mit einem Funktionsgenerator vom Typ *Agilent 33220A* (Agilent, Böblingen) an die Kontaktpads der mikrostrukturierten Chips mittels manuell aufgesetzter Kontaktspitzen angelegt. Die Spannungen betragen 0,5 bis 10 V. Die Frequenzen lagen im Bereich von 10 kHz - 1 MHz, die Kontaktierungszeit im Bereich von 10 Sekunden bis 20 Minuten. Es wurden DNA-Konzentrationen im Bereich von 5 ng/mL bis 100 ng/mL eingesetzt. Bei einigen Experimenten wurden Spannungs- und Frequenzrampen während des Kontaktierens gefahren.

2.2.3.3 G-Wire Assemblierung

Die im weiteren Verlauf *G-Wires* (G-Quartette) genannten DNA-Superstrukturen, wurden in einem Wachstumspuffer (P1) assembliert [Marsh et al., 1995]. Dieser muss sowohl einwertige wie auch zweiwertige Metallionen enthalten. Es wurde eine Oligonukleotid-Konzentration von 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ eingesetzt. Um sicherzustellen, dass zu Beginn der Assemblierung die Oligonukleotide als Monomere vorliegen, wurde die Lösung im Thermomixer für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Proben mit Mineralöl überschichtet. Danach wurde auf 37 °C abgekühlt. Die Wachstumszeit betrug 4 Tage (unveröffentlichte Ergebnisse [Sondermann, 2003]). Zum Auftragen wurden die selbstassemblierten *G-Wires* in einen Verdünnungspuffer überführt und zur Charakterisierung seines Einflusses auf die Länge und Anzahl der *G-Wires* in seiner Konzentration variiert. Abbildung 2.3 zeigt die schematische Struktur der aus den Oligonukleotiden aufgebauten DNA-Überstruktur. Zur Untersuchung der Langzeitstabilität wurden die *G-Wires* nach ihrer Assemblierung im Puffer P2 bei Temperaturen von -20 °C , 4 °C sowie bei Raumtemperatur gelagert und nach verschiedenen langen Lagerungszeiten auf Glimmer immobilisiert bevor sie mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) untersucht wurden.

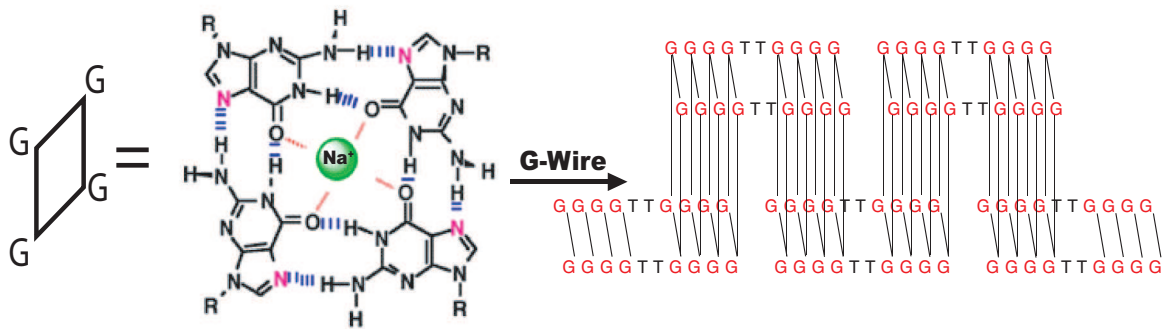


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der DNA-Überstrukturen (*G-Wires*) [2].

Für die Versuche zur Anbindung von Streptavidin-Goldnanopartikeln an *G-Wires* wurde zusätzlich das biotinylierte Oligonukleotid (G4B5) in verschiedenen Konzentrationen von 0,01 µg/mL bis 100 µg/mL nach dem Abkühlen zum Assemblierungsansatz gegeben und für 4 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.2.4 Funktionalisierung

2.2.4.1 Nanopartikel-induzierte Funktionalisierung

Die integrierten DNA-Moleküle wurden mit positiv-geladenen Goldnanopartikeln (*GENO-Gold*, British BioCell Int, Cardiff, UK) funktionalisiert. Dazu wurde 1 mL Genogold-Lösung mit 50 µL Aktivator-Lösung versetzt. Die 1:5 in Wasser verdünnte oder unverdünnte Gold-Lösung wurde auf die Substrate mit DNA (Glimmer oder Chips) gegeben und für 20 Sekunden bis 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

2.2.4.2 Direkte Silberabscheidung unter UV-Licht

Die direkte Funktionalisierung der auf Glimmer immobilisierten DNA-Moleküle erfolgte mit Silberionen, die mit den Basen der DNA unter UV-Bestrahlung einen DNA-Silber-Komplex bilden. Die Glimmeroberflächen wurden dazu mit 200 µL einer 10 mM AgNO₃-Lösung

benetzt. Die Inkubation erfolgte für unterschiedliche Zeiten unter UV-Licht (254 nm) bei Raumtemperatur [Berti et al., 2005]. Die Proben wurden anschließend mit Wasser gespült und unter Stickstoff-Strom getrocknet.

2.2.4.3 Sequenzspezifische Markierung mit Streptavidin-Gold

Die mit Biotin-markierten Oligonukleotiden assemblierten DNA-Superstrukturen wurden mit Streptavidin-konjugierten Goldnanopartikeln (British BioCell Int, Cardiff, UK) inkubiert. Die Bindung des Goldes erfolgte dabei über die in der Molekularbiologie oft verwendete Biotin-Streptavidin-Bindung. Die Lösung der 5 nm großen, mit Streptavidin-konjugierten Goldnanopartikel wurde dazu 1:20 in P2 verdünnt und mit den *G-Wires* für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.4 Fluoreszenzmarkierung

Zur Visualisierung der DNA während oder nach den Immobilisierungsexperimenten wurde diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dazu wurde YOYO-1 verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert mit dem DNA-Doppelstrang. Seine Anregungswellenlänge liegt bei 491 nm, seine Emission bei 509 nm. Abbildung 2.4 zeigt die Strukturformel sowie die entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren. Die Fluoreszenzmarkierung ermöglicht eine Kontrolle der Bewegung von DNA-Molekülen auf Einzelmolekülniveau während der Immobilisierungsversuche, welches insbesondere bei der Dielektrophorese zum Einsatz kam. Desweiteren konnten die eingetrockneten Tropfen mit dem Fluoreszenzmikroskop charakterisiert werden. Dazu wurden 1ng/µl Lambda-DNA mit 0,1 µM YOYO-1 in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 angefärbt oder nach der Immobilisierung markiert.

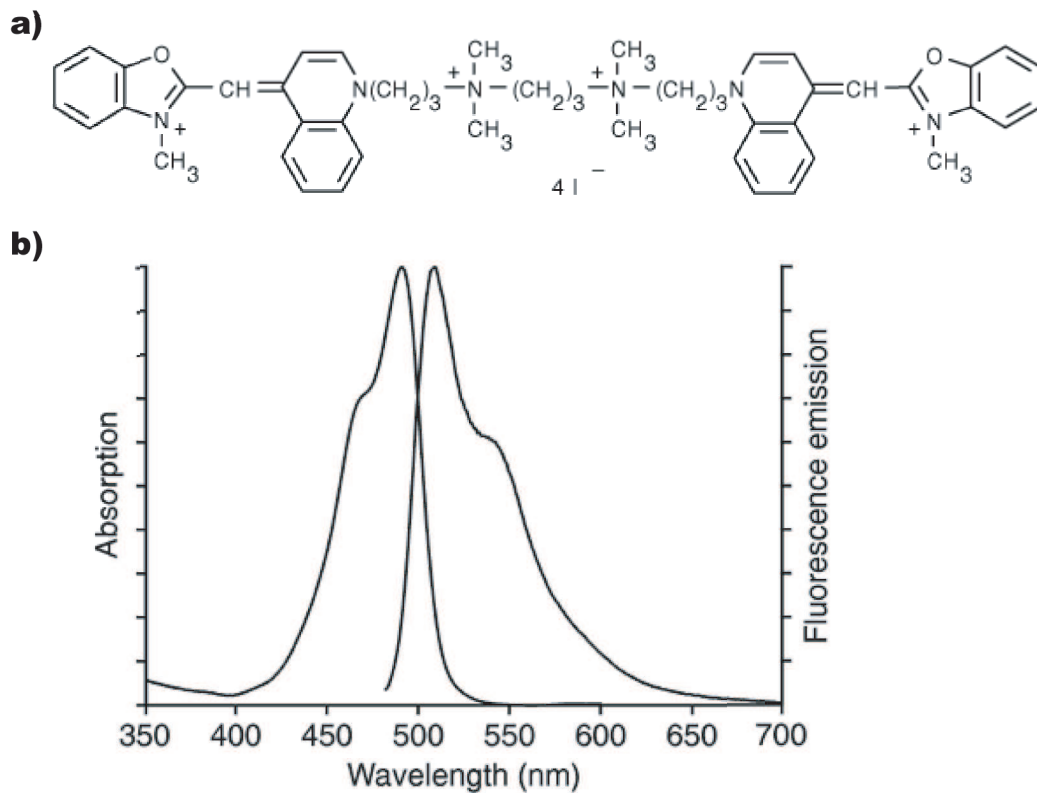


Abb. 2.4: a) Schematische Darstellung der Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes YOYO-1, b) Absorptions- und Emissionsspektrum [3].

2.2.5 Charakterisierungsmethoden

2.2.5.1 Optische Mikroskopie („*in-situ Imaging*“)

Die optischen Aufnahmen erfolgten mit einem Mikroskop vom Typ *Axiotech* (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) und einer CCD Kamera vom Typ *Sensicam* (PCO, Kehlheim) sowie mit einem Mikroskop vom Typ *Axio-Imager Alm* mit einer CCD Kamera vom Typ *Axio-Cam MRc5* (Zeiss, Jena) im Auflichtmodus. Die Verarbeitung der Aufnahmen erfolgte beim *Axiotech* Gerät über die Software *SensiControl*, beim *Axio Imager* über die Software *AxioVision 4.6*.

Die Hellfeld- und Dunkelfeldmikroskopie erfolgte am *Axio-Imager* im Durchlichtmodus, wobei das Licht von einer Kondensorlinse auf das Objekt fokussiert wird. Dabei wird das Licht im Zentrum durch eine Blende ausgeblendet, so dass nur das vom Objekt gestreute Licht im Objektiv gesammelt wird. Der Vorteil besteht darin, dass Objekte unterhalb der Auflösungsgrenze des Lichtes kontrastreich sichtbar gemacht werden können. Die Visualisierung der Nanopartikel erfolgte mit Einsatz von Immersionsobjektiven (Wasser), die eine zusätzliche Verbesserung des Öffnungswinkels liefern. So konnten 60 nm große Gold-Kolloide (British BioCell Int, Cardiff, UK) während der Dielektrophorese *live in-situ* beobachtet werden.

Die Detektion der Fluoreszenzsignales erfolgte mit dem Filterset 9 (Zeiss/Axiotech) mit 450-490 nm // 515-565 nm bzw. 38 HE (Zeiss/AxioImager) mit 450-490 nm // 500-550 nm.

Zur Kontrolle der Dielektrophoreseversuche wurde die Durchführung mittels eines Tauchobjektivs mit der Kamera verfolgt und einzelne Sequenzen als Einzelbilder gespeichert. Die Auswertung und Umwandlung der Einzelbilder in Filmsequenzen erfolgte mit der Software *Quicktime* (Apple, Cupertino, CA) sowie *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Letztere wurde auch zur Bestimmung der Grauwerte verwendet. Zur Bestimmung dieser wurden Messfelder in *Image J* definiert und die Strukturen in den Fluoreszenzbildern vermessen.

2.2.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Mikrostrukturierte Chips sowie geeignete, mit Goldnanopartikel-funktionalisierte, Proben wurden mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) auf das Vorhandensein metallischer Topografien getestet. 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.

2.2.5.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Charakterisierung der Substrate und der immobilisierten DNA Strukturen 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) oder mit einem Messkopf *Multimode* mit SiNCH Spitzen von Nanosensors (Neuchatel, Schweiz; Spitzendurchmesser < 10 nm, Kraftkonstante der Biegearme 34-80 N/m) verwendet. Die Messungen der eingetrockneten Proben erfolgten im

„*tapping-Modus*“ an Luft. Die Resonanzfrequenz der Spitze lag um 330 kHz. „*Multimode*“-Messungen erfolgten im „*contact-Modus*“. Die Scanrate für biologische Proben lag bei 0,5 bis 1 Hz. Die Einstellung der durch die Spitze ausgeübten Kraft wurde mit dem Sollwert-Parameter der Amplitude im Setpoint reguliert. Die gewählte Dimension der Aufnahmen richtete sich nach dem jeweiligen Untersuchungsobjekt und erfolgte mit einer Auflösung von 512 x 512 Bildpunkten. Es wurde im Topographiemodus gescannt, bei schwer aufzulösenden Proben erfolgte auch eine Darstellung der Auslenkung. Die Scandaten wurden mit der Software *Nanoscope SPM 5.31R1* (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) ausgewertet. Im ersten Schritt wurden die Scandaten geglättet. Die Größe der Objekte wurde aus dem vertikalen Maß der Aufsicht bestimmt, wobei die Verfälschung der z-Werte, verursacht durch Glättung der Scanlinien zueinander, berücksichtigt wurde. Um diese Fehler auszuschließen, wurde für die Höhenmessung der Objekte ein Schnitt bei konstantem y-Wert angestrebt. Die Bilder wurden nach der Datenaufnahme und Teilauswertung in Bilddateien exportiert und weiterverwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Integration von Lambda-DNA

3.1.1 Immobilisierung auf Glimmer

Die Methode zur Immobilisierung und Streckung von DNA auf Glimmer ist eine der Standardmethoden der Probenvorbereitung für eine rasterkraftmikroskopische Charakterisierung von DNA. Dabei wies die DNA, je nach Position auf dem Glimmerstück ausgehend vom Auftragspunkt der DNA- und Waschlösung, unterschiedlich starke Streckungszustände auf (Abb. 3.1). Im Bereich der Auftragszone ist die DNA noch geknäult. Bewegt man sich mit dem AFM weiter in Spülrichtung, wurde eine zunehmende Ausrichtung der Moleküle in Flussrichtung sichtbar bei gleichzeitiger Abnahme der Molekülanzahl. Eine zunehmende Streckung der einzelnen DNA-Stränge ist ebenfalls zu verzeichnen. Die Ausmessung der Stränge ergab eine Zunahme der Länge von teilgestreckten Molekülen mit 9,7 μm bis zu 14,6 μm . Dies entspricht ca. 89% der B-Konformation [Li et al., 1998].

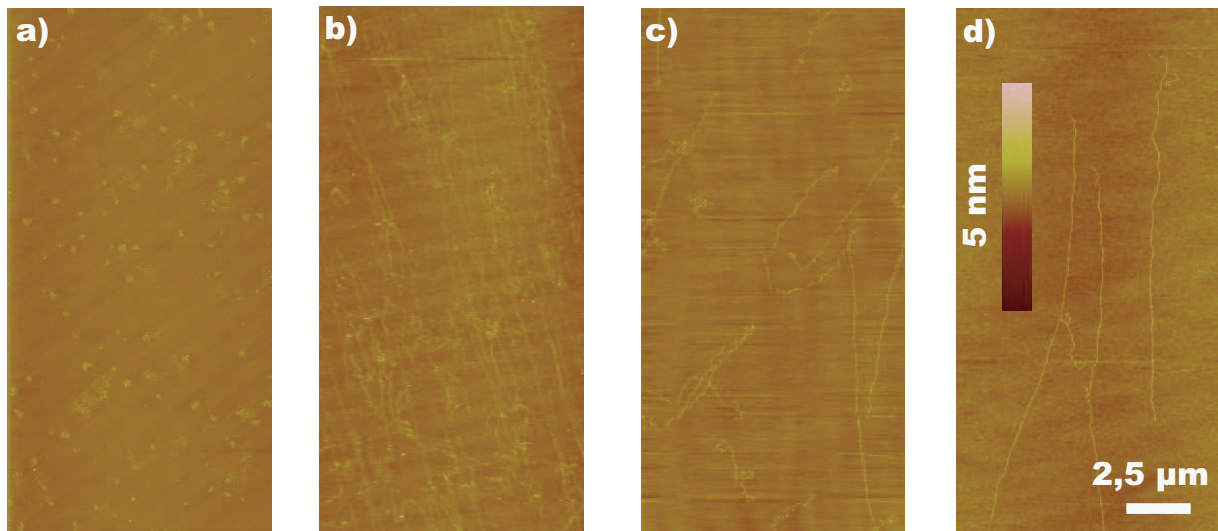


Abb. 3.1: Lambda-DNA auf Glimmer. Im Bereich der Auftragszone (a) liegt die DNA (hell) noch geknäult vor. Mit zunehmender Spülrichtung (b bis d) ist eine abnehmende Molekülzahl sowie eine zunehmende Streckung der DNA-Stränge erkennbar.

3.1.2 Immobilisierung auf Glas und Silizium

3.1.2.1 Eintrocknende Tropfen

Ziel war es, DNA-Moleküle mit Hilfe des zurückweichenden Meniskus von eintrocknenden Tropfen auf Glas und Siliziumsubstraten zu immobilisieren. Dabei sollten die DNA-Stränge möglichst vereinzelt und gestreckt werden.

3.1.2.2 Einfluss von Tropfengröße und DNA-Konzentration

Es wurde der Einfluss der Tropfengröße sowie der DNA-Konzentration auf den eintrocknenden DNA-Tropfen und somit der Einfluss auf das Strecken der DNA-Moleküle getestet. Die benetzten Bereiche der eingetrockneten Tropfen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop auf die fluoreszenzmarkierte DNA hin untersucht. Abbildung 3.2 zeigt eine Übersicht solcher Konzentrations- und Tropfengrößenreihen. Es wurde deutlich, dass bei einer hohen DNA-Konzentration (600 ng/mL; Abb. 3.2a-e) die DNA-Moleküle durch das Eintrocknen nicht vereinzelt werden. Dies konnte für die gewählten Parameter erst bei einer Konzentration von 6 ng/mL erzielt werden. Bei dieser geringen Konzentration ist die Vereinzellung sowie die Streckung der DNA am besten gewährleistet (Abb. 3.2k-n). Die auffälligen hellen Punkte, von

denen aus sich die DNA streckt, sind auf eine höhere Fluoreszenzintensität der dort geknäul-ten DNA zurückzuführen. Es zeigte sich, dass die positiv geladenen APTES-Oberflächen die DNA-Moleküle sehr stark anziehen. Dabei wurden zum Teil die geknäul-ten Moleküle aus dem Tropfen auf der Oberfläche fixiert, welche sich dann durch die Grenzfläche Wasser/Luft des Meniskus nur noch unzureichend strecken liessen. Dies war besonders bei den kleineren Tropfen mit weniger Flüssigkeitsvolumen und entsprechender kleinerer hydrodynamischer Kraft sowie hohen DNA-Konzentrationen der Fall. So wurde ein Kompromiss aus beiden Faktoren für weitere Versuche eine Konzentration von 6 ng/mL sowie eine Tropfengröße von 0,5 µL als Optimum ermittelt.

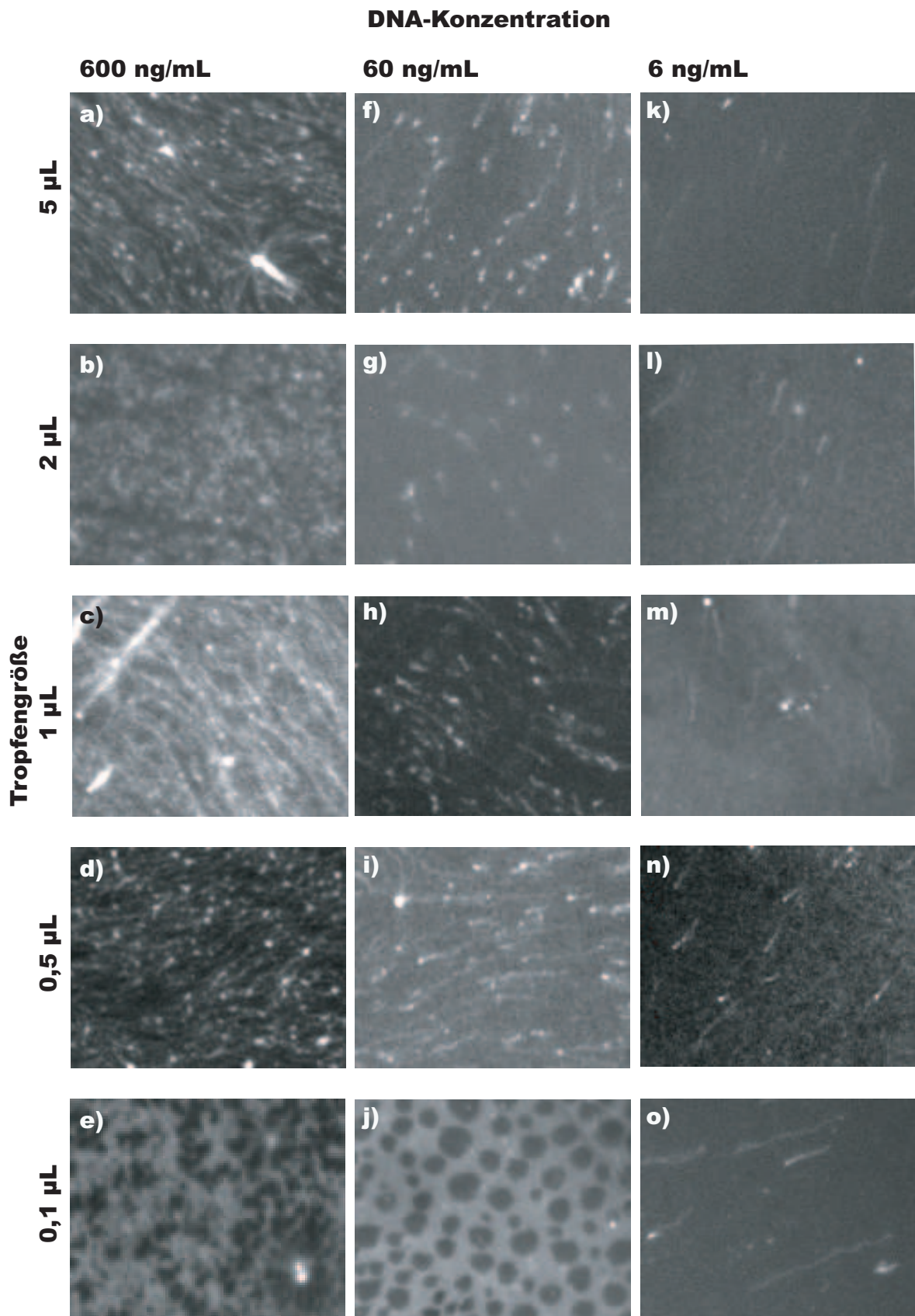


Abb. 3.2: Ausschnitte aus Fluoreszenzaufnahmen von eingetrockneten DNA-Tropfen mit sinkender DNA-Konzentration von links nach rechts sowie abnehmender Tropfengröße von oben nach unten.

Die Tropfenmethode wurde ebenfalls auf oxidierte Siliziumchips übertragen. Dabei wurden die Tropfen auf mit APTES und PDMS modifizierten Oberflächen eingetrocknet und die fluoreszenzmarkierte immobilisierte DNA im Tropfenbereich mit dem Fluoreszenzmikroskop sowie mit dem AFM charakterisiert. Sehr gut lassen sich die verschiedenen Tropfenbereiche in den Übersichtsaufnahmen erkennen (Abb. 3.3a sowie d). Die durch das Verweilen des Tropfens während des Eintrocknens entstehenden Tropfenränder stellen Bereiche hoher DNA-Konzentration meist in ungestreckter oder teilweise gestreckter Form dar. Auf den Detailaufnahmen sowie in den AFM-Bildern sind die unterschiedlich dicken DNA-Bündel zu erkennen. Sehr gut ist ebenfalls die Verzweigung der übereinander liegenden DNA-Stränge der dickeren Bündel zu beobachten. Auf den mit PDMS modifizierten Substraten konnte die DNA länger gestreckt werden und eher einzelne dünne Bündel immobilisiert werden. Auf den APTES-Oberflächen sind zum Teil noch ungestreckte Bereiche der DNA zu finden (Abb. 3.3c).

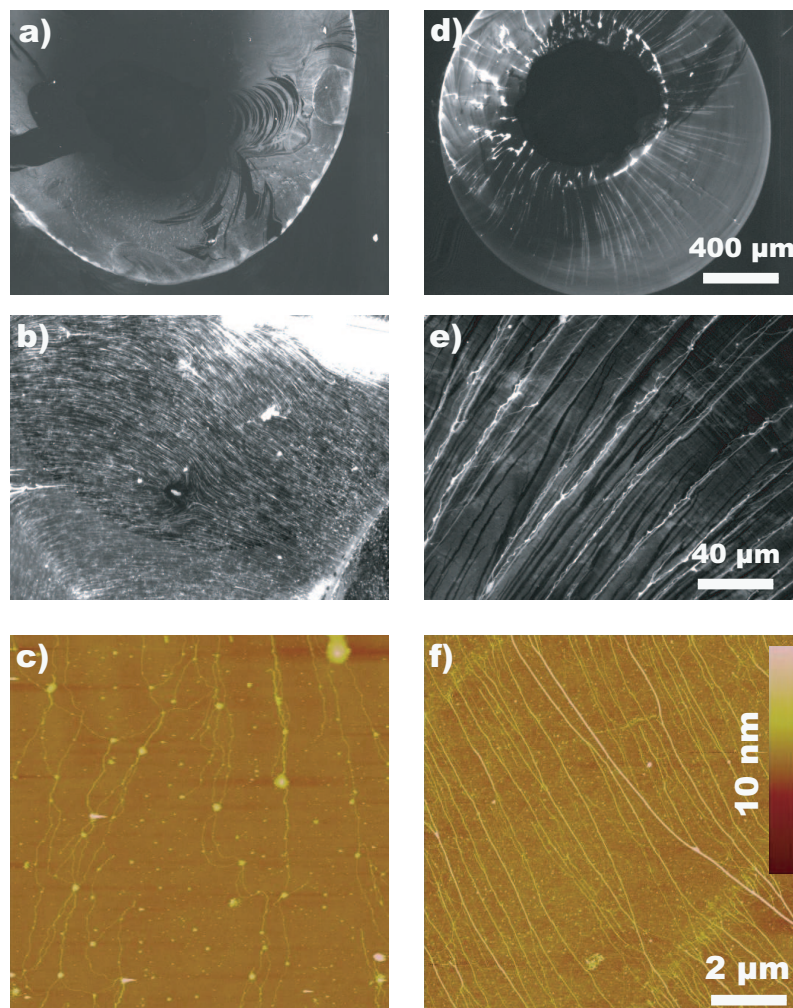


Abb. 3.3: Lambda-DNA auf Silizium modifiziert mit a-c) APTES, d-f) PDMS.

Es konnte auf den mit APTES und PDMS modifizierten Siliziumsubstraten der unterschiedliche Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf das Immobilisierungs- und Streckungsverhalten der DNA gezeigt werden. Dabei handelt es sich bei den APTES-Modifikationen mit den positiv geladenen funktionellen Gruppen um eine sehr adhäsive Oberfläche. Dies führt zum Teil zu einer Immobilisierung der DNA in ihrer physiologischen, geknäulten Konformation. Durch die elektrostatische Wechselwirkung der positiven Oberfläche mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA wird diese so auf den Substraten fixiert.

Dagegen handelt es sich bei den PDMS modifizierten Substraten um sehr hydrophobe Oberflächen. Auf ihnen findet eine Fixierung der DNA-Moleküle fast ausschließlich am Tropfenrand statt. Dabei werden die DNA-Stränge bevorzugt mit einem Ende auf der Substratoberfläche fixiert. Durch den zurückweichenden Meniskus kann sich das in der Lösung befindliche freie Ende der DNA mit dem Tropfenrand bewegen. Die DNA-Moleküle werden gestreckt, teilweise sogar überstreckt. Dies konnte auch auf PMMA beschichteten Oberflächen gezeigt werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei wurde die DNA auf das 1.6 fache ihrer Konturlänge gestreckt [Liu et al., 2004].

3.1.3 Integration in Mikrostrukturen

Die Methode des eintrocknenden Tropfens wurde mit mikrostrukturierten Substraten kombiniert für eine gezielte Integration gestreckter DNA in die Elektrodenspalte. Dabei boten die Elektroden die Möglichkeit eines „*guided self-assembly*“ der DNA. Als zweite Methode wurde die DNA durch Anlegen eines Wechselfeldes an die Elektrodenspalte integriert.

3.1.3.1 Tropfenmethode

DNA bildete während des Eintrocknens Tropfenränder (Abb. 3.4a), wie sie schon auf Silizium und Glas beobachtet wurden. Diese sind auf eine hohe Konzentration ungestreckter DNA-Moleküle zurückzuführen. Die beobachteten Strukturen können durch einen „*stick-slip*“-Mechanismus erklärt werden, bei dem sich die Tropfenränder im Verlauf des Eintrocknens diskontinuierlich bewegen [Deegan et al., 1997, Deegan, 2000]. Auch an den Elektrodenzuleitungen wurden hohe DNA-Konzentrationen beobachtet (Abb. 3.4b). Die Goldelektroden stellen einen bevorzugten Ankerpunkt für die DNA-Moleküle dar. Dies ermöglichte die Anbindung der Moleküle mit einem Ende an die Elektroden und das Strecken durch den zurückweichenden Flüssigkeitsmeniskus in dessen Richtung. Abbildung 3.4c zeigt einen Elektrodenspalt, an dessen Elektroden einzelne DNA-Moleküle angeheftet sind. Diese sind in Richtung der Pfeile gestreckt. Dabei konnten unterschiedliche Längen beobachtet werden. Das an die Ecke der linken Elektrode gebundene DNA-Molekül weist eine Länge von ca. 16,5 μm auf, das auf der Siliziumoberfläche befindliche Molekül eine Länge von ca. 13,3 μm .

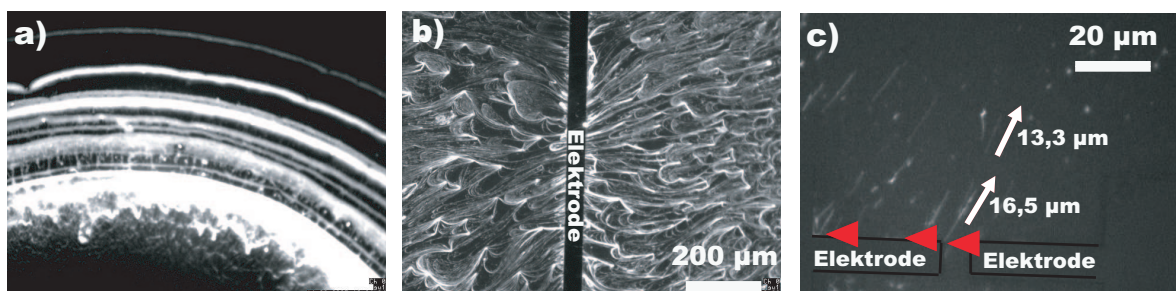


Abb. 3.4: Fluoreszenzaufnahmen von DNA auf mikrostrukturierten Substraten. Die DNA-Moleküle (helle Strukturen) bilden einen Bereich hoher Konzentration am Rand des Tropfens (a). Die Moleküle sammeln sich an den Elektroden (b) oder können im Bereich des Elektrodenspaltes gestreckt vorliegen (c). Die roten Pfeile weisen auf die Anheftungspunkte der DNA an den Elektroden, die weißen Pfeile zeigen die Streckungsrichtung.

Der Eintrocknungsvektor der DNA-Moleküle ist an jeder Elektrode unterschiedlich. Am Anfang bedeckt der Tropfen alle Elektodenspalten und weist infolge der Geometrie des Elektrodenfeldes eine eher rechteckige Form auf. Der Tropfen trocknet nun von den stärksten Krümmungen her zur Mitte des Chips hin ein. Dabei spielt nun ein zweiter Effekt eine entscheidende Rolle. Durch die unterschiedliche Benetzbarkeit des Substratmaterials fungieren die Elektroden als Leitlinien. Damit entsteht an jeder Elektrodenbahn eine weitere Vorzugsrichtung, die sich mit der Haupteintrocknungsrichtung des Tropfens überlagert.

Abbildung 3.5 zeigt die Zusammenstellung einer senkrechten Reihe von 10 Elektodenspalten auf einem Chip. Die DNA in den Elektodenspalten E1 und E2 weist eine Streckung (Pfeilrichtung) von links oben in Richtung Chipmitte auf. Bei Spalt E3 und E4 ist die Richtung nahezu horizontal. Der Elektodenspalt E4 wird dabei von zwei DNA-Molekülen überbrückt. Ab Spalt E5 verläuft die Streckung der DNA zunehmender von links unten zur Chipmitte.

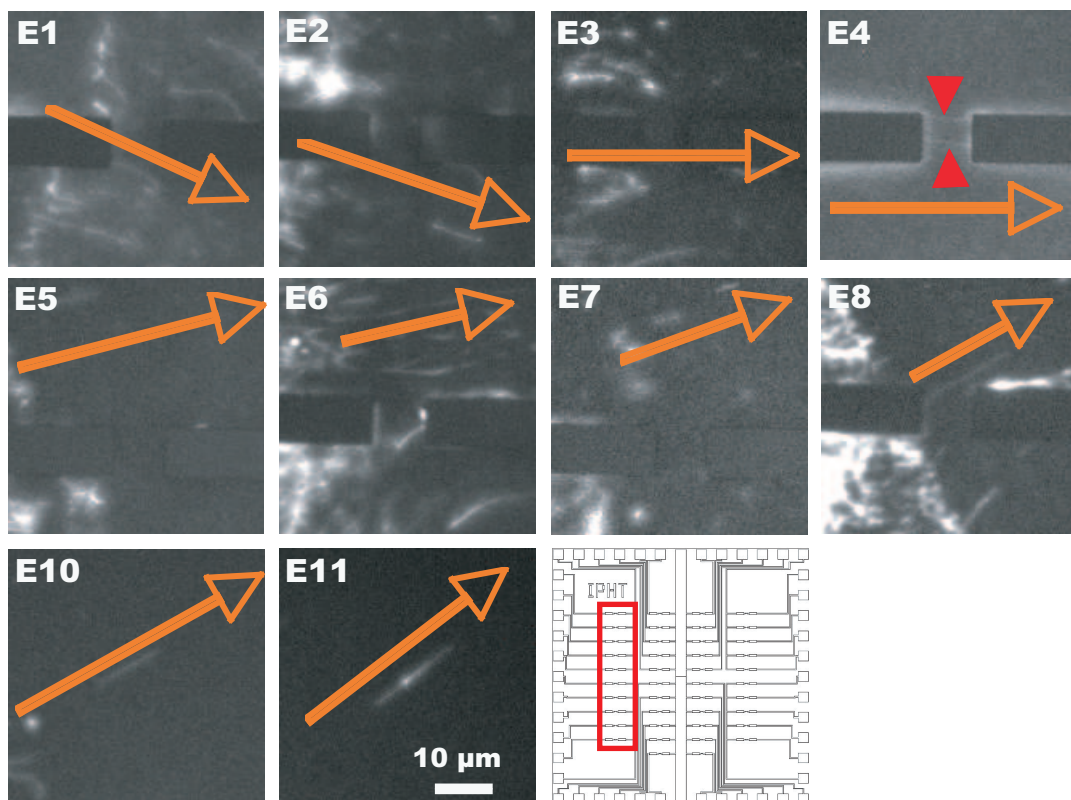


Abb. 3.5: Fluoreszenzaufnahmen von verschiedenen Elektodenspalten mit integrierter DNA. Eine Übersicht einer senkrechten Reihe von Elektodenspalten (markiert im Schema) auf einem Chip ist hier demonstriert. Die Pfeile geben die Streckungsrichtung der DNA-Moleküle an.

Abbildung 3.6 fasst die Ergebnisse der Auswertung von mehreren Chips zusammen. Die Vorzugsrichtungen der DNA-Moleküle in den verschiedenen Elektodenspalten auf dem Chip

ist in Abbildung 3.6a gezeigt. Der effizienteste Bereich für eine Überbrückung der Elektroden mit DNA-Molekülen umfasst die Elektrodenreihen drei bis fünf. In dieser Region stimmen die Haupteintrocknungsrichtung des Tropfens und die Richtung der Elektrodenbahn am besten überein. Beispiele für verschiedene DNA-Strukturen in den überbrückten Elektrodenspalten sind in Abbildung 3.6b gezeigt. Es handelt sich dabei um DNA-Bündel, -geflechte sowie um ein oder mehrere Einzelmoleküle.

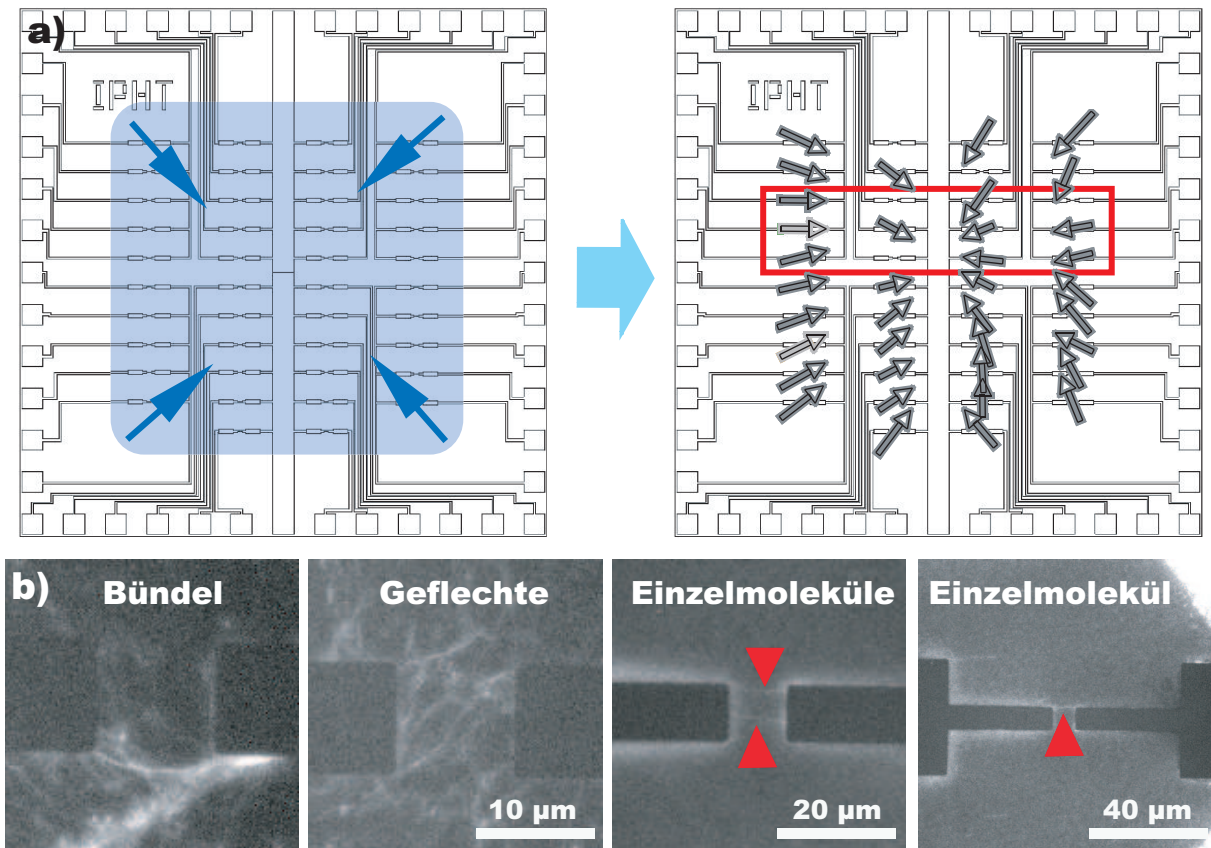


Abb. 3.6: a) Schematische Darstellung des Eintrocknungsvorgang auf einem mikrostrukturierten Chip. Der Bereich für eine erfolgreiche Überbrückung der Elektroden mit DNA-Molekülen ist rot markiert. b) Beispiele typischer DNA-Anordnungen (Fluoreszenzaufnahmen).

Mit der Methode des eintrocknenden Tropfens war es mit guter Effizienz möglich, mikrostrukturierte Elektrodenanordnungen mit DNA zu überbrücken. Dabei konnten bei hohen DNA-Konzentrationen über 50% der Elektrodenspalte überbrückt werden. Diese waren meist DNA-Bündel oder Geflechte. Einzelmoleküle wurden im Allgemeinen nur bei niedrigeren DNA-Konzentrationen integriert. Diese senkten jedoch die Effizienz der Elektrodenüberbrückung auf ca. 36%, wobei ca. 5% DNA-Einzelmoleküle gefunden werden konnten. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist die durch unspezifische DNA-Integration erfolgte Überbrückungen an den Elektrodenzuleitungen. Benötigt wird eine Methode, mit der die

Integration von DNA-Einzelmolekülen mit höherer Effizienz und gezielt in den Elektrodenspalten möglich ist.

3.1.3.2 Dielektrophorese

Dielektrophorese ermöglicht die Positionierung und Ausrichtung von DNA-Molekülen in Mikroelektroden-Anordnungen. Durch Anlegen eines hochfrequenten Wechselfeldes ist es möglich, DNA in den Elektrodenspalten anzureichern und von einer Elektrode zur Anderen zu spannen. Unter Verwendung von Parametern aus der Literatur [Washizu and Kurosawa, 1990], wie z.B. eine Frequenz von 1 MHz und ein Potential von 1 V pro Mikrometer des Elektrodenspaltes, konnte mit den verwendeten Mikrostrukturen und hohen DNA-Konzentrationen eine hohe Anzahl von DNA im Elektrodenspalt angesammelt werden. Abbildung 3.7a zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von integrierten DNA-Molekülen auf einem mikrostrukturierten Chip. Dabei ist auf Grund hoher Feldintensitäten der gesamte Bereich um die Elektrodenstrukturen mit gestreckten DNA-Molekülen bedeckt. Es wird auch der Elektrodenspalt überspannt (Abb. 3.7b). Die hohe Anzahl von DNA-Molekülen und Bündeln zwischen den Elektroden wird deutlich.

Das Ziel waren aber geeignete Parameterkomplexe für eine Integration von DNA-Einzelmolekülen zwischen zwei Elektroden (wie in Abbildung 3.7c schematisch dargestellt). Dabei erwies sich die Charakterisierung der Elektrodenspalte mittels AFM als langwierig (die Ergebnisse lagen erst nach Stunden bzw. Tagen vor). Eine wesentliche Verbesserung der Parameteroptimierung konnte durch Fluoreszenzmikroskopie mit Tauchobjektiven erzielt werden. Diese Art des „*in-situ Imaging*“ erlaubt die Erfassung des Einflusses von Parametern wie z.B. Frequenz und Spannung auf die Bewegung der DNA in Echtzeit („*real-time*“) und ermöglicht so die Bestimmung von Eckparametern und Schwellenwerten des Parameterkomplexes (Frequenz, Spannung, Elektrodenlayout, Reaktionszeit, DNA-Konzentration, Leitfähigkeit des Mediums und Temperatur) der Dielektrophorese von DNA.

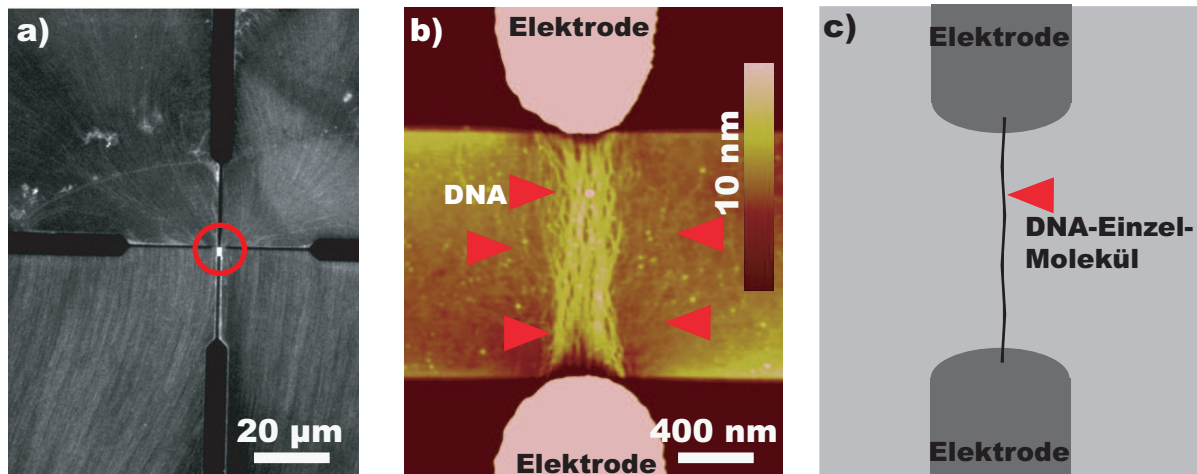


Abb. 3.7: Dielektrophoretisch integrierte DNA im Elektrodenspalt. a) Fluoreszenz-Übersichtsaufnahme der Elektrodenstruktur (schwarz) mit integrierten DNA-Molekülen (hell). b) AFM Aufnahme von DNA-Bündeln in diesem Elektrodenspalt. b) Schematische Darstellung des Ziels: Einzelnes DNA-Molekül zwischen zwei Elektroden.

Die Optimierung des Parameterkomplexes für die reproduzierbare Integration von DNA in Mikrostrukturen erfolgte durch Bestimmung der Eckparameter mittels „*real-time in-situ Imaging*“. Dabei wurde systematisch ein Parameter variiert und die anderen jeweils konstant gehalten. Zur Verfeinerung einzelner Parameter kam zusätzlich die Rasterkraftmikroskopie zur Charakterisierung der integrierten Strukturen zum Einsatz.

Einfluss der Frequenz Abbildung 3.8 zeigt Fluoreszenzaufnahmen während der Dielektrophorese mit unterschiedlichen Frequenzen der Wechselspannung. Eine Frequenz von 10 kHz (Abb. 3.8a) führte zur DNA-Ansammlung auf den Elektroden. Bei einer Frequenz von 100 kHz (Abb. 3.8b) konnte dagegen eine Fokussierung der DNA im Elektrodenspalt beobachtet werden. Dabei sammelte sich die DNA bevorzugt an den Ecken der Elektroden. Von dort aus erfolgte gleichzeitig eine Streckung der Moleküle zur gegenüberliegenden Elektrode, so dass von einer Überbrückung des Spaltes ausgegangen werden konnte. Eine Frequenz des Wechselfeldes von 1 MHz führte zu sehr starker Ansammlung von DNA im Elektrodenspalt (Abb. 3.8c). Die starke Fluoreszenz deutete auf eine größere Anzahl von DNA-Molekülen hin. Es war keine Differenzierung von einzelnen DNA Molekülen oder bevorzugten Ansammlungspunkten möglich.

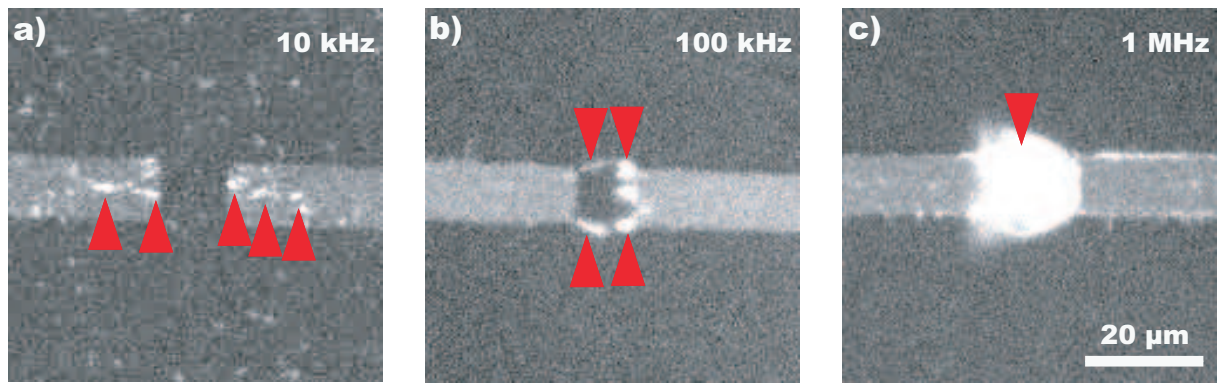


Abb. 3.8: Einfluss der Frequenz auf die Dielektrophorese von DNA. Fluoreszenzaufnahmen eines 10 µm Elektrodenspaltes bei Anlegen eines Wechselfeldes von a) 10 kHz, b) 100 kHz und c) 1 MHz. Die DNA-Moleküle sind als weiße Punkte bzw. größere Spots sichtbar.

Dieses Ergebnis konnte auf den Chips mit den kleineren (2 µm) Elektrodenspalten bestätigt werden. In Abbildung 3.9a lagert sich die DNA bei einer Frequenz von 10 kHz an und auf die Elektroden. Eine Positionierung im Elektrodenspalt dagegen erfolgt nur unzureichend. Eine Frequenz von 100 kHz dagegen führt zu einer reproduzierbaren Integration von DNA-Molekülen zwischen den Elektroden (Abb. 3.9b). Lediglich an den Rändern der Zuleitungen können vereinzelt die Fluoreszenzsignale der markierten DNA detektiert werden. 100 kHz wurde als Optimum für eine gezielte Integration von DNA-Molekülen in Elektrodenspalte ermittelt. Das Verhalten der DNA bei unterschiedlichen Frequenzen der Wechselspannung konnte auch anhand von Fluoreszenzaufnahmen beobachtet werden die nach erfolgter Dielektrophorese aufgenommen wurden. In Abbildung 3.9c und d wird eine signifikante Ansammlung von DNA bei 1 kHz bzw. 10 kHz auf und zwischen den Elektroden deutlich. Bei einer Frequenz von 100 kHz war signifikant weniger DNA, fast ausschließlich im Elektrodenspalt, lokalisiert (Abb. 3.9c). Die weitere Erhöhung auf 1000 kHz führte zu keiner Integration von DNA zwischen oder auf den Elektroden (Abb. 3.9e).

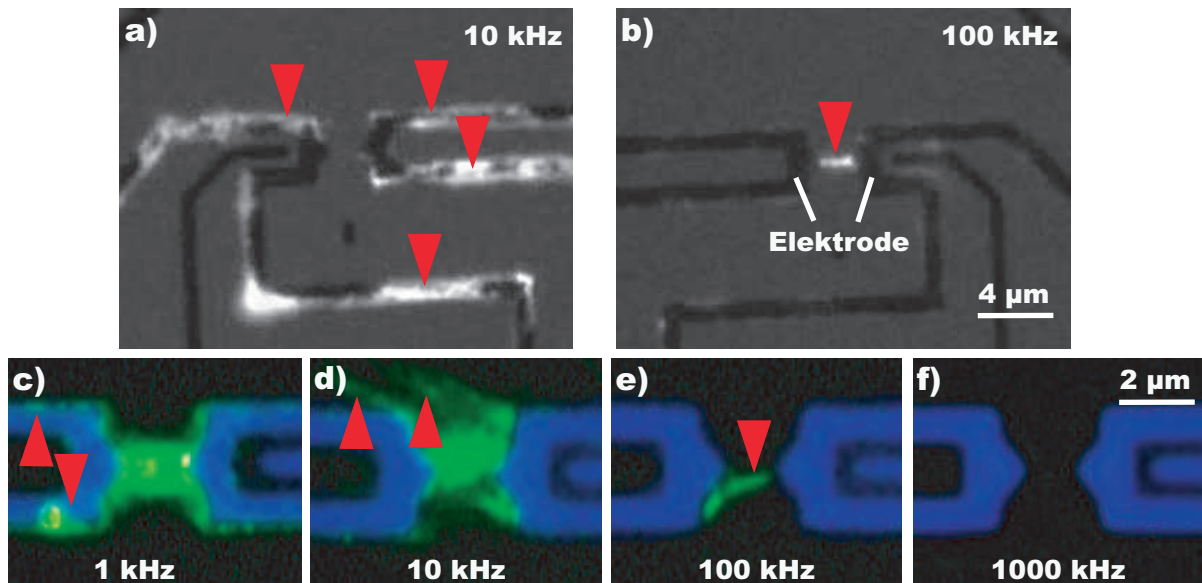


Abb. 3.9: Einfluss der Frequenz auf die Dielektrophorese von DNA. DNA erscheint als helle, die Elektroden als dunkle Strukturen. Fluoreszenzaufnahmen bei Anlegen eines Wechselfeldes von a) 10 kHz und b) 100 kHz sowie Fluoreszenzaufnahmen nach der Dielektrophorese mit a) 1 kHz, b) 10 kHz, c) 100 kHz und e) 1000 kHz. Die DNA ist als grüne Struktur, die Elektroden als blaue Strukturen erkennbar.

Dabei hat die Frequenz des Wechselfeldes einen entscheidenden Einfluss auf das Ansprechverhalten der Gegenionen des DNA-Rückgrates. Diese reagieren unterschiedlich schnell auf das angelegte Wechselfeld und tragen so zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Polarisierung eines DNA-Moleküls bei. Bei einer Frequenz von 100 kHz ist die Polarisierbarkeit der DNA am besten gewährleistet, so dass sie sich in Richtung der höchsten Feldintensitäten im Elektrodenspalt bewegt. Dieses Ergebnis entspricht dem Verhalten von Molekülen bei einer positiven Dielektrophorese. Bei Frequenzen unter 10 kHz verstärken sich Effekte der negativen Dielektrophorese, bei welcher die Moleküle aus Bereichen höherer Feldintensitäten verdrängt werden [Morgan et al., 2003, Morgan et al., 1999]. Bei Frequenzen über 100 kHz kommen verstärkt Effekte zum Tragen, die zu einer Fragmentierung der DNA und so zu einer sinkenden Effizienz der positiven Dielektrophorese führen.

Einfluss der Spannung Die Bestimmung des Schwellenwertes der Spannung auf die Dielektrophorese von DNA ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Diese zeigt Fluoreszenzaufnahmen während des Anlegens einer Spannungsrampe von 0 bis 5,6 V. Ab einer Spannung von 1,5 V (Abb. 3.10b) ist eine beginnende Anlagerung von DNA an die Elektroden erkennbar, was durch den schmalere Elektrodenspalt deutlich wird. Erst eine Ansammlung von

mehreren Molekülen wird als deutliches Fluoreszenzsignal detektiert (Abb. 3.10c). Die weitere Erhöhung der Spannung führt zur immer stärkeren Ansammlung von DNA-Molekülen. So wird in Abbildung 3.10d die Anlagerung von DNA an den äußeren Ecken der Elektrode sowie auch an der Spitze der gegenüberliegenden Elektrode deutlich. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals an diesen Stellen und der damit verbundenen fortschreitenden Ansammlung von DNA konnte mit weiterer Anhebung der Spannung auf bis zu 5,6 V (Abb. 3.10f) beobachtet werden. Die Fluoreszenzsignale waren auch nach dem Abschalten der Spannungsquelle detektierbar (Abb. 3.10g), so dass eine Anlagerung der DNA Stränge an die Goldelektroden angenommen werden kann.

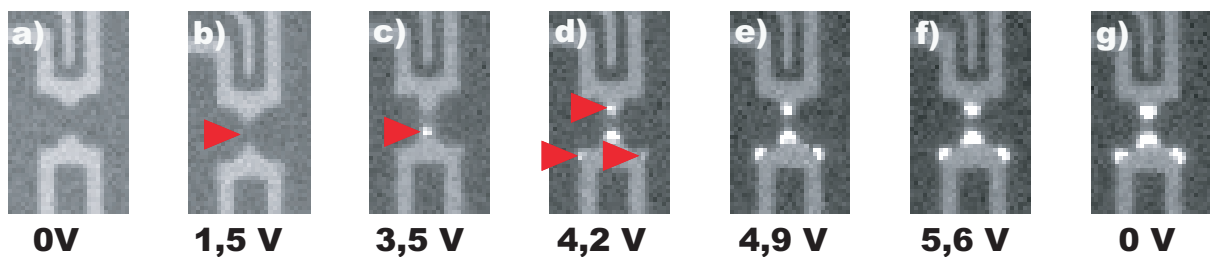


Abb. 3.10: Einfluss der Spannung auf die Dielektrophorese von DNA.

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit Simulationen (Ralph Hölzel, IBMT Golm) des Dielektrophorese-Prozesses überein. Dazu wurde ein berechnetes Bild der Feldintensitäten basierend auf Elektrodenlayout und angelegter Spannung (Abb. 3.11a) mit einem Fluoreszenzbild (Abb. 3.11b), das während einer Dielektrophorese aufgenommen wurde, korreliert. Aus dem daraus resultierenden Bild (Abb. 3.11c) kann man die Korrelation zwischen den berechneten Bereichen erhöhter Feldstärken und Anlagerungspunkten der DNA erkennen. Sie sammelt sich an den Punkten mit Feldstärken von über ca. 2 MV/m. Diese befinden sich an den Spitzen der Elektroden und deren äußeren Eckpunkten. Im Elektrodenspalt dagegen herrschen geringere Feldintensitäten von 0,1 - 0,3 MV/m. Die Asymmetrie der DNA-Anlagerung auf den beiden Elektroden ist auf das Vorhandensein einer zusätzlichen *Gate*-Elektrode zurückzuführen, die bei der Simulation nicht berücksichtigt wurde.

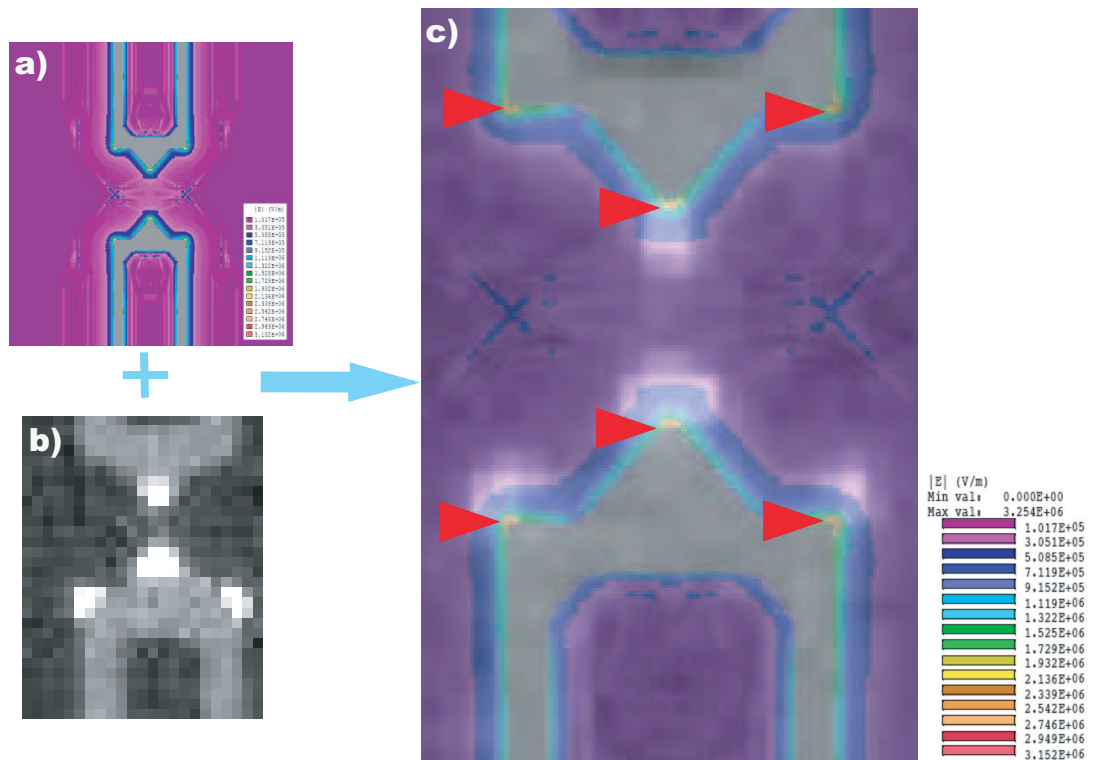


Abb. 3.11: Vergleich der Simulation a) und des Fluoreszenz-live-Bildes b). Die Überlagerung (c) beider Bilder zeigt die Übereinstimmung von Bereichen mit hoher Feldintensität zu den Anheftungspunkten der DNA (rote Pfeile).

Zur präzisen Quantifizierung der DNA in einem Elektrodenspalt wurde das AFM eingesetzt. Dadurch war es möglich, auch DNA-Einzelmoleküle zu detektieren. Abbildung 3.12 zeigt AFM-Aufnahmen nach erfolgter 10 minütiger Dielektrophorese, die mit Spannungen von 1 bis 4 V (a bis d) und einer Frequenz von 100 kHz durchgeführt wurde. Die Ausschnitte in der unteren Ecke zeigen zum Vergleich den entsprechenden Elektrodenspalt im Fluoreszenzbild. Die Ergebnisse der Spannungsrampe (oben) konnten bestätigt werden. Mit höherer Spannung wurde auch mehr DNA zwischen den Elektroden immobilisiert. Dies wird sowohl anhand der Fluoreszenzbilder als auch an den Detailaufnahmen mit dem AFM deutlich. Bei einer Spannung von 1 V wurden die DNA-Moleküle sehr gut gestreckt und man konnte zwischen DNA-Bündeln und DNA-Einzelmolekülen unterscheiden. Mit steigender Intensität der Spannung erhöhte sich die Zahl der DNA-Bündel, welche ab einer Spannung von 2 V eine zunehmende Fragmentierung aufwiesen. Dabei kam es wie im Fall von 4 V (Abb. 3.12d) fast ausschließlich zu Ablagerung von geknäulter oder stark kondensierter DNA im Elektrodenspalt.

Die DNA-Moleküle binden aller Voraussicht nach von einem Ende her an die Elektroden. Von diesem Befestigungspunkt aus spannt sich dann die DNA über den Elektrodenspalt. Eine terminale Bindung von DNA-Molekülen mit Affinität zu Goldelektroden wurde auch von [Allemand et al., 1997] und [Maubach and Fritzsche, 2004] gezeigt. Bei höheren Spannungen kann es nun teilweise zu Ablösungen und Destruktionen der DNA-Moleküle kommen. Dies könnte durch erhöhte Ionenströmungen bei hohen Feldstärken erfolgen. Die DNA-Moleküle knäulen sich wieder teilweise zurück, was zu den beobachteten, kondensierten Bereichen und DNA-Bündeln zwischen den Elektroden führt.

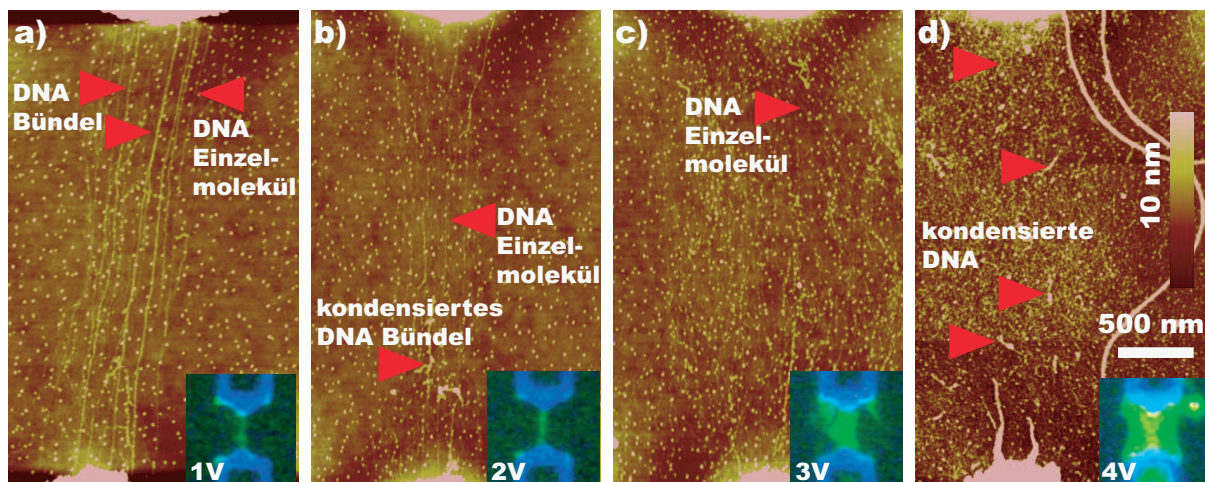


Abb. 3.12: AFM-Aufnahmen von in Elektrodenanordnungen mittels Dielektrophorese integrierten DNA-Molekülen mit Spannungen von a) 1 V, b) 2 V, c) 3 V und d) 4 V. Die Ausschnitte am unteren rechten Rand zeigen zugehörige Fluoreszenzaufnahmen (DNA: grün; Elektroden: blau) desselben Elektrodenspaltes.

Einfluss des Elektrodenlayouts Im Verlauf der Parameteroptimierung stellte sich heraus, dass die Elektrodengeometrie mit den ca. 2 μm Elektrodenspalten für die Integration von DNA-Einzelmolekülen besser geeignet waren. Abbildung 3.13 zeigt Fluoreszenzaufnahmen von integrierter DNA in den verschiedenen Elektrodenlayouts. Die Elektrodengeometrie mit den abgerundeten ca. 1,5 μm entfernten Elektroden (Abb. 3.13a) sowie auch der 10 μm Elektrodenspalt mit den rechteckigen Elektroden (Abb. 3.13b) waren für die gezielte Lokalisierung von DNA-Einzelmolekülen nur unzureichend geeignet. Bei diesen Elektrodenlayouts führte die Form und der Abstand der beiden Elektroden zu Feldintensitätsverteilungen, die eine kontrollierte Integration von einzelnen DNA-Molekülen erschweren. Dies konnte durch die Veränderung der Elektrodenkanten zu schmalern und spitzeren (Abb 3.13c) Struktu-

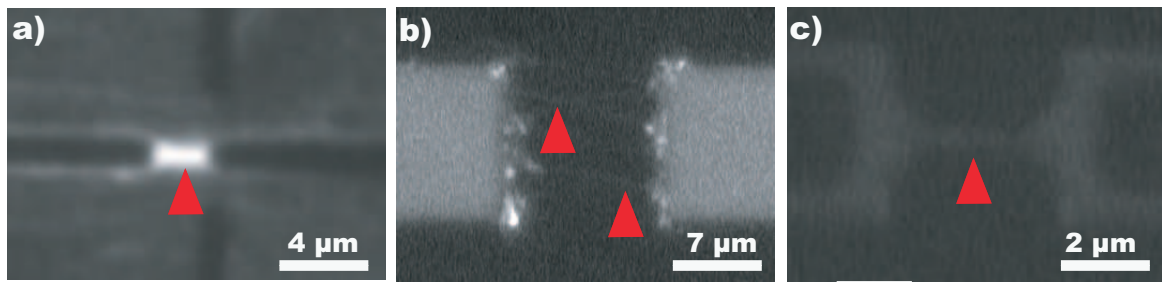


Abb. 3.13: Fluoreszenzaufnahmen von integrierter DNA zwischen verschiedenen Elektrodenformen. a) 1,5 μm entfernte runde Elektroden, b) ca. 10 μm entfernte eckige Elektroden und c) 2 μm Elektrodenspalt mit spitzen Elektroden. Die DNA ist mit roten Pfeilen markiert.

ren verbessert werden, wodurch eine gezielte, lokalisierte Integration von Einzelmolekülen zwischen den Elektrodenspitzen möglich wurde.

Der Vorteil von speziell geformten Elektroden kann auch in der Literatur gefunden werden. So sind abgerundete (sinusoidal) [Suzuki et al., 1998], trapezförmige [Kawabata and Washizu, 2001] sowie dreieckige Geometrien [Dewarrat et al., 2002] für die Immobilisierung von DNA zwischen zwei Elektroden besonders geeignet. Die Inhomogenität des elektrischen Feldes ist bei spitz zulaufenden Elektroden besonders ausgeprägt. Dies führt zu einer besseren Fokussierung der DNA-Moleküle im Elektrodenspalt.

Eine weitere Optimierung des Elektrodenlayouts könnte durch Entfernen der äußeren Spitzen erfolgen. Die experimentellen Ergebnisse wie auch die Simulation zeigten, dass sich die DNA an diese ebenfalls bevorzugt anlagert.

Integration von DNA-Einzelmolekülen Die ermittelten Parameter wurden optimiert hinsichtlich einer gezielten Integration von DNA-Einzelmolekülen im Elektrodenspalt. Dazu wurde die angelegte Spannung weiter reduziert, um den dynamischen Bereich der Einzelmolekül-Immobilisierung anzusprechen. Abbildung 3.14a zeigt eine Elektrodenanordnung, in der DNA über die Dauer von 10 min eingefangen wurden. An den in Abbildung 3.14b gezeigten Spalt wurde für 20 min eine Spannung von 0,5 V mit 100 kHz angelegt. Es zeigte sich, dass bei einer Dauer von 10 min wenige DNA-Einzelmoleküle im Elektrodenspalt detektiert werden konnten. Eine Erhöhung der Dielektrophoresedauer auf 20 min führt zu erhöhter Ansammlung von DNA-Molekülen zwischen den Elektroden. Es können sowohl Einzelmoleküle sowie auch DNA-Bündel gefunden werden [Wolff et al., 2008].

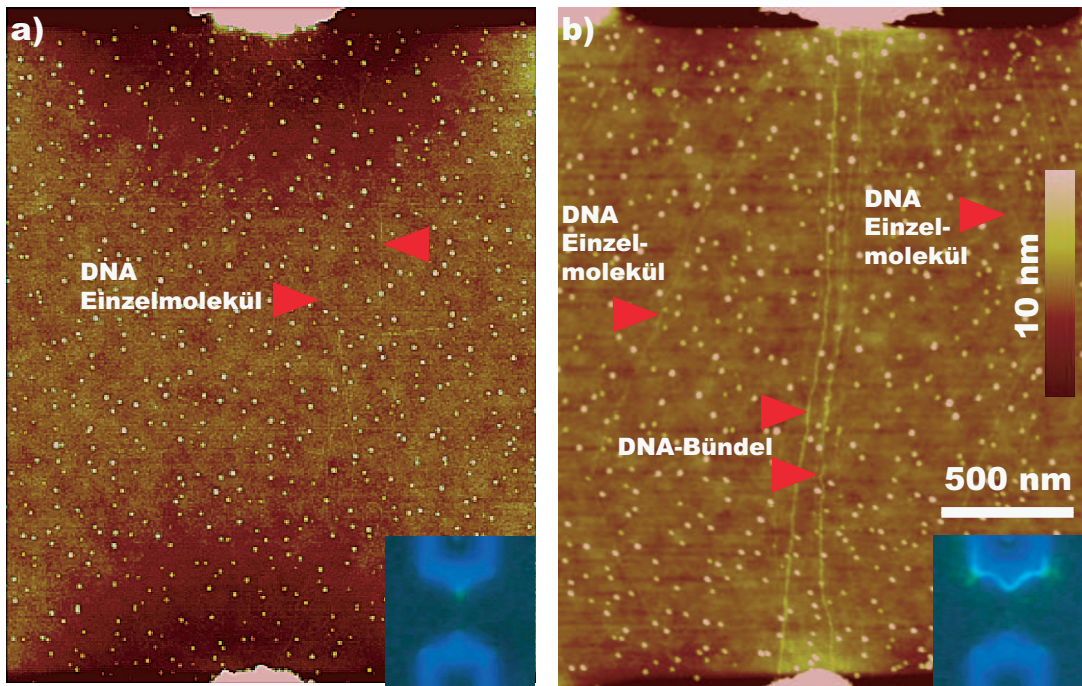


Abb. 3.14: AFM-Aufnahmen von mittels Dielektrophorese integrierten DNA-Einzelmolekülen mit einer Spannung von 0,5 V und einer Reaktionsdauer von a) 10 min und b) 20 min. Die Ausschnitte am unteren rechten Rand zeigen eine Fluoreszenzaufnahme desselben Elektrodenspaltes.

3.2 Integration von DNA-Superstrukturen (*G-Wires*)

Die Grundlagen der Assemblierung von *G-Wires* konnte in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe [Sondermann, 2003, Holste, 2004] prinzipiell geklärt werden. Ihr mögliches Potential als Baustein in der molekularen Nanotechnologie soll hier untersucht werden. Die Assemblierung der *G-Wires* wurde nach Immobilisierung der Strukturen auf Glimmer mit dem AFM charakterisiert. Dabei ist das Verständnis der Immobilisierung und deren beeinflussende Faktoren (Immobilisierungsdauer, Konzentration der Ionen), z.B. auf die Länge der Strukturen, von Bedeutung für einen Einsatz als molekularen Baustein.

Bei Oligonukleotid-Sequenzen, die aus mehr als 4 Guaninen bestehen, kommt es zur Bildung der DNA-Superstrukturen. Für die *G-Wire*-Assemblierung müssen einwertige (Na^+ , K^+) und zweiwertige (Mg^{2+}) Kationen vorhanden sein. Tris/HCl (pH 7,5) ist für die Assemblierung nicht essenziell. Eine Optimierung des Wachstumspuffers ergab, dass sich die Anwesenheit von KCl eher negativ auf die Assemblierung auswirkt. Die Oligonukleotid-Konzentration spielt für die *G-Wire*-Länge keine signifikante Rolle. Es muss jedoch eine Mindestkonzentration vorhanden sein, damit es zur DNA-Superstrukturbildung kommt.

Je nach Immobilisierungsbedingungen können die *G-Wires* in folgende Klassen eingeteilt werden (Abb. 3.15): Kategorie I umfasst wenige sehr kurze Strukturen (Punkte) von weniger als 20 nm Länge. Kategorie II zeichnet sich durch eine dichtere Ansammlung von langen *G-Wires* (kaum verzweigt) aus, während Kategorie III ein dichtes Netzwerk (stark verzweigt) aus DNA-Überstrukturen darstellt. Für Anwendungen als molekulare Bausteine sind vor allem die langen Strukturen der Kategorie II sowie Netzwerke der Kategorie III von Bedeutung, da Strukturen über mehrere Mikrometer realisiert werden können.

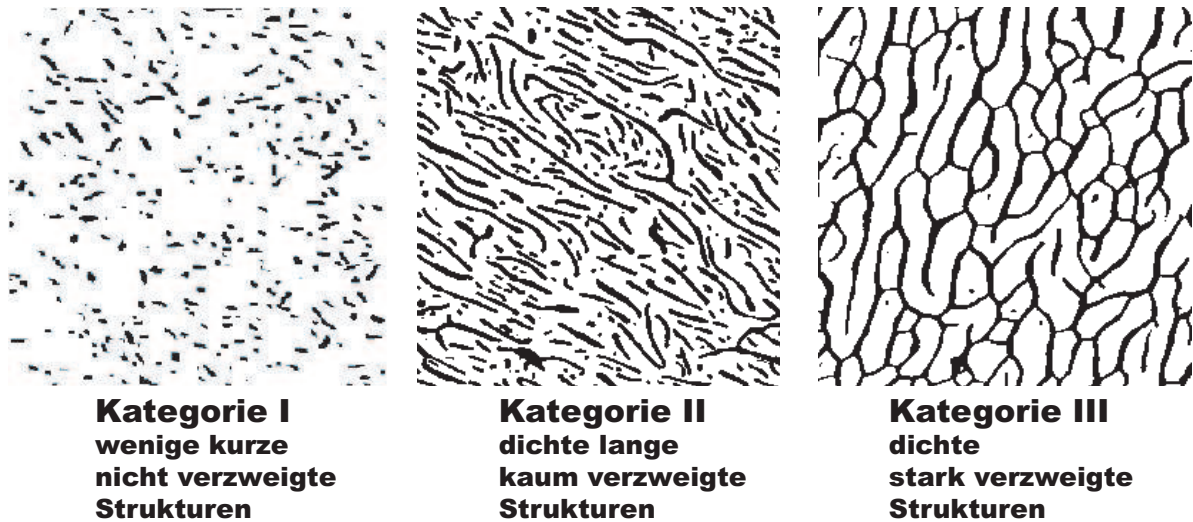


Abb. 3.15: Einteilung der *G-Wires* in Kategorien.

G-Wires bilden meist ausgestreckte Strukturen mit einer variablen Länge von 20 bis 700 nm. Durch ihre Quadruplexstruktur weisen *G-Wires* mit ca. 1,7 nm einen fast doppelt so großen Durchmesser im AFM auf als doppelsträngige DNA (wie z.B. Lambda-DNA) mit ca. 0,8 nm (Abb. 3.16) Diese Werte wurden auch von Marsh et al. berichtet [Marsh et al., 1995]. Dabei hängt die Dicke der Quadruplexstrukturen von der Ionenzusammensetzung während der Assemblierung ab. Desweiteren hat die Auflösung während der AFM-Messungen sowie die Strukturhöhe einen Einfluss auf die gemessenen Durchmesser der DNA-Strukturen. Abbildung 3.16c zeigt den schematischen Vergleich der unterschiedlichen DNA-Strukturen. Lambda-DNA ist ein Einzelmolekül, bei den *G-Wires* handelt es sich dagegen um „Polymere“, die aus „Monomeren“, den kurzen G4-Oligonukleotiden, aufgebaut werden. Diese werden durch die Anwesenheit von Kationen stabilisiert und in ihrer Konformation von den Immobilisierungsbedingungen beeinflusst, welche im Weiteren untersucht werden sollen.

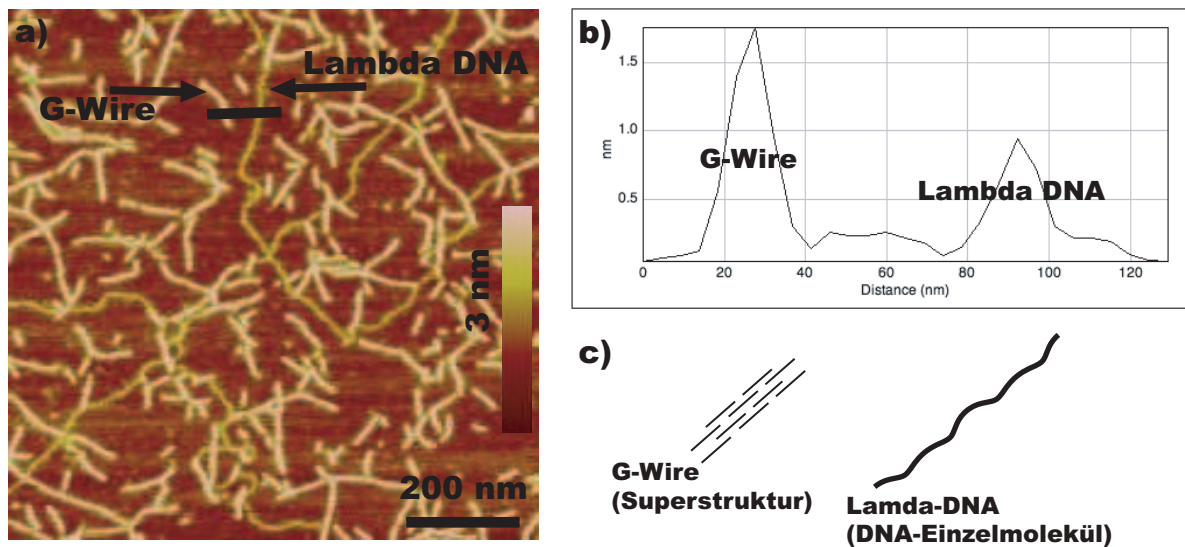


Abb. 3.16: Vergleich von *G-Wires* und Lambda DNA. a) AFM-Aufnahme von immobilisierter Lambda-DNA zusammen mit DNA-Überstrukturen. Der Schnitt (b) zeigt den Unterschied in der Höhe der beiden DNA-Strukturen, die in (c) schematisch dargestellt sind.

3.2.1 Einfluss der Immobilisierungsdauer

Der Einfluss der Immobilisierungszeit auf die Länge der DNA-Strukturen wurde untersucht. Die Immobilisierungsdauer lag standardmäßig bei 4 Minuten. Bereits nach einer Benetzung von 1 Sekunde konnten *G-Wires* immobilisiert werden (Abb. 3.17). Mit zunehmender Immobilisierungsdauer können mehr und längere DNA-Strukturen gefunden werden. Diese Zunahme ist bereits in den Bildausschnitten a) bis e) zu erkennen. Trägt man die jeweils kürzesten, längsten Messwerte und den Median in ein Diagramm ein, ergibt sich folgendes Bild: die kürzesten *G-Wires* liegen bei allen Immobilisierungszeiten bei ca. 20 nm. Diese konnte als kürzeste mit dem AFM identifizierbare Länge der DNA-Superstrukturen ermittelt werden. Die längsten DNA-Strukturen betragen bei 60 Sekunden Immobilisierungsdauer über 350 nm. Bei den Immobilisierungszeiten von 60 und 240 Sekunden wurden mehr als doppelt so viele DNA-Strukturen nachgewiesen (nicht gezeigt), so dass unter diesen Bedingungen im Schnitt die längsten *G-Wires* gefunden werden konnten.

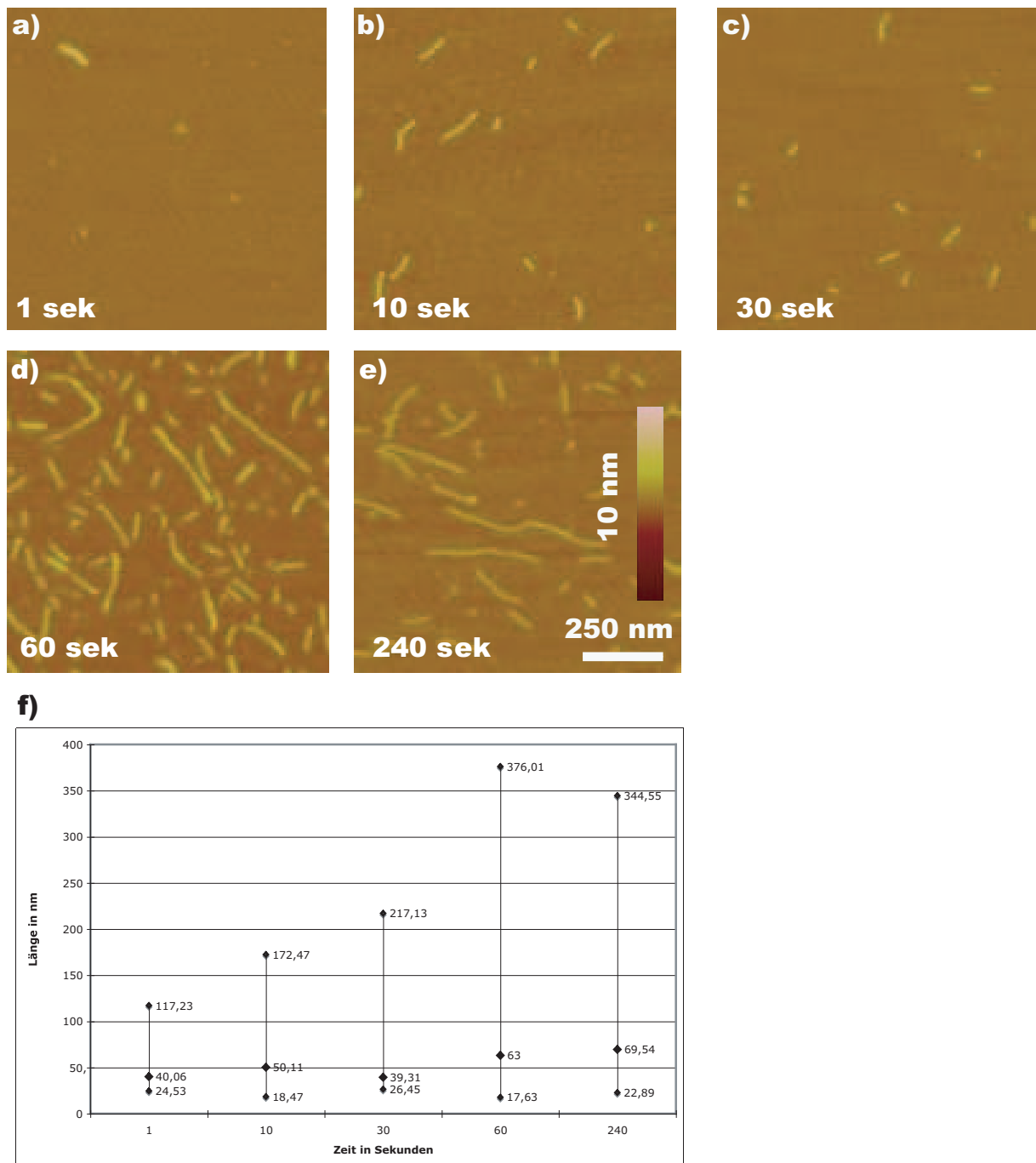


Abb. 3.17: Immobilisierung von *G-Wires* in Abhängigkeit von der Immobilisierungszeit. a bis e) AFM-Bilder zeigen die Oberflächenbedeckung nach verschiedenen Immobilisierungszeiten. f) Das Diagramm verdeutlicht den Einfluss der Immobilisierungszeit auf die erzielte Länge der DNA-Superstrukturen.

Betrachtet man dieses Ergebnis, so wird deutlich, dass es sich bei den *G-Wire* Strukturen um ein dynamisches System handelt. In der DNA-Lösung sind zu einer bestimmten Zeit verschieden lange Superstrukturen zu finden. Nur bei einer ausreichend langen Immobilisierungsdauer (ab einer Minute) können jedoch die längere DNA-Strukturen detektiert werden.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die Stabilisierung sowie die Immobilisierung durch die im Puffer enthaltenen Ionen bei den kürzeren *G-Wires* schneller stattfindet, während zur stabilen Anbindung längerer Strukturen auf der Oberfläche mehr Zeit benötigt wird. Auch die verminderte Diffusion größerer Strukturen wirkt sich auf die Immobilisierung aus.

3.2.2 Einfluss der Ionenkonzentration

Um möglichst einzelne und lange *G-Wires* zu erhalten, wurde der Einfluß des Puffers während der Immobilisierung auf die Länge und Anzahl der DNA-Strukturen hin untersucht. Abbildung 3.18a zeigt die Immobilisierung von *G-Wires* aus einer Standardverdünnung (Ausgangssprobe) in P2 mit 2,5 mM NaCl und 1,45 mM MgCl₂. Es wurden mit ca. 700 nm sehr lange und zum Teil stark verzweigte Strukturen gefunden. Die weiteren Verdünnungen dieser Ausgangssprobe in P2 (Abb. 3.18b und c) führten zu einer Verkürzung der Strukturen auf ca. 300 nm. Die Bedeckung mit den DNA-Superstrukturen ist vergleichbar zur Standardverdünnung. Diese erschwert die Auswertung der Längen der *G-Wires*, da der Anfangs- und der Endpunkt einer diskreten DNA Struktur nicht genau bestimmt werden kann. Die Werte der beiden Verdünnungen in Abbildung 3.18f konnten so für diese Proben nur geschätzt werden. Erst bei einer 1:10 Verdünnung der Ausgangssprobe in P2 richten sich die *G-Wires* so aus, dass diskrete Strukturen aufgelöst werden. Diese sind mit einer maximalen Länge von 254 nm wesentlich kürzer als die *G-Wires* der Ausgangssprobe.

Verdünnungen in Wasser (Abb 3.18 d und e) waren lediglich bis zu einer Stufe von 1:2 durchführbar. Bei weiterer Verdünnung konnten keine DNA-Strukturen mehr immobilisiert werden. Dieser Effekt wird auch anhand der schnellen Abnahme der längsten *G-Wires* von ca. 240 nm auf ca. 90 nm deutlich. Die Medianwerte sinken von ca. 50 auf ca. 30 nm. Bei allen Proben lagen die kürzesten Strukturen bei ca. 20 nm.

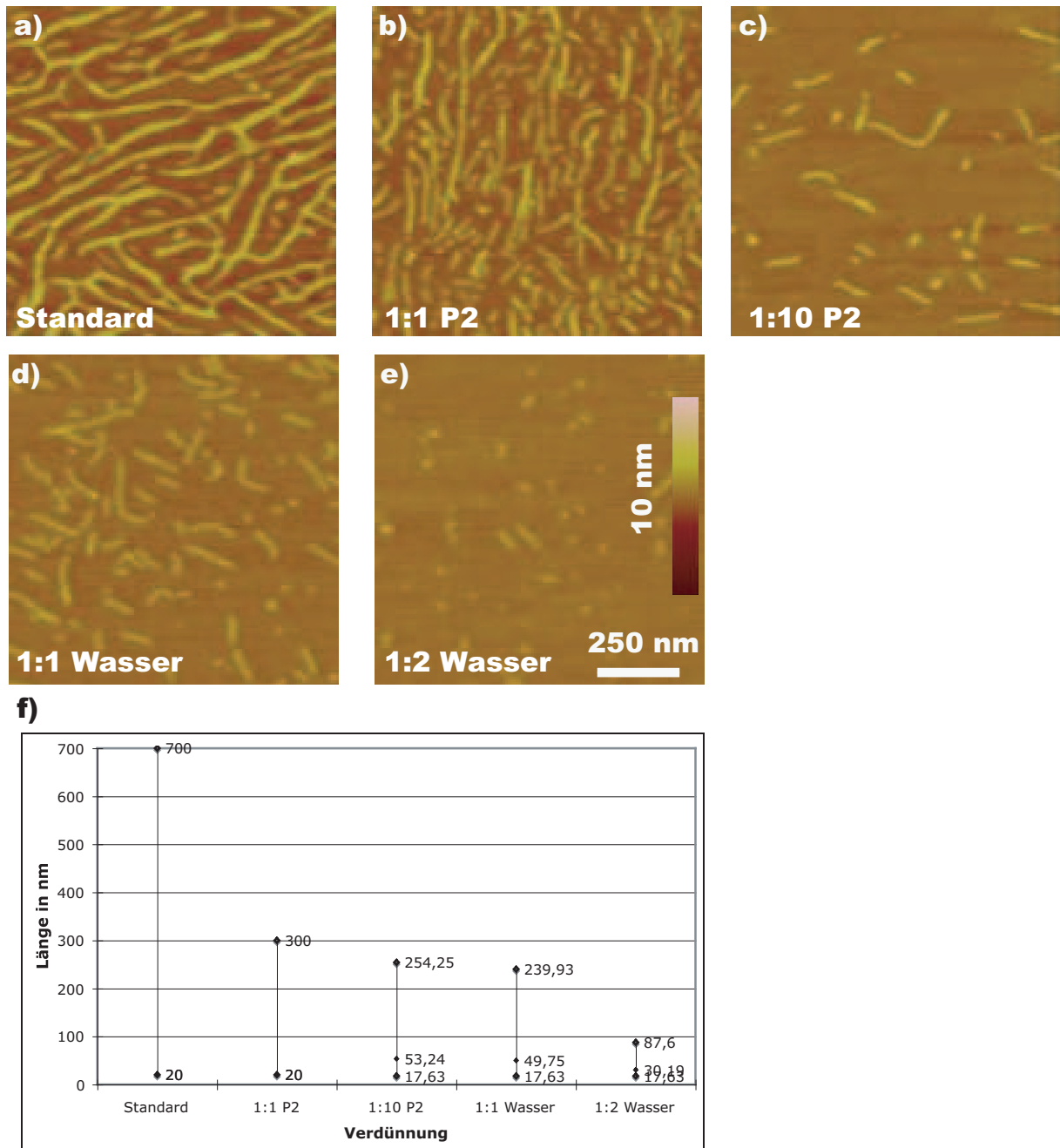


Abb. 3.18: Immobilisierung von *G-Wires* in Abhängigkeit vom Immobilisierungspuffer. AFM-Bilder zeigen die Oberflächenbedeckung nach der Immobilisierung aus verschiedenen Pufferkonzentrationen. a bis c) Steigende Verdünnung in P2. d) und e) Steigende Verdünnung in Wasser. f) Das Diagramm verdeutlicht den Einfluss der Ionenkonzentrationen auf die Länge der DNA-Superstrukturen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Länge der *G-Wire* Strukturen abhängig ist von den Pufferbedingungen während der Immobilisierung. Verdünnungen in P2 (der neben Tris-HCl nur MgCl_2 enthält) sind bis zu einer Stufe von 1:10 möglich, Verdünnungen in Wasser dagegen sind nur bis zu einer Stufe von 1:2 durchführbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin,

dass die Anwesenheit von Magnesiumionen von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der *G-Wires* sowie auch für deren Immobilisierung ist. Magnesiumionen stabilisieren die G-Quartette der *G-Wires* von außen [Marsh et al., 1995]. Bei ausreichender Magnesiumionenkonzentration wird eine Zusammenlagerung von *G-Wires* zu langen Strukturen ermöglicht. Nimmt die Konzentration ab, werden die Magnesiumionen von der Aussenseite abgelöst. Dies kann zum Zerfall der DNA-Strukturen führen.

3.2.3 Stabilität

Abbildung 3.19 zeigt *G-Wires* nach einigen Tagen, nach wenigen Monaten und nach bis zu einem Jahr Lagerung (jeweils in Lösung). Es ist erkennbar, dass zu allen Zeitpunkten noch stabile DNA-Superstrukturen vorlagen und immobilisiert werden konnten. Die Lagertemperatur hat dabei keinen signifikanten Einfluss auf die *G-Wires*. Es konnten sowohl aus Proben die bei Raumtemperatur gelagert wurden (Abb. 3.19 a bis c), als auch aus bei -20 °C eingefrorenen Proben (d bis f) DNA-Strukturen immobilisiert werden. Es konnte bei allen Proben ein ähnliches Bild der Bedeckungsdichte und der Längenverteilung gefunden werden. Eine längere Lagerung der synthetisierten DNA-Strukturen ist also ohne weiteres möglich, da die Langzeit-Stabilität gewährleistet ist.

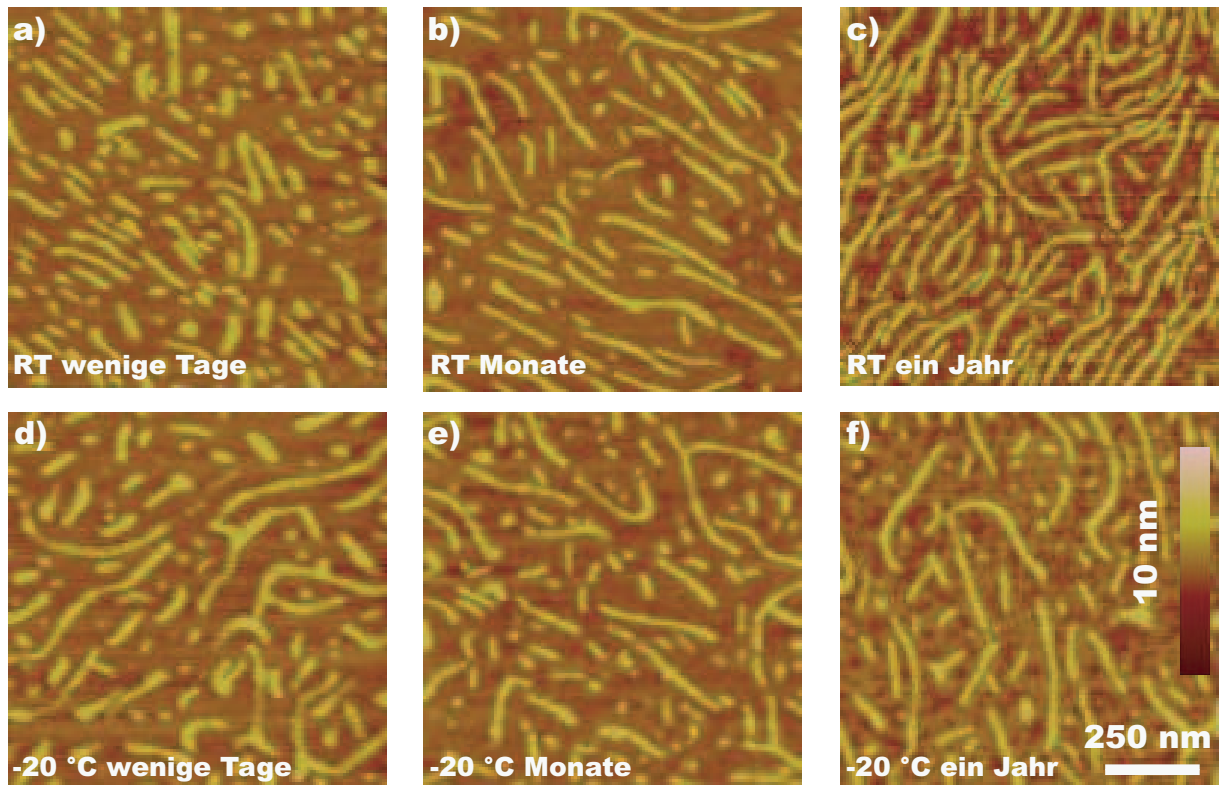


Abb. 3.19: Lagerstabilität von *G-Wires*. Lagerung der Lösungen bei Raumtemperatur: a) nach wenigen Tagen, b) nach Monaten, c) nach einem Jahr. d bis f) Lagerung bei -20 °C für die selben Zeiträume.

3.2.4 Strukturaufklärung und Autoorientierung von *G-Wires*

Zur Aufklärung der Struktur von *G-Wires* wurden hochauflösende, rasterkraftmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Abbildung 3.20 zeigt AFM-Bilder einer verzweigten DNA-Struktur (a) sowie die eines Netzwerkes (b). Legt man ein Höhenprofil durch verschiedene Punkte der *G-Wire*-Struktur, so erhält man folgendes Bild: Der Schnitt durch den Anfangsbereich der Struktur und der Schnitt durch den Verzweigungspunkt weisen mit ca. 1,6 nm die gleiche Höhe auf. Das Höhenprofil durch die beiden verzweigten DNA-Stränge ergibt Werte von ca. 1,3 nm bzw. 1,4 nm. Höhenmessungen an der ringförmigen DNA-Struktur (b) ergeben für die beiden breiten Seiten eine Höhe von ca. 2,4 nm bzw. 2,3 nm. Schnitte durch die schmalere Bereiche des Netzwerkes liegen bei 2,2 nm und bei 1,6 nm an der schmalsten Stelle des Rings.

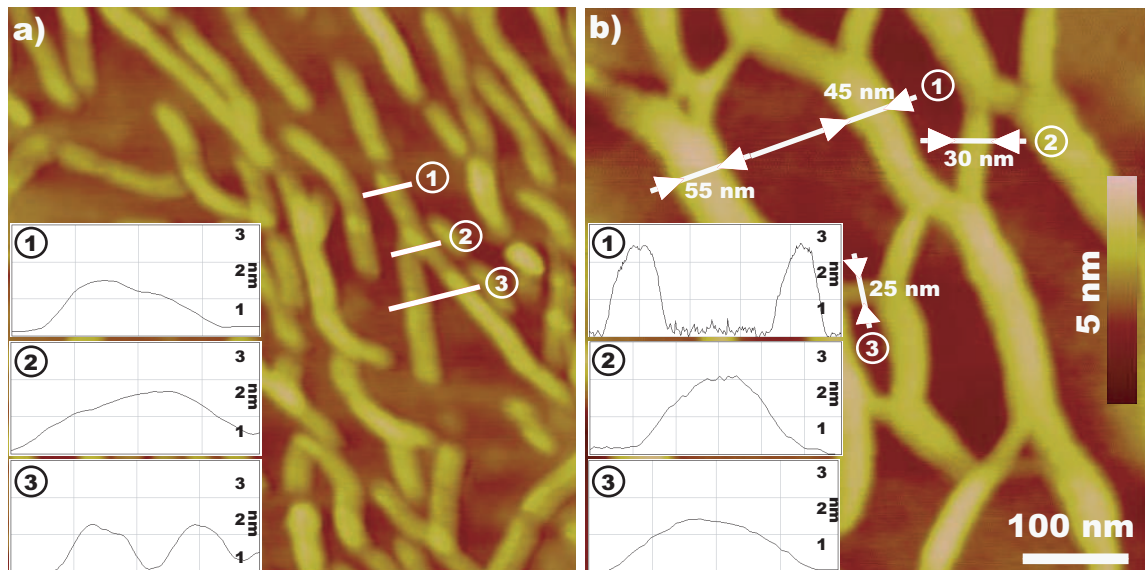


Abb. 3.20: Hochauflösende AFM-Aufnahmen von *G-Wires* mit Höhenmessungen.

Die Werte zeigen, dass sich die Höhe der *G-Wires* in dicht verzweigten Netzwerken mit ca. 2,4 nm nahezu verdoppelt hat, im Gegensatz zu einzeln liegenden DNA-Strukturen mit Höhen von ca. 1,3 nm. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Ausbildung von verzweigten komplexeren Strukturen mit der Aneinanderlagerung mehrerer *G-Wire*-Strukturen einhergeht. Diese lagern sich parallel übereinander als auch nebeneinander an.

Autoorientierung

In vielen AFM-Aufnahmen von auf Glimmer immobilisierten *G-Wires* wurden drei Vorzugsrichtungen sichtbar, nach denen sich die DNA-Strukturen ausrichteten (Abb.3.21a). Die Orientierung erfolgte dabei in 60° Intervallen. Es kann hier eine Ausrichtung des Phosphatrückgrates der DNA entlang des Glimmerrückgrates angenommen werden [Vesenska et al., 2007]. Dabei werden die 0,9 nm entfernten freien Kaliumgitterlücken des Glimmers durch die im Puffer enthaltenen Magnesiumionen besetzt (Abb.3.21b). Diese vermitteln eine elektrostatische Wechselwirkung zu den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates, welche einen Abstand von 0,95 nm haben, was dem Abstand der „next nearest neighbor“ Kaliumlücken entspricht.

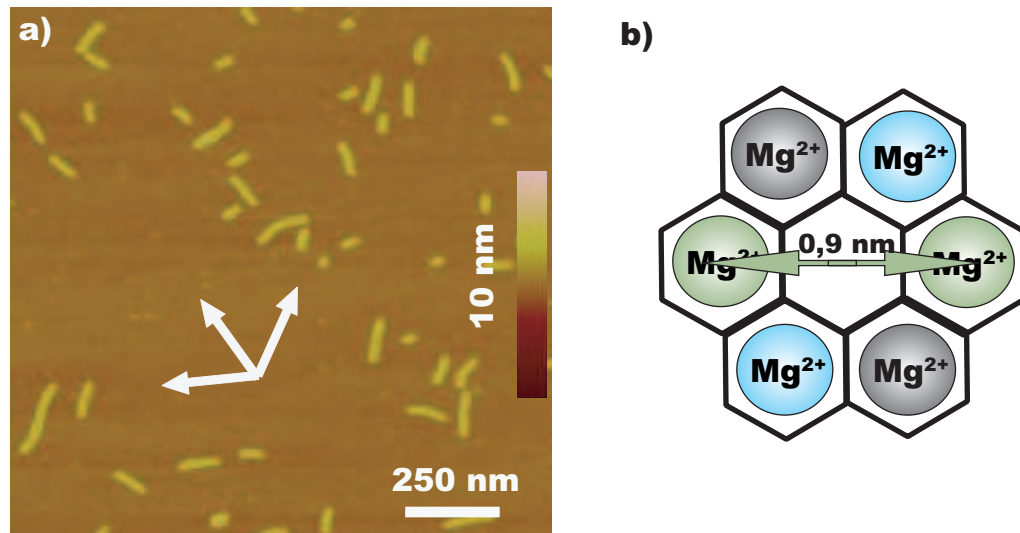


Abb. 3.21: Autoorientierung von *G-Wires* auf Glimmer. a) Die Mehrzahl der Superstrukturen ist in eine der drei eingezeichneten Vorzugsrichtungen orientiert. b) Schematische Darstellung der Besetzung der „next nearest neighbor“ Gitterlücken mit Magnesiumionen.

3.2.5 Immobilisierung von *G-Wire* Strukturen auf Silizium

3.2.5.1 Silizium mit additionaler Funktionalität

Abbildung 3.22 zeigt die Immobilisierung von *G-Wires* auf Silizium mit nativer Oxidschicht. Hier besteht keine regelmäßige Anordnung von Ladungslücken, die von Magnesiumionen besetzt werden können. Die negativ geladenen Hydroxylgruppen der Oxidoberfläche des Siliziums zeigen keine Fernordnung auf der Oberfläche. Die hier ebenfalls durch Magnesium vermittelte Anlagerung der *G-Wires* resultiert daher in einer unregelmässigen Ausrichtung. Auf den aktivierten Siliziumoberflächen war eine Immobilisierung der DNA-Strukturen zudem nur erfolgreich, wenn die Lösung auf dem Chip eingetrocknet wurde. Diese Eintrocknungseffekte haben natürlich ebenfalls Einfluss auf die Ausrichtung der DNA. Deshalb wurden die folgenden Versuche auf den Siliziumsubstraten mit intrinsischer Funktionalität (den Vernetzungsnetzwerken) ohne Eintrocknung der DNA Lösung durchgeführt, um den Einfluss der elektrostatischen Felder auf die Immobilisierung nicht zu überlagern.

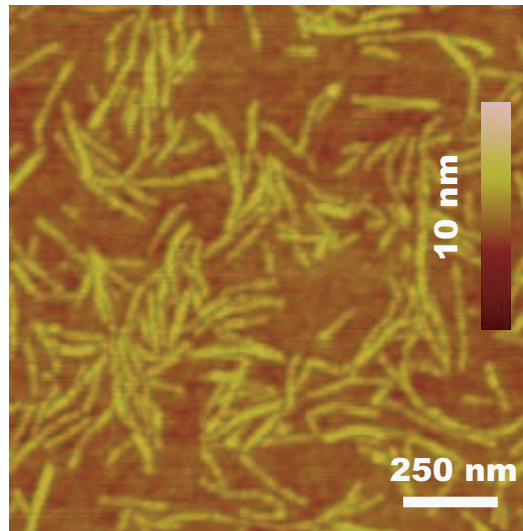


Abb. 3.22: Immobilisierung von *G-Wires* auf Silizium.

3.2.5.2 Silizium mit intrinsischer Funktionalität (Versetzungnetzwerke)

In Abbildung 3.23 sind Untersuchungen zur Anbindung von *G-Wires* auf Substraten mit intrinsischer Funktionalität (den Versetzungsnetzwerken) gezeigt. Es wurden Unterschiede im Verhalten hydrophober und hydrophiler Oberflächen auf das Anbindungsverhalten der DNA-Superstrukturen sichtbar.

Auf den hydrophoben Substraten, die in diesem Fall mit einer HF-Behandlung erzeugt wurden, konnten sowohl bei Substraten mit als auch ohne Versetzungsnetzwerk DNA-Strukturen immobilisiert werden (Abb. 3.23a und b). Es war jedoch aufgrund der Hydrophobizität nur eine schlechte Charakterisierung mit dem AFM möglich. Die Strukturen erscheinen stark verschwommen.

Auf frisch gereinigten Siliziumoberflächen mit hydrophilem Charakter konnten nur auf den Substraten mit einem Versetzungsnetzwerk *G-Wires* immobilisiert werden (Abb. 3.23d). Diese waren jedoch sehr kurz und nur mit einem reduzierten Z-Limit (zur Realisierung einer höheren Auflösung in z) sowie einer erhöhten lateralen Auflösung detektierbar. Ein Abbilden der intrinsisch geladenen Versetzungsmuster mit den *G-Wires* auf der Substratoberfläche war jedoch nicht möglich. Die Eigenschaften der Substratoberflächen beeinflussen die Anbindung der DNA demnach stärker als die intrinsischen Eigenschaften.

Im Falle der hydrophoben Oberflächen (SiH- und Si-CH₃-Gruppen) können sich die *G-Wires* unspezifisch an die Oberfläche anlagern und dichte Netzwerke bilden. Bei den hydrophilen

Substraten (OH-Gruppen) wird dagegen die Anlagerung nur durch das Vorhandensein von Versetzungsnetzwerken ermöglicht. Da es sich um p-dotiertes Silizium handelt, welches positiv geladene Versetzungen ausbildet, ist es denkbar, dass die Ionenstruktur der *G-Wires* gestört wird. Die ebenfalls positiv geladenen Magnesiumionen werden bei der Anlagerung abgestoßen. Dies kann zum „Zerfallen“ der DNA-Strukturen beitragen, so dass nur Bruchstücke immobilisiert werden.

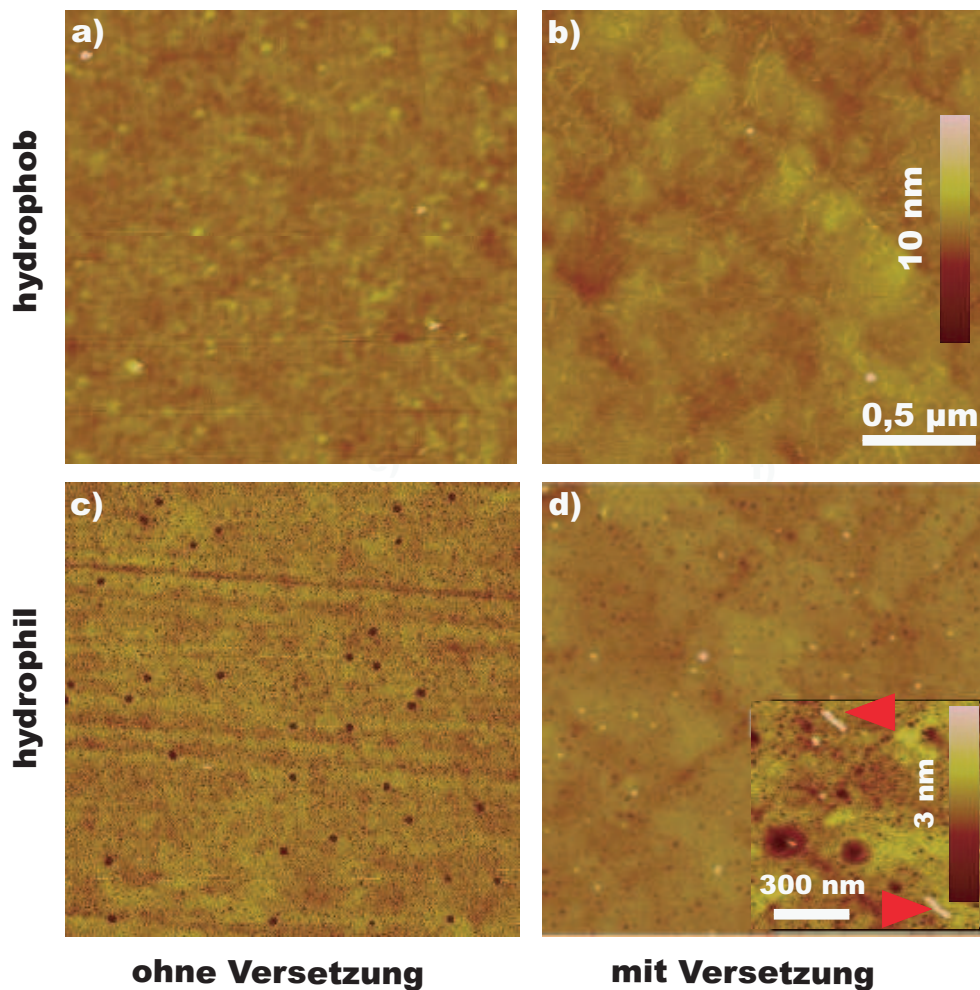


Abb. 3.23: *G-Wires* auf Silizium-Substraten ohne a) und c) mit intrinsischer Funktionalität (Versetzungsnetzwerk) b) und d). Bei den hydrophoben Substraten (a und b) sind die DNA-Superstrukturen nur schwer zu erkennen. Bei den hydrophilen Substraten (c und d) sind lediglich bei der Probe mit Versetzungsnetzwerk (d) *G-Wires* als kurze Strukturen (Pfeilspitzen in der Vergrößerung) zu beobachten.

3.2.6 Integration von *G-Wire*-Strukturen in mikrostrukturierte Substrate

Im nächsten Schritt wurde die Immobilisierung von *G-Wires* auf mikrostrukturierte Chips übertragen. Dabei wurden die Methode des eintrocknenden Tropfens (Abb. 3.24a) sowie der Dielektrophorese angewendet (Abb. 3.24b und c). In beiden Fällen wurden DNA-Strukturen im mikrostrukturierten Elektrodenspalt beobachtet. Im Falle der eingetrockneten *G-Wires* zeigte sich eine fast gleichmäßige Verteilung der DNA-Strukturen im Elektrodenspalt. Die dielektrophoretisch integrierten *G-Wires* waren vorwiegend direkt an den Elektrodenspitzen zu finden. Mit einer Frequenz von 100 kHz konnten, wie im Falle von doppelsträngiger DNA, bei den *G-Wires* die besten Ergebnisse erzielt werden (b), während es bei einer Frequenz von 10 kHz zur starken Anreicherung an und auf den Elektroden kam (c). Es konnte bei keiner Probe eine Überbrückung des Elektrodenspalts erzielt werden. Die DNA-Superstrukturen erwiesen sich als zu kurz und konnten nicht in ausreichender Dichte oder als ausreichend lange Überstruktur in den Elektrodenspalten integriert werden. Es kann von einem störenden Einfluss der Dielektrophorese auf die im Puffer enthaltenen und für die *G-Wire*-Stabilität nötigen Ionen ausgegangen werden. Es war somit keine Integration von längeren DNA-Strukturen oder DNA-Netzwerken (wie sie auf Glimmer gefunden wurden) möglich.

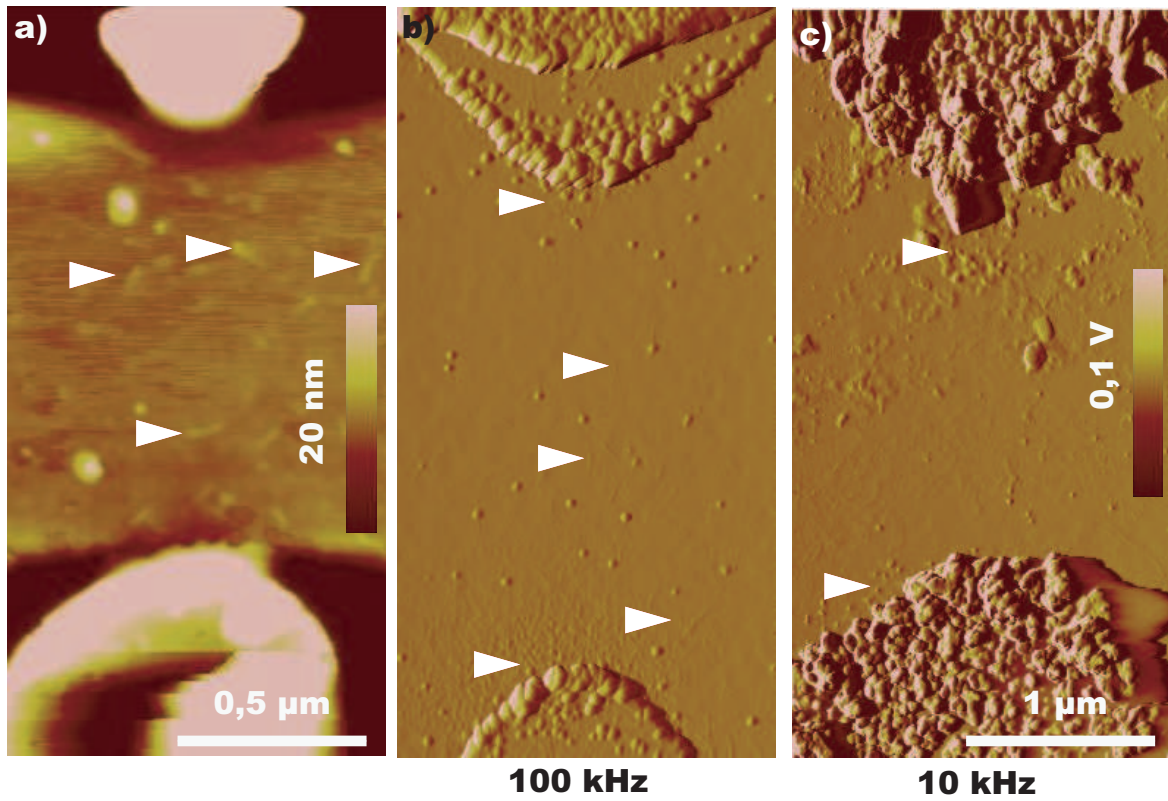


Abb. 3.24: *G-Wires* auf mikrostrukturierten Chips. a) Mit der Tropfenmethode integrierte DNA-Superstrukturen sind über den gesamten Elektrodenspalt zu finden. Die mittels Dielektrophorese b) mit 100 kHz und c) mit 10 kHz integrierten *G-Wires* sind bevorzugt an den Elektroden zu finden.

3.3 Funktionalisierung von DNA-Strukturen

Vorraussetzung für den Einsatz integrierter DNA-Strukturen ist eine anschließende Funktionalisierung. Für eine nanoelektronische Anwendung der integrierten DNA muss diese beispielsweise metallisiert werden, um die mangelnde intrinsische Leitfähigkeit auszugleichen. Die Metallisierung kann dabei Metallnanopartikel-vermittelt am negativ geladenen Rückgrat der DNA oder durch direkte Bindung von Metallionen an den Basen erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit kamen zum einen positiv geladene Goldnanopartikel (*Genogold*) zur Anwendung, zum anderen wurde die DNA mit Silbersalzen unter UV-Bestrahlung sowie dielektrophoretisch metallisiert. Eine weitere Möglichkeit ist die sequenzspezifische Funktionalisierung der DNA mit Biotin. Dies ermöglicht eine lokale Bindung von mit Streptavidin modifizierten Goldnanopartikeln.

Letztendlich stellt die Fluoreszenzmarkierung der DNA mit dem Farbstoff YOYO-1 auch eine Art von Funktionalisierung dar, die eine optische Visualisierung einzelner DNA Moleküle sowie ein „*real-time Imaging*“ ermöglicht.

3.3.1 Metallisierung

Ziel der Metallisierung ist die Anlagerung einer leitfähigen Hülle (bestehend aus einzelnen Clustern) entlang der DNA. Dabei dient das Biotemplate DNA als Gerüst für die Anlagerung von metallischen Strukturen, wie z.B. Goldnanopartikeln, oder auch als aktiver Reaktionspartner für die Reduktion von Metallsalzen. Die entstehenden metallischen Strukturen sollen dabei im Nanometerbereich liegen. Andere Anforderungen sind Homogenität und Kontinuität der entstehenden Schicht sowie gute elektrische Eigenschaften.

3.3.1.1 Nanopartikel-induzierte Metallisierung

Die Metallisierung der DNA-Strukturen mittels positiv-geladener Goldnanopartikel (*Genogold*) erfolgt über Bindung an das negativ-geladene Rückgrat der DNA. Dabei kommt es zu einer elektrostatischen Anlagerung der metallischen Nanopartikel an den DNA-Strang. Abbildung 3.25a zeigt einen Elektrodenspalt mit einem DNA-Bündel nach der Dielektrophorese. Abbildung 3.25b zeigt den gleichen Elektrodenspalt nach einer Inkubation mit *Genogold*. Die AFM-Aufnahmen zeigen, dass die geladenen Partikel sich bevorzugt an die DNA im

Elektroden spalt anlagern. Mit meist geringerer Dichte sind auch unspezifisch gebundene Partikel auf der Siliziumoberfläche und den Goldoberflächen der Elektroden zu finden. Dieses wird auch noch einmal an den Aufnahmen von neben den Elektroden immobilisierten DNA-Molekülen deutlich. Die Abbildungen 3.25c bis e zeigen die mit Genogold funktionalisierten DNA-Moleküle nach einmaliger Inkubation mit der Goldlösung (c), nach dreimaliger Inkubation (d) sowie nach einer weiteren Inkubation mit der konzentrierten Nanopartikel-lösung (e). Die Zunahme der Zahl gebundener Partikel wird deutlich, wobei die Zunahme nach der dritten Inkubation am stärksten ist. Eine weitere Inkubation mit der konzentrierten Goldlösung brachte keine deutlich zunehmende Anlagerung von Goldnanopartikeln.

Durch die Anbindung der Genogold-Partikel entstehen perlenschnurartige Strukturen entlang der DNA-Stränge, wobei die Partikel zum Teil recht eng aneinander liegen. Jedoch sind immer wieder größere Lücken in der Partikelkette zu finden, so dass keine durchgehende elektrisch leitende Struktur entsteht. Messungen an mit Nanopartikeln metallisierten DNA-Molekülen lassen auf eine Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit von den Abständen zwischen den einzelnen Partikel-Inseln schließen [Maubach et al., 2005].

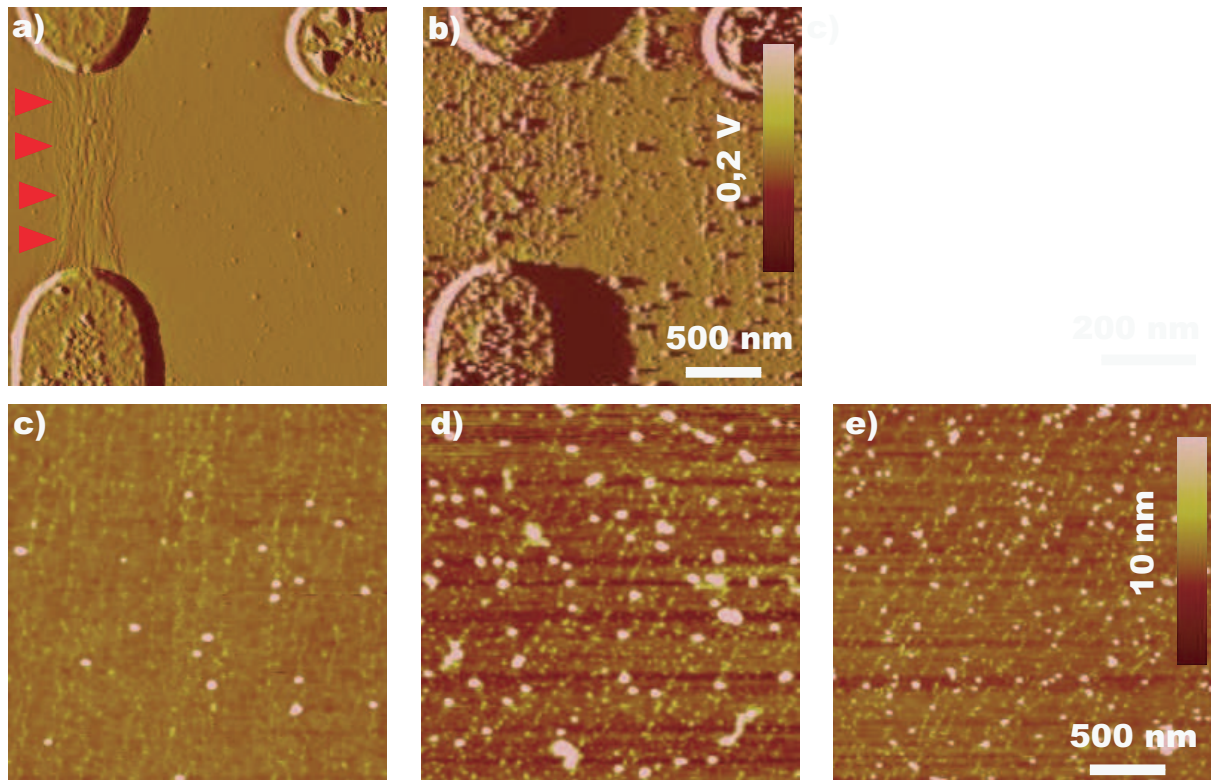


Abb. 3.25: Funktionalisierung von immobilisierter DNA mittels positiv geladenen Goldnanopartikeln (Genogold). In einem Elektrodenspalt immobilisierte DNA-Moleküle (a) wurden mit positiv geladenen Goldnanopartikeln inkubiert, wobei es zu einer Immobilisierung der Partikel bevorzugt entlang der DNA-Moleküle kommt (b). Zunehmende Metallisierung (c bis e) von DNA-Molekülen neben den Elektrodenstrukturen nach mehrmaliger Inkubation in Nanopartikellösungen.

Die Verkleinerung dieser Lücken durch weitere Goldnanopartikelbindung erwies sich als schwierig, da sich in den meisten Fällen nur die unspezifische Anheftung der Partikel auf den Substraten erhöhte. Eine anschließende Silberabscheidung ermöglicht ein schließen dieser Lücken, so dass leitfähige Strukturen generiert werden können [Braun et al., 1998].

3.3.1.2 Direkte Silberabscheidung unter UV-Licht

Eine andere Möglichkeit zur Metallisierung von DNA ist die Reduktion von Metallsalzen an den Basen der DNA. Der dafür nötige Elektronentransfer kann durch chemische Reduktionsmittel oder durch elektrische Felder realisiert werden. Neben dem etablierten Einsatz chemischer Reduktionsmittel, wie beispielsweise Hydrochinon [Hacker et al., 1985], ist auch eine UV-induzierte autokatalytische Reduktion von Metallsalzen an DNA möglich [Berti et al., 2005]. Im hier gezeigten Beispiel wurde Silbernitrat verwendet. Dabei werden ebenfalls über elektrostatische Wechselwirkungen DNA-Silberionen-Komplexe gebildet. Die Bestrahlung

mit UV Licht (254 nm) führt zu einem Anregungszustand der Basen der DNA, die dann als Reduktionszentrum agieren können. Die Silberabscheidung erfolgt dabei ebenfalls entlang der immobilisierten DNA-Stränge, wie in Abbildung 3.26 gezeigt. Mit dem AFM konnte eine Zunahme der Höhe von ca. 0,8 nm für immobilisierte DNA (Abb.3.26a) auf ca. 1,3 nm für metallisierte DNA gemessen werden (b). Im Gegensatz zu der Metallisierung mit Goldnanopartikeln ist die unspezifische Ablagerung von Metall auf dem Substrat („Hintergrundsignal“) hier geringer. Jedoch ist auch eine Zunahme der Rauigkeit des Glimmers zu beobachten, was auf minimale unspezifische Silberabscheidungen auf der Glimmeroberfläche zurückzuführen ist.

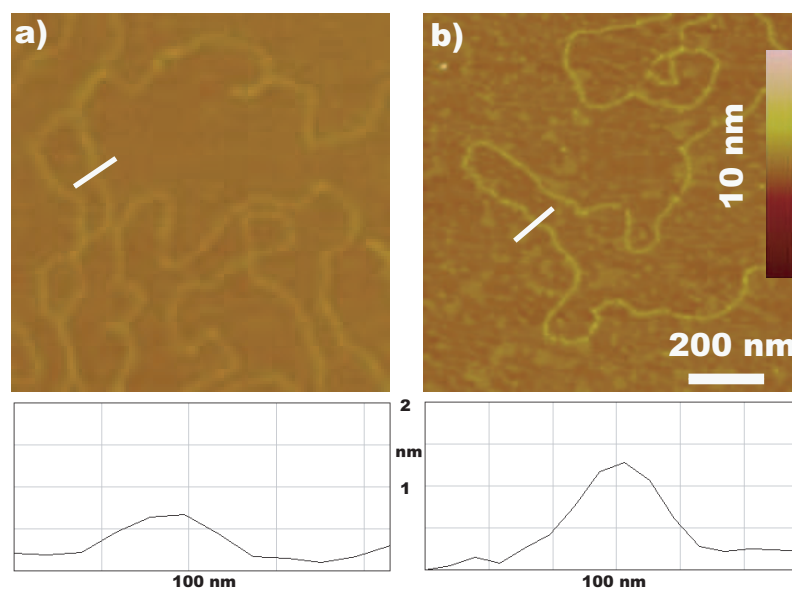


Abb. 3.26: Metallisierung mit Silbernitrat und UV-Bestrahlung. a) Vor und b) nach der Metallisierung. Die Höhe der DNA steigt von 0,8 nm auf über 1,3 nm.

3.3.2 Sequenzspezifische Markierung mit Streptavidin-Gold

Eine gezielte Funktionalisierung mit Goldnanopartikeln ist über das in der Molekularbiologie weit verbreitete Biotin-Streptavidin-System möglich. Die Bindung des Vitamins Biotin durch das Protein Streptavidin erfolgt dabei mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-15} M, einer der stärksten nicht-kovalenten Bindungen überhaupt. Dazu werden mit Biotin markierte Oligonukleotide verwendet. In dem in Abbildung 3.27 gezeigten Beispiel wurden die modifizierten Oligonukleotide zur Synthese von *G-Wires* aus unmodifizierten Oligonukleotiden zugegeben. Diese werden dabei statistisch in die DNA-Überstrukturen eingebaut. Die Immobilisierung

dieser modifizierten *G-Wires* ergab, wie in Abbildung 3.27a gezeigt, sehr dichte Netzwerke. Diese bilden unterschiedliche Bereiche hinsichtlich der Breite der DNA-Strukturen aus.

Abbildung 3.27b zeigt ein solches *G-Wire*-Netzwerk ohne Streptavidin-Gold-Zugabe und c) mit Streptavidin-Gold-Zugabe. Die 5 nm großen Goldpartikel sind sehr gut an und auf den DNA-Überstrukturen zu erkennen. Der Schnitt durch einen markierten DNA-Bereich ergibt eine Höhe von ca. 3 nm für die *G-Wire*-Struktur alleine und ca. 8 nm für den mit einem Nanopartikel funktionalisierten Bereich.

Es wird deutlich, dass die Zugabe von biotinylierten DNA-Oligonukleotiden die Synthese der *G-Wires* nicht negativ beeinflusst. Es konnten in allen Fällen sehr dichte Netzwerke von *G-Wires* gefunden werden. Dabei wurden sehr häufig Verzweigungen mit unterschiedlichen Breiten der DNA-Überstrukturen gefunden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die zufällig eingebauten biotinylierten DNA-Oligonukleotide zu einem Strangabbruch auf einer Seite des Quadruplex-Stranges führt. Dies könnte z.B. durch sterische oder elektrostatische Störung des Kationeneinbaus in das Zentrum der DNA-Überstruktur erfolgen. Es würde sich in diesem Fall nur eine Seite des *G-Wire*-Stranges verlängern, bis sich nach einiger Zeit wieder die viersträngige Form ausbildet.

Die anschließende Markierung mit Streptavidin-Gold kann an frei zugängliche Biotin-Moleküle erfolgen, wie sie z.B. an einem Strangende oder einer oben beschriebenen Strangunterbrechung vorliegen. Da die 5 nm großen Goldnanopartikel aber auch an oder auf dickeren Überstrukturbereichen gefunden wurden und ein kurzer Biotin-markierter Überhang mit dem AFM nicht aufgelöst werden kann, ist eine unspezifische Anheftung von ungebundenem Streptavidin-Gold nicht auszuschließen.

Der Einbau von Biotin-markierten Oligonukleotiden in die DNA-Überstrukturen ermöglicht die Anbindung von Streptavidin-modifizierten Nanopartikeln. Da der Einbau der markierten Oligonukleotide statistisch erfolgt und nicht regioselektiv, kann keine kontrolliert regelmäßige oder kontinuierliche Anordnung von Goldnanopartikeln realisiert werden.

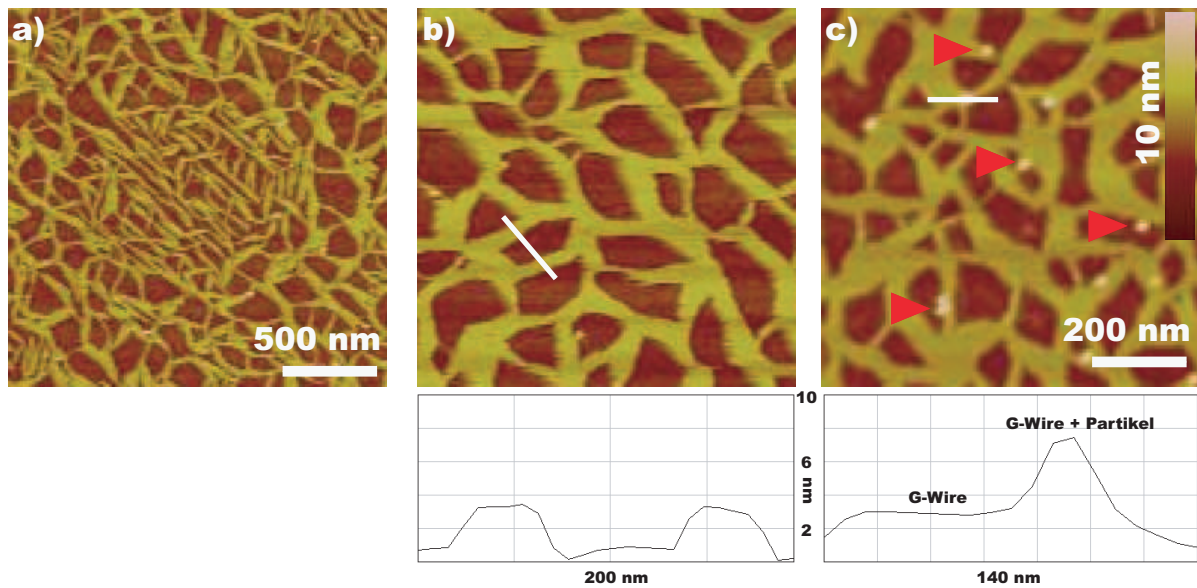


Abb. 3.27: DNA-Überstrukturen nach Synthese mit Biotin-markierten Oligonukleotiden. a) und b) *G-Wires* ohne Zugabe von Streptavidin-Gold, c) *G-Wires* nach Zugabe von Streptavidin-Gold.

3.3.3 Fluoreszenzmarkierung

Die Markierung der DNA-Moleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff ist ein weiteres Beispiel für die spezifische Funktionalisierung. Wie bereits im Verlauf der Arbeit gezeigt, stellt sie einen wichtigen Schritt zur Charakterisierung der DNA-Moleküle während und nach den Integrationsprozessen dar und ermöglicht so die Visualisierung einzelner Moleküle und ihrer Lage bzw. Position. Abbildung 3.28a zeigt eine Übersichtsaufnahme eines eingetrockneten Tropfens und b) den Bereich der gestreckten DNA-Moleküle am Rand des Tropfens. Es wird deutlich, dass zwischen den einzelnen Bereichen je nach DNA-Konzentration sehr gut unterschieden werden kann. Hohe DNA Konzentrationen und dicke DNA-Bündel ergeben sehr helle Stellen auf den Fluoreszenzaufnahmen. Die Verjüngung von dickeren, hellen DNA-Bündeln zu dünneren, blasseren Einzelsträngen wird ebenfalls deutlich. Desweiteren ist auch die Visualisierung von DNA-Einzelmolekülen möglich, wenn diese, wie in Abbildung 3.28c, gestreckt vorliegen.

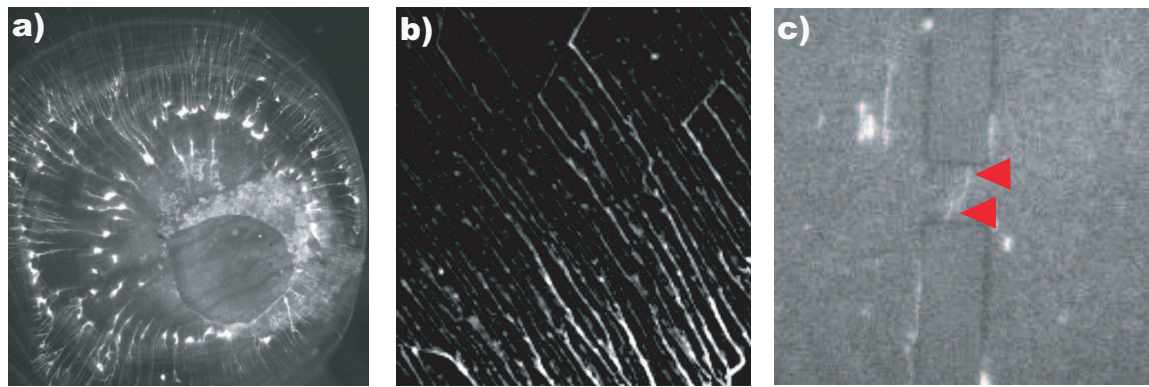


Abb. 3.28: Fluoreszenzaufnahmen eines eingetrockneten DNA Tropfens. a) Übersicht, b) eine Detailaufnahme aus der Randzone mit gestreckten DNA Strängen. c) DNA-Einzelmolekül im Elektrodenspalt.

Ein entscheidender Vorteil der Fluoreszenzmarkierung ist die Möglichkeit einer „*real-time*“ Visualisierung einzelner markierter DNA-Moleküle. Dies ermöglicht eine Kontrolle der Integrationsprozesse und damit eine ganz neue Qualität der Optimierung der Parameter, wie im Fall der Dielektrophorese. Abbildung 3.29 zeigt Einzelbilder aus einer Serie von Fluoreszenzaufnahmen, die während der Beobachtung der *Brownschen* Molekularbewegung von fluoreszenzmarkierten DNA-Molekülen gemacht wurden. Die Unterschiede in der Bewegungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle bei der Verwendung verschiedener Lösungsmittel a) und b) 1x TE Puffer, c) und d) Wasser sowie e) und f) Glycerin/Wasser-Gemisch) ist gut zu erkennen. Die zwei Bilder pro Lösungsmittel zeigen die Bewegung eines ausgewählten DNA-Moleküls (roter Kreis) innerhalb von 10 Sekunden. Es wird eine Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Lösungsmittels (oben nach unten) deutlich. Im TE-Puffer als physiologische Lösung war die Geschwindigkeit der DNA-Moleküle mit ca. 20 $\mu\text{m/s}$ am höchsten. In diesem Medium konnten die DNA-Moleküle ihre natürliche, geknäulte Konformation am besten ausbilden und sich so ohne größeren Widerstand in der Lösung bewegen. In Wasser konnte eine Geschwindigkeit von ca. 11 $\mu\text{m/s}$ ermittelt werden. In Glycerin/Wasser-Gemisch dagegen kam die Bewegung der DNA-Moleküle fast völlig zum Erliegen. Hier war die Viskosität der Lösung am höchsten und die DNA unterlag Konformationsänderungen, die eine Bewegung der Moleküle behinderten.

Die Fluoreszenzmikroskopie erwies sich als eine geeignete Methode zur Visualisierung von biologischen Prozessen auf Einzelmolekülebene, vor allem auch zur Charakterisierung von fluoreszenzmarkierter DNA. Sie liefert zeitnahe Aufnahmen, die wie gezeigt, zur „*real-*

time in-situ“ Visualisierung genutzt werden können. Dabei ist jedoch teilweise die Detektion von Einzelmolekülen durch geringe Signalintensitäten (gerade im gestreckten Zustand) erschwert. Die Hinzunahme weiterer Charakterisierungsmethoden wie z.B. das AFM ermöglichen die Identifizierung dieser Strukturen.

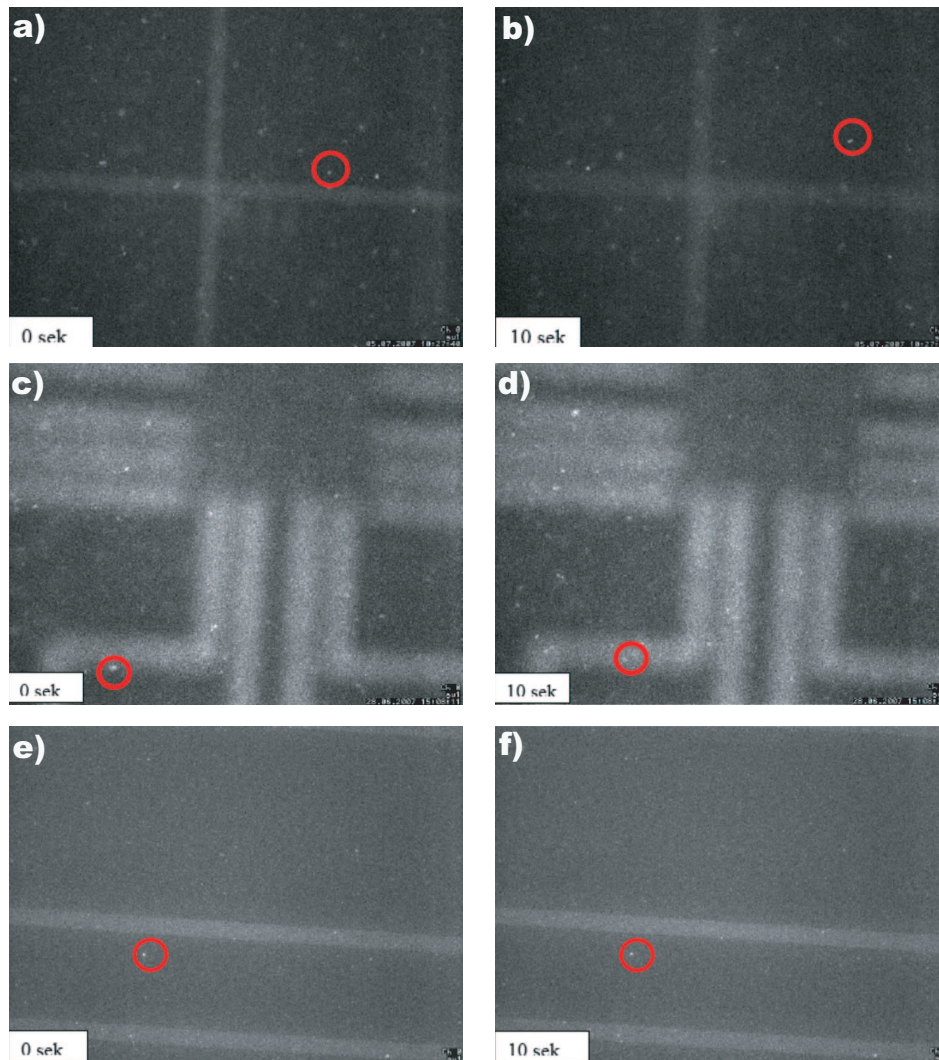


Abb. 3.29: Einzelbilder aus einer „*real time in-situ*“ Fluoreszenz-Serie, nach jeweils 0 und 10 Sekunden. Die Bewegung jeweils eines (rot markierten) DNA Moleküls in TE Puffer (a und b) in Wasser (c und d) sowie in Glycerin/Wasser (d und e) ist gezeigt.

3.4 Korrelative Charakterisierung integrierter Nanostrukturen

Eine effiziente Parameteroptimierung kann nur durch die Kombination von Charakterisierungsmethoden erfolgen. Das „*real-time in-situ*“ Fluoreszenz-*Imaging* ermöglicht eine rasche qualitative Kontrolle über den Erfolg der DNA-Integration. Eine detaillierte Aussage über die Anzahl der DNA-Moleküle kann mit dieser Methode nur unzureichend getroffen werden. Hierfür erwies sich eine hochauflösende Charakterisierungsmethode wie die Rasterkraftmikroskopie als geeignet. So war es möglich, die Anzahl und die genaue Position der integrierten DNA-Moleküle zu bestimmen.

Die Dunkelfeldmikroskopie erlaubte als einzige optische Mikroskopiemethode eine schnelle und extrem sensitive Erfassung (Einzelpartikelsensitivität) von Metallpartikeln, die beispielsweise zur Funktionalisierung der integrierten DNA verwendet wurden. Auch hier konnte mit der Rasterkraftmikroskopie eine detaillierte Aussage über die Anzahl und Bedeckungsdichte sowie über die genaue Lage der Partikel getroffen werden. Die Nanopartikel erlaubten als metallisches und damit leitfähiges Material desweiteren eine Charakterisierung mit dem Rasterelektronenmikroskop, welches ebenfalls eine Einzelpartikelauflösung realisiert.

3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte eine schnelle Charakterisierung der integrierten Nanostrukturen. Mit dieser Methode konnte prinzipiell eine Aussage über das Vorhandensein von DNA-Molekülen erfolgen. Die Auflösung von Einzelmolekülen ist jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich, wie z.B. langen Belichtungszeiten und bei fixierten, ausgestreckten Molekülen. Abbildung 3.30 zeigt die Grauwertanalyse von vier Elektrodenspalten, in denen mittels Dielektrophorese bei unterschiedlichen Spannungen DNA integriert wurde. Dabei repräsentiert die y-Achse die vertikale, durchschnittliche Pixelintensität im gewählten Bereich (rotes Viereck). Es zeigte sich, dass auch in Fluoreszenzaufnahmen mit unzureichendem Kontrast für visuelle Auswertung ein schwaches Signal erhalten werden konnte. Dieses Signal stieg mit zunehmender, angelegter Spannung und der damit verbundenen vermehrten Ansammlung von DNA zwischen den Elektroden. Dabei ist der Anstieg des Grauwertes von den Elektrodenspalten, an die 1 V bzw. 2 V angelegt wurde, sehr gering.

3 V bewirkten nahezu eine Verdopplung des Grauwertsignals und 4 V etwas mehr als eine Verdopplung. Diese Bildauswertung erlaubte jedoch nur eine Aussage über Größenordnung von DNA-Molekülen in den Elektrodenspalten.

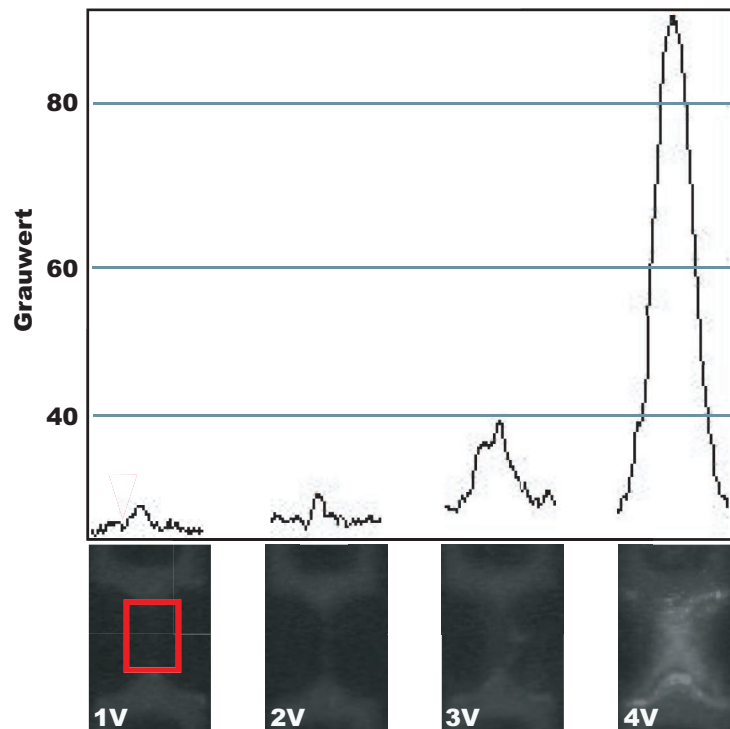


Abb. 3.30: Grauwertanalyse von Fluoreszenzaufnahmen nach Dielektrophorese von DNA-Molekülen mit steigender Spannung. Dabei wurde jeweils ein Bereich (rot markiert) integriert.

Die Rasterkraftmikroskopie ermöglichte einen detaillierteren Blick zwischen die Elektroden, so dass eine genauere Aussage über die Anzahl und die Struktur der DNA-Moleküle getroffen werden konnte. In Abbildung 3.31 ist eine AFM-Aufnahme eines Elektrodenspaltes mit DNA-Einzelmolekülen und DNA-Bündeln gezeigt. Besonders deutlich sind die „dickeren“ DNA-Bündel zu erkennen. Schnitte durch die unterschiedlichen DNA-Strukturen ergaben verschiedene Höhenprofile. DNA-Einzelmoleküle zeigten eine Höhe von ca. 1 nm in Übereinstimmung mit Literaturwerten. Die Höhe der DNA-Bündel reichte von ca. 2,5 nm bis ca. 4,5 nm. Da keine Substrukturen aufgelöst werden, waren keine Informationen über die Anordnung der einzelnen Stränge ableitbar. Die Dimensionen der Bündel deuten im Vergleich mit Einzelmolekülen auf minimal zwei DNA-Moleküle für dünnere Bündel bzw. vier für dickere Bündel hin.

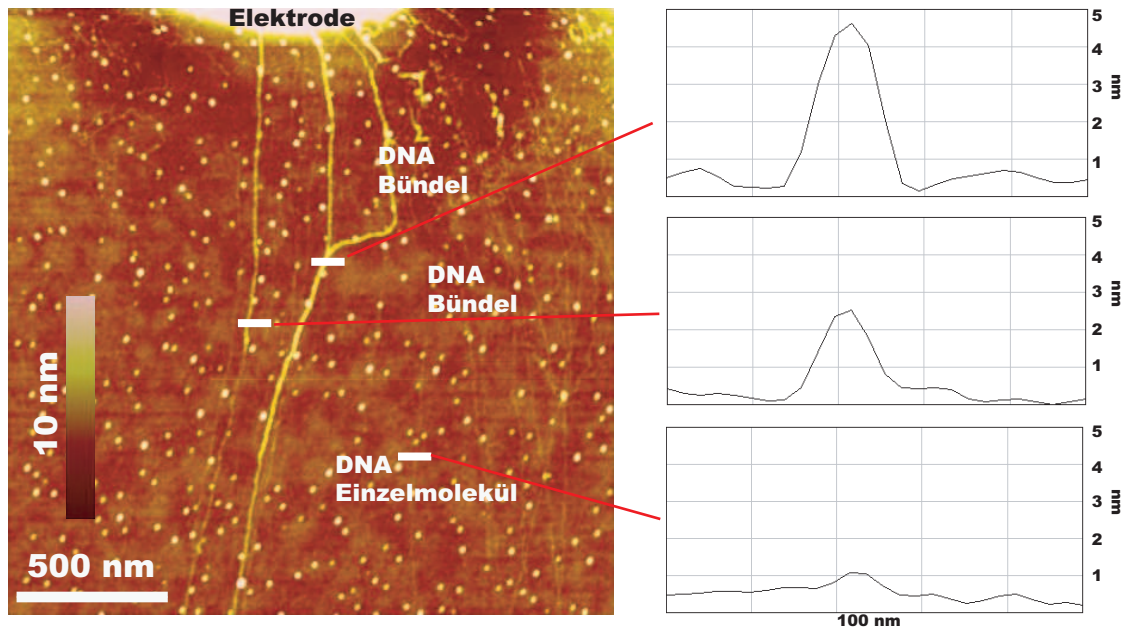


Abb. 3.31: AFM-Aufnahme von DNA-Molekülen im Elektrodenspalt mit Höhenmessung der unterschiedlichen DNA-Strukturen.

Die Funktionalisierung der integrierten DNA-Moleküle mit Nanopartikeln führte zu einer Verbesserung des Kontrastes und damit zu besserer Detektion mit dem AFM. In Abbildung 3.32 sind DNA-Strukturen zwischen Elektroden vor einer Funktionalisierung mit positiv geladenen Goldnanopartikeln a) und nach erfolgter Metallisierung b) dargestellt. Das DNA-Bündel rechts neben der großen Verunreinigung war nach der Funktionalisierung mit den Goldnanopartikeln deutlich besser detektierbar. Höhenmessungen zeigten auch hier eine Höhe von ca. 1 nm für ein DNA-Einzelmolekül. Messungen am DNA-Bündel ergaben eine Höhe von ca. 4 nm für den unmodifizierten Bereich und ca. 20 nm für den mit Goldpartikel modifizierten Abschnitt. Letzterer lag damit in dem vom Hersteller angegebenen Größenbereich der Nanopartikel.

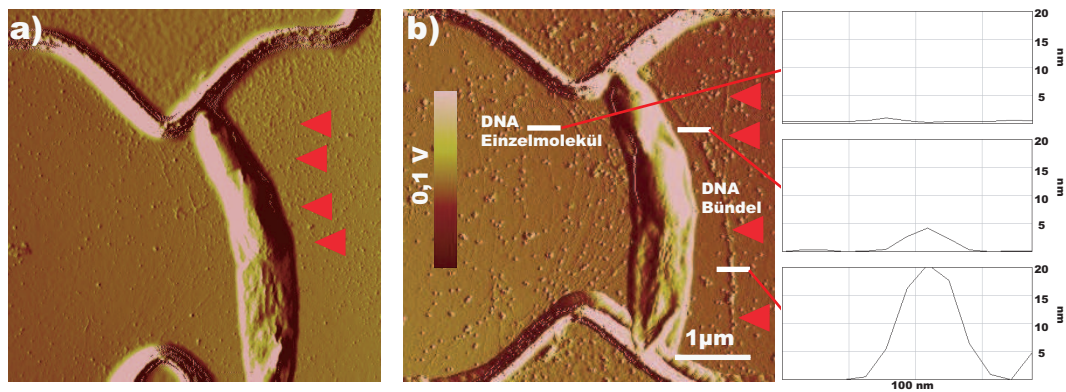


Abb. 3.32: AFM-Aufnahmen von im Elektrodenspalt integrierten DNA-Strukturen (markiert mit roten Pfeilen). a) vor und b) nach Funktionalisierung mit Goldnanopartikeln

3.4.2 Rasterkraftmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie

Die Funktionalisierung mit metallischen Nanopartikeln ermöglichte auch eine Charakterisierung der integrierten DNA-Strukturen mit dem Rasterelektronenmikroskop. Abbildung 3.33 zeigt einen Elektrodenspalt mit integrierter DNA vor (a) und nach (b) Funktionalisierung mit positiv geladenen Goldnanopartikeln. Die DNA war dabei nicht homogen mit den Nanopartikeln bedeckt. Der grüne Pfeil weist auf eine Unterbrechung in der Partikelkette, welche im vergrößerten Bildausschnitt gut zu erkennen ist (Abb. 3.33c). Auch in der REM-Aufnahme (Abb. 3.33d) ist die Unterbrechung in der Metallstruktur erkennbar. Durch das Fehlen von Metall an dieser Stelle kommt es zu einer verminderten Ausbeute an Sekundärelektronen und damit zu einem verminderten Kontrast.

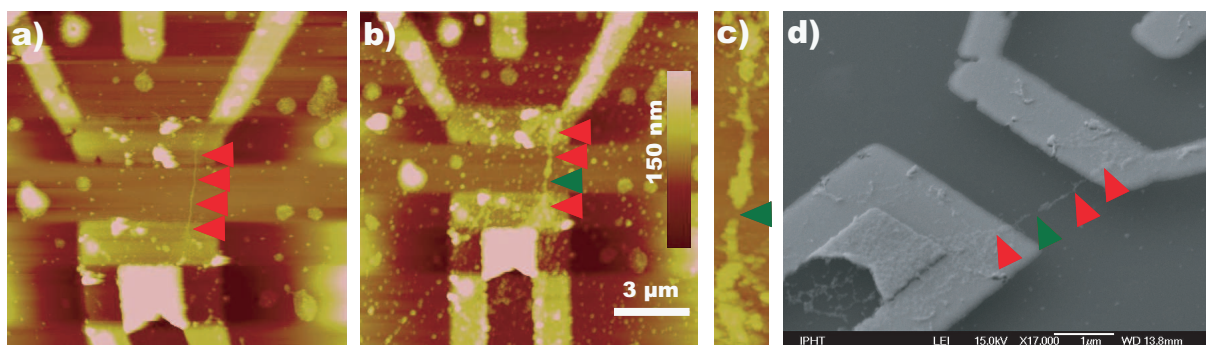


Abb. 3.33: AFM und REM-Aufnahmen von integrierter DNA im Elektrodenspalt. a) Die integrierte DNA überspannt die beiden Elektroden. b) und c) DNA nach Metallisierung mit Goldnanopartikeln. d) REM Aufnahme der metallisierten DNA-Struktur.

3.4.3 Rasterkraftmikroskopie und Dunkelfeldmikroskopie

Die Dunkelfeldmikroskopie erlaubt die optische Detektion von metallischen nanometer-skalierten Objekten. Dabei erzeugt das an den Objekten gestreute Licht einen Streuegel, der vor dunklem Hintergrund sichtbar wird. So konnte das Verhalten von 60 nm großen Goldnanopartikeln während der Dielektrophorese *in-situ* beobachtet werden. Abbildung 3.34a zeigt eine Aufnahme aus einer solchen Bildserie. Die Ansammlung von Nanopartikeln zwischen den Elektroden ist erkennbar. Das AFM zeigt (Abb. 3.34b) eine Überbrückung des Spaltes mit Goldnanopartikeln. Die Partikel bilden einen breiten Rand um die Elektroden. Anhand der durchschnittlichen Höhenverteilung von ca. 60 bis 80 nm wird deutlich, dass es sich dabei um ungefähr eine Monolage Goldnanopartikel handelt. Im schmaler werdenden Bereich steigt die Höhe der Struktur auf ca. 120 nm an. Dies lässt auf Mehrfachlagen von Nanopartikeln schließen. An der schmalsten Stelle konnte wieder eine Höhe von ca. 80 nm gemessen werden.

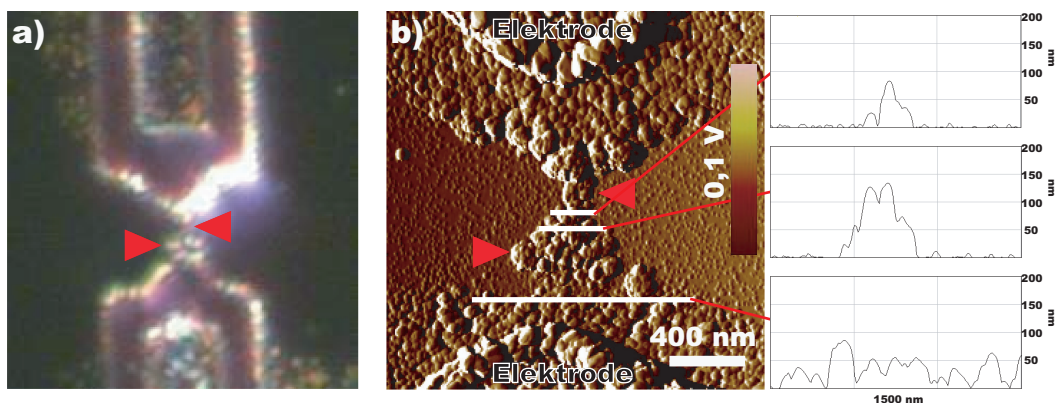


Abb. 3.34: Dunkelfeld-Aufnahme eines mit 60 nm Goldnanopartikel überbrückten Elektrodenspaltes (a). Der selbe Spalt in einer AFM-Aufnahme mit drei Höhenprofilen an den markierten Stellen (b).

Eine optimale Charakterisierung der integrierten Nanostrukturen konnte nur durch die Kombination verschiedener Methoden erfolgen. Dabei war die Fluoreszenzmikroskopie als relativ schnelle bildgebende Methode mit der Möglichkeit des „*real-time in-situ Imaging*“ fluoreszenz-markierter DNA-Moleküle für die Optimierung der verschiedenen Parameter der Integrationsprozesse sehr gut geeignet. Sie ermöglichte die qualitative DNA-Detektion zur Bestimmung von Schwellenwerten und Eckparametern für eine erfolgreiche Integration von DNA-Molekülen in Mikrostrukturen. Die Verfeinerung dieser Parameter hinsichtlich der gewünschten Integration von Einzelmolekülen erforderte die Zuhilfenahme weiterer hochauf-

lösender, mikroskopischer Methoden. So wurde die Rasterkraftmikroskopie angewendet, um die in den Elektrodenspalten immobilisierten DNA-Strukturen in Einzelmoleküle und DNA-Bündel zu unterscheiden. Dadurch konnten z.B. die Parameter der Dielektrophorese weiter angepasst werden und so die Anzahl der integrierten DNA-Moleküle auf den Einzelmolekül-Level eingestellt werden. Nachteil dieser Charakterisierungsmethode ist die relativ lange Aufnahmedauer eines AFM-Bildes und das Fehlen der Möglichkeit die Moleküle in Lösung *in-situ* zu untersuchen.

Die integrierten Nanostrukturen konnten auch nach erfolgreicher Funktionalisierung, insbesondere nach der Metallisierung mit Goldnanopartikeln, mit dem AFM detektiert und anschließend ausgewertet werden. So konnten anhand der Aufnahmen Höhenprofile erstellt werden. Diese ermöglichten eine Unterscheidung von funktionalisierten und nicht funktionalisierten Abschnitten auf den DNA-Molekülen. Die metallisierten Strukturen konnten mit dem Rasterelektronenmikroskop abgebildet werden. Dies erlaubte eine Aussage darüber, dass es sich bei der Funktionalisierung um leitfähiges Material und damit um Metallpartikel handelt. Die positiv geladenen Partikel wurden elektrostatisch an das negativ geladene Rückgrat der DNA gebunden und ermöglichten so einen Kontrast im Rasterelektronenmikroskop.

Die Bewegung und Lage von Metallnanopartikeln wurde zusätzlich mit dem Dunkelfeldmikroskop untersucht. Damit konnte wieder eine relativ schnelle Charakterisierung dieser Strukturen erfolgen. Mit dem AFM war es auch im Falle der Nanopartikel möglich, detaillierte Aussagen (Einzelpartikelauflösung) über die genaue Lage und Anzahl zu treffen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Arbeit wurden Methoden und molekulare Techniken vorgestellt und optimiert, die eine gezielte Integration von DNA-Molekülen ermöglichen und diese als Gerüst-Molekül für eine anschließende metallische Funktionalisierung zugänglich machen. Die DNA-basierte Nano-Konstruktion („*bottom-up*“) erfolgte dabei mittels „*self-assembly*“. Dieses erlaubte eine gesteuerte („*guided*“) Integration der DNA in vorhandene „*top-down*“ Strukturen sowie deren zusätzliche Funktionalisierung (biomolekular).

Die Elektrodenstrukturen der mikrostrukturierten Substrate konnten durch geeignete Methoden als Leitlinien („*guide-lines*“) genutzt werden, um DNA-Moleküle gerichtet zwischen den Elektroden zu positionieren. Dabei kamen die Methode des molekularen „*Combings*“ (Tropfenmethode) sowie die Dielektrophorese zum Einsatz. Die Anwendung der Tropfenmethode konnte von einfachen, unstrukturierten Glas- und Siliziumsubstraten auf Mikrostrukturen übertragen werden. Sie konnte als kostengünstige Methode für die parallele Integration von DNA-Molekülen etabliert werden. Eine DNA-Konzentration von 6 ng/mL und eine Tropfengröße von 0,5 μL lieferte die besten Ergebnisse mit vereinzelt und gestreckten DNA-Molekülen.

Die Dielektrophorese konnte ebenfalls als Integrationsmethode für DNA in die verwendeten Elektrodenstrukturen optimiert werden. Ein Fortschritt konnte hier durch die korrelative Charakterisierung des Dielektrophoreseprozesses erzielt werden. Durch Fluoreszenz „*in-situ real-time Imaging*“ war es möglich, den Einfluss der verschiedenen Parameter auf das Verhalten der DNA-Moleküle direkt während des Prozesses zu beobachten. So konnte der Parameterkomplex der Dielektrophorese systematisch und semi-empirisch optimiert werden. Der Einsatz der Rasterkraftmikroskopie ermöglichte die Visualisierung der DNA-Strukturen bis auf

die Einzelmolekül-Ebene. Durch diese präzise Charakterisierung der integrierten Strukturen konnte die weitere Optimierung und somit die Etablierung des Dielektrophorese-Prozesses als geeignete Methode zur Integration von DNA-Einzelmolekülen zwischen Elektroden erfolgen. Ein Parameterkomplex mit einer Spannung von 0,5 V, einer Frequenz von 100 MHz, einer DNA-Konzentration von 0,02 ng/ μ L sowie einer Reaktionszeit von 20 Minuten konnte zur Integration von DNA-Einzelmolekülen ermittelt werden.

Der elektrische Kontakt zur „Makrowelt“ wurde durch metallische Funktionalisierung der integrierten DNA-Strukturen realisiert. Dazu kamen metallische Nanopartikel sowie direkte, autokatalytische Metallisierungsmethoden zum Einsatz. Die Funktionalisierung konnte ebenfalls durch verschiedene Mikroskopieverfahren charakterisiert werden. Die Dunkelfeldmikroskopie stellte dabei eine Methode zur Visualisierung nanometer-großer, metallischer Partikel direkt *in-situ* dar. Mittels Rasterelektronenmikroskopie konnten metallisierte DNA-Strukturen zusätzlich zur Rasterkraftmikroskopie hochauflösend charakterisiert werden. Das Potenzial solcher metallischen DNA-Strukturen für nanoelektronische Bauteile konnte aufgezeigt werden.

Als weiterer nanobiotechnologischer Baustein konnten DNA-Superstrukturen (*G-Wires*) etabliert werden. Der Einfluss der Lagerung sowie Immobilisierungsbedingungen auf die Struktur der *G-Wires* wurde untersucht. Dabei konnten diese DNA-Superstrukturen immobilisiert und mit dem Rasterkraftmikroskop charakterisiert werden. Die längsten Strukturen konnten mit ca. 700 nm in Netzwerken und ca. 350 nm für vereinzelt *G-Wires* ermittelt werden. Eine Lagerung über mehrere Monate war ohne weiteres möglich. Erste Integrationsversuche in Mikrostrukturen wurden gezeigt.

Die vorgestellte DNA-basierte Nano-Konstruktion ermöglicht mit einfachen Komponenten und Techniken eine definierte Integration und den Aufbau von Molekülkonstrukten aus DNA und DNA-Nanopartikel-Komplexen in mikrostrukturierte Chiplayouts. Die Anwendung, der auf Selbstorganisation basierenden „*bottom-up*“-Techniken (molekulare Konstruktion) auf traditionelle „*top-down*“-Strukturen, ermöglicht neuartige technologische Ansätze.

4.2 Ausblick

Das große Potential DNA-basierter Konstruktionen auf die Entwicklung neuer bioanalytischer oder nanoelektronischer Ansätze ist in einer Vielzahl und momentan ständig steigenden Zahl an Veröffentlichungen ersichtlich. Neben der Nanoelektronik [Maubach et al., 2005, Csaki et al., 2002, Ford et al., 2001, Storm et al., 2001, Richter et al., 2000, Richter et al., 2001, Richter et al., 2002, Keren et al., 2002] sind auch Anwendungen in der Nanobiophotonik für DNA-basierte Konstrukte denkbar. So könnten gezielt integrierte Einzelpartikel einer spektralen Auswertung zugänglich gemacht werden. Die Konstruktion von DNA-funktionalisierten Metall-Nanopartikeln zu Hybrid-Nanostrukturen konnte bereits erfolgreich gezeigt werden [Alivisatos et al., 1996, Mucic et al., 1998, Loweth et al., 1999, Steinbrück et al., 2006, Steinbrück et al., 2008]. Dabei werden sehr häufig einzelne, gut etablierte Prozesse und Techniken beschrieben, die sich mit der Immobilisierung und Integration, Manipulation und Funktionalisierung von DNA beschäftigen. Eine Kombination all dieser Methoden zu einem reproduzierbaren Standardprozess ist noch weitgehend ungelöst. Das betrifft vor allem die Parallelisierung der Integration von DNA, was für eine kommerzielle oder zukunftssträchtige Anwendung unerlässlich ist. Hier bietet der Einsatz von molekularen „*Combing*“-Methoden, wie z.B. die Tropfenmethode, erste Ansätze. Dabei sind jedoch noch nicht alle Prozesse, wie z.B. die eines eintrocknenden Tropfens, komplett verstanden.

Für die Integration von Einzelmolekülen stellt die Dielektrophorese eine geeignete Methode dar. Diese erfordert jedoch entsprechende Elektrodenstrukturen, die eine gleichzeitige Kontaktierung mehrerer Elektrodenspalte ermöglichen. Eine Möglichkeit wäre die Integration des mikrostrukturierten Chip in eine verschließbare Inkubationskammer, die gleichzeitig die elektrische Kontaktierung von außen gewährleistet. Hier könnte auf das *Know-how* elektrisch auslesbarer DNA-Mikroarrays zurück gegriffen werden [Urban et al., 2003, Möller et al., 2001, Möller et al., 2008]. Die Geometrie der Elektroden ist ein zusätzlicher wichtiger Faktor, der weiterer Optimierung bedarf. Fortschritte können hier, wie es bereits demonstriert werden konnte, aus dem Vergleich von Simulation und korrelativer Charakterisierung erzielt werden.

Auch die sich an die Integration anschließende Funktionalisierung sowie das Handling der Proben zwischen den einzelnen Schritten bedürften weiterer Entwicklung. Sehr oft können etablierte Einzelschritte nicht mit der gleichen Präzision und Effizienz in einen Gesamt-

prozess überführt werden. Erste Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Dielektrophorese von DNA und Metall-Nanopartikel sowie die Metallabscheidung unter dielektrophoretischen Bedingungen neue Ansätze für die gezielte Funktionalisierung integrierter DNA-basierter Strukturen darstellen können.

”There is plenty of room at the bottom” - und es gibt noch mehr Arbeit dort.

Literaturverzeichnis

- [Alivisatos et al., 1996] Alivisatos, A. P., Johnsson, K. P., Peng, X., Wilson, T. E., Loweth, C. J., Bruchez, M. P., J., and Schultz, P. G. (1996). Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 382(6592):609–611.
- [Allemand et al., 1997] Allemand, J., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A., and Croquette, V. (1997). pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophysical Journal*, 73(4):2064–2070.
- [Andres et al., 1996] Andres, R. P., Datta, S., Dorogi, M., Gomez, J., Henderson, J. I., Janes, D. B., Kolagunta, V. R., Kubiak, C. P., Mahoney, W., Osifchin, R. F., Reifenberger, R., Samanta, M. P., and Tian, W. (1996). Room temperature coulomb blockade and coulomb staircase from self-assembled nanostructures. *Journal of Vacuum Science and Technology A*, 14(3):1178–1183.
- [Asbury and Engh, 1998] Asbury, C. L. and Engh, G. v. d. (1998). Trapping of DNA in nonuniform oscillating electric fields. *Biophysical Journal*, 74(2):1024–1030.
- [Bachmann, 1998] Bachmann, G. (1998). *Innovationsschub aus dem Nanokosmos*. Zukünftige Technologien (28). VDI-Technologiezentrum, Düsseldorf.
- [Bardea et al., 1997] Bardea, A., Katz, E., Buckmann, A. F., and Willner, I. (1997). NAD-dependent enzyme electrodes: Electrical contact of cofactor-dependent enzymes and electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, 119(39):9114–9119.
- [Bardea et al., 2000] Bardea, A., Katz, E., and Willner, I. (2000). Probing antigen-antibody interactions on electrode supports by the biocatalyzed precipitation of an insoluble product. *Electroanalysis*, 12(14):1097–1106.
- [Beebe, 1995] Beebe, T. P. (1995). Thiol labeling of DNA for attachment to gold surfaces. *Pat. Nr. 5, 472, 881*.

- [Bensimon et al., 1994] Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., and Bensimon, D. (1994). Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 265(5181):2096–8.
- [Bensimon et al., 1995] Bensimon, D., Simon, A. J., Croquette, V., and Bensimon, A. (1995). Stretching DNA with a receding meniscus: Experiments and models. *Physical Review Letters*, 74(23):4754–4757.
- [Berti et al., 2005] Berti, L., Alessandrini, A., and Facci, P. (2005). DNA-templated photoinduced silver deposition. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32):11216–11217.
- [Bier and Kleinjung, 2001] Bier, F. F. and Kleinjung, F. (2001). Feature-size limitations of microarray technology—a critical review. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371(2):151–156.
- [Binnig et al., 1986] Binnig, G., Quate, C., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56:930–933.
- [Birrell et al., 1986] Birrell, G., Habliston, D., Hedberg, K., and Griffith, O. (1986). Silver-enhanced colloidal gold as a cell surface marker for photoelectron microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 34(3):339–345.
- [Bockrath et al., 2002] Bockrath, M., Markovic, N., Shepard, A., Tinkham, M., Gurevich, L., Kouwenhoven, L. P., Wu, M. W., and Sohn, L. L. (2002). Scanned conductance microscopy of carbon nanotubes and DNA. *Nano Letters*, 2(3):187–190.
- [Bowden, 1994] Bowden, M. J. (1994). Introduction to microlithography. ACS, Washington.
- [Braun et al., 1998] Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U., and Ben-Yoseph, G. (1998). DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature*, 391:775–778.
- [Cai et al., 2000] Cai, L., Tabata, H., and Kawai, T. (2000). Self-assembled DNA networks and their electrical conductivity. *Applied Physics Letters*, 77(19):3105–3106.
- [Cherny et al., 1998] Cherny, D. I., Fourcade, A., Svinarchuk, F., Nielsen, P. E., Malvy, C., and Delain, E. (1998). Analysis of various sequence-specific triplexes by electron and atomic force microscopies. *Biophysical Journal*, 74(2):1015–1023.

- [Coffer et al., 1996] Coffe, J. L., Bigham, S. R., Li, X., Pinizzotto, R. F., Rho, Y. G., Pirtle, R. M., and Pirtle, I. L. (1996). Dictation of the shape of mesoscale semiconductor nanoparticle assemblies by plasmid DNA. *Applied Physics Letters*, 96(25):3851–3853.
- [Coffer et al., 1992] Coffe, J. L., Bigham, S. R., Pinizzotto, R. F., and Yang, H. (1992). Characterization of quantum-confined CdS nanocrystallites stabilized by deoxyribonucleic acid (DNA). *Nanotechnology*, 3(2):69.
- [Csaki et al., 2003] Csaki, A., Kaplanek, P., Möller, R., and Fritzsche, W. (2003). The optical detection of individual DNA-conjugated gold nanoparticle labels after metal enhancement. *Nanotechnology*, 14:1262–1268.
- [Csaki et al., 2002] Csaki, A., Maubach, G., Born, D., Reichert, J., and Fritzsche, W. (2002). DNA-based molecular nanotechnology. *Single Molecules*, 3(5-6):275–280.
- [de Pablo et al., 2000] de Pablo, P. J., Moreno-Herrero, F., Colchero, J. ., Gómez Herrero, J., Herrero, P., Baró, A. M., Ordejón, P., Soler, J. M., and Artacho, E. (2000). Absence of DC-conductivity in lambda-DNA. *Physical Review Letters*, 85(23):4992–4996.
- [Deegan, 2000] Deegan, R. D. (2000). Pattern formation in drying drops. *Physical Review E*, 61(1):475–485.
- [Deegan et al., 1997] Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupont, T. F., Huber, G., Nagel, S. R., and Witten, T. A. (1997). Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 389:827–829.
- [Demers et al., 2000] Demers, L. M., Mirkin, C. A., Mucic, R. C., Reynolds, R. A., r, Letsinger, R. L., Elghanian, R., and Viswanadham, G. (2000). A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 72(22):5535–5541.
- [Dewarrat et al., 2002] Dewarrat, F., Calame, M., and Schönenberger, C. (2002). Orientation and positioning of DNA molecules with an electric field technique. *Single Molecules*, 3:189–193.
- [Drexler, 1986] Drexler, E. (1986). *Engines of Creation*. Anchor Books, New York.
- [Duguid et al., 1993] Duguid, J., Bloomfield, V. A., Benevides, J., and Thomas, G. J., J. (1993). Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. interactions and conformational effects

- of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophysical Journal*, 65(5):1916–28.
- [Eichen et al., 1998] Eichen, Y., Braun, E., Sivan, U., and Ben-Yoseph, G. (1998). Self-assembly of nanoelectronic components and circuits using biological templates. *Acta Polymerica*, 49:663–670.
- [Eigler and Schweizer, 1990] Eigler, D. M. and Schweizer, E. K. (1990). Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature*, 344:524–526.
- [Elghanian et al., 1997] Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L., and Mirkin, C. A. (1997). Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277(5329):1078–1081.
- [Fang and Hoh, 1998] Fang, Y. and Hoh, J. H. (1998). Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations. *Nucleic Acids Research*, 26(2):588–593.
- [Faulk and Taylor, 1971] Faulk, W. P. and Taylor, G. M. (1971). An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, 8:1081–1083.
- [Feynman, 1961] Feynman, R. (1961). There's plenty of room at the bottom. In *Miniaturization*, pages 282–296. Reinhold Publishing Corporation, New York.
- [Fink and Schöneberger, 1999] Fink, H.-W. and Schöneberger, C. (1999). Electrical conduction through DNA molecules. *Nature*, 398:407–410.
- [Ford et al., 2001] Ford, W. E., Harnack, O., Yasuda, A., and Wessels, J. M. (2001). Platinated DNA as precursors to templated chains of metal nanoparticles. *Advanced Materials*, 13(23):1793–1798.
- [Fritzsche et al., 1999] Fritzsche, W., Csaki, A., Möller, R., Bickel, R., Senz, S., Langer, J., and Köhler, J. M. (1999). Electrical measurements on single molecules. 1:81–91.
- [Fuller, 2000] Fuller, G. E. (2000). Handbook of semiconductor manufacturing technology. New York.
- [Grinstaff, 1999] Grinstaff, M. W. (1999). How do charges travel through DNA? - An update on a current debate. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 38(24):3629–3635.

- [Gueroui et al., 2002] Gueroui, Z., Place, C., Freyssingeas, E., and Berge, B. (2002). Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9):6005–6010.
- [Hacker et al., 1991] Hacker, G. W., Danscher, G., Graf, A. H., Bernatzky, G., Schiechl, A., and Grimelius, L. (1991). The use of silver acetate autometallography in the detection of catalytic tissue metals and colloidal gold particles bound to macromolecules. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 23(14):286–290.
- [Hacker et al., 1985] Hacker, G. W., Springall, D. R., Van Noorden, S., Bishop, A. E., Grimelius, L., and Polak, J. M. (1985). The immunogold-silver staining method. A powerful tool in histopathology. *Virchows Archiv A: Pathological Anatomy and Histology*, 406(4):449–461.
- [Hansma et al., 1991] Hansma, H., Weisenhorn, A., Gould, S., Sinsheimer, R., Gaub, H., Stucky, G., Zaremba, C., and Hansma, P. (1991). Progress in sequencing deoxyribonucleic acid with an atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science and Technology A*, 9(2):1282–1284.
- [Heller, 1992] Heller, A. (1992). Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *Journal of Physical Chemistry*, 96:3579–3587.
- [Holgate et al., 1983] Holgate, C., Jackson, P., Cowen, P., and Bird, C. (1983). Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 31(7):938–944.
- [Holste, 2004] Holste, C. (2004). *Molekulare Konstruktionen mit selbstassemblierenden DNA-Überstrukturen (G-wire) und Gold - Nanopartikeln*. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena.
- [Hoyer et al., 1996] Hoyer, C., Monajembashi, S., and Greulich, K. O. (1996). Laser manipulation and UV induced single molecule reactions of individual DNA molecules. *Journal of Biotechnology*, 52:65–73.
- [Hölzel and Bier, 2003] Hölzel, R. and Bier, F. (2003). Dielectrophoretic manipulation of DNA. *IEE Proceedings Nanobiotechnology*, 150(2):47–53.
- [Jing et al., 1998] Jing, J., Reed, J., Huang, J., Hu, X., Clarke, V., Edington, J., Housman, D., Anantharaman, T. S., Huff, E. J., Mishra, B., Porter, B., Shenker, A., Wolfson, E., Hiort,

- C., Kantor, R., Aston, C., and Schwartz, D. C. (1998). Automated high resolution optical mapping using arrayed, fluid-fixed DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14):8046–51.
- [Kawabata and Washizu, 2001] Kawabata, T. and Washizu, M. (2001). Dielectrophoretic detection of molecular bindings. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 37(6):1625–1633.
- [Kelley et al., 1997] Kelley, S. O., Barton, J. K., Jackson, N. M., and Hill, M. G. (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode. *Bioconjugate Chemistry*, 8(1):31–37.
- [Kelley et al., 1998] Kelley, S. O., Barton, J. K., Jackson, N. M., McPherson, L. D., Potter, A. B., Spain, E. M., Allen, M. J., and Hill, M. G. (1998). Orienting DNA helices on gold using applied electric fields. *Langmuir*, 14(24):6781–6784.
- [Keren et al., 2003] Keren, K., Berman, R. S., Buchstab, E., Sivan, U., and Braun, E. (2003). DNA-templated carbon nanotube field-effect transistor. *Science*, 302(5649):1380–1382.
- [Keren et al., 2002] Keren, K., Krueger, M., Gilad, R., Ben-Yoseph, G., Sivan, U., and Braun, E. (2002). Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules. *Science*, 297(5578):72–75.
- [Klein et al., 1996] Klein, D. L., McEuen, P. L., Katari, J. E. B., Roth, R., and Alivisatos, A. P. (1996). An approach to electrical studies of single nanocrystals. *Applied Physics Letters*, 68(18):2574–2576.
- [Klein et al., 1997] Klein, D. L., Roth, R., Lim, A. K. L., Alivisatos, A. P., and Mceuen, P. L. (1997). A single-electron transistor made from a cadmium selenide nanocrystal. *Nature*, 389(6652):699–701.
- [LaBean et al., 2000] LaBean, T. H., Yan, H., Kopatsch, J., Liu, F., Winfree, E., Reif, J. H., and Seeman, N. C. (2000). Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 122(9):1848–1860.
- [Lasky et al., 1985] Lasky, J., Stiffler, S., White, F., and Abernathy, J. (1985). Silicon-on-insulator (SOI) by bonding and etch-back. *Electron Devices Meeting, 1985 International*, 31:684–687.

- [Lasky, 1986] Lasky, J. B. (1986). Wafer bonding for silicon-on-insulator technologies. *Applied Physics Letters*, 48(1):78–80.
- [Li et al., 1998] Li, J. W., Bai, C. L., Wang, C., Zhu, C., Lin, Z., Li, Q., and Cao, E. (1998). A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy. *Nucleic Acid Research*, 26(20):4785–4786.
- [Lin et al., 2005] Lin, H.-Y., Tsai, L.-C., Chi, P.-Y., and Chen, C.-D. (2005). Positioning of extended individual DNA molecules on electrodes by non-uniform AC electric fields. *Nanotechnology*, 16(11):2738–2742.
- [Liu et al., 2001] Liu, J., Gómez-Kaifer, M., and Kaifer, A. E. (2001). Switchable molecular devices: From rotaxanes to nanoparticles. *Structure and Bonding*, 99:141–162.
- [Liu et al., 2004] Liu, Y. Y., Wang, P. Y., Dou, S. X., Wang, W. C., Xie, P., Yin, H. W., Zhang, X. D., and Xi, X. G. (2004). Ionic effect on combing of single DNA molecules and observation of their force-induced melting by fluorescence microscopy. *Journal of Physical Chemistry*, 121(9):4302–4309.
- [Loweth et al., 1999] Loweth, C. J., Caldwell, W. B., Peng, X., Alivisatos, A. P., and Schultz, P. G. (1999). DNA als gerüst zur bildung von aggregaten aus gold-nanokristallen. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 111(12):1925–1930.
- [Marsh and Henderson, 1994] Marsh, T. C. and Henderson, E. (1994). G-wires: self-assembly of a telomeric oligonucleotide, d(GGGGTTGGGG), into large superstructures. *Biochemistry*, 33(35):10718–10724.
- [Marsh et al., 1995] Marsh, T. C., Vesenka, J., and Henderson, E. (1995). A new DNA nanostructure, the G-wire, imaged by scanning probe microscopy. *Nucleic Acids Research*, 23(4):696–700.
- [Maubach et al., 2005] Maubach, G., Born, D., Csaki, A., and Fritzsche, W. (2005). Parallel fabrication of DNA-aligned metal nanostructures in microelectrode gaps by a self-organization process. *Small*, 1(6):619–624.
- [Maubach et al., 2003] Maubach, G., Csaki, A., Seidel, R., Mertig, M., Pombe, W., Born, D., and Fritzsche, W. (2003). Controlled positioning of one individual DNA molecule in an electrode setup based on self-assembly and microstructuring. *Nanotechnology*, 14(5):546–550.

- [Maubach and Fritzsche, 2004] Maubach, G. and Fritzsche, W. (2004). Precise positioning of individual DNA structures in electrode gaps by self-organization onto guiding microstructures. *Nano Letters*, 4(4):607–611.
- [Mbindyo et al., 2001] Mbindyo, J., Reiss, B. D., Martin, B. R., Keating, C. D., Natan, M. J., and Mallouk, T. E. (2001). DNA-directed assembly of gold nanowires on complementary surfaces. *Advanced Materials*, 13(4):249–254.
- [Mertig et al., 2002] Mertig, M., Seidel, R., Ciacchi, L. C., and Pombe, W. (2002). Nucleation and growth of metal clusters on a DNA template. *Structural and Electronic Properties of Molecular Nanostructures: AIP Conference Proceedings*, 633:449–453.
- [Michalet, 2001] Michalet, X. (2001). Stretching single-stranded DNA on a surface. *Nano Letters*, 1(7):341–343.
- [Michalet et al., 1997] Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J. S., and Bensimon, A. (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science*, 277(5331):1518–23.
- [Mirkin, 2000] Mirkin, C. A. (2000). Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks. *Inorganic Chemistry*, 39:2258–2272.
- [Mirkin et al., 1996] Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., and Storhoff, J. J. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592):607–609.
- [Monson and Woolley, 2002] Monson, C. F. and Woolley, A. T. (2002). DNA templated construction of metallic nanowires. *DNA-Based Molecular Construction: AIP Conference Proceedings*, 640:83–89.
- [Monson and Woolley, 2003] Monson, C. F. and Woolley, A. T. (2003). DNA-templated construction of copper nanowires. *Nano Letters*, 3(3):359–363.
- [Moreau, 1988] Moreau, W. M. (1988). *Semiconductor Lithography*. Plenum Press, New York.

- [Morgan et al., 2003] Morgan, H., Holmes, D., and Green, N. G. (2003). 3D focusing of nanoparticles in microfluidic channels. *IEE Proceedings Nanobiotechnology*, 150(2):76–81.
- [Morgan et al., 1999] Morgan, H., Hughes, M. P., and Green, N. G. (1999). Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis. *Biophysical Journal*, 77(1):516–525.
- [Mortimer, 1996] Mortimer, C. E. (1996). *Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [Mucic et al., 1998] Mucic, R. C., Storhoff, J. J., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L. (1998). DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials. *Journal of the American Chemical Society*, 120(48):12674–12675.
- [Möller et al., 2001] Möller, R., Csaki, A., Köhler, J., and Fritzsche, W. (2001). Electrical classification of the concentration of bioconjugated metal colloids after surface adsorption and silver enhancement. *Langmuir*, 17:5426–5430.
- [Möller et al., 2008] Möller, R., Schüler, T., Gunther, S., Carlsohn, M. R., Munder, T., and Fritzsche, W. (2008). Electrical DNA-chip-based identification of different species of the genus *kitasatospora*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5):1181–1188.
- [Niemeyer, 1999] Niemeyer, C. M. (1999). Progress in engineering up"nanotechnology devices utilizing DNA as a construction material. *Applied Physics Letters*, 68(2):119–124.
- [Niemeyer, 2000] Niemeyer, C. M. (2000). Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(6):609–618.
- [Niemeyer, 2002] Niemeyer, C. M. (2002). Nanomechanische bauelemente auf DNA-basis. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 114(20):3933–3938.
- [Okahata et al., 1998] Okahata, Y., Kobayashi, T., Tanaka, K., and Shimomura, M. (1998). Anisotropic electric conductivity in an aligned DNA cast film. *Journal of the American Chemical Society*, 120:6165–6166.
- [Orlov et al., 1997] Orlov, A. O., Amlani, I., Berstein, G. H., Lent, C. S., and Snider, G. L. (1997). Realization of a functional cell for quantum-dot cellular automata. *Science*, 227(5328):928–930.
- [Otohe and Ohtani, 2001] Otohe, K. and Ohtani, T. (2001). Behavior of DNA fibers stretched by precise meniscus motion control. *Nucleic Acids Research*, 29(22):109.

- [Patolsky et al., 2002] Patolsky, F., Katz, E., and Willner, I. (2002). Amplified DNA detection by electrogenerated biochemiluminescence and by the catalyzed precipitation of an insoluble product on electrodes in the presence of the doxorubicin intercalator. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 41(18):3398–402.
- [Patolsky et al., 2001] Patolsky, F., Lichtenstein, A., and Willner, I. (2001). Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. *Nature Biotechnology*, 19(3):253–257.
- [Perkins et al., 1994] Perkins, T. T., Quake, S. R., Smith, D. E., and Chu, S. (1994). Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science*, 264(5160):822–826.
- [Pohl, 1951] Pohl, H. A. (1951). The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields. *Journal of Applied Physics*, 22(7):869–871.
- [Pohl and Crane, 1971] Pohl, H. A. and Crane, J. S. (1971). Dielectrophoresis of cells. *Biophysical Journal*, 11(9):711–27.
- [Prokop, 2001] Prokop, A. (2001). Bioartificial organs in the twenty-first century: nanobiological devices. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 944(7):472–490.
- [Richter et al., 2001] Richter, J., Mertig, M., Pompe, W., Mönch, I., and Schackert, H. K. (2001). Construction of highly conductive nanowires on a DNA template. *Applied Physics Letters*, 78(4):536–539.
- [Richter et al., 2002] Richter, J., Mertig, M., Pompe, W., and Vinzelberg, H. (2002). Low-temperature resistance of DNA-templated nanowires. *Applied Physics A*, 74(6):725–728.
- [Richter et al., 2000] Richter, J., Seidel, R., Kirsch, R., Mertig, M., Pompe, W., Plaschke, J., and Schackert, H. K. (2000). Nanoscale palladium metallization of DNA. *Advanced Materials*, 12(7):507–510.
- [Seeman, 1990] Seeman, N. C. (1990). De novo design of sequences for nucleic acid structural engineering. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 8(3):573–81.
- [Seeman, 1991] Seeman, N. C. (1991). The use of branched DNA for nanoscale fabrication. *Nanotechnology*, 2(3):149–159.
- [Seeman, 1998] Seeman, N. C. (1998). DNA nanotechnology: novel DNA constructions. *Annual Review of Biophysics And Biomolecular Structure*, 27:225–248.
- [Seeman, 2003] Seeman, N. C. (2003). DNA nanotechnology. *Materials Today*, 6(7):24–30.

- [Shaiu et al., 1993] Shaiu, W. L., Larson, D. D., Vesenka, J., and Henderson, E. (1993). Atomic force microscopy of oriented linear DNA molecules labeled with 5 nm gold spheres. *Nucleic Acids Research*, 21(1):99–103.
- [Shimbo et al., 1986] Shimbo, M., Furukawa, K., Fukuda, K., and Tanzawa, K. (1986). Silicon-to-silicon direct bonding method. *Journal of Applied Physics*, 60(8):2987–2989.
- [Smith et al., 1992] Smith, S. B., Finzi, L., and Bustamante, C. (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085):1122–6.
- [Sondermann, 2003] Sondermann, A. (2003). *Präparation molekularer Strukturen basierend auf DNA-DNA-Wechselwirkungen für die Nanotechnologie*. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena.
- [Stefan et al., 2000] Stefan, R. I., Staden, J. F. v., and Aboul-Enein, H. Y. (2000). Immunosensors in clinical analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7):659–668.
- [Steinbrück et al., 2006] Steinbrück, A., Csaki, A., Festag, G., and Fritzsche, W. (2006). Preparation and optical characterization of core-shell bimetal nanoparticles. *Plasmonics*, 1(1):79–85.
- [Steinbrück et al., 2008] Steinbrück, A., Csaki, A., Ritter, K., Leich, M., Köhler, J. M., and Fritzsche, W. (2008). Gold and gold-silver core-shell nanoparticle constructs with defined size based on DNA hybridization. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(6):104–113.
- [Storm et al., 2001] Storm, A. J., van Noort, J., de Vries, S., and Dekker, C. (2001). Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale. *Applied Physics Letters*, 79(23):3881–3883.
- [Suzuki et al., 1998] Suzuki, S., Yamanashi, T., Tazawa, S., Kurosawa, O., and Washizu, M. (1998). Quantitative analysis of DNA orientation in stationary ac electric fields using fluorescence anisotropy. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 34(1):75–83.
- [Torimoto et al., 1999] Torimoto, T., Yamashita, M., Kuwabata, S., Sakata, T., Mori, H., and Yoneyama, H. (1999). Fabrication of CdS nanoparticle chains along DNA double strands. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(42):8799–8803.
- [Tran et al., 2000] Tran, P., Alavi, B., and Gruner, G. (2000). Charge transport along the lambda-DNA double helix. *Physical Review Letters*, 85(7):1564–1567.

- [Urban et al., 2003] Urban, M., Möller, R., and Fritzsche, W. (2003). A paralleled readout system for an electrical DNA-hybridization assay based on a microstructured electrode array. *Review of Scientific Instruments*, 74:1077–1081.
- [Vallant et al., 1998] Vallant, T., Brunner, H., U. Mayer, U., Hoffmann, H., Leitner, T., Resch, R., and Friedbacher, J. G. (1998). Formation of self-assembled octadecylsiloxane monolayers on mica and silicon surfaces studied by atomic force microscopy and infrared spectroscopy. *Physical Chemistry B*, 102:7190–7197.
- [Vesenka et al., 2007] Vesenka, J., Bagg, D., Wolff, A., Reichert, A., Moeller, R., and Fritzsche, W. (2007). Auto-orientation of G-wire DNA on mica. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 58(2):256–263.
- [Vesenka et al., 1992] Vesenka, J., Guthold, M., Tang, C. L., Keller, D., Delaine, E., and Bustamante, C. (1992). Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope. *Ultramicroscopy*, 42-44:1243–1249.
- [Wang et al., 1999] Wang, J., Rivas, R., Jiang, M., and Zhang, X. (1999). Electrochemically induced release of DNA from gold ultramicroelectrodes. *Langmuir*, 15(19):6541–6545.
- [Warner and Hutchison, 2003] Warner, M. G. and Hutchison, J. E. (2003). Linear assemblies of nanoparticles electrostatically organized on DNA scaffolds. *Nature Materials*, 2(4):272–277.
- [Warsinke et al., 2000] Warsinke, A., Benkert, A., and Scheller, F. W. (2000). Electrochemical immunoassays. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7):622–634.
- [Washizu and Kurosawa, 1990] Washizu, M. and Kurosawa, O. (1990). Electrostatic manipulation of DNA in microfabricated structures. *IEEE Transactions of Industrial Applications*, 26(6):1165–1172.
- [Washizu et al., 1995] Washizu, M., Kurosawa, O., Arai, I., Suzuki, S., and Shimamoto, N. (1995). Applications of electrostatic stretch-and-positioning of DNA. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 31(3).
- [Weizmann et al., 2004] Weizmann, Y., Patolsky, F., I., P., and Willner, I. (2004). Telomerase-generated templates for the growing of metal nanowires. *Nano Letters*, 4(5):787–792.

- [Weizmann et al., 2001] Weizmann, Y., Patolsky, F., and Willner, I. (2001). Amplified detection of DNA and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on au-nanoparticles. *Analyst*, 126(9):1502–1504.
- [Wevers and Wechsler, 2002] Wevers, M. and Wechsler, D. (2002). *Nanobiotechnologie I: Grundlagen und Anwendungen molekularer, funktionaler Systeme*, volume 38 of *Zukünftige Technologien*. VDI-Technologiezentrum, Düsseldorf.
- [Willner et al., 1996] Willner, I., Heleg-Shabtai, V., Blonder, R., Katz, E., Tao, G., Buckmann, A. F., and Heller, A. (1996). Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto Au-electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, 118(42):10321–10322.
- [Willner et al., 2000] Willner, I., Katz, E., and Willner, B. (2000). In Yang, V. C. and Ngo, T. T., editors, *Biosensors and Their Applications*, pages 47–98. Kluwer Academic Publishers, New York.
- [Willner et al., 1993] Willner, I., Riklin, A., Shoham, B., Rivenzon, D., and Katz, E. (1993). Development of novel biosensor enzyme electrodes: Glucose oxidase multilayer arrays immobilized onto self-assembled monolayers on electrodes. *Advanced Materials*, 5(12):912–915.
- [Willner et al., 2002] Willner, I., Willner, B., and Katz, E. (2002). Functional biosensor systems via surface-nanoengineering of electronic elements. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82(4):325–355.
- [Winfree, 1998] Winfree, E. (1998). *Experiments with DNA self assembly*. Phd thesis.
- [Winfree et al., 1998] Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L. A., and Seeman, N. C. (1998). Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 394(6693):539–544.
- [Wolff et al., 2008] Wolff, A., Leiterer, C., Csaki, A., and Fritzsche, W. (2008). Dielectrophoretic manipulation of DNA in microelectrode gaps for single-molecule constructs. *Frontiers in Bioscience*, 13(1):6834–6840.
- [Yokota et al., 1997] Yokota, H., Johnson, F., Lu, H., Robinson, M., Belu, A. M., Garrison, M. D., Ratner, B. D., Trask, B. J., and Miller, D. L. (1997). A new method for straightening DNA molecules for optical restriction mapping. *Nucleic Acids Research*, 25(5):1064–1070.

- [Yokota et al., 1999] Yokota, H., Sunwoo, J., Sarikaya, M., van den Engh, G., and Aebersold, R. (1999). Spin-stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy. *Analytical Chemistry*, 71(19):4418–4422.
- [Zheng et al., 2004] Zheng, L., Brody, J. P., and Burke, P. J. (2004). Electronic manipulation of DNA, proteins, and nanoparticles for potential circuit assembly. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(3):606–619.

A Anhang

A.1 Bildnachweis

[1] <http://pubs.usgs.gov/of/of01-041/html/docs/images/thumb/illstruc.jpg>

[2] nach Poster Sondermann 2004 „Assembly of G-quartet based DNA superstructures (*G-wires*) with gold nanoparticles“.

[3] <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Structures.-03601.html>

A.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscope</i>)
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
CCD	Ladungsträgergekoppelte Schaltung (<i>charge coupled devise</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> : und andere
Nukleotidbasen	A Adenin G Guanin C Cytosin T Thymidin
ODTS	Octadecyltrichlorsilan
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAM	Selbstorganisierende Monoschicht (<i>self assembeled monolayer</i>)
SSC	Natriumcitratpuffer (<i>sodium salt citrate</i>)
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

A.3 Tabellen

Name	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
1-Aminopropan-2-ol, Dipropylenglycolmono- methylether, Isomerengemisch (Remover Lösung)		Clariant
3- Aminopropyltriethoxysilan	reinst, ~ 96%	Fluka
Aceton	zur Analyse	Merck
Ammoniak	25% zur Analyse	Sigma
Citronensäure-Monohydrat	zur Analyse	Merck
Di- Natriumhydrogenphosphat	wasserfrei, zur Analyse	Merck
Ethanol	reinst, 96%	Roth
Fluorwasserstoff	reinst, 38%-40%	Merck
Glycerin	zur Analyse	Merck
Gold-Kolloid Lösungen (60 nm)		British Biocell
Magnesiumchlorid	zur Analyse	Merck
Methanol	zur Analyse	Roth
Natriumchlorid	zur Analyse	Merck
Polydimethylsiloxan (Fertigpräparat Sylgard 184)		Dow Corning
Salzsäure	37% zur Analyse	Merck
Silbernitrat	99,5%	Merck
Tris-(hydroxymethyl)- Aminomethan	purissimum, > 99,9%	Sigma
Wasserstoffperoxyd	30% zur Analyse	Merck

Tab. A.1: Verwendete Chemikalien.

Puffer	Zusammensetzung	Quelle
20 x SSC-Puffer (pH 7,0)	3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat, pH mit 10 M NaOH eingestellt	(Sambrook et al. 1989)
TRIS-Hydrochlorid (pH 7,4/ 7,6/ 8,0)	1M TRIS, Salzsäure	(Sambrook et al. 1989)
P1	50 mM Natriumchlorid, 50 mM TRIS HCl pH 7,5, 10 mM Magnesiumchlorid	
P2	10 mM TRIS HCl pH 7,5, 1 mM Magnesiumchlorid	
TE (pH 8,0)	10 mM TRIS-Hydrochlorid, 1 mM EDTA (pH 8,0)	(Sambrook et al. 1989)

Tab. A.2: Verwendete Puffer.

Probenbearbeitung	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Thermomixer Comfort</i> (Eppendorf GmbH, Köln) • Hybridisierungsöfen <i>HB-1000</i> (UVP Inc., Upland, CA) • Funktionsgenerator <i>Agilent 33220A</i> (Agilent, Böblingen)
Charakterisierung	<ul style="list-style-type: none"> • Spektrophotometer <i>Nanodrop ND-1000</i> (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, NC, USA) • Fluoreszenzmikroskop <i>Axiotech 100</i> (Carl Zeiss GmbH, Jena) mit CCD Kamera <i>Sensicam</i> (PCO, Kehlheim) • Fluoreszenzmikroskop <i>Axio-Imager A1m</i> (Carl Zeiss GmbH, Jena) mit CCD Kamera <i>Axio-Cam MRc5</i> (Zeiss, Jena) • Rasterelektronenmikroskop <i>Jeol JSM 6700 F</i> (Jeol Europe B.V., Zaventem, Belgien) • Rasterkraftmikroskop <i>Nanoscope III</i> Controller mit Messkopf <i>Dimension 3100</i> oder <i>Multimode</i> (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA)
Datenauswertung	<ul style="list-style-type: none"> • Grauwertanalyse der optischen Aufnahmen Software <i>Image J 1.38</i> (http://rsb.info.nih.gov/ij/) • Steuerung, Datenaufnahme und Datenverwaltung vom <i>Nanoscope III: SPM 5.31R1</i> (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) • Steuerung, Datenaufnahme und Datenverwaltung vom <i>Nanodrop ND-1000: NanoDrop 3.0.0</i> (Ocean Optics, Duiven, Niederlande) und <i>Nanoscript</i>

Tab. A.3: Verwendete Geräte.

A.4 Wissenschaftliche Beiträge

A.4.1 Publikationen

A. Wolff, W. Fritzsche, M. Kittler, X. Yu, M. Reiche, T. Wilhelm, M. Seibt and O. Voss: Charge pattern formation at silicon surfaces for defined biomolecule adsorption, in W. Fritzsche, ed., International Symposium on DNA Based Nanodevices, AIP, Jena, Germany (2008) in press.

A. Wolff, Ch. Leiterer, A. Csaki, W. Fritzsche: Dielectrophoretic manipulation of DNA in microelectrode gaps for single-molecule constructs. *Frontiers in Bioscience* 13 (2008) 6834-6840.

M. Kittler, X. Yu, T. Mchedlidze, T. Arguirov, O.F. Vyvenka, W. Seifert, M. Reiche, T. Wilhelm, M. Seibt, O. Voß, A. Wolff, W. Fritzsche: Regular dislocation networks in silicon as a tool for novel nanostructure devices to be used in optics, biology and electronics. *Small* 3 (2007) 964-973.

J. Vesenka, D. Bagg, A. Wolff, A. Reichert, R. Möller, W. Fritzsche: Auto-Orientation of DNA-superstructures (G-wires) on Mica. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58 (2007) 256-263.

A. Wolff, W. Fritzsche, M. Kittler, X. Yu, M. Reiche, T. Wilhelm, M. Seibt and O. Voss: A Novel Approach to Self-Organized Pattern Formation of Biomolecules at Silicon Surfaces, in W. Fritzsche, ed., International Symposium on DNA-Based Nanoscale Integration, AIP, Jena, Germany (2006) 31-39.

A. Csáki, A. Wolff, T. Schüler, R. Moeller, G. Festag, R. Kretschmer, G. Maubach and W. Fritzsche: Defined DNA Immobilization for a DNA-based Micro-Nano Integration. W. Fritzsche, ed., International Symposium on DNABased Nanoscale Integration, AIP, Jena, Germany (2006) 19-25.

G. Festag, A. Steinbrück, A. Wolff, A. Csaki, R. Möller and W. Fritzsche: Optimization of Gold Nanoparticle-Based DNA Detection for Microarrays. *Journal of Fluorescence* 15 (2005) 161-170.

Buchkapitel

A. Wolff, A. Csaki, W. Fritzsche: Multicomponent Assemblies Including Long DNA and Nanoparticles – An Answer for the Integration Problem? In „Nanotechnology: Science and

Computation” (Ed. by Junghuei Chen · Natasha Jonoska · Grzegorz Rozenberg Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006)

A.4.2 Poster

A. Wolff, W. Fritzsche, M. Kittler, X. Yu, M. Reiche, T. Wilhelm, M. Seibt and O. Voß: Charge pattern formation at silicon surfaces for defined biomolecule adsorption (DNA Based Nanodevices, Jena, May 29.-31.2008)

A. Wolff, A. Csaki, W. Fritzsche: Nanoscale integration of biomolecules and nanoparticles (3rd International Symposium of the Volkswagen Foundation on Complex Materials, Kerkrade, Netherlands March 18.-21.2007)

A. Wolff, W. Fritzsche, M. Kittler, X. Yu, M. Reiche, T. Wilhelm, M. Seibt and O. Voß: Self-organized pattern formation of biomolecules at silicon surfaces (Summer School “Complex Materials: Cooperative Projects of the Natural, Engineering and Biosciences”, VW Foundation, Bremen, 24 June- 1 July 2006)

A. Wolff, W. Fritzsche, M. Reiche, M. Seibt, X. Yu and M. Kittler: Charge pattern formation at silicon surfaces for defined biomolecule adsorption (DNA Based Nanoscale Integration, Jena, May 18.-20.2006)

A. Wolff, A. Csaki, W. Fritzsche: DNA Stretching and Positioning for Nanoelectronics (German-Israeli Foundation G.I.F. Meeting on Nanotubes and Nanowires, Dresden, June 18.-23.2005)

A. Wolff, A. Csaki, W. Fritzsche: Directed DNA-Immobilization on Solid Substrates (2nd International Symposium on Complex Material, Volkswagen Foundation, Stuttgart, June 2-3.2005)

A. Wolff, G. Maubach, A. Csáki, R. Möller, W. Fritzsche: Integration von Biomolekülen auf mikrostrukturierten Siliziumoberflächen (9. Augustusburg Conference of Advanced Science, Augustusburg, September 23.-25.2004)

A. Wolff, G. Maubach, W. Fritzsche: A method for reproducible and highly parallel positioning of individual DNA fibers in electrode gaps (4. Intern. Symposium on Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules, Kloster Banz, February 22.-25.2004)

G. Festag, A. Steinbrück, A. Wolff, A. Csáki, R. Möller, W. Fritzsche: Substrate modification for gold nanoparticle labeling (Intern. Symposium on Bioconjugated Nanoparticles, May 22.-24.5.2003)

A.4.3 Vorträge

A. Wolff: DNA integration for nanoelectronics (NanoBionics IV - from Molecules to Applications, Marburg, September 17-21, 2007)

A. Wolff, A. Csáki, W. Fritzsche: Defined placement of biomolecules on Si surfaces (Summer School “Complex Materials: Cooperative Projects of the Natural, Engineering and Biosciences”, VW Foundation, Bremen, 24 June- 1 July, 2006)

A.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt dabei:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Ulrich S. Schubert für die Betreuung, seine fachliche Unterstützung und förderndes Interesse.

PD Dr. rer. nat. Wolfgang Fritzsche für die Betreuung meiner Arbeit am IPHT, sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeiten, für die anregenden Diskussionen meiner Ergebnisse und die moralische Unterstützung.

Dr. rer. nat. Andrea Csaki für die kritische Auseinandersetzung mit meinen Ergebnissen und die Bereitschaft diese jederzeit mit mir zu diskutieren.

Prof. James Vesenka für die Unterstützung und Zusammenarbeit auf dem Gebiet der *G*-Wires, für die Einarbeitung am *Multimode* Messkopf sowie die Überlassung der schematischen Abbildung der *G*-Wires.

Dr. rer. nat. Thomas Wilhelm für die Bereitstellung der Siliziumsubstrate mit intrinsischer Funktionalität und für produktive Zusammenarbeit bei deren chemischer Modifikation.

Christian Leiterer für seine hilfreichen Arbeiten und Ideen bei der Etablierung der Dielektrophorese und *G*-Wire Assemblierung.

Anastasia und vielen weiteren fleißigen Biochemie-Studenten für ihre Arbeiten bei der Etablierung der Tropfen-Methode.

Claudia Holste und *Anett Reichert* für ihre Vorarbeiten und Geduld bei der Einarbeitung auf dem Gebiet der *G*-Wire Assemblierung.

Franka Jahn und *Andrea Assmann* für die Erstellung der REM-Aufnahmen.

Margitta Sossna, *Katrin Kandra*, *Horst Porwol* und *Andreas Ihring* für die Herstellung der mikrostrukturierten Substrate.

Lieber Dank an das „Krasse Herde Büro“: *Robert Kretschmer*, *Andrea Steinbrück* sowie den zeitweisen Mitgliedern *Martin Leich*, *Katrin Ritter*, *Sven Jessing* und *Werner Uhlemann* für die Bereicherung des Arbeitsklimas.

Thomas Schüler für seine Hilfestellungen am *Multimode* Messkopf, die gegenseitige Ideengebung und Umsetzung zahlreicher Abbildungen mit der 3-D Software *Cinema 4D* und darüber hinaus für seine unbekümmerte und fröhliche Art die es mir erlaubte immer wieder die nötige „Zerstreuung“ zu finden.

Sven Peters für seine Unterstützung bei Problemen mit der *LaTeX* Software.

Allen Mitgliedern der Abteilungen Nanobiophotonik (IPHT) sowie der Jenaer Biochip Initiative der FSU Jena, die während der gesamten Dauer meiner Arbeit ein angenehmes und freundliches Arbeitsklima schufen.

Der Volkswagen Stiftung, welche mit einem Projekt (I/80 070) die finanzielle Basis für diese Arbeit bereitstellte.

Meiner Freundin *Sandra* für das richtige Maß an Ablenkung während meiner Arbeit und nicht zuletzt meiner Mutter *Heidemarie* für ihre fortwährende Unterstützung.

A.6 Lebenslauf

Persönliche Information:

Name: Andreas Wolff
Geburtstag: 03.11.1977
Geburtsort: Jena
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

seit 01/2004 Doktorand am Institut für Photonische Technologien Jena (IPHT)
2004 Sparkassenpreis für beste Diplomarbeit am IPHT
12/2003 Biochemie-Diplom an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10/2002 bis 12/2003 Diplomarbeit am Institut für Photonische Technologien (ehemals
Institut für Physikalische Hochtechnologie) Jena (IPHT)
10/1998 bis 12/2003 Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich Schiller
Universität Jena
06/1996 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
1991 bis 1996 Staatliches Gymnasium „Ernst Haeckel“, Jena
1984 bis 1991 POS J. Gottlieb Fichte, Jena

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

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

Jena, den 14. Oktober 2008

Andreas Wolff