

DNA ALS KLEBSTOFF-
UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG UND WECHSELWIRKUNG
MIT GOLD-NANOPARTIKELN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ulrike Karin Rehn
geb.: 02.11.1975 in: Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Gösele, MPI für Mikrostrukturphysik, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. C. Hübner, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Halle (Saale), 20. 04. 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008558

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008558>]

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 3 |
| 2 | Problemstellung und Ziel der Arbeit | 5 |
| 3 | Grundlagen | 7 |
| 3.1 | Desoxyribonukleinsäure (DNA) | 7 |
| 3.2 | Goldkolloide | 11 |
| 3.2.1 | Kolloidchemische Aspekte | 11 |
| 3.2.2 | Optische Aspekte | 15 |
| 3.3 | DNA auf Goldoberflächen | 18 |
| 3.3.1 | DNA-erzeugte Partikelnetzwerke | 18 |
| 3.3.2 | Eigenschaften der DNA auf Gold | 19 |
| 3.3.3 | Optische Eigenschaften der Partikelnetzwerke | 22 |
| 3.3.4 | Anwendungen, Weiterentwicklungen | 24 |
| 4 | Methoden | 25 |
| 4.1 | Ausgangsmaterial | 25 |
| 4.2 | Generieren von Partikelnetzwerken | 26 |
| 4.3 | Untersuchungsmethoden | 29 |
| 4.4 | Schmelzen der DNA | 30 |
| 5 | DNA als Klebstoff | 32 |
| 5.1 | Nachweis der Verbindung | 32 |
| 5.2 | Morphologie der Hybride | 35 |
| 5.2.1 | Einkomponenten-Systeme | 35 |
| 5.2.2 | Mehrkomponenten-Systeme | 40 |
| 5.2.3 | Simulation der Extinktions-Spektren | 42 |
| 5.3 | Umkehrbarkeit der Verbindung | 47 |
| 6 | Wechselwirkungen DNA - Partikel | 55 |
| 6.1 | Einzelsträngige DNA | 55 |
| 6.2 | Einfluß der Kationen | 58 |
| 6.2.1 | Monovalente Kationen: Natrium | 58 |
| 6.2.2 | Divalente Kationen: Magnesium | 60 |
| 6.2.3 | Unspezifische Aggregation von Partikeln | 62 |
| 6.2.4 | Wirkungsweise von Ionen | 64 |
| 6.3 | Alternative: Protein - Protein - Bindung | 67 |
| 6.4 | Die Persistenzlänge | 70 |

| | | |
|----------|---------------------------------------|-------------|
| 7 | Ausblick und Schlußfolgerungen | 72 |
| 8 | Zusammenfassung | 76 |
| | Literaturverzeichnis | I |
| | Veröffentlichungen | VIII |
| | Danksagung | XI |
| | Erklärung | XII |
| | Lebenslauf | XIII |

1. Einleitung

In den letzten Jahren zeichnet sich insbesondere durch die Entwicklungen in der Nanotechnologie ab, daß verschiedene wissenschaftliche Gebiete, wie Chemie, Biologie, Physik und Werkstoffwissenschaften wieder enger miteinander verzahnt werden. So zieht ein Molekül wie die DNA (Desoxyribonukleinsäure) nicht nur das Interesse der Biologen und Mediziner auf sich, sondern wird auch für andere Wissensgebiete durch seine spezifischen Eigenschaften zunehmend attraktiv. Hierbei spielt die genetische Information keine Rolle. Die wichtigste Eigenschaft der DNA ist die Komplementarität: Zwei Einzelstränge werden spezifisch miteinander gebunden, da nur jeweils zwei der vier möglichen Basen miteinander binden können. Für die volle Funktionsfähigkeit der DNA in der Zelle sind aber eine Reihe von weiteren Molekülen, insbesondere von Proteinen notwendig, die auch in künstlichem Umfeld genutzt werden können und damit als „Werkzeuge“ zur Modifikation zur Verfügung stehen. Die abiologische Nutzung der DNA wurde und wird durch die Möglichkeit, die DNA künstlich herzustellen [1, 2], wesentlich beschleunigt. Künstlich bedeutet, daß die Reihenfolge der Basen, wie auch die Länge der Sequenz festgelegt werden kann. Damit ergibt sich ein weiterer Vorteil: Mit einem geringem Aufwand lassen sich viele unterschiedliche „Bausteine“ herstellen, die sich in ihrer Sequenz und Länge voneinander unterscheiden.

Die unterschiedlichen Anwendungen von DNA, die im folgenden vorgestellt werden, sind nicht isoliert voneinander zu betrachten, sondern verbinden häufig verschiedene Aspekte miteinander. So ist auch für die Zukunft zu erwarten, daß sich einige bisher isolierte Entwicklungen zu neuen Anwendungen verknüpfen werden.

Die Erzeugung von zwei- und dreidimensionalen Strukturen [3, 4, 5, 6, 7], die ausschließlich aus DNA bestehen, nutzt die künstlich hergestellten DNA-Sequenzen in besonderem Maße. Dabei werden nicht nur lineare Moleküle verwendet, sondern Sequenzen erzeugt, die mit mehr als einem weiteren Molekül binden können und damit zu einer zwei- oder dreidimensionalen Vernetzung führen. Neben dieser Erzeugung von Strukturen aus DNA-Molekülen, werden künstliche Sequenzen auch im so genannten „Biocomputing“ verwendet: Die DNA wird für Rechenaufgaben eingesetzt. Die Idee, DNA dafür zu verwenden, bestand bereits, bevor die technischen Möglichkeiten dies erlaubten. Letztendlich gelang es 1994 L. Adleman [8], das Problem des Hamilton'schen Weges, das mit dem Problem eines Handlungsreisenden verwandt und sehr schwer mit herkömmlichen Computern zu lösen ist, mittels DNA zu lösen. Seitdem wurde dieses Gebiet hinsichtlich Umsetzbarkeit und Funktionsweise weiter ausgebaut [9, 10, 11] und wird mittlerweile auch von Firmen wie Intel aufgegriffen.

Ein weiteres Gebiet nutzt DNA eher indirekt als Vorlage, z.B. zur Herstellung und Organisation von Nanopartikeln zu Stäbchen mit speziellen optischen Eigenschaften (CdSe [12]) oder z.B. in elektronischen Anwendungen durch Wachstum von leitenden (Ag [13, 14], Cu [15] Pt [16] Pd [17]) oder halbleitenden (CuS [18]) Clustern entlang der DNA. Besonderes Interesse gilt der

Anordnung der DNA zwischen Elektroden [13,19]

DNA-Moleküle werden für „Nanomaschinen“ ausprobiert, die als „Scheren“, „Motoren“, „Pinzetten“, wiederbeschreibbare Speicherbausteine oder „Getriebe“ eingesetzt werden [20, 21, 22, 23, 24] oder sogar DNA-Stücke auf einer „DNA-Schiene“ transportieren können [25]. Für diese Anwendungen werden auch andere Mechanismen oder Moleküle aus der Zelle adaptiert und führen damit zu einer höheren Komplexität und Funktionsbreite.

Näher an der Biologie und Medizin sind im weitesten Sinne Sensoren auf Basis der DNA bzw. DNA-Chips [26, 27, 28, 29, 30]. Eine zunehmende Rolle spielen DNA-vermittelte Selbst-Assemblierungen, z.B. von Kohlenstoff-Nanoröhrchen [31, 32], Gold-Nanostäbchen [33] oder von Molekülen [34]. In der Biologie werden seit langem Goldpartikel mit einem Durchmesser von ca. 2 nm für Markierungszwecke in Geweben benutzt und so war es naheliegend, diese Goldpartikel durch die DNA anzuordnen [35,36] oder die Struktur der DNA bzw. deren Anordnung als Vorlage zur Organisation von Goldpartikeln zu nutzen [37]. Die optischen Eigenschaften der Goldkolloide werden unter anderem von deren Abstand zueinander bzw. der Größe gebildeter Aggregate bestimmt. So zeigten Mirkin et al. [35], daß sich die Farbe einer Lösung aus 13 nm Goldpartikeln von rot nach bläulich-violett ändert, wenn diese Partikel durch die DNA miteinander verbunden werden. Diese Veränderung, die sich sowohl mit dem bloßen Auge beobachten ließ (ein Novum im Vergleich zu den anderen vorgestellten Beispielen!), als auch mittels UV/VIS-Spektroskopie zu messen war, eröffnete einen weiteren Weg, DNA-basierte Sensoren zu bauen. Eine bisher ungelöste Herausforderung, ein neues Thema, das sich nahtlos anschließt, ist die Frage, ob man zukünftig Nanopartikel, ob aus Gold oder anderen Materialien und gleich welche Geometrie diese haben, durch DNA gerichtet, also zu geordneten dreidimensionalen Strukturen verbinden kann, ob von einer Unterlage ausgehend [38, 39] oder in Lösung. Die Nanopartikel oder -strukturen stellen hier die Bausteine dar, die DNA das „Bindemittel“, den Klebstoff. Die vorliegende Arbeit betrachtet die DNA aus dieser Perspektive als Klebstoff und untersucht grundlegende Aspekte, die für eine erfolgreiche Nutzung unabdingbar sind.

2. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Goldkolloiden, die durch DNA zu Partikelnetzwerken, den so genannten DNA-Hybrid-Materialien verbunden werden. Es handelt sich dabei um eine DNA-vermittelte Selbstorganisation der Partikel. Am Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik gibt es vielfältige Möglichkeiten zur Herstellung von Mikro- und Nanostrukturen aus unterschiedlichsten Materialien. Mit dieser Arbeit sollte ein für das Institut komplett neues Gebiet erschlossen werden, das zukünftig bei geeigneten Materialien durch DNA-vermittelte Selbstorganisation einen größeren und flexibler gestaltbaren Spielraum der Nutzung ermöglicht. Dabei ist beispielsweise an eine Nutzung dieser Hybrid-Materialien in Optik und Sensorik zu denken.

Wichtig für eine Nutzung der DNA ist vor allem das Verständnis der Mechanismen zur Erzeugung der Partikelnetzwerke einerseits und das Verständnis der Wechselwirkung zwischen DNA und Partikel andererseits. Betrachtet man die Literatur, so zeigt sich, daß für die Erklärung von Beobachtungen immer wieder die Hybridisierung bzw. deren Bedingungen herangezogen werden. Die Hybridisierung stellt den Schlüssel zur Verbindung der Partikel dar, da hier die Einzelstränge der DNA auf den Partikeln zum Doppelstrang binden und damit zur Verknüpfung der Partikel führen. Allerdings kann man nicht immer unterscheiden, ob bestimmte Ergebnisse ursächlich mit den Partikeln bzw. dem Partikelnetzwerk zusammenhängen oder „nur“ die Hybridisierung betreffen. Das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen DNA und Partikel wird durch diese Effektüberlagerung wesentlich beeinträchtigt und verhindert eine effiziente Erzeugung der Hybrid-Materialien. Ein weiteres Problem besteht darin, daß für die Hybridisierung nach Erfahrungen aus der Molekularbiologie Salzionen notwendig sind, die ungeschützten kolloidalen Partikel aber in diesen Salzlösungen irreversibel aggregieren. Der kritische Schritt ist das Einsalzen. Dabei wird schrittweise die Salzkonzentration in der mit DNA funktionalisierten Goldsole erhöht, um den nötigen Salzgehalt für die Hybridisierung zu erhalten. Sind die Partikel nicht ausreichend geschützt, kommt es zum Aggregieren der Partikel, und die Proben sind unbrauchbar.

Folglich wird die Effizienz, Partikel durch DNA zu verbinden, im wesentlichen durch zwei Faktoren limitiert: durch die Hybridisierungsrate und durch das Einsalzen. Das Ziel der Arbeit bestand darin, eine Methode zu entwickeln, die nicht von diesen beiden Faktoren abhängig ist. Die DNA-Partikel-Hybride werden unter einem neuen Blickwinkel untersucht und dafür speziell Goldkolloide als Beispielmateriale verwendet. Die entwickelte Methode dient als Brückenschlag, um die Erkenntnisse zu Mechanismen und Wechselwirkungen für eine effizientere Erzeugung von DNA-Hybrid-Materialien zu nutzen.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Teile: Zunächst werden in dem Kapitel Grundlagen die wesentlichen Aspekte der beiden Komponenten, also der DNA auf der einen Seite und der Partikel auf der anderen Seite, zusammengefasst. Neben biologischen Grundlagen zur DNA werden kolloidchemische und optische Eigenschaften der Goldpartikel erläutert. Es folgt der Methoden-Teil. Der sich anschließende Ergebnis-Teil untergliedert sich in zwei Kapitel. Im ersten Kapitel steht die DNA als „Werkstoff“ Klebstoff im Mittelpunkt. Dabei geht es um die Fragen: Wie können die Partikel verbunden werden? Was ist das Resultat? Handelt es sich um eine lösbare Verbindung? Demnach werden hier der Nachweis der Verbindung, die Morphologie der Hybride und das Schmelzen der DNA in den DNA-Partikel-Hybriden untersucht. Das sind die Voraussetzungen, um die DNA als Klebstoff zu nutzen, aber auch, um die Wechselwirkungen zwischen DNA und Partikel zu untersuchen, womit sich das folgende Kapitel beschäftigt. In diesem zweiten Teil geht es im wesentlichen um die eigentliche Ursache für die Notwendigkeit von Salzionen zur Verknüpfung von Partikeln. Nachfolgend werden Schlußfolgerungen aus den bisherigen Ergebnissen gezogen und auf den Vorschlag für die künftige Gestaltung der DNA angewendet, sowie erste Ergebnisse zum DNA-vermittelten Verbinden von Nanostrukturen mit Goldkolloiden vorgestellt.

3. Grundlagen

Im vorliegenden Kapitel werden die beiden Komponenten der Hybrid-Materialien vorgestellt. Der erste Abschnitt befaßt sich mit dem Aufbau der DNA, wichtigen Vorgängen, wie dem Hybridisieren und Schmelzen der DNA und der Frage deren Verfügbarkeit. Es schließen sich die Grundlagen zu den Goldkolloiden an, wobei hier zum einen kolloidchemische Eigenschaften erläutert werden. Diese spielen für das Verständnis der Wechselwirkung zwischen DNA und Partikel eine wichtige Rolle. Da die DNA-Partikel-Hybride im wesentlichen mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht werden, ist zum anderen die Kenntnis der optischen Eigenschaften der Partikel eine wichtige Voraussetzung. Das Kapitel schließt mit dem Abschnitt, der sich mit den bisherigen Kenntnissen zu DNA-Goldpartikel-Hybriden befaßt. Es wird besonderer Wert auf die bisherigen Erkenntnisse und Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen DNA und Partikel gelegt.

3.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Desoxyribonukleinsäure wird im Deutschen mit DNS abgekürzt. Doch hat sich international in den letzten Jahren die Abkürzung DNA vom englischen *deoxyribonucleic acid* zunehmend durchgesetzt, um Mehrfachbezeichnungen für die selbe Substanz zu vermeiden. In dieser Arbeit werden Oligonucleotide verwendet, d. h. sehr kurze DNA-Sequenzen, die aus wenigen Nukleotiden bestehen.

Struktur der DNA Die Desoxyribonucleinsäure ist ein Polymer, das aus den so genannten Nukleotiden besteht. Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker, einem Phosphatrest und einer der vier Basen Guanin (G), Cytosin (C), Adenin (A) oder Thymin (T). Die Nukleotide werden durch den Phosphatrest über eine Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft (siehe Abb. 3.1). Die Verbindung zwischen zwei Nukleotiden entsteht dabei zwischen dem C₅-Kohlenstoffatom der Desoxyribose des einen Nukleotides und dem C₃-Kohlenstoffatom des Zuckers des nächsten Nukleotides. Durch den Phosphatrest trägt die DNA eine negative Ladung. Sie ist ein Polyanion. Der Phosphatrest, der die Nukleotide miteinander verknüpft, wird auch als das Rückgrat der DNA bezeichnet. Des weiteren bekommt der DNA-Strang durch die C₃- bzw. C₅-Verbindung eine Richtung. Aus Gründen der Eindeutigkeit sagt man, ein DNA-Strang läuft vom 5'- zum 3'-Ende. Das 5'-Ende bedeutet, daß an dem Zucker das 5. Kohlenstoffatom (C₅) frei ist, entsprechend ist am 3'-Ende das C₃-Atom frei. Wird die Sequenz eines DNA-Stranges aufgeschrieben, so wird sie immer mit dem 5'-Ende beginnend notiert. Die DNA ist ein Doppelstrang. Das heißt, zu einem Einzelstrang gibt es einen komplementären, gegenläufigen zweiten Einzelstrang. Gegenläufig bzw. antiparallel heißt, daß dieser Strang vom 3'- zum 5'-Ende läuft.

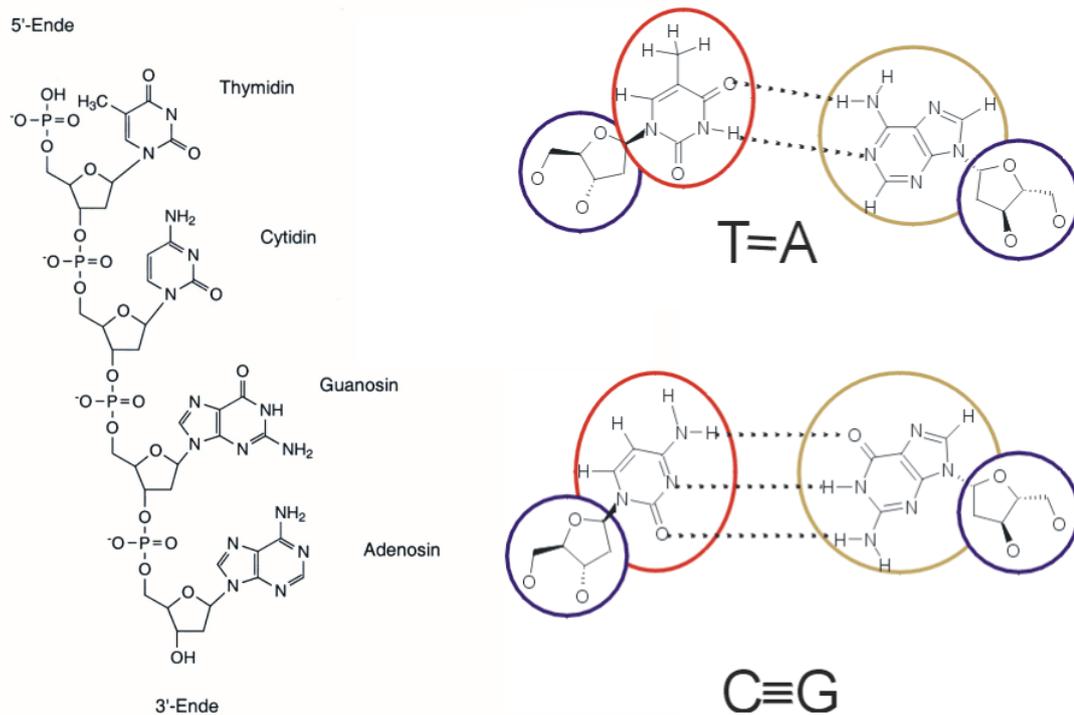


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau der DNA. **Links** Darstellung der vier mit dem Zucker Desoxyribose verknüpften Basen. Die Basen werden durch den Phosphatrest miteinander verbunden. **Rechts** Komplementaritätsprinzip der Basen. Thymin (T) und Adenin (A) binden über zwei Wasserstoffbrücken, Cytosin (C) und Guanin (G) über drei Wasserstoffbrücken. Markierungen: Zucker (blau), Pyrimidin-Basen (rot) und Purin-Basen (gelb). Die gestrichelten Linien stellen die Wasserstoffbrücken dar.

Die Komplementarität hängt mit den Basen zusammen. Die Basen sind innerhalb eines Nucleotides am C_1 des Zuckers kovalent gebunden. Ein DNA-Doppelstrang entsteht durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Basen. Komplementär zueinander sind nur die Basen Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin (siehe Abb. 3.1). Zwischen Adenin und Thymin werden zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet, zwischen Guanin und Cytosin drei. Die Selbstorganisation der DNA-Stränge aus zwei komplementären Einzelsträngen zu einem Doppelstrang wird als Hybridisieren bezeichnet. Der Doppelstrang ist gewunden und wird daher als Doppelhelix bezeichnet. Da es einen gewissen Spielraum in der räumlichen Lage von Rückgrat und Basen gibt, existieren verschiedene Konformationen der DNA, die mit Großbuchstaben bezeichnet werden. In lebenden Organismen kommt überwiegend die B-DNA vor, bei der die Basenpaare auf der Helixachse sitzen und im rechten Winkel zu ihr angeordnet sind.

Die Bezeichnung zur Länge einer DNA-Sequenz kann, z.B. für eine Sequenz aus 24 Basen, entweder als 24mer DNA oder 24bp (engl. *base pair*) erfolgen.

Hybridisierung und Schmelzen von DNA Die Hybridisierung wird durch viele Faktoren beeinflusst. Zum einen spielen Eigenschaften der DNA-Sequenz selbst eine Rolle, wie z.B. die Sequenz-Länge oder die Basenkombination. Zum anderen wird sie aber auch von der Salzkonzentration und der Temperatur bei der Hybridisierung bestimmt. Während der Hybridisierung kommt es zu zufälligen Kollisionen zwischen den Molekülen. Bei einem erfolgreichen Kontakt erfolgt die korrekte Bindung zum Doppelstrang reißverschlussartig. Bisher gibt es aus der Mo-

lekularbiologie lediglich empirische Formeln zur Berechnung der Hybridisierungszeit für eine gegebene Sequenzlänge unter bestimmten Umgebungsparametern. Diese Formeln dienen eher einem Abschätzen der benötigten Zeit, müssen aber immer auf den jeweiligen Fall optimiert werden. Die Hybridisierungshalbwertszeit $t_{\frac{1}{2}}$ in Sekunden bei einer Konzentration C von 0.4 - 1M einwertiger Ionen, einer Temperatur von mindestens 25°C unter der Schmelztemperatur T_m sowie einem pH-Wert zwischen 5 und 9 kann wie folgt abgeschätzt werden [40, 41, 42]:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{N \ln(2)}{3,5 \cdot 10^5 L^{\frac{1}{2}} C} \quad (3.1)$$

Die Komplexität N ist die absolute Länge der Nukleotidsequenz und L die Länge der DNA-Sequenz. Im Hinblick auf die hier verwendete Sequenz bestehend aus weniger als 30 Basen kann die Hybridisierungsdauer auf wenige Sekunden abgeschätzt werden. In der Molekularbiologie ist die Gegenwart von anorganischen Salzen von entscheidender Bedeutung. Ohne Verwendung von NaCl oder MgCl₂ ist eine Hybridisierung wie auch eine stabile Doppelhelix in Lösung nicht möglich. Dennoch muß ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß die Erkenntnisse aus der Molekularbiologie nicht unmittelbar in das hier beschriebene Gebiet übertragen werden sollten! Molekularbiologie und Genetik beschäftigen sich zwar in der Regel nur mit Stücken eines Genoms, doch sind diese Stücke in der Regel noch einige tausend Basen lang (kB = KiloBasen). DNA, die zur Verbindung von Partikeln verwendet wird, ist jedoch deutlich kürzer als 100, meist sogar weniger als 30 Basen lang. Diese kurzen Moleküle sind auch in destilliertem Wasser stabil. Als Erfahrungswert gilt auch, daß so kurze DNA-Stränge in Wasser hybridisiert werden können und keine Natrium-Puffer u.ä. notwendig sind. Dies ist eine sehr gute Voraussetzung, um Metallkolloide mittels DNA zu verbinden.

Der Umkehrprozeß der Hybridisierung ist das Schmelzen bzw. Denaturieren der DNA [43, 44]. Mit dem Schmelzen ist eine Dissoziation des Doppelstranges in zwei Einzelstränge durch Trennen der Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen den Basen gemeint. Die Schmelztemperatur T_m ist charakteristisch für eine gegebene DNA-Sequenz. Da zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken-Bindungen ausgebildet werden, hat eine DNA-Sequenz mit höherem GC-Gehalt auch eine höhere Schmelztemperatur. Das Schmelzen wird mittels UV/VIS-Spektroskopie bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA, während der Temperaturerhöhung verfolgt (Abb. 3.2). Der Absorptionskoeffizient doppelsträngiger DNA ist kleiner als der einzelsträngiger DNA. Auf Grund der sogenannten Basenstapelung (engl. *base stacking*) kommt es dann zu einer charakteristischen Erhöhung der Absorption, aus der die Schmelztemperatur T_m ermittelt werden kann (Maximum der ersten Ableitung). Die Schmelztemperatur wird mit steigender Ionenkonzentration in der Lösung erhöht, d.h. die Schmelzkurve nach rechts verschoben. Der gesamte Vorgang ist reversibel, d. h. unter entsprechenden Bedingungen bilden die Einzelstränge wieder einen Doppelstrang aus. Dieser Vorgang wird auch als Renaturieren bezeichnet.

Mechanische Eigenschaften Für die Verwendung von DNA in der Nanotechnologie spielen die mechanischen Eigenschaften, im besonderen die Stabilität der DNA eine entscheidende Rolle. Insbesondere in den letzten Jahren, in denen sich Einzelmolekül-orientierte rasterkraftspektroskopische und -mikroskopische Methoden stark entwickelt haben, ist die DNA vielfältig untersucht worden [46]. Hierzu zählen zahlreiche Dehnungsexperimente, mit denen die Elastizität untersucht wurde, z. B. durch Überstrecken der DNA [47, 48, 49], die sogar bis zu einem

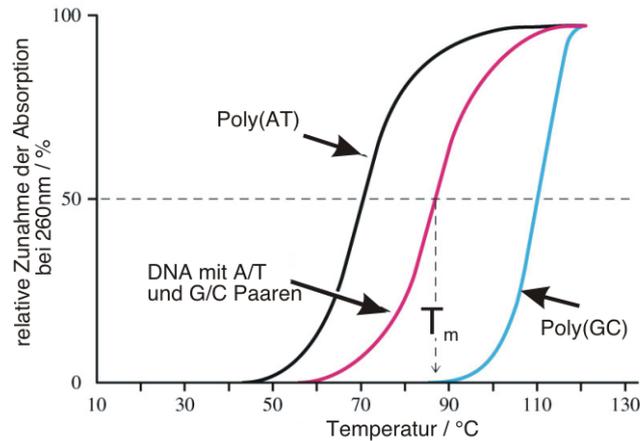


Abbildung 3.2: Schema einer Schmelzkurve von DNA. Die Absorption bei 260 nm verändert sich mit steigender Temperatur. Eine Sequenz aus Adenin und Thymin (schwarz) schmilzt bei geringeren Temperaturen als eine Sequenz aus Guanin und Cytosin (blau). Die real vorkommenden Sequenzen sind ein Gemisch aus allen vier Basen (rot). [45]

Schmelzen des Doppelstranges durch die Krafteinwirkung führen kann. Überstreckt wird die DNA ab 65 pN, was zu einer Strukturänderung von der B-DNA zu S-DNA führt und mit einer Längenzunahme (Konturlänge) bis zu 70% einhergehen kann. Diese S-DNA ist in hohen Salzkonzentrationen bis zu Kräften von 150 pN (beliebige Sequenz) bzw. 300 pN (PolyG/C Sequenz) stabil [50, 51]. Oberhalb dieser Kräfte schmilzt die DNA. Wird die doppelsträngige DNA reiverschlussartig auseinander gezogen, sind dafür Kräfte zwischen 12 pN und 13 pN notwendig. Außerdem zeigt sich eine charakteristische, sgezahnartige Kraft-Dehnungskurve, die mit dem GC-Gehalt korrespondiert [52]. Dies hängt mit den drei Wasserstoffbrücken-Bindungen pro GC-Paar zusammen.

Die Persistenzlänge ist eine Maß für das stabartige Verhalten eines Polymers. Die Persistenzlänge P setzt sich aus einem elektrostatisch bestimmten Teil (P_e) und einem weiteren Teil (P_i) zusammen. Erster hat mit elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der Polymerkette zu tun, während letztere mit den Effekten der Basenstapelung zusammenhängt. Demzufolge ändert sich die Persistenzlänge mit der Ionenstärke [53, 54]. Die Persistenzlänge für einzelsträngige DNA (ssDNA) liegt bei 1 nm [55], die für doppelsträngige DNA (dsDNA) bei 50 nm [48]. Demzufolge ist ssDNA flexibler.

Herstellung Die DNA kann künstlich, z.B. mit der Phosphoramid-Methode, hergestellt werden. Damit ist derzeit jede Länge bis zu ca. 200 Nukleotiden und jede beliebige Basenfolge einer Sequenz möglich. Auf die Herstellung haben sich mittlerweile zahlreiche Firmen spezialisiert. Eingeschränkt wird die Sequenzabfolge nur dadurch, daß die Sequenz keine Sekundärstrukturen enthalten darf. Das heißt, innerhalb der Sequenz dürfen keine zueinander komplementären Basenabfolgen bestehen, da sonst eine Hybridisierung innerhalb des Stranges erfolgt, also z.B. Schleifen (engl. *loops*) ausgebildet werden. Möglich und wünschenswert kann die Herstellung von dsDNA mit sogenannten „klebrigen Enden“ (engl. *sticky ends*) sein: Dann sind die miteinander hybridisierten DNA-Stränge nicht gleich lang, so daß ein- oder beidseitig einzelsträngige „berstehende“ Enden entstehen. Da hier eine Hybridisierung mit anderen komplementären

DNA-Strängen besonders leicht erfolgt, werden diese Enden als klebrig bezeichnet.

Die Prozesse in der Zelle, wie z.B. Replikation (Vervielfältigung) der DNA, Reparaturmechanismen usw. sind ohne Enzyme (Proteine mit spezifischen Eigenschaften) nicht denkbar. Hier soll insbesondere auf die Endonucleasen hingewiesen werden. Sie schneiden spezifisch DNA-Stränge, indem sie bestimmte Basenabfolgen erkennen. Endonucleasen können Einzelstränge oder Doppelstränge schneiden. Diese Enzyme sind inzwischen in großer Vielfalt kommerziell erhältlich. Im Zusammenhang mit der DNA-Verknüpfung von Partikeln können Endonucleasen als selektive Scheren eingesetzt werden [56].

3.2 Goldkolloide

3.2.1 Kolloidchemische Aspekte

Charakteristika kolloidaler Systeme In der vorliegenden Arbeit wurden Goldkolloide verwendet. Bei einem kolloidalen System handelt sich um ein Stoffgemisch, indem ein oder mehrere Substanzen in einem zusammenhängenden Dispersionsmedium verteilt sind. Im Falle der verwendeten Goldkolloide spricht man von einem kolloiddispersen System, da die Partikel zwischen 1 nm und 1 μ m groß sind. Daneben unterscheidet man, je nach Größe auch noch zwischen molekular- und grobdispersen Systemen. Die Kolloide können in hydrophile und hydrophobe Systeme eingeteilt werden, womit das Verhalten der Partikel gegenüber dem Lösungsmittel charakterisiert wird [57]. Während die hydrophilen Kolloide von Wassermolekülen umhüllt und damit stabilisiert werden, adsorbieren hydrophobe Kolloide Anionen oder Kationen, die in der Lösung vorliegen. Zu Letzterem gehören auch die Metallsole, die sich meist mit Anionen umgeben und daher eine formal negative Ladung besitzen. Dies ist wichtig zu beachten, da die DNA durch den Phosphatrest ebenso negativ geladen ist.

Hydrophobe Kolloide werden also durch die adsorbierten Ionen, die eine Schutzschicht bilden, gegenseitig stabilisiert, da sie sich gegenseitig abstoßen. Damit sind sie aber auch gegen Zugabe von Elektrolyten empfindlich, da diese Schutzschicht dann gestört wird und die Partikel agglomerieren können. Es ist möglich, die Partikel durch eine hinreichend große Menge an Gegenionen umzuladen. Die kolloidalen Systeme können auch bezüglich ihrer thermodynamischen und strukturellen Merkmale unterschieden werden [58]. Danach gehören die Metallkolloide zu den Dispersionskolloiden, die thermodynamisch instabil oder metastabil sind.

Elektrische Doppelschicht Im Hinblick auf die Wechselwirkungen zwischen DNA-Molekül und Goldkolloiden ist die Betrachtung der Ladungsverhältnisse um die Partikel von Bedeutung. Ebenso wichtig sind diese aber auch für die Stabilität der Partikel. Um die Partikel bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus, die aus zwei Anteilen besteht [59]. Direkt an der Oberfläche werden die Anionen adsorbiert und bilden die Helmholtz-Schicht (wobei diese sich genau genommen nochmals in eine innere und äußere Helmholtz-Schicht aufteilt). An diese Schicht schließt sich die diffuse Doppelschicht an, die eine größere Ausdehnung hat und überwiegend Kationen enthält (Abb. 3.3). Als diffus wird diese Schicht bezeichnet, weil durch thermische Stöße ein großer Teil der Ionen aus ihrer Position nahe der Grenzschicht herausgeschlagen werden.

Das elektrische Potential der diffusen Doppelschicht klingt exponentiell mit wachsendem Abstand ab. Insgesamt sind die Partikel nach außen elektrisch neutral. Bei voll ausgebildeter Helmholtz-Schicht überwiegen die abstoßenden Kräfte zwischen den Teilchen, und sie liegen dispers vor. Eine Zugabe ionischer Substanzen bewirkt eine Schwächung der Helmholtz-Schicht, da die Anionen teilweise verdrängt werden. Damit wird auch die diffuse Doppelschicht geringer, so daß der Einfluß der kurzreichweitigen anziehenden Kräfte zunimmt. Die Partikel können agglomerieren. Ein Grenzfall ist der isoelektrische Punkt, an dem die Helmholtz-Schicht neutral und die Doppelschicht auf ein Minimum geschrumpft ist. Insgesamt wird das Ausmaß der elektrischen Doppelschicht von der Ionenstärke I

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^n c_{i0} z_i^2, \quad (3.2)$$

mit c_{i0} Konzentration in großer Entfernung vom Zentralion, hier in Entfernung von der Helmholtz-Schicht, z_i der Ladungszahl des Ions, bestimmt. Hohe Ionenstärken führen, ebenso wie sehr geringe, zu einer Destabilisierung. Bei Letzterem liegen zu wenige Ionen vor, um überhaupt eine ausgeprägte Doppelschicht zu bilden [60].

Die Salzkonzentrationen, die zu einem Destabilisieren und Ausfallen der Kolloide führen, sind bereits vor über 100 Jahren untersucht worden. Dabei zeigten sich bestimmte Regelmäßigkeiten. So fallen die meisten Dispersionen bei einer Konzentration von 25 - 150 mM eines monovalenten Salzes aus, bei einem zweiwertigen Ion sind nur noch Konzentrationen von 0.5 - 2 mM und von einem trivalenten nur noch Konzentrationen von 0.01 - 0.1 mM notwendig. Dies wird als Schulze-Hardy-Regel bezeichnet [61,62,63,64,65]. Diese Regel kann umgekehrt auch dazu benutzt werden, um kolloidale Dispersionen zu stabilisieren, indem das potentialbestimmende Ion eine höhere

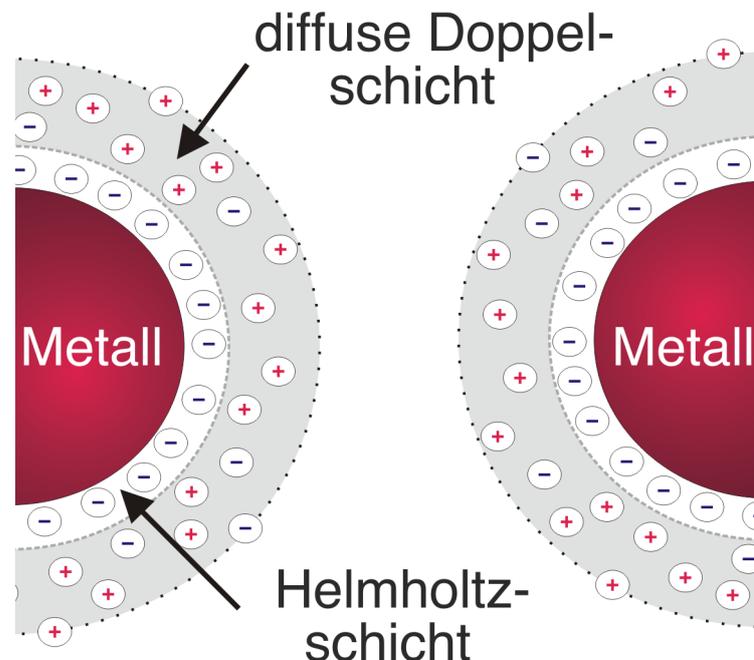


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht um Metallpartikel. Die Metallpartikel adsorbieren Anionen, die die Helmholtz-Schicht bilden (weiß). Daran schließt sich die diffuse Doppelschicht an (grau). Zwischen den Partikeln befindet sich das Lösungsmittel. Darstellung frei nach [60] und [59].

Ladungszahl hat als das Gegenion. Damit werden die elektrostatischen Abstoßungskräfte erhöht, indem die Ladungsdichte für die potentialbestimmenden Ionen erhöht und für die Gegenionen erniedrigt wird [66].

DLVO-Theorie Die DLVO-Theorie [59, 60, 65] erklärt, warum die Kolloide koagulieren. Sie wurde zeitgleich von *Derjaguin* und *Landau* sowie *Verwey* und *Overbeck* entwickelt und wurde daher mit deren Anfangsbuchstaben bezeichnet (Originalarbeiten: [67, 68, 69]). Die DLVO-Theorie beschreibt die Wechselwirkung zwischen Teilchen durch ein Zusammenwirken anziehender und abstoßender Kräfte. Die repulsiven Wechselwirkungsenergien tragen definitionsgemäß ein positives Vorzeichen, da Energie aufgewendet werden muß, um die Teilchen anzunähern. Umgekehrt tragen die attraktiven Energien ein negatives Vorzeichen, da Energie frei wird, wenn sich die Teilchen annähern. Die Wechselwirkungskräfte zwischen den Teilchen summieren sich aus den Einzelkräften, die in unterschiedlicher Art mit größer werdendem Abstand abnehmen. Man unterscheidet Nahwirkungskräfte, die mit einer Abstandsfunktion von r^{-5} oder r^{-6} abfallen, von Fernwirkungskräfte mit flacher abfallenden Funktionen (r^{-1}). Zu den anziehenden Energien zählen Van der Waals-Energien, Grenzflächenenergien bei der Teilchenkoaleszenz flüssig umhüllter Kolloidteilchen, elektrostatische Anziehung zwischen ungleichnamig geladenen Teilchen, sowie die Energien der Physi- und Chemisorption. Die Abstoßungsenergien werden hauptsächlich durch die elektrostatische Abstoßung gleichnamig geladener Teilchen bestimmt.

Die Beschreibung der Wechselwirkung zwischen zwei Teilchen kann durch die Auftragung ihrer Wechselwirkungsenergien gegen den Abstand dargestellt werden (Abb. 3.4). Dabei können sich zwei weit voneinander entfernte gleichnamig geladenen Teilchen gegenseitig anziehen, wenn langreichweitige Van der Waals-Kräfte überwiegen. Sie gelangen dann in das sogenannte sekundäre Minimum. Da eine weitere Annäherung mit einem Energieaufwand verbunden ist, verharren die

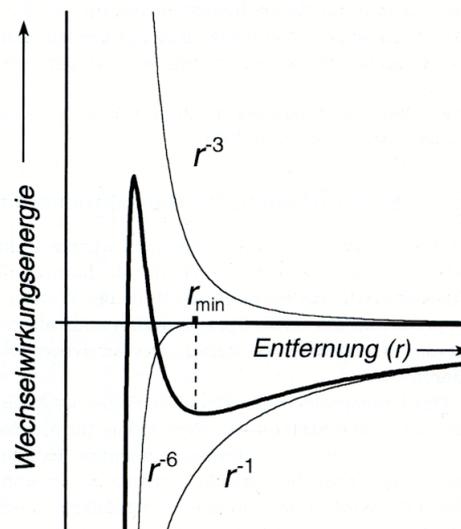


Abbildung 3.4: Wechselwirkungsenergie (dicke Linie) zweier Teilchen als Funktion des Abstandes (r) voneinander, als Resultat der Addition einer elektrostatischen Abstoßungsenergie r^{-3} , sowie zweier Komponenten Van der Waalscher Anziehung r^{-1} und r^{-6} (dünne Linien). Der Abstand r_{min} ist das sekundäre Minimum. Entnommen [59]

Teilchen in diesem Minimum. Bei noch weiterer Annäherung wirken starke Abstoßungskräfte, so daß die Annäherung nur durch eine Überwindung der Energiebarriere durch äußere Kräfte erfolgen kann. Ist die Energiebarriere überwunden, aggregieren die Teilchen im primären Minimum, da dann kurzreichweitige Van der Waals-Kräfte überwiegen. Zu beachten ist, daß die Wechselwirkungsenergien in unterschiedlichem Maße milieuhabhängig sind. Während z. B. die Van der Waals-Wechselwirkungen davon unabhängig sind, hängen die elektrostatischen Wechselwirkungen in starkem Maße davon ab. Die Energiebarriere kann dadurch erniedrigt werden, wenn zum Beispiel durch eine Änderung der Salzkonzentration in der Lösung die elektrostatischen Wechselwirkungen beeinflusst werden (Abb. 3.5). Dies wird durch folgendes verständlich: Gesucht ist, wie sich das Potential ψ mit dem Abstand von einem Zentralion bzw. hier mit dem Abstand von der Partikeloberfläche verändert. Der Ausgangspunkt dafür bildet die Poisson-Boltzmann-Gleichung:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{F}{\varepsilon \varepsilon_0} \sum_{i=1}^n c_{i0} z_i e^{-\frac{z_i e \psi}{kT}}. \quad (3.3)$$

Hierbei sind F die Faraday-Konstante, ε_0 die elektrische Feldkonstante, ε die Dielektrizitätskonstante, c_{0i} die Konzentration und z_i die Ladungszahl der i -ten Ionensorte, k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Die Lösung der partiellen Differentialgleichung lautet unter den Bedingungen, daß nur eine Gegenionenart i vorhanden sei, das Potential klein sei ($z_i e \psi \ll kT$) und Radialsymmetrie ($\psi = \psi(r)$) herrsche:

$$\psi_r = \frac{z_i e}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon} e^{-\kappa r}. \quad (3.4)$$

Das Potential wird also um den Faktor $e^{-\kappa r}$ vermindert, wobei κ der Debye-Hückel-Parameter ist:

$$\kappa = \sqrt{\frac{2F^2 I}{\varepsilon_0 \varepsilon N_A kT}}. \quad (3.5)$$

In den Debye-Hückel-Parameter geht die Ionenstärke I (siehe Gleichung 3.2) ein. Mit steigender Ionenstärke nimmt der Abschirmeffekt zu. Das heißt, ein gegebenes Oberflächenpotential fällt

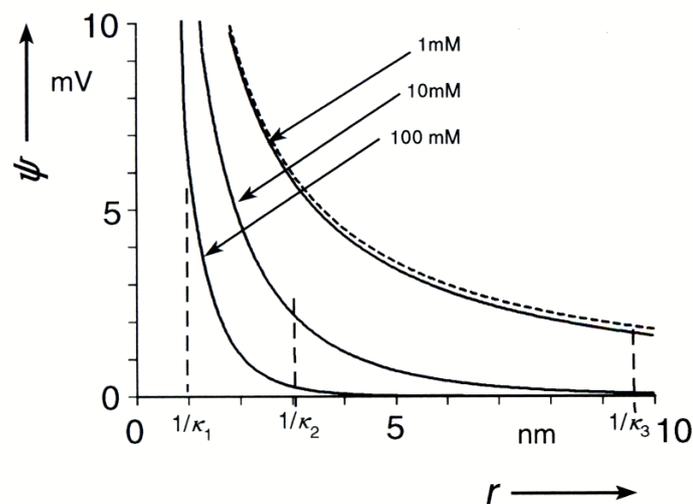


Abbildung 3.5: Potentialverlauf in radialem Abstand von einem einwertigen Zentralion. Potential ohne Berücksichtigung des Einflusses der Ionenwolke (gestrichelte Linie) sowie das durch Ionenwolken verschiedener Konzentrationen eines ein-ein-wertigen Salzes abgeschwächte Potential (durchgezogene Linien). Entnommen [59]

mit steigender Ionenstärke schneller ab und damit sinkt die elektrostatische Abstoßung. Infolge dessen wird die Energiebarriere geringer und die Wahrscheinlichkeit einer Näherung der Partikel im primären Minimum größer.

3.2.2 Optische Aspekte

Die Untersuchungen der DNA-Partikel-Hybride werden in dieser Arbeit im wesentlichen mittels UV/VIS-Spektroskopie durchgeführt. Voraussetzung für die erfolgreiche Nutzung der Methode sind die optischen Eigenschaften der Goldkolloide. Die dispergierten Goldkolloide besitzen eine rote Farbe, eine Eigenschaft, die bereits im Mittelalter zur Gestaltung von roten Teilen in Kirchenfenstern oder für die Rotfärbung von Weinkelchen verwendet wurde.

Quasistatische Näherung Zur Beschreibung [70] der optischen Eigenschaften von Goldkolloiden geht man zunächst von einer Kugel mit dem Radius r in einem homogenen elektrischen Feld E aus. Deren Polarisation P ergibt sich dann mit:

$$P = \alpha \cdot E, \quad (3.6)$$

wobei α :

$$\alpha = \frac{4}{3}\pi r^3 \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m}. \quad (3.7)$$

Dabei ist ε die komplexe Dielektrizitätskonstante des Kugelmaterials und ε_m die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums. Die *quasistatische Näherung* übernimmt diese in der Elektrostatik gültige Lösung und überträgt sie auf sphärische Metallpartikel in einem elektromagnetischem Wechselfeld. Hierfür wird eine Wechselwirkung mit einem räumlich konstanten, aber zeitlich veränderlichen Wechselfeld angenommen und deshalb ε durch $\varepsilon(\omega)$ und ε_m durch $\varepsilon_m(\omega)$ ersetzt. Voraussetzung ist, daß das Teilchen klein gegen die Wellenlänge des eingestrahelten Lichtes ist, zudem wird ein nichtabsorbierendes, umgebendes Medium angenommen. Als Resonanzbedingung gilt:

$$[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + [\varepsilon_2(\omega)]^2 = \min, \quad (3.8)$$

mit $\varepsilon = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2$. Die hier beschriebene Resonanz hat ihrer Ursache in der kollektiven Schwingung der freien Elektronen gegen den positiven Ionenrumpf. Man bezeichnet die Schwingung als Oberflächenplasmon, da die rücktreibende Kraft überwiegend durch die Oberflächenpolarisation bestimmt wird. Ein Plasmon ist ein Plasmaschwingungsquant. Es ist zu beachten, daß in dieser Arbeit überwiegend mit Goldkolloiden mit 20 nm Durchmesser gearbeitet wurde und für diese Quanteneffekte auftreten [71]. Demzufolge gibt es kein kontinuierliches Leitungsband mehr, sondern gequantelte Energieniveaus, in denen sich die Elektronen befinden. Dies wirkt sich auf die Resonanzbedingung aus.

Mie-Theorie 1908 veröffentlichte Gustav Mie [72] seine Arbeit zur Lichtstreuung an Kugeln beliebiger Größe und aus beliebigem Material. Insbesondere galt sein Interesse den unterschiedlichen Farben von Suspensionen unterschiedlich großer Goldkolloide. Diese Arbeit gehört aufgrund ihrer Aktualität und Anwendungsfähigkeit bis heute zu einer der meistzitierten Arbeiten in der

Physik. Die Mie-Theorie stellt die Lösung der Maxwell-Gleichungen für eine Kugel mit dem Radius r aus einem Material mit dem komplexen Brechungsindex n_0 dar. Die Kugel wird von einem Medium mit dem Brechungsindex n_m umgeben. Aufgrund der Geometrie des Streuers werden Kugelkoordinaten verwendet. Mie löste die Maxwell-Gleichungen für eine aus dem unendlichen kommende, ebene und linear polarisierte Welle und erhielt für den Extinktions-, Streu- bzw. Absorptionsquerschnitt:

$$\sigma_{Ext}(\lambda) = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \operatorname{Re}(a_L + b_L) \quad (3.9)$$

$$\sigma_{Streu}(\lambda) = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) (|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad (3.10)$$

$$\sigma_{Abs}(\lambda) = \sigma_{Ext}(\lambda) - \sigma_{Str}(\lambda), \quad (3.11)$$

wobei $k = 2\pi n_m / \lambda$. Dabei ist λ die Wellenlänge der eingestrahnten elektromagnetischen Welle und ε_m die Dielektrizitätskonstante des die Kolloide umgebenden Mediums. Die gestreuten Partialwellen, die von elektrischen und magnetischen Multipolschwingungen innerhalb des Teilchens verursacht werden, werden nach ihrer Ordnung durch den Index L numeriert ($L=1$ Dipol-Anregung, $L=2$ Quadrupol-Anregung). Die Streukoeffizienten a_L und b_L geben den jeweiligen Beitrag der L -ten elektrischen oder magnetischen Multipolschwingung an. Für kleine Teilchen mit einem Radius sehr viel kleiner als die Wellenlänge gelten für a_L und b_L :

$$a_L = \frac{m \Psi_L(mx) \Psi'_L(x) - \Psi_L(x) \Psi'_L(mx)}{m \Psi_L(mx) \xi'_L(x) - \xi_L(x) \Psi'_L(mx)} \quad (3.12)$$

$$b_L = \frac{\Psi_L(mx) \Psi'_L(x) - m \Psi_L(x) \Psi'_L(mx)}{\Psi(mx) \xi'_L(x) - m \xi_L(x) \Psi'_L(mx)} \quad (3.13)$$

Hierbei bezeichnet $m = n_0/n_m$ wobei $n_0 = n_0(\omega)$ den frequenzabhängigen Brechungsindex des Kugelmaterials und n_m den Brechungsindex des umgebenden Mediums darstellt. $\Psi_L(z)$ und $\xi_L(z)$ sind Bessel-Ricatti Funktionen und x ist der Größenparameter, in den der Kugelradius und die Wellenlänge eingehen. Aus der Kenntnis des Extinktionsquerschnittes und des Füllfaktors f sowie des Volumens eines Partikel V_0 , läßt sich der Extinktionskoeffizient $\alpha_{Ext} = f \cdot \sigma_{Ext} / V_0$ berechnen. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, daß die Mie-Theorie nur für ein sphärisches Teilchen gilt. Da dies nicht den realen Gegebenheiten entspricht, wird der Füllfaktor f eingeführt. Der Einfluß des Füllfaktors auf die Extinktion ist in Abb. 3.8 dargestellt. In Abb. 3.6 sind die Extinktions-Spektren für unterschiedliche Durchmesser von Goldkolloiden entsprechend obigem Formalismus (Gleichungen 3.12, 3.13) berechnet worden, und Abb. 3.7 soll den Einfluß des umgebenden Mediums mit dem Brechungsindex n_m auf die Extinktion bei konstanter Partikelgröße und Füllfaktor veranschaulichen.

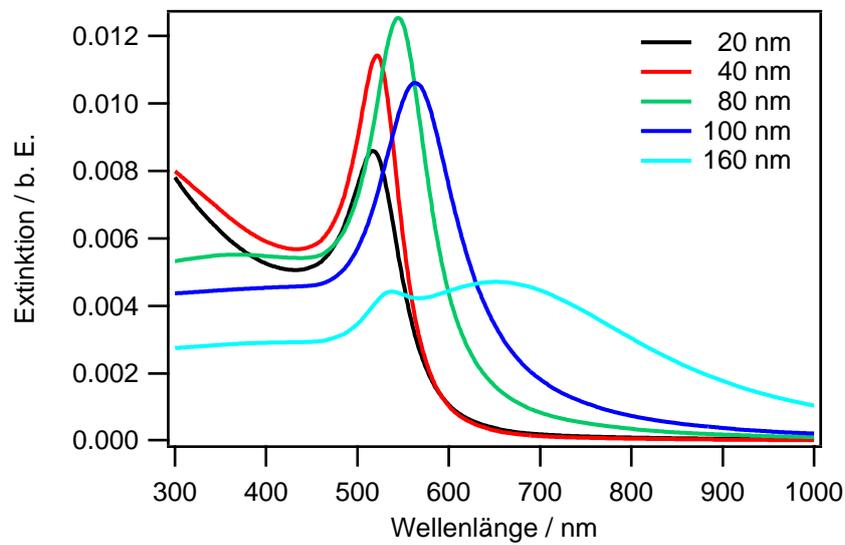


Abbildung 3.6: Berechnung der Extinktion für unterschiedliche Durchmesser von Goldkolloiden bei einem Füllfaktor $f = 0.2$ in Wasser.

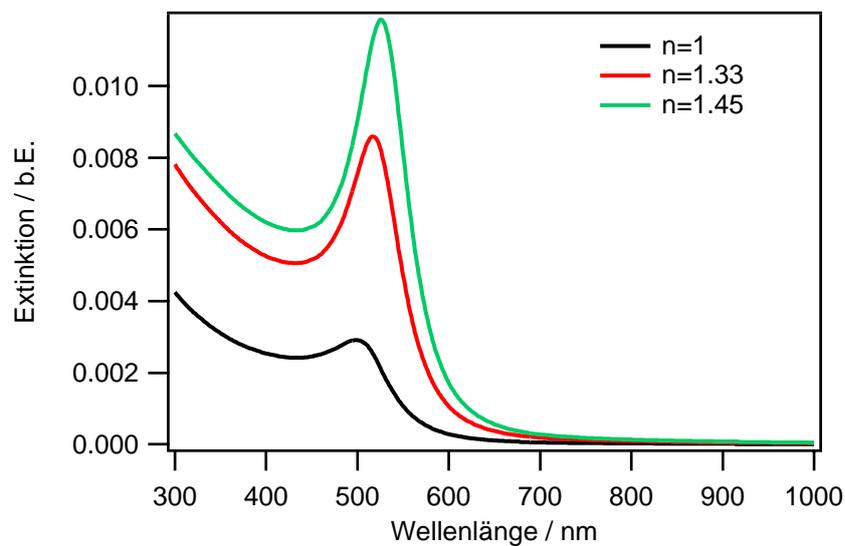


Abbildung 3.7: Berechnung der Extinktion von 20 nm Goldkolloiden, einem Füllfaktor $f = 0.2$ in Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices. Als Beispiel sind hier Wasser ($n_m=1,33$) und Glas ($n_m=1,45$) im Vergleich zu Vakuum ($n_m=1$) angegeben.

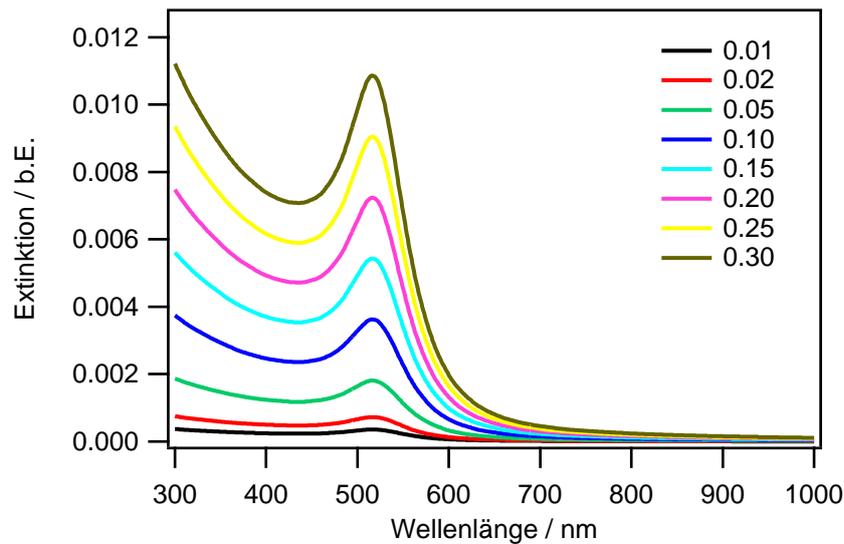


Abbildung 3.8: Berechnung der Extinktion für unterschiedliche Füllfaktoren. Betrachtet wurden 20 nm Goldkolloide in Wasser.

3.3 DNA auf Goldoberflächen

Nach der kurzen Beschreibung der Eigenschaften der beiden einzelnen Komponenten DNA bzw. Goldkolloid wird im folgenden und letzten Abschnitt dieses Kapitels das bisherige Wissen zu den DNA-Partikel-Hybriden vorgestellt.

3.3.1 DNA-erzeugte Partikelnetzwerke

Die beiden grundlegenden Arbeiten zur Verknüpfung von Goldnanopartikeln mit DNA erschienen 1996 [35, 36]. Diese beschreiben die Kopplung der Partikel mittels kurzer Oligonucleotidsequenzen, welche durch eine Thiolgruppe auf der Oberfläche der Goldpartikel chemisorbiert werden. Die Grundzüge der Methode sind schematisch in Abb. 3.9 dargestellt. Die Methode besteht im wesentlichen aus zwei Schritten. Der erste Schritt ist die *kovalente Bindung der thioolfunktionalisierten DNA* auf der Goldoberfläche. Die Reaktion von Thiol-Gruppen mit Gold und die Selbstorganisation dieser als Monoschichten ist in den letzten Jahren gut untersucht worden [73, 74, 75, 76, 77, 78]. Die Bindungsstärke zwischen dem Schwefel-Atom und Gold beträgt ca. 28 kcal/mol. Für die Verbindung von Goldnanopartikeln mittels Hybridisierung der DNA liegen zunächst zwei Fraktionen vor. Jede Fraktion von Partikeln ist mit einzelsträngiger DNA funktionalisiert. Darauf folgt der zweite Schritt, die *Hybridisierung* der Partikel durch Mischen der beiden Fraktionen. Bei erfolgreicher Hybridisierung entstehen Partikelnetzwerke. Von Mirkin et al. [35] werden die Partikel durch eine Abwandlung der Methode miteinander verbunden. Dafür werden die Partikel in den beiden Fraktionen mit einzelsträngiger DNA funktionalisiert, welche nicht komplementär zueinander ist. Bei Mischung beider Fraktionen entstehen erst dann Partikelnetzwerke, wenn eine dritte DNA-Sequenz zugegeben wird, die zu beiden Sequenzen auf den Partikeln komplementär ist.

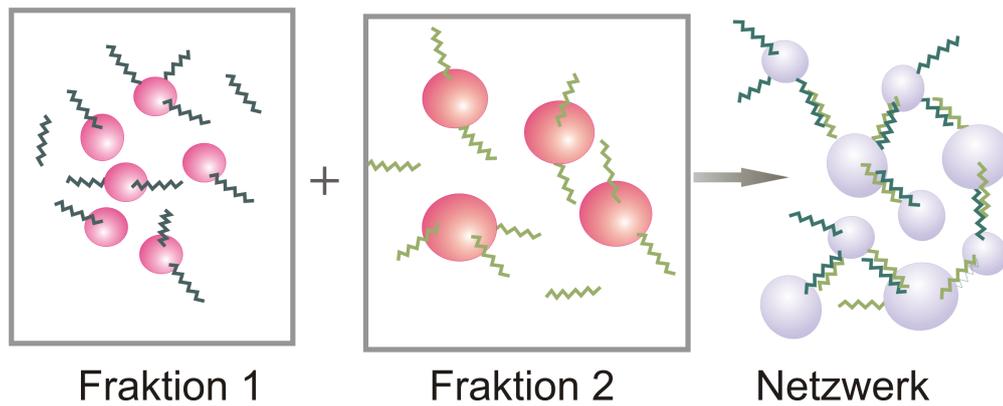


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der konventionellen Methode zur Erzeugung DNA-verknüpfter Nanopartikel. Im ersten Schritt wird einzelsträngige DNA (grün) auf der Oberfläche von Goldkolloiden (rot) gebunden. Werden die beiden Fraktionen gemischt und die komplementären DNA-Stränge hybridisiert, so entsteht das DNA-verknüpfte Partikelnetzwerk.

Unter welchen Bedingungen die Hybridisierung erfolgt, kann sehr unterschiedlich sein, sowohl was die verwendeten Puffer betrifft, als auch die Temperatur, die konstant gehalten oder sogar durch Einfrier- und Auftauschritte drastisch verändert werden kann [79, 80, 81]. Die Hybridisierung kann mehrere Stunden (bis 24 Stunden) dauern. Die Verbindung der Partikel durch DNA wird durch eine Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonenbande dokumentiert. Dabei ist für die meist verwendeten 13 nm Goldpartikel eine Verschiebung von 524 nm auf 576 nm dokumentiert [82]. Eine neue Untersuchung von 2004 von Park et al. [83] befaßt sich mit der strukturellen Untersuchung der Partikelnetzwerke.

3.3.2 Eigenschaften der DNA auf Gold

Bei thiofunktionalisierter DNA kommt es nicht zu einer spontanen **Ordnung der DNA-Moleküle auf der Oberfläche**. Es zeigte sich, daß die Oligonucleotide abgeflacht auf der Oberfläche aufliegen und je nach Bedeckungsgrad der Oberfläche, unterschiedlich viele Basen ebenfalls mit der Oberfläche in Kontakt stehen [84, 77]. Zum Aufrichten werden kurze Alkylthiole benutzt, die eine Neigung von 60° haben und die außerdem zu einer höheren Adsorption von Oligonucleotiden führen [85]. Weiterhin wurde der **Einfluß der Sequenzlänge auf die Wechselwirkung** mit der Oberfläche untersucht [86]. Dabei zeigte sich, daß kurze Sequenzen (bis zu 24 Basen Länge) von der Oberfläche gerichtet abstehen, während es bei langen Sequenzen zu elektrostatischen Wechselwirkungen des negativen Rückgrates der DNA mit der Oberfläche kommt. Demnach wären bei kurzen DNA-Sequenzen keine Alkylthiole notwendig, um eine geordnete, „bürstenartige“ Monoschicht auf der Partikeloberfläche zu erzeugen. Nachteilig ist, daß Oligonucleotidsequenzen mit weniger als 20 Basen weniger stabil sind. Die **Effizienz der DNA-Immobilisierung** auf der Goldoberfläche, d. h. die Verankerung der DNA auf dieser, ist von der Valenz der Salzionen abhängig. Divalente Kationen führen zu einer größeren Immobilisierungseffizienz als eine reine Verdopplung der Konzentration monovalenter Kationen [77]. Die Wirkungsmechanismen sind von mono- und divalenten Kationen unterschiedlich. Für MgCl_2 geht man davon aus, daß es in Wechselwirkung mit dem Rückgrat der DNA, also der Phosphatgruppe tritt, nicht aber mit den Basen an sich [87]. Man geht bei der Adsorption der DNA

auf Goldoberflächen von einer Langmuir-Kinetik aus: Auf einer homogenen Oberfläche wird maximal eine monomolekulare Schicht adsorbiert, und es gibt keine Wechselwirkung zwischen den adsorbierten Molekülen. Die Kinetik wird dabei wesentlich davon beeinflusst, ob die DNA über eine Thiolgruppe chemisorbiert wird oder unspezifisch über ihre Basen bindet [88]. Auch hier können zum Vergleich Untersuchungen mit Alkanthiolen herangezogen werden, etwa wenn geladenen Thiole untersucht wurden [89]. Die Wechselwirkung einzelner Basen mit der Goldkolloidoberfläche ist von Storhoff et al. [90] untersucht worden. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Base und der Stabilität der Partikel in Salzlösungen hergestellt. Es ist bekannt, daß Goldkolloide, deren Oberfläche mit Oligonucleotiden belegt ist, in Salzlösungen stabilisiert werden [35, 91]. Storhoff et al. postulieren, daß diese Stabilisierung mit einer unterschiedlichen Oberflächenbedeckung in Abhängigkeit von der verwendeten Base abhängt. Eine PolyT-Sequenz, also eine Sequenz, die ausschließlich die Base Thymin enthält, soll demnach eine höhere Bedeckungsdichte aufweisen und damit die Partikel elektrostatisch und sterisch besser schützen. Die **unspezifische Bindung von einzel- und doppelsträngigen DNA-Sequenzen** auf den Partikeln ist ebenfalls untersucht worden. Hierfür werteten Sanström et al. [92, 93] mit Gelelektrophorese und CD-Spektroskopie (engl. *circular dichroism*) erhaltene Daten aus und stellten fest, daß sowohl einzelsträngige, als auch doppelsträngige DNA-Sequenzen unspezifisch auf den Partikeln binden können (wenn keine Thiolgruppe vorhanden ist). Für die einzelsträngige DNA geht man von einer Wechselwirkung der Basen mit der Goldoberfläche aus. Deshalb wurde auch geprüft, ob doppelsträngige DNA (24mer) eventuell denaturiert und die dann entstehenden Einzelstränge auf der Goldoberfläche binden. Dies kann für DNA-Sequenzen mit 24 Basen Länge ausgeschlossen werden. Für die Wechselwirkung von dsDNA wird vorgeschlagen, daß die negativ geladene Phosphatgruppe dipolinduzierend wirkt. Diese Wechselwirkung fällt mit r^{-4} ab. Mit steigender Ionenstärke werden die elektrostatischen Abstoßungskräfte abgeschirmt und die Anziehungskräfte gewinnen an Bedeutung, so daß dadurch die dsDNA auf der Oberfläche binden kann. Welches Ausmaß die unspezifische Bindung von DNA-Molekülen hat, hängt wahrscheinlich auch mit der Oberflächenkrümmung der Partikel zusammen. Je größer diese ist, also je kleiner der Partikel, um so geringer ist die Wechselwirkung anzunehmen. Dies kann ein Grund sein, warum bei Zanchet et al. [94] bei 5 nm Partikeln und 100bp DNA Länge keine solche unspezifischen Wechselwirkungen gemessen wurden, im Vergleich zu 13 nm Partikel und 24bp in [92].

Die **Dichte der Oberflächenbedeckung** von planaren Goldoberflächen und sphärischen Partikeln ist unterschiedlich [91]. Danach werden auf den Partikeln deutlich mehr DNA-Stränge immobilisiert. Für 15 nm Goldpartikel kann man eine Bedeckung im Bereich von 160 thiolethionierten Oligonucleotidsträngen erwarten. Allerdings führt die hohe Dichte auch zu einer sehr geringen Hybridisierungsrate von lediglich 4%, die dadurch verbessert werden kann, daß so genannte Spacer-Sequenzen zwischen Thiol und eigentlicher Sequenz eingeschoben werden, die nur aus einer Base bestehen (z.B. PolyT)). Dann liegt die Hybridisierungsrate bei 44%. Die geringe Hybridisierungsrate ohne Spacer-Sequenz wird mit sterischen Behinderungen begründet. Es wird von Demers et al. [91] ausdrücklich darauf hingewiesen, daß zur Bindung der DNA auf der Goldoberfläche diese zunächst in Wasser mit den Partikeln in Kontakt gebracht und dann schrittweise die Salzkonzentration angehoben werden soll. Dieser Schritt wird als Einsalzen bezeichnet. Es wird vorgeschlagen, daß die DNA-Stränge zunächst auch auf der Oberfläche der

Partikel aufliegen können und dann, mit der Erhöhung der Salzkonzentration, elektrostatische Abstoßungen zwischen den DNA-Strängen (negative geladenes Rückgrat) minimiert werden. Dadurch soll die Hybridisierungsrate der Stränge auf den Partikeln erhöht werden.

Weiterhin ist es möglich, nicht nur gleich große Partikel miteinander zu verbinden (Ein-Komponenten-Systeme), sondern auch Goldnanopartikel unterschiedlichen Durchmessers (Zwei-Komponenten-Systeme) [79, 95]. Ebenso können, von einem funktionalisierten Substrat ausgehend, gleich große Partikel schichtweise aufgebaut werden [38].

In der Literatur finden sich Angaben, die entstandenen Strukturen reversibel zu schmelzen (**Schmelzen der DNA**) [79, 96, 97, 98, 99]. Der Übergang von doppelsträngiger zu einzelsträngiger DNA vollzieht sich in einem sehr schmalen Temperaturfenster (scharfer Übergang) im Vergleich zum Schmelzen von ungebundenen DNA-Molekülen in Lösung. Bestimmt wurde die Halbwertsbreite der Schmelzkurven (erste Ableitung) für beide Fälle. Für freie DNA beträgt diese 12°C und für die partikelgebundene DNA 4°C (Heizrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$), wobei die Angaben hierüber schwanken. Es kommt nur zu einer unwesentlichen Verschiebung der Schmelztemperatur T_m . Elghanian et al. [96] weisen darauf hin, daß die Veränderungen der Extinktion im ganzen Spektrum zu beobachten sind und nicht nur bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA. Sie gehen deshalb davon aus, daß der Einfluß der DNA, die auf den Partikeln gebunden ist, so gering ist, daß man im Falle des „Schmelzens“ der Partikelnetzwerke ohnehin nur den Beitrag der Partikel an der Extinktion sieht. In einer späteren Publikation [100] wird dies wieder aufgegriffen und begründet, daß bei dem „Schmelzen“ nur der späte Teil der Partikeldissoziation beobachtet werden kann, nicht aber frühe Schmelzvorgänge, die ausschließlich die DNA betreffen, da deren Konzentration so gering und die Extinktionskoeffizienten ($2.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei λ_{520} für 13 nm Partikel und $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei λ_{260} für ein 30 Basen langes Oligonucleotid) so unterschiedlich sind, daß die DNA nicht detektiert werden könne. Keine Angaben werden dazu gemacht, warum zwei solche Teilvorgänge existieren und wie sie sich unterscheiden. Weiterhin befassen sich Jin et al. [100] mit den einzelnen Einflußfaktoren auf den Dissoziationsvorgang der Partikelnetzwerke. Da diese Publikation als die derzeit ausführlichste zu diesem Thema betrachtet werden kann und damit als Vergleich für die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wichtig ist, werden die Resultate dieser Publikation im folgenden geschildert. Die *Dichte der Oberflächenbelegung* ist proportional zur Schmelztemperatur T_m . Eine verbesserte Hybridisierungsrate bei erhöhter Oberflächenbelegung mit DNA-Molekülen wird in Erwägung gezogen. Die Bedeutung einer ausreichend hohen Oberflächenbelegung wird in einer Stabilisierung der Partikel gegen den für die Hybridisierung notwendigen Salzgehalt der Lösung gesehen. Die *Partikelgröße* führt ebenfalls zu einer veränderten Schmelztemperatur. Größere Partikel zeigen einer geringere Schmelztemperatur, da der Übergang schärfer wird. Der Durchmesser der Partikel, sowie deren unterschiedliche Diffusionseigenschaften werden aber nicht als die eigentlichen Verursacher des Verhaltens gesehen, da Dendrimere [101] und Polymerpartikel im μm -Bereich [102] ein breites Schmelzverhalten zeigen. Eine Begründung für das unterschiedliche Verhalten bei verschiedenen Partikeldurchmessern wird nicht gegeben. Steigende *Salzkonzentrationen* führen zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur. Das ist für freie DNA-Moleküle seit langem bekannt. DNA-verbundene Partikel weisen lediglich höhere absolute Schmelztemperaturen auf. Höhere Salzkonzentrationen führen zur Bildung von größeren Aggregaten, die wiederum zu einer größeren Änderung in der Extinktion führen [103]. Von Jin et al. [100] wird das Verhalten damit begründet, daß eine höhere Salzkonz-

zentration zu geringeren elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Partikeln und damit zu einer höheren Hybridisierungsrate führt. Die Hybridisierungsrate wird als sehr stark abhängig von der Salzkonzentration beschrieben, die zwischen 0.1M und 1M variiert wurde. Es wird darauf hingewiesen, daß die freien DNA-Moleküle der selben Sequenz mit Salzkonzentrationen unter 0.1M hybridisiert werden können, im Falle der DNA-modifizierten Partikel aber mindestens 0.5M NaCl vorliegen muß, um eine Hybridisierung auszulösen. Jin et al. erwägen, daß die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln ein Rolle für die Hybridisierung bzw. Dissoziation spielen. Weiterhin wurde festgestellt, daß mit längerer DNA-Sequenzlänge (und damit größerem Abstand der Partikel) die Schmelztemperatur steigt. Die Hybridisierungsrate, wie auch die Aggregatgröße, werden als Ursachen ausgeschlossen. Geschlußfolgert wird, daß die elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln der dominierende Faktor ist. Den Abschluß der Publikation bildet ein thermodynamisches Modell, das die Ergebnisse bestätigt, allerdings elektrostatische Wechselwirkungen und Eigenschaften der Partikel nicht berücksichtigt. Insgesamt werden die Ergebnisse zumeist unter dem Blickwinkel der Hybridisierung betrachtet und interpretiert. Park and Stroud [104, 105, 106] haben das Schmelzverhalten der DNA-Partikel-Hybride modelliert, welches die experimentellen Daten bzgl. des Unterschiedes zwischen freier und in Partikelnetzwerken gebundener DNA und den dabei beobachteten schärferen Übergang bestätigt.

Storhoff et al. [103] beschreiben, daß es bei nicht getemperten Aggregatlösungen kurz vor dem Schmelzen / der Schmelztemperatur zu einem Verringern der Extinktion kommt. Diesen Effekt bringen sie mit einer Ostwald-Reifung in Verbindung. Demnach wachsen die größeren Aggregate mit steigender Temperatur auf Kosten der kleinen. Es wird vorgeschlagen, daß dieser Effekt mit der Sequenzlänge zusammenhängt, jedoch nicht bei einer Länge von 24 Basen zu beobachten war, sondern erst bei längeren Sequenzen. Beschrieben wird auch, daß beim Erhitzen DNA-Stränge getrennt werden können, ohne daß die Partikel dispergiert werden. Als Konsequenz, daß nicht das Schmelzen der DNA, sondern das Auflösen der Partikelnetzwerke beobachtet wird, weisen die Autoren darauf hin, daß in diesem Fall keine „Schmelzkurve“ gemessen werden kann.

3.3.3 Optische Eigenschaften der Partikelnetzwerke

Die optischen Eigenschaften der Partikelnetzwerke sind ebenfalls untersucht worden [103, 107, 108], ebenso von Goldpartikeln auf Substraten [109]. Die Streuung spielt für DNA-verbundene Partikel eine größere Rolle als für dispergierte, einzelne Partikel (siehe Abb. 3.10). Im folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse zum UV/VIS-Spektrum DNA-verbundener Goldnanopartikel zusammengefasst. Demnach wird das UV/VIS-Spektrum weitestgehend durch die Größe der Aggregate (Anzahl der Partikel pro Aggregat) bestimmt und weniger durch den Abstand zwischen den Nanopartikeln, der durch die DNA-Sequenzlänge bestimmt wird [103]. Die Sequenzlänge ist umgekehrt proportional zum Ausmaß der Rotverschiebung der Plasmonenbande bei Kopplung der Partikel bei Raumtemperatur. Die Unterschiede heben sich aber auf, wenn die Partikelnetzwerke bis kurz unter die Schmelztemperatur getempert werden. Dann werden die optischen Eigenschaften unabhängig von der DNA-Sequenzlänge. Das Tempern bewirkt ein Anwachsen der Aggregatgröße. Demzufolge kann damit gezeigt werden, daß die gebildeten Aggregate die optischen Eigenschaften bestimmen und nicht die Sequenzlänge. In Abbildung 3.11 sind die berech-

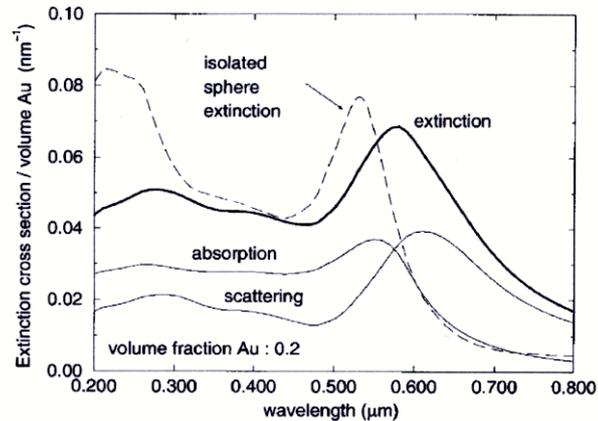


Abbildung 3.10: Extinktionsspektrum für ein 300 nm Aggregat bestehend aus 13 nm spärlichen Goldkolloiden in Wasser mit einem Volumenanteil von 0.2. Aus [107]

neten Veränderungen in den UV/VIS-Spektren zu sehen, wenn zum einen der Partikelabstand konstant gelassen, aber die Aggregatgröße verändert wird (links). Im rechten Bild bleiben andererseits die beteiligten Partikel je Aggregat konstant, aber deren Abstand wird verändert [103]. Die Extinktion wird mit einer Veränderung der Aggregatgröße viel stärker verändert. Eine Verdopplung des Gold-Volumenanteils führt dabei nur zu einer geringen Dämpfung und Rotverschiebung, während ein Anwachsen der Aggregatgröße durch mehr beteiligte Partikel zu einer sehr starken Dämpfung und starken Rotverschiebung der Plasmonenbande führt. Die berechneten Spektren lassen experimentell Aggregate von mehr als 1000 Partikeln pro Aggregat erwarten. Anderenfalls sind die optischen Eigenschaften der doppelten Breite der Plasmonenbande sowie eine starke Dämpfung der Extinktion nicht zu erwarten [107]. Die starke Dämpfung kann mit einem Abschirmen der Partikel im Inneren der Aggregate zusammenhängen.

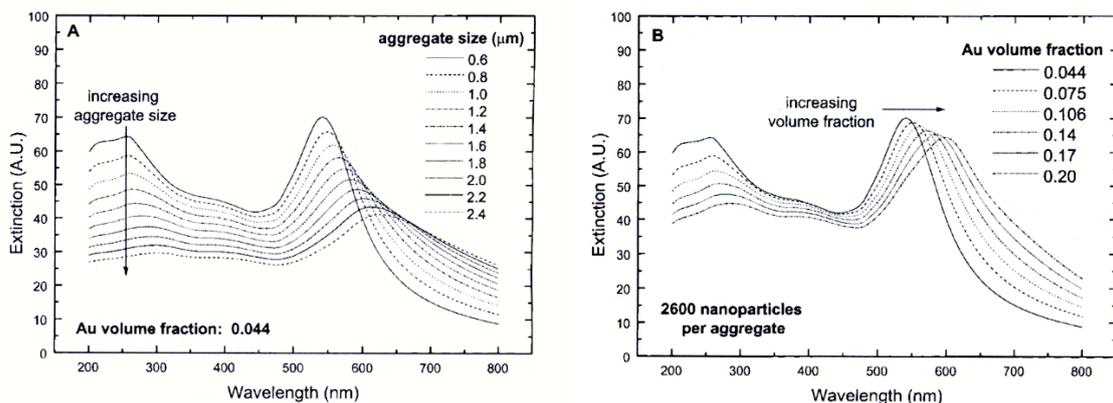


Abbildung 3.11: Simulation auf Basis einer angenommenen Sequenzlänge von 23 nm und einer BCC-Struktur der Partikel, die real nicht gebildet wird. **Links** Änderung der Extinktion bei Änderung der Aggregatgröße, aber konstantem Partikelabstand. **Rechts** Änderung der Extinktion bei verändertem Partikelabstand, aber konstanter Partikelanzahl pro Aggregat. Aus [103]

3.3.4 Anwendungen, Weiterentwicklungen

DNA-verbundene Nanopartikel werden überwiegend im Hinblick auf Bauelemente (heterogene Oberflächenbelegung [110]) oder als Sensoren untersucht und in Betracht gezogen, wobei letzteres in der Literatur als hauptsächliches potentiell Anwendungsbereich genannt wird [96, 97, 111, 112, 113]. Hier geht es vor allem um medizinische Fragestellungen der DNA-Diagnostik. Die Goldpartikel werden mit einer „Anker-DNA“ versehen, die aus einer Lösung mit unbekanntem DNA-Sequenzen die komplementären Sequenzen durch Hybridisierung detektieren soll. Untersucht wird in diesem Zusammenhang, wie selektiv, d.h. wie genau die Hybridisierung ist und ob geringste Fehler (engl. *mismatches*), z.B. eine einzelne Base betreffende Fehlpaarung erkannt werden kann. [82]. Desweiteren wird versucht, nicht nur Goldnanopartikel, sondern auch Nanopartikel aus anderen Materialien mittels DNA und / oder Protein-Erkennung zu verknüpfen (z. B.: Eisenoxid [114]). DNA-verbundene Partikelnetzwerke können mit Enzymen geschnitten werden [56]. Untersucht wird auch, ob die DNA-verbundenen Metallpartikel in elektronischen Anwendungen eingesetzt werden können und welche Eigenschaften die Netzwerke haben [115, 116].

4. Methoden

Im vorliegenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und ihre Verarbeitung vorgestellt. Zunächst werden einerseits die benutzten DNA-Sequenzen und andererseits die Nanostrukturen, die mittels DNA verknüpft wurden, aufgeführt. Anschließend geht es um die Verknüpfung sowie Untersuchungsmethoden der Partikelnetzwerke.

4.1 Ausgangsmaterial

DNA-Sequenzen Die DNA wurde von der Firma Thermo Electron GmbH, Ulm hergestellt und bezogen. Die verwendeten Sequenzen sind unten aufgeführt (siehe Tab. 4.1 und Abb. 4.1). Die Sequenzen waren mit verschiedenen Modifikationen (Thiolgruppe, Biotin) am 3'- und/ oder 5'-Ende versehen. Wurde doppelsträngige DNA verwendet, so wurden die Sequenzen entsprechend Tab. 4.2 zuvor hybridisiert. Aus der gelieferten DNA wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l hergestellt, anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

| Bezeichnung | Sequenzlänge | Sequenz | Modifikation |
|--------------|--------------|--|----------------------|
| G | 24 | AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA | 5' Thiol |
| G' | 24 | TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT | 5' Thiol |
| G_ohne Thiol | 24 | TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT | - |
| Biotin | 24 | AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA | 5' Biotin |
| Biotin' | 24 | TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT | 5' Biotin |
| ss2Biotin | 24 | AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA | 5' Biotin, 3' Biotin |
| tBiotin | 15 | AGC GGA TTT CAC TCT | 5' Biotin |
| tBiotin' | 15 | AGA GTG AAA TCC GCT | 5' Biotin |
| M1 | 8 | AGT CGT TT | 3' Thiol |
| M2 | 8 | GTT GCC AT | 3' Thiol |
| Mir | 19 | ATG GCA ACT ATC GCG CTA G | - |
| Mir' | 19 | AAA CGA CTC TAG CGC GAT A | - |
| L | 39 | GAA TGG ATA TCT GCA GTG AAT TCG GAT CCT TAG CAG TCG | 5' Thiol |
| L' | 39 | CGA CTG CTA AGG ATC CGA ATT CAC TGC AGA TAT CCA TTC | 5' Thiol |

Tabelle 4.1: Verwendete DNA-Sequenzen, notiert in 5' \rightarrow 3' Richtung.

| Charakteristikum | hybridisierte Sequenzen | Name |
|---|-------------------------|-----------|
| beidseitig thiofunktionalisiert | G und G' | dsG |
| einseitig thiofunktionalisiert | G und G_ohne Thiol | dsEsa |
| beidseitig Biotin-funktionalisiert lange Sequenz | Biotin und Biotin' | dsBiotin |
| beidseitig Biotin-funktionalisiert kurze Sequenz | tBiotin und tBiotin' | dstBiotin |
| dsDNA mit „klebrigen Enden“ | Mir und Mir' | dsMir |

Tabelle 4.2: Darstellung der Zusammensetzung der dsDNA-Sequenzen aus Tab. 4.1, die vor den Experimenten hybridisiert worden waren.

Verwendete Goldkolloide und sonstige Strukturen Es wurden Goldkolloide von BBInternational, UK (Tab. 4.3) verwendet, die über Plano, Wetzlar bezogen wurden. Sofern nicht anders angegeben, wurden Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm verwendet. Des Weiteren wurden 20 nm Goldkolloide mit einer Streptavidin-Oberflächenbelegung von Sigma, Taufkirchen, für die Kopplung der Partikel über die Biotin-Streptavidin-Bindung eingesetzt. Für die Verknüpfung von Nanostrukturen unterschiedlicher Geometrien standen am MPI Halle hergestellte Nanostrukturen zur Verfügung. Dabei handelte es sich zum einen um Goldnanostäbe in Lösung mit einem Durchmesser von ca. 400 nm (Herstellung: Martin Steinhart). Diese können in geordnetem, porösem Aluminiumoxid mit Hilfe von einem Polymer und einem Goldprecursor durch Tempern erzeugt werden. Durch anschließende Zerstörung des Aluminiumoxid-Templates werden die Goldstäbchen freigesetzt. Zum anderen sind Siliziumstäbe mit einem Durchmesser von ca. 250 nm Durchmesser, die mittels MBE (Molekularstrahlepitaxie) erzeugt werden, benutzt worden (Herstellung: Luise Schubert). Diese „pilzartigen“ Strukturen tragen ein „Goldköpfchen“.

| Durchmesser in nm | Kolloide / ml |
|-------------------|---------------------|
| 20 | $7 \cdot 10^{11}$ |
| 50 | $4.5 \cdot 10^{10}$ |
| 80 | $1.1 \cdot 10^{10}$ |

Tabelle 4.3: Aufstellung der verwendeten Goldkolloide von BBInternational.

4.2 Generieren von Partikelnetzwerken

Partikelnetzwerke durch dsDNA Partikelnetzwerke aus Goldkolloiden mittels dsDNA (Abb. 4.1 Nr. 1) wurden wie folgt erzeugt: In der Regel wurden die Kolloide doppelt konzentriert verwendet, d.h. 400 Mikroliter der Kolloid-Lösungen wurden zentrifugiert (Minispin von Eppendorf, Hamburg), die überstehende Flüssigkeit abgenommen und die Partikel in 200 Mikroliter entionisiertem Wasser resuspendiert. Dazu wurden $10 \mu\text{l}$ der DNA Stammlösung gegeben und bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert. Die DNA wurde immer weit im Überschuss zugegeben, um eine Sättigung der Partikeloberflächen sicherzustellen. Zur Verknüpfung der Partikel

wurden diese wiederum 6 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgenommen und durch eine Lösung bestehend aus 6fach SSC (engl. *Saline-sodium citrate buffer*, Sigma) und 0.1% SDS (engl. *Sodium dodecyl sulfate*, Sigma), pH 7 ersetzt. Die Natrium-Ionen Konzentration entspricht etwa 1M NaCl. Alternativ ist deshalb für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit auch 1M NaCl Lösung und deren Verdünnungen verwendet worden. Zum Verbinden von Goldkolloiden mit unterschiedlichem Durchmesser wurden diese im Volumenverhältnis (Lösungsmittel) 1:1 verwendet, sofern nichts anderes angegeben ist. Die kleineren Partikel liegen dabei im Überschuß vor.

Die Verknüpfung der Partikel erfolgte auch über einen zweiten Weg, der ssDNA und eine dsDNA-Sequenz verwendet [35] (Abb. 4.1 Nr.7): Es wurden, ebenso wie oben beschrieben, zwei Fraktionen an Partikeln vorbereitet. Statt der dsDNA, wie zuvor, wurde hier einer Fraktion M1, der anderen M2 (siehe Tab. 4.1) zugegeben. Die Proben wurden wiederum 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit $MgCl_2$ auf eine Endkonzentration von 0.35 mM $MgCl_2$ je Fraktion gebracht. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Fraktionen zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit mit der überschüssigen DNA abgenommen und die Partikel in entionisiertem Wasser resuspendiert. Dann wurden beide Fraktionen miteinander gemischt. Es ist zu beachten, daß die DNA-Sequenzen auf den Partikeln nicht komplementär zu einander sind und somit keine Kopplung der Partikel stattfinden kann. Daß DNA auf den Partikeln gebunden ist, zeigt sich durch deren Stabilität gegenüber der Zugabe von $MgCl_2$ (keine Änderung der Farbe der Partikel-Suspension). Nun wurde der Probe die dsDNA-Sequenz dsMir zugegeben, die zu den DNA-Sequenzen auf den Partikeln komplementär ist und damit zu einer Verknüpfung der Partikel führen kann. Die Salzkonzentration der Partikel-Suspension wurde nochmals erhöht. Die UV/VIS-spektroskopische Untersuchung erfolgte unmittelbar nach Zugabe der verbindenden DNA-Sequenz und nach Kopplung der Partikel, die durch eine Farbänderung sichtbar wurde.

Partikelnetzwerke durch ssDNA Zur Verknüpfung mittels zueinander komplementärer ssDNA wurden wiederum, wie oben beschrieben, zwei Partikel-Fraktionen vorbereitet und mit je einer ssDNA-Sequenz (Sequenz L bzw. L') inkubiert (Abb. 4.1 Nr. 3). Anschließend wurden die beiden Fraktionen gemischt und nach einem Tag wie die dsDNA-Proben behandelt, d.h. zentrifugiert und in 6fach SSC, 0.1% SDS resuspendiert.

Die konventionelle Methode (nach A.Taton [117] und AG Fritzsche, IPHT, Jena; verändert), die ssDNA zur Verknüpfung der Partikel benutzt, wird im folgenden beschrieben. Die vorbereitete DNA wird, ebenso wie bisher beschrieben, zu den Goldkolloiden gegeben und beides einen Tag inkubiert. Zum Einsalzen, d.h. schrittweisen Erhöhen der Salzkonzentration in den Kolloidlösungen wird ein 1 M Natriumchlorid/ 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) verwendet. Dabei werden kleine Mengen des Puffers zugesetzt und die Proben zügig gemischt (Minishaker, IKA Labor-technik, Staufen). Vor der nächsten Zugabe ruhen die Proben einige Minuten. Der Vorgang wird mindestens dreimal durchgeführt bis eine Endkonzentration von 0.1 M Natriumchlorid / 10 mM Natriumphosphat-Puffer (Natriumphosphat-Puffer: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , beides Sigma, Taufkirchen) erreicht ist. Danach ruhen die Proben weitere zwei Tage bei Raumtemperatur. Überschüssige DNA, die nicht gebunden hatte, wurde anschließend durch wiederholte Waschschriffe in Natriumchlorid / Natriumphosphat-Puffer entfernt. Des weiteren wurden als Alternative zur thiofunktionalisierten DNA, 20 nm Partikel mit Streptavidin-Oberflächenbelegung

(BBInternational) und dazu Biotin-funktionalisierte DNA (siehe Tab. 4.1 und Tab. 4.2) verwendet. Die Partikel hatten ein Extinktionsmaximum von 525 nm und befanden sich in 0.01M PBS, pH 7.2 (engl. *Phosphate buffered saline*). Die mit Streptavidin funktionalisierten Goldkolloide wurden 1:1 verdünnt. Die Biotin-funktionalisierte DNA wurde ebenso vorbereitet wie die thiofunktionalisierte, d.h. es wurde eine Stammlösung von 100 pmol/ μ l hergestellt und die DNA wiederum im Überschuß zu den Partikeln gegeben und die Extinktion im weiteren Verlauf zeitabhängig gemessen. Außerdem wurde die Biotin-funktionalisierte DNA auch mit den standardmäßig verwendeten 20 nm Goldkolloiden ohne Oberflächenbelegung verwendet. Insgesamt wurde die Biotin-funktionalisierte DNA sowohl einzel- als auch doppelsträngig und in zwei verschiedenen Sequenzlängen eingesetzt.

Verbinden unterschiedlicher Geometrien Werden unterschiedliche Geometrien mittels ssDNA miteinander verbunden, so müssen die beiden Komponenten zunächst getrennt voneinander mit einzelsträngiger DNA funktionalisiert werden. Dies erfolgt analog der Beschreibung für Kolloide, die mittels ssDNA verbunden wurden. Im Falle der Silizium-Wafer wurde anschließend die Kolloidflüssigkeit (80 nm Kolloiddurchmesser) auf das Probenstück (ca. 3x3 mm) gegeben. Es ist wichtig darauf zu achten, daß die Flüssigkeit bei den verwendeten kleinen Volumina von 100 μ l bzw. 200 μ l nicht verdampft. Um dies zu verhindern, wurden 96-Well-Platten (LockWellTM Nunc, Wiesbaden) verwendet und diese immer mit Parafilm abgeklebt. Größere Waferstücke wurden mit einem Flüssigkeitsvolumen von 500 μ l bzw. 1 ml in 4er-Well-Platten (Multischalen, Nunc) auf dem Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) inkubiert.

Die Goldnanostäbe wurden mit 20 nm Goldkolloiden kombiniert. Zur Untersuchung wurde die Lösung der mit den Goldkolloiden verknüpften Stäbe auf Silizium-Wafer getropft und getrocknet.

Die Kontrollen erfolgten jeweils mit Nanostab-Arrays, Goldnanostäbchen und Kolloiden, die nicht mit DNA funktionalisiert waren.

4.3 Untersuchungsmethoden

UV/VIS-Spektroskopie Die Kolloid-Lösungen und Partikelnetzwerke wurden überwiegend mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Dafür stand ein küvettenfrei arbeitendes Gerät zur Verfügung (ND-1000 von NanoDrop, Rockland, DE, USA), welches speziell für biologische Anwendungen entwickelt wurde und mit einem Probenvolumen von 1 μ l arbeitet. Als Referenz wurde Wasser verwendet. Die Kolloidlösungen konnten ohne spezielle Vorbereitungen direkt gemessen werden. Dabei wurden die Proben jeweils in einem Wellenlängenbereich i. d. R. von 250 nm bis 700 nm in dispergierter Form und als miteinander gekoppelte Partikel gemessen. Zu Kontrollzwecken wurden auch die abgenommenen Lösungen nach dem Zentrifugieren gemessen, die die nicht gebundene, überschüssige DNA enthielten. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Igor.

Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) Die Aggregate wurden des weiteren mittels Rasterelektronen-Mikroskopie (JSM 6300F, Jeol) untersucht. Dafür wurden die Partikel-Lösungen auf gereinigte Silizium-Wafer Stücke mehrfach aufgetropft. Die Proben wurden in einem Kleinbrutschrank (Heraeus, Hanau) getrocknet. Um auskristallisiertes NaCl zu entfernen, können die Proben zwei-, dreimal kurz in entionisiertes Wasser getaucht werden. Nach dem Trocknen sind die Proben zur Untersuchung bereit.

Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) Diese Untersuchungsmethode wurde insbesondere zur Charakterisierung der gebildeten Aggregate, also zur Bestimmung der Aggregatgrößen-Verteilung bzw. der Aggregatgröße verwendet. Hierzu wurden schrittweise von der Partikel-Lösung 1 - 2 μl auf ein TEM-Grid (R1/4, Quantifoil, Jena) getropft. Um ein störendes Auskristallisieren von NaCl zu verhindern, wurde von der Rückseite des Grids sofort die Flüssigkeit mittels Filterpapier (Schleicher und Schnell, Dassel) abgezogen. Nach dem vollständigen Abtrocknen standen die Proben zur Transmissionselektronen-Mikroskopie (JEM-1010, Beschleunigungsspannung 110kV, Jeol) bereit.

Bildverarbeitung Die Auswertung der TEM-Bilder zur Erstellung der Statistiken erfolgte mittels des kostenfreien Programms ImageJ (entwickelt am U.S. National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Zunächst wurden die Bilder kalibriert und dann für die Abstandsmessungen ein Linescan durch die jeweils betrachteten Partikel gelegt. Für die Angabe des Abstandes in Nanometern mußte auch der Linescan kalibriert werden. Zur Bestimmung des Partikelabstandes wurden Übersichtsbilder aufgenommen und ausgewertet. Für die Ermittlung der Anzahl der Kolloide pro Aggregat wurde die Zählfunktion des Programmes genutzt. Die Ergebnisse wurden jeweils in Gruppen zusammengefasst und aufgetragen. Für die Darstellung der Bilder in dieser Arbeit wurden zur Bildbearbeitung die Programme CorelDraw 8 bzw. 10 sowie die zugehörigen Versionen von Corel Photo-Paint verwendet.

Berechnung der Extinktions-Spektren Die Berechnung der Extinktions-Spektren erfolgte nach der Mie-Theorie (Gl. 3.12, 3.13). In jedem Falle wurden die Berechnungen für sphärische Goldpartikel mit einem Füllfaktor von 0.2 in Wasser durchgeführt, sofern nichts anderes angegeben ist.

4.4 Schmelzen der DNA

Das Schmelzen der DNA erfolgt durch eine Temperaturänderung mit konstanter Heizrate von 0.5°C/min. Die Temperierung erfolgte in einem Thermostaten (ThermoStat plus, Eppendorf, Hamburg). Dabei betrug die Starttemperatur 22°C und die Endtemperatur 90°C. Die Extinktion wurde wiederum küvettenfrei, wie vorstehend beschrieben, gemessen. Im Temperaturbereich fern des erwarteten Überganges von doppel- zu einzelsträngiger DNA wurde in der Regel alle 5°C die Extinktion gemessen, im Übergangsbereich alle 1 bis 2°C. Die Änderung der Extinktion bei 260 nm wurde gegen die Temperatur aufgetragen. Der Wendepunkt gibt die charakteristische Schmelztemperatur T_m an.

Zuerst wurde dsDNA (dsG) in Wasser bzw. in 1M NaCl geschmolzen. Im nächsten Schritt wurden Partikel, die mit dsDNA funktionalisiert waren untersucht. Hierfür wurden Proben wie in Abschnitt 4.2 mit einseitig thiofunktionalisierter DNA (dsEsa) hergestellt. Ebenso wurde mit beidseitig thiofunktionalisierter DNA (dsG) verfahren, die zur Kopplung der Partikel und damit zu den Partikelnetzwerken führt. Die Extinktion wurde jeweils über einen Wellenlängenbereich von 250 nm bis 700 nm aufgenommen. Damit konnten gleichzeitig Veränderungen am Absorptionsmaximum der DNA bei 260 nm und Veränderungen der Extinktion im Spektrum der Partikel gemessen werden.

5. DNA als Klebstoff

Das vorliegende Kapitel unterteilt sich in drei Abschnitte. Wie die Goldpartikel mittels DNA verbunden werden können und wie man diese Verbindung eindeutig nachweisen kann, wird im ersten Abschnitt behandelt. Der folgende Abschnitt befaßt sich mit der Morphologie der entstehenden Partikelnetzwerke und mit der Interpretation der Extinktions-Spektren. Der letzte Abschnitt geht der Frage nach, ob diese Partikelnetzwerke durch das Schmelzen der DNA wieder getrennt werden können. Dieses Kapitel ist grundlegenden Fragestellungen gewidmet, um DNA als Klebstoff verwenden zu können.

5.1 Nachweis der Verbindung

Die Kopplung von Nanopartikeln mittels DNA kann ohne die kritischen Schritte Hybridisierung und Einsalzen ausgeführt werden, wenn von Beginn an mit doppelsträngiger DNA gearbeitet wird. Da die Persistenzlänge von dsDNA größer ist als die von ssDNA, kann man mit einer höheren Stabilität, und damit verbunden, mit geringeren Wechselwirkungen mit der Oberfläche der Partikel rechnen. Die Reduzierung der notwendigen Schritte zur Kopplung führt auch zu einer Reduzierung möglicher Einflußfaktoren und damit zu einer fokussierteren Untersuchung der Hybride. Zunächst werden diese Vorteile mit dem Nachteil erkauft, keine spezifische, gerichtete Bindung mehr zwischen den DNA-funktionalisierten Partikeln zu haben. Allerdings können dafür vergleichende Untersuchungen von ssDNA und dsDNA stattfinden, was den Gegebenheiten im System durch Verbinden (dsDNA) und Trennen (ssDNA) im Netzwerk vollkommen entspricht. Die Wechselwirkungen können somit auch mit den heterogenen Basenfolgen stattfinden, statt sich auf homogene PolyA- oder PolyT- Sequenzen beschränken zu müssen, die von einer tatsächlichen, sinnvollen Anwendbarkeit weit entfernt sind.

Im folgenden wird die verwendete Methode kurz beschrieben (Abb. 5.1). Die Partikel, die miteinander gekoppelt werden sollen, befinden sich in einer Lösung. Es gibt nur eine Fraktion von Partikeln (im Vergleich zur konventionellen Methode, siehe Abb. 3.9). Zu diesen wird die doppelsträngige DNA gegeben und verbindet, durch die kovalente Bindung des Schwefels aus der Thiol-Gruppe auf dem Gold, die Partikel miteinander. Die Kopplung geschieht in der Regel in einer NaCl-Lösung. Nicht funktionalisierte Partikel sind in dieser Lösung instabil und agglomerieren irreversibel. Damit kann eine erfolgreiche Funktionalisierung der Partikel mit DNA bzw. deren Kopplung sichtbar überprüft werden.

Für den Nachweis, daß die DNA die Partikel miteinander verbindet und selbst nur durch die Thiolgruppe auf der Oberfläche gebunden wird, sind drei Schritte notwendig. Da die Kopplung der Kolloide allein auf der kovalenten Bindung zwischen der thiol-funktionalisierten DNA und der Goldoberfläche beruht, kann diese demnach durch das Vorhandensein bzw. Fehlen der

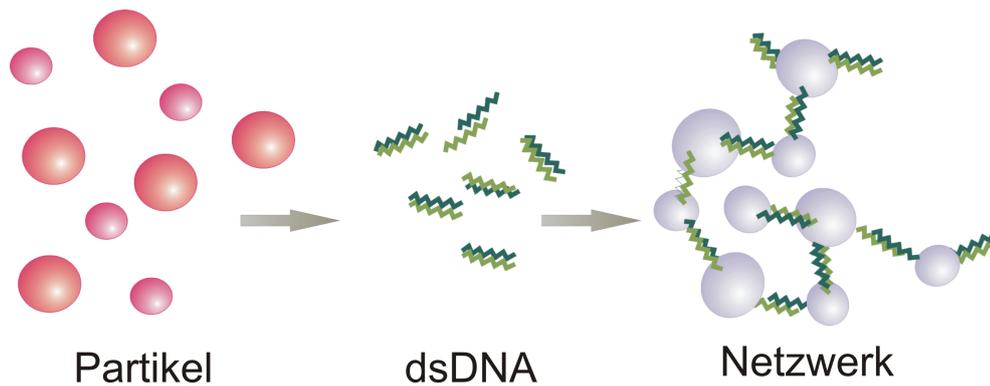


Abbildung 5.1: Schema der in dieser Arbeit entwickelten und verwendeten Methode. Im ersten Schritt werden die zu verknüpfenden Partikel gemischt. Anschließend wird doppelsträngige DNA dazugegeben. Es ist kein Hybridisierungsschritt der DNA notwendig. Die Verknüpfung zum Partikelnetzwerk erfolgt in der Regel in einer NaCl Lösung.

Thiolgruppe beeinflusst werden. Untersucht wird also, wie sich dsDNA mit zwei Thiolgruppen im Vergleich zu einer Sequenz mit nur einer Thiolgruppe bzw. gänzlich ohne Thiolgruppe mit Goldkolloiden verhält. Für den Nachweis wurden 20 nm Goldkolloide verwendet.

Zur Kopplung der Goldkolloide wird dsDNA verwendet, bei der beide Stränge am 5'-Ende thiofunktionalisiert sind. Aus der Literatur [35] ist bekannt, wie das UV/VIS-Spektrum gekoppelter Partikel aussieht. Hier wurden 20 nm Goldkolloide gekoppelt, was zu einer Rotverschiebung von 525 nm zu 555 nm und einer deutlichen Verbreiterung der Plasmonenbande führt (Abb. 5.2). Allgemein zeigt die Übereinstimmung des Ergebnisses mit der Literatur, daß die Kopplung mittels doppelsträngiger DNA möglich ist.

Im nächsten Schritt wird eine Thiolgruppe eliminiert. Damit kann die DNA an ein Partikel binden, aber es ist keine Verbindung zwischen zwei Partikeln möglich. Eine Netzwerkbildung ist also ausgeschlossen. Wie zuvor beschrieben, sind nicht funktionalisierte Partikel in Salzlösungen instabil. Wenn die DNA also auf den Partikeln bindet, sollten sie in Salzlösungen stabil sein und es sollte keine Änderung in der Extinktion auftreten. Dieses Verhalten zeigte sich auch in den Experimenten (Abb. 5.3). Zusammen mit dem Ergebnis der DNA mit zwei Thiolgruppen ist damit eindeutig bewiesen, daß die DNA tatsächlich nur über die Thiolgruppe an der Oberfläche angebunden wird und auch auf die erwartete Weise als Verbindungsstück und Abstandhalter zwischen den Partikeln fungiert. Wäre die DNA über ihr Rückgrat unspezifisch auf dem Goldkolloid gebunden und würde dadurch die Partikel miteinander verbinden, würde auch im Falle der DNA mit einer Thiolgruppe eine Veränderung der Extinktion zu messen sein.

Zur Kontrolle wurden Versuche mit doppelsträngiger DNA vorgenommen, die keine Thiolgruppe besaßen. Damit konnte nochmals untermauert werden, daß nur eine thiofunktionalisierte DNA die Partikel in einer Salzlösung stabilisiert. Ist diese nicht vorhanden, so agglomerieren die Partikel irreversibel und fallen aus. Die Signal-Intensität ist sehr gering, da sich riesige Agglomerate bilden, so daß die Plasmonenbande sehr stark rotverschoben (über den Meßbereich hinaus) und gedämpft ist (Abb. 5.4).

In diesem Abschnitt wurde die Kopplung von Goldkolloiden mittels doppelsträngiger DNA vorgestellt. Diese Methode erlaubt es, in Lösung und durch die UV/VIS-Spektroskopie den Nachweis

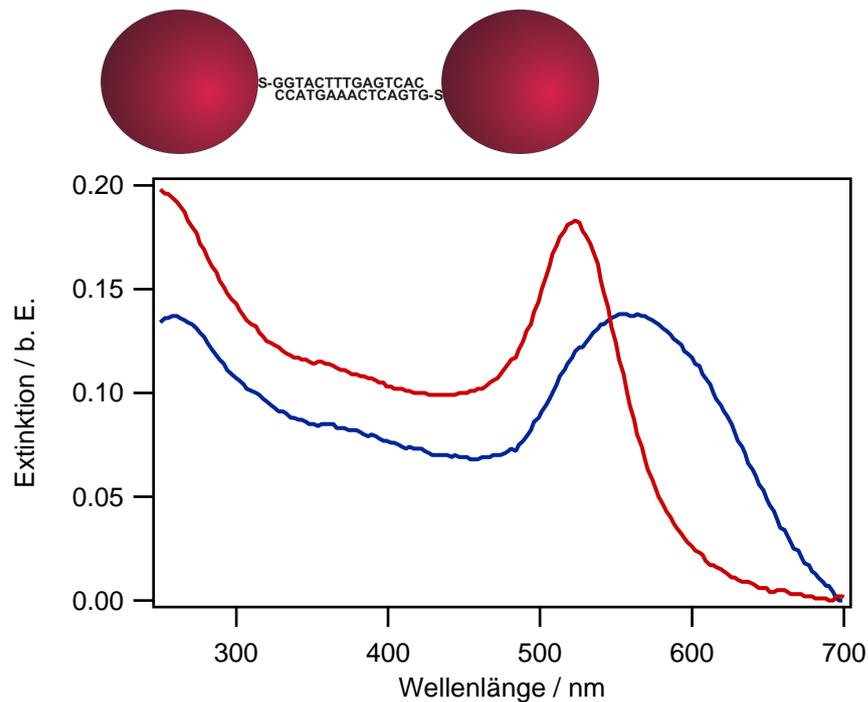


Abbildung 5.2: Oben Schema der Verbindung von Partikeln durch beidseitig thiofunktionalisierte DNA und Unten zugehöriges UV/VIS-Spektrum DNA-gekoppelter 20 nm Goldkolloide. Die Kopplung zeigt sich im UV/VIS-Spektrum durch eine Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonenbande (blau) im Vergleich zu dispers vorliegenden Partikeln zu Beginn (rot).

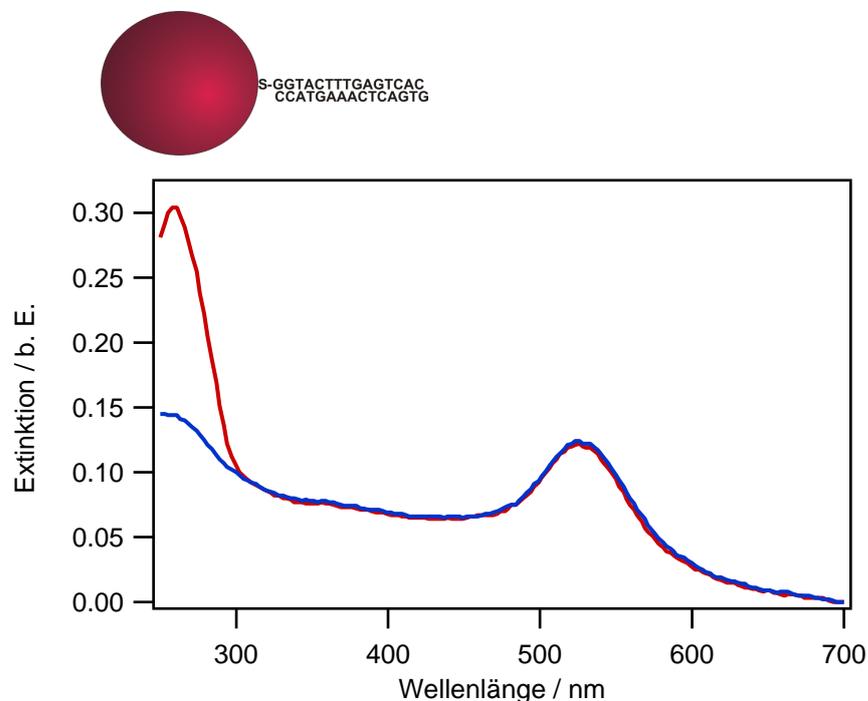


Abbildung 5.3: Oben Schema der Anbindung von einseitig thiofunktionalisierter DNA auf Partikeln und Unten zugehöriges UV/VIS-Spektrum für 20 nm Goldkolloide. Die Spektren sind identisch, da die Partikel in der Salzlösung durch die DNA geschützt sind und weiterhin dispergiert vorliegen (blau), wie zu Beginn (rote Kurve, die DNA ist bereits zugegeben). Die Extinktionsveränderung bei 260 nm kommt durch den Lösungsmittelaustausch und damit einer Entfernung überschüssiger DNA zustande.

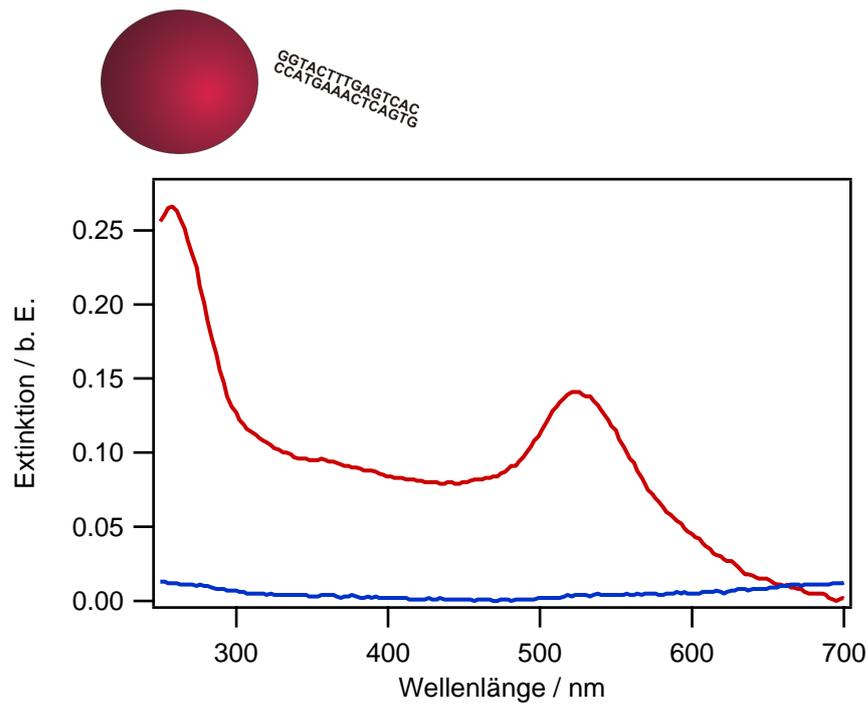


Abbildung 5.4: Oben Schema der Partikel und der nicht thiolfunktionalisierten DNA, sowie Unten das zugehörige UV/VIS-Spektrum für 20 nm Goldkolloide. In der Salzlösung kann keine Extinktion gemessen werden (blau). Die Partikel sind in der Salzlösungen nicht geschützt, agglomerieren irreversibel und fallen aus. Die Extinktion der in der Lösung dispergierten Partikel ist wiederum rot dargestellt.

zu erbringen, daß die Partikel durch die DNA als Abstandhalter miteinander verbunden werden. Damit ist eine wesentliche Grundvoraussetzung zur Nutzung der DNA als Klebstoff erfüllt.

An den Nachweis der Verbindung schließt sich die Frage an, wie die Netzwerke, die durch die Kopplung der Kolloide entstehen, aussehen. Dazu wurden TEM-Analysen durchgeführt, die im nachfolgenden Abschnitt beschrieben werden. Zudem wurden auch weitere Experimente mit der Kopplung verschieden großer Goldkolloide durchgeführt, die ebenfalls vorgestellt werden.

5.2 Morphologie der Hybride

Die verwendeten 20 nm Goldpartikel dienen als Standardgröße der Untersuchung des Systems. Darüberhinaus interessiert aber im Hinblick auf die Erzeugung von Strukturen, ob auch größere Partikel und unterschiedlich große Partikel miteinander verbunden werden können. Deshalb gliedert sich der nachfolgende Abschnitt in die Beschreibung von sogenannten Einkomponenten-Systemen, in denen Partikel gleicher Größe miteinander gekoppelt werden und in die von Mehrkomponenten-Systemen, die eine Kopplung unterschiedlich großer Partikel ermöglichen.

5.2.1 Einkomponenten-Systeme

Es wurden Goldkolloide mit 20 nm, 50 nm und 80 nm Durchmesser durch doppelsträngige DNA gekoppelt. In Abb. 5.5 ist sowohl die Extinktion der Partikel ohne DNA angegeben, als auch die Veränderung der Extinktion für die drei Durchmesser (vorher - nachher). In jedem Falle führte

die Kopplung zu einer sichtbaren Farbveränderung, doch unterscheiden sich die Extinktionspektren der beiden größeren Partikeldurchmesser dadurch, daß hier keine so starke Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonenbande auftritt. Stattdessen ist eine Zunahme der Extinktion im längerwelligen Bereich um 600 nm zu beobachten. Zwangsläufig ergibt sich hier die Frage, ob diese Unterschiede sich in Form und Größe der entstandenen Aggregate widerspiegeln. Deshalb werden nachfolgend die Ergebnisse der TEM-Analyse zu allen drei Durchmessern präsentiert.

Ein Nachteil der TEM- oder REM Aufnahmen ist, daß die gebildeten Aggregate getrocknet werden müssen. Damit gehen Veränderungen der gesamten Struktur einher, so daß die Ergebnisse nur sinnvoll im Zusammenhang mit der UV/VIS-Spektroskopie sind. Es ist zu beachten, daß eine UV/VIS-Spektroskopie an getrockneten Aggregaten auch andere Ergebnisse liefern würde, als die Messung in Lösung, da dann die umgebenden Medien Glas und Luft sind und dies Einfluß auf die Oberflächenplasmonen-Resonanz hat.

Bei den 20 nm Partikeln wurden drei Fälle anhand von TEM-Bildern verglichen: nicht funktio-

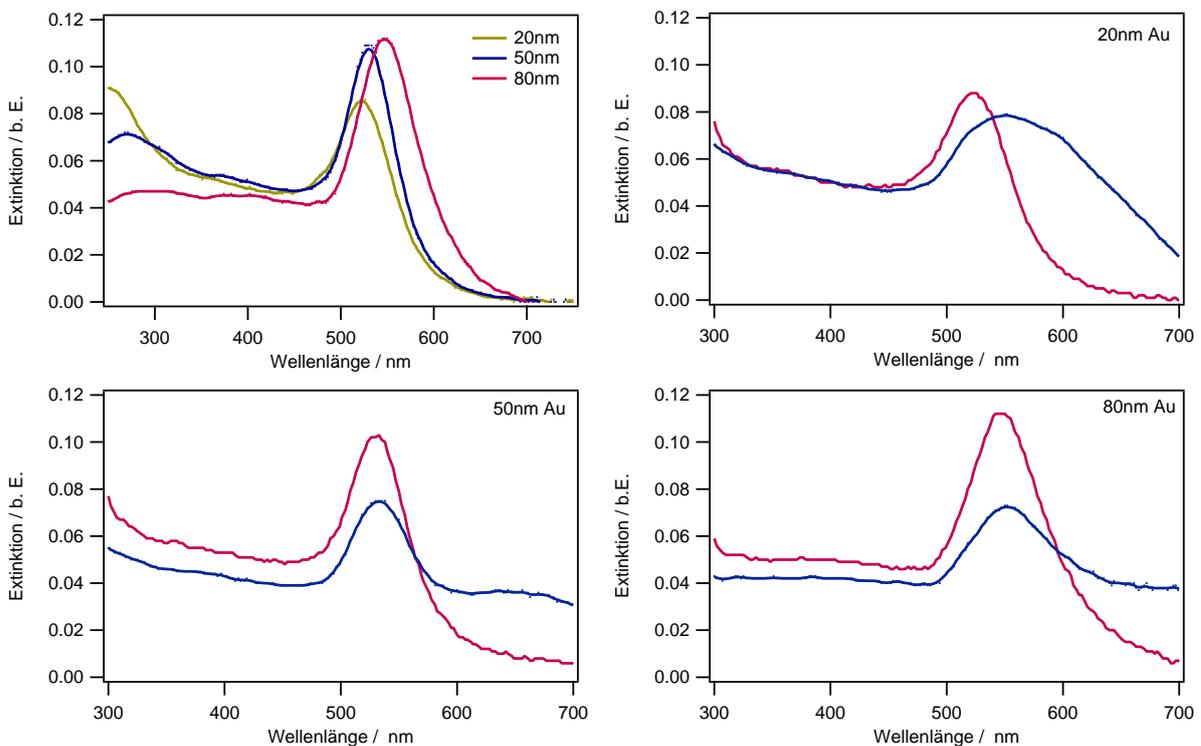


Abbildung 5.5: Extinktions-Spektren von Goldkolloiden mit einem Durchmesser von 20 nm, 50 nm und 80 nm, verbunden durch 24mer dsDNA. **Oben links** Extinktion nicht funktionalisierter Goldpartikel mit verschiedenen Durchmessern. Mit größer werdendem Durchmesser tritt eine Rotverschiebung der Plasmonenbande auf, die Extinktion im Bereich von 260 nm nimmt ab. **Oben rechts** Extinktionsveränderung von 20 nm Goldpartikeln vor der Kopplung (rot) und danach (blau). Durch die Kopplung tritt eine Verbreiterung der Plasmonenbande und eine Rotverschiebung von 525 nm nach 555 nm auf. **Unten links** Extinktionsveränderung von 50 nm Goldpartikeln vor der Kopplung (rot) und danach (blau). Die Rotverschiebung fällt sehr gering aus. Dafür tritt eine Zunahme der Extinktion im Bereich von 650 nm auf. **Unten rechts** Extinktionsveränderung von 80 nm Goldpartikeln vor der Kopplung (rot) und danach (blau). Auch hier ist nur eine geringe Verschiebung, dafür aber im Bereich ab 600 nm eine starke Zunahme der Extinktion zu verzeichnen.

nalisierte Goldkolloide (Abb. 5.6 A), Goldkolloide mit DNA funktionalisiert, aber ungekoppelt (Abb. 5.6 B) und gekoppelte Partikel (Abb. 5.6 C). Für die mit DNA funktionalisierten Partikel wurde beidseitig thiofunktionalisierte DNA verwendet. Es zeigte sich, daß sich die nicht funktionalisierten Goldpartikel beim Trocknen auf dem TEM-Grid zu sehr großen Aggregaten von schätzungsweise über 300 Partikeln zusammenlagern. Es liegen kaum einzelne Partikel vor. Dies ist aber der Fall, wenn die Partikel bereits in der DNA-Lösung inkubiert wurden, aber noch nicht miteinander verbunden waren. Der mittlere Abstand zwischen den Partikeln beträgt dann ca. 66 nm, sie sind also deutlich separiert. Ausgewertet wurden 211 Abstände zwischen 218 Partikeln. Knapp ein Viertel der Abstände ist kleiner als 8 nm. Partikel, die so dicht beieinander liegen, bilden sehr kleine Aggregate aus zwei bis maximal 5 beteiligten Partikeln. Es ist festzuhalten, daß die DNA als Schutz vor einer Agglomeration der Partikel dient und daß möglicherweise bereits einige Partikel durch die DNA miteinander verbunden werden. Werden die 20 nm Goldkolloide miteinander verknüpft, so bilden sich Aggregate. Außerdem liegt ein Teil der Partikel weiterhin einzeln vor. Es wurden die Abstände zwischen den Partikeln ermittelt. Des weiteren wurde die Anzahl der Partikel pro Aggregat bestimmt, da die Größe des Aggregates wesentlich die optischen Eigenschaften bestimmt. Welchen Einfluß die Aggregatgröße auf die Extinktion hat, verdeutlicht die Abb. 5.7, in der die Extinktions-Spektren zweier Proben unterlegt mit einem REM-Bild der entsprechenden Probe den Größenunterschied verdeutlichen. Für den Partikelabstand wurden 93 Abstände zwischen 96 Partikeln ausgewertet. Der mittlere Abstand besträgt 6 nm. Am häufigsten tritt ein Abstand zwischen 4 nm und 7 nm auf (Abb. 5.8). Die DNA hat eine Länge von 8 nm. Daß der gemessene Abstand zwischen den Partikeln kürzer ist, verwundert aus folgenden Gründen nicht: Die DNA ist nicht als gestrecktes Molekül anzunehmen, sondern verkürzt sich, z.B. infolge des Salzgehaltes, oder aufgrund der Spiralisierung der DNA. Das Trocknen der Probe kann ebenfalls ein Verändern der Struktur (Schrumpfen) verursachen. Die Aggregate bilden sich in Lösung, sind also dreidimensional. Da der Aufnahme-winkel der ausgewerteten TEM-Aufnahme immer 90° zur Unterlage beträgt, kann der Abstand zwischen den Partikeln nicht zwangsläufig der maximale Abstand zwischen den Partikeln sein. Das heißt, der Mittelwert der ermittelten Abstände muß geringer als 8 nm sein, um von einer

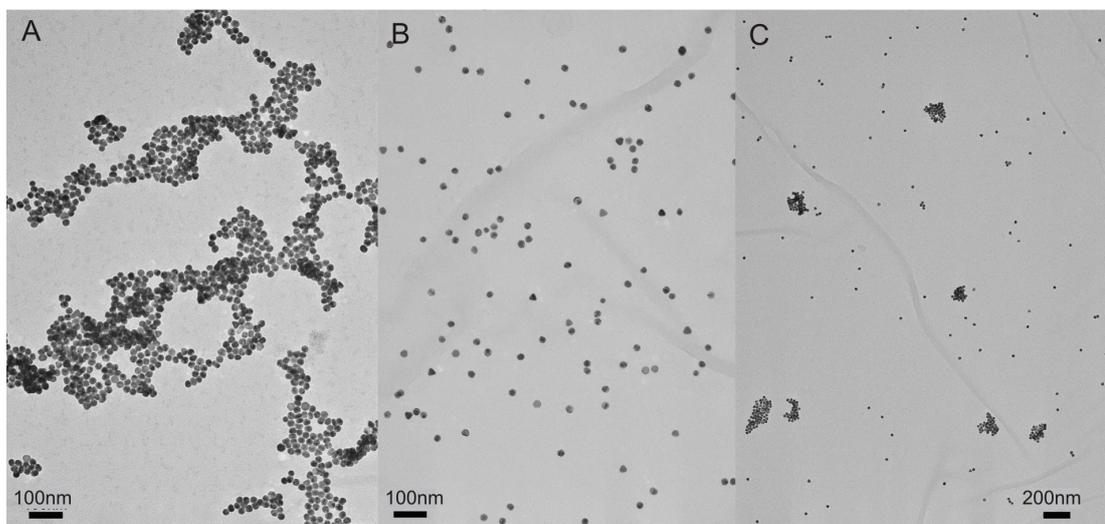


Abbildung 5.6: TEM-Aufnahme von 20 nm Goldkolloiden **A** unbehandelt **B** mit DNA funktionalisiert, aber ungekoppelt und **C** gekoppelt.

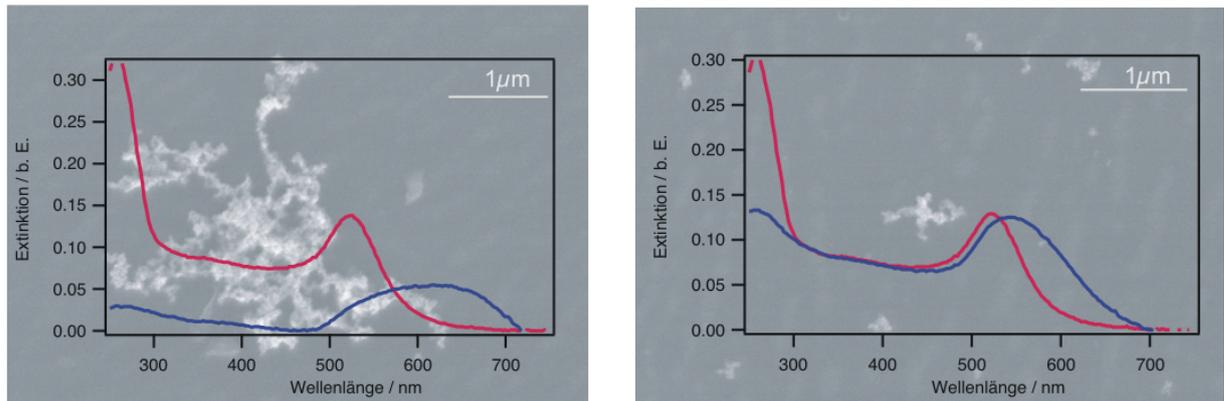


Abbildung 5.7: REM-Aufnahme und zur selben Probe gehörendes Extinktions-Spektrum verdeutlichen den Zusammenhang von Aggregatgröße und Lage der Plasmonenbande - ein Beispiel. Die rote Kurve gibt die Extinktion der dispergierten, die blaue die Extinktion der gekoppelten Partikel an. **Links** Eine starke Rotverschiebung und Dämpfung der Plasmonenbande geht mit sehr großen Aggregaten einher. **Rechts** Ist die Dämpfung und Rotverschiebung schwächer ausgeprägt, liegen in der Lösung kleinere Aggregate vor.

Kopplung der Partikel durch die DNA zu sprechen. Um zu klären, wieviele Partikel typischerweise die Aggregate bilden, wurden 35 eben dieser ausgewertet. Diese 35 Aggregate waren aus mehr als 1700 Partikeln zusammengesetzt. Die genauere Analyse ergab, daß zwei Drittel der Aggregate zwischen 10 und 60 Partikel groß waren, wovon wiederum die meisten zwischen 30 und 50 Partikel umfassten. Ein weiteres knappes Viertel (23%) waren große Aggregate, die zwischen 100 und 150 Partikel umfassten. REM-Aufnahmen ließen bereits eine bestimmte Aggregatgröße von durchschnittlich 40 Partikel erwarten, die durch die TEM-Analyse bestätigt wurden.

Nach der Bestimmung der Aggregatgrößen der gekoppelten 20 nm Goldkolloide wurden Aggregate aus 50 nm Partikeln untersucht. Die Extinktion der gekoppelten Partikel zeigt zwar eine starke Dämpfung, aber keine ausgeprägte Rotverschiebung oder Verbreiterung des Goldpeaks. Die TEM-Analyse zeigte, daß viele kleinere Aggregate gebildet werden (Beispiele für die Aggregate sind in Abb. 5.9 gezeigt). Der Partikelabstand beträgt wie oben im Mittel 6 nm (Häufung zwischen 4 nm und 6 nm). Die Aggregate sind durchschnittlich 20 Partikel groß und damit nur

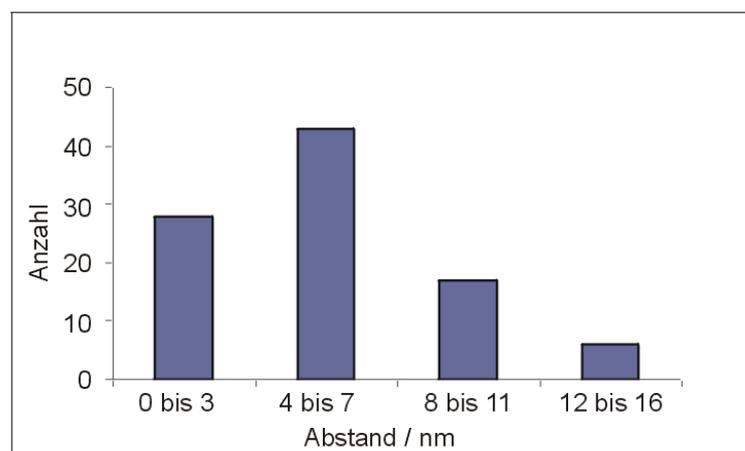


Abbildung 5.8: Verteilung der gemessenen Partikelabstände in den Aggregaten aus 20 nm Goldkolloiden.

noch etwa halb so groß wie die der gekoppelten 20 nm Kolloide. Folglich ist hier auch die Aggregatgrößen-Verteilung nicht so breit: ein knappes Drittel der Aggregate ist sehr klein und besteht aus 5 bis 9 Partikeln. Mehr als die Hälfte der Aggregate umfaßt zwischen 10 und 29 Partikeln. Der Rest verteilt sich auf große Aggregate, die aber in keinem Fall mehr als knapp 90 Kolloide beinhalten. Um einen Anhaltspunkt über die Aggregatbildung insgesamt zu bekommen, wurde eine Übersicht, bestehend aus 93 Partikeln, ausgewertet. Rund 80 % der Aggregate waren größer als 5 Partikel. Insgesamt gingen in die TEM-Analyse 702 Partikel ein.

Weiterhin wurden auch 80 nm Partikel untersucht (Abb. 5.9). In 17 Aggregaten waren 294 Partikel gebunden, womit sich eine durchschnittliche Aggregatgröße von 17 Partikeln ergibt. Die auftretende Aggregatgrößen-Verteilung wird auch kleiner, da jetzt knapp dreiviertel der Aggregate eine Größe zwischen 5 und 19 Partikel aufweisen.

Es kann festgestellt werden, daß mit zunehmendem Partikeldurchmesser die Anzahl der Partikel, die in einem Aggregat gebunden sind, immer geringer wird. Zur Verdeutlichung sind die Größenverteilungen der drei Partikeldurchmesser in Abb. 5.10 angegeben. Der beobachtete Effekt kann durch die geringere Diffusionskonstante mit größer werdendem Partikeldurchmesser erklärt werden. Da eine Verbindung der Partikel miteinander dann zustande kommt, wenn sich die Partikel treffen, muß folglich eine genügend hohe Trefferrate induziert werden. Für größere Partikeldurchmesser ist die Trefferrate geringer, und deshalb sind auch die gebildeten Aggregate kleiner. Der Einfluß der Aggregatgröße auf das Extinktionsverhalten wurde gezeigt und bestätigt. Demzufolge bedeutet eine geringere Dämpfung und Rotverschiebung eine Bildung von kleineren Aggregaten. Storhoff et al. [103] tempern die Lösungen mit den entstandenen Partikelnetzwerken, welches zu einem Anwachsen der Aggregate zu riesigen Partikelansammlungen führt. Das Erhöhen der Temperatur kann als weiterer Faktor zur Erhöhung der Trefferrate interpretiert werden. Mit steigender Temperatur steigt auch die Partikelgeschwindigkeit in der Lösung und folglich damit auch die Wahrscheinlichkeit für einen Zusammenstoß mit anderen Partikeln. Geht man für ein Gedankenexperiment davon aus, daß die Aggregate, unabhängig bis zu welcher Größe sie anwachsen, dispers in Lösung vorliegen und das Volumen der Lösung hinreichend groß ist,

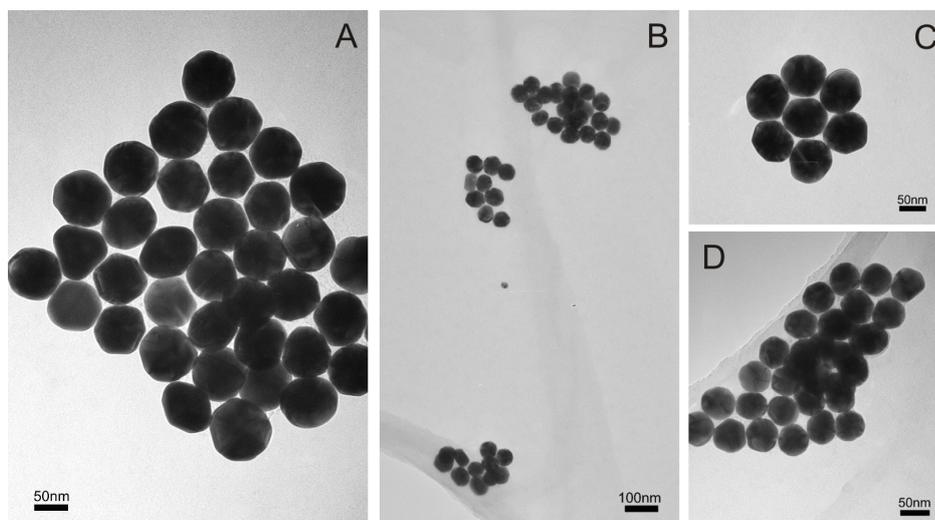


Abbildung 5.9: TEM-Aufnahmen von Aggregaten gekoppelter 50 nm und 80 nm Goldkolloide. **A** und **C** sind Beispiele für 80 nm Kolloide und **B** und **D** für Aggregate bestehend aus 50 nm Kolloiden.

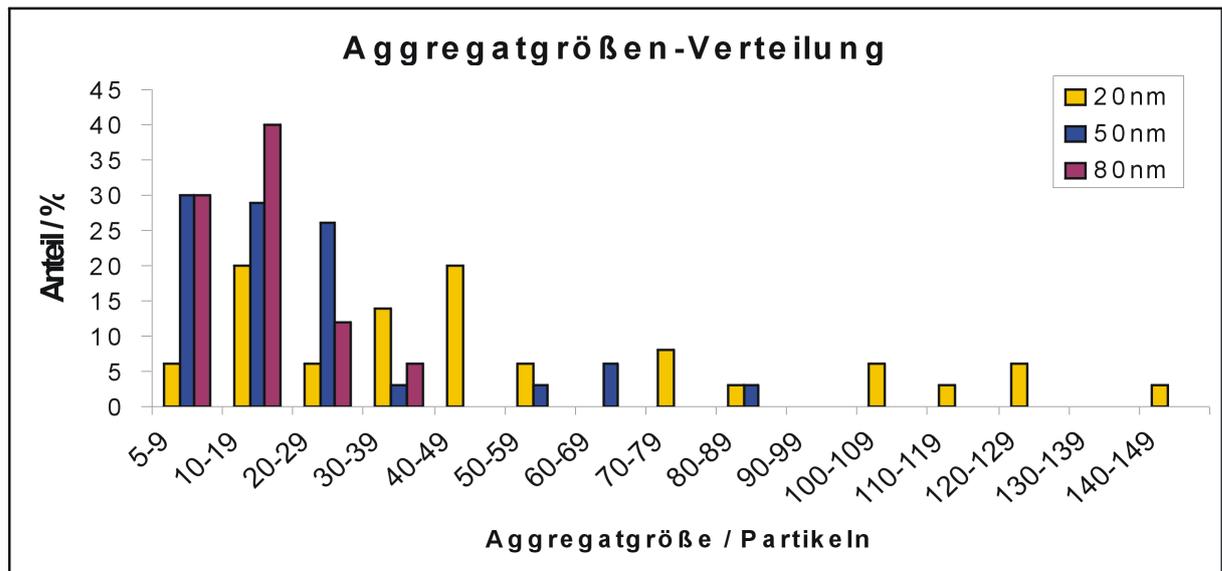


Abbildung 5.10: Aggregatgrößen-Verteilung für Goldkolloide mit einem Durchmesser von 20 nm, 50 nm und 80 nm. Die größten Aggregate bilden sich bei der Kopplung von 20 nm Kolloiden. Gleichzeitig liegen hier auch die größten Unterschiede in der möglichen Aggregatgröße vor. Mit steigendem Partikeldurchmesser sinkt die Anzahl der gebundenen Partikel je Aggregat und die Verteilung wird schmäler.

kann man auch Überlegungen zur maximalen Aggregatgröße anstellen. Bei konstanter Temperatur ist das Aggregatwachstum dann beendet, wenn die Diffusion eines Aggregates so gering geworden ist, daß sich keine Partikel bzw. Aggregate mehr treffen und verknüpfen können. Das Aggregatwachstum wird durch die Diffusion der gebildeten Aggregate bestimmt (DLA engl. *diffusion limited aggregation*). In dieser Arbeit wurde ein Natriumphosphat-Puffer verwendet, der SDS enthielt. SDS erwies sich als stabilisierender Faktor, der ein Ausfallen der Aggregate über längere Zeit (mindestens eine Woche) verhinderte. Im Gegensatz dazu fallen in reiner NaCl Lösung verknüpfte Aggregate nach wenigen Stunden aus. Es ist vorstellbar, daß SDS das Wachstum der Aggregate beeinflusst. Da SDS ein anionisches Detergenz ist, kann es, neben einer sterischen Beeinflussung, die Aggregate auch durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisieren. Vorstellbar ist, daß die Moleküle auf der Oberfläche der Partikel binden und durch die lange Kohlenstoffkette eine weitere Aggregation der Partikel sterisch verhindern. Des weiteren ist auch eine direkte Wechselwirkung mit der DNA denkbar.

5.2.2 Mehrkomponenten-Systeme

Es können auch unterschiedlich große Partikel miteinander verknüpft werden. Dabei kann man sowohl den Durchmesser als auch das Mengenverhältnis der Partikel variieren und untersuchen, wie sich dies in der Extinktion auswirkt. Ein Beispiel für die mit bloßem Auge erkennbaren Unterschiede ist in Abb. 5.11 gegeben, in dem sowohl die Größe, als auch die Mengenverhältnisse verändert wurden. Die rote Farbe der dispergierten Goldkolloide verändert sich durch die Kopplung der Partikel in Richtung violett, pink, rosa. Neben geordneten Strukturen entstehen auch größere ungeordnete Aggregate (Abb. 5.11, 2). Dies kann auch unter Verwendung von einzelsträngiger DNA nicht verhindert werden, da es keine Unterscheidung oder Einschränkung zum Eingehen der Verbindungen zwischen den Partikeln gibt. Im Rahmen dieser Arbeit wird ge-

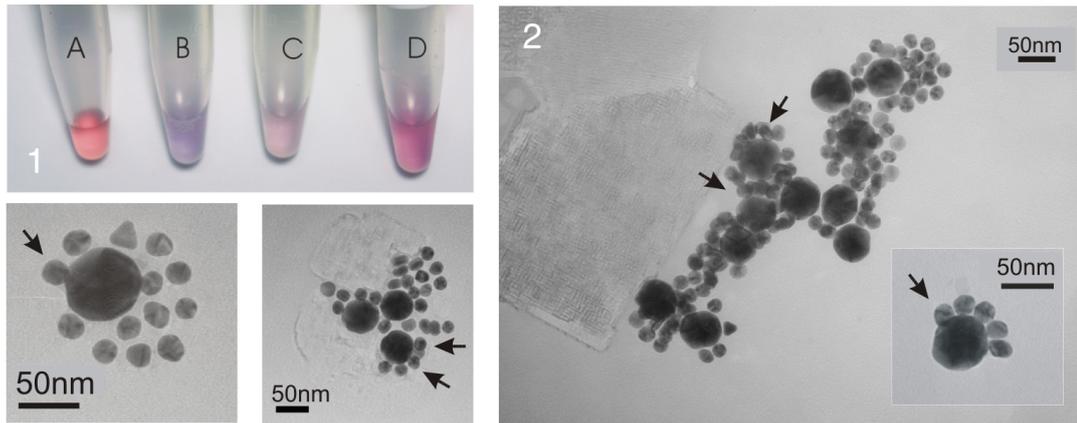


Abbildung 5.11: DNA-verbundene Goldkolloide mit unterschiedlichem Durchmesser. **1** Farbveränderung der Lösungen aus gekoppelten Goldkolloiden. **A** ungekoppelte Kolloide (20 nm) **B** 20 nm und 80 nm **C** 50 nm und 80 nm **D** 20 nm und 80 nm (anderes Verhältnis, kleine Partikel in großem Überschuß. **2** TEM-Aufnahmen gekoppelter 20 nm und 50 nm Partikel. Die Pfeile weisen exemplarisch auf Kolloide hin, die nicht in der Ebene liegen, sondern an darüberliegenden Stellen des großen Kolloides angebunden sind.

zeigt, daß Partikelnetzwerke aus unterschiedlich großen Partikeln durch doppelsträngige DNA hergestellt und für Untersuchungen genutzt werden können. Das Extinktions-Spektrum für miteinander gekoppelte 20 nm und 50 nm Partikel ist in Abb. 5.12 gezeigt. Das Spektrum ist sehr stark gedämpft und verbreitert. Das Spektrum kann dahingehend interpretiert werden, daß größere Aggregate entstehen, respektive an den Aggregaten mehr Partikel beteiligt sind, als bei den 50 nm Kolloiden allein, aber gleichzeitig auch die Aggregatgrößen-Verteilung sehr breit ist, wie bei den 20 nm Partikeln. Die 20 nm Kolloide liegen im Überschuß vor. Daher ist zu erwarten, daß die Anzahl der Aggregate, an denen nur 20 nm Partikel beteiligt sind, überwiegt und damit auch entsprechend die optischen Eigenschaften dominiert. Die Berechnung, aus welchen Anteilen

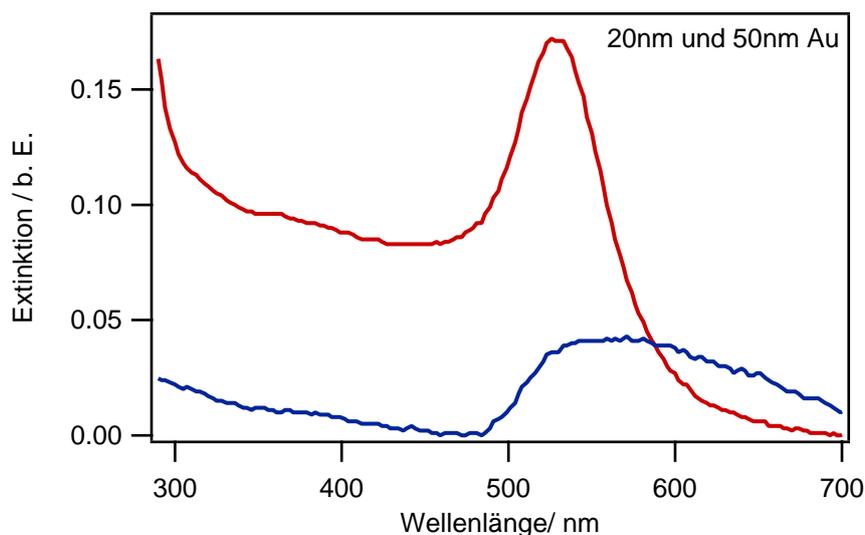


Abbildung 5.12: Extinktions-Spektrum eines Zwei-Komponenten-Systems aus 20 nm und 50 nm Goldkolloiden: die miteinander gemischten, aber noch dispergierten Partikel (rot) und das Spektrum der gekoppelten Partikel (blau).

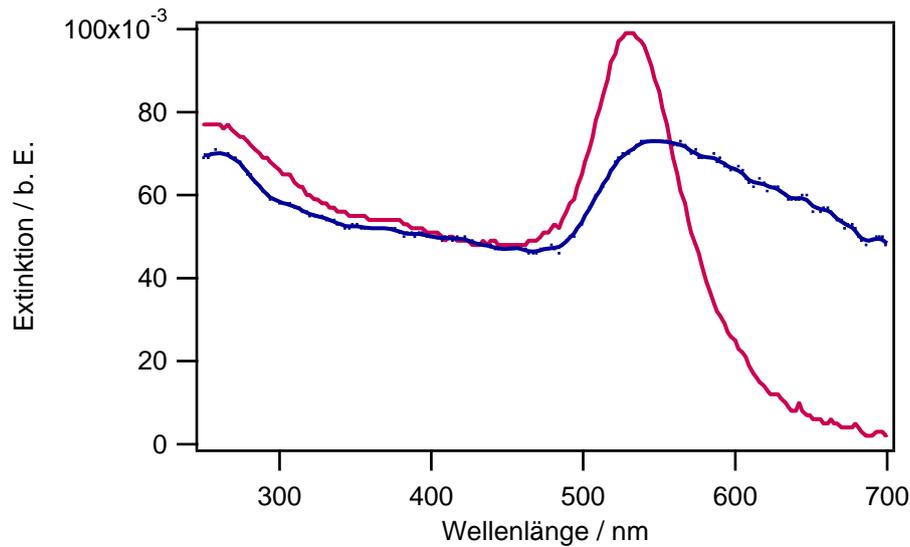


Abbildung 5.13: Extinktions-Spektrum für drei verschiedene Partikeldurchmesser, die DNA-verbunden wurden. Extinktions-Spektrum dispers vorliegender 20 nm, 50 nm und 80 nm Partikel (rot) und der verbundenen Partikel (blau).

sich das gemessene Spektrum zusammensetzt, ist im folgenden Abschnitt 5.2.3 in Abb. 5.19 dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Kopplung mittels doppelsträngiger DNA erlaubt daneben auch eine gleichzeitige Kopplung von mehr als zwei Komponenten. Ein Beispiel ist in Abb. 5.13 gegeben. Hier wurden 20 nm große Partikel mit 50 nm und 80 nm großen Partikeln verknüpft wurden. Das dargestellte Extinktions-Spektrum der gekoppelten Partikel zeigt eine starke Verbreiterung, die durch die sehr unterschiedlichen Aggregatzusammensetzungen und -größen erklärt werden kann. Die Verbreiterung ist deshalb noch stärker als im Falle des zuvor gezeigten Zwei-Komponenten-Systemes. So liegen Aggregate vor, die nur aus kleinen Partikeln bestehen, solche die aus kleinen, mittleren und großen und wenige Aggregate, die nur aus großen Partikeln bestehen. Im Abschnitt 5.2.3 sind Beispiele berechnet, wie man die Verbreiterung im Extinktions-Spektrum von Mehrkomponenten Systemen durch die Überlagerung der Spektren aus unterschiedlich großen Aggregaten erklären kann. Interessant kann diese Möglichkeit der Kopplung werden, wenn eine effektive Sortierung durchgeführt werden kann. Dann kann sehr schnell und parallel eine Reihe von Bauelementen aus Nanopartikeln hergestellt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Schutzfunktion der DNA gegen irreversible Agglomeration in Salzlösungen gezeigt werden kann. Des weiteren hängt die mittlere Aggregatgröße von der Partikelgröße ab und zwar derart, daß mit zunehmendem Durchmesser der Partikel die Aggregate immer weniger Partikel umfassen. Der Abstand zwischen gekoppelten Partikeln ist erwartungsgemäß kleiner als die 8 nm Länge des DNA-Linkers. Auch unterschiedlich große Partikel können miteinander verknüpft werden.

5.2.3 Simulation der Extinktions-Spektren

Mit Hilfe von Berechnungen können die in den vorstehenden Abschnitten präsentierten Ergebnisse untermauert und ergänzt werden. Wird ein sphärisches Partikel angenommen und die komplette Mie-Theorie zur Berechnung herangezogen, so können die in Lösung gemessenen

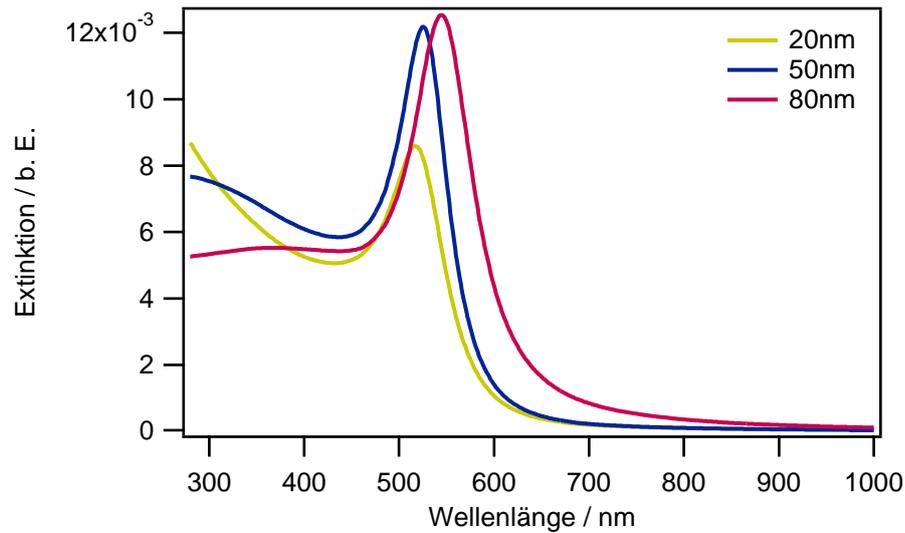


Abbildung 5.14: Berechnete Extinktions-Spektren für sphärische Goldpartikel mit unterschiedlichem Durchmesser. Der Quanteneffekt wurde für die 20 nm Partikel nicht beachtet.

Spektren gut abgebildet werden. Zunächst wird gezeigt, daß Quanteneffekte für Goldpartikel mit einem Durchmesser von 20 nm oder kleiner zu beachten sind [118]. In Abb. 5.14 wurde dies nicht berücksichtigt. Im Vergleich zu den gemessenen Spektren (siehe Abb. 5.5 oben links) führt die Beachtung des Quanteneffekts (Abb. 5.15) zu einer Übereinstimmung, da das Verhältnis der Intensitäten der unterschiedlichen Partikelgrößen den gemessenen entspricht.

Im weiteren wurde das Verhalten für die verwendeten 20 nm, 50 nm und 80 nm Goldpartikel simuliert. Dabei wurde der Fall angenommen, daß sich jeweils zwei Partikel verbinden. Um zu untersuchen, wie sich die Extinktion von dispergierten zu gekoppelten Partikeln verändert, wurde die Extinktion zum einen für den jeweiligen einfachen und doppelten Partikeldurchmesser berechnet. Das gebildete Aggregat wird als ein neues Teilchen mit der entsprechenden Größe

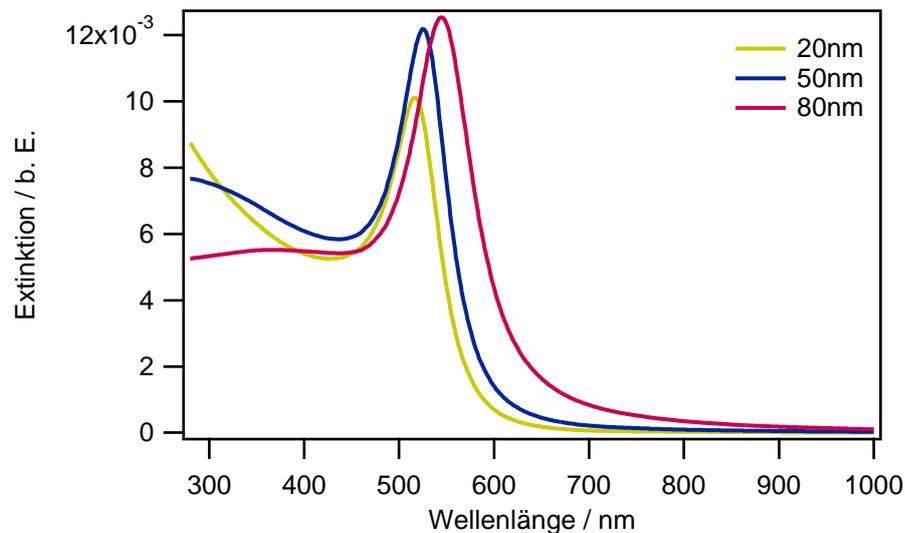


Abbildung 5.15: Berechnete Extinktions-Spektren für sphärische Goldpartikel mit unterschiedlichem Durchmesser. Der Quanteneffekt wurde für die 20 nm Partikel beachtet.

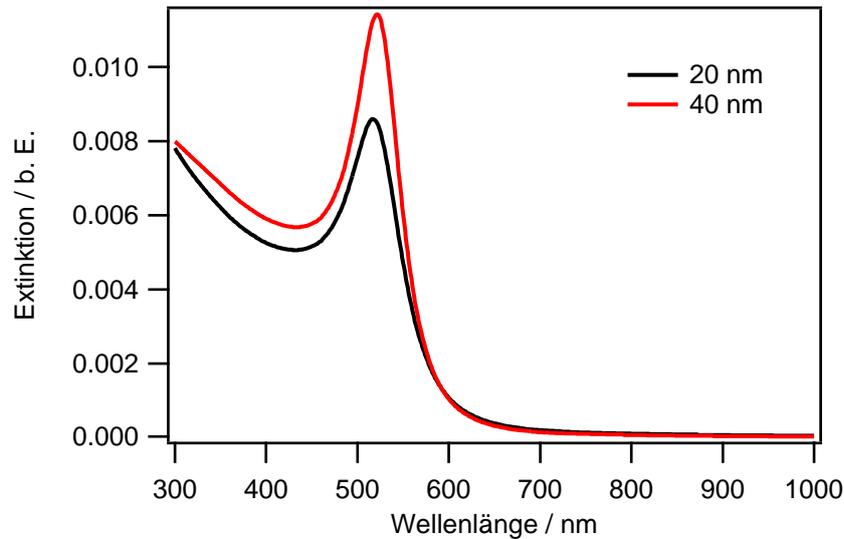


Abbildung 5.16: Berechnete Extinktions-Spektren für 20 nm Goldpartikel und 40 nm Aggregate.

betrachtet. Im folgenden werden berechneten Ergebnisse für die entstehenden 40 nm, 100 nm und 160 nm Partikel verglichen (siehe Abb. 5.16, Abb. 5.17 und Abb. 5.18). Je größer das Teilchen, umso stärker die Rotverschiebung und Dämpfung der Plasmonenbande. Dabei fällt der Unterschied zwischen Ausgangspartikel und gebildeten Partikeln umso stärker aus, je größer der Durchmesser der Ausgangspartikel war. Die Berechnung des Spektrums für 160 nm Partikel zeigt, daß die Plasmonenbande weit in den langwelligeren Bereich hinein verschoben wird. Dies ist bei der Interpretation der gemessenen Spektren zu beachten. Die hier berechneten Spektren stellen zwar einen Sonderfall dar, der real nicht zutrifft, dennoch unterstützen sie die Interpretation der gemessenen Spektren. In allen Fällen werden, wie in dem vorangegangenen Abschnitt gezeigt, tatsächlich mehrere Partikel in einem Partikelnetzwerk gebunden. Wie in Abb. 5.5 gezeigt, gibt es einen Unterschied zwischen den gekoppelten 20 nm Partikeln und den gekoppelten 50 nm bzw. 80 nm Partikeln. Bei letzteren ist überwiegend eine Dämpfung zu beobachten.

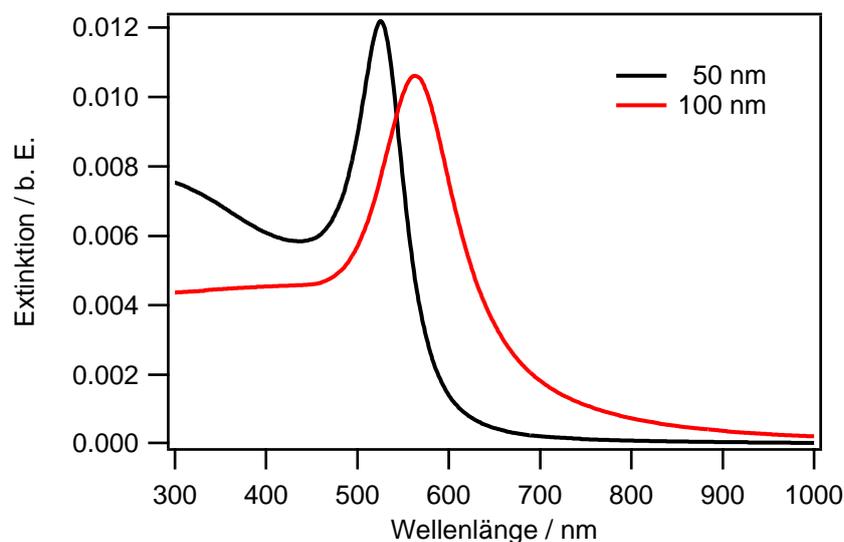


Abbildung 5.17: Berechnete Extinktions-Spektren für 50 nm Goldpartikel und 100 nm Aggregate.

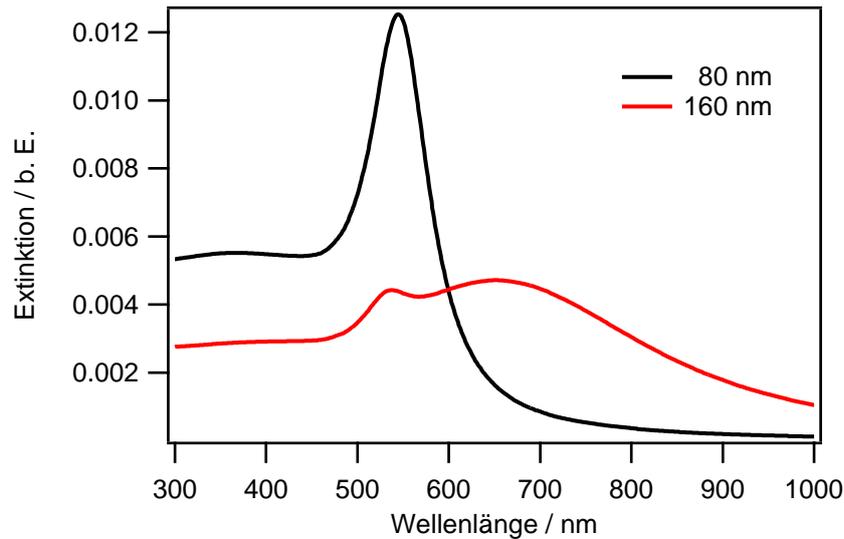


Abbildung 5.18: Berechnete Extinktions-Spektren für 80 nm Goldpartikel und 160 nm Aggregate.

Vergleicht man dies mit den berechneten Spektren und bedenkt, daß real mehr als zwei Partikel verbunden sind, werden die gemessenen Spektren plausibel: Aufgrund der Größe der Partikel kommt es zu einer Dämpfung und zu einer Rotverschiebung mit einem Maximum, daß jenseits des hier meßbaren Bereiches liegt. Daneben ist für den Vergleich der berechneten und gemessenen Spektren zu beachten, daß für die Berechnung die Ausgangsgröße der Partikel zu beachten ist, also nicht vom Spektrum jeweils zweier miteinander verbundener 80 nm Partikel auf die Extinktion eines Aggregates aus 20 nm Partikeln mit der entsprechenden Größe (in diesem Beispiel Aggregat aus 8 Partikeln) geschlossen werden kann. Weiterhin wurden innerhalb dieses Kapitels Mehrkomponenten-Systeme untersucht. Zur Interpretation der gemessenen Spektren wurden Partikel angenommen, die den Durchmesser möglicher Aggregate haben. Dabei wird wiederum zur Berechnung der Extinktions-Spektren von Aggregaten aus zwei Partikeln ausgegangen. Das gemessene Spektrum setzt sich aus den einzelnen Spektren der gebildeten Aggregate zusammen, wobei die jeweiligen Anteile am Gesamten durch die Häufigkeit der jeweiligen Aggregatgröße bestimmt wird. Ein Beispiel ist in Abb. 5.19 gezeigt. Hier wurden 20 nm Partikel mit 50 nm Partikeln kombiniert, wie dies in den Abb. 5.11 (TEM-Aufnahmen) und 5.12 (Extinktions-Spektrum) erfolgte. Es ist, je nach Wichtung der einzelnen Anteile, ein Maximum zwischen 500 nm und 600 nm zu erwarten, das bis ca. 800 nm abklingt. Im Vergleich zum gemessenen Spektrum bestätigt sich dies, wobei bei diesem eine sehr starke Dämpfung auftritt. Des weiteren wurden im vorangegangenen Abschnitt Partikelnetzwerke aus drei verschiedenen Partikeldurchmessern gebildet (Abb. 5.13). Wie bereits dort beschrieben, kommt die starke Verbreiterung der Plasmonenbande durch die Vielzahl möglicher Aggregatzusammensetzungen zustande. Die Simulation der unterschiedlichen Aggregatgrößen ist in Abb. 5.20 dargestellt. Wiederum wurde der Fall angenommen, daß sich jeweils zwei Partikel miteinander verbinden. Da hier größere Aggregate gebildet werden können und diese anteilig einen stärkeren Einfluß haben (Verbindung von zwei 50 nm Partikeln, von einem 50 nm und einem 80 nm Partikel bzw. Verbindung von zwei 80 nm Partikeln), ist eine starke Verbreiterung der Plasmonenbande über eine Wellenlänge von 800 nm hinaus zu erwarten, was auch der Messung entspricht.

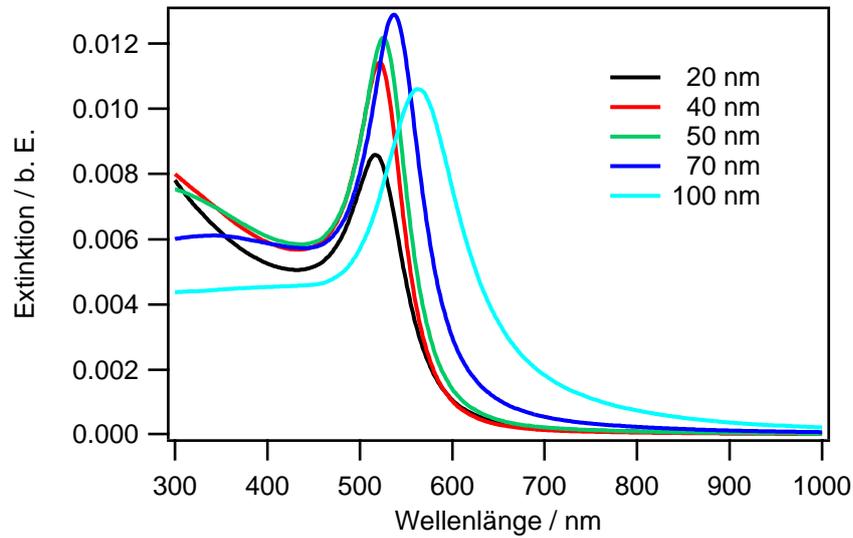


Abbildung 5.19: Berechnete Extinktions-Spektren für Goldpartikel mit einem Durchmesser von 20 nm bzw. 50 nm und die möglichen Kombinationen aus diesen für Aggregate aus je zwei Partikeln.

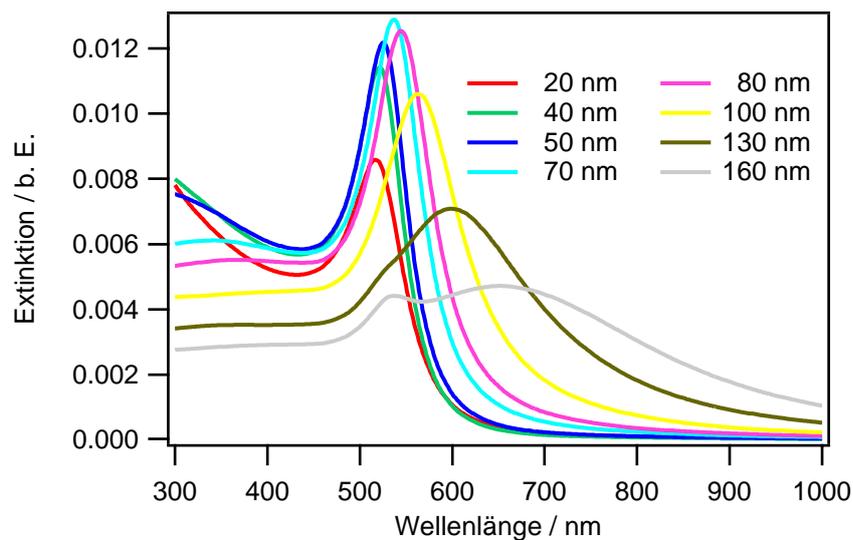


Abbildung 5.20: Berechnete Extinktions-Spektren für Goldpartikel mit einem Durchmesser von 20 nm, 50 nm und 80 nm und den möglichen Kombinationen aus diesen für Aggregate aus je zwei Partikeln.

5.3 Umkehrbarkeit der Verbindung

Ein Vorteil der DNA besteht darin, daß sich die komplementären Einzelstränge der DNA nicht nur spezifisch erkennen, sondern der Doppelstrang reversibel wieder in Einzelstränge getrennt werden kann. Dies geschieht in der Regel durch eine Temperaturerhöhung. Für die Nutzung der DNA als Klebstoff ist demzufolge nachzuweisen, daß auch in DNA-Partikel-Hybriden die DNA geschmolzen werden kann. Aus der Literatur ist dazu einiges bekannt (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Verwendung doppelsträngiger DNA ermöglicht eine tiefergehende Untersuchung hinsichtlich des Einflusses der Partikel auf die Dissoziation der Partikelnetzwerke. Im folgenden wird zunächst das temperaturabhängige Verhalten der Goldkolloide bzw. der freien DNA-Moleküle in Wasser bzw. 1M NaCl (entsprechend den Bedingungen für die Bildung von Partikelnetzwerken) untersucht. Anschließend kann der Einfluß der Goldkolloide auf das Schmelzen mit Hilfe von einseitig- bzw. beidseitig thiofunktionalisierter DNA untersucht werden.

Zunächst ist sicherzustellen, daß sich die Partikel selbst in keiner Weise durch die Temperaturerhöhung verändern. Die Stabilität der Partikel, die auf 100°C erhitzt wurden, ist in Abb. 5.21 gezeigt. Es tritt keine Veränderung der Extinktion mit steigender Temperatur auf. Weiterhin muß gewährleistet sein, daß ein Schmelzen der DNA im verwendeten System durchführbar ist. Dafür wurde die doppelsträngige DNA in entionisiertem Wasser geschmolzen (Abb. 5.22). Die Schmelztemperatur T_m wurde mit 40°C ermittelt. Der empirisch berechnete Wert lag bei $T_m = 56^\circ\text{C}$. Die Schmelzkurve hat den typischen sigmoidalen Verlauf, doch fällt die Änderung der Extinktion insgesamt relativ gering aus. Die Schmelztemperatur erhöht sich, wenn die Ionenkonzentration erhöht wird. Hier verschiebt sich T_m auf 80°C, wenn die DNA in einer 1M NaCl-Lösung erwärmt wird. Das Schmelzen der DNA ist in Abbildung 5.23 unter den Bedingungen gezeigt, wie sie zum Koppeln der Goldkolloide verwendet werden. Es ist außer der Schmelzkurve auch ein Teil der zugehörigen Extinktions-Spektren zu sehen. Wichtig dabei ist zu ermitteln, welcher Anteil später am Spektrum beim Schmelzen von DNA-Goldkolloid-Hybriden durch die DNA verändert wird. Anhand der Spektren kann dieser Einfluß bei einer Wellenlänge größer 400 nm

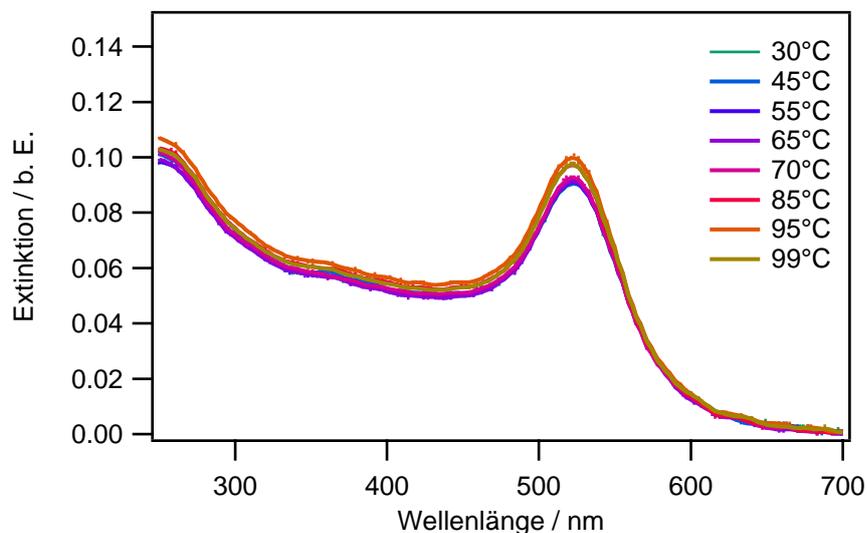


Abbildung 5.21: Extinktions-Spektren der unbehandelten Goldkolloide bei ansteigender Temperatur. Es tritt keine Veränderung der Extinktion auf.

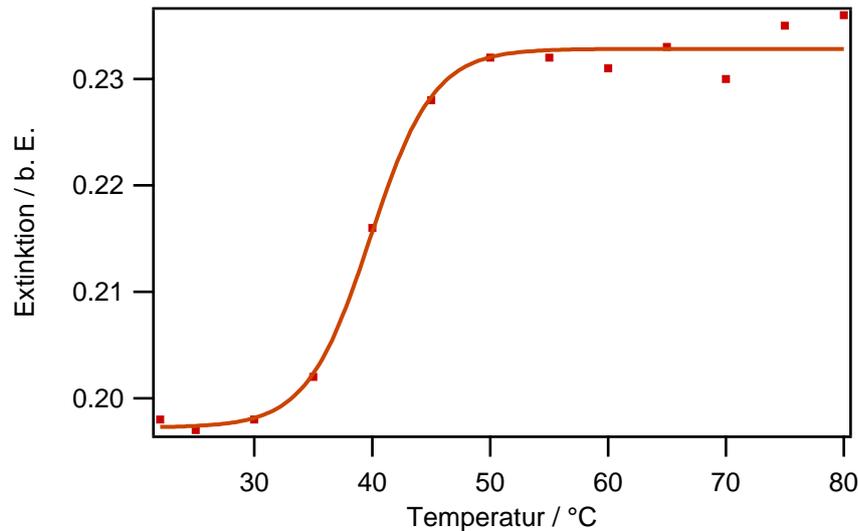


Abbildung 5.22: Temperaturabhängige Änderung der Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ von 24mer dsDNA in Wasser.

als gering eingestuft werden. Im nächsten Schritt wird der Einfluß der Goldkolloide untersucht, wenn sie mit doppelsträngiger DNA mit einer Thiolgruppe funktionalisiert sind. Die Schmelztemperatur erhöht sich leicht. Im Unterschied zu freien DNA-Molekülen in der Salzlösung wird aber der Übergang schärfer, d.h. der Temperaturbereich, in dem die DNA schmilzt, wird kleiner (Abb. 5.24, mittleres Bild). Des weiteren zeigt sich, daß der gesamte Wellenlängenbereich Veränderungen erfährt (Abb. 5.24, unteres Bild). Die Plasmonenbande wird dabei leicht verbreitert und rotverschoben, zudem erhöht sich die Intensität. Wenn die DNA auf beiden Seiten an die Kolloide gebunden ist, d.h. die Kolloide gekoppelt sind, dann sind die Veränderungen im Spektrum noch stärker ausgeprägt. Der Übergang ist wiederum sehr scharf, allerdings fällt die Änderung der Extinktion bei 260 nm noch deutlich stärker aus. Die Plasmonenbande ist durch die Kopplung der Partikel im Vergleich zu ungekoppelten Partikeln bereits verbreitert. Infolge des Schmelzens kommt es zu einer weiteren Verbreiterung und damit verbunden zu einer geringeren Extinktion (Abb. 5.25). Es ist zu beobachten, daß die Extinktion vor dem Schmelzen nicht konstant bleibt, sondern geringer wird. Mit diesem Experiment konnten Ergebnisse zum Schmelzen der DNA-Partikel-Hybride aus der Literatur [96] bestätigt werden. Ebenso wie bei Elghanian et al. [96] zeigt sich ein schärferer Übergang, wobei die Schmelztemperatur im Vergleich zur freien DNA in Salzlösung nur unwesentlich erhöht ist. Im Vergleich zur Literatur konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Schärfe des Übergangs nicht zwangsläufig an ein gebildetes Partikelnetzwerk geknüpft ist. Der scharfe Übergang kommt, wie bei Verwendung der DNA mit einseitiger Thiolfunktionalisierung gezeigt, bereits dann zustande, wenn die Partikel nur mit der DNA funktionalisiert sind, selbst aber noch dispergiert in der Lösung vorliegen. Folglich kann eine Schmelzkurve in diesem Fall bei Betrachtung des Überganges auch als Nachweis für eine erfolgreiche Anbindung der DNA auf den Partikeln benutzt werden. Elghanian et al. [96] diskutieren, daß auf den Partikeln zu wenig DNA gebunden ist, um eine Schmelzkurve der DNA messen zu können. Sie argumentieren, daß man die Änderung der Extinktion der dissoziierenden Partikel sieht, da sich das gesamte Spektrum ändert. Dennoch wird in dieser Publikation die aufgenommene Schmelzkurve mit dem Schmelzen der freien DNA in Salzlösung

verglichen. Würde man tatsächlich zwei unterschiedliche Dinge messen (einmal die DNA, einmal die Partikel) könnte man die beiden Spektren auch nicht miteinander vergleichen. Es ist jedoch auch eine andere Interpretation der Ergebnisse möglich: Das Schmelzen der DNA wird gemessen, allerdings überlagern sich die Beiträge von DNA- und Partikel-Spektrum. Dies zeigt sich im Falle der DNA mit einer Thiolgruppe. Die Partikel liegen dispergiert vor. Zuvor wurde gezeigt, daß die Goldkolloide ihre optischen Eigenschaften durch Erhitzen nicht verändern (siehe Abb. 5.21). Folglich müssen die gemessenen Veränderungen ursächlich mit der gebundenen DNA zusammenhängen. Um die Überlagerung der Spektren deutlicher herauszuarbeiten, wurde die Temperaturabhängigkeit für verschiedene Wellenlängen aufgetragen (Abb. 5.26). Mit größeren Wellenlängen wird die Änderung der Extinktion immer geringer und verliert zunehmend den

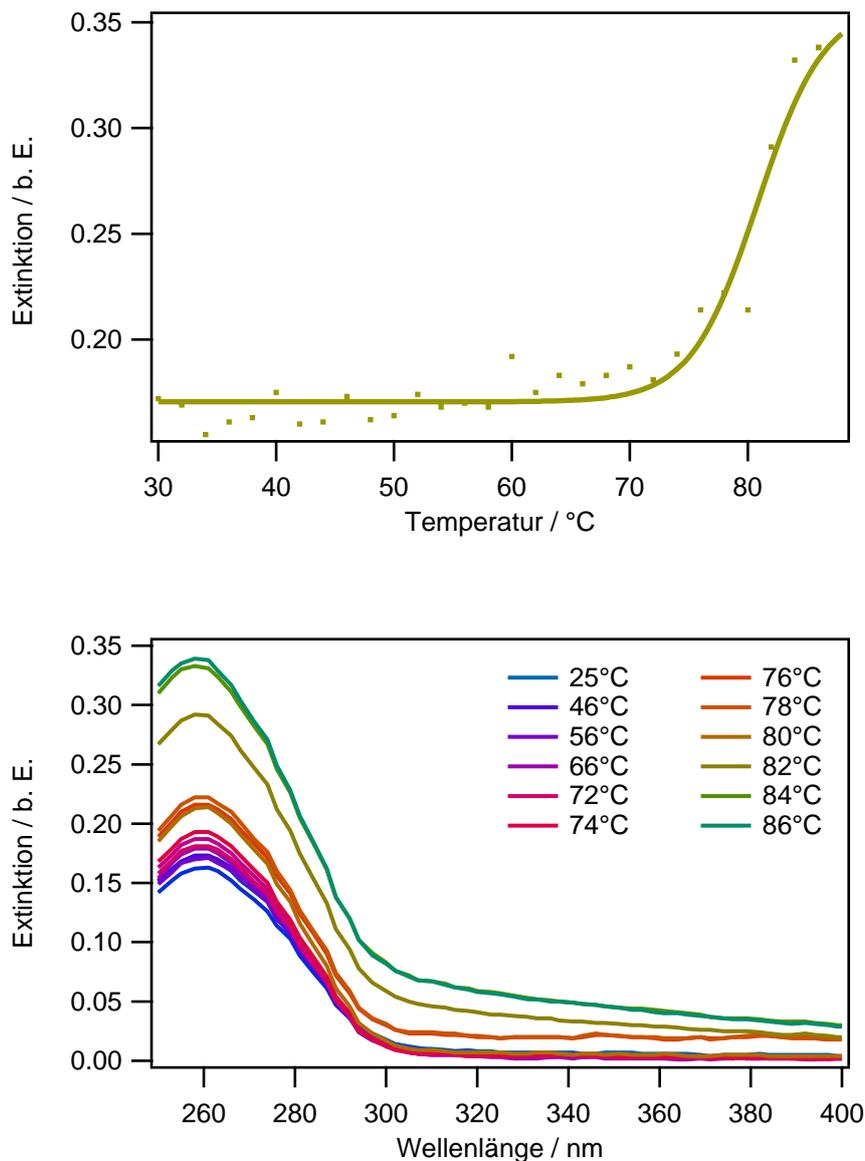


Abbildung 5.23: Schmelzkurve der DNA in 1M NaCl (ohne Goldkolloide). **Oben** Temperaturabhängige Änderung der Extinktion bei $\lambda = 260\text{ nm}$. Die Schmelztemperatur T_m verschiebt sich auf 80°C (im Vergleich zu Abb. 5.22). Die Daten wurden mit einer Sigmoidal-Funktion gefittet. **Unten** Zugehörige Extinktions-Spektren für verschiedene Temperaturen. Die Veränderungen im Spektrum bei Erhöhung der Temperatur betreffen einen Bereich bis zu einer Wellenlänge von $\lambda = 400\text{ nm}$.

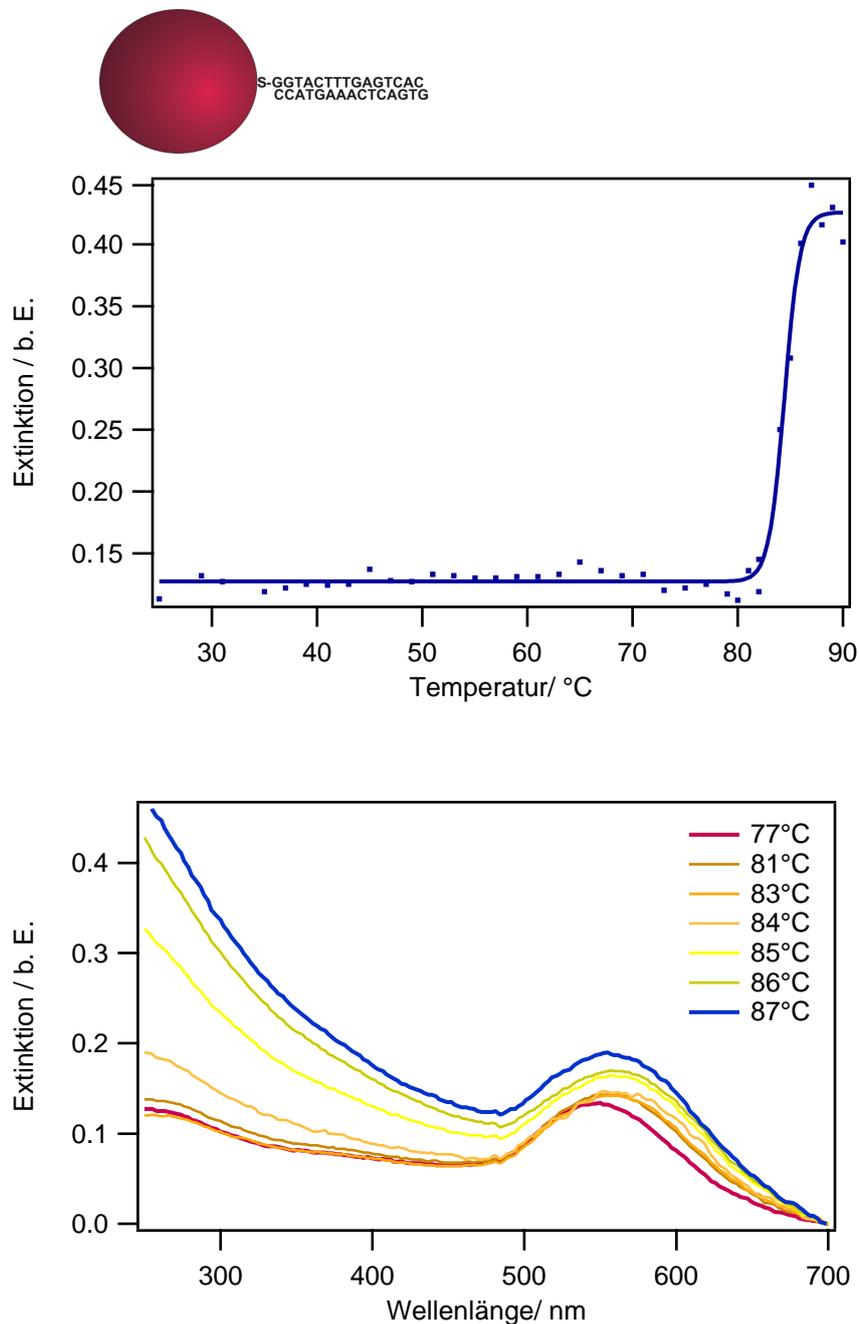


Abbildung 5.24: Einfluß von Goldkolloiden auf das Schmelzen von dsDNA mit einer Thiolgruppe (**Oben** Schema). **Mitte** Temperaturabhängige Änderung der Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. Die Schmelztemperatur T_m beträgt 84°C . Die Daten wurden mit einer Sigmoidal-Funktion gefittet. Der Übergang ist schärfer als bei freier DNA in Salzlösung (Abb. 5.23). **Unten** Zugehörige Extinktions-Spektren bei verschiedenen Temperaturen. Schmilzt die DNA, treten Veränderungen im gesamten Wellenlängenbereich auf.

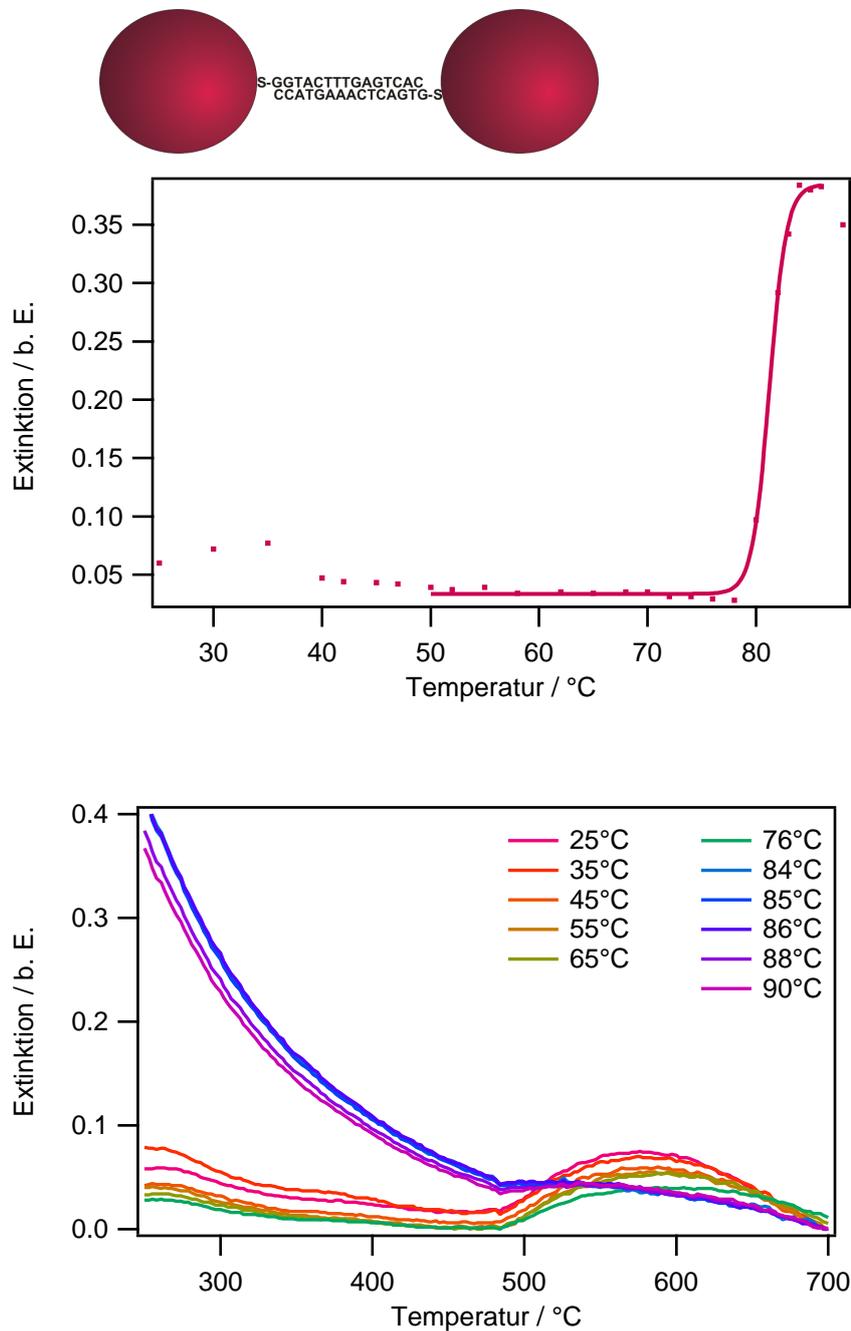


Abbildung 5.25: Schmelzen gekoppelter Goldkolloide (**Oben** Schema). **Mitte** Temperaturabhängige Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. Die Daten wurden mit einer Sigmoidal-Funktion gefittet. Im Vergleich zu (Abb. 5.24) ist die absolute Änderung der Extinktion größer. **Unten** Zugehörige Extinktions-Spektren bei verschiedenen Temperaturen. Vor dem Übergang kommt es zu einem Verringern der Extinktion im gesamten Spektrum.

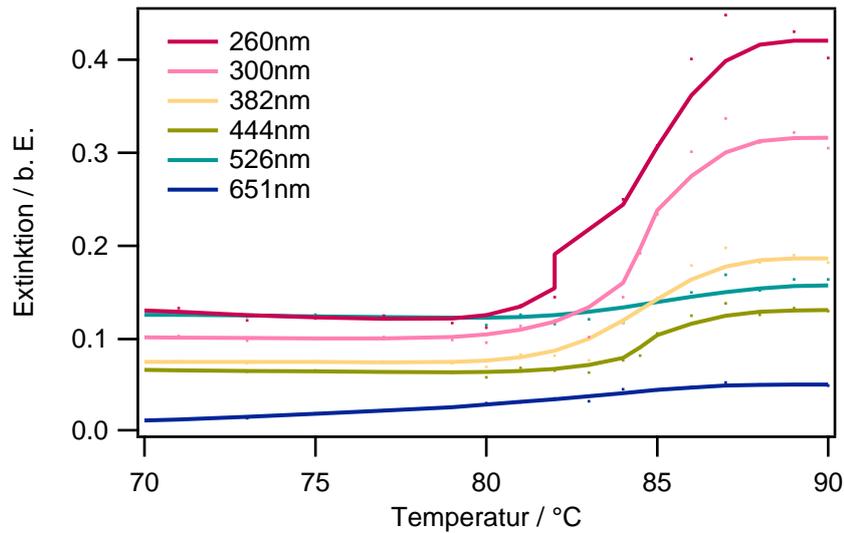


Abbildung 5.26: Temperaturabhängige Änderung der Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen. Untersucht wurden Goldkolloide mit einseitig thiofunktionalisierter dsDNA. Die aufgetragenen Daten wurden geglättet. Je größer die Wellenlänge, um so geringer die Temperaturabhängigkeit. Die stärkste Veränderung tritt bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ auf und nimmt bis zu $\lambda = 400 \text{ nm}$ ab.

charakteristischen sigmoidalen Verlauf. Im Vergleich zu Abb. 5.23 zeigt sich, daß die Änderung der Extinktion bei 260 nm am größten ist und im gleichen Zuge, wie die Extinktion der freien DNA-Moleküle, mit größer werdender Wellenlänge abnimmt. Dadurch kann gezeigt werden, daß das Schmelzen der DNA und damit eine Dissoziation des Partikelnetzwerkes mittels UV/VIS-Spektroskopie beobachtet werden kann. Die insgesamt geringe Konzentration der DNA auf den Partikeln ist kein Hinderungsgrund. Die in [96, 100] vertretene These kann nicht aufrecht erhalten werden, denn dort geht man aufgrund der Methode immer von miteinander gekoppelten Partikeln aus. Argumentiert man, daß in den Spektren nur Veränderungen an und durch die Partikel selbst zu sehen sind, so müßte das Spektrum dissoziierter Partikel exakt dem der dispergierten Partikel entsprechen und zwar auch im kürzerwelligen Bereich. Da aber bereits im Falle der einseitig thiofunktionalisierten dsDNA auf den Goldkolloiden starke Veränderungen beobachtet werden, obwohl die Partikel einzeln und ungebunden vorliegen, ist die Annahme von Elghanian et al. eher unwahrscheinlich.

Auf das Schmelzen / Dissoziieren von DNA-funktionalisierten Partikeln hat die Heizrate einen sehr entscheidenden Einfluß. Aus der Molekularbiologie sind im Zusammenhang mit der Standardmethode PCR (Polymerase-Kettenreaktion engl. *polymerase chain reaction*) sehr schnelle Heizraten zwischen $2^\circ\text{C}/\text{sec}$ und $4^\circ\text{C}/\text{sec}$ bekannt. Dies kann nicht auf das vorliegende System übertragen werden, da hier durch die Anbindung der DNA an die Partikel völlig neue Bedingungen entstehen. Als Mechanismus wird folgendes vorgeschlagen: Es ergeben sich unterschiedliche Schmelzverhalten bei der Betrachtung der selben DNA-Sequenz in Wasser, mit einem Strang am Partikel gebunden oder beidseitig gebunden, da die DNA-Stränge in ihren Freiheitsgraden durch die Bindung auf Gold eingeschränkt werden. Befinden sich die Moleküle frei in Lösung und werden erwärmt, so können sie frei fluktuieren. Gemeint ist damit die Beweglichkeit der DNA-Stränge, da das Schmelzen nicht zwangsläufig reißverschlußartig verläuft. Da Adenine mit Thyminen durch zwei Wasserstoffbrücken verbunden sind, werden diese Verbindungen eher getrennt

und führen so zu einer Destabilisierung des Doppelstranges, der dann in Einzelstränge dissoziiert. Dies wird als kooperativer Effekt bezeichnet. Die Beweglichkeit eines oder beider Stränge wird aber eingeschränkt, wenn ein oder beide Enden auf dem Partikel gebunden sind. Ein oder beide Stränge werden steifer, und damit wird ein kooperatives Schmelzen behindert. Es ist folglich vorstellbar, den scharfen Übergang beim Schmelzen / Dissoziieren DNA-funktionalisierter Partikel dadurch zu erklären, daß der Doppelstrang erst dann schmilzt, wenn genügend Energie vorhanden ist, um sofort auch die Guanine von den Cytosinen zu trennen. Des Weiteren ist ein Einfluß durch die zunehmende Brownsche Bewegung der Goldkolloide in der heißen Lösung vorstellbar. Dies kann zu mechanischem Stress in den Aggregaten führen, also auch zu einem starken Strecken der DNA Moleküle, was wiederum Einfluß auf die Extinktion derselben hat.

Neben der Bewegungseinschränkung der DNA-Stränge und dem mechanischem Streß durch die Partikel gibt es einen weiteren Faktor, der Einfluß auf das Schmelzverhalten haben kann: Jedes Goldpartikel ist über mehrere DNA-Stränge mit anderen Partikeln verbunden, weshalb die DNA-Stränge als nicht mehr unabhängig voneinander betrachtet werden können [100]. Eine Auftrennung eines Aggregates durch Schmelzen der DNA im Partikelnetzwerk kann nur dann zustande kommen, wenn mehrere benachbarte DNA Stränge gleichzeitig schmelzen. Dies kann als eine Kopplung des Schmelzverhaltens im Aggregat betrachtet werden: Das Schmelzen einer beidseitig gebundenen DNA-Sequenz ist nur dann tatsächlich möglich, wenn auch die benachbarten Stränge schmelzen, da anderenfalls die Partikel und damit die DNA-Stränge weiter im Aggregat gebunden sind. Hier spielt nun die Heizrate eine entscheidende Rolle. Es muß jeweils ein Gleichgewichtszustand erreicht werden können. Wird die Temperatur zu schnell erhöht, kann das System nicht folgen. In dieser Arbeit konnten die Schmelzkurven mit einer Heizrate von $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erreicht werden, was als obere Grenze gelten kann. Schnelleres Heizen führt nicht zur Dissoziation des Doppelstranges.

Die Unterschiede in der relativen Änderung der Extinktion gehen im Falle einseitig thiolierter DNA mit einem leichten Verringern, im Falle der beidseitig thioolfunktionalisierten DNA mit einem deutlichen Verringern der Extinktion unmittelbar vor dem Schmelzen einher. Dies ist von Storhoff et al. [103] und Jin et al. [100] als Anwachsen der Aggregate (Ostwald-Reifung) durch die Temperaturerhöhung begründet worden. Demnach führen die größeren Aggregate zu einer stärkeren Dämpfung der Extinktion, die dann durch die Dissoziation der Partikelnetzwerke und das Schmelzen der DNA wieder mindestens kompensiert wird. Da im Falle der einseitig gebundenen DNA keine Aggregate vorliegen, kann man hier lediglich vermuten, daß sich durch die Erwärmung einige unspezifisch miteinander verbundene, kleine Aggregate bilden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich, am Ende des Schmelzens der DNA wieder dispergierte Partikel zu erhalten. Dieser Effekt wird auch in der Literatur beschrieben [96]. Stattdessen fallen die Partikel nach einiger Zeit aus, sie sind instabil geworden. Dieses Verhalten deutet sich bereits in den Spektren mit einer Verbreiterung der Plasmonenbande an. Es ist wahrscheinlich, daß mit einem Trennen der DNA-Doppelstränge

in Einzelstränge diese unter der hohen Salzkonzentration und Temperatur nicht igelartig von der Partikeloberfläche abstehen, sondern teilweise auf dieser aufliegen bzw. unspezifisch mit anderen Partikeln wechselwirken. Dadurch verändert sich die Extinktion. Die Goldkolloide sind nicht mehr gegen die Salzionen geschützt, was zum Aggregieren und Ausfallen führt. Hier schließt sich also unmittelbar die Frage nach den Wechselwirkungen zwischen DNA und Partikel an, die im nächsten Kapitel untersucht werden.

6. Wechselwirkungen DNA - Partikel

Das vorliegende Kapitel beschäftigt sich mit den Wechselwirkungen zwischen DNA und Nanopartikeln. Ausgangspunkt ist die gerichtete Kopplung von Partikeln mittels einzelsträngiger DNA. Die Unterschiede zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA werden insbesondere unter Einfluß von Kationen deutlich, mit denen sich dieses Kapitel ausführlich beschäftigen wird.

6.1 Einzelsträngige DNA

Ziel einer Verknüpfung von Goldpartikeln mittels DNA besteht darin, die Partikel in gerichteter Weise miteinander zu verbinden. Gerichtet heißt, daß zwei Partikel nur dann miteinander verbunden werden können, wenn die DNA-Stränge zueinander komplementär sind. In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse dargestellt, die mit einzelsträngiger DNA mit zwei unterschiedlichen Sequenzlängen erzielt wurden.

DNA-Sequenzlänge von 24 Basen Ein Beispiel ist in Abb. 6.1 gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Partikel spezifisch durch die ssDNA und deren Hybridisierung zur dsDNA miteinander verbunden werden können. Wurde nur eine Fraktion mit einzelsträngiger DNA funktionalisiert, waren nur vereinzelt Partikel miteinander verbunden, da es hier zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Partikeln kommen kann. Als weitere Kontrolle dienten nicht funktionalisierte Partikel, die nicht miteinander binden. Die Methode kann dahingehend abgewandelt werden, daß beide Fraktionen mit einer einzelsträngigen 8mer DNA (Länge

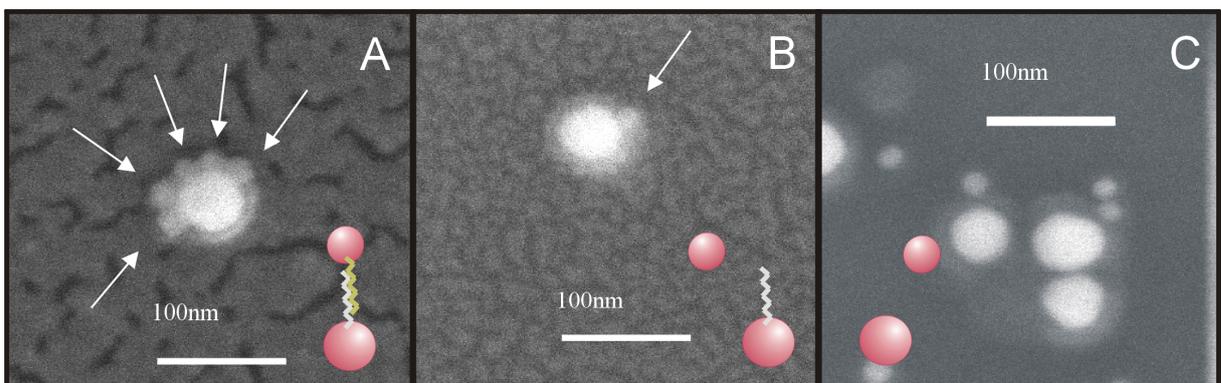


Abbildung 6.1: REM-Aufnahmen der Kopplung von 20 nm und 50 nm Goldnanopartikeln mittels einzelsträngiger DNA (24mer). **A** Beide Nanopartikel-Fractionen wurden mit komplementärer DNA funktionalisiert. Die Partikel sind miteinander gekoppelt. **B** Nur eine Fraktion ist mit DNA funktionalisiert. Nur gelegentlich sind dadurch unspezifische Bindungen zwischen den Partikeln möglich. **C** Keine Fraktion wurde mit DNA funktionalisiert, die Partikel liegen separiert vor.

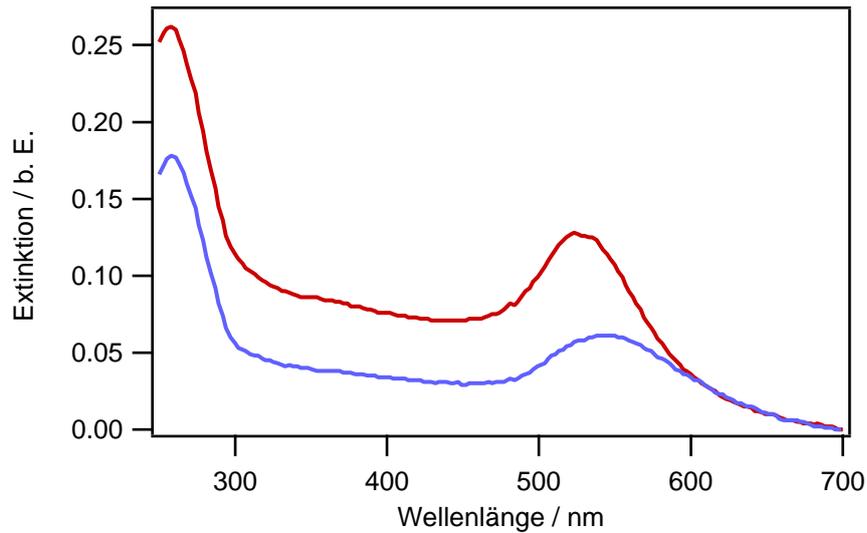


Abbildung 6.2: UV/VIS-Spektrum von 20 nm Partikeln gekoppelt nach Mirkin [35]. Die rote Kurve zeigt die Extinktion der dispergiert vorliegenden Partikel. Die Partikel sind bereits funktionalisiert. Die Linker-DNA ist in der Lösung enthalten. Die blaue Kurve wurde sechs Tage später gemessen. Die Partikel sind gekoppelt. Es tritt eine Peakverbreiterung ein, sowie eine Peakverschiebung um 15 nm.

von 8 Basen) funktionalisiert werden, die zueinander nicht komplementär sind. Beide Fraktionen können also miteinander vermischt werden, ohne daß die Partikel in Kontakt treten können. Erst wenn eine zu beiden DNA-Sequenzen komplementäre DNA zugegeben wird, kommt es zur Verbindung der Goldnanopartikel [35]. Hierbei besteht die Linker-DNA aus einem doppelsträngigem Teil mit „klebrigen Enden“, das heißt überstehenden einzelsträngigen Enden (siehe Kapitel 3.1). Damit konnten ebenfalls Goldnanopartikel miteinander verbunden werden. In Abb. 6.2 ist ein Beispiel für eine Extinktionsmessung angegeben, die eine Kopplung der Partikel anzeigt. Dabei kommt es sowohl zu einer Verbreiterung der Plasmonenbande als auch zu einer Rotverschiebung um mehrere Nanometer. Ein Effekt konnte nicht sofort, sondern erst Tage später beobachtet werden.

DNA-Sequenzlänge von 39 Basen Es wurde untersucht, ob und inwiefern sich eine längere DNA-Sequenz auf die Kopplung der Partikel auswirkt (Abb. 6.3). Ein Vergleich mit Abb. 5.5 (Kopplung mittels 24mer dsDNA) zeigt, daß die Grundtendenz erhalten bleibt: Das Spektrum gekoppelter 20 nm Partikel unterscheidet sich von denen der 50 nm und 80 nm Partikel. Bei 20 nm Partikeln tritt eine deutliche Verbreiterung und Rotverschiebung auf, die noch stärker als im Fall der 24mer dsDNA ist. Bei den 50 nm und 80 nm Partikeln tritt wiederum eine starke Dämpfung der Plasmonenbande und eine Zunahme der Extinktion im längerwelligen Bereich auf. Alle drei Partikelgrößen, die durch Hybridisierung einer 39mer ssDNA miteinander verbunden wurden, zeigen im Vergleich zu den 24mer dsDNA-gekoppelten Partikeln eine stärkere Dämpfung der Extinktion.

Storhoff et al. [103] beschreiben, je länger die DNA-Sequenz, umso geringer die Dämpfung und Verschiebung der Plasmonenbande (der gleichem Partikeldurchmesser und vor dem Tempern). Neben den Messungen werden auch Simulationen zum Einfluß von Aggregatgröße bzw. Partikelabstand auf die Extinktion vorgestellt (siehe Abb. 3.11). Sie stellen fest, daß die optischen

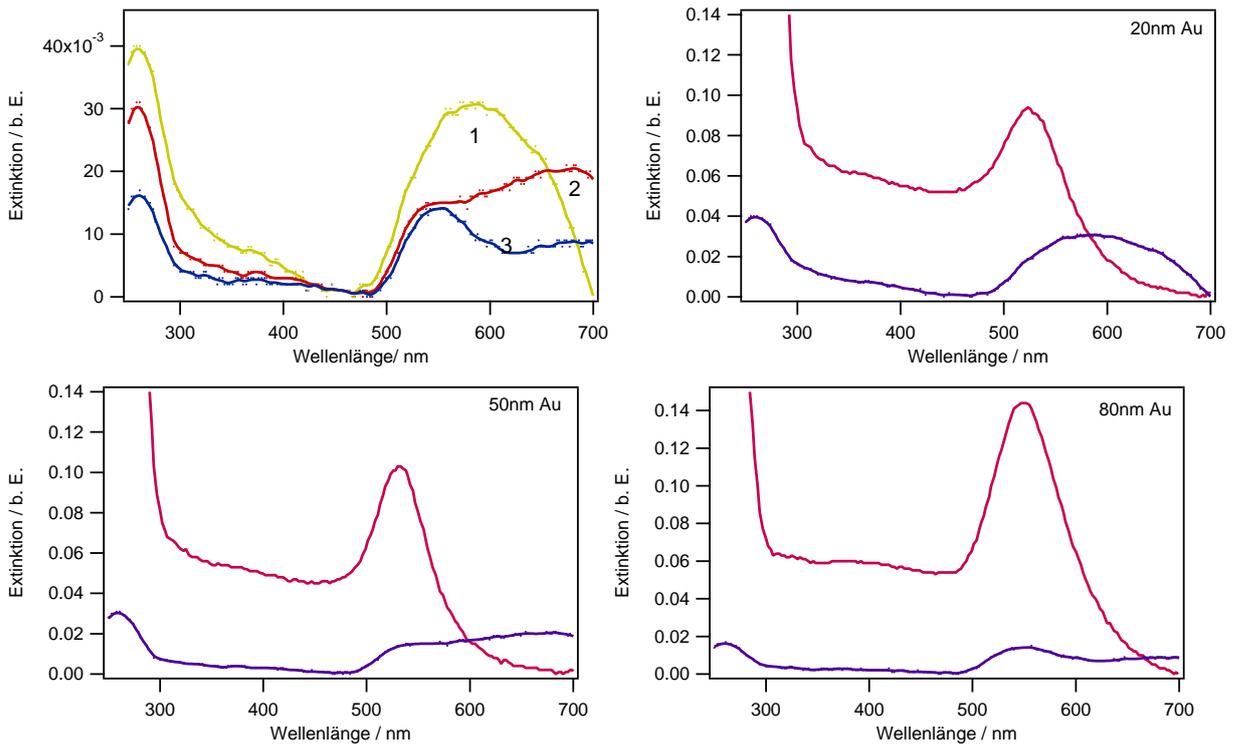


Abbildung 6.3: UV/VIS-Spektren von 20 nm, 50 nm und 80 nm Goldkolloiden, gekoppelt durch die Hybridisierung von 39mer ssDNA. **Oben links** UV/VIS-Spektrum aller drei Partikelgrößen, gekoppelt **1: 20 nm 2: 50 nm und 3: 80 nm** **Oben rechts** UV/VIS-Spektrum 20 nm ungekoppelt (rot) und gekoppelt (blau) **Unten links** UV/VIS-Spektrum 50 nm ungekoppelt (rot) und gekoppelt (blau) **Unten rechts** UV/VIS-Spektrum 80 nm ungekoppelt (rot) und gekoppelt (blau)

Eigenschaften überwiegend durch die Aggregatgröße und weniger durch den Partikelabstand bestimmt werden. Die Ergebnisse von Storhoff et al. sind dann dahingehend zu interpretieren, daß die gebildeten Aggregate mit längerer DNA-Sequenz immer kleiner werden. In der vorliegenden Arbeit führt eine längere DNA-Sequenz, also ein größerer Partikelabstand, dagegen zu einer stärkeren Dämpfung und im Falle der 20 nm Partikel auch zu einer stärkeren Rotverschiebung. Dieses Resultat kann dann zustande kommen, wenn die Anzahl der beteiligten Partikel pro Aggregat konstant bleibt. Dann nimmt die Aggregatgröße zu, und es kommt zu einer stärkeren Dämpfung und Rotverschiebung der Plasmonenbande. Wie bereits im Abschnitt 5.2.1 beschrieben, wird das Aggregatwachstum durch die Verwendung von SDS beeinflusst. Es ist daher möglich, daß, anders als in der Literatur beschrieben, die Partikelanzahl pro Aggregat in etwa konstant bleibt und die Messungen größere Aggregate durch einen größeren Abstand der Partikel zueinander widerspiegeln. Es ist nicht klar zu trennen, welchen Einfluß die Hybridisierung auf die erzielten Resultate hat, da sich auch in diesem Punkt die Vorgehensweisen unterscheiden. Da auch aus der Literatur keine umfassenden Daten vorliegen, sind zur Wirkung veränderter DNA-Sequenzlängen und der Beeinflussung des Aggregatwachstums weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine gerichtete Kopplung von Goldkolloiden durch die Hybridisierung von komplementären DNA-Sequenzen möglich ist. Die Hybridisierungsrate ist teilweise gering, was gleichzeitig zu einer zu geringen Kopplungsrate der Partikel führt. Daraus ergibt sich, daß im Falle der Mirkinschen Methode [35] über eine dritte DNA-

Sequenz als eigentliches Verbindungsstück die Kopplung der Partikel weiter erschwert wird, da hier sogar zwei Hybridisierungsereignisse erfolgreich verlaufen müssen. Es ist teilweise nicht eindeutig möglich, Einflüsse durch die Hybridisierung von denen anderer veränderter Faktoren abzugrenzen. So ist im obigen Beispiel nicht klar, ob die Veränderungen im Spektrum durch den veränderten Abstand der Partikel zueinander oder durch ein verändertes Hybridisierungsverhalten zustande kommen. Daher ist es besonders wichtig, die Wechselwirkungen zwischen Partikel und DNA und die Unterschiede zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA zu untersuchen, z. B. ob die Wechselwirkung zwischen ssDNA und Partikeln mit der geringen Hybridisierungsrate zusammenhängen kann.

6.2 Einfluß der Kationen

Salzionen sind notwendig, um DNA-Goldkolloid-Hybride zu erzeugen. Sie werden auch dann benötigt, wenn mit dsDNA gearbeitet wird. Deshalb ist es von besonderer Bedeutung, den Einfluß der Salzionen zu untersuchen. Im nachfolgenden Abschnitt wird dazu jeweils das Verhalten von ssDNA und dsDNA in Natrium- bzw. Magnesiumchlorid Lösungen verglichen. Natrium- und Magnesiumchlorid wurden gewählt, da diese am häufigsten in der Molekularbiologie verwendet werden.

6.2.1 Monovalente Kationen: Natrium

Die Goldkolloide wurden in einer Natriumchlorid-Lösung durch dsDNA miteinander verbunden. Die zur Kopplung verwendete Lösung ist von einem in der Molekularbiologie verwendeten Hybridisierungspuffer abgeleitet und enthält als weiteren Bestandteil SDS. Es wurde durch Messung bei verschiedenen SDS-Konzentrationen zwischen 0.1% und 1% sichergestellt, daß SDS zu keiner Veränderung der Goldkolloid Extinktion führt. Mit SDS kann aber eine Stabilisierung der Partikelnetzwerke erreicht werden, so daß diese über Wochen stabil in Lösung bleiben und nicht ausfallen. Die Natriumchlorid-Konzentration wurde zwischen 0 und 1 M NaCl variiert und die Änderung der Extinktion von dsDNA-verbundenen Partikelnetzwerken untersucht. Je höher die Salzkonzentration, umso breiter wird die Plasmonenbande und desto stärker wird sie rotverschoben (Abb. 6.4). Eine besonders starke Änderung tritt zwischen 0.75 M NaCl und 1 M NaCl auf.

Weiterhin wurde das Verhalten von Goldkolloiden, die mit 24mer ssDNA funktionalisiert waren, untersucht. Die funktionalisierten Goldkolloide wurden unter den gleichen Experimentierbedingungen untersucht, die bei der Kopplung von Partikeln mittels dsDNA verwendet wurden, d. h. es wurde ein schneller Lösungsmittelaustausch vorgenommen. Da kein komplementärer DNA-Strang vorliegt, kann es nicht zu einer Kopplung der Kolloide kommen und man erwartet, daß sich die Extinktion nicht verändert, wenn die funktionalisierten Partikel in die Natriumchlorid-Umgebung gebracht werden. In Abb. 6.5 ist zu sehen, daß sich dagegen die Extinktion in sehr starkem Maße ändert. Die Plasmonenbande wird stark gedämpft und verschiebt sich bis zu einem Maximum bei 700 nm. Diese Extinktion bleibt aber nicht erhalten. Das System verändert sich weiter. Innerhalb von 40 min verändert sich die Extinktion wieder nahezu zurück zum ursprünglichem Spektrum dispergierter Partikel, d.h. es tritt dann eine Blauverschiebung und

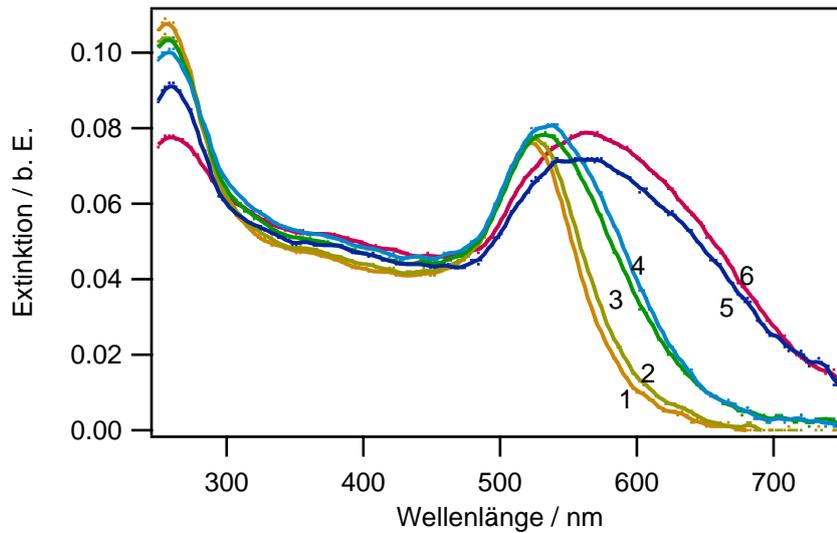


Abbildung 6.4: UV/VIS-Spektren von 20nm Goldkolloiden mit 24mer dsDNA in 0.1% SDS (1); 0.25M NaCl, 0.1% SDS (2); 0.5M NaCl, 0.1% SDS (3); 0.75M NaCl, 0.1% SDS (4) und 1M NaCl, 0.1% SDS (5); 1M NaCl (6).

Intensivierung der Plasmonenbande auf. Interessant dabei ist, daß sich nicht nur die Lage des Maximums verändert, sondern Veränderungen im gesamten Spektrum auftreten.

Die Veränderungen der Extinktion sowohl bei einer Wellenlänge von 260 nm als auch bei 535 nm ist näher untersucht worden. Die Extinktionsveränderungen wurden über einen Zeitraum von 80 min verfolgt (Abb. 6.6). Dabei ist festzustellen, daß die Änderungen an beiden Maxima miteinander korrelieren. Entweder werden diese nur durch die Partikel hervorgerufen und korrelieren folglich miteinander oder es werden sowohl Einflüsse der DNA als auch der Kolloide beobachtet, die miteinander wechselwirken. Diese Frage wird im Abschnitt 6.2.4 diskutiert.

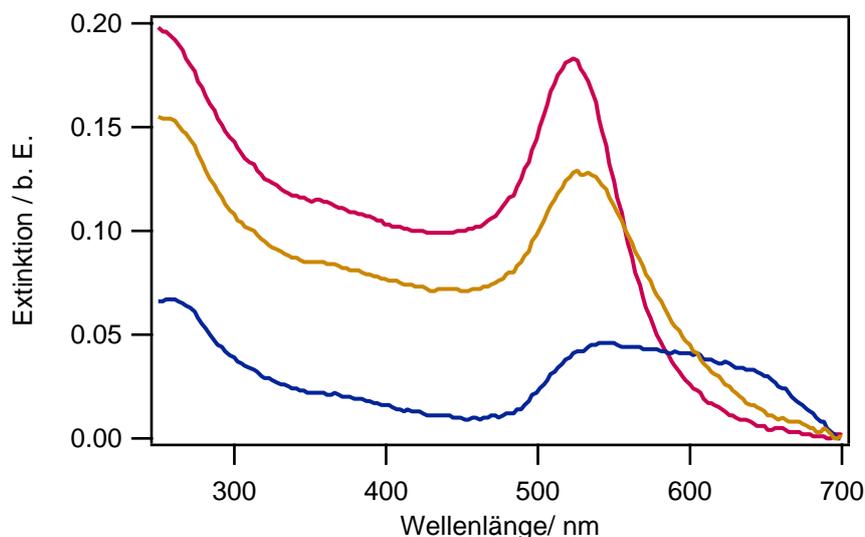


Abbildung 6.5: UV/VIS-Spektrum von Goldkolloiden, funktionalisiert mit 24mer ssDNA. Spektrum der dispergiert vorliegenden Partikel (rot), Partikel in 0.1% SDS, 1M NaCl sofort nach dem Lösungsmitteltausch (blau) und eine Stunde später (gelb).

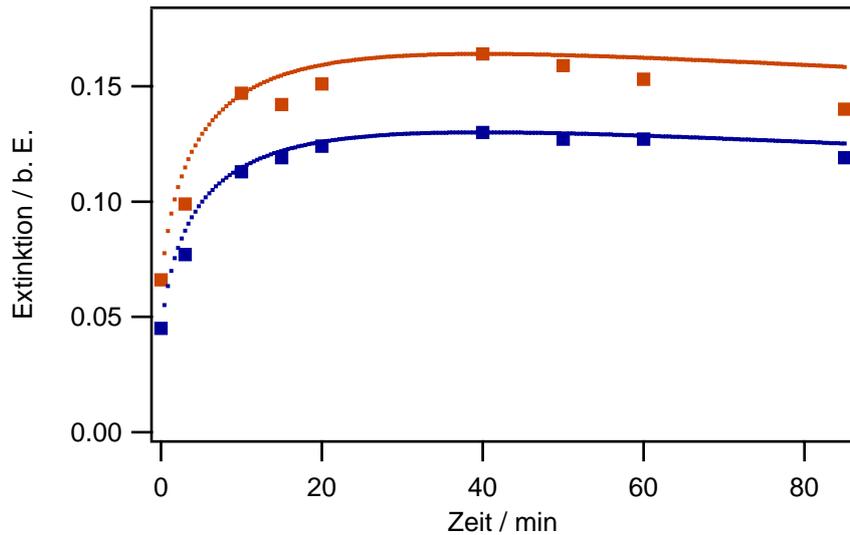


Abbildung 6.6: Zeitabhängigkeit der Extinktions-Veränderung bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (rot) und $\lambda = 535 \text{ nm}$ (blau) von ssDNA-funktionalisierten 20 nm Goldkolloiden in 0.1% SDS, 1M NaCl. Die Daten wurden mit einer Sigmoidal-Funktion gefittet.

6.2.2 Divalente Kationen: Magnesium

Neben Na^+ -Ionen, die in der Biologie eine sehr wichtige Rolle spielen, werden auch Mg^{2+} -Ionen in der Molekularbiologie, z.B. in Hybridisierungspuffern, eingesetzt. Während Na^+ -Ionen überwiegend mit den Basen der DNA wechselwirken, geht man bei Mg^{2+} -Ionen davon aus, daß diese mehr mit dem Rückgrat der DNA, also dem Phosphatrest, wechselwirken. Zum Vergleich wurden die unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen genauso wie im Falle von NaCl gewählt. In Abb. 6.7 ist das Ergebnis dargestellt. Die Extinktions-Spektren unterscheiden sich bei den verschiedenen Konzentrationen wenig. Es kommt zu einer starken Dämpfung und Verbreiterung, die, im Vergleich zu gekoppelten Partikeln in Natriumchlorid, deutlich unterschiedlich ist (siehe

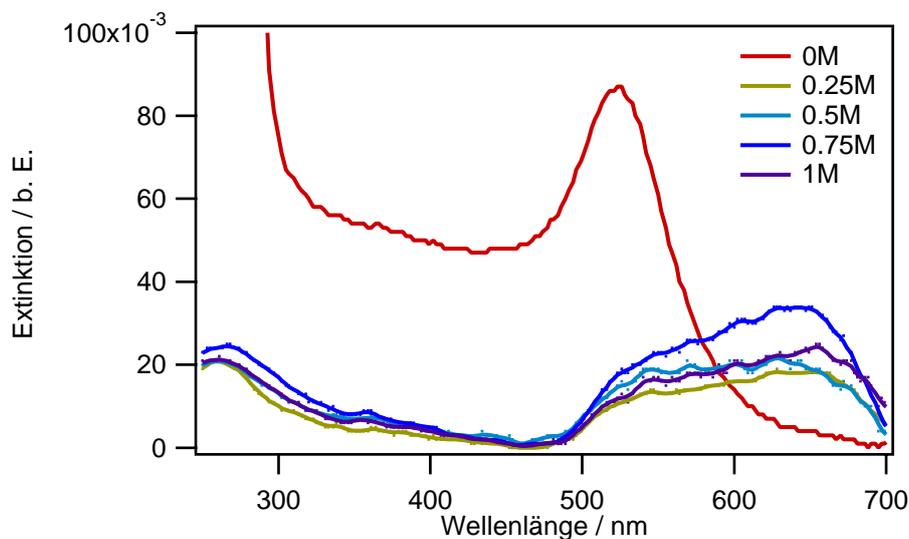


Abbildung 6.7: UV/VIS-Spektrum von dsDNA-funktionalisierten 20 nm Goldkolloiden bei unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen.

Abb. 6.4). Weiterhin gibt es keinen Unterscheid zwischen ssDNA und dsDNA. Dies legt nahe, daß die DNA nicht mehr im eigentlichen Sinne als Abstandshalter zwischen den Partikeln fungiert.

6.2.3 Unspezifische Aggregation von Partikeln

Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Abschnitt machen es erforderlich, sich mit einem weiteren Aspekt zu beschäftigen: der unspezifischen Aggregation. Unspezifisch heißt in diesem Zusammenhang, daß die DNA nicht als Abstandshalter fungiert und eine Verbindung der Partikel nicht durch die kovalente Bindung der Thiolgruppen auf den Oberflächen der Goldkolloide oder der Hybridisierung komplementärer DNA-Stränge zustande kommt.

Aus der Kolloidchemie ist die zunächst empirisch gefundene und später auch theoretisch belegte Schulze-Hardy-Regel bekannt. Demnach kann man die Konzentration eines zweiwertigen Ions geringer wählen, um die selbe Wirksamkeit des einwertigen Ions zu erhalten. Zur Untersuchung unspezifischer Aggregation der Partikel wurde mit Magnesium-Konzentrationen zwischen 0 mM und 1,1 mM $MgCl_2$ gearbeitet. Es wurden 20 nm Gold Partikel verwendet, die mit einem 8mer ssDNA-Strang funktionalisiert waren. Da kein komplementärer DNA-Strang zur Verfügung stand, mußten zu beobachtende Extinktionsänderungen von einer unspezifischen Aggregation der Partikel herrühren. Die unspezifische Aggregation wurde untersucht, indem entweder die Salzkonzentration sehr schnell oder mit sehr großem zeitlichen Abstand erhöht wurde. Zunächst werden die Ergebnisse der schnellen Änderung der Salzkonzentration besprochen. Sehr schnell heißt, daß das gleiche Volumen der Salzlösung unmittelbar im Anschluß an das vorhergehende der Kolloidlösung zugesetzt wurde. Damit geht eine Änderung des UV/VIS-Spektrums einher (Abb. 6.8). Es kommt zu einer Dämpfung, die mit steigender Konzentration verstärkt wird und zu einem Ansteigen der Extinktion im Bereich von 650 nm führt. Zu sehen ist weiterhin, daß auch die Extinktion im Bereich von 260 nm abnimmt, ebenso wie bei 525 nm. Betrachtet man die Extinktionsänderung an den markanten Punkten (260 nm, 525 nm und 626 nm) so zeigt sich, daß sich die Extinktion bei 260 nm und 525 nm in etwa in gleichem Maße verringert, die Ex-

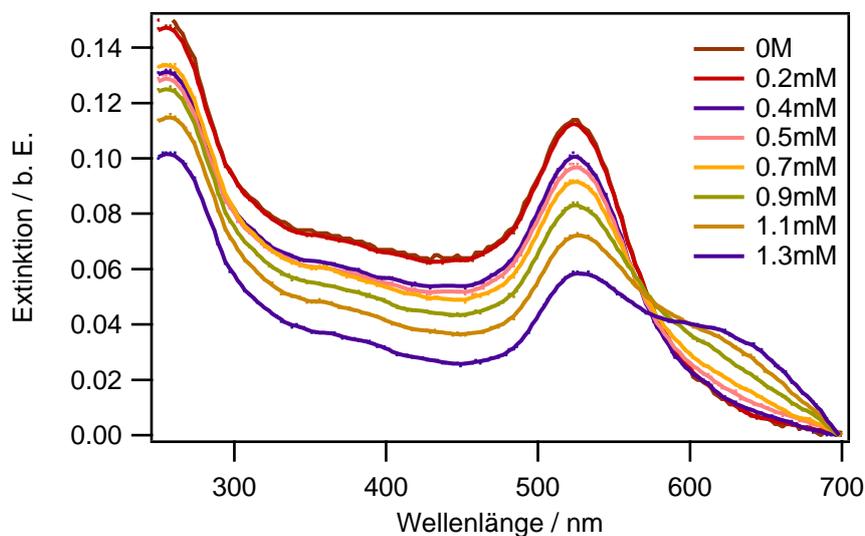


Abbildung 6.8: UV/VIS-Spektrum ssDNA-funktionalisierter 20 nm Goldkolloide in $MgCl_2$ nach unmittelbar aufeinanderfolgender Erhöhung der Konzentration von 0M auf 1,3 mM $MgCl_2$.

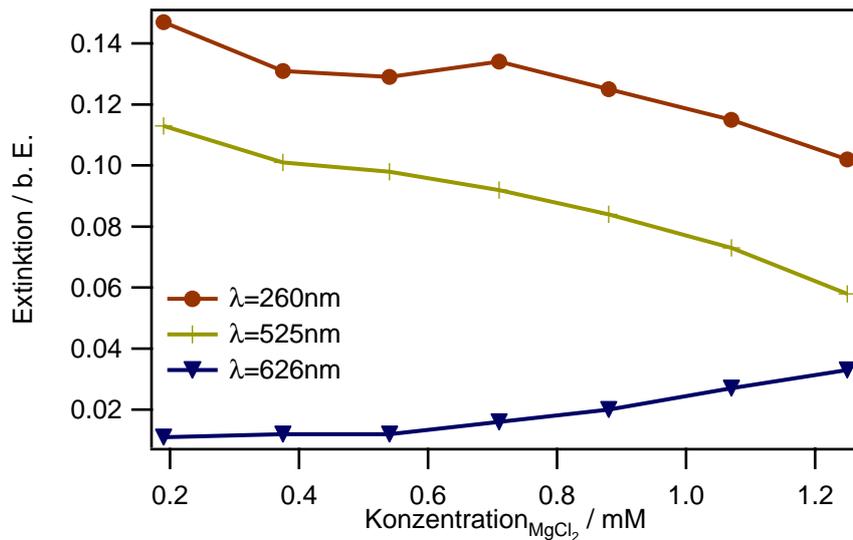


Abbildung 6.9: Konzentrationsabhängige Änderung der Extinktion bei $\lambda = 260\text{ nm}$ (rot), $\lambda = 525\text{ nm}$ (gelb) und $\lambda = 626\text{ nm}$ (blau) ssDNA-funktionalisierter 20 nm Goldkolloide in MgCl_2 .

tinktion bei 626 nm aber weniger stark zunimmt, als sie in den anderen Punkten des Spektrums abnimmt (Abb. 6.9). Nach Beenden der Salzzugabe veränderte sich das Spektrum weiter (Abb. 6.10). Dann treten Veränderungen nicht mehr im gesamten Wellenlängenbereich auf. Stattdessen kommt es zu einer weiteren Rotverschiebung der bei 626 nm gebildeten Schulter und zu einer Zunahme der Extinktion bei einer Wellenlänge von 654 nm, deren zeitlicher Verlauf in Abb. 6.11 gezeigt ist. Die Veränderungen sind nach ca. 40 min abgeschlossen und irreversibel. Die Extinktion ändert sich nicht mehr.

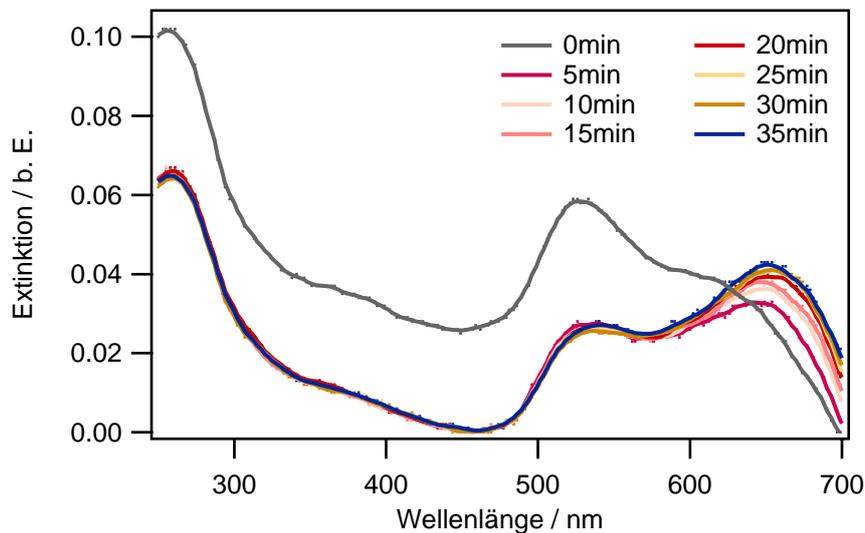


Abbildung 6.10: Veränderung des UV/VIS-Spektrums ssDNA-funktionalisierter 20 nm Goldkolloide in 1,3mM MgCl_2 nach Beenden der Salzzugabe.

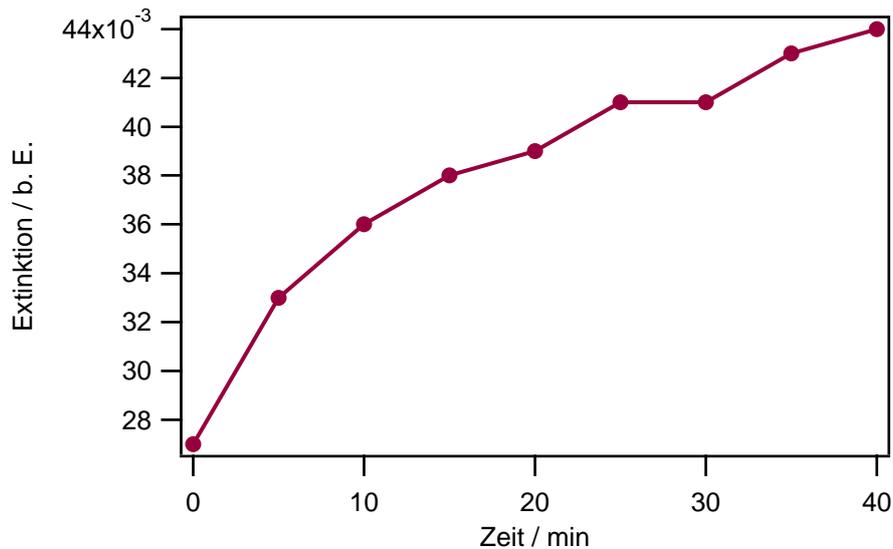


Abbildung 6.11: Zeitliche Zunahme der Extinktion bei $\lambda = 654 \text{ nm}$ ssDNA-funktionalisierter 20 nm Goldkolloide in 1,3mM MgCl_2 nach Beenden der Salzzugabe.

Als nächstes wurde die MgCl_2 -Konzentration in großem zeitlichen Abstand erhöht. Der Abstand zwischen den einzelnen Salzzugaben betrug mindestens 24 Stunden. Bei dieser Vorgehensweise ändert sich die Extinktion der Kolloidlösung nur geringfügig bei 260 nm beim ersten Schritt. Ansonsten bleibt die Extinktion im wesentlichen konstant (Abb. 6.12). Es kommt zu keiner Verschiebung, Verbreiterung oder Dämpfung der Plasmonenbande.

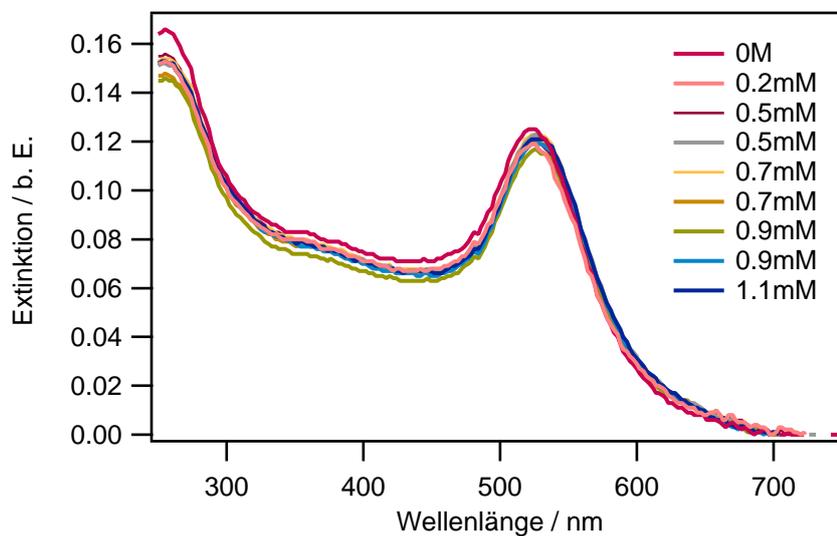


Abbildung 6.12: UV/VIS-Spektrum ssDNA-funktionalisierter 20 nm Goldkolloide bei schrittweiser Erhöhung der MgCl_2 -Konzentration von 0 M auf 1,1 mM jeweils im zeitlichen Abstand von mindestens 24 Stunden.

6.2.4 Wirkungsweise von Ionen

Bereits im Abschnitt 5.1 wurde deutlich, daß eine bestimmte Salzkonzentration auch dann notwendig ist, wenn die Partikel mittels doppelsträngiger DNA verbunden werden. Damit kann

die Notwendigkeit der Ionen nicht mehr mit der Hybridisierung begründet werden. Die DNA muß aber mit den Partikeln assoziiert sein, da man die Partikel zentrifugieren und in einer neuen Lösung resuspendieren kann. Handelt es sich dabei um eine Salzlösung, sind die Partikel dennoch stabil, wenn keine Kopplung wegen der fehlenden zweiten Thiolgruppe oder fehlendem komplementären DNA-Strang möglich ist. Die Partikel aggregieren nicht, auch wenn die Salzkonzentration sehr stark erhöht wird. Diese Beobachtung ist auch aus der Literatur bekannt [35]. Die hier vorgestellte Methode der Kopplung der Partikel durch dsDNA verzichtet auf den kritischen Schritt des „Einsalzens“ und hat damit eine höhere Effizienz, dennoch bleibt die Frage, welche Rolle die Salzionen tatsächlich spielen. Es ist notwendig, wesentlich stärker als bisher in der Literatur geschehen, ein Augenmerk auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Partikeln untereinander und den Partikeln und der DNA zu legen. Nachfolgend werden die Ergebnisse der vorangegangenen Abschnitte unter diesem Gesichtspunkt diskutiert.

Die Ergebnisse von DNA-funktionalisierten Goldkolloiden (ssDNA-funktionalisiert oder dsDNA-funktionalisiert) in einer Natriumchlorid- bzw. Magnesiumchloridlösung unterscheiden sich voneinander. In Natriumchlorid sind konzentrationsabhängige Änderungen der Extinktion im Falle der dsDNA zu beobachten. Von Jin et al. [100] wurde erwähnt, daß für eine Hybridisierung von DNA auf Goldkolloiden mindestens eine Konzentration von 0.5 M NaCl notwendig sei (siehe Abschnitt 3.3). Hier wird nun beobachtet, daß insbesondere ab einer Konzentration von 0.75 M NaCl eine deutliche Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonenbande auftritt. Man kann davon ausgehen, daß die Ursache in beiden Fällen die gleiche ist. Da hier aber doppelsträngige DNA verwendet wird, ist klar ersichtlich, daß dies nicht mit der Hybridisierung zusammenhängen kann. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Änderung der Extinktion bei Konzentrationen über 0.75 M NaCl. Man kann dies im Sinne einer Alles-oder-Nichts-Reaktion interpretieren, d.h. es ist eine bestimmte Konzentration notwendig, um eine Verbindung der Partikel tatsächlich auszulösen.

Wie in Abschnitt 3.2 ausgeführt, kann eine Kolloidlösung dadurch stabilisiert werden, daß die Ladungsdichte des potentialbestimmenden Ions stärker erhöht wird, als die der Gegenionen. Die DNA ist ein Polyanion und somit ist es vorstellbar, daß die stabilisierende Wirkung der DNA nicht nur auf sterischen Gründen, sondern eben auf diesem Effekt der elektrostatischen Stabilisierung beruht. Die Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln werden durch das Polyanion DNA erhöht, die diffuse Doppelschicht wird dicker. Folglich ist eine höhere Konzentration von Gegenionen notwendig, um die Abstoßungskräfte zu überwinden. Deshalb sind die DNA-funktionalisierten Partikel in einer Salzlösung stabil. Wenn dem so ist, hat dies aber auch Konsequenzen für die Kopplung der Partikel durch DNA. Dazu müssen sich die Partikel mindestens bis auf die Länge der DNA-Sequenz annähern können, und dafür müssen wiederum die Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln minimiert werden - eine Zugabe einer ausreichenden Menge von Gegenionen ist notwendig. Dies gilt sowohl im Falle der einzel- wie auch der doppelsträngigen DNA. Im Fall der ssDNA kann eine Hybridisierung nur dann erfolgreich sein, wenn sich die Partikel mindestens bis auf den entsprechenden Abstand nähern. Damit können die Beobachtung von Jin et al. [100] mit den hier gewonnenen Ergebnissen zum konzentrationsabhängigen Verhalten von dsDNA-Partikel-Hybriden in Übereinstimmung gebracht werden. Die Schlußfolgerung ist, daß die Bildung der Partikelnetzwerke, gleich ob durch Hybridisierung von ssDNA oder Kopplung durch dsDNA, durch die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln

als limitierendem Faktor bestimmt werden.

Ist die Konzentration der Ionen zu hoch, kommt es zu unspezifischen Aggregationen der Partikel. Die DNA hat dann weder eine elektrostatische, noch eine sterisch schützende Funktion. Sie tritt selbst mit der Oberfläche der Partikel in Wechselwirkung. Dieses Bild zeigt sich im Fall von Magnesiumchlorid-Konzentrationen bis zu 1M. Unspezifisch ist die Aggregation der Partikel, weil ssDNA und dsDNA das gleiche Bild zeigen. Man kann die Extinktion dahingehend deuten, daß sich sehr große Aggregate in der Lösung bilden. Da bekannt ist, daß Magnesium am negativ geladenen Rückgrat der DNA bindet, ist es vorstellbar, daß die DNA, ob ssDNA oder dsDNA, über das Rückgrat gebunden auf der Oberfläche der Partikel aufliegt. Wird die Konzentration entsprechend der Schulze-Hardy-Regel verringert, treten diese unspezifischen Aggregationen nicht mehr auf. Ein Beispiel ist in Abb. 6.2 gezeigt, wo Partikel durch Hybridisierung von ssDNA in 0.36 mM $MgCl_2$ gekoppelt wurden. Hier spielen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen DNA und Partikel eine Rolle. Dies zeigt sich auch im Verhalten von ssDNA in Natriumchlorid. Auch hier kann die zunächst sehr starke Veränderung der Extinktion in der Salzlösung als unspezifische Aggregation der Partikel interpretiert werden. Allerdings ist diese reversibel. Innerhalb einer Stunde lösen sich die Aggregate wieder auf. Erklärbar ist dies, wenn man zunächst wiederum annimmt, daß die DNA-Stränge aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen auf der Partikeloberfläche aufliegen und sich Schritt für Schritt wieder davon lösen. Dann können sie auch wieder als sterische Abstandhalter dienen. Daß die Spektren der dispergierten Partikel in Wasser mit dem der redispergierten in der Salzlösung nicht vollkommen übereinstimmen (siehe Abb. 6.5) liegt daran, daß nicht alle Aggregate wieder aufgelöst werden und aufgrund deren optischer Eigenschaften eine leichte Rotverschiebung bestehen bleibt.

Der Umstand, daß unspezifische Aggregationen einmal reversibel und einmal irreversibel sind, ist hier untersucht worden. Wird die Salzkonzentration immerfort erhöht, bewirkt man damit eine Aggregation der Partikel. Ab einem bestimmten Punkt ist der Prozeß der unspezifischen Aggregatbildung nicht mehr reversibel. Möglicherweise ist dies mit einer bestimmten Aggregatgröße verbunden, die nicht mehr aufgelöst werden kann und stattdessen als „Keim“ für weiteres Aggregatwachstum dient (daher auch die beobachteten Extinktionsveränderungen nach Beenden der Salzzugabe). Strebt ein System dem thermodynamischen Minimum zu, ist dies wegabhängig. Das heißt, das Resultat ist immer das gleiche, unabhängig davon, wie das System in den Zustand kommt. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse bei schneller oder langsamer Erhöhung der Salzkonzentration, zeigt sich, daß die Resultate im Gegensatz dazu wegabhängig sind. Das heißt, die Aggregatentstehung ist kinetisch kontrolliert. Die Problematik des Einsalzens rührt daher, daß dieser Weg eine Aggregatbildung fördert und leicht zu einem irreversiblen Aggregieren führt. Daraus ist zu schlußfolgern, daß das schrittweise Erhöhen der Salzkonzentration als kritisch einzustufen ist. Um die Ausbeute an kopplungsfähigen DNA-funktionalisierten Partikeln zu erhöhen, ist stattdessen eine einmalige Konzentrationsänderung mit höher konzentrierter Salzlösung vorzuziehen.

Betrachtet man unspezifisch gebundene DNA, d.h. DNA, die keine Thiolgruppe besitzt und stattdessen mit ihren Basen oder dem Rückgrat auf der Oberfläche gebunden wird, so zeigt sich, daß diese DNA keinen Schutz der Kolloide vor irreversiblen Aggregieren darstellt (siehe Abschnitt 5.1). Wird in einer solchen kolloidalen Lösung die Konzentration der Gegenionen erhöht, so können sich diese sowohl an das negativ geladene Rückgrat der DNA anlagern, als

auch die elektrische Doppelschicht der Partikel beeinflussen. Die Ladung von Teilchen und Partikel werden ausgeglichen, so daß die DNA nicht mehr elektrostatisch gebunden ist. Dadurch besteht zwischen den Partikeln weder eine elektrostatische Abstoßung, noch werden sie durch Schutzmoleküle stabilisiert und aggregieren deshalb.

Abschließend wird diskutiert, ob bei den beobachteten Extinktionsveränderungen der ssDNA in NaCl (siehe Abb. 6.6) eine Änderung der Extinktion bei 260 nm ursächlich mit der DNA und eine Änderung der Extinktion bei 535 nm ursächlich mit den Partikel zusammenhängt. Diese Frage wurde schon einmal im Zusammenhang mit dem Schmelzen der DNA diskutiert. Dort ging es um die Frage, ob es überhaupt möglich sei, in einem DNA - Partikelnetzwerk das Schmelzen der DNA / die Dissoziation der Netzwerke durch eine Extinktionsänderung bei 260 nm detektieren zu können, da der Beitrag der DNA zur Extinktion als sehr gering einzustufen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß dies möglich ist, denn durch die starke Zunahme der Extinktion der DNA in dissoziiertem Zustand steigt deren Beitrag und Einfluß auf das Spektrum. Im Falle der ssDNA in NaCl kann man allerdings nicht ohne weiteres davon ausgehen, hier an der charakteristischen Wellenlänge Eigenschaften der DNA widergespiegelt zu bekommen. Die Tatsache, daß die Änderungen der Extinktion bei 260 nm und 535 nm in gleichem Maße erfolgt, unterstützt eher die These, daß eine Netzwerkbildung nicht nur durch eine Verbreiterung und Rotverschiebung der Plasmonenbande, sondern durch eine Einbeziehung des gesamten Spektrums betrachtet werden muß. Die gebildeten Aggregate bestimmen die optischen Eigenschaften.

6.3 Alternative: Protein - Protein - Bindung

Die elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln spielt, wie aus den vorangegangenen Abschnitten zu entnehmen ist, eine wichtige Rolle. Bei der Suche nach Alternativen, diese anders als durch eine Änderung der Ionenkonzentration zu überwinden, stößt man auf die Möglichkeit, anstelle einer Thiolgruppe und deren Bindung auf der Oberfläche auf Protein - Protein - Interaktionen zurückzugreifen. Bekanntes und vielfach benutztes Beispiel einer Schlüssel-Schloß-Bindung zwischen zwei Proteinen ist der Komplex aus Streptavidin und Biotin. Streptavidin ist ein relativ großes Moleküle mit „Abmessungen“ von 4.5 x 4.5 x 5.8 nm und besteht aus vier Untereinheiten, die jeweils ein Biotin-Molekül binden können. Da die Proteine durch ihre Größe zu einem zusätzlichen Abstand der Partikel voneinander und auch von der DNA zur Partikeloberfläche führen, kann man geringere Wechselwirkungen zwischen DNA und Oberfläche bzw. eine Überbrückung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Partikeln erwarten. Innerhalb dieser Arbeit wurden Goldkolloide wiederum mit einem Durchmesser von 20 nm verwendet, deren Oberfläche mit Streptavidin belegt war. Die DNA war ein- oder beidseitig mit Biotin anstelle der Thiolgruppe versehen. Damit das Protein in seiner nativen Form auf den Kolloiden vorliegt, ist eine geringe Salzkonzentration notwendig, in der sich die Kolloide bereits befinden. Anschließend wird die Biotin-funktionalisierte DNA zugegeben. Die Extinktion ändert sich nur gering, es kommt zu einer schwachen Dämpfung der Plasmonenbande. Eine Verbreiterung oder Verschiebung konnte nicht beobachtet werden. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm (siehe Abb. 6.13, rote Kurve). Wird die DNA zugegeben, so kommt es durch die DNA zu einer leichten Blauverschiebung

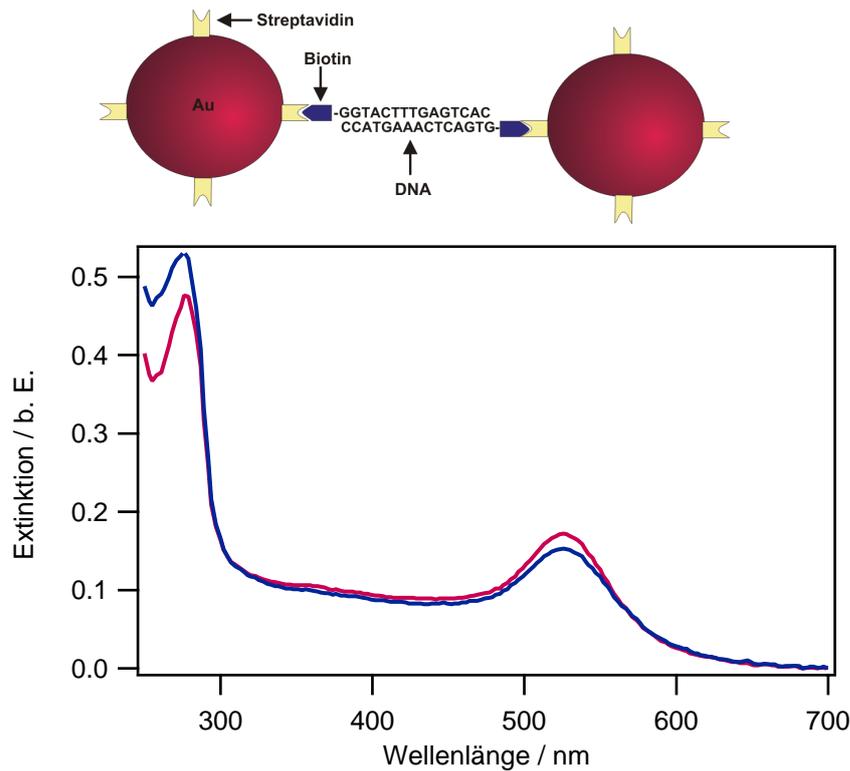


Abbildung 6.13: **Oben** Schema der Verbindung von Streptavidin-Partikeln durch beidseitig Biotin-funktionalisierte dsDNA und **Unten** Extinktions-Spektren der dispergierten Partikel (rot) und nach Zugabe der DNA (blau). Nach Zugabe der DNA kommt es zu einer leichten Dämpfung der Plasmonenbande.

in Richtung 260 nm (blaue Kurve in Abb. 6.13).

Geprüft wurde auch, ob eine Bindung mit einer beidseitig Biotin-funktionalisierten ssDNA erzeugt werden kann. Weiterhin ist zu beachten, daß durch die Größe des Streptavidin der Abstand zwischen den Partikeln im Vergleich zur DNA-Sequenz gleicher Länge, aber über Thiolgruppe gebunden, erheblich vergrößert wird. Um dies auszugleichen, wurde auch eine kürzere, beidseitig Biotin-funktionalisierte dsDNA (15 Basen Länge) verwendet. In keinem Fall konnte eine Extinktionsänderung wie sie von der thiofunktionalisierten DNA bei Kopplung der Partikel bekannt war, beobachtet werden. Deshalb wurden anstelle der Streptavidin-Partikel wiederum die bisher verwendeten, nichtfunktionalisierten Goldkolloide eingesetzt. Eine unspezifische Bindung des Proteins Biotin auf der Goldoberfläche war zu erwarten. Für diese Experimente wurden die Kolloide in der wässrigen Lösung belassen und keine Salzionen zugesetzt. Die Biotin-funktionalisierte DNA wurde in zwei Varianten erprobt: Zum einen dsDNA, die beidseitig Biotin-funktionalisiert war und zum andern ssDNA, die nur einseitig Biotin-funktionalisiert war.

Im Fall der dsDNA kommt es nach einigen Stunden zu einer Dämpfung der Extinktion im Wellenlängenbereich von 260 nm und 525 nm sowie zu einer Extinktionszunahme im Bereich von 680 nm (Abb. 6.14). Die Veränderungen erfolgen über mehr als 24 Stunden. Wird ssDNA verwendet, kommt es zu keinen Veränderungen im Spektrum (Abb. 6.15). Die Intensitätszunahme bei 260 nm kommt durch die Zugabe der DNA zu den Kolloiden zustande.

Die Experimente mit nicht funktionalisierten Goldkolloiden zeigen eine Bindung von Biotin auf der Oberfläche der Kolloide an. Da keine Veränderung der Extinktion bei der ssDNA zu de-

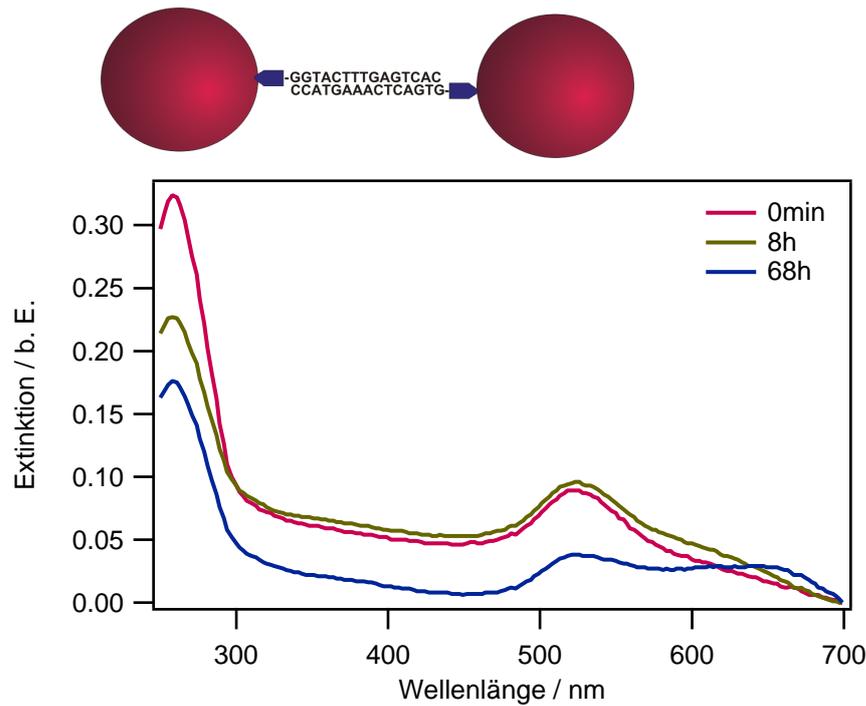


Abbildung 6.14: **Oben** Schema der Verbindung von Goldkolloiden mit beidseitig Biotin-funktionalisierter dsDNA und **Unten** Extinktions-Spektren nach unterschiedlichen Zeiten ab Zugabe der DNA.

tektieren ist, können die Veränderungen bei der dsDNA als Verbindung zweier Kolloide durch die Biotin-funktionalisierte DNA betrachtet werden. Aufgrund der Persistenzlänge der dsDNA (siehe den folgenden Abschnitt 6.4) ist es als unwahrscheinlich anzunehmen, daß die beidseitig Biotin-funktionalisierte DNA mit beiden Biotin-Molekülen auf ein und dem selben Partikel bindet. Die Veränderungen im Spektrum über die Zeit ähneln denen der durch Salzzugabe ausgelösten unspezifischen Aggregation von Partikeln (Abschnitt 6.2.3). Hier erfolgt die Verbindung der Kolloide in deionisiertem Wasser und ausschließlich durch die Bindung der Biotin-Moleküle auf den Partikeloberflächen. Daraus wird ersichtlich, welche weitreichenden Konsequenzen die Wahl der Anbindung der DNA auf der Oberfläche für die Kopplung und Aggregatbildung der Partikel hat. Eine Kopplung der Partikel über Streptavidin - Biotin konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist dies auf die Größe der Partikel zurückzuführen oder die optischen Eigenschaften der Goldkolloide werden durch die Belegung mit dem Protein derart verändert, daß eine Kopplung nicht wie bisher detektiert werden kann. In der Literatur [114] wurden für ein ähnlich gelagertes Experiment zur Kopplung über Biotin - Streptavidin kleinere Partikel verwendet, aber auch hier beträgt die Rotverschiebung lediglich 7 nm.

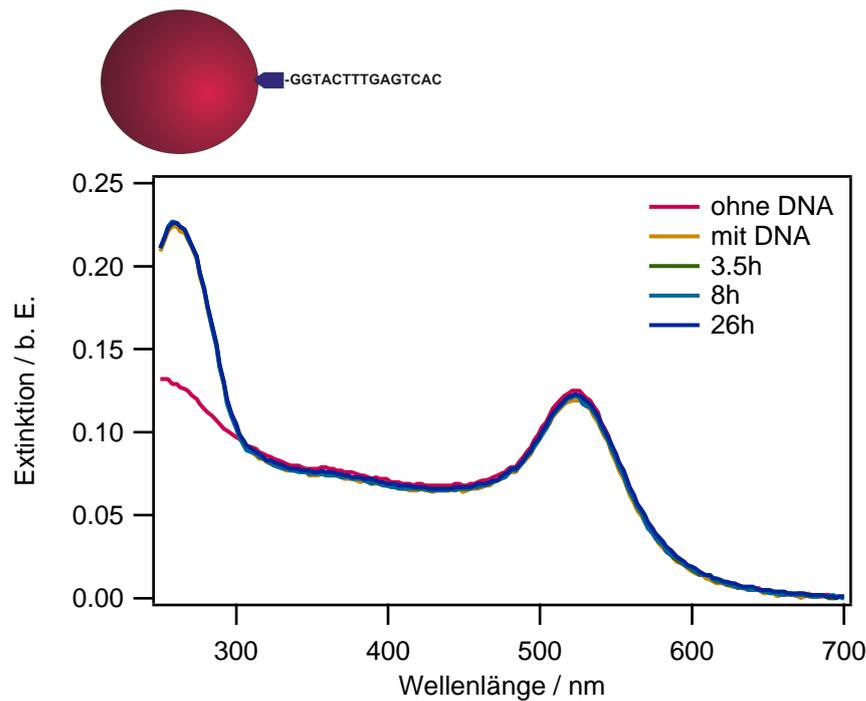


Abbildung 6.15: Oben Schema der Anbindung von einseitig Biotin-funktionalisierter ssDNA auf Goldkolloiden und Unten Extinktions-Spektren der dispergierten Partikel (rot), bei Zugabe der DNA (gelb) und zu unterschiedlichen Zeiten danach.

6.4 Die Persistenzlänge

Im folgenden Abschnitt werden zwei bereits vorgestellte Ergebnisse dieser Arbeit zusammen unter einem anderen Blickwinkel betrachtet. Im ersten Kapitel im Abschnitt 5.1 wurde der Nachweis der Verbindung von Goldkolloiden mittels dsDNA erbracht. Hierfür wurde u. a. dsDNA verwendet, die nur an einem Ende eine Thiolgruppe enthielt und somit nicht zur Erzeugung von Partikelnetzwerken benutzt werden kann. Bringt man Partikel, deren Oberfläche mit dieser DNA belegt ist, in eine Umgebung hoher Salzkonzentration, so ändert sich die Absorption nicht, da erwartungsgemäß die Partikel in der Salzlösung vor dem Aggregieren geschützt sind und damit weiterhin dispergiert vorliegen. Behandelt man dagegen mit ssDNA belegte Partikel in der gleichen Weise, so ändert sich die Absorption. Die Partikel bilden zunächst Aggregate und liegen erst nach einiger Zeit wieder dispergiert vor (Abschnitt 6.2.1). Beide Fälle unterscheiden sich lediglich darin, daß einmal dsDNA und einmal ssDNA unter den selben Bedingungen untersucht wird. Der Unterschied im Resultat kann auf die unterschiedlichen Persistenzlängen zurückgeführt werden. Wie in den Grundlagen (siehe Abschnitt 3.1) bereits ausgeführt, beträgt die Persistenzlänge von dsDNA ein Vielfaches der von ssDNA. Die ssDNA ist wesentlich flexibler und kann daher leichter mit der Partikeloberfläche in Wechselwirkung treten. Obwohl die Sequenz mit 24 Basen sehr kurz ist, steht die ssDNA nicht igelartig von der Oberfläche ab, wie das nach Steel et al. [86] zu erwarten wäre, sondern kann mit dem Partikel wechselwirken. Anders sieht dies im Falle der dsDNA aus. Hier wurde Ähnliches wie bei der ssDNA nicht beobachtet. Ist die dsDNA auf der Partikeloberfläche gebunden, so ist eine Wechselwirkung mit der Oberfläche aufgrund der größeren Steifigkeit sehr unwahrscheinlich. Durch Vergleich des unterschiedlichen Verhaltens von ssDNA und dsDNA kann gezeigt werden, daß die Persistenzlänge nicht nur im

Zusammenhang mit den Partikeln nachgewiesen werden kann, sondern auch, daß sie Konsequenzen für die Erzeugung von Partikelnetzwerken hat. Deutlich wird damit, daß eine erfolgreiche Hybridisierung durch diese Eigenschaft der ssDNA limitiert werden kann.

7. Ausblick und Schlußfolgerungen

Im ersten Teil dieses Kapitels werden erste Ergebnisse zur Kombination von Goldnanopartikeln mit anderen Geometrien präsentiert, die einen Ausblick auf die Kombinationsmöglichkeiten mit Hilfe der DNA geben sollen. Des Weiteren werden Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen der vorangegangenen Abschnitte gezogen, die sich für die Erzeugung von DNA-Partikel-Hybriden, insbesondere die Struktur der DNA ergeben.

Zur Kombination sphärischer Nanopartikel mit eindimensionalen Nanostrukturen wurden zum einen Goldnanostäbchen (in Lösung) und zum anderen Siliziumnanostäbchen mit Goldkolloiden (Abb. 7.1) verbunden. Für die Bindung von 80 nm Goldpartikeln auf Siliziumnanostäbchen mit einem Durchmesser von ca. 250 nm wurden REM-Aufnahmen ausgewertet. Diese ergaben, daß 47% der Partikel mit einem Stäbchen assoziiert waren und 40% der Stäbchen mit mindestens einem Kolloid assoziiert sind. In Kontrollversuchen wurde gezeigt, daß ohne DNA keine Kolloide auf dem Wafer oder den Stäbchen haften und komplett weggespült werden können. Im Querschnittsbild zeigte sich, daß die Partikel allerdings nicht, wie erwartet, auf dem Goldköpfchen der Stäbchen gebunden waren, sondern sich um deren „Fuß“ gruppierten. Dies kann mit dem Trocknen der Probe oder z.B. mit einem ungünstigen Verhältnis zwischen Partikelgröße und Stabilität sowie „Tragfähigkeit“ der DNA zu tun haben. Die Methode zur Anbindung von Kolloiden an andere Geometrien muß optimiert werden, doch sollen die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 7.2 A) eine Idee davon geben, was mit der DNA als Klebstoff in Zukunft realisiert werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die Kombination von Goldnanostäbchen mit 20 nm Goldkolloiden. In Abb. 7.2 B ist die Verknüpfung eines Goldnanostäbchens mit Goldkolloiden zu sehen. Die Belegung mit den Kolloiden ist deutlich zu erkennen. Im Vergleich dazu konnte in einem Kontrollexperiment, in dem keine DNA verwendet wurde, keine oder nur einzelne Kolloide auf den Stäbchen beobachtet werden.

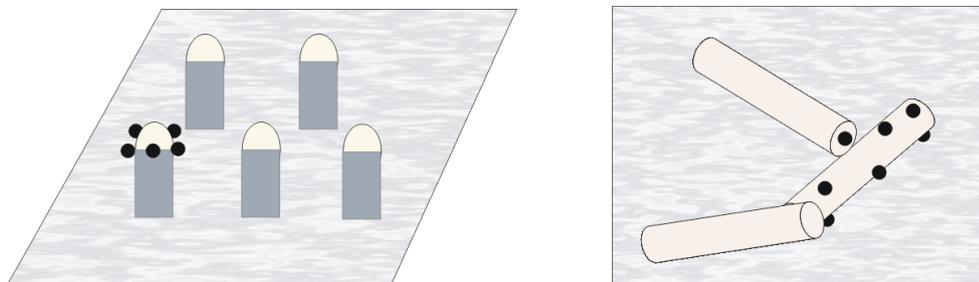


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung zur Kombination unterschiedlicher Geometrien. **Links** Siliziumnanostäbchen (grau) mit Gold„köpfchen“ (weiß) und daran gebundenen Goldkolloiden (schwarz). **Rechts** Goldstäbchen (weiß) mit Goldkolloiden (schwarz). Die Goldstäbchen befinden sich in Lösung und müssen für Untersuchungen auf einer Unterlage getrocknet werden.

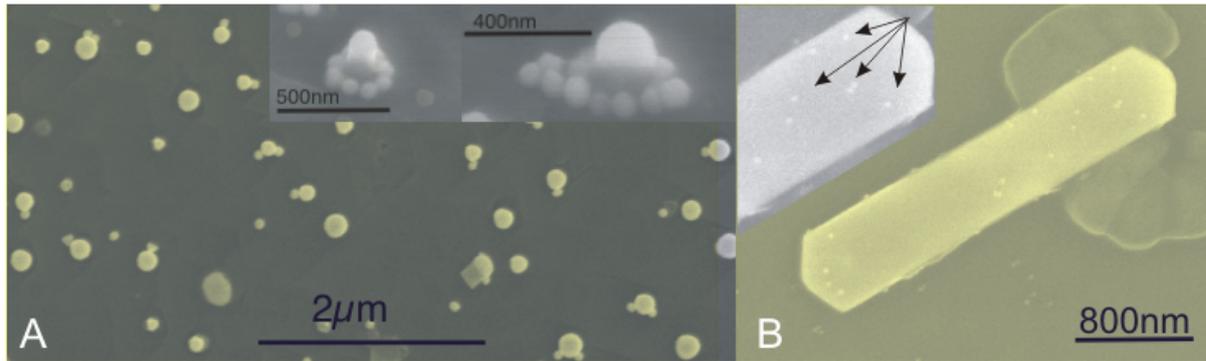


Abbildung 7.2: Kombination von Goldkolloiden mit Siliziumnanostäbchen und Goldnanostäbchen. **A** Draufsicht auf Siliziumstäbchen mit einem Durchmesser von ca. 250 nm an die Goldkolloide mit einem Durchmesser von 80 nm gebunden sind. Die Kolloide befinden sich am Fuß der Stäbchen, wie in den Detailausschnitten gezeigt wird. **B** Goldnanostäbchen, auf dem 20 nm Goldkolloide gebunden sind. Die Vergrößerung zeigt einen Ausschnitt des Stäbchens. REM-Aufnahmen

Abschließend werden die Ergebnisse dieser Arbeit unter dem Gesichtspunkt einer effektiven *und* selektiven Verknüpfung von Nanostrukturen durch DNA weiterentwickelt. Das Fernziel ist, DNA als Klebstoff für verschieden Nanostrukturen zu verwenden. Dabei sollen die DNA-Moleküle nicht nur als einfaches Verbindungsmolekül dienen, vielmehr können die speziellen Eigenschaften der DNA genutzt werden. In dieser Arbeit wurden die Partikel überwiegend mittels dsDNA verbunden. Es hat sich gezeigt, daß die Verknüpfung von Partikeln durch doppelsträngige DNA nicht nur zur Erforschung der Hybride genutzt werden kann, sondern darüber hinaus auch nützliche Vorteile besitzt. Dazu gehört die mechanische Steifigkeit und damit verbunden, die geringe Wechselwirkung mit der Oberfläche. Verwendet man auch zukünftig doppelsträngige DNA, kann auf zusätzliche Moleküle (z. B. die bisher verwendeten Alkylthiole), die die ssDNA-Moleküle aufrichten und stabilisieren sollen, verzichtet werden. Damit wird es auch überflüssig, einzelsträngige PolyT oder PolyA-Sequenzen zu verwenden, da die Basen Adenin und Thymin weniger mit der Oberfläche wechselwirken sollen. Auch wenn dies zutrifft, so besitzen diese Sequenzen doch immer und weiterhin die geringe Persistenzlänge der ssDNA.

Um die selektive Bindung wieder einzuführen und damit die Komplementarität der DNA zu nutzen, schließt sich an den doppelsträngigen Bereich ein kurzer einzelsträngiger Bereich an (Abb. 7.3). Werden zum Beispiel 7 Basen verwendet, so ist bereits mit diesem kurzen Bereich eine Vielzahl von „Bausteinen“ möglich, die parallel eingesetzt werden können. Ein solcher kurzer Bereich sollte ohne Schwierigkeiten hybridisieren. Er kann als „klebriges Ende“ betrachtet werden, von denen bekannt ist, daß sie problemlos und mit hoher Affinität zueinander binden.

Der Vorteil des hier vorgeschlagenen DNA-Strukturaufbaus besteht darin, daß nur ein Hybridisierungsereignis erfolgreich stattfinden muß. Zudem kann der Abstand zwischen den zu verknüpfenden Nanopartikeln leicht eingestellt werden: Statt immer längere ssDNA-Sequenzen auf den Partikeln zu binden, die mit zunehmender Länge leichter mit der Oberfläche wechselwirken, wird hier der dsDNA-Bereich verlängert und der ssDNA-Bereich für die Hybridisierung konstant gelassen. Die maximale Länge wird durch die Persistenzlänge der dsDNA unter den jeweiligen Umständen vorgegeben. Als Grenze für den maximalen Abstand, wenn zwei Nanopartikel durch einen linearen DNA-Linker miteinander verbunden werden, kann eine Länge von ca. 150 bp pro

Partikel, also ein Abstand von insgesamt ca. 100 nm abgeschätzt werden. Derartige Abstände können ausschließlich mit dsDNA erreicht werden. Des weiteren bietet diese Vorgehensweise den Vorteil, daß mit längerer DNA-Sequenz die Hybridisierungsbedingungen konstant bleiben und keine Komplikationen durch eine längere zu hybridisierende Sequenz auftreten. In diesem Zusammenhang sei auch darauf verwiesen, daß eine kurze „Verbindungssequenz“ gleichbedeutend mit einer niedrigen Schmelztemperatur ist. Die in dieser Arbeit verwendeten 24 Basen sind bereits zu lang, da unter den notwendigen Salzbedingungen die Schmelztemperatur zu hohen Temperaturen verschoben wird. Werden jedoch nur 5 Basen als „Überlapp“ zwischen den jeweiligen Partikeln verwendet, so schmelzen diese bei relativ niedrigen Temperaturen. Da das dsDNA-Stück deutlich länger gewählt wird, schmilzt dieses bei höheren Temperaturen. Das Aufschmelzen an dem verbindenden, überlappenden Bereich (rote Markierung in Abb. 7.3) wird begünstigt, da das Rückgrat der DNA an diesen Stellen unterbrochen, also nicht verbunden ist. Diese Instabilität fördert ein Aufschmelzen. Zudem kann dieser Vorgang noch dadurch unterstützt werden, daß das doppelsträngige Teilstück GC-reich gewählt wird und / oder das später verbindende einzelsträngige Teilstück möglichst AT-reich. Eine andere Möglichkeit zur Dissoziation der Partikelnetzwerke ohne Schmelzen der DNA ist kürzlich von Hazarika et al. [119] veröffentlicht worden. Dabei wird die Verbindung wie auch die Dissoziation des Partikelnetzwerkes durch „Treibstoff“-DNA bewerkstelligt. Ausgenutzt wird dabei der Effekt, daß DNA mit komplementären Sequenzen hybridisiert, auch wenn nur Teilbereiche der DNA-Stränge komplementär zueinander sind. Wird eine weitere Sequenz zugegeben, die komplett komplementär zu einem der beiden DNA-Stränge ist, so löst sich die alte Verbindung und die neu zugegebene Sequenz hybridisiert vollständig mit dem entsprechenden DNA-Strang. Dieses Prinzip ermöglicht einen Kreislauf von Bindung und Dissoziation der Partikel und könnte zukünftig ebenso auf die doppelsträngigen DNA-Verbindungsstücke angewendet werden.

Möchte man die Dichte der Kopplungs-DNA auf den Partikeln verringern, ohne deren Stabilität gegen Salzionen zu verringern, ist folgendes denkbar: Zum einen wird die dsDNA hergestellt, die die Nanopartikel später verbinden soll. Zum anderen wird eine zweite kürzere dsDNA ohne überstehende „klebrige Enden“ hergestellt. Diese beiden doppelsträngigen Sequenzen werden vermischt und dann zu den Partikeln gegeben. Beide Sequenzen werden auf den Partikeln in gleichem Maße gebunden. Somit sind die Partikel gut geschützt und gleichzeitig ist die Kopplungs-DNA, da sie weiter aus dem DNA-Film herausragt, leichter zugänglich. Es ist zu überlegen, ob diese Vorgehensweise insgesamt vorzuziehen ist, um Partikel mit einer kontrollierten Anzahl von Kopplungs-DNA-Sequenzen herzustellen. Denn wenn beispielsweise auf einem Kolloid nur ein oder zwei DNA-Moleküle vorhanden sind, so kann man dann nach herkömmlicher Methode nicht von einem Schutz der Partikel in einer Salzlösung durch die DNA-Moleküle ausgehen.

Untersucht wurde in dieser Arbeit auch, ob mittels Protein - Protein - Bindung die elektrostatischen Wechselwirkungen überbrückt werden können und ein Arbeiten ohne Salz möglich ist. Innerhalb dieser Arbeit konnte diese Verbindungsart nicht als Alternative zur kovalenten Bindung identifiziert werden. Die Biotin - Streptavidin - Bindung erscheint zunächst durchaus geeignet, da sie im Gegensatz zum typischen Verhalten von Proteinen sehr thermostabil ist (sind die Proteine gebunden, sind sie bis 112°C stabil und liegen nativ vor [120]). Ferner finden sich auch in jüngster Zeit Beispiele für die Kopplung von Partikeln über diese Protein - Protein - Bindung [114], doch wird auch dort nicht auf Natriumchlorid und das Einsalzen verzichtet.

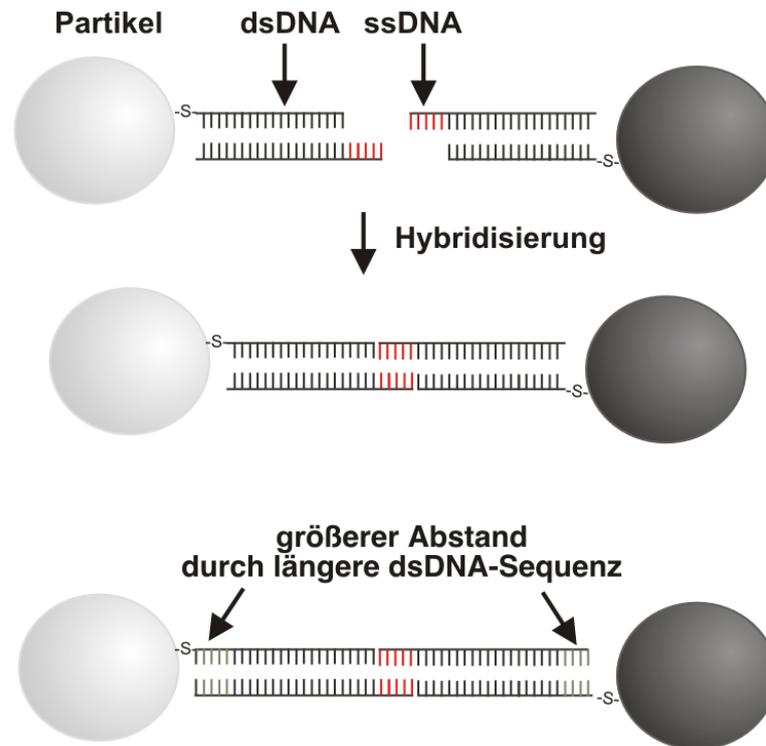


Abbildung 7.3: Vorschlag für den Aufbau einer robusten und selektiv bindenden DNA-Sequenz. Die DNA besteht aus einem doppelsträngigen Stück und einem kurzen ssDNA Stück („klebriges Ende“). Durch die Hybridisierung erfolgt eine selektive Verbindung der Nanopartikel. Der Abstand der Partikel kann durch einen längeren dsDNA-Abschnitt realisiert werden.

Zusammenfassend wird vorgeschlagen, die DNA weiterhin kovalent auf der Oberfläche, z.B. mittels Thiolgruppe zu binden, dann ein doppelsträngiges Teilstück zu verwenden (z.B. 20 Basen lang), um ein stabiles und wechselwirkungsarmes Verbindungsstück zu erhalten und dann für eine selektive Bindung einen kurzen DNA-Einzelstrang (z.B. 7 Basen) anzuschließen.

Zukünftig kann man aber auch an eine Nutzung von verzweigten, statt linearen DNA-Verbindungen zwischen den Partikeln denken. Dies könnte man in einfacher Form, z.B. einer einfachen Verzweigung tun. Oder man nutzt die auf anderem Gebiet sehr weitgediehenen Arbeiten, um aus DNA-Molekülen 3D-Architekturen zu bilden [5, 121]. In abgewandelter Form könnten daraus neue DNA-Sequenzen zur Kopplung hergestellt werden, die eine komplexere Gestaltung der DNA-Partikel-Hybride, z. B. den gezielten Aufbau von 3D-Strukturen erlauben.

8. Zusammenfassung

Diese Arbeit befaßte sich mit DNA-verbundenen Goldkolloiden. Die Hybride wurden überwiegend mittels doppelsträngiger DNA erzeugt. Diese Methode erlaubt es, auf die limitierenden Schritte der Hybridisierung und des Einsalzens zu verzichten. Damit ist eine Untersuchung der DNA-Partikel-Hybride und der Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Partikeln wie auch der Partikel untereinander unter einem neuen Blickwinkel möglich. Es wurde der Nachweis erbracht, daß die DNA tatsächlich als Abstandshalter zwischen den Partikeln fungiert und eine Verbindung der Partikel nur dann zustande kommen kann, wenn die DNA über die Thiolgruppen auf den Goldoberflächen bindet. Unspezifische Bindungen über das Rückgrat der DNA führen nicht zu einer Kopplung der Partikel. Durch die dsDNA wurden Partikel mit gleichem wie auch mit unterschiedlichen Durchmessern miteinander verbunden. Die durch die Kopplung entstandenen Partikelnetzwerke wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie und TEM-Analyse untersucht. Je größer der Durchmesser der Kolloide war, umso weniger Partikel waren je Aggregat vereinigt. Insgesamt kann innerhalb dieser Arbeit bestätigt werden, daß die Größe der gebildeten Aggregate wesentlich die optischen Eigenschaften bestimmt.

Die DNA, die auf den Partikeln gebunden ist, kann geschmolzen werden. Trotz der Dominanz der optischen Eigenschaften der Partikel kann das Schmelzen mittels UV/VIS-Spektroskopie verfolgt werden. Durch die hier verwendete Methode kann die Ansicht, daß die Partikelnetzwerke zu einem schärferen Übergang führen, widerlegt werden. Die Unterschiede, die sich im Vergleich zum Schmelzen der freien DNA-Moleküle in Lösung ergeben, sind bereits dann zu beobachten, wenn die DNA nur einseitig auf einer Partikeloberfläche gebunden ist. Der Übergang zwischen doppelsträngiger und dissoziierter DNA findet in einem engeren Temperaturbereich statt, der Übergang wird schärfer. Die Anbindung der DNA an die Oberfläche minimiert die Freiheitsgrade der DNA und führt deshalb zu einem veränderten Schmelzverhalten. In einem Partikelnetzwerk kommt zusätzlich noch mechanischer Streß hinzu, da sich die Partikel durch die Erwärmung stärker bewegen. Zudem ist das Schmelzen der einzelnen DNA-Moleküle in einem Partikelnetzwerk nicht mehr unabhängig voneinander, da an einem Partikel mehrere DNA-Stränge Kontakte zu mehreren Partikeln herstellen. Bisher ist das Schmelzen und Hybridisieren nicht reversibel möglich, da es zu starken Wechselwirkungen zwischen der ssDNA und den Partikeloberflächen kommt.

Es zeigte sich, daß ohne Salzionen keine Kopplung der Partikel mittels DNA stattfinden kann. Bisher wurde als Grund für die Notwendigkeit der Salzionen die Hybridisierung angesehen, was hier aufgrund der verwendeten Methode widerlegt werden kann. Die DNA erhöht zunächst durch ihre Eigenschaft als Polyanion die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln. Dies stärkt deren Stabilität gegenüber zugegebenen Salzionen. Für eine Kopplung müssen die elektrostatischen Abstoßungskräfte durch Erhöhung der Kationenkonzentration wieder minimiert werden. Dafür ist eine ausreichend hohe Schwellenkonzentration an Kationen notwendig.

Gezeigt hat sich auch, daß sich die Persistenzlänge in der stärkeren Wechselwirkung von einzelsträngiger DNA mit der Partikeloberfläche widerspiegelt.

Kolloidale Dispersionen sind thermodynamisch metastabil. Dies zeigt sich durch unspezifische, d.h. nicht DNA-erzeugte Aggregatbildung. Die unspezifische Aggregation der Partikel ist kinetisch kontrolliert.

Als Alternative zur Anbindung der DNA über eine Thiolgruppe auf der Partikeloberfläche wurde eine Bindung über Streptavidin - Biotin bzw. nur über Biotin untersucht.

Erste Resultate für eine Verbindung von sphärischen mit eindimensionalen Nanostrukturen mittels DNA wurden vorgestellt.

Aus den Resultaten dieser Arbeit wird für das zukünftige Verbinden von Nanopartikeln mittels DNA ein Ansatz vorgeschlagen, bei denen die verwendeten DNA-Moleküle sowohl geringe Wechselwirkungen mit der Oberfläche zeigen, als auch eine spezifische Erkennung der Moleküle zur gerichteten Kopplung von Nanopartikeln erlauben.

Literaturverzeichnis

- [1] M. H. Caruthers. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science*, 230:281 – 285, 1985.
- [2] P. Pancoska, Z. Moravek, and U. M. Moll. Rational design of DNA sequences for nanotechnology, microarrays and molecular computers using eulerian graphs. *Nucleic Acids Res.*, 32:4630 – 4645, 2004.
- [3] J. Chen and N. C. Seeman. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature*, 350:631 – 633, 1991.
- [4] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, and N. C. Seeman. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 394:539 – 544, 1998.
- [5] P. Sa-Ardyen, N. Jonoska, and N. C. Seeman. Self-assembly of irregular graphs whose edges are DNA helix axes. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:6648 – 6657, 2004.
- [6] P. J. Paukstelis, J. Nowakowski, J. J. Birktoft, and N. C. Seeman. Crystal structure of a continuous three-dimensional DNA lattice. *Chem. Biol.*, 11:1119 – 1126, 2004.
- [7] R. P. Goodman, R. M. Berry, and A. J. Turberfield. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron. *Chem. Commun.*, 12:1372 – 1373, 2004.
- [8] L. M. Adleman. Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *Science*, 266:1021 – 1024, 1994.
- [9] Y. Benenson, T. Par-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, and E. Shapiro. Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules. *Nature*, 414:430 – 434, 2001.
- [10] X. Su and L. M. Smith. Demonstration of a universal surface DNA computer. *Nucleic Acids Res.*, 32:3115 – 3123, 2004.
- [11] N. Jonoska. Trends in computing with DNA. *J. Comput. Sci & Technol.*, 19:98 – 113, 2004.
- [12] M. Artemyev, D. Kisiel, S. Abmiotko, M. N. Antipina, G. B. Khomutov, V. V. Kislov, and A. A. Rakhnyanskaya. Self-organized, highly luminescent CdSe nanorod-DNA complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:10594 – 10567, 2004.
- [13] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, and G. Ben-Yoseph. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature*, 391:775 – 778, 1998.
- [14] J. T. Petty, J. Zheng, N. V. Hud, and R. M. Dickson. DNA-templated Ag nanocluster formation. *J. Am Chem. Soc.*, 126:5207 – 5212, 2004.
- [15] C. F. Monson and A. T. Wooley. DNA-templated construction of copper nanowires. *Nano Lett.*, 3(3):359 – 363, 2003.

- [16] M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel, W. Pompe, and A. De Vita. DNA as a selective metallization template. *Nano Lett.*, 2:841 – 844, 2002.
- [17] J. Richter, M. Mertig, and W. Pompe. Construction of highly conductive nanowires on a DNA template. *Appl. Phys. Lett.*, 78:536 – 538, 2001.
- [18] W. U. Dittmer and F. C. Simmel. Chains of semiconductor nanoparticles templated on DNA. *Appl. Phys. Lett.*, 85:633 – 635, 2004.
- [19] G. Maubach, A. Csáki, D. Born, and W. Fritzsche. Controlled positioning of a DNA molecule in an electrode setup based on self-assembly and microstructuring. *Nanotechnology*, 14:546 – 550, 2003.
- [20] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel, and J. L. Neumann. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature*, 415:62 – 65, 2000.
- [21] Y. Chen, M. Wang, and C. Mao. An autonomous DNA nanomotor powered by a DNA enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:3554 – 3557, 2004.
- [22] J.-S. Shin and N. A. Pierce. Rewritable memory by controllable nanopatterning of DNA. *Nano Lett.*, 4:905 – 909, 2004.
- [23] Y. Tian and C. Mao. Molecular gears: A pair of DNA circles continuously rolls against each other. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:11410 – 11411, 2004.
- [24] W. U. Dittmer and F. C. Simmel. Transcriptional control of DNA-based nanomachines. *Nano Lett.*, 4:689 – 691, 2004.
- [25] P. Yin, H. Yan, X. G. Daniell, A. J. Turberfield, and J. H. Reif. A unidirectional DNA walker that moves autonomously along a track. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:4906 – 4911, 2004.
- [26] R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras, and D. J. Lockhart. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics Suppl.*, 21:20 – 24, 1999.
- [27] S. R. Nicewarner-Peña, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Peña, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, and M. J. Natan. Submicrometer metallic barcodes. *Science*, 294:137 – 141, 2001.
- [28] J. M. Köhler, A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, W. Straube, and W. Fritzsche. Selective labeling of oligonucleotide monolayers by metallic nanobeads for fast optical readout of DNA-chips. *Sensors and Actuators B*, 76:166 – 172, 2001.
- [29] R. Möller, A. Csáki, J. M. Köhler, and W. Fritzsche. Electrical classification of the concentration of bioconjugated metal colloids after surface adsorption and silver enhancement. *Langmuir*, 17:5426 – 5430, 2001.
- [30] T. Niazov, V. Pavlov, Y. Xiao, and I. Willner. DNAzyme-functionalized Au nanoparticles for the amplified detection of DNA or telomerase activity. *Nano Lett.*, 4:1683 – 1687, 2004.
- [31] K. Keren, R. S. Berman, E. Buchstab, U. Sivan, and E. Braun. DNA-templated carbon nanotube field-effect transistor. *Science*, 302:1380 – 1382, 2003.

- [32] K. A. Williams, P. T. M. Veenhuizen, B. G. de la Torre, R. Eritja, and C. Dekker. Nanotechnology - Carbon nanotubes with DNA recognition. *Nature*, 420:761, 2002.
- [33] E. Dujardin, L.-B. Hsin, C. R. C. Wang, and S. Mann. DNA-driven self-assembly of gold nanorods. *Chem. Commun.*, 14:1264 – 1265, 2001.
- [34] M. A. Abdalla, J. Bayer, J. O. Rädler, and K. Müllen. Synthesis and self-assembly of perylene-diimide oligonucleotide conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:3967 – 3970, 2004.
- [35] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382:607–609, 1996.
- [36] A.P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. G. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, and P. G. Schultz. Organization of nanocrystal molecules using DNA. *Nature*, 382:609 – 611, 1996.
- [37] S. Xiao, F. Liu, A. E. Rosen, J. F. Hainfeld, N. C. Seeman, K. Musier-Forsyth, and R. A. Kiehl. Self-assembly of metallic nanoparticle arrays by DNA scaffolding. *J. Nanoparticle Res.*, 4:313 – 317, 2002.
- [38] T. A. Taton, R. C. Mucic, and R. L. Letsinger. The DNA-mediated formation of supramolecular mono- and multilayered nanoparticle structures. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:6305 – 6306, 2000.
- [39] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, M. Noyong, and U. Simon. Bifunctional DNA-gold nanoparticle conjugates as building blocks for the self-assembly of cross-linked particle layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311:995 – 999, 2003.
- [40] B. D. Hames and S. J. Higgins. *Gene Probes 2: A Practical Approach*. Irlpress at Oxford University Press, **1995**.
- [41] J. Meinkoth and G. Wahl. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, 138:267 – 284, 1984.
- [42] J. G. Wetmur and N. Davidson. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.*, 31:349 – 370, 1968.
- [43] D. Cule and T. Hwa. Denaturation of heterogeneous DNA. *Phys. Rev. Lett.*, 79:2375 – 2378, 1997.
- [44] I. A. Shkel and Jr. M. T. Record. Effect of the number of nucleic acid oligomer charges on the salt dependence of stability (ΔG degrees(37)) and melting temperature (T-m): NLPB analysis of experimental data. *Biochemistry*, 43:7090 – 7101, 2004.
- [45] http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/fg19-17.jpg.
- [46] C. Bustamante, S. B. Smith, J. Liphardt, and D. Smith. Single-molecule studies of DNA mechanics. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 10:279 – 285, 2000.
- [47] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA - an extensible molecule. *Science*, 271:792 – 794, 1996.

- [48] S. B. Smith, Y. J. Cui, and C. Bustamante. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271:795 – 799, 1996.
- [49] D. Bensimon, A. J. Simon, V. Croquette, and A. Bensimon. Stretching DNA with a receding meniscus - experiments and models. *Phys. Rev. Lett.*, 74:4754 – 4757, 1995.
- [50] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nature Struct. Biol.*, 6:346 – 349, 1999.
- [51] M. Hegner, S. B. Smith, and C. Bustamante. Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:10109 – 10114, 1996.
- [52] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:11935 – 11940, 1997.
- [53] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, and C. Bustamante. Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6185 – 6190, 1997.
- [54] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.*, 72:795 – 794, 1997.
- [55] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules*, pages 5763 – 5765, 1997.
- [56] A. G. Kanaras, Z.X. Wang, A. D. Bates, R. Cosstick, and M. Brust. Towards multi-step nanostructure synthesis: Programmed enzymatic self-assembly of DNA/gold systems. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42(2):191 – 194, 2003.
- [57] A. Holleman and N. Wiberg. *Lehrbuch der anorganischen Chemie. 101. Auflage, Walter deGruyter Berlin*, 1995.
- [58] H.-D. Doerfler. *Grenzflächen- und Kolloidchemie. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim*, 1994.
- [59] R. Glaser. *Biophysik. 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena*, 1996.
- [60] K. Mansyreff. Neue Aspekte bei der Anwendung von Silberkolloiden in der SERS-Spektroskopie. *Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg*, 2002.
- [61] H. Schulze. Schwefelarsen in wässriger Lösung. *J. Prakt. Chemie*, 25:431– 452, 1882.
- [62] H. Schulze. Antimontrisulfid in wässriger Lösung. *J. Prakt. Chemie*, 27:320 – 332, 1883.
- [63] W. B. Hardy. On the mechanism of gelation in reversible colloidal systems. *Proc. Roy. Soc. London*, 66:95 – 109, 1900.
- [64] W. B. Hardy. A preliminary investigation of the conditions which determine the stability of irreversible hydrosols. *Proc. Roy. Soc. London*, 66:110 – 125, 1900.
- [65] H.-J. Butt, K. Graf, and M. Kappl. *Physics and Chemistry of Interfaces. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, 2003.
- [66] K.-H. Näser. *Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure. 18. Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig*, 1988.

- [67] E. J. W. Verwey, J. T. Overbeek, and K. Nes. *Theory of the stability of lyophobic colloids: the interaction of sol particles having an electric double layer*. Elsevier, New York, 1948.
- [68] B. Derjaguin. A theory of interaction of particles in presence of electric double layers and the stability of lyophobic colloids and disperse systems. *Acta Physicochim. URSS*, 10:333 – 346, 1939.
- [69] B. Derjaguin and L. D. Landau. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim. URSS*, 14:633 – 662, 1941.
- [70] T. Kalkbrenner. Charakterisierung und Manipulation der Plasmon-Resonanz eines einzelnen Gold-Nanopartikels. *Dissertation, Universität Konstanz*, 2002.
- [71] A. Kawabata. Electronic properties of fine metallic particles. III. ESR absorption line shape. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 29:902 – 904, 1970.
- [72] G. Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.*, 25:377 – 445, 1908.
- [73] R. G. Nuzzo and D. L. Allara. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 105:4481 – 4483, 1983.
- [74] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo. Formation of monolayer films by spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:321 – 335, 1989.
- [75] M. Hegner, P. Wagner, and G. Semenza. Immobilizing DNA on gold via thiol modification for atomic force microscopy imaging in buffer solutions. *FEBS Lett.*, 336:452 – 456, 1993.
- [76] O. Medalia, J. Englander, R. Gucenberger, and J. Sperling. AFM imaging in solution of protein-DNA complexes formed on DNA anchored to a gold surface. *Ultramicroscopy*, 90:103 – 112, 2002.
- [77] D. M. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L. J. Whiteman, and M. J. Tarlov. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(17):5219 – 5226, 2003.
- [78] M. Brust, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and C. J. Kiely. Novel gold-dithiol nanonetworks with non-metallic electronic properties. *Adv. Mater.*, 7:795, 1995.
- [79] R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:12674 – 12675, 1998.
- [80] G. R. Souza and J. H. Miller. Oligonucleotide detection using angle-dependent light scattering and fractal dimension analysis of gold-DNA aggregates. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:6734 – 6735, 2001.
- [81] R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, R. Elghanian, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff. Chemistry of oligonucleotide-gold nanoparticle conjugates. *Phosphorus Sulfur*, 146:359 – 362, 1999.
- [82] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probe. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:1959 – 1964, 1998.

- [83] S.-J. Park, A. A. Lazarides, J. J. Storhoff, L. Pesce, and C. A. Mirkin. The structural characterization of oligonucleotide-modified gold nanoparticle networks formed by DNA hybridization. *J. Phys. Chem. B*, 108:12375 – 12380, 2004.
- [84] T. M. Herne and M. J. Tarlov. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:8916 – 8920, 1997.
- [85] T. Aqua, R. Naaman, and S. S. Daube. Controlling the absorption and reactivity of DNA on gold. *Langmuir*, 19:10573 – 10580, 2003.
- [86] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, and M. J. Tarlov. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.*, 79:975 – 981, 2000.
- [87] S. A. Kazakov. *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*. Oxford University Press, New York, 1996.
- [88] R. Georgiadis, K. P. Peterlinz, and A. W. Peterson. Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid monolayer films using SPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3166 – 3173, 2000.
- [89] M. G. Bellino, E. J. Calvo, and G. Gordillo. Adsorption kinetics of charged thiols on gold nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6:424 – 428, 2004.
- [90] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. Sequence-dependent stability of DNA-modified gold nanoparticles. *Langmuir*, 18:6666 – 6670, 2002.
- [91] L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, and G. Viswanadham. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to thin films and nanoparticles. *Anal. Chem.*, 72:5535 – 5541, 2000.
- [92] P. Sandström, M. Boncheva, and B. Åkerman. Nonspecific and thiol-specific binding of DNA to gold nanoparticles. *Langmuir*, 19:7537 – 7543, 2003.
- [93] P. Sandström and B. Åkerman. Electrophoretic properties of DNA-modified colloidal gold nanoparticles. *Langmuir*, 20:4182 – 4186, 2004.
- [94] D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, and A. P. Alivisatos. Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. *Nano Lett.*, 1:32 – 35, 2001.
- [95] C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, and P. G. Schultz. DNA-based assembly of gold nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38:1808 – 1812, 1999.
- [96] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, and C. A. Mirkin. Selective colorimetric detections of polynucleotides based on the distance dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277:1078 – 1081, 1997.
- [97] J. Liu and Y. Lu. Colorimetric biosensors based on DNAzyme-assembled gold nanoparticles. *J. Fluorescence*, 14:343 – 354, 2004.
- [98] C.-H. Kiang. Phase transition of DNA-linked gold nanoparticles. *Physica A*, 321:164 – 169, 2003.

- [99] D. B. Lukatsky and D. Frenkel. Phase behavior and selectivity of DNA-linked nanoparticle assemblies. *Phys. Rev. Lett.*, 92:068302–1 – 068302–4, 2004.
- [100] R. Jin, G. Wu, Z. Li, C. A. Mirkin, and G. C. Schatz. What controls the melting properties of DNA-linked nanoparticle assemblies? *J. Am. Chem. Soc.*, 125:1643 – 1654, 2003.
- [101] M. S. Shchepinov, K. U. Mir, J. K. Elder, M. D. Frank-Kamenetskii, and E. M. Southern. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res.*, 27:3035 – 3041, 1999.
- [102] R. A. Reynolds, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. A gold nanoparticle/latex microsphere-based colorimetric oligonucleotide detection method. *Pure Appl. Chem.*, 72:229 – 235, 2000.
- [103] J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, and G. C. Schatz. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *J. Am. Chem. Soc.*, 122:4640 – 4650, 2000.
- [104] S. J. Park and D. Stroud. Theory of the optical properties of a DNA-modified gold nanoparticle system. *Physica B*, 338:353 – 356, 2003.
- [105] S. J. Park and D. Stroud. Theory of melting and the optical properties of gold/DNA nanocomposites. *Phys. Rev. B*, 67:212202–1 – 212202–4, 2003.
- [106] S. J. Park and D. Stroud. Structure formation, melting, and optical properties of gold/DNA nanocomposites: Effects of relaxation time. *Phys. Rev. B*, 68:224201–1 – 224201–11, 2003.
- [107] A. A. Lazarides and G. C. Schatz. DNA-linked metal nanosphere materials: structural basis for the optical properties. *J. Phys. Chem. B*, 104:460 – 467, 2000.
- [108] A. A. Lazarides and G. C. Schatz. DNA-linked metal nanosphere materials: Fourier-transform solutions for the optical response. *J. Chem. Phys.*, 112(6):2987 – 2993, 2000.
- [109] T. Okamoto and I. Yamaguchi. Optical absorption study of the surface plasmon resonance in gold nanoparticles immobilized onto gold substrates by self-assembly technique. *J. Phys. Chem. B*, 107:10321 – 10324, 2003.
- [110] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, and P. Hazarika. Oligofunctional DNA-gold nanoparticle conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42:5766 – 5770, 2003.
- [111] T. A. Taton, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 289:1757 – 1760, 2000.
- [112] J. J. Storhoff, A. D. Lucas, V. Garimella, Y. P. Bao, and U. R. Müller. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nature Biotechnol.*, 22:883 – 887, 2004.
- [113] D. A. Schultz. Plasmon resonant particles for biological detection. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14:13 – 22, 2003.
- [114] M. Li and S. Mann. DNA-directed assembly of multifunctional nanoparticle networks using metallic bioinorganic building blocks. *J. Mater. Chem.*, 14:2260 – 2263, 2004.

- [115] S.-J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, P. W. Brazis, C. R. Kannewurf, and R. L. Letsinger. The electrical properties of gold nanoparticle assemblies linked by DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39:3845 – 3848, 2000.
- [116] J. S. Hwang, S. W. Hwang, and D. Ahn. Electrical conduction measurement of thiol modified DNA molecules. *Superlattices and Microstructures*, 34:433 – 438, 2003.
- [117] T. A. Taton. *In: Current Protocols in Nucleic Acid*. John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [118] P. Miclea. Formation and characterization of metal nanoparticle coatings on oxide nanospheres. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*, 2002.
- [119] P. Hazarika, B. Ceyhan, and C. M. Niemeyer. Reversible switching of DNA-gold nanoparticle aggregation. *Angew. Chem.*, 116:6631 – 6633, 2004.
- [120] M. Gonzáles, L. A. Bagatolli, I. Echabes, J. L. R. Arrondo, C. E. Argaraña, C. R. Cantor, and G. D. Fidelio. Interaction of biotin with streptavidin: Thermostability and conformational changes upon binding. *J. Biol. Chem.*, 272:11288 – 11295, 1997.
- [121] N. C. Seeman. Biochemistry and structural DNA nanotechnology: An evolving symbiotic relationship. *Biochem.*, 42:7259 – 7269, 2003.

Veröffentlichungen

H. Zimmermann, I. Westphal, U. Rehn, G. Fuhr. Investigation of cell traces using an atomic force/ interference reflection microscope. *Europ. Biophys. J.* **29** 315 (2000).

H. Zimmermann, E. Richter, C. Reichle, I. Westphal, P. Geggier, U. Rehn, S. Rogaschewski, W. Bleiß, G. R. Fuhr. Mammalian cell traces - Morphology, molecular composition, artificial guidance and biotechnological relevance as a new type of „bionanotube”. *Appl. Phys. A.* **73**, 11 - 26 (2001).

U. Rehn und G. Fuhr Investigation of the formation and alteration of branched cell traces using interference reflection microscope. International Conference: Cell Migration in Development and Disease, Berlin (2001).

U. Rehn, P. Göring, K. Nielsch, R. B. Wehrspohn, U. Gösele Potential applications of porous materials in cell biology. 273. WE-Heraeus-Seminar „Micro to Macromechanics of Hierarchical Living Materials and Technical Structures”, Bad Honnef (2002). Poster

U. Rehn, P. Göring, K. Nielsch, S. Matthias, R. B. Wehrspohn, U. Gösele Ordered porous templates and replicas in biotechnology. 293. WE-Heraeus-Seminar „NanoBionics II from Molecule to Application”, Marburg(2002). Poster

U. Rehn, P. Göring, K. Nielsch, S. Matthias, R. B. Wehrspohn, U. Gösele Ordered porous templates and replicas in biotechnology. Materials Research Society Fall Meeting, Boston, USA (2002). Poster

U. Rehn, R. B. Wehrspohn, U. Gösele DNA-mediated assembly of metal nanoparticles: Hybridization step and optical properties. International Symposium: Bioconjugated Nanoparticles in Molecular Diagnostics and Therapy, Jena (2003). Poster

J. Hohlbein, U. Rehn, R. B. Wehrspohn In-situ optical characterisation of porous alumina. *Phys. Stat. Sol. (a)* **201**, 806 - 810 (2004).

U. Rehn Optical properties of DNA-conjugated gold nanoparticles. Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz. (2004). Vortrag

U. Rehn, R. B. Wehrspohn, U. Gösele Optical properties of DNA-conjugated gold nanoparticles under different electrostatic conditions. 320. WE-Heraeus-Seminar „Nano-Physics of DNA”, Bad Honnef. (2004). Poster

U. Rehn, R. B. Wehrspohn, U. Gösele DNA-linked metal nanoparticles: Electrostatic interactions and optical properties. 7th International Conference on Nanostructured Materials, Wiesbaden (2004). Vortrag

U. Rehn, R. B. Wehrspohn, U. Gösele DNA-mediated assembly of gold nanoparticles influenced by cations. In: Proc. Fourth IEEE Conference on Nanotechnology, WE-P 24, Piscataway, USA (2004).

U. Rehn DNA-linked gold nanoparticles: Towards new hybrid materials. International Workshop Nanoscale Structure and Dynamics, Lutherstadt Wittenberg (2004). Vortrag (eingeladen)

Danksagung

Auf die vergangenen drei Jahre am Institut und in Halle/Saale sehe ich sehr gern zurück. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die diese Zeit bisher durch ihre Unterstützung, Hilfe, wohlwollende Begleitung und Freundschaft angenehm werden ließ.

Die Gelegenheit, etwas Neues aufbauen zu können ist selten und war für mich eine Herausforderung. Deshalb gilt mein sehr herzlicher Dank Herrn PROF. DR. ULRICH GÖSELE, der diese Doktorarbeit ermöglichte und mir mit großem Vertrauensvorschuß angenehm viel Entscheidungsraum und Entwicklungsmöglichkeiten ließ. Seine dezente, aber nachdrückliche Art den Dingen ihre Richtung zu geben, hat sehr wesentlich zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen. Herrn PROF. DR. RALF WEHRSPHOHN danke ich für seinen nahezu unerschütterlichen Optimismus, die gute Einarbeitung und seinen Enthusiasmus, der meine Arbeit insbesondere bis zu seinem Wechsel an die Universität Paderborn begleitete. Herrn PROF. DR. CHRISTIAN HÜBNER danke ich für die Übernahme der Betreuung an der Martin-Luther-Universität Halle, sein stets offenes Ohr und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Ein besonderer Dank geht an die Arbeitsgruppe um Herrn DR. WOLFGANG FRITZSCHE am IPHT Jena, die wertvolle „Starthilfe“ leistete und als kritischer Diskussionspartner meiner Ergebnisse wichtige Impulse gab. Herrn DR. MAXIMILIAN KREITER vom MPI für Polymerforschung in Mainz danke ich für sein freundliches Entgegenkommen und die intensive Diskussion zur Interpretation der Extinktions-Spektren. Als geduldigen Diskussionspartner zu allen Fragen optischer Eigenschaften der Goldpartikel sowie der Berechnung der Extinktions-Spektren danke ich herzlich Herrn DR. PAUL-TIBERIU MICLEA, Universität Paderborn. Für die transmissionselektronischen Aufnahmen möchte ich mich bei Frau DR. PETRA GÖRING und meinem Mitdoktoranden FRANZ REISCHER bedanken. Für die Herstellung verschiedener Nanostrukturen bedanke ich mich herzlich bei Frau DR. PETRA GÖRING, Herrn DR. MARTIN STEINHART, Herrn DR. KORNELIUS NIELSCH sowie bei meinen Mitdoktoranden FLORIAN KOLB, LUISE SCHUBERT und SVEN MATTHIAS. Ein zügiges Weiterarbeiten und Auswerten der TEM-Aufnahmen wurde durch den hervorragenden Service von Frau ELISABETH PÄTZOLD und Herrn MATTHIAS SCHIFFNER ermöglicht. Ebenso möchte ich mich für die stets freundliche und prompte Unterstützung von Herrn DR. HELLMUT HÖCHE bedanken, der selbst „altertümliche“ Literatur zu finden und zu beschaffen wußte. Großes Lob auch an die HERREN DER HAUSTECHNIK, die quasi aus dem Nichts einen Laborarbeitsplatz bauten. Für die Unterstützung insbesondere in der letzten Phase dieser Arbeit sei Herrn PROF. DR. RALF WEHRSPHOHN, Herrn DR. MARTIN STEINHART, ebenso wie Herrn DR. GUIDO SAUER und JOHANNES HOHLBEIN gedankt. In Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung und hier insbesondere Frau DR. CORDELIA SCHIENE-FISCHER, wurde in der Anfangsphase als weiteres Themenfeld die Proteinfaltung in porösen Materialien entwickelt. Die Studienjahresarbeit von JOHANNES HOHLBEIN zu betreuen hat mir viel Spaß gemacht, und es ist umso erfreulicher, daß sich dieses Projekt inzwischen über die Diplomarbeit hinaus entwickelt hat. Für die entspannte Arbeitsatmosphäre im Büro danke ich DANILO ZSCHECH, LILI ZHAO und JOHANNES HOHLBEIN, wobei letzterer, ebenso wie FRANZ REISCHER, in Zeiten meiner Abwesenheit meine Pflanzen nicht vertrocknen ließ. Meinen Mitdoktoranden CARSTEN TIEG, FLORIAN KOLB und TORSTEN GEPPERT sei für manch' geselligen Abend gedankt. Last but not least möchte ich den Mitarbeitern des Institutes für die herzliche und offene Atmosphäre danken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Ulrike Rehn

Halle/Saale, im Dezember 2004

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Ulrike Karin Rehn
Geburtsdatum 02. November 1975
Geburtsort Dresden

SCHULAUSBILDUNG

1982 - 1994 Polytechnische Oberschule, Leistungsklasse und
Gymnasium in Dresden

BERUFSTÄTIGKEIT

Okt. 1994 - Okt. 1995 Besucherservice Sächsische Staatsoper Dresden
sowie naturwissenschaftlich orientierte Praktika

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Apr. 1995 - Sept. 1995 Magisterstudium Erziehungswissenschaften,
Soziologie und Philosophie
Technische Universität Dresden

Okt. 1995 - Apr. 2001 Diplomstudium Biophysik
Humboldt-Universität zu Berlin

ab Dez. 2001 Promotionsstudium am Max-Planck-Institut für
Mikrostrukturphysik Halle/Saale