

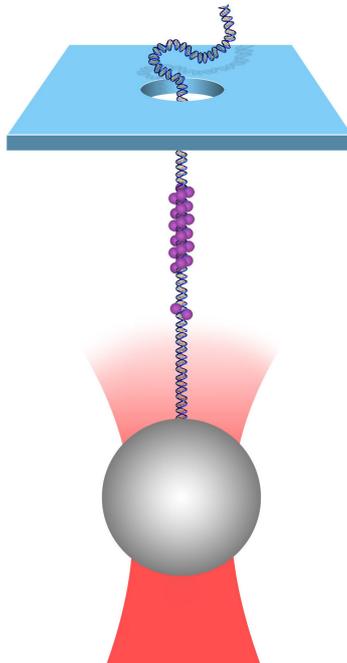
Einzelmolekül-Experimente an Nanoporen mit der Optischen Pinzette

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

André Spiering



Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

März 2014

»Alle Dinge sind schwierig, bevor sie einfach werden.«

(Thomas Fuller)

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

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

Bielefeld, den 31.03.2014

(André Spiering)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti (Fakultät für Physik, Universität Bielefeld)

Prof. Dr. Thomas Huser (Fakultät für Physik, Universität Bielefeld)

Diese Arbeit ist auf alterungsbeständigem Papier gemäß ISO 9706 gedruckt. Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.

Eingereicht am: 31.03.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Optische Falle	3
2.2. Nanoporen.....	11
2.3. Biomoleküle.....	15
2.3.1. DNA.....	15
2.3.2. Proteine	21
2.3.3. Lipide	27
2.4. Zweikernige Metallkomplexe.....	30
2.5. Carbon-Nanomembranen.....	31
2.6. Graphen.....	33
2.7. Kraft auf DNA in Nanoporen	35
3. Materialien und Methoden.....	40
3.1. Nanoporenexperimente.....	40
3.1.1. Versuchsaufbau.....	40
3.1.2. Präparationen für Siliziumnitrid-Poren.....	44
3.1.3. Präparationen für Graphen-Poren	46
3.1.4. Präparationen für Carbon-Nanomembran-Poren	49
3.1.5. Präparationen für lipidbeschichtete Poren	50
3.2. DNA-Streckversuche.....	51
3.2.1. Versuchsaufbau.....	51
3.2.2. Probenpräparation	53
3.3. AFM-Abbildungen	54
3.3.1. Funktionsprinzip	54
3.3.2. Probenpräparation.....	55

3.4. Magnetische Pinzette	56
3.4.1. Versuchsaufbau	56
3.4.2. Probenpräparationen	57
4. Ergebnisse und Auswertung	59
4.1. Nanoporen-Experimente	60
4.1.1. Größenbestimmung der Nanoporen	60
4.1.2. DNA-Translokationen durch Nanoporen	67
4.1.3. DNA-Ligand-Komplexe in Nanoporen	81
4.1.4. Graphen-Poren	92
4.1.5. Carbon-Nanomembran-Poren	99
4.1.6. Lipidbeschichtete Nanoporen	103
4.1.7. Abhängigkeit der Kraft von der Porengröße	112
4.2. Zweikernige Metallkomplexe	114
4.2.1. DNA-Streckversuche mit Optischer Pinzette	114
4.2.2. Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen	117
4.2.3. Nanoporen-Experimente mit Optischer Pinzette	119
4.2.4. Untersuchungen mit Magnetischer Pinzette	121
5. Zusammenfassung und Ausblick	126
Literaturverzeichnis	128
Danksagung	136
Anhang	138

1. Einleitung

Die Biophysik untersucht und beschreibt biologische Systeme und bringt dabei – im Gegensatz zu verwandten Disziplinen wie Chemie oder Biologie – hauptsächlich physikalische Messmethoden und -apparaturen zur Anwendung. Hierbei werden beispielsweise mechanische Kräfte, elektrische Ladungen, Spannungen und Ströme, Bindungs- und Zerfallsraten oder optische Spektren bestimmt um biologische Zusammenhänge zu beschreiben und Interaktionen verschiedener Biomoleküle aufzudecken. Viel häufiger als andere Physikbereiche folgt sie dabei der Prämisse induktiver Erkenntnisgewinnung: Aus der Fokussierung auf einzelne Details und deren Verständnis leitet sie eine allgemeingültigere Theorie zur Beschreibung immer komplexerer biologischer Systeme her, um sich so in Einzelschritten der Beschreibung des interessierenden Gesamtsystems langsam anzunähern. Vom Einzelnen hin zum Allgemeinen: Besonders bei so komplexen Systemen wie biologischen Organismen – bei denen schon kleinste Änderungen, teils sogar nur auf atomarer oder molekularer Ebene, das Gesamtsystem erheblich beeinflussen können – wäre ein umgekehrtes Vorgehen von nur geringem Erkenntnisgewinn. Aus der Betrachtung des Gesamtsystems allein könnte man wenig Aussagen über die zahllosen zugrundeliegenden Mechanismen ableiten und damit ebenso wenig Voraussagen über Einflüsse und Störungen treffen, die beschreibenden Parameter wären nur sehr grobe Mittelwerte.

Aus diesem Grund sind Einzelmolekül-Experimente ein wesentlicher Bestandteil biophysikalischer Forschung. Jeder Organismus wird letztlich durch die Vorgänge auf molekularer Größenskala bestimmt; hier entscheiden sich das reibungslose Funktionieren, das Antworten auf Störeinflüsse, das Reparieren von Schäden und das zukünftige Fortbestehen. Auch die Entstehung des Lebens überhaupt beruht im Grundsatz auf den physikalischen Prozessen nach denen sich Moleküle selbst organisieren, mit ihrer Umwelt oder untereinander interagieren und somit die Entwicklung in eine bestimmte Richtung – hin zu immer komplexeren Systemen – treiben. Das Wunder des Lebens steckt also in den an sich unbelebten Molekülen und die biophysikalischen Wechselwirkungen zwischen jenen hauchen ihnen schließlich das Leben ein.

Auch diese Arbeit soll sich mit der Untersuchung von einzelnen Biomolekülen – wie zum Beispiel Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren – sowie deren Wechselwirkung sowohl mit äußeren Einflüssen als auch untereinander befassen. Zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften dieser Moleküle ist dabei aufgrund ihrer unerreicht sensitiven Kraftauflösung die Optische Pinzette prädestiniert. Hierbei wird mithilfe eines starken Laserstrahls ein kleines Mikrokügelchen berührungslos gefangen, an welchem anschließend Biomoleküle immobilisiert und nanometergenau manipuliert werden können. Das photonische Potential in dem sich das Kügelchen befindet, sorgt darüber hinaus dafür, dass selbst winzige auf das Kügelchen einwirkende Kräfte zu einer deutlich messbaren Auslenkung aus dessen Gleichgewichtslage führen. Im Gegensatz zu anderen kraftspektroskopischen Methoden wie

z.B. dem Rasterkraftmikroskop kann die Optische Pinzette somit kleinste Kräfte im Sub-Piconewton-Bereich messen oder gezielt ausüben und erlaubt ferner ein sehr einfaches Experimentieren unter wässriger Pufferlösung, was für die meisten Biomoleküle die normale physiologische Umgebung darstellt.

Für einen großen Teil dieser Arbeit wurde die Optische Pinzette überdies mit Messungen an Nanoporen kombiniert. Dies sind kleinste, nur wenige Nanometer große Löcher in einer dünnen Membran, welche es z.B. durch Anlegen einer elektrischen Transmembran-Spannung erlauben, passierende Biomoleküle zu detektieren. Wie diese Arbeit zeigen soll, sind Nanoporen darüber hinaus ein sehr hilfreiches Werkzeug um auch strukturelle oder dynamische Eigenschaften der Biomoleküle während dieser Translokationsereignisse aufzuklären. Als einfaches Modellsystem für die Vielzahl natürlich vorkommender Nanoporen und Ionenkanäle, und der damit verbundenen Transportprozesse in Zellen, sind künstlich hergestellte Nanoporen von hohem Interesse sowohl in der Grundlagenforschung als auch in vielseitigen speziellen Anwendungsgebieten wie z.B. der Medizintechnik. So gibt es zum Beispiel bereits seit dem Jahr 1996 die Idee, einen einzelnen DNA-Strang kontrolliert durch eine Nanopore hindurch zu fädeln und dabei aus dem Ionenstromsignal die genaue Sequenz der Basenpaare abzulesen [1], was eine erhebliche Geschwindigkeitssteigerung und Kostensenkung gegenüber herkömmlichen Sequenzierungsmethoden verspricht und einen Quantensprung für die personalisierte und zielgerichtete Medizin darstellen könnte.

Bisher ist diese sogenannte Nanoporen-Sequenzierung aus diversen, hauptsächlich experimentellen Gründen – von denen auch diese Arbeit berichten wird – noch nicht in zufriedenstellenden Maßstäben gelungen, doch auf dem Weg zu diesem Ziel kam es zu vielen Entdeckungen, unerwarteten Effekten und neuen Erfindungen, so dass die Forschung auf dem Gebiet der Nanoporen eher beflügelt als gehemmt wurde.

Im Detail beschäftigt sich diese Arbeit im ersten Teil mit Translokationsprozessen von DNA und DNA-Ligand-Komplexen durch Nanoporen. Es werden die auftretenden Effekte, Messgrößen und maßgebenden Einflussfaktoren genauer untersucht und die durchgeführten experimentellen Verbesserungen vorgestellt. Insbesondere wird gezeigt, wie sich Modifikationen der Nanoporen auf die Translokationsereignisse und Messungen auswirken können, wenn zum Beispiel die Porengröße, die äußeren Bedingungen (Salzkonzentration, elektrische Spannung usw.) oder das Material der Nanoporenmembran (Siliziumnitrid, Graphen, Carbon-Nanomembran, Lipiddoppelschicht) verändert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wird anhand von maßgeschneiderten, synthetisierten und DNA-bindungsfähigen Liganden – den zweikernigen Metallkomplexen – gezeigt, wie die im ersten Teil verwendeten Messmethoden und Erkenntnisse weiter verwendet werden können um die biophysikalischen Eigenschaften und Wirkweisen bisher völlig unbekannter Stoffe experimentell zu bestimmen.

2. Grundlagen

Dieses 2. Kapitel beschäftigt sich mit den theoretischen Grundlagen und liefert eine Einführung in diejenigen biologischen, chemischen und physikalischen Hintergründe die zum Durchführen und zum Verständnis der Experimente sowie deren Auswertung und Interpretation benötigt werden. Im darauf folgenden 3. Kapitel erfolgt eine Beschreibung der verwendeten Materialien, Versuchsaufbauten, Präparationsschritte und Messmethoden. Anschließend folgt im 4. Kapitel schließlich die Darstellung und Diskussion der gewonnenen Messergebnisse und im abschließenden 5. Kapitel eine Zusammenfassung der Erkenntnisse dieser Arbeit in Bezug zum aktuellen Stand der Forschung und ein Ausblick auf mögliche zukünftige Experimente und Verbesserungen. Im Anhang befinden sich eine Liste der Publikationen und Konferenzbeiträge des Autors, sowie ein Lebenslauf.

2.1. Optische Falle



Abbildung 1: Joseph Dziedzic und Arthur Ashkin bei der Demonstration ihrer Optischen Pinzette. With permission by: AIP Emilio Segre Visual Archives, Physics Today Collection, photos.aip.org

Die Entdeckung des Prinzips der Optischen Falle – nach dem sich kleine Objekte durch photonisch ausgeübte Streu- und Gradientenkräfte berührungslos einfangen lassen – gelang Arthur Ashkin bereits im Jahre 1970, motiviert von der Fragestellung, ob der Strahlungsdruck eines fokussierten Laserstrahls ausreicht, um eine messbare Beschleunigung auf mikrometergroße Latexkügelchen in wässriger Lösung zu vermitteln [2]. Ihm gelang es in diesem Experiment zwei unterschiedliche Effekte zu beobachten: Zum einen bewegten sich die Mikropartikel wie erwartet, aufgrund der Streukräfte die bei der Reflektion der Laserstrahlung an diesen Mikrokügelchen entstehen, in axialer Ausbreitungsrichtung des Lasers. Zum anderen wurden sie jedoch auch

radial durch die aus der Lichtbrechung herrührenden Gradientenkräfte beschleunigt, stets in Richtung zur optischen Achse des Lasers hin, also zur höchsten Strahlungsintensität und waren damit bereits in zwei Dimensionen gefangen.

Um nun eine stabile dreidimensionale optische Falle zu erzeugen, musste die vom Laserstrahl erzeugte Streukraft, welche die Kügelchen in Ausbreitungsrichtung des Lasers beschleunigte, vollständig kompensiert werden. Ashkin experimentierte hierfür mit einem zweiten, genau entgegengesetzten Laser, welcher ebenfalls eine Streukraft bewirkte und das Kügelchen damit in einem Gleichgewichtszustand („optical well“) verharren ließ [2]. In einem weiteren Versuch wurde die Gravitation der Erde genutzt um die Streukraft des Lasers zu

kompensieren, indem der Aufbau so nach oben ausgerichtet wurde, dass die Kügelchen auf dem Laserstrahl schwebten („optical levitation“) [3]. Beide Möglichkeiten schränkten den experimentellen Aufbau jedoch stark ein, da eine perfekte Ausrichtung der (beiden) Laser benötigt wurde und die Stabilität der Falle sehr stark von der Balance zwischen Streu- und Schwerkraft (bzw. zwischen den Streukräften beider Laser) abhing. Damit führten z.B. Leistungsschwankungen des Lasers zur Instabilität der Falle und auch die Größenverteilung der verwendbaren Kügelchen war aus diesem Grund sehr eingeschränkt.

Die eleganteste Lösung zur Realisierung einer dreidimensionalen optischen Falle fanden Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm und Chu schließlich 1986 in den Bell Laboratories, indem ein einzelner Laserstrahl so stark fokussiert wurde, dass der dadurch erzeugte Intensitätsgradient zu einer zusätzlichen, nun axialen, Gradientenkraft führte, die stark genug war um die vom Laser ebenfalls ausgeübte Streukraft zu kompensieren [4]. Widerstandsfähig gegenüber Schwankungen und äußeren Einflüssen ließ sich so durch einen sehr einfachen und robusten Aufbau eine stabile optische Falle erzeugen, deren Anwendungsmöglichkeit sich nun über verschiedenste Fachgebiete und Partikelgrößen erstreckte. Den Einzug in die Biophysik als Optische Pinzette begründete ebenfalls Ashkin, indem es ihm gelang die Falle zum Fangen von Viren, Bakterien und anderen einzelnen Zellen einzusetzen und diese durch die Verwendung eines Infrarot-Lasers dabei hochpräzise und ohne jegliche Beschädigung zu manipulieren [5,6]. Auch die Idee, die optische Falle zum Fangen von einzelnen Atomen zu benutzen stammt ursprünglich von Ashkin [7,8], doch erst seinem Kollegen Steven Chu gelang die Weiterentwicklung der optischen Falle soweit, dass einzelne neutrale Atome stabil mit einem Laser gefangen und gekühlt werden konnten, wofür er schließlich 1997 den Nobelpreis in Physik erhielt.

Funktionsprinzip

Im Bereich der Rayleigh-Streuung, für den der Partikeldurchmesser d sehr klein im Vergleich zur verwendeten Wellenlänge des einfallenden Lichts ist ($d < 0,2 \cdot \lambda$) können die Partikel als Punktdipole angesehen werden, auf die in einem inhomogenen elektromagnetischen Feld die Lorentzkraft wirkt, woraus sich schließlich eine Beschreibung der Streu- und Gradientenkräfte ableiten lässt [9]. Dagegen ist die Beschreibung der auftretenden Kräfte im Bereich der Mie-Streuung ($d \gg \lambda$), wie sie auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikrokügelchen auftritt, durch die anschaulichere geometrische Strahlenoptik möglich. In beiden Bereichen ist das Grundprinzip jedoch das gleiche: Reflektion und Brechung am zu fangenden Partikel führen zu einer Impulsänderung des eingestrahlt Laserlichts und damit aufgrund der geltenden Impulserhaltung zu einem Impulsübertrag auf das Partikel, welches bei geschickter Einstellung der Parameter von den dabei übermittelten Kräften schließlich gefangen gehalten wird.

Für die radial auftretenden Kräfte, die ein Kügelchen zur optischen Achse des Laserstrahls hin ziehen und es damit bereits in zwei Dimensionen gefangen halten, ist dieses Funktionsprinzip in Abbildung 2 für ein leicht aus der optischen Achse ausgelenktes Kügelchen dargestellt: Ein Laserstrahl wird in der Grundmode (TEM_{00}) betrieben und weist aus diesem Grund in der radialen Ebene eine nahezu gaußförmige Intensitätsverteilung der Form $I = I_{max} \exp(-2r^2/w^2)$ auf. Hierbei ist I die Intensität des Strahles im radialen Abstand r

von der optischen Achse (bei welcher die maximale Strahlintensität I_{\max} erreicht wird). Die generelle Strahlweite w kann sich dabei je nach Fokussierung oder Strahlqualität in axialer Ausbreitungsrichtung ändern.

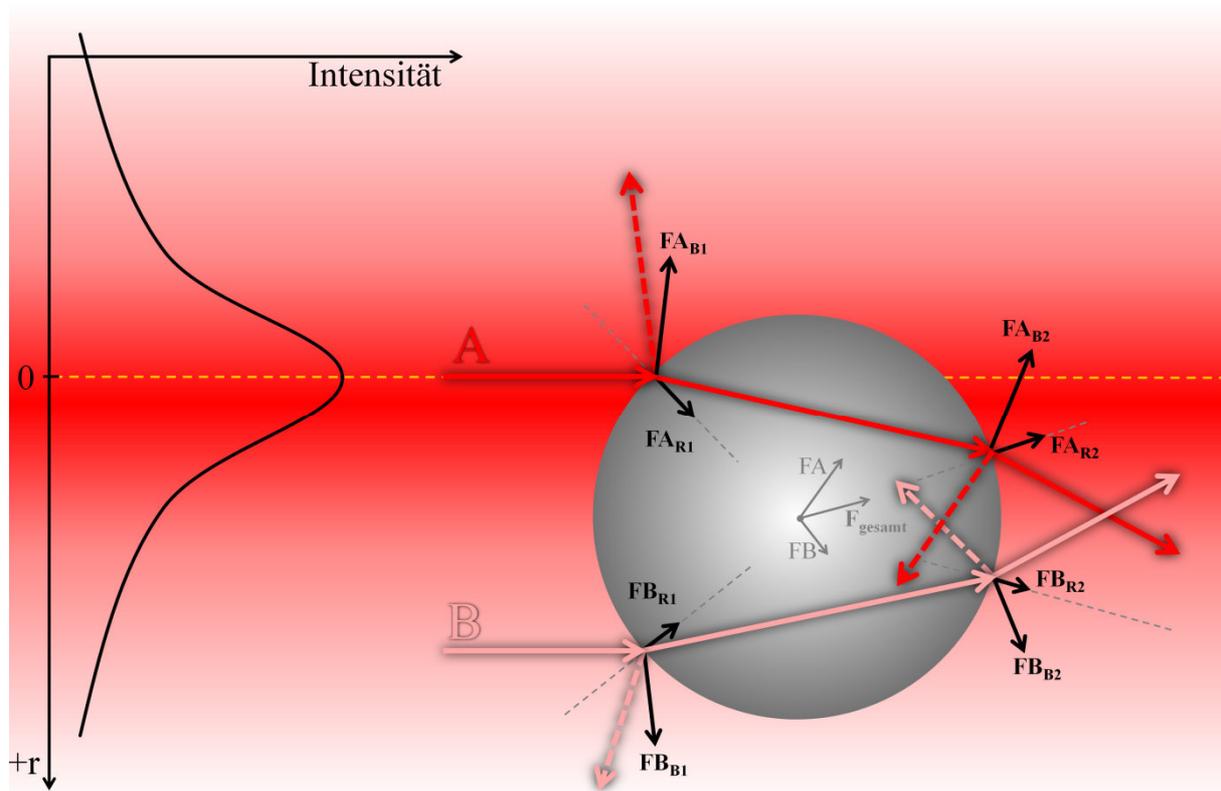


Abbildung 2: Zustandekommen der Kräfte auf ein Mikrokügelchen in einem geradlinigen Laserstrahl, die es radial in Richtung der optischen Achse und axial in Strahlrichtung hin beschleunigen.

Der exemplarische Teilstrahl A wird beim Auftreffen und Passieren des Kügelchens an dessen Außen- und Innenseite sowohl reflektiert als auch gebrochen und führt dabei zu Kräften (FA) die auf das Kügelchen übertragen werden: Die beiden Reflektionen (Indizes R1 und R2) folgen dem Reflexionsgesetz, nach welchem Ein- und Austrittswinkel im Bezug zum grau gestrichelten Lot auf der Kugeloberfläche von gleicher Größe sein müssen. Die dabei übertragenen, sogenannten Streukräfte (FA_{R1} und FA_{R2}) zeigen jeweils in Lotrichtung. Die Brechung des transmittierenden Laserstrahls erfolgt dagegen beim Eintritt ins Kügelchen (Index B1) zum Lot hin und beim Austritt (Index B2) vom Lot weg, da der Brechungsindex des Mikrokügelchens – als wesentliches Kriterium für eine stabile Falle – größer ist als derjenige des umgebenden Mediums. Die bei der Brechung übertragenen Kräfte (FA_{B1} und FA_{B2}) ergeben sich sehr anschaulich aus dem gedachten Kräfteparallelogramm (gebrochener Strahl und übertragene Kraft müssen zusammen addiert aufgrund der Impulserhaltung dem eingestrahnten Impuls entsprechen) und besitzen sowohl eine Komponente in

Ausbreitungsrichtung des Lasers, als auch in Richtung der höchsten Intensität auf der optischen Achse, weshalb sie oft als Gradientenkräfte bezeichnet werden.

Addiert man nun alle vom Teilstrahl A ausgeübten Streu- (FA_{R1} , FA_{R2}) und Gradientenkräfte (FA_{B1} , FA_{B2}), so ergibt sich netto eine Kraft FA mit Komponenten sowohl in Strahlrichtung als auch in Richtung der höchsten Intensität. Das Kügelchen würde also vom Strahlungsdruck des Lasers „angeschoben“ und gleichzeitig zur optischen Achse hingezogen werden. Der Teilstrahl B erzeugt ganz analog die gleichen Kräfte, die jedoch aufgrund der Symmetrie am Kugelmittelpunkt gespiegelt erzeugt werden. Die netto ausgeübte Kraft FB hat damit Komponenten sowohl in Strahlrichtung als auch in Richtung von der optischen Achse weg. Aufgrund der gaußförmigen Intensitätsverteilung sind diese Kräfte des Teilstrahles B jedoch von schwächerer Intensität als die vom achsennäheren Teilstrahl A erzeugten Kräfte. Addiert man dementsprechend über beide Teilstrahlen, ergibt sich schlussendlich eine Gesamtkraft F_{gesamt} , welche das Kügelchen in Strahlrichtung beschleunigt und dabei stets in die Strahlmitte auf die optische Achse zieht. In der Abbildung sind die addierten Kräfte der Teilstrahlen A und B als FA und FB , sowie die daraus resultierende Gesamtkraft F_{gesamt} im zueinander korrekten Verhältnis als graue Pfeile im Kugelmittelpunkt aufgetragen.

Um das Kügelchen nun auch in der dritten Dimension – der axialen Strahlrichtung – zu fangen und damit eine stabile dreidimensionale Falle zu erzeugen, wird der Laserstrahl nach Ashkins Idee [4] stark fokussiert, wodurch die nun auch axial auftretenden Gradientenkräfte in negativer Strahlrichtung groß genug werden um die beschriebenen Kraftkomponenten in positiver Strahlrichtung vollständig zu kompensieren.

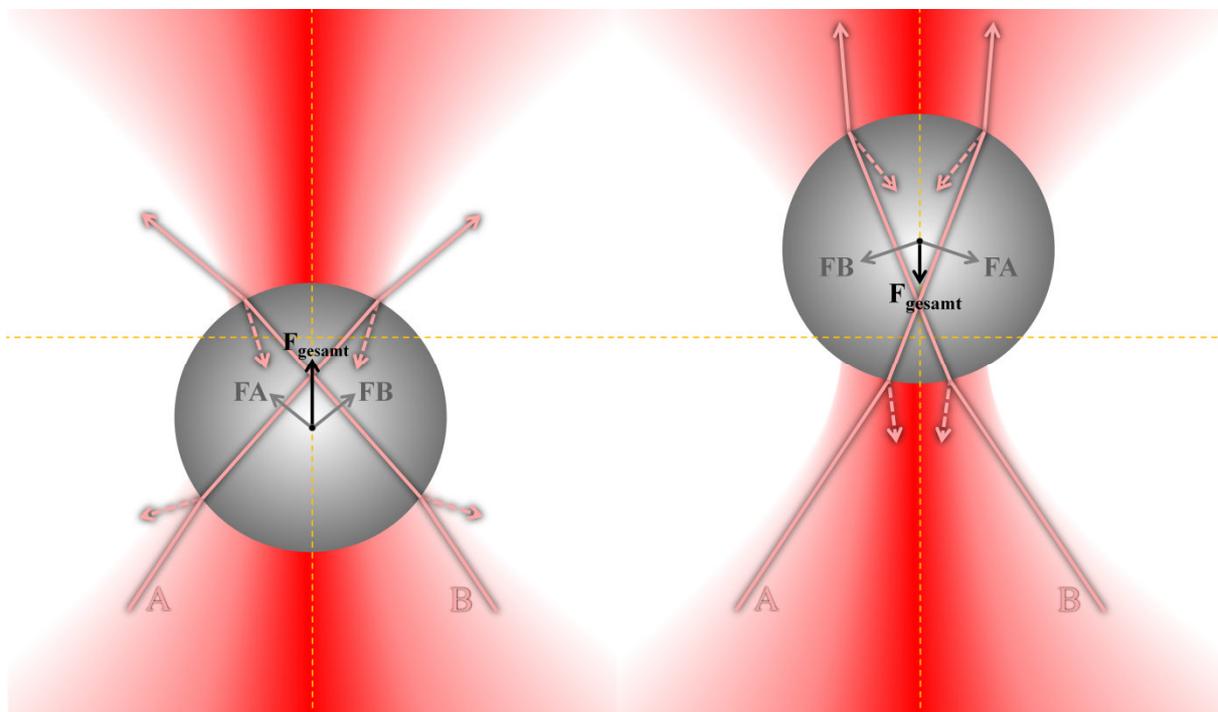


Abbildung 3: Zustandekommen der Kräfte auf ein Mikrokügelchen in einem fokussierten Laserstrahl, die es axial zum Fokus des Lasers hin beschleunigen.

In Abbildung 3 ist der stark fokussierte Laserstrahl durch zwei exemplarische Teilstrahlen A und B dargestellt. Wieder werden beide Strahlen beim Ein- und Austritt sowohl reflektiert als auch gebrochen, was an allen Grenzflächen zu Streu- und Gradientenkräften führt, die sich analog zu Abbildung 2 konstruieren lassen. Gezeigt sind hier nur jeweils die Summe dieser Teilkräfte beider Teilstrahlen (FA und FB) sowie die daraus resultierende Gesamtkraft F_{gesamt} . Für ein Kügelchen, dessen Brechungsindex größer ist als derjenige des umgebenden Mediums, zeigt die resultierende Kraft stets in Richtung des Laserfokus, egal ob es sich in axialer Strahlrichtung davor (linke Bildhälfte) oder dahinter (rechte Bildhälfte) befindet.

Sobald die Vektorsumme über alle bisher beschriebenen radialen, axialen und äußeren Teilkräfte (Streu-, Gradienten-, Schwerkraft) verschwindet, befindet sich das Kügelchen durch diese Kombination aus gaußförmiger Intensitätsverteilung und starker Strahlfokussierung somit in einem Gleichgewichtszustand nahe des Laserfokus und ist dadurch in allen drei Raumdimensionen stabil gefangen. So kann es für die verschiedensten Experimente manipuliert und zum Messen von Kräften verwendet werden.

In der Biophysik kommen hierbei vor allem Nd:YAG Infrarot-Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm zum Einsatz, da es bei den hohen benötigten Laserleistungen schnell zu Aufheizungen und Beschädigungen der Proben kommen kann. Man benötigt also eine Wellenlänge, die sowohl vom gefangenen Objekt (Mikrokügelchen, Bakterium, Zelle usw.) als auch vom umgebenden Medium (Probenkammer, wässrige Pufferlösung usw.) so wenig wie möglich absorbiert wird, was vor allem im nahen Infrarotbereich gegeben ist, wie in Abbildung 4 dargestellt [10]. Gleichzeitig führt eine größere Wellenlänge zu einer größeren Ausdehnung des Laserfokus und damit zu einer geringeren Strahlintensität am gefangenen Objekt, ohne dabei jedoch an Haltekraft der Falle einzubüßen [11], so dass auch hierdurch optische Schädigungen reduziert werden können. Ein dritter Vorteil infraroter Strahlung ist schließlich, dass diese sich sehr einfach von sichtbarer Strahlung trennen lässt und damit die optische Falle keinen störenden Einfluss mehr auf eventuelle visuelle oder videobasierte Messungen und Auswertungen hat.

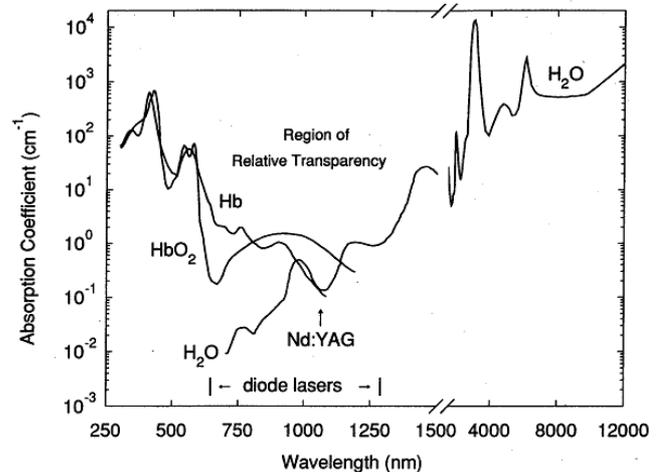


Abbildung 4: Absorptionsspektrum von Wasser und biologischen Chromophoren (Deoxy- und Oxyhemoglobin), in Bezug zur Wellenlänge von Infrarotlasern. Aus [10]

Mittlerweile kommen zur weiteren Vermeidung von Probenschädigungen sowie zur Erhöhung der Fallenstabilität auch zahlreiche andere Strahlprofile anstatt der beschriebenen gaußförmigen Intensitätsverteilung zum Einsatz. So bewirkt zum Beispiel ein Ausblenden der achsennahen Strahlung, welche hauptsächlich Beiträge zu den unerwünschten Streukräften liefert, dass die stark divergierenden achsenfernen Strahlen anteilig höhere Gradientenkräfte ausbilden können. Durch so ein „Doughnut“-Profil (TEM₀₁-Mode) können Partikel vor allem in axialer Strahlrichtung stabiler gefangen werden [12] und es ergeben sich neue

Anwendungsgebiete wenn Partikel Eigenschaften aufweisen – wie erhöhte Reflektivität für die verwendete Strahlung, oder völlige Undurchlässigkeit wie z.B. bei Metallpartikeln – die ein Fangen in herkömmlichen gaußförmigen Fallen stark erschweren würden [13,14].

Kraftmessung und Kalibrierung

Ein mit der Optischen Pinzette gefangenes Objekt kann nicht nur dazu benutzt werden durch Verschiebung der Fallenposition in einer Probenkammer Kräfte auf andere Objekte auszuüben, sondern bietet auch den großen Vorteil die einwirkenden externen Kräfte auf das gefangene Objekt selbst sehr präzise messen zu können. Dieses befindet sich aufgrund der Laserstrahlung in einem photonischen Potential, das für die nähere Umgebung des Laserfokus als harmonisch angesehen werden kann:

$$V(x) = \frac{1}{2} kx^2 \quad (1)$$

Eine externe Kraft F auf ein gefangenes Kügelchen führt damit zu einer – der Kraft proportionalen – Auslenkung x aus der Gleichgewichtslage, wobei der Proportionalitätsfaktor k hier, ähnlich zur Federkonstanten aus dem Hookschen Gesetz, die Stärke bzw. Steifigkeit der optischen Falle enthält:

$$F = -k \cdot x \quad (2)$$

Für typische Anwendungen und Kugelgrößen von mehreren Mikrometern gilt diese Linearität je nach Richtung bis zu Auslenkungen von ungefähr dem 0,6-fachen des Kugelradius [15], jenseits davon kann sich die Fallenstärke zunächst stark erhöhen bis das Kügelchen den rückstellenden Einfluss des Potentials schließlich ganz verlässt.

Um die externen Kräfte auf das gefangene Kügelchen zu bestimmen, muss also die Auslenkung x aus der Gleichgewichtslage gemessen werden. Darüber hinaus gestaltet sich die genaue Berechnung der von der Falle ausgeübten Kräfte in den meisten Fällen als sehr schwierig oder gar unmöglich, so dass der Parameter k ebenfalls experimentell kalibriert werden muss. Für beide Messgrößen gibt es mehrere mögliche Zugänge von denen die gebräuchlichsten kurz erläutert werden sollen:

x: Zur Bestimmung der Auslenkung x aus der Gleichgewichtslage in der optischen Falle kann zum einen das vorwärtsgestreute Laserlicht benutzt werden, welches das Kügelchen passiert hat. Dieses wird mit einem zweiten Objektiv aufgefangen und, da sich dieser Strahlkegel bei einer radialen Auslenkung des Kügelchens ebenfalls mit verschiebt, als Indikator für die Auslenkung verwendet [16]. Eine Bestimmung der axialen Auslenkung kann dagegen über die Intensität des aufgefangenen Lichts oder über Interferenzeffekte geschehen [17–19].

Eine zweite Möglichkeit, welche den experimentellen Aufbau nicht so stark einschränkt und auf ein zweites Objektiv verzichten kann, besteht darin das meist sehr schwache rückgestreute Licht vom Kügelchen durch den bereits vorhandenen Hauptstrahlengang zu detektieren. Dies geschah historisch zuerst durch einen zweiten Laser, dessen geeignet gewählte Wellenlänge eine hohe Reflektivität am Kügelchen

garantierte [20,21], und danach in Weiterentwicklungen durch die Ausnutzung der Polarisierungsänderung des vom Fallenlaser selbst zurückgestreuten Lichts [22,23].

Als dritte Möglichkeit kann ein Videobild des gefangenen Kügelchens aufgenommen werden und die Auslenkung desselbigen als direkte Bewegung oder Größenänderung im Bild detektiert werden [24]. Dies gewinnt vor allem in letzter Zeit aufgrund der Fortschritte in Computer-Rechenleistung, Kamerasensitivität, Videoauflösung und -geschwindigkeit, sowie besserer Beleuchtungstechnik an Einfluss [25]. Experimentell bietet diese Methode die wenigsten Einschränkungen und ist am einfachsten in einen Versuchsaufbau zu integrieren und korrekt zu kalibrieren.

Bei allen Möglichkeiten kann die Umrechnung der zur Detektion verwendeten Messgröße (Lichtintensität, Strahlkegelposition, Pixelverschiebung im Video usw.) in die tatsächliche physikalische Auslenkung x des Kügelchens geschehen, indem eine Kalibrierung anhand einer vorher genau bekannten mechanischen Auslenkung des Kügelchens durchgeführt wird. Dies ist z.B. durch das Anstoßen des Kügelchens an eine feste Grenzfläche und dem anschließenden Weiterbewegen der Falle möglich.

- k: Zur Umrechnung der nun gemessenen Auslenkung x in eine auf das Kügelchen wirkende Kraft wird darüber hinaus die Steifigkeit k der Falle benötigt. Sie gibt Auskunft darüber, wie stark die Auslenkung bei einer bestimmten Kraft tatsächlich ist. Auch hier gibt es mehrere Ansätze, wie sich die Fallensteifigkeit experimentell kalibrieren lässt. In der praktischen Anwendung sollte diese Kalibrierung für jedes neu gefangene Objekt auch erneut durchgeführt werden, da die Fallenstärke von den Eigenschaften des konkret gefangenen Objekts abhängt.

Die einfachste und am häufigsten zum Einsatz kommende Kalibrierungsmöglichkeit ergibt sich aus dem Ansatz, eine zuvor genau bekannte Kraft auf das Kügelchen einwirken zu lassen und aus der dabei gleichzeitig gemessenen Auslenkung nach Gleichung 2 die Kraftkonstante k zu berechnen. In wässriger Lösung bietet sich hierfür die Stokes-Reibungskraft an:

$$F_R = -6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad (3)$$

Hierbei ist r der Kugelradius, η die Viskosität der umgebenden wässrigen Lösung und v die Strömungsgeschwindigkeit mit der das Kügelchen laminar durch die Flüssigkeit bewegt werden muss um die gewünschte Reibungskraft F_R zu erzeugen. Die Geschwindigkeit v mit der die optische Falle (oder die gesamte Flüssigkeitszelle um die Falle herum) bewegt wird um die gewünschte Kraft zu übertragen, lässt sich durch Piezoelektrik zumeist sehr präzise einstellen, so dass eine Neukalibrierung schnell, ohne großen Rechenaufwand und in Echtzeit erfolgen kann.

Ungenauigkeiten bei der Kalibrierung rühren vor allem daher, dass Gleichung 3 nicht mehr exakt gilt, wenn das Kügelchen in der Nähe von Grenzflächen bewegt wird. So beträgt der Fehler bei oberflächenparallelen Bewegungen für einen Abstand von 5 Kugelradien zum Beispiel 10%, für 2 Kugelradien bereits 40% und für einen Kugelradius sogar 300% [10], was durch einen Korrekturfaktor ausgeglichen werden

muss. Durch die starke Fokussierung des Laserstrahls hat man es oft mit sehr geringen Arbeitsabständen des Objektivs und deshalb mit dünnen Abmessungen der Flüssigkeitszellen zu tun, so dass eine Nähe zu Grenzflächen bei der Kalibrierung nie ganz ausgeschlossen werden kann und eine Korrektur berücksichtigt werden sollte. Ein zweiter Grund für Ungenauigkeiten bei der Kalibrierung über die Stokes-Reibung ist die benötigte Viskosität η der umgebenden Lösung. Diese hängt unter anderem von der Temperatur ab, die sich im Inneren von Probenkammern oft nur schwer messen lässt. Aufheizungen durch die Beleuchtung der Zelle und durch den Fallenlaser finden oft dynamisch und positionsabhängig statt, so dass die exakte Temperatur während der Kalibrierung nur abgeschätzt werden kann. So sinkt die Viskosität von Wasser bei einer Erwärmung von 20 °C auf 30 °C bereits um 20% [26], ein Fehler der linear in die Gleichung (3) zur Kalibrierung eingeht.

Eine weitere Möglichkeit um die Fallensteifigkeit k zu bestimmen, ist neben der beschriebenen Stokes-Kalibrierung, die Analyse des Rausch-Spektrums des gefangenen Kügelchens. In wässriger Lösung vollführen alle mikroskopischen Objekte aufgrund der Stöße mit Atomen und Molekülen der Umgebung eine statistisch verteilte Brownsche Molekularbewegung, so dass jede Kraftmessung an so einem Partikel mit thermisch induziertem Rauschen behaftet ist. Die Bewegung des Teilchens im harmonischen Potential der Falle wird also durch eine zusätzliche äußere zeitabhängige Kraft $F(t)$ bestimmt, die zur Brownschen Bewegung führt und durch die gaußförmige stochastische Variable $\zeta(t)$ mit Mittelwert 0 und Varianz $\delta(t - t')$ modelliert werden kann [10,27]:

$$\gamma \frac{dx}{dt} + kx = F(t) = \zeta(t) \sqrt{2k_B T \gamma} \quad (4)$$

Hierbei ist γ der Reibungskoeffizient des Teilchens, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Durch Fourier-Transformation dieser Gleichung und Bildung der spektralen Leistungsdichte ergibt sich das Rauschspektrum [27]:

$$S(f) = \frac{k_B T}{2\pi^2 \gamma (f^2 + f_c^2)} \quad (5)$$

Die Eckfrequenz $f_c = \frac{k}{2\pi\gamma}$ enthält dabei die gesuchte Fallensteifigkeit k , so dass durch Anfitzen von Gleichung 5 an die aufgenommene Rauschamplitude (als Funktion der Frequenz) dieser Parameter k bestimmt werden kann. Allerdings muss hier beachtet werden, dass der Reibungskoeffizient $\gamma = 6\pi\eta r$ ebenfalls die Viskosität enthält und sich in der Nähe von Oberflächen verändern kann und deswegen mit den oben beschriebenen Korrekturen betrachtet werden sollte. Des Weiteren wird für die Bestimmung der Eckfrequenz eine hohe Frequenz der Datenaufzeichnung und genügend lange Aufzeichnungsdauer benötigt (damit sich das Kügelchen im Mittel in seiner Gleichgewichtsposition befindet), so dass diese Methode für schnelle Neukalibrierungen in Echtzeit oder für videobasierte Auswertungen (aufgrund der Begrenzung der Bildwiederholfrequenz) weniger gut zu handhaben ist. Für die Videoauswertung bietet sich deswegen zum Beispiel die Allan-Varianz an, um das Rauschspektrum auch in niedrigeren Frequenzen auswerten zu können [25,28,29].

2.2. Nanoporen

Nanoporen sind kleinste Löcher, von wenigen Nanometern im Durchmesser, die sich in einer dünnen Membran befinden, wobei der Begriff mittlerweile hauptsächlich für künstlich hergestellte Nanoporen in Festkörper-Membranen und für biologische Protein-Poren in Lipid-Membranen verwendet wird. Da viele in der Natur vorkommende, spezifische und unspezifische Transport- und Austauschprozesse auf zellulärer Ebene über nanometergroße Poren und Ionenkanäle geschehen, bilden künstliche Nanoporen ein vereinfachtes Modellsystem um ebendiese Prozesse genauer zu erforschen und die beeinflussenden Parameter zu ergründen. So sind viele biologische Vorgänge, wie z.B. der spezifische Transport von Nukleinsäuren und Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma durch die sogenannten Kernporen (engl.: *nuclear pore complex, NPC*), bei gleichzeitigem unspezifischen Transport von kleineren Molekülen, aufgrund der Vielzahl der beteiligten Teilprozesse und Helferproteine bisher noch nicht vollständig verstanden [30], so dass die biophysikalische Grundlagenforschung einen eigenständigen Bereich in der Forschung an und mit Nanoporen bildet. Auch die Herstellung der Nanoporen selbst ist mit darunter einzuordnen, da die große Nachfrage nach Nanoporen für die unterschiedlichsten Anwendungsgebiete (so arbeiten mittlerweile geschätzt mehr als 100 Forschungsgruppen weltweit mit Nanoporen [31,32]) zunehmend neue Anforderungen an alternative Herstellungsmethoden und neuartige Materialeigenschaften stellt, die selbst wiederum Gegenstand aktueller Forschung sind.

Einen zweiten, eher anwendungsorientierten Forschungsbereich, stellt die Verwendung von Nanoporen zum Bau von biophysikalischen und diagnostischen Sensoren dar. Hierfür werden die Poren zumeist in eine elektrisch isolierende Membran integriert um durch anschließendes Anlegen einer elektrischen Spannung entlang der Pore die zu untersuchenden Biomoleküle mittels Elektrophorese und -osmose durch die Pore zu ziehen, was in Abbildung 5 links gezeigt ist. Beim Durchtritt wird der gleichzeitig gemessene Ionenstrom durch die Pore charakteristisch beeinflusst, so dass dieses Prinzip besonders in der Analytik zur schnellen Detektion und Unterscheidung von Biomolekülen bei hoher Datenrate geeignet ist. Mit einem Aufbau dieser Art lassen sich z.B. Nukleinsäuren unterscheiden [33] oder deren Auftreten in Einzelstränge untersuchen [34,35], DNA-Ligand-Komplexe nachweisen und analysieren [36–38], Proteine detektieren [39] und ihre Funktion untersuchen [40–43] oder chemische Reaktionen lokal beobachten [44]. Auch in zielgerichteten medizinischen Anwendungen, wie z.B. beim Erstellen eines Blutbilds, findet dieses Prinzip als sogenannter Coulter-Counter Anwendung, wenngleich auch mit Porendurchmessern im Mikrometerbereich, um dabei ganze Zellen zählen und in der Größe unterscheiden zu können. Mit besonders kleinen Porendurchmessern lässt sich dagegen steril filtern, wenn Bakterien oder Viren die Nanoporen nicht passieren können [45].

Benötigt man indessen eine langsamere Passiergeschwindigkeit der zu untersuchenden Biomoleküle durch den Nanoporen-Sensor, so besteht eine Möglichkeit z.B. darin, die Nanoporen mit einer Optischen Pinzette zu kombinieren, wie es auch in dieser Arbeit geschieht. Wie in Abbildung 5 rechts dargestellt, dient das gefangene Kügelchen hierbei als Haltegriff um die Translokation eines Polymers wie z.B. DNA gezielt steuern oder auch ganz stoppen zu können, was es unter anderem erlaubt, bestimmte Bereiche ein und desselben

Biomoleküls beliebig oft, in wählbaren Geschwindigkeiten und reproduzierbar abzuscannen. Dabei können neben den Ionenströmen nun auch die durch die Optische Pinzette gemessenen Kräfte zur Untersuchung dienen. Mit Aufbauten dieser Art wurden z.B. die bei der DNA-Translokation auftretenden Kräfte und Effekte erforscht [46–48], Proteine und deren Bindungsverhalten an DNA analysiert, oder die elektrische Ladung von Biomolekülen untersucht [49,50].

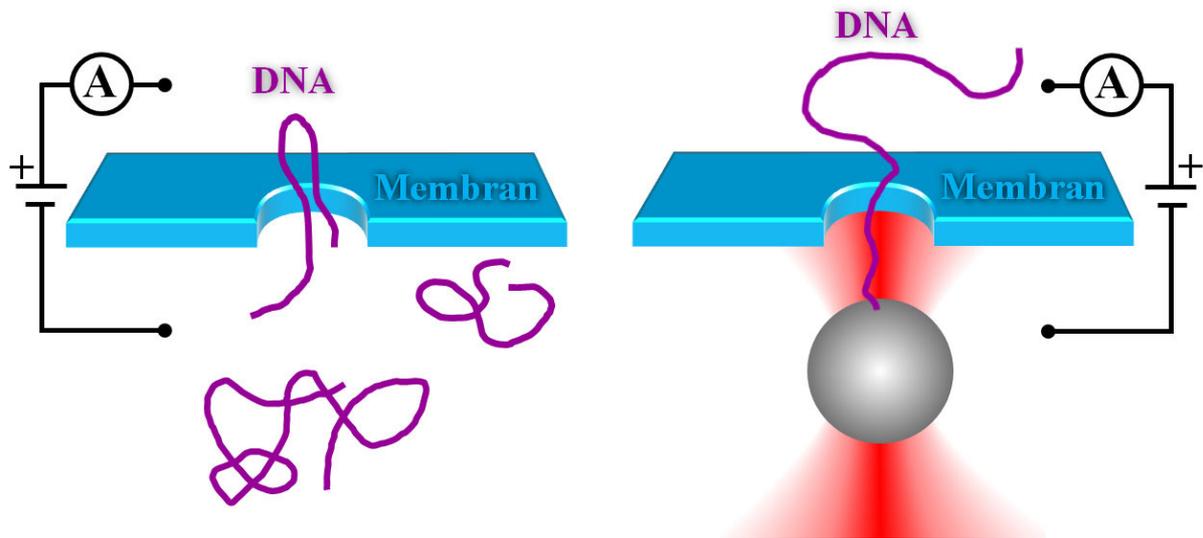


Abbildung 5: Durch eine angelegte Spannung werden negativ geladene DNA-Stränge frei (links) oder kontrolliert mit Hilfe der Optischen Pinzette (rechts) durch eine Nanopore gefädelt. Gleichzeitig wird der Ionenstrom aufgezeichnet und im Falle der Optischen Pinzette zusätzlich auch die Kraft auf das Kügelchen.

Den dritten, eigenständigen und mittlerweile sehr großen Forschungszweig der Nanoporenexperimente bildet die sogenannte Nanoporen-Sequenzierung, die auch aus den Forschungsergebnissen der bereits genannten Bereiche unablässig vorangetrieben wird. Im Jahre 1996 zeigte die Forschergruppe um Daniel Branton von der Harvard Universität, dass beim Durchtritt eines Einzelstrangs DNA oder RNA durch eine Proteinpore Regionen mit bestimmter Häufung eines Basentyps den Ionenstrom durch die Pore unterschiedlich stark blockieren [1,51]. So postulierte er bereits damals, dass es prinzipiell möglich sein sollte, die Reihenfolge der Basen eines kompletten DNA-Strangs, welcher die Gesamtheit an Erbinformationen eines Organismus enthält, mit Hilfe von Nanoporen direkt abzulesen. Dies würde erheblich schneller und billiger vonstattengehen als mit herkömmlichen Sequenzierungsmethoden, bei denen DNA aufwändig vervielfältigt, markiert und zerteilt wird und die gewonnenen Informationen anschließend wieder aufwändig zusammengesetzt werden müssen. Die Methode wäre zudem unanfälliger für Lesefehler, würde den gescannten Strang intakt lassen und geschähe darüber hinaus in Echtzeit. Auch Forschungspreise und langfristige Projektziele wie das „1000\$-Genom“, nachdem die Sequenzierung des vollständigen humanen Genoms zukünftig einmal für 1000\$ und in 24 Stunden erfolgen sollte (und damit in die Größenordnung anderer klinischer Tests einzuordnen wäre), beflügelten die Forschung mit Nanoporen als Sequenzierungstechnik der „3. Generation“, da sie als vielversprechendstes Werkzeug hierfür geeignet scheinen [52,53].

Dass die Nanoporen-Sequenzierung bis jetzt – trotz vieler Fortschritte und Weiterentwicklungen – noch nicht mit den gewünschten Zielsetzungen gelungen ist, liegt vor allem an den umfangreichen experimentellen Herausforderungen die es zu überwinden gilt [54]. So muss jede Base ein ausreichend deutliches und unterscheidbares Signal liefern, die Pore darf jede Base nur einmal detektieren (weshalb thermische Fluktuationen in der Pore kontrolliert oder korrigiert werden müssen) und Pore und Membran müssen ausreichend stabil sein um die Lesevorgänge (und eventuellen chemischen Behandlungen) zu überstehen ohne weitere Fehler im Messsignal zu produzieren. Des Weiteren muss eine erhebliche räumliche Auflösung erreicht werden, da z.B. für eine Porenlänge von 20 nm bereits rund 60 Basen gleichzeitig in der Porenregion wären, was eine Unterscheidung unmöglich macht. Dies verlangt insbesondere nach neuen Materialien und Messtechniken, um die Auflösungsgrenze immer weiter nach unten zu verschieben. Auch die zeitliche Auflösung muss groß genug sein um einzelne Basen deutlich und fehlerfrei voneinander zu unterscheiden und dabei gleichzeitig hohe Geschwindigkeiten zulassen um die Datenmengen eines kompletten menschlichen Genoms – welches um die 3,2 Milliarden Basenpaare enthält – in konkurrenzfähiger Zeit auswerten zu können. Für eine Zielsetzung von 24 Stunden entspricht dies noch immer einer Datenrate von 37000 Basen pro Sekunde, oder 27 Mikrosekunden pro Basenpaar, was vermutlich nur durch eine hohe Parallelisierung von Ausleseprozessen zu erreichen ist.

Trotz (und wegen) dieser enormen Herausforderungen, gibt es dennoch kontinuierliche Fortschritte bei der Nanoporensequenzierung, sowohl von akademischen Forschungsgruppen, als auch von Wirtschaftsunternehmen wie z.B. IBM, Roche oder Oxford Nanopore Technologies. Erste kommerzielle Protein-Poren-Sequenziermaschinen sind bereits erhältlich um DNA- und RNA-Fragmente sowie Proteine zu analysieren [55,56]. Auch RNA-Sequenzen [57] und epigenetische Methylierungszustände von DNA-Abschnitten [58], welche das Ablesen oder Ignorieren bei der DNA-Transkription steuern und bei Krebs- und Autoimmunerkrankungen wichtig sein können [59], lassen sich bereits mit Nanoporen-Technik untersuchen, so dass die erfolgreiche Sequenzierung eines menschlichen Genoms unter den genannten Zielsetzungen für Dauer und Preis mit hoher Wahrscheinlichkeit in naher Zukunft möglich und kommerziell erhältlich sein wird.

Herstellung von Nanoporen

Bei Experimenten mit Nanoporen kann grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Arten von Poren unterschieden werden:

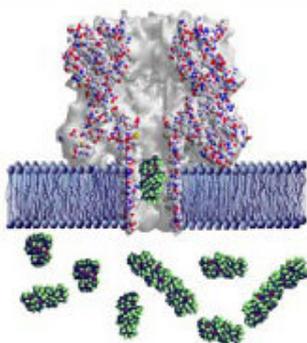


Abbildung 6: α -Hemolysin Pore in einer Lipid-Doppelschicht. Aus [60]

Protein-Nanoporen lassen sich nutzen, indem natürlich (z.B. in Bakterien) vorkommende Proteine in eine freistehende Lipid-Doppelschicht eingebracht werden um dort eine Nanopore als Kanal zwischen den zwei durch die Lipidschicht getrennten Reservoirs zu formen, wie in Abbildung 6 dargestellt ist [60]. Dabei ist es mittlerweile möglich, die Proteine und damit die Eigenschaften der Poren auch weiter anzupassen, indem die Bakterien durch Mutagenese zur Ausbildung modifizierter Proteine gebracht werden, die in dieser Art nicht natürlich

vorkommen würden. So lassen sich durch das Austauschen von einzelnen Aminosäuren der Proteine z.B. elektrische Ladungen und hydrophile oder hydrophobe Eigenschaften der Poren verändern [61] oder Bindungsstellen für Zielmoleküle bereitstellen. Das bekannteste und am häufigsten verwendete Protein ist hierbei das vom *Staphylococcus aureus* produzierte α -Hemolysin, doch auch viele andere porenformende Transmembranproteine (die sogenannten Porine) wie z.B. MspA, OmpF (engl.: *outer membrane protein F*) und OmpC werden je nach Anwendung direkt oder modifiziert für die verschiedensten analytischen Experimente verwendet [62,63]. Allen Porinen ist hierbei gemein, dass sie eine relativ kleine Pore (ca. 1,5 nm Durchmesser) formen, durch die nur einzelsträngige DNA oder RNA passieren kann. Darüber hinaus benötigen sie stets eine intakte Lipid-Doppelschicht, was gerade für Langzeitexperimente eine Herausforderung darstellt.

Oftmals weit stabiler gegenüber thermischen, elektrischen, chemischen und mechanischen Einflüssen sind dagegen Festkörper-Nanoporen. Bei diesen lassen sich zudem die Porengeometrien über einen viel größeren Bereich anpassen, die Materialien frei wählen und die Oberflächen beliebig chemisch oder biologisch modifizieren [64]. Als Träger für die Pore dient zumeist, wie auch in dieser Arbeit, ein kleiner (in der Halbleiterindustrie in Massen gefertigter und deswegen leicht erhältlicher) Siliziumchip (Abbildung 7) von ca. 3 mm Durchmesser und 200 μm Dicke, auf dessen Unterseite eine typischerweise 10 bis 400 nm dünne Membran eines elektrisch isolierenden Materials wie Siliziumnitrid, Siliziumdioxid oder Aluminiumoxid aufgetragen ist. In das Silizium wird ein trichterförmiger Zugang zu dieser Membran geätzt, so dass sich in der Chipmitte ein freistehendes Membranfenster ergibt, in das die Nanopore gebohrt werden kann.

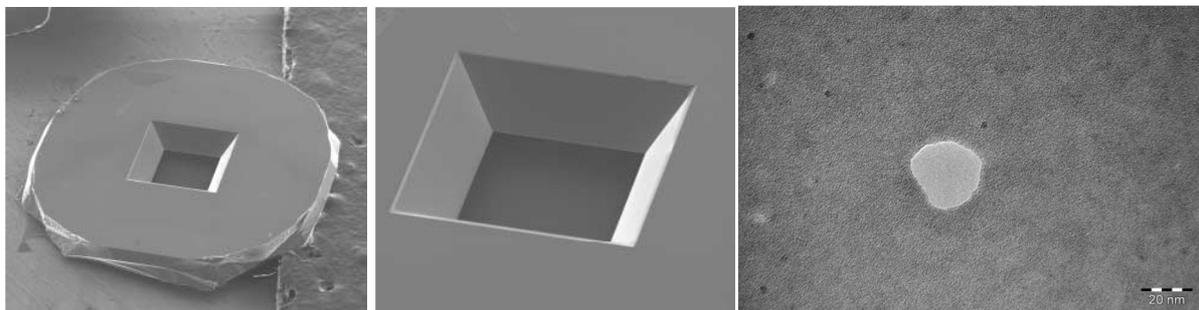


Abbildung 7: Siliziumchip mit geätztem trichterförmigem Zugang zum Membranfenster aus Siliziumnitrid, sowie dort hinein gebohrte Nanopore (SEM bzw. TEM-Aufnahme des Herstellers).

Zum Bohren wird entweder ein fokussierter Elektronenstrahl oder ein Ionenstrahl aus Gallium-, Argon- oder Helium-Ionen benutzt. Alle Techniken bieten hierbei diverse Vor- und Nachteile, die je nach Anwendungsgebiet im Voraus abgewogen werden müssen. Mit hochenergetischen Elektronenstrahlen lassen sich so z.B. aufgrund der guten Fokussierbarkeit besonders kleine Nanoporen bis hinunter zu 1 nm Durchmesser erzeugen, da die Membran während des Beschusses zum Teil verflüssigt wird und ein anfänglich größer gebohrtes Loch so gezielt zugeschmolzen werden kann [65]. Ionenstrahlen dagegen erlauben eine höhere Flexibilität was Dimensionen und Materialien der Membranen angeht, sie ätzen das Membranmaterial viel schneller und erzeugen dabei eher konisch geformte Poren, während der Elektronenstrahl trichterförmige, bzw. Sanduhr-förmige Poren erzeugt [66,67]. Auch die Eigenschaften der Porenoberfläche unterscheiden sich, wenn z.B. beim Ionenbeschuss die

Oberfläche aufgeladen oder Ionen zusätzlich eingebaut werden. Mit Gallium-Ionen sind so bisher Poren-Durchmesser bis hinunter zu 10 bis 20 nm [68] und mit Helium-Ionen bis zu 4 nm möglich [69].

Neben den beiden vorgestellten hauptsächlich verwendeten Arten von Nanoporen gibt es darüber hinaus auch viele Spezialanwendungen und neue Materialien oder Hybridsysteme, wie Graphenporen [70], Glaskapillaren mit Nanometeröffnungen [71,72], mit Lipiden [73] oder Proteinen [43] beschichtete Festkörper-Nanoporen, aus gefalteter DNA hergestellte Poren [74] („DNA-Origami“), biomimetische Kernporen [30] und viele weitere.

2.3. Biomoleküle

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit für Einzelmolekül-Experimente verwendeten Biomoleküle sowie deren Eigenschaften einführend vorgestellt werden. Hierzu zählen Nukleinsäuren wie die DNA, eine Vielzahl von DNA-bindenden Proteinen, sowie darüber hinaus verschiedenartig verwendete weitere Proteine und Lipide.

2.3.1. DNA

Die DNA (engl.: *deoxyribonucleic acid* oder deutsch: Desoxyribonukleinsäure) ist ein sehr langes biologisches Kettenmolekül. Sie kommt bis auf wenige Ausnahmen in jeder einzelnen Zelle in allen Lebewesen vor und dient als Langzeitspeicher für die Gesamtheit an Erbinformationen eines Organismus, indem sie die Anleitung zum Aufbau von weiteren Ribonukleinsäuren und Proteinen in kodierter Form enthält. Der Aufbau und die korrekte Funktion von lebenden Organismen, sowie deren ablaufende Stoffwechselfvorgänge, sind damit essentiell abhängig vom fehlerfreien Kopieren, Dekodieren und Umsetzen der in der DNA gespeicherten Informationen, so dass die DNA selbst, sowie alle an DNA bindenden und mit ihr interagierenden Biomoleküle (die sogenannten Liganden) ein wesentlicher Bestandteil biophysikalischer und medizinischer Forschung sind.

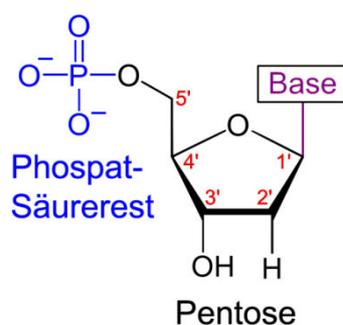


Abbildung 8: Nucleotidbaustein der DNA bestehend aus Zucker, Phosphat-Säurerest und Base

Bereits im Jahre 1953 wurden die strukturellen Eigenschaften der DNA von den Forschern James Watson und Francis Crick aufgeklärt, wofür sie 1962 den Nobelpreis der Medizin erhielten [75]. Sie entdeckten, dass DNA aus zwei langen Kettensträngen besteht, die sich in Form einer Doppelhelix antiparallel umeinander winden. Jeder der beiden Einzelstränge ist dabei ein Polymer aus einzelnen, aneinander gereihten Kettengliedern, den sogenannten Nucleotiden, die selbst wiederum aus drei verschiedenen Bausteinen bestehen (vgl. Abbildung 8). Der namensgebende Pentose-Zuckerring (die Desoxyribose) besteht hierbei aus fünf

Kohlenstoffatomen, welche der Reihe nach mit den Bezeichnungen 1' bis 5' durchnummeriert werden. An das 5'-Kohlenstoffatom ist ein negativ geladener Phosphatsäurerest angebinden und an das 1'-Kohlenstoffatom eine von vier möglichen Basen. Dies kann entweder eine Purin-Base in Form von Adenin (A) oder Guanin (G) sein, oder eine der beiden Pyrimidin-Basen Thymin (T) oder Cytosin (C).

Die Aneinanderreihung der einzelnen Nukleotid-Bausteine zu einem polymeren DNA-Einzelstrang geschieht, indem die am 3'-Kohlenstoffatom der Pentose angebundene OH-Gruppe eine Phosphodiesterbindung mit dem am 5'-Atom gebundenen Phosphatsäurerest des benachbarten Nukleotids eingeht. Aufgrund der eingeführten Bezeichnungen ist es zudem möglich auf dem sich so bildenden Einzelstrang eine ausgewiesene Richtung eindeutig anzugeben (z.B. vom 3'- zum 5'-Ende). Zur Bildung eines stabilen Polymers lagert sich, wie in Abbildung 9 dargestellt [76], ein zweiter polymerer Einzelstrang an den ersten an. Dieser verläuft antiparallel (in diesem Beispiel also vom 5'- zum 3'-Ende) und wird durch die Bildung von Basenpaarungen mit dem anderen Einzelstrang verknüpft. Die erlaubten Basenpaarungen beschränken sich hierbei jedoch auf die Bindung von Adenin mit Thymin, die von zwei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird, sowie auf die Bindung von Guanin mit Cytosin, welche drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Der zweite Strang enthält aufgrund dieser Beschränkungen also genau den „Negativ-Abdruck“ der Basensequenz des ersten Stranges. Diese Sequenz bildet den Informationsspeicher der DNA, wobei für die spätere Umsetzung in Proteine jeweils drei aufeinanderfolgende Basenpaare (ein „Triplet“) die Kodierung für eine bestimmte Aminosäure darstellen [77].

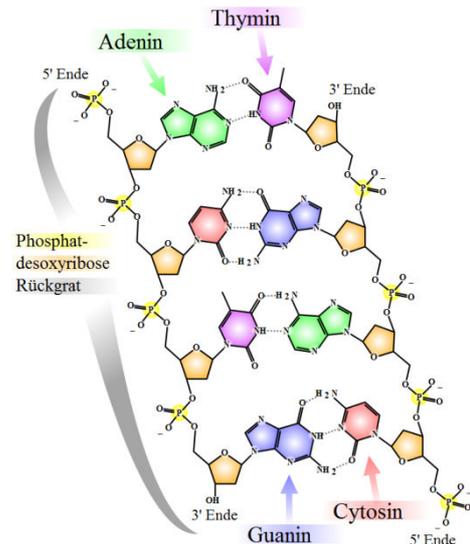


Abbildung 9: Chemische Struktur eines DNA-Doppelstranges, mit negativ geladenem Rückgrat und Basenpaarung. Quelle: [76]

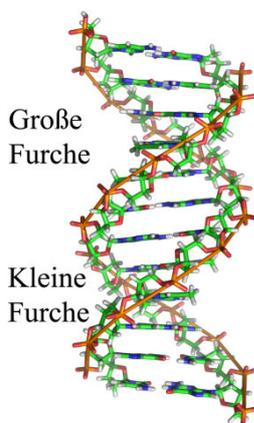


Abbildung 10: B-DNA. Quelle: [78]

Unter physiologischen Bedingungen formieren sich die beiden Einzelstränge zu der in Abbildung 10 gezeigten Doppelhelix-Struktur [78], die als B-DNA bezeichnet wird. Die beiden Einzelstränge werden durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen sowie durch das Aufeinanderstapeln (engl.: *base stacking*) der sich ausbildenden Basenpaare aneinander stabilisiert [79]. Die schraubenförmige Doppelhelix besitzt einen Durchmesser von etwa 2,4 nm, ist rechtsgängig, vollführt alle 3,4 nm eine vollständige Drehung und schließt dabei 10,4 Basenpaare mit ein, so dass diese einen Abstand von 0,33 nm voneinander haben [80]. Das nach außen zeigende Rückgrat der DNA wird von den sich abwechselnden Pentose-Ringen und Phosphat-Säure-Resten gebildet und ist aufgrund der negativen Ladung der Phosphate mit zwei Elektronen pro Basenpaar selbst stark negativ geladen. Es schließt die fast senkrecht zur Drehachse stehenden Basenpaar-Stapel ein, wobei sich aufgrund dieser

Konformation jedoch (als kleine und große „Furche“ bezeichnete) Bereiche ergeben, in denen die Basen nicht vollständig vom Rückgrat abgedeckt sind. Diese 2,2 nm bzw. 1,2 nm großen Gebiete [81] sind eine häufige Bindungsstelle für DNA-bindende Stoffe.

Neben der beschriebenen B-DNA treten seltener auch die beiden anderen bekannten Konformationen A-DNA und Z-DNA auf, wenn zum Beispiel bei Dehydration oder in besonders G-C-reichen Abschnitten stärkere Knicke oder Verzerrungen der oben gezeigten Dimensionen der Doppelhelix auftreten [82,83].

Kraftspektroskopie an DNA

Trotz der Eigenabstoßung des DNA-Rückgrats aufgrund der starken negativen Ladung liegt die DNA in Lösung nie als ausgestreckte Kette vor. Zum einen sorgen die Stöße mit den Umgebungsmolekülen und andere entropische Effekte dafür, dass sie sich zunächst statistisch zusammenknäult, zum anderen sorgen in lebenden Organismen eine Vielzahl von Helferproteinen (wie z.B. Histone) für eine möglichst dichte Packung. Anders würde ein DNA-Doppelstrang auch kaum in jede einzelne Zelle passen, da seine enorme Länge – beim Menschen z.B. um die zwei Meter – den Zelldurchmesser um mehrere Größenordnungen übersteigt. Die DNA muss also für die verschiedensten physiologischen Vorgänge z.B. gepackt, entfaltet, die Helix entwunden, linearsiert oder in Einzelstränge aufgetrennt werden, während die dabei beteiligten Proteine die dafür nötigen mechanischen Kräfte aufbringen oder funktionell überwinden müssen. Eine nähere Untersuchung der Stabilität und rein mechanischen Eigenschaften von DNA (oder DNA-Ligand-Komplexen) ist also sowohl für das Verständnis der ablaufenden biologischen Prozesse als auch für die verschiedensten medizinischen oder biotechnologischen Anwendungen von hohem Interesse und lässt sich z.B. durch die Kraftspektroskopie bewerkstelligen.

Hierfür werden beide Enden eines DNA-Doppelstranges an zwei unterschiedlichen Mikrokügelchen oder Oberflächen immobilisiert, woraufhin durch unterschiedliche Methoden der End-zu-End-Abstand des Stranges vergrößert und die dafür benötigten Kräfte gemessen werden können. Für hohe Kräfte oder Ortsauflösungen eignet sich dabei besonders die Rasterkraftmikroskopie (vgl. Kapitel 2.8.). Dagegen bietet die Optische Pinzette (vgl. Kapitel 2.1.) eine hohe und sensitive Kraftauflösung, sowie den Vorteil sich mit den Mikrokügelchen meist in allen drei Raumdimensionen sowie auch unter wässrigen Pufferlösungen frei bewegen zu können. Werden stattdessen neben der Elastizitätsuntersuchung auch Informationen über die Torsionskräfte oder Windungen der DNA-Doppelhelix benötigt, bietet sich die Magnetische Pinzette an, mit welcher die Kügelchen gezielt gedreht und die rückstellenden Kräfte auch gemessen werden können [84].

In Abbildung 11 wurde so ein Kraftspektroskopie-Experiment mit der Optischen Pinzette an λ -DNA von 16,4 μm Konturlänge (wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wird) durchgeführt. Der im statistischen Knäuel vorliegende DNA-Doppelstrang wurde zwischen zwei Mikrokügelchen immobilisiert, welche anschließend langsam voneinander entfernt wurden um dabei den Abstand zwischen ihnen und die ausgeübten Kräfte zu messen. Es ergibt sich eine sehr typische Kurvenform, die zunächst mit einem steilen Anstieg der Kraft-Abstands-Kurve beginnt, bis die Konturlänge der DNA erreicht wird. Dieser Bereich ist von

der Entropie bestimmt, was bedeutet, dass die aufzuwendenden Kräfte jener Energie entsprechen, die dem Gesamtsystem (DNA und Umgebungsmoleküle) zugeführt werden muss um die Entropie zu verringern. Anschaulich betrachtet ist dies also das Ausstrecken oder Entwirren der DNA entgegen ihrem Bestreben als entropisch günstigeres statistisches Knäuel vorzuliegen.

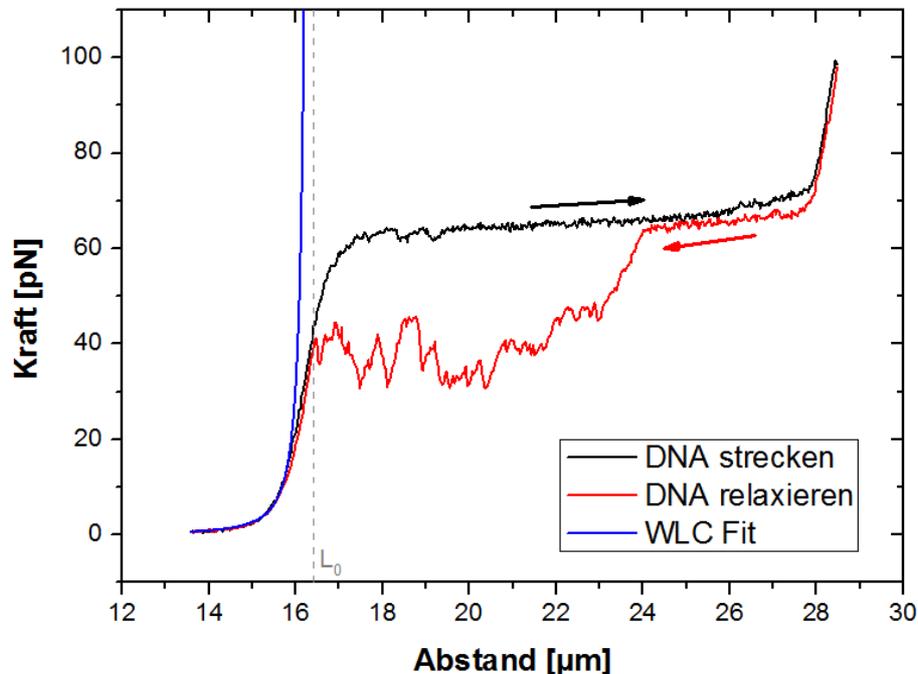


Abbildung 11: Kraftspektroskopie-Experiment an DNA mit deutlichem Kraftplateau und Hysterese zwischen Streckung und Relaxation

An diesen ersten Anstieg schließt sich ein Kraftplateau an, bei welchem sich die DNA bis auf das 1,7-fache ihrer Konturlänge überstreckt, ohne dass die dafür aufzuwendende Kraft signifikant weiter steigen würde. In diesem Bereich wird das Verhalten der DNA hauptsächlich von der Enthalpie bestimmt und damit vom Aufreißen intramolekularer Bindungen und Konformationsänderungen, was auch als Schmelzen bezeichnet wird. Das genaue Verhalten der DNA auf diesem Kraftplateau war über viele Jahre hinweg Gegenstand intensiver Forschung und wurde erst jüngst unter anderem durch Forschungsgruppen um Erwin Petermann oder Yan Jie aufgeklärt [85–87]. Demnach ist die genaue Höhe des Plateaus von der Geometrie der Immobilisierung abhängig: Ist nur jeweils einer der beiden Doppelstränge der DNA-Doppelhelix am jeweiligen Mikrokügelchen direkt befestigt, so liegt es bei etwa 65 pN, erfolgt die Immobilisierung an den beiden Kügelchen jedoch jeweils über das Anbinden beider Einzelstränge (so dass an beiden Kügelchen sowohl das 3'-Ende als auch das 5'-Ende der DNA-Doppelhelix fest verknüpft sind), liegt das Plateau dagegen bei etwa 110 pN. Ferner konnten sie zeigen, dass während des Plateaus die doppelsträngige DNA graduell in eine oder mehrere von drei möglichen, in Abbildung 12 dargestellten Formen übergeht [88]: Ausgehend von eventuell vorhandenen Fehlstellen in der kovalenten Verknüpfung des DNA-Rückgrats (also von Strangbrüchen eines Einzelstranges, engl.: *nicks*), oder von den freien, nicht immobilisierten Enden, kann einer der beiden Einzelstränge nach und nach abschmelzen, so dass nur noch ein intakter Einzelstrang (engl.: *single stranded*

DNA: *ssDNA*) verbleibt. Gleichsam ist es möglich (wenn keine Defekte vorliegen), dass sich wachsende Domänen (engl.: *melting bubbles*) ergeben, in denen zwei Einzelstränge koexistieren ohne jedoch miteinander noch durch Wasserstoffbrücken verbunden zu sein. Als dritte Möglichkeit kann die DNA in eine neue, hochgeordnete, überstreckte Form übergehen, in welcher der Doppelstrang zwar entwunden wird aber die Basenpaarungen erhalten bleiben, was als S-DNA bezeichnet wird. In welchem Umfang und Verhältnis diese drei beschriebenen Konformationsänderungen beim Überstrecken genau auftreten, ist dabei sowohl von der Stabilität der DNA selbst als auch von äußeren Parametern abhängig.

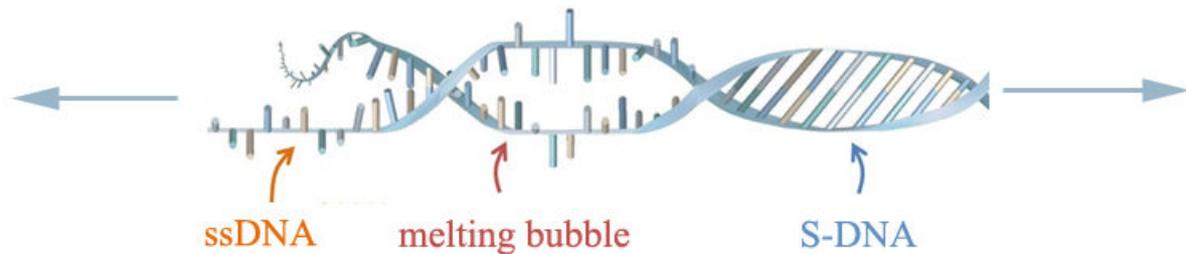


Abbildung 12: Die drei möglichen Konformationsänderungen der DNA, die während des Überstreckens im Kraftplateau auftreten können. Frei nach [88]

Wird nun über das Plateau hinaus überstreckt, so liegt meist nur noch ein intakter DNA-Einzelstrang vor, welcher entwunden ist und seine Konturlänge erreicht hat, so dass nun der zweite steile Anstieg in der Kraft-Abstands-Kurve folgt. Ab hier verhält sich die Überstreckungskurve der λ -DNA genauso, wie die äquivalente Streckkurve einer einzelsträngigen DNA. Ein noch weiteres Strecken führt nun häufig zum Ab- oder Durchreißen des noch intakten Stranges, wobei in seltenen Fällen auch noch ein zweites, kleineres Plateau beobachtet werden kann, wenn die chemischen Bindungen der einzelsträngigen DNA aufgedehnt werden. Relaxiert man dagegen die DNA anstatt sie abreißen zu lassen, so folgt die Relaxationskurve in weiten Teilen genau der Überstreckungskurve. Allein im Bereich des Kraftplateaus ergibt sich eine beobachtbare Hysterese, bei welcher die beiden Einzelstränge durch erneutes Ausbilden der Basenpaarungen zu einer intakten Doppelhelix rekombinieren.

Die genaue Form der Überstreckungskurve hängt sowohl im entropischen als auch im enthalpischen Bereich von vielen Faktoren ab, wie z.B. pH-Wert, Ionenkonzentration und Temperatur der Pufferlösung, Streckgeschwindigkeit, Art der Basenpaare usw., ist bei gleichen Bedingungen jedoch stets sehr gut reproduzierbar. Genau diese Eigenschaft kann man sich in kraftspektroskopischen Untersuchungen zu Nutze machen, indem die Streckkurve als Sensor für die Messung der beeinflussenden Parameter benutzt wird. Unter anderem verändern an die DNA bindende Liganden die Kurven sehr spezifisch [89], und abhängig von der Art und Weise der Anbindung, so dass man z.B. auch bei unbekanntem Liganden (wie im zweiten Teil des Experimentalteils dieser Arbeit) allein aus den Streckkurven bereits Aussagen über ihr Bindungsverhalten ableiten kann.

Während der enthalpische Bereich Aussagen über die inneren Bindungen und Konformationsänderungen des DNA-Moleküls erlaubt, und theoretisch über das thermodynamische Aufschmelzen der Bindungen modelliert werden muss [87], liefert der

entropische Bereich hauptsächlich Aussagen über die Steifigkeit, Länge und bevorzugte Konformation der DNA in Pufferlösung, ohne dass kraftinduzierte intramolekulare Struktur-Veränderungen auftreten. Für diesen Bereich des ersten Anstiegs in der Kraft-Abstands-Kurve (unterhalb der Konturlänge des Moleküls) gibt es mehrere theoretische Modelle:

- Das FJC-Modell (engl.: *freely jointed chain*) geht von einem Polymer aus N gleichartigen Monomeren der Länge l_0 aus. Diese sind starr, können sich nicht gegenseitig beeinflussen und erlauben zudem jeden beliebigen Bindungswinkel zwischen benachbarten Kettengliedern. Die Selbstverdrängung, die es zwei Kettengliedern verbieten würde den gleichen Raum einzunehmen, ist in diesem theoretischen Modell noch nicht berücksichtigt, so dass die Kette einen statistischen „random walk“ vollführt.
- Das FRC-Modell (engl.: *freely rotating chain*) schränkt einen Bindungswinkel zwischen benachbarten Kettengliedern ein, so dass der Kette eine gewisse Flexibilität und Elastizität zugeordnet werden können.
- Das WLC-Modell (engl.: *worm-like chain*) verkürzt die Kettenglieder zudem durch Aufstellen der Bedingung $l_0 \rightarrow 0$, so dass das Polymer als kontinuierlich flexibel angenommen werden kann und keine starren Glieder mehr besitzt.

Zur Beschreibung relativ steifer und sehr langer Polymere (wie z.B. DNA) ist das WLC-Modell am besten geeignet, so dass es für den entropischen Bereich der DNA-Streckkurve bevorzugt zur theoretischen Beschreibung verwendet wird.

Aus dem Worm-Like-Chain-Modell kann schließlich eine Interpolationsformel hergeleitet werden [90,91], welche das Kraft-Abstands-Verhalten sowohl für den Bereich kleiner Kräfte und Streckungen (in dem die DNA noch statistisch geknäult ist) als auch im Bereich hoher Kräfte (in welchem sich der End-zu-End-Abstand der Konturlänge annähert) gut beschreibt:

$$F = \frac{k_B T}{l_P} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_0}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right] \quad (6)$$

Der linke Term in der Klammer steht hierbei für große Kräfte, der mittlere und rechte Term für kleine Kräfte F , die zum Ausstrecken des Polymers auf den End-zu-End-Abstand x aufgewendet werden müssen. $k_B T$ ist die thermische Energie, L_0 die Konturlänge und l_P die sogenannte Persistenzlänge. Sie kann verstanden werden als derjenige Abstand, über den die Orientierung der Kette korreliert bleibt, sich also nicht wesentlich ändert, und ist damit ein Maß für die Biegesteifigkeit des Polymers. Bei DNA ist sie unter anderem von der Ionenkonzentration der umgebenden Pufferlösung abhängig: Hohe Konzentrationen führen zu einer starken Abschirmung der negativen Ladungen des Rückgrats und damit zu einer geringeren Selbstabstoßung, also kleineren Persistenzlänge und Steifigkeit. Niedrige Ionenkonzentrationen dagegen bewirken eine größere Steifigkeit der DNA, wobei unter physiologischen Bedingungen von einer Persistenzlänge von etwa 50 nm ausgegangen wird [92].

In Abbildung 11 wurde die Formel (6) für das rein entropische Streckverhalten von DNA nach dem WLC-Modell in blau mit angefitet. Es liefert als Fitparameter sowohl die

Konturlänge L_0 der DNA (welcher sich das Modell asymptotisch annähert) als auch die Steifigkeit in Form der Persistenzlänge l_p (welche im Modell über die Schärfe und Höhe des Knickes der Kurve entscheidet). Zu erkennen ist darüber hinaus, dass nach dem Modell die DNA stets leicht verknäult vorliegt und damit eine geringere Ausdehnung als ihre eigentliche Konturlänge aufweist (diese wird erst bei unendlich großen Kräften erreicht), so dass man sich für zufriedenstellende Resultate beim Anfitten meist auf den Bereich kleiner Kräfte (z.B. unterhalb von 10 pN) beschränkt in welchem die gemessene Streckkurve noch nicht von enthalpischen Beiträgen beeinflusst wird.

2.3.2. Proteine

Ähnlich wie die vorgestellte DNA sind auch Proteine zumeist sehr lange biologische Kettenmoleküle. Sie steuern den Großteil der physiologischen Funktionen eines Organismus, wie z.B. den strukturellen Aufbau, den Metabolismus durch die enzymatische Katalyse von chemischen Reaktionen, den Stofftransport, die Immunantwort, die Reparatur, Ver- und Entpackung, Replikation und Transkription von DNA, den Signaltransport in und zwischen Zellen und viele weitere. Die einzelnen Kettenglieder bestehen hierbei aus jeweils einer von 22 proteinogenen Aminosäuren [93], welche (bis auf zwei Ausnahmen) alle in der Sequenz der DNA eines biologischen Organismus direkt durch Basentriplets kodiert sind und über Peptidbindungen miteinander zu längeren Polypeptiden bzw. Proteinen verknüpft werden. Natürlich vorkommend gibt es darüber hinaus noch eine große Anzahl weiterer Aminosäuren mit biologischer Wirkung, von denen bisher ca. 500 bekannt sind [94], die jedoch nicht zum Aufbau von Proteinen beitragen. Auch synthetisch erzeugte Aminosäuren und rein theoretisch konstruierbare Formen gibt es in hoher Anzahl.

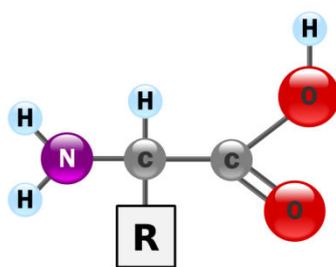


Abbildung 13: Aufbau von Aminosäuren. Aus [95]

Der allgemeine strukturelle Aufbau so einer proteinogenen Aminosäure ist in Abbildung 13 dargestellt [95]: An ein zentrales Kohlenstoffatom (C) schließen sich eine Carboxygruppe (-COOH), ein Wasserstoffatom (-H), die namensgebende Aminogruppe (-NH₂) und eine Seitenkette (Restgruppe: -R) an, in welcher sich die einzelnen Aminosäuren unterscheiden. Diese Restgruppe kann dabei sehr einfach aufgebaut sein und z.B. nur ein einzelnes Wasserstoffatom (-H) enthalten wie bei der Aminosäure Glycin, oder eine komplexere Form aufweisen und längere Kohlenwasserstoffketten oder aromatische Ringe beinhalten, wie z.B. bei Phenylalanin oder Tryptophan. Die Art

der Seitenkette entscheidet sehr wesentlich über die chemischen und physikalischen Eigenschaften (und damit biologischen Wirkweisen) der Aminosäuren, wie z.B. über die Polarität, Hydrophobizität, das Säure-Base-Verhalten usw.

Die Verknüpfung einzelner Aminosäuren zu einem Polypeptid (bei weniger als 100 Aminosäuren) oder Protein (bei mehr als 100 Aminosäuren) erfolgt, indem unter Wasserabspaltung die Aminogruppe (-NH₂) der ersten und die Carboxygruppe (-COOH) der nächsten Aminosäure eine Amid-Bindung (-NH-CO- + H₂O) eingehen, die auch als Peptid-Bindung bezeichnet wird. Für die biologische Funktion der Proteine ist jedoch zumeist nicht

die Sequenz der Aminosäuren (Primärstruktur) direkt, sondern vor allem die dreidimensionale räumliche Struktur des gesamten Proteins verantwortlich, da häufig (z.B. bei Immunantworten oder hormonellen Ligand-Rezeptor-Reaktionen) sehr spezifische räumliche Bindungstaschen zur Erkennung der Zielmoleküle nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ ausgebildet werden müssen. Oft gibt man deswegen ebenfalls Auskunft über die höher geordneten räumlichen Strukturen: Die Sekundärstruktur bezeichnet die wiederkehrenden räumlichen Muster, zu denen sich Aminosäuren (durch Ausbilden von Wasserstoffbrücken zwischen unterschiedlichen Peptidbindungen) besonders häufig zusammenlagern, wie z.B. α -Helix (der Aminosäure-Strang windet sich in einer Spirale, ähnlich wie bei DNA), β -Faltblatt (mehrere Strangabschnitte bilden nebeneinander gelagert eine zickzack-gefaltete Blattstruktur), β -Schleife usw. Die Tertiärstruktur beschreibt schließlich die genaue dreidimensionale Struktur des gesamten Stranges (also das genaue Zusammenlagern der Motive der Sekundärstruktur) und wird bestimmt durch die Wechselwirkung der Seitenketten, hydrophobe Effekte, ionische Bindungen, Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Kräfte. Lagern sich nun mehrere, fertig gefaltete Peptidketten gleicher (homomerer) oder unterschiedlicher (heteromerer) Art, auch noch untereinander zusammen um größere Proteinkomplexe zu formen, so bezeichnet man dies als Quartärstruktur.

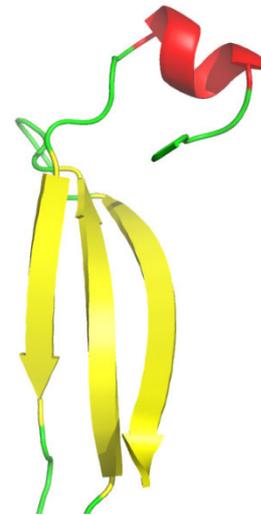


Abbildung 14: Proteinrückgrat in Cartoon-Darstellung mit den Motiven α -Helix (rot), antiparalleles β -Faltblatt (gelb) und ungeordneten Strangabschnitten (grün). Erstellt mit PyMOL.

Zu beachten ist hier, dass die höheren Strukturen und alle Eigenschaften natürlich bereits eindeutig von der Primärstruktur in der Aminosäuresequenz vorgeschrieben sein müssen. So sorgen z.B. Abschnitte mit eher hydrophoben Aminosäuren aufgrund entropischer Effekte für die Bildung von Aggregaten, die sich dann anhand der Oberflächeneigenschaften weiter falten usw. Eine genaue theoretische Vorhersage der Gesamtstruktur eines Proteins allein aus seiner Primärsequenz ist jedoch zumeist noch sehr schwierig, so dass die Untersuchung des Einflusses einzelner Aminosäuren auf die Form und Funktion des Gesamtproteins, sowie gezielte Modifikationen der Aminosäuren, ein sehr aktuelles Forschungsgebiet bieten. Besonders auch deswegen, da Fehlfaltungen von Proteinen aufgrund der fehlenden oder gar toxischen biologischen Aktivität zu einer Vielzahl von sehr ernstesten Erkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, BSE, Mukoviszidose, oder zu bestimmten Krebsarten führen können [96], wobei die Gründe und Auslöser für die Fehlfaltungen jedoch meist noch nicht bekannt sind.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Proteine sowie deren strukturelle Eigenschaften kurz eingeführt werden:

RecA

Das DNA-bindende Protein RecA entstammt dem Bakterium *E. coli*, doch analoge Proteine gibt es in fast jedem Organismus, wobei sie stets Aufgaben der DNA-Instandhaltung und Schadensreparatur übernehmen. Ein Monomer dieses Proteins besteht aus ca. 350 Aminosäuren, mit einem Gesamtgewicht von 38 kDa und besitzt Bindungsstellen für einzel- und doppelsträngige DNA, für ATP (Adenosintriphosphat) und ATP-Analoga [97].

Bindet während der DNA-Reparatur ein Monomer an einen DNA-Strang, was bevorzugt an Strangbrüchen oder einzelsträngiger DNA geschieht, so erfolgt (unterstützt durch eine Aktivierung mit ATP) von dieser Bindungsstelle aus eine Polymerisation mit weiteren Monomeren, so dass sich ein wachsendes Rec-Filament (mit Vorzugsrichtung vom 5'- zum 3'-Ende) ergibt, welches die DNA umhüllt [98]. Dieses Filament erlaubt durch die zusätzliche Bindung und korrekte Ausrichtung eines weiteren DNA-Stranges den Austausch beschädigter DNA-Abschnitte durch intakte Regionen des homologen Stranges, was in Abbildung 15 dargestellt ist [99].

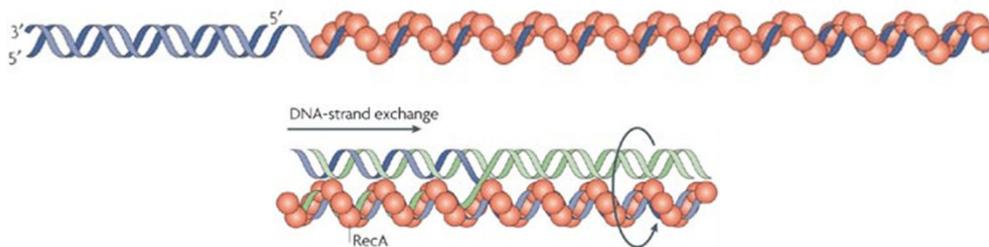


Abbildung 15: Beschichtung von DNA mit einem langen RecA-Filament (oben) sowie Reparatur durch Strangaustausch mittels Bindung und Ausrichtung einer zweiten DNA (unten). Aus [99]

Die komplette Beschichtung eines DNA-Stranges mit einem polymeren RecA-Filament führt zu einem Anwachsen des effektiven Durchmessers auf etwa 7,5 nm [37], sowie zu einer Zunahme der Konturlänge um 50% und der negativen Linienladungsdichte um 90% [46,100,101].

Besonders für medizinische Anwendungen ist die Erforschung der Eigenschaften von RecA oder analogen Proteinen interessant, da es für die DNA-Reparatur in vielen Bakterien verantwortlich ist und eine Hemmung oder Beeinflussung seiner Funktion z.B. die Wirksamkeit von Antibiotika erheblich erhöhen könnte [102].

EcoRI

Das Protein EcoRI ist eine Endonuklease und wurde – ähnlich wie die meisten Nukleasen – nach seiner ursprünglichen Entdeckung benannt: Es stammt es aus dem Bakterium *Escherichia coli* des Stammes R und stellt die erste (I) entdeckte Nuklease dieses Organismus dar. Dem Bakterium dient es zur Abwehr und Entfernung von durch Phagen eingebrachter Fremd-DNA. Im Gegensatz zu Exonukleasen, die an ein Strang-Ende von DNA binden und dort den Abbau der DNA beginnen können, bindet EcoRI abseits der Enden und kann

daraufhin einen internen Schnitt im DNA-Rückgrat induzieren. In seiner Funktion als Restriktionsenzym bindet EcoRI dabei zunächst unspezifisch an den DNA-Strang, wandert diesen durch Diffusion entlang, bis von der erkennenden Domäne des Proteins die Basensequenz GAATTC auf der DNA festgestellt wird [103]. An diesem Ort erfolgt durch Konformationsänderung eine spezifische Bindung und das katalytische Zentrum der Restriktionsdomäne des Proteins vollführt zwei Schnitte in unterschiedlichen Bereichen des Rückgrats der beiden DNA-Einzelstränge, was in Abbildung 16 gezeigt ist. Nach dem Schneiden kann es daraufhin entweder vom Strang dissoziieren oder durch Diffusion zur nächsten Erkennungssequenz wandern.



Abbildung 16:
Erkennungssequenz und
Schnittposition (rot) von EcoRI

Durch den versetzten Schnitt wird ein Überhang („sticky end“ oder auch „klebriges Ende“) von vier Basenpaaren am 5'-Ende der DNA erzeugt, was ein besonders leichtes Zusammensetzen mit Schnittstellen anderer Stränge erlaubt. Dieser einfache und gezielte Zusammenbau bekannter DNA-Abschnitte ist dabei von so entscheidender Bedeutung für die Biotechnologie, dass

für die Entdeckung und Verwendung von Restriktionsenzymen wie EcoRI im Jahre 1978 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde.

Der genaue Aufbau des Proteins ist in Abbildung 17 dargestellt [104]: Es besteht aus einem Homodimer, also zwei identischen Untereinheiten, die jeweils aus 276 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 31 kDa zusammengesetzt sind. Die aktiven Zentren dieser globulären Monomere weisen sowohl α -Helizes als auch β -Faltblätter auf, mit zwei Bindungsstellen für Mg^{2+} -Ionen, während eine herausragende Schlaufe des Peptidrückgrats sich um die DNA windet und so eine Bindung mit dieser vermittelt.

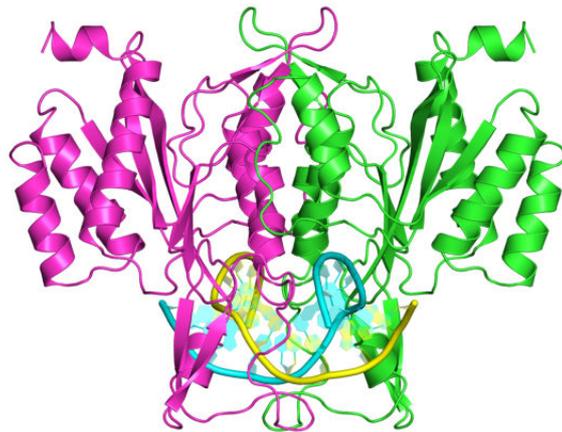


Abbildung 17: Homodimer (pink und grün) von EcoRI an DNA-Doppelstrang (gelb und blau). Quelle: [104]

Es wird davon ausgegangen, dass die Schneidefunktion von den bindenden Magnesium-Ionen aktiviert wird, während z.B. die Bindung von Ca^{2+} -Ionen zu einer spezifischen Bindung ohne anschließendem Schneiden führen kann [105]. Ferner ist mittlerweile auch eine verminderte Selektivität für die Erkennungssequenz beobachtet worden („Star-Aktivität“), bei welcher unter bestimmten Bedingungen (wie zu hohem pH-Wert oder zu niedriger Ionenstärke der Pufferlösung) auch ein festes Anbinden und/oder Schneiden abseits der spezifischen Bindungsstellen erfolgt [106].

Topoisomerase

Als Topoisomerasen bezeichnet man Enzyme, die in der Lage sind die räumliche Struktur (Topologie) von DNA zu beeinflussen, die atomare Zusammensetzung und Anzahl der chemischen Bindungen der DNA jedoch dabei völlig unverändert (isomer) zu belassen. Sie dienen der DNA dazu Torsionsspannungen abzubauen.

Für viele biologische Vorgänge muss die DNA in bestimmten Regionen aus ihrer Doppelhelix-Form entwunden werden – wie z.B. bei der Transkription, Rekombination und Replikation – was zu einem Überdrehen in anderen Bereichen und damit torsionaler Spannung führt. Wird diese zu groß können sich superspiralisierte Abschnitte bilden oder die entwundenen Bereiche werden zurückgedreht, was die am Prozess beteiligten Proteine in ihrer Funktionserfüllung behindern kann, so dass die Torsionsspannung zunächst durch Topoisomerasen abgebaut werden muss. Besonders während Prozessen wie der Zellteilung sind diese damit von erheblicher Relevanz, so dass viele medizinische Anwendungen auf die Hemmung von Topoisomerasen abzielen (durch sogenannte Topoisomerase-Inhibitoren), wenn die erhöhte Zellteilung von Bakterien [107] oder z.B. Krebszellen durch eine Chemotherapie [108,109] verhindert werden soll.

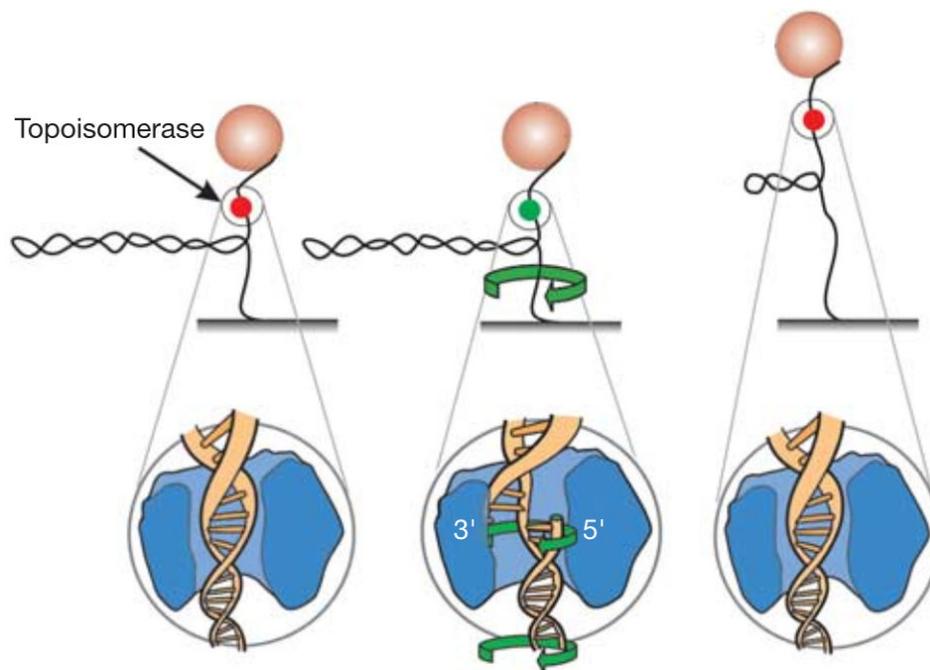


Abbildung 18: Topoisomerase IB bindet an einen superspiralisierten DNA-Doppelstrang, durchtrennt einen Einzelstrang und ermöglicht dadurch eine Entspannung und teilweise Aufhebung der Superspiralität. Die Schnittstelle im Phosphat-Rückgrat wird anschließend wieder kovalent verknüpft. Quelle: [111]

Allgemein bindet, wie in Abbildung 18 gezeigt, ein globuläres Topoisomerase-Protein an einen DNA-Doppelstrang, um dann – in einigen Fällen aktiviert durch Metall-Ionen und/oder ATP – das Phosphat-Rückgrat vorübergehend zu durchtrennen und ein Entwinden der über-

oder unter-drehten DNA zu ermöglichen. Nach dieser Entspannung wird die Schnittstelle erneut kovalent verbunden, so dass der chemische Ursprungszustand – bei nun veränderter Topologie – wieder hergestellt wird [110]. Klassifiziert werden die Topoisomerasen dabei in zwei Haupt-Gruppen (I und II), je nachdem ob nur ein Einzelstrang der DNA durchtrennt wird und das Entwinden um den intakten anderen Strang herum geschieht (Typ I) oder ob beide Einzelstränge der DNA durchbrochen werden (Typ II). Letzteres ermöglicht sowohl ein Entwinden, als auch ein Passieren eventuell anderer Doppelstrang-Abschnitte durch die erzeugte Schnittstelle und erlaubt damit eine komplexere Neuorganisation z.B. in chromosomaler DNA oder das Entfernen von Superspiralisierung. Je nach Art der Entspannung (z.B. Anzahl der Drehungen pro Zyklus, Drehrichtung usw.) und der dafür benötigten Bedingungen (Metall-Ionen, ATP-Verbrauch) erfolgt häufig auch eine Einteilung in weitere Sub-Klassen, wie z.B. Topoisomerase Typ IB (kurz TopIB), die in dieser Arbeit verwendet wird und keine Metall-Ionen oder ATP benötigt um einen Einzelstrang der DNA zu durchtrennen und nach dem Entwinden wieder zu verknüpfen [111].

Biotin-Streptavidin

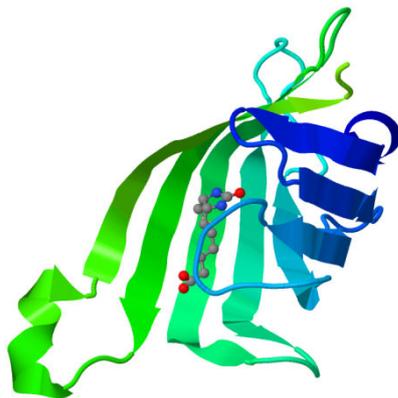


Abbildung 19: Streptavidin mit gebundenem Biotin. Quelle [113]

Die beiden Biomoleküle Biotin und Streptavidin bilden die stärkste bekannte, nichtkovalente, spezifische Bindung miteinander aus [112], so dass sie für sehr vielfältige Präparationen und biotechnologische Anwendungen eingesetzt werden können: überall da wo Biomoleküle an Oberflächen (oder aneinander) hochaffin immobilisiert werden sollen. Die hohe Affinität begründet sich hierbei aus der räumlichen Struktur beider Moleküle: Ein Monomer des Proteins Streptavidin besteht aus 159 Aminosäuren [113] die hauptsächlich acht antiparallele, fassförmig angeordnete β -Faltblätter formen und so eine perfekt passende Bindungstasche für das viel kleinere Enzym Biotin liefern. Verstärkt wird die Bindung noch durch eine Schleife im Streptavidin-Rückgrat, die sich über das

gebundene Biotin legen kann, sowie der häufig vorkommenden Zusammenlagerung von Monomeren zu einem tetrameren Streptavidin-Komplex [114]. In diesem Komplex können bestimmte, nach außen zeigende Aminosäure-Seitenketten eines Monomers zur Bindung eines Biotins in der Bindungstasche des benachbarten Monomers beitragen.

In der Bindungstasche selbst tragen sowohl Wasserstoffbrückenbindungen, als auch van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen zur Bindung bei; stabilisiert und abgeschirmt durch die beschriebene räumliche Konformation. Die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung ist deswegen mit einer Dissoziationskonstante von $4 \times 10^{-14} \text{ mol/l}$ nicht nur extrem stark, sondern auch sehr robust gegenüber äußeren Einflüssen wie z.B. chemischen Lösungsmitteln, hoher Temperatur oder pH-Wert-Schwankungen, da ein Aufbrechen der Bindung zumeist erst nach einer Denaturierung des Proteins geschehen kann. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass z.B. ein vorübergehendes Erhitzen der wässrigen Pufferlösung auf 70°C zu einem Ablösen ohne Denaturierung führen kann, woraufhin sich die Verbindung erneut ausbilden kann [112].

2.3.3. Lipide

Neben den bereits beschriebenen Proteinen und Nukleinsäuren bilden Lipide die dritte große Gruppe derjenigen Biomoleküle, die – abgesehen von Wasser – den hauptsächlichsten Massenanteil von lebenden Organismen darstellen. Im Gegensatz zu jenen bilden Lipide jedoch keine langkettigen, kovalent verknüpften Polymere aus, sondern lagern sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften zu den verschiedenartigsten, flexiblen Molekülverbänden zusammen. Als hauptsächlichste Aufbaustoffe von biologischen Membranen, als Botenstoffe sowie Energiespeicher übernehmen sie damit wichtige Aufgaben in der Strukturbildung und im Metabolismus aller Lebewesen.

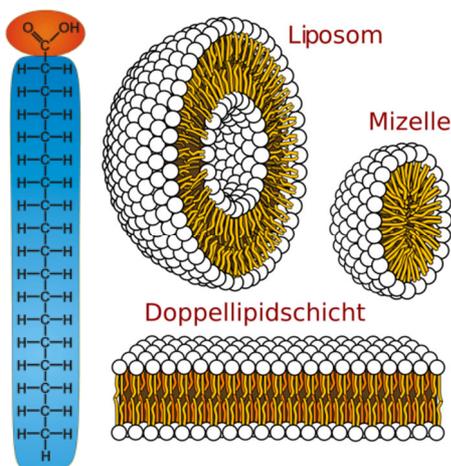


Abbildung 20: Unterschiedliche Aggregate zu denen sich amphiphile Lipide (links) in wässriger Lösung anlagern können. Quelle [116,117]

Lipidmoleküle sind hierbei zumeist amphiphiler Natur, das heißt sie bestehen aus einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe, an die sich eine oder mehrere unpolare, hydrophobe Kohlenwasserstoff-Ketten anschließen. Aufgrund dieser Eigenschaft neigen Lipidmoleküle in polaren Lösungsmitteln wie Wasser zur Selbstorganisation, indem zwecks Entropiemaximierung (bzw. Minimierung der freien Energie) die hydrophoben Molekülbereiche wechselwirken und Aggregate bilden, die sie gegen das Lösungsmittel abschirmen [115]. An Grenzflächen (z.B. Wasser-Luft) können sich so Lipidmonoschichten formen, in denen die polare Kopfgruppe aller beteiligten Moleküle zur wässrigen Phase hin ausgerichtet wird (und über Wasserstoffbrücken und ggf. ionische Bindungen mit dem wässrigen Medium wechselwirkt), während die unpolaren Restgruppen den Molekülverband über hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte zusammenhalten. Ohne Grenzflächen dagegen bilden, wie in Abbildung 20 gezeigt [116,117], die keilförmigen Lipidmoleküle (oft diejenigen mit nur einer Kohlenwasserstoff-Kette) kugelförmige Mizellen aus, während die zylinderförmigen Lipidmoleküle (häufig mit zwei Kohlenwasserstoffketten) zur Ausbildung von planaren Lipid-Doppelschichten neigen, welche – wenn diese aufgrund ausreichend hoher Lipidkonzentration vollständig in sich geschlossen werden können – auch Wasser einschließende Vesikel (wie z.B. Liposome im Falle von Phospholipiden) formen können.

Besonders Lipiddoppelschichten und Liposome sind dabei von erheblicher Bedeutung für die biophysikalische Forschung. Zum einen stellen sie ein einfaches (proteinfreies) Modellsystem für Zellmembranen und die innerhalb von Zellen für Transportprozesse verwendeten Vesikel dar, so dass z.B. deren Zusammensetzung, der Protein-Einbau und fluide Transport, das Abschnüren und Passieren der Membran (Endo- und Exozytose), oder die Selbstorganisation und Membranbildung selbst umfangreich studiert werden können. Zum anderen können künstlich hergestellte Vesikel dazu benutzt werden, Stoffe (wie z.B. Medikamente oder DNA)

gezielt in Zellen hinein zu transferieren, unabhängig davon, ob diese Substanzen wasser- oder fettlöslich sind, was eine langsamere Wirkstoffabgabe, bessere Bioverträglichkeit und gezielte lokale Einschränkung der Behandlung oder biotechnologischen Anwendung (wie z.B. als „Bioreaktor“) erlaubt [118].

Auch in der Nanoporenforschung können Lipidschichten vielfältig verwendet werden, wie z.B. zum Einbau von Proteinporen wie α -Hemolysin, zur Veränderung der Oberflächeneigenschaften von Festkörper-Nanoporen oder – aufgrund der fluiden, flexiblen Eigenschaften – sogar zum gezielten und verlangsamten Transport von Proteinen durch die Nanoporenregion, wobei die Lipiddoppelschicht als „Schiene“ dient, auf welcher die zu untersuchenden Moleküle verankert und transportiert werden [73].

Entsprechend ihrem Aufbau der Kopf- und Schwanz-Gruppen lassen sich Lipidmoleküle grob in verschiedene Hauptgruppen einteilen, wie z.B.: Fettsäuren (Carboxy-Kopfgruppe mit einfachem Alkylschwanz), Glykolipide (Glycerol mit ein bis drei veresterten Fettsäuren), Phospholipide (phosphorhaltige Kopfgruppe mit zumeist zwei Kohlenwasserstoffschwänzen), Sphingolipide (Sphingosin ist mit einer Fettsäure über eine Amid-Bindung verknüpft), Saccharolipide (Fettsäuren sind an ein Zucker-Rückgrat gebunden) usw.

Membranbildend sind hierbei in der Natur vor allem diejenigen Phospholipide, die entweder Sphingosin oder Glycerol in der hydrophilen Kopfgruppe, sowie zwei hydrophobe Alkylschwänze enthalten. Die Kopfgruppen entscheiden dabei hauptsächlich über die Eigenschaften der Membranoberfläche (Ladung, Rauigkeit, chemische Funktionalisierung, Bindungsstellen für Rezeptormoleküle usw. [119]) und die Kohlenwasserstoffschwänze (durch ihre Länge, räumliche Konformation und den Sättigungsgrad, also Umfang an Doppelbindungen) über die Härte und Flüchtigkeit (Phasenverhalten) der Membran [120].

Konkret werden in dieser Arbeit die folgenden Lipide zur Herstellung von Vesikeln und Lipiddoppelschichten verwendet, deren chemische und räumliche Strukturen auch in Abbildung 21 dargestellt sind [121]:

- POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) besitzt große Ähnlichkeit zum Gemisch von membranbildenden Phospholipiden in Säugetieren und wird deswegen am häufigsten als Modellsystem in biophysikalischen Experimenten verwendet. Es besitzt eine gesättigte und eine ungesättigte Kohlenwasserstoffkette mit der Länge von 16 bzw. 18 Kohlenstoffatomen.
- DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) unterscheidet sich von POPC durch die erste Alkylkette, die hier länger ist (18 C-Atome) und dabei wie die zweite Kette ebenfalls einfach ungesättigt vorliegt.
- Rhodamin-DOPE (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[lissamine rhodamine B sulfonyl]*) ist ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B markiertes Lipid. Da Lipidschichten und Vesikel in der Regel aufgrund ihrer geringen Membrandicke mikroskopisch kaum zu beobachten sind, erlaubt eine Einfärbung einen leichteren experimentellen Zugang. Die Maxima von Absorption und Emission liegen bei einer Wellenlänge von 560 und 583 nm. Die Kettenlängen und der Sättigungsgrad entsprechen denen von DOPC: Zwei Ketten zu 18 C-Atomen, jeweils einfach ungesättigt.

- DOPG (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-1'-rac-glycerol*) weist ebenfalls zwei ungesättigte Alkylketten von 18 C-Atomen Länge auf. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Lipiden enthält die Kopfgruppe jedoch einen Glycerol- anstatt eines Cholin-Anteils, weshalb dieses Lipid anionisch (eine negative Ladung pro Molekül bei pH-Wert 7,6) anstatt elektrisch neutral (bzw. zwitterionisch) ist.

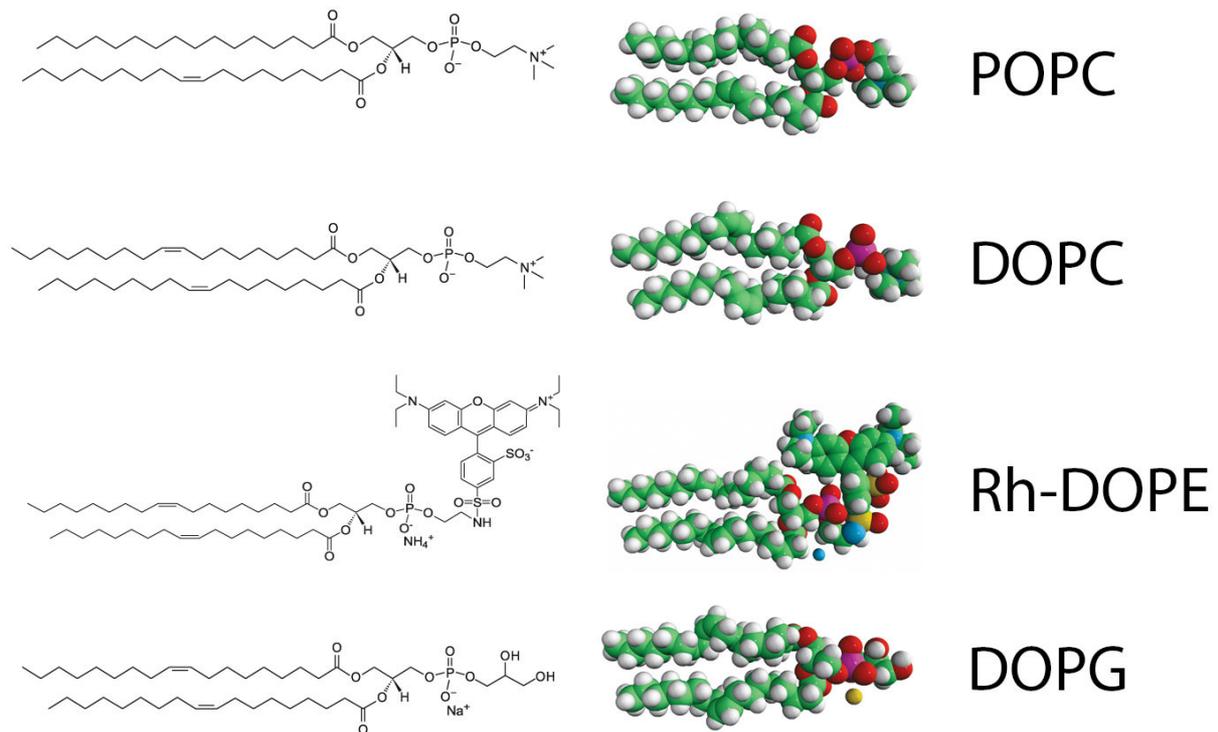


Abbildung 21: Chemische und räumliche Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Lipide. Quelle: [121]

Je nach Art und Eigenschaften der verwendeten Lipide kann man bei der Vesikelherstellung unterschiedliche Größen und Formen erreichen. Vesikel mit nur einer Lipid-Doppelschicht als Membran nennt man unilamellar, während mehrere Doppelschichten (z.B. Vesikel innerhalb von größeren Vesikeln) als multilamellar bezeichnet werden. Unilamellare Vesikel teilt man darüber hinaus ebenfalls nach ihrer Größe ein: in kleine (SUV – *small unilamellar vesicles* bis 100 nm), große (LUV – *large unilamellar vesicles* bis 1 μm) und riesige (GUV – *giant unilamellar vesicles* größer 1 μm), von denen alle Größen in dieser Arbeit auch verwendet werden. Der Aufbau der Lipide hat dabei nicht nur Einfluss auf die Vesikelgröße, sondern auch z.B. auf die Flexibilität, Durchlässigkeit und Stabilität der Membran, sowie auf die Polarität und elektrische Ladung der Vesikel, so dass je nach Anwendung ein neues optimales Lipidgemisch gefunden werden muss.

2.4. Zweikernige Metallkomplexe

Die in dieser Arbeit untersuchten, sogenannten zweikernigen Metallkomplexe (oder auch engl.: *dinuclear metal complexes, DNMC*) gehören zum aktuellen Forschungsgebiet der Arbeitsgruppe „Anorganische Chemie I“ um Prof. Dr. Thorsten Glaser in der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld. Dort wurden sie von Dr. Thomas Jany synthetisiert und charakterisiert [122]. Im Rahmen dieser vorliegenden Dissertation sollen nun ihre verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten mit DNA-Molekülen erforscht werden. Die Metallkomplexe entstammen dabei der Idee, DNA-bindende Moleküle von Grund auf maßzuschneidern und sie nach Möglichkeit mit verschiedenen, gewünschten Funktionen ausstatten zu können.

Da viele in der Natur vorkommende Restriktionsenzyme (wie z.B. Endonukleasen) in ihren aktiven Zentren zwei oder drei, zumeist zweiwertige Metall-Ionen enthalten, bot es sich an, das Design mit zwei Metall-Ionen zu starten. Diese sollten aufgrund ihrer positiven Ladung das DNA Rückgrat erkennen und eine permanente Bindung eingehen, und zudem in der Lage sein durch ihren Lewis-Säure-Charakter an Sauerstoff-Atome zu binden und die Phosphodiester-Bindungen zwischen Phosphat und Zucker im DNA-Rückgrat kooperativ hydrolytisch aufzubrechen (ähnlich wie Restriktionsenzyme). Beide Funktionen (permanentes Binden und/oder Schneiden) würden Polymerasen (und andere wichtige Biomoleküle) in ihrem Funktionieren und damit die DNA-Replikation selbst insgesamt so stark behindern, dass die Metallkomplexe vor allem als neue Methode in der Krebstherapie Anwendung finden könnten. Bisherige in der Chemotherapie verwendete metallische Zytostatika – wie z.B. cis-Platin – binden zumeist an die Basenpaare der DNA. Neue Funktionsmechanismen, wie das hier vorgestellte Attackieren des DNA-Rückgrats, könnten also dabei helfen ein umfangreicheres Spektrum an Tumorarten abzudecken, bisher ausgebildete Resistenzen zu umgehen oder allgemein zu einer besseren Verträglichkeit der Chemotherapie selbst zu führen.

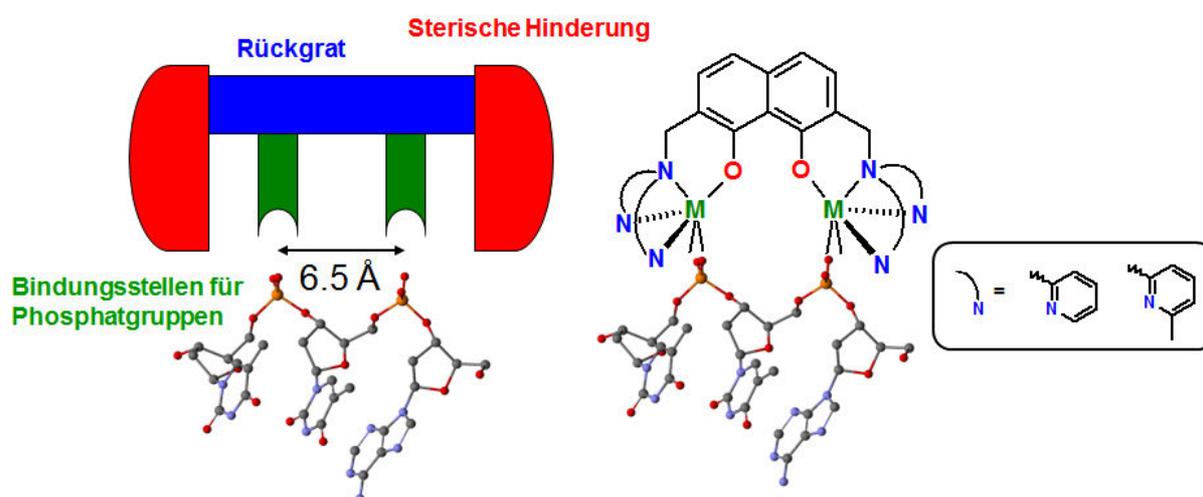


Abbildung 22: Design-Konzept zur Synthese der zweikernigen Metallkomplexe. Aus [122]

In Abbildung 22 ist der allgemeine strukturelle Aufbau dargestellt, nach welchem die zweikernigen Metallkomplexe konzipiert wurden. Die zwei Metall-Ionen (grün) werden durch ein steifes Rückgrat (blau) genau im Abstand von zwei Phosphaten des DNA-Rückgrats (0,65 nm) stabil gehalten um dieses molekular erkennen und kooperativ attackieren zu können. Um das ungewollte unspezifische Binden an die Basenpaare der DNA oder an benachbarte Metallkomplexe zu verhindern (und damit die spezifische Wirksamkeit zu erhöhen), müssen die Komplexe darüber hinaus durch eine Schutzgruppe (rot) großräumig abgeschirmt werden um eine sterische Hinderung zu erzeugen.

Die drei verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Metallkomplexe

- $[(\text{tom}^{6\text{-Me}})\{\text{Ni}(\text{OAC})_2\}] \cdot 13\text{H}_2\text{O}$ (1106,46 g/mol)
- $[(\text{tom}^{6\text{-Me}})\{\text{Co}(\text{OAC})_2\}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (872,74 g/mol – ohne Hydrat)
- $[(\text{tom}^{6\text{-Me}})\{\text{Cu}(\text{OAC})_2\}] \cdot 8,5\text{H}_2\text{O}$ (1035,12 g/mol)

enthalten entweder Nickel, Kobalt oder Kupfer und sind in Abbildung 23 gezeigt. Es ist dabei davon auszugehen, dass die gezeigte (durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärte) elektrisch neutrale Form nur für den kristallinen Aggregatzustand gilt und die Komplexe in wässriger Lösung die inneren Acetat-Liganden verlieren und gegen Lösungsmittelmoleküle austauschen, und damit als zweifach positive Ionen vorliegen können.

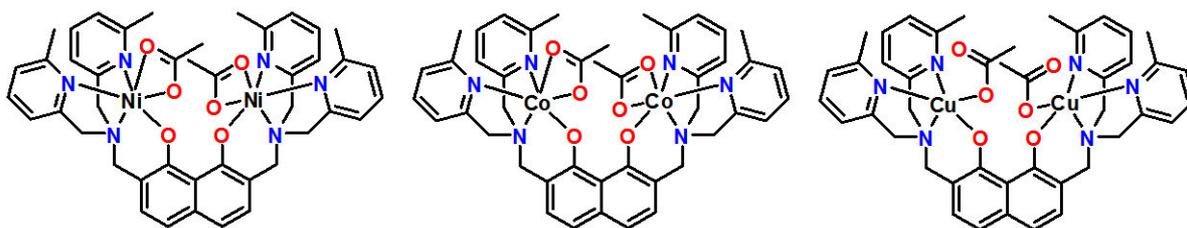


Abbildung 23: Chemische Struktur der drei verwendeten zweikernigen Metallkomplexe (Ni, Co, Cu).

2.5. Carbon-Nanomembranen

Carbon-Nanomembranen sind künstlich hergestellte, organische, polymere Membranen von wenigen Nanometern Dicke (ca. 1 bis 3 nm) und gehören damit – neben Graphen (vgl. folgendes Kapitel) – zu den dünnsten im Labor herstellbaren, freitragenden Strukturen. Sie sind im Allgemeinen sehr stabil und gleichzeitig flexibel (und damit quasi ein mikroskopisches Pendant zu makroskopischer „Plastikfolie“). Wesentlich dünner als Lipid-Doppelschichten, und dabei nicht wie diese auf ein wässriges Medium beschränkt, lassen sie sich darüber hinaus mit einer Vielzahl von modifizierbaren Eigenschaften versehen, die in anderen Materialien kaum integriert werden könnten. Damit sind sie von besonderer Bedeutung für zukünftige Entwicklungen im Bereich der Biotechnologie, Nanowissenschaften und neuartiger Elektronik.

Die in dieser Arbeit verwendeten Carbon-Nanomembranen sollen als Membran für Nanoporen-Translokationsexperimente dienen und wurden von der Arbeitsgruppe „Physik Supramolekularer Systeme und Oberflächen“ um Dr. Andrey Turchanin und Prof. Dr. Armin Gölzhäuser der Fakultät für Physik an der Universität Bielefeld hergestellt. Beide haben die im Folgenden beschriebene Methode zur Herstellung der Membranen mit- und weiterentwickelt [123,124], dargestellt in Abbildung 24.

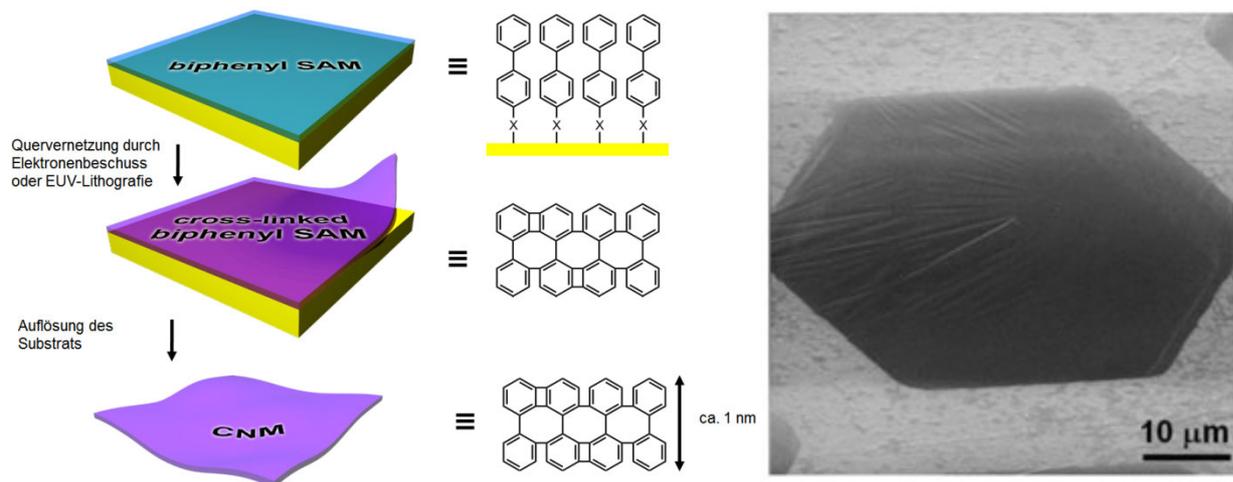


Abbildung 24: Herstellung von Carbon-Nanomembranen durch Quervernetzung von polyaromatischen, zur Monoschicht selbstorganisierten Molekülen (links) sowie Helium-Ionen-Mikroskopie-Aufnahme so einer freistehenden Carbon-Nanomembran (rechts). Aus [123]

Bei der Fabrikation wird der Effekt ausgenutzt, dass sich bestimmte organische Moleküle (wie z.B. Thiole, Silane usw.), ähnlich zum Organisationsprinzip von Lipiden an Grenzflächen, auch auf festen Substraten (wie z.B. Gold, Silber, Silizium usw.) durch Adhäsion anlagern und zu einer dicht gepackten Monoschicht selbst organisieren können. Diese Schichten werden auch als SAMs (engl.: *Self Assembled Monolayers*) bezeichnet und können nach der Oberflächenanlagerung durch hochenergetischen Elektronenbeschuss (oder extreme UV-Bestrahlung) in ihren Bindungen quervernetzt werden. Nach dem Auflösen des ursprünglichen Substrats erhält man so eine in sich stabile, freistehende Carbon-Nanomembran, die auf die gewünschten Oberflächen transferiert werden kann.

Durch die Wahl der selbstorganisierenden Moleküle (und der Parameter bei der Bestrahlung) hat man dabei großen Einfluss auf die Eigenschaften und weiteren Verwendungsmöglichkeiten der hergestellten Membran: Die Länge und Packungsdichte der Moleküle legt die Dicke und mechanische Stabilität der fertigen Membran fest und die Art der Moleküle die optischen und elektrischen Eigenschaften. So eignen sich besonders dünne (1 nm) Membranen z.B. als Proben-Unterlage bei hochauflösender Transmissions-Elektronen-Mikroskopie, da sie nur wenig zur Streuung und damit Unschärfe beitragen.

Integriert man in den Molekülen (abgesehen von den quervernetzenden aromatischen Ringen) noch Kopfgruppen mit bestimmten chemischen Eigenschaften, so lassen sich beide Membranoberflächen (im Prinzip unabhängig voneinander) auch chemisch oder biologisch

funktionalisieren. So ist es z.B. möglich Membranen herzustellen, die auf einer Seite hydrophil und auf der anderen Seite hydrophob sind, oder Membranen, die Metalle, Polymere, Fluorophore, organische oder weitere Biomoleküle enthalten, was besonders für die Entwicklung von Biosensoren von großem Vorteil ist.

Durch Lithographie-Verfahren ist es darüber hinaus auch möglich die fertigen Membranen nach der Herstellung räumlich weiter zu strukturieren und so z.B. auszudünnen, zu perforieren oder Poren einzubringen, so dass man Filter oder „Nanosiebe“ erzeugen kann, mit denen sich z.B. Moleküle, Polymere oder Proteine trennen lassen.

Ebenfalls wurde bereits gezeigt, dass ein extremes Aufheizen (Pyrolyse bei 1000 bis 3000 K) zu einem stellenweisen Übergang der Membranstruktur zu hochgeordneten, hexagonalen Kohlenstoff-Anordnungen führt, umgeben von amorphen Domänen. Im Prinzip lässt sich so also ein gradueller Übergang zu Graphen erzeugen, wobei die elektrische Leitfähigkeit – je nach Umfang der Transformation – ebenfalls graduell zwischen Isolator und metallischem Leiter eingestellt werden kann [125]. Die so erzeugten Strukturen zeigen einen Feldeffekt und könnten damit durch die große Kontrolle über die elektrischen Eigenschaften einmal in neuartigen, extrem dünnen und schnellen 2D-Elektroniken (z.B. in auf Kohlenstoff basierenden Transistoren) verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil der Carbon-Nanomembranen ist schließlich die Möglichkeit, mehrere Schichten (mit unterschiedlichen Eigenschaften) im Prinzip frei aufeinander zu stapeln und damit neuartige hybride Materialien (z.B. alternierend leitfähig und isolierend) oder gezielt gewünschte Schichtdicken herstellen zu können [126].

2.6. Graphen

Graphen ist eine gitterförmige Monoschicht aus hexagonal („bienenwabenförmig“) angeordneten Kohlenstoffatomen. Es ist mit einer Schichtdicke von etwa 0,34 nm das dünnste bisher bekannte stabile Material und soll deswegen in dieser Arbeit als Membran für Nanoporenexperimente dienen. Theoretisch vorausgesagt, und in Simulationen untersucht, wurde Graphen (als Grundbaustein für die in Abbildung 25 gezeigten anderen Allotrope des Kohlenstoffs [127]) bereits viele Jahrzehnte vor seiner tatsächlichen Entdeckung, da man lange anzweifelte ob eine ein-atomige Lage in der Praxis thermodynamisch stabil existieren könnte.

Erst 2004 konnten Konstantin Novoselov und Andre Geim eine relativ einfache Methode zur Herstellung von Graphen realisieren, die es ihnen fortan erlaubte die Eigenschaften dieser Schichten auch experimentell zu studieren, wofür ihnen 2010 der Nobelpreis für Physik verliehen wurde. Durch ihre Arbeit lösten sie eine wahre Explosion in der Forschung mit Graphen aus, mit allein über 11500 bisherigen Zitationen ihres in *Science* veröffentlichten Artikels [128].

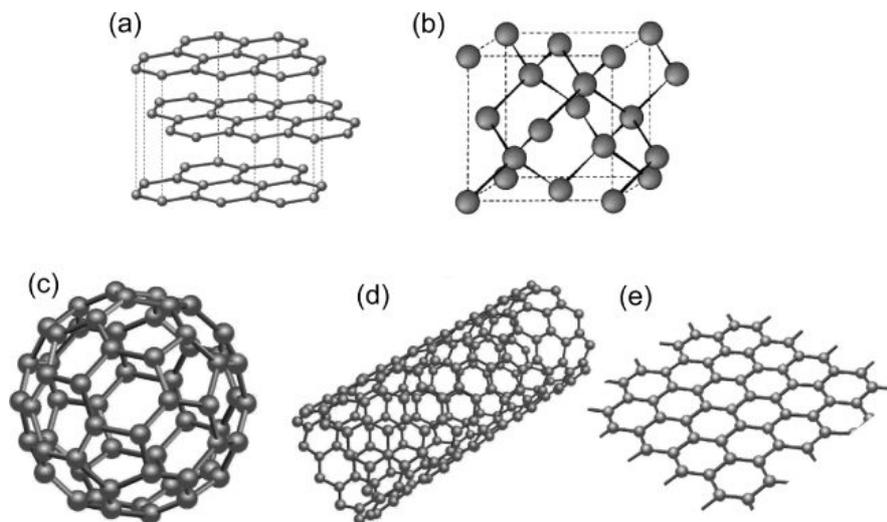


Abbildung 25: Die Kohlenstoff-Allotrope Graphit (a), Diamant (b), Fulleren (c), Kohlenstoffnanoröhre (d) und Graphen (e). Aus [127]

Aufgrund der sehr starken, kovalenten Atombindungen in Graphen (6 C-C Bindungen und drei delokalisierte Elektronen pro hexagonalem Ring, also ähnlich zu Benzol) und der rein zweidimensionalen Struktur weist es außergewöhnliche mechanische und überraschende elektrische Eigenschaften auf und ist zudem leicht verfügbar, was es zu einem sehr vielversprechenden neuen Material in den verschiedensten Forschungsbereichen und zukünftigen Industrien macht.

Graphen besitzt mit 130 GPa die höchste Zugfestigkeit die je in einem Material gemessen wurde [129], bei gleichzeitig hoher Biegesteifigkeit und sehr geringer Dichte, es ist also leicht und dennoch extrem stabil. Es weist ferner auch eine hohe Leitfähigkeit für Wärme und für elektrischen Strom auf, wobei die freie Weglänge der Elektronen fast nur von den eventuell vorhandenen Defekten im Material begrenzt wird. Aufgrund der zweidimensionalen Struktur verhält es sich hierbei wie ein Halbleiter ohne Bandlücke und es kann z.B. der Quanten-Hall-Effekt bereits bei Zimmertemperatur beobachtet werden. Die Ruhemasse der Elektronen wird (quasi relativistisch) verschwindend gering, was zu hohen Geschwindigkeiten führt und Graphen damit (sowie aufgrund der sehr einfachen Miniaturisierungsmöglichkeiten und des auftretenden Feldeffekts) zu einem Kandidaten als Material für zukünftige hochfrequente Transistoren macht. Auch in der Sensortechnik könnte es Anwendung finden, da sich anlagernde Moleküle die elektrische Leitfähigkeit stark beeinflussen können.

Der optische Transmissionsgrad T einer Monolage Graphen für elektromagnetische Strahlung hängt nur von der Feinstrukturkonstanten $\alpha = \frac{e^2}{\hbar c} = 1/137$ ab [130]:

$$T = \left(1 + \frac{1}{2}\pi \cdot \alpha\right)^{-2} \approx 1 - \pi \cdot \alpha \approx 0,977 \quad (7)$$

Dies bedeutet, Graphen ist im Prinzip ein transparenter Leiter und eine Monolage absorbiert im gesamten sichtbaren und infraroten Spektrum rund 2,3% des einfallenden Lichts und ist damit trotz ihrer ein-atomigen Dicke grundsätzlich bereits mit bloßem Auge zu erkennen. Erst

unterhalb von 400 nm Wellenlänge steigt die Absorption stark an. Das optische Transmissionsverhalten bietet also bereits eine sehr einfache Möglichkeit zwischen Mono- und Multilag zu unterscheiden; eine genauere Analyse der Schichtdicke und Anzahl der enthaltenen Defekte ist dagegen z.B. mit Raman-Spektroskopie möglich [131].

Trotz des hohen Bedarfs ist die industrielle Produktion von Graphen bisher sehr aufwendig und teuer, es werden jedoch stets neue Verfahren entwickelt um dem entgegen zu wirken. Nach der von Novoselov und Geim eingeführten Methode, die auch in dieser Arbeit verwendet wird, kann Graphen mittels sogenannter mechanischer Exfoliation aus der Aufspaltung von Graphitschichten hergestellt werden. Diese werden mit Klebeband so lange voneinander abgezogen und dabei weiter ausgedünnt, bis stellenweise nur noch Monoschichten übrig bleiben, die dann auf ein Substrat transferiert werden können („Scotch-Tape-Methode“). Je nach Rauigkeit des verwendeten Bands und Qualität des Graphits (entscheidend sind hier die Korngrößen, in denen die Graphitschichten defekt- und knitterfrei aufeinander gestapelt sind) lassen sich so Schichten mit Kantenlängen von mehreren Dutzend Mikrometern erzeugen. Vorteil hierbei ist die gute Qualität der erzeugbaren Monolagen (die in dieser Arbeit z.B. keine Defekte enthalten dürfen), der Nachteil ist die geringe Ausbeute und der hohe Zeitaufwand zum Finden geeigneter Flecken.

Andere Verfahren benutzen z.B. das Aufdampfen auf Trägermaterial durch chemische Gasphasenabscheidung (CVD), das epitaktische Wachstum auf metallischen Substraten oder Siliziumcarbid, die chemische, akustische oder photonische Aufspaltung von Graphit, die Reduktion von Graphenoxid, die Pyrolyse von Carbon-Nanomembranen und viele weitere Ansätze [132]. Sie erlauben häufig eine schnellere Produktion viel größerer Schichten, erreichen dabei bisher jedoch nicht die Qualität monokristallinen Graphens wie es durch Exfoliation gewonnen werden kann.

2.7. Kraft auf DNA in Nanoporen

In diesem letzten Kapitel der theoretischen Grundlagen dieser Arbeit sollen zur Vorbereitung des sich anschließenden Experimentaltails noch einmal zusammenfassend die Effekte betrachtet werden, die sich auf die Kraftmessung mittels optischer Pinzette auswirken, wenn ein DNA-Strang durch eine Nanopore gefädelt wird.

Hierfür wird von der in Abbildung 26 gezeigten Situation ausgegangen, wie sie in vielen Experimenten dieser Arbeit vorliegt: Eine isolierende Membran trennt zwei Flüssigkeitsreservoirs, die nur durch die in die Membran gebohrte Nanopore verbunden sind. An einem Mikrokügelchen wird ein DNA-Strang immobilisiert und

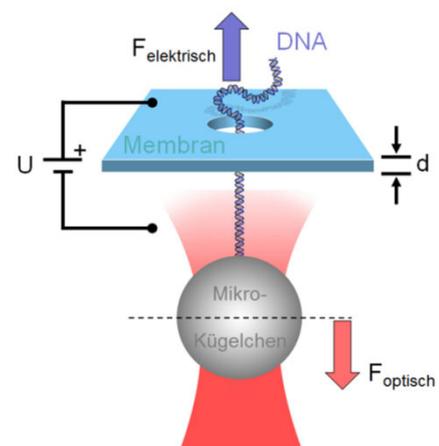


Abbildung 26: Messprinzip bei den Experimenten mit kontrollierten DNA-Translokationen durch Nanoporen.

mit Hilfe der Optischen Pinzette in die Nähe der Pore gebracht. Aufgrund der negativen Ladung der DNA kann diese mittels einer angelegten Transmembranspannung in die Pore eingefädelt werden. Die elektrische Kraft auf die DNA wird daraufhin von der Haltekraft der Optischen Pinzette kompensiert und kann deswegen gemessen werden.

Geht man von einer typischen angelegten Spannung $U=50$ mV und einer Membrandicke $d=20$ nm aus, so ergibt sich ein elektrisches Feld E von:

$$E = \frac{U}{d} = \frac{50 \text{ mV}}{20 \text{ nm}} = 2.500.000 \frac{\text{V}}{\text{m}} \quad (10)$$

welches aufgrund der isolierenden Eigenschaften der Membran allein in der Porenregion abfällt. Die elektrische Kraft $F = Q \cdot E$, welche auf den eingefädelt DNA-Strang wirkt, ergibt sich nun aus der Netto-Ladung Q desjenigen DNA-Teilstücks, welches sich in der Porenregion befindet. Sie berechnet sich aufgrund der 2 negativen Elementarladungen e^- pro DNA-Basenpaarabstand (von 0,34 nm) und der Porenlänge d von 20 nm zu:

$$Q = \frac{2 \cdot e^-}{bp} \cdot d = \frac{2 \cdot e^-}{0,34 \text{ nm}} \cdot 20 \text{ nm} = 117,65 \cdot e^- = 1,88 \cdot 10^{-17} \text{ C} \quad (11)$$

Mit dieser Ladung wirkt also theoretisch die elektrische Kraft

$$F = Q \cdot E = 1,88 \cdot 10^{-17} \text{ C} \cdot 2,5 \cdot 10^6 \frac{\text{V}}{\text{m}} = 47 \cdot 10^{-12} \frac{\text{V} \cdot \text{C}}{\text{m}} = 47 \text{ pN} \quad (12)$$

mit 47 pN auf die eingefädelt DNA und müsste mit der Optischen Pinzette zu messen sein.

In der Realität kommt es jedoch zu einer Vielzahl von Effekten, die einen Einfluss auf die experimentell bestimmbare Kraft haben, so dass diese nicht nur von der rein elektrostatischen Kraft abhängt.

In wässriger Pufferlösung weist sowohl die DNA eine elektrische Ladung auf, als auch die Oberfläche der Nanopore. Der hauptsächliche Grund dafür ist, dass abhängig vom pH-Wert die oberflächennahen Silanolgruppen (-Si-OH) dissoziieren und dann protoniert oder deprotoniert vorliegen können (-SiOH₂⁺ bzw. -Si-O⁻). Darüber hinaus können Partialladungen im Material zur Adsorption von Ionen der Pufferlösung führen, die Aminogruppen (-Si-NH₂) können ebenfalls dissoziieren (Si-NH₃⁺) usw. Das in dieser Arbeit verwendete Siliziumnitrid (Si₃N₄) ist dabei im Allgemeinen (abhängig von der Präparationsmethode und damit dem Verhältnis von Si und N auf der Porenoberfläche) ab einem pH-Wert von etwa 5 negativ

geladen, erst bei sehr sauren Pufferlösungen ($\text{pH} < 4$) stellt sich eine positive Oberflächenladung ein [133].

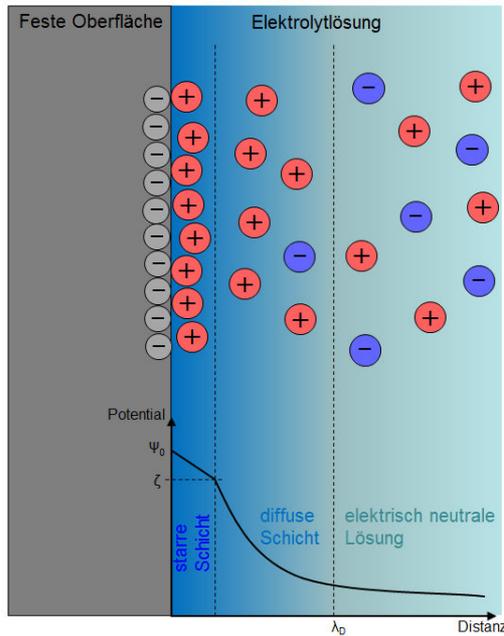


Abbildung 27: Elektrolytische Doppelschicht

Länge, für Elektrolyt-Ionen effektiv nicht mehr zu spüren ist und die Oberfläche als nahezu elektrisch neutral erscheint. Diese Debye-Länge

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{k_B T \cdot \epsilon}{2e^2 Z^2 c}} \quad (13)$$

ist dabei abhängig von der thermischen Energie $k_B T$, der Dielektrizitätskonstanten ϵ in der Doppelschicht, sowie der Ladung Z und Konzentration c der Ionen, wobei e die Elementarladung bezeichnet [134]. Je geringer also die Ionenstärke der Pufferlösung, desto weiter ist das (reduzierte) Oberflächenpotential zu spüren, wobei typische Debye-Längen im Bereich von wenigen Nanometern liegen.

Wird nun zusätzlich eine elektrische Spannung angelegt (wie im Experiment zum Einfädern der DNA), so bewirkt die positiv geladene, elektrochemische Doppelschicht durch Impulsübertrag auf das Lösungsmittel eine effektive Strömung im selbigen, was als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet wird. Dieser ist dabei genau entgegengesetzt der Richtung, in die sich freie DNA aufgrund der angelegten Spannung bewegen würde. Die Geschwindigkeit v des elektroosmotischen Flusses

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (14)$$

ist abhängig vom oben beschriebenen Zeta-Potential, der elektrischen Feldstärke E und der Viskosität η der Pufferlösung. Sie nimmt deswegen indirekt mit sinkendem pH-Wert, sinkender Temperatur und steigender Ionenkonzentration der Lösung ab, da die Oberflächenladung bzw. die Ausdehnung der Doppelschicht dann geringer ist [135].

Der elektroosmotische Fluss sorgt durch hydrodynamische Reibungskräfte F_{EOF} an der DNA dafür, dass die mit der Optischen Pinzette gemessene effektiv wirkende Kraft F_{eff} im Vergleich zur rein elektrostatischen Kraft F_e stark reduziert ist: $F_{eff} = F_e - F_{EOF}$. Typische Werte reichen für große Poren in dieser Arbeit z.B. bis zu einer 90%-igen Reduzierung, also $\frac{F_{EOF}}{F_e} = 0,9$. In Abbildung 28 ist dieser Grad der

Reduzierung für mehrere verschiedene Oberflächenladungsdichten S der Nanopore in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Pufferlösung theoretisch simuliert worden [136]. Für stärkere negative Aufladungen S der Poren-Oberfläche ist auch die Reduzierung der elektrostatischen Kraft

größer, da höhere Oberflächenladungen zu einem stärkeren elektroosmotischen Fluss führen. Für hohe Salzkonzentrationen ist die Kraftreduzierung bei gegebener Oberflächenladung nahezu konstant, für sehr geringe Salzkonzentrationen nimmt sie dagegen nach diesem Modell ab, da sich die Debye-Längen von DNA und Porenwand bei dieser kleinen Pore bereits zu überschneiden beginnen. Zu beachten ist außerdem, dass selbst bei absolut ungeladener Poren-Oberfläche noch immer eine Reduzierung der elektrostatischen Kraft stattfindet, da die DNA ihre Ladung – und abschirmende Doppelschicht – behält und sich so noch immer ein elektroosmotischer Fluss (von etwas geringerer Stärke) ausbilden kann.

Bei der Übertragung auf tatsächliche Kraftmessungen muss man in diesem Modell jedoch beachten, dass natürlich auch die Oberflächenladung selbst – je nach Material mehr oder weniger stark – von der Salzkonzentration (und dem pH-Wert) abhängen kann. So besitzt z.B. Siliziumdioxid bei hohen KCl-Salzkonzentrationen eine Oberflächenladung von $S = -60 \text{ mC/m}^2$ und bei niedrigen Salzkonzentrationen nur noch bis zu -4 mC/m^2 [136]. An Siliziumnitridporen konnte dagegen bisher keine Abhängigkeit der effektiven Kraft von der Salzkonzentration nachgewiesen werden [47], allerdings ist man aus experimentellen Gründen (Vermeidung von Klebeeffekten usw.) zumeist an einen schmalen Bereich möglicher pH-Werte gebunden. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass in Siliziumnitrid die Oberflächenladung stark vom Prozess des Bohrens der Nanopore abhängt, und z.B. durch Beleuchtung der Pore mit sichtbarem Licht während des Experiments zusätzliche negative Ladungen induziert werden können, die dann den elektroosmotischen Fluss erhöhen [137].

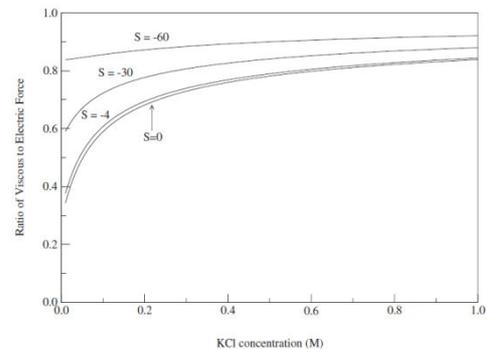


Abbildung 28: F_{EOF}/F_e in Abhängigkeit von der Salzkonzentration für verschieden stark geladene Oberflächen. Simuliert für eine 5 nm breite Pore in einer 60 nm dicken Membran. Aus [136]

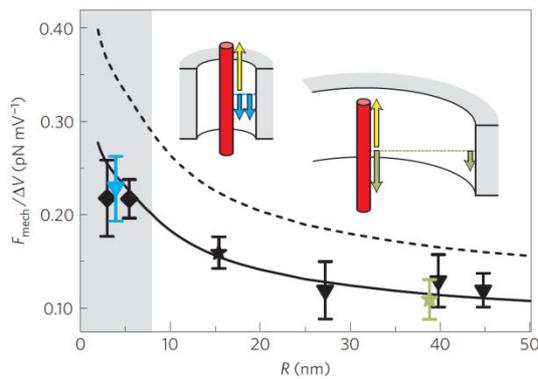


Abbildung 29: Normierte effektive Kraft F_{eff}/U in Abhängigkeit vom Porenradius R . Aus [48]

Der elektroosmotische Fluss ist ebenfalls der Grund dafür, dass die gemessene effektive Kraft nicht nur von der angelegten Spannung, und wie beschrieben von der Oberflächenladung abhängt, sondern auch von der Porengeometrie selbst. So führt eine raue Poren-Innenseite zu einer geringeren Fließgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses und damit zu einer höheren gemessenen, effektiven Kraft. Auch die Größe der Pore wirkt sich auf die Kraft aus, besonders wenn sich bei kleinen Poren die elektrochemischen Doppelschichten von DNA und Porenwand überlappen können und so zu geringerem elektroosmotischen Fluss und damit höheren effektiven Kräften führen. Abbildung 29 zeigt die normierten effektiven Kräfte in Abhängigkeit des Porenradius (für 60 nm Siliziumdioxid-Membranen), wie sie von van Dorp et al. bestimmt wurden [48], und als Referenz für die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse verwendet werden. Im Schema sind dabei die elektrischen Kräfte als Pfeil nach oben und die durch das elektroosmotische Flussprofil entstehenden Reibkräfte für zwei unterschiedliche Porengrößen als Pfeile nach unten dargestellt.

In allen Fällen ist die gemessene effektive Kraft proportional zur angelegten Spannung, da sich sowohl elektrostatische als auch elektroosmotische Reibkraft proportional zum elektrischen Feld verhalten. Werden dagegen mehrere DNA-Stränge gleichzeitig in die Pore gefädelt, so ist die Kraft nicht proportional zu ihrer Anzahl. So erzeugen zwei DNA-Stränge z.B. nicht genau die doppelte, sondern eine leicht geringere messbare Kraft, da die zusätzlichen Abschirmschichten von mehreren Strängen in der Porenregion (besonders bei geringen Salzkonzentrationen) hydrodynamisch wechselwirken und damit kooperativ den elektroosmotischen Fluss weiter erhöhen können. Jedes zusätzliche DNA-Molekül in der Nanopore liefert damit (durch nun stärkeren elektroosmotischen Fluss) einen leicht geringeren Beitrag zur effektiven Kraft als sein jeweiliger Vorgänger [138].

3. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Versuchsaufbauten und Messmethoden vorgestellt, die zur Gewinnung der im nachfolgenden Kapitel aufgeführten Messergebnisse zur Anwendung gebracht wurden. Darin eingeschlossen sind die benötigten Materialien, Chemikalien und die Präparationen der jeweiligen Proben. Zunächst wird hierfür auf die Nanoporen-Experimente eingegangen, gefolgt von den DNA-Streckexperimenten, den Rasterkraft-Mikroskopie-Aufnahmen sowie der Beschreibung der Magnetischen Pinzette.

3.1. Nanoporenexperimente

Beschrieben werden hier der Aufbau der Optischen Pinzette für die Nanoporenexperimente, das allgemeine Layout der bei diesen Versuchen verwendeten Flüssigkeitszellen, sowie die Herstellung und Verwendung der verschiedenen Membranen (Silizium-Nitrid, Graphen, Carbon-Nanomembranen, Lipidmembranen und –beschichtungen) und die Präparation der dazugehörigen DNA-Proben.

3.1.1. Versuchsaufbau

Der Aufbau der Optischen Pinzette für die Nanoporen-Experimente soll im Folgenden einführend kurz skizziert werden. Eine genauere Beschreibung (inkl. Herstellerangaben) des Aufbaus mit rückgestreutem Licht lässt sich dabei in den dazugehörigen Veröffentlichungen [22,27] und die Weiterentwicklung zur Videoauswertung in [28] und [25] finden.

Optische Pinzette

Die Optische Pinzette ist in Abbildung 30 schematisch dargestellt. Das Kernstück bildet ein leistungsstarker Infrarot-Laser (Nd:YAG, 1000 mW, 1064 nm) der in ein inverses Mikroskop eingespiegelt wird. Der linear P-polarisierte Strahl (durchgezogene Linie) passiert dort zunächst unverändert einen polarisierenden Strahlteiler (*polarizing beam splitter* – PBS), wird anschließend aufgeweitet, von einer $\lambda/4$ -Platte rechts-zirkular polarisiert und mit einem Wasserimmersions-Objektiv (60x) in die Probenkammer fokussiert um dort die Optische Falle zu bilden. Das vom gefangenen Partikel zurückgestreute Licht (gestrichelte Linie) wird vom gleichen Objektiv aufgefangen und in einem parallelen, nun links-zirkular polarisierten Strahl über den gleichen Strahlengang zurückgeschickt. Nach dem Passieren der $\lambda/4$ -Platte liegt dieses Licht linear S-polarisiert vor und wird deshalb vom Strahlteiler nun auf einen Detektor ausgespiegelt. Wirkt eine Kraft (in axialer Strahlrichtung) auf das gefangene Partikel, so wird dieses aus dem Strahlfokus ausgelenkt und die Intensität des rückgestreuten

Licht ist (nach vorheriger Kalibration) ein Maß für die wirkende Kraft. Um Interferenzeffekte (zwischen dem reflektierten Licht vom Kügelchen und von der Nanoporen-Membran) auf dem Detektor zu verringern, sind zusätzlich eine Lochblende als konfokale Filterung sowie ein Obstruktionsfilter in den Strahlengang eingebracht, welcher achsenparalleles Licht (wie es hauptsächlich von der Membran reflektiert wird) ausblendet und konvergent rückgestreutes Licht vom Kügelchen (welches in der Peripherie des Strahlengangs zurückgestreut wird) passieren lässt. So formt sich ein „Doughnut-Profil“ des Fallenlasers, welches (aufgrund geringerer Streukräfte) die Fallenstärke in Strahlrichtung noch einmal erhöht.

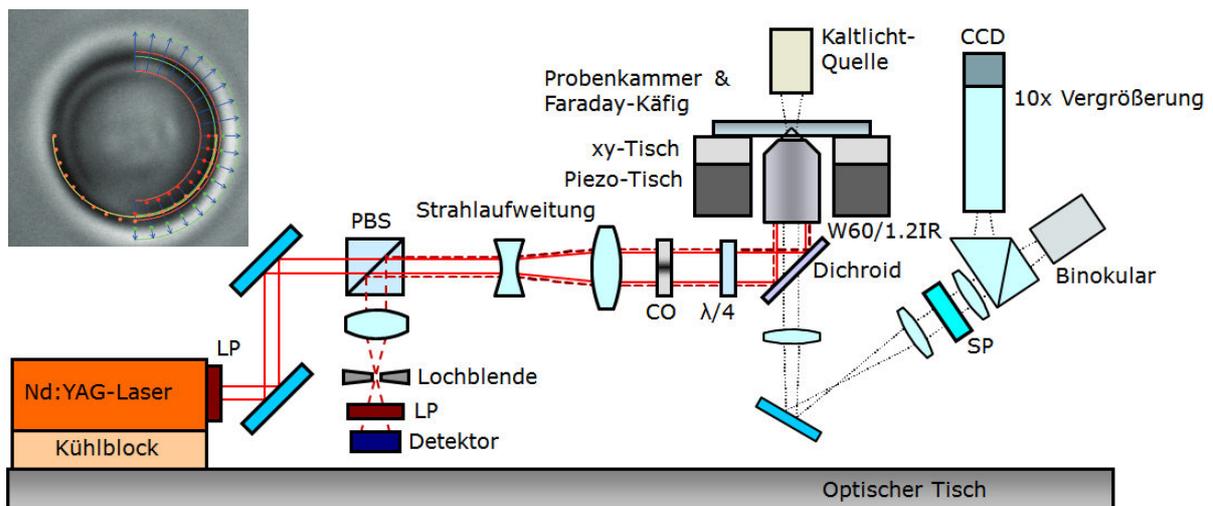


Abbildung 30: Schematischer Aufbau der Optischen Pinzette mit Kraftmessung über rückgestreutes Licht und Videoauswertung. Der Bildausschnitt links zeigt ein Abbild des gefangenen Kügelchens, wie es der CCD erscheint und von der Auswertungssoftware zur Berechnung der scheinbaren Kugelgröße (gelber Kreis) aus der Detektion der steigenden (grün) und fallenden (rot) Kontrast-Kanten entlang der blau markierten Speichen verwendet wird.

Die Flüssigkeitszelle wird auf einem mechanischen xy-Tisch sowie einem darauf befindlichen Piezo-Tisch montiert, so dass sich das gefangene Objekt relativ zur Probenkammer grob ausrichten sowie mit Nanometer-Präzision bewegen lässt. Eine Abschirmung mit einer Metallbox wirkt als Faradayscher Käfig und erlaubt so das störungsfreie Messen der winzigen elektrischen Ströme durch die Nanopore.

Über das inverse Mikroskop kann die von oben beleuchtete Probenkammer zusätzlich mit einem Okular betrachtet werden, während eine 10x Nachvergrößerung ein Bild des gefangenen Kügelchens auf einer CCD-Kamera erzeugt. Dies erlaubt zusätzlich eine Echtzeit-Kraftauswertung über das Videobild des gefangenen Kügelchens, wofür von einer Software die Kanten im Bild detektiert werden und ein Kreis in das Bild vom Kügelchen gefittet wird, um schließlich die scheinbare Größe des Partikels im Bild zu bestimmen [25,28]. Wird das Kügelchen aus dem Laserfokus durch eine Kraft (in axialer z-Richtung) ausgelenkt, so ändert sich dieser scheinbare Kugelradius auf dem CCD-Chip und die Größenänderung ist ein Maß für die wirkende Kraft. Eine Auslenkung in x- oder y-Richtung dagegen würde anstatt einer

Größenänderung eine Verschiebung des Kugel-Abbilds auf dem CCD-Chip hervorrufen und ist somit ebenfalls leicht detektierbar.

Die gesamte Regelung und Messung (von Piezo-Tisch-Bewegung, Kraft, elektrischer Spannung und Ionenstromstärke) wird in einer LabVIEW-Steuersoftware vorgenommen und die Kalibrierung der Kraft erfolgt für beide Messmethoden (rückgestreutes Licht und Videoauswertung) jeweils mit Hilfe der im Kapitel 2.1. beschriebenen Stokes-Reibung.

Flüssigkeitszelle und elektrische Kontaktierung

Die verwendete Flüssigkeitszelle für die Nanoporen-Experimente ist in der folgenden Abbildung 31 dargestellt.

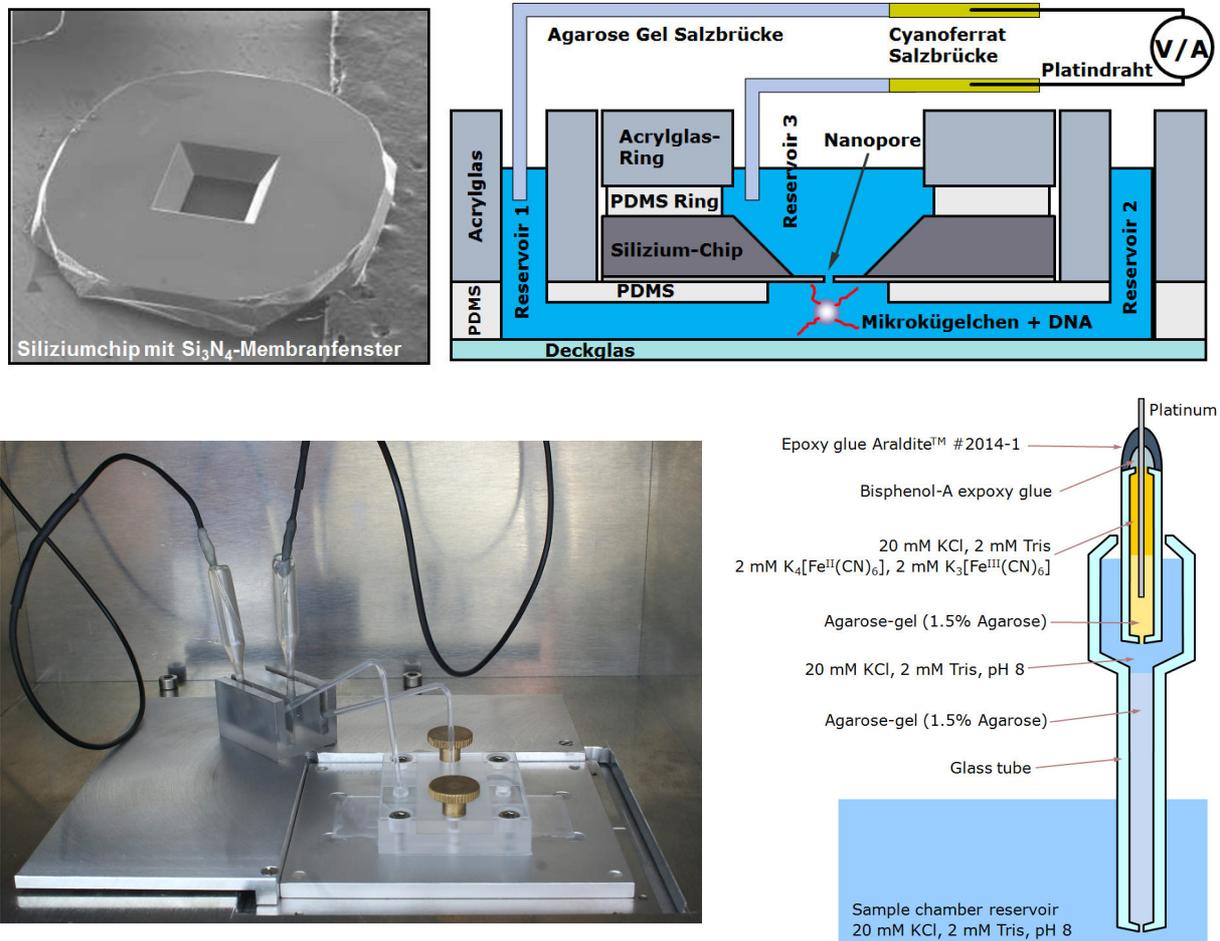


Abbildung 31: Der Siliziumchip mit Siliziumnitrid-Membranfenster und darin befindlicher Nanopore (oben links), sowie die Flüssigkeitszelle mit elektrischer Kontaktierung.

Die Grundplatte bildet ein dünnes Deckgläschen, über welches die darüber befindliche Flüssigkeitskammer durch das Mikroskop betrachtet werden kann, sowie das Einstrahlen des

Fallenlasers ermöglicht wird. Auf dieses Gläschen wurde zuvor eine ca. 40 μm dicke Schicht eines Polymers (PDMS – Polydimethylsiloxan) mittels Rotationsbeschichtung aufgetragen und durch mehrstündiges Erhitzen bei 80°C ausgehärtet. Aus diesem Polymer wurde anschließend mittig ein Kanal ausgeschnitten und mit einer weiteren 40 μm dünnen PDMS-Lage vollständig abgedeckt, so dass sich eine versiegelte Kammer von ca. 1 mm Breite, 26 mm Länge und 40 μm Höhe ergibt. Drei von oben gestanzte Löcher erlauben einen Zugang zu dieser Probenkammer, wobei die beiden äußeren mit größeren Flüssigkeitsreservoirs aus Acrylglas verbunden sind und auf das mittlere der Silizium-Chip mit Membranfenster und Nanopore gelegt wird. Die Gegenseite des Chips wird ebenfalls mit einem PDMS-Ring versiegelt und der gesamte Aufbau mit einem hohlen Acrylglas-Stempel fixiert, der damit das dritte Flüssigkeitsreservoir bildet.

Damit sich die beiden PDMS-Schichten wasserdicht verbinden und der Kanal anschließend luftblasenfrei mit zuvor entgastem Wasser füllen lässt, wird das PDMS direkt vor dem Zusammenbau ca. 45 Sekunden mit Sauerstoff-Plasma behandelt und dadurch stark hydrophil gemacht. Auch der Siliziumchip wird entweder durch Sauerstoffplasma oder (für noch größere Hydrophilie) mit Piranha-Säure behandelt, um eine luftblasenfreie Benetzung mit Wasser zu gewährleisten, da selbst kleinste Blasen die Pore verstopfen würden. In Fällen sehr sensibler Membranen, die eine solche Behandlung nicht überstehen, muss dagegen der Chip zunächst mit Ethanol komplett benetzt werden und der Einbau in die Flüssigkeitszelle danach vollständig unter Wasser erfolgen.

Nach dem Zusammenbau der Zelle lässt sich das entgaste, destillierte Milli-Q-Wasser über die drei Flüssigkeitsreservoirs durch die jeweils benötigte salzhaltige Pufferlösung austauschen und auch die Kügelchen und DNA-Lösungen lassen sich so einspülen. In allen Fällen muss jedoch darauf geachtet werden, dass der Kanal nicht austrocknet oder kleinste Luftblasen eingebracht werden, da sich diese kaum mehr entfernen lassen und den Kanal oder die Pore endgültig verstopfen würden.

Die elektrische Kontaktierung des ersten und dritten Reservoirs, zu beiden Seiten der Nanopore, erfolgt über zwei Platindrähte. Diese befinden sich in einer Cyano-Ferrat-Lösung und sind über eine Agarose-Gel-Brücke mit den Reservoirs verbunden. Diese Art der Kontaktierung sorgt dafür, dass der Widerstand der Platindraht-Oberfläche verringert wird und durch einen langsameren Übergang vom Oberflächen-Potential zu demjenigen der Pufferlösung eine bessere Leitfähigkeit und schnellere Reaktion auf Spannungsänderungen gegeben ist [21]. Der Grund hierfür ist die Reduzierung der elektrochemischen Doppelschicht (vgl. Kapitel 2.7.), die sich ansonsten an den Elektroden wie ein Kondensator aufladen würde sobald ein Potential angelegt wird.

Das Anlegen der Spannung und Messen der Ionenstromstärke erfolgt mittels LabVIEW über einen Axopatch Verstärker (Axopatch 200B, Molecular Devices, California, USA).

3.1.2. Präparationen für Siliziumnitrid-Poren

Porenherstellung

Als Trägermedium für die Nanoporen dient ein 3 mm großer Siliziumchip aus der Elektronenmikroskopie, mit einem quadratischen Membranfenster von typischerweise ca. 60 µm Kantenlänge (vgl. Kapitel 2.2 und Abbildung 7). Dieses Fenster enthält eine freistehende Siliziumnitrid-Membran mit variablen Ausmaßen, wobei in dieser Arbeit 10 nm (Norcada Inc., Edmonton, Kanada) sowie 20 und 50 nm (Structure Probe Inc., Pennsylvania, USA) dünne Membranen verwendet wurden.

In diese Siliziumnitrid-Membran wird mittig mit Hilfe eines Helium-Ionen-Mikroskops (ORION Plus, Carl Zeiss AG) eine einzelne Nanopore mit dem jeweils gewünschten Durchmesser gebohrt. Gegenüber dem zuvor verwendeten [139] Gallium-Ionen-Strahl bietet diese Methode eine höhere erreichbare Auflösung (und damit kleinere mögliche Nanoporen-Durchmesser), vermeidet die Aufladung der Oberfläche (da ein gleichzeitiger Beschuss mit ladungskompensierenden Elektronen möglich ist) und ist generell durch einen sanfteren Material-Abtrag gekennzeichnet. Damit kann z.B. der Porenradius allein über die Dauer der Belichtung eingestellt werden und durch großflächiges Belichten wird auch ein gezieltes weiteres Ausdünnen der Membran möglich.

Vor dem Einbau in die Flüssigkeitszelle wird der Chip entweder durch 45-sekündige Sauerstoff-Plasmabehandlung oder durch ein 30-minütiges Bad in 80°C heißer Piranha-Säure (Wasserstoffperoxid und Schwefelsäure im Verhältnis 1:3) gereinigt und hydrophil gemacht, sowie mit Milli-Q-Wasser abgespült.

Probenpräparation

Sämtliche Experimente wurden im „Nanoporenpuffer“ (20 mM KCl bzw. wenn angegeben auch höhere Konzentration, 2 mM Tris/HCl und pH-Wert 8,0) durchgeführt, der durch Unterdruck entgast und anschließend mikrogefiltert wurde. Für freie DNA-Translokationen durch die Nanopore wurden 16,4 µm lange λ-DNA-Stränge (48502 Basenpaare, New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA oder auch Roche, bzw. Promega Corp., Wisconsin, USA) verwendet.

Für die kontrollierten Translokationen mittels Optischer Pinzette wurden die λ-DNA-Stränge an mit Streptavidin beschichtete Mikrokügelchen aus Polysterol (3,05 bzw. 3,28 µm Durchmesser, 0,5% w/v, Spherotech, Illinois, USA) immobilisiert.

Dafür wurde die DNA wie folgt mit mehreren Biotin-Molekülen an einem Ende markiert: 20 µl λ-DNA (500 ng/µl) und 2 µl Oligos (5'-AGGTCGCCGCC-3', 432 ng/µl, Metabion, München) werden zusammen auf 75 °C aufgeheizt um die ringförmig vorliegende DNA (Plasmid) zu einem Strang mit 12 überstehenden Basenpaaren (*sticky ends*) auf jeder Seite aufzubrechen. Ein anschließendes langsames Abkühlen (innerhalb von 80 Minuten auf 25 °C) sorgt dafür, dass sich die Oligos an die komplementären überstehenden Basenpaare an einem Ende der DNA anlagern und diese Enden damit absättigen. Eventuelle Strangbrüche werden

nun durch die Zugabe von 10 μl 2xQuickLigase Reaktionspuffer und 1 μl Quick T4 DNA Ligase (beide New England Biolabs Inc.) und einer halbstündigen Inkubation bei 25 °C kovalent repariert. Anschließend wird die Ligase durch 20 μl EDTA (0,5 M Lösung) und ein Aufheizen für 10 Minuten auf 65 °C hitzedeaktiviert. Das jeweilige andere Ende der DNA-Stränge wird durch die Zugabe von 0,6 μl der mit 4 Biotin markierten Oligos (5'-GGGCGGCGACCT-3', 543 ng/ μl , InvitrogenTM, California, USA) und einem langsamen Abkühlen (von 40 °C auf 25 °C in 60 Minuten) markiert. Zur Aufreinigung wird das komplette Gemisch in einen Filter (Ultra-0,5 50 kDA Ultracel Filter, AmiconTM) gegeben und in mehreren Zentrifugations-Schritten (je 5000g für 7 Minuten) mit Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0) gewaschen. Nach einem anschließenden Verdünnen der abgefilterten DNA mit 180 μl des gleichen Puffers hat diese etwa eine Konzentration von 50 ng/ μl .

Zum Immobilisieren der DNA an den Mikrokügelchen wurden 0,5 μl der Kügelchen-Stammlösung und etwa 1 μl der zuvor beschriebenen DNA-Lösung in 10 μl Nanoporenpuffer gelöst und direkt vor dem Experiment für etwa 30 Minuten im Kühlschrank bei 6 °C belassen.

In den Experimenten mit Liganden wurde diese fertig präparierte DNA-Kügelchen-Lösung noch zusätzlich mit den jeweiligen Proteinen inkubiert:

- Im Falle von RecA mit 20 μl Reaktionspuffer (1,1 M KCl, 16 mM MgCl₂), 10 μl ATP γ S-Lösung (860 μM , Roche Inc.) und 0,4 μl RecA (53 μM , New England Biolabs Inc.) für eine Stunde bei 37 °C und anschließendem Verdünnen mit 1 ml Nanoporenpuffer.
- Im Falle von EcoRI mit 20 μl CaCl₂-Puffer (20 mM) und 0,7 μl EcoRI-Lösung (10 u/ μl) für eine Stunde bei 37 °C und anschließendem Verdünnen mit 1 ml Nanoporenpuffer.
- Für die Experimente ohne Liganden wurde die DNA-Kügelchen-Lösung dagegen direkt mit 1 ml Nanoporenpuffer verdünnt.

Bei allen Experimenten kann es dabei von Vorteil sein, das fertige Gemisch vor dem Experiment noch einmal aufzureinigen, falls es zu unerwünschtem Kleben der Kügelchen an Membran oder anderen Kügelchen kommen sollte. Hierfür wurde bei 10000g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand entnommen und das Gemisch erneut mit 1 ml Nanoporenpuffer verdünnt.

3.1.3. Präparationen für Graphen-Poren

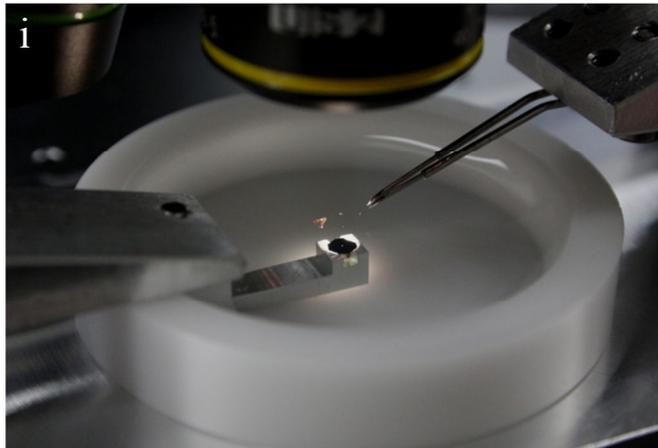
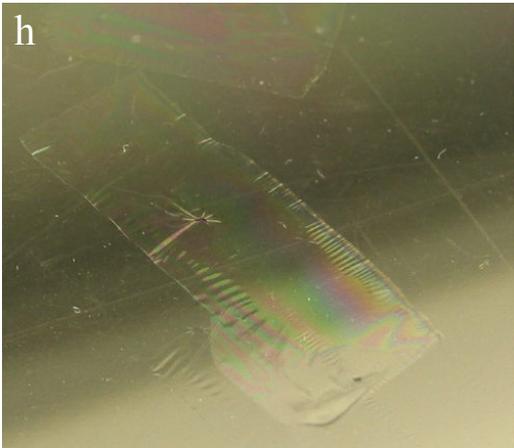
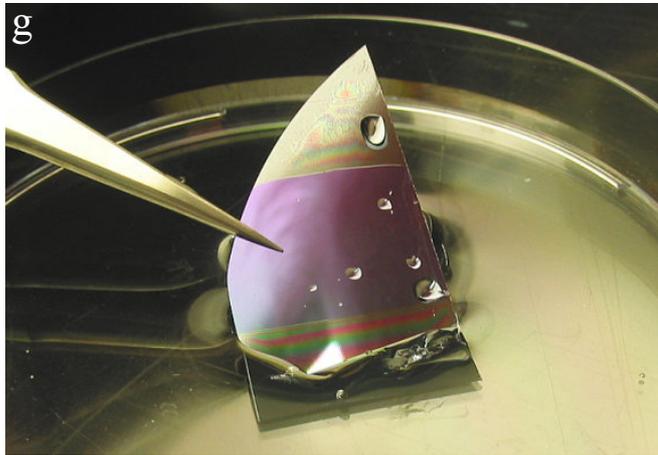
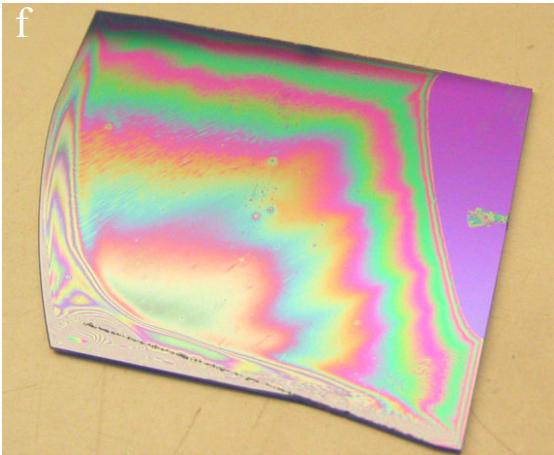
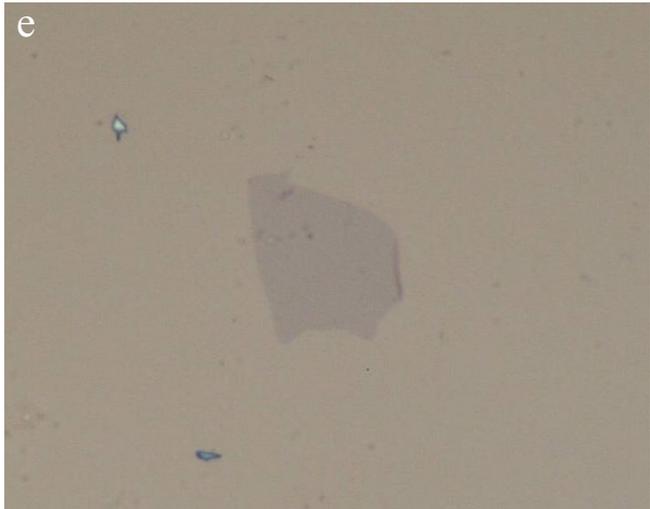
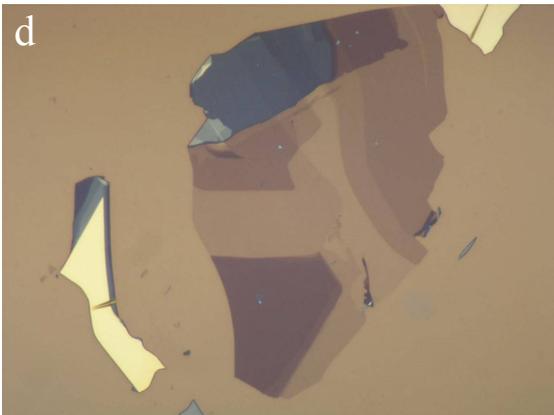
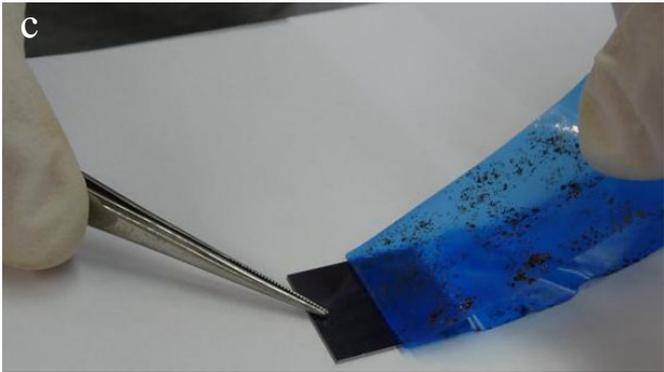
Die Arbeitsschritte zur Herstellung von Graphen-Nanoporen sind in der nachfolgenden Abbildung 32 dargestellt. Nach der Methode der Exfoliation [128] wird eine Graphit-Flocke („Graphenium“, 5-10 mm, NGS Naturgraphit GmbH) auf Adhäsions-Klebeband (Nitto Tape, SPV 224P, FFT Handelsgesellschaft) gegeben (a) und durch mehrmaliges Zusammenfalten und Abziehen immer weiter ausgedünnt (b), so dass sich neben den Graphitregionen auch Stellen mit Graphen-Monolagen ergeben. Durch das Anpressen auf ein ausgeschnittenes Teilstück eines Siliziumwafers mit einer 90 nm dicken Siliziumdioxidschicht (P-type, B-doped <100> Si Wafer, MTI Corp., California, USA) werden diese Regionen schließlich auf den Wafer übertragen (c). Die SiO₂-Schicht sorgt nun durch Interferenzeffekte dafür, dass die Graphen-Mono- und -Multilagen im Auflichtmikroskop sehr einfach anhand ihrer Farbe und des Kontrastes unterschieden werden können (d), was es ermöglicht gezielt nach ausreichend großen Monolagen (e) zu suchen und diese zu markieren.

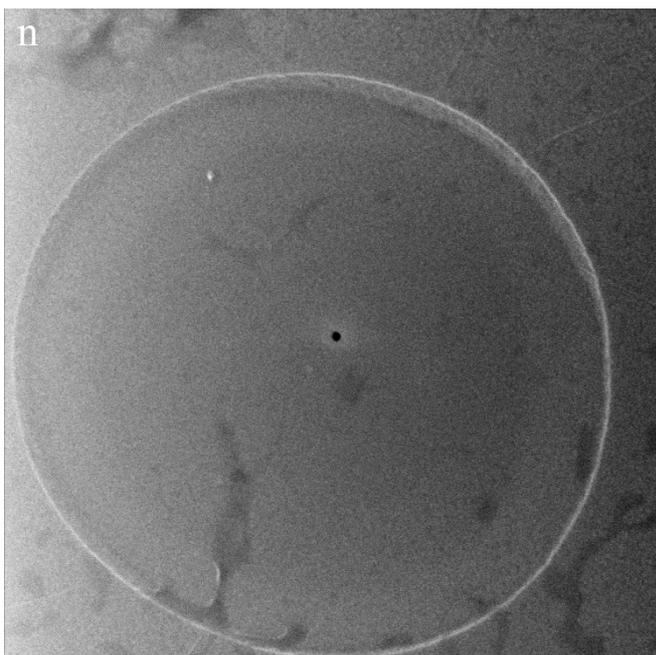
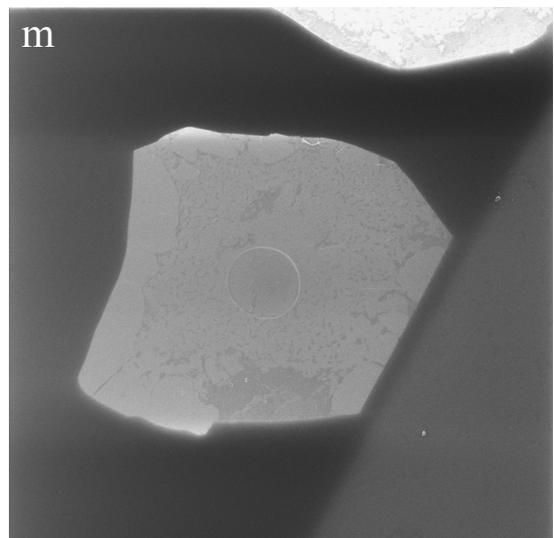
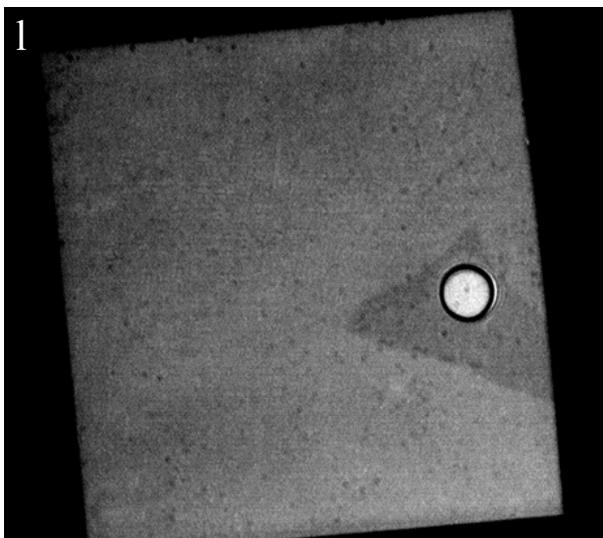
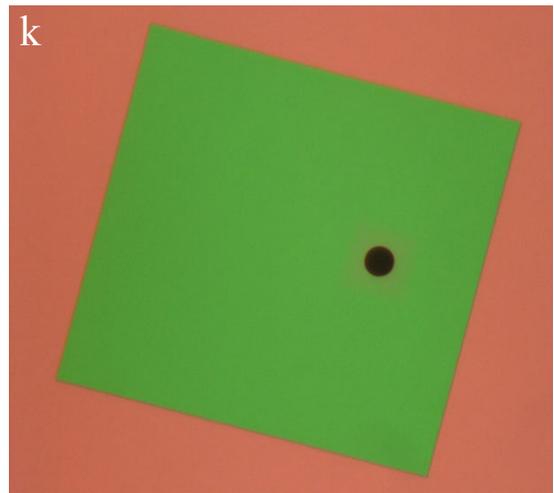
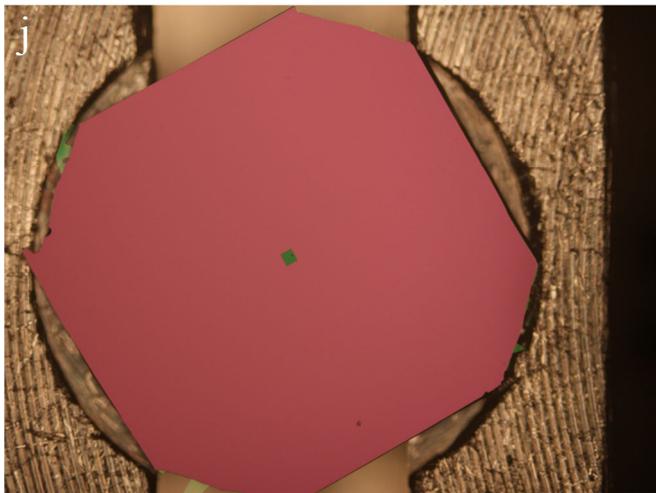
Das Übertragen des Graphens auf ein (für die Flüssigkeitszelle geeignetes) Membranfenster erfolgt anschließend über die Methode des *Wedging-Transfers* [140]: Hierfür wird das Waferstück in ein Cellulose-Polymer (0,3 g Cellulose Acetat Butyrat, 65000 g/mol, gelöst in 10 ml Ethylacetat) getaucht und getrocknet (f). Die zuvor markierte Region mit der Graphen-Monolage wird mit einem Skalpell ausgeschnitten und durch Eintauchen in Wasser (g) vom Wafer gelöst. Das ausgehärtete Polymer schwimmt nun auf der Wasseroberfläche (h) und trägt das Graphen an seiner Unterseite, so dass es mit einem Mikromanipulator (i) durch zwei Nadelspitzen sehr genau auf der Wasseroberfläche bewegt werden kann. Im Wasser wird nun ein Siliziumchip (Ref: 11202125, Silson Ltd., England) mit einem Membranfenster (j) unter dem schwimmenden Polymer mit dem Graphen positioniert. Im Gegensatz zu den anderen Nanoporen-Experimenten besteht die Membran hier jedoch aus 400 nm dickem Siliziumnitrid und enthält ein 5-7 µm großes Loch (k), auf welches die Graphenlage abgelegt wird. Nach dem vorsichtigen Absenken des Wasserspiegels trocknet der Chip und das Graphen samt Polymer haftet fortan fest auf der Siliziumnitridmembran. Ein Eintauchen des Chips in Ethylacetat löst das Polymer vollständig auf und es verbleibt nur die Graphenmonolage auf dem Chip (l), die das Loch in der Membran vollständig bedeckt.

Im Gegensatz zum reinen Siliziumnitrid liefert Graphen dabei im Helium-Ionen-Mikroskop einen hohen Kontrast (m) und das Bohren einer Nanopore kann sofort nach der dafür nötigen Bestrahlung mit Helium-Ionen auch abbildend kontrolliert werden (n).

Der Einbau in die Flüssigkeitszelle für die Experimente erfolgt analog zu Kapitel 3.1.1., wobei auf Sauerstoff-Plasma oder Piranha-Säure aufgrund der sehr dünnen Graphen-Membran allerdings verzichtet werden muss, und der Zusammenbau stattdessen nach dem luftblasenfreien Benetzen mit Isopropanol komplett unter Wasser erfolgt.

Die für die Experimente verwendete freie λ-DNA und die DNA-Kügelchen-Lösung sind ebenfalls identisch zu den Proben der anderen Nanoporen-Experimente mit Siliziumnitrid-Poren (Kapitel 3.1.2.).





ZEISS	Field Of View	Acceleration V	Dwell Time	Frame Averaging
	6.00 um	25.2 kV	0.5 us	64
	Working Dist	Blanker Current	Tilt Angle	
	9.5 mm	-0.1 pA	0.0 deg	500.00 nm

Abbildung 32: (diese und vorige Seite) Arbeitsschritte zur Herstellung von Nanoporen in einer Graphen-Membran mittels Exfoliation, Wedging-Transfer und Helium-Ionen-Mikroskop. Erklärung im Text.

3.1.4. Präparationen für Carbon-Nanomembran-Poren

Die von der Arbeitsgruppe um Professor Dr. Armin Götzhäuser hergestellten Carbon-Nanomembranen liegen wie in Abbildung 33 gezeigt, fertig quervernetzt auf einer Goldschicht vor, die wiederum auf ein dünnes Schichtsilikat (Glimmer bzw. *Mica*) aufgetragen wurde. Um die Membran für die Experimente als freistehenden Träger für eine Nanopore nutzen zu können, muss sie auf einen für die Flüssigkeitszelle geeigneten Siliziumchip mit Siliziumnitridmembran, bzw. auf das darin befindliche Loch (mit einem Durchmesser von 7-12 μm) übertragen werden.

Hierfür wird eine ähnliche Methode verwendet wie beim *Wedging-Transfer* von Graphen. Zunächst wird die Carbon-Nanomembran mit zwei dünnen Schichten eines Polymers (PMMA) beschichtet [126], eine davon weich und flexibel um die Membran nicht zu beschädigen und eine härtere um die großflächige Struktur der Schicht während des Transfers zu erhalten. Das Auftragen geschieht jeweils per *spin coating* mit einem anschließenden Aushärten bei 90 °C für 5 Minuten. Danach erfolgt ein Einweichen in Kaliumiodid (KI/I₂-Ätzlösung) für 3 Minuten sowie ein mehrmaliges abwechselndes Spülen mit Wasser und KI/Wasser-Lösung. Bei einem erneuten Bad in KI/I₂-Lösung für 10 Minuten schwimmt das Konstrukt auf der Wasseroberfläche, das Gold löst sich nun allmählich auf und das sich ablösende Mica sinkt zu Boden. Nun kann der Siliziumchip samt Mikrometerloch im Wasser unterhalb der schwimmenden Carbon-Nanomembran platziert und der Wasserspiegel gesenkt werden. Nach dem Eintrocknen (20 Minuten 90 °C) wird das PMMA auf der Oberseite mit Aceton aufgelöst und es ergibt sich eine freistehende Carbon-Nanomembran in die nun mit dem Helium-Ionen-Mikroskop eine Nanopore gebohrt wird.

Im Gegensatz zu Graphen liefert die Carbon-Nanomembran jedoch kaum Kontrast während des Bohrens, so dass eine Kontrolle der Porengröße nur über das Abschätzen der Bohrparameter und während des Experiments über den elektrischen Widerstand der Porenmembran erfolgen kann.

Sollten dickere Membranen hergestellt werden, so werden vor dem Bohren mehrere Einzelschichten durch den beschriebenen Transferprozess aufeinandergestapelt.

Der Einbau in die Flüssigkeitszelle und die Probenpräparation (DNA + Kügelchen) erfolgen analog zu Graphen wie in den vorigen Kapiteln beschrieben.

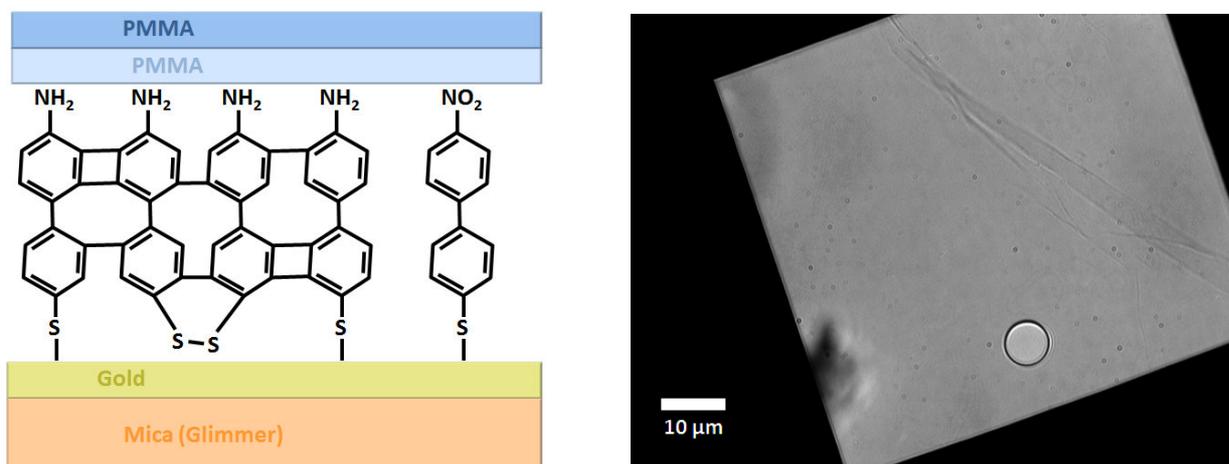


Abbildung 33: Carbon-Nanomembran vor (links) und nach (rechts) dem Transfer auf das 7 μm große Loch in einer Siliziumnitrid-Membran. Zu erkennen ist vor allem der Faltenwurf der Carbon-Membran neben dem Loch.

3.1.5. Präparationen für lipidbeschichtete Poren

Zur Beschichtung einer Siliziumnitrid-Nanopore mit einer Lipiddoppelschicht wird der Nanoporenchip entsprechend Kapitel 3.1.2. mit Piranha-Lösung gereinigt und in die Flüssigkeitszelle eingebaut. Nun wird die Zelle mit Nanoporenpuffer hoher Salzkonzentration (2M KCl) befüllt und als Referenz der elektrische Widerstand der Pore gemessen, um so ihren Durchmesser abschätzen zu können (vgl. Kapitel 4.1.1.). Die hohe Salzkonzentration ist hierbei nötig, da bei geringen Ionenstärken die Oberflächenladungen des Siliziumnitrids die Leitfähigkeit der Pore dominieren würden und erst bei hohen Ionenstärken (1-2 M) hauptsächlich die Poren-Geometrie für deren Widerstand ausschlaggebend ist.

Nach der Widerstandsmessung werden die Reservoirs der Flüssigkeitszelle zur Beseitigung aller Salzreste mit destilliertem Wasser gespült und anschließend wieder mit Vesikelpuffer (150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH-Wert 7,5) befüllt. In das erste Reservoir werden nun 100 µl in Vesikelpuffer gelöste kleine unilamellare Vesikel (SUV) in die Flüssigkeitszelle gegeben und nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten mit destilliertem Wasser wieder hinausgespült. So wird sichergestellt, dass nur diejenigen Lipide in der Flüssigkeitszelle verbleiben, die durch das Platzen der Vesikel an der hydrophilen Siliziumnitridmembran eine Lipiddoppelschicht geformt haben und nun auch die Nanopore benetzen. Zur Kontrolle wird nun erneut der Widerstand der Pore in hoher Salzkonzentration (2 M KCl) gemessen und mit dem zuvor bestimmten Referenzwert der unbeschichteten Pore verglichen um auf eine erfolgreiche Beschichtung (und damit verbundener Reduzierung des Porendurchmessers) rückschließen zu können. Gleichzeitig wurden die Vesikel mit Rhodamin-B fluoreszent markiert, so dass zeitgleich eine optische Kontrolle der Beschichtung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Filtersatz 20, Carl Zeiss, Anregung BP 546/12, Emission BP 575-640) ermöglicht wird.

Angelehnt an [73] wurde die SUV-Lösung nach der folgenden Methode hergestellt: 150 µl POPC (Ref. 850457) und 10 µl Rhodamin-DOPE (Ref. 810150, beide Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) werden im Verhältnis 99,2/0,8 Mol-% in 40 µl Chloroform gelöst und in einen Rundkolben gegeben. Dieser wird für 20-30 Minuten im Rotationsverdampfer mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, so dass das Chloroform vollständig verdampft. Anschließend werden 500 µl Vesikelpuffer (s.o.) in den Rundkolben pipettiert und so lang geschwenkt, bis sich die Lipide vollständig von der Wand gelöst haben. Die Lösung wird nun in ein *Falcon Tube* gegeben, mit Eiswasser von außen gekühlt und mit einem Ultraschallfinger für ca. 15 Minuten mit Ultraschall (mit steigender Leistung) behandelt, bis sich die Lipide zu winzigen Vesikeln umformen und die Lösung damit klar und transparent wird.

Die Experimente mit DNA, Mikrokügelchen und Optischer Pinzette erfolgen analog zu den Experimenten an Siliziumnitrid-Nanoporen (Kapitel 3.1.2.).

Alternativ zu den SUV können auch riesige Lipidvesikel (GUV, mehrere Mikrometer Durchmesser) verwendet und über der Pore zum Platzen gebracht werden. Dazu werden sie in das obere (mit Nanoporenpuffer gefüllte) Reservoir 3 gegeben und während des Absinkens wird der Ionenstrom durch die Pore gemessen und aufgezeichnet.

Die Herstellung der GUV-Lösung erfolgt hierbei über die Methode der Elektroformation [141] (*electroswelling*): Es werden 31,32 μl DOPC (Ref. 850375), 0,793 μl DOPG (Ref. 840475) und 0,329 μl Rhodamin-DOPE (Ref. 810150, alle Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) in 467,75 μl Chloroform gelöst (Verhältnis 99 : 0,995 : 0,005 Mol-%). Zwischen zwei mit Indium-Zinn-Oxid beschichteten Gläsern wird ein U-förmig ausgeschnittenes Stück PDMS geklemmt, um so eine Reaktionskammer zu formen. Auf beide Kammerinnenseiten werden je 15 μl der Lipidlösung pipettiert, großflächig auf den Gläsern verteilt und für 3 Stunden im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Anschließend werden die Reaktionskammer mit Sucrose-Lösung (0,3 M) gefüllt und die beiden ITO-Glasplättchen mit Elektroden über Silberleitlack elektrisch kontaktiert. Jede Minute wird die angelegte 12 Hz Sinus-Wechselspannung um 0,1 V bis auf insgesamt 1,6 V (effektiv) erhöht und dann für 2 bis 3 Stunden bei 1,6 V belassen, so dass sich die Vesikel zwischen den Glasplättchen formen können. Ein leichteres Ablösen von den Oberflächen wird durch abschließendes Anlegen einer 5 Hz Rechteck-Wechselspannung für 10 Minuten erreicht, woraufhin die Vesikel durch das Ausspülen der Reaktionskammer mit Sucrose-Lösung entnommen werden können. Die Sucrose-Füllung der Vesikel sorgt dafür, dass die GUVs im Experiment leichter zu Boden sinken und dass sie (durch den osmotischen Druck) durch Änderung der umgebenden Pufferlösung leichter zum Aufplatzen zu bringen sind.

3.2. DNA-Streckversuche

Neben den Experimenten an Nanoporen bilden die DNA-Streckversuche eine weitere Möglichkeit Informationen über DNA-Ligand-Komplexe zu gewinnen. Da hierfür die DNA an beiden Enden zwischen zwei Kügelchen immobilisiert werden muss, wird ein modifizierter Versuchsaufbau der Optischen Pinzette benötigt, der im Folgenden beschrieben werden soll.

3.2.1. Versuchsaufbau

Der Aufbau der Optischen Pinzette für die DNA-Streckversuche ist in Abbildung 34 dargestellt, ähnelt in den wesentlichen Teilen dem in Kapitel 3.1.1. beschriebenen Versuchsaufbau und funktioniert nach den dort beschriebenen Prinzipien. Da nun jedoch Kräfte in x-Richtung (senkrecht zur Laserstrahl-Achse) gemessen werden sollen, kommt ein Lineardetektor zur Auswertung des rückgestreuten Lichts zum Einsatz. Eine Verschiebung des Mikrokügelchens aus dem Mittelpunkt der optischen Falle (aufgrund externer Kräfte) führt ebenso zu einer Verschiebung des Strahlkegels des rückgestreuten Lichtes, und kann nach einer Kalibration über die Stokes-Reibung vom Lineardetektor in eine Kraft übersetzt werden.

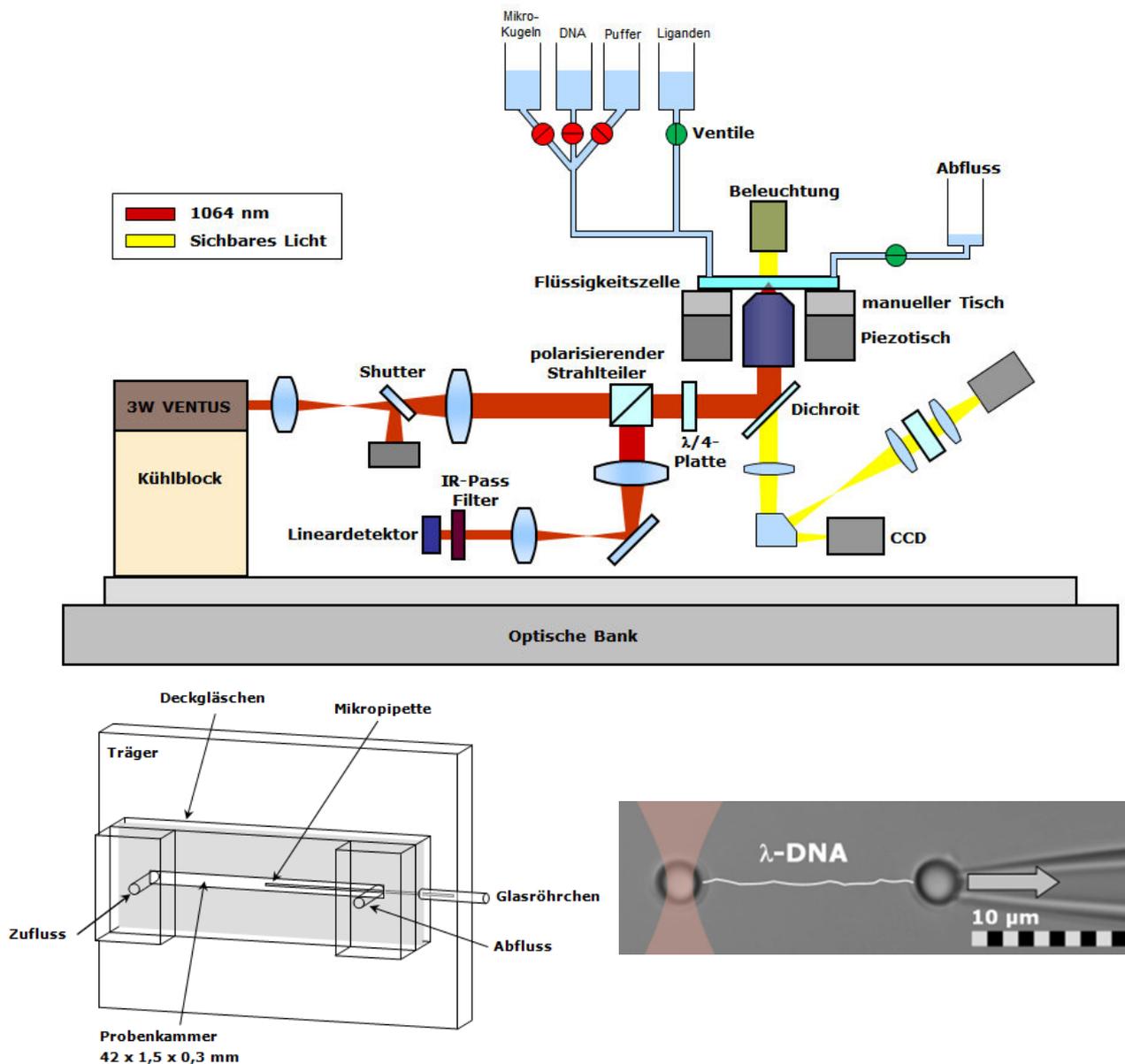


Abbildung 34: Versuchsaufbau der Optischen Pinzette mit Zuleitungssystem für die Proben (oben), Schema der Flüssigkeitszelle (links unten) sowie Bild der Mikrokügelchen und Mikropipette während des Experiments (rechts unten), wobei Laserfokus und DNA-Strang zur Veranschaulichung markiert wurden.

Auch die verwendete Flüssigkeitszelle muss an die veränderte Messprozedur angepasst werden. Sie besteht deshalb aus zwei Lagen Parafilm mit einem eingeschnittenen Kanal, die sich zwischen zwei Deckgläschen befinden. Zwischen die beiden Lagen wird zudem eine Mikropipette aus Glas (mit einem Spitzendurchmesser von 1-2 μm) geklemmt und über ein Glasröhrchen und einen Teflonschlauch mit einer Spritze verbunden, um so einen leichten Unterdruck an der Spitze erzeugen zu können.  ber zwei Bohrungen im oberen Deckgläschen und zwei aufgeklebte Acrylglas-Verbindungen werden ein Zu- und Abfluss zur Flüssigkeitszelle geschaffen, über welche sie mit fünf verschließbaren Flüssigkeitsreservoirs

verbunden wird. Diese erlauben das Einleiten (und Ausspülen) der Mikrokügelchen, der DNA, der Liganden sowie der verwendeten Pufferlösung, wobei sich die Fließgeschwindigkeit in der Flüssigkeitszelle über den hydrostatischen Druck durch den Höhenunterschied zwischen den Flüssigkeitsgefäßen an Zu- und Ablauf der Zelle, sowie über die Auswahl der Kanalbreite regeln lässt.

3.2.2. Probenpräparation

Für die Experimente muss zunächst ein λ -DNA-Strang zwischen zwei Mikrokügelchen immobilisiert werden. Hierfür werden zwei Mikrokügelchen (3,05 μm Durchmesser, Spherotech, Illinois, USA) mit der Optischen Pinzette gefangen, von denen eines in der Falle verbleibt und eines durch leichten Unterdruck an der Spitze der Mikropipette fixiert wird. Nach sorgfältigem Ausspülen der übrigen Kügelchen mit Pufferlösung kann die DNA-Lösung eingeleitet werden, während das Kraftsignal des gefangenen Kügelchens aufgezeichnet wird. Kommt es zu einem Anbinden eines Endes der mit Biotin markierten DNA-Stränge an das mit Streptavidin beschichtete Kügelchen in der Falle, so macht sich dies aufgrund der nun höheren Reibungskraft im Flüssigkeitsstrom durch kleine Kraftsprünge von wenigen pN bemerkbar. Da die DNA-Stränge an beiden Enden mit Biotin markiert sind, darf der Flüssigkeitsstrom nun (bei der Umstellung von DNA-Lösung auf Pufferlösung zum Spülen) keinesfalls unterbrochen werden, da sonst beide Enden eines Stranges am gleichen Kügelchen anbinden würden. Stattdessen wird darauf geachtet, dass der am Kügelchen gebundene Strang aufgrund der Strömung wie eine Fahne im Wind hinter dem gefangenen Kügelchen „flattert“ und ausgestreckt bleibt, während man sich mit diesem Kügelchen langsam in Stromrichtung dem zweiten Kügelchen an der Mikropipette annähert. Durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen des gefangenen Kügelchens kann nun das Anbinden des zweiten Endes am anderen Kügelchen überprüft werden: Sollte beim Entfernen der beiden Kügelchen ein starker Kraftanstieg auftreten, so hat eine erfolgreiche Anbindung stattgefunden.

Aus diesem Ausgangszustand kann nun ein Streckexperiment durchgeführt werden, indem die Kügelchen langsam voneinander entfernt und zeitgleich der Abstand beider Kügelchen (berechnet aus der Position des Piezotisches) sowie die wirkende Kraft (berechnet aus der Position des zurückgestreuten Lichtkegels) aufgezeichnet werden. Auch die Liganden können nun in der gewünschten Konzentration eingeleitet werden.

Als Pufferlösung zum Spülen, sowie zum Verdünnen der DNA (70 μl , 280 pM λ -DNA auf 1,5 ml Puffer), der Kügelchen (0,5 μl , 0,5% m/v Stammlösung auf 1,5 ml Puffer) und der Liganden (verschiedene Konzentrationen) kommt in allen Fällen entgaster und gefilterter PBS-Puffer (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2PO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH-Wert 7,4) oder OT-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0) zum Einsatz. Zum Auflösen der zweikernigen Metallkomplexe werden diese in der gewünschten Konzentration in ca. 15 ml Puffer gegeben und für 10-20 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Zur Vermeidung des Ausfallens oder Ausflockens der Metallkomplexe ist es alternativ möglich, diese zunächst in höherer Konzentration in destilliertem Wasser zu lösen und diese Lösung langsam mit Pufferlösung zur gewünschten Konzentration zu verdünnen.

Zur beidseitigen Markierung der DNA mit mehreren Biotin-Molekülen wird das nachfolgende Protokoll verwendet: 40 µl λ-DNA (250 µg/ml, Roche AG) oder 20 µl λ-DNA (488 µg/ml, New England Biolabs Inc.) werden in einem PCR-Tube für 5 Minuten bei 65 °C aufgeschmolzen und direkt im Anschluss auf Eis gekühlt, so dass das ursprüngliche Plasmid nun als linearer DNA-Strang vorliegt. In einem zweiten Gefäß wird währenddessen der Ansatz der Nukleotide in folgender Reihenfolge vorgenommen: In 180 µl destilliertem Milli-Q-Wasser werden 20 µl 10xNEBuffer 2 gelöst. Es folgen 1,25 µl Biotin-11-dCTP (5 mM), sowie je 0,21 µl dATP, dGTP, dTTP (100 mM, Amersham Pharmacia) und 2 µl des Polymerase I Fragments „Klenow 3' → 5' exo-“ (New England Biolabs). Dieser Ansatz wird auf zwei PCR-Tubes aufgeteilt (je 102 µl) und mit je 20 µl (bzw. 10 µl bei NEB) der zuvor aufgeschmolzenen DNA vermischt. Es folgt eine 2 stündige Inkubation bei 37 °C, was die überstehenden *sticky ends* der DNA kovalent mit den jeweils komplementären Nukleotiden auffüllt, während an das Cytosin zusätzlich Biotin gebunden ist. Die Polymerase-Funktion wird anschließend durch Zugabe von jeweils 1,95 µl EDTA (0,5 M) und einem Aufheizen für 5 Minuten auf 70 °C gestoppt. Zuletzt werden beide Ansätze in einen Filter gegeben (Ultra-0,5 50 kDA Ultracel Filter, AmiconTM) und in der Zentrifuge 5 mal für jeweils 10 Minuten bei 14000g mit jeweils 400 µl OT-Puffer gewaschen um die DNA von den restlichen Enzymen zu trennen. Die mit Biotin markierte DNA kann nun aus dem Filter entnommen (1000g für 3 Minuten, mit umgedrehtem Filtereinsatz) und mit 180 µl OT-Puffer verdünnt und bei -20 °C zur Aufbewahrung eingefroren werden.

3.3. AFM-Abbildungen

3.3.1. Funktionsprinzip

Die Rasterkraftmikroskopie (engl.: *atomic force microscopy* – *AFM*) zählt zu den Rastersonden-Mikroskopie-Techniken, bei denen eine Sonde in die Nähe (oder in Kontakt mit) einer Oberfläche gebracht und diese anschließend Punkt für Punkt abgerastert wird. Aus der dabei gemessenen Wechselwirkung zwischen Sonde und Oberfläche in jedem Punkt kann schließlich im Computer ein topografisches Bild rekonstruiert werden. So lässt sich eine hohe Auflösung – zumeist im Nanometer-Bereich – erreichen, also weit jenseits des Limits herkömmlicher optischer Mikroskopie-Techniken.

Beim AFM dient, wie in Abbildung 35 gezeigt [142], als Sonde ein Federbalken (*Cantilever*) mit einer feinen Nadelspitze, die im Idealfall nur wenige Atome umfasst. Mittels Piezoelektrik kann die Spitze in allen drei Raumdimensionen in Nanometerschritten über die Probenoberfläche gerastert werden, während ihre mechanische Auslenkung durch einen auf eine Quadrantendiode reflektierten Laserstrahl bestimmt wird.

Während der Messung spürt die Spitze dabei das sogenannte Lennard-Jones-Potential, mit einer repulsiven, kurzreichweitigen Kraftwirkung (wenn sich Atomorbitale von Spitze und Probe überlappen und aufgrund des Pauli-Prinzips abstoßen) und einer schwachen, attraktiven Kraftwirkung bei etwas höheren Abständen, die aufgrund von van-der-Waals-

Wechselwirkungen entstehen. Je nach Abstand der Spitze von der Probenoberfläche kann das AFM deswegen in verschiedenen Modi betrieben werden (*contact mode*, *non-contact mode*), wobei in dieser Arbeit stets der *tapping mode* verwendet wurde. Dieser vereint das sehr schonende Scannen des *non-contact-mode* mit der hohen erreichbaren Auflösung des *contact-mode*, indem die Spitze in Schwingung versetzt wird und nur während der Schwingamplitude die Oberfläche kurz berührt. Über einen Regelkreis wird der Abstand zwischen Spitze und Probe während des horizontalen Scannens so eingestellt, dass die Resonanzfrequenz des Cantilevers konstant gehalten wird, so dass die dafür benötigte vertikale Ausgleichsbewegung ein direktes Abbild der Probentopografie darstellt.

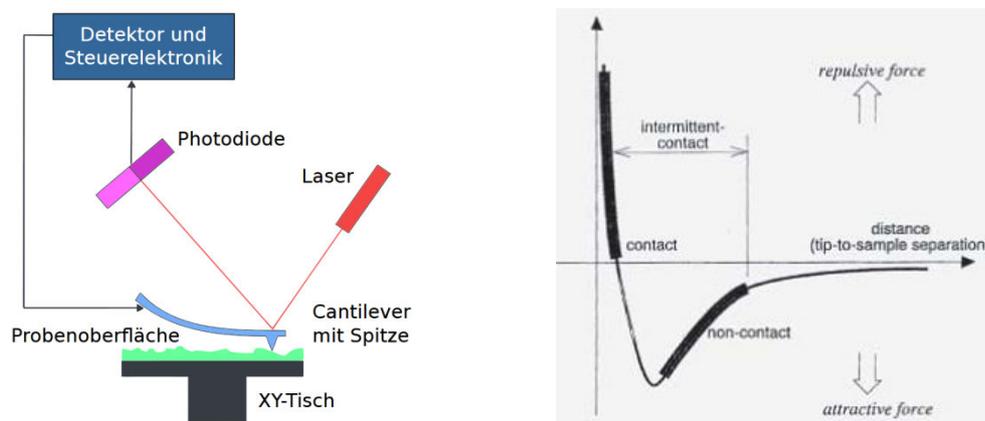


Abbildung 35: Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops (links) und Lennard-Jones-Potential als Funktion des Abstands zwischen Probe und Spitze (rechts). Quelle: [142]

Abgesehen vom Betriebsmodus und der Regelungstechnik ist die Auflösung hauptsächlich von der Qualität der verwendeten Nadelspitze abhängig, da das rekonstruierte Bild mathematisch eine Faltung zwischen Proben- und Spitzen-Geometrie darstellt. Besonders bei der Bestimmung von Nanoporen-Durchmessern oder Liganden-Größen mit Hilfe des AFM muss deswegen beachtet werden, dass der dabei auftretende Fehler (in horizontaler Richtung) im Bereich des Krümmungsradius der Spitze (z.B. 10 nm) liegen kann und dass auch anderweitige Darstellungsfehler auftreten können. So z.B. wenn die Spitze aufgrund ihrer eigenen Geometrie scharfe Konturen nicht exakt abfahren kann, Fremdmoleküle an ihr haften, oder ihre Form nicht ideal ist (z.B. „Doppelspitze“).

3.3.2. Probenpräparation

Zur Darstellung der DNA-Ligand-Komplexe wird zunächst ein kleines Mica-Plättchen (1 cm^2) mehrmals mit Klebeband abgezogen, um eine saubere, atomar glatte Oberfläche als Träger für die zu scannende Probe zu schaffen. Etwa $5 \mu\text{l}$ NiSO_4 -Lösung (100 mM) werden auf die Mica-Oberfläche gegeben und nach 10 Minuten Einwirkzeit mit Milli-Q-Wasser abgespült. Anschließend werden etwa $10 \mu\text{l}$ der DNA-Ligand-Lösung auf die Oberfläche pipettiert und für 15 Minuten einwirken gelassen. Nach dem sorgfältigen Abspülen der überflüssigen Lösung mit Milli-Q-Wasser und dem Abtrocknen unter einem Stickstoff-Strom

kann das Scannen im AFM (Nanoscope V, Multimode, Bruker) mit monolithischen Kraftsensoren (Tap300AI, NanoAndMore GmbH) im *tapping mode* erfolgen.

Die aufgebrauchte DNA-Ligand-Lösung besteht hierbei

- für die Metallkomplexe aus: 260 pM λ -DNA, 10 μ M des jeweiligen zweikernigen Metallkomplexes, 20 mM KCl, 2 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0
- für RecA-DNA-Komplexe aus: 10 μ l λ -DNA (240 pM), 10 μ l RecA-Lösung (760 nM) und 10 μ l ATP γ S-Lösung (860 μ M) in 30 μ l Reaktionspuffer (1,1 M KCl, 16 mM MgCl₂), die für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden.

3.4. Magnetische Pinzette

Ähnlich zum Prinzip der Optischen Pinzette lassen sich auch mit der Magnetischen Pinzette kleine Mikrokügelchen fangen und manipulieren um Experimente an daran immobilisierten Biomolekülen, wie z.B. DNA, durchzuführen. Da das Fangen hier jedoch nicht mit Laserstrahlung sondern über magnetische Felder geschieht, eröffnet sich durch das dafür nötige magnetische Moment der Kügelchen der große Vorteil, diese gezielt rotieren zu lassen und damit auch Torsionskräfte auf daran immobilisierte DNA ausüben (oder messen) zu können. Biologische Einzelmoleküle lassen sich mit der Magnetischen Pinzette also sowohl mit höherer Kraftauflösung (aber geringerer maximaler Kraft) strecken, als auch in sich selbst verdrehen.

3.4.1. Versuchsaufbau

Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 36 gezeigt [143]. In der Flüssigkeitszelle werden DNA-Moleküle zwischen jeweils einem magnetischen Kügelchen und dem Boden der Kammer immobilisiert. Zwei über der Flüssigkeitszelle installierte, drehbare Permanent-Magnete ziehen die Mikrokügelchen in z-Richtung nach oben und erlauben so das Strecken des Moleküls. Die auszuübende Streckkraft kann über die Entfernung und die gewünschte Torsion über die

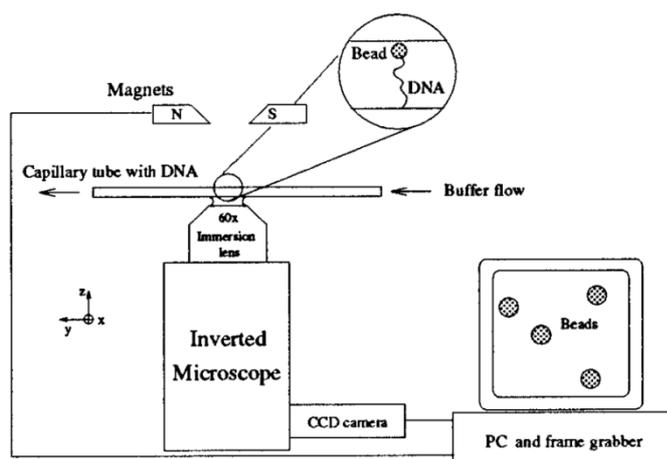


Abbildung 36: Schema der Magnetischen Pinzette. Aus [143]

Rotation der Magnete direkt beeinflusst werden. Unterhalb der Flüssigkeitszelle befindet sich ein Ölimmersions-Objektiv, über welches mit Hilfe einer CCD-Kamera im Computer das Bild

der Mikrokügelchen aufgezeichnet werden kann. Analog zur Video-Auswertung bei der Optischen Pinzette kann eine Software so die Position und Bewegung aller Mikrokügelchen im Blickfeld bestimmen: Die x- und y-Position über die Verschiebung im Bild und die z-Position über den Grad der Unschärfe mit welchem die Kügelchen erscheinen, indem das aktuelle Bild mit einem zuvor aufgenommenen Kalibrierungsbild (bei verschiedenen bekannten z-Abständen) verglichen wird. Während der Messung werden also der z-Abstand (zwischen Kugel und Oberfläche), die Rotation und die auf das Molekül wirkende Kraft (berechnet aus den thermischen Ortsfluktuationen des Kügelchens, die umso kleiner werden je straffer das Molekül bei höheren Kräften gespannt wird) aufgezeichnet.

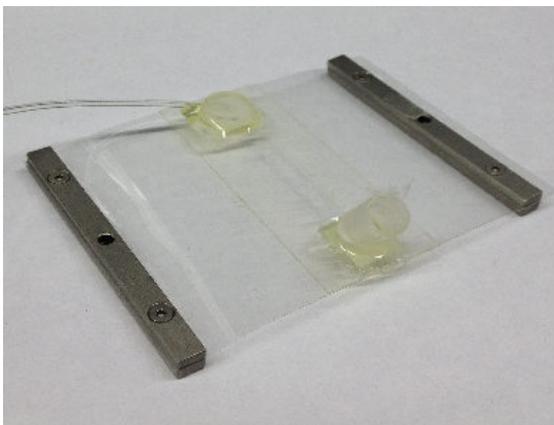


Abbildung 37: Verwendete Flüssigkeitszelle

Die Flüssigkeitszelle muss sehr flach konstruiert sein, um sowohl den Arbeitsabstand des Objektivs nicht zu überschreiten, als auch die Magnete so nah wie möglich an die Kügelchen annähern zu können. Sie besteht deswegen aus einem ausgeschnittenen Kanal in doppelseitigem Klebeband. Den funktionalisierbaren Boden der Probenkammer bildet ein dünnes Deckgläschen, welches auch den Kontakt zum Ölimmersions-Objektiv herstellt, und die Decke bildet eine dünne Mylar-Folie mit zwei aufgeklebten Flüssigkeitsreservoirs zu beiden Enden des Kanals, durch welche die Proben eingeleitet werden können.

3.4.2. Probenpräparationen

Als Biomoleküle für die Experimente standen 3,4 μm lange DNA-Fragmente (PicoTwist, Frankreich) zur Verfügung, die an einem Ende mit Digoxigenin (DIG) und am anderen mit Biotin markiert waren.

Der Boden der Flüssigkeitszelle muss deswegen mit dem entsprechenden Antikörper (Anti-DIG) funktionalisiert werden. Hierfür wird das Deckgläschen zunächst mit Aceton und destilliertem Wasser gereinigt und für mehrere Minuten in Natronlauge (2 M) gegeben um schützende Oberflächengruppen vom Glas zu entfernen. Nach einem Spülen mit destilliertem Wasser wird das Gläschen auf der Heizplatte getrocknet (150 °C, 30 Minuten) und mit einem dünnen Film „Sigmacote“ (Sigma-Aldrich Corp.) hydrophilisiert.

Nach dem Zusammenbau der Flüssigkeitszelle werden 70 μl Anti-DIG (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS-Puffer, Roche) in den Kanal gespült und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach folgt ein Spülen mit Passivierungspuffer (PBS-Puffer mit 0,2% BSA, 0,1% TWEEN®20, 5 mM EDTA, 10 mM Natriumazid), der 12 Stunden in der Zelle verbleibt um die unbeschichteten Stellen der Glasoberfläche abzusättigen.

Als Kügelchen dienen 1 μm große, mit Streptavidin beschichtete „Dynabeads®“ (MyOne™ Streptavidin C1, 10 mg/ml, Invitrogen Corp., Kalifornien, USA), von denen 5 μl mehrfach mit 200 μl PBS-Puffer gewaschen werden (Verdünnen in PBS, Absinken lassen mit Hilfe eines Permanentmagnets, Überstand abnehmen) um unspezifisches Kleben zu reduzieren. Zuletzt erfolgt ein Lösen in 5 μl PBS-Puffer.

1 μl der DNA-Lösung und 5 μl der gewaschenen Kügelchen-Lösung werden zusammen in 90 μl PBS-Puffer gelöst und während der Einwirkzeit von 30 Minuten mehrmals vorsichtig aufgeschüttelt. Anschließend erfolgt wieder ein Waschen (3-4 mal) mit PBS-Puffer.

Abschließend wird die Kügelchen-DNA-Lösung in die Flüssigkeitszelle gespült und für 15 Minuten ohne Magnetfeld einwirken gelassen, woraufhin sich die Kügelchen am Boden absetzen und sich das DIG-markierte Ende der DNA mit der Anti-DIG-Beschichtung der Glasoberfläche verbinden kann. Die überschüssigen, ungebundenen Kügelchen werden nun herausgespült und die Magnete angenähert. Alle Kügelchen die sich nun um wenige μm vom Boden abheben, besitzen eine erfolgreiche Immobilisierung der DNA zwischen Kugel und Glasoberfläche und können für die Experimente verwendet werden. Auch die gewünschten Liganden können nun eingeleitet werden.

4. Ergebnisse und Auswertung

In diesem Kapitel werden die Experimente und Messergebnisse vorgestellt, ausgewertet und diskutiert, die für diese Arbeit mit den im vorigen Kapitel beschriebenen Methoden gewonnen wurden.

Dies beinhaltet zunächst eine nähere Betrachtung der Effekte und Faktoren, welche die Messungen an Nanoporen beeinflussen können, wie z.B. die Porengröße, das Herstellungsverfahren, die Porengeometrie, die Beleuchtung usw.

Anschließend erfolgt die Diskussion der DNA-Translokations-Experimente durch Nanoporen. Diese Experimente gliedern sich auf in zunächst freie Translokationen – in denen sich DNA-Stränge aufgrund der angelegten Transmembranspannung frei, und in hoher Anzahl, durch die Nanoporen bewegen können – sowie kontrollierte Translokationen, für welche einzelne DNA-Stränge an einem mit der Optischen Pinzette gefangenen Kügelchen immobilisiert und so in der Nanopore kontrolliert bewegt oder auch ortsfest gehalten werden können.

Hierauf folgen Experimente in denen die DNA zusätzlich mit Liganden versehen wurde, sowie mehrere Fälle, für welche das häufig verwendete Silizium-Nitrid der Nanoporen-Membran durch verschiedenartige, neue Materialien (wie z.B. Graphen, Carbon-Nanosheets, Lipid-Doppelschichten) modifiziert bzw. gänzlich ersetzt werden konnte.

Nach einer Zusammenfassung dieses ersten experimentellen Teils der Arbeit über Nanoporen, in welcher insbesondere der Einfluss der Porengröße und des Porenmaterials auf die gemessenen Kräfte noch einmal diskutiert wird, folgt schließlich der zweite Hauptteil, welcher sich mit den zweikernigen Metallkomplexen beschäftigt. Die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften dieser neuartigen, synthetisch hergestellten und maßgeschneiderten Moleküle waren bisher völlig unbekannt und sollen im Rahmen dieser Arbeit näher erforscht werden. Hierfür wurde die Wechselwirkung dieser Metallkomplexe mit DNA durch verschiedene Methoden untersucht – wie z.B. DNA-Streckungen mit der Optischen Pinzette, Nanoporenexperimente, AFM-Aufnahmen und Versuche mit der Magnetischen Pinzette – um so ein genaueres Bild von deren Eigenschaften zeichnen zu können.

4.1. Nanoporen-Experimente

4.1.1. Größenbestimmung der Nanoporen

Eine sehr wichtige Kenngröße für alle Experimente mit Nanoporen ist der Durchmesser der Poren. Besonders bei sehr kleinen Nanoporen, mit Abmessungen von nur wenigen Nanometern, führt die Beschränkung auf solch kleinste Flüssigkeitsvolumina dazu, dass sich die Physik dieser mikroskopischen (bzw. „nanoskopischen“) Systeme stark von der Physik an größeren betrachteten Systemen unterscheiden kann: Viele physikalische Kenngrößen (wie z.B. Temperatur, Ladung, Viskosität, Konzentrationen usw.) sind als makroskopische Mittelwerte definiert. Die eigentlich zugrundeliegenden mikroskopischen Effekte (wie z.B. exakte räumliche Ladungsverteilungen und -abschirmungen, Molekülpositionen und Molekülbewegungen, lokale chemische und physikalische Oberflächeneigenschaften, usw.) gewinnen somit bei Experimenten auf der Nanometerskala einen immer größeren Einfluss, da sie nicht mehr so einfach im Rahmen eines viel größeren Systems herausgemittelt werden können.

Die Dimensionen des betrachteten Systems sind also von erheblicher Relevanz für die zu erwartenden Messergebnisse und eine möglichst genaue Bestimmung der Nanoporengröße bietet daher einen ersten Anhaltspunkt bei der Auswertung der hier durchgeführten Experimente. Für die Größenbestimmung gibt es mehrere Möglichkeiten, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden und im Folgenden vorgestellt werden sollen.

Bei der Herstellung der Festkörper-Nanoporen durch Elektronen- bzw. Ionen-Beschuss einer Silizium-Nitrid-Membran (vgl. Kapitel 2.2. und 3.1.2.) entscheidet zumeist die Dauer der Belichtung über den endgültigen Durchmesser der Pore. Eine längere Belichtungszeit führt damit, wie in Abbildung 38 dargestellt, bei reproduzierbaren Strahleigenschaften zu einer proportional größeren Nanopore. Aus Vergleichsmessungen, in denen der Porendurchmesser (z.B. durch Elektronenmikroskopie, AFM-Aufnahmen oder auch durch das Abbilden mit dem zum Bohren der Pore verwendeten Elektronen- oder Ionen-Mikroskop selbst) für eine feste Belichtungszeit exakt bestimmt wurde, kann diese also direkt nach dem Bohren bereits in einen Durchmesser umgerechnet werden. Der Fehler kann hier jedoch aufgrund der möglichen unterschiedlichen Fokussierung und einstellbaren Strahlparameter bei mehreren Nanometern liegen.

Eine viel exaktere Methode wäre das Abbilden der Pore im direkten Anschluss an ihre Herstellung mit dem zum Bohren verwendeten Ionen-Mikroskop. Allerdings führen die hohen Energien – die für einen ausreichend hohen Kontrast beim Abbilden derart durchlässiger Membranen benötigt werden – zu einem weiteren Anwachsen (oder Zuschmelzen) der Pore, sowie zu unerwünschten Ablagerungen (von z.B. Kohlenstoffresten oder Membranmaterial) in der Porenregion, die das eigentliche Experiment erheblich stören. So muss genau dieses Abscannen in den meisten Fällen ausdrücklich vermieden werden. Aus diesem Grund bildet der „Umweg“ über die Belichtungszeit als Maß für die Porengröße eine praktischere und sehr

schonende erste Abschätzung, welche die Qualität der fertig gebohrten Pore nicht beeinträchtigt.

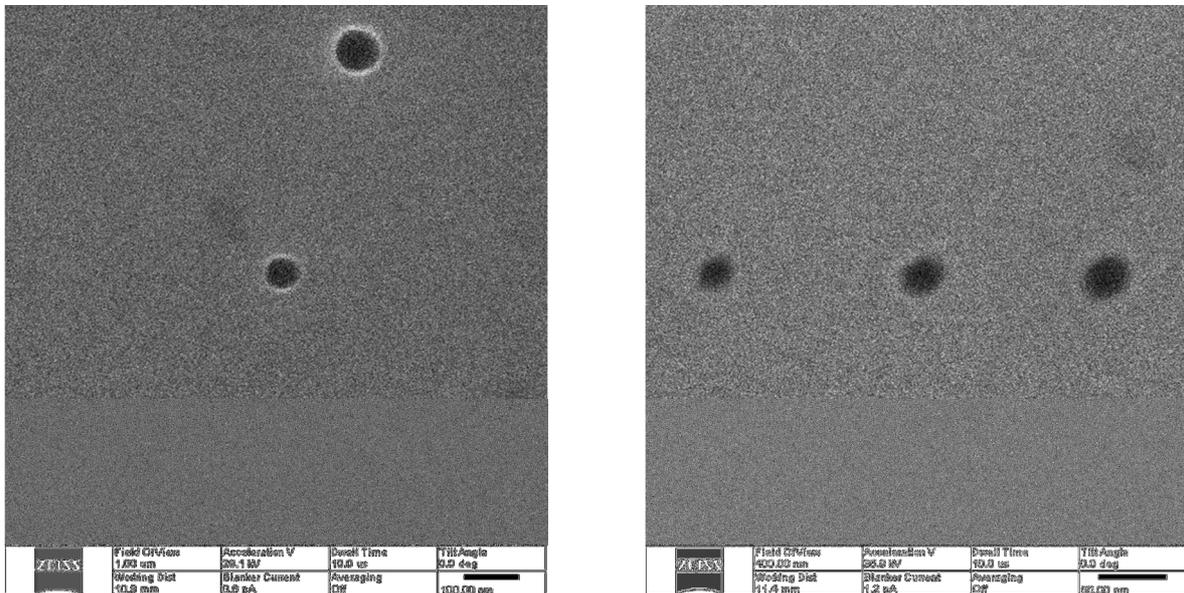


Abbildung 38: Eine höhere Belichtungszeit während des Bohrens der Nanoporen durch Ionen-Beschuss führt reproduzierbar zu proportional größeren Porendurchmessern.

Eine zweite, ebenfalls schonende, zugleich jedoch sehr zeitaufwendige Möglichkeit der Größenbestimmung der Nanopore direkt nach dem Bohren ist das Abbilden mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM). Abbildung 39 zeigt so einen Scan der Siliziumnitridmembran mit einer gebohrten Nanopore.

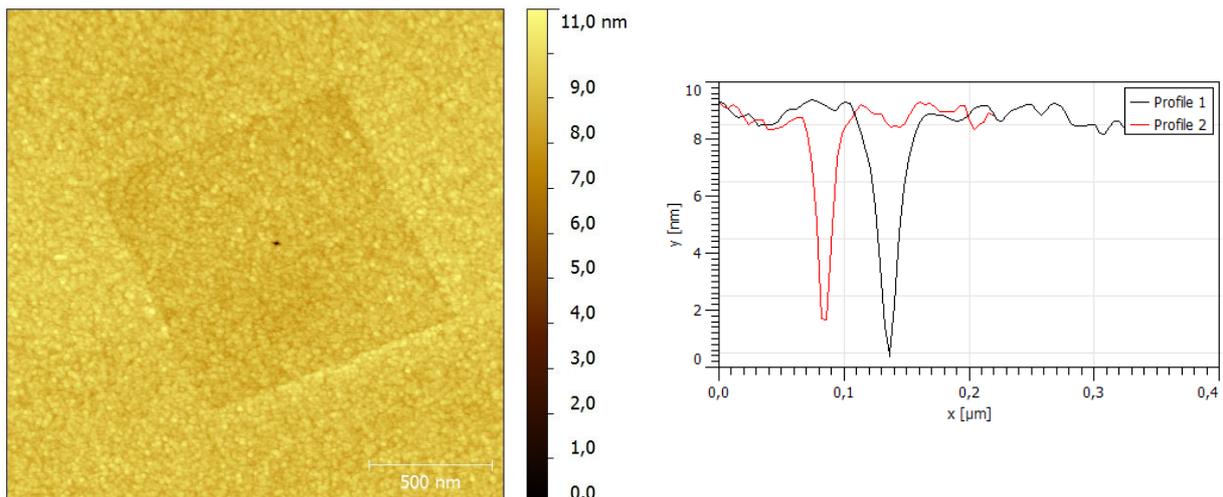


Abbildung 39: AFM-Scan einer Nanopore in einer Siliziumnitrid-Membran (links) sowie exemplarisches Höhenprofil (in x- und y-Richtung) der Pore (rechts) aus welchem sich der Porendurchmesser ablesen lässt.

Die Siliziumnitridmembran erstreckt sich hierbei über den gesamten Scan-Bereich, während die Pore als schwarzer Punkt in der Bildmitte zentriert zu erkennen ist. Das umgebende quadratische Fenster ist ein Bereich in dem die Membran aufgrund des kurzzeitigen Abbildens mit dem Helium-Ionen-Mikroskop nach dem eigentlichen Bohren um 0,3 bis 1 nm ausgedünnt wurde. Dies verdeutlicht zum einen das bereits angesprochene, nachträgliche Beeinflussen der Nanoporenumgebung durch das Abbilden mit Elektronen- oder Ionen-Mikroskopen, welches bei Poren, die für anschließende Experimente weiter verwendet werden sollen, aus genau diesem Grund vermieden werden muss. Zum anderen dient dieser quadratische Bereich in diesem Fall als Markierung, um die Nanopore mit dem AFM leichter auffinden zu können. Aus dem AFM-Höhenprofil durch die Nanopore kann nun ihr Durchmesser abgelesen werden: Im gezeigten Fall ist die Pore eher elliptisch mit einer Größe von ca. 30x20 nm. Beachtet werden muss hierbei jedoch, dass die Schärfe der AFM-Spitze einen Einfluss auf den gemessenen Durchmesser besitzt. Bei einem Spitzenradius von typischen 10 nm kann der Fehler bei der Größenbestimmung der Nanoporen also in einer vergleichbaren Größenordnung liegen und erlaubt damit ebenfalls nur eine ungefähre Abschätzung der tatsächlichen Nanoporengröße. Vermutlich werden die tatsächlichen Durchmesser der Poren eher größer sein als die vom AFM gemessenen, da die Cantilever-Spitze aufgrund ihrer eigenen horizontalen Ausdehnung zunächst die Kontur der Pore abfahren muss, bevor sie in die Pore eindringen und ein Höhsignal liefern kann. Poren mit kleineren Durchmessern als der Spitzenradius sind aus diesem Grund auch nicht mehr mit dem AFM bestimmbar.

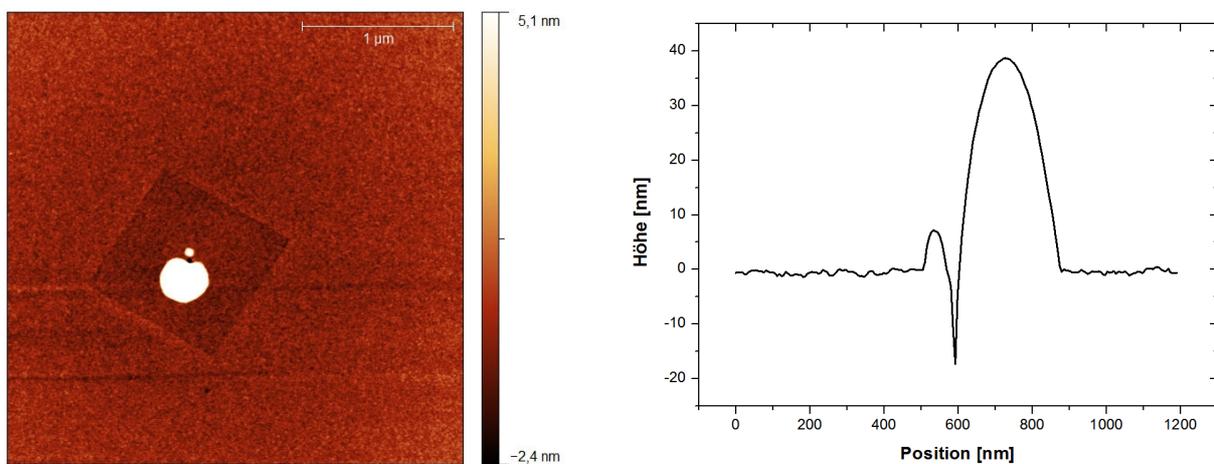


Abbildung 40: AFM-Scan einer Nanopore mit störenden Ablagerungen („Nanovulkan“) in der Porenregion.

Die bereits genannten, störenden Ablagerungen in der Porenregion aus Kohlenstoff- oder Membran-Resten, die gehäuft auftreten, wenn die Pore direkt nach dem Bohren per Ionen-Mikroskop abgebildet wird, sind in Abbildung 40 gezeigt. Diese „Nanovulkane“ ergeben sich vermutlich aus lokalen Aufladungen während des Abbildens (oder teilweise auch während des Bohrens) mit anschließender Materialablagerung. Sie lassen sich auch nachträglich (z.B. durch eine Behandlung mit O₂-Plasma oder Piranha-Säure) nicht mehr entfernen. Für DNA-Translokations-Experimente oder Versuche mit der Optischen Pinzette können solche Poren deswegen meistens nicht mehr verwendet werden, weshalb die Größenbestimmung nur mit

schonenderen Methoden, oder alternativ erst nach dem eigentlichen Experiment geschehen kann.

Eine dritte Möglichkeit der Größenbestimmung – schnell durchführbar und ohne die Pore zu beeinflussen – greift auf deren elektrischen Widerstand zurück: Da die Membrandicke und experimentellen Parameter bei verschiedenen Poren sehr gut bekannt und reproduzierbar einstellbar sind, hängt der elektrische Widerstand einer Nanopore (nach dem Einbau in die mit Pufferlösung gefüllte Flüssigkeitszelle) nur von deren Größe ab. Kleinere Widerstände stehen also offensichtlich für größere Poren und umgekehrt. Geht man davon aus, dass aufgrund der isolierenden Eigenschaften des Siliziumnitrids das elektrische Potential nach dem Anlegen einer Spannung allein innerhalb der Pore (und in kleinen Bereichen zu beiden Seiten davon) abfällt [73], so lässt sich der Widerstand berechnen zu:

$$R = R_P + 2R_A$$

Hierbei ist R der Gesamtwiderstand des Systems, der sich experimentell durch das Anlegen einer Spannung U und dem gleichzeitigen Messen des Ionenstroms I durch die Pore bestimmen lässt. R_P ist der Widerstand des zylindrischen Porenvolumens und R_A der „Access“-Widerstand, der daher rührt, dass das elektrische Feld zu beiden Seiten der Pore (hier in 2 Halbkugel-Volumen) etwas aus dem eigentlichen Porenvolumen herausragt, bevor es abseits davon schließlich auf null abfällt. Hieraus folgt:

$$R = \frac{\rho l_P}{\pi r^2} + \frac{\rho}{2r}$$

Mit dem Porenradius r , der Porenlänge (bzw. Membrandicke) l_P und dem spezifischen Widerstand ρ der Pufferlösung, der abhängig von Temperatur und Ionenstärke ist. Ein Umstellen nach dem Porenradius r liefert schließlich:

$$r = \frac{\rho}{4U} I + \sqrt{\frac{\rho^2}{16U^2} I^2 + \frac{\rho l_P}{\pi U} I} \quad (15)$$

Im Experiment wird die Flüssigkeitszelle mit einer Pufferlösung hoher Ionenstärke befüllt (z.B. 2M KCl, spezifischer Widerstand $\rho = 0,0467 \Omega\text{m}$), da bei niedrigen Ionenstärken eventuelle Oberflächenauf Ladungen die Leitfähigkeit der Pore noch dominieren würden. Anhand der angelegten Spannung U , der dabei gemessenen Ionenstromstärke I und der bekannten Membrandicke l_P (typischerweise 10 oder 20 nm) kann somit der effektive Porenradius r berechnet werden.

Die Form des elektrischen Feldes in der Porenregion wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Lukas Bogunovic auch theoretisch simuliert und ist in Abbildung 41 für verschiedene Porengrößen und Membrandicken gezeigt. Die linke Spalte entspricht einer Membrandicke von 20 nm und die rechte Spalte zeigt Membranen mit 10 nm Dicke. Von oben nach unten sind dabei jeweils Poren mit einem Durchmesser von 60, 20 und 7 nm berechnet worden. Gut zu erkennen ist, dass in der Tat der größte Teil des elektrischen Potentials nur in der unmittelbaren Porenregion abfällt. Das elektrische Feld ist dort also am stärksten und nimmt ferner bei kleineren Porendurchmessern ebenfalls zu. Bei größeren Poren erstreckt sich auch der Bereich

des Potentialabfalls weiter über die Grenzen des eigentlichen Porenvolumens hinaus. Die Annahme zweier halbkugelförmiger Bereiche mit Access-Widerstand R_A (zu beiden Seiten der Pore) für Formel 15 erscheint damit realistisch – insbesondere auch für Poren die nicht viel breiter als lang sind.

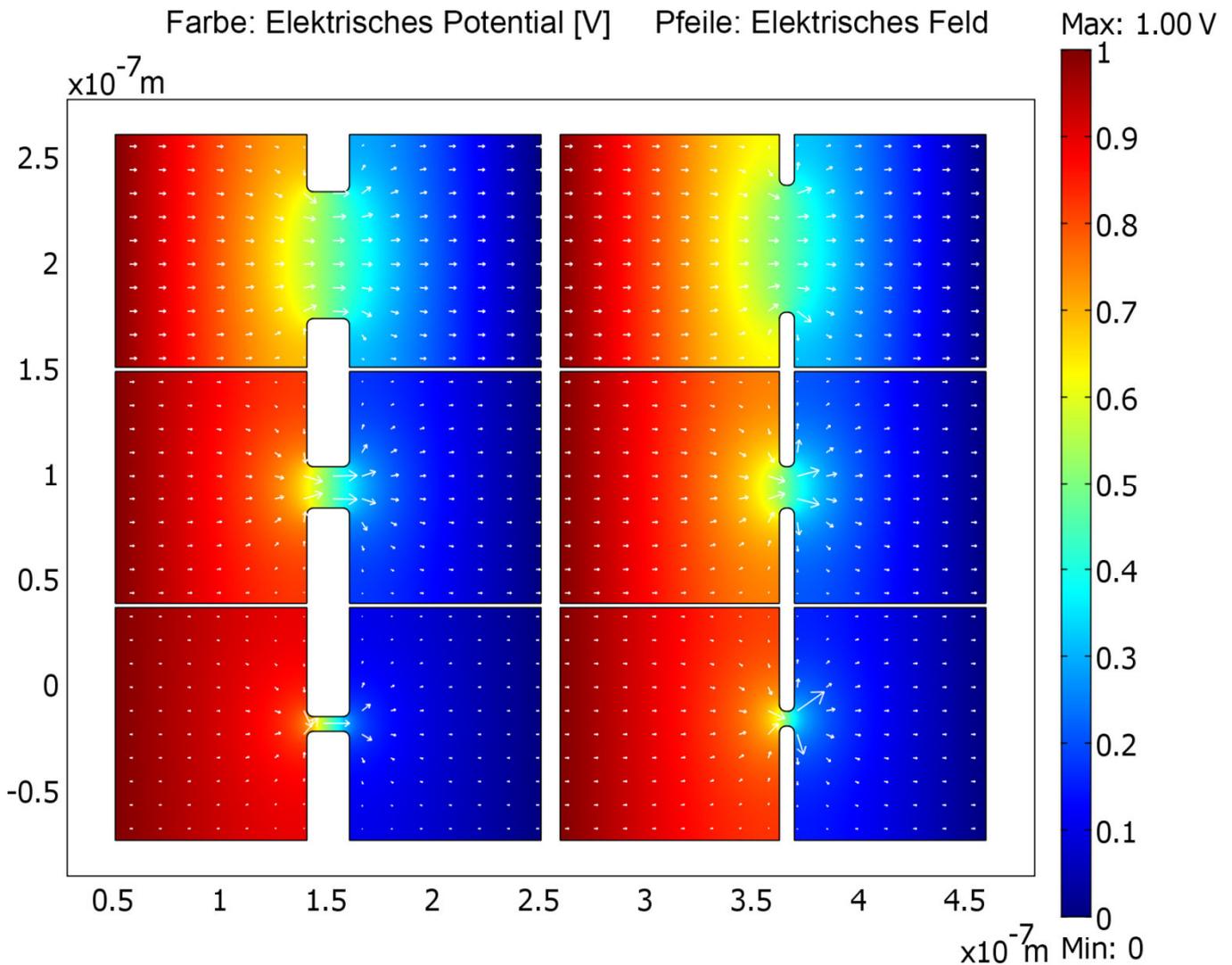


Abbildung 41: Theoretische Simulation des Potentialabfalls in verschiedenen großen Nanoporen mit 60 nm (oben), 20 nm (Mitte) und 7 nm Durchmesser (unten) für eine 20 nm (links) und 10 nm (rechts) dicke Siliziumnitridmembran.

Aus Vergleichsmessungen mit anderen Methoden (wie Elektronen-Mikroskopie und AFM-Aufnahmen) zeigte sich, dass die Größenbestimmung der Nanoporen aus der Widerstandsberechnung nach Formel 15 sehr zuverlässig, reproduzierbar und mit einem Fehler von maximal 5 nm auch relativ genau funktioniert. In den meisten Fällen wird während des Experiments mit der Nanopore zudem sowieso eine angelegte Spannung benötigt, so dass die Größenbestimmung auch nachträglich anhand der im Experiment aufgezeichneten Stromwerte geschehen kann. Allerdings müssen hierbei die Einflussfaktoren

des Experimentierens auf die Widerstandsmessung beachtet werden: Wie in der Messung in Abbildung 42 gezeigt ist, haben sowohl die Beleuchtung (die für die Videoauswertung benötigt wird) als auch der Fallenlaser der Optischen Pinzette einen nicht unerheblichen Einfluss auf die gemessenen Stromstärken.

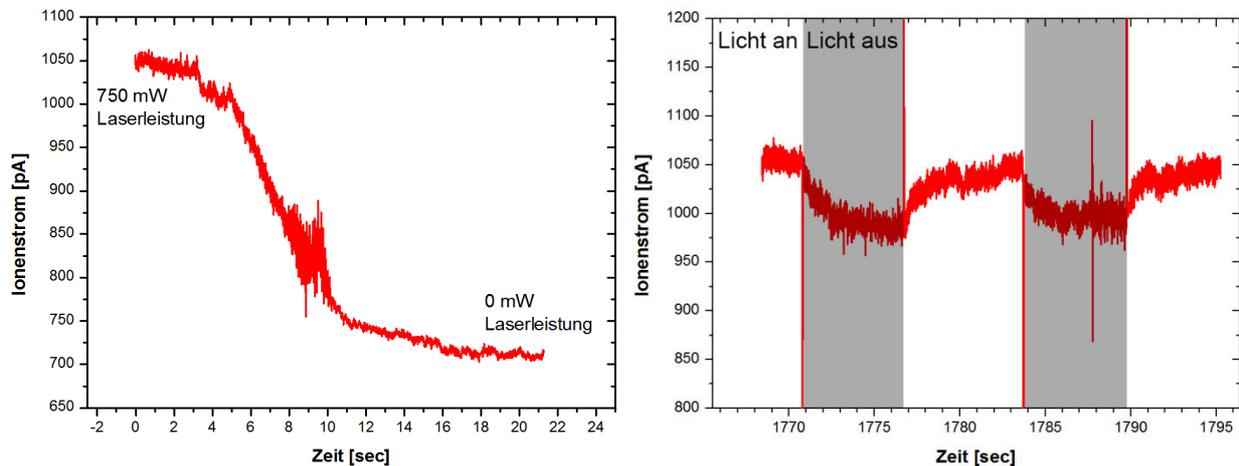


Abbildung 42: Einfluss des Lasers (links) und der Kaltlichtlampe (rechts) auf die gemessene Stromstärke.

Hierfür wurde der Laser während einer Strommessung langsam heruntergefahren bzw. die Beleuchtung an- und ausgeschaltet. Im Mittel kann der gemessene Strom dabei vom Laser um bis zu 40% und von der Kaltlichtlampe um bis zu 10% erhöht werden, was jedoch auch stark von eventuellen Verschmutzungen nahe der Pore abhängen kann. Grund für die Stromzunahme ist also vermutlich eine Aufheizung der Flüssigkeitszelle bzw. der Nanoporenregion und eine Beeinflussung der elektrochemischen Doppelschicht an den Platinkontakten (vgl. Kapitel 2.7.) bzw. den noch lichtempfindlicheren Silberchlorid-Kontakten. Für eine Größenbestimmung der Nanopore aus dem elektrischen Widerstand sollte also eine Messung bei Zimmertemperatur und mit komplett abgeschalteter Beleuchtung verwendet werden.

Neben der Belichtungszeit beim Bohren, dem AFM-Abbildern und der elektrischen Widerstandsmessung kann als vierte Möglichkeit auch ein Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) zur Größenbestimmung der Nanoporen verwendet werden. Im Gegensatz zum Helium-Ionen-Mikroskop liefert dieses, aufgrund des Durchlicht-Verfahrens, einen guten Kontrast der Nanoporen in den dünnen Siliziumnitrid-Membranen, erfordert hierfür jedoch ebenfalls hohe eingestrahlte Energien. Um die Poren für die Experimente also nicht zu gefährden (und die besprochenen Ablagerungen zu vermeiden) kann dieses Verfahren erst nach den eigentlichen Experimenten durchgeführt werden. Deswegen ist es mit einem hohen Aufwand verbunden: Die Poren müssen den Einbau in die Flüssigkeitszelle, das Experiment, den Ausbau und das Trocknen verschmutzungsfrei überstehen. Auch das Auffinden der Poren ist aufgrund der hohen Vergrößerung des TEM sehr zeitintensiv.

Abbildung 43 zeigt zwei Nanoporen von 6 und 11 nm Durchmesser, die mit Hilfe des TEM abgebildet wurden. Neben der sehr genauen Größenbestimmung ist ebenso ein auftretendes Problem zu erkennen, wenn die Scan-Dauer während des Suchens nach der Pore zu lang und die benötigte Energien für die TEM-Auflösung zu hoch sind: Im Verlauf einer Messung führt das vom Elektronenstrahl verflüssigte Material am Porenrand nach und nach zu einem Zuschmelzen der Nanopore, so dass eine korrekte Größenbestimmung mit zunehmender Zeit erschwert und eine Wiederverwendung der Pore verhindert wird. Mit theoretischer Sub-Nanometer-Auflösung ist das TEM jedoch auch die genaueste Methode, wenn die Durchmesser der Nanoporen sehr genau bekannt sein müssen, und es wurde für diese Arbeit deswegen mehrfach verwendet.

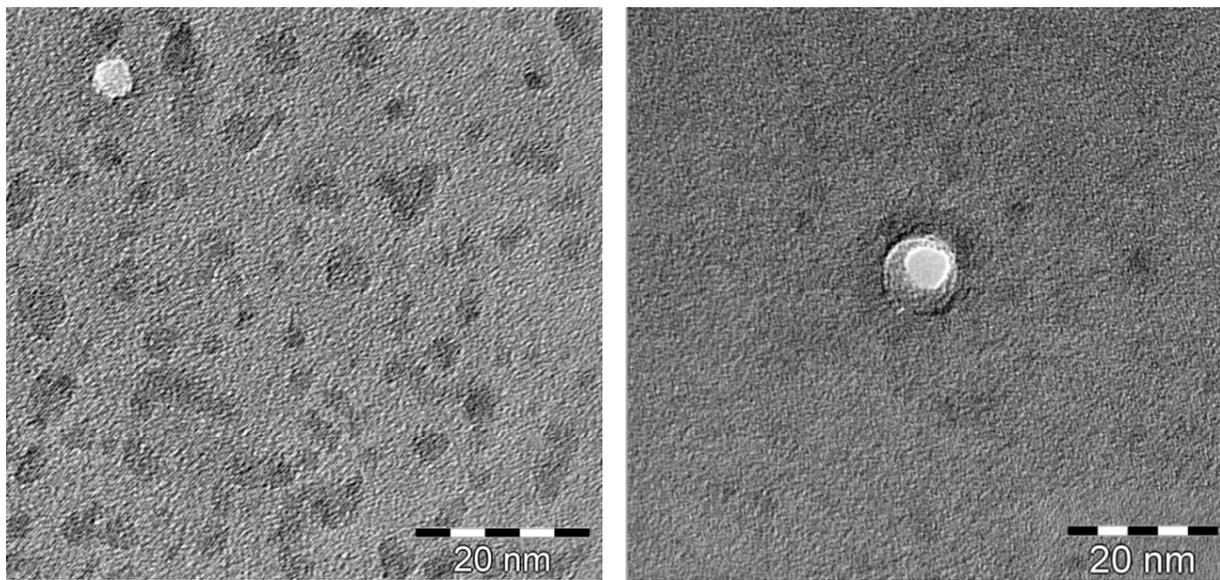


Abbildung 43: Größenbestimmung der Nanoporen (hier 6 und 11 nm) durch TEM-Abbildung. Lange Belichtungszeiten bei hoher Auflösung führen zu einem fortschreitenden Zuschmelzen der Poren (rechts).

4.1.2. DNA-Translokationen durch Nanoporen

Freie Translokation

Nach dem Einbau einer Nanopore in die Flüssigkeitszelle und dem Befüllen mit Nanoporenpuffer können die DNA-Translokationsexperimente begonnen werden, von denen die einfachste Version in Abbildung 44 dargestellt ist. Für diesen (auch als „Coulter-Counter“ bekannten) Aufbau der freien DNA-Translokation wird die DNA-Lösung in das untere Flüssigkeitsreservoir gegeben und eine positive Transmembran-Spannung angelegt um die DNA-Stränge aufgrund ihrer stark negativen Ladung durch die Nanopore zu ziehen. Eine gleichzeitige Messung des Ionenstromes durch die Pore erlaubt nun das Detektieren der einzelnen Translokationsereignisse, da die DNA-Stränge während des Durchtritts sowohl zusätzliche Ladungen in die Porenregion bringen, als auch einen gewissen Teil des Porenvolumens blockieren.

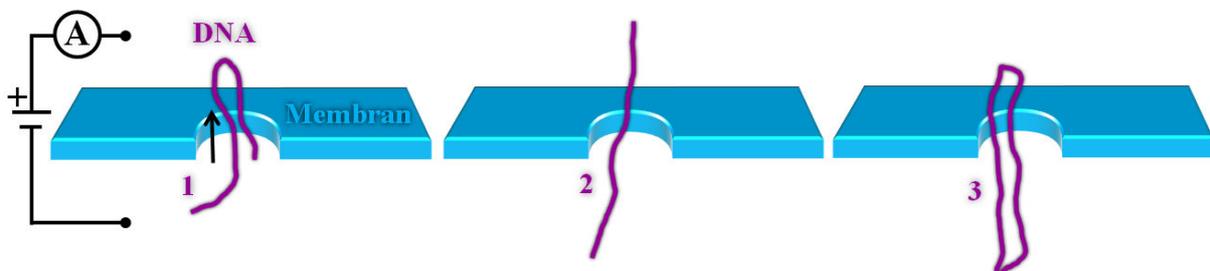


Abbildung 44: Prinzip des „Coulter-Counter“-Aufbaus, bei dem eine Transmembranspannung die negativ geladenen DNA-Stränge durch die Nanopore zieht und gleichzeitig der Ionenstrom durch die Pore aufgezeichnet wird. Die Translokation kann dabei in verschiedenen Konformationen erfolgen.

Prinzipiell stehen der DNA dabei – je nach Porengröße – mehrere Konformationen zur Verfügung, in denen sie die Pore passieren kann, die sich entsprechend des unterschiedlich blockierten Porenvolumens auch im aufgezeichneten Ionenstromsignal unterscheiden lassen sollten.

In der nachfolgenden Abbildung 45 ist so eine Coulter-Counter-Messreihe mit verschiedenen angelegten Spannungen durchgeführt worden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind zudem alle Grafiken mit derselben Skalierung dargestellt. Das Experiment wurde in Nanoporenpuffer mit einer Konzentration von 20 mM KCl an einer 10 nm dicken Siliziumnitrid-Membran mit einer ca. 25 nm großen Nanopore durchgeführt.

Vor der Zugabe der DNA (Grafik Mitte links) sind – vom Grundrauschen der Strommessung abgesehen – keinerlei Peaks beim Anlegen einer Spannung gemessen worden. Gezeigt sind hier beispielhafte +50 mV, doch auch höhere und negative Spannungen zeigten das gleiche Verhalten. Es kann also von einer funktionstüchtigen Nanopore ohne Ablagerungen sowie von einer verschmutzungsfreien Pufferlösung ausgegangen werden, was zu diesem zeitlich stabilen Stromsignal führt.

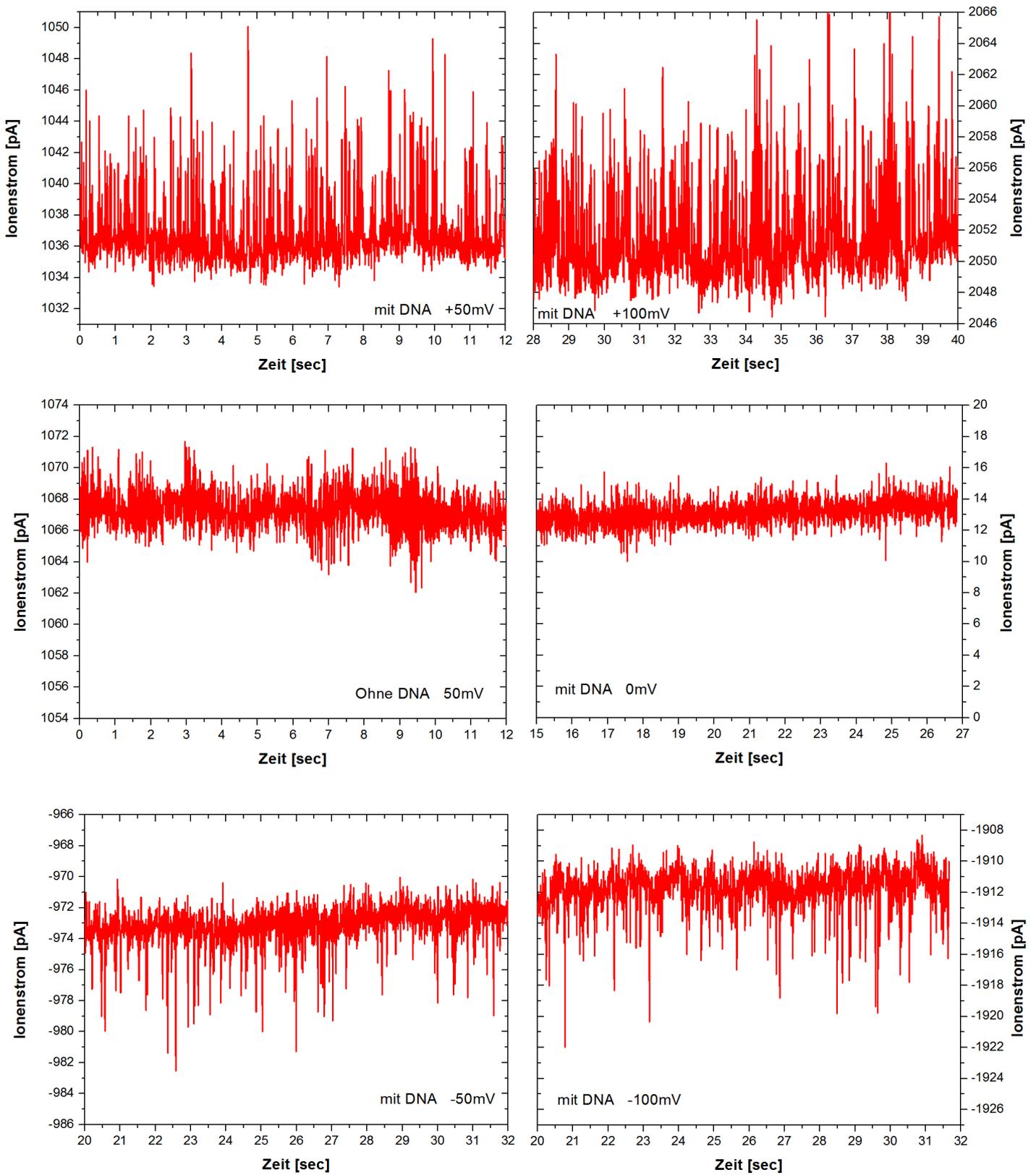


Abbildung 45: Freie DNA-Translokationen nach dem Coulter-Counter-Prinzip gemessen bei verschiedenen Spannungen.

Nach der Zugabe von λ -DNA zeigen sich deutlich erkennbare Strompeaks, die bei positiven Spannungen (obere Bildreihe) nach oben und bei negativen Spannungen (untere Bildreihe) nach unten gerichtet sind. Beim Abschalten der Spannung (Bild Mitte rechts) verschwinden sie dagegen ganz. Diese Signale sind damit der Translokation einzelner DNA-Stränge zuzuordnen, welche die Pore – je nach Vorzeichen der Spannung – in unterschiedlicher Richtung durchqueren. Dass der Betrag des Stroms beim Passieren einer DNA zu- anstatt abnimmt, ist hierbei der niedrigen Ladungsträger-Konzentration (20 mM) der Pufferlösung zuzuschreiben. Es werden also durch eine passierende DNA, aufgrund ihrer negativen Ladung und dem Anziehen einer abschirmenden Ionenwolke, mehr Ladungsträger in die Nanopore gebracht, woraufhin der Strom ansteigt. Bei hohen Salzkonzentrationen jenseits von 400 mM würde dagegen der Effekt der Volumenblockierung überwiegen, da die DNA ein Hindernis für den Stromfluss darstellt, woraufhin der Strom während einer Translokation abnimmt [144].

Auffällig ist darüber hinaus die hohe Häufigkeit an Translokations-Ereignissen. Diese lässt sich kaum durch die Variation der Spannung beeinflussen und rührt demnach vermutlich hauptsächlich aus der Konzentration an hinzugegebener DNA sowie der Geometrie der verwendeten Flüssigkeitszelle her. In mehreren Experimenten wurde beobachtet, dass eine gewisse Schwellenspannung (z.B. 50 mV) zunächst überschritten werden muss, damit überhaupt Ereignisse auftreten, und eine höhere Spannung dann aber keine messbare Erhöhung der Translokations-Häufigkeit mehr mit sich bringt.

Eine zweite Auffälligkeit ist die Höhe der einzelnen Peaks. Diese ist bei doppelter Spannung zwar geringfügig größer, jedoch keinesfalls doppelt so hoch. Abhängig ist sie hauptsächlich von der Größe der Nanopore, wobei größere Poren (aufgrund der niedrigeren elektrischen Feldstärke) langsamere Translokationen und (aufgrund der prozentual geringeren Volumenblockierung einer einzelnen DNA) weniger ausgeprägte Signale liefern [145]. Dennoch sollte eine Erhöhung der Spannung zu einer deutlicheren Erhöhung der Peaks führen. Eventuell liegen bei solch niedrigen Salzkonzentrationen also Aufladungseffekte der Porenwand vor, welche das Signal mit beeinflussen können. Dafür spricht auch die Asymmetrie der Peaks: Für negative Spannungen scheinen diese etwas niedriger auszufallen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wären ein verzögertes Ansprechen der Stromkontakte und eine zu hohe Datenmittelung während der Strommessung, so dass die eigentlichen Peakhöhen aufgrund zu niedriger Abtastraten des Signals nicht mehr vollständig erfasst werden können. Vergrößert man aus dem Stromverlauf, wie in Abbildung 46 gezeigt, eine einzelne DNA-Translokation heraus, so zeigt sich dieses Problem deutlicher. Die von der Auswertungssoftware verwendeten 125 Hz zur gemittelten Datenaufzeichnung (linkes Bild) reichen bei weitem nicht aus, um die eigentliche DNA-Translokation abzubilden. Der aufgezeichnete Peak besteht hierbei sogar oft nur aus einem einzelnen Punkt. Für eine bessere Auswertung wurden daraufhin die ungemittelten Daten mit einer Abtastrate von 66 kHz aufgezeichnet (rechtes Bild), doch auch hier erhöhte sich die Auflösung der Ereignisse nicht nennenswert. Während einer typischen DNA-Translokationszeit von z.B. 10 ms besitzt das Signal trotz der hohen Datenrate noch immer eine ansteigende und absteigende Flanke die einen scharfen Peak begrenzen. Es muss deswegen davon ausgegangen werden, dass die Platin-Kontakte der Strommessung zu langsam reagieren um die sich kurzfristig verändernde Ionenstromstärke fehlerfrei abzubilden. Sie können somit nicht schnell genug auf den

veränderten Strom reagieren, so dass die DNA schon vor der Anpassung an die Maximalstromstärke die Pore wieder verlassen hat.

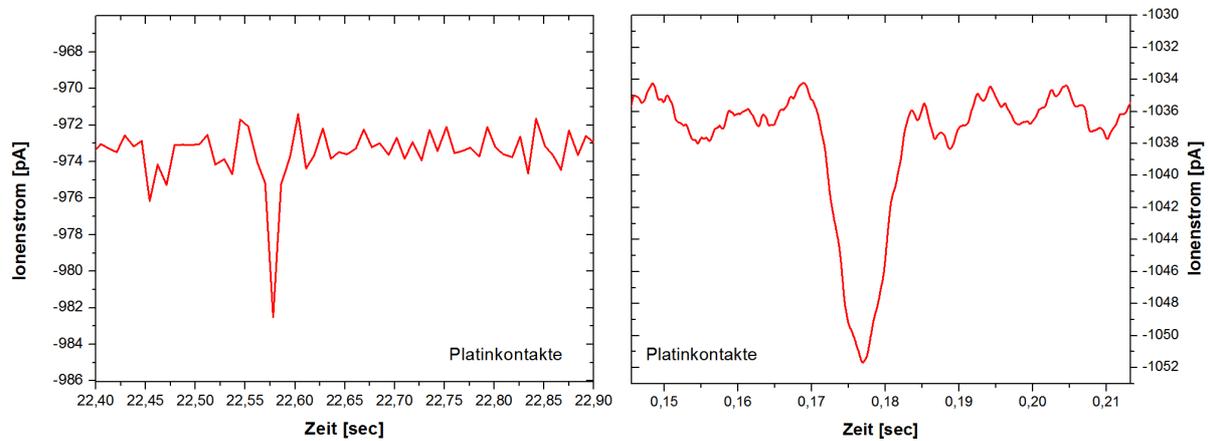


Abbildung 46: Eine einzelne DNA-Translokation jeweils mit Platinkontakten gemessen, bei einer Datenrate von 125 Hz (links) und 66 kHz (rechts).

Für weitere Coulter-Counter-Experimente wurden aus diesem Grund Silberchlorid-Kontakte verwendet. Diese sind empfindlicher als Platin-Kontakte und es kann auf die Gel-Brücke (vgl. Abbildung 32) verzichtet werden. Entsprechend erhöht sich allerdings auch das Grundrauschen der Messung und die Lichtempfindlichkeit des Aufbaus fällt deutlich höher aus.

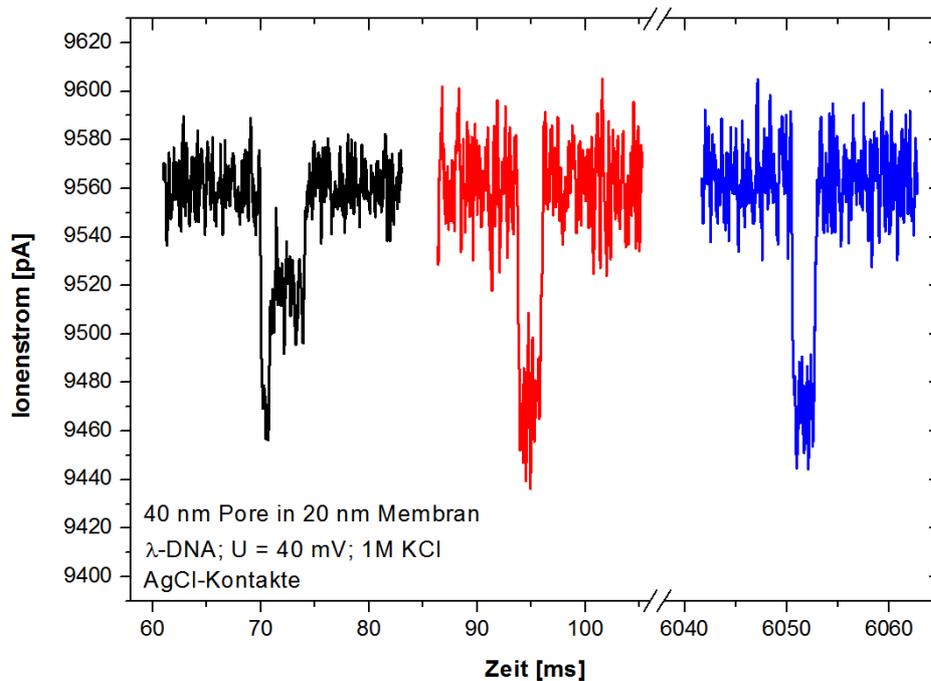


Abbildung 47: Einzelne DNA-Translokations-Ereignisse mit Silberchlorid-Kontakten gemessen. Nachträgliche Datenmittelung von 66 kHz auf 5 kHz.

In Abbildung 47 sind mehrere typische DNA-Translokations-Ereignisse gezeigt, die aus den Experimenten mit Silberchlorid-Kontakten stammen. Die Tiefe der Peaks ist nun (unterstützt durch die nun auch verwendete hohe Salzkonzentration von 1M KCl) reproduzierbar und es lassen sich verschiedene Konformationen der DNA beim Porendurchtritt erkennen. Während das rote und blaue Signal die gleiche Tiefe von 2 nS und Translokationszeit von ca. 2,3 ms besitzen, zeigt der Anfang des schwarzen Signals zunächst einen vergleichbar tiefen Einbruch, der sich jedoch im weiteren Verlauf auf die Hälfte von 1 nS reduziert. Die Translokationszeit ist mit 4,2 ms bei diesem Ereignis auch knapp doppelt so lang wie bei den anderen beiden. Man kann daraus schlussfolgern, dass die schwarze Kurve der ersten Konformation aus Abbildung 44 entspricht, in dem die DNA zum Teil gefaltet, jedoch mit unterschiedlich langen Enden durch die Pore tritt. Das tiefste Stromniveau entspricht somit zwei DNA-Doppelsträngen die sich zeitgleich in der Pore aufhalten, so dass die beiden anderen Ereignisse der dritten Konformation aus Abbildung 44 entsprechen müssen, bei welcher die DNA vermutlich als Ring vorliegt. Da die hier verwendete λ -DNA (wenn sie keine Bruchstellen aufweist) ursprünglich als Plasmid auftritt, ist dies zugleich auch die wahrscheinlichste Konformation und sollte bei den Messungen am häufigsten zu beobachten sein.

Eine Abhängigkeit der Peakhöhe von der Porengröße konnte in diesen Versuchen ebenfalls beobachtet werden. Abbildung 48 zeigt zwei Translokationsereignisse einer großen Nanopore mit einem Durchmesser von etwa 90 nm. Die Ereignisse sind weniger deutlich vom Grundrauschen der Strommessung zu unterscheiden und die Translokationszeit erhöht sich entsprechend den Erwartungen (aufgrund der geringeren elektrischen Feldstärke bei größeren Poren) bis auf ca. 10 ms. Für möglichst deutliche Signale und geringes Rauschen sollten die Nanoporen bei Coulter-Counter-Experimenten also so klein wie möglich sein. Allerdings reduziert sich bei kleinen Poren auch die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher DNA-Translokationen, da der Einflussbereich des elektrischen Feldes weniger weit in den Raum abseits der Pore herausragt, so dass mit sehr hohen Konzentrationen gearbeitet oder ein Kompromiss zwischen Signalqualität und Translokationshäufigkeit gefunden werden muss.

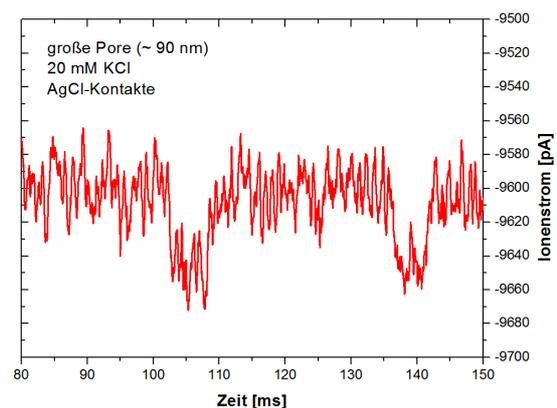


Abbildung 48: DNA-Translokation an einer sehr großen Nanopore.

Allgemein führte eine höhere Salzkonzentration (1M KCl) zu häufigeren Ereignissen und deutlicher ausgeprägten Peaks als eine niedrige Konzentration (20 mM KCl), was vermutlich auf die bessere Abschirmung von Oberflächenladungen sowie die (aufgrund der höheren Leitfähigkeit) niedrigeren benutzten Spannungen zurückzuführen ist. Wie Abbildung 49 zeigt, eignen sich die Silberchlorid-Kontakte jedoch sehr gut für alle Konzentrationen, da sie sehr schnell auf Stromänderungen reagieren können und ein entsprechend deutliches Signal liefern.

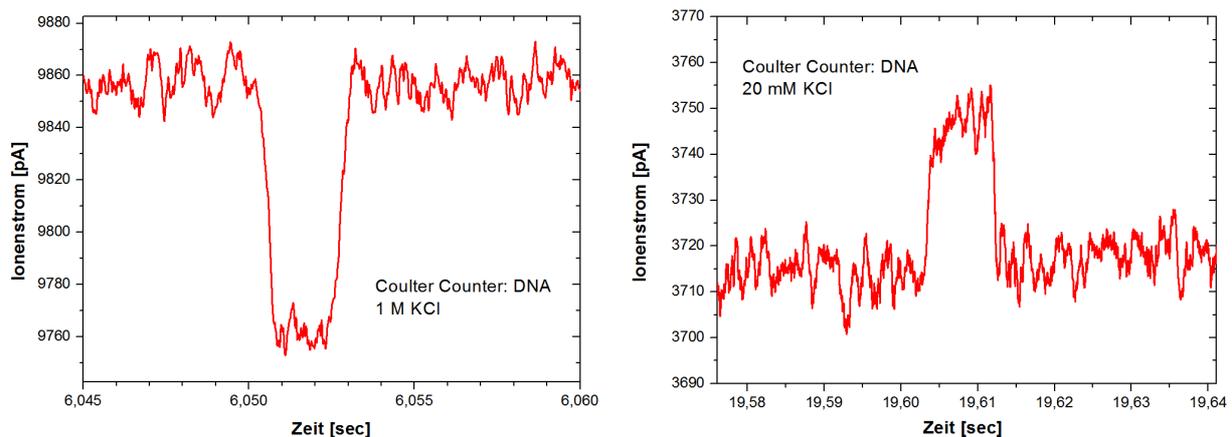


Abbildung 49: Translokations-Ereignisse bei hoher (links) und niedriger (rechts) Salzkonzentration.

Auch die Richtungsabhängigkeit der Signale von der Salzkonzentration ist hier noch einmal erkennbar: Bei 1 M KCl zeigen sich Einbrüche im Stromsignal, da die DNA als physisches Hindernis den Stromfluss blockiert. Bei 20 mM KCl zeigt sich dagegen eine Stromzunahme während der Translokation, da zusätzliche Ladungsträger in die Porenregion gebracht werden.

Kontrollierte Translokation

Mit Hinblick auf die Nanoporen-Sequenzierung – bei der die Basensequenz einer DNA mit dem Ionenstrom oder einem anderen Informationskanal während einer Nanoporen-Translokation ausgelesen werden soll – bestehen sehr hohe experimentelle Anforderungen. Um die verschiedenen Basenpaare einer doppelsträngigen DNA (oder alternativ die Basen einer einzelsträngigen DNA) voneinander unterscheiden zu können muss die räumliche und zeitliche Auflösung des entsprechenden Messsignals ausreichend hoch sein. Der Durchmesser der Nanopore sollte also möglichst klein und im Idealfall nur wenig größer als der Durchmesser der DNA sein. Auch die Membran muss sehr dünn und die angelegte Spannung hoch sein, so dass sich nur wenige Basen gleichzeitig in der Pore aufhalten und ein differenziertes Signal ausgebildet werden kann. Alle diese Anforderungen führen jedoch zu einer beschleunigten Translokation, die für eine Sequenzierung viele Größenordnungen zu schnell erfolgt. So müssten bei einer Translokationszeit von einer Millisekunde während des Durchtritts einer λ -DNA (mit 48502 Basenpaaren) durch eine Nanopore bereits 48,5 Millionen Basen pro Sekunde aufgelöst werden, was weder die Stromkontakte noch eine Auswertungs Elektronik mit ausreichender Präzision zur Zeit leisten können. Für eine zuverlässige Sequenzierung muss also die Translokationszeit um mehrere Größenordnungen verringert werden.

Neben chemischen Präparationen der Nanoporenoberflächen, temporären Bindungen mit Liganden in der Porenregion oder einer chemischen oder biologischen Markierung der DNA

selbst, bietet die physikalische Fixierung mit Hilfe der Optischen Pinzette die direkteste Möglichkeit die Translokation und deren Geschwindigkeit zu kontrollieren.

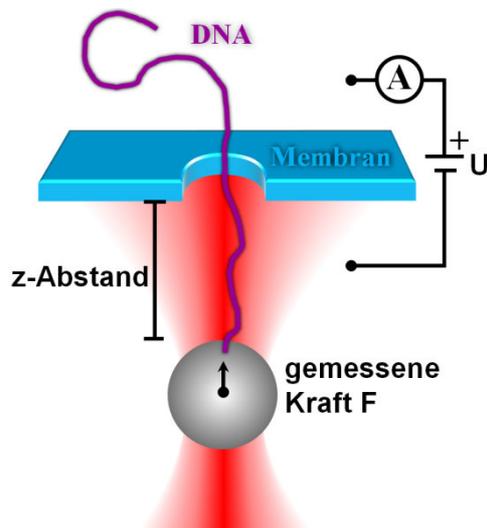


Abbildung 50: Prinzip der Kombination von Nanoporentranslokation und Optischer Pinzette

Nach dem in Abbildung 50 dargestellten Prinzip wird hierfür die DNA an einem kleinen Mikrokügelchen fixiert, welches mit der Optischen Pinzette eingefangen werden kann. Durch die angelegte Transmembranspannung wird die DNA durch die Pore gezogen, wobei die Anbindung am Kügelchen nun jedoch, durch die Rückstellkraft der Optischen Pinzette, eine vollständige Translokation verhindert. Das gewünschte Teilstück der DNA, welches sich in der Pore befinden soll, kann so mit Hilfe der Piezo-Elektronik der Optischen Pinzette prinzipiell nanometergenau eingestellt und fixiert werden. Dies erlaubt ein beliebig langsames, beliebig häufiges und hoch präzises Abscannen der gewünschten DNA-Bereiche, wobei die gemessene Kraft hier – neben dem Ionenstrom – auch noch eine weitere zentrale Messgröße zum Informationsgewinn bietet. Gleichzeitig wird der zuvor kalibrierte z-Abstand zwischen der Kügelchen-Oberkante und der

Nanoporenmembran aufgezeichnet, aus dem sich später Rückschlüsse auf die exakte Mess-Position entlang der DNA-Konturlänge ziehen lassen.

Der typische Verlauf einer solchen, von der Optischen Pinzette kontrollierten, DNA-Translokation ist in Abbildung 51 anhand von zwei Beispielmessungen gezeigt.

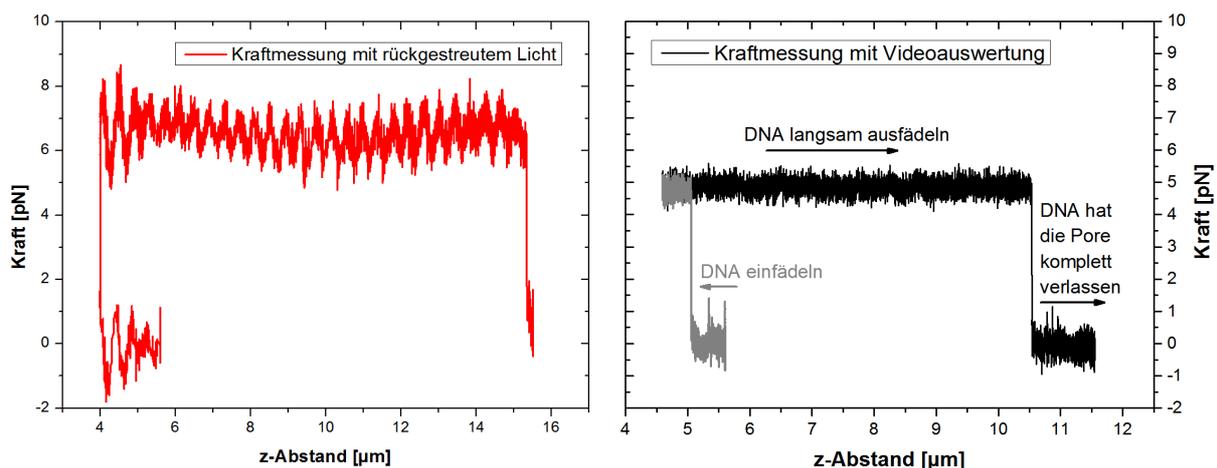


Abbildung 51: Zwei Standardmessungen von je einer DNA-Translokation durch eine Nanopore kontrolliert mit der Optischen Pinzette

Zunächst ist die Kraft hierbei Null, während der z-Abstand langsam verkleinert und die DNA damit in die Nähe der Porenregion gebracht wird. Je nach Gyrationradius der DNA kann ein

Einfädeln dabei bei einem Abstand von typischerweise 3-5 μm geschehen. Sofort nachdem die DNA in die Pore gezogen wurde, springt das Kraftsignal auf einen höheren Wert, da die angelegte Spannung an der DNA und diese wiederum am Kügelchen zieht, und selbiges damit leicht aus seiner Gleichgewichtslage auslenkt. Während einer nun erfolgenden Vergrößerung des z-Abstands, bei welcher die DNA langsam aus der Pore ausgefädelt wird, bleibt der Kraftwert relativ konstant, da sich zwar immer ein anderer, aber stets gleichartiger Teil des DNA-Strangs in der Porenregion befindet. Nachdem das Ende des DNA-Stranges erreicht wurde, wird diese nun komplett ausgefädelt und die gemessene Kraft fällt auf null zurück.

Die gemessene Kraft, während sich eine DNA in der Pore befindet, ist hierbei abhängig vom Durchmesser der Pore (vgl. Kapitel 4.1.8) und linear abhängig von der angelegten Spannung. Während der Experimente zeigte sie sich dagegen unabhängig von der Salzkonzentration der Pufferlösung und der Dicke der Nanoporenmembran.

Der z-Abstand, bei welchem die DNA komplett ausgefädelt wird da ihre End-zu-End-Distanz erreicht ist, bildet ein indirektes, kraftabhängiges Maß für deren Konturlänge. Beachtet werden muss hierbei nämlich, dass die DNA aufgrund ihrer elastischen Eigenschaften stets etwas kürzer vorliegt als ihre eigentliche Konturlänge. Nach dem WLC-Modell (vgl. Kapitel 2.3.1.) beträgt die Länge einer DNA unter der angelegten Kraft von 7 pN z.B. nur 94,57% ihrer Konturlänge. Eine eigentlich 16,4 μm lange λ -DNA würde damit unter einer Kraft von 7 pN bereits bei einem z-Abstand von 15,51 μm ausgefädelt werden. Ein zweiter Effekt hat hierbei jedoch ebenfalls einen Einfluss auf die Messung: So wird das Kügelchen kraftabhängig leicht aus seiner Gleichgewichtsposition zur Membran hin ausgelenkt, so dass der DNA im Experiment etwas weniger Abstand zur Verfügung steht, als der (aus der Piezo-Position des Fallenfokus bestimmte) z-Abstand angibt. Bei einer Kraft von 7 pN und einer Fallenstärke von typischerweise 50 pN/ μm beträgt diese Auslenkung des Kügelchens bereits etwa 0,14 μm . Zusammenfassend bewirkt eine 16,4 μm lange λ -DNA, unter der Kraft von 7 pN, aufgrund der zwei beschriebenen Effekte einen maximal messbaren z-Abstand von $(16,4 \mu\text{m}) \cdot 0,9457 + 0,14 \mu\text{m} = 15,65 \mu\text{m}$. Sollte der Abstand also – bei gleicher Kraft – geringer ausfallen, so hatte die DNA nicht ihre volle Länge, was auf Beschädigungen oder ein teilweises Kleben am Kügelchen zurückzuführen sein kann.

Analog zur Konturlänge lässt sich so natürlich auch jede andere beliebige Position auf der λ -DNA aus dem dazugehörigen z-Abstand berechnen, wenn die DNA-Elastizität nach dem WLC-Modell und die Auslenkung des Mikrokügelchens kraftabhängig beachtet werden.

Aus dem Vergleich der zwei Messungen lässt sich gut erkennen, dass in manchen Fällen das Kraftsignal während des Ausfädels einer DNA von einem Interferenzsignal überlagert zu sein scheint (links), dieser Effekt in anderen Messungen (rechts) dagegen überhaupt nicht auftritt. Bisher [139] wurde davon ausgegangen, dass die Ursache in der Messung des rückgestreuten Lichts liegt, da vom Kügelchen und von der Membran zurückgestreute Strahlung auf dem Detektor interferieren kann. Nach der Einführung der Kraftmessung per Videoauswertung zeigte sich zwar noch immer ein gehäuftes Auftreten dieser Interferenzen während der Kraftmessung per rückgestreutem Licht, doch traten sie vereinzelt auch während der Videoauswertung auf. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Interferenzen zu einer realen Verschiebung des gefangenen Kügelchens in der Optischen Falle führen,

während sich dieses relativ zur Membran bewegt, und der Effekt nicht erst auf dem Detektor auftritt. Die Videoauswertung ist schließlich vom rückgestreuten Licht völlig unabhängig durchführbar und zeichnet die reale Bewegung des Kügelchens relativ zum Kamerafokus auf.

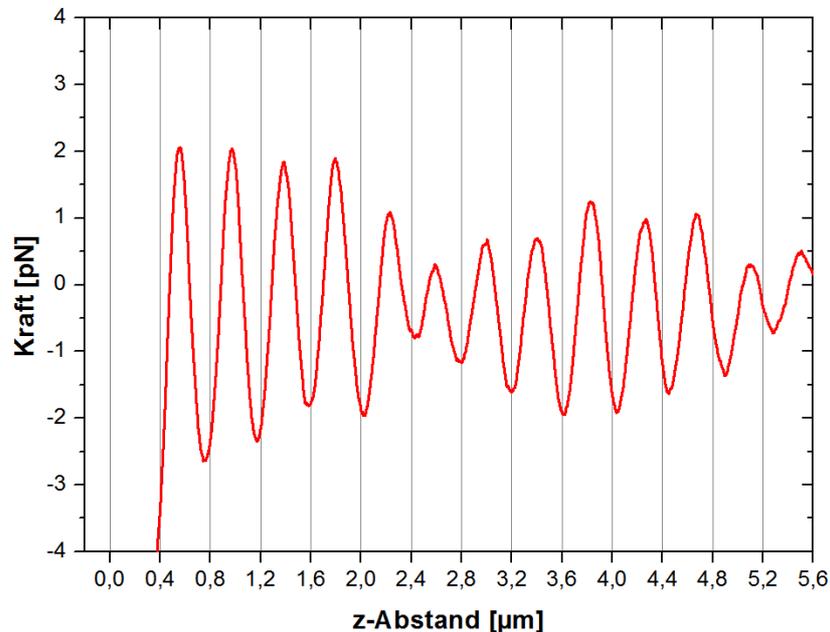


Abbildung 52: Der Abstand zweier Interferenzminima während der Kraftmessung beträgt 409 nm und genügt damit gut der Interferenzbedingung der verwendeten Laserstrahlung in wässriger Lösung.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich eine stehende Welle zwischen Membran und Kügelchen ausbildet, da beide Oberflächen wie die Spiegel in einem Resonator wirken, was die Position der Optischen Falle schließlich leicht verschieben kann. Dafür spricht auch der Abstand zwischen zwei Interferenzminima, der in Abbildung 52 zu 409 nm bestimmt wurde. Hierfür wurde ein Kügelchen ohne DNA sehr langsam der Membranoberfläche angenähert und die Interferenz des Kraftsignals aufgezeichnet. Sie wird mit kleinerem Abstand, dickeren Membranen und höherer Laserleistung größer. Der Abstand zweier Minima entspricht mit 409 nm sehr gut der Interferenzbedingung der verwendeten Infrarot-Laserstrahlung mit Wellenlänge λ im wässrigen Medium mit Brechungsindex n von $\lambda/2n = 403$ nm.

Dass die Interferenzeffekte während der Experimente unterschiedlich stark ausgeprägt sind, muss mit den Eigenschaften des Resonators zusammenhängen. Da zudem die verwendeten Membranen stets gleich, die Kügelchen jedoch verschieden waren, besteht die Vermutung, dass sich die Kügelchen stark in ihrer Reflektivität unterscheiden können. Dieser Zusammenhang wurde in Abbildung 53 näher untersucht, indem die Reflektivität eines Kügelchens in Abhängigkeit seiner Größe gemessen wurde. Da eine genaue Bestimmung der Kugelgröße schwierig ist, wurde hierfür der scheinbare Kugelradius auf der Kamera-CCD der Videoauswertung herangezogen, welcher zwar mit der realen Größe korreliert, aber vermutlich nicht linear in diese umgerechnet werden kann. Als Maß für die Reflektivität der Kügelchen wurde die Intensität des rückgestreuten Lichts auf dem Detektor verwendet, der sonst zur Kraftauswertung per rückgestreutem Licht dient. Insgesamt lassen sich damit zwar

keine absolut quantitativen Aussagen treffen, jedoch zeichnet sich auch so ein qualitativ eindeutiges Bild ab:

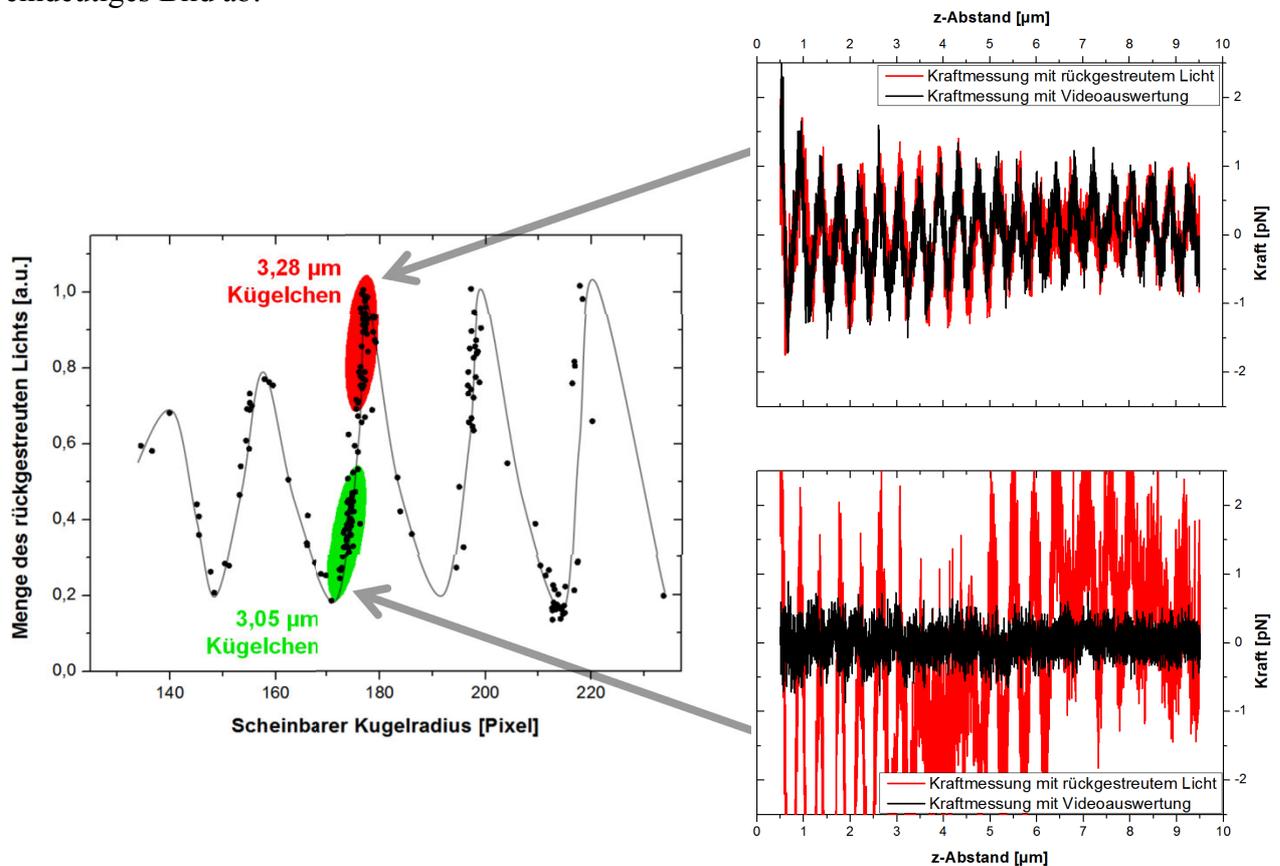


Abbildung 53: Menge des rückgestreuten Lichts in Abhängig von der Kugelchen-Größe, sowie Vergleich von Kraftauswertung per Videoauswertung und per rückgestreutem Licht für zwei häufig verwendete Kugelchengrößen.

Die unterschiedlich großen Kugelchen besitzen – vermutlich aufgrund von Interferenzeffekten des an ihrer Vorder- und Rückseite reflektierten Laserlichtes – eine stark unterschiedlich ausgeprägte Reflektivität. Diese hängt periodisch von der Kugelgröße ab, so dass z.B. die meisten Kugelchen aus der Charge mit einem Nominal-Durchmesser von 3,05 µm fast gar kein Licht und die meisten Kugelchen mit einem vom Hersteller angegebenen Durchmesser von 3,28 µm sehr viel Licht reflektieren. Dies erklärt zudem, warum die Interferenzeffekte gehäuft bei der Auswertung per rückgestreutem Licht auftreten, da hierfür nur stark reflektierende Kugelchen (von 3,28 µm Durchmesser) in Frage kommen. In diesem Größenbereich erzeugen beide Messmethoden einen deutlichen Interferenzeffekt (Bild rechts oben), sind jedoch in der Signalqualität beide gleichwertig verwendbar. Bei der Verwendung von Kugelchen mit 3,05 µm Größe dagegen (wie für den größten Teil dieser Arbeit) treten zwar auch vereinzelt größere oder kleinere Kugelchen in der Probe auf, die Hauptanzahl liegt jedoch in einem Bereich mit minimaler Reflektivität. Sie sind damit besonders gut für die Videoauswertung zu gebrauchen, da sie keinen Resonator ausbilden können und damit keine Interferenzeffekte erzeugen (Bild rechts unten). Eine Kraftauswertung per rückgestreutem Licht ist für diese Kugelchengröße damit jedoch nicht mehr möglich, da das Signal extrem verstärkt werden muss und Rauschen und Rest-Interferenz damit viel zu groß werden.

Mit diesen Erkenntnissen kann bereits vor dem Experiment sehr schnell eine Entscheidung getroffen und das für die geplanten Messungen jeweils optimale Kügelchen ausgewählt werden, da nur der scheinbare Radius per Videoauswertung einmalig bestimmt werden muss.

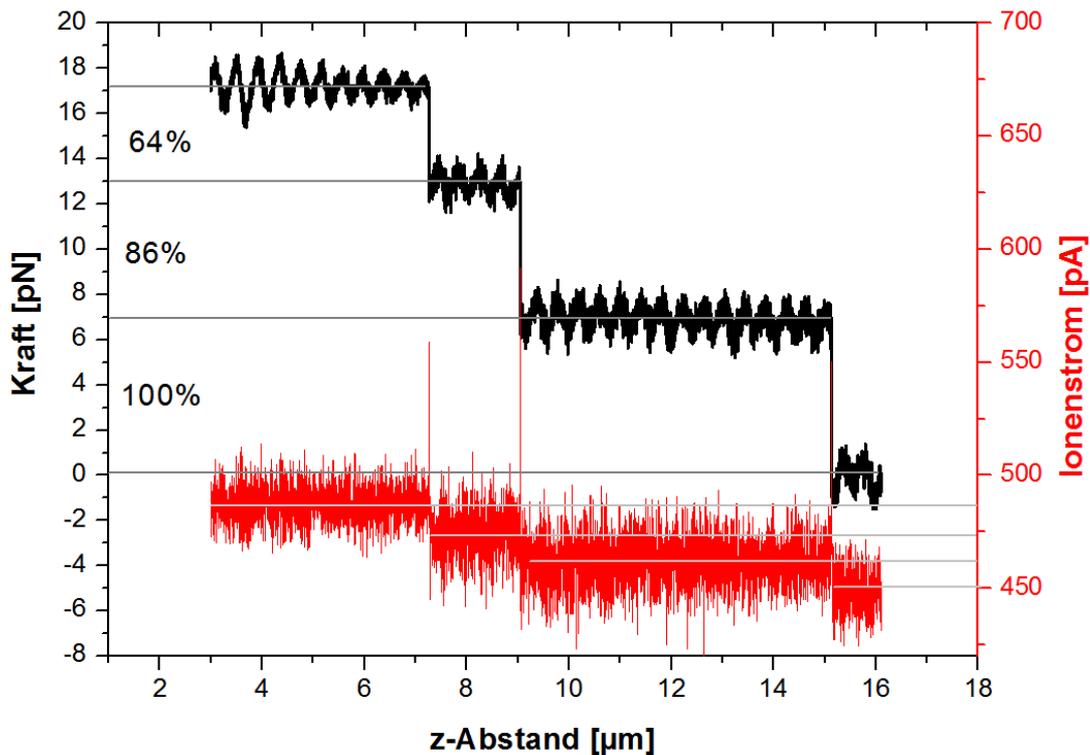


Abbildung 54: Kraft und Stromsignal während des Ausfädelns mehrerer DNA-Stränge unterschiedlicher Länge.

Neben den beschriebenen zwei Methoden der Kraftmessung kann auch das Ionenstromsignal als Messgröße zur Auswertung des Experiments verwendet werden. Wie in Abbildung 54 gezeigt ist, folgt dieses – bei den typischerweise niedrigen Salzkonzentrationen – qualitativ genau dem Kraftsignal. Befindet sich eine DNA in der Pore, so nimmt der Strom (analog zu den Messungen während der freien Translokation) zu, da sich mehr Ladungsträger in der Porenregion befinden. Allerdings ist das Stromsignal weniger deutlich ausgeprägt und mit höherem Rauschen behaftet als das korrespondierende Kraftsignal, so dass in den meisten Fällen auf eine Auswertung des Stroms verzichtet werden kann. Das Kraftsignal ist zudem weniger anfällig für eine Beeinflussung durch die Beleuchtung, fehlerhafte Abschirmung oder Verschmutzung der Pore.

Abbildung 54 lässt auch noch einen weiteren Unterschied zwischen Kraft- und Stromsignal erkennen: Befinden sich mehrere DNA-Stränge gleichzeitig in der Pore, so nimmt der Strom proportional mit der DNA-Anzahl zu, zumindest im Rahmen der hier erreichbaren Auflösung. Für das Kraftsignal gilt dies jedoch nicht und so erzeugen zwei DNA-Stränge nicht den doppelten und drei DNA-Stränge nicht den dreifachen Wert der Haltekraft einer DNA.

Vielmehr wird die Kraft anteilig immer stärker reduziert, je mehr DNA-Stränge sich in der Pore befinden. Dies kann zu einem kleinen Teil vermutlich der Unlinearität der Optischen Falle und des Detektors zugeschrieben werden, wenn bei hohen Kräften Kugelauslenkung und Menge des rückgestreuten Lichts nicht mehr proportional zur anliegenden Kraft reagieren. Zum größten Teil spielen hier jedoch kooperative Effekte zwischen den DNA-Strängen und ihren elektrochemischen Abschirmschichten eine Rolle. Diese erzeugen aufgrund ihrer starken negativen Ladungen zwischen sich einen viel stärkeren elektroosmotischen Fluss, als dies zwischen einer DNA und der Porenwand geschieht, so dass die Abschwächung durch den elektroosmotischen Fluss umso stärker ausfällt, je mehr DNA-Stränge gleichzeitig eingefädelt sind. Dieser Effekt ist auch in theoretischen Simulationen bereits beobachtet worden [138].

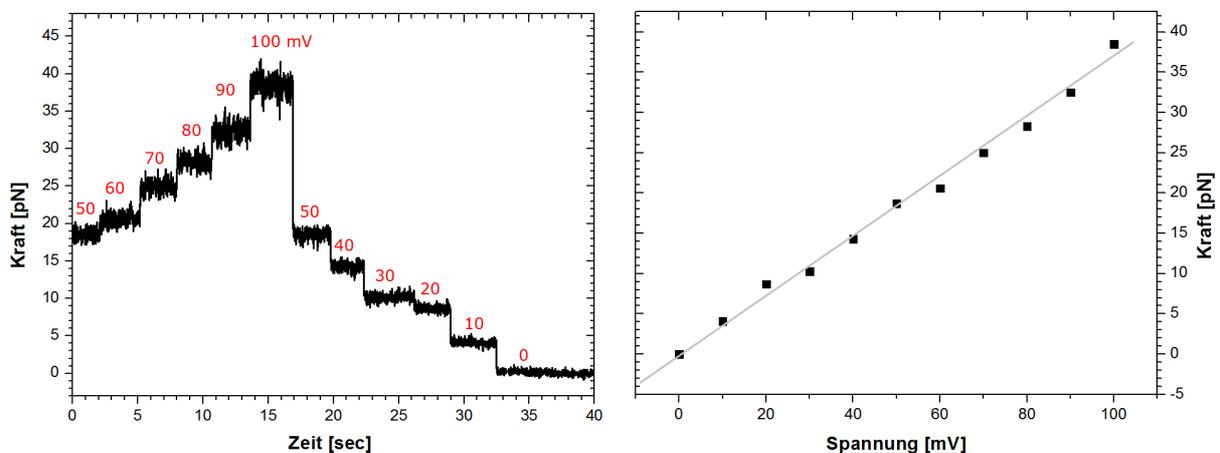


Abbildung 55: Lineare Abhängigkeit der gemessenen Kraft von der angelegten Transmembranspannung für eine 8 nm große Pore bei 20 mM KCl Pufferlösung.

In der Regel reagiert die gemessene Kraft – wie in Abbildung 55 gezeigt – proportional auf die angelegte Spannung, welche die DNA durch die Pore zieht. Neben der elektrostatischen Kraft, die natürlich linear vom elektrischen Feld und damit von der Spannung abhängt, scheint damit auch der kraftreduzierende elektroosmotische Fluss proportional von der Spannung abhängig zu sein. So ergibt sich insgesamt über einen großen Spannungsverlauf ein deutlich lineares Verhalten der gemessenen Kraft (rechtes Bild).

In einigen Experimenten wurde jedoch eine Abweichung von diesem Verhalten festgestellt, besonders bei sehr kurzen DNA-Fragmenten. Eine solche Messung ist in Abbildung 56 gezeigt. Während sich bei niedrigen Spannungen noch immer ein linearer Zusammenhang ausbildet, so steigt die Abweichung davon bei höheren Spannungen immer weiter an. Das Kügelchen wird somit bei hohen Spannungen immer stärker zur Membran hin ausgelenkt.

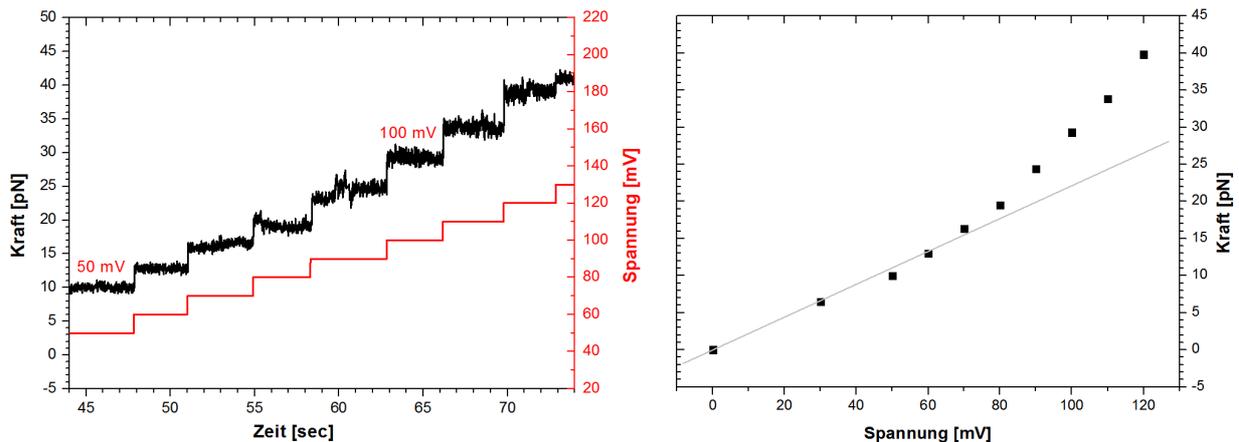


Abbildung 56: Unlineare Abhängigkeit der Kraft von der angelegten Spannung, wie sie in einigen Experimenten mit niedrigen z-Abständen auftritt.

Aufgrund der kurzen z-Abstände in diesen Experimenten wurde deswegen die Vermutung aufgestellt, dass die Kügelchen selbst – auch ohne DNA – vom elektrischen Feld in der Porenregion beeinflusst werden, letztlich also aufgrund der steigenden Kräfte eine negative Ladung aufweisen müssen. Zu diesem Zweck wurde, wie in Abbildung 57 gezeigt, ein Kontrollexperiment, gänzlich ohne anhaftende DNA durchgeführt. Während das Kügelchen bei verschiedenen z-Abständen in der Nähe der Pore gehalten wird, wurde die Spannung variiert und die Kraft auf das Kügelchen gemessen.

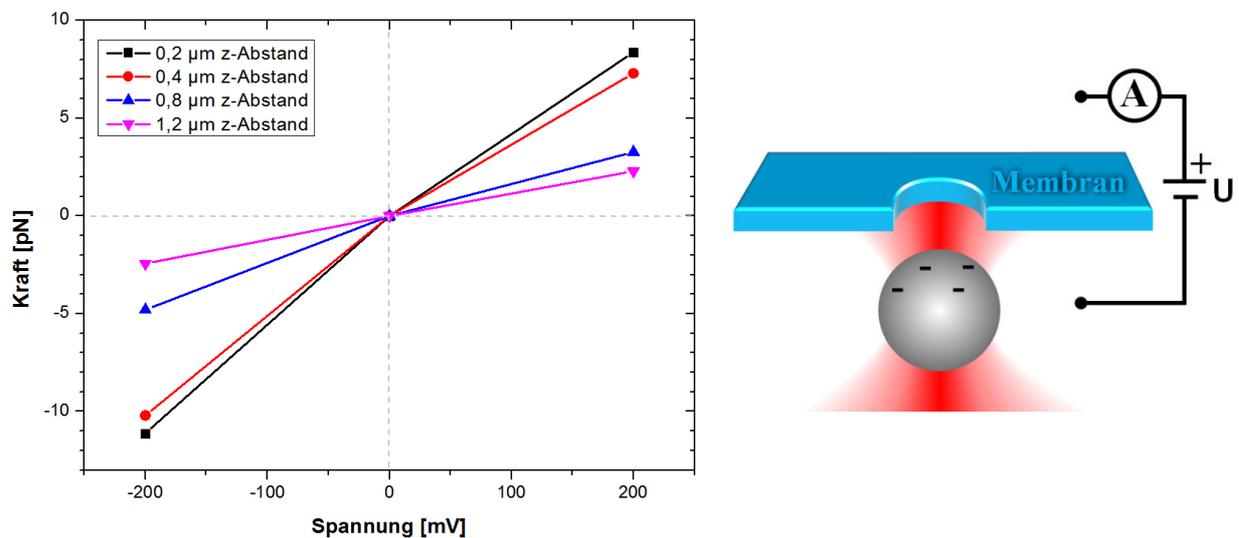


Abbildung 57: Kontrollexperiment zur Untersuchung der Kraft auf Kügelchen ohne anhaftende DNA.

Es zeigt sich, dass die Kügelchen in der Tat – auch ohne daran immobilisierte DNA – von der elektrischen Spannung angezogen bzw. abgestoßen werden. Sie müssen damit eine negative Netto-Ladung aufweisen, die sich vermutlich aus einer Oberflächenladung des Polyesterols bei

den gegebenen Salzkonzentrationen und pH-Werten ergibt. Auch eine Polarisation der Ladungen innerhalb des Kugelchens ist denkbar. Der Effekt ist hierbei umso größer, je kleiner der z-Abstand zwischen Kugeloberfläche und Nanopore ausfällt. Bei kleineren z-Abständen muss er deswegen bei der Auswertung der Experimente stets beachtet werden, erst jenseits von 2 μm fällt er nicht mehr ins Gewicht. Damit sind längere DNA-Stränge für die Messungen an Nanoporen von Vorteil.

Auffällig ist zudem der leichte Knick in den Kurven beim Umpolen der Spannung: Die Anziehung bei positiven Spannungen fällt betragsmäßig anscheinend geringer aus, als die Abstoßung des Kugelchens bei negativen Spannungen. Ein Grund dafür könnte auch hier der elektroosmotische Fluss sein, der durch die Pore fließt und dann auf das Kugelchen trifft. Bei positiven Spannungen fließt er von oben nach unten und drückt dann direkt auf das angezogene Kugelchen um die Auslenkung in Membranrichtung damit etwas abzuschwächen. Bei negativen Spannungen dagegen wird das Kugelchen sowieso schon von der Membran weggedrückt und der von unten nach oben fließende elektroosmotische Fluss hat mehr Raum zur Ausbildung zur Verfügung, in dem er nicht mit der Kugel in Kontakt gerät und kann zudem auch aus den seitlichen Bereichen der Porenregion stammen. Die Abschwächung der Kraft fällt damit aufgrund der geringeren Reibung am Kugelchen kleiner aus.

4.1.3. DNA-Ligand-Komplexe in Nanoporen

Aufgrund der hohen experimentellen Anforderungen an die Nanoporen-Sequenzierung besteht ein zunächst einfacherer Schritt darin, größere Strukturen (als die Basenpaare) an einem DNA-Strang mit Hilfe der Nanoporen-Translokation nachzuweisen und exakt zu lokalisieren. Da das Rückgrat der DNA – wie bei den zuvor durchgeführten Messungen mit der Optischen Pinzette festgestellt – ein homogenes Kraftsignal auf seiner gesamten Länge bewirkt, wurden für die nachfolgenden Messungen verschiedene DNA-bindende Liganden an der DNA angebracht. Diese Experimente mit (zum Teil anderen) Liganden wurden bereits während der Diplomarbeit des Autors [139] begonnen, so dass sich an dortiger Stelle auch zahlreichere und vertiefendere Messungen befinden. Für die vorliegende Arbeit sollen deswegen die Ergebnisse nur exemplarisch vorgestellt, nun jedoch auch in einem theoretischen Zusammenhang ausführlicher ausgewertet werden.

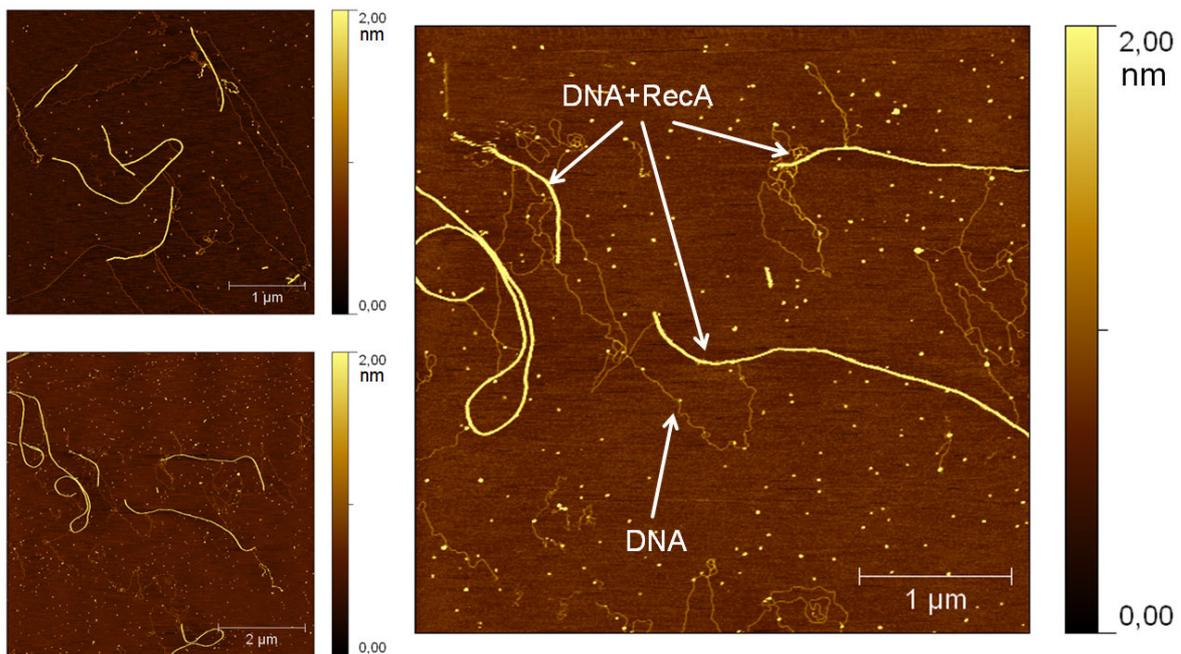


Abbildung 58: AFM-Aufnahme des Proteins RecA, welches an DNA lange Filamente bildet.

Als Ligand kam hierbei zunächst RecA zum Einsatz (vgl. Kapitel 2.3.2.), welches, wie in Abbildung 58 gezeigt, zur Bildung von langen Filamenten entlang eines DNA-Stranges neigt und dabei sowohl dessen Durchmesser als auch dessen negative Linienladungsdichte deutlich erhöht.

Abbildung 59 zeigt das Ergebnis, wenn ein derart präparierter DNA-Strang mit Hilfe der Optischen Pinzette durch eine Nanopore gezogen wird. Es ergeben sich sehr deutliche Kraftsignale, die sich je nach Form des Filaments unterscheiden können.

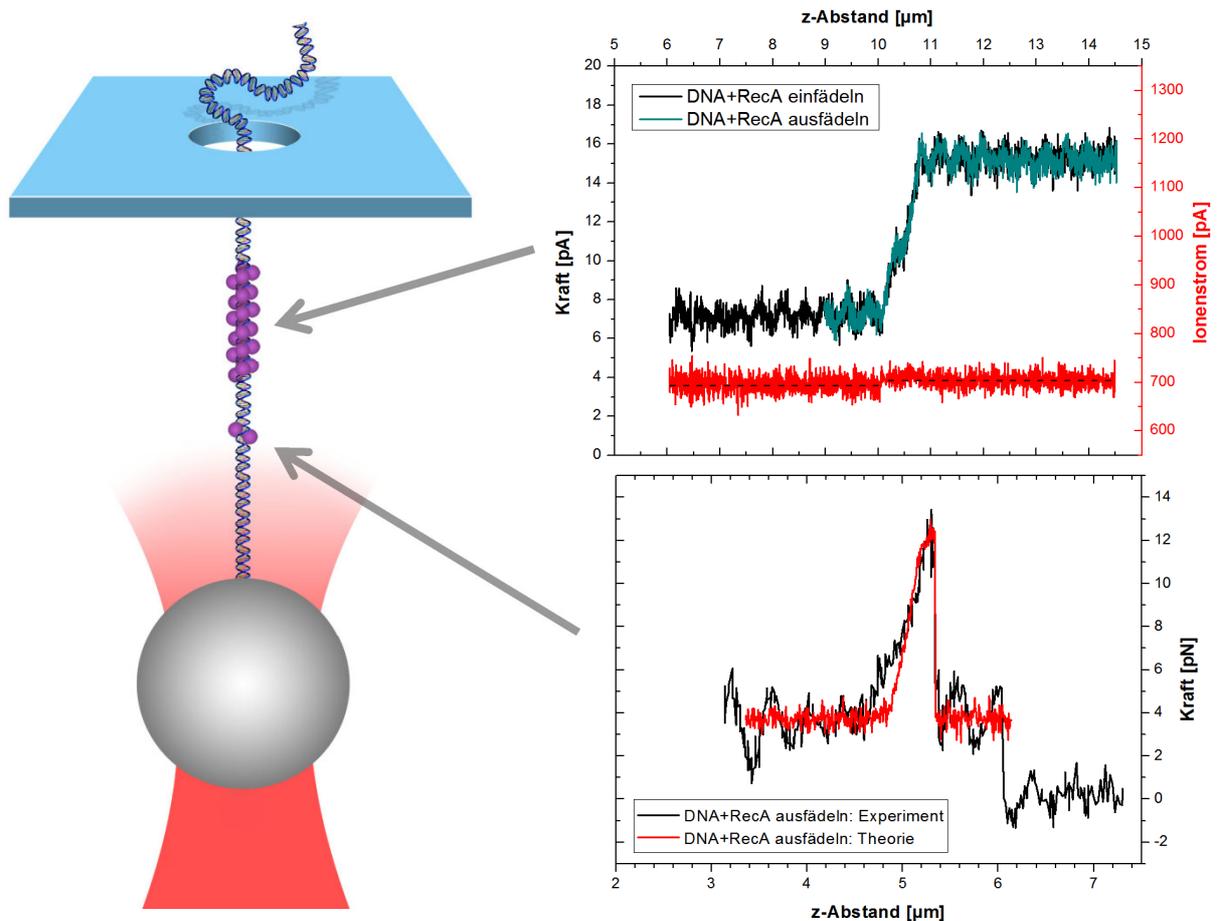


Abbildung 59: Nanoporen-Messungen mit der Optischen Pinzette für zwei verschiedene RecA-DNA-Komplexe.

Die obere Messung zeigt hierbei ein sehr langes RecA-Filament, welches bei 50 mV durch eine 40 nm große Pore gezogen wurde, und die untere Messung ein sehr kurzes Filament bei 20 mV und einer 45 nm großen Nanopore.

In beiden Fällen zeigt sich zunächst bei kleinen z-Abständen der übliche, homogene Kraftverlauf, da sich hier nur pure DNA, ohne jegliche Liganden, in der Pore befindet. Sobald während des weiteren, langsamen Ausfädelns jedoch der Anfang des jeweiligen RecA-Filaments erreicht wird, steigt die Kraft kontinuierlich auf einen etwa 2,5-fach höheren Wert an.

Im Falle des langen RecA-Filaments verbleibt die Kraft nun während des weiteren Ausfädelns auf diesem höheren Wert und auch eine Umkehr der Scan-Richtung (so dass nun ein sehr langsames Einfädeln des DNA-Stranges stattfindet) kann diesen Kraftverlauf sehr exakt reproduzieren. Es kann daraus geschlussfolgert werden, dass sich das RecA-Filament fest mit der DNA verbunden hat und seine relative Position daraufhin nicht mehr ändern kann.

Im Falle des sehr kurzen RecA-Filaments sinkt die Kraft sofort nach dem Erreichen des um den Faktor 2,5 erhöhten Kraftwerts abrupt auf ihren Ursprungswert zurück. Das Filament wurde hier also bereits komplett durch die Pore gezogen und es befindet sich wieder pure,

unbeschichtete DNA in der Pore. Diese wird nach dem Erreichen ihrer vollständigen Länge ebenfalls aus der Pore gezogen, so dass die Kraft dann auf null absinkt. Im gezeigten Fall geschieht dies bei einem z-Abstand von 6,05 μm , was nach der kraftabhängigen Korrektur der Kugelauslenkung und und DNA-Ausdehnung nach dem WLC-Modell einer Konturlänge von knapp 6,5 μm entspricht.

Außerdem ist in der oberen Messung zu erkennen, dass der Ionenstrom wie bei den vorhergehenden Kraftmessungen qualitativ dasselbe Verhalten zeigt und gleichzeitig mit ansteigt, hierbei jedoch ebenfalls nur eine geringere Auflösung im Vergleich zum Kraftsignal zu erzielen ist.

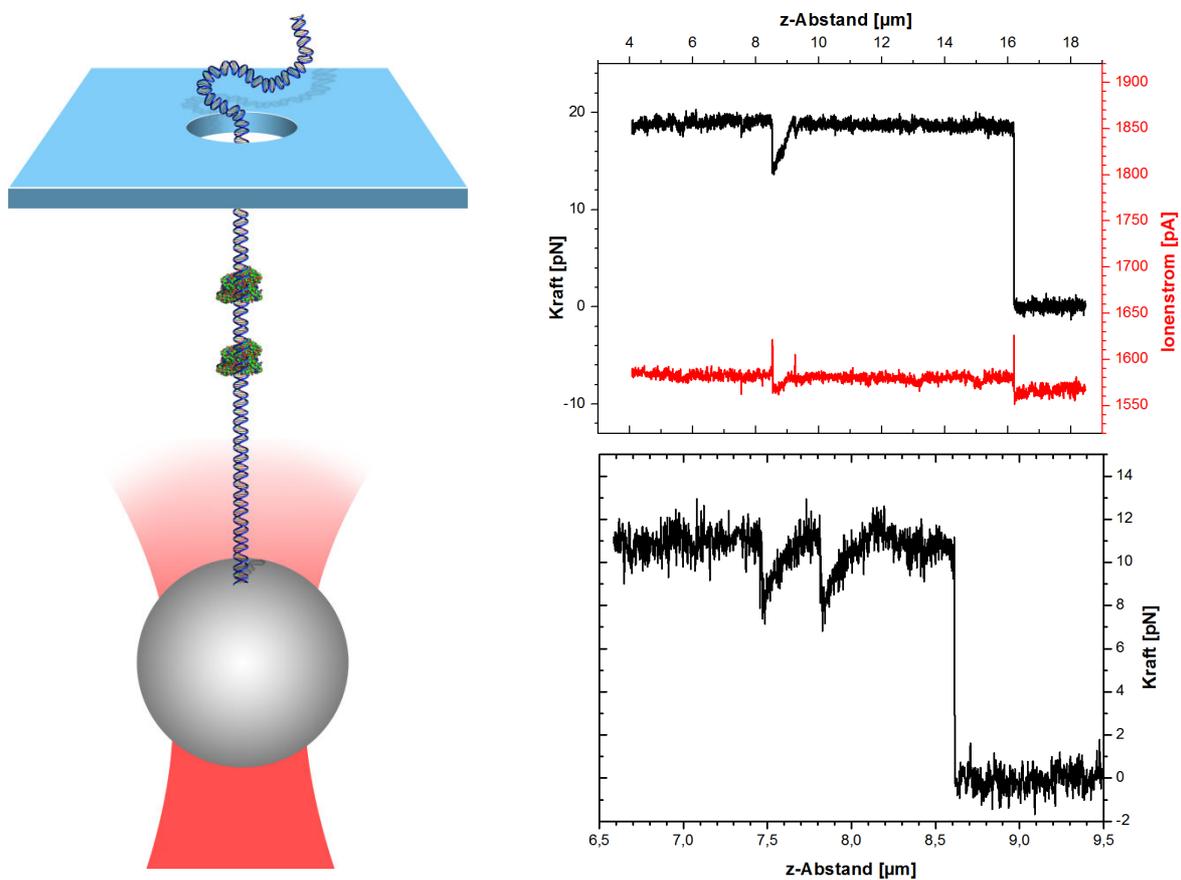


Abbildung 60: Nanoporen-Messung mit der Optischen Pinzette für ein einzelnes (oben) und für zwei aufeinanderfolgende (unten) DNA-gebundene EcoRI-Proteine.

Ein ähnliches, jedoch scheinbar spiegelverkehrtes Verhalten des Kraftsignals ergibt sich, wenn das gleiche Experiment, wie in Abbildung 60 gezeigt, mit positiv geladenem EcoRI-Proteinen anstatt mit negativ geladenem RecA durchgeführt wird. Hier findet ein abrupter Krafteinbruch statt, sobald die Position des Liganden während des Scannens der DNA erreicht wird, gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg zurück auf den ursprünglichen Wert. Auch hier spiegelt der Ionenstrom das Verhalten des Kraftsignals exakt wider.

Zur genauen Klärung des Verhaltens der verschiedenen Liganden, sowie der dabei auftretenden (jeweils asymmetrischen) Formen der Kraftanstiege und –einbrüche wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Peter Reimann und Dr. Sebastian Getfert eine theoretische Beschreibung entwickelt und die DNA-Translokation der DNA-Ligand-Komplexe auch theoretisch simuliert [50]. Es wird dabei von vier verschiedenen, wirkenden Potentialen ausgegangen, deren Summe nach der gesuchten Kraft (bzw. den dazugehörigen Bewegungsgleichungen) abgeleitet werden kann. Dabei berücksichtigt werden:

- das harmonische Potential der Optischen Falle (in dem sich das Mikrokügelchen je nach Kraftwirkung bewegen kann)
- das elektrostatische Nanoporen-Potential (welches sich aus der angelegten Spannung und deren Wirkung auf die Ladung der DNA ergibt)
- das Wormlike-Chain-Potential (welches die Elastizität der DNA und ihre Antwort auf externe Kräfte beschreibt)
- das elektrostatische Potential des Liganden (welches sich aus dessen Ladung, sowie dem elektrischen Nanoporen-Potential ergibt und die Wirkung des elektroosmotischen Flusses beinhaltet, wenn statt der realen eine effektive Liganden-Ladung verwendet wird)

Anstatt der Newtonschen Bewegungsgleichungen werden hier zudem Langevin-Gleichungen verwendet um die Bewegung der beteiligten Komponenten zu beschreiben. Diese beinhalten zusätzlich eine stochastische Dynamik, welche aufgrund der Brownschen Molekularbewegung und anderer Fluktuationen und Dissipationen in den verwendeten Größenskalen zu erwarten ist.

Die Simulation führt nun zu einem veränderten Bild der DNA-Ligand-Translokation, welche in Abbildung 61 anschaulich dargestellt ist.

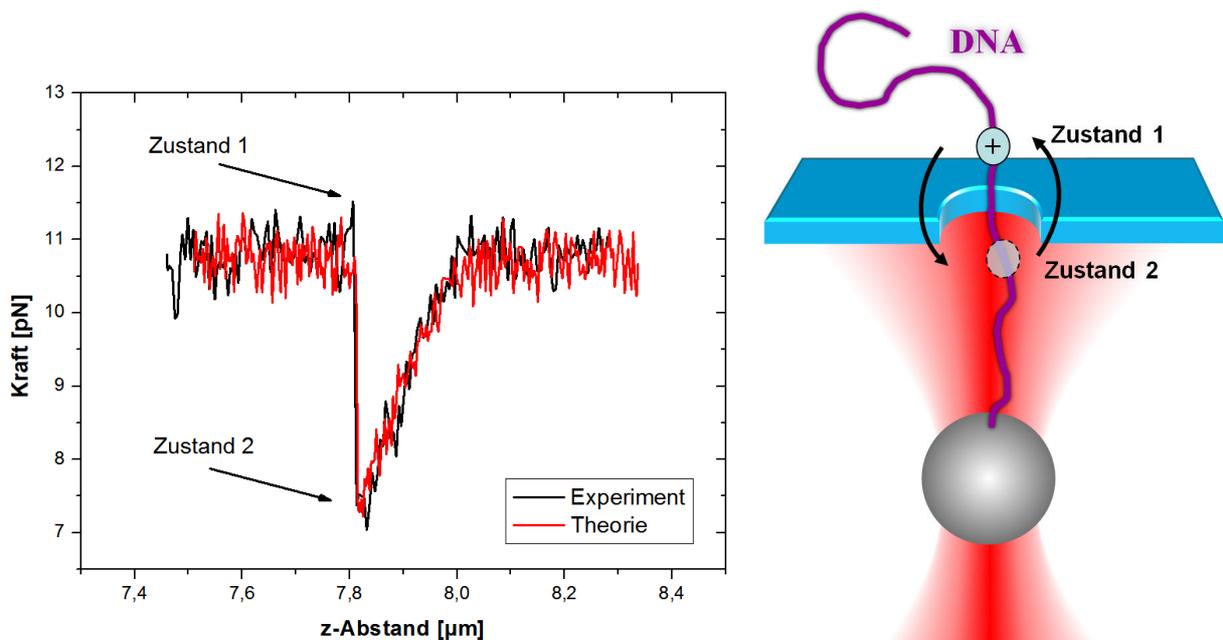


Abbildung 61: Ergebnis der theoretischen Simulation, nach welcher der Ligand abrupt von einem Zustand 1 diesseits der Pore zu einem Zustand 2 jenseits der Pore springt.

Demnach findet der Durchtritt der Liganden durch die Nanopore hochdynamisch statt: Sobald ein positiver Ligand in die Porenregion gezogen wird, so stellt dieser aufgrund seiner verringerten Ladung einen geringeren Widerstand dar als die pure DNA und springt abrupt (mitsamt des angebondenen DNA-Teilstücks) in einen zweiten Zustand jenseits der Pore. Da die DNA nun aufgrund dieses Sprungs weniger stark gespannt ist, hat dies einen abrupten Krafteinbruch zur Folge. Um nun auch das homogene Stück DNA hinter dem Liganden weiter durch die Pore zu ziehen, muss nun zunächst die ursprüngliche mechanische Spannung des DNA-Stranges wiederhergestellt werden, so dass sich der charakteristische, graduelle Kraftanstieg zurück auf den Ausgangswert ergibt.

Für einen negativ geladenen Liganden ergibt sich eine ähnliche Erklärung: Sobald der Ligand (bzw. das Ligand-Filament) in den Bereich der Pore kommt, in dem das elektrische Feld zu wirken beginnt, so stellt dieser nun aufgrund seiner erhöhten negativen Ladung einen höheren Widerstand dar als die pure DNA. Es muss also mehr Kraft aufgewendet werden um den Liganden weiter in die Pore zu ziehen, was zu dem beobachteten charakteristischen, graduellen Kraftanstieg führt. Sobald das Ende des Filaments erreicht wird, fehlt der zusätzliche Widerstand jedoch und der DNA-Strang springt abrupt soweit durch die Pore, bis die ursprüngliche mechanische Spannung für die Translokation purer DNA wiederhergestellt ist.

Wie der Vergleich zwischen theoretischen und experimentellen Messwerten in Abbildung 61 (links) und Abbildung 59 (rechts unten) zeigt, kann die theoretische Simulation sehr gut die Form, Position und das Rauschen des Kraftsignals beschreiben, sowohl für positiv als auch negativ geladene Liganden. Die effektive Ladung der Liganden ist zudem ein Fit-Parameter, so dass sich aus den Messungen damit auch zusätzliche Informationen gewinnen lassen. Im vorliegenden Fall wäre die effektive Ladung der DNA gleich $-1,23e/nm$, eines einzelnen EcoRI-Proteins gleich $+59,5e$ und eines einzelnen RecA-Monomers gleich $-14e$, jeweils angegeben in Elementarladungen e . Zudem kann die Position des Liganden auf der DNA, trotz des vergleichsweise sehr breiten Signals, sehr genau berechnet werden.

Der Grund für das Springen der Liganden wird deutlicher, wenn man die Summe aller Potentiale betrachtet, welcher der DNA-gebundene Ligand ausgesetzt ist. In Abbildung 62 ist hierfür die Form des Potentials für verschiedene z -Abstände aufgetragen, wenn der Ligand weit abseits der Pore oder in direkter Porennähe positioniert wird. Für Bereiche zu beiden Seiten, weit abseits der Pore (Bereich a und Bereich e) besitzt das Potential ein eindeutiges Minimum. Von entsprechenden, thermischen Fluktuationen abgesehen folgt der Ligand damit genau der Bewegung, die durch das Ziehen mit der Optischen Pinzette am Kügelchen (und damit an der DNA) vorgegeben wird. Nähert sich nun der Ligand von einer Seite dem elektrischen Feld in der Porenregion (Bereich b und Bereich d), so besitzt die aktuelle Ligandenposition zwar immer noch ein eindeutiges Potentialminimum, jedoch bildet sich auf der jeweils anderen Seite der Pore langsam ein zweites, jedoch zunächst höher liegendes, Potentialminimum aus, in welches der Ligand mit geringer Wahrscheinlichkeit springen kann. In der exakten Porenmitte sind diese beiden Minima schließlich gleich tief.

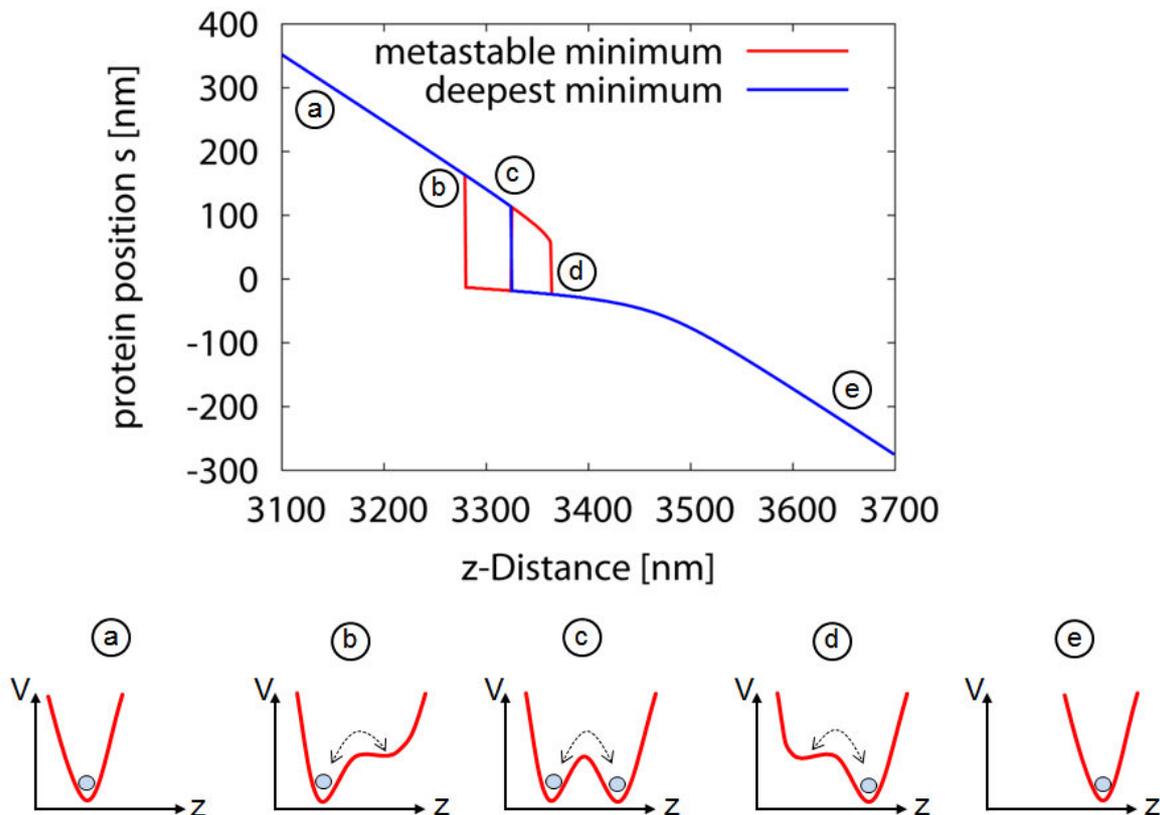


Abbildung 62: Form der Potentialsumme für verschiedene z-Abstände zur Pore. Im Bereich c befände sich der Ligand genau mittig in der Pore, es bilden sich jedoch zwei Potentialminima zu beiden Seiten der Pore aus.

Diese Form der Potentiale (und die Höhe der Barriere zwischen den beiden Minima) sagt theoretisch auch eine leichte Hysterese zwischen dem Ein- und Ausfädeln des DNA-Ligand-Komplexes voraus: Beim Ausfädeln besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit für den Weg a - d - e, während beim Wieder-Einfädeln der Weg e - b - a bevorzugt wird. Diese Hysterese konnte nach dieser Voraussage bei sehr schnellen, genauen Messungen auch experimentell bestätigt werden, was in der nebenstehenden Abbildung 63 gezeigt ist. Der Unterschied der Sprungposition zwischen Hin- und Rückweg beträgt hierbei nur etwa 20 nm.

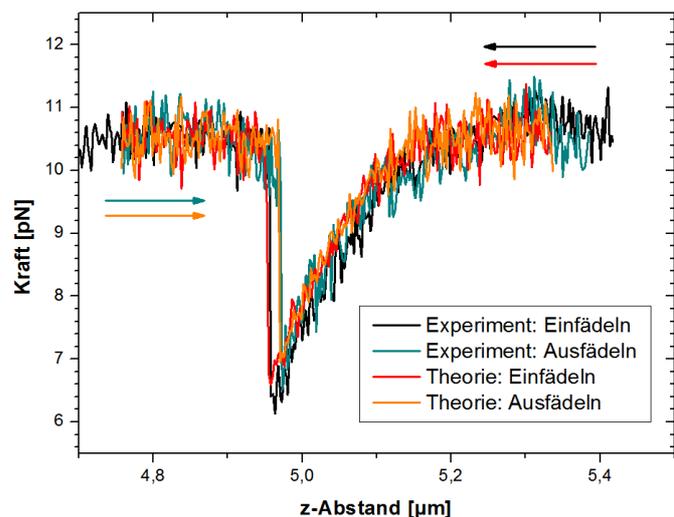


Abbildung 63: Versatz der Sprungposition des Liganden beim Ein- und Ausfädeln aus der Nanopore.

Neben der Ladung und Form des Liganden sollte die angelegte Spannung einen erheblichen Einfluss auf die Form des Kraftsignals liefern. So erzeugt eine höhere Spannung ebenso eine höhere Kraft auf die DNA, was zu einer höheren mechanischen Spannung und Längs-Ausdehnung, sowie einer stärkeren Auslenkung des Kügelchens aus der Optischen Falle führt. Insgesamt müsste sich damit aufgrund des stärkeren elektrischen Feldes sowohl die Tiefe als auch die Position des Krafteinbruchs deutlich ändern.

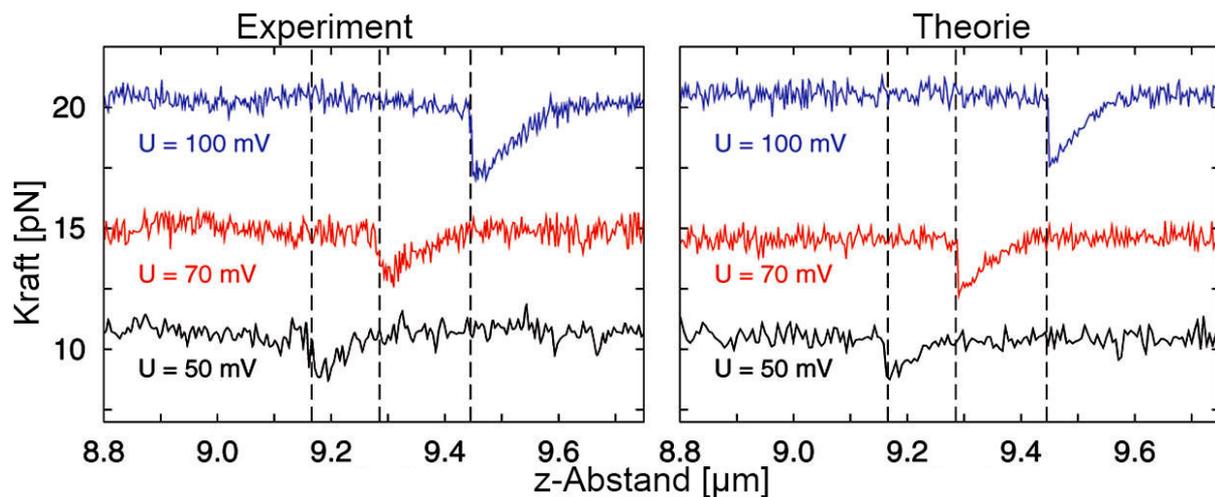


Abbildung 64: Spannungsabhängigkeit der Tiefe und Position der Krafteinbrüche eines EcoRI-Proteins.

Abbildung 64 zeigt so eine Messung, bei welcher der Krafteinbruch eines einzelnen EcoRI-Proteins für verschiedene elektrische Spannungen aufgezeichnet wurde. Wie erwartet verschiebt sich dabei die Position des Kraftabfalls beim Erhöhen der Spannung zu größeren z-Abständen. Darüber hinaus fällt der Krafteinbruch für höhere Spannungen deutlich tiefer aus. Da in den Experimenten der Ligand bei sehr hohen Spannungen jedoch teilweise von der DNA abgerissen wurde, ist hier stets ein Kompromiss zwischen Signalqualität und Schonung der Ligand-Bindung zu suchen. Sowohl das Verschieben der Sprungposition als auch die Veränderung der Tiefe der Krafteinbrüche werden von der theoretischen Simulation sehr gut reproduziert, so dass damit alle experimentell beobachteten Effekte sehr gut erklärt werden können.

Zur sehr genauen Untersuchung des Springens des Liganden durch die Pore, und zum experimentellen Ausmessen der beiden dabei theoretisch vorausgesagten Potentialminima, wurde der Ligand in einem, in Abbildung 65 gezeigten, Experiment extrem langsam durch die Porenregion bewegt und dabei für einige Zeit in festen Positionen gehalten. Die Messung erfolgte bei 100 mV und einer rund 37 nm großen Nanopore. Der Ligand wurde hierfür knapp oberhalb der Pore positioniert (Bereich a), so dass sich dieser im Zustand 1 befand. Anschließend wurde der Ligand um 10 nm weitergezogen (Bereich b), woraufhin sich dieser noch immer bevorzugt im Zustand 1 aufhielt, jedoch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (von hier 3,4%) bereits durch die Pore in den Zustand 2 springen konnte. Weitere Schritte von jeweils 10 nm bevorzugten nun mit zunehmender Wahrscheinlichkeit den zweiten Zustand,

bis im Bereich d schließlich der Ligand komplett durch die Pore gezogen wurde und vollständig im Zustand 2 verblieb. Da zwischen Bereich c1 und c2 ein Umschlagen der Aufenthaltswahrscheinlichkeit auch ohne ein Weiterbewegen des Liganden stattfand, muss davon ausgegangen werden, dass es hier vielleicht zu einem leichten Driften des Piezotisches oder der Flüssigkeitszelle kam.

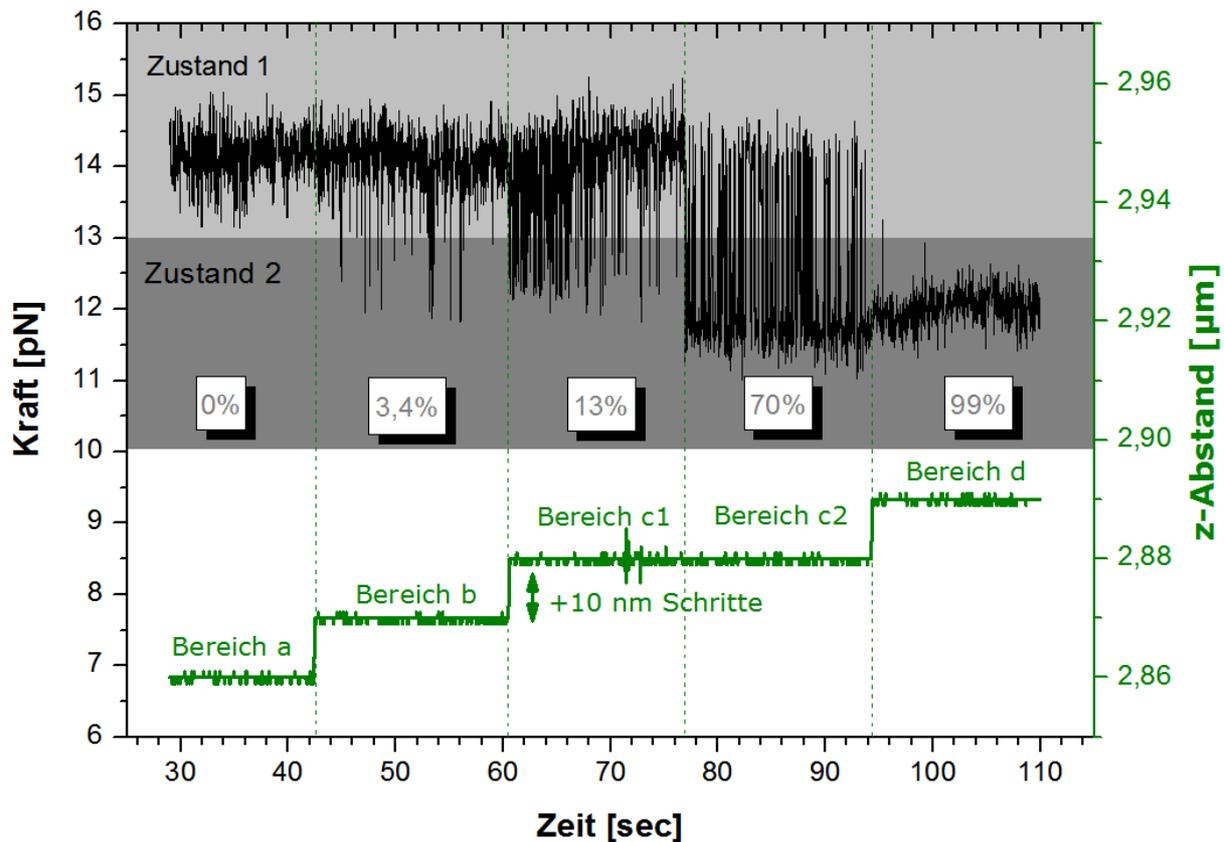


Abbildung 65: Zeitweises Fixieren des z-Abstandes an verschiedenen Positionen des Liganden beim Durchtritt durch die Nanopore. Der Ligand springt, je nach Halteposition, unterschiedlich häufig zwischen den zwei theoretisch vorausgesagten Zuständen hin und her.

Aus der Messung ist erkennbar, dass der Ligand keinesfalls in einem statischen, einmaligen Prozess die Pore durchquert, sondern – wie theoretisch vorausgesagt – hochdynamisch von einem Zustand diesseits der Pore in einen Zustand jenseits der Pore springt. Ferner kann ebenfalls ein Sprung zurück in den Ursprungszustand erfolgen, wenn der Ligand nicht extern durch die Optische Pinzette weiter aus der Pore herausgezogen wird. Je nach der exakten Position, in welche der Ligand gezogen wird, findet eine Bevorzugung für einen der beiden Zustände (und damit eines der beiden Potentialminima) statt. Die in der Abbildung angegebenen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für den Zustand 2 an den verschiedenen Positionen sind dabei aus den Histogrammen (Abbildung 66) des jeweiligen Bereichs berechnet worden, welche die Häufigkeit der gemessenen Kraftwerte angeben. Aus diesen Histogrammen lässt sich ebenfalls erkennen, wie ein langsames Weiterbewegen des Liganden zu einer immer höheren Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Zustand 2 führt. Interessanterweise

ist das Histogramm des Zustands 2 im Bereich d deutlich schmaler als das Histogramm des Zustands 1 im Bereich a. Das Krafrauschen fällt also merklich geringer aus, sobald der Ligand durch die Pore in Richtung der Optischen Falle, und damit in den Bereich niedrigerer Kräfte gesprungen ist.

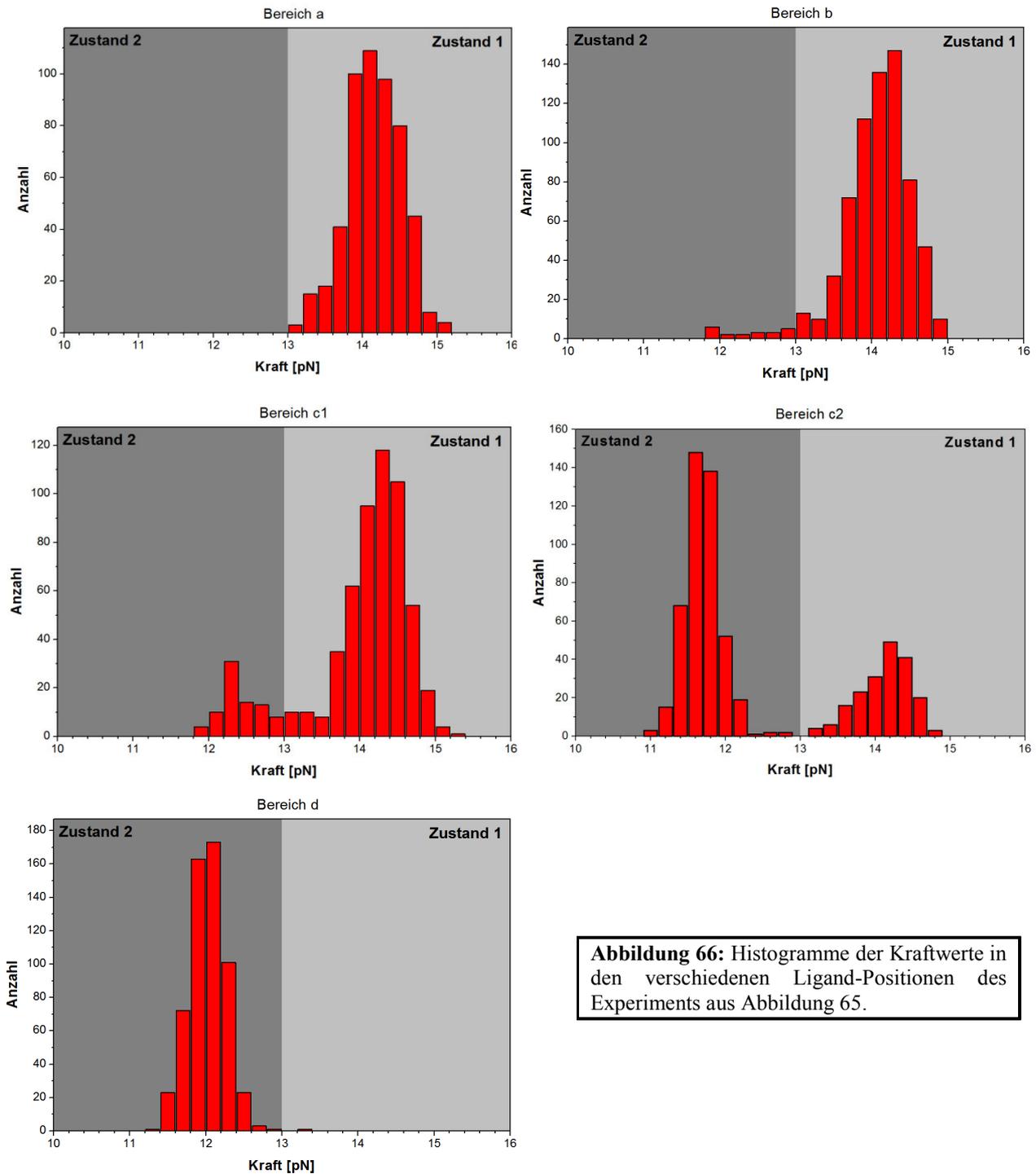


Abbildung 66: Histogramme der Kraftwerte in den verschiedenen Ligand-Positionen des Experiments aus Abbildung 65.

Abgesehen von der Position des Liganden, die extern durch die Optische Pinzette vorgegeben wird, besitzt auch die angelegte elektrische Spannung einen Einfluss auf die Form und Position der beiden Potentialminima und damit auf die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Liganden in je einem der beiden Zustände zu beiden Seiten der Pore. Abbildung 67 zeigt eine Messung, in welcher der Ligand exakt in der 50%-Position, und damit genau in der Pore gehalten wurde. Der Ligand hält sich hier also mit gleicher Wahrscheinlichkeit in je einem der beiden Zustände auf und die Potentialminima besitzen die gleiche Tiefe.

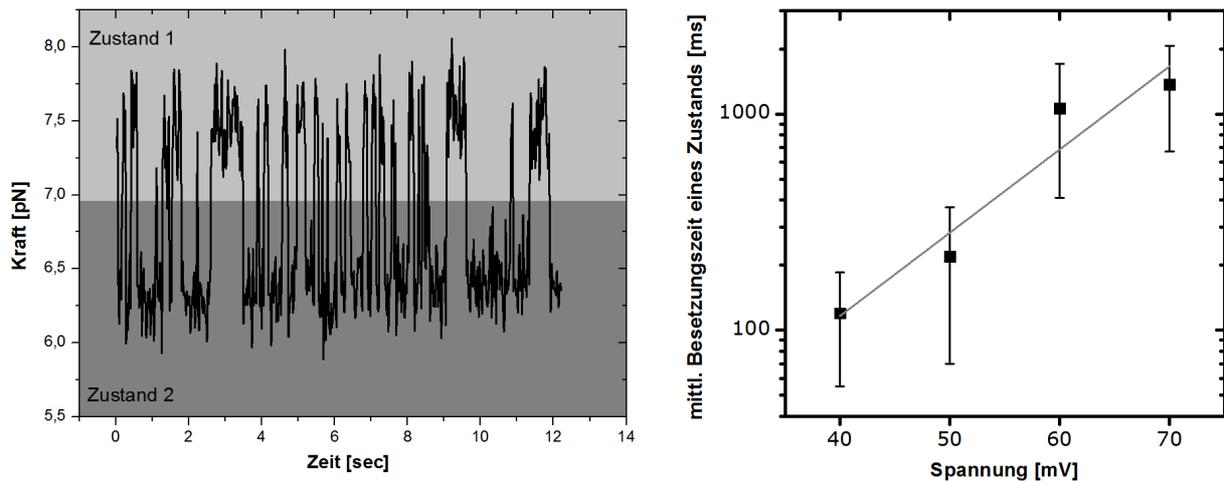


Abbildung 67: Das Fixieren des Liganden im Porenzentrum (50/50-Position) erlaubt das Bestimmen der spannungsabhängigen mittleren Besetzungszeit der beiden Zustände.

Eine Erhöhung der Spannung führt hierbei zu einer längeren mittleren Besetzungszeit eines gegebenen Zustands. Ein Umspringen ist demnach umso wahrscheinlicher, je niedriger die angelegte elektrische Spannung ausfällt, und – wie im vorigen Abschnitt gesehen – je dichter der Ligand am Porenzentrum positioniert ist.

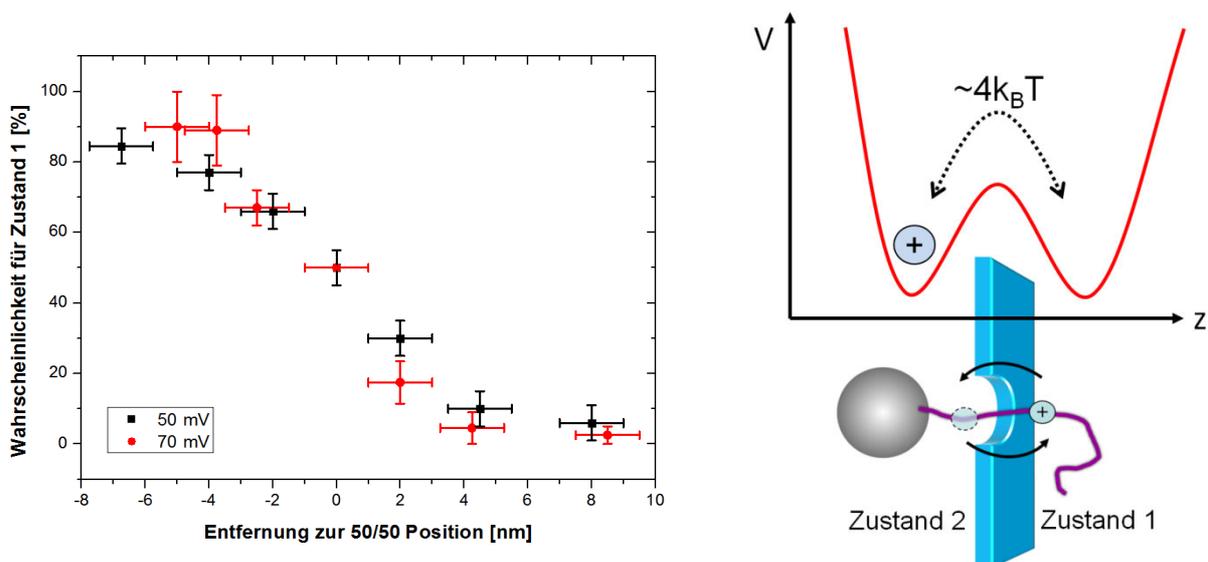


Abbildung 68: Distanz- und Spannungs-Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustands 1.

Wie noch einmal in Abbildung 68 gezeigt, können schon sehr wenige Nanometer Abstand zur Porenmitte das Verhältnis der beiden Zustände erheblich verschieben. Modelliert man zudem die mittlere Besetzungszeit τ eines Zustands entsprechend der Kramers-Theorie mit $\tau = \tau_0 \exp(\Delta E / k_B T)$, so berechnet sich aus diesen Ergebnissen die Höhe der Energiebarriere ΔE zwischen den beiden Potentialminima bei typischerweise angelegten 50 mV zu rund dem Vierfachen der thermischen Energie ($4k_B T$) mit dem Vorfaktor $\tau_0 = 4\text{ms}$.

Zusammenfassend haben diese Nanoporen-Experimente mit Ligand-DNA-Komplexen erstmalig gezeigt, dass der Nachweis und die genaue Lokalisation von Liganden mit hoher Präzision möglich sind. Auch Aussagen über die effektive Ladung oder die Potentiallandschaft in der Nanoporenregion können mit Hilfe der entwickelten Theorie getroffen werden und die Ergebnisse decken sich sehr gut mit den experimentellen Messwerten. Die Translokation im Nanometermaßstab erfolgt dabei jedoch keinesfalls so statisch und geordnet wie man es aus makroskopischen Überlegungen zunächst annehmen würde. Thermische Energie, Brownsche Molekularbewegung und kleinste Positionsveränderungen führen zu deutlich messbaren Unterschieden im hochdynamischen, stochastisch verteilten Translokationsverhalten. Gerade im Hinblick auf eine Sequenzierung der DNA mit Hilfe von Nanoporen, müssen diese Fluktuationen und dynamischen Prozesse stets beachtet und z.B. von einer Auswertungssoftware statistisch herausgerechnet werden. Dies führt zu einem weit höheren Aufwand, nicht nur bei der experimentellen Messtechnik sondern auch bei der Auswertung der gewonnenen Daten. Gleichzeitig könnte diese besondere Sensitivität der Messungen auf kleinste Störgrößen jedoch zukünftig auch zu einem Vorteil verwandelt werden, um die zeitliche und räumliche Auflösung dieser Experimente z.B. durch statistische Auswertungsverfahren stark zu erhöhen.

Prinzipiell sind die Nanoporen-Experimente, trotz sehr aufschlussreicher Ergebnisse, noch immer mit starken Einschränkungen behaftet, so dass neue Materialien und Techniken benötigt werden. Die Membranen müssen dünner, die Poren kleiner und die Oberflächen leichter zu modifizieren und funktionalisieren sein, um so z.B. Salzkonzentrationen und pH-Werte freier wählen zu können, Klebe-Effekte der DNA an den Oberflächen zu verhindern und Translokationen (auch anderer Stoffe als DNA, wie z.B. von Proteinen) gezielter steuern und viel genauer messen zu können.

Der weitere Verlauf dieser Arbeit beschäftigt sich deswegen mit Experimenten an neuartigen Materialien, die zur Herstellung von zukünftigen Nanoporen-Sensoren dienen könnten.

4.1.4. Graphen-Poren

Graphen ist das dünnste bekannte Material und sollte sich aufgrund dessen am besten für die Nanoporesequenzierung eignen. Zwar ragt das elektrische Feld zu beiden Seiten der Pore aus dem eigentlichen Porenvolumen heraus, doch selbst dann sollten sich nur sehr wenige Basenpaare gleichzeitig im Einflussbereich des Feldes befinden und ein Signal generieren.

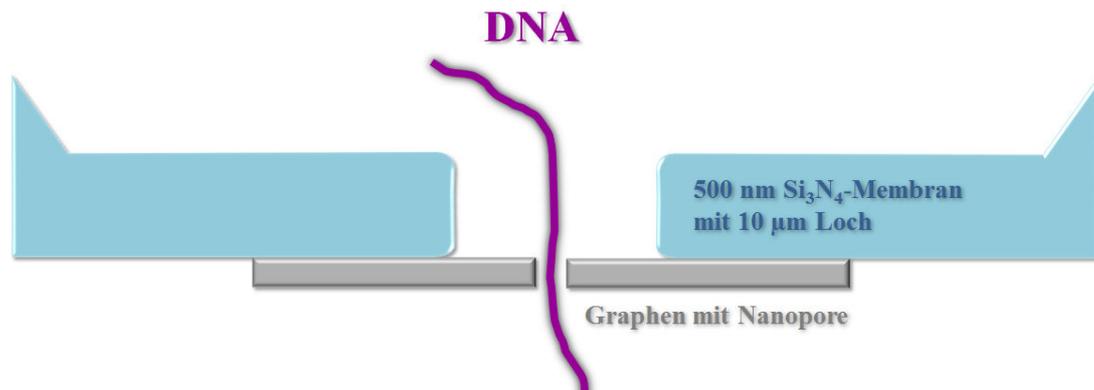


Abbildung 69: Prinzip der Versuche mit Graphen: Die Graphen-Flocke wird auf einem dickeren Si₃N₄-Substrat aufgebracht, welches ein Mikrometer-Loch enthält, und ist dann dort freistehend.

Das Ziel der ersten Versuche mit Graphen sollte demnach zunächst darin bestehen, wie in Abbildung 69 dargestellt, eine freistehende Graphen-Membran auf einem Loch in einem Siliziumnitrid-Substrat zu immobilisieren. Das Loch muss hierfür mehrere Mikrometer groß sein, damit sich diesem später mit dem Kügelchen der Optischen Pinzette genähert werden kann, ohne dass die Beugungseffekte des Lochrandes zu unerwünschten Störungen im Kraftsignal führen können. Die Substrat-Membran muss zudem ausreichend stabil sein um dieses Loch zu beherbergen, ohne sich dabei zu verbiegen, und wurde deswegen mit einer Dicke von 500 nm verwendet. Die per Wedging-Transfer (vgl. Kapitel 3.1.3.) aufgebrachte Graphen-Lage muss des Weiteren möglichst weit über die Ränder dieses Loches hinausragen, da nur so ein wasserdichter (und stromdichter) Kontakt hergestellt werden kann. Die elektrische Isolation ist hierbei essenziell, denn für eine erfolgreiche DNA-Translokation darf das elektrische Feld nur innerhalb der später hineingebohrten Nanopore abfallen und nicht in etwaig undichten Randbereichen zwischen Graphen und dem Substrat.

Die Ausbeute bei der Herstellung von ausreichend großen Graphen-Monolagen per Exfoliation ist sehr gering und die Prozedur sehr zeitaufwendig, jedoch zugleich unabdingbar, da andere Methoden bisher noch keine defektfreien Monolagen erzeugen können. Um dennoch regelmäßige Experimente durchführen zu können, wurden deshalb zum Teil auch Graphen-Multilagen mit unterschiedlicher Schichtdicke verwendet. Abbildung 70 zeigt einige von diesen Graphenlagen, die erfolgreich auf das Loch der Siliziumnitrid-Membran transferiert werden konnten. Die Bandbreite reicht hier von sehr dicken Lagen (links) über wenige Einfach-Lagen (Mitte) bis hin zu (sehr seltenen) Monolagen (rechts) die über das Loch gelegt werden können.

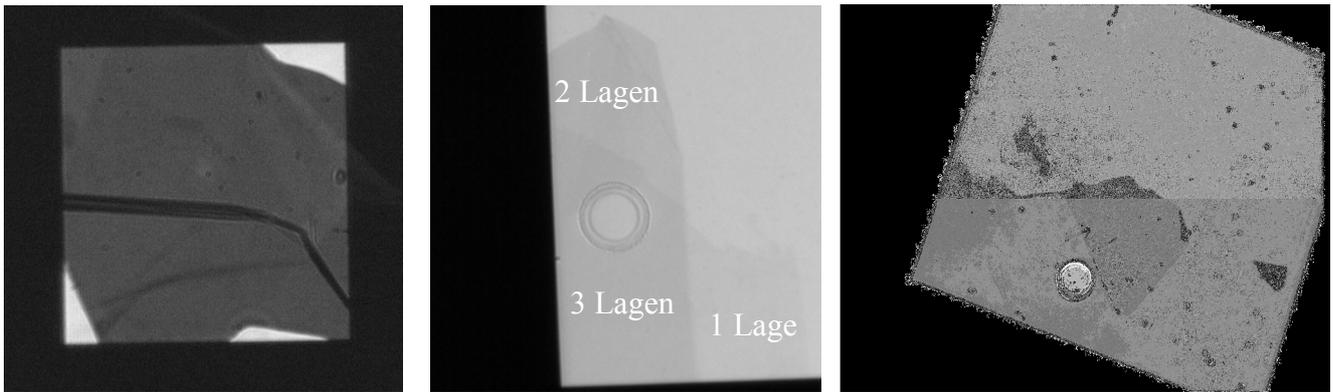


Abbildung 70: Mehrere erfolgreich präparierte Graphenflocken unterschiedlicher Schichtdicke.

Die sehr gute Sichtbarkeit der Graphenflocken im Durchlichtmikroskop, selbst von Monolagen mit einer Dicke von weniger als einem Nanometer, bestätigt hier noch einmal die theoretische Voraussage, dass eine Monolage rund 2,3% des transmittierenden Lichts absorbiert. Genau aus diesem Grund bestand der erste Test nach einem erfolgreichen Transfer darin, zu klären ob das Graphen die für die Optische Pinzette benötigten hohen Laserleistungen überhaupt überstehen würde. Eine direkte Bestrahlung dickerer Graphen-Lagen zeigte hier sehr eindeutig, dass diese die Energie absorbieren, sich aufheizen und im Bereich der Bestrahlung kaputtgehen. So ließen sich große Löcher per Laser in das Graphen brennen, was in Abbildung 71 gezeigt ist. Auch Versuche mit dünneren Schichten deuteten bereits an, dass die Experimente im absoluten Grenzbereich erfolgen müssten: Erst ab einer Graphendicke von ein bis zwei Lagen und einer Reduktion der Laserleistung auf etwa 400 mW (bei welcher die Optische Falle gerade noch stark genug ist um wirkende Kräfte bis zu 15 pN zu messen) konnte sich der Membran genügend weit angenähert werden, um eventuelle DNA-Experimente durchzuführen ohne die Graphenschicht dabei zu beschädigen. Die Experimente müssten also stets mit äußerster Vorsicht durchgeführt werden, wären aber dennoch theoretisch möglich.

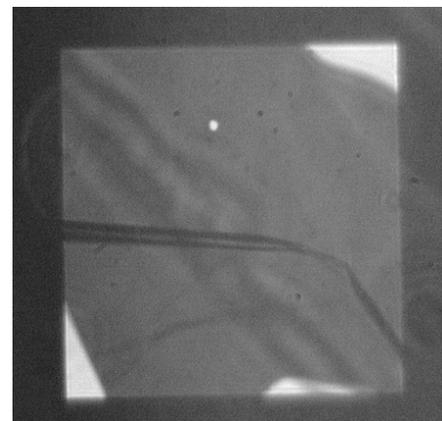


Abbildung 71: Bestrahlung mit dem Laser brennt Löcher in das Graphen.

Für die folgenden Experimente musste deswegen – trotz des hohen Zeitaufwands – jeweils eine Graphenmono- oder Doppel-Lage präpariert werden. Unter anderem wurde dabei nach einer Möglichkeit gesucht, auch dickere Lagen gezielt weiter auszdünnen und damit ausreichend dünne Lagen herstellen zu können. Abbildung 72 zeigt, wie eine Behandlung mit Sauerstoff-Plasma für mehrere Minuten zu einem immer weiteren Ausdünnen der Multi-Lagen führt. Diese Methode könnte also dazu dienen, eine höhere Ausbeute bei der Präparation per Exfoliation zu erreichen. Hier zeigte sich im Anschluss an das Ausdünnen jedoch das Problem, dass die mit Plasma behandelten Graphen-Flocken nicht mehr per Wedging-Transfer vom Siliziumnitrid-Substrat abgelöst werden konnten, sondern zu stark

anhafteten. In Zukunft könnte dieses Problem vielleicht einmal durch eine Oberflächenbeschichtung des Substrats oder die Wahl eines anderen Untergrunds umgangen werden, für die hier gezeigten Experimente wurde jedoch aus Zeitgründen wieder auf die herkömmliche Präparation zurückgegriffen (vgl. Kapitel 3.1.3.).

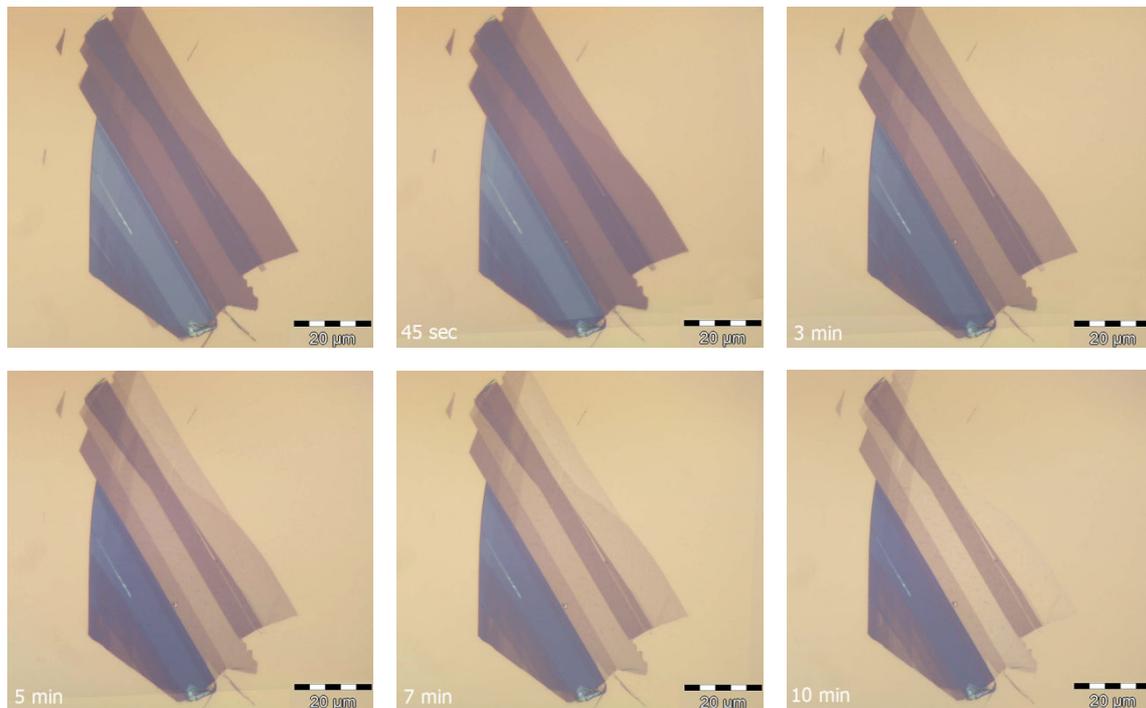


Abbildung 72: Durch eine Behandlung mit Sauerstoff-Plasma können dickere Graphen-Lagen nach und nach langsam ausgedünnt werden.

Nach einer erfolgreichen Präparation einer Graphen-Monolage auf dem Loch in der Siliziumnitrid-Membran sollte zunächst stets eine Messung des elektrischen Widerstands erfolgen. So kann gewährleistet werden, dass das Graphen das Loch ausreichend dicht versiegelt, was eine Voraussetzung für die DNA-Translokation ist. Erst danach kann die Probe wieder aus der Flüssigkeitszelle ausgebaut werden, um im Helium-Ionen-Mikroskop eine Nanopore in das Graphen zu bohren.

Abbildung 73 zeigt die Strom-Spannungs-Kennlinie einer Graphen-Monolage vor (links) und nach (rechts) dem Bohren einer etwa 20 nm großen Nanopore. Ohne Pore versiegelt das Graphen das Loch in ausreichend hohem Maß und der elektrische Widerstand bei einer Salzkonzentration von 20 mM KCl beträgt hier rund 29 G Ω , sie eignet sich also sehr gut für ein Translokationsexperiment. Nach dem Bohren der Pore wurde die Kennlinie bei einer Salzkonzentration von 1M KCl aufgenommen, um eventuelle Oberflächenladungseffekte auszuschließen, und es zeigt sich (abgesehen von der höheren Leitfähigkeit aufgrund der Pufferlösung) eine deutliche Abnahme des elektrischen Widerstands aufgrund der eingebrachten Nanopore. Die leichte Abweichung bei hohen Spannungen rührt vermutlich

dennoch von restlichen Oberflächenladungen her, oder aber hohe Spannungen beeinflussen die Graphen-Membran an sich. So wurden bei z.B. bei sehr hohen angelegten Spannungen (um die 1V) – besonders bei Multi-Lagen – Interferenzeffekte in der Graphenschicht beobachtet. Es kann damit vermutet werden, dass hohe Spannungen die Graphenmembran noch dichter auf das Siliziumnitrid-Substrat ziehen (oder es abstoßen) und so ein asymmetrisches Strom-Spannungs-Verhalten auftreten kann. Für Translokations-Experimente dagegen reichen im Allgemeinen auch niedrigere Spannungen, so dass diese Effekte keine Rolle spielen sollten.

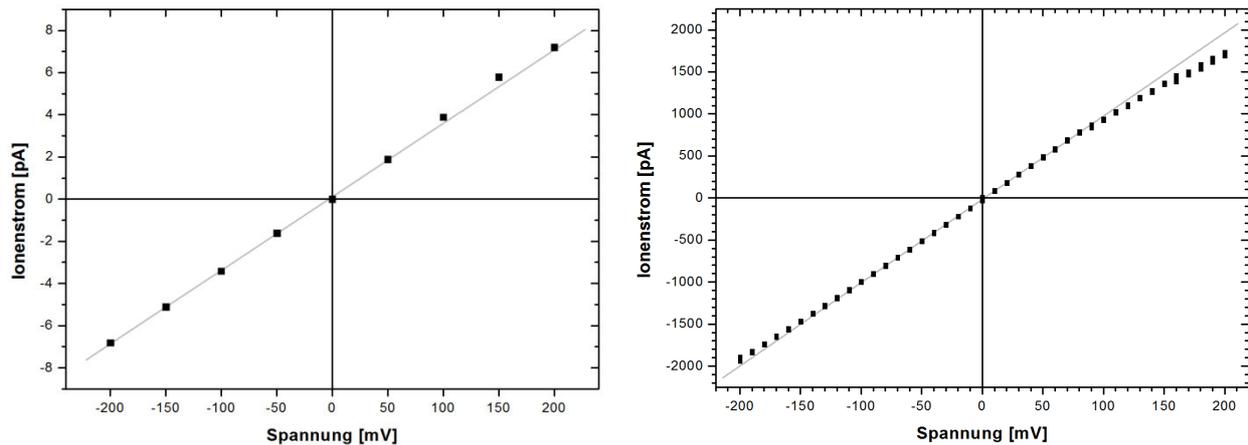


Abbildung 73: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Graphen-Monolage vor (links) und nach (rechts) dem Einbringen einer 20 nm großen Nanopore.

Freie Translokation

Mit einer gebohrten Nanopore in der Graphen-Membran kann nun getestet werden, ob – trotz der nur einatomigen Dicke – das elektrische Feld die nötige räumliche Ausdehnung besitzt um DNA durch die Nanopore ziehen zu können. Hierfür wurde, wie bei der freien Translokation in Siliziumnitrid-Nanoporen, freie λ -DNA in ein Flüssigkeitsreservoir gegeben,

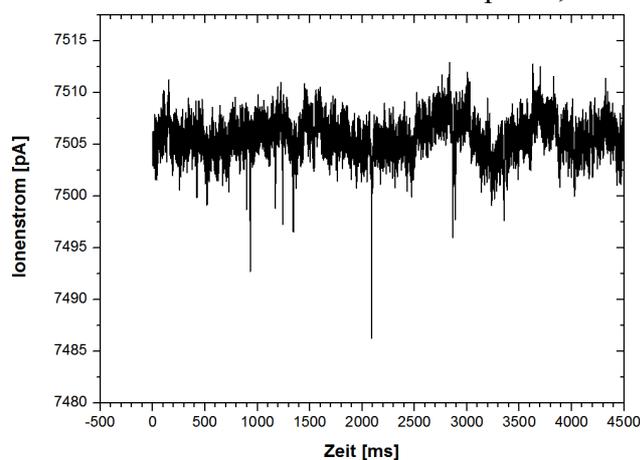


Abbildung 74: Freie DNA-Translokation durch eine 50 nm große Graphen-Pore bei 100 mV und 1M KCl.

eine Spannung angelegt und der Ionenstrom aufgezeichnet um die Translokationsereignisse detektieren zu können. Es zeigten sich viel weniger Ereignisse als bei den Experimenten mit Siliziumnitrid-Poren. Vermutlich klebte die DNA also verstärkt am Graphen, so dass es nur zu vereinzelt Translokationen kommen konnte, und die geringe Membrandicke führte zu einem sehr eingegrenzten Wirkungsbereich des elektrischen Feldes. In Abbildung 74 sind solche Translokationsereignisse an einer rund 50 nm großen Pore gezeigt, da diese an größeren Poren viel häufiger auftraten.

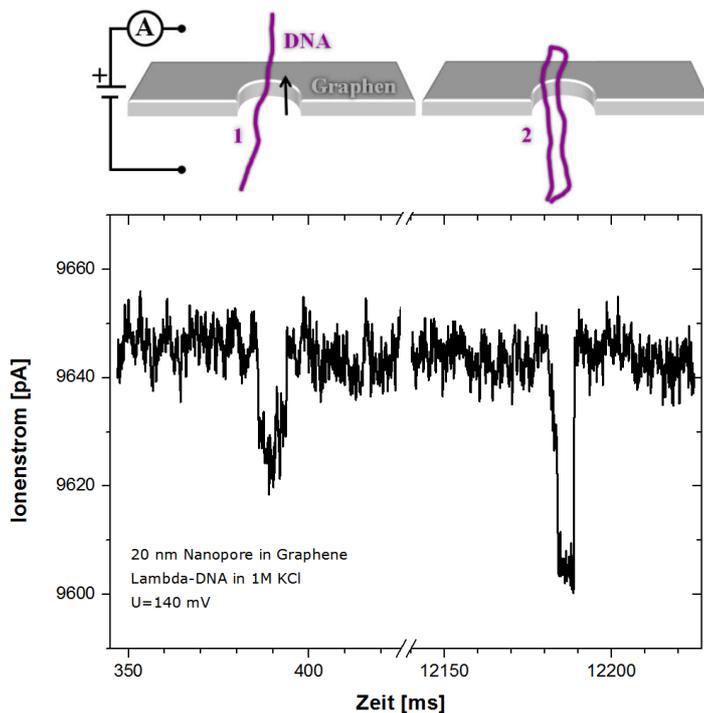


Abbildung 75: Zwei DNA-Translokationen durch eine Graphen-Nanopore mit jeweils unterschiedlichen Konformationen des DNA-Stranges.

Analog zu den Versuchen an Siliziumnitrid-Nanoporen sind auch hier die Stromeinbrüche deutlicher ausgeprägt, wenn die Pore kleiner ausfällt und eine genauere Betrachtung einzelner Translokationsereignisse lässt ebenfalls einen Aufschluss über die Konformation der DNA zu. In Abbildung 75 sind zwei Ereignisse von einer 20 nm großen Pore bei 140 mV und 1M KCl gezeigt. Das erste Ereignis ist mit einer Translokationszeit von 10 ms und einem Einbruch der Leitfähigkeit von 0,2 nS ziemlich genau doppelt so lang und halb so tief wie das zweite Ereignis (10 ms und 0,4 nS). Im ersten Fall ist die DNA damit vermutlich in gestrecktem Zustand und im zweiten Fall als Plasmid durch die Pore gezogen worden.

Insgesamt konnten diese Experimente damit zeigen, dass die DNA-Translokation auch durch Graphen-Nanoporen prinzipiell möglich ist und dabei analoge Ergebnisse zu den Versuchen mit Siliziumnitrid-Nanoporen an viel dickeren Membranen liefert. Auch hier ergeben sich deutlich ausgeprägte Muster im Ionenstromsignal während einer Translokation, die zudem die unterschiedlichen DNA-Konformationen erkennen lassen. Auch eine Kombination mit der Optischen Pinzette im Zuge einer kontrollierten Translokation sollte deswegen prinzipiell möglich sein.

Kontrollierte Translokation

Für die kontrollierte Translokation wurde, wie bei den Siliziumnitrid-Poren, ein DNA-Strang an einem Mikrokügelchen immobilisiert und mit Hilfe der Optischen Pinzette in die Nähe der Graphen-Nanopore manövriert. Hierbei zeigte sich jedoch ein völlig unerwarteter und stets reproduzierbarer Effekt: Sobald das Kügelchen unterhalb der freistehenden Graphen-Membran angekommen war, begann es in der Optischen Falle zu zappeln und seine Oberfläche zeigte eine deutliche Blasenbildung die es schließlich zum irreversiblen Verschrumpeln brachte. Wurde das Mikrokügelchen dagegen unterhalb des Siliziumnitrid-Substrats oder unterhalb der Region bewegt, in welcher das Graphen auf dem Substrat aufliegt (und damit nicht freistehend ist), trat dieser Effekt nicht auf. Abbildung 76 verdeutlicht dies, wobei sich das Kügelchen stets im Laserfokus befindet und die Graphen-Monolage als schwacher Schatten über dem Loch in der Siliziumnitrid-Membran erkennbar ist. Das Kügelchen wird mit der Optischen Pinzette unterhalb der Membranen (im Bild von links nach rechts) in den Bereich des freistehenden Graphens geschoben, woraufhin es seine Form unwiederbringlich verändert und für Kraftmessungen deswegen nicht mehr verwendet werden kann.

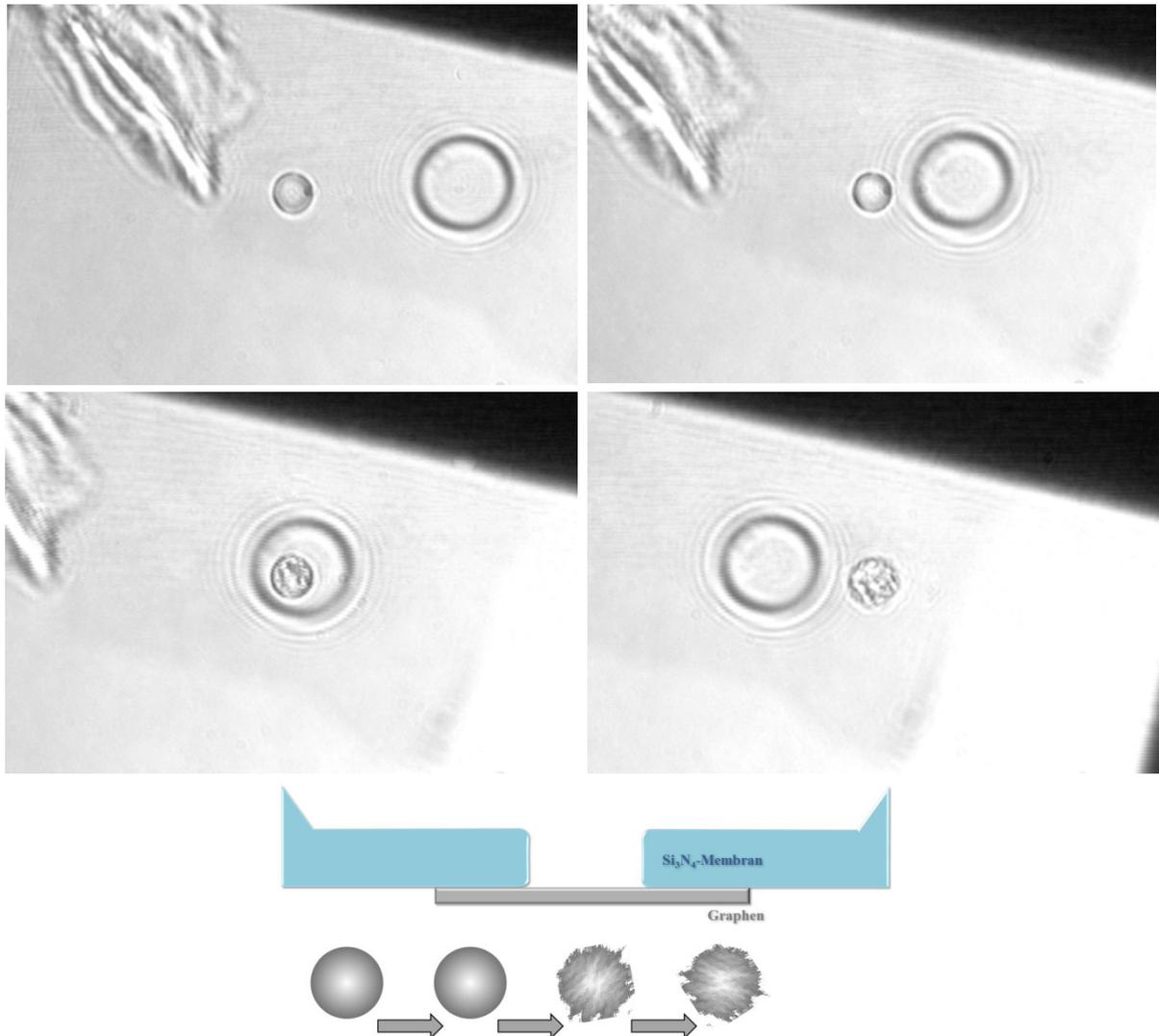


Abbildung 76: Das Polysterol-Mikrokügelchen in der Optischen Falle wird zerstört, sobald es in den Bereich unterhalb des freistehenden Graphens bewegt wird.

Genauere Untersuchungen ergaben dabei eine eindeutige Abhängigkeit dieses Effekts von der verwendeten Laserleistung: je geringer diese gewählt wurde, desto näher konnte man sich mit dem Kügelchen der Graphen-Membran annähern.

Laserleistung	z-Abstand beim Aufschmelzen
800 mW	4 μm
700 mW	3 μm
500 mW	2 μm

Aufgrund des Zappelns des Kügelchens, der Abhängigkeit von der Laserleistung und der Formveränderung, die einem Aufschmelzen gleicht, muss von einem Aufheizen des Kügelchens durch den Laser ausgegangen werden. In welcher Form dies geschieht, und warum nur unterhalb der freistehenden Graphen-Membran, ist jedoch nach wie vor völlig

ungeklärt. Ein Entfernen des Infrarot-Filters vor der Kamera im Mikroskop der Optischen Pinzette ließ keine zusätzlichen Strahlenquellen (z.B. transversale Moden am Rand des Lochs), kein Streulicht und keine aufgeheizten Stellen erkennen, außer dem direkten Laserfokus, dem das Kügelchen jedoch auch bei anderen Experimenten zerstörungsfrei ausgesetzt ist. Die Aufheizung scheint zudem sehr lokal im Kügelchen selbst stattzufinden, da weder Konvektionsströmungen noch Luftblasen in der umgebenden Pufferlösung beobachtet werden konnten.

Da Polyesterol bereits ab etwa 70°C langsam in den amorphen Zustand übergeht und auch die Biotin-Streptavidin-Bindung der immobilisierten DNA in diesem Temperaturbereich aufzubrechen beginnt, ist eine kontrollierte Translokation nur sehr schwer möglich, sollte es sich tatsächlich um thermische, lokale Aufheizungen des Kügelchens handeln. Zwar ist ein erfolgreiches Experiment theoretisch noch immer denkbar, wenn ein großer Abstand zur Membran und eine geringe Laserleistung eingehalten werden, doch ist dies aufgrund der vielen glücklichen Zufälle die dafür zeitgleich zusammentreffen müssen (defekt- und verschmutzungsfreie Monolage des Graphens; DNA-Strang maximaler Länge; Pore der richtigen Größe etc.), bisher leider noch nicht gelungen. Lokale Temperaturmessungen – wie z.B. über temperatursensitive Farbstoffe oder Berechnungen aus dem temperaturabhängigen Zappeln des Kügelchens in der Optischen Falle – könnten hier in Zukunft mehr Aufschluss bringen um den Ursprung des Aufschmelzens weiter zu ergründen.

Trotz dieser Schwierigkeiten wäre Graphen das ideale Material für eine mögliche Nanoporen-Sequenzierung und verwandte sensorische Anwendungen. Es erlaubt nicht nur die Herstellung der dünnsten denkbaren Membran und damit eine hohe Auflösung in den Messsignalen, sondern eröffnet aufgrund seiner mechanischen Robustheit und der besonderen elektrischen Eigenschaften einen völlig neuen Kosmos an möglichen Experimenten. Graphen ist – wie für DNA-Translokationen unabdingbar – senkrecht zu seiner Schichtebene stark hydrophob und elektrisch isolierend, gleichzeitig jedoch in der Ebene selbst hoch leitfähig. Wie in der Illustration in Abbildung 77 gezeigt [146], könnte so z.B. auch der transversale Tunnelstrom als weitere Messgröße bei der Sequenzierung von DNA genutzt werden.

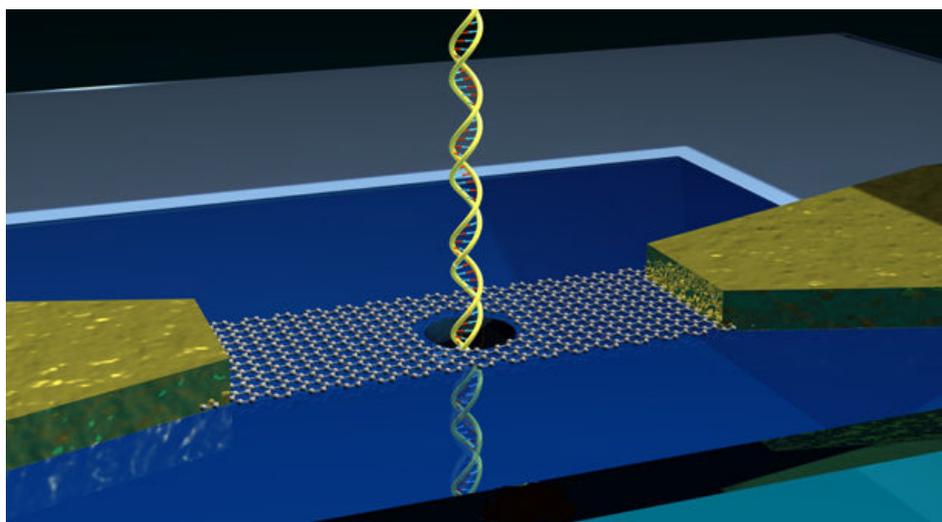


Abbildung 77: Elektrisch kontaktiertes Graphen könnte einmal zur DNA-Sequenzierung dienen, indem der transversale Tunnelstrom gemessen wird. [146]

4.1.5. Carbon-Nanomembran-Poren

Zwar sind Carbon-Nanomembranen mit 1-3 nm um einiges dicker als eine Graphen-Monolage, doch können auch sie – durch ein Aushärten bei hohen Temperaturen – mit vergleichbaren mechanischen und elektrischen Eigenschaften versehen werden. Aufgrund der unvorhergesehenen Probleme bei der kontrollierten Translokation durch Graphen-Membranen sollten deswegen auch Carbon-Nanomembranen als Alternative für eine möglichst dünne Nanoporen-Membran verwendet werden.

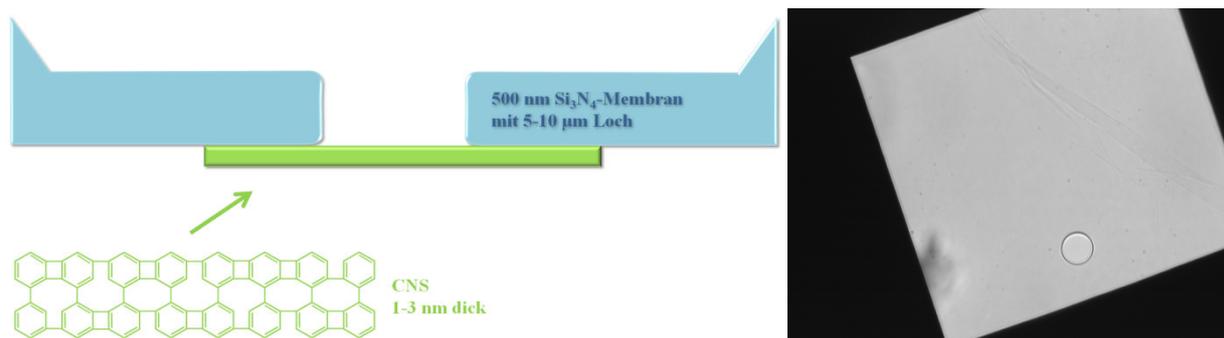


Abbildung 78: Freistehendes Carbon-Nanosheet (CNS) auf einem Mikrometer-Loch im Si_3N_4 -Substrat.

Hierfür wurden die von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Armin Götzhäuser hergestellten Membranen, analog zu den Präparationen mit Graphen, auf ein (mehrere Mikrometer großes) Loch in einer 500 nm dicken Siliziumnitrid-Membran transferiert. Abbildung 78 zeigt diesen Aufbau schematisch, während im Durchlicht-Mikroskop das Membranfenster mit Loch sehr gut zu erkennen ist. Der Teil der Carbon-Nanomembran, der sich freistehend über dem Loch befindet, ist dagegen im Unterschied zu Graphen nahezu unsichtbar. Erst weiter rechts im Bild, in einem Bereich in dem es zu einer Faltenbildung dieser Carbon-Nanomembranen (auch CNS: „Carbon-Nanosheets“) kam, kann man diese anhand eines schwachen Kontrasts erahnen.

Begonnen wurden die Versuche mit Membranen die aus Stickstoff-markierten Bi-phenyl-Thiolen (NBPT) hergestellt wurden (vgl. Abbildung 33). Hier zeigten erste Widerstandsmessungen nach dem erfolgreichen Transfer – welche die notwendige Dichtigkeit für Translokationsversuche sicherstellen sollten – dass diese Membranen leider einen sehr geringen elektrischen Widerstand aufweisen. Wie in Abbildung 79 gezeigt ist, wird der Ionenstrom (im Vergleich zu einem Mikrometerloch ganz ohne abdeckende Membran) nur rund um den Faktor 2 reduziert. Dies ist so weit von einer benötigten Versiegelung im Giga-Ohm-Bereich entfernt, dass diese Membranen für Translokations-Experimente überhaupt nicht verwendet werden können. Zwar bieten Carbon-Nanosheets den Vorteil, dass sie frei aufeinander gestapelt werden können, doch auch mehrere Sheets übereinander erzeugten keine signifikante Zunahme des elektrischen Widerstands. Als Grund für diese gute Leitfähigkeit senkrecht zur Schichtebene können hierbei vermutlich Defekte, Löcher und eine unzureichende Quervernetzung der aromatischen Biomoleküle angenommen werden.

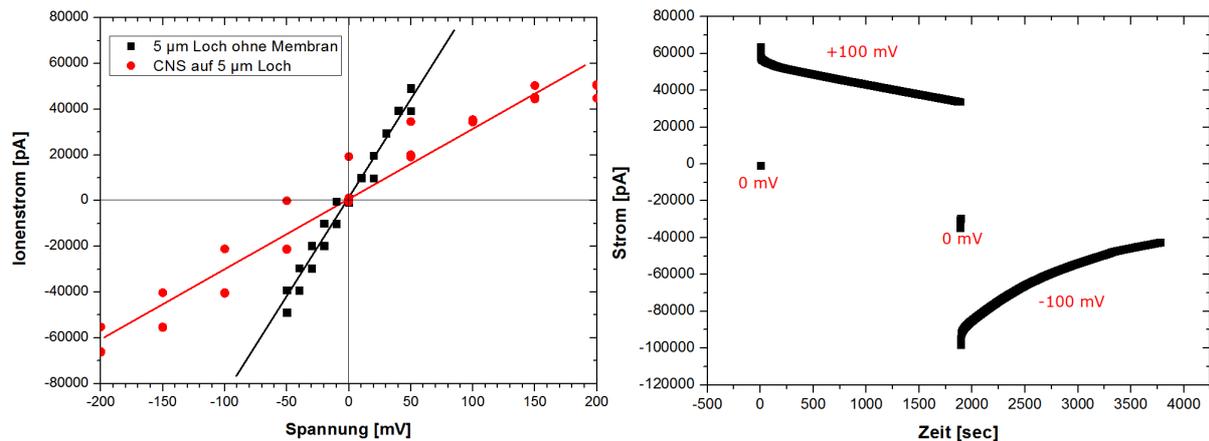


Abbildung 79: Strom-Spannungs-Kennlinie des freien und mit einem NBPT-Carbon-Nanosheet abgedeckten Mikrometer-Lochs (links). Die Streuung der Punkte ergibt sich aus einem starken zeitlichen Driften des Ionenstroms (rechts) auch ohne Spannungsänderungen.

Auch ein weiterer Effekt ist bei den Strommessungen beobachtet worden und in der Abbildung zu erkennen: Wird die Spannung erhöht und wieder verringert, so liegen die aufeinanderfolgenden Messpunkte für ein und dieselbe Spannung nicht mehr übereinander. Der Ionenstrom driftet mit der Zeit (wie in der Abbildung rechts dargestellt), auch ohne Spannungsänderung, dem Nullpunkt entgegen. Vermutlich findet also – ausgelöst durch die angelegte Spannung – ein unerwünschter, sukzessiver Einbau von weiteren Ladungen in die Carbon-Nanomembran statt, was den Ionenstrom verändert und ein weiteres Argument für eine sehr löchrige Membran darstellt.

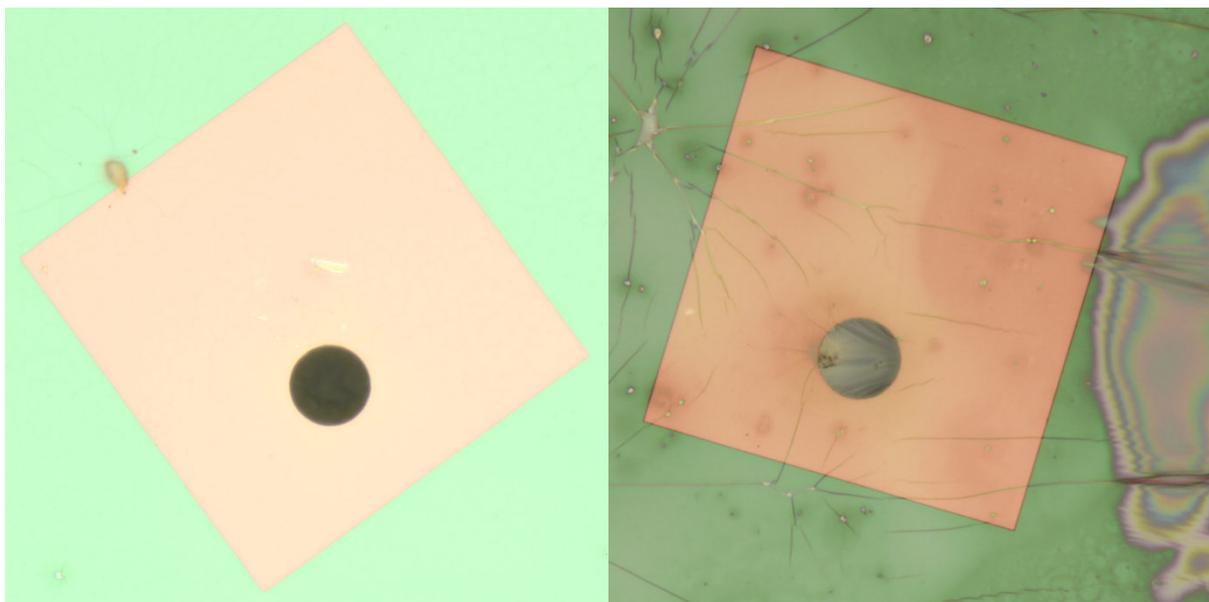


Abbildung 80: Etwa 1 nm dünnes NBPT-Carbon-Nanosheet (links) und „missglücktes“ etwa 3 nm dickes BPT-Carbon-Nanosheet (rechts), welches im Auflichtmikroskop viel deutlicher zu erkennen ist.

Andere verwendete Präkursor-Moleküle bei der Carbon-Nanosheet-Herstellung, wie z.B. BPT anstatt NBPT (vgl. Abbildung 25) zeigten in den Messungen des elektrischen Widerstands ein ähnliches Verhalten. Erst durch einen glücklichen „Unfall“ bei der Präparation wurde eine Charge von Membranen hergestellt, die sich für die hier vorliegenden Anforderungen viel besser eignen. Bereits im Auflichtmikroskop zeigte sich, wie in Abbildung 80 dargestellt, dass diese Membranen etwas dicker ausgefallen waren als alle davor hergestellten. Genauere Messungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Götzhäuser bestätigten schließlich eine Dicke von etwa 3 nm. Vermutlich sind hier bereits vor der Quervernetzung durch Elektronenbeschuss bereits mehrere aromatische Molekül-Lagen übereinander gestapelt gewesen, die im nächsten Arbeitsschritt dann auch senkrecht zur Ebene miteinander vernetzt wurden und eine viel dichtere Membran erzeugten.

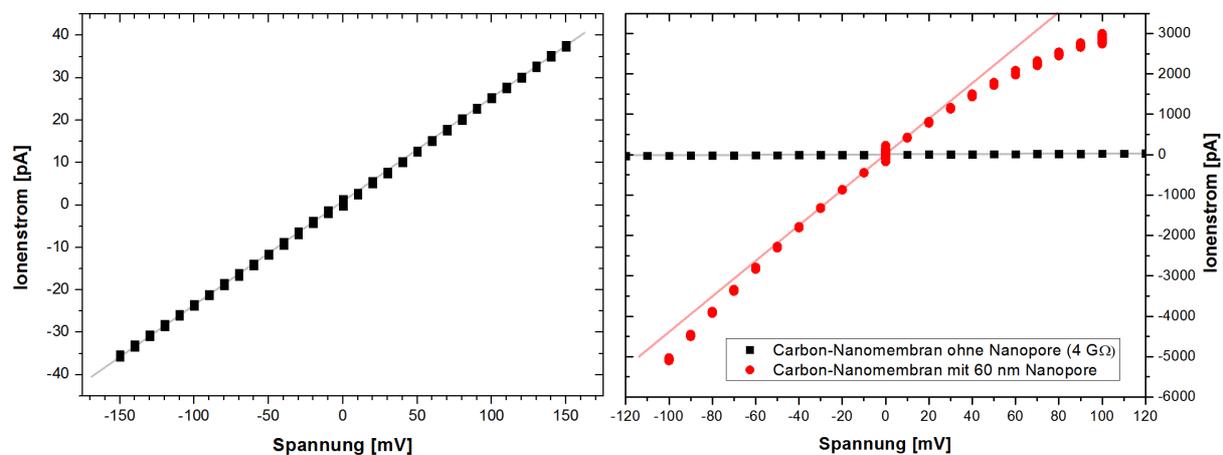


Abbildung 81: Strom-Spannungs-Kennlinie des geschlossenen Carbon-Nanosheets (links) sowie nach dem Bohren einer 60 nm großen Nanopore (rechts), jeweils bei 20 mM KCl.

Die Abbildung 81 (links) zeigt eine Strom-Spannungs-Kennlinie einer solchen dickeren Carbon-Nanomembran, die sich sehr linear verhält und bei einer Salzkonzentration von 20 mM KCl einen typischen Widerstand von etwa 4 GΩ besitzt. Die Membran versiegelt das darunter liegende Loch also ausreichend dicht und eignet sich deswegen ideal für DNA-Translokations-Experimente. In die Membran wurde daraufhin mit Hilfe des Helium-Ionen-Mikroskops eine etwa 60 nm große Pore gebohrt und der elektrische Widerstand erneut gemessen (rechts). Ähnlich wie bei den durchlässigeren NBPT-Membranen verläuft die Kennlinie auch hier mit leichten Abweichungen von der Linearität bei höheren Spannungen. Der Einbau von weiteren Oberflächenladungen oder die mechanische Verformungen durch das starke elektrische Feld können also auch hier nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Da die Carbon-Nanomembranen sehr lichtdurchlässig sind, sollten sie nicht durch den Laser der Optischen Pinzette beschädigt werden, so dass nun die Messungen der kontrollierten DNA-Translokation erfolgen konnten. Ein solcher erfolgreicher Versuch ist in Abbildung 82 gezeigt. Zwei DNA-Stränge unterschiedlicher Länge wurden durch das Anlegen von 50 mV in die Carbon-Nanosheet-Nanopore eingefädelt und langsam wieder herausgezogen, während die dabei wirkende Kraft auf das Mikrokügelchen aufgezeichnet wurde.

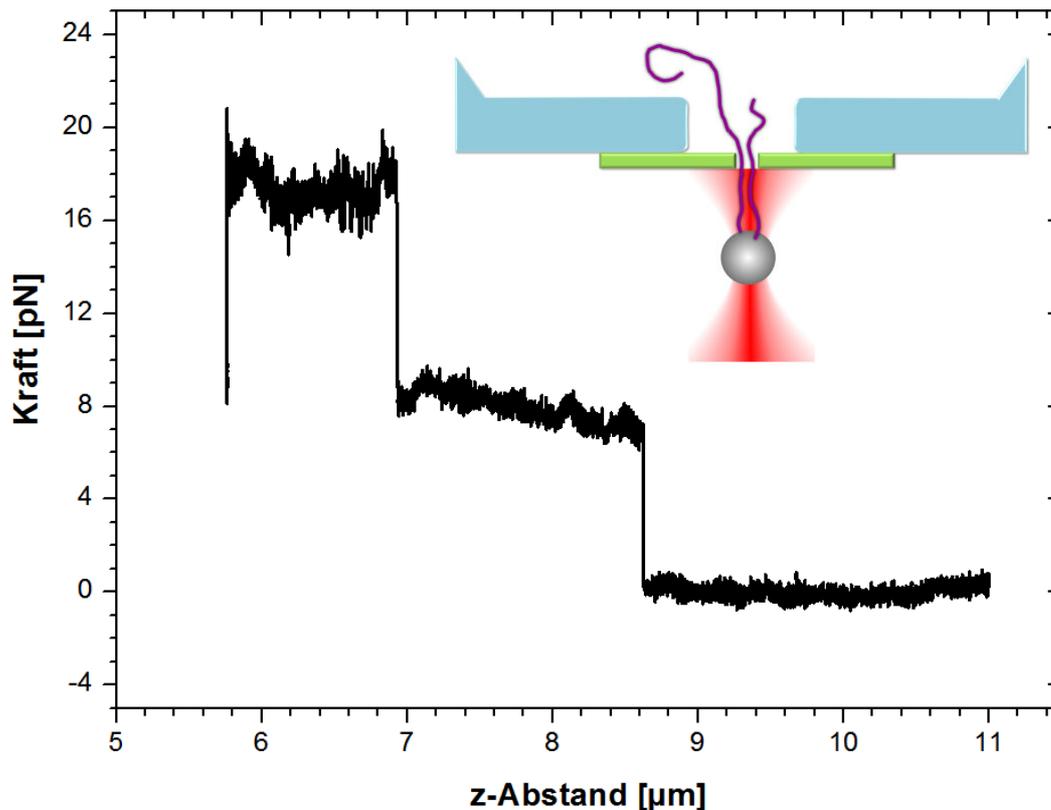


Abbildung 82: Kontrollierte Translokation zweier DNA-Stränge durch eine Carbon-Nanosheet-Pore.

Der Ionenstrom durch die Pore ist hier aufgrund seines großen Rauschens nicht mit aufgetragen, doch ähnlich zu den vorigen Messungen driftete er im Verlauf der Messung zum Teil stark in Richtung des Nullpunkts. Auch hier kam es deswegen vermutlich zu Aufladungen der Membran, die auch ein Grund dafür sein könnten, warum das Kraftsignal des längeren DNA-Strangs während des langsamen Ausfädelns nicht konstant bleibt und das Signal der kürzeren DNA stark verrauscht erscheint. Die auf eine DNA wirkende Kraft von 7 bis 8 pN ist dennoch vergleichbar mit den typischen Kraftwerten bei Siliziumnitrid-Nanoporen in dickeren Membranen.

Dieser Erfolg zeigt nicht nur, dass die kontrollierte Translokation an diesen Carbon-Nanosheets möglich ist, sondern gibt zugleich auch neue Hoffnung für die Experimente mit Graphen, da die Eigenschaften der beiden Materialien vergleichbar sind. Zwar ist die Membran mit 3 nm nicht mehr so dünn wie zuvor gewünscht, doch die zukünftige Aufklärung des Herstellungsprozesses dieser dichten Carbon-Nanosheets und weitere Experimente mit Graphen führen mit Sicherheit zu noch dünneren erreichbaren Membranen, die in Kombination mit der Optischen Pinzette vielleicht einmal für Sensoren und zur DNA-Sequenzierung benutzt werden könnten.

4.1.6. Lipidbeschichtete Nanoporen

Neben der Verkleinerung der Poren und dem Verwenden dünnerer Membranen ist auch eine Oberflächenfunktionalisierung von entscheidender Bedeutung für die Verbesserung und gezielte Beeinflussung von Nanoporen-Translokationen. Allzu häufig kommt es bei den bisherigen Experimenten zu negativen Einflüssen aufgrund von unerwünschten Oberflächenladungen, Verschmutzungen oder dem Kleben der DNA an den Substraten. All dies könnte durch eine bessere Kontrolle über die Oberflächeneigenschaften verhindert oder sogar gezielt genutzt werden.

Ein Schritt in diese Richtung wurde, im Rahmen dieser Arbeit, durch die Beschichtung von Festkörper-Nanoporen mit einer Lipid-Doppelschicht gegangen. Die Kopfgruppen der einzelnen Lipid-Moleküle lassen sich prinzipiell mit vielen gewünschten Stoffen, funktionellen Gruppen und Eigenschaften maßgeschneidert ergänzen, so dass dieser Ansatz ein solides Grundgerüst für die Weiterentwicklung von zukünftigen Experimenten darstellt.

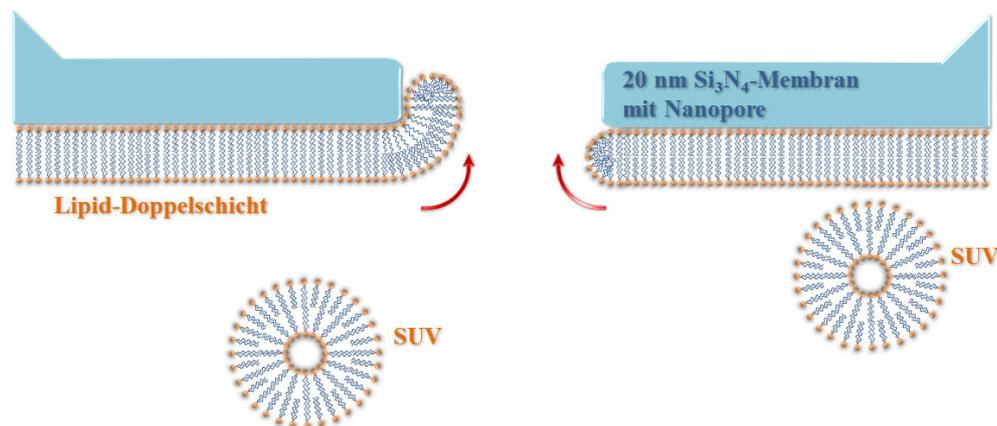


Abbildung 83: Prinzip der Beschichtung einer hydrophilen Nanopore mit einer Lipid-Doppelschicht durch die Verwendung kleiner unilamellarer Vesikel.

Zur Beschichtung wurden, wie in Abbildung 83 schematisch gezeigt, kleine unilamellare Vesikel (SUV) auf die Nanoporenmembran gegeben, welche zuvor durch die Behandlung mit Piranha-Säure stark hydrophil gemacht wurde. Aufgrund der kleinen Durchmesser der Vesikel (von weniger als 50 nm), und der daraus resultierenden starken Oberflächenspannung, platzen diese an der Siliziumnitrid-Membran auf und die hydrophilen Kopfgruppen lagern sich an die stark hydrophile Membran an. Die hydrophoben Gruppen der Lipidmoleküle dagegen werden nun durch die Anlagerung einer weiteren, umgekehrt orientierten Lipidschicht gegen die wässrige Pufferlösung abgeschirmt, so dass sich insgesamt eine Lipid-Doppelschicht ausbildet, welche die Nanoporenmembran überzieht.

Die Kontrolle, ob nicht nur die Membranoberfläche sondern auch die Innenseite der Nanopore selbst beschichtet wurde, kann hierbei aufgrund der geringen Größe der Pore nur indirekt geschehen. Hierfür wurden die Lipide fluoreszent markiert und die Membran im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Bei einer erfolgreichen Beschichtung kriecht die Grenzfläche des Lipidfilms durch die Pore und bildet auch auf der Gegenseite der Membran

eine räumlich begrenzte Lipid-Doppelschicht aus. Dieses Verhalten ist in Abbildung 84 gezeigt. Im Bereich, in welchem die Membran nun von beiden Seiten beschichtet ist, liegen in der Draufsicht also zwei Lipid-Doppelschichten übereinander, weshalb er unter dem Mikroskop als hellerer Fleck auf der ansonsten gleichmäßig fluoreszierenden Membran zu erkennen ist. Je nach Lipidmenge und Einwirkdauer kann dieser zweite Fleck unterschiedliche Größen aufweisen (jedoch nie größer als das Membranfenster selbst) und ein Ausbleiben desselbigen ist stets ein Zeichen für eine unzureichende Beschichtung oder gar ein Verstopfen der Pore.

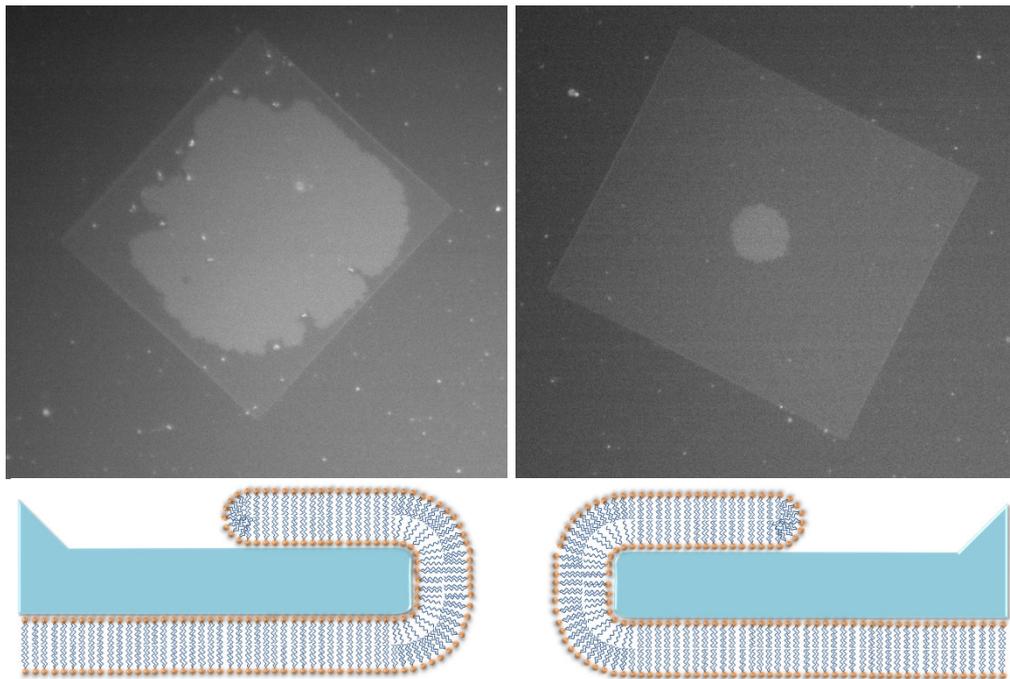


Abbildung 84: Kontrolle der erfolgreichen Poren-Beschichtung über die Fluoreszenz des zweiten Lipidflecks auf der abgewandten Membranseite.

Eine zweite indirekte Kontrollmöglichkeit ist die Überprüfung des elektrischen Widerstands. Während einer erfolgreichen Beschichtung mit einer Lipid-Doppelschicht nimmt der Durchmesser der Nanopore um die Dicke zweier Lipidfilme, und damit rund 7,0 bis 9,6 nm ab [73]. Auch der Ionenstrom durch die Pore sollte damit abnehmen.

Pore	Durchmesser[nm]	I_{vor} [nA]	I_{nach} [nA]	Verkleinerung [nm]
TEM Pore 1	95	160	130 (90 nach 12h)	8
Chip 1	29	33	26	1
Chip 3	33	40	5	22
Chip 3	30	35	27	1
Chip 8	25	27	11	8
Chip 9	30	35	27	1
Chip 9	34	41	26	6
Chip 11	30	34	17	8
Chip 11	27	30	8	13
Chip 12	12	8	6	1

Die obenstehende Tabelle zeigt den Ionenstrom einiger Nanoporen (bei 100 mV und 2 M KCl) sowohl vor als auch nach einer Beschichtung mit Lipiden. Der Durchmesser der Pore und die effektive Verkleinerung desselben durch die Lipidbeschichtung sind hierbei mit Formel 15 aus Kapitel 4.1.1. aus den gemessenen Ionenströmen berechnet worden. Ebenfalls wurde hier bereits beachtet, dass während einer Beschichtung nicht nur der Durchmesser abnimmt, sondern die Membrandicke auch im gleichen Maße zunimmt.

Es zeigt sich, dass in einigen Fällen die effektive Abnahme des Porendurchmessers sehr nah an den erwarteten 9,6 nm liegt, in anderen Fällen jedoch deutlich größer oder kleiner ausfällt. Da nur der Ionenstrom durch die Pore als Messgröße zur Verfügung steht, sind mehrere Ursachen dafür denkbar, wie z.B. inhomogene Beschichtungen, Verschmutzungen, Oberflächenaufladungen, asymmetrische Porengeometrien, Messfehler usw. Diese Abschätzung über den elektrischen Widerstand ist dennoch ein erster guter Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Beschichtung und lässt zudem erkennen, dass die Beschichtung dynamisch und für jede Pore verschieden erfolgt, der Lipidfilm also nicht starr auf der Membran aufliegt sondern stets fluide verbleibt.

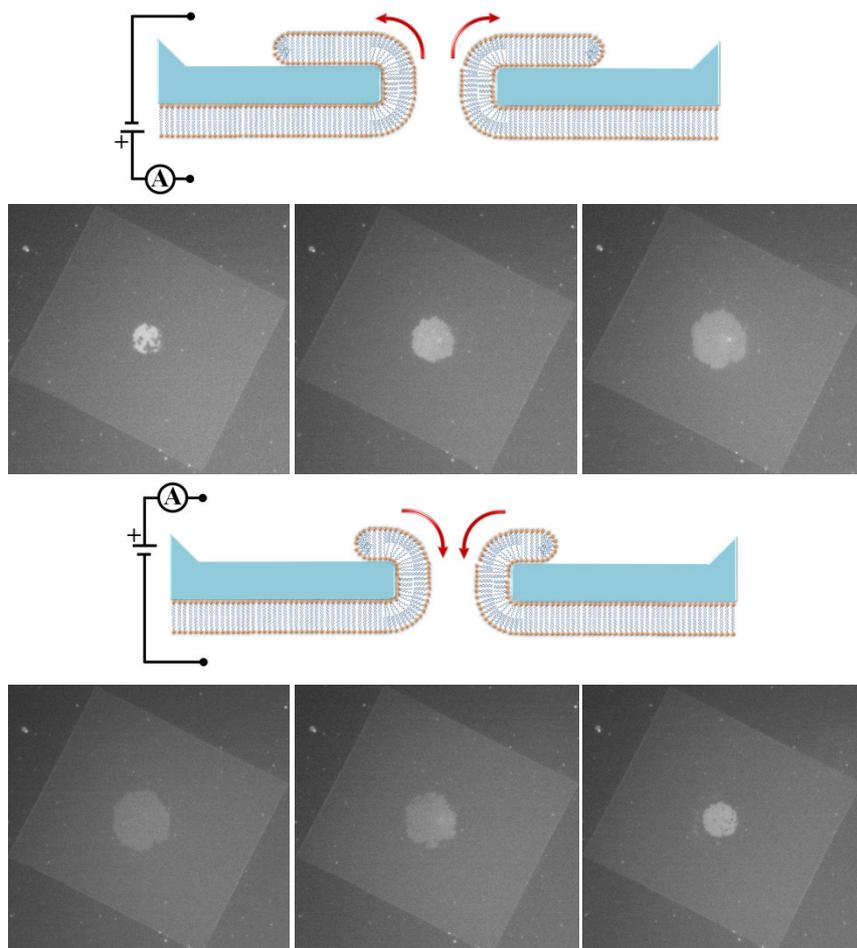


Abbildung 85: Die gesamte Lipidbeschichtung lässt sich mittels hoher Spannungen durch die Pore ziehen bzw. zurückdrücken, woraufhin der sichtbare Lipid-Fleck wächst bzw. schrumpft.

Bestätigt wird diese Annahme außerdem durch die mikroskopische Beobachtung bei hohen angelegten Spannungen (Abbildung 85): Hier ist – je nach Polarität der Spannung – ein Wachsen oder Schrumpfen des Lipidflecks zu beobachten. Die Spannung zieht (oder drückt) also die gesamte Lipid-Doppelschicht entlang der Membran-Oberfläche durch die Pore, wobei der Lipidfilm sich dabei so verhält, als wäre er elektrisch positiv geladen. Da die verwendeten Lipide zwar zwitterionisch, doch netto elektrisch neutral sind, erfolgt diese Bewegung deswegen vermutlich aufgrund des elektroosmotischen Flusses durch die Pore, welcher an der Lipidschicht reibt und diese mitzieht. Da dieser Effekt jedoch erst bei sehr hohen Spannungen (von mehreren Volt) auftritt, sollte er für die normale DNA-Translokation keine Rolle spielen und die Lipidschicht kann in diesen Fällen als stabil angesehen werden.

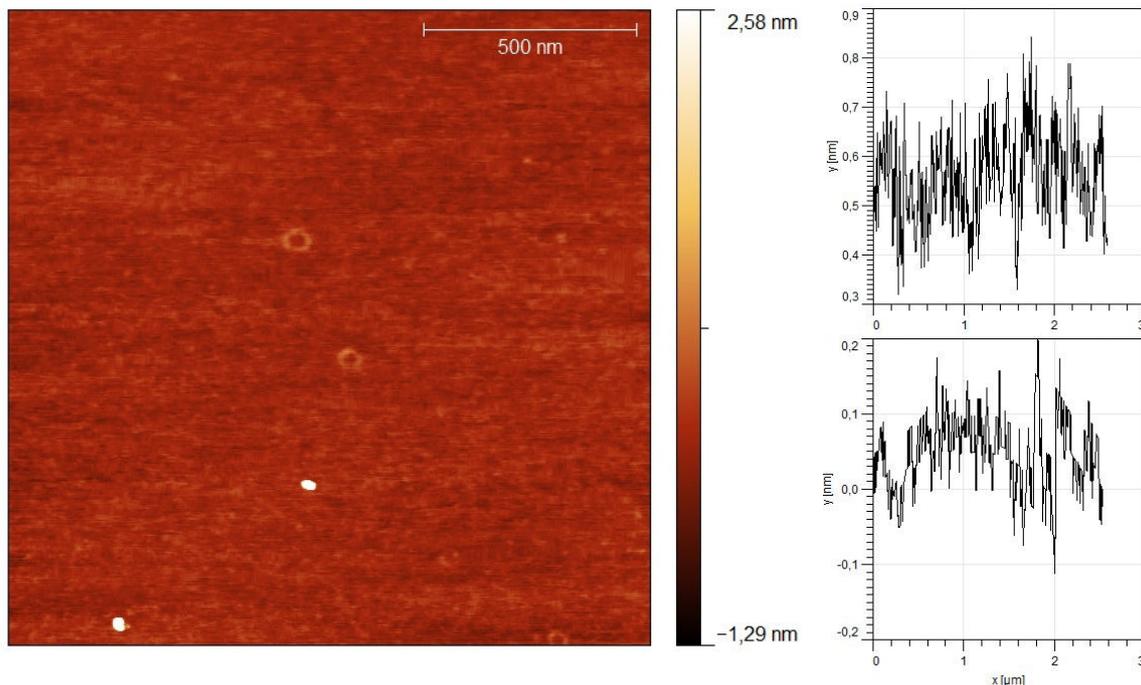


Abbildung 86: AFM-Scan einer Lipid-Doppelschicht auf Mica mit nicht aufgeplatzen Vesikeln (links) sowie Oberflächenprofil eines Bereichs mit (rechts oben) und ohne (unten rechts) Lipidbeschichtung.

Um sicher zu gehen, dass die kleinen Vesikel auf der Oberfläche tatsächlich aufplatzen und eine Lipid-Doppelschicht formen, anstatt sich nur (evtl. mobil) anzulagern, wurde zusätzlich noch eine Kontrolle mit dem Rasterkraft-Mikroskop vorgenommen. Hierfür wurden die SUV auf eine Mica-Oberfläche gegeben, für 15 Minuten einwirken gelassen und dann mit destilliertem Wasser abgespült. Ein Scan zeigte hierbei, wie in Abbildung 86 dargestellt, kleine „Doughnut“-förmige Gebilde auf der gesamten Oberfläche. Diese etwa 50 nm großen Vesikel waren demnach zu groß um aufzuplatzen und legten sich flach auf die Oberfläche, wobei ihr Mittelteil „durchhängt“ und so zu diesem sichtbaren Ringprofil führt. Eine Analyse des Oberflächenrauschens im Bereich der Vesikel (oben rechts) bzw. in einem Mica-Bereich ohne Vesikel-Behandlung (unten rechts) zeigt jedoch ein etwa doppelt so hohes Rauschen für Bereiche in denen Vesikel einwirken konnten. Dies deutet stark darauf hin, dass auf der Oberfläche tatsächlich eine geschlossene Lipid-Doppelschicht vorliegt, die sich aus dem Platzen von Vesikeln kleinerer Größe gebildet hat und nun mit dem AFM nicht mehr strukturell aufgelöst werden kann.

Mit diesen Ergebnissen kann eine erfolgreich beschichtete Nanopore zur kontrollierten DNA-Translokation verwendet werden. Abbildung 87 zeigt die Strom-Spannungs-Kennlinie einer ca. 41 nm großen Pore. Aufgrund der Präparation mit SUVs (vgl. Kapitel 3.1.5.) muss die Salzkonzentration der Pufferlösung im Verlauf des Experiments mehrmals gewechselt werden. Hier hängt der Ionenstrom (ähnlich wie bei allen anderen Experimenten dieser Arbeit) bei niedrigen Ladungsträger-Konzentrationen nicht linear von der Salzkonzentration ab. So ist der Strom bei einer Konzentration von 2M KCl z.B. nicht 100 mal so hoch wie bei 20 mM KCl, sondern nur etwa 60 mal. Bei hohen Konzentrationen dagegen ist das lineare Verhalten meistens wieder hergestellt, und beim Wechsel von 1M KCl zu 2M KCl zeigt sich in fast allen Experimenten ein doppelt so hoher Ionenstrom. Dies bestätigt die Vermutung, dass bei niedrigen Salzkonzentrationen die Oberflächenladungen der Pore einen deutlichen Einfluss auf die Leitfähigkeit haben können.

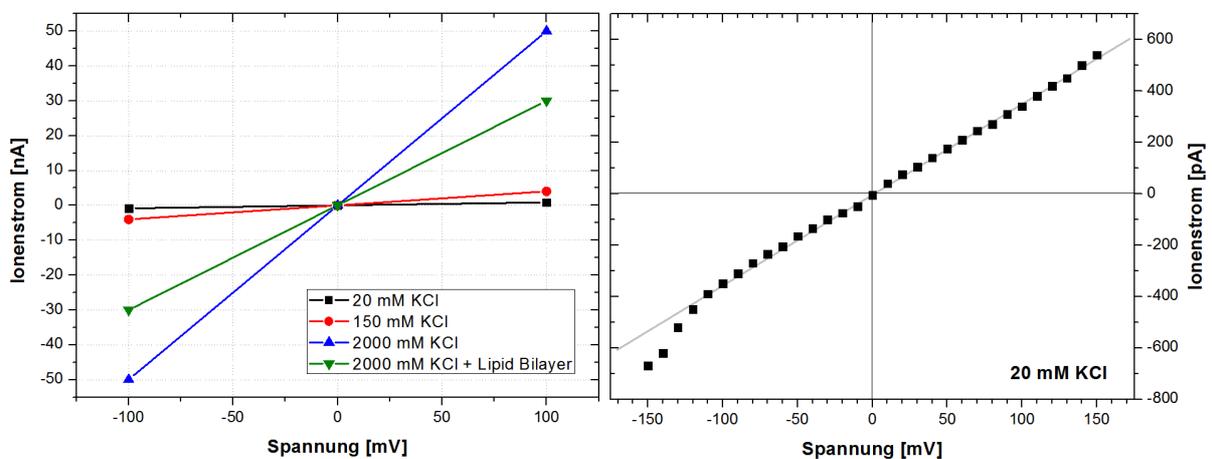


Abbildung 87: Strom-Spannungs-Kennlinie der 41 nm großen Nanopore bei verschiedenen Salzkonzentrationen (links) sowie nach der erfolgreichen Beschichtung mit einer Lipid-Doppelschicht (rechts).

Während der Beschichtung mit einer Lipid-Doppelschicht in einer 2M KCl-Pufferlösung nahm der Ionenstrom um 40%, von 50 nA (blau) auf 30 nA (grün) ab, was einer effektiven Reduzierung des Nanoporendurchmessers um etwa 10 nm entspricht und damit sehr gut zu den vorausgesagten 9,6 nm einer kompletten Beschichtung passt. Nach dem Wechsel auf Nanoporen-Puffer (20 mM KCl) zeigte sich eine lineare Strom-Spannungs-Kennlinie (rechts), die erst bei stark negativen Spannungen leichte Abweichungen aufwies. Der Grund hierfür ist vermutlich die Fluidität des Lipidfilms und ein Hinweis darauf, dass hohe Spannungen im Experiment vermieden werden sollten um die noch immer dynamische Beschichtung der Pore nicht zu gefährden.

Das Ergebnis der erfolgreichen kontrollierten Translokation mit der Optischen Pinzette ist in Abbildung 88 gezeigt. Ein einzelner DNA-Strang (mit berechneter Konturlänge von 15,1 μm) wurde hierfür bei 50 mV komplett aus der vollständig lipidisierten Nanopore ausgefädelt, wobei sich eine Kraft von 16 pN ergab. Diese Kraft liegt sehr deutlich über den Werten, die sich an vergleichbaren Poren ohne Lipidbeschichtung ergeben (vgl. Kapitel 4.1.8.). Es kann also geschlossen werden, dass der elektrisch neutrale Lipidfilm einen großen Teil der Oberflächenladungen des negativ geladenen Siliziumnitrids abschirmt, und damit zu einem geringeren elektroosmotischen Fluss und einer geringeren Reduzierung der elektrostatischen

Kraft führt, so dass sich höhere messbare Kräfte ergeben. Durch eine gezielte Wahl der Lipide, deren Ladung und anderer Eigenschaften, könnte so in Zukunft einmal der elektroosmotische Fluss bewusst kontrolliert und je nach Anwendungsgebiet reduziert oder verstärkt werden. So ist mit den Lipiden nicht nur ein Einfluss auf die gemessene Kraft bei der kontrollierten Translokation (und auf die Translokationszeit bei der freien Translokation) denkbar, sondern auch eine darüber hinaus gehende Kontrolle der chemischen Oberflächeneigenschaften der Porenwand.

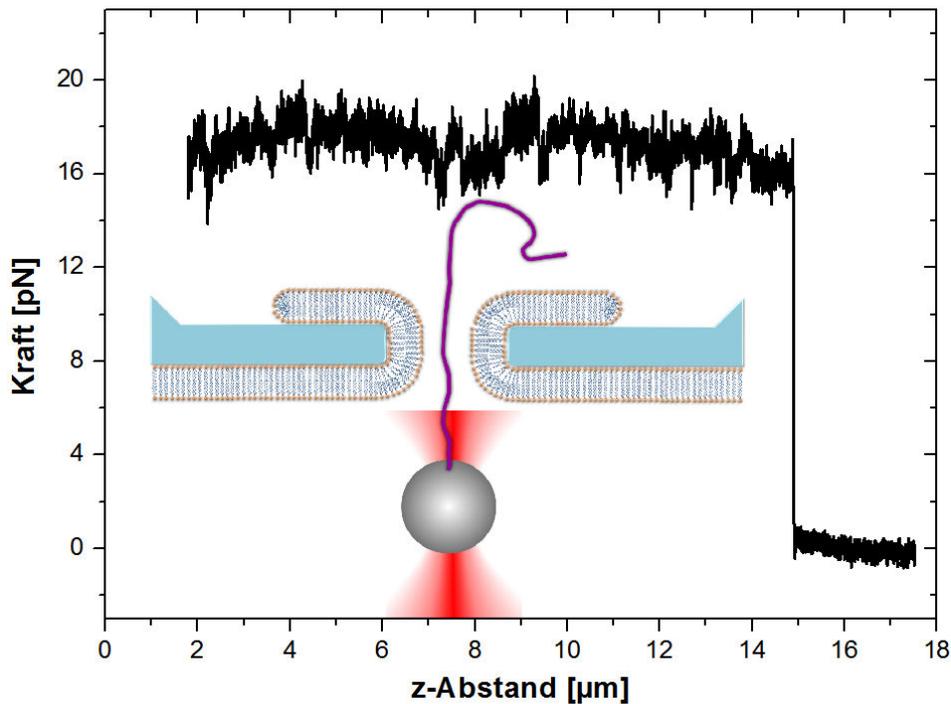


Abbildung 88: Kontrollierte DNA-Translokation, bei 50 mV und 20 mM KCl, durch eine Nanopore, die zuvor mit einer Lipid-Doppelschicht beschichtet wurde.

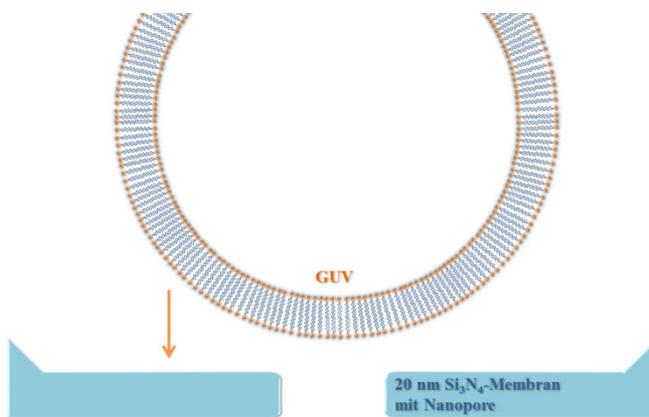


Abbildung 89: Absinken eines Riesenvesikels (GUV).

Eine weitere Möglichkeit der Porenbeschichtung mit einer Lipid-Doppelschicht ergab sich zufällig aus anderen Versuchen, in denen die Nanopore von einer freistehenden Lipidschicht abgedeckt werden sollte. Hierfür wurden, wie im Schema in Abbildung 89 gezeigt ist, riesige Vesikel (GUV) statt der kleinen Vesikel (SUV) in die Probenkammer gegeben, die dort zu Boden sinken und über der gesamten Siliziumnitrid-Membran (inklusive Nanopore) aufplatzen sollten.

Die Ionenstrommessung an einer 54 nm großen Pore (bei 100 mV und 20 mM KCl) während so eines Versuchs zeigt Abbildung 90. Das Hinzugeben der Riesenvesikel ist als deutliches Rauschen im Stromsignal zu erkennen, auf welches ein abrupter Abfall des Stroms auf nahezu Null folgt. Hier ist ein Vesikel großflächig aufgeplatzt und versiegelt die Nanopore vollständig mit einer Lipid-Doppelschicht. Das dabei aufgenommene Fluoreszenzbild zeigt das geplatzte Vesikel als großen Fleck, während in der rechten unteren Ecke noch ein zweites Vesikel zu erkennen ist, welches langsam auf die Membran-Oberfläche absinkt.

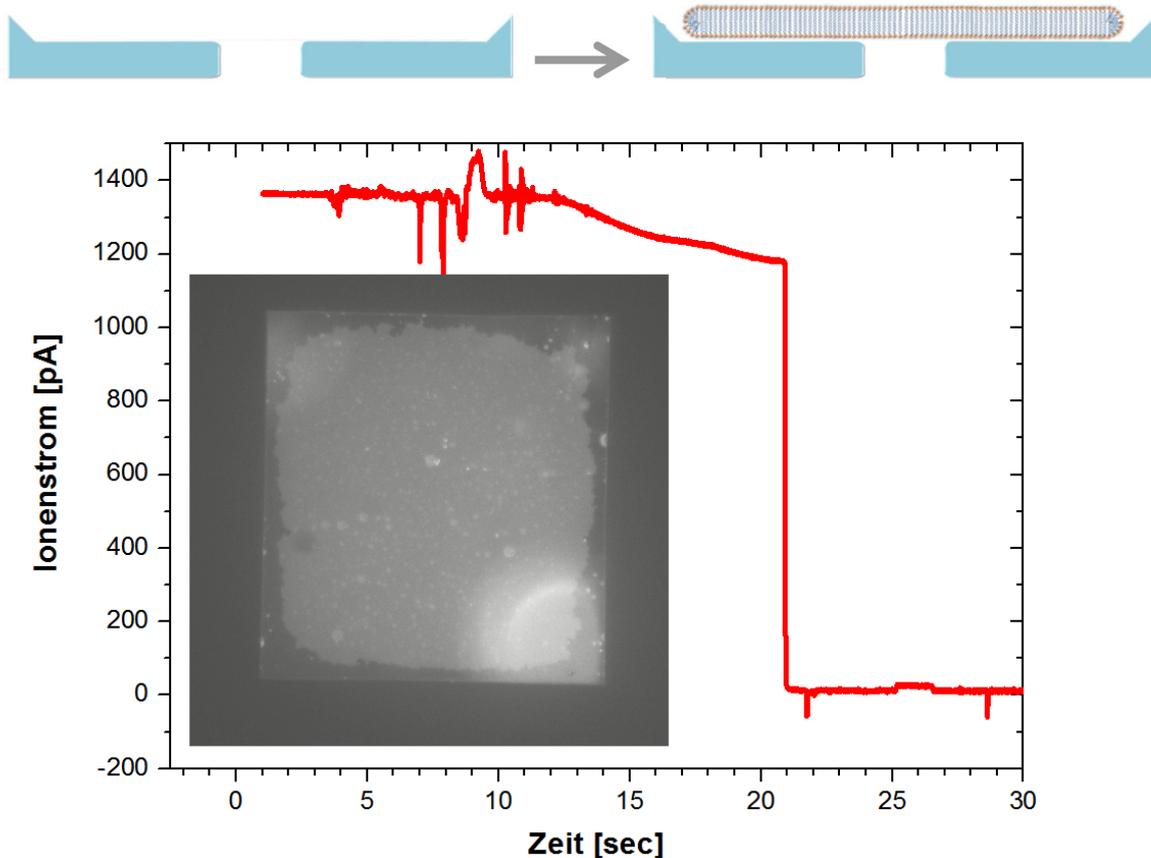


Abbildung 90: Ionenstrom während des Absinkens und Aufplatzens eines Riesenvesikels, was die Nanopore mit einer Lipid-Doppelschicht versiegelt.

Während des Wechsels auf eine Pufferlösung mit einer Konzentration von 1M KCl nahm der Strom nun jedoch wieder sprunghaft zu und gleichzeitig zeigte sich im Fluoreszenz-Bild ein zweiter heller Lipidfleck in der Mitte des Membranfensters (Abbildung 91). Die freistehende Lipid-Doppelschicht war also aufgerissen und durch die Nanopore gezogen worden, so dass sich dadurch dieselbe Ausgangssituation ergab, wie bei den Versuchen mit den kleinen Vesikeln: Eine komplett lipid-beschichtete Nanopore. Sie konnte deswegen ebenfalls für kontrollierte DNA-Translokations-Experimente mit der Optischen Pinzette verwendet werden.

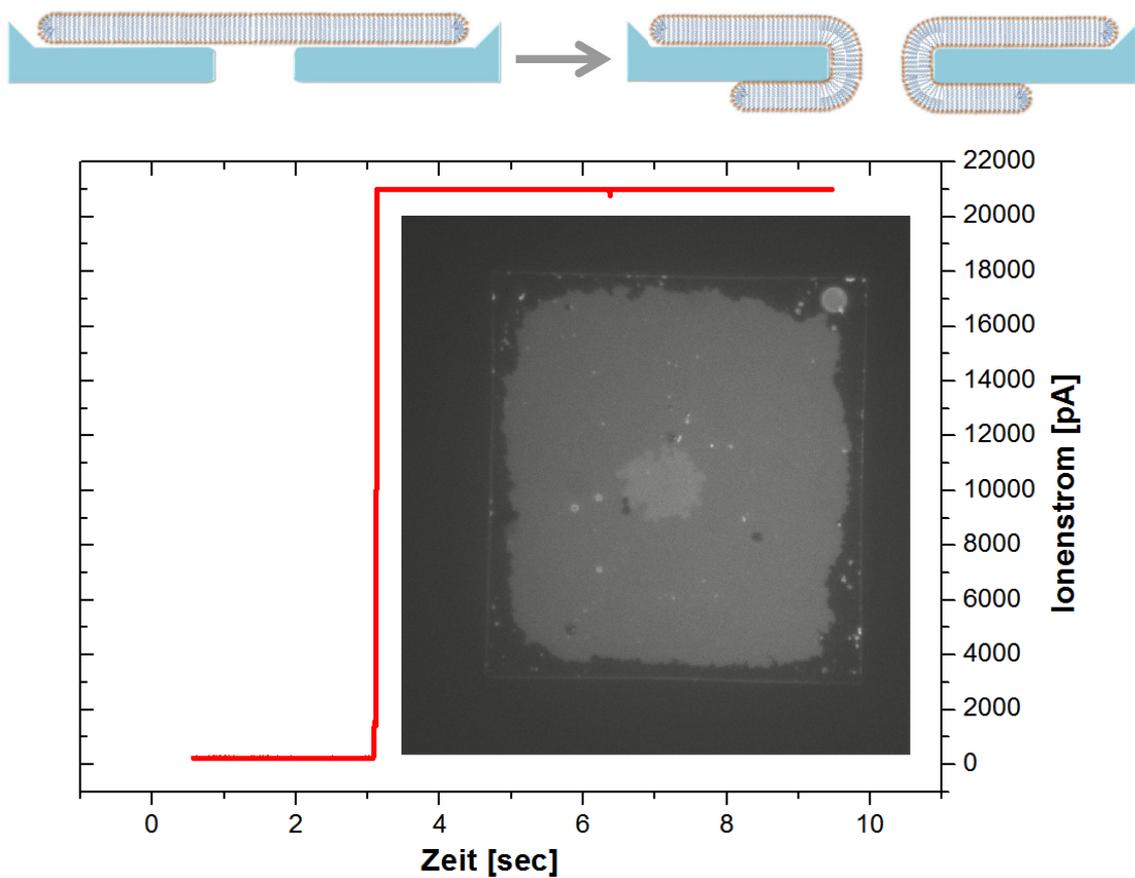


Abbildung 91: Ionenstrom während des Aufreißens der freistehenden Lipid-Doppelschicht, welche dadurch durch die Nanopore gezogen wird und den zweiten sichtbaren Lipidfleck erzeugt.

Das Ergebnis zweier kontrollierter Translokationen von DNA-Strängen unterschiedlicher Länge (bei 50 bzw. 70 mV und 20 mM KCl) zeigt die folgende Abbildung 92.

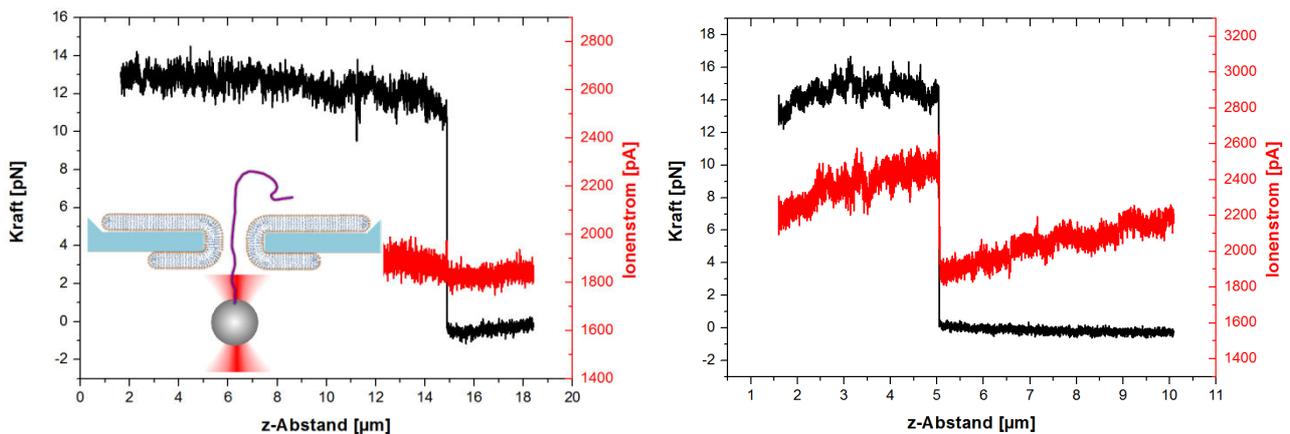


Abbildung 92: Zwei kontrollierte DNA-Translokationen an der lipidbeschichteten Nanopore, die durch das Aufplatzen eines Riesenvesikels beschichtet wurde.

Auch hier ergeben sich, analog zur vorigen Messung, viel höhere Kräfte auf die DNA, als dies für vergleichbar große aber unbeschichtete Poren zu erwarten ist. Die Beschichtung unterdrückt einen Teil der Oberflächenladung und dies führt zu einem geringeren elektroosmotischen Fluss und einer höheren messbaren Kraft. Auffällig ist hier außerdem, dass der Ionenstrom durch die Pore während des kompletten Ausfädelns des DNA-Stranges zum Teil nur kleine (links) aber auch sehr große (rechts) Sprünge vollführt. Dies unterstreicht vermutlich noch einmal den fluiden, dynamischen Charakter der Lipidbeschichtung. Wenn diese nicht die gesamte Porenwand bedeckt, so können teilweise die darunterliegenden Oberflächenladungen an Einfluss gewinnen. Darüber hinaus ist der DNA-Strang vielleicht nicht mittig durch die Pore gezogen worden, sondern konnte mit dem Lipidfilm und der darunter liegenden Porenwand interagieren, so dass jedes Einzel-Experiment zu leicht unterschiedlichen Stromsignalen führen kann. Da das zweite Experiment bei 70 mV durchgeführt wurde, ist hier die Kraft mit 0,2 pN/mV auch geringer als die 0,26 pN/mV bei den angelegten 50 mV des ersten Experiments. Dies spricht ebenfalls für eine unvollständige Lipidbeschichtung im zweiten Fall, welche einen höheren elektroosmotischen Fluss erzeugte.

4.1.7. Abhängigkeit der Kraft von der Porengröße

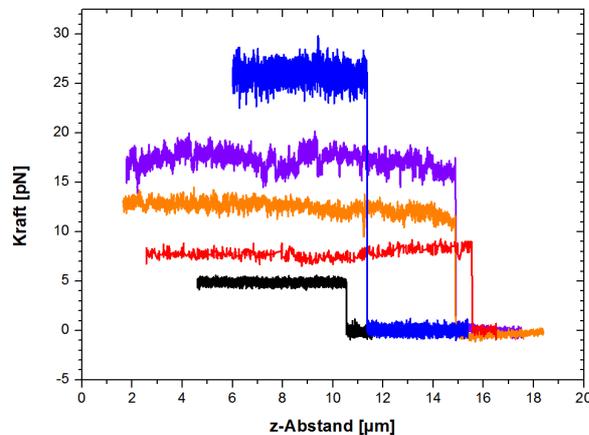


Abbildung 93: Verschiedene Kraftkurven bei gleichen Bedingungen (50 mV, 20 mM KCl) jedoch unterschiedlichen Porengrößen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden, bei den Experimenten der kontrollierten Translokation von DNA mit der Optischen Pinzette, viele Messkurven aufgenommen, die sich in ihrer Form stark voneinander unterscheiden (Abbildung 93). Die unterschiedlichen gemessenen z-Abstände der einzelnen Experimente sind hierbei auf die unterschiedlichen Konturlängen der individuellen DNA-Moleküle zurückzuführen, während der Unterschied im Kraustrauchen hauptsächlich von der gemessenen Kraft, der gewählten Laserleistung sowie (bei der Videoauswertung) vom Grad der Beleuchtung des Mikrokügelchens abhängt. Da alle hier gezeigten Experimente jedoch bei identischen

Bedingungen (50 mV, 20 mM KCl) durchgeführt wurden, und auch stets die gleichen Membranen und Präparationsschritte Anwendung fanden, müssen die Unterschiede in der Höhe der gemessenen Kräfte hauptsächlich vom Durchmesser der Nanoporen abhängen.

In Abbildung 94 sind diese unterschiedlichen Kraftwerte auf einen DNA-Strang in einer Nanopore für verschiedene Experimente dieser Arbeit zusammengefasst.

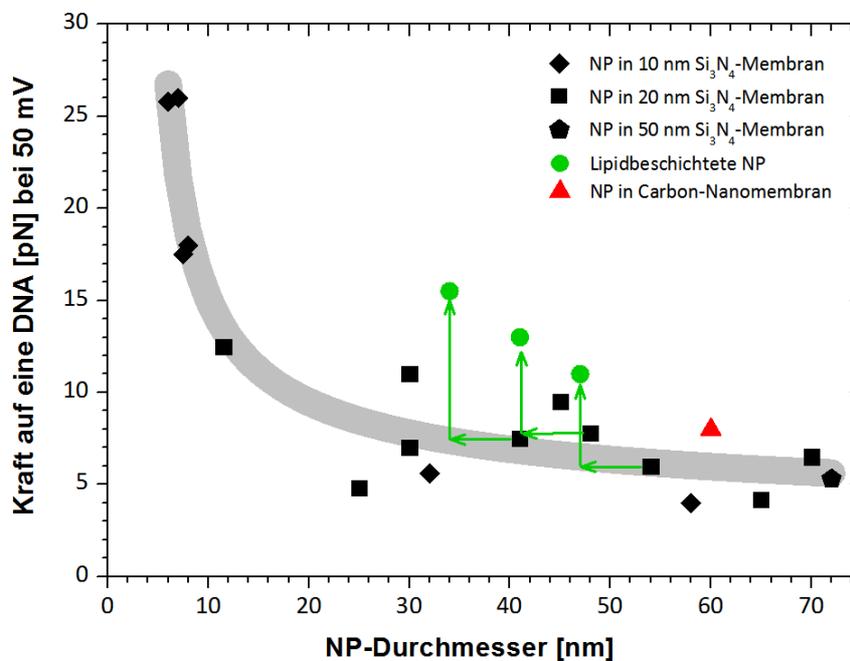


Abbildung 94: Abhängigkeit der gemessenen Translokations-Kräfte vom Nanoporen-Durchmesser bei 50 mV und 20 mM KCl.

Die Durchmesser der Nanoporen (NP) wurde hierfür explizit jeweils per TEM-Messung (nach dem eigentlichen Translokations-Experiment) bestimmt und zudem per Widerstandsmessung mit Formel 15 aus Kapitel 4.1.1. verifiziert.

Es zeigt sich eine eindeutige, charakteristische Abhängigkeit, bei welcher die gemessenen Kräfte für kleinere Poren immer größer werden. Die theoretisch vorhergesagte elektrostatische Kraft, von maximal 47 pN bei 50 mV und damit rund 1 pN/mV (vgl. Kapitel 2.7.) wird jedoch in keinem Fall erreicht, so dass der elektroosmotische Fluss bei allen Porengrößen einen erheblichen Einfluss ausüben muss. Die negativen Oberflächenladungen der DNA und der Porenwand ziehen hierbei positive Gegenionen in der Pufferlösung an, die als Folge ebenfalls vom elektrischen Feld, jedoch entgegengesetzt zum DNA-Strang, beschleunigt werden. Als Konsequenz bildet sich ein Fluss der gesamten Pufferlösung, welcher hydrodynamisch an der DNA reibt und so die elektrostatische Kraft zu einer effektiv kleineren, gemessenen Kraft auf die DNA reduziert. Bei großen Nanoporen ist dieser elektroosmotische Fluss sehr stark und die Reduzierung der elektrischen Kraft beträgt z.B. bei einer typischen gemessenen Kraft von 7,5 pN bis zu 85%. Bei sehr kleinen Poren, bei denen sich die Wolken der Gegen-Ionen von DNA und Porenwand immer weiter überlappen, ist der elektroosmotische Fluss dagegen viel schwächer ausgeprägt und die Reduzierung der elektrischen Kraft beträgt hier nur noch um die 45%.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die gemessene Kraft unabhängig von der Länge der Nanopore ist, da sich die Experimente an verschiedenen Membrandicken gut in das Gesamtbild einreihen. Dies entspricht den theoretischen Erwartungen, da weder die elektrostatische Kraft (Kapitel 2.7.) noch der elektroosmotische Fluss [136] von der Porenlänge abhängen sollten. Eine Abhängigkeit von der Oberflächenladung der Porenwand (und damit nicht zuletzt auch von der Art des konkreten Herstellungsprozesses der Nanopore sowie deren Material) ist dagegen stets vorhanden, was die Abweichung der absoluten Kraftwerte im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen [48] erklären könnte, die sich vor allem im Bereich sehr kleiner Poren bemerkbar machen. Zwar konnte bisher in den Experimente kein Einfluss der Salzkonzentration auf die gemessene Kraft festgestellt werden, doch gerade im Bereich sehr kleiner Poren, bei denen der genaue Abschirmradius von besonderer Bedeutung für den elektroosmotischen Fluss ist, könnte die Ladungsträgerkonzentration durchaus eine Rolle spielen. Leider ist man experimentell oft auf einen schmalen Bereich möglicher Konzentrationen und pH-Werte eingeschränkt, da es sonst zu Klebe-Effekten der DNA oder zu einem Aufschwimmen der Kügelchen (aufgrund des hohen Auftriebs bei sehr hohen Konzentrationen) kommt. Dennoch könnten hier weitere Experimente in Zukunft mehr Klarheit bringen.

Die Messung der DNA-Translokation an einem Carbon-Nanosheet zeigt keine große Abweichung zu vergleichbar großen Poren aus Siliziumnitrid. Findet dagegen eine Lipidbeschichtung statt, so ist die dabei gemessene Kraft in etwa doppelt so hoch, als man es allein aus der Reduzierung des Porendurchmessers heraus erwarten würde. Die elektrisch neutrale Lipidbeschichtung schirmt also einen sehr deutlichen Teil der Oberflächenladung des Substrats ab, was zu einem geringeren elektroosmotischen Fluss führt. Um all diese Ergebnisse in Zukunft auch quantitativ auswerten zu können, wird zurzeit in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Peter Reimann eine theoretische Beschreibung entwickelt, die bald mehr Klarheit über das exakte Verhalten des elektroosmotischen Flusses bringen könnte.

4.2. Zweikernige Metallkomplexe

Dieser zweite experimentelle Themenkomplex der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Ergründung der biophysikalischen Eigenschaften von zweikernigen Metallkomplexen (DNMC). Diese wurden von Dr. Thomas Jany maßgeschneidert synthetisiert und sollen nun auf ihre Interaktion mit DNA-Molekülen hin erstmalig untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene biophysikalische Messmethoden verwendet, die zum Teil auch bereits bei den Nanoporen-Experimenten ihre Anwendung fanden.

4.2.1. DNA-Streckversuche mit Optischer Pinzette

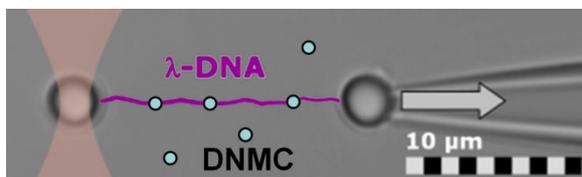


Abbildung 95: Schema der Streckexperimente.

Eine gute Möglichkeit DNA bindende Liganden nachweisen, sowie ihre Bindungsart einschätzen zu können, bieten Streckexperimente mit der Optischen Pinzette. Hierfür wird, wie in Abbildung 95 schematisch gezeigt, ein DNA-Strang zwischen zwei Kügelchen immobilisiert, die dann kontrolliert

voneinander entfernt werden können. Dies führt zu einer charakteristischen, stets reproduzierbaren Streckkurve (vgl. Abbildung 11 und Kapitel 2.3.1.), die sich nach dem Anbinden von Liganden ebenfalls charakteristisch verändern müsste.

Zunächst wurde bei einem Streckexperiment ohne zusätzliche Liganden festgestellt, dass die Form der charakteristischen Kurve auch von der Salzkonzentration der Pufferlösung abhängt, was in Abbildung 96 gezeigt ist. Während der PBS-Puffer zu dem bekannten charakteristischen Verlauf führt, ist der Übergang in destilliertem Wasser weitaus ungeordneter und die Hysterese zwischen Strecken und Relaxieren um ein Vielfaches höher. Der Grund hierfür ist vermutlich die negative Ladung des DNA-Rückgrats. Bei niedrigerer Abschirmung der selbigen, aufgrund der geringeren Salzkonzentration, ist die Selbstabstoßung des Rückgrats größer und die Rekombination der Basen während des Relaxierens wird erschwert. Während der nachfolgenden Experimente musste also stets auf

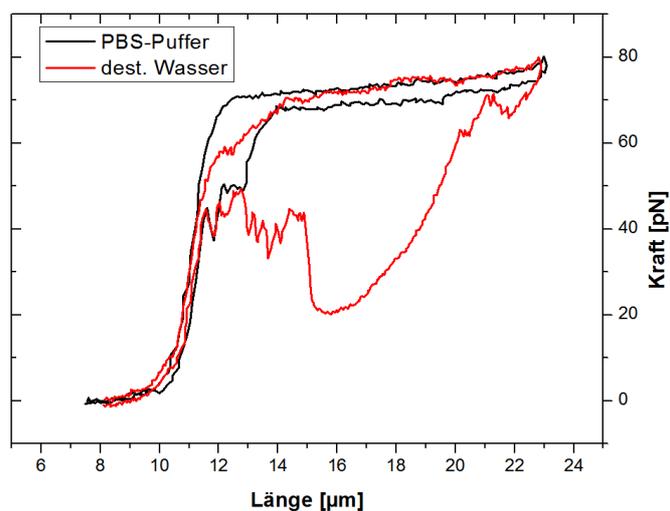


Abbildung 96: Unterschied der Streckkurven in physiologischem PBS-Puffer und in destilliertem Wasser.

eine physiologische Umgebung für die DNA geachtet werden, was z.B. bei der Konzentration des PBS-Puffers (ca. 150 mM NaCl) in ausreichendem Maße sichergestellt ist.

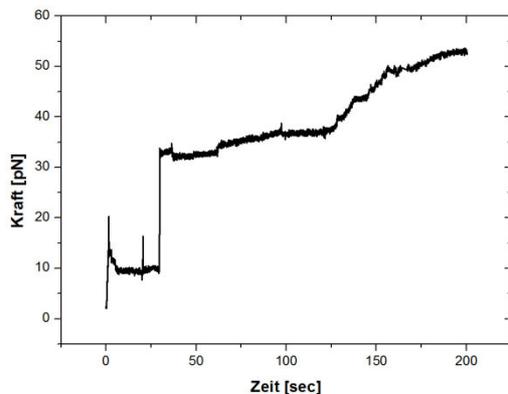


Abbildung 97: Ansteigendes Kraftsignal während des Einleitens der Metallkomplexe.

Für das anschließende Experiment mit den Metallkomplexen wurde ebenfalls eine DNA zwischen den zwei Kügelchen immobilisiert und mit einer Vorspannung von wenigen pN nur leicht gedehnt. Daraufhin wurden die in PBS-Puffer gelösten Metallkomplexe (6 μ M Kupfer-DNMC) in die Flüssigkeitszelle geleitet und währenddessen das Kraftsignal aufgezeichnet (Abbildung 97). Die ersten beiden Sprünge (auf etwa 10 und 35 pN) der Kraft stammen hierbei jeweils vom Öffnen des Zu- und Ablaufs der Flüssigkeitszelle, da die dadurch entstehende Strömung am Kügelchen in der Optischen Falle reibt. Die dann folgenden, teilweise stufenförmigen Kraftanstiege auf bis zu 55 pN sind

jedoch allein der Wirkung der eingeleiteten Metallkomplexe zuzuschreiben. Hier erhöhte sich offenbar die Spannung der DNA, so dass diese stärker an den beiden Mikrokügelchen ziehen konnte, was durch eine Verkürzung ihrer Konturlänge erklärt werden kann.

Nach dem Herausspülen der ungebundenen Liganden mit reiner Pufferlösung und dem Abstellen der Flüssigkeitsströmung wurde nun ein voller Streckzyklus aufgenommen. Wie in Abbildung 98 gezeigt, traten dabei, im Vergleich zur zuvor aufgenommenen Streckkurve ohne Liganden (schwarz), bereits vor dem Erreichen der Konturlänge mehrere Kraftanstiege auf, so als hätte sich die DNA auf diese Länge verkürzt. Nach dem Erreichen einer gewissen Kraft, von typischerweise 10 bis 40 pN, folgte auf jeden Kraftanstieg jedoch ein abrupter Abfall auf ein niedrigeres Niveau, was mit einer schlagartigen Verlängerung der DNA zu erklären ist. Während des anschließenden Relaxierens traten diese Kraftpeaks dagegen nicht auf.

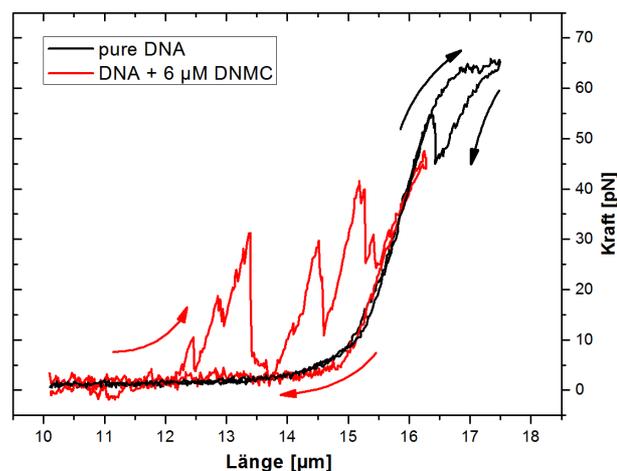


Abbildung 98: DNA-Streckkurve ohne und mit hinzugegebenen Metallkomplexen.

Die weitere Überprüfung der Höhe dieser Abrisskräfte erfolgte mittels einer so genannten Force-Clamp-Messung. Hierfür wurde die DNA mit den eingeleiteten Metallkomplexen zunächst relaxiert, um ihnen genügend Zeit zur Anbindung zu geben. Dann wurde die DNA mit einer Kraft von 15 pN gestreckt und dieser Kraftwert im weiteren Verlauf des Experiments durch eine automatische Nachregelung konstant gehalten. In Abbildung 99 (links) ist die sich dabei verändernde DNA-Länge als Funktion der Zeit aufgetragen. Auch hier kommt es zu abrupten, stufenförmigen Zunahmen der DNA-Länge, bis zum Erreichen

ihrer vollständigen Konturlängen. Allerdings muss hierfür im Vergleich zu höheren Zugkräften weitaus mehr Zeit vergehen.

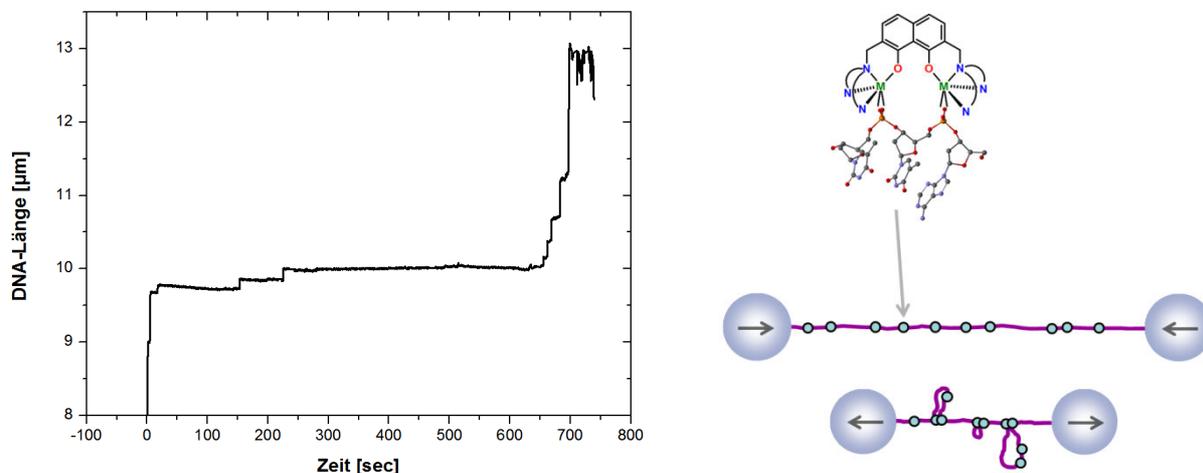


Abbildung 99: Force-Clamp-Messung unter einer konstanten Kraft von 15 pN (links) und Schema der Interpretation dieser Ergebnisse (rechts).

Eine Interpretation all dieser Ergebnisse zeigt die Abbildung 99 (rechts). Demnach binden die zweikernigen Metallkomplexe zunächst gesondert am Rückgrat des DNA-Strangs. Wird dieser Strang ausreichend relaxiert, so können die aromatischen Ringgruppen mehrerer Metallkomplexe wechselwirken und sich so z.B. über π - π -Stapelung miteinander verknüpfen. Für diese Bindungsart sprechen auch die typischen Kräfte von 10 bis 40 pN, welche damit etwa 3 bis 6 mal stärker sind als eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung. Wird die DNA nun erneut gestreckt, so ist diese zunächst kürzer, was sich als frühzeitiger Kraftanstieg in den Streckkurven zeigt. Unter der steigenden angelegten Kraft können die Bindungen zwischen verschiedenen Metallkomplexen jedoch nach und nach wieder aufreißen, was schließlich zu diesem charakteristischen Sägezahnmuster führt.

Tiefer gehende Streck-Experimente mit Metallkomplexen wurden von Susan Haji Samo im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt [147] und sind an dortiger Stelle zu finden. So zeigte sich dabei für alle Arten der Metallkomplexe (Kupfer, Nickel, Kobalt) ein ähnliches Verhalten. Sie ließen sich zudem nach dem initialen Anbinden nicht mehr durch Spülen mit Pufferlösung von der DNA entfernen und das Verknäulen und Verkürzen der DNA erfolgte umso stärker, je länger die DNA zuvor im relaxierten Zustand gehalten wurde. Darüber hinaus wurden Kontroll-Experimente mit den drei jeweiligen Metall-Salzen durchgeführt (die zur Synthese der Komplexe verwendet werden), wodurch bestätigt werden konnte, dass eine Wechselwirkung der DNA-gebundenen Metallkomplexe nur erfolgt wenn diese neben dem aktiven Metallzentrum auch ihr sterisches Rückgrat enthalten.

4.2.2. Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen

Eine direktere Abbildung der Metallkomplexe und ihres Einflusses auf DNA konnte mit dem Rasterkraftmikroskop erfolgen. In Zusammenarbeit mit Alexander Harder wurde hierfür mit Metallkomplexen versehene DNA auf einer Mica-Oberfläche abgescantet.

Ein typisches Ergebnis für die Kupfer-Komplexe ist in Abbildung 100 gezeigt, doch auch die anderen beiden Arten von Metallkomplexen (Kobalt, Nickel) verhielten sich bei den Experimenten in ähnlicher Weise.

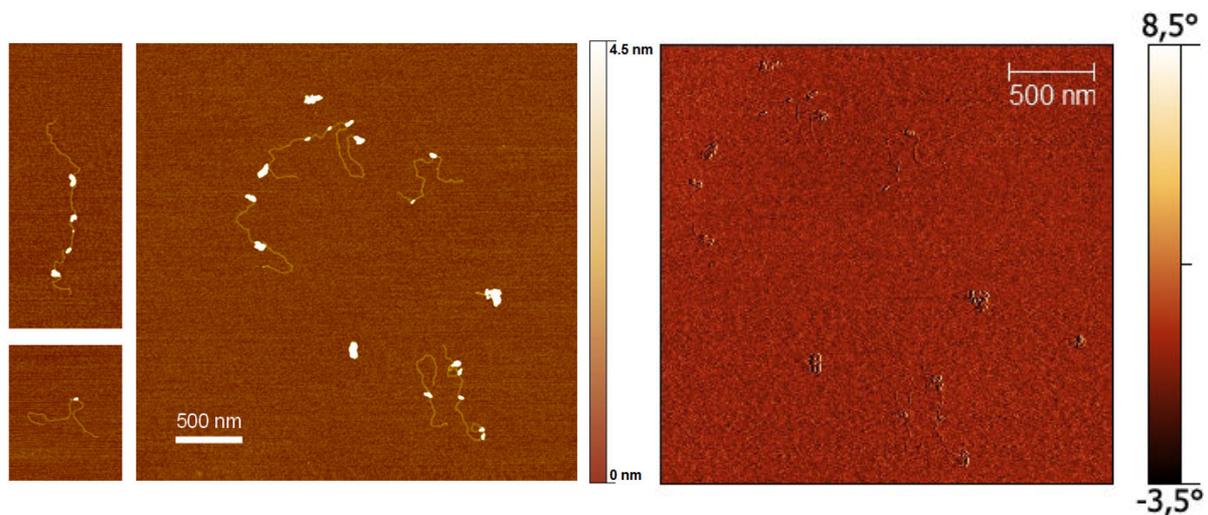


Abbildung 100: Topographie (links) und Phasenbild (rechts) der DNA-gebundenen Nickel-Metallkomplexe.

Das linke Bild zeigt hierbei die Topographie, also ein direktes Höhenabbild der Oberfläche. Neben den DNA-Strängen selbst lassen sich große, erhöhte Bereiche erkennen, in denen die DNA stark verknäult vorliegt. Das rechte Bild zeigt die gleichzeitig aufgezeichnete Phasenverschiebung zwischen dem schwingenden Cantilever und dessen Anregung und kann als Maß für die mechanische Härte des gescanteten Materials verstanden werden. Da hier kein signifikanter Unterschied auf der DNA-Oberfläche festzustellen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die hohen Bereiche im Topographie-Bild tatsächlich verknäulte DNA und nicht etwa Salzreste oder die Metallkomplexe selbst sind.

Hier bestätigt sich damit die Interpretation aus den vorherigen Streck-Experimenten, nach welcher die Metallkomplexe an der DNA binden und durch ihre Wechselwirkung zu einem stellenweisen Verknoten, Verknäulen und begleitendem Verkürzen der DNA-Länge führen.

In zwei Einzelfällen trat bei den AFM-Aufnahmen von Kobalt-Metallkomplexen noch ein weiterer Effekt auf, der in Abbildung 101 dargestellt ist. Die Knoten der DNA sind hier viel kleiner als bei vorigen Untersuchungen und in bestimmten Bereichen fehlen Stücke der DNA. Da die Richtung des ursprünglichen Stranges jedoch noch erkennbar ist, kann dieses Zerschneiden erst nach der Immobilisierung der DNA auf der Mica-Oberfläche stattgefunden haben und wurde vielleicht durch die Kobalt-Komplexe ausgelöst.

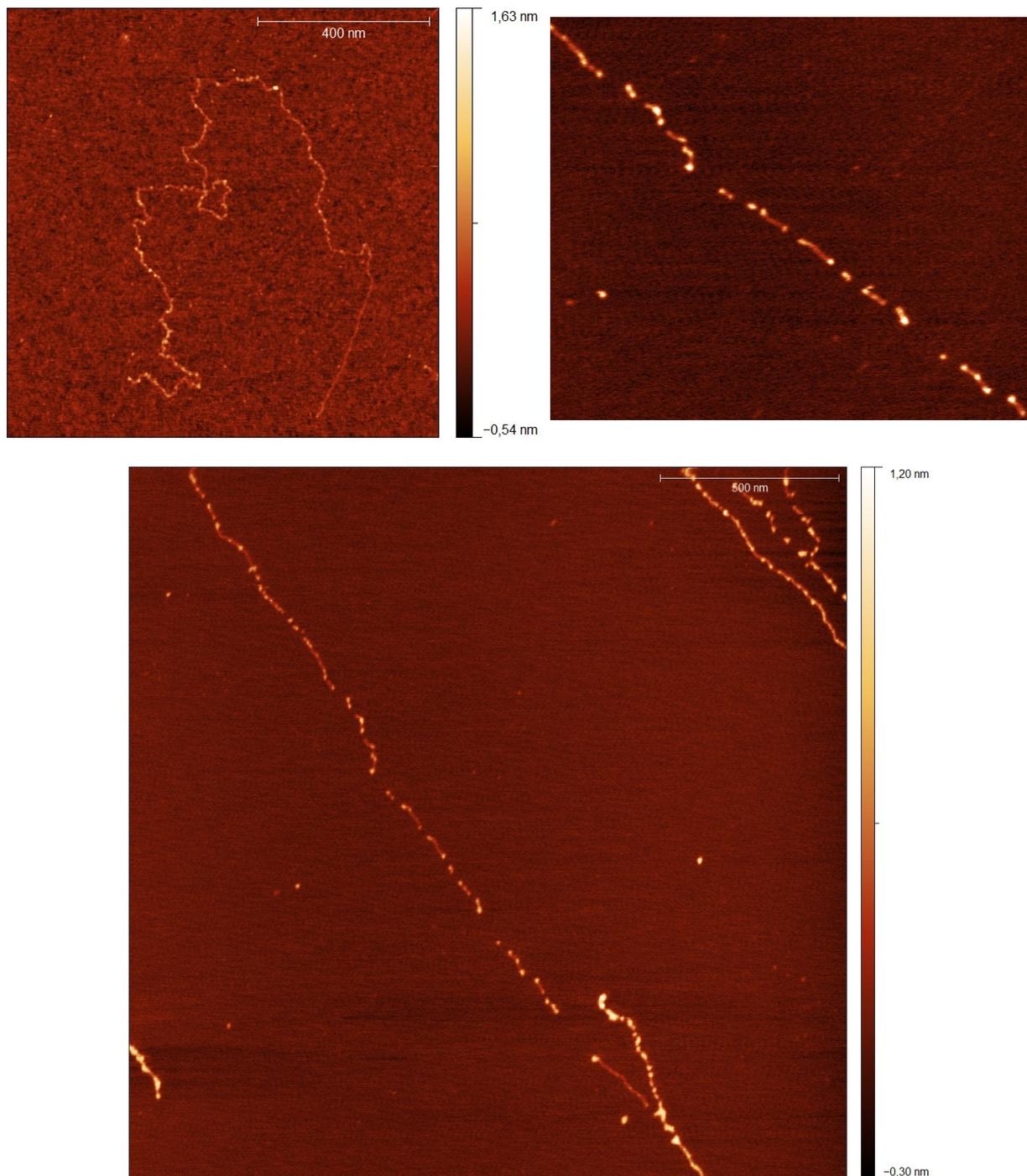


Abbildung 101: Vermutete Schneidefunktion der Kobalt-Metallkomplexe.

Zwar wurde dieses Verhalten bisher noch nicht zufriedenstellend reproduziert, doch auf dieser Grundlage konnten bereits weitere Experimente – wie zum Beispiel mit der Magnetischen Pinzette (vgl. Kapitel 4.2.4.) – geplant werden, um diese vermutete Schneidefunktion genauer zu überprüfen. Auf Grundlage des ursprünglichen Liganden-Designs wäre ein Schneiden des DNA-Rückgrats (mittels der zweiwertigen Metallzentren) zumindest durchaus möglich.

4.2.3. Nanoporen-Experimente mit Optischer Pinzette

Ähnlich wie die verschiedenartigen Proteine in Kapitel 4.1.3. sollten auch die DNA-gebundenen zweikernigen Metallkomplexe im Rahmen einer kontrollierten Nanoporen-Translokation vermessen werden.

Allgemein fiel hierbei zunächst auf, dass in den meisten Fällen gar keine DNA-Stränge mehr durch die Pore gefädelt werden konnten, sobald diese mit den Metallkomplexen in Berührung gekommen waren. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die Zugabe der Metallkomplexe vor dem Experiment oder während der Translokation einer puren DNA erfolgte (um sicher zu gehen, dass das entsprechende Kügelchen überhaupt einen intakten DNA-Strang gebunden hat): Sobald die DNA einmal ausgefädelt wurde um ein neues Translokations-Experiment nach der Komplex-Zugabe zu starten, wurde sie in den meisten Fällen nicht mehr in die Pore gezogen. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass bei diesen Experimenten wie üblich nur ein Ende der DNA an einem Kügelchen immobilisiert ist. Da die hinzugegebenen Metallkomplexe zu einem starken Verknäulen der DNA führen, kann das zweite, freie Ende stark verknötet werden und klebt fortan entweder am Kügelchen oder in einem großen DNA-Knäuel. In diesen Fällen reicht die elektrische Kraft in der Pore nicht mehr aus, den Strang wieder zu lösen und hindurch zu ziehen.

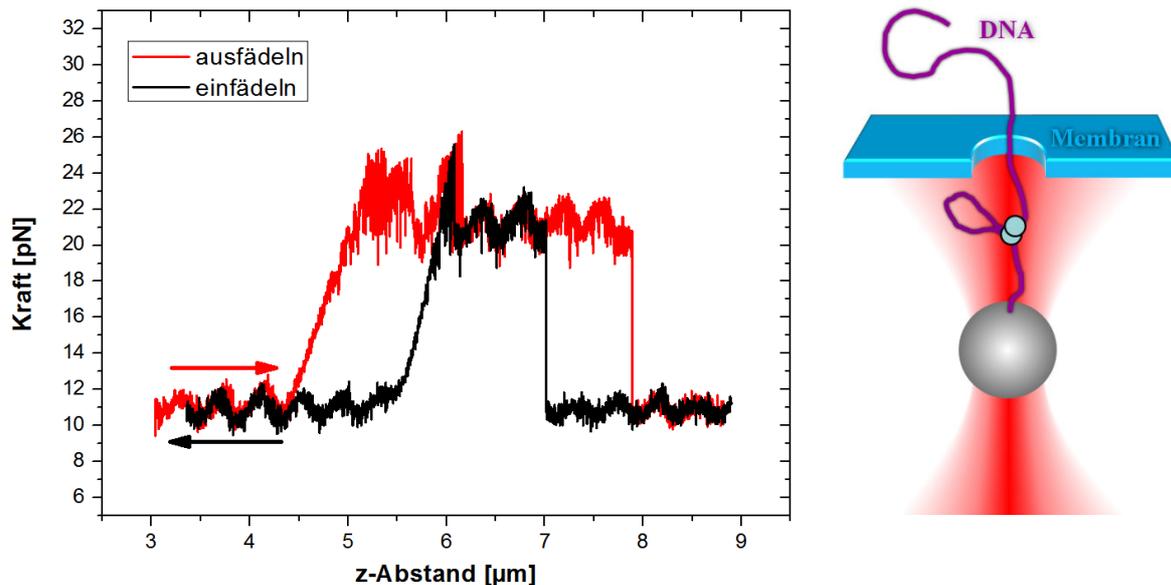


Abbildung 102: Kontrollierte DNA-Translokation mit angebundenen Nickel-Metallkomplexen.

Einen Fall, in welchem dies dennoch gelungen ist, zeigt Abbildung 102. Bei einer Spannung von 100 mV konnte ein DNA-Strang erfolgreich in die Pore gezogen werden und erzeugte nun zunächst ein gleichbleibendes Kraftsignal bei etwa 11 pN. Beim weiteren Ausfädeln (rot) wuchs die Kraft nun jedoch auf etwa den doppelten Wert an, um nach einem größeren Abstand wieder abrupt auf den ursprünglichen Wert abzufallen. Dieses Verhalten verhält sich analog zu den Versuchen mit RecA (vgl. Abbildung 59), so dass auch hier in diesem Abstandsbereich mehr negative Ladungen in der Pore gewesen sein müssen. Wurde dieser Bereich nun in entgegengesetzter Richtung, also durch langsames Einfädeln der DNA, erneut

abgescannt, so erzeugte dies zwar eine qualitativ ähnliche Messkurve (schwarz), jedoch bei anderen z-Abständen, so als wäre der Bereich höherer negativer Ladung nun verkürzt.

Eine Interpretation bietet hier das rechts in der Abbildung dargestellte Schema. Demnach deutet die starke Hysterese darauf hin, dass die gescannte Struktur keine starre Position entlang der DNA behält (wie bei RecA), sondern beweglich und dynamisch ist, was durch eine von den Metallkomplexen erzeugte Schlaufe der DNA erklärt werden könnte. Diese passiert die Pore entgegen dem elektrischen Feld (beim Ausfädeln) in längs ausgestrecktem Zustand, während sie beim Einfädeln (in Richtung des Feldes) schneller hindurchgezogen wird als der am Kügelchen fixierte Strang und so ein kürzeres, erhöhtes Kraftsignal erzeugt. Dass die Kraft hier allerdings nur doppelt so hoch ist wie bei einem Einfachstrang (und nicht dreimal so hoch, wie für so eine Schlaufe erwartet), verlangt nach weiteren Annahmen. Eventuell waren im Bereich des DNA-Knäuels so viele Metallkomplexe gebunden, dass diese durch ihre eigene positive Ladung die negative Ladung der DNA effektiv reduzierten.

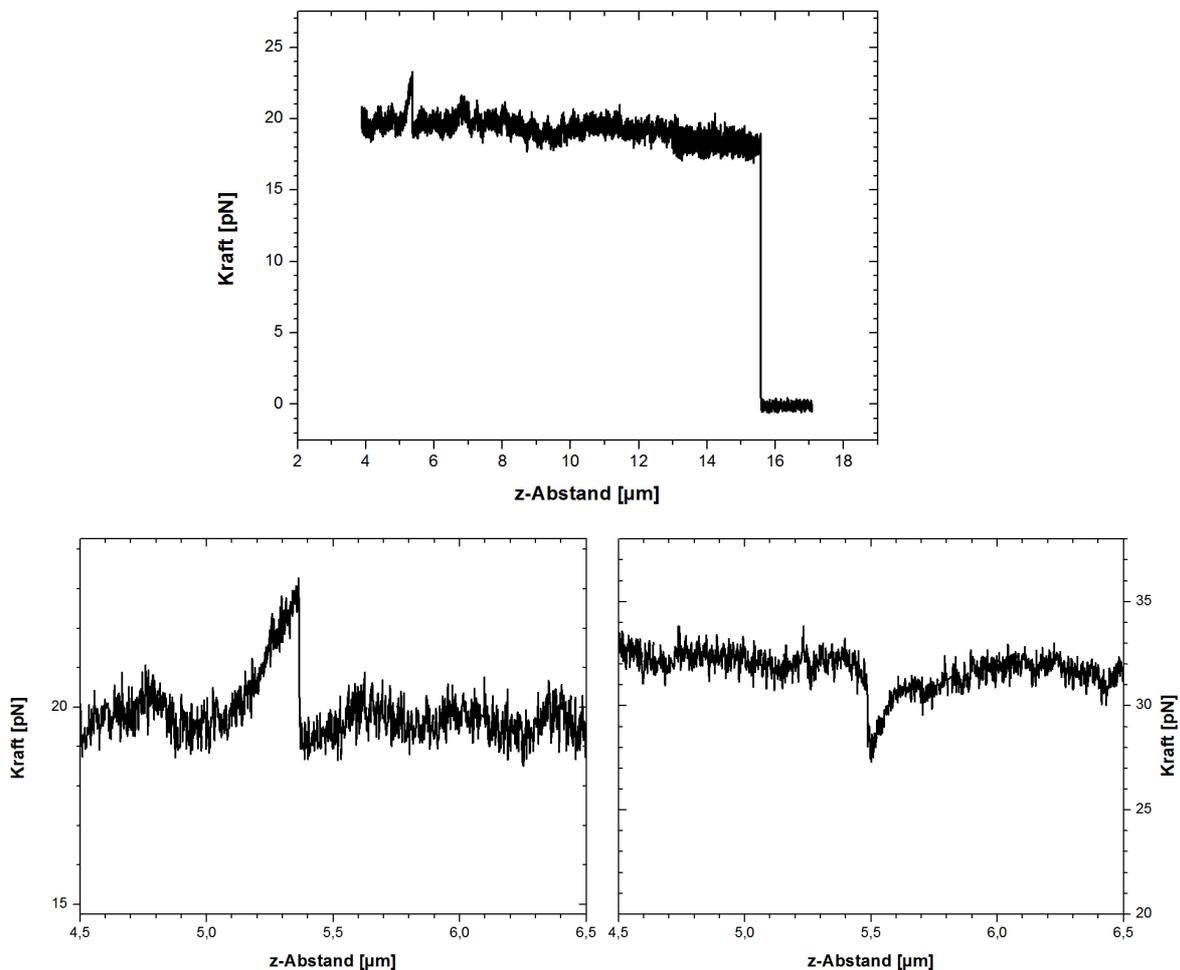


Abbildung 103: Vermutlich kurzer DNA-Knoten (oben und links) sowie Signal des freiliegenden Metall-Komplexes (rechts), nachdem sich der Knoten während des Scannens mit hoher Spannung gelöst hat.

Ein zweites solches Experiment ist in Abbildung 103 dargestellt. Hier zeigte sich bei 50 mV während des Ausfädelns der DNA (oben) eine sehr kurze und vergleichsweise geringe Kraftzunahme (links vergrößert dargestellt), die mehrmals reproduziert werden konnte. Nach dem mehrmaligen Scannen bei nun erhöhten 100 mV, schlug dieses Signal jedoch ab einem gewissen Zeitpunkt in einen Krafeinbruch um (rechts) und ein weiteres Ausfädeln zeigte zudem, dass hier die ganze Zeit zwei DNA-Stränge gleichzeitig gemessen wurden, da diese nun (im Gegensatz zum ersten Ausfädeln der oberen Abbildung) unterschiedliche Länge aufwiesen (nicht gezeigt).

Vielleicht wurden die beiden Stränge hier durch die Metallkomplexe zunächst miteinander verknotet und die dadurch erzeugte (sehr kurze) DNA-Schleife passierte die Pore so schnell, dass sich kein viel höherer Kraftwert ausbilden konnte. Nach dem Auflösen des Knäuels (durch die hohen Spannungen) wäre demnach der Bereich der angebondenen Metallkomplexe direkt, ohne verknotete DNA, gescannt worden. Erst wurden so die Auswirkungen der Metallkomplexe auf die DNA gemessen (verknoten und Erhöhung der Kraft) und danach die Eigenschaften der Metallkomplexe selbst (positive Ladung und dadurch Krafeinbruch).

Die Messung sollte zwar grundsätzlich mit Vorsicht betrachtet werden, da hier zwei DNA-Stränge gleichzeitig gemessen wurden, doch die Ergebnisse reihen sich insgesamt ebenfalls sehr gut in das Gesamtbild ein, welches sich auch aus den AFM-Bildern und den Streck-Experimenten ergibt. Die Annahme des Anbindens und lokalen Verknäuelns der DNA durch eine Liganden-Wechselwirkung konnte damit auch durch diese Experimente weiter bestätigt werden.

4.2.4. Untersuchungen mit Magnetischer Pinzette

Basierend auf dem maßgeschneiderten Liganden-Design und den AFM-Aufnahmen wurde vermutet, dass die zweikernigen Metallkomplexe nicht nur an die DNA binden und diese dann verknäueln können, sondern mit geringer Wahrscheinlichkeit auch ein Zerschneiden der DNA durch die kooperative Auftrennung der Phosphodiester-Bindungen in ihrem Rückgrat bewirken. Die Versuche mit der Optischen Pinzette bieten dabei wenig Möglichkeiten diese Schneidefunktion zu überprüfen, da eine aufgebrochene kovalente Bindung im Rückgrat keine messbaren Auswirkungen auf die Streckkurven oder z.B. die Kraftsignale bei einer Nanoporen-Translokation hat. Die Magnetische Pinzette dagegen ist hierfür nahezu prädestiniert. Wie in Abbildung 104 gezeigt, können mit den magnetischen Kügelchen neben der üblichen Streckung der DNA auch Torsionskräfte ausgeübt werden. Die DNA bildet bei diesen Drehungen – ähnlich zu einer verwundenen Telefonschnur – superspiralisierte Abschnitte aus und verkürzt dadurch den messbaren End-

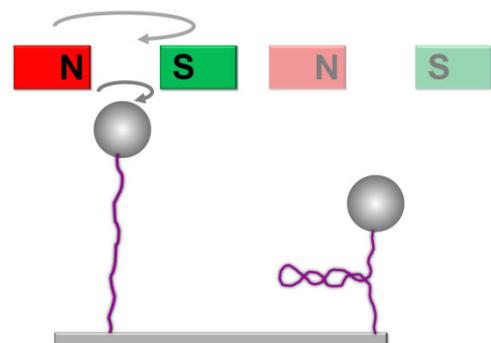


Abbildung 104: Prinzip der DNA-Superspiralität in der Magnetischen Pinzette.

zu-End-Abstand. Dieser Effekt tritt jedoch nur bei vollständig intakter, doppelsträngiger DNA auf, bei welcher auch beide Einzelstränge jeweils gesondert am Kügelchen und an der Oberfläche immobilisiert sind. Sollte die DNA dagegen einen Schnitt oder Strangbruch in ihrem Rückgrat aufweisen, so würde die torsionale Spannung vollständig abgebaut werden, indem sich die DNA an dieser Schnittstelle um den anderen, intakten DNA-Einzelstrang dreht und dadurch entwindet. Durch die Superspiralität bei Torsion (respektive dem Ausbleiben der selbigen) lässt sich damit die Schnittfunktion von Liganden sehr direkt nachweisen.

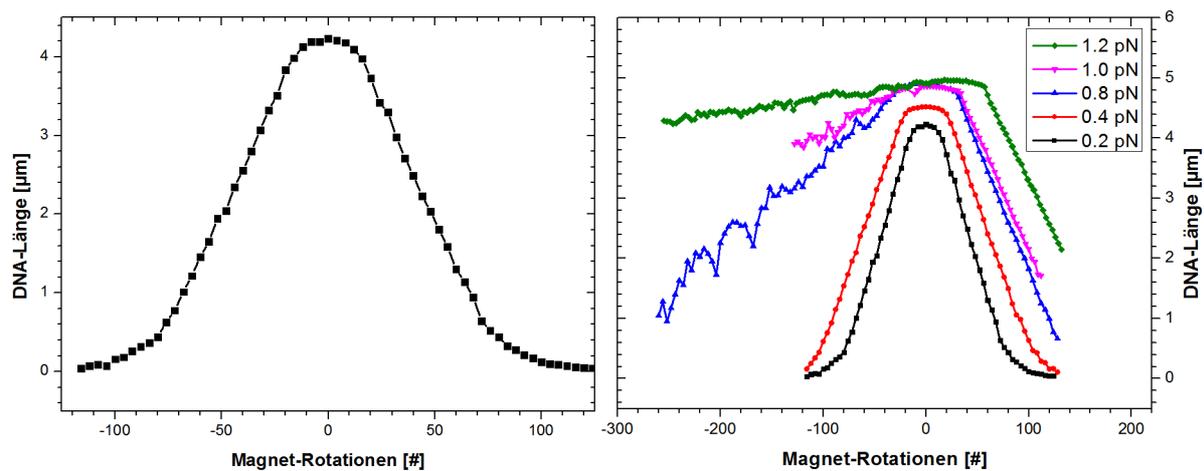


Abbildung 105: Typische und kraftabhängige „Hut-Kurven“ während der DNA-Verdrehung, die sich aus der Verkürzung durch die Superspiralität ergeben.

Ein typisches Experiment an der Magnetischen Pinzette mit purer DNA (ohne Liganden) zeigt die Abbildung 105. Die DNA wird zwischen dem magnetischen Kügelchen und der Oberfläche der Probenkammer immobilisiert und mit einer fest vorgegebenen Zugkraft zunächst leicht ausgestreckt. Wird das Kügelchen nun gedreht, so bildet sich in der DNA eine immer höhere Torsionsspannung, welche nach einigen Drehungen durch das Ausbilden superspiralisierter Bereiche entspannt wird. Weitere Drehungen führen deswegen zu einer proportionalen Verkürzung der DNA, bis das Kügelchen schließlich irgendwann gänzlich zum Boden der Probenkammer gezogen wurde und keine weitere Verkürzung mehr zulässt. Die genaue Verkürzung pro Umdrehung (also die Steigung der Kurve) ist vom Radius der superspiralisierten Struktur, und damit vom effektiven, salzabhängigen Radius der DNA abhängig [143]. Dieses Verhalten führt schließlich zu einer charakteristischen Messkurve („hat curve“), deren Form auch von der angelegten Streckkraft abhängig ist. Je höher diese Kraft, desto größer ist (nach dem WLC-Modell) auch die Länge der DNA ohne Torsion. Bei niedrigen Kräften (kleiner 0,4 pN) ist die Verkürzung beim anschließenden Verdrehen symmetrisch, da die DNA hier superspiralisiert. Bei höheren Kräften dagegen erfolgt noch immer eine Superspiralisierung, wenn die DNA in positiver Drehrichtung (d.h. in der selben Richtung wie ihre Doppelhelix) verdreht wird. Bei entgegengesetzter Drehrichtung verkürzt sich die DNA dagegen bei steigenden Kräften immer weniger, da hier der Doppelstrang zu

denaturieren beginnt [143]. Bei sehr hohen Kräften (größer 3 pN, hier nicht gezeigt) fände auch in beiden Drehrichtungen keine merkliche Verkürzung mehr statt.

Darüber hinaus muss bei diesen Experimenten stets darauf geachtet werden, dass sich nur ein einziges DNA-Molekül am entsprechenden Kügelchen befindet. Sollten mehrere DNA-Stränge vorhanden sein, so verdrehen sich diese bei einer Torsion umeinander, was zu einer viel spitzeren, in Abbildung 106 gezeigten Kurve führt. Die Verkürzung findet hier bereits ab der ersten Kugelumdrehung statt und die Denaturierung der DNA bei hohen Kräften hat hier keinen großen Einfluss mehr auf die Form der Kurven. Die charakteristische Asymmetrie bei höheren Kräften bleibt damit aus, da sich noch immer beide (nun denaturierten) DNA Stränge umeinander winden. Zur Überprüfung der Schnittfunktion von Liganden sollten die Experimente deswegen stets jeweils nur mit einem einzigen DNA-Strang pro Kügelchen, bei niedrigen Kräften sowie bei einer Torsion im positiven Drehsinn erfolgen.

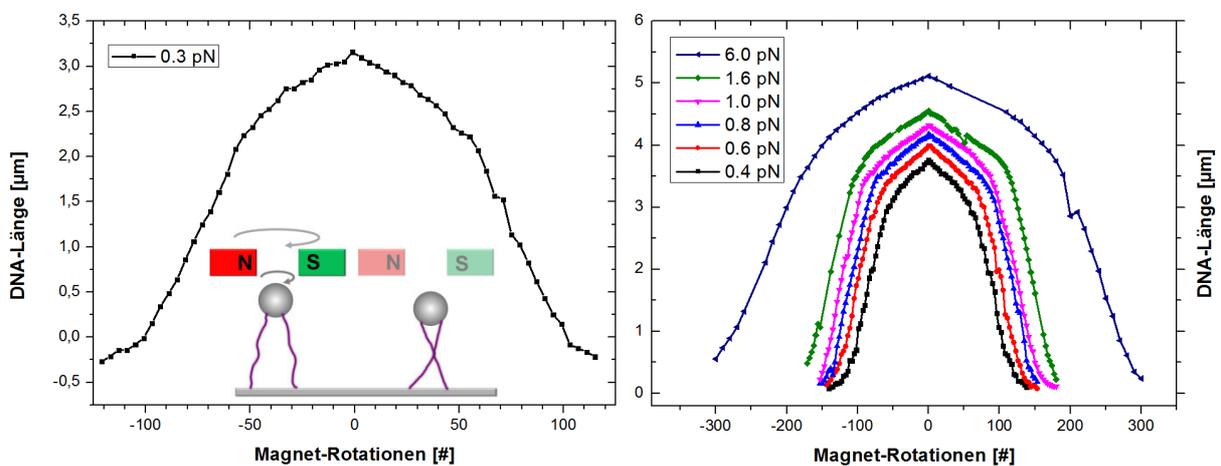


Abbildung 106: Spitze, stets symmetrische Messkurven, wenn sich zwei DNA-Stränge umeinanderwickeln.

Ein Biomolekül mit bekannter und gut erforschter Schnittfunktion, welches in der Natur zum Abbau von Torsionsspannungen in verdrehter DNA dient, ist die Topoisomerase (vgl. Kapitel 2.3.2.). Um Vergleichsmessungen für die Experimente mit zweikernigen Metallkomplexen zu haben, die ähnliche Eigenschaften aufweisen könnten, wurde deswegen zunächst die Topoisomerase IB näher untersucht. In Abbildung 107 ist dieses Experiment gezeigt, wofür zunächst ein DNA-Strang immobilisiert und mit einer festen Haltekraft von 0,3 pN ausgestreckt wurde. Darauf folgte ein Verdrehen – in positiver Drehrichtung – bis sich die DNA-Länge stark verkürzt hatte (Bild oben links, rot markierter Bereich) und ein Anpassen der Streckkraft auf den jeweils gewünschten Wert zwischen 0,2 und 1 pN. Danach wurde die Topoisomerase in die Flüssigkeitszelle gespült und die DNA-Länge als Funktion der Zeit aufgezeichnet.

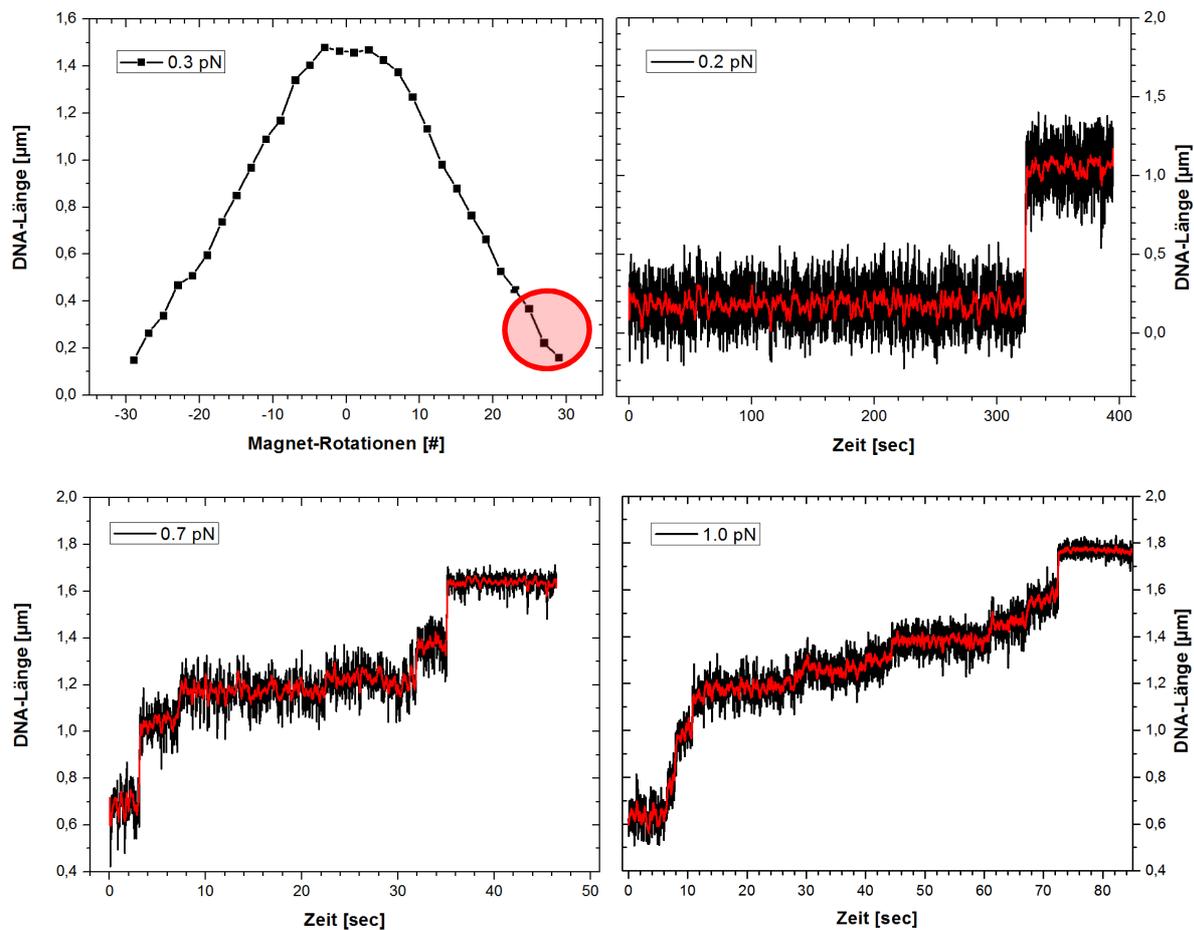


Abbildung 107: Entwinden der applizierten Superspiralität und dadurch verursachte Verlängerung der DNA während der Zugabe von Topoisomerase IB unter verschieden starken Zugkräften.

Hierbei zeigt sich, dass die Länge der DNA (in diskreten Schritten) mit der Zeit zu ihrem ursprünglichen Maximal-Wert zurückkehrt. Die Topoisomerase bewirkt also durch ihren Schnitt im DNA-Rückgrat ein Entspannen der Torsionskräfte und damit ein Auflösen der superspiralisierten Bereiche. Bei diesem Prozess traten umso mehr Einzelschritte auf, je höher die Haltekraft eingestellt wurde, welche die DNA in die Länge zieht, und die komplette Entspiralisierung scheint bei höheren Kräften insgesamt schneller vonstatten gegangen zu sein. Es könnten dort jedoch bereits auch mehrere Topoisomerase-Moleküle angebunden haben, da die Messung hoher Kräfte zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte als diejenige für niedrige Kräfte. In jedem Fall erzeugte die Schnittfunktion der Topoisomerasen eine eindeutig messbare Längenzunahme, welche bei den Metallkomplexen eventuell noch viel stärker ausgeprägt sein sollte. Denn im Gegensatz zu jenen können diese den einmal getätigten Schnitt im Rückgrat vermutlich nicht mehr kovalent versiegeln nachdem eine teilweise Entspannung stattgefunden hat, so dass die Torsion wahrscheinlich in einem Schritt komplett abgebaut wird.

Bei den anschließend durchgeführten Experimenten mit den zweikernigen Metallkomplexen zeigte sich jedoch ein anderes Verhalten. Eine direkte Längenzunahme beim Einleiten der Liganden, wie bei der Topoisomerase, konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr kam es, wie in Abbildung 108 gezeigt, in den meisten Fällen sogar zu einer weiteren Verkürzung. Die Metallkomplexe führen also auch in diesen Experimenten nach dem Anbinden an die DNA in bestimmten Bereichen zu einer Verknäulung und Verknotung, so dass deren Länge insgesamt etwas kürzer ausfällt. Auf die Bildung von superspiralisierten Bereichen bei positiver oder negativer Verdrehung haben die Metallkomplexe dagegen keinen Einfluss. Die Messkurve mit angebondenen Metallkomplexen liegt damit (bei gleicher Streckkraft) zwar insgesamt tiefer als die zuvor aufgenommene Messkurve purer DNA, sie ist jedoch noch immer formgleich und symmetrisch.

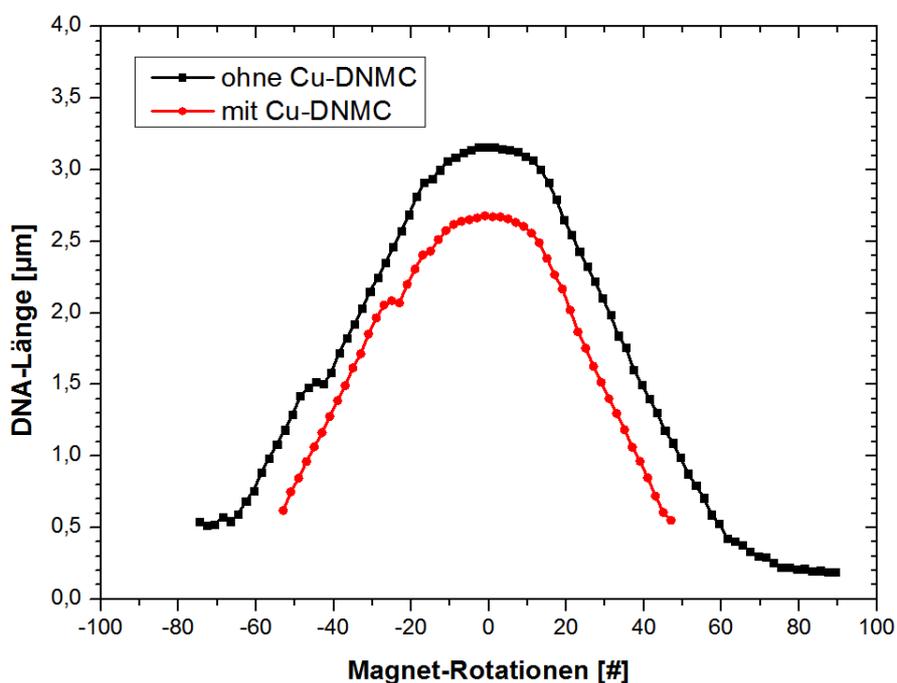


Abbildung 108: Verkürzung der DNA nach der Zugabe von Metallkomplexen.

Tiefergehende Experimente hierzu, mit allen drei Arten von Metallkomplexen und verschiedenen Konzentrationen, wurden von Ying Wang im Rahmen ihrer Master-Arbeit durchgeführt und finden sich ebenda [148]. Nur in sehr seltenen Einzelfällen konnte dabei eine Verlängerung der DNA nach der Zugabe von Metallkomplexen beobachtet werden, doch könnte dies – aufgrund der teilweise sehr langen Einwirkzeit von vielen Stunden – auch aus Beschädigungen der DNA herrühren, die nicht von den Metallkomplexen bewirkt wurden. Sollten die Metallkomplexe also tatsächlich eine Schnittfunktion besitzen, so tritt diese nur mit einer so geringen Wahrscheinlichkeit auf, dass die hier durchgeführten Einzelmolekül-Experimente nicht das geeignete Mittel zum statistischen Nachweis darstellen können.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Experimente mit und an Nanoporen haben sich in den letzten Jahren zu einem rasant wachsenden Forschungszweig verwandelt und ein Ende dieser Entwicklung ist bisher noch lange nicht abzusehen. Künstlich hergestellte Festkörper-Nanoporen und natürlich vorkommende Proteinporen werden so gleichermaßen bereits in vielen technologischen Anwendungen, Biosensoren, Nanofiltern sowie in der theoretischen und experimentellen Grundlagenforschung verwendet um die Translokationsprozesse einerseits genauer zu verstehen und andererseits in praktischen Anwendungen in vielfältiger Weise gezielt auszunutzen. Nicht nur die natürlich ablaufenden Prozesse in Zellen und Zellkernen können durch diese Forschung in Zukunft besser verstanden werden, sondern auch völlig neue Anwendungsgebiete sind durch ein genaueres Verständnis der Nanoporen denkbar.

Eine solche Idee, welche sich als Durchbruch für die personalisierte Medizin erweisen könnte, beschäftigt sich mit der DNA-Sequenzierung durch das nanometergenaue Abscannen eines kompletten DNA-Stranges mit Hilfe solcher Nanoporen. Dies könnte die bisher üblichen, teuren und langwierigen, chemischen Sequenzierungsverfahren einmal ablösen und den langjährigen Traum vom „1000\$-Genom in 24 Stunden“ Realität werden lassen.

Unter dieser Prämisse beschäftigt sich diese vorliegende Arbeit mit DNA-Translokationen durch die verschiedenartigsten Nanoporen. Zunächst konnte so gezeigt werden, dass künstlich gebohrte Siliziumnitrid-Poren einzelne freie DNA-Translokationen zuverlässig detektieren können und sich aus den gemessenen Ionenströmen durch die Nanoporen auch zusätzliche Informationen, wie z.B. über die Konformation der DNA, ablesen lassen. In einem nächsten Schritt wurde zudem bestätigt, dass sich dieses Konzept auch auf viel dünnere Porenmembranen (z.B. Graphen) gut übertragen lässt und dabei analoge Ergebnisse liefert. Im Hinblick auf eine zuverlässige Nanoporen-Sequenzierung erfolgen die dabei beobachteten Translokationen jedoch um viele Größenordnungen zu schnell, was nach einer möglichst genauen Kontrolle der einzelnen Translokationen verlangt. In dieser Arbeit bestand der Ansatz deswegen aus der Kombination der Nanoporen mit einer Optischen Pinzette, wodurch eine einzelne DNA-Translokation gezielt gesteuert und beliebig langsam, oft und präzise durchgeführt werden kann. Die Experimente offenbarten den erheblichen Einfluss des elektroosmotischen Flusses auf die bei der Translokation auftretenden Kräfte, die damit vom Nanoporenmaterial, dem Herstellungsprozess und den Porengrößen ganz entscheidend mitbestimmt werden. Durch eine Kontrolle des elektroosmotischen Flusses, z.B. über die Wahl der Porengröße oder durch eine Lipidbeschichtung, kann so gezielt Einfluss auf den Translokationsprozess genommen werden, was in zukünftigen Experimenten mit Sicherheit von immer höherer Wichtigkeit sein wird.

Anhand von DNA-Ligand-Systemen wurde in dieser Arbeit mit gröberen Strukturen aufgezeigt, dass das Prinzip der Nanoporen-Sequenzierung auch für kleinere Strukturen (das heißt konkret: die einzelnen Basenpaare) einmal gut funktionieren könnte. Proteine von nur wenigen Nanometern Größe konnten an der DNA präzise lokalisiert und durch ihre effektive Ladung zuverlässig voneinander unterschieden werden. Zugleich wurde jedoch auch aufgedeckt, dass eine Skalierung dieses Prinzips, auf die für eine Sequenzierung nötigen Maßstäbe, zu erheblichen experimentellen Herausforderungen führen wird. So zeigten sowohl

die Experimente, als auch begleitende theoretische Simulationen, dass die Translokationsprozesse hoch dynamisch erfolgen und statistisches Rauschen und thermische Molekularbewegungen auf diesen Größenskalen keinesfalls mehr vernachlässigt werden können. Auch neuartige Materialien wie Graphen oder Carbon-Nanomembranen, die einen Ausweg versprechen und die Auflösungsgrenze deutlich herab setzen könnten, sind (wie in dieser Arbeit gezeigt wurde) nicht frei von experimentellen Problemen, so dass sich hier auch in Zukunft noch erheblicher Forschungsbedarf auftut. Die Nanoporensequenzierung bleibt damit nach wie vor eine große Herausforderung, die jedoch keinesfalls unüberwindbar sein muss. Gerade in letzter Zeit hat sich das Forschungsaufkommen zu Nanoporen und Graphen so rasant vergrößert, dass hier in naher Zukunft mit Sicherheit mit vielen Durchbrüchen zu rechnen ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den von Grund auf neu geplanten und synthetisierten zweikernigen Metallkomplexen, deren biophysikalische Eigenschaften es erstmalig näher zu erforschen galt. Die Ergebnisse verschiedener Messmethoden konnten hierfür zu einem einheitlichen Gesamtbild formuliert werden, wonach die Komplexe an DNA binden und dort miteinander wechselwirken. Als Folge ergibt sich ein lokales Verknäulen und Verknoten der DNA, wobei sich eine zusätzliche Schneidefunktion der Komplexe jedoch nicht mit statistisch belastbarer Sicherheit nachweisen ließ. Hier könnten zusätzliche, zukünftige Experimente mit größeren Probenmengen – im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Einzelmolekül-Experimenten – mehr Klarheit bringen und statistische Aussagen über die Schneidewahrscheinlichkeit zulassen.

Literaturverzeichnis

1. J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer, "Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel," *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13770–13773 (1996).
2. A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure," *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156–159 (1970).
3. A. Ashkin, "Optical Levitation by Radiation Pressure," *Appl. Phys. Lett.* **19**, 283 (1971).
4. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt. Lett.* **11**, 288 (1986).
5. A. Ashkin and J. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria," *Science* **235**, 1517–1520 (1987).
6. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane, "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams," *Nature* **330**, 769–771 (1987).
7. S. Chu, J. Bjorkholm, A. Ashkin, and A. Cable, "Experimental Observation of Optically Trapped Atoms," *Phys. Rev. Lett.* **57**, 314–317 (1986).
8. S. Chu, L. Hollberg, J. Bjorkholm, A. Cable, and A. Ashkin, "Three-dimensional viscous confinement and cooling of atoms by resonance radiation pressure," *Phys. Rev. Lett.* **55**, 48–51 (1985).
9. Y. Harada and T. Asakura, "Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime," *Optics Communications* **124**, 529–541 (1996).
10. K. Svoboda and S. M. Block, "Biological Applications of Optical Forces," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247–285 (1994).
11. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane, "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams," *Nature* **330**, 769–771 (1987).
12. A. Ashkin, "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime," *Biophysical Journal* **61**, 569–582 (1992).
13. K. Sakai and S. Noda, "Optical trapping of metal particles in doughnut-shaped beam emitted by photonic-crystal laser," *Electron. Lett.* **43**, 107 (2007).
14. G. Roosen and C. Imbert, "The TEM₀₁ mode laser beam—A powerful tool for optical levitation of various types of spheres," *Optics Communications* **26**, 432–436 (1978).
15. A. C. Richardson, Reihani, S N S, and L. B. Oddershede, "Non-harmonic potential of a single beam optical trap," *Opt Express* **16**, 15709–15717 (2008).
16. M. J. Lang, C. L. Asbury, J. W. Shaevitz, and S. M. Block, "An Automated Two-Dimensional Optical Force Clamp for Single Molecule Studies," *Biophysical Journal* **83**, 491–501 (2002).
17. H. Kress, Stelzer, Ernst H. K., and A. Rohrbach, "Tilt angle dependent three-dimensional-position detection of a trapped cylindrical particle in a focused laser beam," *Appl. Phys. Lett.* **84**, 4271 (2004).
18. K. C. Neuman and S. M. Block, "Optical trapping," *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 2787 (2004).
19. A. Rohrbach, H. Kress, and Stelzer, Ernst H. K., "Three-dimensional tracking of small spheres in focused laser beams: influence of the detection angular aperture," *Opt. Lett.* **28**, 411 (2003).
20. G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky, and A. Libchaber, "Backscattering from a tethered bead as a probe of DNA flexibility," *Appl. Phys. Lett.* **73**, 291 (1998).

21. U. F. Keyser, van der Does, J., C. Dekker, and N. H. Dekker, "Optical tweezers for force measurements on DNA in nanopores," *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 105105 (2006).
22. A. Sischka, C. Kleimann, W. Hachmann, M. M. Schäfer, I. Seuffert, K. Tönsing, and D. Anselmetti, "Single beam optical tweezers setup with backscattered light detection for three-dimensional measurements on DNA and nanopores," *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 63702 (2008).
23. A. R. Carter, G. M. King, and T. T. Perkins, "Back-scattered detection provides atomic-scale localization precision, stability, and registration in 3D," *Opt Express* **15**, 13434–13445 (2007).
24. O. Otto, C. Gutsche, F. Kremer, and U. F. Keyser, "Optical tweezers with 2.5 kHz bandwidth video detection for single-colloid electrophoresis," *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 23710 (2008).
25. S. Knust, A. Spiering, H. Vieker, A. Beyer, A. Gölzhäuser, K. Tönsing, A. Sischka, and D. Anselmetti, "Video-based and interference-free axial force detection and analysis for optical tweezers," *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 103704 (2012).
26. J. Kestin, M. Sokolov, and W. A. Wakeham, *Viscosity of liquid water in the range -8 °C to 150 °C* (American Chemical Society and the American Institute of Physics for the National Bureau of Standards, 1978).
27. A. Sischka, "Kraftspektroskopie und Einzelmoleküldetektion mit der Optischen Pinzette. Dissertation Universität Bielefeld," (2005).
28. S. Knust, "Video-based and interference-free axial force detection and analysis for optical tweezers. Bachelor-Arbeit Universität Bielefeld," (2012).
29. B. M. Lansdorp and O. A. Saleh, "Power spectrum and Allan variance methods for calibrating single-molecule video-tracking instruments," *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 25115 (2012).
30. S. W. Kowalczyk, L. Kapinos, T. R. Blosser, T. Magalhães, P. van Nies, Lim, Roderick Y. H., and C. Dekker, "Single-molecule transport across an individual biomimetic nuclear pore complex," *Nature Nanotech* **6**, 433–438 (2011).
31. "The Nanopore Site. Research Groups," <http://www.thenanoporesite.com/research-groups.html>.
32. J. B. Edel and T. Albrecht, *Engineered nanopores for bioanalytical applications* (William Andrew; Elsevier Science [distributor], 2013).
33. G. M. Skinner, van den Hout, Michiel, O. Broekmans, C. Dekker, and N. H. Dekker, "Distinguishing Single- and Double-Stranded Nucleic Acid Molecules Using Solid-State Nanopores," *Nano Lett.* **9**, 2953–2960 (2009).
34. V. Viasnoff, N. Chiaruttini, J. Muzard, and U. Bockelmann, "Force fluctuations assist nanopore unzipping of DNA," *J. Phys.: Condens. Matter* **22**, 454122 (2010).
35. B. McNally, M. Wanunu, and A. Meller, "Electromechanical Unzipping of Individual DNA Molecules Using Synthetic Sub-2 nm Pores," *Nano Lett.* **8**, 3418–3422 (2008).
36. S. W. Kowalczyk, A. R. Hall, and C. Dekker, "Detection of Local Protein Structures along DNA Using Solid-State Nanopores," *Nano Lett.* **10**, 324–328 (2010).
37. Smeets, R. M. M., S. W. Kowalczyk, A. R. Hall, N. H. Dekker, and C. Dekker, "Translocation of RecA-Coated Double-Stranded DNA through Solid-State Nanopores," *Nano Lett.* **9**, 3089–3095 (2009).
38. M. Wanunu, J. Sutin, and A. Meller, "DNA Profiling Using Solid-State Nanopores: Detection of DNA-Binding Molecules," *Nano Lett.* **9**, 3498–3502 (2009).

39. D. Rodriguez-Larrea and H. Bayley, "Multistep protein unfolding during nanopore translocation," *Nature Nanotech* **8**, 288–295 (2013).
40. M. M. Mohammad and L. Movileanu, "Protein Sensing with Engineered Protein Nanopores," in *Nanopore-Based Technology*, Vol. 870, M. E. Gracheva, ed. (Humana Press, 2012), pp. 21–37.
41. G. Oukhaled, J. Mathé, A.-L. Biance, L. Bacri, J.-M. Betton, D. Lairez, J. Pelta, and L. Auvray, "Unfolding of Proteins and Long Transient Conformations Detected by Single Nanopore Recording," *Phys. Rev. Lett.* **98** (2007).
42. R. Stefureac, L. Waldner, P. Howard, and J. S. Lee, "Nanopore Analysis of a Small 86-Residue Protein," *Small* **4**, 59–63 (2008).
43. R. Wei, V. Gatterdam, R. Wieneke, R. Tampé, and U. Rant, "Stochastic sensing of proteins with receptor-modified solid-state nanopores," *Nature Nanotech* **7**, 257–263 (2012).
44. H.-C. Wu and H. Bayley, "Single-Molecule Detection of Nitrogen Mustards by Covalent Reaction within a Protein Nanopore," *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6813–6819 (2008).
45. T. A. Desai, D. J. Hansford, L. Kulinsky, A. H. Nashat, G. Rasi, J. Tu, Y. Wang, M. Zhang, and M. Ferrari, "Nanopore Technology for Biomedical Applications," *Biomedical Microdevices* **2**, 11–40 (1999).
46. A. R. Hall, S. van Dorp, S. G. Lemay, and C. Dekker, "Electrophoretic Force on a Protein-Coated DNA Molecule in a Solid-State Nanopore," *Nano Lett.* **9**, 4441–4445 (2009).
47. U. F. Keyser, B. N. Koeleman, S. van Dorp, D. Krapf, Smeets, Ralph M. M., S. G. Lemay, N. H. Dekker, and C. Dekker, "Direct force measurements on DNA in a solid-state nanopore," *Nat Phys* **2**, 473–477 (2006).
48. S. van Dorp, U. F. Keyser, N. H. Dekker, C. Dekker, and S. G. Lemay, "Origin of the electrophoretic force on DNA in solid-state nanopores," *Nat Phys* **5**, 347–351 (2009).
49. A. Sischka, A. Spiering, M. Khaksar, M. Laxa, J. König, K.-J. Dietz, and D. Anselmetti, "Dynamic translocation of ligand-complexed DNA through solid-state nanopores with optical tweezers," *J. Phys.: Condens. Matter* **22**, 454121 (2010).
50. A. Spiering, S. Getfert, A. Sischka, P. Reimann, and D. Anselmetti, "Nanopore Translocation Dynamics of a Single DNA-Bound Protein," *Nano Lett.* **11**, 2978–2982 (2011).
51. M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, and D. W. Deamer, "Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules," *Biophys J* **77**, 3227–3233 (1999).
52. E. R. Mardis, "Anticipating the 1,000 dollar genome," *Genome Biol* **7**, 112 (2006).
53. R. F. Service, "GENE SEQUENCING: The Race for the \$1000 Genome," *Science* **311**, 1544–1546 (2006).
54. D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, and J. A. Schloss, "The potential and challenges of nanopore sequencing," *Nat Biotechnol* **26**, 1146–1153 (2008).
55. E. Check Hayden, "Nanopore genome sequencer makes its debut," *Nature* (2012).
56. "The GridION™ system - The GridION™ system - Technology - Oxford Nanopore Technologies," <https://www.nanoporetech.com/technology/the-gridion-system/the-gridion-system>.

57. M. Ayub and H. Bayley, "Single Molecule RNA Base Identification with a Biological Nanopore," *Biophysical Journal* **102**, 429a (2012).
58. W.-W. Li, L. Gong, and H. Bayley, "Single-Molecule Detection of 5-Hydroxymethylcytosine in DNA through Chemical Modification and Nanopore Analysis," *Angew. Chem.* **125**, 4446–4451 (2013).
59. P. M. Das, "DNA Methylation and Cancer," *Journal of Clinical Oncology* **22**, 4632–4642 (2004).
60. Robertson, Joseph W F, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Rubinson, O. V. Krasilnikov, and J. J. Kasianowicz, "Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore," *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8207–8211 (2007).
61. T. Z. Butler, M. Pavlenok, I. M. Derrington, M. Niederweis, and J. H. Gundlach, "Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 20647–20652 (2008).
62. S. Hadi Alijanvand and H. Mobasheri, "Biophysics of Polynucleotide Interactions with OmpF Nanopore Forming Protein, Possible Tool for DNA Sequencing," *Biophysical Journal* **102**, 335a (2012).
63. M. Pavlenok, I. M. Derrington, J. H. Gundlach, M. Niederweis, and J. Mathe, "MspA Nanopores from Subunit Dimers," *PLoS ONE* **7**, e38726 (2012).
64. B. N. Miles, A. P. Ivanov, K. A. Wilson, F. Doğan, D. Japrun, and J. B. Edel, "Single molecule sensing with solid-state nanopores: novel materials, methods, and applications," *Chem. Soc. Rev.* **42**, 15 (2012).
65. A. J. Storm, J. H. Chen, X. S. Ling, H. W. Zandbergen, and C. Dekker, "Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision," *Nat Mater* **2**, 537–540 (2003).
66. Y. Liebes, B. Hadad, and N. Ashkenasy, "Effects of electrons on the shape of nanopores prepared by focused electron beam induced etching," *Nanotechnology* **22**, 285303 (2011).
67. S. Liu, T. D. Yuzvinsky, and H. Schmidt, "Effect of Fabrication-Dependent Shape and Composition of Solid-State Nanopores on Single Nanoparticle Detection," *ACS Nano* **7**, 5621–5627 (2013).
68. N. Patterson, D. P. Adams, V. C. Hodges, M. J. Vasile, J. R. Michael, and P. G. Kotula, "Controlled fabrication of nanopores using a direct focused ion beam approach with back face particle detection," *Nanotechnology* **19**, 235304 (2008).
69. J. Yang, D. C. Ferranti, L. A. Stern, C. A. Sanford, J. Huang, Z. Ren, L.-C. Qin, and A. R. Hall, "Rapid and precise scanning helium ion microscope milling of solid-state nanopores for biomolecule detection," *Nanotechnology* **22**, 285310 (2011).
70. C. A. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, M. D. Fischbein, K. Venta, Z. Luo, Johnson, A. T. Charlie, and M. Drndić, "DNA Translocation through Graphene Nanopores," *Nano Lett.* **10**, 2915–2921 (2010).
71. L. J. Steinbock, O. Otto, C. Chimere, J. Gornall, and U. F. Keyser, "Detecting DNA Folding with Nanocapillaries," *Nano Lett.* **10**, 2493–2497 (2010).
72. W. Li, Bell, Nicholas A. W., S. Hernández-Ainsa, V. V. Thacker, A. M. Thackray, R. Bujdoso, and U. F. Keyser, "Single Protein Molecule Detection by Glass Nanopores," *ACS Nano* **7**, 4129–4134 (2013).
73. E. C. Yusko, J. M. Johnson, S. Majd, P. Prangkio, R. C. Rollings, J. Li, J. Yang, and M. Mayer, "Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls," *Nature Nanotech* **6**, 253–260 (2011).
74. Bell, Nicholas A. W., C. R. Engst, M. Ablay, G. Divitini, C. Ducati, T. Liedl, and U. F. Keyser, "DNA Origami Nanopores," *Nano Lett.* **12**, 512–517 (2012).

75. J. D. Watson and Crick, F. H. C., "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid," *Nature* **171**, 737–738 (1953).
76. "Chemische Struktur der DNA,"
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Chemische_Struktur_der_DNA.svg.
77. F. H. Crick, L. Barnett, S. Brenner, and R. J. Watts-Tobin, "General nature of the genetic code for proteins," *Nature* **192**, 1227–1232 (1961).
78. Wikipedia, "A-DNA, B-DNA and Z-DNA.png," http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png.
79. P. Yakovchuk, E. Protozanova, and M. D. Frank-Kamenetskii, "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix," *Nucleic Acids Res* **34**, 564–574 (2006).
80. M. Mandelkern, J. G. Elias, D. Eden, and D. M. Crothers, "The dimensions of DNA in solution," *J Mol Biol* **152**, 153–161 (1981).
81. R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, and R. E. Dickerson, "Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA," *Nature* **287**, 755–758 (1980).
82. B. Basham, G. P. Schroth, and P. S. Ho, "An A-DNA triplet code: thermodynamic rules for predicting A- and B-DNA," *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6464–6468 (1995).
83. A. H. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, van Boom, J H, van der Marel, G, and A. Rich, "Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution," *Nature* **282**, 680–686 (1979).
84. J. Lipfert, Kerssemakers, Jacob W J, T. Jager, and N. H. Dekker, "Magnetic torque tweezers: measuring torsional stiffness in DNA and RecA-DNA filaments," *Nat Meth* **7**, 977–980 (2010).
85. G. A. King, P. Gross, U. Bockelmann, M. Modesti, Wuite, G. J. L., and Peterman, E. J. G., "Revealing the competition between peeled ssDNA, melting bubbles, and S-DNA during DNA overstretching using fluorescence microscopy," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 3859–3864 (2013).
86. J. van Mameren, P. Gross, G. Farge, P. Hooijman, M. Modesti, M. Falkenberg, Wuite, G. J. L., and Peterman, E. J. G., "Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 18231–18236 (2009).
87. X. Zhang, H. Chen, S. Le, I. Rouzina, P. S. Doyle, and J. Yan, "Revealing the competition between peeled ssDNA, melting bubbles, and S-DNA during DNA overstretching by single-molecule calorimetry," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 3865–3870 (2013).
88. "Three Distinct Transitions Revealed,"
http://www.science.nus.edu.sg/images/corpcorcomms/Strech_YanJie.jpg.
89. A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Ros, and D. Anselmetti, "Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA Binding Ligands," *Biophysical Journal* **88**, 404–411 (2005).
90. C. Bustamante, J. Marko, E. Siggia, and S. Smith, "Entropic elasticity of lambda-phage DNA," *Science* **265**, 1599–1600 (1994).
91. J. F. Marko and E. D. Siggia, "Stretching DNA," *Macromolecules* **28**, 8759–8770 (1995).
92. Y. Lu, B. Weers, and N. C. Stellwagen, "DNA persistence length revisited," *Biopolymers* **61**, 261–275 (2002).
93. C. Hertweck, "Biosynthesis and Charging of Pyrrolysine, the 22nd Genetically Encoded Amino Acid," *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 9540–9541 (2011).

94. I. Wagner and H. Musso, "New Naturally Occurring Amino Acids," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22**, 816–828 (1983).
95. Wikipedia, "AminoAcidball.svg," <http://en.wikipedia.org/wiki/File:AminoAcidball.svg>.
96. C. M. Dobson, "Protein folding and misfolding," *Nature* **426**, 884–890 (2003).
97. X. Xing and C. E. Bell, "Crystal structures of Escherichia coli RecA in a compressed helical filament," *J Mol Biol* **342**, 1471–1485 (2004).
98. R. M. Story, I. T. Weber, and T. A. Steitz, "The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer," *Nature* **355**, 318–325 (1992).
99. M. M. Cox, "Motoring along with the bacterial RecA protein," *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 127–138 (2007).
100. T. Simonson, M. Kubista, R. Sjoback, H. Ryberg, and M. Takahashi, "Properties of RecA-oligonucleotide complexes," *J Mol Recognit* **7**, 199–206 (1994).
101. A. Stasiak and E. H. Egelman, "Structure and function of RecA-DNA complexes," *Experientia* **50**, 192–203 (1994).
102. T. J. Wigle and S. F. Singleton, "Directed molecular screening for RecA ATPase inhibitors," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**, 3249–3253 (2007).
103. A. Pingoud, "Structure and function of type II restriction endonucleases," *Nucleic Acids Research* **29**, 3705–3727 (2001).
104. "Protein Data Bank Eintrag: 1ckq," <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1ckq/summary>.
105. V. Pingoud, W. Wende, P. Friedhoff, M. Reuter, J. Alves, A. Jeltsch, L. Mones, M. Fuxreiter, and A. Pingoud, "On the Divalent Metal Ion Dependence of DNA Cleavage by Restriction Endonucleases of the EcoRI Family," *Journal of Molecular Biology* **393**, 140–160 (2009).
106. N. E. Biolabs, "EcoRI | Datenblatt des Herstellers," <https://www.neb.com/products/R0101-EcoRI>.
107. L. A. Mitscher, "Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents," *Chem. Rev.* **105**, 559–592 (2005).
108. L. F. Liu, S. D. Desai, T. K. Li, Y. Mao, M. Sun, and S. P. Sim, "Mechanism of action of camptothecin," *Ann N Y Acad Sci* **922**, 1–10 (2000).
109. Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, and D. Strumberg, "Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme," *Biochim Biophys Acta* **1400**, 83–105 (1998).
110. J. J. Champoux, "DNA TOPOISOMERASES. Structure, Function, and Mechanism," *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369–413 (2001).
111. D. A. Koster, V. Croquette, C. Dekker, S. Shuman, and N. H. Dekker, "Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB," *Nature* **434**, 671–674 (2005).
112. A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, and M. Uhlen, "The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures," *Electrophoresis* **26**, 501–510 (2005).
113. "RCSB Protein Data Bank Eintrag: 1STP," <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1STP>.
114. P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, and F. R. Salemme, "Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin," *Science* **243**, 85–88 (1989).
115. C. Tanford, "The hydrophobic effect and the organization of living matter," *Science* **200**, 1012–1018 (1978).

116. T. Fester, “amphiphil,” <http://www.scivit.de/glossar/biochemie/amphiphil.html>.
117. “Phospholipide in Wasser.svg,” http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipide_in_Wasser.svg.
118. A. Jesorka and O. Orwar, “Liposomes: technologies and analytical applications,” *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **1**, 801–832 (2008).
119. J. Kim, M. Mosior, L. A. Chung, H. Wu, and S. McLaughlin, “Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids,” *Biophys J* **60**, 135–148 (1991).
120. W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans, “Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers,” *Biophys J* **79**, 328–339 (2000).
121. “Website des Herstellers,” <http://avantilipids.com/>.
122. T. Jany, “Molekulare Erkennung von Biomolekülen mit maßgeschneiderten Metallkomplexen. Dissertation Universität Bielefeld,” (2012).
123. P. Angelova, H. Vieker, N.-E. Weber, D. Matei, O. Reimer, I. Meier, S. Kurasch, J. Biskupek, D. Lorbach, K. Wunderlich, L. Chen, A. Terfort, M. Klapper, K. Müllen, U. Kaiser, A. Götzhäuser, and A. Turchanin, “A Universal Scheme to Convert Aromatic Molecular Monolayers into Functional Carbon Nanomembranes,” *ACS Nano* **7**, 6489–6497 (2013).
124. A. Turchanin and A. Götzhäuser, “Carbon nanomembranes from self-assembled monolayers: Functional surfaces without bulk,” *Progress in Surface Science* **87**, 108–162 (2012).
125. A. Turchanin, A. Beyer, C. T. Nottbohm, X. Zhang, R. Stosch, A. Sologubenko, J. Mayer, P. Hinze, T. Weimann, and A. Götzhäuser, “One Nanometer Thin Carbon Nanosheets with Tunable Conductivity and Stiffness,” *Adv. Mater.* **21**, 1233–1237 (2009).
126. C. T. Nottbohm, A. Turchanin, A. Beyer, R. Stosch, and A. Götzhäuser, “Mechanically Stacked 1-nm-Thick Carbon Nanosheets: Ultrathin Layered Materials with Tunable Optical, Chemical, and Electrical Properties,” *Small* **7**, 874–883 (2011).
127. M. Scarselli, P. Castrucci, and M. de Crescenzi, “Electronic and optoelectronic nano-devices based on carbon nanotubes,” *J. Phys.: Condens. Matter* **24**, 313202 (2012).
128. K. S. Novoselov, “Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films,” *Science* **306**, 666–669 (2004).
129. C. Lee, X. Wei, J. W. Kysar, and J. Hone, “Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene,” *Science* **321**, 385–388 (2008).
130. R. R. Nair, P. Blake, A. N. Grigorenko, K. S. Novoselov, T. J. Booth, T. Stauber, Peres, N. M. R., and A. K. Geim, “Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene,” *Science* **320**, 1308 (2008).
131. A. C. Ferrari, J. C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K. S. Novoselov, S. Roth, and A. K. Geim, “Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers,” *Phys. Rev. Lett.* **97** (2006).
132. F. Bonaccorso, A. Lombardo, T. Hasan, Z. Sun, L. Colombo, and A. C. Ferrari, “Production and processing of graphene and 2d crystals,” *Materials Today* **15**, 564–589 (2012).
133. M. Firmkes, D. Pedone, J. Knezevic, M. Döblinger, and U. Rant, “Electrically Facilitated Translocations of Proteins through Silicon Nitride Nanopores: Conjoint and Competitive Action of Diffusion, Electrophoresis, and Electroosmosis,” *Nano Lett.* **10**, 2162–2167 (2010).

134. M. M. Kohonen, M. E. Karaman, and R. M. Pashley, "Debye Length in Multivalent Electrolyte Solutions," *Langmuir* **16**, 5749–5753 (2000).
135. F. Lottspeich and H. Zorbas, *Bioanalytik* (Spektrum Akademischer Verlag, 1998).
136. S. Ghosal, "Electrokinetic-flow-induced viscous drag on a tethered DNA inside a nanopore," *Phys. Rev. E* **76**, 61916 (2007).
137. N. Di Fiori, A. Squires, D. Bar, T. Gilboa, T. D. Moustakas, and A. Meller, "Optoelectronic control of surface charge and translocation dynamics in solid-state nanopores," *Nature Nanotech* (2013).
138. N. Laohakunakorn, S. Ghosal, O. Otto, K. Misiunas, and U. F. Keyser, "DNA Interactions in Crowded Nanopores," *Nano Lett.* **13**, 2798–2802 (2013).
139. A. Spiering, "Kraftspektroskopie- und Nanoporen-Experimente mit der Optischen Pinzette. Diplomarbeit Universität Bielefeld," (2010).
140. G. F. Schneider, V. E. Calado, H. Zandbergen, Vandersypen, Lieven M. K., and C. Dekker, "Wedging Transfer of Nanostructures," *Nano Lett.* **10**, 1912–1916 (2010).
141. M. I. Angelova, S. Soléau, P. Méléard, F. Faucon, and P. Bothorel, "Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications," in *Trends in Colloid and Interface Science VI*, Vol. 89, C. Helm, M. Lösche, and H. Möhwald, eds. (Steinkopff, 1992), pp. 127–131.
142. "Atomic Force Microscope,"
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Atomic_force_microscope_block_diagram_%28de%29.svg.
143. T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, "Behavior of Supercoiled DNA," *Biophysical Journal* **74**, 2016–2028 (1998).
144. Smeets, Ralph M. M., U. F. Keyser, D. Krapf, M.-Y. Wu, N. H. Dekker, and C. Dekker, "Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through Solid-State Nanopores," *Nano Lett.* **6**, 89–95 (2006).
145. W. Si, J. Sha, L. Liu, Y. Qiu, and Y. Chen, "Effect of nanopore size on poly(dT)₃₀ translocation through silicon nitride membrane," *Sci. China Technol. Sci.* **56**, 2398–2402 (2013).
146. F. Traversi, C. Raillon, S. M. Benameur, K. Liu, S. Khlybov, M. Tosun, D. Krasnozhan, A. Kis, and A. Radenovic, "Detecting the translocation of DNA through a nanopore using graphene nanoribbons," *Nature Nanotech* **8**, 939–945 (2013).
147. Susan Haji Samo, "DNA-Ligand Complex Force Spectroscopy with Optical Tweezers. Master-Arbeit Universität Bielefeld," (2012).
148. Ying Wang, "Testing the Cutting-Functionality of Cobalt-, Copper- and Nickel-Complexes with Magnetic Tweezers. Master-Arbeit Universität Bielefeld," (2013).

Danksagung

Wissenschaftliche Forschung ist in der heutigen Zeit zweifelsohne (und zum Glück) kein Einzelkampf mehr, sondern interdisziplinäre Teamarbeit. Wie im Mannschaftssport leistet zwar auch hierbei jeder seinen ganz individuellen Beitrag, doch kann dies umso besser und erfolgreicher funktionieren, je eingespielter das Team auftritt und je facettenreicher seine Zusammensetzung ausfällt.

In diesem Sinne bin ich einer großen Anzahl von Menschen zu tiefem Dank verpflichtet, die in dieser Mannschaft mitgespielt haben und ohne die an ein Gelingen dieser Arbeit niemals zu denken gewesen wäre. Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti möchte ich hierbei besonders und zuvorderst danken, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaft“ diese Doktorarbeit durchzuführen. Als Teamchef, Betreuer und „Mannschaftskapitän“ versteht er es wie kein anderer, alle Mitarbeiter durch Neugier zu motivieren und so jedes neue Experiment mit Spannung und Leben zu erfüllen. Auch hat er niemals Kosten oder Mühen gescheut, die einem erfolgreichen Experiment hätten entgegenstehen können und stand allen Mitarbeitern stets mit neuen Ideen, Rat und Tat, internationalen Kontakten und viel Engagement zur Seite.

Meinem Betreuer, Kollegen, Mitstreiter, „Trainingspartner“ und Freund Dr. Andy Sischka möchte ich ebenso herzlich danken für die jahrelange Betreuung, Zusammenarbeit, Geduld, Hilfe und tatkräftige Unterstützung. Ohne ihn und seine Erfahrung wäre eine Arbeit mit der Optischen Pinzette oder mit den Nanoporen wohl niemals möglich gewesen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe D1 möchte ich mich bedanken für die ausnahmslos gute Arbeitsatmosphäre, die hilfreichen Diskussionen, Anregungen und die gemeinsame Zeit. Die interdisziplinäre Zusammensetzung habe ich stets genossen und als besondere Bereicherung empfunden: Wenn man von sich aus einmal nicht mehr weiterkam, hatte man spätestens nach einem Rundgang durch die Abteilung tausend neue Ideen und Lösungen für die eigenen Experimente gesammelt. Während meiner Zeit hier habe ich viel von euch gelernt und viel mit euch gelacht... zwei der wichtigsten Dinge, die das Leben überhaupt erst lebenswert machen. Dafür danke ich euch allen von Herzen! Insbesondere den „stützenden Säulen“ der Abteilung, Dr. Katja Tönsing, Christoph Pelargus, Gabi Krome, Karin Lacey und Helene Schellenberg für die Unterstützung bei chemischen, biologischen, technischen, experimentellen, bürokratischen und allen anderen denkbaren und undenkbaeren Angelegenheiten.

Direkt zu dieser Arbeit beigetragen haben: Lukas Galla durch seine enge Zusammenarbeit bei allen Experimenten mit Lipiden; Alexander Harder durch sein Wissen, Können und die Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop; Sebastian Knust durch die technische Einführung der Videoauswertung an der Optischen Pinzette und durch Experimente mit Graphen; Ying Wang durch die Zusammenarbeit und Weiterführung der Experimente mit der Magnetischen Pinzette; Susan Haji Samo und Roland Hillmann durch ihre fortführenden Streckexperimente mit der Optischen Pinzette; Lukas Bogunovic durch theoretische Simulationen und Christoph Pelargus durch das unermüdliche Bohren immer neuer Nanoporen. Ich danke euch!

Für die Kooperation und gemeinsamen Projekte danke ich zudem der Theoretischen Physik (Prof. Dr. Peter Reimann, Dr. Sebastian Getfert, Andreas Meyer), der Anorganischen Chemie (Prof. Dr. Thorsten Glaser, Dr. Thomas Jany), der Physik Supramolekularer Systeme (Prof. Dr. Armin Gölzhäuser, PD Dr. André Beyer, Henning Vieker), sowie Prof. Dr. Thomas Huser für die Übernahme des Zweitgutachtens zu dieser Arbeit.

Meine ehemaligen Physiklehrer, insbesondere Jochen Kupsch, haben stets nicht nur das Wissen, sondern vor allem die Begeisterung, den Spaß und die Freude an Physik vermittelt und weitergeben können. Besonders in diesem Fach kann man Schüler leider sehr schnell abschrecken, so dass meinen ausnahmslos guten Physiklehrern an dieser Stelle für ihre großartige Arbeit ausdrücklich gedankt werden soll.

Schließlich gilt mein besonderer Dank auch meiner Familie. Meinen Eltern und Großeltern, die mich stets unterstützt haben, sei es seelisch, moralisch, fachlich und nicht zuletzt auch finanziell. Genauso viel Geduld hat mir auch meine liebe Frau Anna-Lena entgegengebracht. Ohne Ausnahme unterstützte sie mich stets, auch wenn meine Nervosität und Zerstreuung über dem „Großprojekt Doktorarbeit“ so manches Mal die Überhand zu gewinnen drohten. Ihr danke ich in tiefer Liebe.

Anhang

Publikationsliste

1. “*Video-based and Interference-free Axial Force Detection and Analysis for Optical Tweezers*”; S. Knust, A. Spiering, H. Vieker, A. Beyer, A. Götzhäuser, K. Tönsing, A. Sischka and D. Anselmetti; *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 103704, (2012)
2. „*Single-Molecule DNA Translocation Through Si₃N₄- and Graphene Solid-State Nanopores*“; A. Spiering, S. Knust, S. Getfert, A. Beyer, K. Rott, L. Redondo, K. Tönsing, P. Reimann, A. Sischka and D. Anselmetti; *Nanopores for Bioanalytical Applications*, Joshua Edel and Tim Albrecht (Editors); The Royal Society of Chemistry, Pages 99-105; ISBN: 978-1-84973-416-5, (2012)
3. “*Nanopore Translocation Dynamics of a Single DNA-Bound Protein*”; A. Spiering, S. Getfert, A. Sischka, P. Reimann and D. Anselmetti; *NANO Letters* **11**, 2978-2982, (2011)
4. “*Dynamic Translocation of Ligand-Complexed DNA Through Solid-State Nanopores with Optical Tweezers*”; A. Sischka, A. Spiering, M. Khaksar, M. Laxa, J. König, K.-J. Dietz and Dario Anselmetti; *Journal of Physics: Condensed Matter* **22**, 454121, (2010)
5. “*Binding Kinetics of Bisintercalator Triostin A with Optical Tweezers Force Mechanics*”; Ch. Kleimann, A. Spiering, A. Sischka, K. Tönsing, N. Sewald, U. Diederichsen and D. Anselmetti; *Biophysical Journal* **97**, 2780-2784, (2009)

in Vorbereitung bzw. eingereicht:

6. “*Rational Design of a Cytotoxic Dinuclear Cu₂ Complex that Binds at the DNA Phosphate Backbone*“; Th. Jany, A. Moreth, A. Sischka, A. Spiering, A. Harder, S. Haji Samo, Y. Wang, A. Stammeler, H. Bögge, G. Fischer von Mollard, D. Anselmetti and Th. Glaser, submitted (2013)
7. “*Lipid Bilayer Coating of Nanopores affects the DNA Threading Force*” (working title); L. Galla, A. Spiering, A. Sischka, M. Mayer, A. Hall and D. Anselmetti; in preparation (2014)

Konferenzbeiträge: Poster

1. “*Characterization of Single Translocating DNA-bound Proteins through Nanopores with Optical Tweezers*”; A. Spiering, A. Sischka, K. Tönsing, K. Rott and D. Anselmetti; Annual Meeting of the German Biophysical Society, **Bochum**, (2010)
2. “*Optical Tweezers Measurements of Threading Individual DNA and DNA-Ligand-Complexes through Solid-State Nanopores*”; A. Spiering, A. Sischka, K. Tönsing, I. Seuffert, Th. Gisler, K.-J. Dietz and D. Anselmetti; DPG Frühjahrstagung, **Regensburg**, (2010)
3. “*Characterization of Single Translocating DNA-bound Proteins through Nanopores with Optical Tweezers*”; A. Spiering, A. Sischka, K. Tönsing, K. Rott and D. Anselmetti; Optical Tweezers Symposium, **Berlin**, (2010)
4. “*Dynamics of a Single DNA-bound Protein Translocating through a Nanopore*”; A. Spiering, S. Getfert, A. Sischka, K. Tönsing, K. Rott, P. Reimann and D. Anselmetti; DPG Frühjahrstagung, **Dresden**, (2011)
5. “*Nanopore Translocation Dynamics of a Single DNA-Bound Protein*”; A. Spiering, S. Getfert, A. Sischka, P. Reimann and D. Anselmetti; SFB-613 Workshop, **Loccum**, (2011)
6. “*Nanopore Translocation Dynamics of a Single DNA-Bound Protein*”; A. Spiering, S. Getfert, A. Sischka, K. Tönsing, K. Rott, P. Reimann and D. Anselmetti; NanoBioVIEWS Joint Meeting, **Berlin**, (2011)
7. “*Molecular Recognition of DNA with Tailor-Made Metal Complexes investigated with Nanopores and Optical Tweezers*”; T. Jany, Th. Glaser, A. Spiering and A. Sischka; SFB-613 International Symposium, **Bielefeld**, (2012)
8. “*Video-based Axial Force Analysis for 3D Quantitative Optical Tweezers*”; S. Knust, A. Sischka, A. Spiering and D. Anselmetti; DPG Frühjahrstagung, **Berlin**, (2012)
9. “*Nanopore Translocation Dynamics of a Single DNA-Bound Protein*”; A. Spiering, S. Getfert, A. Sischka, K. Tönsing, K. Rott, P. Reimann and D. Anselmetti; Zing Conference 2012: Nanopores, **Lanzarote Spanien**, (2012)
10. “*Single Molecule Translocation through Surface-Modified Nanopores*”; A. Spiering, L. Galla, K. Tönsing, A. Beyer, A. Sischka, Ch. Pelargus, A. Götzhäuser, M. Mayer and D. Anselmetti; 1st Bielefeld Workshop on Nanolayers and Artificial Membranes, **Bielefeld**, (2013)

Lebenslauf

• Persönliche Daten

André Spiering: geboren am 08.09.1982 in Zittau, Deutschland

• Schulbildung

1989 bis 1993: 18. Grundschule Hellersdorf von Berlin
1993 bis 1995: 1. Grundschule Fredersdorf-Vogelsdorf (Brandenburg)
1995 bis 1999: Einstein-Gymnasium Neuenhagen bei Berlin
Fachoberschulreife (sehr gut)
1999 bis 2003: Oberstufenkolleg der Universität Bielefeld
Abitur (sehr gut)
Anerkennung des Vordiploms Physik der Universität Bielefeld

• Zivildienst

2003 bis 2004: Kolpinghaus Bielefeld

• Studium

2004 bis 2010: Diplomstudiengang Physik an der Universität Bielefeld
Abschluss: Diplom (sehr gut)
2009 bis 2010: Diplomarbeit Physik an der Universität Bielefeld
„Kraftspektroskopie- und Nanoporen-Experimente mit der Optischen Pinzette“ (sehr gut)
Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik & Angewandte Nanowissenschaft“, Prof. Dr. Dario Anselmetti, Bielefeld

• Promotion

seit 08/2010: Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorarbeit
Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik & Angewandte Nanowissenschaft“, Prof. Dr. Dario Anselmetti, Bielefeld