Adhäsion und Reibung einzelner DNA-Moleküle

Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Universität des Saarlandes

eingereicht von

Kordula Schellnhuber

geboren am 04.10.1990 in Ingolstadt

Saarbrücken, 2024

Tag des Kolloquiums:	07.01.2025
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre
Berichterstatter:	Prof. Dr. Roland Bennewitz
	Prof. Dr. Christian Wagner
Vorsitz:	Prof. Dr. Albrecht Ott
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. Haibin Gao

Inhaltsverzeichnis

1 Abstract Version Deutsch **1**

2 Abstract Version Englisch **2**

3 Einleitung **3**

4 Stand der Forschung **9**
4.1 DNA-Aufbau und Verwendung 9
4.1.1 DNA-Struktur 9
4.1.2 DNA-Origami und Nano Switch 13
4.1.3 Nicks und Overstretching 18
4.2 Single-Polymer-Friction 22
4.2.1 Reibungsverhalten von einzelnen Polymersträngen an fest-flüssigen Grenzflächen 23
4.2.2 Kraftspektroskopie einzelner in ein Polymergel eingearbeiteter Polymere 27
4.2.3 Superschmierfähigkeit von Graphenbändern auf Goldoberflächen 29
4.2.4 Kraftspektroskopie einzelner DNA-Oligomere auf Graphit . . 31
4.2.5 Interaktionen von DNA-Strängen mit nanoporösen Proteinkristallen 34
4.3 Polymermodelle 36
4.3.1 WLC-Modell 36
4.3.2 Persistenzlänge (Bisherige Studien) 38
4.3.3 Bindungsrate und Gyrationsradius 40
4.4 Verwendete Bindungstypen 41
4.4.1 Digoxigenin-Antidigoxigenin 41
4.4.2 Biotin-Streptavidin 44

5 Materialien und Methoden **47**
5.1 Hybridisierung der DNA M13mp18 47
5.2 Funktionalisierung des Cantilevers 52
5.3 Verwendete Oberflächen 53
5.3.1 Cellulosenitrat 53
5.3.2 Selbstorganisation-Blockpolymere 56
5.3.3 Poly-L-Lysin 56
5.4 Funktionalisierung der Cellulosenitratoberfläche 60
5.5 Herstellung der porösen Membranoberfläche 63

5.6 Herstellung der Poly-L-Lysinflächen 65
5.7 Rasterkraftmikroskop 66
5.7.1 Kontaktmodus 68
5.7.2 Intermittierender Modus 68
5.7.3 Kraftspektroskopie 69
5.8 Versuchsdurchführung 70
5.8.1 Topographiemessungen 70
5.8.2 Adhäsionsmessungen 72
5.8.3 Reibungsmessungen 74
5.8.4 Kalibrierung und Datenauswertung 76
5.9 Flowcell 77

6 Ergebnisse und Diskussion **81**
6.1 Topographiemessungen 81
6.1.1 DNA-Abbildungen 81
6.1.2 Abbildung der Cellulosenitratoberflächen 84
6.1.3 Abbildung der porösen Membran 88
6.1.4 Abbildung der Poly-L-Lysinoberfläche 95
6.2 Adhäsionsmessungen 96
6.2.1 Adhäsionsmessungen auf Cellulosenitratoberflächen 96
6.2.2 Adhäsionsmessungen auf poröser Membran 111
6.2.3 Vergleich der beiden Oberflächen 134
6.3 Messungen mit der Flowcell 135
6.4 Reibungsmessungen 137
6.4.1 Reibungsmessungen auf Cellulosenitratoberflächen 137
6.4.2 Reibungsmessungen auf poröser Membran 145
6.4.3 Reibungsmessungen auf Poly-L-Lysin 167
6.4.4 Vergleich der Oberflächen 171

7 Fazit und Ausblick **173**

Abbildungsverzeichnis **175**

Literaturverzeichnis **193**

1 Abstract Version Deutsch

Das Verständnis und die Kontrolle der Dynamik von Polymer-Oberflächen-Wechselwirkungen sind die Voraussetzung für das Design von Nanoobjekten und für das Verständnis biologischer Prozesse. Wir untersuchen dynamische Reibung und Adhäsion an einer Fest-Flüssig-Grenzfläche mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM). Als Modellsystem wird ein einzelnes M13mp18-DNA-Molekül, mit einer Länge von $2.5\mu m$, mittels Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung über einen Bead an einen Cantilever gebunden. Bei den Adhäsionsmessungen wird der Cantilever mehrfach gen Oberfläche gefahren, wobei er teilweise mehrere hundert Nanometer darüber verweilt, um eine Interaktion zwischen dem Bead und der Oberfläche zu vermeiden.

Die Reibungsmessungen werden durchgeführt, indem der Cantilever seitlich parallel zur Oberfläche in einer Höhe von mehreren hundert Nanometern mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten bewegt wird. Dies führt zur adhäsiven Wechselwirkung zwischen dem DNA-Molekül an verschiedenen Oberflächen und somit zu einer Verbiegung des Cantilevers. Die verwendeten Oberflächen sind eine mit Cellulosenitrat und Anti-Digoxigenin beschichtete Glasoberfläche, eine positiv geladene poröse Membran und eine mit Poly-L-Lysin beschichteter Glasoberfläche.

Das Signal wird unter Berücksichtigung der Abrisskraft, Abrissposition und Frequenz sowie auf mögliche Hotspots bei den Reibungsmessungen analysiert, um typische Wechselwirkungen der DNA mit verschiedenen Oberflächen aufzudecken.

2 Abstract Version Englisch

Understanding and controlling the dynamics of polymer-surface interactions are key to design nanoscale objects and to understand biological processes. We study dynamic friction and adhesion at the solid-liquid interface by means of atomic force microscopy (AFM) with focus on entanglement dynamics. As a model system, a single M13mp18 DNA-molecule with a length of 2.5 µm is attached via a bead to a cantilever using biotin-streptavidin interaction.

Adhesion measurements are performed by approaching and retracting from the surface several times. Partially stopping several hundred nanometers over the surface to avoid the interaction between the bead and the surface. Friction measurements are performed by driving the cantilever laterally in parallel to the surface at a height of several hundred nanometers with different tip velocities. During sliding, the adhesive interaction between the DNA molecule on the AFM tip and different surfaces causes a bending of the cantilever. The used surfaces are a glass surface coated with Nitrocellulose and Anti-Digoxigenin, a positively charged porous membrane and a glass slide coated with Poly-L-Lysine.

The signal will be analysed in consideration of the detachment force, position and frequency and possible hotspots for the friction measurements to reveal typical interactions of DNA with different surfaces.

3 Einleitung

Bereits in frühen Kindertagen führen wir Adhäsionsmessungen und Reibungsmessungen mit verschiedenen Materialien durch. Wir sammeln zahlreiche Sticker in Alben und an Laternenmasten. Danach stellen wir fest, dass diese an unterschiedlichen Oberflächen unterschiedlich gut haften. Wir stellen fest, dass deren Klebekraft nach längerer Zeit und nach mehrmaligen Messungen nachlassen und beschäftigen uns mit anderen wichtigen Fragen. Tut es mehr weh, wenn man das Pflaster schnell oder langsam abzieht. Ebenfalls ein absoluter Klassiker bei den Probematerialien ist Kaugummi. Dessen Adhäsionskraft wurde an jedem zur Verfügung stehenden Material bei Zimmertemperaturbedingungen und draußen getestet.

Auch an Reibungsmessungen gibt es einige. So gleiten wir, manchmal auch grazil, mit Metallproben übers Eis und stellen fest, dass ein nasser Boden im Schwimmbad die Reibungskraft zwischen unseren Füßen und den Fließen deutlich verringert. Auch Experimente mit Bananenschalen werden oft durchgeführt. Deren Nachahmung schaffte es sogar in Computerspiele.

Doch mit der Zeit werden die Kinder zu Wissenschaftlern mit einer staatlichen oder firmengebundenen Förderung. Die Geräte, mit denen die Experimente durchgeführt werden, werden komplexer und teurer. Der Aufbau besser dokumentiert, doch der Anreiz bleibt der gleiche. Wie unterscheiden sich die verschiedenen Oberflächen und wie verhält sich die Abrisskraft des Materials der Wahl. 2014 beschrieben Formenti et al. wie sich technische und materielle Verbesserungen, so wie ein grundsätzliche besseres Verständnis von Reibungsprozessen auf Eis, auf die Schnelligkeit beim Schlittschuhlaufen auswirken. [1] 1995 befassten sich Munkgaard et al. mit der Adhäsion von Kaugummi auf diversen Zahnersatzmaterialien. [2]

Reibung und Adhäsion entstehen meistens über die Ausbildung von mehreren Bindungen. Sollte sich eine Bindung lösen kann diese noch einmal hergestellt werden, sofern die Probe noch über andere Stellen an der Oberfläche gebunden ist. Dies gilt bis die letzte Bindung aufgelöst wurde. Auf Grund dessen sind auch einzelne Bindungsstränge von Bedeutung. Interessant für die Entstehung von Adhäsion einzelner Moleküle ist die Arbeit von Jeppesen et al. [3] Diese untersuchten die Entstehung von Bindungen unter anderem in Abhängigkeit von der Polymerlänge und der zu überwindenden Distanz. Auf der einen Seite waren mit Biotin funktionalisierte Polymere angebunden und auf der anderen Seite die komplementären Streptavidinrezeptoren. Jeppesen et al. gingen dabei davon aus, dass es vor allem auf drei Faktoren ankommt: die Bindungsenergie der Biotin-Streptavidinbindung,

die Größe und Struktur des Verbindungselements und die Länge des Polymerstrangs.

In dieser Arbeit wird die Interaktion von einzelnen DNA-Strängen mit verschiedenen Oberflächen gemessen. Hierbei handelt es sich um $2.5\mu m$ lange M13mp18-DNA-Stränge, die über einen Bead mit einem Durchmesser von $1.0\mu m$ am Cantilever befestigt sind. Der Bead ist mit Streptavidin beschichtet und der Cantilever und die DNA mit Biotin beschichtet beziehungsweise funktionalisiert. Dabei handelt es sich um eine sehr starke Verbindung, die garantiert, dass sich die DNA bei den Messungen nicht vom Cantilever löst und die Abrissmomente nur ein Ablösen der DNA von der Oberfläche indizieren.

Bei den Oberflächen handelte es sich um eine mit Cellulosenitrat beschichtete Glasoberfläche, eine poröse Membran und eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Oberfläche. Auf den Oberflächen wurden sowohl Adhäsions- als auch Reibungsmessungen aufgenommen.

Ein Schema mit einer zugehörigen Beispielkurve auf poröser Membran findet sich in Abbildung 1. Der Cantilever wird ein erstes Mal auf die Probenoberfläche gefahren, um die Cantileverhöhe zu bestimmen (hellblau). Danach wird der Cantilever erneut nach oben gefahren und die DNA wird von der Oberfläche gelöst (orange). Dass der Cantilever wirklich in Kontakt mit der Oberfläche war erkennt man an dem starken Kräfteanstieg von $600pN$ in der Annäherungskurve und dem starken Kräfteabfall zu Beginn der Ablösekurve. Danach wird der Cantilever erneut auf die Porbenoberfläche gefahren, hält dieses Mal jedoch mehrere nm über der Oberfläche an (dunkelblau). Dies soll dazu dienen, dass nur die DNA mit der Oberfläche interagiert und nicht der Bead, über den die DNA an den Cantilever angebunden ist. Danach verweilt der Cantilever eine vorgegebene Zeit über der Oberfläche, um der DNA Zeit zu geben an der Oberfläche anzudocken (gelb). Danach fährt der Cantilever erneut nach oben. Diesmal löst sich lediglich die DNA von der Oberfläche und nicht der Bead (dunkelrot). Dies erkennt man der Kraftkurve auch daran, dass der anfängliche Adhäsionspeak fehlt.

Bei den Reibungsmessungen wird der DNA-Strang lateral in einer konstanten Höhe parallel zur Oberfläche gefahren.(Abbildung 2) Der Abstand zur Oberfläche verhindert eine Interaktion zwischen Oberfläche und Bead. Durch die Bewegung lateral zur Oberfläche wird der Cantilever sowohl vertikal, als auch lateral ausgelenkt. Der Cantilever fährt dabei in beide Richtungen hin und her. Zur besseren Erläuterung der Messungen ist eine Beispielkraftkurve abgebildet. In diesem Fall ist lediglich die vertikale Auslenkung dargestellt. Der Hinweg ist blau eingefärbt und wird als Trace bezeichnet. Der Rückweg ist rot eingefärbt und als Retrace markiert. In dieser Beispielkurve sieht man im Hinweg zwei Kraftausschläge und im Signal beim Rückweg einen Kraftausschlag. Dies deutet auf zwei Interaktionen währen dem Hinweg und eine Interaktion während dem Rückweg hin.

Die Messungen werden im Folgenden in Bezug auf Abrisskräfte, Abrisslängen und Abrissverteilung analysiert und verschiedene Oberflächen miteinander verglichen.

Kapitel 1 und 2 beinhalten eine kurze Zusammenfassung dieser Arbeit. Jeweils einmal auf deutsch und einmal auf englisch. Kapitel 3 beinhaltet die Einleitung, die Sie gerade lesen.

In Kapitel 4 wird der bisherige Stand der Forschung beschrieben. Dabei wird zuerst auf den Aufbau von DNA beziehungsweise deren Verwendung in DNA-Origami oder Zugversuchen eingegangen. Des Weiteren werden verschiedene Experimente beschrieben aus denen sich Bezüge zu unseren Messungen ableiten lassen. So zum Beispiel das Ausfädeln einzelner Polymerstränge aus Gelen oder dem Reibungsverhalten von Polymersträngen auf fest-flüssigen Grenzflächen. Außerdem wird auf die Polymermodelle eingegangen mit denen die bisherigen Messungen analysiert werden. Zu guter Letzt werden die verwendeten Stoffe und Bindungstypen vorgestellt, die zum Beispiel dazu verwendet wurden die DNA am Cantilever zu befestigen oder mit anderen Oberflächen interagieren zu lassen.

Das Kapitel 5 beinhaltet den Materialen und Methodenteil. Dort findet sich ein ausführliches Protokoll zur Vorbereitung der DNA, der Probenoberflächen und des Cantilevers. Des Weiteren schildert es die Funktionsweise des verwendeten Rasterkraftmikroskops und die verschiedenen verwendeten Modi. Im allerletzten Unterkapitel wird auf die Versuchsdurchführung der einzelnen Experimente eingegangen. Dies umfasst die Topographiemessungen auf den einzelnen Probenoberflächen, die Adhäsionsmessungen und die Reibungsmessungen, so wie die dazugehörige Kalibrierung der Kräfte.

Kapitel 6 beschreibt die Auswertung der Daten, welche während den Messungen aufgenommen wurden. Außerdem gibt es zu jedem Unterkapitel einen entsprechenden Diskussionsteil.

In Kapitel 7 wird ein Fazit für die bisherigen Messungen gegeben und ein Ausblick für mögliche weitere Versuche. Des Weiteren wird auf Verbesserungsvorschläge für spätere Messungen eingegangen.

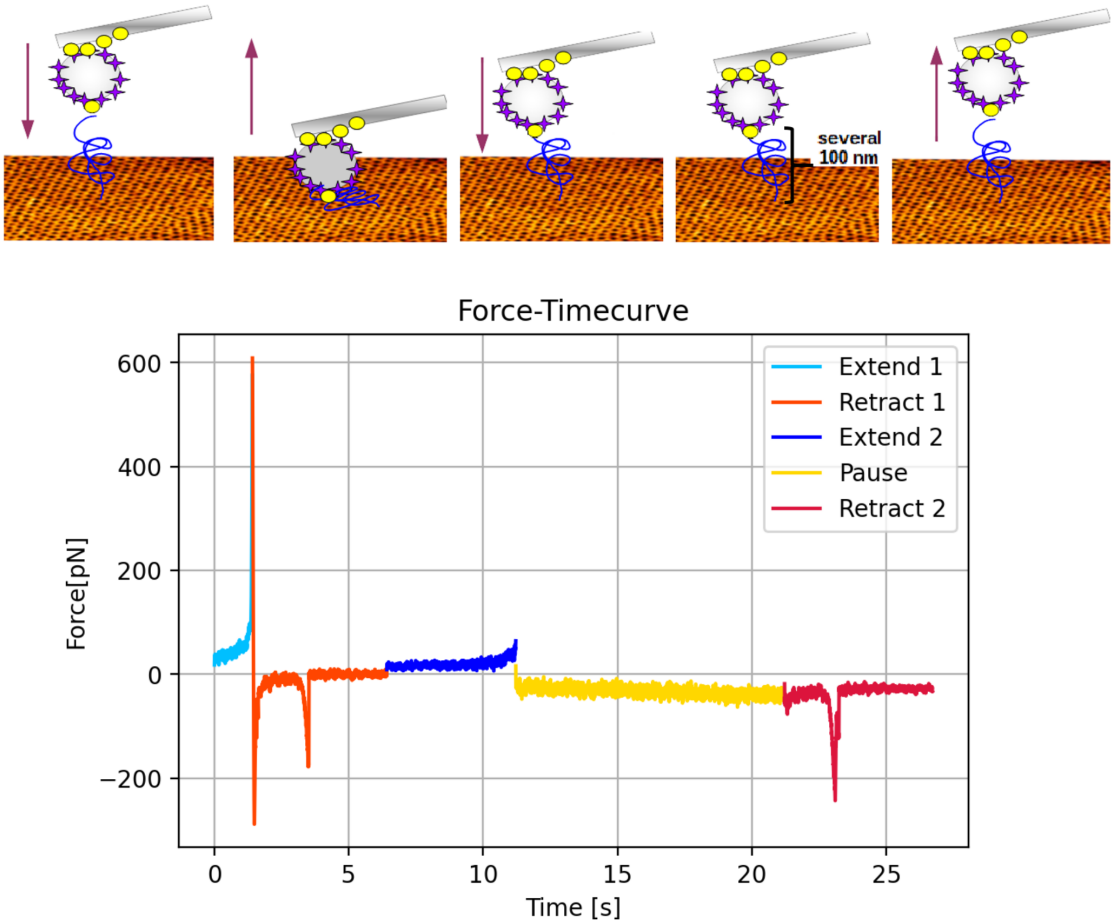


Abb. 1: Schema für den Versuchsaufbau der Adhäsionsmessungen auf poröser Membran und einer dazugehörigen Beispielkurve. Zur Bestimmung der Distanz zwischen Oberfläche und DNA wird der Cantilever ein erstes Mal auf die Probe gefahren und dann wieder nach oben. Danach wird er ein zweites Mal richtung Probe gefahren, wobei er dieses Mal mehrere 100 nm über der Probe anhält, sodass nur die DNA mit der Oberfläche interagiert und nicht der Bead. Nach dem Abwarten einer vorher vorgegebenen Pause fährt der Cantilever erneut nach oben und die DNA reißt von der Oberfläche ab.

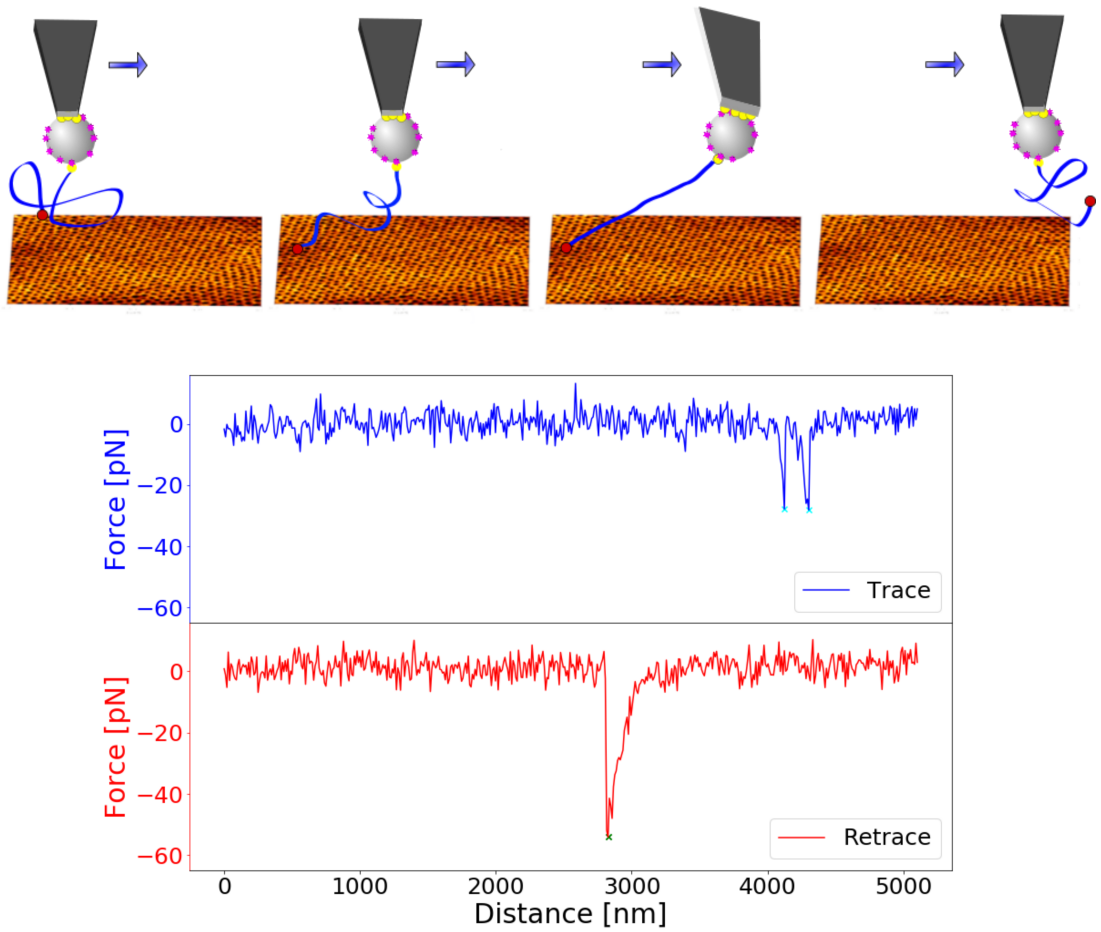


Abb. 2: Schema für den Versuchsaufbau für Reibungsmessungen. Dabei fährt der Cantilever lateral parallel in einer konstanten Höhe über die Oberfläche. Der DNA-Strang wird gespannt und reißt ab, was eine Auslenkung des Cantilevers in vertikale Richtung bedeutet. Danach fährt er die gleiche Stelle wieder zurück. Zusätzlich ist ein Beispiel für eine typische Kraftkurve abgebildet. Der Hinweg ist blau und der Rückweg rot dargestellt. In dieser sind während des Hinwegs zwei Abrissmomente und während des Rückwegs ein Abrissmoment erkennbar. [4]

4 Stand der Forschung

Im folgenden Kapitel wird der bisherige Stand der Forschung vorgestellt. Zunächst wird auf den DNA-Aufbau und dessen Verwendung in bisherigen Experimenten eingegangen. Danach werden verschiedene Experimente beschrieben, in denen bereits Reibungskräfte von Polymersträngen in verschiedenen Versuchsaufbauten beschrieben wurden. Außerdem wird auf Polymermodelle eingegangen und die verwendeten Oberflächen und Bindungstypen werden vorgestellt.

4.1 DNA-Aufbau und Verwendung

In dieser Arbeit wird die DNA als Material verwendet und nicht als biologisches System. Der Fokus liegt deshalb nicht auf den genetischen Eigenschaften sondern auf den mechanischen. In dem folgenden Unterkapitel wird deshalb zunächst auf die DNA-Struktur eingegangen sowie deren Verwendung in der Forschung wie zum Beispiel DNA-Origami. Außerdem werden Spezialfälle wie Overstretching und die Bildung von Nicks vorgestellt. Diese Fälle sind sehr wichtig, da die in diesem Experiment verwendete DNA Nicks besitzt und in einigen Experimenten Overstretching gezeigt hat.

4.1.1 DNA-Struktur

Deoxyribonucleic acid oder auch kurz DNA wird oft als Baustein des Lebens bezeichnet. Sie wurde 1943 das erste Mal von Oswald Avery aufgenommen. Jener bewies später, dass die Weitergabe von Informationen des Erbgutes bei Bakterien durch die DNA erfolgt. [5] [6] [7] Davor nahm man an, dass das durch Proteine geschieht. Es handelt sich bei der DNA um eine Doppelhelix, die aus zwei einzelnen ssDNA-Strängen besteht. Das Rückgrat der Leiterstränge besteht aus Phosphatdesoxyribose. Dabei handelt es sich um einen Zucker, der einen fünfseitigen Ring mit 4 Kohlenstoffatomen und einem Sauerstoffatom beinhaltet. Die Zuckerbausteine werden durch dreifach negativ geladene Phosphatreste durch eine Estergruppe miteinander verbunden. Dadurch entsteht eine generell leicht negative Ladung der DNA, welche für die späteren Messungen noch wichtig wird. Die Phosphordiesterbrücken zwischen den Desoxyribosenucleotiden sind richtungsorientiert. Das bedeutet, dass sie sich immer zwischen dem C3'-Atom von einem Zuckerring mit dem C5'-Atom eines anderen Zuckerrings verbinden. Daraus folgt, dass die einzelnen Stränge immer zwei verschiedene Enden besitzen. Eines mit einem C3'-Atom und eines mit einem C5'-Atom. Dies spielt bei der Funktionalisierung von DNA eine wichtige Rolle. Des

Weiteren verlaufen die beiden Leiterstränge antiparallel. Das bedeutet, dass der Strang auf der einen Seite von 3' nach 5' läuft und auf der anderen Seite von 5' nach 3'.

Verbunden werden die beiden Leiterstränge durch die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin. Zwei der Basenpaare sind hierbei jeweils komplementär zueinander: Adenin und Thymin beziehungweise Guanin und Cytosin. Alle vier Basen gehören zu den Heterocyclen. Dies bedeutet, dass ihre Ringe nicht nur aus Kohlenstoff bestehen. Bei allen Basen handelt es sich hierbei um zwei Stickstoffatome pro Ring. Bei Adenin und Guanin handelt es sich zudem um Purine. Das bedeutet, dass sie aus insgesamt zwei Kohlenstoffringen bestehen. Thymin und Cytosin sind Pyrimidine, die aus lediglich einem Kohlenstoffring bestehen. Die Verbindung der komplementären Basenpaare miteinander erfolgt über Wasserstoffbrücken. Adenin und Thymin bilden jeweils zwei Wasserstoffbrücken zueinender aus. Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken. Die Basenpaare werden stets mit dem C1'-Atom gekoppelt. (Abbildung 3)

Die beiden Stränge sind schraubenförmig in einander verdreht und bilden eine Spirale, die jeweils aus ungefähr 10 Leitersprossen, also 10 Basenpaaren pro Wendelgang, besteht. Ein Wendelgang hat eine ungefähre Länge von 3,4 nm und einen Durchmesser von 2,37 nm. Die DNA wickelt sich um Nucleosome mit einem Durchmesser von 10 nm. Diese Nucleosome bilden ein Knäuel von einer Dicke von bis zu drei umwickelten Nucleosomen. Dieses Konstrukt bezeichnet man als DNA-Super-Superhelix.(Abbildung 4)

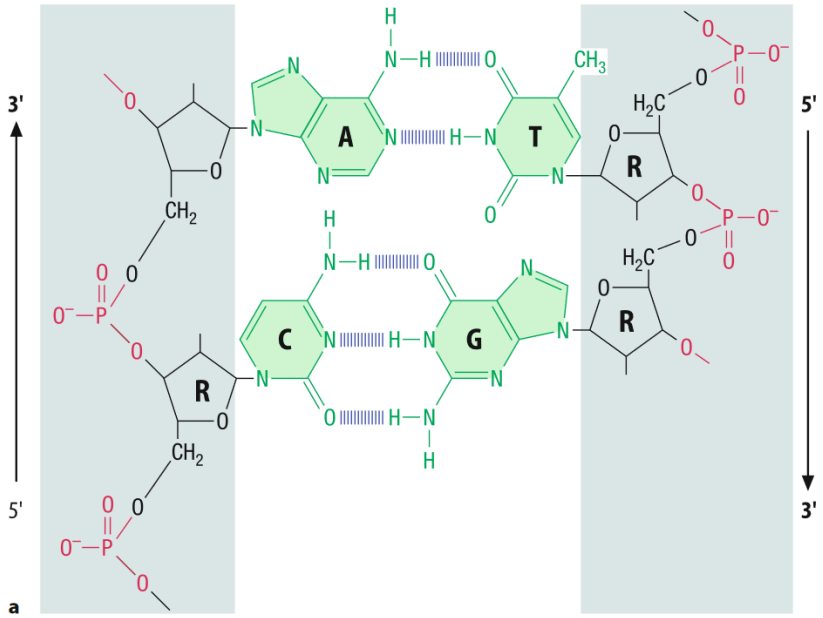


Abb. 3: Schema zur Strukturformel der DNA-Doppelhelix. Es gibt zwei komplementäre Basenpaare, die aus Adenin und Thymin beziehungsweise aus Guanin und Cytosin bestehen. Diese sind über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Das Außengerüst besteht aus Zucker beziehungsweise negativ geladenen Phosphatresten. [6]

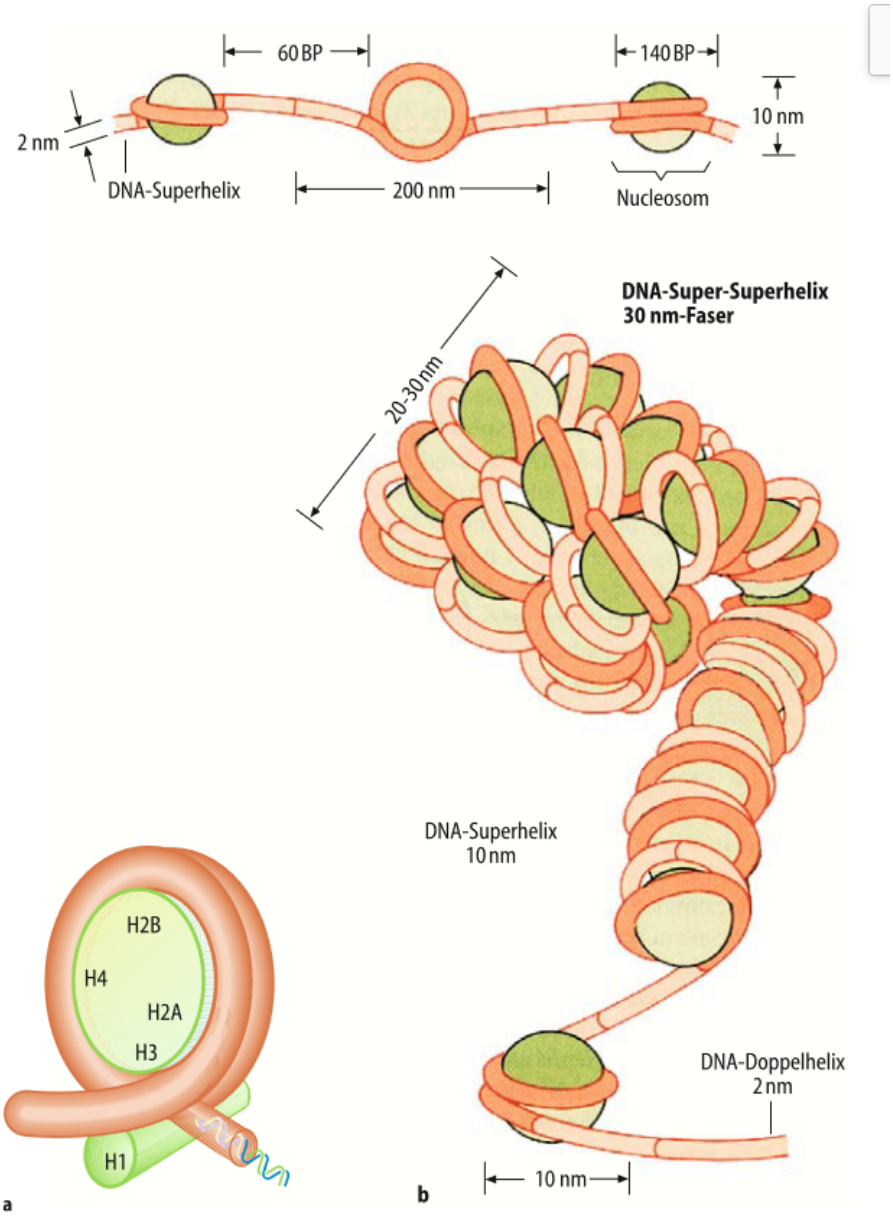


Abb. 4: Zu sehen ist, wie sich eine DNA-Doppelhelix um einzelne Nucleosomen wickelt und diese zusammen ein größeres Knäuel mit einem Durchmesser von um die 20-30 nm formen. Der Durchmesser von den einzelnen Nucleosomen beträgt um die 10 nm, der Durchmesser des DNA-Strangs 2 nm. [6]

4.1.2 DNA-Origami und Nano Switch

Nachdem die Struktur von DNA-Strängen beschrieben wurde, wird in diesem Unterkapitel auf die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten von DNA eingegangen. Ein wichtige Rolle spielt die Arbeit von Paul W. K. Rothemund. [8] In seinen Versuchen verwendete er einzelsträngige M13mp18-DNA-Moleküle, deren Stränge er in zweidimensionale Gebilde formte. Dazu verwendet er ein Grundgerüst, um das sich die DNA selbst herum anordnet. Die so entstandenen Figuren haben einen Durchmesser von 100 nm.

Der Herstellungsprozess der DNA-Origami umfasst 5 Schritte. (Abbildung 5) Der erste Schritt ist die Erstellung eines Modells. Dieses Grundgerüst besteht aus auseinander geschnittenen Doppelhelices mit einem Durchmesser von 2 nm, wobei alle 16 Basen miteinander verbunden sind, um die Struktur aufrecht zu erhalten. Die einzelnen Helices sind zueinander verdreht. Jede komplette Windung besteht aus 10,67 Basen. Im zweiten Schritt wird ein lineares Baugerüst durch die Doppelhelix gefädelt. Dieser Strang besteht aus 900 Nukleotiden und erschafft noch mehr Übergänge zwischen den Doppelhelices. Im dritten Schritt werden weitere Heftstränge hinzugefügt, die aus den komplementären Basen zu dem einzelsträngigen Grundgerüst bestehen. Dies wird nach und nach zu einem doppelsträngigen Grundgerüst ergänzt. Durch die Seitenwechsel zwischen den einzelnen Helices kommt es zu sogenannten Nicks. Dies sind Lücken in der DNA-Struktur, die im Unterkapitel *Nicks und Overstretching* noch ausführlich erläutert werden. Es muss jedoch betont werden, dass am Ende alle Basen des Einzelstranges mit einer komplementären Base verbunden sind. Es kommt lediglich zu Lücken zwischen den einzelnen komplementären Oligomeren auf Grund deren Anordnung. In den letzten beiden Schritten wird die Struktur des DNA-Origami opitimiert, indem einzelne Stränge angefügt beziehungsweise entfernt werden.

Im Folgenden sind nun verschieden DNA-Origamikonstrukte abgebildet. (Abbildung 6) Diese besitzen die unterschiedlichsten Formen, zum Beispiel eckig oder rund. Die Origami werden auf Mica abgelegt und dann unter dem AFM begutachtet. Dabei kann es sein, dass das Konstrukt durch die Messung verändert wird. Es ist jedoch nicht klar in welchem Ausmaß die Topographiemessungen die Anordnung der Origami beeinflussten. Die Bilder werden danach in Bezug auf die Ähnlichkeit zum Grundgerüst bewertet. Das erste Bild in Abbildung 6 a) zeigt ein Quadrat. 13% der so geformten Quadrate wurde als gelungen klassifiziert und 25% immerhin als Rechteck. Abbildung 6 b) stellt zwei Rechtecke dar, die durch Brücken an verschieden Stellen miteinander verbunden wurden. 90% dieser Konstrukte wurden als gelungen angesehen. In weiteren Versuchen wurden schwierigere Konstrukte gebildet wie zum Beispiel Sterne oder Smileys. Die Sterne in Abbildung 6c) hatten eine Erfolgsrate von 11% und die Smileys in Abbildung 6d) eine Erfolgsrate von 70%. Eine besondere Schwierigkeit ergab sich bei der Herstellung eines Dreiecks, dessen Seiten aus einzelnen Rechtecken besteht. (Abbildung 6) Die Erfolgsrate

lag dabei unter 1%. Wahrscheinlich verbanden sich die Dreiecke auf Grund der Schichtungen innerhalb der Rechtecke häufiger miteinander, was dafür sorgte, dass sie sich verzogen. Deswegen wurde eine weitere Möglichkeit der Dreiecksbilung verwendet. Hierbei bestanden die einzelnen Seiten nicht aus Rechtecken, sondern aus Trapezen. (Abbildung 6) Das Gesamtkonstrukt wird stabiler, da sich zwischen den Trapezen mehr Verbindungen aufbauen können als zwischen den Rechtecken, bei denen nur die äußeren Eckpunkte aneinander grenzen. Dieses Konstrukt zeigte eine Erfolgsrate von 88 %.

Eine weitere wichtige Art der DNA-Manipulation auf der Anordnungsebene sind DNA Nanoswitches.[9] Dabei handelt es sich um programmierbare, sich selbst organisierende DNA-Moleküle. Die Moleküle werden dabei so modifiziert, dass sie Rückschlüsse auf die Bindungs- beziehungsweise Dissoziationsraten von verschiedenen Bindungstypen zulassen. Es handelt sich hierbei um zunächst einzelne Stränge, die durch das Anfügen von komplementären Basenpaaren vervollständigt werden. Die einzelnen Nukleotide bilden größere Ketten, sogenannte Oligonukleotide. Diese Oligonukleotide können speziell funktionaliert werden, indem ihnen andere Moleküle hinzugefügt werden. Sollten zwei Oligonukleotide innerhalb des Polymerstrangs mit Molekülen funktionalisiert werden, die eine Bindung miteinander eingehen, kommt es zu einer Schleifenbildung. Bei den Messungen von Koussa et al. wurde der Fokus auf eine Funktionalisierung mit Streptavidin und Biotin gelegt, welche gemeinsam eine sehr starke Bindung eingehen. Es gab insgesamt pro DNA-Strang zwei Andockpunkte für funktionalisierende Moleküle. Bei der Hybridisierung kann es zu insgesamt drei möglichen Ergebnissen kommen. Möglichkeit Nummer 1 ist, dass sich an beiden Andockpunkten Streptavidin ansiedelt. Das würde dafür sorgen, dass sich keine Schleife bildet. Das Gleiche gilt für Möglichkeit Nummer 2, in der sich an beiden Andockpunkten Biotin ablagert. Nur bei Möglichkeit Nummer 3, bei der sich an jeweils einem Punkt Streptavidin und am anderen Biotin anlagert, kann sich eine Schleife bilden. Zur Auftrennung der Moleküle in lineare DNA und DNA mit Schleife wird eine Elektrophorese durchgeführt. Dabei wird an ein Gel, welches die DNA-Moleküle enthält eine externe Spannung angelegt. Die negativ geladene DNA wandert somit zur positiv geladenen Anode. Die DNA-Moleküle mit Schlaufe haben eine andere elektrische Ladung als die DNA-Moleküle ohne Schlaufe. Deswegen setzen sie sich auch an anderen Stellen im Gel ab. An den Stellen, an denen sich die DNA-Stränge ablagern, bilden sich graue Streifen. Je höher die DNA-Konzentration, desto dunkler der Streifen. Die DNA M13mp18 ist auf Grund ihrer Länge von 2,48 µm sehr gut zu erkennen. (Abbildung 7)

Für die Bestimmung der Bindungsrate beziehungsweise der Dissoziationsrate werden zunächst die DNA-Stränge, welche bereits eine Schlaufe gebildet haben, aussortiert. Überbleiben die linearen DNA-Stränge, in diesem Fall Stränge, die mit Biotin versehen sind. Dem Gel wird Streptavidin beigesetzt und die DNA-Stränge fangen an eine Bindung zu formen. Sobald sie eine Schleife gebildet haben, bewegen sie sich innerhalb des Gels. Der Streifen an der Position mit den gebundenen DNA-Strängen

wird dunkler. Bei dem Dissoziationsexperiment ist es genau anders herum. Das Streptavidin löst sich, die Bindung öffnet sich und das Molekül wandert auf die andere Seite. Bei der Bindungrate steigt der Prozentsatz zunächst langsam auf um die 10-20%, dann bis zu ungefähr 80% und steigt dann langsam weiter an bis alle Moleküle gebunden sind. Bei der Dissoziationsrate sinkt die Anzahl der gebundenen Moleküle logarithmisch.

Beeinflusst werden diese Raten durch die Temperatur. Je höher die Temperatur, desto schneller lösen beziehungsweise bilden sich die Schlaufen. Der Unterschied ist am deutlichsten bei der Dissoziationsrate zu sehen.

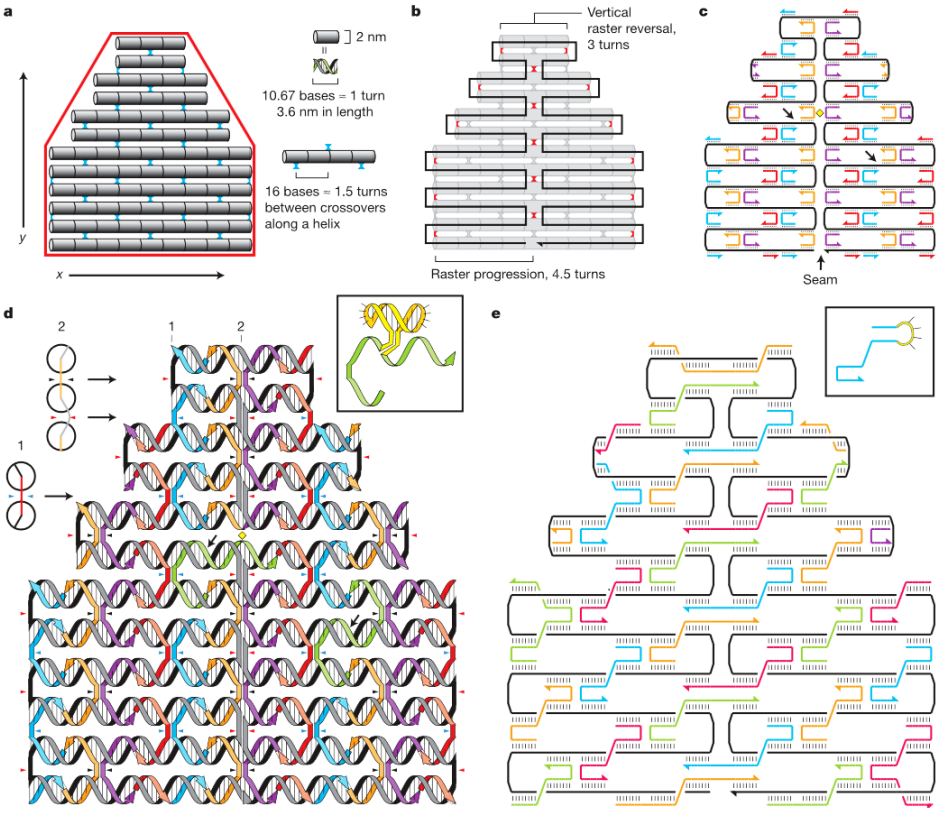


Abb. 5: Bildliche Darstellung der 5 Schritte zur Erstellung eines DNA-Origamis. a) Schema des Grundgerüstes aus den verschiedenen Doppelhelices. Die blauen Pfeile stellen die Verbindungen zwischen den einzelnen Doppehelices dar. b) Einfädelung der einzelsträngigen DNA (rot). Dadurch entstehen zwischen den einzelnen Doppelhelices noch weitere Verbindungspunkte. c) Einfügen von sogenannten Heftsträngen. Diese enthalten komplementäre Basen zu dem Einzelstrang. Zwischen den verschiedenen doppelsträngigen Segmenten bilden sich Nicks. Es sind alle Basen des Einzelstranges gebunden. d) und e) Optimierung des Konstruktes durch die Einfügung beziehungsweise die Entfernung von einzelnen Strängen. [8]

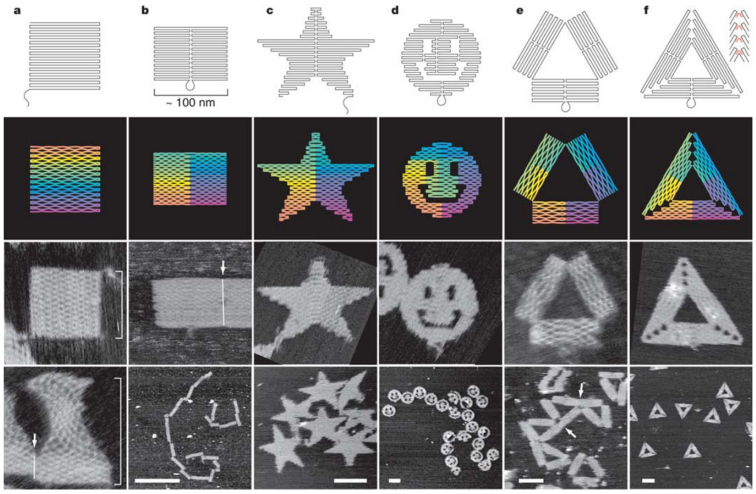


Abb. 6: Die beiden oberen Reihen zeigen die schematische Anordnung des DNA-Origamis, die beiden unteren Reihen Topographiemessungen mittels AFM. Die dritte Reihe von oben immer ein enzelnes Konstrukt und die unterste Reihe mehrere Konstrukte. In Spalte a) und b) sind verhältnismäßig einfache Konstrukte zu sehen: Ein Quadrat und zwei Rechtecke, die über Brücken miteinander verbunden sind. Spalte c) zeigt ein Sternorigami und Spalte d) einen Smiley. Das schwierigste Konstrukt mit einer Erfolgsrate von unter 1% ist in Spalte e) zu sehen. Es handelt sich um ein Dreieck dessen Seiten aus Rechtecken bestehen. Die zweite Art, Dreiecke zu formen, ist in Spalte f) zu sehen. Hiebei bestehen die einzelnen Seiten aus Trapezen. [8]

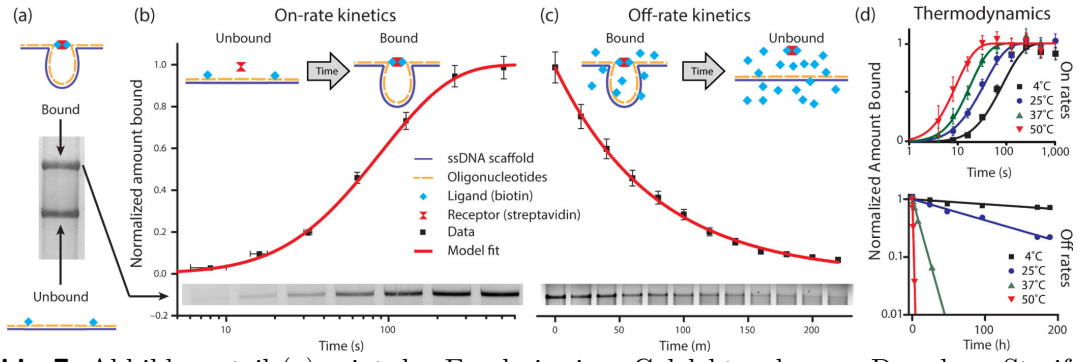


Abb. 7: Abbildungsteil (a) zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese. Der obere Streifen ist die Position der DNA-Stränge mit Schleife, der untere Streifen ist die Position der DNA-Stränge ohne Schleife. (b) Bindungrate, der mit Biotin und Streptavidin verbunden Schleifen. (c) Dissoziationsrate der Bindungen zwischen Biotin und Strepavidin. (d) Temperaturabhängigkeit der Messungen. Je höher die Temperatur desto schneller bilden sich Schlaufen oder lösen sich wieder auf. [9]

4.1.3 Nicks und Overstretching

In sehr vielen Arbeiten spielen DNA-Stränge mit Nicks eine wichtige Rolle. [10] [11] [12] [13] [14] Dabei handelt es sich um Lücken, die meistens in einem der beiden Zucker-Phosphat-Rückgratstränge zu finden sind. Vor allem kommen sie bei künstlich hergestellten DNA-Sequenzen vor. Diese sind zum Beispiel DNA-Origami oder einzelsträngige DNA-Moleküle, die mittels Hybridisierung mit den dazugehörigen Oligomeren vervollständigt werden. Solche Lücken wirken sich auf das Verhalten der DNA aus, sowohl was die Flexibilität angeht, als auch die Stabilität. Um dies zu analysieren, ist es notwendig, zunächst zu bestimmen, wie sich Lücken auf die Anordnung der einzelnen Basenpaare auswirken. Diese halten die beiden Hauptstränge zusammen und spielen somit eine wichtige Rolle.

Dazu simulierten Lee et al. eine Doppelhelix, deren einer Strang komplett durchgängig ist und wo die andere Seite aus zwei verschiedenen Strängen besteht. [12] (Abbildung 8) Dadurch, dass die Basenpaare nur auf einer Seite miteinander befestigt sind, haben sie auf der anderen Seite mehr Bewegungsspielraum, was mehrere Verschiebungsmöglichkeiten begünstigt. In Abbildung 8 sind die verschiedenen Ausrichtungen innerhalb von einem kartesischen Koordinatensystem abgebildet. Dabei verläuft die Y-Achse entlang der komplementären Basenpaare, die Z-Achse entlang der DNA-Leiterstränge und die X-Achse senkrecht zu den Basenpaaren. Eine Möglichkeit der Verschiebung wäre, dass die beiden Basenpaare (in der Abbildung 8 als blau-rot beziehungsweise blau-grün dargestellt) entlang der X-Achse beziehungsweise der Y-Achse kippen. Dies kann den Abstand zwischen den jeweiligen Leiterenden vergrößern oder verkleinern. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich die beiden Basenpaare entlang der Z-Achse zueinander verdrehen. Auch dies würde den Abstand zwischen den Leiterenden auf der einen Seite verändern beziehungsweise den durchgehenden Strang verdrehen. Die Basenpaare können sich auch entlang der X-Achse beziehungsweise Y-Achse zueinander verschieben. Eine letzte Möglichkeit wäre, dass sich die Basenpaare als Ganzes aneinander nähern beziehungsweise voneinander entfernen.

Generell wird zwischen zwei Arten der Verbiegung der DNA-Doppelhelix unterschieden. Zum einen die Torsionssteifigkeit, bei der angegeben wird, wie sehr sich der Torso der Doppelhelix verdreht, und zum anderen die Biegesteifigkeit, bei der sich die DNA in die verschieden Richtungen verbiegt. Das Verhältnis der Torsionssteifigkeit zur Biegesteifigkeit wird im Folgenden als C/B bezeichnet. Mit Hilfe der Simulationen konnte festgestellt werden, dass die Lücken einen Weichmachereffekt auf die Torsionssteifigkeit haben. Dieser Effekt ist stark abhängig von der Position und der Anzahl der Lücken. Eine wichtige Rolle spielen die sich gegenüber liegenden Basenpaare der beiden Strangenden. Mit Hilfe des C/B wurden spezielle DNA-Helices designed, die zu einem DNA-Origami angeordnet wurden. Durch den vorgegebenen C/B konnte die Verdrehung der einzelnen DNA-Stränge vorausberechnet werden. Lee et al. führten an, dass für ein besseres Verständnis der Nicks

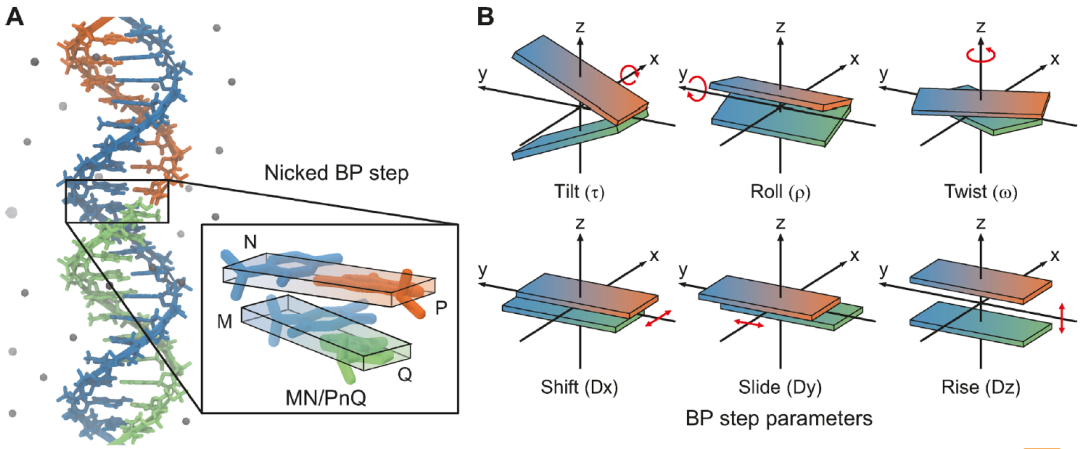


Abb. 8: Abbildungsteil A zeigt eine doppelsträngige DNA-Helix. Einer der beiden Stränge (blau) ist vollständig. Der andere Strang besteht aus zwei verschiedenen DNA-Sequenzen, die rot und grün eingefärbt sind. An der Stelle zwischen den beiden Sequenzen bildet sich eine Lücke. Die Basenpaare können sich somit auf einer Seite frei verschieben. In Abbildungsteil B werden sechs Möglichkeiten vorgestellt, wie sich zwei Basenpaare gegeneinander verschieben. Auf der linken Seite in Blau befinden sich zwei Basen, die an einem durchgängigen Strang befestigt sind. Die anderen beiden Basenpaare sind jeweils an einem anderen Leiterstrang befestigt. [12]

noch weitere Studien von Nöten sind.

In den bisherigen Arbeiten wurden die einzelnen DNA-Stränge lediglich modifiziert beziehungsweise angeordnet. Doch was passiert eigentlich, wenn eine größere Kraft auf die einzelnen DNA-Stränge wirkt? Dieser Frage ging das Team Bongini et al. nach. [15] Sie entwarfen einige Modelle, um das Verhalten der DNA während stark einwirkender Kräften zu simulieren. Zunächst wird die DNA lediglich gestreckt, sodass das Knäuel linear gespannt vorliegt. Danach geht man davon aus, dass zunächst die äußeren Leiterstränge gedehnt werden. Dabei wird der Durchmesser der Spiralwindung fortwährend schmaler. Die Länge der DNA insgesamt nimmt zu. Bei noch stärker Krafteinwirkung werden die Spiralwindungen nach und nach entdreht und einzelne Basenpaare fangen an zu reißen. Ein Schema dazu befindet sich in Abbildung 9. Dabei ist zu bemerken, dass dies nicht bei allen komplementären Basenpaaren gleich auftritt. Es gibt zwei verschiedene Basenpaare. Adenin und Thymin beziehungsweise Guanin und Cytosin. Adenin und Thymin sind über zwei Wasserstoffbrücken aneinander gekoppelt. Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken. Somit besitzen Guanin und Cytosin eine Wasserstoffbrücke mehr, die durch die von außen einwirkende Kraft aufgelöst werden muss. Abschnitte innerhalb der DNA, die aus mehr Guanin-Cytosin-Basenpaaren bestehen sind somit widerstandsfähiger als Abschnitte innerhalb der DNA, bei denen Adenin-Thyminbindungen vorherrschen.

Einen weiteren Einfluss auf das Overstretchingverhalten hat die Anzahl von Nicks.

Diesen Einfluss untersuchten von Mameren et al. mit Hilfe von optischen Pinzetten.[16] Dabei wurden DNA-Stränge an Beads angebracht, die auseinandergezogen werden. Das Verhalten der DNA wird mit dem Fluoreszensmikroskop aufgenommen. Sie stellten dabei fest, dass Nicks innerhalb des DNA-Stranges die Kraft, die für ein Overstretching von Nöten ist, von 110 pN auf 65 pN herabsetzen. Dies gilt auch für DNA-Stränge, die nicht an beiden Leitersträngen am Bead befestigt sind. Dabei trennt sich die doppelsträngige DNA an den äußeren Enden auf, die nicht beidseitig befestigt sind. Die DNA franst regelrecht aus. In manchen Experimenten triff das Auflösen der komplementären Basenpaare auch innerhalb des Doppelstrangs auf. Dies ist auf Nicks innerhalb der DNA-Struktur zurückzuführen. Der einzelsträngige Anteil der DNA kann sich entspannen und Verformungsenergie abgeben. Es wurde außerdem festgestellt, dass die Energie, die es braucht, um die Basenpaare zu trennen, zunimmt, je flexibler das Grundgerüst wird. Auf Grund der einzelsträngigen Anteile innerhalb des Konstrukts wird der Strang biegsamer. Je biegsamer der Strang auf Grund des Overstretchings wird, desto schwerer wird es, die verbliebenen Basenpaare zu trennen. Dies erklärt auch, warum die Basenpaare nicht alle bei 65 pN reißen. Bei DNA-Strängen, die an beiden äußeren Enden an beiden Seiten befestigt sind, tritt der Overstretchingeffekt vor allem in Regionen auf, die viele Adenin-Thymin-Basenpaare aufweisen. Adenin und Thymin sind lediglich über zwei Wasserstoffbrücken aneinander gekoppelt, weswegen es weniger Energie braucht, um die Verbindung zu lösen. Die Vermutung von Mameren et al. ist, dass am Ende zwei einsträngige DNA-Sequenzen übrig bleiben, die an einzelnen Stellen miteinander verknüpft sind. Diese Stellen wären bevorzugt Sequenzen, in denen Basenpaare zwischen Guanin und Cytosin vorherrschen.

Auf Grund des Overstretchings verlängert sich der DNA-Strang um das 1,7-fache. Dies ist ein Wert, den auch die Gruppe Zhang et al. feststellte. [17] Sie stellten drei Varianten vor, wie das Overstretching und somit das Auflösen der Basenpaare ablaufen kann. Die erste Möglichkeit wäre, dass sich die beiden Leiterstränge wie ein Reißverschluss auftrennen und sich die einzelsträngigen Enden aufwickeln. Eine weitere Theorie ist, dass das Auflösen der Basenpaare innerhalb des Konstrukts stattfindet und sich langsam, aber sicher in Richtung der Extremitäten ausbreitet. Die dritte und letzte Möglichkeit wäre, dass sich die Basenpaare voneinander trennen und dann wieder zu neuen Basenpaaren zusammensetzen. Dies wird als B-zu-S-Transition bezeichnet. Wie auch bei Mameren et al. wird unterschieden zwischen DNA-Strängen, bei denen beide Enden befestigt sind, und DNA-Strängen, bei denen nur ein Ende befestigt ist. Dabei hat sich die DNA hinterher wieder entspannt. In einigen Fällen sieht man zwischen Anspannung und Entspannung eine Hysterese. Die DNA-Stränge mit Hysterese wiesen eine größere Overstretchinglänge auf und stammt diese laut Zhang et al.vom Trennen der doppelsträngigen DNA in einzelsträngige DNA. Des Weiteren weisen DNA-Stränge, die zuvor keine Hysterese aufwiesen, eine Hysterese auf, sobald die Magnesiumkonzentration erhöht wird. Bei DNA-Strängen, die an den Enden nicht geöffnet waren, kann es nur ein Overstretching in Form von B-zu-S-Transition oder Auflösung der Basenpaare innerhalb des

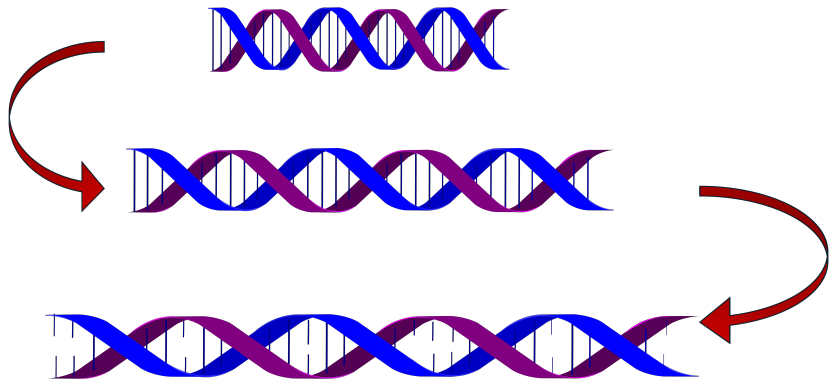


Abb. 9: Schema zur kontinuierlichen Streckung einer DNA-Doppelhelix, die in einem Overstretching mündet. Die DNA-Doppelhelix wird zunächst gestreckt, wobei die einzelnen Leiterstränge gedehnt werden und die Spirale verbogen wird. Der Abstand zwischen den einzelnen Leitersprossen, also der einzelnen Basenpaare wird größer. Die Spirale wird zunehmend verformt, das Konstrukt insgesamt länger und teilweise kommt es zum Aufbrechen der einzelnen komplementären Basenpaare.

Strangs geben.[18] Es wird davon ausgegangen, dass die B-zu-S-Transition keine Hysterese aufweist im Gegensatz zur Auflösunge der Basenpaare innerhalb des Strangs.

In Abbildung 10 ist eine von uns aufgenommene AFM-Kraftkurve zu sehen. Dabei wird ein einzelnes M13mp18-DNA-Molekül zunächst gestreckt und reißt schließlich von einer Oberfläche ab. Bei diesem Strang handelt es sich um einen DNA-Komplex, der aus einem vollständigen Leiterstrang und einem zweiten einzeln zusammengesetzten Leiterstrang besteht. Zwischen den einzelnen Oligomeren innerhalb des zweiten Leiterstrangs gibt es Nicks. Mehr über diesen Aufbau wird im Kapitel 5.1 beschrieben. Das Molekül ist an einem Cantilever befestigt. Auf der X-Achse ist der Abstand zwischen Oberfläche und Cantilever angegeben und auf der Y-Achse die Kraft, die in horizontaler Richtung auf den Cantilever wirkt. Die normale Konturlänge des Moleküls beträgt $2.5\mu m$. Somit müsste die DNA bei einem Abstand von $2.5\mu m$ zwischen Oberfläche und Cantilever abreißen. An der Kraftkurve ist allerdings zu erkennen, dass der Cantilever erst ab einem Abstand von $4\mu m$ wieder neutral ausgelenkt ist. Das bedeutet, dass die DNA mit einer Länge von abgerissen ist. Die DNA wurde somit überstreckt. Ein weiteres Indiz für Overstretching ist das Kräfteplateau. Die auslenkende Kraft ist ab einem Abstand von ungefähr $2.5\mu m$ konstant. Dies deutet darauf hin, dass der Cantilever ab diesem Zeitpunkt nicht mehr zusätzlich ausgelenkt wurde, sondern die DNA nachgegeben hat und sich verformt hat. Diese Verformung hat eine zusätzliche Krafteinwirkung kompensiert. Es ist darauf hinzuweisen, dass das Kräfteplateau in den Originaldaten bei ungefähr $40pN$ lag und anhand des Overstretchings nachkalibriert wurde.

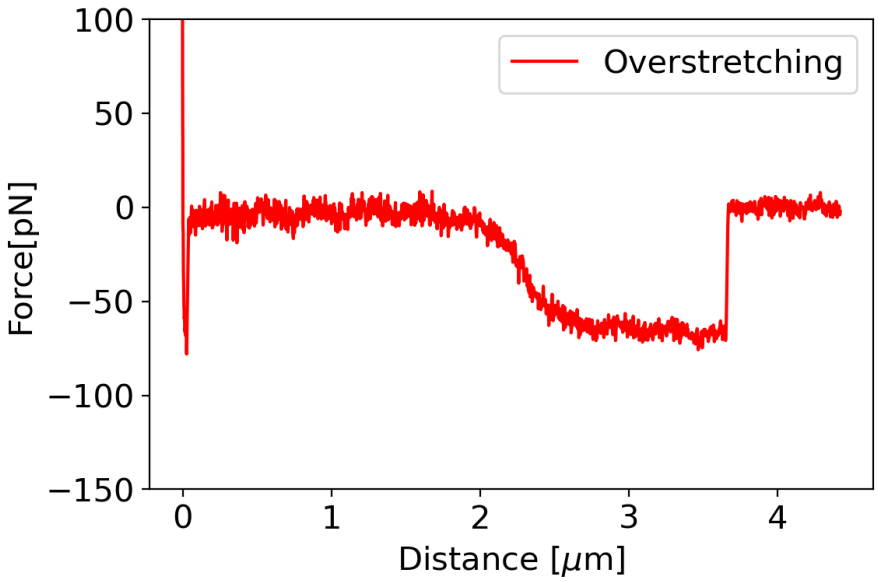


Abb. 10: Abbildung einer Kraft-Distanzmessung, bei der eine einzelne DNA-Doppelhelix gespannt wird. Die DNA in dem Beispiel erreicht eine maximale Krafteinwirkung von um die 60 pN. Die verwendete DNA besitzt in diesem Fall zu Beginn der Messung eine Länge von 2,5 µm. Sie wird allerdings bis zu einer Länge von fast 4 µm gespannt, was für ein deutliches Overstretching spricht. Das Kräfteplateau zwischen 2,5 µm und 4 µm spricht dafür, dass die ursprüngliche DNA-Doppelhelix in diesem Intervall nicht mehr gespannt, sondern lediglich überstreckt wurde.

Overstretching und das häufig damit verbundene Aufbrechen von Basenpaaren ist ein häufig untersuchtes Phänomen bei Zugexperimenten an derDNA, das auch für diese Arbeit eine interessante Rolle spielt. [19] [20] [21] [22] [23]

4.2 Single-Polymer-Friction

Im folgenden Unterkapitel werden nun fünf wissenschaftliche Arbeiten vorgestellt, mit deren Auswertung sich wichtige Rückschlüsse auf unsere Messungen ziehen lassen. Eine der Arbeiten stammt von Bizan N. Balzer, der sich mit dem Reibungsverhalten von einzelnen Polymersträngen an fest-flüssigen Grenzoberflächen beschäftigt und diese in drei Schemata unterteilt. Des Weiteren wird die Arbeit von Takaharu Okajima et al. vorgestellt, der einzelne Polymerstränge aus einem Gel herauszieht. Die Arbeitsgruppe von Shigeki Kawai et al. führt ein Experiment durch, welches den Reibungsmessungen in dieser Arbeit sehr ähnelt. Dabei ziehen sie einzelne Graphenstränge, an einem Cantilever befestigt, über eine Goldoberfläche. Währenddessen befindet sich der Cantilever in unterschiedlichen Höhen und Hinbeziehungsweise Rückweg wurden miteinander verglichen. Ebenfalls wichtig ist die Arbeit von Iliafar et al, die sich mit Kraftspektroskopie einzelner DNA-Oligomere auf Graphit beschäftigt. Zuletzt befasse ich mich mit der Arbeit von Wang et al,

dessen Messungen das genaue Gegenteil einer der Hauptaskpekte dieser Arbeit sind. Er versucht DNA-Stränge nicht in Poren hinein kriechen zu lassen, sondern zog DNA-Stränge aus Poren heraus, die bereits damit gefüllt sind.

4.2.1 Reibungsverhalten von einzelnen Polymersträngen an fest-flüssigen Grenzflächen

Eine wichtige Grundlage für das Verständnis von Reibungsmessungen einzelner DNA-Stränge lieferte die Arbeitsgruppe Bizan N. Balzer et al. [24] Sie untersucht das Reibungsverhalten von einzelnen Polymersträngen an fest-flüssigen Grenzflächen mittels AFM und unterteilt dies in drei Kategorien: „slip“, „desorption stick“ und „cooperative stick“ (Abbildung 11).Während des Experiments wird das Ende eines Polymerstrangs an einem Cantilever befestigt. Die Spitze wird um mehr als 100 nm von der Oberfläche weggefahren, sodass sie nicht mehr im Kontakt mit der Probe ist und nur noch der Strang mit der Oberfläche interagieren kann. Das Polymerkonstrukt wird parallel zur Probenoberfläche und somit senkrecht zur Cantileverachse gezogen. Die Normalkraft F_z der Reibungsmessung kann anhand der Auslenkung des Cantilevers ermittelt werden. Die dazugehörige Kraft F_x in die laterale Richtung ergibt sich durch die Kräftezerlegung der Gesamtkraft F_{tan} in ihre zwei Komponenten, wobei der dazugehörige Polymerwinkel ϕ zwischen der Normalkraft und der Gesamtkraft entlang des Polymerstrangs aufgespannt wird. Die Reibungskraft F_R wirkt der Kraft Fx entgegen. R_z ist ein Maß für die ursprüngliche Auslenkung des Polymerkonstrukts senkrecht zur Oberfläche vor dem Ziehen. R_x ist die Auslenkung des Polymerstrangs parallel zur Probenoberfläche, die durch das Ziehen entsteht (Abbildung 12).

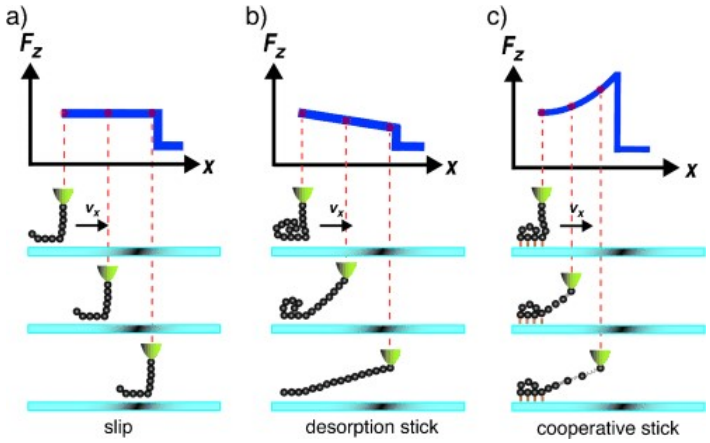


Abb. 11: Verschiedene Arten der Haftung eines einzelnen Polymers auf einer fest-flüssigen Grenzfläche, während das Polymer lateral parallel zur Oberfläche gezogen wird. [24]

Charakteristisch für den „slip“ ist eine sehr geringe und nicht mehr messbare Reibungskraft von 0,1 pN. Das Polymerkonstrukt gleitet somit ungehindert über die Oberfläche und es bildet sich ein Kräfteplateau mit einer konstanten Kraft F_z in vertikale Richtung. Durch den Abriss des Polymer-Stranges von der Oberfläche sinkt die Kraft augenblicklich auf 0. Der „cooperative stick“ zeichnet sich dadurch aus, dass das Polymer nicht auf der Oberfläche entlanggezogen wird, sondern sich nach und nach von der Oberfläche ablöst. Der Reibungskoeffizent ist in diesem Fall

so hoch, dass die Desorption gegenüber dem Gleiten überwiegt, und die Normalkraft sinkt linear in Abhängigkeit von der Zuglänge, bis das Konstrukt abreißt und die Kraft abrupt auf 0 sinkt. Beim „cooperative stick“ haftet der Polymerstrang so stark an der Oberfläche, dass die einzelnen Kettenglieder nach und nach gestreckt und von einer lateralen Kraft ausgelenkt werden. Dies spiegelt sich in einem parabolischen Anstieg von F_z wieder. Die Kraft sinkt auf 0, sobald der Strang abgerissen ist.

Während des Experiments wird das Ende eines Polymerstrangs an einem Cantilever befestigt. Die Spitze wird um mehr als 100 nm von der Oberfläche weggefahren, sodass sie nicht mehr im Kontakt mit der Probe ist und nur noch der Strang mit der Oberfläche interagieren kann. Das Polymerkonstrukt wird parallel zur Probenoberfläche und somit senkrecht zur Cantileverachse gezogen. Die Normalkraft F_z der Reibungsmessung kann anhand der Auslenkung des Cantilevers ermittelt werden. Die dazugehörige Kraft F_x in die laterale Richtung ergibt sich durch die Kräftezerlegung der Gesamtkraft F_{tan} in ihre zwei Komponenten, wobei der dazugehörige Polymerwinkel ϕ zwischen der Normalkraft und der Gesamtkraft entlang des Polymerstrangs aufgespannt wird. Die Reibungskraft F_R wirkt der Kraft Fx entgegen. R_z ist ein Maß für die ursprüngliche Auslenkung des Polymerkonstrukts parallel zur Cantileverachse vor dem Ziehen. R_x ist die Auslenkung des Polymerstrangs parallel zur Probenoberfläche, die durch das Ziehen entsteht (Abbildung 12).

$$F_z = F_{tan} * cos(arctan(R_x/R_z)) \tag{1}$$

Im Folgenden werden Beispiele für die Reibungsprozesse beleuchtet. In Abbildung 12 b) wird die Normalkraftkurve für eine Wechselwirkung vom Typ „slip“dargestellt. Die Normalkraft F_z bleibt konstant, während der Polymerstrang um x in die laterale Richtung gezogen wird. Dies lässt darauf schließen, dass die Reibung auf der Oberfläche so gering ist, dass der Polymerstrang fast gar keinen Widerstand erfährt und ohne Reibung über die Oberfläche gleitet. In Abbildung 12 c) werden sowohl Normalkraft als auch laterale Kraft in Abhängigkeit von der Zuglänge x dargestellt. Die Normalkraft sinkt hierbei linear von $90pN$ auf $71pN$ ab, bis sie bei ungefähr $2,8\mu m$ abrupt auf 0 sinkt. Die laterale Kraft steigt hingegen linear von $0pN$ auf $40pN$ an und sinkt bei ebenfalls $2,8\mu m$ augenblicklich auf 0. Dies spricht für einen „desorption stick “, bei dem der Polymerstrang die ganze Zeit konstant auf einer Position haften bleibt, jedoch nach und nach von der Oberfläche gelöst wird. Abbildung 12 d) zeigt bis zu einer Zuglänge von $2,6\mu m$ebenfalls einen „desorption stick “. Danach bleiben sowohl die Normalkraft als auch die laterale Kraft konstant, bis sie bei über $3\mu m$ abrupt auf 0 fallen. Wahrscheinlich geht die Art des „desorption stick“bei $2,6\mu m$ in einen „slip“über. Anfangs steigt die laterale Kraft mit sunehmender Zuglänge stark an, bis sie bei $2,6\mu m$ die Reibungskraft übersteigt und sich der Polymerstrang soweit von der Oberfläche löst, dass er anfängt über die Oberfläche zu gleiten. Dies geschieht so lange, bis sich der Polymerstrang komplett von der Oberfläche löst und somit keine Kraft mehr auf ihn wirkt. Abschließend wird in Abbildung 12 e) und Abbildung 12 d) der Einfluss von der Zuggeschwindigkeit bzw.

von dem Anteil des Polymerstrangs, der auf der Oberfläche haftet, analysiert, bezogen auf die Reibungskraft. Hierbei lässt sich keine direkte Abhängigkeit feststellen.

Nach Abschluss der Untersuchungen von Bizan N. Balzer et al. lassen sich deren Ergebnisse in vier Kernaussagen unterteilen. Bei guten Lösungsmitteln und homogenen hydrophoben Substraten lassen sich vor allem „slips “beobachten, im Gegensatz zu schlechten Lösungsmitteln, die zu „desorption stick “führen. Eine starke Häufung von Wasserstoffbrücken führt oft zu einer Streckung des Polymerstranges „cooperative stick “. Alle Fälle, die dazwischen liegen, verursachen vor allem „desorption stick “.

Die Arbeit von Bizan N. Balzer et al. ist für die Arbeit während dieser Doktorarbeit relevant, da sie verschiedene Reibungsverhalten mit den dazugehörigen Kraftdistanzkurven aufzeichnet. Durch den Vergleich der Kraftdistanzkurven von Bizan N. Balzer et al. mit unseren Messungen können Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die DNA über die Oberfläche gleitet, langsam abgezogen wird oder während dem Abziehen gestreckt wird.

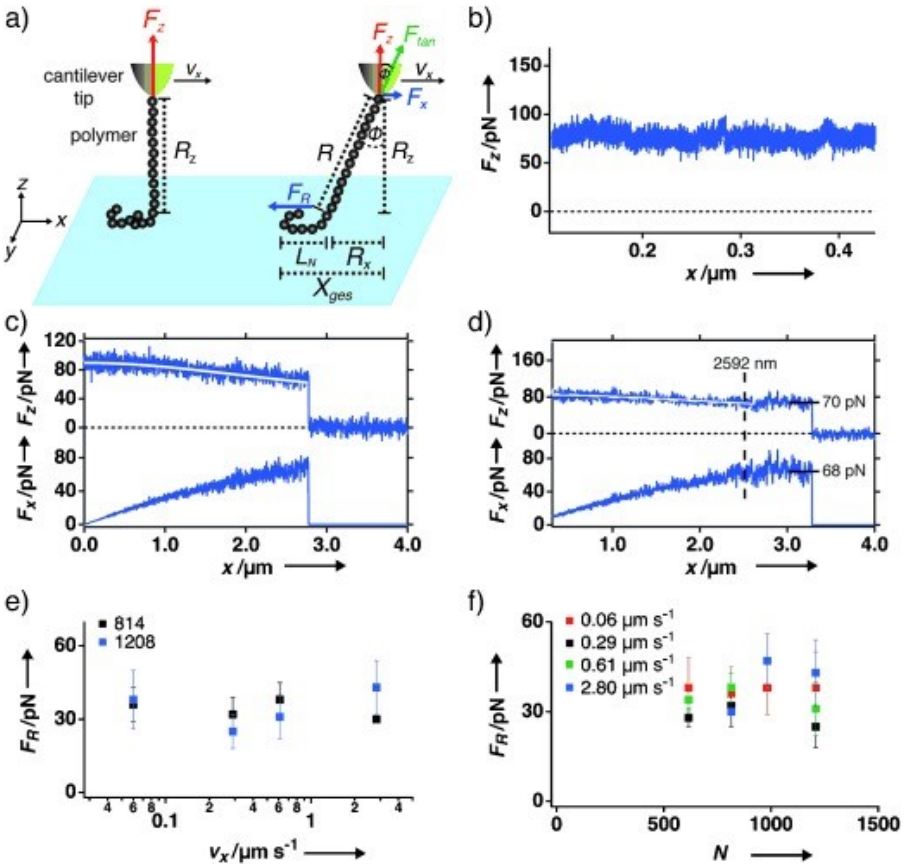


Abb. 12: Abbildung a) zeigt die Kräftezerlegung vor (links) und während dem Ziehen (rechts) in die laterale Richtung. In Abbildung b) wird die Normalkraft F_z in Abhängigkeit von der Zuglänge dargestellt. Die Kraftdistanzkurve verläuft linear, was darauf schließen lässt, dass der Polymerstrang mit sehr geringer Reibung über die Oberfläche gleitet. Es handelt sich um „slip“. In Abbildung c) wird gezeigt, wie die Normalkraft in Abhängigkeit von der Zugdistanz kontinuierlich leicht absinkt und die Kraft in lateraler Richtung konstant ansteigt. Beide sinken am Schluss abrupt auf 0. Dies spricht dafür, dass der Polymerstrang zunächst auf der Obefläche haftete und dann kontinuierlich abgezogen wird. In Abbildung d) findet bis zu einer Zuglänge von ungefähr $2,6\mu m$ ein „desorption stick “ statt. Bei weiterem Ziehen ist die laterale Kraft groß genug, um die Reibungskraft zu überwinden und der DNA-Strang gleitet über die Oberfläche. Abbildung e) zeigt die Abhängkeit der Reibungskraft von der Zuggeschwindigkeit und Abbildung f) die Abhängigkeit der Reibungskraft von der Zahl der Monomere, die auf der Oberfläche haften. [24]

4.2.2 Kraftspektroskopie einzelner in ein Polymergel eingearbeiteter Polymere

Die Arbeitsgruppe von Takaharu Okajima et al. widmet sich der Kraftspektroskopie einzelner Polymerstränge, welche mit einem größeren Polymernetzwerk beziehungsweise Gel verwoben sind. [25] Die Enden der Stränge aus Poly(Ethylenglycol) (PEG) sind mit Thiol versehen und das Gel besteht aus Poly(Acrylamid). Der Polymerstrang wird mittels der Thiolgruppe an einen AFM-Cantilever mit einer goldenen Spitze gebunden. Dieser wird nach oben gefahren, wobei der Polymerstrang langsam aus dem Gel herausgefädelt wird beziehungsweise mit den Strängen des Netwzwerks interagiert. Ein Schema für die beiden verschieden Zugaufbauten ist in Abbildung 13 zu sehen.

Die hierbei entstandenen Kraftdistanzkurven lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Hälfte zeigt ein konstantes Kräfteplateau, welches trotz wachsendem Abstand zwischen Oberfläche und Cantileverspitze konstant bleibt. Dies erinnert sehr an die Kraftmessungen von einzelnen Polymersträngen durch Bizan N. Balzer, bei denen das Polymer lediglich über die Oberfläche gleitet. Es kann vermutet werden, dass der Polymerstrang lediglich an den Netzwerksträngen vorbeigeleitet wird und nicht wirklich mit diesen interagiert, sodass es keine punktuellen Veränderung der Kraft bei den einzelnen Netzwerksträngen gibt. Die andere Gruppe weist einen nicht-konstanten Kräfteverlauf auf. Wahrscheinlich hat sich der Polymerstrang in diesen Fällen mit den Netzwerksträngen verhakt, was dazu führt, dass die Kraft punktuell ansteigt, sobald der Polymerstrang an einer Art Knoten zieht und dieser gelöst wird.

Zudem wurde die Konzentration der Knotenpunkte innerhalb des Gels verändert. Die Frage war hierbei, ob sich die Länge des Kräfteplateaus beziehungsweise die Länge des nichtlinearen Anstiegs mit sinkender beziehungsweise steigender Knotenpunktkonzentration verändert. Diese Länge wird im Verlauf als Interaktionslänge bezeichnet. Dasselbe gilt für die Abrisskräfte. Abschließend lässt sich sagen, dass sich die charakteristische Interaktionslänge mit einer variierenden Anzahl von Knotenpunkten veränderte. Eine steigende Anzahl von Knotenpunkten sorgte dafür, dass die Interaktionslänge sank. Das könnte daran liegen, dass die Knotenpunkte enger aufeinander folgen und somit der Polymerstrang mit einer höheren Frequenz mit den Knotenpunkten interagiert. Bei der Abrisskraft ließen sich weder bei den Kräfteplateaus noch bei den nicht linearen Anstiegen eine Veränderung in Abhängigkeit von der Knotenpunktkonzentration feststellen.

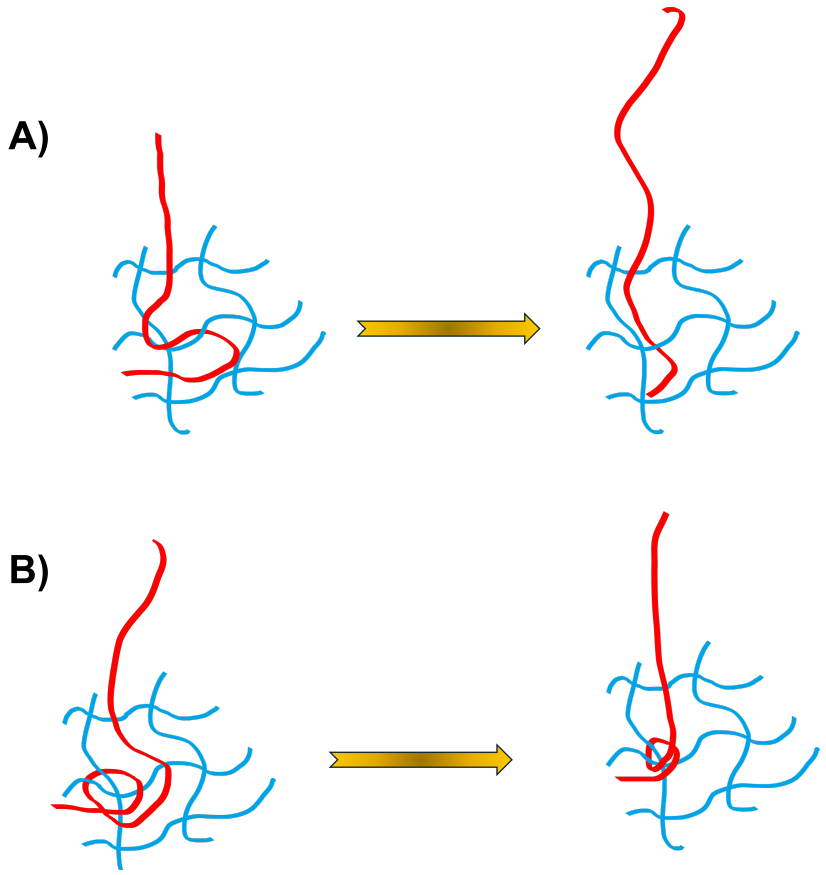


Abb. 13: Eine kurze Zusammenfassung der verschiedenen Intearktionsmöglichkeiten zwischen dem einzelnen Polymerstrang und dem restlichen Netzwerk. In allen Fällen ist der einzelne Polymerstrang an einen Cantilever gebunden, der ihn aus dem Netzwerk herauszieht. In Abbildungsteil A ist ein Schema gezeigt, bei dem der Polymerstrang zwar in das Gel eingewoben, jedoch nicht verknotet ist. Der Strang gleitet somit lediglich an den Netzwerksträngen vorbei. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Kräfteplateaus. In Abbildungsteil B ist der Polymerstrang mit dem Netzwerk verknüpft, weswegen eine zusätzliche punktuelle Kraft auf ihn einwirkt, er gespannt beziehungsweise auch vom Gel abgerissen wird.

4.2.3 Superschmierfähigkeit von Graphenbändern auf Goldoberflächen

Im Gegensatz zu den Messungen von Takaharu Okajima, die große Ähnlichkeiten zu den Adhäsionsmessungen auf der porösen Membran haben, haben die Messungen von Shigeki Kawai große Ähnlichkeiten zu den Reibungsmessungen auf der porösen Membran. [26] Im Messaufbau von Shigeki Kawai et al. wurde statt der DNA in unserem Experiment ein einzelner Strang aus Graphenbändern befestigt. Dieser wurde in beide Richtungen über eine glatte Goldoberfläche gezogen. Dabei wurde der Abstand zwischen dem Cantilever und der Oberfläche variiert und das Signal der Frequenzänderung und die Veränderung zwischen Hin- und Rückweg analysiert. (Abbildung 14). Das Ziel der Untersuchung war die Superschmierfähigkeit von Graphen auf Gold. Graphen gilt als Material mit einem geringen Reibungsfaktor, da es nicht mit anderen Stoffen interagiert und sehr steif ist, was die Kontaktflächen mit anderen Materialien reduziert. Um die Superschmierfähigkeit von Graphen auf Gold zu untersuchen, wurde der Frequenzunterschied des Cantilevers in Abhängigkeit von der Zugdistanz untersucht. Die Messungen wurden bei 4.8 K im UHV durchgeführt.

Das ursprüngliche Experiment bestand allerdings darin zu sehen, wie weit man Graphenbänder mit Hilfe des Cantilevers verschieben kann. Die angewandte Messmethode verwendet die Elemente von AFM-Messungen im Nicht-Kontaktmodus. Dabei berührt der Cantilever die Oberfläche nicht, sondern fährt so nahe an die Probe heran, bis die Interaktion mit der Oberfläche die Schwingfrequenz des Cantilevers beeinflusst. Durch weitere Frequenzänderungen in Abhängigkeit von der Cantileverschiebung in X-Y-Richtung können Rückschlüsse auf die Beschaffung der Probe geschlossen werden. [27] Auch Kawai et al. fahren den Cantilever so lange auf die Oberfläche bis sich die Schwingfrequenz verringerte. Diese Höhe des Cantilevers wurde als z=0 bezeichnet. Die Graphenschleife hatte sich um d=2.2 nm verschoben. Diese Verschiebung variierte hinsichtlich der Länge der Graphenbänder und der Position auf der Oberfläche. Bei der Verschiebung handelte es sich immer um Sprünge. Das Graphenband glitt nicht über die Oberfläche, was darauf schließen lässt, dass die Interaktion zwischen der Schleife und der Cantileverspitze schwach ist. Die Graphenbänder konnten dabei maximal 22 nm weit geschoben werden, da sich auf der Goldoberfläche noch weitere Graphenbänder befanden, mit denen die gezogene Graphenschlaufe ansonsten kollidiert wäre. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Graphenbänder manchmal leicht rotierten beziehungsweise sich in seltenen Fällen auch in vertikaler Richtung vor Beginn der Messungen bewegten. Die Graphenbänder selbst hatten eine maximale Länge von bis zu 55 nm.

Um mehr Rückschlüsse über die Reibungskräfte bei dynamischen Prozessen ziehen zu können, wurden die Graphenbänder an der Cantileverspitze befestigt und dann in einer konstanten Höhe über die Oberfläche gezogen. Der Cantilever weist zu Beginn der Messung eine konstante Oszillation auf. Die Schleife wurde hierbei über 12 nm parallel zur Oberfläche hin und her gezogen. Das Experiment wurde mehrfach

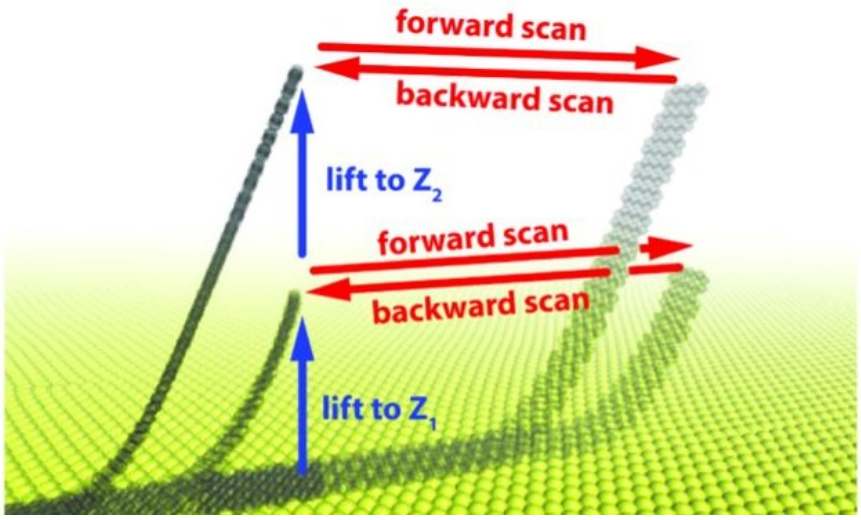


Abb. 14: Ein einzelner Strang, der aus mehreren aneinandergereihten Graphenbändern besteht, wird an einem Cantilever befestigt über eine glatte Goldoberfläche gezogen. Dieser Prozess wird vorwärts und rückwärts wiederholt, wobei die Höhe des Cantilever Z variiert wird. [26]

---

wiederholt. Die verschiedenen Höhen waren 2, 3, 4 und 5 nm. Durch die Bewegung über die Oberfläche in X-Richtung wird der Cantilever zusätzlich in Schwingung versetzt, was zu einer Veränderung der Amplitude führt. Des Weiteren unterscheidet sich die Oszillation zwischen Hin- und Rückweg. Bei einer Cantileverhöhe von 5 nm sieht man im Signal während dem Rückweg mehrere sehr starke Ausschläge, die nichts mehr mit der eigentlichen Oszillation gemein haben.

Die Goldoberfläche selbst besteht teilweise aus einer fcc-Struktur und teilweise aus einer hcp-Struktur. Wenn das Graphenband vollständig auf einem hcp- oder fcc-Gitter liegt, ist die Reibungskraft minimal. Das Gleiche gilt für den Fall, dass das Band sich über einer Grenzregion der beiden Gitterstrukturen befindet. Lediglich wenn die freie Kante oder der Ablösungspunkt eine Grenzregion kreuzt, wird die Reibungskraft maximal.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Arbeit von Kawai et al. zeigt, dass Graphen eine sehr geringe Reibung im Bereich von 100 pN aufweist. Bei dem Vergleich mit unserer Arbeit muss man bedenken, dass die Größenordnungen bei diesem Experiment sehr viel geringer waren als bei unseren Messungen. Die Länge der Graphenbänder als auch die Distanz, über die sie gezogen werden, erstreckt sich auf wenige nm. Der DNA-Strang in unseren Messungen ist hingegen 2500 nm lang und wird über eine Distanz von mehreren 1000 nm gezogen. Zudem interagiert die DNA sehr viel eher mit der Umgebung als Graphen.

4.2.4 Kraftspektroskopie einzelner DNA-Oligomere auf Graphit

In diesem Versuch widmet sich die Gruppe von Iliafar et. al dem Peelingverhalten von ss-DNA.[28] Dafür werden Kraftdistanzkurven mittels AFM aufgezeichnet, wobei besonderer Wert darauf gelegt wird, die Abrisskräfte in Abhängigkeit von dem sich lösenden Basenpaar zu analysieren. Als Oberfläche wird pyrolytisches Graphit verwendet. Die ss-DNA wird mit einer Thiolgruppe funktionalisiert. Bei den analysierten Molekülen handelt es sich um 5'-poly(dT_{50}), 5'-poly(dT_{100}), 3'-poly(dA_{50}) und 5'-poly(dG_{100}). Die Zahlen vor dem „'"beziehen sich auf die Stelle, an der das Oligomer anbindet, und die Zahl innerhalb der Klammer gibt an, wie viele Basen das zugehörige Oligomer zählt. Für die Messung werden mit Gold beschichtete Cantilever mit einer Federkonstante von $0.3N/m$ verwendet. Diese werden zunächst im Plasmacleaner gereinigt und mit Ethanol gespült, um oxidiertes Gold zu entfernen. Die ss-DNA wird mit dem mit der Thiolgruppe versehenen Ende an die Goldspitze gebunden und dann mit dem AFM auf die Graphitoberfläche gefahren. Um in die Analyse miteinzufließen, mussten die Kraftdistanzkurven folgende Kriterien erfüllen: Die Extendkurve und die Retractkurve müssen in dem Bereich überlappen, in dem die DNA keinen Kontakt mehr mit der Oberfläche hat. Die Distanzlänge des letzten Peelingsteps muss kleiner sein als die Konturlänge, sofern sich keine Sekundärstrukturen bilden. Die Adhäsionkraft zwischen Cantileverspitze und Oberfläche darf nicht zu groß sein, um das eigentliche Peeling der DNA nicht zu überlagern, und die Peelingregion muss ein mindestens 10 nm langes Plateau enthalten (Abbildung 15). Die Kraftdistanzkurven werden mittels des Freely Jointed Chainmodells beschrieben. Dabei wird die Konturlänge gemäß dem Literaturwert mit $0.56nm$ angegeben. Die freie Energie der Adhäsion kann dadurch wie folgt bestimmt werden.

$$\Gamma = ln\left[4\pi\frac{(\sinh(F))}{F}\right] \tag{2}$$

$$F = \frac{fb(1+\frac{f}{\kappa})}{k_B T} \tag{3}$$

Bei b handelt es sich um die Kuhnlänge, bei F um die dimensionslose Adhäsionskraft von einer Kuhnlänge und bei Γ um die dimensionslose freie Energie einer Kuhnlänge. Die Ablösekraft ist f. Einen wichtigen Faktor spielt hierbei die Stretchingenthalpie. Dabei wird die Kuhnlänge um f/κ verlängert. Hierbei gibt κ die Elastizität von einem Segment an.

Iliafar et. al fanden durch ihre Messungen heraus, dass die Länge der DNA und die Anbindungsrichtung einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Kräfte während des Peelings haben. Die Bindungsenergien der einzelnen Oligomere lagen zwischen 8 und $11k_BT$. Des Weiteren wird der Unterschied zwischen gebundenen und ungebundenen Zuständen bezogen auf die Freie Energie berechnet. Es wird hierbei davon ausgegangen, dass die Basenpaare nicht aneinander haften, wenn sich das

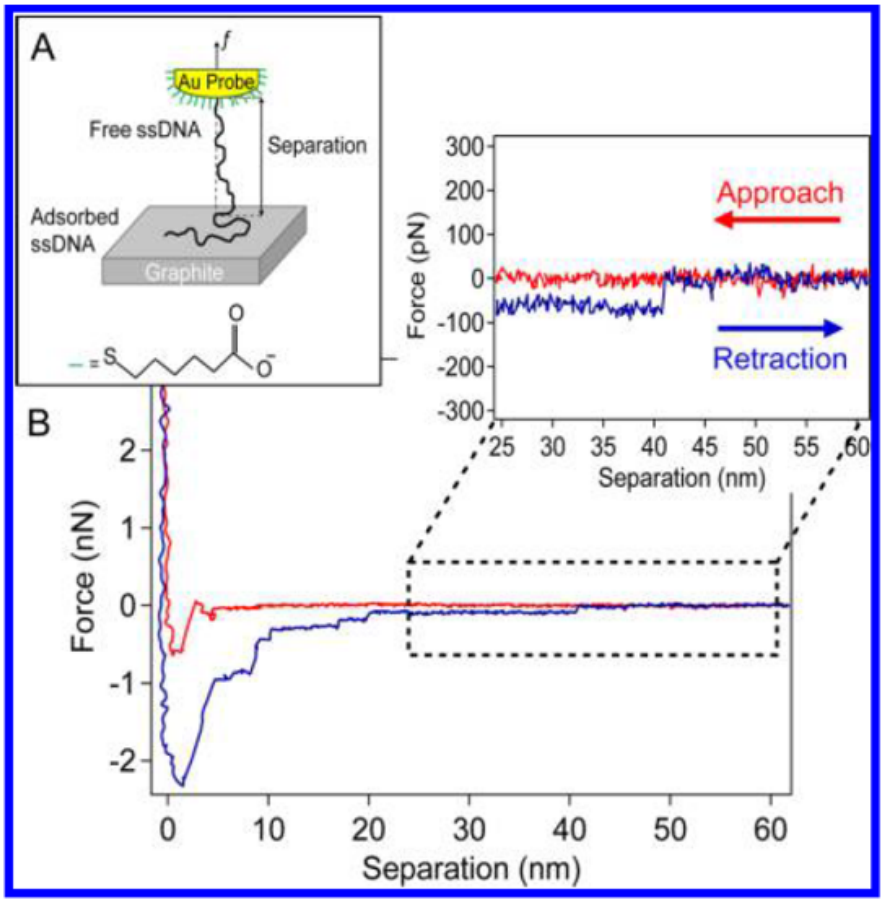


Abb. 15: In Abbildungsteil A wird der eigentliche Versuchsaufbau dargestellt. Die freie ss-DNA ist hierbei an einen Ende an der Goldspitze und am anderen Ende an der Graphitoberfläche angebunden. Bei Abbildungsteil B handelt es sich um eine aufgenommene Kraftdistanzkurve. In Rot ist der Extend dargestellt und in Blau der Retract in Abhängigkeit von der Trennungslänge (seperation). Die Trennungslänge ist hierbei der Abstand vom Cantilever zur Oberfläche. Das Peeling ist im linken Bereich zwischen 0 und $40nm$ deutlich zu sehen. [28]

System in einem gestreckten Zustand befindet, da die einzelnen Basen dann zu weit voneinander entfernt sind. Dies ist der Fall ab einer Kraft von über $60pN$. Im auf der Oberfläche absorbierten Zustand wären die Basen enger aneinander und hätten somit die Möglichkeit, aneinander zu haften.

Ebenfalls von Interesse sind die möglichen Mechanismen, die die Autoren als Erklärung für verschiedene Abrissmuster heranziehen. Dabei wird vor allem auf die unterschiedlichen Möglichkeiten von Sekundärstrukturen eingegangen. In Abbildungsteil 16 A wird die Bildung einer Sekundärstruktur entlang des DNA-Strangs dargestellt, die nicht auf der Oberfläche angebunden ist. Es handelt sich um ein Dimer, welches aus zwei Monomeren besteht. Durch das Spalten dieses Dimers würde sich die Konturlänge des eigentlichen DNA-Strangs verlängern. In Abbildungsteil

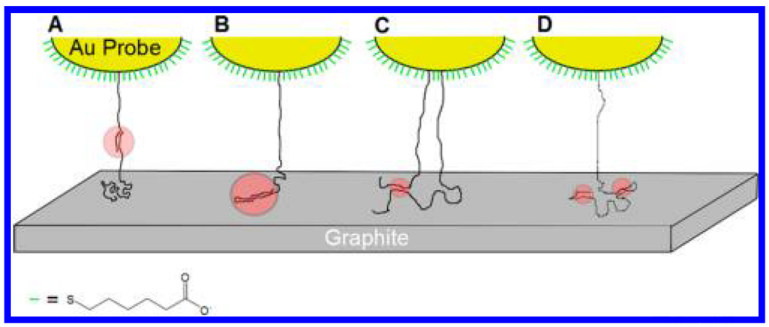


Abb. 16: Abbildungsteil A stellt die Bildung einer Sekundärstruktur entlang des Teils des DNA-Strangs dar, der nicht an die Oberfläche gebunden ist. Im Gegensatz zu Abbildungsteil B, bei dem sich die Sekundärstruktur auf der Oberfläche befindet. Die Abbildungen C und D stellen eine Mischung aus verschieden willkürlichen Sekundärstrukturen dar, die für ein charakteristisches Stretchingverhalten sorgen. Die kleinen grünen Striche stellen mit Thiol funktionalisierte Polymerketten dar, die die ss-DNA an die Goldspitzen binden. [28]

B bildet die DNA Sekundärstrukturen, die an der Oberfläche angebunden sind. Diese könnten für stärkere Absorptionskräfte bei geringen Distanzen sorgen. Die Abbildungen C und D zeigen Sekundärstrukturen, die sich willkürlich entlang des DNA-Strangs bilden bzw. sich auch zwischen zwei verschiedenen DNA-Strängen ausbilden. Diese sorgen für ein charakteristisches Stretchingverhalten. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Anbindung der DNA am Cantilever, die darauf beruht, dass die funktionalisierte Thiolgruppe an dem mit Gold beschichteten Cantilever haftet. Dies wäre eine interessante Teilveränderung für unser bisheriges System.

4.2.5 Interaktionen von DNA-Strängen mit nanoporösen Proteinkristallen

In einem Experiment von Dafu Wang et al. werden einzelne DNA-Stränge aus den Poren von Proteinkristallen mittels AFM herausgezogen.[29] Die Proteinkristalle sind von Campylobacter jejuni. Die Poren sind gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt und besitzen einen Durchmesser von $13nm$, und die Distanz zwischen den Porenmittelpunkten beträgt 18 nm. Bei der DNA handelt es sich um doppelsträngige 30-mer dsDNA. Es gab insgesamt 5 verschiedene Versuchsaufbauten, bei denen jeweils ein DNA-Strang aus einer einzelnen Pore herausgezogen wurde. (Abbildung 17) Beim Versuchsaufbau A ist weder der Proteinkristall mit DNA geladen noch der Cantilever aktiviert beziehungsweise mit Dithionitrobenzoesäure beschichtet. Die Beschichtung kann mit den Thiolanteilen der DNA reagieren. Somit sollte im Gegensatz zu Versuchsaufbau B, bei dem der Kristall und der Cantilever geladen sind, keine Interaktion zwischen dem Kristall und der Cantileverspitze vorherrschen. In Versuchsaufbau C sind sowohl die DNA innerhalb des Proteinkristalls als auch die Beschichtung am Cantilever durch TCEP blockiert. Bei Versuchsaufbau D ist lediglich der Cantilever aktiviert und bei Versuchsaufbau E ist die DNA bereits an den Cantilever gebunden und der Proteinkristall selbst ist leer. Für alle Versuchsaufbauten wurden die Adhäsionskräfte miteinander verglichen und ausgewertet.

Die geringste Adhäsionsenergie wies der Versuchsaufbau A auf, bei dem weder der Kristall noch die Cantileverspitze präpariert waren. Da die Adhäsion bei den anderen Versuchsaufbauten, bei denen der Kristall mit DNA versehen ist, höher ist, kann man davon ausgehen, dass die Interaktion mit der DNA einen wichtigen Anteil bei der Adhäsionsentstehung hat. Die höchste Adhäsionsenergie wurde im Versuchsaufbau B gemessen. In diesem Versuch sind sowohl Kristall als auch Spitze aktiviert, was die vorherige These erneut untermauert. Bei den anderen Versuchsaufbauten wurde zudem unterschieden, ob sich der Cantilever direkt über dem Zentrum der Pore oder über dem Wall befindet. Sowohl bei Versuchsaufbau B (Cantilever aktiviert/Kristall aktiviert) als auch bei Versuchsaufbau C (Cantilever geblockt/Kristall geblockt) macht es einen großen Unterschied, ob sich die Cantileverspitze über dem Zentrum der Pore befindet oder über der Porenwand. Die Adhäsionsenergie ist in beiden Fällen über der Wand sehr viel geringer als über dem Zentrum. Bei Versuchsaufbau D (Cantilever aktiviert/Kristall nicht aktiviert) lässt sich dieser Unterschied nicht finden. Die Adhäsionsenergie ist in beiden Fällen sehr gering. Sobald sich der Cantilever direkt über dem Porenzentrum befindet, ist sie im Falle von C deutlich geringer. Versuchsaufbau E, bei dem die DNA bereits an den Cantilever gebunden ist, weist genauso wie Versuchsaufbau A nur eine sehr geringe Adhäsionsenergie auf. Nach den Hauptmessungen wurde eine zusätzliche Messung gestartet, bei der der Kristall mit DNA geladen und die Cantileverspitze nicht aktiviert ist. Diese Messung wies ähnliche Adhäsionsenergien auf wie Versuchsaufbau A. All das spricht sehr stark dafür, dass die Adhäsion vor allem durch die Interaktion zwischen DNA und Cantileverspitze entsteht.

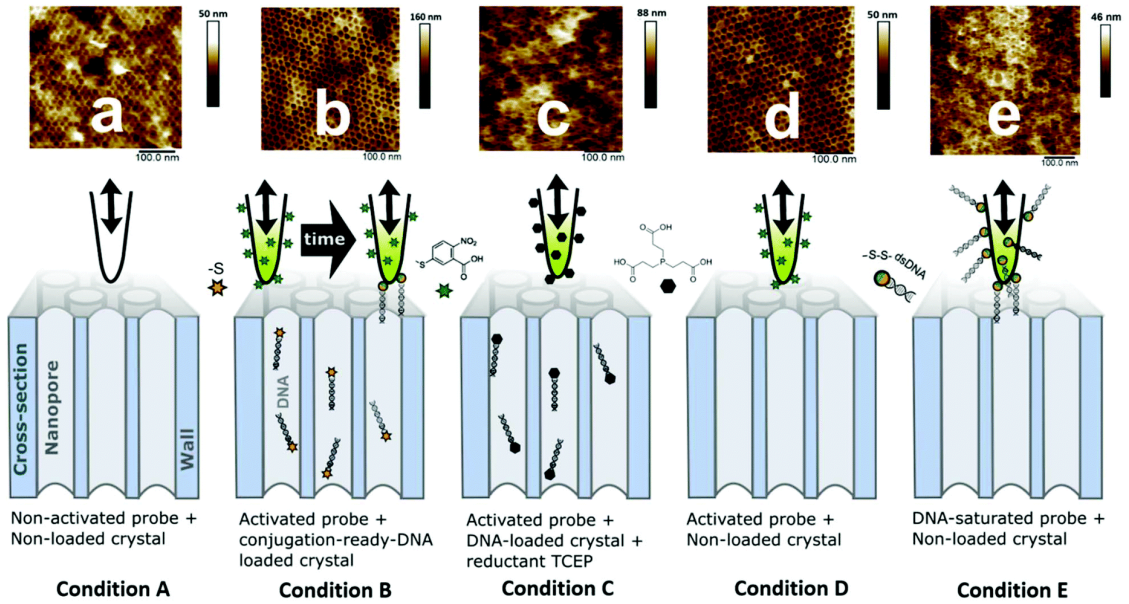


Abb. 17: Zusammenfassung der fünf verschiedenen Messaufbauten. In Versuchsaufbau A ist der Proteinkristall nicht mit DNA funktionalisiert und der Cantilever ist nicht beschichtet. Versuchsaufbau B zeigt das genaue Gegenteil. Einen Proteinkristall, der mit DNA geladen ist, und einen Cantilever, der so beschichtet ist, dass er mit den zugehörigen Thiolgruppen der DNA-Stränge interagieren kann. In Versuchsaufbau C sind beide Seiten mit TCEP geblockt, wodurch keine Interaktion möglich ist. Im Falle von Versuchsaufbau D ist der Proteinkristall nicht mit DNA-Strängen geladen, allerdings ist der Cantilever beschichtet und nicht geblockt. Versuchsaufbau E zeigt eine Messmethode, bei der die DNA bereits an den beschichteten Cantilever gebunden und der Proteinkristall nicht mehr mit DNA geladen ist. Im Anschluss gab es noch einen letzten Versuch, in dem Kristall mit DNA geladen und der Cantilver nicht beschichtet war. Dieser Versuch wurde allerdings nicht schematisch dargestellt.[29]

Diese Messergebnisse sind für die hiesige Arbeit sehr interessant, da die Messmethode der unseren zwar ähnelt, aber dennoch in einigen entscheidenen Punkten anders ist. Bei unseren Messungen ging es darum, eine DNA in eine Pore einzufädeln. und dann herauszulösen. Durch eine Reproduktion der Messungen von Dafu Wang et al. auf der Membran könnte man die zugehörigen Adhäsionsenergien mit den Adhäsionsenergien vergleichen, die bis jetzt aufgenommen wurden. Dadurch könnte man überprüfen, ob sich die DNA wirklich in die Pore eingefädelt hat.

4.3 Polymermodelle

Im folgenden Unterkapitel wird auf die Polymermodelle eingegangen, die die verwendete DNA beschreiben. Dabei wird das Worm-Like-Chain-Modell besprochen, welches die Flexibilität des Strangs beschreibt. Danach wird auf die bisherigen Erkenntnisse der Wissenschaft in Bezug auf die Persistenzlänge von doppelsträngigen DNA-Molekülen eingegangen. Zuletzt wird eine Blick auf Bindungsraten und den Gyrationsradius geworfen.

4.3.1 WLC-Modell

Für das mechanische Verhalten von DNA-Strängen werden normalerweise zwei verschiedene Modelle angewendet. Zum einen das Freely-Jointed-Chainmodell, auch Ideales Kettenmodell genannt, oder das Worm-Like-Chainmodell, auch Wurmartiges Kettenmodell genannt. Das Freely-Jointed-Chainmodell wird vor allem bei einzelsträngigen DNA-Molekülen angewendet. Es simuliert das Polymer als Strang, der aus mehreren einzelnen Kettengliedern besteht, welche nicht miteinander interagieren. Ihre Anordnung beschreibt eine Art Random Walk, bei dem die Kettenglieder theoretisch sich auch überlappen können und sehr sehr stark frei auslenkbar sind. Doppelsträngige DNA-Moleküle sind hingegen etwas steifer, weswegen sich das Worm-Like-Chainmodell anbietet. [30] [31] [32] Bei diesem sind die einzelnen Kettensegmente auch frei auslenkbar, allerdings nicht so stark wie beim Freely-Jointed-Chainmodell. Die einzelnen Kettensegmente können sich nicht überlappen. Des Weiteren kann ein Polymer, das durch das Worm-Like-Chainmodell beschrieben wird, zwar seine Form wie ein echter Wurm bis zu einem gewissen Grad ändern, indem er sich etwas verbiegt, jedoch nur bis zu einem gewissen Grad. Das Freely-Jointed-Chainmodell könnte man eher mit einer Kette aus Büroklammern beschreiben, die sehr viel beweglicher ist. (Abbildung 18)

Die Länge der einzelnen Kettensegmente im Polymer beim Worm-Like-Chainmodell bezeichnet man als Persistenzlänge. [33] [34] Sie entspricht der kleinsten Untereinheit der Kette, bei der sich eine Bewegung des einen Kettenendes nicht auf die Position des anderen Kettenendes auswirkt. Ein Beispiel dafür wäre ein einzelnes Spaghetto. Wenn das Spaghetto ungekocht ist und man es an einem Ende wie einen Zauberstab bewegt, wird sich die Bewegung direkt auf das andere Ende des Spaghettos auswirken. Das Spaghetto würde also im Worm-Like-Chainmodell eine Persistenzlänge besitzen, die länger ist als das Spaghetto selbst, da es sehr steif ist. Anders würde es bei einem gekochten Spaghetto aussehen. Wenn man das eine Ende von einem gekochten Spaghetto bewegt, bewegt sich nicht automatisch das andere Ende mit. Das gekochte Spaghetto ist weniger steif und besteht nun aus einzelnen Kettensegmenten. Die Kettensegmente besitzen eine Persistenzlänge, die geringer ist als die Länge des gesamten Spaghetto. Daraus lässt sich schließen, dass eine höhere Persistenzlänge auch eine höhere Steifigkeit bei der Kette bedingt. Die gesamte Länge des Polymers wird als Konturlänge bezeichnet. Diese setzt sich aus

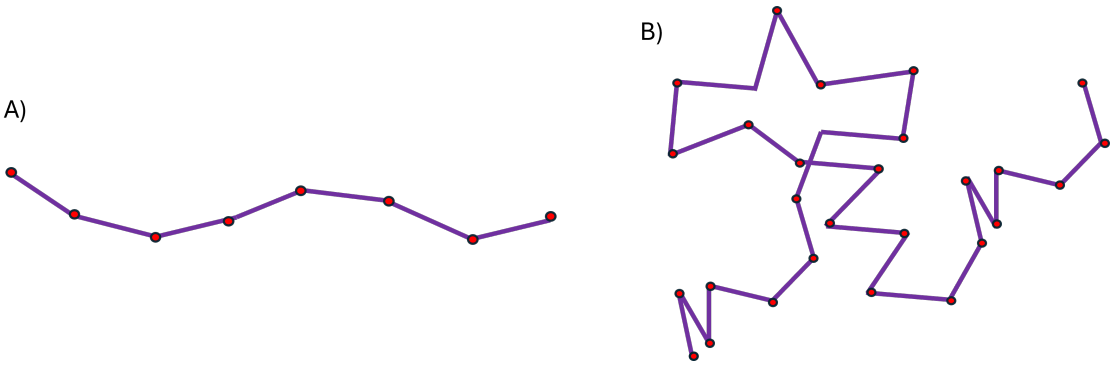


Abb. 18: In Abbildungsteil A ist ein Polymer dargestellt, welches sich gemäß dem Worm-Like-Chainmodell verhält. Die Enden der einzelnen Kettensegmente sind durch rote Punkte dargestellt. Das Polymer ist nicht komplett gestreckt, weswegen die Konturlänge kürzer ist als der Abstand zwischen den äußeren Enden. Der Strang ist leicht gekrümmt. In Abbildungsteil B ist ein Polymer dargestellt, welches durch das Freely-Jointed-Chainmodell beschrieben wird. Die einzelnen Kettenglieder überlagern sich teilweise und die Freiheitsgrade zwischen den Gliedern sind höher. Das Polymer ist insgesamt viel flexibler als das Polymer in Abbildungsteil B.

der Anzahl der einzelnen Kettensegmente und deren Längen zusammen. L ist im Folgendem die Konturlänge, n die Anzahl der Kettensegmente und p die Persistenzlänge.

$$L = n \cdot p \tag{4}$$

Im Ruhezustand liegt das Polymer gestreckt vor, sondern krümmt sich. [35] Damit würde die Konturlänge der Ende-bis-Ende-Distanz entsprechen. In Lösungen liegt das Polymer normalerweise leicht geknäult vor. [36] Somit entspricht die Distanz zwischen den beiden Enden nicht der Konturlänge L. Die Krümmung entsteht durch thermische Fluktuationen und das Polymer liegt in einem Zustand niedriger freier Energie vor. Durch eine zusätzliche Streckung wird das Polymer ausgelenkt und die Entropie des Polymers sinkt, da es nun eine geringere Anzahl an möglichen Konformationen gibt. Mit der steigenden Größe steigt auch die Enthalpie.

Für den Hamiltonian des Polymers ergibt sich:

$$H = H_b + H_e + H_t \tag{5}$$

Dabei bezieht sich H_b auf die allgemeine Bindungsenergie, H_e auf die Energie, die benötigt wird um das Polymer zu strecken. Das Polymer verhält sich lokal elastisch. H_t bezieht sich auf die Zugenergie an den äußeren Enden.

Die Berechnung für die Streckung ist in der Gleichung 4.3.2 gegeben. [37] Dabei bezeichnet L die Konturlänge, F die Kraft, mit der an der Kette gezogen wird, k_B die Boltzmannkonstante, p die Persistenzlänge, T die vorherrschende Temperatur und S den Streckungsfaktor. Der Term $\frac{F}{S}$ ergibt den Unterschied zwischen dem

normalen Worm-Like-Chainmodell und dem Elastic Worm-Like-Chainmodell. Die Variable x beschreibt die Auslenkung des DNA-Strangs. Das Elastic Worm-Like-Chainmodell wird auch häufig als Extensible Worm-Like-Chainmodell bezeichnet. [30]

$$x = L\left[1 - \frac{1}{2}\left(\frac{k_B \cdot T}{Fp}\right)^{\frac{1}{2}} + \frac{F}{S}\right] \tag{6}$$

4.3.2 Persistenzlänge (Bisherige Studien)

Zur Persistenzlänge von ds-DNA-Strängen gab es bislang mehrere Studien. Üblicherweise wird bei der Persistenzlänge ein Wert von ungefähr 50 nm angegeben. Es wurde jedoch bereits mehrfach festgestellt, dass dies nicht immer der Fall sein muss. Verschiedene Faktoren wie Konturlänge, Nicks oder Anbindungsmethode können hierbei eine Rolle spielen. [32] [10] [38] [39] [40] Seol et al. untersuchte hierfür die Elastizität von DNA-Molekülen mit einer Konturlänge zwischen 0,6 µm und 7 µm. Dabei stellten sie fest, dass die Persistenzlänge schon bei einer langen Konturlänge L = 1300 nm um 10 % geringer ist als erwartet. Des Weiteren ließ sich sagen, dass vor allem bei kleineren Konturlängen galt: Je geringer die Konturlänge, desto höher die Variation bei der Persistenzlänge. Sie postulierten außerdem, dass die Persistenzlänge von dem Aufbau des Zugexperiments abhängig ist. In ihren Messungen ist die DNA an der einen Seite an einer festen Oberfläche angebunden und an der anderen Seite an einem Bead. Dieser Bead ist in einer Optischen Falle gefangen. Eine Variation des Experiments bestand darin, die DNA an beiden Enden jeweils an einem Bead zu befestigen, der in einer Optischen Falle gefangen ist. Die Elastizität der DNA und somit auch deren Persistenzlänge wird durch die thermische Fluktuation beeinflusst, die bei dem Bead eine Rotation auslöst. Ein weiterer Faktor ist die Anbindung der DNA an die Oberfläche beziehungsweise deren Auslenkung auf Grund der Krafteinwirkung über die Optische Falle. Dabei gibt es zwei Varianten. Zum einen, dass das DNA-Molekül senkrecht zur Oberfläche gestreckt wird, und somit die gesamte Kraft als Normalkraft wirkt, oder, dass sich der Bead seitlich von der Anbindungsstelle der DNA befindet und die DNA somit schräg gespannt wird. Seol et al. fanden in ihren Messungen, dass die Persistenzlänge bei senkrecht zur Oberfläche angebundenen DNA-Molekülen steigt und bei Molekülen, die schräg zur Oberfläche angebracht sind, sinkt.

Für die Bestimmung der variierten Persistenzlänge etablierten sie die Formel:

$$p_{WLC} = \frac{p_\infty}{1 + (a * p_\infty)/L} \tag{7}$$

Dabei ist p_{WLC} die variierte Persistenzlänge, L die Konturlänge und p_∞ die Persistenzlänge von einem unendlich langem Polymerstrang. Es muss allerdings angefügt werden, dass sich die Persistenzlänge von einem unendlich langem Strang lediglich auf ein Polymer mit einer Konturlänge von 7030 nm bezieht. Der Faktor a ist

eine Variable, die von den äußeren Bedingungen abhängt und dementsprechend angepasst wird.

Ein weiterer Faktor für die Persistenzlänge ist das Verhältnis zwischen Guanin-Cytosin-Basenpaaren und Adenin-Thymin-Basenpaaren. Wie bereits im Kapitel über den Aufbau der DNA erwähnt, sind Adenin und Thymin über zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden und Guanin und Cytosin auch über zwei Wasserstoffbrücken. Das Team von Chuang et al. stellte sich deshalb die Frage, welchen Einfluss das Verhältnis zwischen den beiden Basenpaaren auf die Persistenzlänge des DNA-Strangs hat. [40] Sie stellten fest, dass die Persistenzlänge mit einem ansteigende Guanin-Cytosinanteil größer wird. Bei einem Guanin-Cytosinanteil von 34% liegt die Persistenzlänge je nach Versuchsaufbau bei 47 nm beziehungsweise 53 nm und bei einem Anteil von 60% bei 60 nm beziehungsweise 68 nm. Sie wird somit um die 20% größer. Des Weiteren konstatierten sie, dass sich die Persistenzlänge aus einer intrinsischen Persistenzlänge und einem elektrostatischem Anteil besteht. Somit gilt:

$$l_p = l_{p,0} + l_{p,el} \tag{8}$$

mit

$$l_{p,0} = \frac{EI_S}{k_B T} \tag{9}$$

$l_{p,0}$ bezeichnet hierbei die intrinsische Persistenzlänge, die sich aus der Bindungsenergie E und dem Trägheitsmoment I_S bildet. T ist die Temperatur und k_B die Boltzmannkonstante. $l_{p,el}$ stellt den elektrostatischen Anteil dar.

Des Weiteren spielt die Konzentration von speziellen Salzen eine wichtige Rolle bei der Persistenzlänge. Mehrere Studien zeigen, dass Magnesium DNA-Stränge flexibler macht. In diesem Zusammenhang untersuchten Brunet et al. den Einfluss von Magnesium und der Ionenstärke auf die Persistenzlänge. [39] Dazu verwendeten sie zwei Versuchsaufbauten. Einmal befand sich die DNA in einer Pufferlösung mit Na^+, bei der die Ionenstärke erhöht wurde ohne Magnesium und einmal wurde Magnesium beigefügt. In der Lösung ohne Mg^{+2} vergrößerte sich die Persistenzlänge bei sinkender Ionenstärke von 30 auf 55 nm. Bei gleicher Ionenstärke von 0.025 besitzt die DNA eine Persistenzlänge von 50 bis 55 nm ohne zusätzliches Magnesium und eine Persistenzlänge von 40 bis 45 nm mit zusätzlichem Magnesium. Dies entspricht einer Verkürzung der Persistenzlänge von 20%.

Auch Furrer et al. befassten sich mit der Persistenzlänge in Abhängigkeit von den Salzkonzentrationen. [10] Dabei unterschieden sie zwischen DNA-Strängen mit und ohne Nicks. In beiden Fällen änderten sie die Salzkonzentration von 10 mM Tris(pH 7.5) und 10 mM $NaCl$ auf 150 mM $NaCl$ und 10 mM $MgCl_2$. Bei der DNA ohne Nicks reduzierte sich die Persistenzlänge von 78 auf 54 nm, was einer Reduktion von

ungefähr 30% entspricht. Die DNA mit Nicks erhöhte hingegen ihre Persistenzlänge von 21 auf 43 nm.

4.3.3 Bindungsrate und Gyrationsradius

In den bisherigen Unterkapiteln zu Polymermodellen ging es vor allem um die Auswirkungen von Krafteinwirkungen auf Polymerstränge. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Bindungsrate von einzelnen Polymersträngen, also wie oft ein Polymer mit einer Bindungsstelle interagiert und eine Kraft auf den Strang wirkt. Das Polymer bewegt sich leicht geknäult in der Flüssigkeit und hat in diesem Fall keine Vorzugsrichtung. Diesen Umstand untersuchten Bell et al., die dafür das Ideale Kettenmodell oder auch Rouse Modell verwendeten. [41] Dies beschreibt ein Polymer, dessen einzelne Kettenglieder durch einzelne Federn dargestellt werden, die über einzelne Massenpunkte miteinander verbunden sind. Die Massenpunkte sind leicht gegeneinander verschiebbar und werden durch Brownian Motion bewegt. Das Polymer ist an einer Seite auf einer geraden, glatten Oberfläche angebunden. Dabei unterschieden Bell et al., ob sich die zweite Bindungsstelle an der gleichen Oberfläche befindet oder auf einer gegenüberliegenden Oberfläche. Die mittlere Anbindungszeit für eine Stelle auf der gleichen Oberfläche wird im Folgenden als τ_{on} bezeichnet und die Anbindungszeit zu einer gegenüberliegenden Oberfläche als τ_2. (Abbildung 19) Für die Anbindungszeiten gilt:

$$\tau_{on} = \frac{N^2 b^4}{9D\epsilon^2} e^{\frac{3a^2}{2Nb^2}} \tag{10}$$

$$\tau_2 = \frac{2R_g^2 d^2}{3\pi^2 D\epsilon^2} \frac{1}{(1 + 36d^4/\pi^2 R_g^4)} e^{\frac{3(d^2+a^2)}{2R_g^2}} \tag{11}$$

dabei ist N die Anzahl der Kettenglieder, b die Kuhnlänge, D ist die Diffusionskonstante und a die Distanz zwischen den beiden Anbindungsstellen, innerhalb einer Ebene. Des Weiteren sind ϵ der Bindungsradius der zweiten Bindungsstelle, d der Abstand zwischen zwei Oberfläche, sollte der Polymerstrang an einer anderen Oberflächen andocken, und $R_g = \sqrt{Nb}$.

Für die Messungen in dieser Arbeit ist lediglich τ_2 von Bedeutung, da das Ziel der Messung nicht ist, dass sich die DNA zwei Mal an den Cantilever bindet, sondern mit einer anderen Oberfläche interagiert.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Gyrationsradius. Dieser beschreibt, wie weit sich ein Polymer in einer bestimmten Flüssigkeit ausdehnt beziehungsweise welchen Radius das Knäuel hat. Generell kann dies laut Tree et al. in drei verschiedene Formen aufgeteilt werden. [36] Wenn das Polymer nicht geknäult ist, sondern linear vorliegt, wird dieser Zustand als Rod bezeichnet. Wenn das Polymer geknäult ist, allerdings nicht sehr stark, beziehungsweise das Polymer nicht in sich verwirrt ist

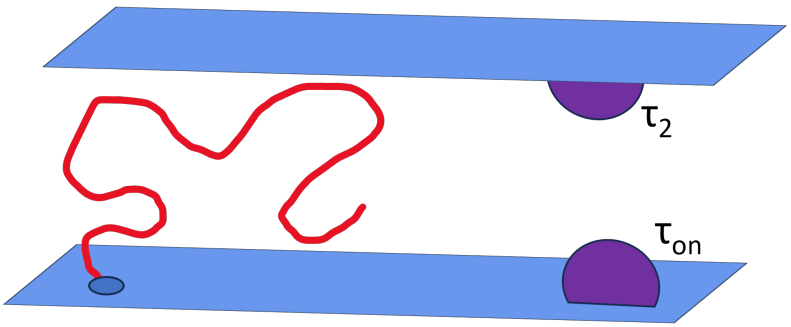


Abb. 19: Schema des Versuchsaufbau von Bell et al. Zu sehen ist ein einzelner Polymerstrang(rot), der an einer der beiden Oberflächen angebunden ist. Es gibt auf beiden Seiten jeweils eine Anbindungsmöglichkeit(lila). Die Anbindungsmöglichkeit auf der gleichen Oberfläche ist mit τ_{on} gekennzeichnet und die Anbindungsmöglichkeit auf der Seite gegenüber mit τ_2.

---

wird von einem Gaussian Coil gesprochen. Wenn das Polymer in sich verwickelt ist und sehr stark geknäult ist, spricht man von einem Swollen Coil. Wichtige Faktoren für die Größe des Knäuls sind zum einen die Umgebung, also die Viskosität und die Temperatur, in der sich das Knäuel befindet, und zum anderen die Flexibilität beziehungsweise der Durchmesser des Polymerstrangs. Der Gyrationsradius ist gegeben durch:

$$R_G = \sqrt{\frac{1}{6} 2pL} \tag{12}$$

Dabei ist p die Persistenzlänge und L die Konturlänge. [36] Unsere DNA kann als ideales Polymer angesehen werden. Der Gyrationsradius beträgt mit einer Persistenzlänge von $10.3nm$ und einer Konturlänge von $2448nm$ $92nm$. Das Knäuel ist somit sehr viel kleiner als die linear gestreckte DNa. Die Wahrscheinlichkeit einen Abriss zu sehen sinkt bei größeren Abständen als dem Gyrationsradius.

4.4 Verwendete Bindungstypen

Im Folgenden sollen Stoffe beziehungsweise Bindungstypen vorgestellt werden, die bei den Kraftspektroskopiemessungen verwendet wurden. Dies betrifft die Bindung zwischen Digoxigenin und Antidigoxigenin und die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin.

4.4.1 Digoxigenin-Antidigoxigenin

Die Bindung zwischen Digoxigenin und Antidigoxigenin ist sehr gut untersucht und wird in dieser Arbeit verwendet, um die einzelnen DNA-Stränge auf einer Cellulosenitratoberfläche anzubinden. Dazu wird der DNA-Strang mit Digoxigenin

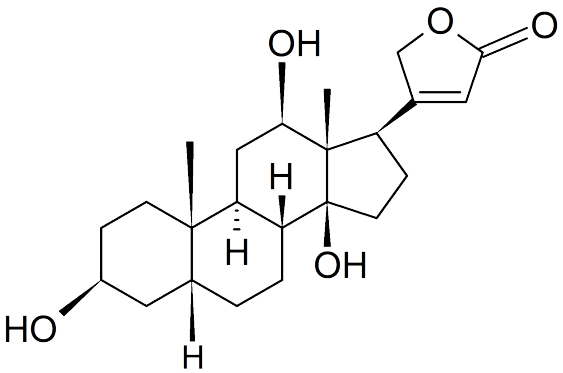


Abb. 20: Strukturformel von Digoxigenin. Digoxigenin besteht aus mehreren aneinandergereihten Benzolringen, einem Cyclopentan, das wiederum an ein Cyclopenten mit integrierter Ethergruppe hängt. An das Cyclopenten ist ebenfalls ein eine Ketongruppe gebunden. An den Rest des Moleküls sind mehrere Hydroxygruppen beziehungsweise einzelne Wasserstoffatome gebunden. [46]

funktionalisiert und die Cellulosenitratoberfläche mit Anti-Digoxigenin beschichtet. In diesem Kapitel soll es um den bisherigen Stand der Forschung bei dieser Bindung gehen. Die Verwendung von Digoxigenin-Antidigoxigenin wird im Materialien- und Methodenteil ausführlich beschrieben. Die Strukturformel von Digoxigenin ist zum besseren Verständnis in Abbildung 20 aufgezeichnet.

Die Anbindung von DNA-Strängen mittels einer Digoxigenin-Antidigoxigeninbindung wurde bereits in einigen Studien verwendet. [42] [43] [44] Bei der Verwendung dieser Anbindungsmethode ist es allerdings wichtig zu wissen, unter welchen Bedingungen die Bindung reißt. Dies betrifft zum einen die natürliche Dissoziationsrate k_{off}, die die Rate angibt, mit der sich DNA-Stränge auch ohne zusätzliche Krafteinwirkung von der Oberfläche lösen, aber auch die Ablösekraft in Abhängigkeit von der Zuggeschwindigkeit beziehungsweise der Zugrate. Diesen Untersuchungen widmeten sich Neuert et al. [45] Sie verwendeten dabei AFM-Kraftspektroskopiemessungen mit verschiedenen Zugraten, um für jede Zugrate die wahrscheinlichste Abrisskraft zu ermitteln. Die wahrscheinlichste Abrisskraft, also die Abrisskraft, die am häufigsten bei einer gewissen Zugrate auftritt, wird gegeben durch:

$$F^* = \frac{k_B T}{\Delta x} ln \frac{\dot{F} \Delta x}{k_B T k_{off}} \tag{13}$$

Dabei steht k_B für die Boltzmannkonstante, T für die Temperatur, Δx die Abrisslänge und $\dot{F}$ die Kraftentwicklung über die Zeit, also die Zugrate.
Beim Plotten der Zugrate gegen die wahrscheinlichste Abrisskraft ergibt sich, dass die wahrscheinlichste Abrisskraft mit steigender Zugrate zunimmt. Zudem lässt sich k_{off} über einen linearen Fit einmal als k_{off1} über die niedrigen Zugrates und als k_{off2} über die hohen Zugrates bestimmen.

In Abbildung 21 sind insgesamt vier Kräfteverteilungen bei vier verschiedenen

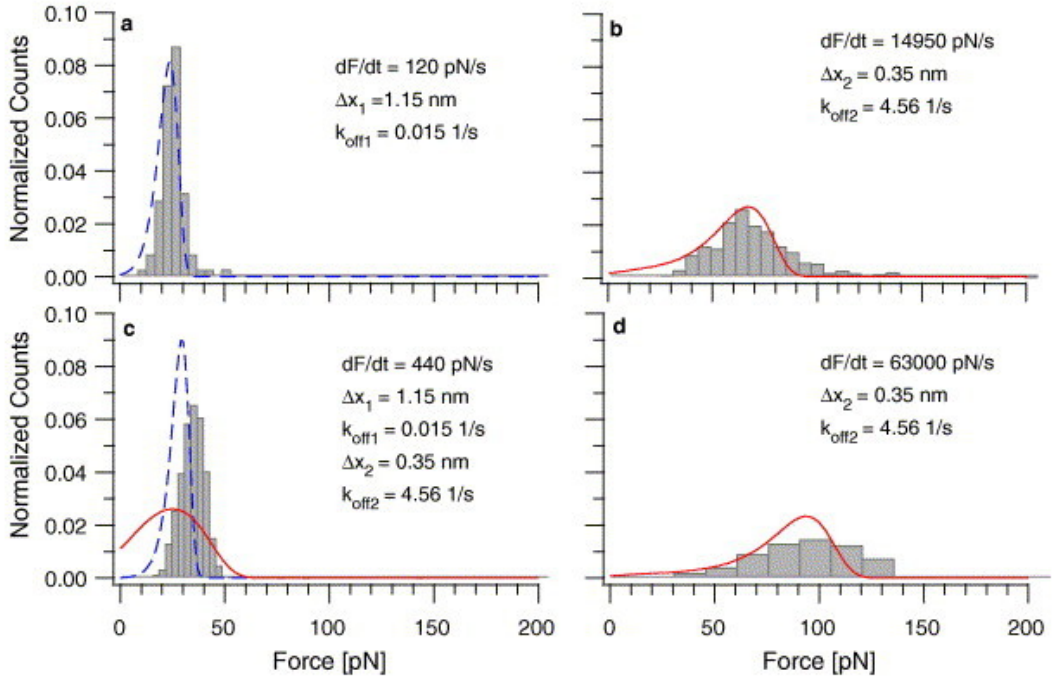


Abb. 21: Histogramm über die Verteilung der Abrisskräfte für verschiedene Zugraten. Abbildungsteil a) zeigt die Abrissverteilung bei einer geringen Zugrate von 120 pN/s. Abbildungsteil b) und d) zeigen eine Abrissverteilung bei einer hohen Zugrate von 14950 pN/s beziehungsweise 63000 pN/s. Abbildungsteil c) kann mit einer Zugrate von 440 pN/s beiden zugeschrieben werden. Bei einer höheren Zugrate steigt die wahrscheinlichste Abrisskraft und die Kräfteverteilung verbreitert sich. [45].

Zugraten dargestellt. Abbildungsteil a) zeigt die Kräfteverteilung bei einer Zugrate von 120pN/s. Dabei zeigt sich, dass die wahrscheinlichste Abrisskraft bei um die 30 pN liegt und die Abrisskräfte generell zwischen 10 und 60 pN liegen. Mit einer höheren Zugrate von 440 pN/s liegt die wahrscheinlichste Abrisskraft immer noch bei ungefähr 30 pN, allerdings ist der Peak deutlich abgeflacht. In Abbildung b) und d) sind Kräfteverteilungen bei höheren Zugraten zu sehen. Bei Abbildung b) mit einer Zugrate von 14950 pN/s reißt die Verbindung zwischen Digoxigenin und Antidigoxigenin am häufigsten bei einer Abrisskraft von 60 pN und der Peak ist weiter abgeflacht. Die Kräfteverteilung liegt zwischen 30 und 140 pN. Bei Abbildung d) liegt die Zugrate bei 63 000 pN/s und die wahrscheinlichste Abrisskraft liegt bei um die 100 pN, was mehr als einer Verdreifachung der ursprünglich wahrscheinlichsten Abrisskraft entspricht. Die Kräfteverteilung liegt zwischen 30 und 140 pN. Die gestrichelte beziehungsweise die blaue Linie zeigen die berechnete Wahrscheinlichkeitsfunktion $p(F)$ mit k_{off1} beziehungsweise k_{off2}.

4.4.2 Biotin-Streptavidin

Die Bindung zwischen Anti-Digoxigenin und Digoxigenin ist eine gute Möglichkeit, um die DNA von der Oberfläche aufzusammeln. Um die DNA an den Cantilever zu binden, benötigt man eine noch stärkere Bindung, da man verhindern will, dass die DNA sich während den Messungen vom Cantilever löst. Ein guter Kandidat hierfür ist die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin. Sie ist sehr stark, gut untersucht und wird häufig bei Experimenten mit dem AFM verwendet. [47] [48] [49] Streptavidin ist ein Protein, welches eine hohe Affinitiät zu Biotin besitzt, kann aber auch unspezifische Bindungen eingehen. [50] [51] Biotin wird oft als Vitamin angesehen, obwohl es dies im engeren Sinne nicht ist. Es gehört jedoch zur Gruppe der Enzyme und fungiert im Körper als Katalysator für Carboxylierungen. [52] [51] [53]. Die Bindung gilt als eine der stärksten nicht kovalenten Bindungen. Für ein besseres Verständnis ist die Strukturformel von Biotin in Abbildung 22 aufgezeichnet.

Wie schon bei der Anti-Digoxigenin-Digoxigeninbindung hängt auch die Stabilität der Biotin-Streptavidinbindung stark von der Zugrate ab und somit von der Geschwindigkeit des Cantilvers. Diesen Umstand untersuchten Merkel et al., wobei sie bei den Messungen kein AFM verwendeten, sondern eine Biomembran-Kraftsonde. [54] Dabei wird an einer Mikropipette eine Membran mittels bloßem Ansaugen befestigt und die Membranspannung wird durchgängig gemessen. An die Membran selbst ist ein Glaskügelchen geklebt. Durch das Ziehen an der Glaskugel mittels einer zweiten Pipette wird die Membran zusätzlich gespannt. Die zusätzliche Spannung der Membran gilt als Kalibrierung für die Krafteinwirkung auf die Glaskugel. Die Membran wird als eine Art Feder wie bei gewöhnlichen Messungen gesehen.

Bei den Messungen wurden insgesamt 6 verschiedene Zugraten verwendet. Danach wurden die Kräfte wie bei Neuert für jede Zugrate als Histogramm geplottet und die wahrscheinlichste Abrisskraft wurde ermittelt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die wahrscheinlichste Abrisskraft mit einer steigenden Zugrate deutlich ansteigt.(Abbildung 23) Des Weiteren flacht der Peak deutlich ab und verschiebt sich in einen Bereich mit höheren Abrisskräften. Bei einer Zugrate von $10^1 pN/s$ liegen die Abrisskräfte in einem Bereich von bis zu 50 pN. Bei einer Zugrate von $10^6 pN/s$ liegen die niedrigsten Abrisskräfte bei etwas unter 100 pN und die höchsten Abrisskräfte bei über 200 pN. Die wahrscheinlichste Abrisskraft vervierfachte sich zwischen $10^1 pN$ und $10^6 pN$.

Für unsere Messungen ist ebenfalls von Interesse, dass Streptavidin ein Protein ist, welches aus insgesamt vier Untereinheiten besteht. [49] Das bedeutet, dass Streptavidin mit bis zu 4 Biotinmolekülen gleichzeitig interagieren kann. Dies verstärkt insbesondere die Anbindung des mit Strepavidin gecoateten Beads an den mit Biotin gecoateten Cantilever.

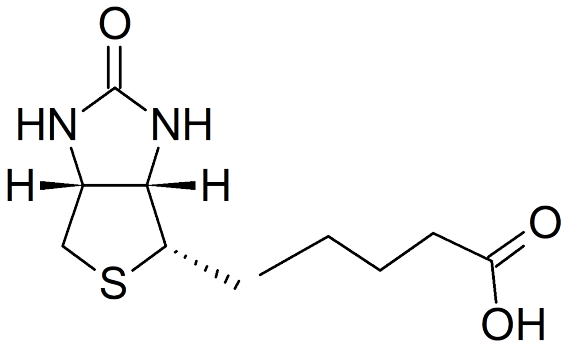


Abb. 22: Strukturformel von Biotin. Es handelt sich um ein Dipentan. In das eine Cyclopentan ist ein Schwefelatom integriert und eine Pentylestergruppe hängt ran. An dem anderen Cyclopentan befindet sich eine Oxidgruppe und zwei Thiolgruppen. An der Schnittstelle zwischen den beiden Cyclopentanen befinden sich zwei Wassterstoffatome. [53]

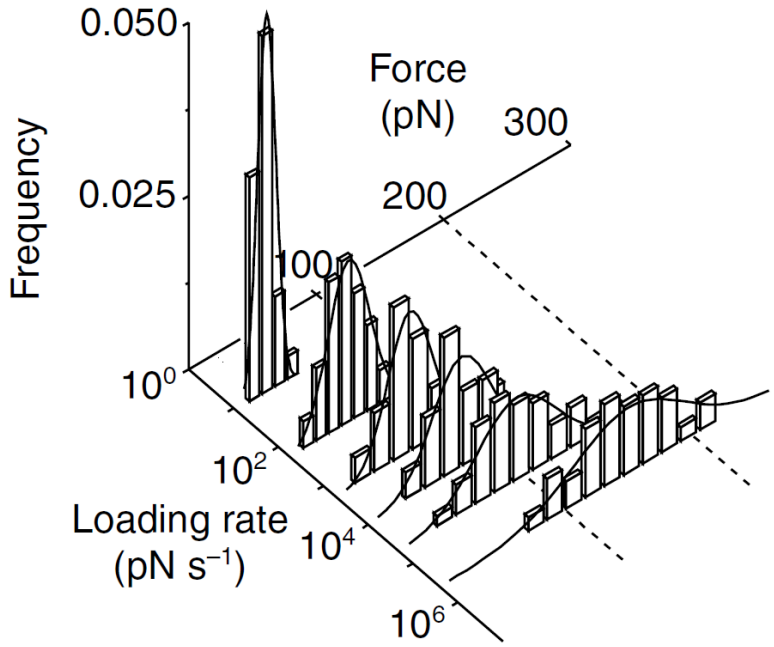


Abb. 23: Histogramme über die Abrisskräfteverteilung bei insgesamt 6 verschiedenen Zugraten zwischen 10 und 10^6 pN/s. Zu beachten ist hierbei, dass die wahrscheinlichste Abrisskraft mit zunehmender Zugrate stark anwächst. Des Weiteren flacht der Peak bei der wahrscheinlichsten Abrisskraft ab und auch die maximale und minimale Abrisskraft vervielfachen sich. [54]

5 Materialien und Methoden

Im Folgenden werden nun der Versuchsaufbau, das verwendete Messgerät und die dazugehörigen Messvorbereitungen vorgestellt. Zu den Vorbereitungen zählen die Herstellung der DNA, die Funktionalisierung des Cantilevers, die Funktionalisierung der Cellulosenitratoberflächen und die Herstellung der Membranoberflächen und der Poly-L-Lysin-Oberflächen. Danach werden das verwendete Rasterkraftmikroskop und die verschiedenen verwendeten Modi beschrieben. Des Weiteren wird die Durchführung der verschiedenen Topographie-, Adhäsions- und Reibungsmessungen vorgestellt. Abgeschlossen wird das Kapitel durch die Kräftekalibrierung der Cantilever, welche eine sinnvolle Auswertung erst möglich macht, und die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Datenauswertung.

5.1 Hybridisierung der DNA M13mp18

Die Funktionalisierung der hiesigen DNA wurde ähnlich zu der Arbeit von Koussa et al. durchgeführt, die ebenfalls Nanoswitches verwendeten. [9] Allerdings nutzten diese die Hybridisierung für die Bildung von Schleifen und wir hingegen um die Enden an den Cantilever beziehungsweise an die Oberfläche zu binden.

Bei der Hybridisierung wird eine einzelsträngige DNA zu einer doppelsträngigen DNA vervollständigt. Dazu kann entweder ein kompletter zweiter Strang angelagert werden oder einzelne Oligonukleotide, die miteinander nicht oder nur teilweise verbunden sind. Dies sorgt für Nicks, die einen Einfluss auf das Verhalten der DNA haben. Für die folgenden Messungen wurde die M13mp18-DNA verwendet (Abb. 24). Zu Beginn der Messung ist es wichtig, die DNA an einer Oberfläche anzubinden, um sie später mit dem Cantilever einzusammeln. Dazu wird das untere Ende der DNA mit Digoxigenin funktionalisiert, das mit dem Anti-Digoxigenin auf der Cellulosenitratoberfläche eine Verbindung eingeht. Die DNA ist unter dem optischen Mikroskop nicht sichtbar. Deswegen wird an dem anderen Ende der DNA ein Dynabead (MyOne Thermofischer) befestigt. Dieser ist mit Streptavidin beschichtet. Damit die DNA mit den Beads reagiert, wird sie mit Biotin funktionalisiert, das eine starke Bindung mit Biotin eingeht.

Im Folgenden sind nun die 7 Schritte der Funktionalisierung aufgezeigt. In Schritt 1 und 2 wird die Vorbereitung der Nukleotidlösung beschrieben, welche die Bauteile für den zweiten DNA-Strang liefert. Schritt 3 und Schritt 4 beschreiben, wie aus dem anfänglichen Plasmid, der lineare Einzelstrang wird, an dem die Oligomere

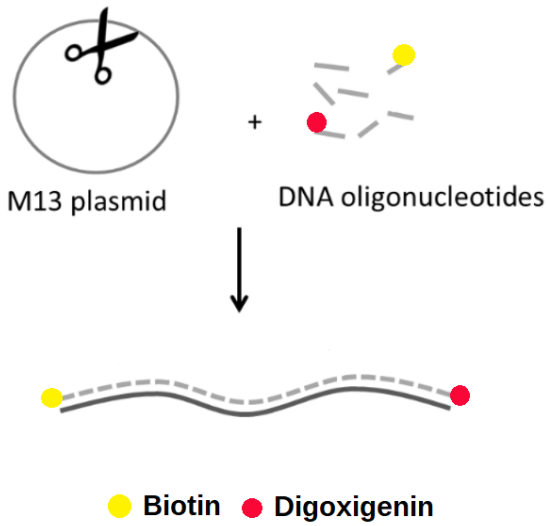


Abb. 24: Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Schritte. Die DNA wird an beiden Enden einmal mit Biotin beziehungsweise mit Digoxigenin funktionalisiert. Biotin wird in Gelb und Digoxigenin in Rot dargestellt. [55]

andocken werden. In Schritt 5 und 6 geschieht die eigentliche Hybridisierung und in Schritt 7 wird erklärt, wie die DNA zur Lagerung aufbereitet wird. Mit Abbildung 5.1 ist ein kurzes Schema als Zusammenfassung der einzelnen Schritte eingearbeitet.

Vorbereitung der Oligonukleotidlösung

Zu Beginn wird zunächst die Oligonukleotidlösung hergestellt, aus der sich später der zweite Strang zusammensetzt. Dazu wird eine Backbonelösung verwendet, die sozusagen das Grundgerüst für den zweiten Strang bildet. Um die Möglichkeit zu haben, das Grundgerüst noch nachträglich zu funktionalisieren, werden einige Oligomere erst später beigemischt. Diese Leerstellen werden als Dars bezeichnet. Da jedoch in unserem Fall nur die beiden Endpositionen funktionalisiert werden, werden die Oligomere für die restlichen Leerstellen beigemischt. Dazu werden jeweils $4\mu L$ der Lösungen Dar 2,3,4,5,6,7,8,9 und 10 miteinander vemischt und als 9 Dar(-1) beschriftet. Die $0.8\mu L$ der Lösung mit den fehlenden Dars wird mit $12.2\mu L$ der Backbonelösung vermengt und als $121bb(-1/12)$ beschriftet. Es sind somit nun alle Oligomere, abgesehen von den Endstellen, in der Oligonukleotidlösung enthalten.

Linearisierung des M13mp18-Plasmids

Der nächste Schritt ist die Formung des Einzelstranges, an dem die Oligonukleotide später andocken werden. Dazu wird ein M13mp18 DNA-Plasmidring mit Hilfe eines

Schritt 1: Herstellung der Darlösung

- 4 µL Dar 2, 3, 4, 5, 6,7,8, 9 und 10
- Beschriftung als 9 Dar (-1)

Schritt 2: Vervollständigung des Rückgrats

- 0,8 µL 9 Dar (-1)
- 12,2 µL 111 bb
- Beschriftung als 121 bb (-1/12)

Restriktionsenzyms linearisiert. $5\mu L$ 100nM zirkulare einzelsträngige DNA-Lösung werden mit $2,5\mu L$ 10x NE-Buffer 2 und $16\mu L$ nucleasefreiem Wasser vermengt. Um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden, muss bei der Pippetierung sehr vorsichtig vorgegangen werden. Das Schneideenzym für die Linearisierung funktioniert nur bei doppelsträngigen DNA-Strängen. Deshalb werden $0,5\mu L$ 100 µM BtsCl Cutsidemarker hinzugefügt, um an einer Stelle des Plasmidrings einen doppelsträngigen Anteil zu schaffen. Danach wird die Lösung für 30 Sekunden im PCR-Thermozykler auf $95°C$ erhitzt. Dadurch werden die Enzyme in der Lösung deaktiviert. Die Lösung wird auf $50°C$ abgekühlt und $1\mu L$ BtsCl Restriktionsenzym hinzugegeben. Das Schneideenzym kann das Plasmid an der doppelsträngigen Stelle zerschneiden. Mit dieser Methode kann auch sichergestellt werden, dass die DNA nur an einer Stelle geschnitten wird. Dieser Vorgang dauert eine Stunde lang. Danach wird die gesamte Lösung erneut auf $95°C$ erhitzt und alle Enzyme deaktiviert.

Schritt 3: Vorbereitung für die Linearisierung

- 5 µL 100 nM zirkular einzelsträngige M13 DNA-lösung (Plasmid)
- 2,5 µL 10x NE-Buffer 2
- 0,5 µL 100 µM BtsCl Cuttingside
- 16 µL Nucleasefreies Wasser

Schritt 4: Linearisierung bei Erhitzen

- Erhitzen der Lösung auf 95 °C für 30 Sekunden
- Abkühlen auf 50 °C
- Hinzugabe von 1 µL BtsCl Restriktionsenzym
- Zerschneiden bei konstanten 50 °C für eine Stunde
- Erneutes Aufheizen und Deaktivierung des Enzyms

Funktionalisierung der linearisierten M13mp18 DNA

Nachdem die DNA linearisiert wurde, können die komplementären Oligonukleotide hinzugefügt werden. Um zu gewährleisten, dass wirklich alle DNA-Stränge vervollständigt werden, liegen in der Oligonukleodidlösung genug Oligomere vor, um die 10-fache Anzahl an Einzelsträngen zu hybridisieren. $5\mu L$ der linearisierten

DNA werden mit $1,3\mu L$ 121 bb gemischt. Außerdem werden die funktionalisierten Oligomere für die Endstellen beigemengt. Die Lösung wird ein weiteres Mal auf $90°C$ erhitzt. Die Lösung wird schrittweise um $1°C$ pro Minute auf $20°C$ heruntergekühlt, was eine optimale Anlagerung gewährleisten soll. Danach wird die Lösung bei $4°C$ im PCR-Thermozykler bis zur Verdünnung aufbewahrt.

Schritt 5: Funktionalisierung

- 1,3 µL 121 bb
- 5 µL 20 nM linearisierte M13 DNA
- 0,4 µL Dig-Dar 1-3' (100µM)
- 0,4 µL Var 12 Biotin(100µM)
- 0,3 µL NE-Buffer 2

Schritt 6: Deaktivierung des Enzyms

- Erhitzen der Lösung auf 90°C
- Schrittweises Abkühlen der Lösung um 1 °C pro Minute auf 20 °C

Normalerweise hat ein doppelseitiger DNA-Strang eine Persistenzlänge von ungefähr 50 nm. Das hybridisierte DNA-Konstrukt wies in den durchgeführten Experimenten eine Persistenzlänge von $10.3nm$ auf. Die Persistenzlänge wird wahrscheinlich durch die Nicks bei dem künstlich entstandenen Oligomerstrang verkürzt. Sie verändern die Flexibilität und Stabilität der DNA nachhaltig. (Abbildung 25)

Verdünnung und Lagerung der DNA

Die entstandene DNA-Lösung wird in einem Verhältnis von 1:100 mit PBS-Puffer verdünnt und dann auf mehrere Mikroreaktionsgefäße mit jeweils $100\mu L$ Inhalt verteilt. Dadurch wird die Gefahr einer Verunreinigung reduziert. Die Proben werden eingefroren. Dadurch, dass die Lösung auf verschiedene Behälter verteilt ist, muss nicht immer die gesamte DNA-Lösung aufgetaut werden, weswegen die Gefahr einer Denautrierung verringert wird.

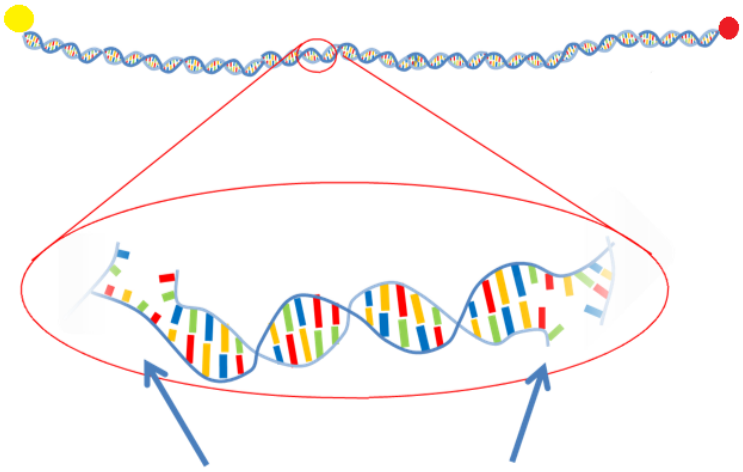


Abb. 25: Schema zur Struktur der DNA. Die Enden sind jeweils mit Biotin beziehungsweise Digoxigenin funktionalisiert. Zwischen den einzelnen hinzugefügten Oligomeren bilden sich Nicks aus. Deren Position ist mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. [4]

Schritt 7: Verdünnung und Lagerung

- Verdünnung im Verhältnis 1:100 mit PBS-Puffer
- Verteilung auf mehrere Gefäße und Einfrieren

Verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen

- Dig-Dar 1-5‘ CTGAGTAATGTGTAGGTAAAGATTCAAAAGGGTGAGAAAGGCCGGAGACA-3‘
- Var 12 Biotin-3‘ 5’GGGCGCGAGCTGAAAAGGTGGCATCAATTCTACTAATAGTAGTAGGCATT/3BioTEG-3‘

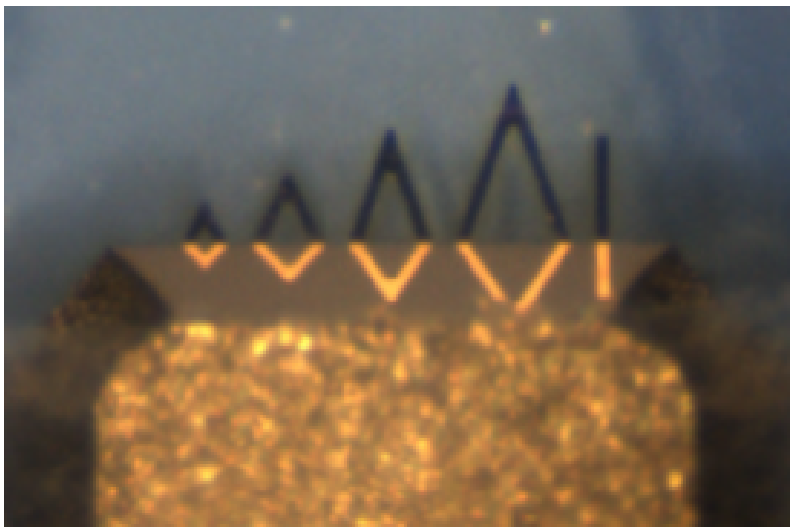


Abb. 26: Aufnahme eines MLCTO10-Cantilevers unter dem optischen Mikroskop. Zu sehen sind die vier unterschiedlich großen triangulären Spitzen links und die rectanguläre Spitze auf der rechten Seite. Die Probe befindet sich eingespannt in einen Glaskopf. Der bläulich schimmernde Hintergrund ist die poröse Membranoberfläche.

5.2 Funktionalisierung des Cantilevers

Für die Adhäsions- und Reibungsmessungen werden Cantilever vom Typ MLCT-O10 verwendet. Eine Cantileverabbildung unter dem optischen Mikroskop findet sich in Abbildung 26. Die Cantilever bestehen aus Siliziumnitrid und wurden von der Firma Bruker hergestellt. Auf einer der beiden Seiten sind sie mit Gold beschichtet. Da die Beads auf einer flachen Oberfläche befestigt werden sollen, besitzen sie keine Spitzen. Außerdem erscheinen sie unter einigen optischen Mikroskopen als transparent, was die Positionierung und Überprüfung der Beads einfacher gestaltet. Insgesamt sind an dem Cantileverchip 5 trianguläre und ein rechteckiger Cantilever angebracht.

Zu sehen sind in Abbildung 26 insgesamt 5 Cantilever. Dabei handelt es sich von links nach rechts um vier trianguläre und einen rechteckigen Cantilever. Der rechteckige Cantilever wird mit dem Buchstaben B bezeichnet. Die triangulären Cantilever von rechts nach links mit C bis F. Auf der anderen Seite des Chips befindet sich ein weiterer triangulärer Cantilever, der mit dem Buchstaben A gekennzeichnet ist. Der Cantilever C ist mit einer Länge von $300\mu m$ der größte der triangulären Cantilever und besitzt laut Hersteller eine Federkonstante von $0.01N/m$. Die genaue Federkonstante wurde für jeden Cantilever während der Messung bestimmt. Auf Grund der geringen Federkonstante ist er sehr sensitiv und reagiert empfindlicher auf etwaige Auslenkungen. Dadurch ist er am besten für unsere Messungen geeignet. Die Federkonstante von D läge bereits bei $0.03N/m$ und die der anderen kleineren Cantilever wäre dementsprechend noch höher, da sie noch steifer sind. Die Resonanzfrequenz des Cantilevers C beträgt $7kHz$ an Luft. Alle Messungen wurden in Pufferlösung, also in einem wasserähnlichen Medium durchgeführt, weswegen sich

die Resonanzfrequenz ungefähr halbiert.

Vor Beginn der Messung muss der Cantilever mit Biotin beschichtet werden, sodass der mit Streptavidin funktionalisierte Bead am Cantilever haftet. Um diese Biotinschicht herzustellen, wird Bovine Serum Albumine Biotin oder kurz BSA-Biotin verwendet. Davon werden $1mg$ in $1mL$ PBS-Puffer gelöst und dann auf zwei Mikroreaktionsgefäße mit jeweils $0.5mL$ aufgeteilt. Danach werden beide Gefäße mit weiteren $0.5mL$ PBS-Pufferlösung aufgefüllt. Wie auch schon bei der DNA-Lösung wird die entstandene Lösung auf verschiedene kleinere Mikroreaktionsgefäße mit jeweils $150\mu L$ aufgeteilt. Die Mikroreaktionsgefäße werden eingefroren. Durch die Aliquotierung muss immer nur ein Gefäß pro Cantilever aufgeteilt werden, was die Gefahr von Verschmutzung reduziert.

In eine Petrischale werden zwei Mikroreaktionsgefäßdeckel gestellt. Einer davon wird mit $150\mu L$ BSA-Biotinlösung gefüllt und der zweite mit Wasser aufgefüllt. Der zweite Mikroreaktionsgefäßdeckel soll dafür sorgen, dass die BSA-Biotinlösung nicht austrocknet. Der Cantilever wird in den ersten Mikroreaktionsgefäßdeckel mit der BSA-Biotinlösung gelegt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Cantilever untergetaucht wird und nicht auf der Oberfläche treibt. Die Petrischale wird mit Parafilm verschlossen, sodass das Risiko einer Austrocknung weiter gesenkt wird. Die Cantilever müssen mindestens 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubieren. Pro Messung werden zwei Cantilever angefertigt, da diese sehr fragil in der Handhabung sind. Wenn sie nicht gebraucht werden, können sie zwei bis drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.3 Verwendete Oberflächen

Im Folgenden sollen die verschiedenen Oberflächentypen vorgestellt werden, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Es handelt sich hierbei um Oberflächen, an denen DNA angebunden wurde beziehungsweise mit denen die DNA interagiert hat. Cellulosenitrat ist eine Oberfläche, an die die DNA zu Beginn angebunden war, aber es wurden auch Messungen darauf durchgeführt. Andere Oberflächen waren ein selbstorganisiertes Blockpolymer, bestehend aus Polystyrol und Polyvinylpyridin, sowie eine Glasfläche, die mit Poly-L-Lysin beschichtet war.

5.3.1 Cellulosenitrat

Cellulosenitrat ist ein häufig verwendetes Polymer in der Molekularbiologie, welches bereits seit über 30 Jahren verwendet wird. [56] Es bildet ein Konstrukt, an das Polymere wie DNA, RNA oder Proteine nichtkovalent und irreversibel angebunden werden. Es wird vermutet, das die Polymere über hydrophobe oder elektrostatische

Effekte an die Oberfläche gebunden werden. Bis heute ist die genaue Anbindungsart allerdings nicht geklärt. Cellulosenitrat bildet eine ungefähr 20 bis 30 µm dicke Membran, die aus mehreren Poren besteht. Durch ihre dreidimensionale Matrix bietet sie mehrere Anbindungsmöglichkeiten als eine zweidimensionale Oberfläche mit den gleichen Maßen wie zum Beispiel funktionalisierte Glasoberflächen. Des Weiteren ist Cellulosenitrat ungiftig, was die Handhabung des Stoffes erleichtert. Die Strukturformel von Cellulosenitrat ist in Abbildung 27 zum besseren Verständnis aufgezeichnet.

Cretich et al. untersuchten die Anbindungskapazitäten von DNA-Molekülen an mit Cellulosenitrat beschichteten Glasoberflächen.[56] Die Celluloseoberflächen wurden teilweise mit Copoly(DMA-NAS-MAPS) beschichtet. Es handelt sich hierbei um Copoly(N,N-dimethylacrylamid-N-acryloyloxysuccinimid-3-(trimathoxysilyl)propylmethacrylat).

Bei den DNA-Molekülen handelt es sich um Oligonukleotide, die mit Aminogruppen funktionalisiert sind. Die Aminogruppen sind leicht positiv geladen und werden häufig zur Anbindung an Oberflächen verwendet. Die Anbindungsrate wird über Fluoreszenzaufnahmen von den verschiedenen Positionen bestimmt. Die Konzentration der Oligonukleotide wird dabei schrittweise von 0.1 µM auf 15 µM erhöht. In Abbildung 28 sind die Fluoreszenzaufnahmen der drei Oberflächen, Glas mit Copoly(DMA-NAS-MAPS), Cellulosenitrat mit Copoly(DMA-NAS-MAPS) und Cellulosenitrat ohne (DMA-NAS-MAPS), zu sehen. Die Konzentration der Oligonukleotide steigt dabei von links nach rechts und von oben nach unten an. In der oberen Reihe sind von links nach rechts die Konzentrationen 0.1 µM, 0.5 µM und 1 µM abgebildet. Die untere Reihe zeigt die Konzentrationen 5 µM, 10 µM und 15 µM. Es lässt sich feststellen, dass mit einer steigenden Konzentration auch die Fluoreszenz ansteigt. Generell binden bei der jeweils gleichen Konzentration die Oligonukleotide eher an der Cellulosenitratoberfläche als an der Glasoberfläche an. Bei einer Konzentration von 0.5 µM und 1 µM ist die Anbindungsrate von den Oligonukleotiden bei beiden Cellulosenitratoberflächen mit und ohne Copoly(DMA-NAS-MAPS) gleich hoch. Bei einer Konzentration von 5 µM und 10 µM haften die Oligonukleotide eher an Cellulosenitratoberflächen mit Copoly(DMA-NAS-MAPS). Bei einer Konzentration von 15 µM haften mehr Oligonukleotide an Cellulosenitratoberflächen ohne Copoly(DMA-NAS-MAPS).

Während unserer Messung wird die Cellulosenitratoberfläche zusätzlich mit nicht funktionalisierter DNA versehen. Die zusätzliche negative Ladung der DNA-Stränge auf der Oberfläche soll dafür sorgen, dass die DNA nicht auf der Oberfläche liegt, sondern aufgerichtet über der Oberfläche treibt.

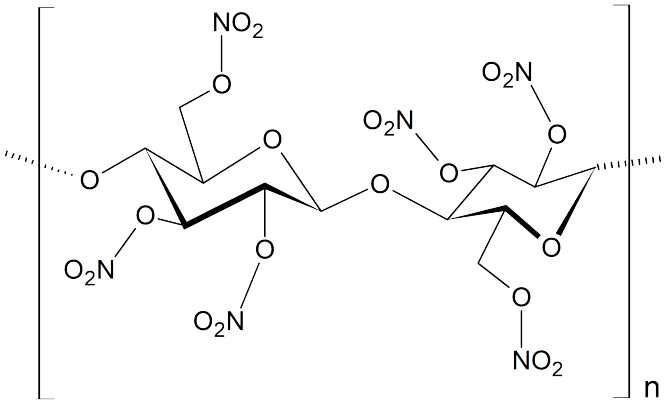


Abb. 27: Strukturformel von Cellulosenitrat. Es besteht aus zwei Cyclopentanring mit einem eingeschlossenen Sauerstoffatom. Die beiden Ringe sind über ein Sauerstoffatom miteinander verbunden. An jedem Ring sind drei Stickstoffdioxidgrupppen über eine einzelnes Sauerstoffatom angebunden. [57]

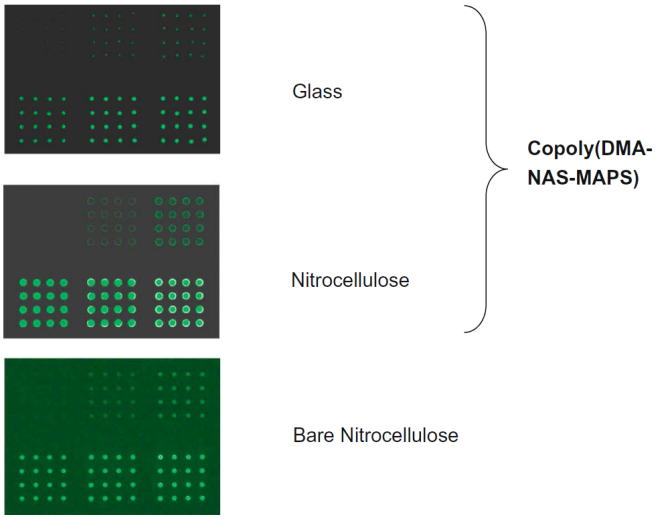


Abb. 28: Fluoreszenzmessung von aminomodifizierten Oligonukleotiden auf drei verschiedenen Oberflächen. Die Glasoberfläche ist mit Copoly(DMA-NAS-MAPS) modifiziert genau wie eine der beiden Cellulosenitratoberflächen. Die dritte Oberfläche ganz unten ist nur mit Cellulosenitrat versehen. Die Oligonukleotidkonzentration wird von links nach rechts und von oben nach unten auf den jeweiligen Probenoberflächen erhöht. Es zeigt sich, dass die Fluoreszenz mit steigender Konzentration ansteigt. Des Weiteren ist die Fluoreszenz auf den Glasoberflächen mit Cellulosenitrat höher wie auf der Glasoberfläche ohne Cellulosenitrat.[56]

5.3.2 Selbstorganisation-Blockpolymere

Die in dieser Arbeit verwendete poröse Membran ist aus AB-Blockcopolymeren aus Styrol und 4-Vinylpyridin assembliert. [58] Diese entstehen durch eine anionische Polymerisation, indem die Monomere nacheinander an die wachsenden Makroionen angelagert werden und das Carbanion an das Ende der Kette übertragen wird. Der Vorteil einer anionischen Polymersiation ist der quantitative Umsatz und die geringe mittlere Molmassenverteilung. Dadurch entstehen lineare Polymerblöcke mit einer ähnlichen Länge. Das Wachstum wird durch das Ausbleiben von weiteren Monomeren pausiert. Typische Monomere für die Carbanionische Polymerisation sind Butadien, Isopren, Styrol, 4-Vinylpyridin, Methylmethacrylat und Vinylferrocen. Durch die Zugabe von weiteren Monomeren, diesmal einer anderen Art entsteht ein zweiter Block. Diese Reaktion wird durch die Zugabe von Elektrophilen abgebrochen wie zum Beispiel Wasser oder HCl. Als Initiator für diese Reaktion werden häufig starke Basen oder die Einelektronenübertragung verwendet. Bei der Herstellung der hiesigen Membran wurde sec-BuLi (sec-ButhylLithium) in THF verwendet.

Die gesamte Reaktion wird unter dem Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt, da dieser die Reakton gefährdet. Gleiches gilt für Wasser.

Nur wenn die Ketten die gleiche Länge haben kommt es zu einer geordneten Struktur. Die Zugabe von Magnesiumacetat sorgt im späteren für eine homogenere Strukturierung. [59]

Blockpolymere beinhalten mindestens zwei verschiedene Arten von Polymersträngen. Blockpolymere, bei denen ein Polymerstrang an einen weiteren Polymerstrang geknüpft wird, bezeichnet man als AB-Blockcopolymere oder Diblock-Copolymere(AB). Blockpolymere, bei denen drei verschiedene Polymerstränge aneinander geknüpft werden, nennt man ABC-Blockpolymer oder Triblock-Copolymer(ABC). Blockcopolymere, bei denen ein Strang aus einem Polymer A an einen Strang aus einem Polymer B und dann wieder an einen Strang aus Polymer A geknüpft ist, bezeichnet man als Triblock-Copolymer(ABA). Des Weiteren gibt es Polymerstränge, die an den Enden funktionalisiert sind. Diese bezeichnet man als α-ω-Endgruppenfunktionalisierte Polymere. (Abbildung 29)

5.3.3 Poly-L-Lysin

Poly-Lysin ist ein Polymer, welches positiv geladen ist und deswegen sehr häufig zur Anbindung von DNA verwendet wird. [60] [61] [62] Die Strukturformel von Poly-L-Lysin zeigt Abbildung 30. Es handelt sich hierbei um ein Enantiomer, was bedeutet, dass es von ihm nicht überlappbare Spiegelbilder gibt. Dieses Phänomen bezeichnet man als Chiralität. [63] Poly-Lysin lässt sich in Bezug auf die Chiralität in Poly-L-Lysin und Poly-D-Lysin unterteilen. In der hiesigen Arbeit wird Poly-L-

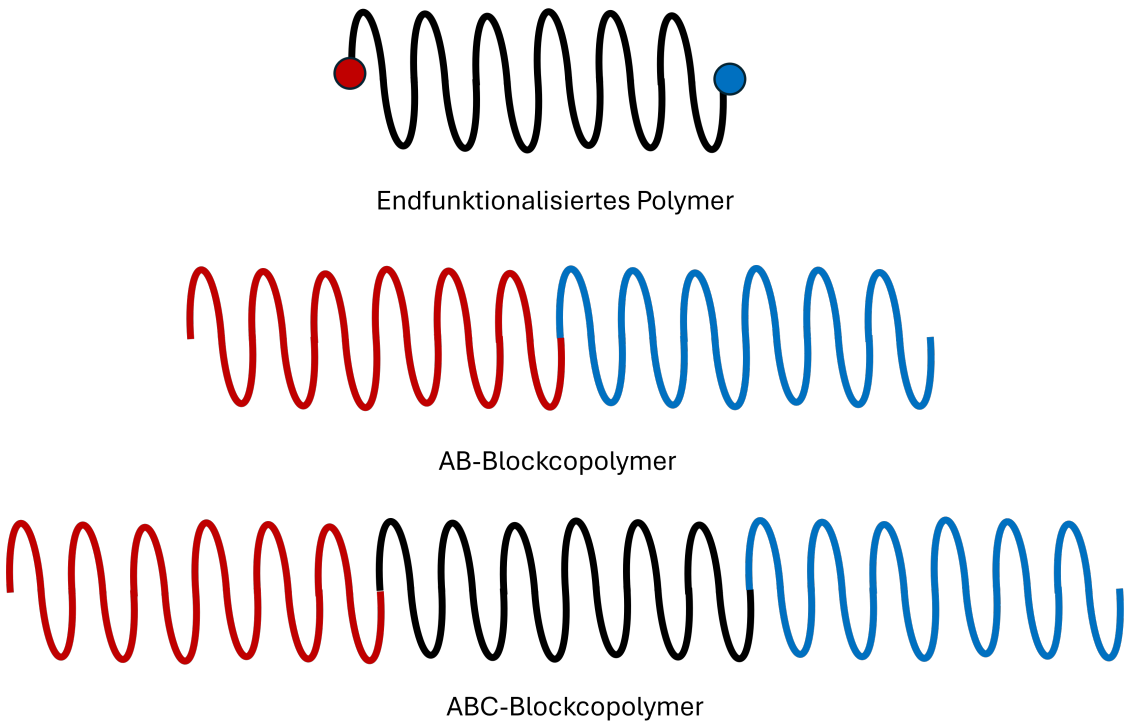


Abb. 29: Schemata für drei verschiedene Polymerarchitekturen. Oben sieht man ein Konstrukt, welches aus einem einzelnen Polymerstrang besteht, der an beiden Enden funktionalisiert ist. Darunter befindet sich ein AB-Blockcopolymer, welches aus zwei verschiedenen Polymersträngen besteht. Unten ist ein ABC-Blockcopolymer abgebildet, welches aus insgesamt drei verschiedenen Polymersträngen besteht.

Lysin verwendet. Poly-Lysin besteht aus einer Heptankette, an deren zweiter Stelle eine Ketongruppe sitzt, an der dritten Stelle eine Aminogruppe und an der letzten Stelle eine Sticktoffhydroxygruppe. [64]

Wie stark Poly-L-Lysin an die DNA bindet, hängt sehr von dem pH-Wert ab. Dem widmete sich Wagner et al. [66] Bei einem leicht säuerlichen pH-Wert von 5.4 ist der Lysin-Polymerstrang komplett protoniert und somit sehr stark positiv geladen. Die DNA selbst ist durchgängig negativ geladen, weswegen sich die beiden Stränge gleichmäßig aneinender schmiegen. Bereits nach einer kurzen Simulationszeit von 10 ns sind sie stark miteinander verbunden. Bei einem neutralen pH-Wert von 7.4 ist der Poly-L-Lysinstrang nur zu ungefähr 50% protoniert. Das bedeutet, dass der Strang weniger positiv geladen ist und nicht so gut an die DNA anbindet. Nach ungefähr 10 ns ist er nur stellenweise an den DNA-Strang angebunden. Dennoch formt sich der Polyplex nach einer längeren Zeit komplett. (Abbildung 31)

Ein weiterer wichtiger Faktor ist das N/P-Verhältnis. Dabei steht N für die Anzahl der Stickstoffe in der PLL-Einheit und P für die Anzahl der Phosphate im Rückgrat des DNA-Stranges. Die Aminogruppen sind folglich leicht positiv geladen, die

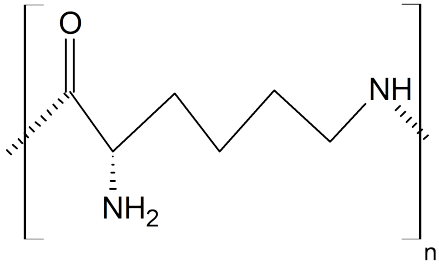


Abb. 30: Strukturformel von Poly-Lysin. Poly-Lysin besteht aus einer Heptankette an deren zweiter Stelle eine Ketongruppe sitzte, an der dritten Stelle eine Aminogruppe und an der letzten Stelle eine Sticktoffhydroxygruppe. [65]

Phosphatreste sorgen für eine negative Ladung. Ein höheres N/P-Verhältnis sorgt für eine bessere Anbindung der DNA.

Die Stabilität des gebildeten Polyplexes lässt sich direkt an der Anzahl der Wasserstoffbrücken abzählen, die dominant für diese Bindung sind. Bei einem niedrigeren pH-Wert von 5.4 gibt es die ersten Wasserstoffbrücken nach $2ns$, bei einem pH-Wert von 7.4 erst nach $7ns$. Des Weiteren steigt die Anzahl der Wasserstoffbrücken bei 5.4 auch sehr viel steiler an als bei 7.4. Mit der Zeit nähern sie sich allerdings an. Ein weiteres Indiz ist die Stärke der Wasserstoffbrücken. Die Energie der Wasserstoffbrücken steigt bei dem geringeren pH-Wert von 5.4 sehr viel schneller an als bei 7.4. Die Wasserstoffbrücken innerhalb des Komplexes sind also sehr viel schwächer und seltener, was zu einer langsameren Bildung des Polyplexes führt.

Hards et al. führten Zugexperimente mit DNA auf Poly-L-Lysinoberflächen durch. [67] Die Bindung wurde währenddessen unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Dadurch konnten sie feststellen, dass die gesamte DNA mit der Poly-L-Lysinoberfläche verbunden war und nicht nur punktuell. Außerdem stellten sie fest, dass die DNA bei Abrisskräften von über $70pN$ um bis zu das 1.6-fache gestreckt wurde. Dennoch war es nicht möglich ein B-S-Plateau zu sehen.

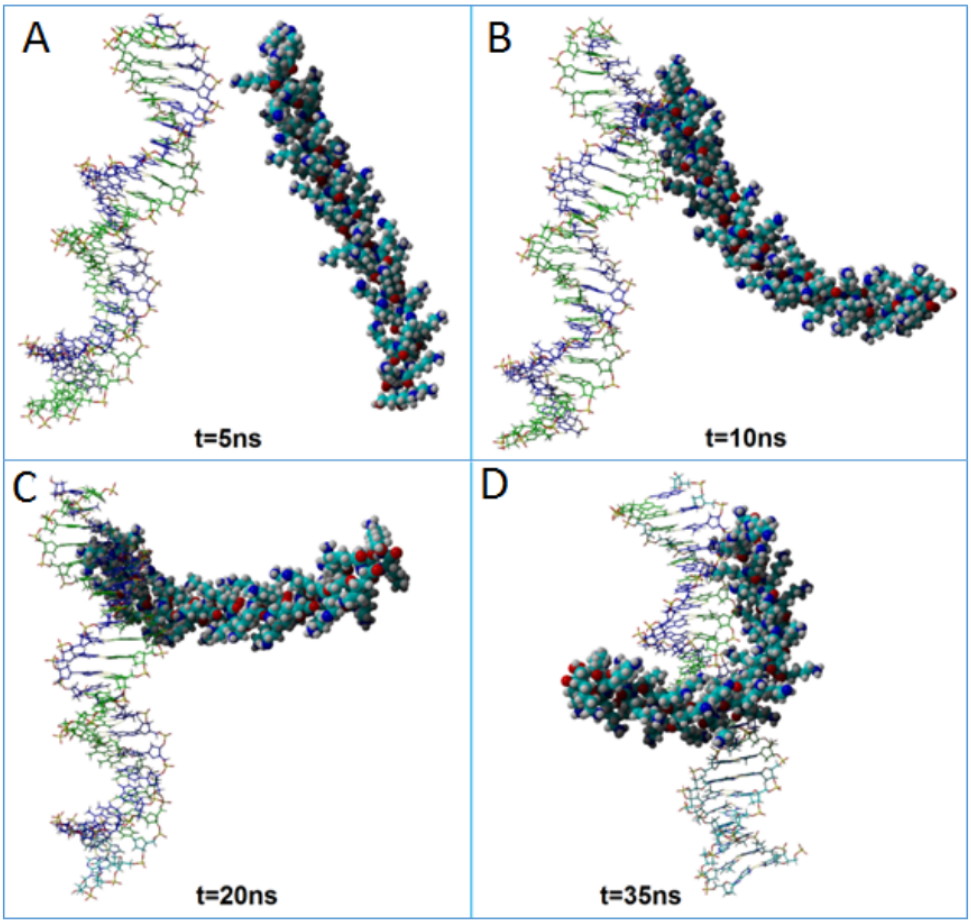


Abb. 31: Simulation der Formung eines Polyplexes, bestehend aus PLL(rechts) und DNA (links). Der pH-Wert liegt im neutralen Bereich bei 7.4. Die Zeitintervalle sind $5ns$, $10ns$, $20ns$ und $35ns$. Das PLL-Polymer nähert sich dem DNA-Komplex zuerst an und umschlingt ihn danach zunehmend. [61]

5.4 Funktionalisierung der Cellulosenitratoberfläche

Um die DNA-Stränge mit dem Cantilever aufzusammeln, müssen diese zunächst immobilisiert werden. Ansonsten würden sie auf Grund der Cantileverbewegung davontreiben. Um dies zu verhindern, wird eine Cellulosenitratoberfläche mit Anti-Digoxigenin beschichtet, welches mit dem mit Digoxigenin funktionalisiertem Ende der DNA reagiert. Um zu verhindern, dass sich die DNA auf die Oberfläche legt, wird diese zusätzlich mit nicht funktionalisierter DNA geblockt. Dadurch treibt die DNA wie eine Boje über der Oberfläche(vergleiche Abbildung 32). Das andere DNA-Ende wird mit einem Bead gekoppelt, der mit Streptavidin beschichtet ist. Dieser Bead ist im Gegensatz zur DNA unter dem Mikroskop sichtbar, weswegen die DNA mit dem Cantilever direkt anvisiert werden kann.

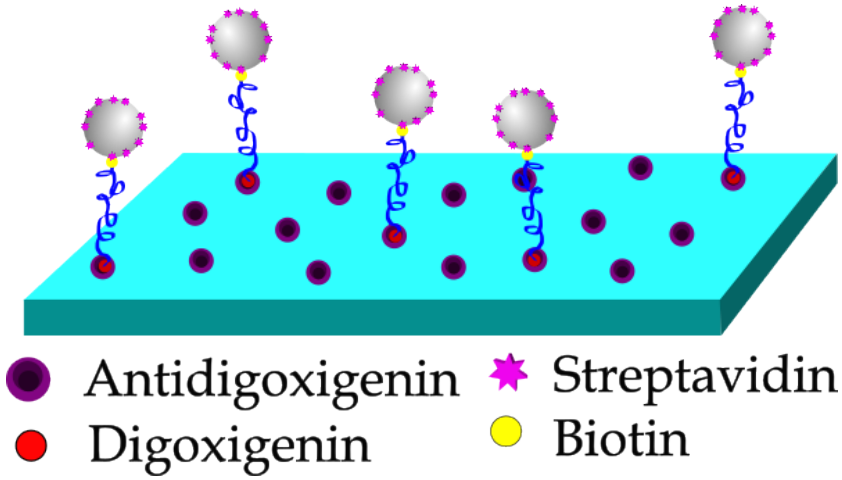


Abb. 32: Schema der zu untersuchenden Probenoberfläche. Die mit Cellulosenitrat beschichtete Oberfläche wird mit Anti-Digoxigenin versehen, an dem die einzelnen DNA-Stränge andocken können. Auf der anderen Seite werden sie mit Beads mit einem Durchmesser von $1\mu m$ funktionalisiert.

Vorbereitung der Glasoberflächen

Bei den Cellulosenitratoberflächen handelt es sich zunächst um Glasplättchen mit einem Durchmesser von $15mm$ x $15mm$. Bevor sie beschichtet werden, müssen sie zunächst gereinigt werden. Zu Beginn der Messungen wurden sie mit Aceton und Isopropanol gereinigt. Dazu wurden die Glasplättchen in ein mit Aceton gefülltes Gefäß gestellt. Dies wurde in ein Ultraschallbad von Elmasonic gestellt und dort mit einer Frequenz von $37kHZ$ 10 Minuten lang beschallt. Dieser Prozess wurde danach mit Isopropanol wiederholt, da sich wegen dem Aceton beim Trocknen kleine Salzkristalle auf der Oberfläche bilden. Danach müssen die Plättchen möglichst zügig mit einer Stickstoffpistole getrocknet werden, da sie im feuchten Zustand

anfälliger für Kontamination sind.

Im weiteren Verlauf wurde die Reinigungsmethode verändert. Statt dem Aceton und dem Isopropanol wurden die Plättchen mit dem alkalischem Lösungsmittel Hellmanex III gereinigt. Dieses reduziert die Oberflächenspannung. Zur Reinigung werden die Plättchen in ein Gefäß gestellt und es wird $1mL$ Hellmanexlösung auf die Plättchen pipettiert. Danach wird das Gefäß mit normalem Leitungswasser aufgefüllt. Das Ganze wird für 20 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Danach werden die Plättchen 10 Mal mit normalem Leitungswasser abgewaschen, sodass sich die Hellmanexrückstände lösen. Danach werden sie wie vorher mit der Stickstoffpistole getrocknet. Zwischen beiden Reinigungsmethoden konnte unter dem AFM bei den Oberflächenmessungen kein Unterschied festgestellt werden. Die Reinigung mit Aceton und Isopropanol ist zeitlich aufwendiger und die Lösungen müssen in speziellen Kanistern entsorgt werden. Die Hellmanexlösung kann stattdessen über das Waschbecken entsorgt werden. Deswegen entschieden wir uns im Verlauf der Messungen für die Reinigung mit Hellmanex III. Zu Beginn der Arbeit wurden manche Plättchen zusätzliche mit dem Plasmareiniger gesäubert. Da dieser Arbeitsschritt für keine reineren Proben sorgte, wurde er im späteren Verlauf weggelassen.

Herstellung der Cellulosenitratlösung

Für die Herstellung der Cellulosenitratlösung wird zunächst eine $10mg/mL$-Stocklösung hergestellt, dazu werden $4mg$ Cellulosenitrat in $400\mu L$ Amylacetat gelöst. Vor jeder Oberflächenbeschichtung wurde ein Teil der Stockinglösung verdünnt. Dafür werden $5\mu L$ der Cellulosenitrat-Amylacetatlösung mit $15\mu L$ Amylacetat vermischt. Von dieser verdünnten Lösung wird jeweils $1\mu L$ auf ein Glasplättchen pipettiert. Dies wird danach gleichmäßig mit der Pipettenspitze verstrichen. Anschließend werden die Plättchen bei $75°C$ eine halbe Stunde lang zum Aushärten im Backofen gebacken. Die Glasplättchen können bis zu 4 Wochen in einem Exsikkator bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Beschichtung der Oberfläche

Die Glasplättchen werden für die Messung mittels doppelseitigem Kaptonklebeband auf einen Objektträger oder direkt in eine Petrischale geklebt. Um die mit Antidigoxigenin und DNA-Lösung funktionalisierte Stelle später wiederzufinden, haben wir vorher ein Loch in das Kaptontape gestanzt. Nur in diesem Bereich werden die Lösungen aufpipettiert. Das Loch wird mit einem üblichen Bürolocher gestanzt. Ein Schema für die Anbringung der Glasplättchen findet sich in Abbildung 33. Sollte das Plättchen nicht direkt in eine Petrischale geklebt werden, wird der Objektträger für die weiteren Vorbereitungen in eine Petrischale gelegt.

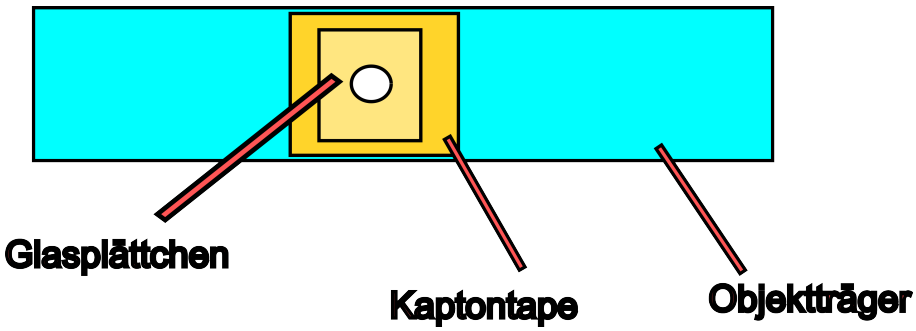


Abb. 33: Schema zur Befestigung des Glasplättchens. Auf dem Objektträger wird ein rechteckiges Stückchen Kaptonklebeband befestigt. Dieses hat in der Mitte ein Loch. Auf die andere Seite des doppelseiten Klebebands wird das Glasplättchen geklebt.

Als Nächstes wird die Oberfläche mit Anti-Digoxigenin-AP (Roche Diagnostics GmbH Mannheim) funktionalisiert.Für die Vorbereitung der Antidigoxigeninlösung wird $2,5\mu L$ Anti-Digoxigenin mit $12,5\mu L$ PBS-Puffer der Firma Gibco von Thermofischer (pH-Wert von $7,4$) verdünnt. Ein $10\mu L$ großer Tropfen der Lösung wird auf das Glasplättchen direkt über dem Mittelpunkt des Stanzlochs gesetzt. Die Lösung inkubiert für 20-30 Minuten. Die Petrischale wird wegen der Gefahr des Austrocknens mit Parafilm verschlossen. Sollte sich die Probe auf dem Objektträger befinden, wird neben diesen zusätzlich ein mit Wasser gefülltes Mikroreaktionsgefäß gestellt. Ansonsten ist die Petrischale klein genug, sodass dies nicht nötig ist. Nach der Inkubationszeit wird das Plättchen mit PBS abgespült.

Herstellung der Blockinglösung

Um zu verhindern, dass sich die DNA-Stränge während den Messungen auf die Oberfläche legen, wird die Cellulosenitratoberfläche mit negativer Ladung geblockt. Dazu wird eine Blockinglösung, die aus einer Block-Reagenz der Firma Roche angereichert wird, verwendet. Sie besteht aus einzelnen nicht funktionalisierten DNA-Strängen, welche sich auf der Oberfläche ablagern. Für die Herstellung der Blockinglösung muss die pulverförmige Block-Reagenz in einer speziellen Pufferlösung gelöst werden. Dazu werden zunächst $0,1161g$ Maleinsäure in $4mL$ Milli-Q-Wasser gelöst. Danach werden $0,08766g$ NaCl hinzugefügt. Die Pufferlösung muss einen neutralen pH-Wert besitzen, weswegen dieser mit einer pH-Elektrode überprüft wird. Da die Lösung bis zu diesem Zeitpunkt im sauren Bereich liegt, wird so lange NaOH (1M) hinzugefügt, bis die Lösung einen pH-Wert von $7,5$ erreicht hat. Danach wird das Volumen der Lösung auf $9mL$ aufgefüllt und der pH-Wert erneut überprüft. Sollte der pH-Wert sich verändern, wird erneut NaOH(1M) hinzugefügt, bis der pH-Wert wieder bei $7,5$ liegt. Danach wird das Volumen auf $10mL$ aufgefüllt. $1g$ der Block-Reagenz werden danach in $10mL$ Pufferlösung aufgelöst. Zum besseren Lösen wird die Lösung in einem magnetischen Rührgerät erhitzt und gerührt, bis das Pulver sich komplett aufgelöst hat. Danach wird die Lösung autoclaviert und jeweils im Verhältnis 1:10

mit PBS(1x) verdünnt. Die fertige Blockinglösung wird bis zu ihrer Verwendung im Gefrierfach gelagert.

Die so entstandene Blocklösung wird als $10\mu L$ großer Tropfen auf die Stanzstelle gegeben und dann 2 Mal alle 30 Minuten gewechselt. Danach wird die Oberfläche erneut mit PBS gespült.

Vorbereitung der Bead-DNA-Lösung

Bevor die verdünnte DNA-Lösung auf der Oberfläche aufgetragen wird, wird sie mit den Beads vermengt. Dabei handelt es sich um MyOnebeads von Thermofischer. Das sind kleine Polymerkügelchen mit einem Eisenkern von $1\mu m$ Durchmesser, die mit einer Monolage Streptavidin beschichtet sind. Das Streptavidin ist kovalent an die Beadoberfläche gebunden. Die Beads sind hydrophil, negativ geladen und dafür bekannt, schnell in flüssigen Medien zu reagieren. Durch ihre weitestgehend einheitliche Größenverteilung mit einem CV $< 5\%$ sind Ergebnisse mit Beads sehr leicht reproduzierbar. Bevor die Beads verwendet werden können, müssen sie gereinigt werden. Dazu werden $10\mu L$ der Beadlösung mit $90\mu L$ PBS-Puffer gemischt. Da die Beads magnetisch sind, können sie mit einem Magneten an den Boden des Mikroreaktionsgefäßes gezogen werden. Der Überschuss kann somit leicht abpipettiert werden. Dieser Vorgang wird 5 Mal wiederholt, wobei die Lösung jeweils mit $90\mu L$ aufgefüllt und danach wieder abpipettiert wird.

Oberflächenfunktionalisierung mit DNA

Danach wird die DNA-Beadlösung auf die Oberfläche pipettiert. Diese besteht aus $0.5\mu L$ DNA (1:100) verdünnt und $0.5\mu L$ Beadlösung. Im späteren Verlauf wurde die DNA-Konzentration auf 1:1000 geändert und die Beadlösung auf !:10 verdünnt. Die Inkubationszeit der Beads-DNA Mischung beläuft sich auf 20-30 Minuten. Danach wird die Probe schräg gehalten, sodass überschüssige DNA-Stränge, die sich nicht auf der Oberfläche angedockt haben, entfernt werden können. Die Oberfläche wird mehrmals mit PBS gespült. Zuletzt wird die Oberfläche mit $10\mu L$ DNA-Lösung geimpft. Dieser Schritt wurde im Verlauf der Messreihe als unnötig erachtet und weggelassen.

5.5 Herstellung der porösen Membranoberfläche

Die verwendete Membran besteht aus sich selbst anordnenden Strängen, die auf der einen Seite aus Polystyrol und auf der anderen Seite aus Poly-(4-Vinyl-Pyridin) bestehen. Das Poly-(4-Vinyl-Pyridin) ist zudem methyliert, was für eine positive

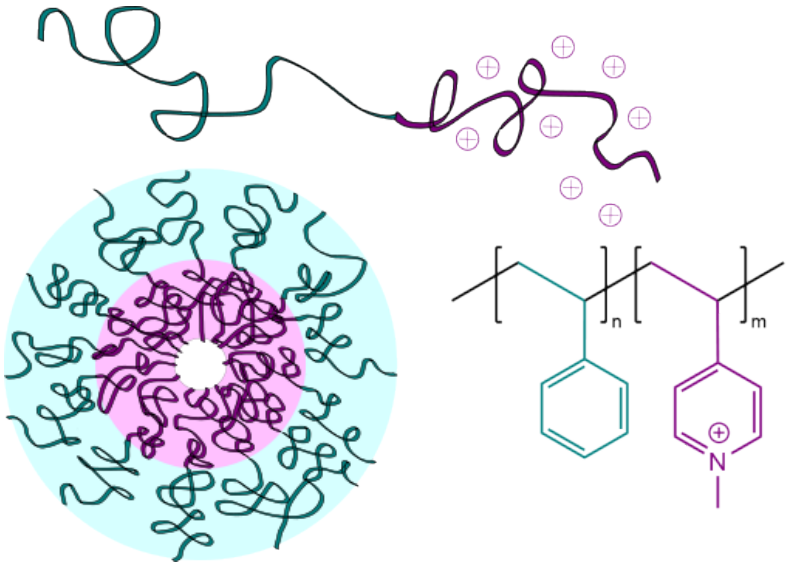


Abb. 34: Darstellung einer einzelnen Pore, die aus verschiedenen Strängen besteht. Die Stränge selbst bestehen auf der einen Seite aus Polystyrol (grün) und Poly-(4-Vinyl-Pyridin (violett). Der P4VP-Anteil ist methyliert und somit positiv geladen. Anbei befindet sich die Strukturformel der Polymerketten. [4]

Ladung sorgt. Das dazugehörige Gegenion bildet Iodid (Abbildung 34).

Diese positive Ladung soll eine Interaktion der negativen DNA mit der Probenoberfläche begünstigen. Bei der Porenbildung ordnen sich die Stränge so an, dass die positiv geladenen Poly-(4-Vinyl-Pyridin)-Anteile den Umriss der Pore bilden (Abbildung 34). Der Polystyrolanteil füllt die Zwischenräume zwischen den Poren aus. Diese speziell auf die Porenöffnung begrenzte positive Ladung soll ein Einfädeln der DNA in die Pore begünstigen.

PS-b- P4VP wird fortlaufend durch eine anionische Polymerisation bei -67°C in THF synthetisiert. Davor werden die einzelnen Monomere und das Lösungsmittel destilliert. Durch die Hinzugabe von sekundärem Buthyllithium wird die Synthese gestartet. Nach zwei Studen wird P4VP mit Hilfe einer Spritze in die Lösung gemischt. Alles wird für 4 Stunden mit einem magnetischen Rührgerät gerührt. Zum Beenden der Reaktion wird Methanol beigefügt. Die Lösung wird konzentriert und das THF unter verringertem Druck entfernt. Das entstandene Polymer wird in Wasser aufgefangen und dann später im Vakuum getrocknet.

Um die Membran zu bilden, wird ein getrocknetes Blockcopolymer in THF/ DMF(40/60) aufgelöst. Dadurch entsteht eine 20wt% Lösung, die 48 Stunden lang gerührt wird. Zur Entstehung der Poren wird Magnesiumacetat(0,15wt%) zugesetzt. Das Polymer wird gerakelt,sodass die entstandene Oberfläche eine Höhe von 150 µm hat. Nach Z Minuten werden die Oberflächen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 20°C für 5 Minuten gelegt und werden dann 24 Stunden an

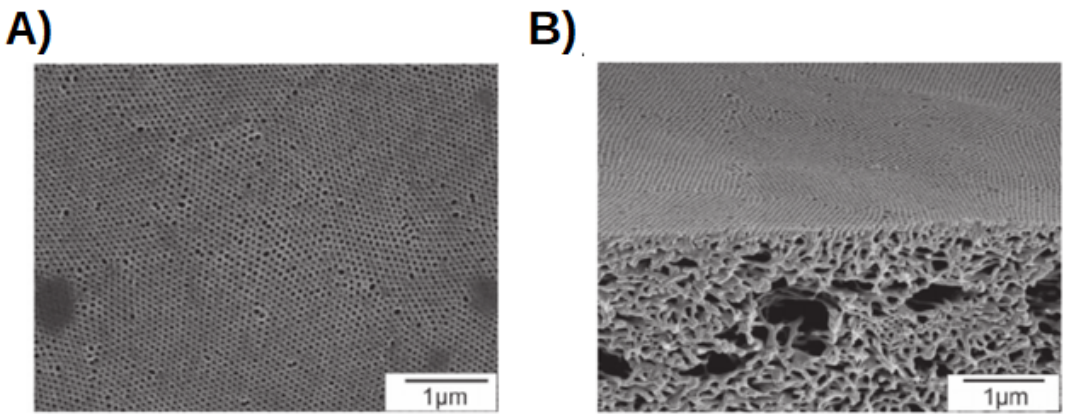


Abb. 35: SEM-Aufnahmen einer porösen Membranoberfläche. Abbildungsteil A) zeigt die Oberfläche von oben. Die Poren sind gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Abbildungsteil B) zeigt einen Querschnitt von der porösen Membranoberfläche. Unterhalb der Oberfläche sieht man die Verästelungen der Poren, die sich zu einem Schwamm formen.[59]

Luft und 24 Stunden im Vakuumofen bei 60°C getrocknet.

Bei den Membranoberflächen sind die Poren homogen verteilt, jedoch nicht linear aneinander gereiht. Stattdessen bilden sie einzelne Domänen, die von Korngrenzen abgetrennt werden. (Abbildung 35A)) Die einzelnen Porenwälle verästeln sich unterhalb der Oberfläche zu verschiedenen Gängen, die eine Art Schwamm bilden. (Abbildung 35B))

5.6 Herstellung der Poly-L-Lysinflächen

Bei den verwendeten Poly-L-Lysinflächen handelt es sich nicht um Oberflächen, die komplett beschichtet sind. Stattdessen wurden lediglich einzelne Streifen mit Poly-L-Lysin angebracht. Die Idee dahinter war, die Andockpositon der DNA genauer zu bestimmen. Darauf wird im Speziellen noch im Ergebnisteil eingegangen. Die Herstellung der Poly-L-Lysin-Oberflächen besteht im Wesentlichen aus drei verschiedenen Schritten: Der Reinigung der verwendeten Glasplättchen, der Herstellung der Stempel und dem Drucken selbst. Das Herstellungsprotokoll ist angelehnt an die Arbeit von Zhang et. al. [68].

Reinigung der Glasplättchen

Bevor die Glasplättchen mit Poly-L-Lysin funktionalisiert werden können, müssen sie zunächst gereinigt werden. Dazu werden sie als erstes mit für $30min$ im Ultraschallbad mit Hellmanex (2%) gereinigt. Danach werden die Oberflächen mit destilliertem Wasser abgespült. Dies wird einmal wiederholt. Danach werden die

Proben für weitere $30min$ in Isopronal (50%) ins Ultraschallbad gestellt und zwei Mal mit destilliertem Wasser gespült. Dieser Schritt wird mit Aceton, Ethanol und destiliertem Wasser wiederholt. Die gereinigten Proben werden in destilliertem Wasser bis zu ihrer späteren Verwendung gelagert.

Herstellung der PDMS-Stempel

Danach werden die Stempel für die späteren Proben hergestellt. PDMS wird mit einem Härter in einem Verhältnis von 10:1 (w/w) vermischt. Diese PDMS-Lösung wird mit der Vakuumpumpe 5 Minuten lang verrührt und dann entgast. Die Silikonform wird vorbereitet und die PDMS-Lösung wird in die Form gefüllt. Das Ganze wird für 2 Stunden bei einer Temperatur von $95°C$ in den Ofen gestellt. Danach wird das PDMS vorsichtig aus der Form gelöst. Mit diesen Stempeln wurden für diese Arbeit Streifen mit einer Dicke von ungefähr $4\mu m$ hergestellt.

Drucken

Die PDMS-Stempel werden 10 Minuten lang mit Ethanol im Ultraschallbad gereinigt und dann zwei Mal mit MilliQ-Wasser gereinigt. Danach werden sie mit der Stickstoffpistole getrocknet. Danach werden die Stempel mit dem Plasmareiniger der Firma Diener plasma GmbH bei $0.3mbar$ für 2 Minuten gereinigt. $10\mu L$ der Poly-L-Lysin-Lösung werden auf dem Stempel aufgetragen. Für diese Lösung wurden $0.1mg$ Poly-L-Lysin in $1mL$ destilliertem Wasser aufgelöst. Die Lösung härtet 1 Stunde lang bei Raumtemperatur aus. Die überschüssige Lösung wird entfernt und die Stempeloberfläche vorsichtig mit der Stickstoffpistole getrocknet. Danach wird der Stempel für 5 Minuten in einem feuchten Container inkubiert.

Die Glasoberflächen werden ebenfalls 2 Minuten lang bei $0.3mbar$ im Plasmaofen gereinigt. Der Druckvorgang wird mit dem Drucker der Firma GESIM MicroContact Printer 4.1 (GESIM, Germany) durchgeführt. Die Stempel werden dabei mit einem Druck von $12kPa$ für 5 Minuten auf die Oberfläche gepresst. Dieser Vorgang findet bei Raumtemperatur in einem Abzug statt. Danach inkubieren die Oberflächen für $10Minuten$ bei Raumtemperatur und werden drei Mal mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wird PBS verwendet, da die Messungen später auch in PBS durchgeführt werden.

5.7 Rasterkraftmikroskop

Das Prinzip des Rasterkraftmikroskops wurde zum ersten Mal 1986 von Binning, Quate und Gerber bei der American Physical Society vorgestellt. [69] Es wur-

de als eine Weiterführung des Rastertunnelmikroskops angesehen und somit als Mischung von Rastertunnelmikroskop und Profilometer bezeichnet. Als einer der Vorzüge wurde vor allem genannt, dass die zu untersuchenden Proben durch die Messmethode nicht beeinflusst beziehungsweise beschädigt werden. Das Rasterkraftmikroskop, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, ist von JPK. Mittlerweile wird das Rasterkraftmikroskop in den unterschiedlichsten Bereichen wie Physik, Chemie, Biologie oder den Materialwissenschaften auf Grund seiner zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten eingesetzt.

Bei der Verwendung des Rasterkraftmikroskops wird die Probenoberfläche abgerastert beziehungsweise abgetastet und nicht wie bei vielen anderen Mikroskopen mit optischen Mitteln untersucht. [70] [71] [72] [73] Um dies besser zu verstehen, stelle man sich einen Blinden vor, der anhand seines Langstocks versucht seine Umgebung zu erkunden. Dies geschieht, indem er sein Umfeld mit konstanten Auf- und Abbewegungen abrastert. Bei dem Rasterkraftmikroskop, auf Engl. AFM, ist der Langstock ein Federbalken beziehungsweise auf Engl. Cantilever. Dieser Cantilever wird über Piezomotoren im Scankopf gesteuert. Somit kann er sowohl in x- y-Richtung als auch nach oben und unten bewegt werden. Der Probenhalter befindet sich unterhalb von dem Scankopf. Während den Messungen muss die Probe im Probenhalter gut befestigt sein, da kleinste Erschütterungen die Messergebnisse verfälschen können. Durch die Interaktion mit der Oberfläche wird der Cantilever ausgelenkt. Diese Auslenkung wird durch einen Lichtstrahl, der auf den Cantilever trifft, detektiert. Die Reflektion des Lichtstrahls wird auf einer Vierquadrantenphotodiode aufgenommen. Die Änderung der Position gibt Aufschlüsse über die Auslenkung des Cantilevers. Der reflektierte Strahl sollte eine möglichst hohe Intensität aufweisen, um es besser auswerten zu können. Diese Methode wird auch Lichtzeigerprinzip genannt (Abb. 36). Messungen mit dem AFM sind sowohl in Luft als auch in klaren Flüssigkeiten möglich, die den Lichtstrahl nicht unterbrechen. Mittlerweile gibt es aber auch spezielle AFMs, welche in nicht durchsichtigen Flüssigkeiten operieren können.

Eine der häufigsten Anwendungsmöglichkeiten sind Topographiemessungen, aber auch das Einritzen von Mustern in Oberflächen. Der Cantilever kann modifiziert werden, indem er magnetisch aufgeladen wird, um magnetische Domänen zu messen, oder an eine Spannung angelegt werden. Außerdem können Adhäsionsmessungen durchgeführt werden, indem zum Beispiel Zellen oder wie in dieser Arbeit einzelne DNA-Stränge an der Cantileverspitze befestigt werden. Des Weiteren können durch das Eindrücken von Oberflächen mit dem Cantilever Rückschlüsse auf deren Elastizität ermöglicht werden. Eine weitere wichtige Messmethode sind Reibungsmessungen, bei denen der Cantilever lateral ausgelenkt wird. Mittlerweile gibt es auch Highspeed- Rasterkraftmikroskope, die eine so hohe Frequenz aufweisen, dass die entstandenen Bilderaufnahmen einem Video gleichkommen.

Im Folgenden sind nun die drei Modi Kontaktmodus, Intermittierender Modus und Kraftspektroskopie beschrieben,die bei den Messungen für diese Arbeit verwendet

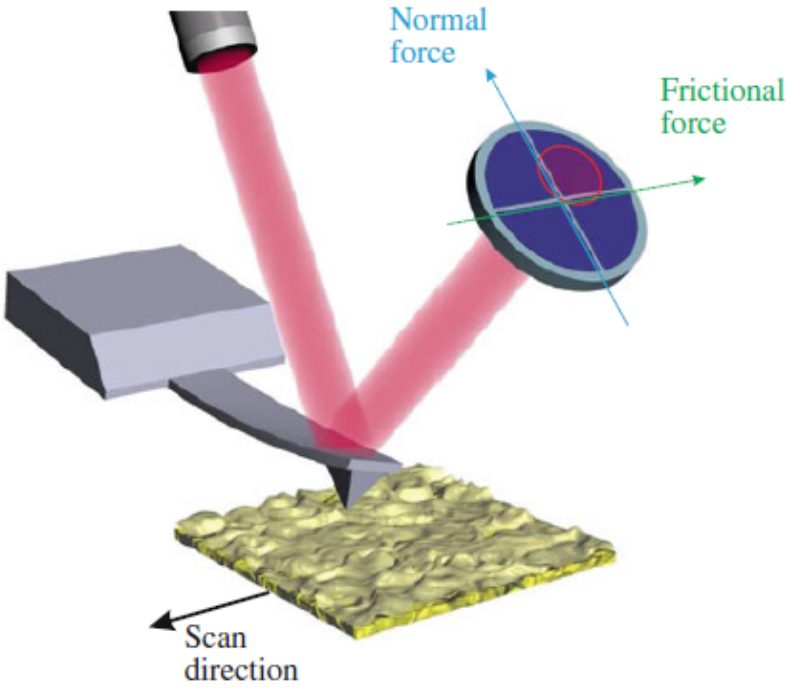


Abb. 36: Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Der Strahl wird zunächst auf den Cantilever projeziert. Das reflektierte Signal trifft auf eine Photodiode. Die Auslenkung der Cantilevers in laterale und horizontale Richtung wird durch die Auslenkung des Lasersignals auf der Photodiode signalisiert. [72].

wurden.

5.7.1 Kontaktmodus

Im Kontaktmodus wird die Probe direkt von der Cantileverspitze abgerastert, das heißt, die Spitze und die Oberfläche befinden sich im dauerhaften Kontakt. Durch Veränderungen auf der Oberfläche wird der Cantilever sowohl vertikal nach oben und unten als auch lateral nach rechts und links ausgelenkt. Das Höhensignal und die beiden Auslenkungssignale können danach abgegriffen und analysiert werden. Dadurch, dass die Spitze sich im direkten Kontakt befindet, kann die Oberfläche beschädigt werden, vor allem bei weichen Proben. Außerdem kann die Spitze nach mehreren Messungen auf harten unebenen Oberflächen stumpf werden, was die Qualität der Messungen verschlechtert.

5.7.2 Intermittierender Modus

Auch beim Intermittierenden Modus wird die Probe abgerastert, jedoch befindet sich der Cantilever nicht die ganze Messung über direkt auf der Oberfläche. Der

Cantilever tastet die Probe dabei durch Auf-und Abbewegungen ab. Zusätzlich wird die Spitze extern zur Schwingung angeregt. Die anregende Frequenz sollte dabei ungefähr der Resonanzfrequenz entsprechen. Die Wechselwirkung zwischen der Probenoberfläche und der Cantileverspitze verändert die Resonanzfrequenz und die Dämpfung des Systems, was eine Veränderung der Schwingungsamplitude und der Phase erzeugt. Phasenaufnahmen und Amplitudenaufnahmen können vor allem bei der Untersuchung von Proben, die aus unterschiedlichen Materialien bestehen, eine wichtige Rolle spielen oder bei Proben, die mit einem anderen Material verunreinigt sind. Die unterschiedlichen Wechselwirkungen der verschiedenen Materialien sind vor allem im Phasenbild gut sichtbar. Zudem hat der Intermittierende Modus den Vorteil, dass er die Proben nicht beschädigt, und ist somit vor allem für weiche biologische Proben geeignet.

5.7.3 Kraftspektroskopie

Kraftdistanz-beziehungsweise Zeitkurven spielen bei der Kraftspektroskopie eine wichtige Rolle. Man kann sie in drei verschiedene Formen unterteilen: Annäherungsabschnitte, Pausenabschnitte und Ablöseabschnitte. Bei der Annäherungskurve nähert sich der Cantilever der Probe und erfährt zunächst keine Krafteinwirkung. Sobald die Spitze mit der Probe in Kontakt kommt, wirkt eine stark ansteigende Kraft auf sie. Der Cantilever wird gebogen. Während der Pause verweilt der Cantilever entweder bei konstanter Kraft oder in konstanter Höhe über der Probe. Danach wird der Cantilever wieder von der Probe zurückgezogen. Dabei sinkt die Kraft zunächst, die auf den Cantilever einwirkt. Im Falle einer Adhäsion kommt es, sobald die Spitze anfängt, sich von der Oberfläche zu lösen, zu einer entgegengesetzten Kraft, die die Spitze festhält. Während der drei Etappen können jeweils die Auslenkung des Cantilevers in die laterale Richtung, die vertikale Richtung und das Signal der gemessenen Höhe bestimmt werden.

Das Folgende ist nun ein Beispiel für eine in diesen Messungen typische Kraft-Distanzkurve. (Abbildung 37) Die Annäherungskurve ist in Blau und die Ablösekurve in Rot dargestellt. Es ist zu beachten, dass der hierbei verwendete Cantilever keine Spitze besitzt und stattdessen ein Bead mit DNA daran befestigt ist. Der Cantilever befindet sich zunächst ohne jegliche Krafteinwirkung über der Oberfläche. Die leichte Aufwärtsbewegung im Signal stammt sehr wahrscheinlich vom Drift. Der Cantilever befindet sich zu Beginn ungefähr $4\mu m$ über der Oberfläche. Er wird auf die Oberfläche hinabgefahren, wodurch der Bead samt DNA in Kontakt mit der Oberfläche gerät. Der Cantilever wird ausgelenkt bis zu einer maximalen Krafteinwirkung von in diesem Fall etwas über $30pN$. Danach wird die Kraft auf den Bead beziehungsweise den Cantilever reduziert. Ab einem Abstand von ungefähr $2\mu m$ zur Oberfläche wird der Cantilever ausgelenkt, da die DNA gespannt wird. Sobald die maximale Kraft erreicht ist, reißt sie bei ungefähr $3\mu m$ ab und der Cantilever kehrt in die ursprüngliche unausgelenkte Position zurück.

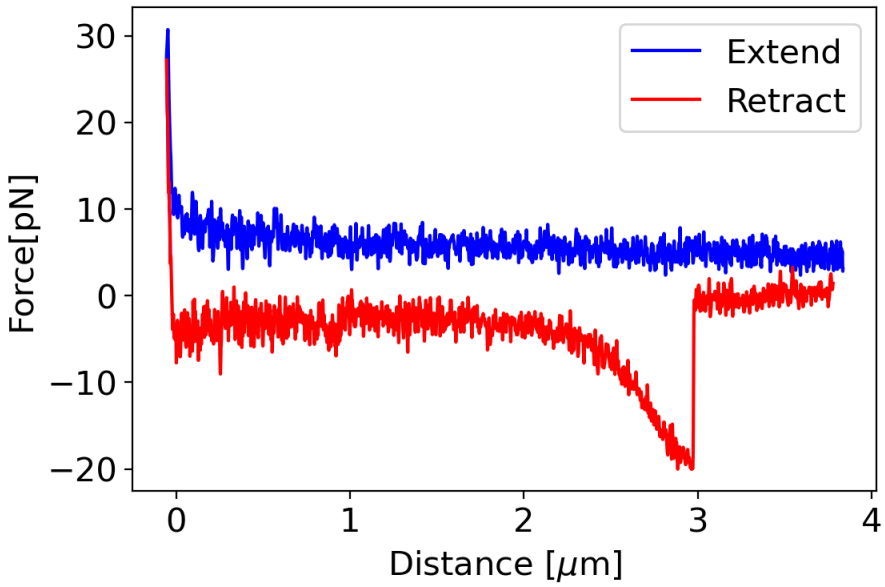


Abb. 37: Beispiel für eine typische Kraftdistanzkurve bei den Kraftspektroskopiemessungen. Der Cantilever besitzt keine Spitze, sondern ist mit einem Bead und einem einzelnen DNA-Strang funktionalisiert. Die Annäherungskurve des Cantilevers ist in Blau, die Ablösekurve in Rot dargestellt. Die DNA reißt bei einem Abstand zur Oberfläche von ungefähr 2,5 µm von der Oberfläche ab.

5.8 Versuchsdurchführung

Im Folgenden werden die einzelnen Versuchsaufbauten geschildert. Im Wesentlichen kann man die Messungen in drei verschiedene Kategorien einteilen: Topographiemessungen, Adhäsionsmessungen und Reibungsmessungen. Die Topographiemessungen wurden auf der Cellulosenitratoberfläche, der porösen Membran und der Poly-L-Lysin-Oberfläche aufgenommen. Des Weiteren gibt es auch Topographiemessungen von einzelnen DNA-Strängen auf Poly-L-Ornithin. Die Adhäsionsmessungen fanden auf Cellulosenitratoberflächen und der porösen Membran statt. Die Reibungsmessungen fanden zusätzlich auf Poly-L-Lysin statt.

5.8.1 Topographiemessungen

Bevor die Interaktion der DNA mit den verschiedenen Oberflächen gemessen werden kann, werden diese anhand von Topographiemessungen charakterisiert. Dies gilt für die Cellulosenitratoberflächen, die poröse Membran und die Poly-L-Lysinoberfläche. Außerdem wurde die DNA abgebildet.

Abbildung der DNA

Die DNA-Abbildungen werden im intermittierenden Modus mit PPP-NCL-50-Cantilevern aufgenommen. Dazu wird die DNA auf Glimmerplättchen angebracht. Zunächst wird die oberste Schicht mit einer Pinzette abgespalten. Danach werden $10\mu L$ Poly-L-Ornithin auf die Oberfläche pipettiert. Da die Flüssigkeit sehr leicht verläuft, ist eine Anbringung in Tropfform nicht möglich. Wie auch schon bei der Funktionalisierung der Cellulosenitratoberfläche wird ein feuchtes Tuch in die Petrischale gelegt und das Ganze mit Parafilm verschlossen. Die Lösung inkubiert für 10 Minuten. Danach wird die Oberfläche drei Mal mit reinstem Wasser gespült, um nicht angebundene Poly-L-Ornithinmoleküle zu entfernen. Die Oberfläche wird mit Stickstoff getrocknet. Danach wird die Oberfläche mit $10\mu L$ DNA-Lösung inkubiert und hinterher erneut drei Mal gespült, um nicht angebundene DNA-Stränge zu entfernen. Abschließend wird die Oberfläche erneut mit Hilfe von Stickstoff getrocknet. Die Aufnahmen wurden im Intermittierendem Modus in Luft durchgeführt.

Abbildung der Cellulosenitratoberflächen

Die Cellulosenitratoberflächen wurden genau so wie, im oberen Teil beschrieben, hergestellt und ebenfalls mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops abgebildet. Dabei sollte vor allem geklärt werden, ob die Oberflächen homogen beschichtet sind oder ob es bevorzugte Andockpunkte auf der Oberfläche gibt. Die Aufnahmen wurden im Kontaktmodus und im Intermittierendem Modus durchgeführt. Die Messungen fanden zum Teil in Luft und zum Teil in einem PBS-Tropfen statt.

Abbildung der porösen Membran

Die Membranoberflächen aus der Arbeitsgruppe von Markus Gallei befinden sich zu Beginn der Messungen angetrocknet in einem kleinen Glasbehälter. Sie kleben an der Glaswand und müssen mit einer Pinzette abgelöst werden. Membranstücke, die zu sehr an der Oberfläche haften, müssen zunächst mit PBS benetzt werden, wodurch sie sich leicht von der Glaswand abziehen lassen. Vorder- und Rückseite der Membran wurden mit Hilfe der Kamera des AFMs bestimmt. Die Membranseite mit den Poren wird mit den offenen Poren nach oben in eine Petrischale gelegt und dann mit Kaptonklebeband befestigt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Klebestreifen so angebracht sind, dass der Cantilever die Oberfläche erreichen kann und nicht der Glaskopf durch die höheren Kanten des Kaptons blockiert wird. Danach wird die Membran komplett mit PBS bedeckt. Bevor mit den Messungen begonnen werden kann, muss noch eine Stunde gewartet werden, da sich auf der Membran Luftblasen bilden, die die Messungen beeinflussen würden. Es werden Aufnahmen der Membran in verschiedenen Größenordnungen gemacht. Dies soll einen guten Gesamtüberblick über die Probe geben, in Bezug auf Unebenheiten, Makel und Verteilung der Poren, aber auch einen Eindruck von der Größe und

Form einzelner Poren liefern. Die Messungen fanden im Kontaktmodus oder im Intermittierendem Modus statt. Die Oberflächen waren währenddessen komplett in PBS getaucht.

Abbildung der Poly-L-Lysinoberflächen

Die Poly-L-Lysinoberflächen waren während und vor den Messungen immer komplett mit PBS bedeckt. Die meisten Messungen selbst fanden im Intermittierenden Modus statt, um die Oberfläche nicht zu beschädigen.

5.8.2 Adhäsionsmessungen

Um die Adhäsionsmessungen durchzuführen, muss zunächst ein einzelner Bead mit einem DNA-Strang an dem Cantilever befestigt werden. Dazu wird mit der Kamera eine geeignete Stelle gefunden, an der sich Beads befinden, jedoch auch nicht zu viele, sodass nur einer angebunden wird. Danach wird der Cantilever auf die entsprechende Stelle gefahren. Ob der Bead am Cantilever haftet, wird anhand der aufgenommenen Kraft-Distanzkurven festgestellt. So muss es einen Abrissmoment innerhalb der Ablösekurve geben, der bei einem Cantileverabstand von mindestens $2\mu m$ auftritt. Zu Beginn der Messungen wurde ein Kamera verwendet, unter der man die Beads zwar sehen konnte, jedoch waren die Einstellungen unscharf. Außerdem war der Blickwinkel der Kamera von oben auf den Cantilever und die Probenoberfläche. Während den späteren Messungen wurde eine Kamera mit einer höheren Auflösung verwendet, die den Cantilever von unten zeigt. Da das Cellulosenitrat auf den Glasplättchen komplett und der Cantilever selbst zumindest teilweise transparent sind, ist es möglich, den Bead unter dem Cantilever zu sehen. Dadurch kann man die genaue Beadposition unter dem Cantilever sehen. Außerdem ist zu sehen, ob der Bead am Cantilever befestigt ist. Wenn man den Cantilever über der Oberfläche bewegt und der Bead sich mit bewegt, weiß man, dass der Bead am Cantilever hängt.

Danach wird der Cantilever entweder über einen DNA-freien Teil der Probenoberfläche gefahren oder die Oberfläche wird gewechselt. Dieser Wechsel muss relativ schnell erfolgen, da der Cantilever ansonsten austrocknet und die DNA kaputt geht. Nach dem Probenwechsel muss eine Stunde gewartet werden, bevor die eigentlichen Messungen starten können. Dies soll dafür sorgen, dass der Drift in der Probe reduziert wird. Für die späteren Messungen auf der Membran wurde die Kamera außerdem gewechselt, da die Membran nicht transparent ist.

Bei den Adhäsionsmessungen auf Cellulosenitrat wurden standardmäßige Messungen durchgeführt, bei denen der Cantilever zunächst einmal auf die Oberfläche gefahren und dann wieder zurückgezogen wird. Für die Messungen auf der Membran wurde ein etwas komplexerer Aufbau herangezogen. Indem der Cantilever zwischen der Annäherung und der Ablösung mehrere $100nm$ über der Oberfläche verweilt, kann

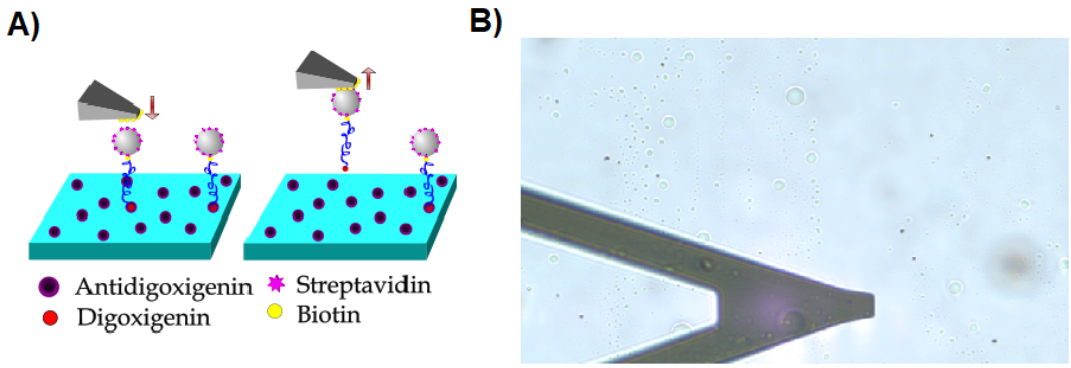


Abb. 38: A) Schemata für das Aufsammeln eines einzelnen DNA-Strangs auf der Cellulosenitratoberfläche. B) Aufnahme unter dem optischen Mikroskop von dem Cantilever direkt über der Obefläche. Bei den kleinen schwarzen Punkten handelt es sich um Beads.[4]

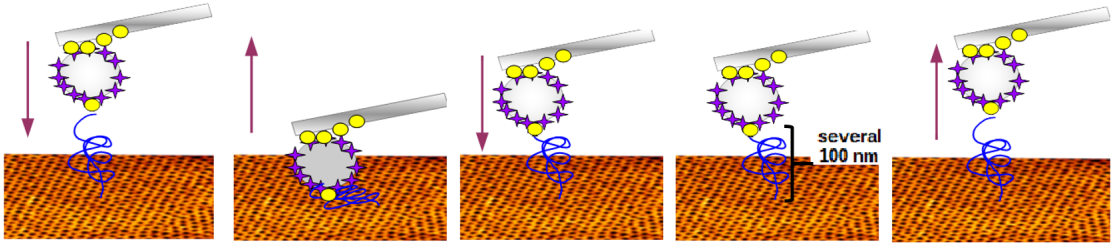


Abb. 39: Schemata für den Verlauf der Adhäsionsmessungen. Zuerst wird eine erste Annäherung (A) durchgeführt, um die Entfernung zur Oberfläche herauszufinden. Danach wird der Cantilever zurückgezogen (B). Bei der zweiten Annäherung (C) stoppt der Cantilever einige hundert Nanometer vor der Oberfläche, sodass nur der DNA-Strang selbst, aber nicht der Bead in Kontakt mit der Oberfläche ist (D). Nach einer Pause wird der Cantilever erneut zurückgezogen und die DNA reißt ab (E).

---

sichergestellt werden, dass nur die DNA in Kontakt mit der Oberfläche ist und nicht der Bead. Dafür wird zunächst eine erste Annäherung durchgeführt, um den Abstand zur Oberfläche zu bestimmen. Danach wird der Cantilever zurückgezogen und erneut heruntergefahren, jedoch mehrere $100nm$ weniger, sodass sich der Cantilever in dieser Höhe über der Oberfläche befindet. Diese Position wird für verschiedene Zeiten zwischen $0.05s$ und $10s$ beibehalten, in denen die DNA Zeit hat, sich in eine Pore einzufädeln. Abschließend wird der Cantilever zurückgezogen und der DNA-Strang reißt ab (Abbildung 39). Dieser Abrissmoment wird anhand der vertikalen Auslenkung des Cantilevers bestimmt.

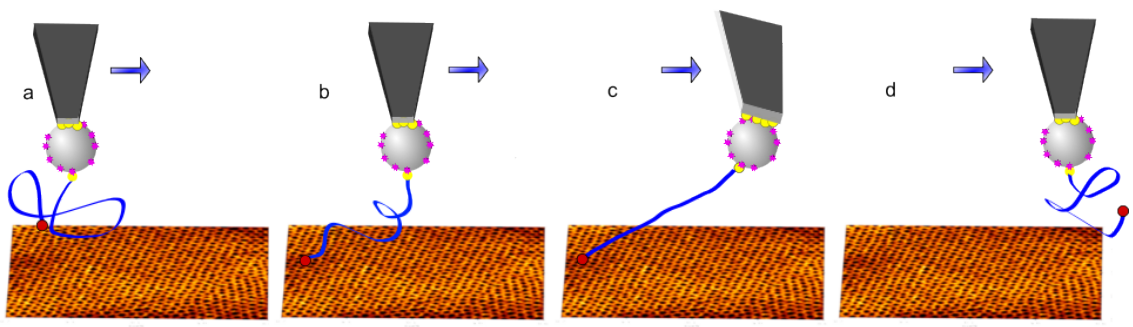


Abb. 40: Schema zum Aufbau der Reibungsmessung. Während dem Hinweg bewegt sich der Cantilever in einer bestimmten Höhe von links nach rechts über die Oberfläche. Beim Rückweg bewegt er sich in die andere Richtung. Von der Bewegungsrichtung hängt auch die Verkippung des Cantilevers in der lateralen Ebene ab. [4]

5.8.3 Reibungsmessungen

Das Grundprinzip der Reibungsmessungen wird in Abbildung 40 dargestellt und ist für alle drei Oberflächen gleich. Die DNA wird genau wie bei den Adhäsionsmessungen am Cantilever angebracht. Der Cantilver befindet sich erneut mehrere 100 nm über der Oberfläche, sodass der Bead selbst nicht mehr in Kontakt mit der Probe ist, sondern nur der DNA-Strang. Dann wird der Cantilever mit einer voreingestellten Geschwindigkeit von links nach rechts bewegt, wobei die DNA über die Oberfläche gezogen wird.

Bei der Bewegung über der Oberfläche wird die Spitze des Cantilevers auf Grund der gespannten DNA nach unten gezogen. Dies verursacht einen Ausschlag in vertikaler Richtung. Zudem kann es je nachdem, ob das Signal auf dem Hinweg („Trace“) oder auf dem Rückweg („Retrace“) aufgenommen wird, eine Kippung des Cantilvers nach rechts oder nach links geben. Dies führt zu einem Ausschlag im lateralen Signal. Ein vereinfachtes Schema dazu findet sich in Abbildung 40.

Abbildung 41 zeigt eine bessere Verdeutlichung der eigentlichen Größenverhältnisse. Die Höhe des Beads über der Oberfläche ist im Vergleich zur Länge der DNA sehr gering. Sie ist mit $250nm$ $10x$ kleiner. Der Bead ist mit einem Durchmesser von $1\mu m$ nur $2,5x$ so klein wie die DNA. Dadurch ist der Winkel zwischen dem ausgelenkten DNA-Strang und der Oberfläche bei einer maximal gespannten DNA sehr klein. Er würde lediglich $5,79°$ betragen. Die Distanz, die der Cantilever in diesem Fall zurücklegen muss, um die DNA komplett zu spannen, ist nur $13nm$ kürzer als die eigentliche DNA-Länge. Dies gilt nur für den Fall, dass lediglich das äußerste Ende des DNA-Strangs an der Oberfläche andockt. Im Gegensatz zu den Adhäsionsmessungen gibt es eine Kräftezerlegung in die laterale Kraft, die parallel zur Probenoberfläche ist, und die Normalkraft, die senkrecht dazu verläuft. Die Kraft in die laterale Auslenkung wäre somit $10x$ höher als die Kraft in die vertikale Auslenkung.

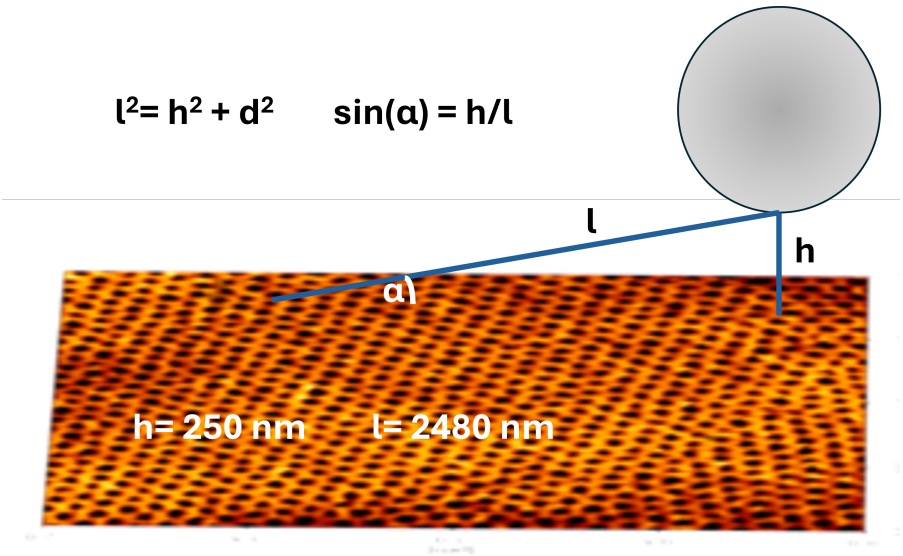


Abb. 41: Schema mit den eigentlichen Größenverhältnissen während einer Beispielreibungsmessung. Der Bead befindet sich in einer Höhe von ungefähr $250nm$. Die DNA ist somit mit $2480nm$ ungefähr $10x$ länger als die eigentliche Messhöhe. Der Winkel α, der sich zwischen dem Vektor der Normalkraft und der Lateralkraft aufspannt wäre extrem klein und würde dafür sorgen, dass die Lateralkraft sehr viel größer sein müsste als die Normalkraft.

Je nachdem, um welche Probenoberfläche es sich handelt, reagiert die DNA auf eine unterschiedliche Art und Weise mit der Oberfläche. Bei den Messungen auf Cellulosenitrat wird sie lediglich mit den Stellen reagieren, die mit Anti-Digoxigenin beschichtet sind. Somit bindet nur der unterste Teil des DNA-Strangs mit der Oberfläche. Bei den Messungen auf der porösen Membran oder auf Poly-L-Lysin hat die gesamte DNA die Möglichkeit, mit der Oberfläche zu interagieren. Die Poren sind auf Grund der Methylierung positiv geladen. Die DNA selbst ist negativ geladen, wodurch die Möglichkeit besteht, dass die DNA in die Pore hineinkriecht und sich an der Porenwand verankert. Es besteht auch die Möglichkeit, dass der DNA-Strang sich nach und nach in verschiedene Poren einfädelt oder es zu einem sogenannten Hopping kommt. Das bedeutet, dass sich die DNA von der Oberfläche löst und sofort mit der nächsten Pore interagiert, über die sie gezogen wird. Eine andere Möglichkeit, um gelegentlich auftretende Mehrfachabrisse zu erklären, wäre, dass sich die DNA schon zu Beginn in mehrere Poren eingefädelt hat. Dies würde bedeuten, dass sich die DNA zuerst spannt und sich nach und nach aus den verschiedenen Poren lösen muss. Zwischen den einzelnen Abrissen spannt sich die DNA erneut, was die unterschiedlichen Abstände zwischen den einzelnen Abrissen in den Kraftkurven erklären würde.

Bei alldem ist allerdings zu beachten, dass die DNA als Knäuel vorliegt und somit auf den geladenen Proben wahrscheinlich nicht komplett gespannt wird. Damit wäre der Winkel in Abbildung 41 nicht ganz so klein und der Unterschied zwischen der

Normalkraft und der lateralen Kraft wäre nicht so groß wie in der Skizze angegeben.

5.8.4 Kalibrierung und Datenauswertung

In dem folgenden Unterkapitel geht es um die unterschiedlichen Datenauswertungsprozeduren der verschiedenen Messungen und die Kalibrierung der Cantilever für die Analyse der Adhäsions-und Reibungsmessungen.

Kalibrierung

Die vertikale Auslenkung wurde mit Hilfe des kontaktbasierten Kalibrierungsmodus von Volt in Newton umgewandelt. [74] [75] Dazu wurde zunächst eine Kraft-Distanzkurve aufgenommen. Danach wird die Steigung der Annäherungskurve linear gefittet, wodurch die Sensitivität des Cantilevers berechnet werden kann. Die Federkonstante wird über das thermische Hintergrundrauschen gefittet. Dazu wird der Cantilever mehrere μm von der Oberfläche nach oben gefahren, sodass er frei schwingt und nicht mehr in Kontakt mit der Oberfläche ist. Danach wird das Frequenzsignal gemessen und gefittet. Beides wird miteinander verrechnet, wodurch das Signal in Newton umgewandelt werden kann. Die Kalibrierung wurde in PBS durchgeführt, nachdem bereits ein Bead an dem Cantilever befestigt war. Die Kalibrierung fand, um das Risiko eines Ablösens des Beads so gering wie möglich zu halten, noch auf der Cellulosenitratoberfläche statt.

Datenauswertung

Für die Datenauswertung der Topographiemessungen wird das Bildauswertungsprogramm der Software Gwyddion verwendet. Bei Messungen im Kontaktmodus werden die einzelnen Aufnahmen in Bezug auf das Höhensignal, die vertikale Auslenkung und die laterale Auslenkung miteinander verglichen. Bei Messungen im Intermittierenden Modus wird das ausgewertete Höhensignal mit dem Phasenbild und dem Amplitudenbild verglichen, um nicht nur Topographien zu bestimmen, sondern auch gegebenenfalls unterschiedliche Materialien beziehungsweise Substanzen zu identifizieren.

Die Adhäsionsmessungen werden mit Hilfe der Auswertungssoftware von JPK beziehungsweise mit einem selbstgeschriebenen Programm analysiert. Dabei wird lediglich die Ablösekurve verwendet, da in dieser die Abrissmomente zu finden sind. Zunächst wird die Baseline begradigt und der eigentliche Kontaktpunkt wird gefittet. Das Signal wird außerdem geglättet und die vertikale Auslenkung wird mit Hilfe der vorher bestimmten Sensitivität und der Federkonstante von Volt in Newton umgerechnet. Danach werden die Abrisse in Bezug auf Abrisskraft, Abrissposition

und Abrissverlauf analysiert.

Bei den Reibungsmessungen wurde ein selbstgeschriebenes Pythonprogramm zur Auswertung verwendet. Dazu wurden die einzelnen Messungen eingelesen und zunächst lediglich das Signal der vertikalen Auslenkung betrachtet. Die Daten werden in Hin- und Rückweg unterteilt. Ein Ereignis wird als Abriss gewertet, wenn die vertikale Auslenkung, also die Normalkraft, einen Wert von 3.5 mal der Standardabweichung der einzelnen Linie überschreitet. Alle Abrisse werden in Bezug auf die Merkmale Abrisskraft, Abrissposition innerhalb der Linie und Abrissposition auf der Oberfläche unterteilt. Zudem wird untersucht, ob es mehrere Abrisse gibt beziehungsweise wie viele Abrisse es pro Linie in einer Messung gibt. Die Abstände zur Oberfläche wurden teilweise variiert. Die Standardhöhe betrug um die $250nm$. Dies ist jedoch kein konstanter Wert, da der Cantilever nicht auf einer konstanten Höhe gehalten werden konnte. Variiert wurde außerdem die Geschwindigkeit, mit der die DNA über die Oberfläche gezogen wurde. Auch dieser Faktor wurde während der Auswertungen analysiert.

5.9 Flowcell

Das AFM eignet sich sehr gut für die Messung und Beschreibung von einzelnen Abrisskurven. Es ist jedoch nicht geeignet, um große Datenmengen von verschiedenen DNA-Strängen aufzunehmen. Da pro Messtag im Idealfall nur eine DNA am Cantilever angebunden ist, bedeutet dies für einen Vergleich von 50 verschiedenen DNA-Molekülen 50 verschiedene Messtage. Dies wäre äußerst zeitintensiv und kostspielig. Eine geeignetere Wahl, um möglichst viele Daten für Messungen mit DNA-Strängen zu generieren, ist die Flowcell. [55] Bei diesem Versuchsaufbau werden die DNA-Stränge am Grund eines Kanals angebracht. Dieser ist mit PBS gefüllt, da sich die DNA immer in einer pH-neutralen wässrigen Lösung befinden muss und der Strom später dazu dient, die DNA-Stränge von der Oberfläche abzureißen. Die Moleküle werden hierbei nicht von der Oberfläche einzeln abgezogen, sondern mittels einer starken Strömung, die auf die angebundenen Beads wirkt, zunächst ausgelenkt und dann abgerissen. Mittels dieser Methode sorgt man dafür, dass alle DNA-Stränge, die sich auf der Oberfläche befinden, unter den gleichen Messbedingungen abgezogen werden können. (Abbildung 43) Der Abrissmoment wird mit einer CCD-Kamera (DMK 33GX178, ImagingSource, Bremen, Deutschland) aufgenommen. Dazu wird ein Video aufgenommen, in dem die Beadpositionen zunächst ohne Strom, dann ausgelenkt und im letzten Teil während des Abrisses aufgenommen werden. Dabei wurde ein Objektiv mit einer 20fachen Vergrößerung und eine Aufzeichnungsrate von $5fps$ verwendet. (Abbildung 42)

Für die Messung mittels Flowcell muss die Cellulosenitratoberfläche modifiziert werden. Um den Kanal zu bilden, werden zwei Glasplättchen aufeinandergelegt,

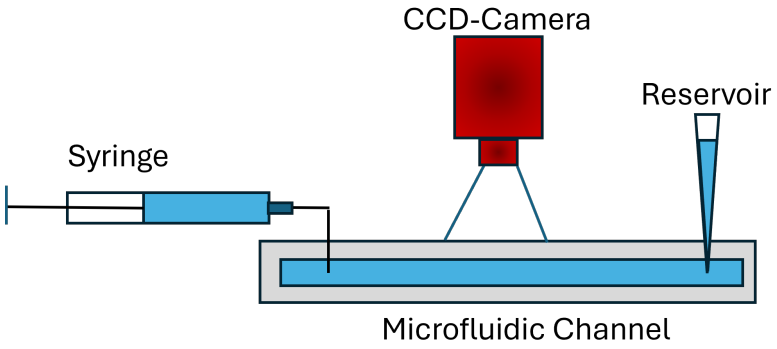


Abb. 42: Schema für den allgemeinen Setup der Flowcell. Der mit PBS gefüllte Kanal auf der einen Seite mit der Spritzpumpe und auf der anderen Seite mit einer Pipettenspitze, die als Reservoir fungiert. Der Fluss innerhalb des Kanals und das Abrissverhalten der DNA-Stränge wird über die CCD-Kamera in der Mitte aufgezeichnet.

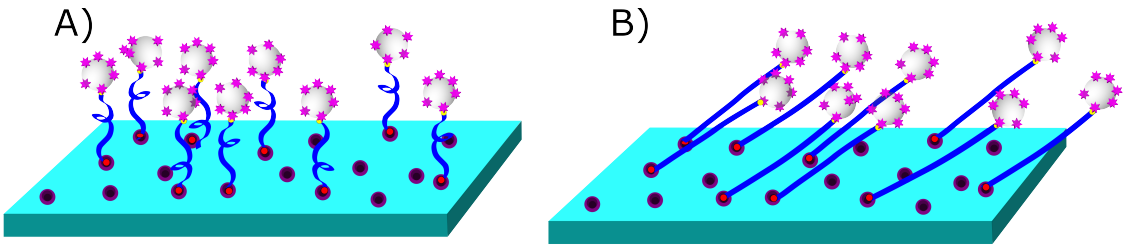


Abb. 43: Schema über die Anbindung der Bead-DNA-Konstrukte mit und ohne Strömung. Abbildungsteil A) stellt die Anbindung der DNA dar, bevor die Strömung eingestellt wird. Die Beads sind inhomogen über die verschiedenen Anti-Digoxigeninstellen an der Oberfläche angebunden. Sie treiben um die Andockstelle herum wie kleine Bojen. Abbildungsteil B) zeigt den Messaufbau, sobald die Strömung eingestellt wurde. Die DNA-Moleküle werden ausgelenkt und die DNA-Stränge werden gespannt. Bei einer weiteren Erhöhung der Flussgeschwindigkeit werden die DNA-Stränge mitsamt den Beads abreißen.

---

wobei eines davon mit Cellulosenitrat funktionalisiert ist, das andere nicht. Die beiden Oberflächen werden mit Kapton zusammengeklebt. Dabei wird ein kleines Stückchen in dem Kaptontape freigelassen, um den Kanal zu formen. Der Kanal ist $1mm$ x $10mm$ groß und wurde durch einen CO2-Lasercutter ausgestanzt. An die beiden Enden des Kanals werden kleine Löcher mit einem Durchmesser von $0.8mm$ gebohrt. In die Löcher selbst werden Pipetten von Eppendorfer mit einem Volumen von $10\mu L$ gesteckt. Über sie wird der Kanal befüllt beziehungsweise entleert. Der dazugehörige Aufbau ist in Abbildung 44 dargestellt. Bei den Vorbereitungen für die AFM-Messungen wird jeweils ein Tropfen mit $10\mu L$ Volumen auf die Oberfläche gesetzt. Bei den Messungen mit der Flowcell wird die Lösung zunächst über die eine Pipettenspitze in den Kanal geflutet und dann wieder auf der anderen Seite über die zweite Pipettenspitze hinausgespült. Bei jeder Lösung wird darauf geachtet, dass

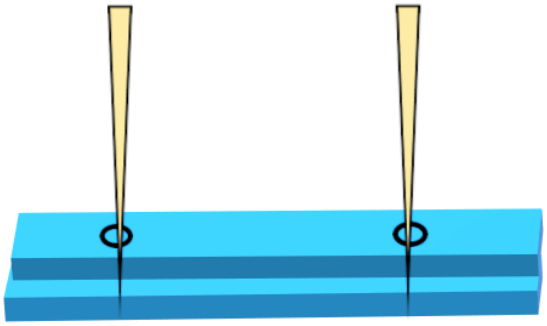


Abb. 44: Schema über den Aufbau des Kanals. Die beiden Glasplättchen sind übereinander gelegt und mit Kapton aufeinander geklebt. In dem Kapton befindet sich eine schmale Lücke mit einem Durchmesser von $1mm$ x $10mm$. An den Enden des Kanals befinden sich zwei Löcher, die als Ein- beziehungsweise Ausgang fungieren. Die verschiedenen Lösungen werden über die beiden Pipettenspitzen eingeführt.

der gesamte Kanal von der Lösung durchflutet ist. Dies wird sichergestellt, indem beide Pipettenspitzen während der Inkubationszeit gefüllt sind. Bei der letzten Spülung wird der Kanal umgedreht, sodass überschüssige DNA-Beadkonstrukte aus dem Kanal gespült werden. Bei jeder Spülung des Kanals muss darauf geachtet werden, dass keine Blasen in den Kanal gefüllt werden. Die Anbindung der DNA-Konstrukte im Kanal ist sehr fragil und würde durch das Überrollen durch eine einzelne Luftblase zerstört werden.

Zwischen den Probenvorbereitungen gibt es noch drei weitere geringfügige Unterschiede. Zum einen wurde die Blockinglösung bei den Messungen mit der Flowcell 4-mal für je 15 Minuten und bei den AFM-Messungen 2 Mal für je 30 Minuten inkubiert. Des Weiteren wurde die Beadlösung nicht verdünnt und die DNA-Lösung lediglich direkt nach der Hybridisierung im Verhältnis 1:100 verdünnt. Für die Abrissprozesse bei der Flowcell ist es nicht wichtig, dass die DNA-Stränge weit auseinander liegen, da man sie nicht einzeln abreißen will. Stattdessen ist es eher von Vorteil, eine möglichst hohe Dichte an DNA-Strängen zu haben, um entsprechend viele Abrissmomente aufzuzeichnen. Des Weiteren wurde auf den letzten Schritt verzichtet, bei dem die Probe mit reiner DNA geimpft wird.

Die Strömung innerhalb vom Kanal wird von einer Spritzpumpe (Al-100 World Precision Instruments, Saratosa, USA) erzeugt. Die Strömungsrate wird hierbei von $0\mu L/min$ auf $500\mu L/min$ erhöht. Die Strömungsrate wird später in die benötigte Kraft kalibriert. Dazu wird das Auftreten von Overstretching als Normierungswert verwendet. Als 0-Punkt für $0pN$ fungiert logischerweise eine Strömungsrate von $0\mu L/min$. Um sicher zu gehen, dass die Strömungsrate auch bei höheren Strö-

mungsgeschwindigkeiten korrekt angezeigt wird, wird das Volumen der Pipette am Ende des Kanals mit einer separaten Kamera gefilmt. Somit kann die Strömung in Abhängigkeit von der Füllhöhe überprüft werden.

Nicht alle Beads werden ins Endergebnis miteinbezogen. Bevor der Strom für die Messung angestellt wird, wird die Oberfläche ohne weitere Einwirkungen von außen für $60s$ aufgezeichnet. Die Bewegung der einzelnen Beads wird nach der Messung ausgewertet. Wenn ein Bead sich überhaupt nicht auf der Oberfläche bewegt oder teilweise über die Oberfläche wandert, werden die Abrissmomente dieses Beads nicht miteinbezogen. Es werden lediglich Beads miteinbezogen, die eine Brownsche Bewegung um den vermuteten Andockpunkt vollziehen.

Die aufgenommenen Videos werden später mit ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) und einem ImageJ Plugin für das Tracken von Partikeln von Sbalzarini und Koumoutsakos analysiert.

6 Ergebnisse und Diskussion

Das nun folgende und vorletzte Kapitel stellt die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse vor und zur Diskussion. Es besteht im Wesentlichen aus drei Haupteilen: den Topographiemessungen, den Adhäsionsmessungen und den Reibungsmessungen. Des Weiteren wird auf Messungen in der Flowcell eingegangen, die ebenfalls das Abrissverhalten der DNA untersuchten und diese Ergebnisse mit hiesigen Messungen verglichen. Das Unterkapitel mit den Topographiemessungen lässt sich unterteilen in die Abbildung der verwendeten DNA, der verwendeten Cellulosenitratoberfläche und der porösen Membran. Außerdem werden die Adhäsionsmessungen der DNA sowohl auf Cellulosenitrat als auch auf poröser Membran vorgestellt und miteinander verglichen. Im letzten Unterkapitel werden die Reibungsmessungen auf Cellulosenitrat, poröser Membran und Poly-L-Lysin gegenübegestellt und analysiert.

6.1 Topographiemessungen

Im Folgenden werden die Topographiemessungen der DNA-Abbildungen, der Cellulosenitratoberflächen und der porösen Membran vorgestellt. Bei der Membran wird dabei besonderer Wert auf die Verteilung der Poren und deren durchschnittliche Größe gelegt. Des Weiteren werden auch Unebenheiten, unerwünschte Löcher oder Risse und gegebenenfalls Verunreinigungen untersucht.

6.1.1 DNA-Abbildungen

In der Abbildung 45 sind Topographiemessungen der mit DNA beschichteten Glimmeroberflächen zu sehen. B) und D) sind die jeweiligen Höhenprofile der beiden Abbildungen A) und C). Der weiße Strang in Abbildung 29A) hat eine Höhe von ungefähr $3nm$. Diese Höhe ist bei allen drei Linescans gleich. Er formt auf der linken Seite zwei Mal eine Art von Knäuel, die durch einen einzelnen Strang miteinander verbunden sind. Des Weiteren ist der Strang mehrere μm lang. Auf Grund der Länge könnte es sich hierbei um zwei DNA-Stränge handeln, die aneinander hängen und an den äußeren Enden ineinander verwickelt sind. Der Strang müsste somit insgesamt eine Länge von $5\mu m$ haben. In der Abbildung C) hat der weiße Strang eine Höhe von $4nm$. Es könnte sein, dass der DNA-Strang an dieser Stelle mit sich selbst verwickelt ist, sodass zwei Teile aufeinanderliegen. Auf Grund der Länge

gehen wir von einem einzelnen DNA-Strang aus. Diese Art von engen Verwicklungen hatten wir zunächst nicht erwartet. Die DNA-Stränge sind durchwegs negativ geladen, von daher wäre es eher erwartbar gewesen, dass die linearen DNA-Stränge ausgestreckt auf der Oberfläche liegen. Anzuführen ist hierbei der Vergleich zu den Abbildungen von Lyubchenko et al. Diese nahmen ein DNA-Plasmid in Ringform und in linearisierten Form auf. Die linearisierten DNA-Moleküle lagen weit ausgestreckt auf der Oberfläche, wohingegen sich die Plasmidringe stärker verhakten. [76] Dass die DNA-Stränge stärker gekrümmt sind als erwartet, könnte an den Nicks liegen. Diese Leerstellen zwischen den Oligomeren des angedockten Strangs könnten für eine zusätzliche Flexibilität sorgen. Dies würde dazu führen, dass der Strang verkrümmter vorliegt. Da die hinzugefügten Oligomere nur an die komplementären Basen gebunden, aber nicht untereinander verbunden sind, gibt es dementsprechend viele Nicks, an denen sich die DNA stärker verbiegen kann als ein Doppelstrang ohne Nicks. Die Persistenzlänge der DNA beträgt $10nm$, was die Entstehung der Knäuele erklären würde. [77] Bei einer weiteren Kontrollmessung, diesmal ohne DNA, konnten keine ähnlichen Konstrukte auf der Oberfläche gefunden werden. Dies bestätigt die Annahme, dass es sich um DNA handelt.

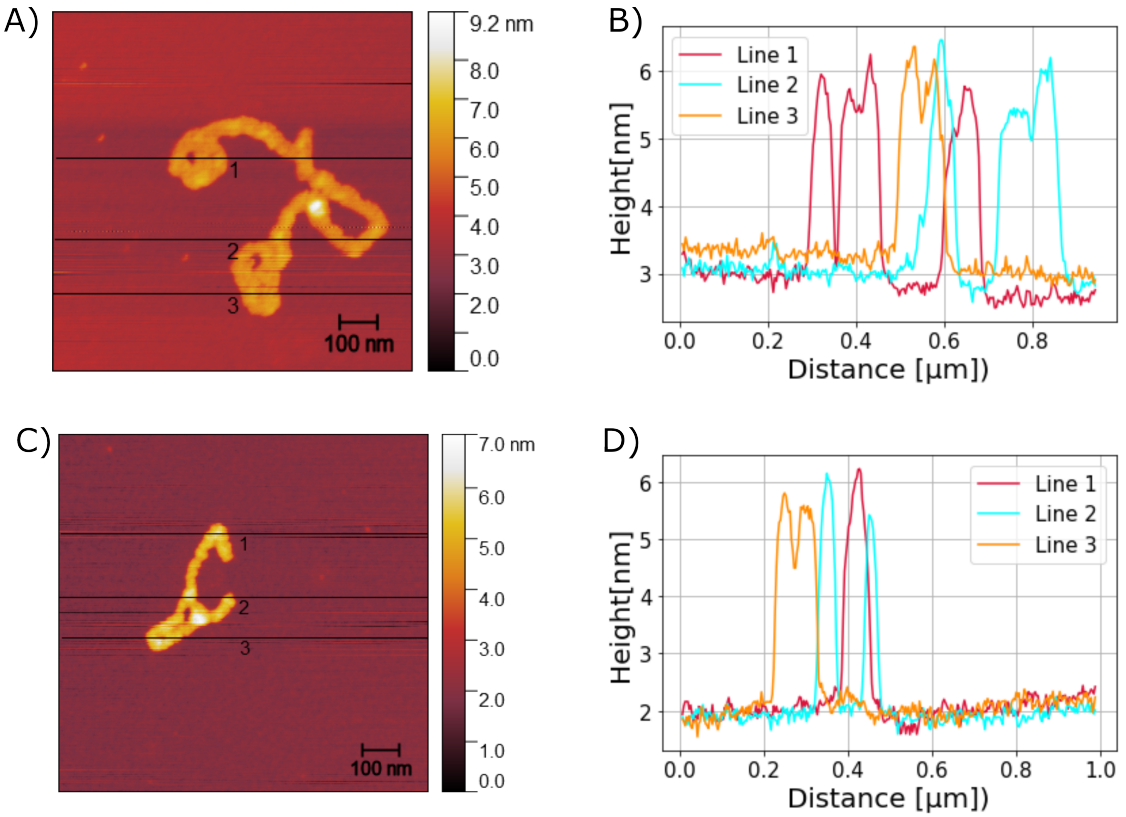


Abb. 45: A) C) AFM-Abbildungen der mit Poly-L-Ornithin und DNA beschichteten Glimmer-Oberfläche. Bei den hellen Schnüren handelt es sich um DNA. B) und D) sind die jeweiligen Höhenprofile der Topographiemessungen.

Der Durchmesser von einer DNA-Doppelhelix beträgt $2nm$. Die Topographiemessungen des Konstrukts in Abbildungsteil A) weisen ein Höhenprofil von $3nm$ auf. Bedenkt man Messungenauigkeiten beziehungsweise eventuelle Überreste von Pufferlösung, passt der Querschnitt aus Abbildungsteil B) sehr gut zu einem normalen durchschnittlichen Querschnitt einer DNA-Doppelhelix. [6] Das Konstrukt in Abbildungsteil C) weist ein Höhenprofil von $4nm$ auf. Dies würde darfür sprechen, dass sich in diesem Fall ein DNA-Strang überlagert und sich somit der Querschnitt verdoppelt. Ebenfalls interessant für die Messungen ist der Gyrartionsradius, der bei diesem Konstrukt bei $92nm$ liegt. Die untere der Schlaufen, die man im Abbildungsteil A) sieht hat einen Durchmesser von ungefähr $200nm$. Die obere der Schlaufen hat einen Durchmesser zwischen 100 und $150nm$. Beide Durchmesser liegen im Größenbereich des Gyrationsradius. Betrachtet man die Längen der beiden Konstrukte, könnte auch dies mit den $2500nm$ übereinstimmen. Genauere Angaben sind in Bezug auf die konkrete Konturlänge des Konstrukts schwierig, da Teile des Strangs wahrscheinlich übereinanderliegen.

6.1.2 Abbildung der Cellulosenitratoberflächen

Dieses Unterkapitel beschäftigt sich mit den Topographiemessungen der Cellulosenitratoberflächen. Die Cellulosenitratoberlfächen wurden in verschiedenen Abbildungsrößen abgebildet, um einen besseren Überblick über die Probe allgemein, aber auch über deren Details zu bekommen.

Einen ersten Überblick von den Cellulosenitratoberflächen liefert Abbildung 46. Sie zeigt Topographiemessungen mit einer Fläche von 30 x 30μm. Zu sehen sind einige Löcher, die nicht homogen verteilt sind. Die meisten davon ziehen sich von links oben nach rechts unten. Des Weiteren gibt es mehrere kreisförmige Anordnungen. Die Ränder dieser Anordnungen sind leicht erhöht und teilweise von weiteren Löchern durchzogen. Insgesamt weist die Cellulosenitratoberläche eine geringe Rauigkeit von mehreren 10nm auf. Innerhalb des Linienprofils 2 gibt es eine einzelne mittige Erhöhung von um die 30nm.

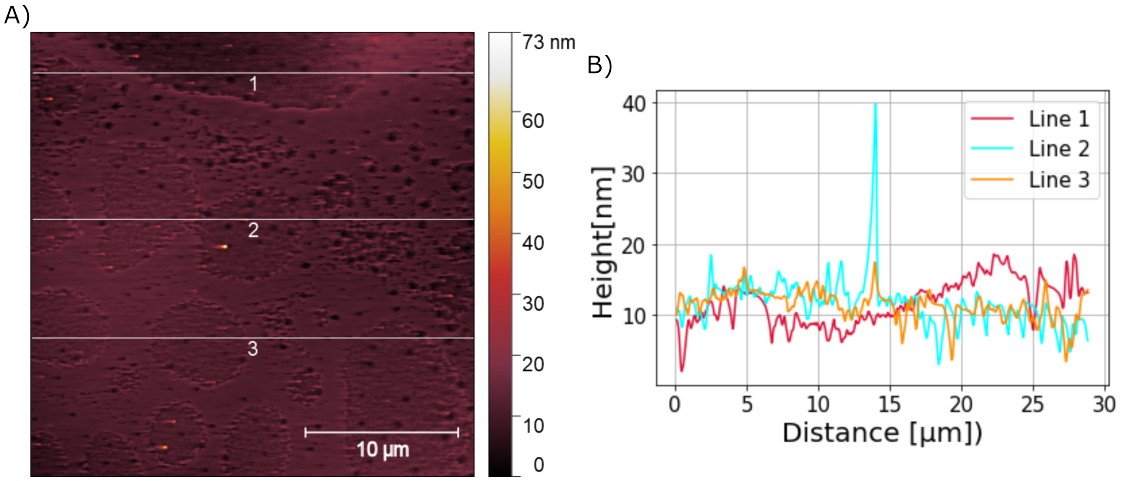


Abb. 46: Abbildungsteil A) Topographiemessung auf Cellulosenitrat mit einer Fläche von 30μm x 30μm. Zu sehen sind mehrere Löcher auf der Oberfläche, die nicht homogen verteilt sind. Zudem gibt es innerhalb der Oberfläche kreisförmige Anordnungen. Es sind drei Linien für Oberflächenquerschnitte angegeben. B) Abbildung der drei Oberflächenquerschnitte. Das zweite Linienprofil zeigt eine starke Erhöhung direkt in der Mitte von ungefähr 30nm. Ansonsten ist die Oberfläche eher flach mit Höhenunterschieden von ungefähr 10nm

Abbildung 47 zeigt Topographiemessungen mit einer Fläche von 10 x 10μm. Die Abbildungsteile A) und C) zeigen die Oberflächenmessungen und die Abbildungsteile B) und D) die dazugehörigen Linienprofile. Zu erkennen sind in beiden Abbildungen sowohl die Löcher als auch die kreisförmigen Anordnungen. Abbildungsteil A) zeigt zentral eine kreisförmige Anordnung mit einem Durchmesser von ungefähr 8μm. Diese trennt sich vom Rest der Oberfläche durch eine erhöhte Anordnung ab, die von weiteren Löchern durchzogen wird. Am unteren Rand beziehungsweise in der linken oberen Ecke gibt es weitere Andeutungen von kreisförmigen Anordnungen. Das dazugehörige Linienprofil zeigt Höhenschwankungen von 10nm beziehungsweise

einzelne Ausreißer mit Peaks von bis zu $20nm$. In Abbildungsteil C) sind die kreisförmigen Anordnungen kleiner mit einem Durchmesser von ungefähr $2nm$. Manche überlappen sich auch. Die Ränder der Anordnungen sind erneut erhöht und werden von mehreren Löchern durchzogen. Das Linienprofil zeigt wieder Höhenschwankungen von um die $10nm$ und vereinzelte Peaks mit einem Ausschlag von 15 bis $20nm$.

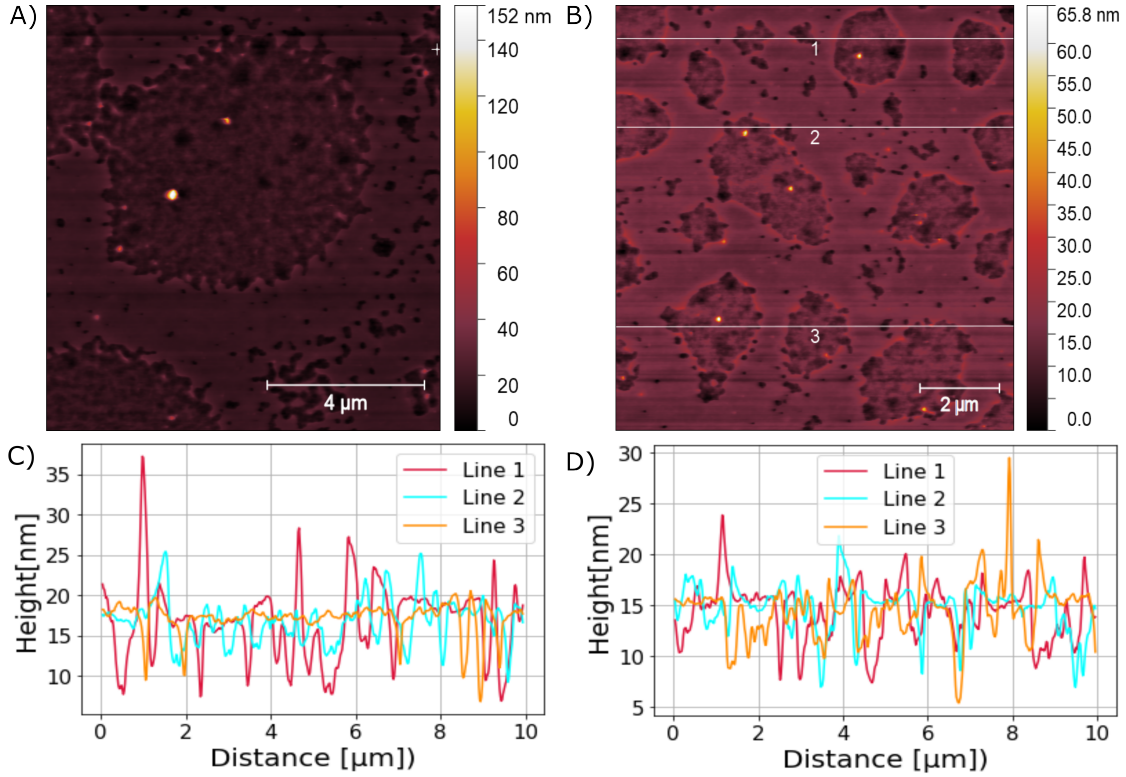


Abb. 47: A) Aufnahmen auf der gleichen Oberfläche mit einer Fläche von $10\mu m$ x $10\mu m$. Es finden sich erneut Löcher, die relativ inhomogen auf der Oberfläche verteilt sind. In der Mitte befindet sich ein kreisförmiges Konstrukt. Abgegrenzt wird das Konstrukt durch einzelne Löcher und Erhöhungen. B) Linienprofil zu der Oberfläche in A). Die Oberfläche ist generell relativ flach mit Höhenunterschieden von maximal $20nm$. C) Eine weitere Topographieaufnahme an einer anderen Stelle mit weiteren verschieden kreisförmigen Anordnungen. Diese sind kleiner als in Abbildungsteil A). Zu sehen sind erneut inhomogen verteilte Poren. D) Das dazugehörige Linienprofil zu Abbildungsteil C). Abgesehen von einem Ausschlag in Linienprofil 3 auf der rechten Seite ist die Oberfläche sehr flach und weist lediglich Höhenunterschiede von um die $10nm$ auf.

Abbildung 48 zeigt eine kreisförmige Anordnung mit einem Durchmesser von ungefähr $1\mu m$. Die kreisförmige Anordnung ist von einer leichten Erhöhung umschlossen. Das Bild selbst hat eine Fläche von 5 x $5\mu m$. Zu sehen sind erneut einige Löcher, die einen Durchmesser von um die $100nm$ haben. Manche Löcher überlappen einander. In der rechten unteren Ecke ist der äußere Rand einer weiteren kreisförmigen Anordnung zu sehen. Ihr genauer Durchmesser kann nicht bestimmt werden, aber sie wird sehr viel größer sein als die andere kreisförmige Anordnung. Im Linienprofil

sind die einzelnen Löcher sehr gut zu erkennen. Des Weiteren ist das Innere der kreisförmigen Anordnung in der unteren rechten Ecke sehr viel rauer als der Rest der Oberfläche. Die Oberfläche an sich weist lediglich Unebenheiten von wenigen nm auf. Des Weiteren lassen sich am Rand Ausschläge mit einem Peak von bis zu $20nm$ finden. Die Löcher am Rand haben einen Durchmesser von ungefähr $200nm$. Die kreisförmige Anordnung in der linken oberen Ecke weist auch höhere Unebenheiten als der Rest der Oberfläche auf, allerdings nicht so starke wie die in der unteren Ecke. Sie weisen Peaks mit Höhenunterschieden von bis zu $5nm$ auf.

Die größeren kreisförmigen Flächen könnten von der Auftragung der Cellulosenitratlösung stammen. Die verschiedenen Löchern könnten von der Inkubation im Backofen stammen. Die Bildung von Löcher beziehungsweise Poren konnte bereits von Cretich et al. [56] festgestellt werden. Dadurch wird die Oberfläche dreidimensional, was dafür sorgen könnte, dass die DNA mehr Möglichkeiten hätte sich anzubinden. Dies würde voraussetzen, dass das Anti-Digoxigenin ebenfalls an den Wänden der Löcher haftet. Somit würde die Wahrscheinlichkeit steigen, dass sich die DNA an diesen Orten befestigt oder gleich mehrere Stränge.

Unter dem optischen Mikroskop konnte bei den späteren Messungen festgestellt werden, dass es Orte gibt, an denen mehrere DNA-Stränge angebunden sind und oder an denen keine DNA angebunden ist. Dies könnte eventuell auf die Löcher zurückzuführen sein. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass die ringförmigen Strukturen einen Einfluss auf die Anbindunswahrscheinlichkeit haben. Dies Theorien lassen sich jedoch nicht nachprüfen, da die topographischen Strukturen zumindest unter unserem optischen Mikroskop nicht erkennbar waren.

Des Weiten kann man feststellen, dass die Oberfläche nur geringe Unebenheiten von maximal $20nm$ aufweist. Die späteren Reibungsmessungen finden auf Höhen von mehreren $100nm$ statt. Auf Grund der geringen Unebenheiten, sollte der Cantilever nicht versehentlich in Kontakt mit der Oberfläche geraten.

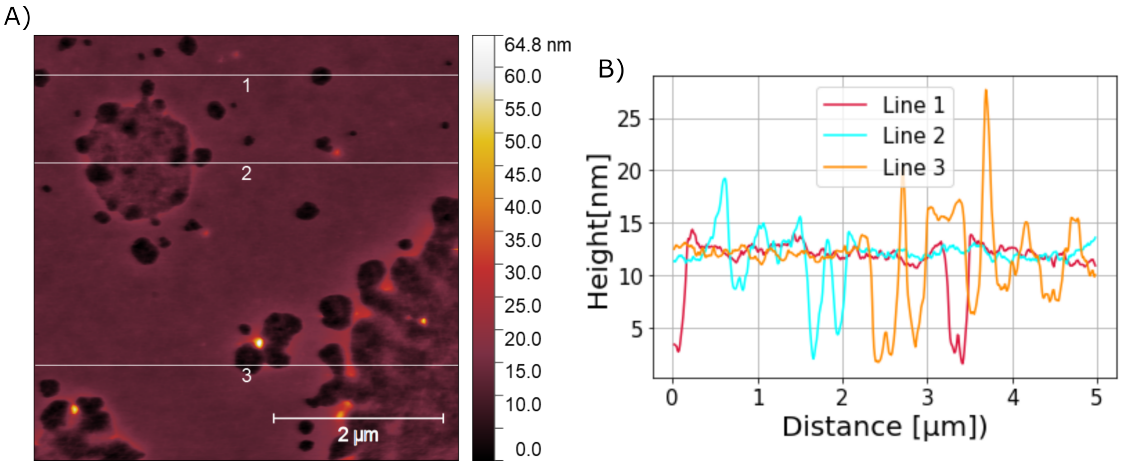


Abb. 48: A) Topographieaufnahme einer weiteren Stelle, diesmal mit einer Fläche von μm auf $5\mu m$. Sie zeigt eine kleinere kreisförmige Anordnung in der linken oberen Ecke und den Rand einer größeren kreisförmigen Anordnung in der rechten unteren Ecke. B). Die dazugehörigen Linienprofile. Die einzelnen Ausschläge zeigen die Breite der verschiedenen Löcher. Ihr Durchmesser sind wenige $100nm$ Im Linienprofil 3 ist die Erhöhung der kreisförmigen Anordnung auf der rechten Seite mit ungefähr $20nm$ angegeben.

6.1.3 Abbildung der porösen Membran

Im Folgenden werden die Aufnahmen der PS-*b*-P4VP-Oberfläche vorgestellt. Die Membran wurde in verschiedenen Größen abgebildet, um zum einen einen Überblick über die Oberfläche zu bekommen und zum anderen die Größe von einzelnen Poren bzw. deren Abstand zueinander zu analysieren.

Um einen ersten Eindruck über die Beschaffenheit der Probe zu bekommen, ist in Abbildung 49 eine SEM-Aufnahme von der porösen Membran zu sehen. Auf der Oberfläche sind die Poren homogen verteilt, wobei die Poren ungefähr die gleiche Größe besitzen. Die meisten Poren sind, abgesehen von ein paar Ausnahmen, sauber voneinander getrennt. In seltenen Fällen gehen zwei Poren ineinander über. Außerdem finden sich keine Risse oder Löcher in der Porenstruktur und die Oberfläche selbst wirkt frei von Unreinheiten. Die Verteilung der Poren befindet sich auf verschiedenen Orientierungsdomänen, die durch Korngrenzen voneinander getrennt werden. Die Poren sind somit nicht linear hintereinander gereiht.

Des Weiteren sind in Abbildung 50 zwei Bilder der Größe $30\mu m$ x $30\mu m$ zu sehen, die mit dem AFM aufgenommen worden sind. Es handelt sich hierbei um die gleiche Aufnahme, einmal als Topographiemessung und einmal als Phasenbild. Wie bereits in Abbildung 50 zu erkennen ist, liegt die Rauigkeit der Membran laut dem Höhenprofil bei ungefähr 20 nm. Es gibt einzelne Unebenheiten auf der Oberfläche, doch auch deren Höhenprofile weisen eine Unebenheit von deutlich unter $100nm$ auf. Unebenheiten von über 100 nm könnten die Messergebnisse verfälschen. Der Cantilever könnte beispielsweise während den Reibungsmessungen an den Erhöhungen hängen bleiben und somit topographische Einflüsse in die Messung bringen. Besonders auffällig ist die starke, mehrere μm breite Erhöhung, die fast linear in der oberen Hälfte von links nach rechts verläuft. Sie steht in Kontrast zu der eher schnurförmigen kurvigen dunklen Linie, die von links oben nach rechts unten verläuft und sehr viel schmäler ist. Da die obere Erhöhung sehr gerade ist, im Gegensatz zu der anderen, könnte es sich hierbei um eine Knickkante handeln, die beim Ablösen vom Glas mit der Pinzette entstanden ist. Bei der schnurförmigen Linie könnte es sich um einen Riss innerhalb der porösen Membran handeln. Auch eine generelle Störung der selbstorganisierten Membranstruktur an dieser Fläche ist möglich. Des Weiteren finden sich einige hellere Flecken, die wahrscheinlich von Dreck oder Staub herrühren, beziehungsweise eine dunkle Stelle in der Mitte in V-Form, bei der es sich ebenfalls um einen Riss handeln könnte. Laut dem Höhenprofil ist die Stelle ungefähr $30\mu m$ tief.

In Abbildung 51 ist ein Ausschnitt von $5\mu m$ x $5\mu m$ zu sehen. Beide Aufnahmen sind von verschieden Stellen, aber von der gleichen Membran. Die Topographiemessung aus Abbildungsteil A) wurde im Kontaktmodus aufgenommen und die Topographiemessung aus Abbildungsteil B) im intermittierenden Modus. Die Poren sind regelmäßig auf der Oberfläche verteilt, jedoch erscheint die Oberfläche an

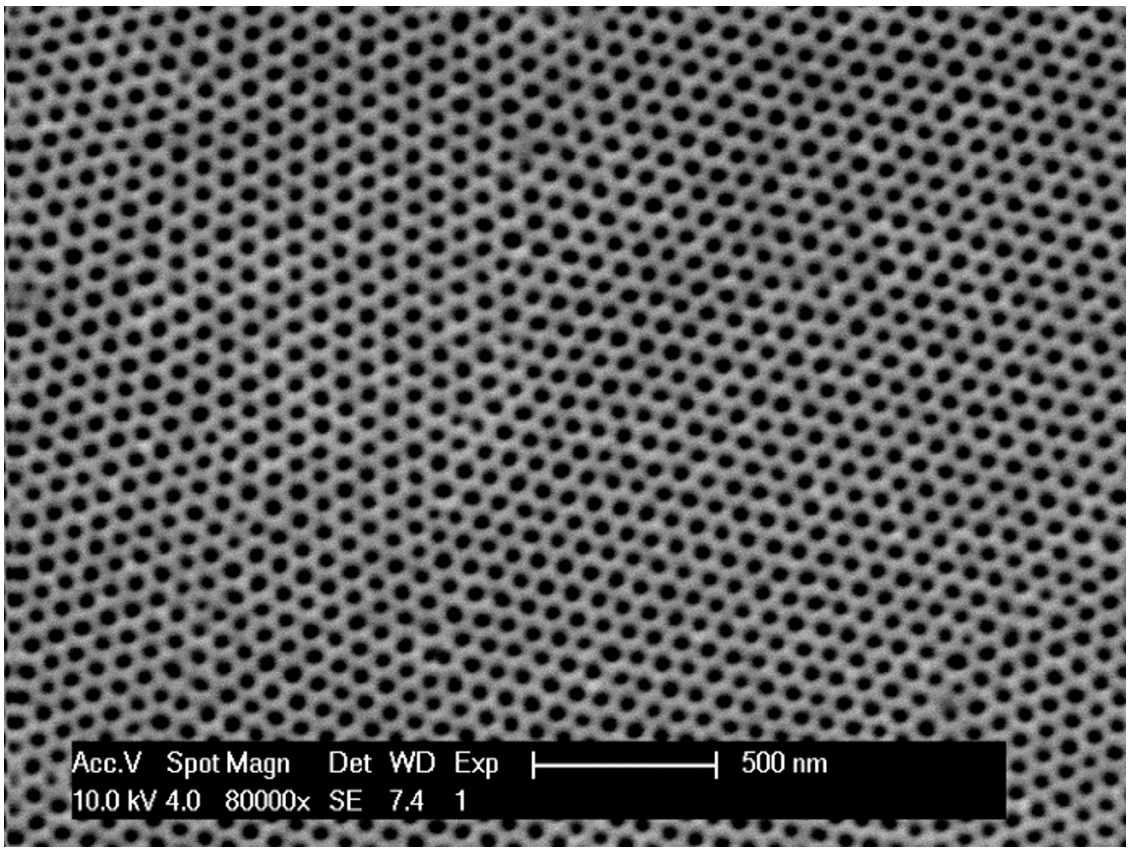


Abb. 49: SEM-Aufnahme der porösen Membran. Die Poren sind homogen auf der Oberfläche verteilt und auf der ganzen Oberfläche gleich groß. Des Weiteren sieht man keine Risse oder Unreinheiten auf der Oberfläche. Obwohl die Poren homogen auf der Membran verteilt sind, sind sie nicht linear aneinander gereiht, sondern innerhalb von verschiedenen Orientierungsdomänen. Generell sind die Poren ungefähr gleich groß, allerdings finden sich anhand der Korngrenzen verzogene und sehr kleine Poren, die zum Teil auch miteinander verbunden sind. [4]

sich leicht gewellt, was auch das Höhenprofil anzeigt. Das Höhenprofil zeigt eine maximale Schwankung von 40-50nm an. Die Oberfläche ist somit relativ eben, was sie für die späteren Reibungsmessungen gut geeignet macht. Die Poren an sich sind nicht rund, sondern wirken eher wie Bienenwaben hexagonal angeordnet. Im Abbildungsteil A) sind erneut zwei dunkle größere Linien links und mehrere kürzere und dünnere Linien rechts zu sehen. Interessant ist, dass sowohl die dickeren als auch die dünneren parallel zueinander verlaufen. Im Hintergrund sind die Poren zu sehen. Im BildC) sind keine Artefakte zu sehen. Die Poren liegen gleichmäßig verteilt auf der Oberfläche.

Einen genaueren Überblick über die Porenstruktur liefert die Abbildung 52. Sie zeigt die Porenverteilung auf einer Skala von 1μm x 1μm. Die Poren sind gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Jedoch sind manche, vor allem auf der rechten Seite, miteinander verbunden und an manchen Stellen wie zum Beispiel links unten gibt

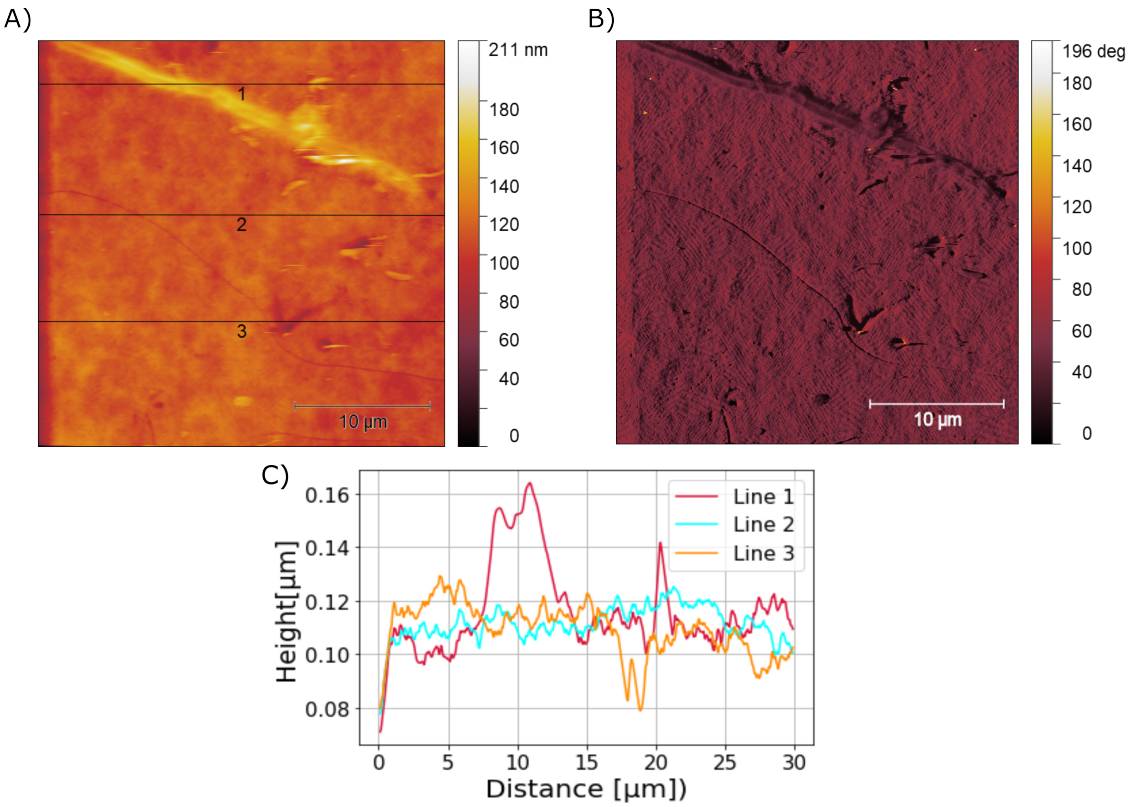


Abb. 50: A) Abbildung der Oberfläche als Topographiemessung mit den Maßen 30μm x 30μm. B) Die gleiche Messung, jedoch diesmal als Phasenbild. C) Linescan der links oben gezeigten Topographiemessung.

---

es Stellen, an denen sich bei einem regelmäßigen Muster Poren formen müssten, aber keine sind. Des Weiteren variiert die Größe der Poren. So wirken die Poren leicht links generell etwas schmäler als die Poren leicht rechts. Generell zeigt das Höhenprofil, dass die Probenoberfläche leicht gewellt ist. Dies könnte sowohl am Aufkleben der Membran als auch an der Struktur der Membran selbst liegen. Laut dem Höhenprofil liegt die Tiefe der Poren bei mindestens 2nm. Über die wirkliche Tiefe der Pore kann das Höhenprofil jedoch keine Auskunft geben, da die Messung durch die Breite der Spitze des Cantilevers und deren mögliches Eindringen in die Pore begrenzt ist. Abbildung 53 verdeutlicht dies etwas besser. Die Spitze des Cantilevers ist sehr viel größer als die Pore und hat eine Höhe von 12000nm. Die Spitzenbreite beträgt um die 10nm. Der Winkel des Querschnitts der Spitze beträgt insgesamt 56°. Damit kann die Spitze nur eine Tiefe von bis zu 37nm erreichen. Abbildungsteil A) beschreibt den ungefähren Aufbau, wohingegen Abbildungsteil B) den ungefähren Höhenverlauf der Spitze beschreibt.

Um die Abbildung von einer einzelnen Pore zu erhalten, wurde die Skala noch einmal auf 250nm x 250nm verkleinert. Die Poren weisen unterschiedliche Größen auf. Sowohl die großen als auch die kleinen Poren bilden eine gleichmäßig verteilte

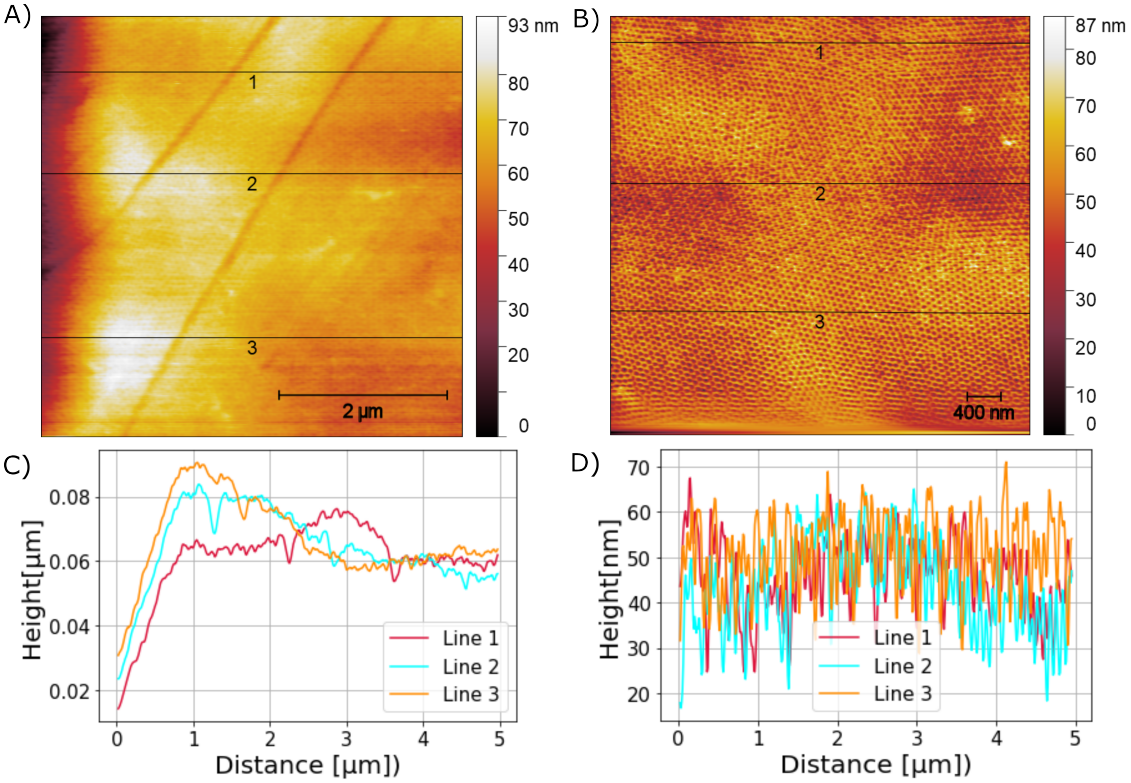


Abb. 51: A) Abbildung der Membran auf einer Skala von $5\mu m$ x $5\mu m$. Die Aufnahme wurde im Kontaktmodus aufgenommen. C) Der dazughörige Linescan. B) Abbildung der Membran an einer anderen Stelle. Diesmal im intermittierenden Modus mit $5\mu m$ x $5\mu m$. D) Der dazugehörige Linescan.

Kette an Poren mit regelmäßigen Abständen und ungefähr gleichen Durchmessern. Dieser starke Unterschied gilt jedoch nur für den Retrace. Im Tracesignal sehen die Poren auf der linken Seite ebenfalls größer aus, jedoch ist der Unterschied nicht so groß wie im Retracesignal. Dies spricht dafür, dass es sich bei den Größenunterschieden zumindest teilweise um ein Messartefakt handelt. Eine konkrete Breite für die Poren zu ermitteln, ist aber nicht nur wegen den Messartefakten schwierig. So stellt sich zum Beispiel die Frage, wo die Pore anfängt und aufhört. Die braunen Stellen um die schwarzen Löcher indizieren, dass die Porenwände nicht steil nach oben verlaufen, sondern leicht abgeflacht nach oben gehen. An dieser Stelle sollte sich auch die mit Poly-(4-Vinyl-Pyridin) versehene Stelle befinden. Wenn man den Linescan betrachtet, wäre die Breite einer Pore, wenn man von den äußeren Enden ausgeht, über $100nm$. Wenn man nur den schwarzen Anteil der Poren betrachtet, wären es etwas über $50nm$ bei den kleineren Poren auf der rechten Seite etwas weniger. Mit einem Durchmesser von $2nm$ wäre die DNA somit schmal genug, um in die Pore zu kriechen. Das Knäuel wäre mit einem Gyrationsradius von $92nm$ zu groß, um sich in die Pore zu fädeln, ohne sich zusammenzuziehen. Laut dem Höhenprofil läge die Tiefe bei mehreren nm. Auch wenn die genaue Tiefe der Poren nicht bestimmt werden kann, wird davon ausgegangen, dass deren Tiefe im Vergleich

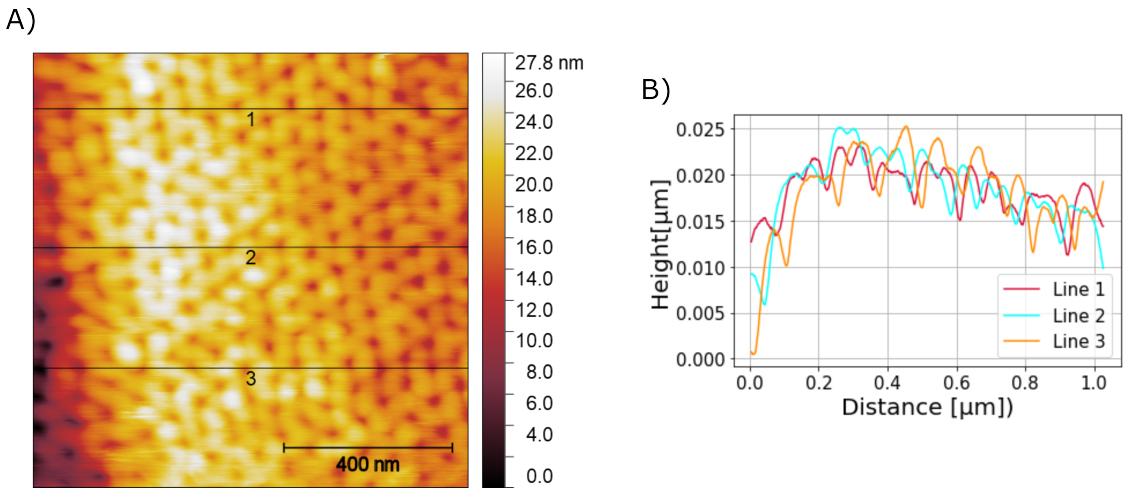


Abb. 52: A) Topographiemessung auf einer Skala von $1\mu m$ x $1\mu m$. B) Der dazugehörige Linescan. Laut diesem liegt die Tiefe einer Pore bei ungefähr $2\mu m$. Generell wirkt es so, als ob die Oberfläche links etwas höher liegen würde als rechts. Die elliptische Form der Poren bleibt in diesem Fall beim Signal sowohl im Hinweg als auch im Rückweg konstant.

zu der Länge der DNA von $2,5\mu m$ eine untergeordnete Rolle spielt.

Um die verschiedenen Proben zum Ende der Messungen noch einmal miteinander zu vergleichen, wurden alle Chargen neu vermessen. Die Proben waren zu diesem Zeitpunkt seit mehreren Monaten ausgetrocknet und von Salzkristallen der PBS-Lösung bedeckt. Zur Vermessung wurden die Proben zunächst in reinstem Wasser teilweise mehrere Tage eingeweicht, wobei die Lösung mehrmals ausgetauscht wurde. Bei den Messungen selbst konnte festgestellt werden, dass die Porenstruktur der Membranoberflächen erhalten war. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 55 zu finden. Abbildungsteil A) zeigt eine Topographiemessung von einem Membranausschnitt der Fläche $2\mu m$ x $2\mu m$. Die Poren sind klar und deutlich zu erkennen und homogen auf der Probe verteilt, allerdings sind sie nicht rund und zum Teil eher schlitzförmig, was die Berechnung eines durchschnittlichen Porendurchmessers erschwert. Es zeigen sich keine Risse oder größere Löcher in der Membran. Des Weiteren sieht man keine Ablagerung von Salzkristallen. Abbildungsteil B) zeigt eine 3D-Darstellung des gleichen Oberflächenabschnitts. Zu erkennen sind erneut die regelmäßig verteilten Poren und dass die Oberfläche zwischen den Poren nicht eben ist, sondern nach oben gewölbt. Zusammenfassend lässt sich über diese Messungen sagen, dass alle Oberflächen, abgesehen von einer Charge, noch sehr gut erhalten waren. Bei einer Charge hatte sich das Material der Membran aufgelöst, sodass die Struktur der Poren nicht mehr erhalten war. Es kann allerdings auch Zufall sein, dass sich genau diese beiden aus der gleichen Charge aufgelöst haben.

Die vorgestellten Topographieaufnahmen stimmen gut mit den Aufnahmen von Gallei et al. überein. [59] Dies betrifft sowohl die Größe der Poren, das Vorhandensein von Korngrenzen, aber auch das teilweise Verwachsen von zwei Poren zu einer

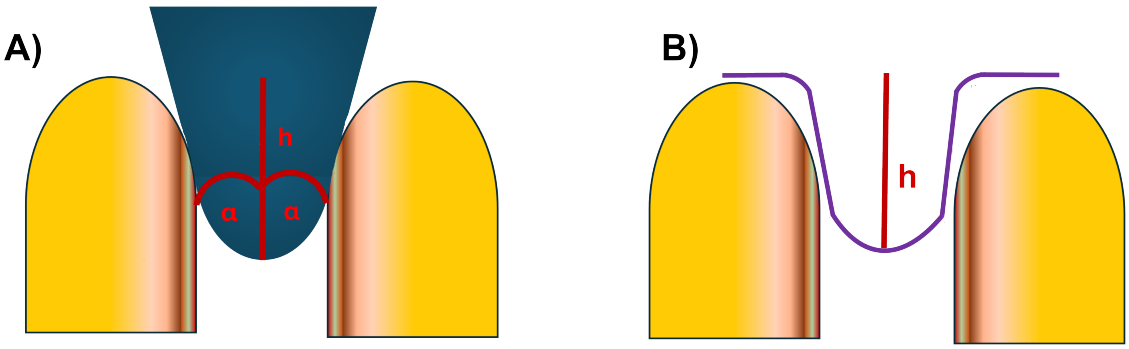


Abb. 53: Schema zur besseren Verdeutlichung der Eindringtiefe des Cantilevers in die Pore. Abbildungsteil A) zeigt den Cantilever in einer Pore mit einem Durchmesser von 40 nm. Der Winkel der Spitze α beträgt 28°. Die maximale messbare Tiefe dementsprechend $37nm$. Die Spitze ist leicht abgerundet mir einer Spitzenbreite von um die $10nm$. In Abbildungsteil B) ist das durch den Cantilever abgebildete Höhenbild (lila) zu sehen.

Pore. Leider können mit Hilfe des AFMs keine Hinweise auf die Tiefe der einzelnen Schächte geliefert werden.

Bei allen Messungen der Membranoberfläche bleibt ebenfalls das Problem, dass mit den Topographiemessungen nur die Struktur abgebildet werden kann. Die Methylierung wird nach der Strukturbildung durchgeführt, weswegen die Porenstruktur nicht eine geglückte Mehtylierung nachweisen kann. Ob die Methylierung funktioniert hat beziehungsweise, ob sie nur an manchen Stellen erfolgt ist, lässt sich mit einer Topographiemessung nicht sagen.

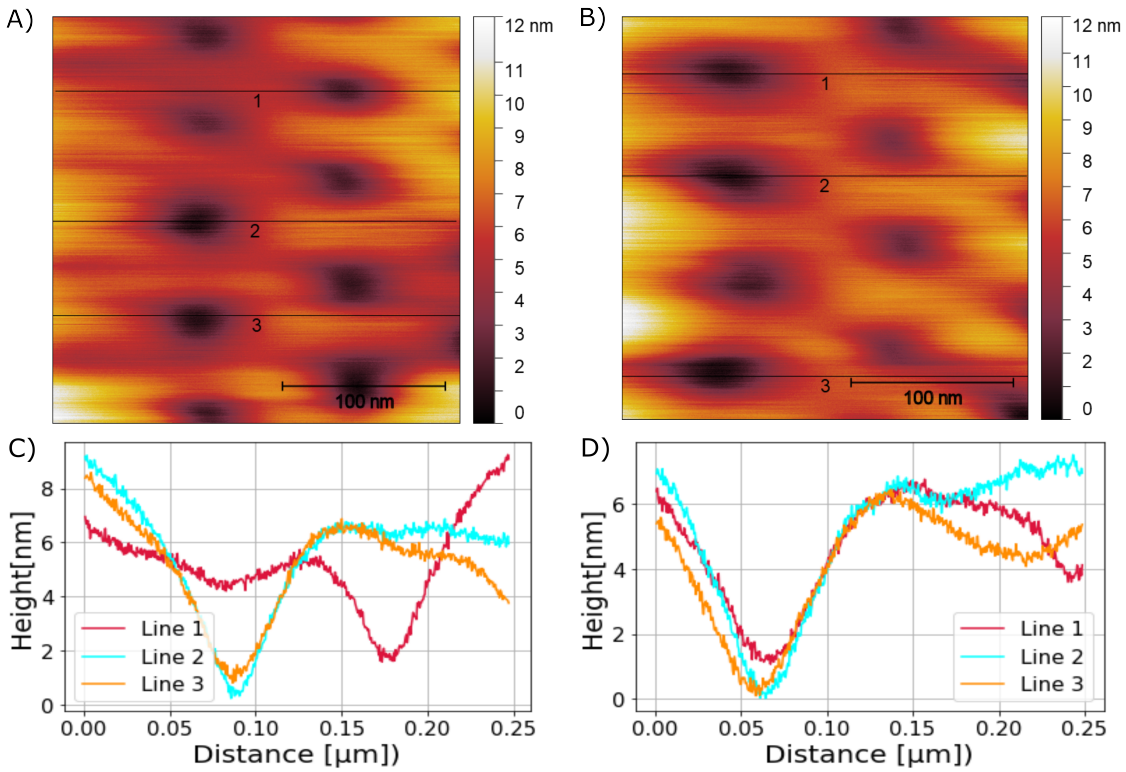


Abb. 54: A) und B) Topographiemessungen der Membran auf einer Skala von 250nm x 250nm. C) und D) Die dazugehörigen Linescans. Zu erkennen ist, dass die Poren eine unterschiedliche Größe aufweisen.

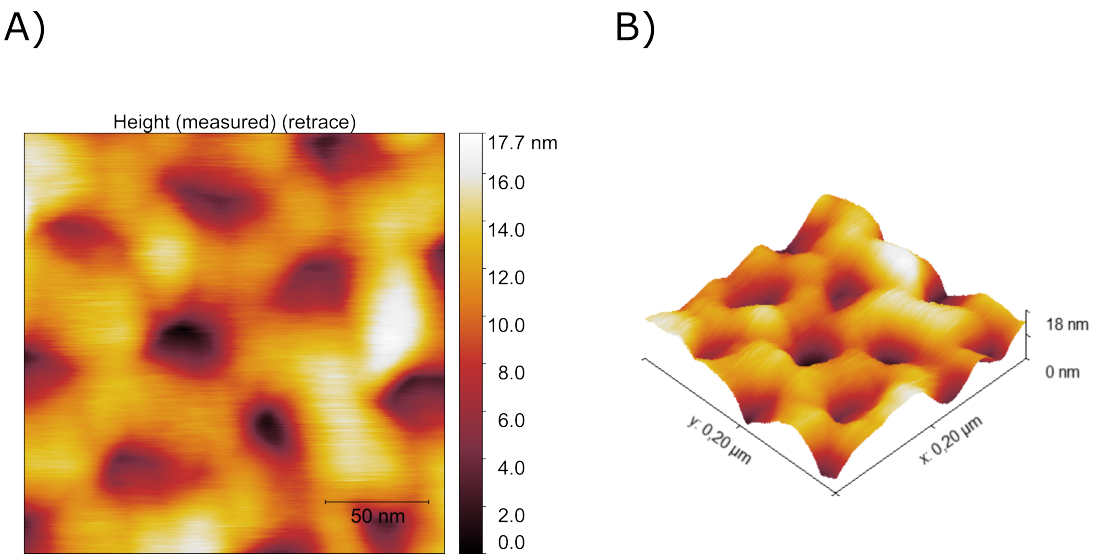


Abb. 55: A) Topographieaufnahme von einer Membranoberfläche, die über ein halbes Jahr ausgetrocknet war. Die Porenstruktur ist dennoch gut zu erkennen und es sind keine Salzkristalle abgebildet. B) 3D-Struktur der gleichen Membranoberfläche. Die Flächen zwischen den Poren sind nicht eben, sondern leicht erhöht. [4]

6.1.4 Abbildung der Poly-L-Lysinoberfläche

Zur Charakterisierung der Poly-L-Lysin-Oberfläche wurden mehrere Topographiemessungen im intermittierenden Modus durchgeführt. Zusätzlich dazu wurden Phasen- und Amplitudenbilder aufgenommen. In Abbildung 56 wird jeweils eine Topographieaufnahme (Abbildungsteil A) und ein Phasenbild (Abbildungsteil B) an der gleichen Position abgebildet. Zu sehen sind insgesamt drei Streifen, die von links unten nach rechts oben verlaufen. Die Streifen sind ungefähr $4\mu m$ breit und zwischen den Streifen befinden sich freie Flächen mit einer Breite von ungefähr $10\mu m$. Bei den Streifen handelt es sich sehr wahrscheinlich um das aufgestempelte Poly-L-Lysin.

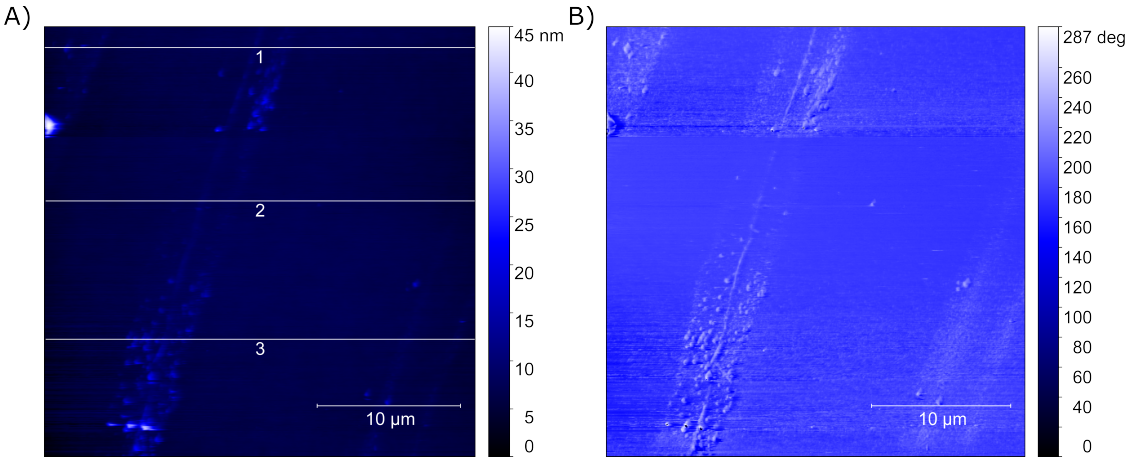


Abb. 56: Abbildung der Poly-L-Lysin-Oberfläche. Zu sehen ist in Abbildungsteil A) eine Topographieaufnahme und in Abbildungsteil B) ein Phasenbild. Die Streifen sind unregelmäßig jedoch in beiden Aufnahmen zu erkennen.

Bereits in Abbildungsteil A) lässt sich erkennen, dass das Poly-L-Lysin nicht gleichmäßig aufgetragen wurde. Vor allem in der Mitte des Bildes bei Linie 2 befindet sich fast kein Poly-L-Lysin auf der Oberfläche. Dieses konzentriert sich vor allem im Bereich des unteren bzw. des oberen Bildabschnitts. Der Streifen erreicht eine maximale Höhe von $15nm$. Mit diesem Höhenunterschied wäre der Streifen geeignet für eine Messung in mehreren $100nm$. Der Cantilever würde beim Wechsel zwischen freier Fläche und Poly-L-Lysin nicht in Kontakt mit der Oberfläche geraten. Des Weiteren ist der rechte Streifen schlechter zu erkennen, als der mittlere Streifen. Dieses Bild zeichnet sich ebenfalls im Phasenbild. Auch hier ist der Verteilung des Poly-L-Lysins unregelmäßig.

Allgemein war das Poly-L-Lysin sehr unregelmäßig auf den Streifen aufgetragen. Stempelreste zwischen den Streifen waren jedoch kaum vorhanden.

6.2 Adhäsionsmessungen

In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse der Adhäsionsmessungen auf Cellulosenitratoberflächen und poröser Membran vorgestellt und diskutiert. Ein besonderer Schwerpunkt liegt hierbei auf der Analyse der Abrisslänge, der Abrisskraft und der Anzahl der Abrisse. Des Weiteren ist von Interesse, welche Polymermodelle sich auf die Form der Kraft-Distanzkurven anwenden lassen. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Worm-Like-Chain-Modell oder Overstretching. Außerdem werden diverse Beispielkurven vorgestellt, um einen besseren Einblick in die Messanalyse zu vermitteln.

6.2.1 Adhäsionsmessungen auf Cellulosenitratoberflächen

In diesem Unterkapitel widme ich mich zunächst den Adhäsionsmessungen auf Cellulosenitratoberflächen. Die Kraft-Distanzkurven wurden auf Abrissmomente manuell untersucht. Des Weiteren wurden von jedem Abrissmoment die Abrisslänge, die Abrisskraft und die Form des Kraftanstiegs während der Streckung des DNA-Strangs analysiert. Dabei wird unterschieden, ob die Kraft linear ansteigt oder ein Plateau bildet. Abrissmomente werden nur gewertet, solange sie mindestens eine Abrisslänge von über $1.0\mu m$ aufweisen. Es wurde außerdem notiert, ob es sich bei den Kraft-Distanzkurven um Kurven handelt, die mehrere Abrissmomente oder nur einen Abrissmoment zeigen. Bei allen Kraft-Distanzkurven wurde die Kraft außerdem um den Faktor 1.65 nach oben korrigiert. Die Kräfte wurden anhand des Overstretchings nachkalibriert. Das Overstretching fand während den Messungen im Durchschnitt bei $40pN$ beziehungsweise bei $80pN$ statt. Der Literaturwert beträgt für Overstretching $65pN$, weswegen die Kräfte nach oben korrigiert wurden. Die Messergebnisse sind von besonderem Interesse, da die DNA zu Beginn aller Adhäsions- und Reibungsmessungen von einer Cellulosenitratoberläche abgelöst wird und dieser Teil des Experiments somit in jeder Messung vorhanden ist. Des Weiteren bietet sie eine geeignete Möglichkeit, die Messergebnisse mit denen auf der porösen Membran zu vergleichen.

Im Folgenden werden nun die verschiedenen Kategorien der Kraft-Distanzkurven vorgestellt. Abbildung 57A) zeigt eine Kraft-Distanzkurve mit einem einzelnen Abrissmoment. Die Kraftdistanzkurve weist zunächst einen leichten Adhäsionspeak auf. Dieser ist allerdings unter der Grenze von $1.0\mu m$ und wird somit nicht in die Wertung genommen. Der leichte Adhäsionspeak könnte außerdem auch vom Ablösen des Beads stammen und nicht von der DNA selbst. Ab einer Distanz von ungefähr $2.5\mu m$ wird die DNA gestreckt und der Cantilever ausgelenkt. Die Kraft steigt linear an und die DNA reißt bei einer Länge von $2.8\mu m$ ab. Die benötigte Abrisskraft liegt bei $75pN$. Bei diesem Abriss wird kein Overstretching beobachtet. Die Form des Kräfteanstiegs verläuft konkav und gemäß des eWLC-Modells. Deshalb zählt diese Kurve zur Kategorie „Single & eWLC “.

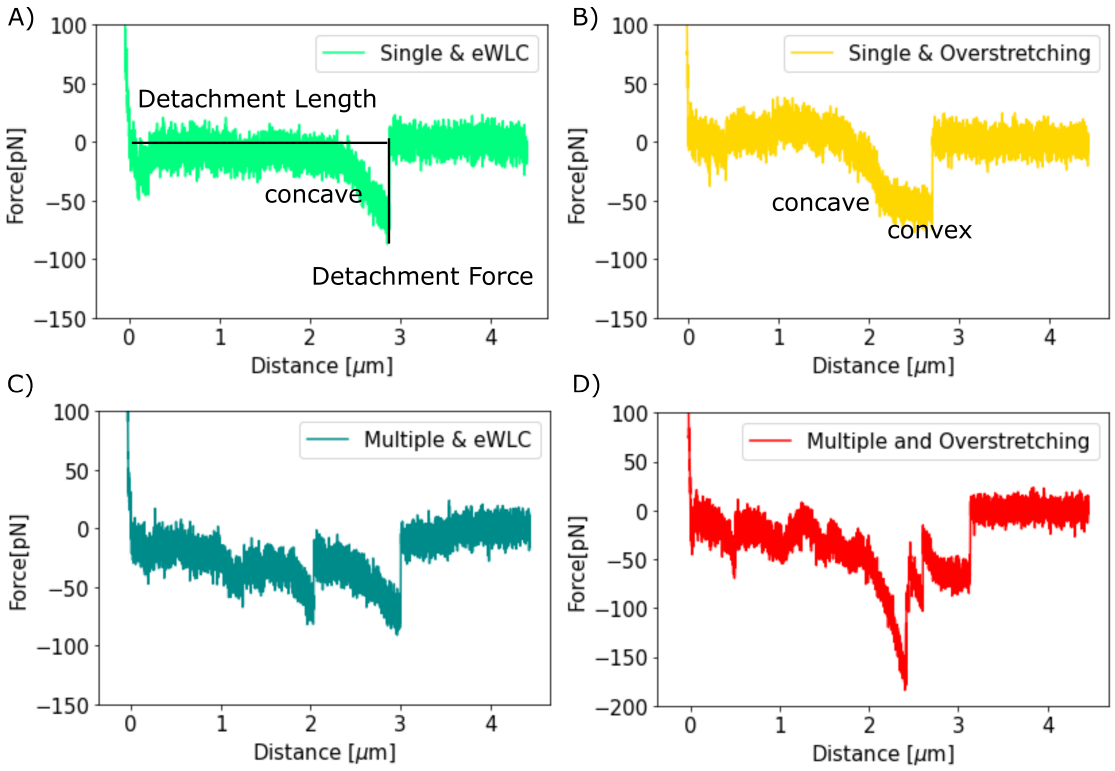


Abb. 57: Abbildungsteil A) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die einen einzelnen nicht konvexen Abriss zeigt. Sie zählt somit zu den Kurven „Single & eWLC ". Der Abriss zeigt einen Abrissmoment mit einer Abrisslänge von $2.8\mu m$. Abbildungsteil B) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die einen einzelnen konvexen Abriss zeigt. Sie zählt somit zu den Kurven „Single & Overstretching". Der Abriss zeigt einen Abrissmoment mit einer Abrisslänge von etwas unter $3\mu m$. Vor dem Ablösen der DNA von der Oberfläche steigt die Kraft nicht linear an, sondern weist ein Plateau auf. Dieses Plateau deutet darauf hin, dass die DNA nicht nur gestreckt wird, sondern im Bereich des Plateaus auch überstreckt wird. Des Weiteren sieht man einen leichten Adhäsionspeak. Abbildungsteil C) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die mehrere Abrisse ohne Overstretching zeigt. Die Abrissmomente zählen somit zur Kategorie „Multiple & Overstretching". Insgesamt kann man drei Abrissmomente feststellen. Abbildungsteil D) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die mehrere Abrissmomente zeigt, von denen einer der konvexen Sparte zugeordnet werden kann. Die ersten Abrisse zählen somit zu der Kategorie „Multiple & Overstretching"und der letzte Abriss auch zur Kategorie „Multiple & Overstretching ".

Abbildung 57B) zeigt eine Kurve mit einem einzelnen Abrissmoment. Die Kurve weist jedoch keinen linearen Kraftanstieg bis zum Abrissmoment auf. Zu Beginn der Streckung verläuft der Kräfteanstieg monoton steigend gemäß des eWLC-Models. Sobald die maximale Kraft erreicht wurde, mündet die Kraft-Distanzkurve in ein Kräfteplateau mit konvexer Krümmung. Das Kräfteplateau ist ungefähr $0.5\mu m$ lang. In diesem Bereich findet das Overstretching der DNA statt. Die DNA löst sich bei einer Distanz von knapp unter $3\mu m$ ab. Die Abrisskraft beträgt um die $65pN$, was

dem Literaturwert entspricht. Da die Kraft-Distanzkurve nur einen Abrissmoment vorweist und dieser ein Kräfteplateau aufweist, zählt sie zu der Kategorie „Single & Overstretching “.

Bei der Kraft-Distanzkurve in Abbildung 57C) sind drei Abrissmomente zu finden. Zwei davon sind sehr deutlich zu erkennen und liegen bei einer Cantileverhöhe von $2\mu m$ beziehungsweise $3\mu m$. Die Abrisskraft liegt in beiden Fällen bei $75pN$. Ein weiterer Abrissmoment liegt etwas versteckter im Hintergrundrauschen. Er weist eine Abrisslänge von $1.3\mu m$ und eine Abrisskraft von ungefähr $60pN$ auf. Seine Abrisskraft liegt somit leicht unter der der anderen Abrisskräfte. Dass es drei Abrissmomente gibt, könnte bedeuten, dass entweder zwei DNA-Stränge angebunden sind oder dass sich die DNA von der Anti-Dig-Anbindungsstelle löst, sich direkt danach erneut anbindet und dann zum letzten Mal abreißt. Beide Abrissmomente fallen in die Kategorie „Multiple & eWLC “.

Die letzte Beispielkurve ist in Abbildung 57D) zu sehen. Sie weist mehrere Abrissmomente auf, drei davon verlaufen nicht konvex und einer konvex. Der Abrissmoment zu Beginn der Kraft-Distanzkurve findet bei einer Distanz von unter $1\mu m$ statt. Er fällt somit nicht in die Statistik. Die nächsten beiden Abrisse verlaufen ebenfalls nicht konvex und folgen direkt aufeinander. Zwischen den beiden Abrissmomenten fällt die Kraft nicht auf 0 zurück. Der erste Abrissmoment ist bei fast $200pN$ und der zweite Abrissmoment bei $100pN$. Der letzte Abriss weist ein Kräfteplateau auf, was für Overstretching spricht. Er findet bei ungefähr $3.5\mu m$ und einer Abrisskraft von $65pN$ statt. Das Kräfteplateau selbst ist um die $0.5\mu m$ lang. Somit fallen die ersten beiden Abrissmomente in die Kategorie „Multiple & Overstretching“und der letzte Abrissmoment in die Kategorie „Multiple & Overstretching“. Da die Abrissmomente eine Abrisskaskade bilden, könnte es sein, dass die DNA langsam und ruckweise von der Oberfläche gelöst wurde. Dies könnte man mit dem langsamen Ablösen eines Kaugummis vergleichen, dessen verschiedene Anbindungspunkte nach und nach von der Oberfläche abgezogen werden. Kurz bevor sie komplett abreißt, wird sie noch ein letztes Mal überstreckt, wodurch der konvexe Abrissmoment entsteht.

Vereinzelt konnten neben diesen Kraftverläufen auch Messkurven aufgenommen werden, die einzelne rechteckige Stufen statt dem Kräfteabfall in Abbildung 57 A) oder C) aufwiesen. Da diese allerdings kein konvexes Kräfteplateau wie in 57 B) oder D) aufweisen werden diese Kurven ebenfallls zu „Single & eWLC “beziehungsweise „Multiple & eWLC “gezählt.

Das Ablöseverhalten der DNA-Moleküle erinnert an die Kraft-Distanzkurven von Okajima et al. [25] und Iliafar et al. [28]. Okajima et al. fanden zwei verschiedene Arten von Kraft-Distanzkurven als sie einzelne Polymerstränge aus einem Gel zogen. Zum einen Kraftdistanzkurven, die ein Stufenplateau und zum anderen Kraft-Distanzkurven, die einen linearen Kräfteanstieg zeigten. Das Stufenplateau spricht dafür, dass das Polymer an den Strängen im Gel vorbeigeglitten ist und der

lineare Abfall dafür, dass sich das Polymer verhakt hat. Diese beiden Phänomene treten auch bei unseren Messkurven auf, was bedeutet, dass die Stränge an diesen Stellen entweder an der Oberfläche vorbeiglitten oder sich verhakt hatten. Auch die stufenförmigen Abrisskaskaden bei Iliafar et al. die beim schrittweisen Ablösen aufgenommen worden sind passen sehr gut ins Bild.

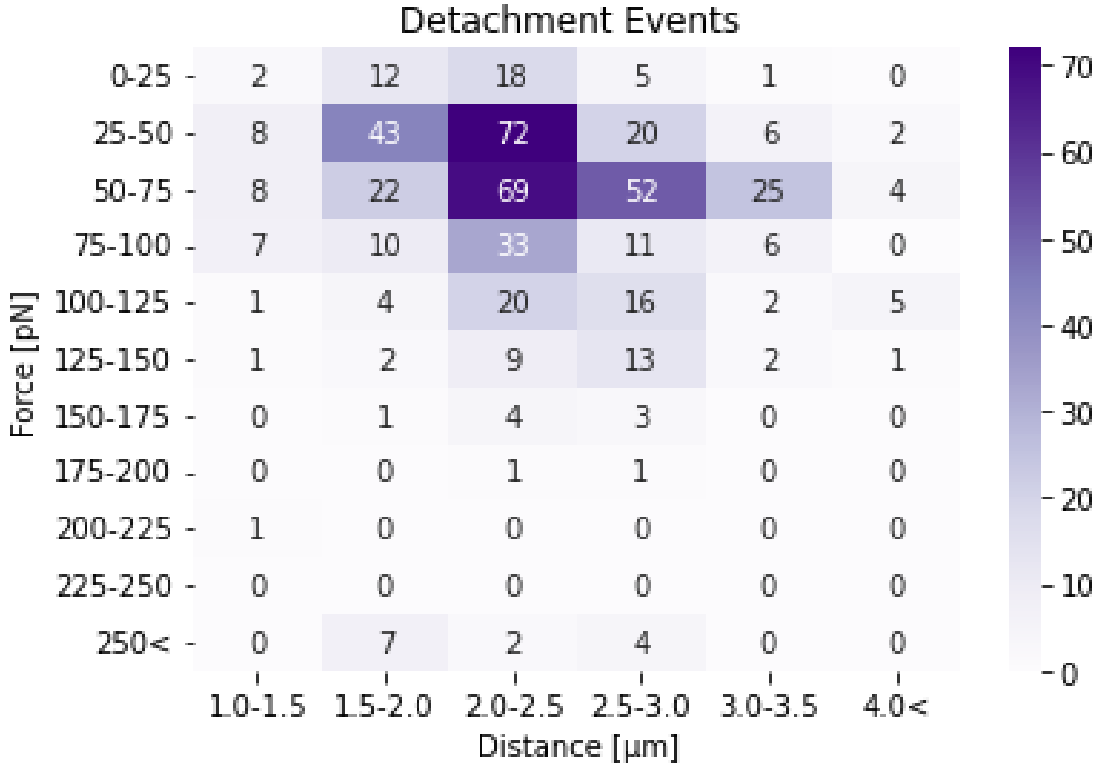


Abb. 58: Heatmap über die verschiedenen Abrisse. Die einzelnen Abrisse werden unterteilt in Bezug auf die Abrisslänge und die Abrisskraft. Die Felder variieren in Bezug auf die Abrisslänge auf dem Cellulosenitrat zwischen $1\mu m$ und über $4\mu m$ und sind jeweils $0.5\mu m$ groß. Bezüglich der Abrisskraft variieren die Felder zwischen $0pN$ und über $250pN$, wobei die Felder jeweils $25pN$ umfassen. Die Anzahl der Abrissmomente pro Feld erstreckt sich von 0 bis 72.

Nachdem die möglichen verschiedenen Formen der Abrissmomente vorgestellt wurden, kann zur Analyse der Abrissmomente übergegangen werden. Besonders wichtig ist in diesem Fall die Untersuchung der Abrisslänge und der Abrisskraft. In Abbildung 58 findet sich eine Heatmap, die die Verteilung der Abrissmomente in Abhängigkeit von der Abrisslänge und der Abrisskraft darstellt. Zunächst fällt auf, dass die meisten Abrissmomente bei einer DNA-Streckung von 2.0 bis $2.5\mu m$ auftreten. Insgesamt treten in diesem Bereich 72 Abrisse mit einer Abrisskraft zwischen 25 und $50pN$ auf und 69 bei einer Abrisskraft zwischen 50 und $75pN$ auf. Abrisse mit niedrigeren Abrisslängen weisen häufiger auch niedrigere Abrisskräfte auf. So lässt sich feststellen, dass bei einer Abrisslänge zwischen 1.5 und $2.0\mu m$ die Abrisskraft

in den meisten Fällen zwischen 25 und $50pN$ liegt. Bei einer Abrisslänge zwischen 2.5 und $3.0\mu m$ weisen die meisten Abrissmomente eine Abrisskraft zwischen 50 und $75pN$. Bei einer höheren Abrisskraft von über $100pN$ dünnt die Anzahl der Abrissmomente stark aus. Nur vereinzelt finden sich Abrissmomente bei einer DNA-Streckung von über $4.0\mu m$. Im Bereich zwischen 150 und $250pN$ finden sich so gut wie gar keine Abrissmomente mehr. Überraschend ist eine kleinere Häufung bei über $250pN$. Die Abrisslänge liegt bei diesen Abrissmomenten zwischen 1.5 und $3.0\mu m$. Interessant ist auch, dass die meisten Abrissmomente eine Abrisslänge zwischen 1.5 und $2.0\mu m$ aufweisen, also eine tendenziell kleinere Abrisslänge. Dies widerspricht der Tendenz im niedrigeren Kraftbereich, bei dem die Abrisslänge mit zunehmender Kraft höher wird.

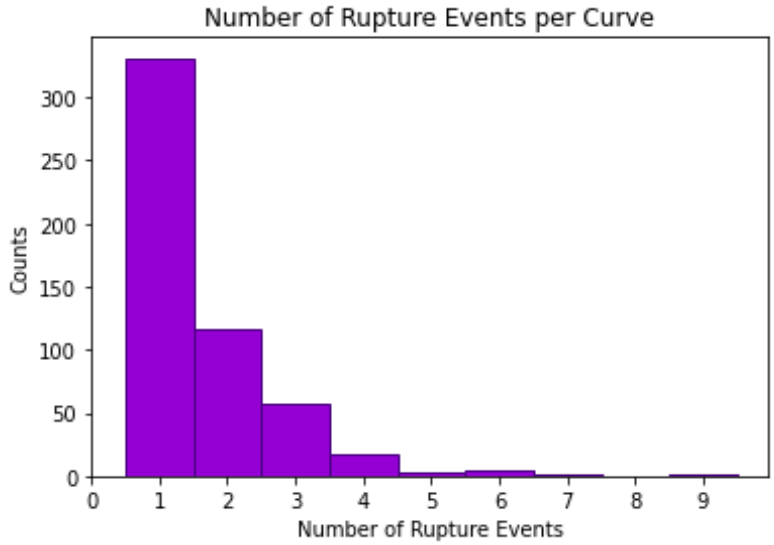


Abb. 59: Überblick über die Anzahl der Abrisse innerhalb einer aufgenommenen Kraft-Distanzkurve.

Abbildung 59 geht auf die Anzahl der Abrisse innerhalb einer Kraft-Distanzkurve ein. So zeigt sie an, dass über 300 Kraft-Distanzkurven nur einen einzelnen Abriss aufweisen. Dieser kann konvex oder nicht konvex verlaufen. Knapp über 100 Kurven weisen mindestens zwei Abrisse auf. Diese können entweder beide nicht konvex sein, beide konvex oder einer davon konvex und der andere nicht konvex. Ungefähr 50 Messkurven weisen drei Abrissmomente auf und ungefähr 20 vier Abrissmomente. Sehr wenige Messkurven weisen fünf, sechs, sieben oder neun Abrissmomente auf. Keine einzige zeigte acht Abrissmomente. Dass die meisten Kraft-Distanzkurven lediglich einen Abrissmoment zeigen, unterstützt die These, dass die DNA in den meisten Fällen lokal eine Dig-Antidigbindung eingeht, die gelöst wird, sobald die DNA gestreckt wird. Durch die einmalige Ablösung entsteht nur ein Abriss. Der Rest des Stranges interagiert in diesem Fall also wahrscheinlich nicht mit der Oberfläche und wird nicht stückweise nach und nach abgezogen.

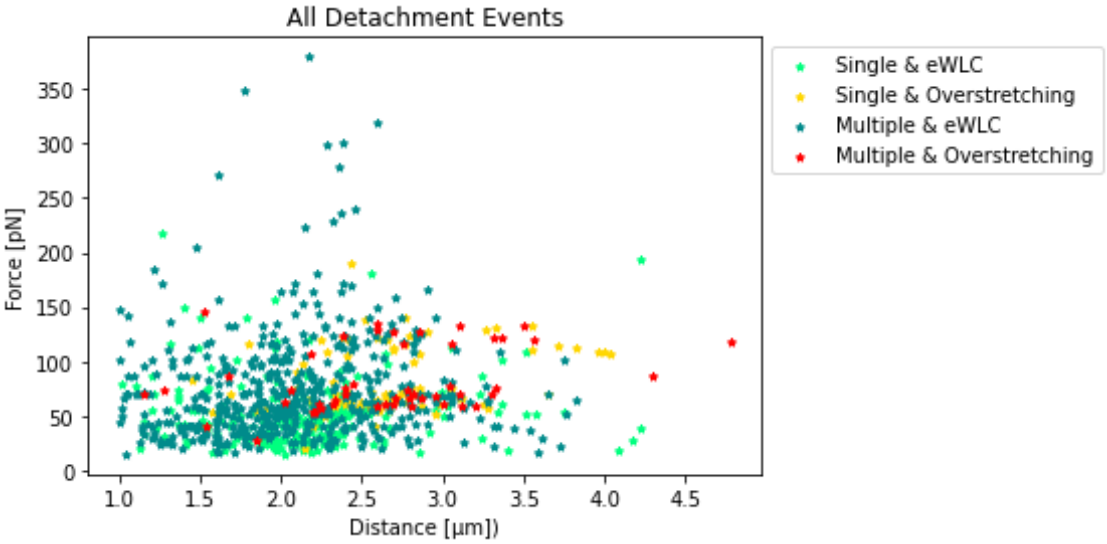


Abb. 60: Übersicht über alle Abrissmomente in Abhängigkeit von der Abrisslänge und der Abrisskraft. Bei allen Abrissen wird unterschieden, ob sie in einer Kraft-Distanzkurve auftreten, in der mehrere oder nur ein Abriss vorherrschen, und ob innerhalb dieser Kraft-Distanzkurve Konvexe Abrisse vorhanden sind.

In Abbildung 60 ist die Verteilung der Abrissmomente in Abhängigkeit von der Abrisslänge und der Abrisskraft erneut dargestellt. Dabei wird allerdings zwischen den verschieden Abrissarten unterschieden. Abrissmomente, die aus einer Kraft-Distanzkurve stammen, lediglich einen Abriss vorweisen und nicht konvex verlaufen, werden in Cyan dargestellt. Sie fallen in die Kategorie „Single & eWLC“. Abrissmomente, die aus einer Kraft-Distanzkurve stammen, die lediglich einen Abriss vorweisen und konvex verlaufen sind, dunkelgelb. Somit gehören sie zur Kategorie „Single & eWLC“. Abrissmomente aus Kraft-Distanzkurven mit mehren Abrissmomenten werden in Rot dargestellt, sofern sie konvex verlaufen, und in Blau, sofern sie kein Overstretching zeigen. Sie kommen in die Sparte „Multiple & Overstretching“beziehungsweise „Multiple & eWLC“. Generell lässt sich auf den ersten Blick feststellen, dass die meisten Kurven kein Overstretching aufweisen. Des Weiteren überwiegen die Abrissmomente der Kategorie „Multiple & eWLC“, was darauf zurückzuführen ist, dass solche Kraft-Distanzkurven mehr Abrisse aufweisen und somit auch mehr Datenpunkte erzeugen. Des Weiteren formen die Abrissmomente mit konvexem Abriss zwei konstante Stufen. Einmal bei $65pN$ und einmal bei um die $120pN$. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Abrissmomente von der oberen Stufe durch die Ablösung von zwei verschiedenen DNA-Strängen stammen. Des Weiteren finden sich vereinzelt Abrisse mit einer Abrisskraft von über $200pN$. Allerdings zeigt keiner dieser Momente Anzeichen von Overstretching, obwohl die Grenze von $65pN$ überschritten ist. Abrisse mit Overstretching lassen sich vor allem bei einer Abrisslänge von über $2.5\mu m$ finden. Dies liegt an dem Overstretching, was die eigentliche Konturlänge von $2.5\mu m$ überstreckt und dass die DNA somit länger wird.

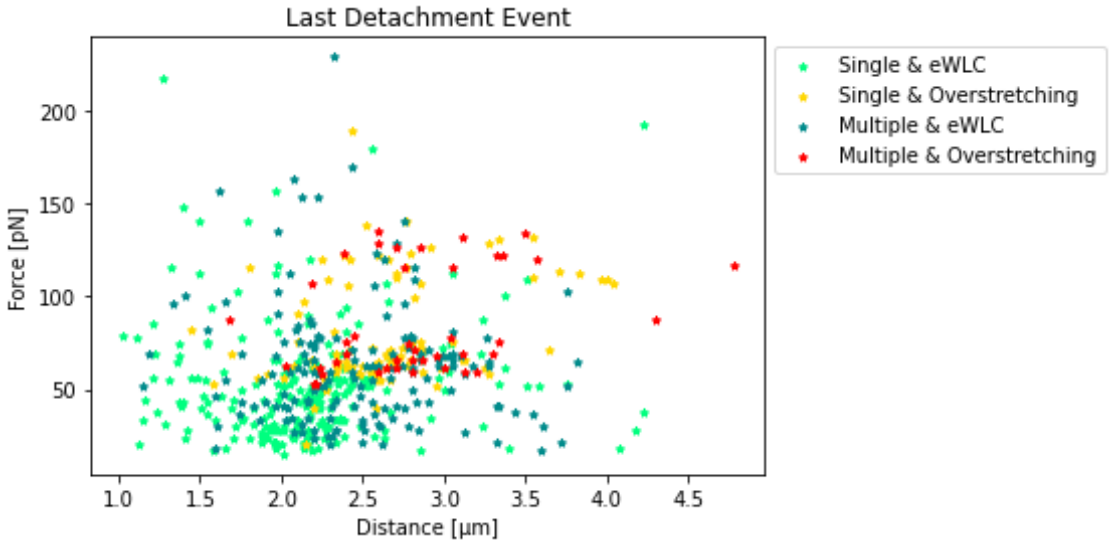


Abb. 61: Übersicht über alle letzten Abrissmomente. Bei den Abrissmomenten wird erneut unterschieden, ob sie aus einer Kraft-Distanzkurve mit mehreren oder nur einem Abrissmoment stammen. Des Weiteren, ob es ein Konvexer Abriss ist oder nicht. Wenn es sich bei der Messkurve um eine Kraftkurve mit nur einem Abrissmoment handelte, wurde dieser Abriss gewählt.

Abbildung 61 zeigt im Gegensatz zu Abbildung 60 lediglich den letzten Abriss. Dies sorgt für eine präzisere Übersicht, da alle Kraft-Distanzkurven nur einen Abrissmoment in die Statistik einfließen lassen. Dadurch gibt es viel weniger Datenpunkte in der Kategorie „Multiple & eWLC“. Somit ist die starke Häufung der Abrissmomente der Kategorie „Single & eWLC“zwischen 1.0 und 2.5μm und bei unter 100pN besser sichtbar. Ebenfalls deutlich sichtbar sind die beiden Stufen, die durch die konvexen Abrissmomente gebildet werden. Diese fangen bei einer Abrisslänge von um die 2.0μm an. Je länger die Abrisslänge, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen konvexen Abriss handelt. Dennoch gibt es auch bei einer Länge von über 2.5μm einige Abrisse, die nicht konvex verlaufen. Eigentlich würde eine höhere Abrisslänge auf Overstretching hindeuten. Allerdings fehlt das Kräfteplateau. Außerdem gibt es bei einer Abrisskraft von über 150pN vor allem Abrisse ohne Kräfteplateau. Dies könnte auf mehrere DNA-Stränge hindeuten. Wenn man die nicht konvexen Abrisse vergleicht, fällt auf, dass die Abrissmomente der Kraft-Distanzkurven mit mehreren Abrissmomenten tendenziell eine höhere Abrisslänge aufweisen als die mit nur einem Abrissmoment. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die DNA Schritt für Schritt abzieht und dabei leicht gedehnt wird. Das könnte vielleicht auch das Kräfteplateau des Overstretchings überdecken. Die Messergebnisse lassen sich gut mit der Arbeit von Zhang et al. [17] vergleichen. Dieser fand Polymere, die durch Streckung auf das 1.7−-fache gestreckt waren. Dies würde für die DNA in diesem Fall eine maximale Länge von 4.25μm bedeuten.

Abbildung 62 beschäftigt sich lediglich mit den Konvexen Abrissmomenten. Abbil-

dungsteil 62 A) zeigt das Verhältnis zwischen Einzelabrissen und Mehrfachabrissen. Die Mehrfachabrisse müssen dabei mindestens einen konvexen Abriss aufweisen. Insgesamt ist es so, dass zwei Drittel der Kraft-Distanzkurven mit konvexem Abrissmoment nur einen einzelnen Abriss aufweisen. Ein Drittel weist mehrere Abrisse auf. In Abbildungsteil 62 B) wird untersucht, ob eine Kraft-Distanzkurve, die mehrere Abrissmomente aufweist, von denen mindestens einer konvex verläuft, mit einem konvexen Abriss endet. Dies trifft in den allermeisten Fällen zu. Wie bereits beschrieben, deuten mehrere Abrisse entweder auf ein stückweises Ablösen oder Hopping hin. Ein konvexer Abrissverlauf verweist darauf, dass die DNA überstreckt wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass die DNA überstreckt wird und dann endgültig abreißt, ist hoch. Es ist wahrscheinlich, sollte die DNA an mehreren Punkten unspezifisch angedockt sein, dass diese Anbindungen zuerst reißen, bevor sie sich überstreckt. Abbildungsteil 62 B) unterstützt diese These. Bei unter 5% handelt es sich bei dem letzten Abrissmoment in der Kategorie „Multiple & Overstretching “nicht um einen Abrissmoment, der konvex verläuft.

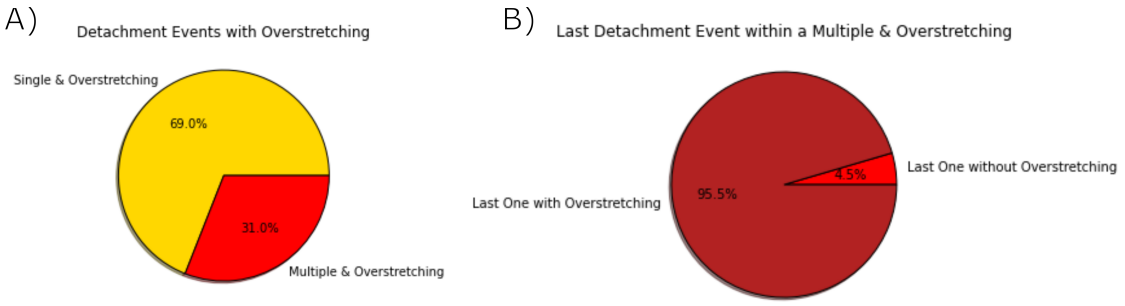


Abb. 62: Überblick über die Kraft-Distanzkurven, die mindestens einen Konvexen Abriss vorweisen. Abbildungsteil A) stellt das Verhältnis zwischen Kraftkurven dar, in denen es lediglich einen Abrissmoment gibt, der zusätzlich konvex ist, und Kraftkurven, die mehrere Abrissmomente aufweisen und bei denenmindestens einer davon konvex ist. Abbildungsteil B) zeigt, dass bei 95% der Mehrfachabrisskurven mit mindestens einem Konvexen Abriss der letzte Abriss ein Konvexer Abriss ist.

Bis jetzt lag der Fokus auf dem Zeitpunkt des Abrissverhaltens. Konvexe Abrissmomente mit Kräfteplateau deuten auf ein Overstretching hin. Mehrere Abrisse deuten auf ein stückweises Ablösen oder Hopping hin. Abrissmomente mit einer höheren Abrisslänge als $2.5\mu m$ sind wahrscheinlich auf eine Streckung der DNA zurückzuführen und hohe Abrisskräfte könnten auf mehrere DNA-Stränge hindeuten. Eine Erklärung für kürzere Abrisse als $2.5\mu m$ könnte die Anbindung der DNA liefern. (Abbildung 63) Die DNA ist nicht direkt an den Cantilever angebunden, sondern über einen Bead. Das mit Biotin funktionalisierte Ende interagiert mit einem der Streptavidinmoleküle, mit denen der Bead beschichtet ist. Der Bead selbst hat einen Durchmesser von $1.0\mu m$. Das entspricht 40% der Länge des DNA-Strangs. Je nachdem, wo die DNA auf dem Bead andockt, wird die DNA früher oder später gespannt. Dies kann für eine Variation der Abrisslänge von $1.0\mu m$ sorgen. Die

Abrisslänge würde dann zwischen 1.5 und 2.5μm liegen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für einen Großteil der Abrissmomente mit geringeren Abrisslängen.

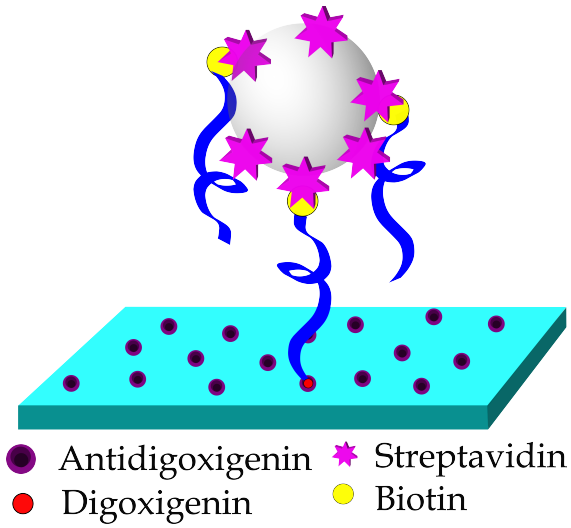


Abb. 63: Schema über die verschiedenen Andockmöglichkeiten der DNA-Moleküle am Bead. Der Bead ist mit mehreren Strepavidinmolekülen beschichtet, sodass sich die DNA-Stränge auf unterschiedlichen Höhen befinden. Die Stränge, die sich weiter oben befinden, werden schneller gespannt als die Stränge weiter unten, weswegen es zu unterschiedlichen gemessenen Abrisslängen kommen kann.

Eine weitere mögliche Erklärung, für geringere Abrisslängen wäre die Art der Anbindung an der Oberfläche. Zum besseren Verständnis ist dazu ein Schema in Abbildung 64 abgebildet. Bis jetzt wurde davon ausgegangen, dass die DNA direkt unter dem Bead an der Oberfläche andockt. Dies würde jedoch voraussetzen, dass die DNA linear nach unten hängt und beim Annähern des Cantilevers direkt mit dem Antidigoxigenin interagiert. Die DNA liegt allerdings geknäult vor und ist zusätzlich in PBS, was bedeutet, dass sie eher in der Lösung vor sich hin treibt. Die Wahrscheinlichkeit ist somit hoch, dass sich das mit Digoxigenin funktionalisierte Ende nicht direkt unter dem Bead befindet und die DNA somit nicht senkrecht zur Oberfläche gespannt wird, sondern leicht schräg. Die DNA wird in diesem Fall schneller gespannt und die Abrisslänge verändert sich. Je schräger die DNA angebracht ist, desto geringer ist die gemessene Abrisslänge. Dadurch verringert sich auch der vertikale Anteil der Abrisskraft. Wenn der Andockpunkt an der Oberfläche direkt unter dem Andockpunkt am Bead ist, ist der Anteil der Abrisskraft in die laterale Richtung gleich Null. Wenn die DNA allerdings schräg gespannt wird, kommt es zu einer Kräftezerlegung in vertikale und laterale Richtung. Da bei den Adhäsionsmessungen nur der vertikale Anteil, also die Normalkraft, gemessen wird und nicht die Gesamtkraft, erscheint die Abrisskraft kleiner, obwohl die Gesamtkraft gleich geblieben ist.

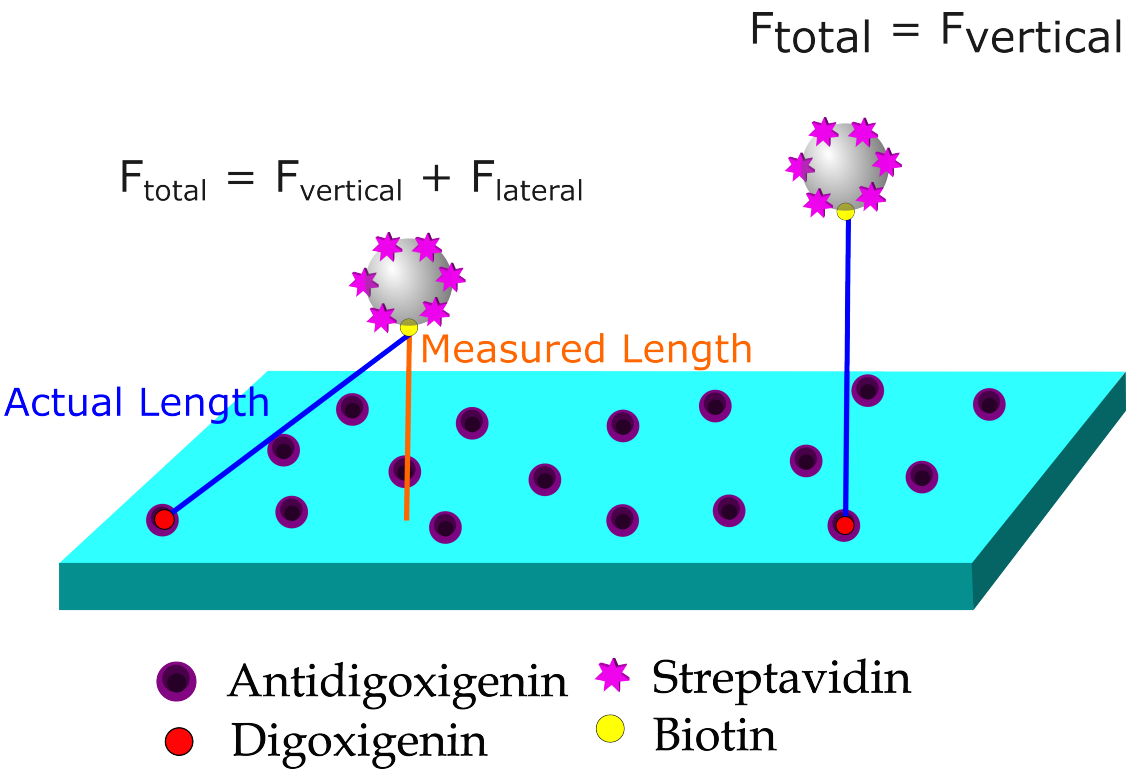


Abb. 64: Schema über die verschiedene Art und und Weise des Andockens der DNA an die Cellulosenitratoberfläche. Bei dem linken DNA-Molekül befindet sich das dazugehörige Anti-Digoxigenin nicht direkt unter dem Bead. Deswegen ist die Höhe des Cantilevers in diesem Fall nicht die gespannte Länge des Strangs. Es kommt somit zu zwei Längen. Der gemessenen Länge in Orange und der eigentlichen Länge in Blau. Zusätzlich kommt es zu einer Kräftezerlegung. Die Gesamtkraft ist nicht gleich der Normalkraft, sondern setzt sich aus dem lateralen und dem vertikalen Anteil zusammen. Bei dem rechten DNA-Strang befindet sich die zugehörige Andockstelle direkt unter dem Bead. Dadurch wird die DNA gerade nach oben gezogen und die eigentliche Länge der DNA entspricht der gemessenen Abrisslänge beziehungsweise der Höhe des Cantilevers. Die Gesamtkraft setzt sich nur aus der Normalkraft zusammen und es gibt keinen lateralen Anteil.

Interessant ist, dass die DNA trotz dieser hohen Abrisskräfte nicht vom Cantilever abreißt. Der Cantilever entfernt sich bei den Adhäsionsmessungen mit einer Geschwindigkeit von $1\mu m/s$ von der Oberfläche. Die Federkonstante schwankt je nach Messung zwischen $0.005N/m$ und $0.03N/m$. Dadurch erreicht sie eine Zugrate zwischen $30pN/s$ und $5pN/s$. Bei diesen vergleichsweise geringen Zugraten sollte die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin eigentlich bei einer Kraft von unter $100pN$ reißen. [54] Falls sich die DNA vom Cantilever gelöst hätte wäre dies aufgefallen, da es ansonsten keine weiteren Abrissmomente gegeben hätte. Dies spricht dafür, dass der Bead über mehrere Biotin-Streptavidin an den Cantilever gebunden war.

Ein weiterer Aspekt ist die Häufung von Abrissmomenten. Für die Häufung von

Abrissmomenten ist nicht nur die geglückte Anbindung der DNA an den Cantilever via Bead wichtig, sondern auch die Verteilung von Anti-Digoxigenin auf der Oberfläche. Um einen besseren Überblick zu bekommen, werden mehrere Stellen auf der Oberfläche abgerastert. Dazu wird eine Fläche festgelegt, die ein Messgitter aus verschiedenen Messpunkten beschreibt. Diese Messpunkte werden nach und nach abgerastert. Danach wird die Fläche erneut abgerastert oder die Position verschoben. Dadurch ist es möglich festzustellen, ob Andockstellen auf der beschriebenen Messfläche homogen verteilt sind oder nicht. Je mehr mögliche Andockstellen, desto mehr Abrissmomente. Diese Andockstellen kann man jedoch unter dem optischen Mikroskop nur indirekt ausmachen. Anti-Digoxigenin ist unter dem optischen Mikroskop nicht sichtbar. Ob eine Stelle auf der Cellulosenitratoberfläche gesichert mit Anti-Digoxigenin funktionalisiert ist, lässt sich nur sagen, wenn ein Bead dort angedockt ist. Durch eine Verdünnung der Beadlösung gibt es weniger Beads und somit weniger Stellen, an denen gesichtert Anti-Digoxigenin ist. Die verringerte Lösung ist allerdings wichtig, um sicherzugehen, dass nur ein Bead andockt. Bei diversen Messungen deutete sich jedoch an, dass Anti-Digoxigenin sehr viel seltener auf der Oberfläche zu finden ist, als erwartet. In der folgenden Messung wurde mehrmals ein Gitter mit 8 x 8 Messpunkten und einer Gesamtfläche von insgesamt $10\mu m$ x $10\mu m$ verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass nur eine einzige Position mehrere Abrissmomente hervorbrachte, welche auch zugleich der ursprünglich Andockpunkt der DNA war.

Ein Schema über den Verlauf der Messung ist in Abbildung 65 aufgezeichnet. Die Messung startet in der linken unteren Ecke. Der Cantilever rastert danach die Oberfläche entlang der roten Linie ab. Insgesamt werden 64 Positionen vermessen. Das Gitter wurde insgesamt vier Mal komplett abgefahren. Die einzigen Kraft-Distanzkurven mit Abrissmoment wurden an der Position 20, also am 21. Messpunkt aufgenommen. Dies deutet darauf hin, dass sich lediglich an dieser Stelle reaktives Anti-Digoxigenin befand. Des Weiteren wurden die Messpunkte bei Position 19 und Position 21 ebenfalls mehrfach vermessen. Dabei gab es jedoch keinen einzigen Abrissmoment, obwohl die Positionen lediglich $1.25\mu m$ voneinander entfernt liegen.

Die Häufung der Abrissmomente an Position 20 deutet darauf hin, dass sich das DNA-Knäuel sehr zentral unterhalb des Beads befand, wodurch lediglich die Position 20 als Andockpunkt fungierte. Wenn es an den Positionen 19 oder 21 ebenfalls Abrissmomente gegeben hätte, hätte es sein können, dass sich die DNA erneut an dem Andockpunkt direkt an Position 20 bindet, dieses Mal jedoch schräg gespannt gewesen wäre. Rein theoretisch könnte es somit zu Abrissmomenten in einem Umkreis von $2.5\mu m$ von der mit Anti-Digoxigenin funktionalisierten Stelle kommen, was der Länge der DNA entspricht. Je weiter der Bead von der eigentlich Andockstelle entfernt wäre, desto kürzer wäre die gemessene Abrisslänge.

Diese Messung verdeutlicht noch einmal eindrücklich eine der Grundsatzfragen des

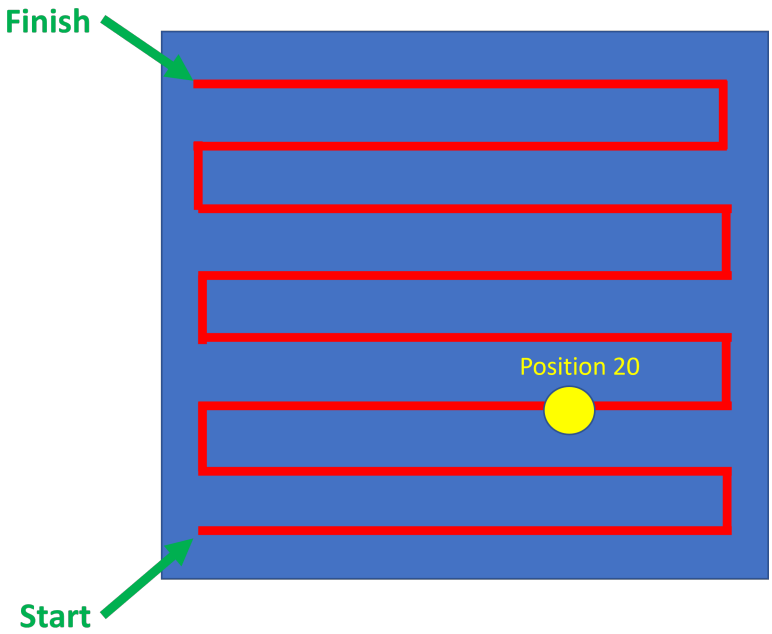


Abb. 65: Gitter mit den verschiedenen Adhäsionsmesspunkten. Insgesamt besteht es aus 8 x 8 Messpunkten. Die erste Messung findet in der linken unteren Ecke statt. Der Cantilever rastert danach Linie für Linie von oben nach unten ab und endet in der oberen linken Ecke. Der Weg ist rot gekennzeichnet. Von besonderem Interesse ist die Position 20, also der 20 Messpunkt. Nur an dieser Stelle gab es Kraft-Distanzkurven mit Abrissen.

ganzen Messaufbaus. Das System registriert den Abriss nur an der Stelle, an der der Cantilever ausgelenkt wird. Dies lässt nur indirekt Rückschlüsse auf die eigentlich Position der Anbindung zu. Die eigentliche Andockposition beziehungsweise die reale Abrisslänge können nur rekonstruiert werden. Mit dieser Fragestellung werden wir uns noch häufig in dieser Arbeit beschäftigen.

In Abbildung 66 sind die aufgenommenen Kraft-Distanzkurven bei Position 20 geplottet. Sie überlappen sich sehr stark und die Abrisskraft liegt bei allen bei ungefähr 30 bis $40pN$. Zwei Kraft-Distanzkurven weisen ein Kräfteplatau auf, was auf Overstretching hindeutet. Dies wäre für Abrissmomente in diesem Kraftbereich nicht üblich. Die beiden anderen Kraft-Distanzkurven weisen fast identisches Streckverhalten auf. Die Abrisslänge liegt zwischen 2.5 und $3.5\mu m$. Die Kraft-Distanzkurven, die kein Overstretching aufweisen, haben eine verhältnismäßig hohe Abrisslänge von $3.0\mu m$ und mehr. Eine der Kraft-Distanzkurven weist einen zusätzlichen Abriss bei einer Höhe von $1.5\mu m$ und einer Kraft von $15pN$ auf. Des Weiteren zeigt diese Kraftkurve zu Beginn auch einen starken Adhäsionspeak.

Die Kraft-Distanzkurven wurden nicht direkt hintereinander, aber in der Reihenfolge der Legendenbeschriftung aufgenommen. Die erste Kraft-Distanzkurve weist Overstretching auf, besitzt aber auch die geringste Abrisslänge mit um die $2.5\mu m$.

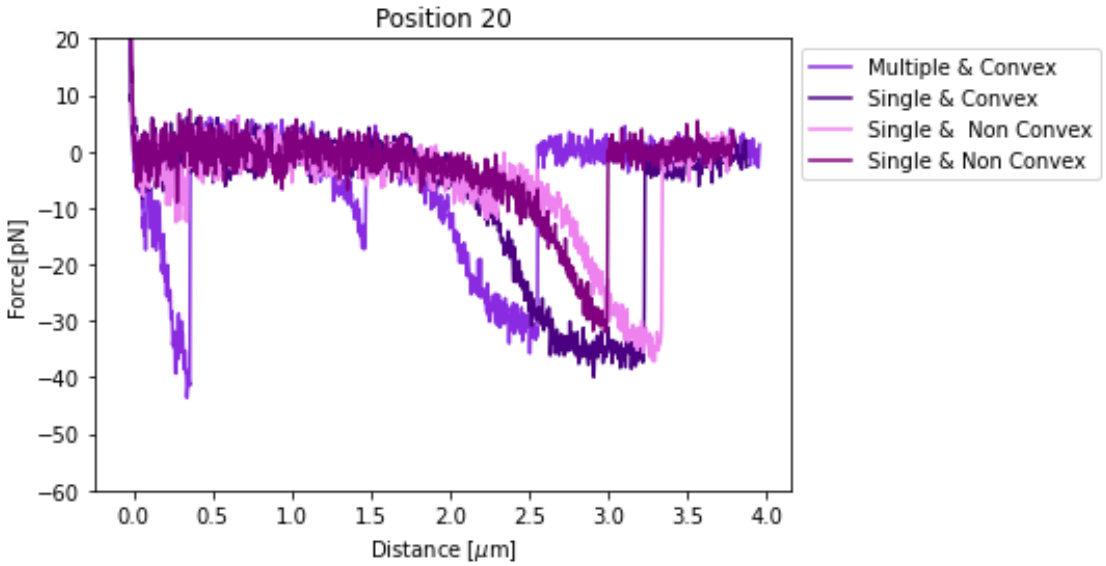


Abb. 66: Verschiedene Kraft-Distanzkurven, die alle an der Position 20 aufgenommen wurden. Die Abrissmomente überlappen sich sehr stark, sind jedoch nicht identisch. Zwei der Kraft-Distanzkurven weisen Overstretching auf. Die Abrisskräfte liegen jedoch bei allen im Bereich von 30 bis $40pN$, obwohl das Overstretching in Kräftebereichen von $65pN$ liegen sollte. Die Abrisslänge variiert zwischen 2.5 und $3.5\mu m$.

Die zweite aufgenommene Kraftkurve weist das stärkste Kräfteplateau auf und eine Abrisslänge von über $3.0\mu m$. Der DNA-Strang wurde folglich überstreckt. Die dritte Kraft-Distanzkurve weist fast die gleiche Abrisslänge auf, jedoch kein Kräfteplateau. Dennoch zeigt sie Ansätze von Overstretching. Dies könnte darauf hindeuten, dass die DNA noch überstreckt war und lediglich auf die Länge gespannt wurde, die sie in dem bereits überstreckten Zustand hatte. Die vierte Kraft-Distanzkurve zeigt eine Abrisslänge von $3.0\mu m$. Sie ist immer noch etwas länger, jedoch nicht mehr so lang wie bei der dritten Kraft-Distanzkurve. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich das Overstretching wieder leicht, aber noch nicht komplett zurückgebildet hat. Das würde auch das fehlende Kräfteplateau erklären.

Zu guter Letzt möchte ich noch einmal auf die Persistenzlänge eingehen. Für eine doppelsträngige DNA wird normalerweise eine Persistenzlänge von $50nm$ erwartet. Für den Fit der Kraft-Distanzkurven anhand des eWLC-Modells wurden einige Kurven herausgesucht, die einen klaren kontinuierlichen Kraftverlauf und eine konstante Baseline aufweisen. Ein Beispiel für so eine Kurve ist in Abbildung 67 dargestellt. [55] Die Kraft-Distanzkurve (schwarz) zeigt einen klaren Abrissmoment bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $2.1\mu m$ und einer Abrisskraft von ungefähr $25pN$. Der dazugehörige Fit ist in Rot dargestellt. Die gefitteten Persistenzlängen sind in einem Histogramm in der unteren linken Ecke abgebildet. Die meisten Kraft-Distanzkurven weisen eine Persistenzlänge von ungefähr $10nm$ auf. Des Weiteren gibt es auch Kurven mit einer Persistenzlänge zwischen 20 und $30nm$.

Alle Persistenzlängen liegen allerdings klar unter der üblichen Persistenzlänge von $50nm$. [32] Dies könnte daran liegen, dass der zweite Strang der DNA nicht durchgängig ist und viele Nicks aufweist. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die DNA nur über einen Strang angebunden ist, da nur eine Strangseite mit Digoxigenin beschichtet ist. Beonders interessant hieran ist, dass die DNA nicht an der durchgängigen Seite angebunden ist. Sie hängt somit an dem kurzen Oligomerendstück. Chuang et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss von verschiedenen Basenpaaren. [40] Adenin-Thyminbindungen sind auf Grund von ihren 2 Wasserstoffbrücken schwächer Guanin Cytosinbindungen. Ein höherer Adenin-Thyminanteil begünstigt somit Overstretching, macht die DNA flexibler und verringert somit die Persistenzlänge. Da die DNA über das kurze Oligomerstück angebracht wurde wurde lediglich der Adenin-Thyminanteil für dieses kurze Endstück betrachtet. Es stellte sich heraus, dass die DNA an diesem Teil zu 56% aus Adenin-Thyminverbindungen besteht. Dies begünstigt würde Overstretching und eine kürzere Persistenzlänge begünstigen. Die DNA würde somit am unteren Ende ausfransen.

Ebenfalls von Interesse ist die Salzkonzentration der Pufferlösung PBS, in der die Zugexperimente durchgeführt wurden. Brunet et al. [39] konnten feststellen, dass der Einfluss von Magnesium einen wichtigen Einfluss auf die Flexibilität und somit die Persistenzlänge hat. Magnesium macht die DNA flexibler, wodurch sie eine geringere Persistenzlänge aufweist. Magnesium ist allerdings nicht in unserer PBS-Pufferlösung enthalten, weswegen der Einfluss von Magnesium nicht die geringe Persistenzlänge erklären kann. Es wäre allerdings möglich, dass andere Salze eine ähnliche Wirkung haben.

Problematisch ist, dass nur eine geringe Anzahl von Kurven gefittet wurde und somit nicht viele Daten für die Statistik vorliegen. Um mehr Daten über die Persistenzlänge zu bekommen, ist die Flowcell sehr viel rentabler, da dort Hunderte von Kraft-Distanzkurven gleichzeitig aufgenommen werden. Deren Auswertung ist in Kapitel 6.3 zu finden.

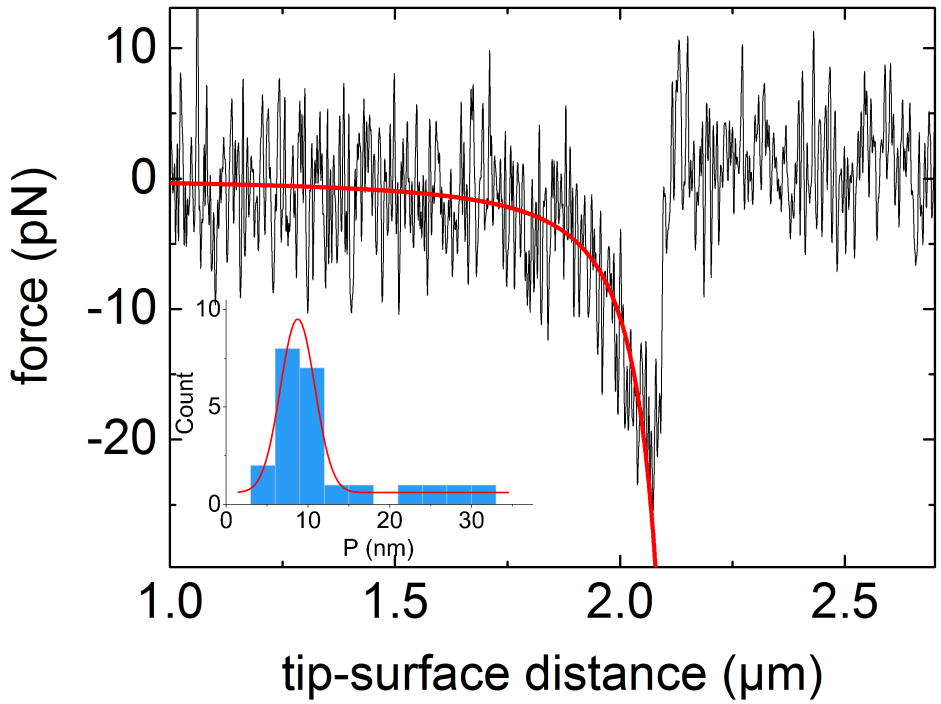


Abb. 67: Abbildung eines typischen Abrissmoments in Schwarz. Der DNA-Strang reißt bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $2.1\mu m$ und weist eine Abrisskraft von $25pN$ auf. Der dazugehörige eWLC-Fit ist in Rot eingezeichnet. Zusätzlich dazu ist ein Histogramm in der linken unteren Ecke eingefügt. Dies zeigt ein Histogramm, das die Persistenzlänge p von verschiedenen Kraftdistanzkurven dargestellt. Die meisten Kurven weisen eine Persistenzlänge von um die $10nm$ auf. Des Weiteren gibt es auch vereinzelt Persistenzlängen zwischen 20 und $30nm$. [55]

6.2.2 Adhäsionsmessungen auf poröser Membran

Der Hauptunterschied zwischen den Adhäsionsmessungen auf Cellulosenitratoberflächen und poröser Membran ist die Art der Anbindung der DNA auf der Oberfläche. Auf den Cellulosenitratoberflächen wurde die DNA an der Probe über die Anti-Digoxigenin-Digoxigeninbindung angebunden. Anti-Digoxigenin ist homogen auf der Oberfläche verteilt, wohingegen der DNA-Strang lediglich am unteren Ende mit Digoxigenin funktionalisiert ist. Dies bedeutet, dass nur das Ende des Strangs mit der Oberfläche reagiert. Bei den Adhäsionsmessungen auf poröser Membran erfolgt die Interaktion zwischen der Oberfläche und dem DNA-Strang auf Grund der unterschiedlichen Ladungen. Die Porenwände der Membran sind positiv geladen und der gesamte DNA-Strang ist wegen seinem Phosphatgerüst homogen negativ geladen. Dies bedeutet, dass keine bevorzugte Andockstelle innerhalb des Polymerstrangs existiert. Beide Messungen wurden in wässriger Pufferlösung aufgenommen. Des Weiteren wurde der Cantilever bei den Messungen auf Cellulosenitrat direkt auf die Oberfläche gefahren, wodurch es zu einem Kontakt zwischen Bead und Oberfläche kam. Ein besonderer Fokus liegt auch in diesem Unterkapitel bei der gemessenen Abrisslänge, der Abrisskraft und dem Verlauf des Abrisses. Daraus sollen erneut Rückschlüsse auf das eigentliche Abrissverhalten und die reale Abrisslänge geschlossen werden.

Beispielkurve

In Abbildung 68 ist der Ablauf einer Beispielmessung angegeben. Abgebildet sind vier representative Kraft-Distanzkurven. Der Cantilever fährt zunächst ein erstes Mal auf die Oberfläche. Der Kräfteverlauf während dem Herunterfahren ist in der ersten Annäherungskurve (hellblau) in Abbildung 68 zu sehen. Sobald der Cantilever die Oberfläche erreicht, drückt er auf die Oberfläche, bis er eine Kraft von $600pN$ ausübt. Danach wird der Cantilever zurückgefahren und die Kraft sinkt. Dies wird anhand der ersten Ablösekurve (orange) dargestellt. Beim Ablösen des Beads von der Membran haftet der Bead an der Oberfläche, was einen Adhäsionspeak von ungefähr $300pN$ verursacht. Danach fährt der Cantilever weiter von der Oberfläche weg. Die DNA wird gespannt und reißt bei einer Cantileverhöhe beziehungsweise einer gemessenen Abrisslänge von $2\mu m$ ab. Danach wird der Cantilever ohne weitere Krafteinwirkung nach oben zur Ausgangsposition gefahren. Im nächsten Schritt fährt der Cantilever bei der zweiten Annäherung (dunkelblau) auf die Oberfläche zu, hält jedoch $300nm$ über der Oberfläche an. Dies sorgt dafür, dass lediglich die geknäuelte DNA die Möglichkeit hat, mit der Oberfläche in Kontakt zu kommen. Der Bead berührt die Oberfläche nicht. Dadurch, dass der Bead nicht auf die Oberfläche drückt, fehlt der starke Kräfteanstieg von $600pN$.

Nach einer vorgegebenen Pausenzeit, die je nach Messung zwischen $0.05s$ und $10.0s$ variiert, wird der Cantilever erneut nach oben gefahren. Der charakteristische Kräf-

teabfall zu Beginn der Kurve fehlt genauso wie der Adhäsionspeak zu Beginn der Kraft-Distanzkurve, bei der der Bead von der Oberfläche gelöst wird. Beim nach oben fahren wird die DNA gespannt und reißt bei einer Höhe von $2\mu m$ ab. Dies ist die gleiche Abrisslänge wie während dem ersten Ablösen von der Oberfläche. Der Cantilever wird im Gegensatz zu dem ersten Ablösen nicht wieder sofort austariert, sondern erneut ausgelenkt, sodass es zu einem weiteren Abrissmoments innerhalb des eigentlichen Abrissmoment kommt. Dies spricht dafür, dass die DNA an zwei Stellen an der Oberfläche befestigt war und diese Stellen sich nacheinander lösten. Danach fährt der Cantilever ohne weitere Krafteinwirkung nach oben. Für die Auswertung der Ergebnisse ist es wichtig, die Kraft-Distanzkurven zu begradigen. Mit dem Auswertungsprogramm gab es lediglich die Möglichkeit, zwischen einer Begradigung der Ablösekurven oder der Annäherungskurven zu wählen. Da für die Analyse der Abrissmomente die Ablösekurve verwendet wird, wurde die Begradigung in Abhängigkeit von den Ablösekurven durchgeführt. Die unterschiedlichen Baselines der Kurven sind auf den Drift zurückzuführen. Des Weiteren wurde der Nullpunkt beziehungsweise der Kontaktpunkt zwischen Oberfläche und Cantilever durch die erste Ablösekurve bestimmt. Da sich der Drift leicht von Kraftkurve zu Kraftkurve unterscheidet, liegen die Kurven nicht direkt übereinander. Außerdem sind die Annäherungskurven nicht korrekt begradigt.

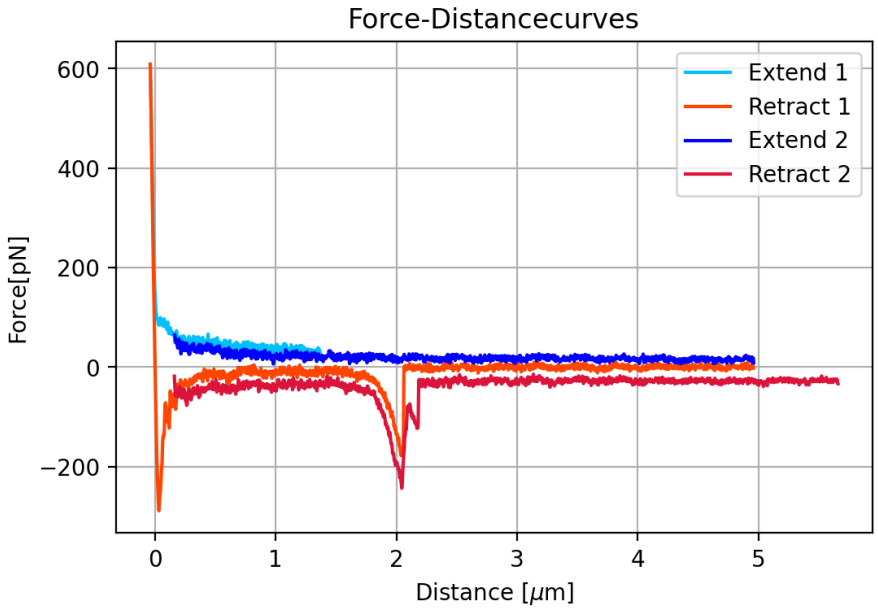


Abb. 68: Abbildung der vier verschiedenen Kraftdistanzkurven während einer Beispielmessung. Die Messung startet mit einer ersten Annäherungskurve(hellblau). Danach wird der Cantilever hochgefahren (orange). In beiden Kurven wird der erhebliche Kräfteanstieg beziehungsweise Abfall wegen dem Kontakt mit der Oberfläche deutlich. Danach fährt der Cantilever erneut nach unten (dunkelblau), wobei er mehrere $100nm$ über der Oberfläche anhält. Der Cantilever wird erneut nach oben gefahren (rot). In beiden Ablösekurven sind Abrissmomente zu sehen.

In Abbildung 68 wurde der Messablauf in Abhängigkeit von der Cantileverhöhe dargestellt. Zum besseren Verständnis wird die gleiche Messung noch einmal in Abhängigkeit von der Messzeit dargestellt (Abbildung 69). Der zunächst auffälligste Unterschied ist, dass zusätzlich zu den beiden Annäherungs- beziehungsweise Ablösekurven die Pause (gelb) angegeben ist. Die Messung beginnt mit der ersten Annäherungskurve (hellblau), bei der die Kraft zunächst stark ansteigt, während der Bead auf die Oberfläche drückt. Bei der ersten Ablösekurve (orange) sinkt die Kraft zunächst und mündet in einem Adhäsionspeak. Der Cantilever fährt zunächst ohne weitere Krafteinwirkung nach oben. Die DNA wird gespannt und reißt ab. Die gesamte Ablösekurve ist $5s$ lang. Danach folgt ohne Pause die zweite Annäherungskurve (dunkelblau). Diese dauert ebenfalls $5s$. Es fehlt erneut der deutliche Kraftanstieg am Ende der zweiten Annäherungskurve. Danach ruht der Cantilever während der Pause für $10s$ über der Oberfläche. Dies lässt der DNA zusätzlich Zeit mit der Oberfläche zu interagieren, was der DNA eine höhere Chance gibt, in eine Pore zu kriechen. Der letzte Teil der Messung besteht aus der zweiten Ablösekurve (dunkelrot), bei der der Abrissmoment erneut an der gleichen Stelle ist. Der Adhäsionspeak fehlt.

Wie auch schon bei der Darstellung in Abhängigkeit von der Höhe entschieden wir uns bei der Auswahl der zu begradigenden Kurven für die Ablösekurven. Auffällig ist in Abbildung 69 der Anstieg der Normalkraft am Ende der ersten und zweiten Annäherungskurve. Dieser Anstieg stammt wahrscheinlich von hydrodynamischen Einflüssen. Der Cantilever fährt auf die Oberfläche hinab und muss die Pufferlösung verdrängen. Dadurch erfährt er eine Kraft und somit Auslenkung nach oben, obwohl er noch nicht auf der Oberfläche angekommen ist.

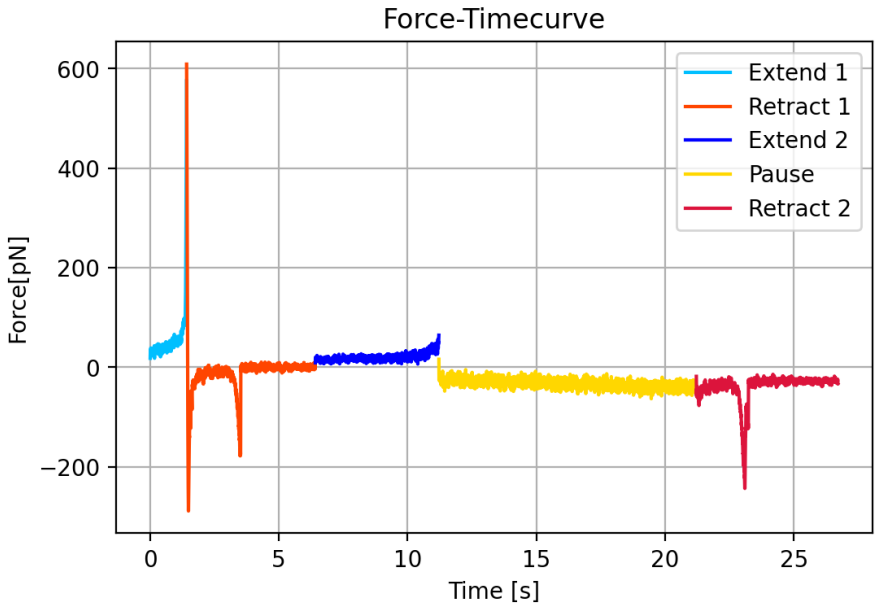


Abb. 69: Kraftzeitkurve der gleichen Messung wie in Abbildung 68. Diesmal ist die Kraft nicht in Abhängigkeit von der Cantileverhöhe, sondern von der Zeit dargestellt. Die Annäherungskurven sind erneut in Hellblau beziehungsweise Dunkelblau geplottet und die Ablösekurven in Orange beziehungsweise Rot. Hinzu kommt das Pausensignal, welches in diesem Fall 10s lang und in Gelb dargestellt ist.

Diskussion zu Ablösekurve 2

Für die Auswertung der Abrissmomente sind vor allem Ablösekurve 1 und Ablösekurve 2 von Interesse. Der Bead war zu Beginn der zweiten Ablösekurve nicht in Kontakt mit der Membran. Dadurch kann sichergestellt werden, dass lediglich die DNA mit der Membran interagiert und alle Abrisse vom Ablösen der DNA stammen. Auf Grund dessen beschäftige ich mich in diesem Unterkapitel zunächst lediglich mit der zweiten Ablösekurve. Es gab auf der porösen Membran zwei erfolgreiche Messungen, deren Ergebnisse im Folgenden vorgestellt und analysiert werden. Die beiden Messungen wurden mit unterschiedlichen Cantilevern und somit auch unterschiedlichen DNA-Strängen aus der gleichen Stockinglösung durchgeführt. Die Membranstücke stammen von der gleichen Membrancharge, sind also unter den gleichen Bedingungen hergestellt worden.

Da der Cantilever zu Beginn der Messung $300nm$ von der Oberfläche entfernt ist, fängt das Signal der Kraft-Distanzkurve erst bei einer Distanz von $300nm$ an. Bei der gemessenen Abrisslänge wird der Abstand des Cantilevers zur Oberfläche ebenfalls mit eingebunden. In Abbildung 70 sind vier Ablösekurven aus der ersten Messung dargestellt. Bei allen Kraft-Distanzkurven handelt es sich um die jeweils zweite Ablösekurve. Abbildungsteil 70 A) zeigt eine Kraft-Distanzkurve mit einem einzelnen Abrissmoment mit einer Abrisslänge von fast $2\mu m$ und Abrisskraft bei $35pN$. Bei der Ablösekurve in 70B) sind mehrere Abrissmomente abgebildet. Der erste Abrissmoment findet bei einer Abrisslänge von fast $1\mu m$ statt und weist eine Abrisskraft von über $100pN$ auf. Der zweite Abriss findet bei ungefähr $1.5\mu m$ statt. Die Abrisskraft beträgt $90pN$. Der Cantilever wird nicht sofort wieder austariert, sondern erzeugt einen weiteren Abriss. Die DNA war wahrscheinlich an drei Stellen an der Oberfläche angebunden, von denen sie sich nach und nach löste. Abbildungsteil 70 C) zeigt ebenfalls mehrere Abrissmomente. Sie folgen direkt aufeinander und haben alle eine Abrisslänge von unter $1\mu m$ wobei sie in etwa den gleichen Abrissmoment aufweisen. Der einzelne Abrissmoment in Abbildungsteil D) bei $0.7\mu m$ ist mit unter $0.3pN$ sehr klein.

Die Abrisskräfte variieren bei allen vier Beispielkurven somit stark zwischen knapp über $20pN$ und knapp über $100pN$. In drei von vier Kurven gibt es Abrissmomente bei einer Cantileverhöhe von knapp unter $1\mu m$. Die Abrisskurven mit einem einzelnen Abrissmoment deuten darauf hin, dass die DNA nur an einer einzigen Stelle angebunden ist. Keine der hier angeführten Kraft-Distanzkurven weist Kräfteplateaus auf, die ein Indikator für Overstretching sind, obwohl die Abrisskräfte in Abbildungsteil B) deutlich über $100pN$ sind. Der zweite Abrissmoment in Abbildungsteil 70 B) zeigt eine leicht parabolische Form während dem Kräfteanstieg. Dies könnte ein Anzeichen für ein abgebrochenes Overstretching sein. Die Abrisskraft wäre mit $90pN$ hoch genug für eine Überstreckung der DNA.

Im Gegensatz zu den Adhäsionmessungen auf Cellulosenitrat gab es außerdem keine

Messungen mit stufenförmigen Abrissen. Dies spricht dafür, dass die DNA nicht über die Oberfläche geglitten ist wie bei einem Teil der Messungen von Okajima et al. [25] Dies erscheint logisch, da die DNA durchwegs negativ geladen ist, weswegen ein ruckartiges stückweises Lösen von der positiv geladenen Oberfläche intuitiver wirkt. Mehrere Abrisse könnten somit auch ein Anzeichen für das Einfädeln in die Pore sein, aus der die DNA nach und nach herausgefädelt wird.

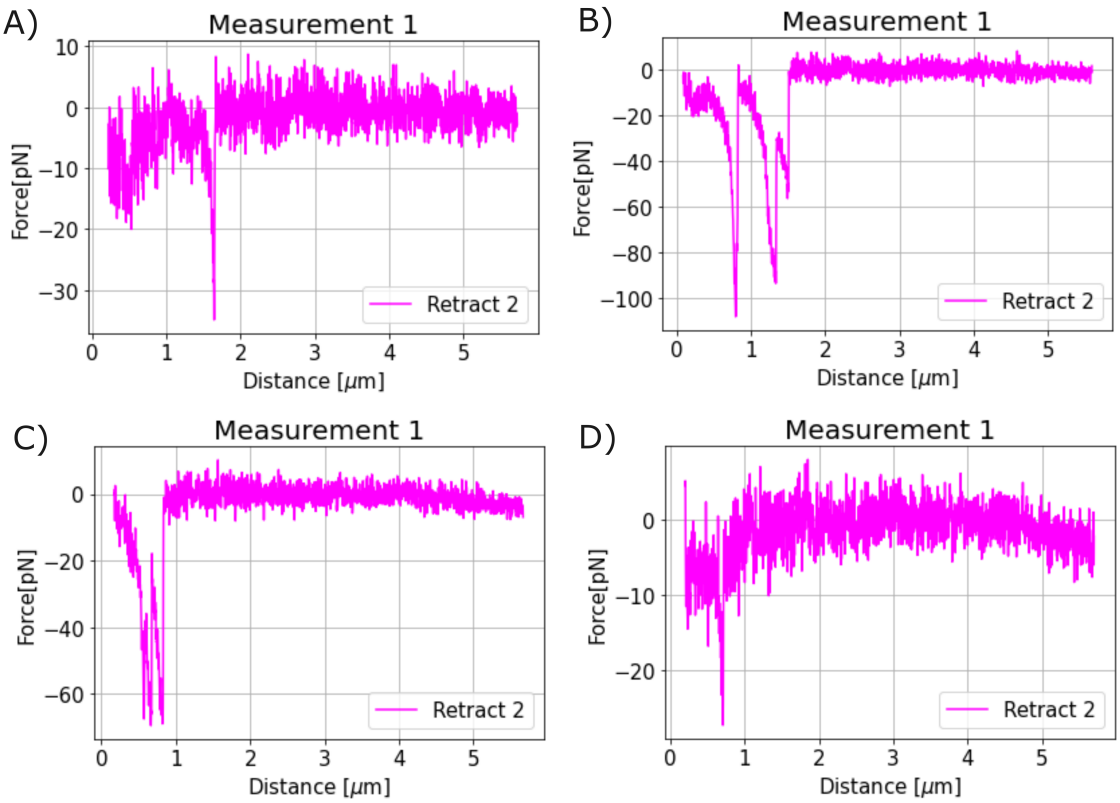


Abb. 70: Zusammenstellung von 4 repräsentativen Kraft-Distanzkurven aus Messung 1. Es ist jeweils nur die zweite Ablösekurve abgebildet. Die Abrisslänge liegt deutlich unter der Konturlänge und die Abrisskraft variiert stark zwischen 20 und 100pN.

In Abbildung 71 sind Ablösekurven aus der zweiten Messung abgebildet. Auffällig ist, dass alle vier Beispielkurven einen Abrissmoment bei einer gemessenen Abrisslänge von 2μm aufweisen. Abbildungsteil A) zeigt eine Ablösekurve mit einem einzelnen Abrissmoment, der eine Abrisskraft von ungefähr 80pN aufweist. Dies spricht dafür, dass die DNA an einer Stelle an der Oberfläche befestigt war und dann genau einmal von der Oberfläche gelöst wurde. Trotz der hohen Abrisskraft sind keine Anzeichen für ein Kräfteplateau zu erkennen. Die Ablösekurve in Abbildungsteil B) zeigt einen fast identischen Abrissmoment. Die Kraftauslenkung schnellt jedoch nicht sofort auf 0pN zurück, sondern zeigt einen weiteren Ausschlag nach mehreren 100nm auf 40pN. Dies spricht dafür, dass sich zunächst nicht die komplette DNA gelöst hat und dass sich, bevor sich der Cantilever austarieren konnte, erneut ein Teilstück von

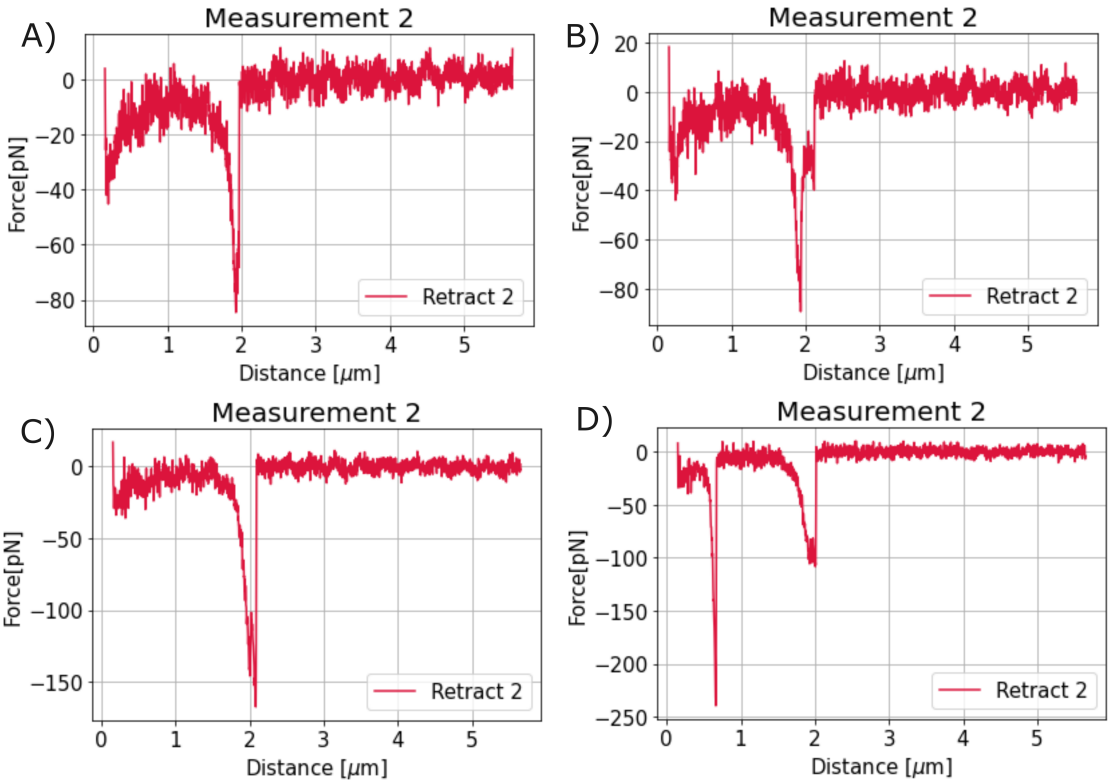


Abb. 71: Darstellung von vier repräsentativen Ablösekurven aus Messung 2. Alle Kurven wurden mit einer Starthöhe von $300nm$ aufgenommen und weisen einen Abrissmoment bei ungefähr $2\mu m$ auf.

der Oberfläche ablöste. Die Abrisskraft ist allerdings fast doppelt so hoch und liegt bei knapp über $150pN$. In Abbildungsteil D) sind zwei klar voneinander abgetrennte Abrissmomente zu sehen. Der Cantilever hatte somit zwischen den Abrissmomenten genug Zeit, um sich wieder auszutarieren. Der erste Abrissmoment zeigt trotz der sehr hohen Abrisskraft von $250pN$ keine Anzeichen von Overstretching. Der zweite Abrissmoment findet statt, nachdem der Cantilever wieder komplett austariert ist und um die $100nm$ weiter nach oben gefahren ist. Die Abrisskraft beträgt bei dem zweiten Abrissmoment $100pN$. Dabei löst sich die DNA nicht sofort von der Oberfläche und es gibt einen kurzen Ausschlag, bevor die DNA mit einer Abrisskraft von $100pN$ endgültig abreißt. Im Gegensatz zu dem ersten Abrissmoment verläuft der Kräfteanstieg leicht parabolisch, was für Overstretching sprechen würde. Eine Abrisskraft von $100pN$ wäre dafür definitiv ausreichend.

Die Abrisskräfte variieren genauso wie bei den Beispielkurven aus Messung 1 stark, allerdings liegen sie in einem höheren Bereich. Bei der zweiten Messung schwanken sie zwischen $80pN$ und fast $250pN$. Ein sehr hoher Kräftebreich, bei dem die Bedingungen für Overstretching gilt. Des Weiteren ähneln sich die Abrissmomente der Kraft-Distanzkuven in Form und Abrisslänge.

In Abbildung 72 A) sind die Abrisskräfte der Abrissmomente der ersten Messung in Abhängigkeit von der Abrisslänge dargestellt. Die Punkte sind in Abhängigkeit von der Pausenzeit eingefärbt. Zu erkennen ist zum einen, dass eine längere Abrisslänge keine höhere Abrisskraft bedingt. Die meisten Abrissmomente häufen sich bei einer Abrisskraft von unter $40pN$ und einer Abrisslänge von unter $1\mu m$. Man sieht innerhalb dieses Abschnittes keine Tendenz für einen Einfluss der Pausenzeit auf die Abrisslänge oder Abrisskraft. Die vereinzelten Ausreißer bei $5.0s$ und $1.0s$ heben sich mit einer Abrisskraft von um die $100pN$ stark von den anderen Abrissmomenten ab. Auffällig ist allerdings, dass es nur sehr wenige Abrissmomente bei einer Pausenzeit von $0.05s$ gibt. Dies könnte aber auch daran liegen, dass mehr Messungen bei höheren Pausenzeiten durchgeführt wurden. Die Abrisswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Pausenzeit wird im Folgenden noch untersucht werden.

In Abbildung 72 B) ist die Abrisskraft der Abrissmomente in Abhängigkeit von der Abrisslänge für die zweite Messung abgebildet. Zu erkennen sind die zwei separat von einander getrennten Bereiche in Bezug auf die Abrisslänge. Betrachtet man die Abrissmomente, die unter $1\mu m$ liegen und eine Abrisskraft von unter $100pN$ aufweisen, erkennt man keinen Einfluss der Pausenzeit. Erneut lässt sich an dieser Stelle erkennen, dass es weniger Abrisse mit einer Pausenzeit von unter $0.5s$ gibt. Bei der Abrisshäufung rund um $2\mu m$ lässt sich kein Unterschied zwischen den Pausenzeiten festmachen. Dennoch kann man feststellen, dass die Abrisslänge in diesem Bereich leicht in Abhängigkeit von der Abrisskraft ansteigt. Dies könnte erneut für die Theorie sprechen, dass die DNA weiter in die Pore hineinkriecht, sich die Länge, die gespannt werden muss, verringert und mehr Kraft von Nöten ist, um sie wieder zu lösen. Sie steckt tiefer drin und ist besser angebunden. Abrisslängen bei Pausenzeiten von unter $0.5s$ konzentrieren sich vor allem auf das erste Intervall. Die Abrissmomente bei einer Pausenzeit von über $2.0s$ sind in Bezug auf die Abrisslänge am breitesten gestreut.

Die Ergebnisse aus Messung 2 deuten darauf hin, dass die Abrisskräfte und Abrisslängen bei einer längeren Pausenzeit stärker gestreut werden. Eine längere Pausenzeit bietet der DNA mehr Zeit, mit der Oberfläche zu interagieren. Die DNA ist gleichmäßig elektrisch negativ geladen. Eine längere Pausenzeit könnte dafür sorgen, dass sich längere Abschnitte der DNA an der Oberfläche befestigen oder dies an mehreren Punkten bewerkstelligen. Je größer die DNA-Abschnitte sind, die an der Oberfläche andocken, desto mehr Kraft wird benötigt, um sie wieder von der Oberfläche zu lösen. Die Wahrscheinlichkeit steigt, dass sich zusätzlich zu den schwach angebundenen kurzen DNA-Segmenten auch stark angebundene DNA-Segmente an der Oberfläche andocken. Zusätzlich dazu steigt mit einer höheren Pausenzeit die Wahrscheinlichkeit, dass ein DNA-Strang in eine Pore kriecht. Lediglich die Porenwände der Membran sind positiv geladen. Eine längere Pausenzeit würde der DNA Zeit geben, immer weiter in die positiv geladene Pore zu kriechen. Dadurch würde ein größerer Teil der negativ geladenen DNA direkt mit der positiv geladenen Porenwand interagieren. Die Abrisskraft würde sich mit einem tieferen Eindringen

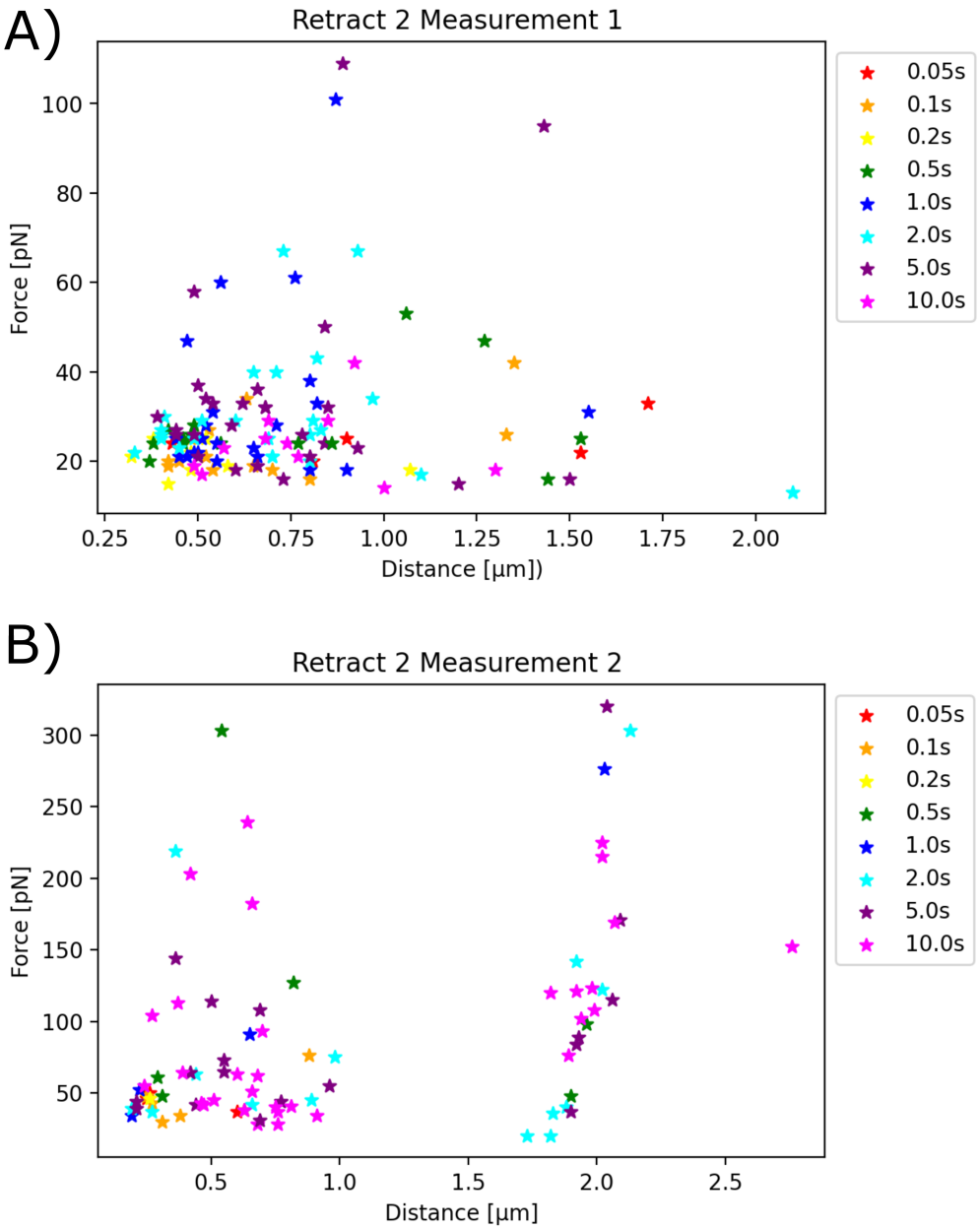


Abb. 72: Abbildungsteil A) stellt die Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Abrisslänge für die Messung 1 dar. Abbildungsteil B) widmet sich den Abrissmomenten in Messung 2. Die Pausenzeiten variieren in beiden Fällen zwischen $0.05s$ und $10.0s$.

in die Pore erhöhen. Dies würde erklären, warum sich die Abrisskraft bei höheren Pausenzeiten nicht generell erhöht, sondern sich lediglich breiter auffächert. Eine ähnliche Tendenz gibt es für die Abrisskräfte in Messung 1.

Das Eindringen der DNA in die Pore würde auch die Abrisslängen in Messung 2 erklären. Es könnte sein, dass die DNA ab einer Pausenzeit von $0.5s$ anfängt, in die Pore zu kriechen. Nachdem sie ungefähr $500nm$ in die Pore gekrochen ist erreicht, sie den abgebildeten Sättigungswert und kommt nicht tiefer. Dies würde die konstante Abrisslänge bei $2\mu m$ erklären. Zumindest sofern die DNA möglichst unten am Bead angebunden ist. Ein Anbinden weiter oben am Bead würde die gemessene Abrisslänge verringern. Abrisslängen, die sich innerhalb der unteren Abrisslängenstufe befinden, würden hingegen von DNA-Strängen stammen, die lediglich kurz und nur mit einem kurzen Teilsegment mit der Oberfläche interagieren. In der ersten Messung ist die zweite Stufe bei den Abrisslängen nicht zu sehen. Dies würde darauf hindeuten, dass die DNA-Stränge während dieser Messung nicht in die Poren gekrochen sind, sondern nur kurz mit der Oberfläche interagiert haben. (siehe 6.2.1)

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Abhängigkeit der Abrissmomente vom zeitlichen Verlauf der Messung. Die Anbindung der DNA an den Cantilever kann während der Messung beeinflusst werden. Des Weiteren wurden die Messpunkte nicht alle an der gleichen Postion aufgenommen. Während der ersten Messung gab es insgesamt 5 verschiedene Messreihen. Bei der ersten Messung wurde die Pausenzeit in der ersten Messreihe zwischen $0.05s$ und $5.0s$ variiert. Bei den anderen Messreihen wurden lediglich höhere Pausenzeiten zwischen $1.0s$ und $10.0s$ verwendet, um der DNA mehr Zeit zu geben, mit der Oberfläche zu interagieren. Bei allen fünf Messreihen weisen die meisten Abrissmomente eine Abrisslänge von unter $1.0\mu m$ und eine Abrisskraft von unter $40pN$ auf. Zwischen den verschiedenen Messreihen lässt sich sowohl in Bezug auf die Abrisskraft als auch auf die Abrisslänge kein Unterschied ausmachen. Allerdings dünnt die Anzahl der Abrissmomente im Verlauf der Messung aus.

Etwas anderes lässt sich für den Zeitverlauf der zweiten Messung feststellen. Insgesamt wurden 4 Messreihen aufgenommen. Während der ersten Messreihe konnten lediglich ein paar Abrissmomente mit einer Länge von unter $1.0\mu m$ und einer Abrisskraft von unter $100pN$ festgestellt werden. Gleiches gilt für die vierte Messreihe. Bei der zweiten und dritten Einzelmessung konnten in Bezug auf die Abrisslänge zwei Stufen festgestellt werden. Abrissmomente in der ersten Stufe wiesen eine Länge von unter $0.5\mu m$ auf und Abrissmomente der zweiten Stufe eine Länge von um die $2\mu m$. Vor allem die zweite Stufe ist hierbei interessant, da sie im Bereich der Konturlänge liegt. In Bezug auf die Abrisskraft kann festgestellt werden, dass die Kräfte während der zweiten und dritten Messreihe ein Spektrum zwischen $350pN$ und etwas unter $50pN$ aufweisen. Die erste und die zweite Messreihe wurden an der gleichen Stelle aufgenommen. Allerdings wurde der Cantilever zwischendurch nach oben gefahren, weswegen es sehr gut sein könnte, dass nicht exakt die gleiche Stelle erwi-

scht wurde. Die anderen beiden Messreihen wurden an anderen Stellen durchgeführt.

Die Betrachtung der Zeitverläufe spricht dafür, dass es eine Abhängigkeit von der Messposition und nicht von der Pausenzeit gibt. Dies würde darauf hindeuten, dass die Ladung auf der Membran nicht homogen verteilt ist und es Stellen gibt, an denen mehr Kraft benötigt wird, die DNA von der Oberfläche zu lösen. Wenn man davon ausgeht, dass die Abrissmomente mit einer Länge von $2\mu m$ von Messungen stammen, bei denen die DNA in die Pore gekrochen ist, würde das bedeuten, dass sie nur während der zweiten und der dritten Messreihe in der zweiten Messung die Möglichkeit hatte, in die Pore zu kriechen. Dies könnte daran liegen, dass die Methylierung an dieser Stelle besonders gut funktioniert hat oder die DNA direkt über dem Zentrum einer Pore lag.

Diskussion zu Ablösekurve 1

Bis jetzt wurde lediglich auf Abrissmomente in der zweiten Ablösekurve eingegangen, da bei ihnen der Bead zu Beginn der Kraft-Distanzkurve nicht in Kontakt mit der Oberfläche war. Aber auch innerhalb der ersten Ablösekurve wurden einige Abrissmomente aufgezeichnet. In Abbildung 73 sind erneut die zweiten Ablösekurven aus Abbildung 70 abgebildet (rosa). Diesmal mit der jeweils dazugehörigen Ablösekurve 1 (orange). Alle Beispielkurven stammen aus der ersten Hauptmessung. Zwischen den beiden Abrisskurven besteht in X-Richtung eine Lücke, da die Ablösekurve 2 wenige Nanometer über der Oberfläche gestartet wurde. Des Weiteren gibt es einen leichten Drift, weswegen die Kurven nicht in Y-Richtung überlappen.

Zu sehen ist bei allen ersten Ablösekurven der charakteristische Kräfteabfall zu Beginn der Kurve und ein mehr oder weniger starker Adhäsionspeak. In Abbildungsteil A) gibt es in beiden Ablösekurven bei der gleichen Cantileverhöhe einen Abrissmoment bei um die $50pN$. Abrissmomente bei der gleichen Cantileverhöhe gibt es auch in 73, diesmal unterscheidet sich die Höhe der Abrisskräfte deutlich und es kommt innerhalb der zweiten Ablösekurve zu mehreren Abrissmomenten. In den Abbildungsteilen B) und D) sind lediglich Abrissmomente in der zweiten Ablösekurve zu sehen.

In Abbilung 74 sind erneut die zweiten Ablösekurven aus Abbildung 71, diesmal zusammen mit den jeweiligen ersten Ablösekurven, geplottet. Zu sehen ist der in allen Abbildungen charakteristische Kräfteabfall zu Beginn der ersten Ablösekurve und der Adhäsionspeak zu Beginn der Kurve. Dieser liegt in den Abbildungsteilen A), B) und C) bei um die $200pN$ und bei Abbildungsteil D) bei um die $100pN$. In allen Abbildungsteilen findet bei einer Cantileverhöhe von $2\mu m$ sowohl in der ersten als auch bei der zweiten Ablösekurve ein Abrissmoment statt. Diese überlappen mehr oder weniger stark miteinander. Die Abrissmomente innerhalb der zweiten Ablösekurve in Abbildungsteil C) und D) zeigt Anzeichen von Overstretching und

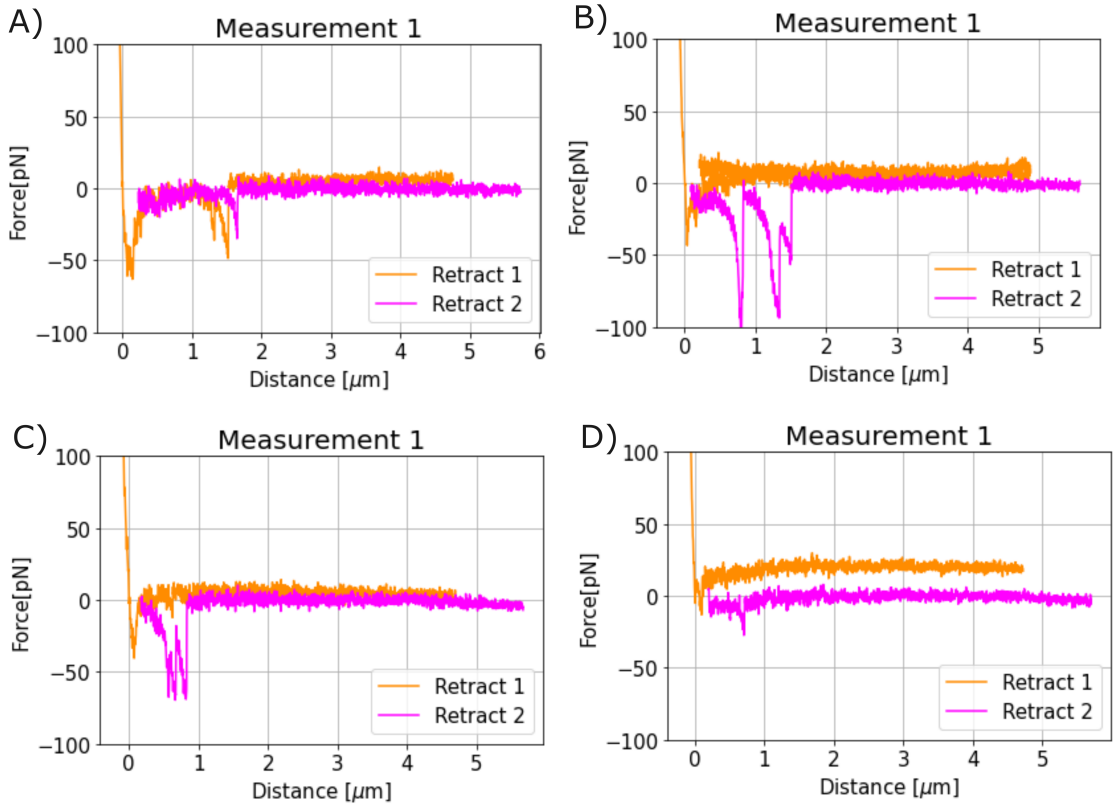


Abb. 73: Darstellung von Ablösekurven der zweiten Messung. Es handelt sich bei den zweiten Ablösekurven jeweils um die Kurven aus Abbildung 71. Zu sehen ist die erste Ablösekurve in Orange und die zweite Ablösekurve in Rot.

weisen eine Abrisskraft von über $65pN$. Das fehlende Plateau spricht dafür, dass die DNA nicht gestreckt wurde. Bei den anderen Abrissmomenten gibt es kein Anzeichen für Overstretching obwohl diese auch Abrisskräfte von über $65pN$ aufweisen. Zudem kommt es in den Abbildungsteilen B) und D) zu einem weiteren Abrissmoment.

Um einen besseren Überblick über die Abrissmomente der ersten Ablösekurve zu bekommen, sind deren Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Abrisslänge in Abbildung 75 dargestellt. Die Abrissmomente der ersten Ablösekurve aus Messung 1 sind in einem hellen Orangeton angegeben, die Abrissmomente aus der ersten Ablösekurve der zweiten Messung sind in einem dunkleren Orangeton angegeben. Es zeichnet sich in beiden Fällen ein ähnliches Bild ab wie bei den zweiten Ablösekurven der ersten und zweiten Messung. Die Abrissmomente der ersten Messreihe liegen größtenteils bei einer Cantileverhöhe von unter $1\mu m$ und erstrecken sich bis zu einer Abrisslänge von ungefähr $1.5\mu m$. Es gibt zudem einen Abrissmoment bei einer Abrisslänge von knapp unter $2\mu m$. Die meisten Abrissmomente weisen eine Abrisskraft von unter $100pN$ auf. Im Gegensatz zu den zweiten Ablösekurven gibt es aber auch Abrisskräfte, die bei bis zu $500pN$ liegen. Es gibt einen einzelnen Abrissmoment, der eine Abrisskraft von $800pN$ aufweist. Generell lässt sich sagen,

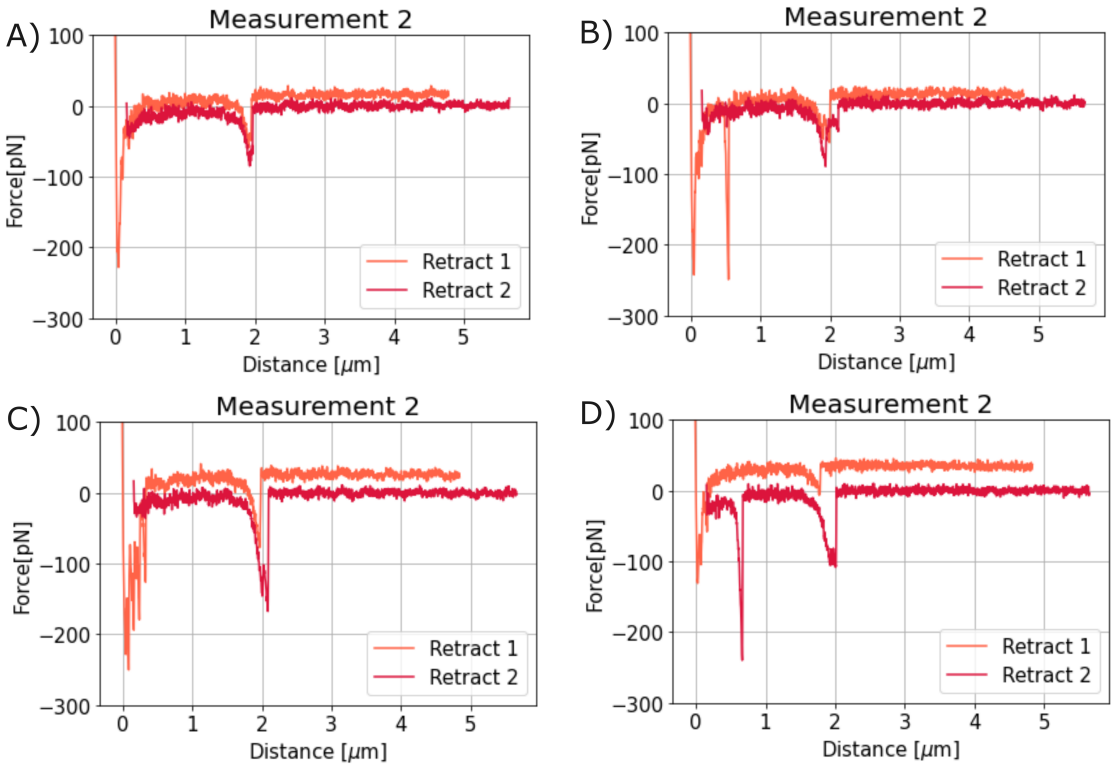


Abb. 74: Darstellung der gleichen Messpunkte von Abbildung 71 aus Messung 1. Dieses Mal sind Retract 1 (orange) und Retract 2 (rot) übereinander geplottet. Zu sehen ist bei allen Ablösekurven ein Abrissmoment bei einer Cantileverhöhe von $2\mu m$.

dass die Abrissmomente mit der höheren Abrisskraft eher eine geringere Abrisslänge aufweisen.

Betrachtet man die Abrissmomente der zweiten Messung, fällt auf, dass diese ebenfalls stark den Abrissmomenten aus der zweiten Ablösekurven ähneln. Es gibt zwei Häufungspunkte. Einer liegt bei unter $1\mu m$. Der andere liegt bei um die $2\mu m$. Sowohl bei dem ersten als auch bei dem zweiten Häufungspunkt gibt es eine Abrisskräftestreuung zwischen deutlich unter $100pN$ und fast $700pN$. Bei dem ersten Häufungspunkt wirkt die Abrisskraft der Abrissmomente willkürlich gestreut. Bei dem zweiten Häufungspunkt erkennt man allerdings einen scheinbar logarithmischen Zusammenhang zwischen der Abrisskraft und der Abrisslänge. Je höher die gemessene Abrisslänge, desto höher die erforderliche Abrisskraft. Dies deutet darauf hin, dass es keine simple Abhängigkeit zwischen der Abrisskraft und der Abrisslänge gibt, sondern zwei verschiedene Abrissphänomene. Zudem gibt es auch hier einen vereinzelten Abrissmoment mit einer Abrisslänge von um die $2.5\mu m$ und einer Abrisskraft von über $100pN$.

Die starke Ähnlichkeit zwischen der ersten und zweiten Ablösekurve in beiden Messungen spricht dafür, dass es sich bei beiden Ablösekurven um die gleichen

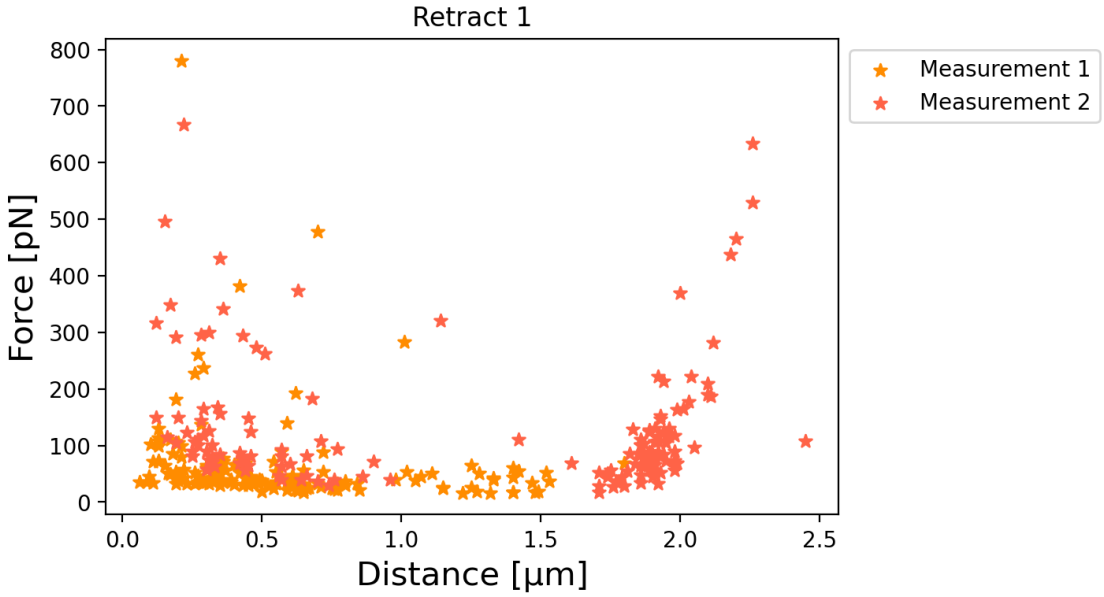


Abb. 75: Vergleich der beiden ersten Ablösekurven in Messung 1 und Messung 2. Die Abrisskraft der Abrissmomente wird in Abhängigkeit von der Abrisslänge dargestellt. Die Cantileverhöhe erstreckt sich dabei auf bis zu $2.5\mu m$ und die maximale Kraft beträgt fast $800pN$.

Ablösephänomene handelt. Dies stellt auch noch einmal klar, dass es eine starke Abhängigkeit von der Position auf der Membran gibt.

Um die Ähnlichkeit der Abrissmomente zwischen der ersten Ablösekurve und der zweiten Ablösekurve besser zu vergleichen, wurden diese in Abhängigkeit vom Zeitverlauf geplottet. Der Zeitverlauf für die zweite Messung in Bezug auf die gemessene Abrisslänge ist in Abbildung 76 angegeben. Abrissmomente aus der ersten Ablösekurve sind in Orange dargestellt und Abrissmomente, die aus der zweiten Ablösekurve stammen, sind in Rot dargestellt. Man erkennt vier Messreihen, die durch drei gestrichelte rote Linien voneinander getrennt sind. Die Abrissmomente der zweiten und der dritten Messreihe können erneut in Stufen eingeteilt werden.

Es muss angefügt werden, dass die ersten beiden Messreihen auf der gleichen Position stattgefunden haben und die anderen beiden auf jeweils anderen Positionen. Auf Grund der Pause zwischen den beiden ersten Messreihen kann die Position jedoch leicht verschoben worden sein. Die erste Messreihe beinhaltet lediglich Abrissmomente mit einer Länge von unter $1\mu m$. Es gibt etwas mehr Abrissmomente in der ersten Ablösekurve als in der zweiten. Die vierte Messreihe zeigt ebenfalls lediglich Abrissmomente mit einer Länge von unter $1\mu m$. Die Messreihen zwei und drei zeigen zwei Stufen von Abrisslängen bei beiden Ablösekurven. In der zweiten Messreihe sind die Abrissmomente aus Ablösekurve 1 und Ablösekurve 2 ungefähr gleich verteilt. Bei der zweiten Messreihe erkennt man in der höheren Stufe bei um

die $2\mu m$ mehr Abrissmomente aus der ersten Ablösekurve. Bei der unteren Stufe gibt es ungefähr genauso viele Abrissmomente aus der ersten wie aus der zweiten Ablösekurve.

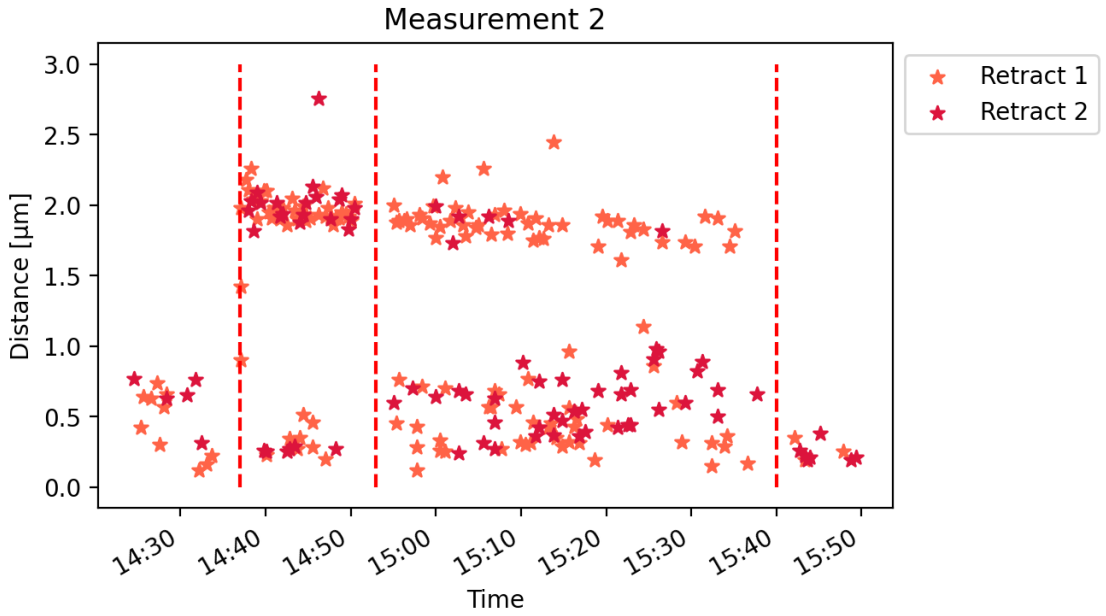


Abb. 76: Abrisslänge der Abrissmomente in Abhängigkeit vom Zeitverlauf. Dargestellt sind alle Abrissmomente der ersten Ablösekurve aus Messung 2 in Orange und alle Abrissmomente der zweiten Ablösekurve aus Messung 2 in Rot. Zu sehen sind insgesamt 4 verschiedene Messreihen, die durch die gestrichelten roten Linien voneinander getrennt sind. Es sind sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Ablösekurve bei der ersten und der zweiten Messreihe zwei Stufen zu erkennen und bei der ersten und der vierten Messreihe nur die untere der beiden Stufen.

Betrachtet man die repräsentativen Abrissmomente in Abhängigkeit von ihrer Abrisskraft, fehlen diese Stufen. Die meisten Abrisskräfte liegen bei allen vier Messreihen bei bis zu $150pN$. Sowohl bei der zweiten als auch bei der dritten Messreihe gibt es verstärkt Abrissmomente mit einer Abrisskraft von bis zu $700pN$. Bei der ersten Messreihe gibt es lediglich zwei vereinzelte Abrissmomente mit fast $400pN$ beziehungsweise $700pN$ und bei der vierten Messreihe lediglich einen einzelnen Abrissmoment mit einer Kraft von $500pN$.

Der Zeitverlauf der ersten Messung wurde ebenfalls analysiert, allerdings konnte man dadurch keine weiteren Rückschlüsse auf die Beziehung zwischen der ersten und der zweiten Ablösekurve ziehen.

Pause

Sowohl die Darstellungen zur Abhängigkeit der verschiedenen Messreihen als auch die starke Ähnlichkeit zwischen der ersten und der zweiten Ablösekurve deuten darauf hin, dass die Pausenzeit eine untergeordnete Rolle bei dem Verlauf und der Entstehung der Abrissmomente spielt. Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass eine höhere Pausenzeit für eine größere Auffächerung der Abrisslänge sorgen könnte. Die DNA hätte in Fällen mit einer höheren Pausenzeit mehr Zeit mit der Oberfläche zu interagieren. Um den Einfluss der Pause zu erörtern, wurde explizit das Pausensignal während den Messungen abgebildet.

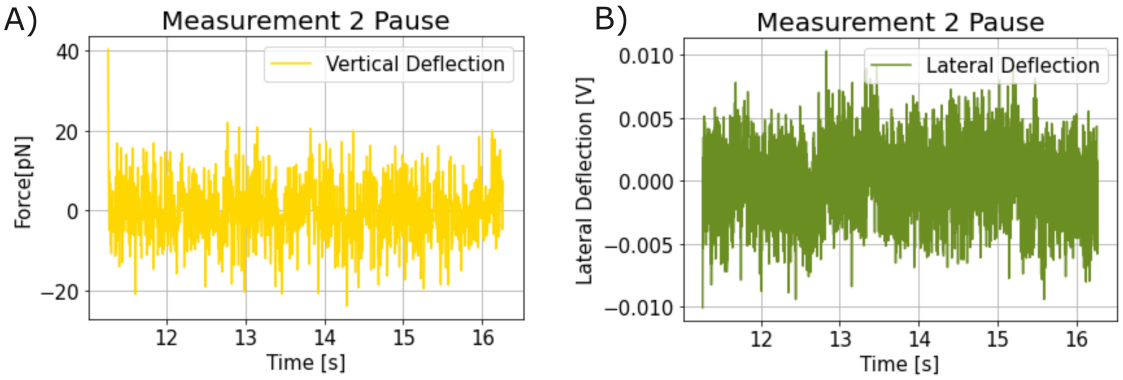


Abb. 77: Abbildung der Pausenzeit in Abhängigkeit vom Zeitverlauf. In Abbildungsteil A) ist der Verlauf der Cantileverauslenkung in vertikale Richtung zu sehen.(gelb) Abbildungsteil B) zeigt die gleiche Messung, diesmal handelt es sich um die Auslenkung des Cantilevers in die laterale Richtung.(grün) Die vertikale Auslenkung ist in pN angegeben und die laterale Auslenkung in V. Bei dem Pausensignal handelt es sich um ein Zeitintervall von $5.0s$. Die Aufnahme stammt aus der zweiten Messung.

In Abbildung 77 ist das Pausenintervall für einen Messpunkt aus der zweiten Messung in Abhängigkeit von der Zeit abgebildet. Die Pause selbst dauert insgesamt $5.0s$. In Abbildungsteil 77A) wird die vertikale Auslenkung des Cantilever in Gelb dargestellt. Das Signal wurde in pN konvertiert. Zu Beginn der Messung gibt es einen leichten Ausschlag von $20pN$. Dies könnte noch ein hydrodynamischer Effekt auf Grund der Annäherung des Cantilevers sein. Das Signal selbst schwankt in einem Bereich von $\pm 20pN$. $2s$ nach Beginn der Pausenzeit kann man in dem Signal eine leichte Unregelmäßigkeit feststellen. Es gibt allerdings keinen Ausschlag oder etwas, das dem Verlauf der Abrissmomente aus den Ablösekurven ähnelt.

In Abbildungsteil 77B) ist die laterale Auslenkung des Cantilevers in Abhängigkeit vom Zeitverlauf dargestellt.(grün) Es handelt sich um die gleiche Messung. Die laterale Auslenkung liegt in Volt vor. Zu Beginn der Messung gibt es einen leichten Ausschlag nach unten. Des Weiteren gibt es eine leichte Stufenbildung nach ungefähr $1.5s$, bei der die laterale Auslenkung leicht ansteigt. Während dem gesamten Intervall gibt es auch bei der lateralen Auslenkung ein konstantes Hintergrundrauschen. Das

Signal schwankt deswegen um bis $\pm 0.005V$. Eine leichte Unregelmäßigkeit lässt sich auch in der lateralen Auslenkung nach $2s$ sehen. Diese Unregelmäßigkeit geht im Hintergrundrauschen unter. Generell verläuft das Signal der lateralen Auslenkung etwas unruhiger als das Signal der vertikalen Auslenkung. Es ist außerdem möglich, dass kleinere Ausschläge auf Grund des Hintergrundrauschens untergehen.

Andere Pausensignale sehen ähnlich aus. Es gibt keine größeren Ausschläge während des Pausensignals oder der Kräfteverläufe, die eine abrissähnliche Form besitzen. Ab und zu gibt es einen leichten Abfall des Kraft bei der vertikalen Auslenkung beziehungsweise einen Anstieg bei der lateralen Auslenkung zu Beginn der Kurve. Dies lässt mehrere Schlüsse zu. Zum einen könnte es sein, dass gewisse Ausschläge von dem Hintergrundrauschen verschluckt werden. Es wäre durchaus möglich, dass die DNA den Cantilever geringfügig nach unten auslenkt, sobald sie in Kontakt mit der Oberfläche tritt. Dies könnte ein ruckartiger Vorgang sein, was einen ruckartigen Kraftausschlag im Signal bewirken würde. Da es sich hierbei um keinen Ablösemoment handelt, bei dem stärkere Kräfte benötigt werden würden, könnte es sein, dass die leichte Auslenkung des Cantilevers im Hintergrundrauschen untergeht. Das Hintergrundrauschen liegt zwischen $6.83pN$. Zur Berechnung wurde die Standardabweichung des Pausensignals verwendet. Zum anderen wäre es möglich, dass die DNA nicht während der Pausenzeit mit der Oberfläche interagiert, sondern bereits während der Annäherung zur Oberfläche. Dies würde eine komplette Unabhängigkeit der Abrissmomente von der Pausenzeit bedeuten.

Die maßgebliche Ursache für das Hintergrundrauschen bei den Messungen ist in diesem Fall das thermische Rauschen des Cantilevers. Dieses ist abhängig von der Federkonstante und der Außentemperatur. Eine gängige Formel hierfür ist [71]:

$$\frac{1}{2}k_N < z^2 >= \frac{1}{2}k_B T \tag{14}$$

Dabei ist k_N die Federkonstante, kB die Boltzmannkonstante, z die Auslenkung des Cantilevers und T die Temperatur. Die Auslenkung des Cantilever wird durch

$$z = \frac{F}{k_N} \tag{15}$$

in die dazu benötigte Kraft umgewandelt. Daraus ergibt sich für das erwartete Hintergrundrauschen die Formel:

$$\sqrt{< F^2 >} = \sqrt{k_N k_B T} \tag{16}$$

Die Federkonstanten der Cantilever lagen bei $0.007N/m$ und $0.009N/m$. Damit liegt das erwartete Hintergrundrauschen bei $5.29pN$ beziehungsweise $5.98pN$. Es liegt somit sehr nahe am erwarteten Hintergrundrausen.

Die Abrissmomente wurden bis jetzt in Abhängigkeit von ihren charakteristischen Eigenschaften Abrisskraft und Abrisslänge in Abhängigkeit von der Pausenzeit,

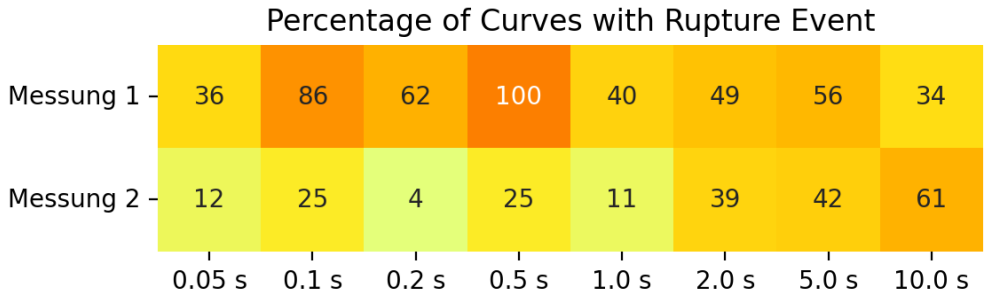


Abb. 78: Überblick über den Anteil von zweiten Ablösekurven mit einem Abrissmoment. Es wird hierbei unterschieden zwischen der ersten und der zweiten Messung. Die Messkurven mit Abrissmoment wurden in Abhängigkeit von der Pausenzeit zusammengefasst. In der Mitte der einzelnen Felder steht jeweils der Prozentsatz von Ablösekurven, die mindestens einen Abrissmoment vorwiesen. Des Weiteren sind die Felder in unterschiedlich starken Gelbtönen eingefärbt. Je dunkler der Ton, desto höher ist der Prozentsatz an Kurven, die einen Abrissmoment aufweisen.

dem Zeitverlauf und der Position auf der Membran untersucht. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Häufigkeit von Abrissmomenten. Es wurden nicht bei allen Pausenzeiten gleich viele Messungen aufgenommen, was die korrekte Darstellung der Abhängigkeit von den Pausenzeiten erschwert. Es ist deswegen sinnvoll zu bestimmen, ob die Pausenzeit einen Einfluss auf die Häufigkeit von Abrissmomenten hat, um das Bild zu vervollständigen. Dazu wurden alle Kurven mit einem Abrissmoment in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Pausenzeit zusammengefasst und deren Anteil an den insgesamt aufgezeichneten Kurven mit der jeweiligen Pausenzeit berechnet. Diese Berechnung betraf nur Kurven, welche einen Abrissmoment in der zweiten Ablösekurve aufweisen, da die Abrissmomente aus der ersten Ablösekurve unabhängig von der Pausenzeit sind. Da beide Messungen sich stark voneinander unterscheiden, wurden sie getrennt ausgewertet. In beiden Messungen waren alle Pausenzeiten zwischen 0.05 und 10.0s vorhanden.

Eine erste Vermutung legt nahe, dass eine höhere Pausenzeit eine höhere Häufigkeit von Abrissmomenten begünstigen würde. Die DNA hätte länger Zeit, mit der Oberfläche zu interagieren, und hätte somit häufiger die Möglichkeit anzudocken. In Abbildung 78 sind die Prozentsätze der zweiten Ablösekurven mit Abrissmoment in Abhängigkeit von der jeweiligen Pausenzeit angegeben. Des Weiteren sind sie auf beide Messungen unterteilt. In der Mitte der Felder steht der dazugehörige Prozentsatz. Die Felder sind außerdem unterschiedlich eingefärbt, um einen besseren Überblick zu bekommen. Je dunkler der Farbton, desto mehr Ablösekurven mit Abrissmoment gab es repräsentativ zu der Gesamtanzahl von Messungen. Es fällt zunächst auf, dass beide Messungen relativ unterschiedliche Werte aufweisen. Der Anteil an Messkurven mit Abriss liegt bei der ersten Messung bei einer Pausenzeit von 0.1s und 0.5s mit Abstand am höchsten. Bei einer Pausenzeit von 0.1s wiesen 86% der zweiten Ablösekurven einen Abrissmoment auf und bei einer Pausenzeit von

$0.5s$ waren es sogar alle Ablösekurven. Hingegen ist die Häufigkeit bei einer Pausenzeit von $10.0s$ mit 34% relativ niedrig. Sie ist fast genauso hoch wie die Häufigkeit bei $0.05s$ mit 36%. Generell lässt sich kein klarer Trend bei der ersten Messung erkennen, was die Abhängigkeit des Abrissmomentanteils von der Pausenzeit angeht.

Messung 2 zeichnet ein anderes Bild. Bei einer Pausenzeit von $0.05s$ weisen 12% der Ablösekurven mindestens einen Abrissmoment auf. Bei einer Pausenzeit von $10.0s$ weisen hingegen 61% mindestens einen Abrissmoment auf. Das sind ungefähr 5 mal mehr Abrissmomente. Generell gibt es einen Trend zu einer höheren Häufigkeit von Abrissmomenten bei einer höheren Pausenzeit. Dieser Trend ist allerdings nicht komplett geradlinig. So weisen die Pausenzeiten $0.1s$ und $0.5s$ jeweils einen Prozentsatz von 25% auf, wohingegen der Anteil von Kurven mit Abrissmoment bei einer Pausenzeit von $1.0s$ nur bei 11% liegt und bei einer Pausenzeit von $0.2s$ sogar nur bei 4%.

Die Ergebnisse aus Messung 1 und Messung 2 lassen unterschiedliche Rückschlüsse in Bezug auf die Häufigkeit von Abrissmomenten in Abhängigkeit von der Pausenzeit zu. Die Werte in Messung 1 suggerieren, dass es keine Abhängigkeit gibt, wohingegen die Werte aus Messung 2 suggerieren, dass es einen gewissen Trend, wenn auch mit Unterbrechungen, gibt. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass bei den jeweiligen Pausenzeiten unterschiedlich viele Messpunkte aufgenommen worden sind. Des Weiteren wurden auch nicht bei allen Messreihen Messpunkte mit allen Pausenzeiten aufgenommen. In der zweiten Messung wurden bei allen Messreihen Messpunkte mit allen Pausenzeiten aufgenommen. Bei der ersten Messung wurden in keinem Fall alle Pausenzeiten zwischen 0.05 und $10.0s$ aufgenommen. Bei der ersten Messung wurden alle Messpunkte bei Pausenzeiten zwischen $0.05s$ und $5.0s$ aufgezeichnet. Bei den anderen Messreihen wurden lediglich Pausenzeiten mit $1.0s, 2.0s, 5.0s$ und $10.0s$ aufgenommen. Durch diese unterschiedlichen Messreihen wurden während der ersten Messreihe bei einer Pausenzeit von $0.05s$ 14 Messpunkte aufgenommen und bei einer Pausenzeit von $10.0s$ 29. Die meisten Messungen wurden mit $1.0s, 2.0s$ und $5.0s$ Pausenzeit aufgenommen. Bei einer Pausenzeit von $1.0s$ 43 Stück, bei einer Pausenzeit von $2.0s$ 41 Stück und bei einer Pausenzeit von $5.0s$ ebenfalls 41 Stück. Diese stark unterschiedliche Anzahl kann zu einer gewissen Verzerrung führen.

Auch bei der zweiten Messung wurden nicht bei jeder Pausenzeit gleich viele Ablösekurven aufgenommen. Dennoch schwankten diese lediglich zwischen 24 Stück ($0.05s$) und 36 Stück ($10.0s$). Des Weiteren spielt, wie bereits behandelt, die Abrissposition auf der Membran eine größere Rolle. Eine Verzerrung durch die unterschiedlich häufige Verwendung von Pausenzeiten könnte dadurch noch verschärft werden. So sorgen Messungen an günstigeren Positionen für einen höheren Anteil an Ablösekurven mit Abrissmoment. Dies aber nur bei den Pausenzeiten, die auch an dieser Stelle aufgenommen wurden.

Unter Betrachtung all dieser Gesichtspunkte wirkt die Häufigkeitsverteilung aus Messung 2 verlässlicher. Dies würde für einen positiven Trend in Abhängigkeit von

der Pausenzeit sprechen, was auch die Vermutung bestätigen würde, dass die DNA mehr Zeit zum Interagieren mit der Oberfläche hat und somit länger die Möglichkeit hat, auf der Oberfläche anzudocken.

Für einen Einfluss der Pausenzeit spricht die Arbeit von Bell et al. [78] Diese berechneten wie lange ein Polymer braucht um auf der anderen Seite einer Spalte anzudocken. Dies geschieht in Abhängigkeit vom Gyrationsradius und der Breite der Spalte. Für eine Breite von $300nm$ und einem Gyrationsradius von $92nm$ erwarten sie eine Zeit von $2.2s$. Diese Zeit liegt zwischen der minimalen und der maximalen Pausenzeit.

Overstretching

Ein wichtiger Aspekt bei den Adhäsionsmessungen auf Cellulosenitrat war das Auftreten von Kräfteplateaus als Indikator für Overstretching. Obwohl die Abrisskräfte vor allem bei der zweiten Messung auf der Membran hoch genug sein müssten, um Overstretching zu verursachen, gibt es lediglich Ansätze von Kräfteplateaus in einigen wenigen Kurven. Die Frage wäre also, warum Overstretching auf der Membran im Gegensatz zu der Cellulosenitratoberfläche nicht auftritt beziehungsweise wenn, dann nur in Ansätzen.

Das zentrale Augenmerk liegt hierbei auf der Anbindung des DNA-Strangs. Wie bereits im Kapitel Stand der Forschung besprochen, hat die Anbindung der DNA an den äußeren Enden einen starken Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Moleküls. Die Anbindung der DNA unterscheidet sich im Wesentlichen durch zwei Aspekte. Zum einen wird die DNA bei den Messungen auf Cellulosenitratoberflächen lediglich an einer Seite des Moleküls, also an einem Strang angebunden. Diese Anbindung entsteht lediglich auf Grund der Anti-Digoxigeninbeschichtung der Oberfläche und der Funktionalisierung der DNA mit Digoxigenin. Zum anderen wird nicht der Strang an die Oberfläche angebunden, welcher in einem Stück vorliegt, sondern nur das kurze Oligomersegement, welches mit Digoxigenin funktionalisiert ist. Bei den Messungen auf der Membran erfolgt die Anbindung über die unterschiedlichen Ladungen. Dies bedeutet, dass beide Stränge angebunden sind, was für eine höhere Stabilität sorgt.

Der zweite Faktor, der sich ändert, ist die Konturlänge. Bei den Messungen auf Cellulosenitrat dockt die DNA immer mit dem untersten Ende an der Oberfläche an. Bei den Messungen auf der Membran hat die DNA allerdings die Möglichkeit, mit jedem möglichen Segment an der Oberfläche anzudocken. Je nachdem, ob die DNA mit ihrem Strang weiter hinten oder weiter vorne andockt, ergibt das entweder eine kürzere oder längere Konturlänge. Es wäre außerdem interessant zu wissen, ob die DNA immer mit beiden Strängen andockt oder nur mit einem. In dem Fall gäbe es auch noch einen zusätzlichen Unterschied, ob sie mit dem durchgehenden Strang

andockt oder nur mit einem der kürzeren Oligomerstränge.

In Abbildung 79 ist ein kurzer Überblick über die verschiedenen Andockweisen gegeben. In Abbildungsteil A) dockt die DNA mit dem Strangende an. Dadurch wird während dem Ablöseprozess die gesamte DNA gestreckt. Die Konturlänge liegt bei $2.5\mu m$ genauso wie die gemessene Abrisslänge. In Abbildungsteil B) dockt nicht das Strangende, sondern ein relativ mittiger Teil der DNA an. Der Stranganteil, der während dem Abrissprozess gespannt wird, schrumpft. Die Konturlänge verringert sich und die gemessene Abrisslänge wird deutlich kleiner. Des Weiteren ist der restliche Teil der DNA ebenfalls auf der Membran angebunden. Dies erfolgt nur auf Grund der Anziehung zwischen den unterschiedlichen Ladungen. Der Anteil der DNA, der an der Membran befestigt ist, ist dementsprechend länger. Somit wird auch mehr Kraft benötigt, um die DNA abzuziehen. Der Andockvorgang in Abbildungsteil C) ist ähnlich wie der in Abbildungsteil B). Die DNA mit dem Strangende angebunden, sondern mit ihrem mittleren Strangsegment. Die Anbindung an sich verläuft punktuell, sodass nur ein kurzer DNA-Abschnitt angebunden wurde. Der restliche Teil der DNA liegt nicht auf der Oberfläche, sondern treibt in der Pufferlösung. Er muss somit nicht abgelöst werden.

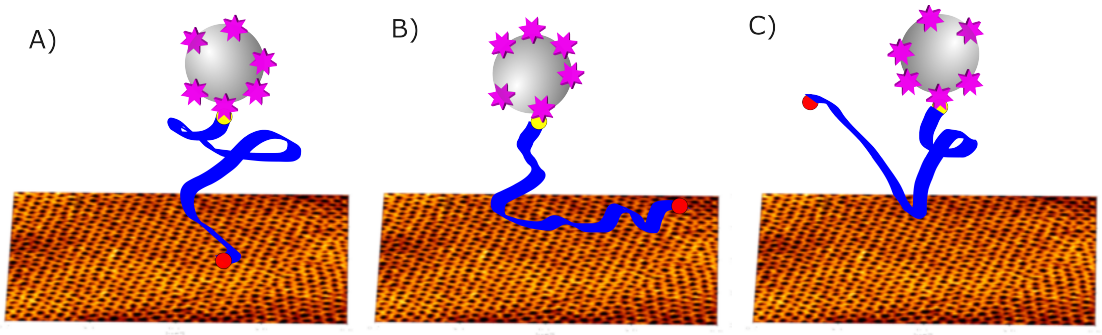


Abb. 79: Überblick über drei Anbindungsmöglichkeiten der DNA an die poröse Membran. In Abbildungsteil A) dockt die DNA mit dem untersten Ende des Strangs an. Dadurch wird beim späteren Abrissprozess die volle Länge des Moleküls gestreckt. B) Die DNA dockt mit einem anderen Teil des Strangs an. Dadurch kann nur noch ein kürzeres Stück der DNA gespannt werden. Der Rest des Stranges liegt auf der Oberfläche und wird ebenfalls durch die Interaktion zwischen den positiven und negativen Ladungen angebunden. C) Ähnlich wie in Abbildungsteil B) dockt die DNA relativ mittig auf der Oberfläche an, sodass nur ein kürzeres Stück gespannt werden kann. Der Rest der DNA liegt allerdings nicht auf der Oberfläche sondern treibt in der Pufferlösung.

Die Messkurven erinnern etwas an die Messkurven von Hards et al. [67] Diese führten zwar Zugexperimente von DNA auf Poly-L-Lysinoberflächen durch, allerdings basieren diese ebenfalls auf dem Prinzip, dass die DNA nicht punktuell andockt, sondern der teilweise komplette Strang mit der Oberfläche interagiert. Bei diesen Messungen konnte man ebenfalls trotz höherer Kräfte und einer verlängerten Konturlänge sehr oft keine Plateaus in den Kraft-Distanzkurven wahrnehmen.

eWLC-Fit

Im Laufe dieser Arbeit wurden nicht nur einzelne Kraft-Distanzkurven gefittet. In Abbildung 80 sind die Abrissmomente aus der zweiten Messung zu sehen. Dabei werden die Abrissmomente der ersten Ablösekurve in Abbildungsteil A) in Orange dargestellt und die Abrissmomente der zweiten Ablösekurve in Abbildungsteil B) in Rot. Beide Kurven wurden andhand des eWLC-Modells gefittet. Die Persistenzlänge wurde in beiden Fällen auf $10nm$ gesetzt. Des Weiteren wurden nur Abrissmomente verwendet, die eine Abrisslänge von über $1.6\mu m$ aufweisen. Außerdem wurde ein Abrissmoment bei über $2.48\mu m$ nicht berücksichtigt, da er weit von den anderen Abrissmomenten abwich. Für den eWLC-Fit wurden im Folgenden zwei Fitarten verwendet, die in den jeweiligen Abbildungsteilen eingezeichnet sind. Einmal wurde die Konturlänge beim eWLC-Fit mitgefittet und einmal wurde sie vorher auf $2.48\mu m$ festgesetzt. Der Fit mit der gefitteten Konturlänge ist jeweils in Dunkelblau eingezeichnet und der Fit mit der vorher festgesetzten Konturlänge in Grün.

Auffällig ist zunächst, dass der Fit mit der vorher festgesetzten Konturlänge in beiden Fällen weit von der eigentlichen Messkurve abweicht. Dies lässt darauf schließen, dass die Konturlänge kürzer war als erwartet. Dies könnte daran liegen, dass die DNA entweder weiter oben am Bead angebracht war oder über ein DNA-Segment an der Oberfläche angedockt war, das nicht am Ende des Strangs war. Die gefittete Konturlänge betrug für die erste Ablösekurve $1.9\mu m$ und für die zweite Ablösekurve $1.94\mu m$. Die sehr ähnliche Konturlänge spricht auch noch einmal dafür, dass die Abrissmomente in den beiden Ablösekurven von der gleichen DNA stammen, die auf die gleiche Art und Weise angebracht ist.

Die Persistenzlänge wurde in beiden Fällen auf $10nm$ festgesetzt, da sie aus vorherigen Messungen auf Cellulosenitrat bekannt ist. Die dadurch entstandene Fitkurve verläuft passend zu den Messpunkten. Des Weiteren wurde der Streckungsfaktor S gefittet. Dieser lag bei den Abrissmomenten der ersten Ablösekurve bei $3.29pN$ und bei den Abrissmomenten der zweiten Ablösekurve bei $2.77pN$. Diese Werte liegen ebenfalls im Bereich von bisher aufgenommen Kraft-Distanzkurven auf Cellulosenitrat.

Aus den Fits lässt sich schließen, dass es sich bei den Abrissmomenten um einen DNA-Strang handelte, dessen Konturlänge auf Grund von der Anbindung am Bead oder an der Oberfläche von der eigentlichen Konturlänge abweicht. Die vorher festgesetzte Persistenzlänge von $10nm$ wirkt außerdem passend.

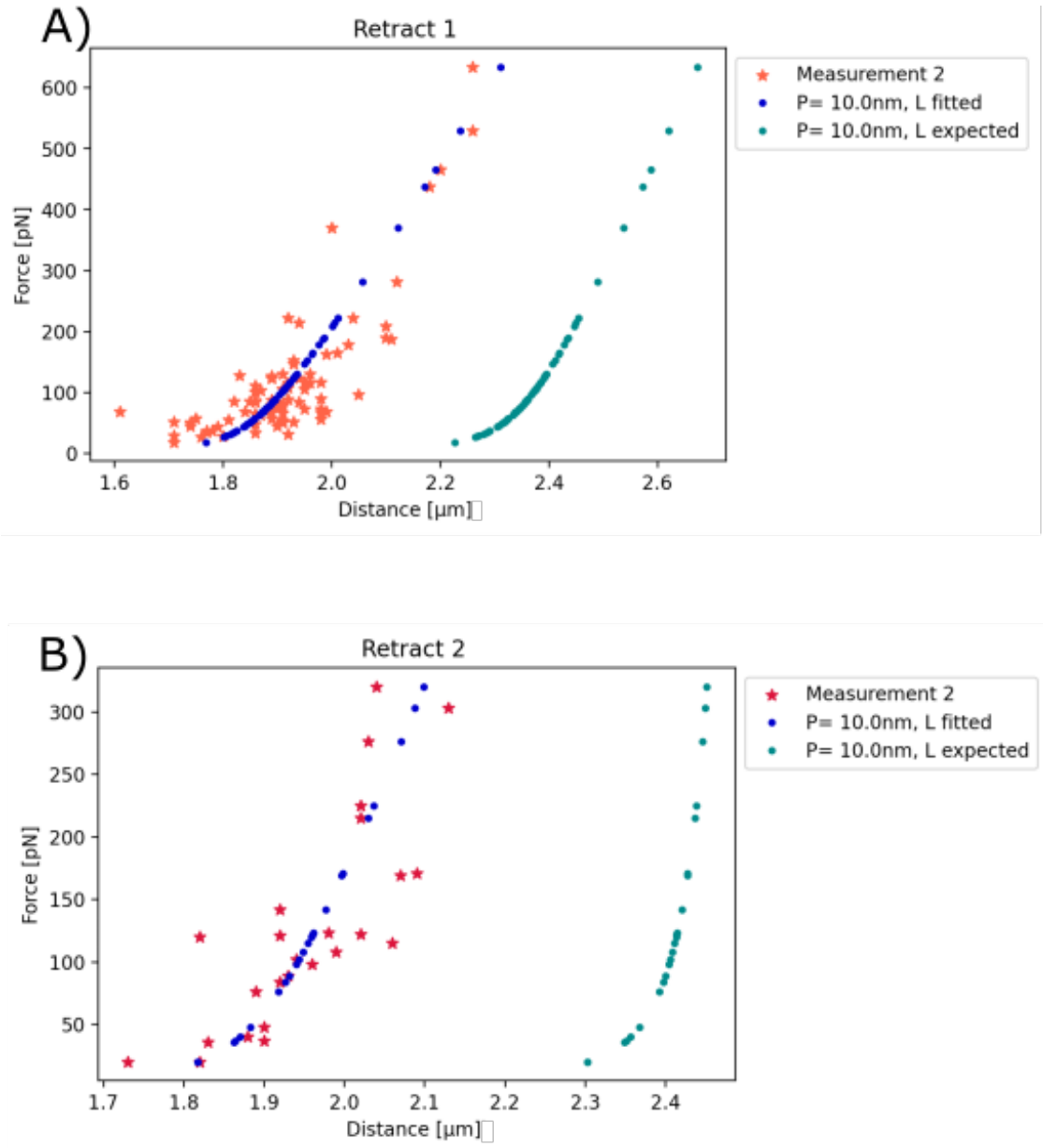


Abb. 80: Darstellung der Abrissmomente der zweiten Messung innerhalb der ersten Ablösekurve (orange) A) und der zweiten Ablösekurve (rot) B). Die Abrisskraft wird in Abhängigkeit von der Abrisslänge geplottet, wobei lediglich Abrissmomente mit einer Abrisslänge von über $1.6\mu m$ geplottet wurden. Beide Kurven werden anhand des eWLC-Modells gefittet. Einmal wird dabei die Konturlänge die erwartete Konturlänge verwendet und einmal die durch den Fit berechnete.

6.2.3 Vergleich der beiden Oberflächen

Die Messungen auf der Membran und auf der Cellulosenitratoberfläche wurden mit leicht unterschiedlichen Methoden aufgenommen. Am besten lassen sich dabei noch die Messungen auf dem Cellulosenitrat mit den ersten Ablösekurven auf der Membran vergleichen. Generell fällt auf, dass die Abrisskräfte auf der Membran breiter aufgefächert sind als auf dem Cellulosenitrat. Auf dem Cellulosenitrat gab es keine einzige Kraft-Distanzkurve, die eine Abrisskraft von über $400pN$ aufwies. Bei der Membran gab es hingegen vereinzelt Kraft-Distanzkurven mit bis zu $800pN$. Dies könnte an den verschiedenen Anbindungsarten liegen. So kostet es mehr Kraft, zwei Strangseiten abzureißen oder größere Strangsegmente. Generell benötigten die meisten Abrissmomente eine Kraft von unter $200pN$. Zu bedenken ist an dieser Stelle, dass die Abrisskräfte auf Grund der Kalibrierung anhand des Overstretchings um das 1.65-fache gesteigert wurden. Bei gleicher Kalibrierung würde dies bedeuten, dass die eben erwähnten $800pN$ auf $1320pN$ steigen würden. Dies wäre mehr als das Vierfache von der maximal erreichten Abrisskraft auf Cellulosenitrat.

Ein weiterer Unterschied ist in Bezug auf die Abrisslängen zu finden. Bei den Abrissmomenten auf Cellulosenitrat gab es einige Kraft-Distanzkurven, die eine Abrisslänge von über $2.5\mu m$ aufweisen. Die längste Abrisslänge betrug hierbei fast $5\mu m$. Dies spricht dafür, dass die DNA stark gedehnt beziehungsweise überstreckt wurde. Die meisten Abrisse fanden bei einer Cantileverhöhe von bis zu $3.0\mu m$statt. Generell sind die Abrisslängen relativ gleichmäßig verteilt und es gibt keine starken, klar diskreten Häufungspunkte. Dies ist zumindest bei der zweiten Messung auf der Membran anders. Es gibt zwei klar voneinander getrennte Häufungspunkte bei einer Cantileverhöhe von unter $1\mu m$ und bei um die $2\mu m$. Des Weiteren gibt es nur einen einzigen Abrissmoment bei einer Cantileverhöhe von knapp unter $3\mu m$. Dies alles spricht dafür, dass die DNA entweder nicht gestreckt wurde oder nicht mit dem Strangende an der Oberfläche andocken konnte.

Dafür, dass die DNA nicht gestreckt wurde, spricht, dass bei keiner der Kraft-Distanzkurven deutliche Kräfteplateaus zu erkennen waren. Manche der Kraft-Distanzkurven wiesen leichte Ansätze von Overstretching auf. Dies steht im starken Kontrast zu den Abrisskurven auf Cellulosnitrat, bei dem Overstretching häufig stattfand. Beiden Messaufbauten ist außerdem gemein, dass sie Kraft-Distanzkurven hervorbringen, die sehr große Abrisskräfte aufweisen und trotzdem kein Overstretching zeigen.

6.3 Messungen mit der Flowcell

Um die Persistenzlänge der DNA zu untersuchen eignet sich die Flowcell besser als das AFM. Bei der Verwendung der Flowcell können mehrere 100 Messkurven gleichzeitig aufgenommen werden, was schnell für einen großen Vorrat an Daten sorgt.

In Abbildung 81 ist eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Messungen mit der Flowcell dargestellt. [55] Abbildungsteil A zeigt eine Art Mischung aus Histogramm und Heatmap. Es wird die Auslenkungskraft in Abhängigkeit von der Auslenkungslänge dargestellt. Wenn eine Auslenkungskraft bei der jeweiligen Auslenkungslänge häufiger auftritt wird dies in Rot dargestellt. Sollte diese Auslenkungslänge bei dieser Auslenkungskraft selterner vorkommen ist dieser Punkt auf der Heatmap blau. Insgesamt wurde für diesen Abbildungsteil 302 Kraftkurven aufgenommen mit einer Kraftänderungsrate von $1.4pN/s$. Zu erkennen ist das für die DNA-Stränge charakteristische Längenplateau bei $2.5\mu m$. Der Verlauf des Kräfteanstiegs in Abhängigkeit von der Anbindungslänge folgt dem WLC-Modell und beschreibt das Streckverhalten der DNA.

Abbildungsteil B) legt den Fokus auf die Persistenzlänge der untersuchten DNA-Stränge. Dargestellt wird die Anzahl der aufgenommenen DNA-Stränge in Abhängigkeit von der Persistenzlänge. Diese wurden mit verschiedenen Kraftänderungsraten aufgenommen. Diese schwankte zwischen $0.7pN/s$ und $7pN/s$. Die DNA hat eine Persistenzlänge von $10.3nm$. Dies ergaben die meisten Fits über die gestreckten DNA-Stränge. Die verschiedenen Fits, welche Persistenzlängen von $5nm$ bis $30nm$ aufweisen ergeben eine Gaußkurve. Die abweichenden Persistenzlängen lassen sich auf Messungenauigkeiten und die Auswahl von Fitbereichen zurück führen. Dies ist vergleichsweise kurz für die Persistenzlänge von einem DNA-Strang. Die vergleichsweise niedrige Persistenzlänge könnte durch die zahlreichen Nicks verursacht worden sein. Diese liegen zwischen den verschiedenen Oligomeren des zweiten zusammengesetzten Strangs. Dies macht die DNA flexibler. Dass das Vorkommen von Nicks einen Einfluss auf die Persistenzlänge haben kann ist bekannt.

Des Weiteren ist die DNA nur über einen Strang mit der Oberfläche verbunden. Das passende Digoxigenin zum Anti-Digoxigenin auf der Oberfläche ist lediglich an der funktionalisierten Strangseite befestigt. Bisherige Versuche anderer Forscher haben gezeigt, dass es einen Rolle für die Persistenzlänge spielt, ob die DNA über beide Stränge oder nur einen Strang angebunden ist.

Zudem handelt es sich bei diesem Anbindungspunkt auch noch um eines der kurzen Oligomerstränge, was noch einen weiteren Einfluss haben könnte.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Persistenzlänge der DNA sowohl bei den AFM-Messungen, als auch bei den Messungen mittels Flowcell im Schnitt bei ungefähr

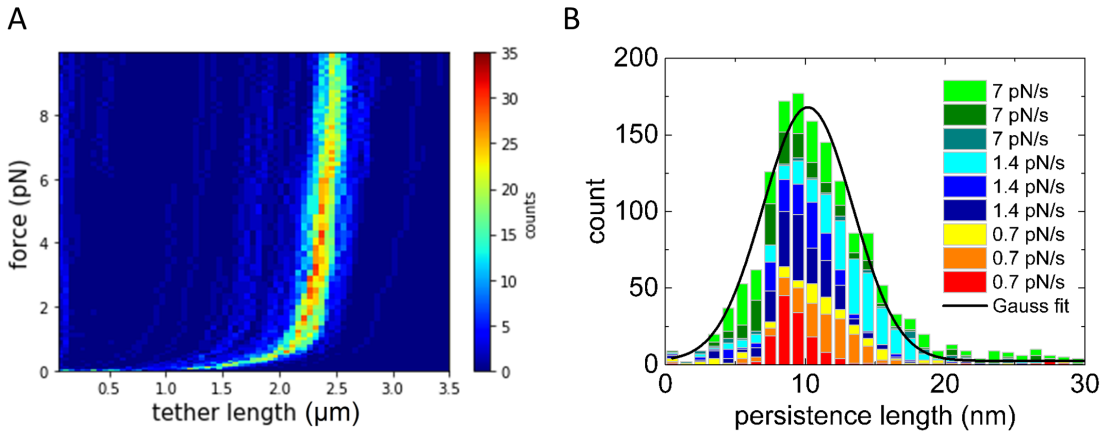


Abb. 81: Kurze Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Adhäsionsmessungen, die mit Hilfe der Flowcell zurchgeführt wurden. Abbildungsteil A) zeigt den typischen Verlauf der Kraft-Distanzkurven. Zusehen ist dieser Ablauf in Form einer Art Heatmap. Die Häufigkeit von Kräften bei der angegebenen Länge wird alsFarbe dargestellt. Je häufiger eine Kraft bei einer gewissen Länge auftritt desto mehr liegt sie im rötlichem Anteil des Spektrums. Bereiche mit einer sehr niedrigen Häufigkeit liegen im blauen Bereich. Deutlich zu erkennen ist die Bildung eines Längenplateaus bei $2.5\mu m$. B) Aufschlüsselung der gemessenen Persistenzlänge der DNA. Die meisten DNA-Stränge weisen eine Persistenzlänge von $10nm$ auf. Einige wenige auch eine Persistenzlänge von bis zu knapp $30nm$. Anzahl der DNA-Stränge mit der jeweiligen Persistenzlänge bildet eine Gaußkurve. [55]

$10nm$ liegt. Der Durchschnitt betrug bei den Messungen in der Flocwecll $10.2nm$. Beide Messaufbauten zeigen somit eine Persistenzlänge von deutlich unter $50nm$ auf.

6.4 Reibungsmessungen

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Reibungsmessungen auf den verschiedenen Oberflächen vorgestellt. Bei den Adhäsionsmessungen wird die DNA senkrecht zur Oberfläche nach oben gezogen. Bei den Fällen, in denen sich der DNA-Andockpunkt direkt unter dem Cantilever befindet, geht der laterale Anteil der Abrisskraft gegen 0. Bei den Reibungsmessungen wird der Cantilever hingegen lateral parallel über die Oberfläche gezogen. Das bedeutet, dass der laterale Anteil bei den Abrisskräften steigt. Bei dem verwendeten Cantilever handelt es sich um das Modell „MLCT-O10“. Das bedeutet, dass der Cantilever nicht rechteckig, sondern triangulär ist. Die trianguläre Form ist für biologische Proben sehr gut geeignet, da er weich ist und sehr sensitiv auf Kräfteeinwirkungen von außen reagiert. Die Reibungsmessungen wurden auf Cellulosenitratoberflächen, poröser Membran und mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasoberflächen aufgenommen und erneut in Bezug auf Abrisslänge, Abrisskraft und Abrissverteilung untersucht.

6.4.1 Reibungsmessungen auf Cellulosenitratoberflächen

Die Reibungsmessungen wurden zunächst auf Cellulosenitrat durchgeführt. Diese Messungen sind am einfachsten durchzuführen, da der Cantilever nach dem Aufsammeln des DNA-Strangs die Oberfläche nicht verlässt, sondern auf der gleichen Oberfläche bleibt. Dadurch entfällt das Risiko, dass die DNA sich während einem Probenwechsel von der Oberfläche löst. Außerdem kann der Bereich um die DNA während dem Oberflächenwechsel nicht austrocknen. Des Weiteren wurden bereits einige Adhäsionsmessungen auf der Cellulosenitratoberfläche durchgeführt. Dadurch ist es möglich, die Reibungsmessungen mit den Adhäsionsmessungen zu vergleichen.

Bei den Reibungsmessungen auf Cellulosenitrat wurde der Cantilever während dem Hinweg von links nach rechts und dem Rückweg von rechts nach links bewegt. Dabei wurde die Cantileverhöhe variiert, um eine geeignete Höhe für die Messungen zu finden. Das Ziel war hierbei, einen Abstand zu finden, bei dem lediglich Interaktionen zwischen der Oberfläche und dem DNA-Strang gemessen werden und nicht welche mit dem Bead oder gar dem Cantilever. Dennoch darf der Cantilever nicht zu weit von der Oberfläche entfernt sein, da ansonsten die Chance nur sehr gering ist, dass der DNA-Strang mit der Oberfläche interagiert. Des Weiteren ist zu bedenken, dass nur der unterste Abschnitt des DNA-Strangs mit der Oberfläche interagiert. Dies führt erneut dazu, dass die Chance sinkt, dass Abrissmomente stattfinden.

In Abbildung 82 ist der Messverlauf für eine Reibungsmessung auf Cellulosenitrat dargestellt. Dabei wird die Messzeit auf der X-Achse angegeben und die Cantileverhöhe auf der Y-Achse. Insgesamt wird die Messreihe in fünf verschiedene Einzelmessungen unterteilt. Die einzelnen Abschnitte werden mit I. bis V. markiert. Zwischen den einzelnen Messungen wird der Cantilever erneut auf die Oberfläche

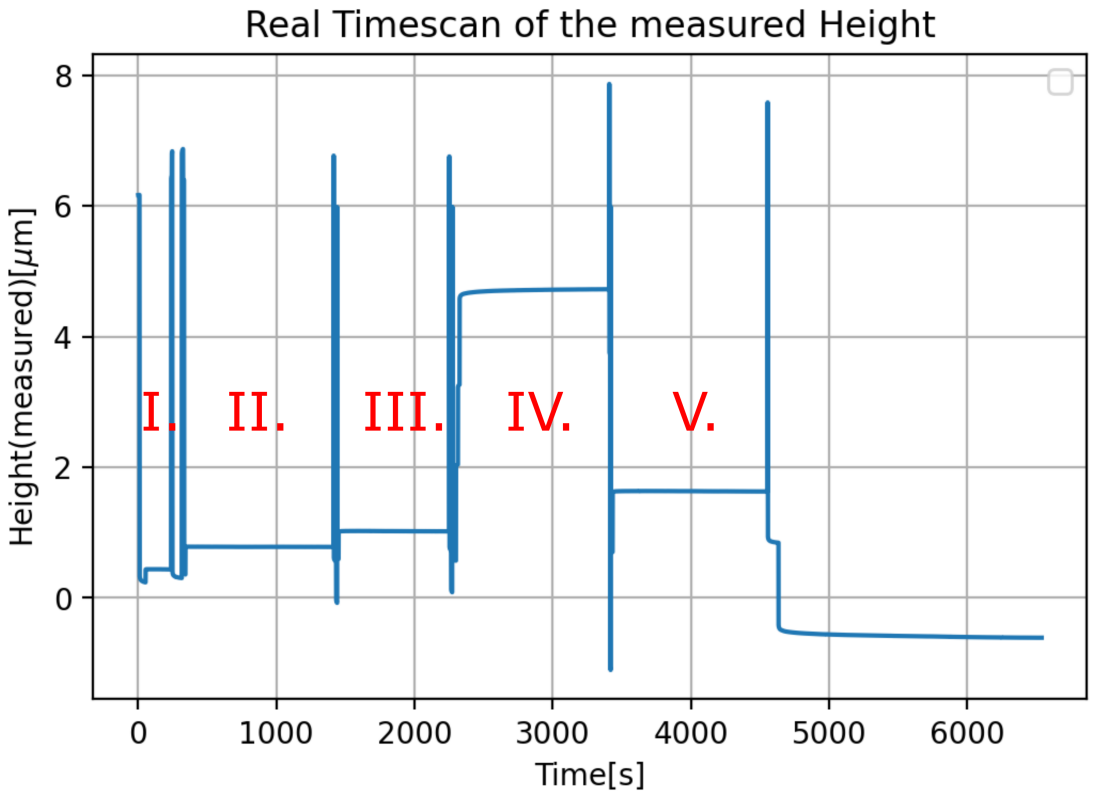


Abb. 82: Abbildung des Cantileverhöhenverlaufs bei einer Reibungsmessung auf Cellulosenitrat. Auf der X-Achse ist der Zeitverlauf abgebildet und auf der Y-Achse die Cantileverhöhe. Aufgeteilt wird die Messreihe in 5 verschiedene Einzelmessungen bei unterschiedlichen Höhen.

---

gefahren, um zu gewährleisten, dass die Höhe jedes Mal neu und korrekt eingestellt werden kann. Die Messungen in den Abschnitten I. fanden bei einer Höhe von $200nm$ statt. Damit liegt der Abstand zur Oberfläche im Bereich des Gyrationsradius, da dieser $92nm$ beträgt. Der Ende-bis-Ende-Radius beträgt $225nm$. Dies ist eine geeignete Höhe, um die DNA während dem Ziehen über die Oberfläche in Kontakt mit dem Antidigoxigenin zu bringen. Die Messhöhen in Bereich II. und III. liegen darüber, sind jedoch nicht so weit davon entfernt, dass eine Interaktion unwahrscheinlich ist. Die Messungen aus Abschnitt IV. finden auf einer Höhe statt, die fast doppelt so hoch ist wie die DNA lang. Die Oberfläche der Nitrocellulose weist auch auf Flächen von $30\mu m$ x $30\mu m$ lediglich Unebenheiten von bis zu $100nm$ auf. Dies bedeutet, dass es bei einer korrekten Höheneinstellung keine Interaktion mit der Oberfläche geben sollte. Die letzte Messung in Abschnitt V. findet bei einer Cantileverhöhe von $900nm$ statt. Dies bedeutet, dass die DNA die Möglichkeit hätte mit der Oberfläche zu interagieren, dass diese Wahrscheinlichkeit jedoch geringer sein sollte als in den Abschnitten I., II. und III.

Beispielkurven bei 200 nm

Im Weiteren sind Beispielkurven für die Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $200nm$ zu sehen. Abbildung 83 zeigt das Signal der vertikalen Auslenkung des Cantilevers. Zu sehen ist in beiden Abbildungsteilen das Signal für jeweils eine Linie. Der Cantilever fährt zunächst von links nach rechts parallel zur Oberfläche (Blau) und dann von rechts nach links (Rot). Die Signale von beiden Abbildungsteilen weisen vor allem Ausschläge nach oben auf. Im Gegensatz zu den bisherigen Abrissmomenten der Adhäsionsmessungen kommt es zum einen zu einem positven Kräfteanstieg und zum anderen sind die Ausschläge rundlich und deren Kräfteanstieg beziehungsweise Abfall zueinander symmetrisch. Dies deutet daraufhin, dass es sich bei den Ausschlägen nicht um Interaktionen der DNA mit der Oberfläche handelt. Wahrscheinlich handelt es sich um eine repulsive Wechselwirkung des Beads mit der Oberfläche. Lediglich in Abbildungsteil A) gibt es auf dem Hinweg zwei Ausschläge nach unten, die von einer Interaktion zwischen DNA-Strang und Oberfläche stammen könnten. Diese liegen bei einer Kraft von ungefähr $75pN$. Diese Messung spricht dafür, dass eine Cantileverhöhe von $200nm$ nicht ausreichend war, um Einflüsse von Topographie zu vermeiden.

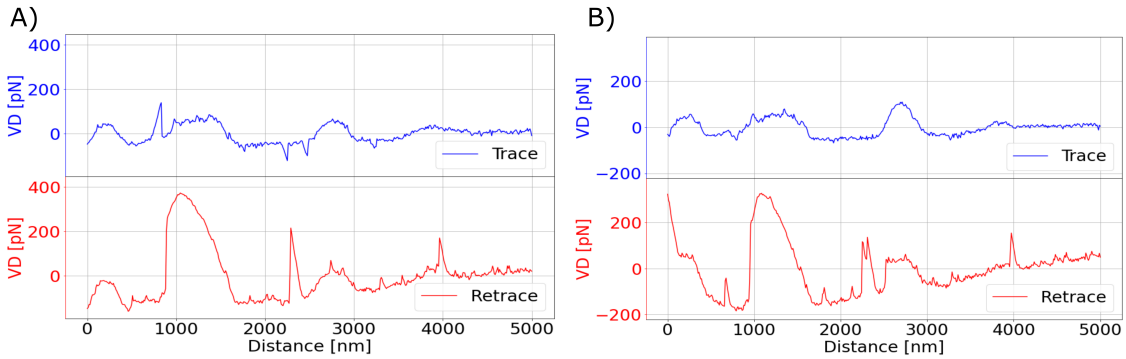


Abb. 83: Beispielkurven für die Messung bei einer Cantilverhöhe von $200nm$. Zu sehen ist in beiden Fällen das Signal der normalen Auslenkung, einmal für den Hinweg in Blau und für den Rückweg in Rot. Die Ausschläge im Signal zeigen nach oben und weisen eine rundliche Form auf.

Abbildung 84 zeigt einen Vergleich zwischen der normalen und der lateralen Auslenkung innerhalb von einer Linie. Abbildungsteil A) zeigt die beiden Auslenkungen für das Signal während des Hinwegs. Das Signal der vertikalen Auslenkung in Dunkelblau und das der lateralen Auslenkung in Hellblau. Abbildungsteil B) zeigt das Messsignal für den Rückweg. Dabei ist der vertikale Anteil in Rot und der laterale Anteil in Dunkelrot dargestellt. Interessant ist hierbei, dass das Signal zwischen vertikaler Auslenkung und lateraler Auslenkung perfekt gespiegelt wird. Es scheint sich um eine Kopplung zwischen den beiden Signalen zu handeln. Jedes Mal, wenn das Signal beim vertikalen Anteil nach oben verläuft, verläuft es beim lateralen Anteil nach unten. Insgesamt. sieht auch in diesen beiden Fällen das Ergebnis nach Einflüssen von Topographie aus. Die Erhebungen sind jedoch nicht genauso stark

abgerundet wie in Abbildung 83.

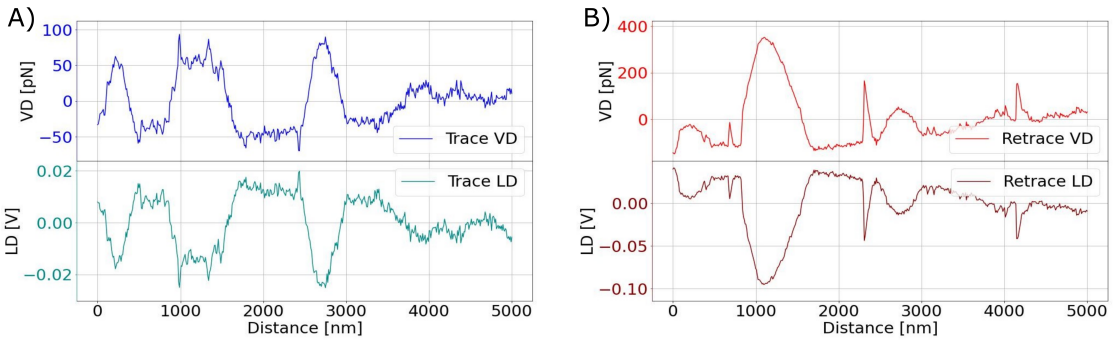


Abb. 84: A) Beispielkurven, die jeweils das Laterale Signal in Hellblau (LD) und das Verikale Signal in Dunkelblau (VD) für den Hinweg zeigen. B) Das Laterale Signal wird in Dunkelrot und das vertikale Signal in Hellrot für den Rückweg dargestellt.

Beispielkurven bei 400 nm

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse beleuchtet, die bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $400nm$ aufgenommen wurden. Gemäß der Topographiemessungen auf Cellulosenitrat sollte es bei dieser Höhe keine Interaktion mehr zwischen Cantilever und Oberfläche geben. Dennoch sieht man bei einigen Messungen im vertikalen Auslenkungssignal Ausschläge nach oben. Die Abbildungsteile 85A), 85B) und 85C) weisen alle drei einen Ausschlag nach oben an der ungefähr gleichen Stelle auf. Die Auslenkung beginnt nachdem der Cantilever ungefähr $1000nm$ weit gefahren wurde, und endet bei einer Weglänge von $2500nm$, also der Länge der DNA. In diesen Abbildungsteilen gibt es auf dem Rückweg ebenfalls einen Ausschlag. Diesmal verläuft das Signal bei A) und B) nach unten und bei C) nach oben. Die Ausschläge auf dem Rückweg bei A) und B) wirken wie normale Kräfteausschläge bei Abrisskurven. Die DNA wird gestreckt und somit der Cantilever leicht nach unten gezogen. Die Abrisskräfte wären in diesem Fall ungefähr $70pN$, was ebenfalls eine passende Kraft wäre. Die Ausschläge nach oben deuten hingegen eher auf etwas hin, das den Cantilever nach oben gedrückt hat. Abgesehen von Abbildungsteil B) weisen die Ausschläge jedoch keine rundliche Form auf wie bei der Cantileverhöhe von $200nm$.

Abbildungsteil D) weist sowohl auf dem Hinweg als auch auf dem Rückweg die typischen Ausschläge nach unten auf. Dabei lassen sich bei dem Weg von links nach rechts drei Abrissmomente ausmachen und bei dem Weg von rechts nach links ein größerer Ausschlag mit einer Abrisskraft von $40pN$. Die Abrissmomente auf dem Hinweg weisen alle eine Abrisskraft von ungefähr $20pN$ auf. Es ist wahrscheinlich, dass die DNA mehrmals an der Oberfläche andockte und immer wieder abgerissen wurde. Der Abstand zwischen den einzelnen Abrissen beträgt ungefähr $2000nm$. Dies spricht dafür, dass die DNA direkt nach dem Abriss erneut gespannt wurde und somit die Anti-Digoxigeninposition recht nah beieinanderliegen.

Abbildung 85 ist insgesamt sehr interessant, da sie zeigt, dass es wahrscheinlich einen Zusammenhang zwischen dem Hinweg und dem Rückweg innerhalb von einer Linie gibt. So kommt es in Abbildungsteil C) sowohl am Ende des Hinwegs als auch zu Beginn des Rückwegs zu einem Abrissmoment, der vielleicht von der gleichen Anti-Digoxigeninstelle verursacht wurde. Unklar ist allerdings, warum die Abrisskräfte unterschiedlich groß sind. Ein ähnliches Bild zeigt sich in Abbildungsteil D) bei dem die Abrisskraft auf dem Rückweg ebenfalls deutlich höher ist. In Abbildungsteil C) findet man außerdem zu Beginn des Hinwegs und am Ende des Rückwegs einen positiven Kräfteanstieg, der wahrscheinlich auch von der gleichen Stelle stammt. Eine mögliche Interpretation wäre, dass die Oberfläche an dieser Stelle leicht abgelöst oder geschwollen war, was den Bead samt Cantilever nach oben gedrückt hat. Ein anderes Bild zeigt sich hingegen in Abbildungsteil A). und B). Hier wird der Cantilever währnd dem Hinweg nach oben gedrückt und während dem Rückweg gibt es die Anzeichen für eine Interaktion der DNA mit der Oberfläche.

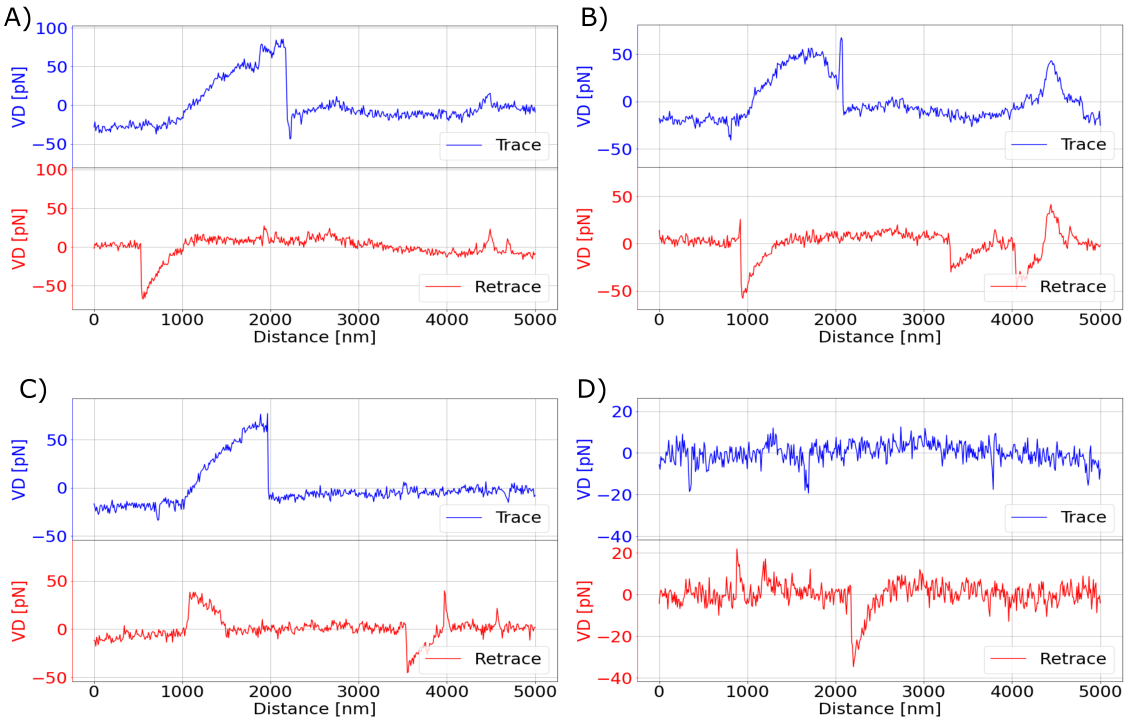


Abb. 85: Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $400nm$. Zu sehen sind in A), B) und C) sowohl Ausschläge nach oben, als auch nach unten. Lediglich in Abbildungsteil D) sind nur Ausschläge nach unten zu sehen. Die Ausschläge nach oben könnten Anzeichen für Topographie sein. Die Ausschläge nach unten ein Anzeichen für die Interaktion zwischen DNA und Oberfläche.

In Abbildung 86 wird jeweils der vertikale Ausschlag mit dem lateralen Ausschlag verglichen. In den Abbildungsteilen A) und B) wird der Hinweg dargestellt und in den Abbildungsteilen C) und D) der Rückweg. In Abbildungsteil A) gibt es zwei Ausschläge nach unten, die auf Abrissmomente hindeuten. Der erste Abrissmoment

weist eine Abrisskraft von um die $65pN$ auf und der zweite von ungefähr $10pN$. Beide Signale werden im lateralen Ausschlag gespiegelt. In Abbildungsteil B) sind insgesamt 6 Abrissmomente über den Hinweg hinweg verteilt. Die Abrissmomente liegen, abgesehen von dem letzten bei einer Kraft von um die $25pN$. Der letzte Abriss weist eine Kraft von ungefähr $50pN$ auf. Die Abrisskräfte würden in dem Bereich liegen, der auch bei den Adhäsionsmessungen festgestellt wurde. Gespiegelt werden die Abrissmomente zumindest teilweise im lateralen Signal. In Abbildungsteil C) und D) gibt es sowohl Ausschläge nach oben als auch nach unten. Außerdem wird das Signal der vertikalen Auslenkung in der lateralen Auslenkung gespiegelt.

Von der Form her erinnern die Abrissmomente stark an die Abrissmomente von Balzer et al. [24]. Dieser entdeckte drei verschiedene Arten, mit denen ein Polymer über die Oberfläche gezogen werden kann. Die Form der Abrissmomente ähnelt dem „cooperative stick “. Dabei wird das Polymer stark gestreckt, während es von der Oberfläche gelöst wird. Da die DNA-Stränge bei einer Abrisskraft von über $50pN$ gestreckt werden, würde dies sehr gut ins Bild passen

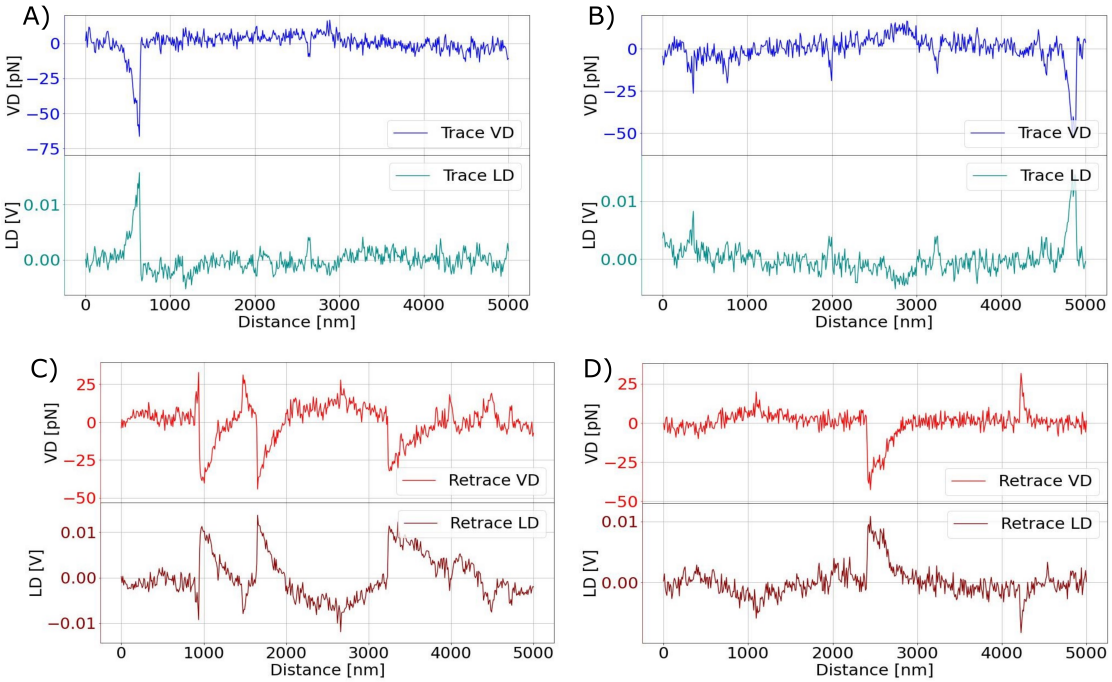


Abb. 86: Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $400nm$. Verglichen werden jeweils das Signal der vertikalen und der lateralen Auslenkung miteinander. Das Signal in C) und D) wird zwischen der Auslenkung im vertikalen und im lateralen Teil perfekt gespiegelt. Bei dem Signal in A) und B) spiegeln sich lediglich die größeren Ausschläge.

Beispielkurven bei 900 nm

Bei einer Cantileverhöhe von $900nm$ ist der Gyrationsradius deutlich überschritten, dennoch hat die DNA mit einer Länge von $2.5\mu m$ noch die Möglichkeit, mit der Oberfläche zu interagieren. Mögliche Interaktionen des Beads mit der Oberfläche auf Grund von variierenden Höhen sollten ad acta gelegt sein. In Abbildung 87 sind Beispielkurven für Messungen bei einer Cantileverhöhe von $900nm$ zu sehen. Es fällt zunächst auf, dass das Signal sehr viel stabiler wirkt als auf den bisherigen Höhen. Das Hintergrundrauschen liegt bei $7pN$. In Abbildungsteil 87A) gibt es auf dem Hinweg zwei Abrissmomente bei einer Weglänge von knapp unter $2000nm$ und knapp über $2000nm$. An ungefähr der gleichen Position gibt es auf dem Rückweg einen weiteren Ausschlag in ungefähr der gleichen Größenordnung. Allerdings verläuft diesmal der Ausschlag nach oben. Eigentlich müsste er genauso wie auf dem Hinweg nach unten verlaufen. Dieses Phänomen tritt bei einigen Messlinien auf. Eine mögliche Ursache könnte auch hier sein, dass die DNA auf dem einen Weg mit der Oberfläche interagiert und auf dem anderen Weg ein Teil der Oberfläche nach unten gedrückt wird, weil er davor von der DNA nach oben gezogen wurde. Dies würde auch erklären, warum die Abrissmomente von Hin- und Rückweg sowohl in Abbildungsteil A) als auch in B) im gleichen Kräftebereich liegen. Insgesamt gibt es in Abbildungsteil B) über den ganzen Hinweg hinweg 6 Abrissmomente zwischen einer Weglänge von $1500nm$ und $4500nm$. Auf dem Rückweg gibt es an ungefähr der gleichen Stelle erneut drei Ausschläge nach oben. Dabei weist der erste Abrissmoment die stärkste Kraft auf, was darauf hindeuten würde, dass dies das größte Stück gewesen sein könnte, das heruntergedrückt wurde. Bei einem Vergleich mit der Arbeit von Balzer et al. lässt sich sagen, dass auch diese Abrissmomente von einem „cooperativ stick“stammen.

Es ist außerdem zu bedenken, dass die Probe zu diesem Zeitpunkt bereits mehrere Stunden in PBS lag, was vielleicht dafür gesorgt hat, dass die Probe etwas instabiler gewesen ist. Es war außerdem die letzte Messung an diesem Tag, weswegen die Oberfläche von den Interaktionen mit der DNA beziehungsweise dem Bead/Cantilever etwas beansprucht war. Dies könnte dazu geführt haben, dass sich Teile der Oberfläche gelöst beziehungsweise aufgestellt haben.

Bei der Betrachtung des lateralen Ausschlags fällt auf, dass die Abrissmomente teilweise gespiegelt werden. In Abbildungsteil 88 A) verläuft das vertikale Signal zunächst sehr geradlinig. Im lateralen Signal gibt es jedoch einen starken Kräfteabfall. Beide Abrissmomente tauchen sowohl im vertikalen als auch im lateralen Signal auf. Allerdings ist der zweite Abrissmoment im vertikalen Signal etwas höher, als der erste. Im lateralen Signal sind sie fast gleich groß. Abbildungsteil B) zeigt ebenfalls sowohl im vertikalen als auch im lateralen Signal einen Ausschlag, jedoch ist der Rest des Signals an verschiedenen Stellen leicht unterschiedlich.

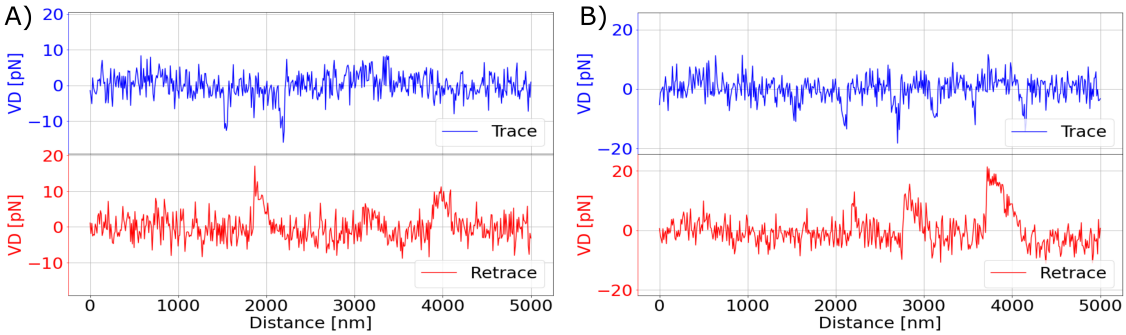


Abb. 87: Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $900nm$. Das Signal verläuft sowohl auf dem Hinweg, als auch auf dem Rückweg stabiler. Auf beiden Wegen gibt es Ausschläge, jedoch verlaufen die Ausschläge auf dem Hinweg bei den meisten Kurven nach unten und auf dem Rückweg nach oben.

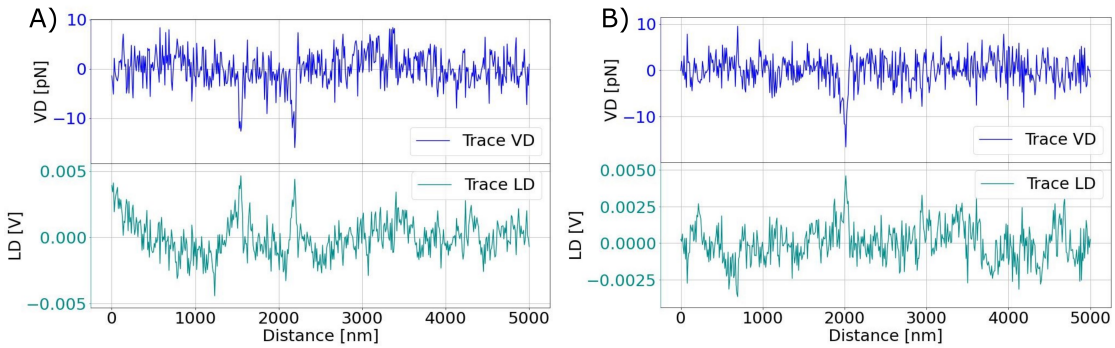


Abb. 88: Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $900nm$. Ein Vergleich zeigt, dass die Abrissmomente teilweise in der lateralen Auslenkung gespiegelt werden, jedoch nicht komplett. Insgesamt verlaufen beide Signale deutlich stabiler, als bei den vorherigen Höheneinstellungen.

Beispielkurven bei 4130 nm

Bei einer Messung mit einer Cantileverhöhe von $4130nm$ war es der DNA nicht mehr möglich, mit der Oberfläche zu interagieren. Des Weiteren wurden auch keine möglichen Anzeichen der Topographie entdeckt. Zum Teil gab es minimale Ausschläge von wenigen pN insgesamt war das vertikale Signal aber sehr konstant und verlief sowohl auf dem Hin- als auch auf dem Rückweg geradlinig und stabil. Das laterale Signal verlief insgesamt etwas unruhiger als das vertikale. Dies wurde jedoch auch bei anderen Messungen mehrfach festgestellt..

6.4.2 Reibungsmessungen auf poröser Membran

Die meisten Reibungsmessungen wurden auf der porösen Membran aufgenommen. Dabei wurden verschiedene Parameter wie die Abhängigkeit von der Cantileverhöhe, der Scangeschwindigkeit und der Position untersucht. Zudem wurde das Hintergrundrauschen begutachtet. Es wurde sowohl das Signal in vertikeler Auslenkung als auch in lateraler Auslenkung analysiert. Der Hauptfokus lag auf der vertikalen Auslenkung, da der Cantilever in der vertikalen Richtung sensibler reagiert und das Signal der lateralen Auslenkung instabiler ist als das Signal in vertikaler Richtung. Genauso wie schon bei den Adhäsionsmessungen wurden bei den Reibungsmessungen die Abrissmomente gemäß des eWLC-Modells untersucht. Zur Analyse der Messungen auf poröser Membran wurden verschiedene Programme mit Python geschrieben. Diese konnten leider nicht auf die Messungen auf Cellulosenitrat angewendet werden, da die Auswertungen nur für Kraft-Distanzkurven funktionieren, bei denen die Ausschläge einen Kräfteabfall aufweisen. Dies war jedoch bei einigen Messungen auf Cellulosenitrat nicht der Fall.

Beispielkurven

Um einen besseren Einblick in die Reibungsmessungen zu bekommen, werden in Abbildung 89 vier verschiedene Beispielkurven aufgezeichnet. Der Cantilever bewegt sich wie bei den Messungen auf Cellulosenitrat von links nach rechts beziehungsweise von rechts nach links. In Abbildungsteil A) findet während dem Hinweg kein Abrissmoment statt. Beim Rückweg lässt sich ein Abrissmoment mit einer Kraft von $35pN$ bei ungefähr der Hälfte des Weges feststellen. Die DNA wird nach einer Strecke von $2000nm$, also bei dem Marker $3000nm$, gespannt, bis die benötigte Kraft für den Abriss erreicht wird. Danach reißt die DNA ab und der Cantilever tariert sich aus.

Abbildungsteil B) zeigt zwei Abrissmomente auf dem Hinweg und einen Abrissmoment auf dem Rückweg. Bei den Abrissmomenten auf dem Hinweg liegt die Abrisskraft bei $60pN$. Auf dem Rückweg liegt sie hingegen bei $100pN$. Auch bei diesen Kraft-Distanzkurven lässt sich erkennen, dass der Cantilever auf dem Hinweg bei der Bewegung von links nach rechts nach und nach ausgelenkt wurde, beim Rückweg erfolgt dies von rechts nach links. Die Form des Abrisses wird gespiegelt. Des Weiteren ist das Signal nach dem Abrissmoment auf dem Rückweg etwas unruhiger und es gibt ganz am Ende einen Ausschlag, bei dem nicht sicher ist, ob es sich dabei um Hintergrundrauschen handelt oder um einen Abrissmoment, der im Hintergrundrauschen untergeht.

Abbildungsteil C) zeigt im Hinweg drei verschiedene Abrissmomente. Der erste Abrissmoment weist eine hohe Abrisskraft von um die $200pN$ auf, wohingegen die Abrisskräfte der anderen beiden bei ungefähr 25 beziehungsweise $50pN$ liegen. Des

Weiteren spaltet sich der erste Abrissmoment noch in zwei Ausschläge auf. Beim Rückweg ist nur ein Abrissmoment vorhanden. Dieser weist ebenfalls eine geringe Abrisskraft von ungefähr $25pN$ auf. Auch bei dieser Aufnahme scheinen sich der zweite beziehungsweise dritte Abrissmoment des Hinwegs mit dem Abrissmoment auf dem Rückweg zu spiegeln.

In Abbildung D) gibt es zum Ende des Hinwegs zwei Abrissmomente, die eine sehr ähnliche Abrissform und eine Abrisskraft von $40pN$ aufweisen. Auf dem Rückweg erkennt man zwei weitere Abrissmomente mit einer Kraft von ungefähr $30pN$. Auch diese beiden ähneln sich sehr stark und treten bereits zu Beginn des Weges auf. Es wäre also möglich, dass die Abrissmomente vom Hin- und Rückweg von der gleichen Andockposition verursacht wurden.

So stellt sich die Frage, warum die DNA teilweise auf dem Hin- beziehungsweise Rückweg mit der gleichen Stelle interagiert, dies jedoch nicht immer der Fall ist. Des Weiteren variieren die Abrisskräfte sehr stark. Manche DNA-Stränge reißen bei einer Kraft von $40pN$ ab und manche erst bei einer Kraft von $200pN$. Außerdem variiert die Anzahl der Abrissmomente. Manche Kurven weisen einen Abrissmoment auf und manche bis zu dreien. Auffällig ist auch bei diesen Kraft-Distanzkurven, dass es trotz höherer Abrisskräfte nicht zu Overstretching kommt. Außerdem spiegelt sich der Streckvorgang zwischen dem Hin- und dem Rückweg. Auf dem Hinweg wird die DNA von links nach rechts gespannt, weswegen die Kraft zunächst von links nach rechts ansteigt und dann schlagartig auf 0 geht. Auf dem Rückweg ist es genau anders herum.

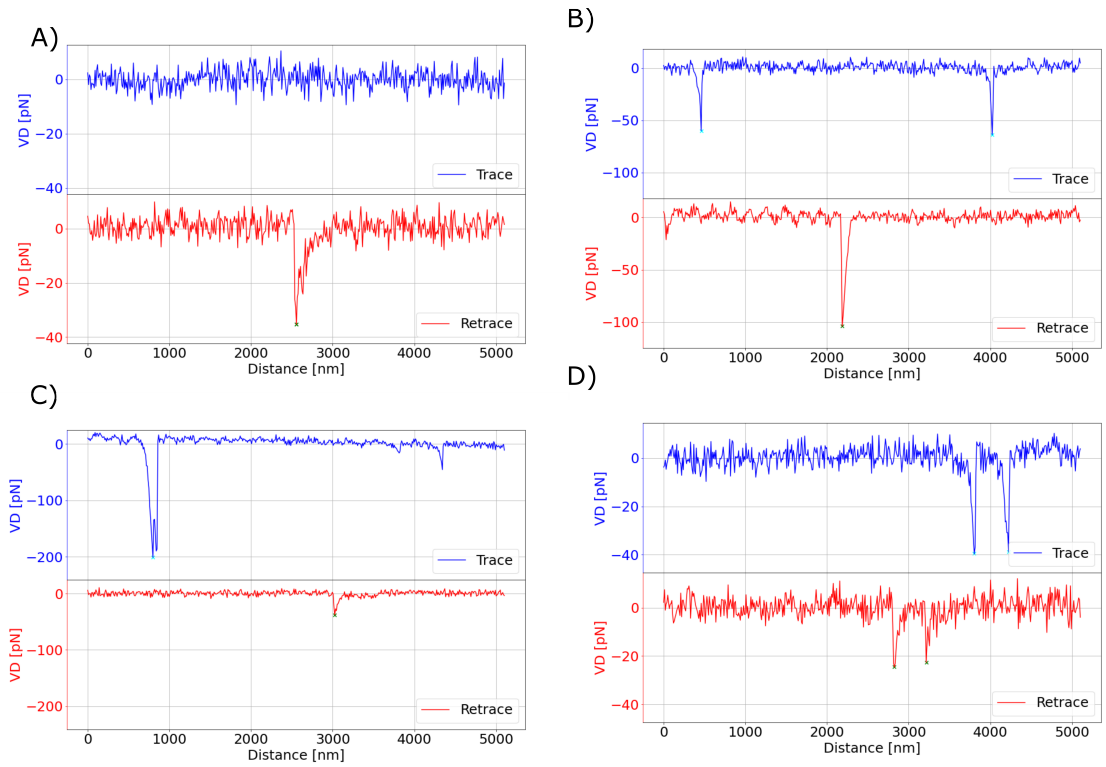


Abb. 89: Zusammenstellung von vier verschiedenen Beispielkurven für den Hinweg und Rückweg innerhalb von einer Linie. [4]

Positionsabhängigkeit

Der erste wichtige Punkt bei der Datenauswertung ist die Analyse der Abrissposition. Dabei spielt es nicht nur eine Rolle, wo die DNA innerhalb der Messlinie abgerissen ist, sondern auch bei welcher Position auf der Membranoberfläche. So kann bestimmt werden, ob die positivie Ladung auf der Membran homogen verteilt ist oder nicht. Zuerst widmen wir uns der Analyse der Abrissposition innerhalb der Messlinie. Dazu wird Abbildung 90 zu Rate gezogen. Abbildungsteil A) zeigt die Anzahl der Abrissmomente in Abhängigkeit von der Position auf dem Hinweg. Abbildungsteil B) zeigt die Anzahl der Abrissmomente auf dem Rückweg. Alle Messungen wurden am 17. September 2021 aufgenommen. Die Abbildungsteile C) und D) stellen die Anzahl der Abrisse auf dem Hin- und Rückweg für die Messreihe am 23. September 2023 dar. Der Cantilever rastert die Oberfläche Linie für Linie ab, bis die Messung entweder auf Grund von Topographie abgebrochen wird oder die vorgegebene Fläche abgerastert wird. Die Abrissmomente werden dann in Abhängigkeit von der Position auf der Linie zusammengefasst. Das bedeutet, dass es sich nicht um die gleiche Linie handelt, sondern um verschiedene aufeinander folgende. Nachdem die Messung beendet ist wird die Messung entweder an der gleichen Stelle wiederholt oder die Stelle gewechselt. Oft werden außerdem Parameter wie die Geschwindigkeit des Cantilevers geändert. Alle Messungen am 17. September 2021 und 23. September 2021 fanden bei einer Cantileverhöhe von $250nm$ statt.

Abbildungsteil A) zeigt die Verteilung der Abrisspositionen für den Hinweg. Dabei gibt es ein deutliches Maximum von über 30 Abrissmomenten bei einer Position von $3\mu m$. Generell liegen die meisten Abrissmomente bei dieser Messung zwischen $2\mu m$ und $4\mu m$. Das bedeutet, dass die DNA in diesem Bereich bereits maximal $2-4\mu m$ weit gezogen wurde. Falls die DNA zu Beginn der Messlinie direkt mit der Membran agiert, wird sie, sofern kein Overstretching auftritt, spätestens bei einer Position von $2.5\mu m$ abreißen. Dies aber auch nur für den Fall, dass das untere Ende der DNA an der Oberfläche andockt. Ansonsten wäre der Anteil der DNA, der gespannt werden kann, dementsprechend kürzer. Dies bedeutet, je weiter sich die DNA von links nach rechts bewegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einem Abrissmoment kommt. Gemäß Abbildungsteil A) sieht es so aus, als würden der DNA-Strang meistens in der ersten Hälfte der Linie mit der Oberfläche interagieren. Dass es so wenig Abrissmomente am Ende der Messlinien gibt, könnte daran liegen, dass die DNA bereits abgerissen ist und sich erst wieder erneut anbinden muss. Sie ist somit noch nicht gespannt genug, um erneut abzureißen. Es kommt auch zu Beginn der Messlinien zu Abrissmomenten. Dies könnte daran liegen, dass der angebundene DNA-Teil entweder sehr kurz war oder, dass die DNA sich in einem Bereich außerhalb der Messlinien angebunden hat, also zum Beispiel bei $-1.0\mu m$. Das würde bedeuten, dass die eigentliche gespannte Länge länger ist als die gemessene Länge. Des Weiteren ist es auch möglich, dass ein DNA-Strang bereits auf dem Rückweg in eine Pore gekrochen ist und sich erst auf dem Hinweg von der Oberfläche wieder löst.

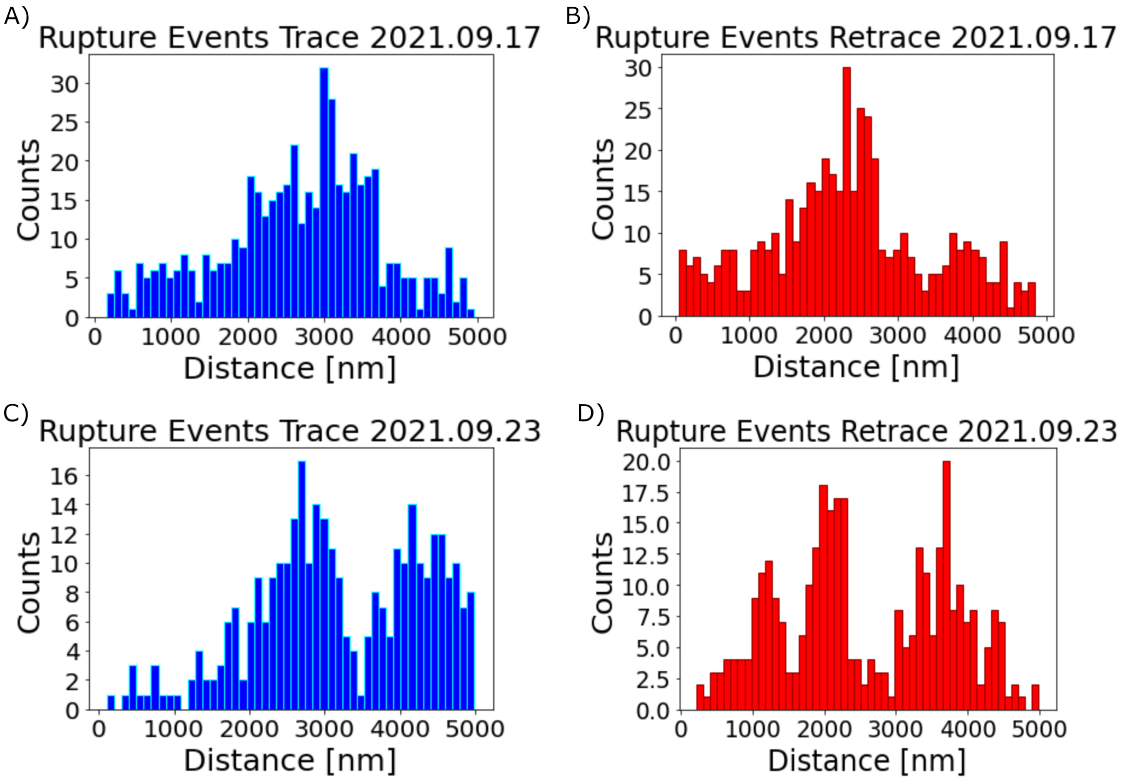


Abb. 90: Zwei Beispiele für Abrissmomentverteilung in Abhängig von der Position innerhalb der Linie. Dargestellt sind ist die Anzahl der Abrisse in Abhängigkeit von der Position auf dem Hinweg in Blau beziehungsweise auf dem Rückweg in Rot. Insgesamt gibt es pro Linie 512 Messpunkte. Eine Messlinie erstreckt sich über $5\mu m$.

Abbildungsteil B) stellt den Rückweg für die gleiche Messung wie in Abbildungsteil A) dar. Das Ergebnis wirkt teilweise gespiegelt, da das Maximum an Abrissmomenten nun bei ungefähr $2.5\mu m$ liegt und die Abrissmomente an den Messlinienrändern stark ausgedünnt sind. Die DNA wurde diemals von rechts nach links über die Oberfläche gezogen. Dies würde erklären, warum das Maximum um $0.5\mu m$ nach links verschoben wurde. Insgesamt bleibt die Anzahl der Abrissmomente zwischen dem Hin- und dem Rückweg ungefähr gleich.

Abbildungsteil C) und D) stammen vom 23. September 2023. Zu sehen sind in diesem Fall zwei Maxima in Bezug auf die Abrissmomente. Einer davon liegt bei $3\mu m$ der andere bei $4.5\mu m$. Dies spricht dafür, dass es zwei Bereiche gab, in denen die DNA bevorzugt andockte. Abbildungsteil D) zeigt insgesamt drei Maxima. Das erste Maximum zeigt sich an dem Punkt, an dem die DNA maximal $1.5\mu m$ auf dem Weg von rechts nach links gespannt wurde. Die Messlinienränder sind erneut stark ausgedünnt.

In Abbildung 91 sind die Abrisse für alle Reibungsmessungen auf poröser Membran dargestellt. Die Messungen vom 12.Mai 2021 wurden hierfür ausgeschlossen, da die

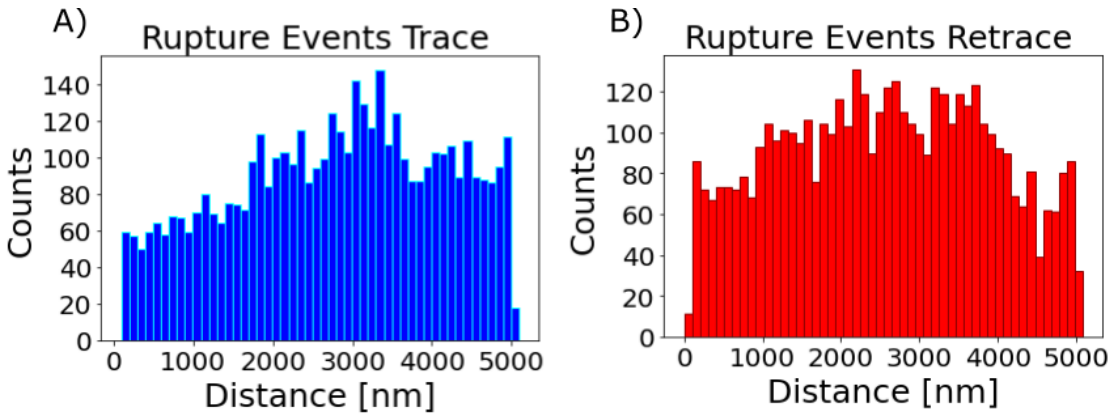


Abb. 91: Histogramme für die Verteilung der Abrisse für alle Messtag in einem. Abbildungsteil A) zeigt dabei den Hinweg und B) den Rückweg

Weglänge an diesem Tag nur $4000nm$ betrug und diese abweichende Strecke die Messungen verzerren würde. In Abbildungsteil A) lässt sich mit steigender Weglänge ein Anstieg der Abrissanzahl erkennen. Insgesamt ließ sich dieser Trend jedoch nur bei ein paar Messungen beobachten und nicht bei allen. Da an den unterschiedlichen Messtagen unterschiedlich viele Abrissmomente detektiert wurden, können einzelne Messtage das Ergebnis verzerren. In Abbildungsteil B) liegen ebenfalls die meisten Abrissmomente in der Mitte, jedoch kann man von keiner Spiegelung der Abrissmomente zwischen Hin- und Rückweg sprechen. Dieses Bild entspricht der Mehrheit der Messungen.

Bis jetzt wurde die Position der Abrissmomente lediglich in Bezug auf die Stelle innerhalb der Messlinie analysiert. Ein weiterer interessanter Punkt ist die Verteilung der Abrisse auf der Oberfläche allgemein. Zwei Beispiele hierfür sind in Abbildung 92 zu finden. Sie zeigen jeweils zwei Einzelmessungen von verschiedenen Tagen. Diese Messtage sind wie in Abbildung 90 der 17. September 2021 in Abbildungsteil A) und der 23. September 2021 in Abbildungsteil B). Die Messung beginnt bei beiden Abbildungsteilen in der linken unteren Ecke. Die Linien sind insgesamt $5\mu m$ lang. Die Messung verläuft, wie schon vorher beschrieben, von links nach rechts beim Hinweg und von rechts nach links beim Rückweg. Danach wird auf die nächste Linie gewechselt. Das geschieht in diesem Fall so lange, bis Anzeichen von Topographie in den Messungen zu sehen sind oder der vorher angegebene Messbereich abgerastert wurde. Insgesamt wurden in Fällen, in denen keine Topographie auftritt, maximal 512 Linien vermessen. Bei einer Länge von $5\mu m$ bedeutet dies dass zwischen den einzelnen Linien $9.77nm$ liegen. Sobald es zu einem Abrissmoment kommt, wird diese Stelle mit einem „X“markiert. Dieses „X“ist beim Hinweg bläulich und auf dem Rückweg rötlich. Je höher die Abrisskraft bei dem jeweiligen Abrissmoment ist, desto intensiver ist der Farbton. Ziel dieser Analyse ist es zum einen zu erkennen, ob es Orte auf dem Membran gibt, an denen die DNA eher mit der Oberfläche interagiert. Zum anderen wird untersucht, wie die Verteilung der Abrisskräfte in Bezug auf die Position ist und ob sich die Abrissmomente von Hinweg und Rückweg

spiegeln. Dies sowohl in Bezug auf die Position, die Häufigkeit, aber auch auf die Abrisskraft.

Bei Abbildungsteil A) liegen die meisten Abrissmomente zwischen $1500nm$ und $4000nm$. Dies gilt sowohl für die Abrissmomente auf dem Hinweg als auch auf dem Rückweg. Generell liegen die Abrissmomente auf dem Hinweg tendenziell weiter rechts als die Abrissmomente auf dem Rückweg. Des Weiteren sind in der oberen linken Ecke vergleichsweise wenig Abrisse. Dies kann allerdings auch nur Zufall sein. Auf dem Hinweg gibt es Abrissmomente mit bis zu $100pN$, wohingegen es auf dem Rückweg Abrissmomente nur bis zu $50pN$ gibt. Die hohen Abrisskräfte treten allerdings nur vereinzelt auf. Allgemein liegt die Abrisskraft in beiden Fällen zwischen $20pN$ und $40pN$. Außerdem gibt es auf dem Hin- und Rückweg ungefähr gleich viele Abrissmomente.

In Abbildungsteil B) liegen die meisten Abrissmomente eher auf der linken Seite zwischen $0nm$ und $3500nm$. Es ist keine Tendenz zu erkennen, dass die Abrissmomente während dem Hinweg weiter rechts liegen als die Abrissmomente auf dem Rückweg. Des Weiteren liegen die Abrisskräfte meistens im Bereich zwischen $20pN$ und $40pN$. Es gibt ungefähr genauso viele Abrissmomente auf dem Hinweg wie auf dem Rückweg.

Insgesamt lässt sich sagen, dass es bei vereinzelten Messungen Positonen gibt, an denen die DNA-Stränge häufiger abreißen als an anderen. Dies gilt jedoch nicht für die Messungen im Allgemeinen, was dafür spräche, dass die Membran sowohl in Bezug auf die Poren als auch deren Ladung homogen angeordnet ist. Des Weiteren kommt es zu keiner deutlichen Spiegelung der Position zwischen Hin- und Rückweg was dafür spricht, dass die Stellen, mit denen die DNA zu diesem Zeitpunkt interagiert, nicht immer reagieren. Im Weiteren wurden die Abrissmomente von verschiedenen Messreihen an der gleichen Stelle übereinander geplottet. Auch diese zeigten keine bevorzugten Andockpunkte der DNA auf der Oberfläche. Es muss jedoch angefügt werden, dass die Messergebnisse vor allem in Bezug auf die Position schwierig zu analysieren sind. So ist es klar, an welchem Punkt die DNA abreißt, aber nicht an welchem Punkt sie angedockt hat. Die Abrisslänge kann stark variieren, da der gesamte DNA-Strang auf Grund der durchwegs negativen Ladung in der Lage ist, mit der Oberfläche zu interagieren. Dennoch würden wir nach bisherigen Erkenntnissen davon ausgehen, dass bevorzugte Andockpunkte nur in vereinzelten Messungen existieren. Im Generellen ist dies nicht der Fall.

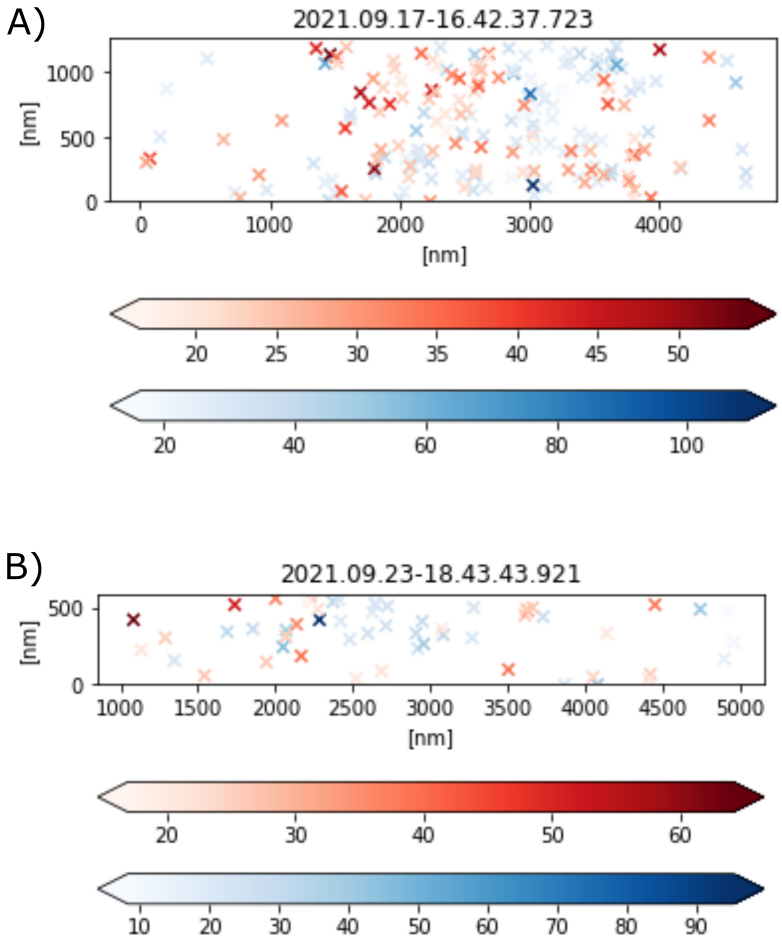


Abb. 92: Überblick über die Abrissverteilung auf der Oberfläche. Dargestellt ist jeweils eine Einzelmessung vom 16.07.2021 in A) und eine Einzelmessung vom 23.09.2021 in B). Die Kreuze markieren den Punkt auf der Oberfläche, an dem ein Abriss stattgefunden hat. Abrissmomente in Blau stammen vom Hinweg und Abrissmomente in Rot vom Rückweg. Je dunkler der Farbton, desto höher ist die Abrisskraft. In Abbildungsteil A) sind die Abrissmomente vor allem konzentriert auf den mittleren Bereich zwischen $1500nm$ und $4000nm$. Tendenziell liegen die Abrisskräfte auf dem Hinweg eher im rechten Teil und auf dem Rückweg im linken Abschnitt der Aufnahme. Bei Abbildungsteil B) liegen die Abrissmoment tendenziell eher im linken Bereich, sind allerdings eher homogen verteilt. [4]

Geschwindigkeitsabhängigkeit

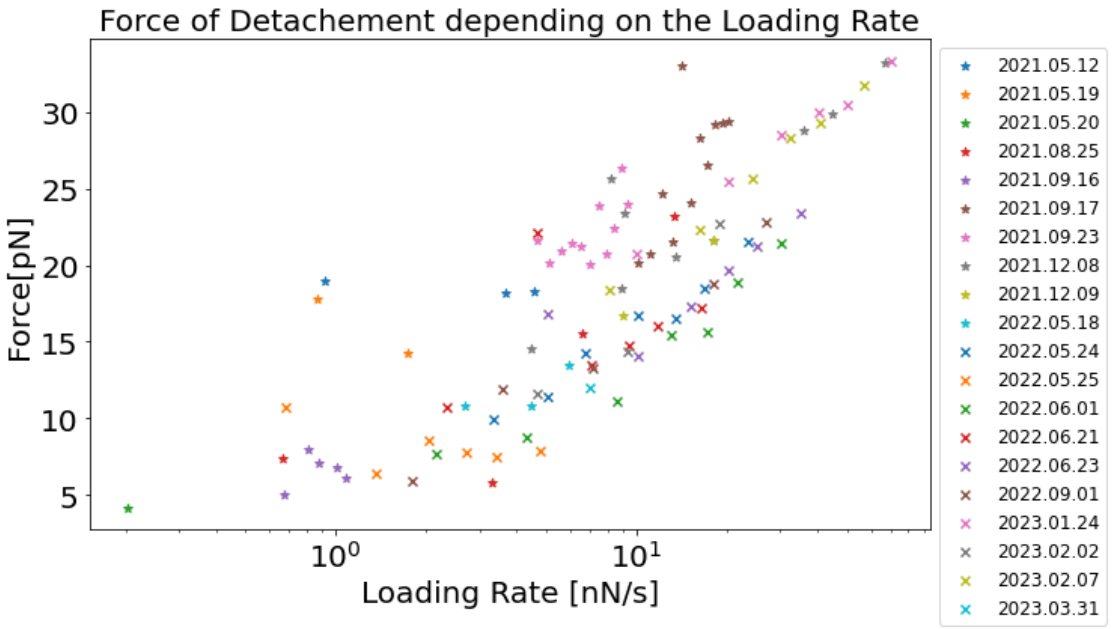


Abb. 93: Abbildung der Abrisskraft in Abhängigkeit von der Zugrate. Zu erkennen ist, dass die Abrisskräfte mit einer größer werdenden Zugrate ansteigen. Die Abrisskräfte liegen bei Messungen mit geringer Zugrate im Bereich von unter $10pN$ und wachsen schließlich auf über $30pN$ an.

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Messergebnisse ist die Geschwindigkeit des Cantilevers beziehungsweise die Zugrate. Es macht für die Höhe der Abrisskräfte einen Unterschied, wie schnell die DNA über die Oberfläche gezogen wird. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 93 dargestellt. Deutlich zu erkennen, ist, dass die Abrisskraft logarithmisch mit einer steigenden Zugrate ansteigt. Dass die Abrisskraft auf Grund von einer steigenden Zugrate in logarithmischer Form ansteigt, ist bereits aus den Arbeiten von Evans et al. [79], Bell et al. [78], Strunz et al. [80] bekannt. Sie evaluierten, dass es drei Spektrumsbereiche bei der Zugrate gibt. Objekte sind meistens über mehrere Stellen miteinander verbunden. Bei sehr geringen Zugraten reißen zwar mit der Zeit Bindungen ab, jedoch nicht alle gleichzeitig. Dadurch haben die abgerissenen Bindungen genug Zeit, um sich erneut zu bilden, und das Objekt reißt nicht ab. Im zweiten Teil des Spektrums wurde eine kritische Abrisskraft erreicht, bei der alle Bindungen abreißen. In diesem Teil des Spektrums steigt die Abrisskraft logarithmisch mit steigender Zugrate an. Für den logarithmischen Anstieg der wahrscheinlichsten Abrisskraft gilt die Formel:

$$F = \frac{k_B T}{x} ln \frac{ucx}{k_B T \nu} \tag{17}$$

Dabei handelt es sich bei F um die wahrscheinlichste Abrisskraft, T ist die Temperatur, k_B die Boltzmannkonstante, ν ist die thermische Dissoziationsrate, u ist die

Zuggeschwindigkeit, c die Elastizität und x die Lücke zwischen dem Energieminimum und der zu überwindenden Energiebarriere. Bei sehr hohen Belastungraten wird die Energiebarriere so schnell überwunden, dass nur das Auftreten von hohen Reibungskräften dem sofortigen Abreißen entgegenwirkt.

Die Zugraten von unseren Messungen sind bereits hoch genug, um in den mittleren Teil des Spektrums zu kommen. Die Belastungsraten sind bereits hoch genug, um alle Anbindungspunkte auf einmal abzureißen, wodurch wir uns in dem Teil des Spektrums befinden in dem die Abrisskraft logarithmisch ansteigt. Dies bedeutet, dass die natürliche Lebensdauer der DNA-Anbindung länger ist als die Zeit, die der Cantilever benötigt, um über die Oberfläche zu fahren. Wenn die Lebensdauer der DNA-Anbindung kürzer wäre, würde dies bedeuten, dass sich eine Veränderung der Cantilevergeschwindigkeit nicht auf die Abrisskraft auswirken würde.

Ein wichtiger Faktor für den Vergleich der Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit ist die Federkonstante. Bei allen Messungen wurde die gleiche Art von Cantilevern verwendet, dennoch wurde für jede Messung ein neuer Cantilever funktionalisiert. Die Cantilever weisen verschiedene Härtegrade und somit auch eine unterschiedliche Flexibilität auf. Je steifer der Cantilever ist, desto mehr Kraft braucht es, um ihn auszulenken. Dies wirkt sich auf das Messen der Abrisskräfte aus. Die reine Betrachtung der Cantilevergeschwindigkeit kann die Daten in Bezug auf die Abrisskräfte somit verzerren. In Abbildung 93 ist deshalb die Abrisskraft der verschiedenen Messungen in Abhängigkeit von der Zugrate aufgezeichnet. Um die Zugrate zu berechnen, wurde die Geschwindigkeit mal der Federkonstante genommen.

Die geringste Geschwindigkeit war hier $0.1\mu m/s$ und die höchste Geschwindigkeit $7.5\mu m/s$. Dabei wurden nicht bei jeder Messung alle Geschwindigkeiten verwendet. So gab es zum Beispiel Messungen, bei denen die Geschwindigkeit lediglich in Schritten von $0.2\mu m/s$ von $1.0\mu m/s$ auf $2.0\mu m/s$ erhöht und dann wieder gesenkt wurde. In den meisten Fällen wurde die Geschwindigkeit zunächst schrittweise gesteigert und dann gesenkt. Es muss außerdem angefügt werden, dass für den gleichen Messtag Messungen mit der gleichen Geschwindigkeit zusammengefasst wurden.

Bei dem einzelnen Messwert vom 31. März 2023 handelt es sich um eine Reibungsmessung auf gereinigtem Glas, die als Vergleichsmessung galt. Es ist zu erkennen, dass sie sich gut in die anderen Messergebnisse einreiht. Die Interaktion zwischen der Glasoberfläche und der DNA geschah vermutlich ebenfalls auf Grund der Ladungsunterschiede, da die Glasoberfläche selbst nicht funktionalisiert war. Allerdings zeigte sich eine Reaktion erst bei einer Höhe von $200nm$.

Zudem muss angefügt werden, dass alle Messungen, abgesehen von den ersten vier, bei einer Cantileverhöhe von $250nm$ aufgenommen wurden. An den anderen Messtagen wurde die Höhe zwischen den einzelnen Messungen verstellt. Die Cantileverhöhe

am 12. Mai 2021 variierte zwischen 250 und 900nm. Am 19. Mai 2021 lag sie zwischen 150nm und 400nm. Am 20. Mai 2021 wurden alle Messungen bei 250nm beziehungsweise 300nm durchgeführt und am 25. August 2021 zwischen 150nm und 650nm. Die unterschiedlichen Höhen könnten einen Einfluss auf die Abrisskraft haben. Dies würde zwei abweichende Messpunkte bei einer Geschwindigkeit von 1.0$\mu m/s$ erklären, die eine Kraft von knapp 20pN aufweisen.

Für alle Messungen ist der Median der Abrisskraft angegeben, wodurch einzelne Ausreißer die Werte nicht verzerren können. Die Abrisskräfte in Abbildung 93 liegen zwischen 5pN und 35pN. Des Weiteren fällt auf, dass die Abrisskraft mit einer steigenden Zugrate wächst. Generell gilt dies für die meisten Messungen. Eine Ausnahme bildet hierbei die Messung vom 19.05.2021. Bei dieser Messung steigt die Abrisskraft trotz steigender Zugrate nicht an. Eine nachträgliche Betrachtung der Abrissmomente ließ jedoch nicht darauf schließen, dass sich die Abrissmomente innerhalb der Messung von Abrissmomenten in anderen Messungen unterscheiden. Des Weiteren konnte nicht festgestellt werden, dass sich die Abrissmomente während der Messung veränderten oder ein anderer Parameter aufgetreten ist, der die Auswertung beeinflusst hätte.

Höhenabhängigkeit

Ein wichtiges Kriterium für die Messungen ist die Höhe des Cantilevers. Dabei ist es wichtig, eine Höhe zu finden, bei der zunächst nicht der Bead mit der Oberfläche reagiert. Wir wollten nur die Reaktion zwischen der DNA und der porösen Oberfläche analysieren. Die Oberfläche der Membran ist nicht komplett eben, weswegen eine Cantileverhöhe von unter 100nm das Risiko erhöhen würde, dass der Bead mit der Oberfläche interagiert. Des Weiteren ist die Membran auf Grund des Kaptontapes nicht komplett eben aufgeklebt. Dennoch ist es wichtig, eine Höhe zu wählen, bei der es eine realistische Chance gibt, dass die DNA mehrfach mit der Oberfläche interagiert. Die DNA hängt nicht senkrecht nach unten zur Oberfläche, sondern ist sehr wahrscheinlich geknäult. Eine mögliche Höhe wäre innerhalb des Gyrationsradius von 225 nm.

Zu Beginn der Messungen wurden verschiedene Höhen ausprobiert. Diese sind in Abbildung 94 angegeben. Beim Start der Versuchsreihe wurden die Messungen bei verschiedenen Cantileverhöhen vorgenommen. Um die Messergebnisse besser miteinander zu vergleichen, wurden die meisten Messungen auf der gleichen Höhe aufgenommen. Diese beträgt um die 250nm und liegt somit im Bereich des Gyrationsradius. Insgesamt wurden vier verschiedene Messungen mit verschiedenen Höhen durchgeführt. Sowohl bei den Messungen am 19.05.2021 als auch bei der Messreihe am 12.05.2021 ist zu erkennen, dass die Anzahl der Abrisse mit steigender Cantileverhöhe sinkt. Diese würde darauf hindeuten, dass das Knäuel bei steigender Höhe seltener andockt. Bei der Messung vom 25.08.2020 bleibt die Anzahl der Abrissmo-

mente zwischen $150nm$ und $650nm$ ungefähr konstant und liegt im niedrigen Bereich von unter 0.5 Abrissen pro Linie. Die Messung vom 20.05.2021 kann nicht berücksichtigt werden, da es nur eine einzige Messung bei einer Cantileverhöhe von $300nm$ gibt.

Auch hier können wieder die Erkenntnisse von Bell et al. angeführt werden. [41] Mit der von Ihnen berechneten Formel würde die Zeit, die die DNA braucht, um an der Oberfläche anzudocken, bei einer Cantileverhöhe zwischen $150nm$ und $900nm$ zwischen $0.054ms$ und 6.3610^54s variieren. Vor allem der Wert für eine Höhe von $900nm$ wäre absurd hoch. Auch dies stützt die Vermutung, dass eine steigende Distanz die Wahrscheinlichkeit einer Bindung und damit eines gemessenen Abrissmoments senkt.

Zusätzlich muss angeführt werden, dass die Messhöhe nicht perfekt konstant gehalten werden konnte. Tendenziell sank die Messhöhe vor allem zu Beginn der Messreihe ab. Deswegen wurde die Messung erst einige Sekunden nach der Einstellung der Höhe gestartet. Danach sank die Messhöhe nur noch langsam ab, was jedoch immer noch, je nach Dauer der Messung, zu einem Höhenunterschied von um die $50nm$ zwischen Beginn und Ende der Messung führen konnte. Der Höhenunterschied ist allerdings auch von Messung zu Messung unterschiedlich. Wahrscheinlich ist dies auch abhängig von der Strömung innerhalb von der PBS-Lösung. Eine starke Strömung könnte das Knäuel und somit das DNA-Molekül auslenken. Es könnte somit in Strömungsrichtung gestreckt werden beziehungsweise sich der Oberfläche nähern oder entfernen.

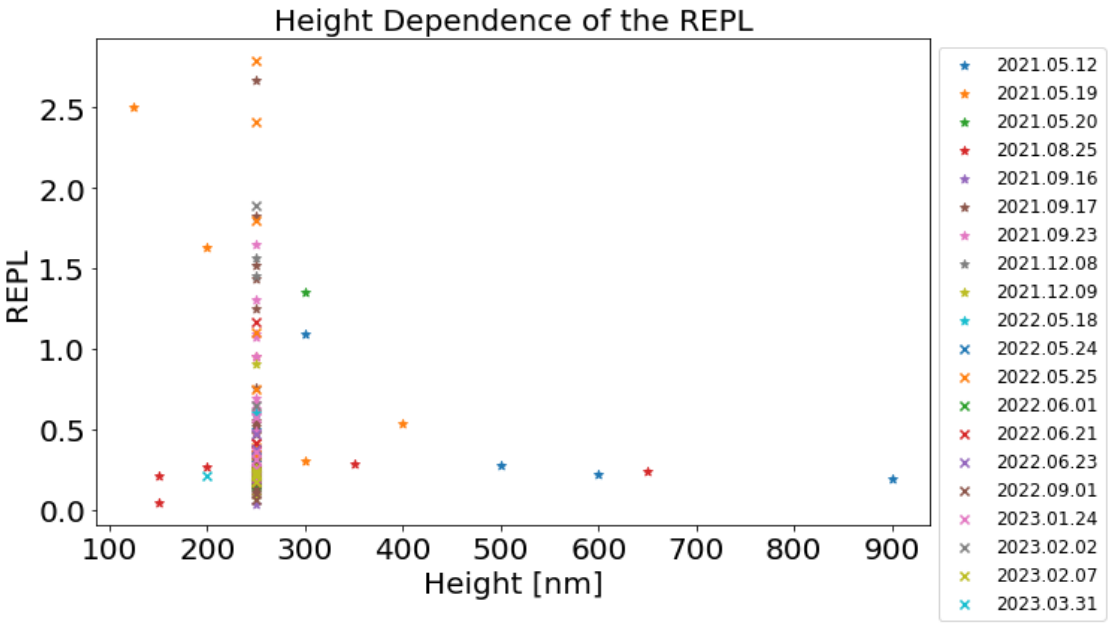


Abb. 94: Dichte der Abrissmomente pro Linie in Abhängigkeit von der Höhe des Cantilevers. Die Höhe wurde bei zwei Membranchargen zwischen $150nm$ und $900nm$ variiert. In den meisten Fällen wurden die Messungen bei einer Höhe von $250nm$ durchgeführt. Diese Messhöhe liegt auch im Rahmen des Gyrationsradius.

Abrissmomente pro Linie

Ebenfalls interessant für diese Messungen ist die Anzahl der Abrisse pro Linie. Im vorherigen Unterkapitel wurde darauf eingegangen, wie diese mit den verschiedenen Cantileverhöhen variiert. Ebenfalls wichtig für die Bestimmung der Abrissmomente pro Linie ist die Variierung der Cantilevergeschwindigkeit. In Abbildung 95 ist die Anzahl der Abrisskräfte pro Linie in Abhängigkeit von der Cantilevergeschwindigkeit dargestellt. Die Anzahl der Abrisse wird hierbei pro Linie angegeben. Das bedeutet, dass die Abrisse von Hinweg und Rückweg addiert werden. Die Anzahl der Abrisse für eine Messreihe wurden aufsummiert und dann durch die Anzahl der in dieser Messreihe aufgenommenen Linien geteilt. Alle Linien innerhalb einer Messreihe wurden somit mit der gleichen Cantilevergeschwindigkeit gemessen.

In Abbildung 95 ist der Verlauf der Abrissmomente pro Linie für alle Messtage zu sehen. Zunächst fällt auf, dass die maximale Anzahl der Abrissmomente zwischen $0.1\mu m/s$ und knapp $2.0\mu m/s$ am höchsten ist. Allerdings ist die minimale Anzahl der Abrissmomente pro Linie konstant sehr niedrig. Somit ist das Spektrum in Bezug auf die Abrisskraft bei geringeren Zuggeschwindigkeiten von bis zu $2.0\mu m/s$ stärker aufgefächert als bei höheren Geschwindigkeiten. Bei den Messungen vom 25. Mai.2022 kann man ein deutliches exponentielles Absinken der Anzahl von Abrissmomenten in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit erkennen. Tendenzen hierfür gibt es zudem bei den Messungen von 23. September 2021 und dem 17. September 2021.

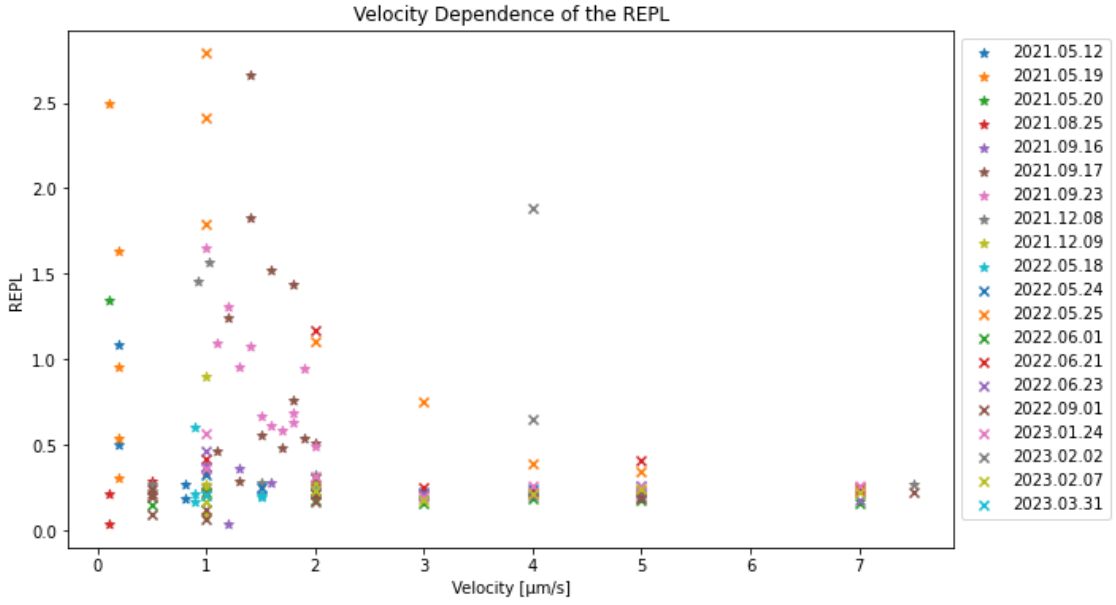


Abb. 95: Anzahl der Abrissmomente pro Linie in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit, wobei mit Linie der Hinweg und der Rückweg gemeint sind. Die meisten Linien weisen weniger als einen Abrissmoment auf.

Für das Formen einer Bindung benötigt die DNA bei einer Höhe von $250nm$ $24ms$. Dies geht aus der Gleichung von Bell und Terentejev hervor bei der Annahme, dass die Poren einen Durchmesser von $40nm$ aufweisen und sich zum Zeitpunkt der Bindung unter dem Cantilever befinden. [41] Wenn der Cantilever mit einer Geschwindigkeit von $1.0\mu m$ über die Oberfläche fährt, bräuchte er bei einer Weglänge von $5000nm$ $5s$. Insgesamt benötigt der Cantilever $40ms$, um über eine Pore zu fahren. Dies ist ausreichend Zeit für das Formen einer Bindung. Selbst mit der höchsten Geschwindigkeit von $7.5\mu m/s$ wäre es noch realistisch ein Bindung zwischen der DNA und der Oberfläche zu formen. Der Cantilever würde etwas über $5ms$ für den Weg über die Pore benötigen.

Jeppesen et al. fanden außerdem heraus, dass ein großes und flexibles Verbindungselement die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass eine Verbindung entsteht. [3] Wenn das Verbindungselement klein ist, ist dessen Beweglichkeit sehr wichtig. In dieser Arbeit wäre der gesamte DNA-Strang das Verbindungselement, da der gesamte DNA-Strang negativ funktionalisiert ist. Außerdem ist das DNA-Molekül lang genug, um die Distanz zur Oberfläche mit höherer Wahrscheinlichkeit zu überbrücken. Ebenfalls als wichtig erachteten Jeppesen et al. die Bindungsenergie. Zudem muss sich das Polymer in einer Lösung befinden, in der es sich möglichst flexibel entfalten kann. Es handelt sich somit um ein komplexes System, bei dem nicht nur der Ende-bis-Ende-Radius eine Rolle bei der Andockwahrscheinlichkeit spielt. Dies gilt wahrscheinlich auch für unser System.

Bei unserem System ist wie bereits beschrieben der Teil des Polymers, der mit der Oberfläche interagieren kann sehr hoch, da der komplette Strang negativ geladen ist. In einem optimalen Fall würde der Cantilever bei einer Strecke über 63 Poren mit einem Radius von $40nm$ fahren, die positiv geladen sind. Dies wirkt im ersten Momen nach einigen Möglichkeiten, doch zum einen sind die Poren nicht direkt hintereinander angeordnet, sondern orientieren sich an Korngrenzen, zum anderen ist es so, dass die Fahrtrichtung des Cantilevers sich nicht an der Porenausrichtung orientiert. Es kann somit sein, dass der Cantilever auf einer Wegstrecke über keine einzige Pore fährt. Für den Fall, dass es nötig ist direkt über das Zentrum der Pore zu fahren, um eine Bindung zu formen würde die Wahrscheinlichkeit noch weiter sinken, da der Cantilever oft über eine Pore fährt, ohne dass die DNA direkt mit dem Zentrum der Pore interagiert. Man bedenke hier noch einmal, das die DNA einen Durchmesser von nur $2nm$ besitzt. Eine höhere Cantilevergeschwindigkeit würde die Wahrscheinlichkeit weiter reduzieren.

Hintergrundrauschen

Ein wichtiger Faktor für die Messungen ist das auftretende Hintergrundrauschen. Als Hintergrundrauschen wird die durchschnittliche Schwingung des Cantilevers definiert, die er ausführt, ohne dass die DNA mit der Oberfläche in Kontakt tritt.

Es wird somit in pN angegeben. Dieses Rauschen entsteht vor allem durch die hydrodynamischen und thermischen Einflüsse. Strömungen innerhalb der Pufferlösung können durch Einflüsse von außen wie zum Beispiel durch Lärm oder Erschütterung entstehen. Sie können aber auch wegen der Bewegung des Cantilevers auftreten. Ein höheres Hintergrundrauschen kann problematisch werden, wenn es so stark ist, dass es den Abrissmoment des DNA-Strangs überdeckt. Eine Formel für das erwartete Hintergrundrauschen wurde bereits im Ergebnisteil der Adhäsionsmessungen etabliert. Die verwendeten Cantilever bei den Reibungsmessungen hatten eine Federkonstante zwischen $0.002N/m$ und $0.01N/m$. Somit variiert das erwartete Hintergrundrauschen auf Grund der thermischen Anregung des Cantilevers zwischen $4.02pN$ und $8.99pN$. Zusätzlich wurde das Hintergrundrauschen für die einzelnen Linien ermittelt, indem von den Linien die Standabweichung gebildet wurde. Im Folgenden wird nun zum einen das gemittelte Hintergrundrauschen für alle Messtage, zum anderen das Hintergrundrauschen für die jeweilige Messreihen untersucht. Dabei wird grundsätzlich zwischen dem Hintergrundrauschen auf dem Hinweg und dem auf dem Rückweg unterschieden.

In Abbildung 96 wird das Hintergrundrauschen für den Verlauf der Messtage abgebildet. Dazu wird das Hintergrundrauschen zunächst für jede Messlinie bestimmt. Dieser Wert wird über die Einzelmessung gemittelt und danach wurden die Einzelmessungen miteinander gemittelt, um den durchschnittlichen Wert für den Messtag festzustellen. Unterschieden wird dabei zwischen dem Hinweg in Blau und dem Rückweg in Rot. Das Hintergrundrauschen wird ebenfalls in pN angegeben. Die Werte werden entlang der X-Achse in Abhängigkeit vom Messtag geplottet. Der Messtag ist im Format „JJJJ.MM.TT“geschrieben. Das Hintergrundrauschen pendelt bei einem Wert von um die $5pN$. An den Tagen 25. August 2021, 17. September 2021 und 1. September 2023 ist das Hintergundrauschen extrem niedrig. In den meisten Fällen liegt das Hintergrundrauschen vom Hinweg und Rückweg fast direkt übereinander. Dies spricht dafür, dass es nur selten während der Messung zu Ereignissen kam, die nur das Hintergrundrauschen während dem Hinweg oder dem Rückweg beeinflusst haben. Dies könnte daran liegen, dass sich stärkere Erschütterungen oft je nach Cantilevergeschwindigkeit über 2 oder mehrere Messlinien hinweg ausgewirkt haben. Des Weiteren ist die Geschwindigkeit des Cantilevers dem Hinweg und dem Rückweg gleich, somit sollte auch die durch die Bewegung verursachte Strömung gleich hoch sein. Eine Außnahme bildet die Messung vom 2. Februar 2023. Dort liegt der Wert des Hintergrundrauschens auf dem Hinweg bei ungefähr $35pN$ und auf dem Rückweg bei $50pN$. Es handelt sich somit um eine Differenz von $15pN$. Das ist das Dreifache des durchschnittlichen Hintergrundrauschens über alle Messungen hinweg.

Im Folgenden sind in Abbildung 97 die Werte fürs Hintergrundrauschen innerhalb von verschiedenen Messreihen dargestellt. Die Marker kennzeichnen den gemittelten Wert für die Einzelmessung innerhalb der Messreihe. Unterteilt werden die Messwerte in Hinweg(blau) und Rückweg(rot). In Abbildungsteil A) sieht man drei Messungen, bei denen das Hintergrundrauschen bei ungefähr $4pN$ liegt. Die Geschwindigkeit

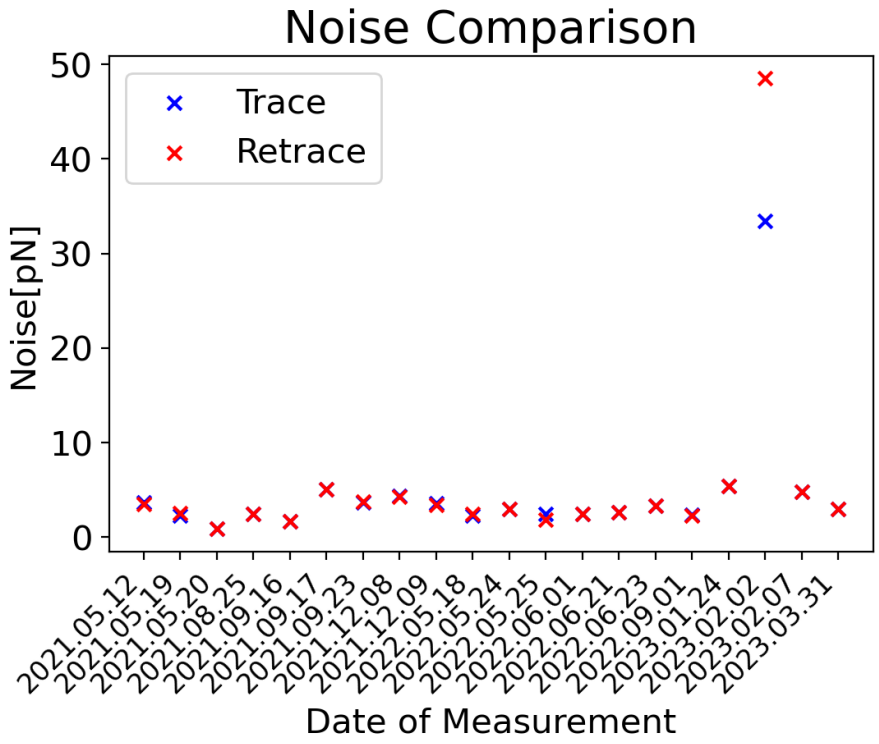


Abb. 96: Überblick über das Hintergrundrauschen bei den verschiedenen Messtagen. Das Hintergrundrauschen ist in pN angegeben und auf der X-Achse ist der jeweilige Messtag angegeben. Dieser ist im Format „JJJJ.MM.TT“aufgezeichnet. Pro Messtag wird das durchschnittliche Hintergrundrauschen einmal auf dem Hinweg in Blau und einmal auf dem Rückweg in Rot dargestellt. Zu erkennen ist, dass das Hintergrundrauschen in den meisten Fällen um einen Wert von $5pN$ pendelt. Eine Ausnahme bildet das Hintergrundrauschen am 2. Februar 2023. In den meisten Fällen überlappen sich das Hintergrundrauschen vom Hinweg und vom Rückweg. Die einzige Ausnahme bildet erneut das Hintergrundrauschen am 2. Februar 2023. Das Hintergrundrauschen vom Hinweg liegt bei $35pN$ und beim Rückweg bei $50pN$.

---

des Cantilevers betrug in diesem Fall $1.02\mu m/s$, $0.92\mu m/s$ und $2.0\mu m/s$. Bei den ersten beiden Messungen weichen die Weret des Hintergrundrauschens von Hin- und Rückweg leicht voneinander ab. Bei den nächsten beiden Messungen wurde die Geschwindigkeit auf $5.0\mu m/s$ beziehungsweise $7.5\mu m/s$ erhöht, sodass auch das Hintergrundrauschen auf bis zu $6pN$ anstieg. Danach wurde die Geschwindigkeit schrittweise auf $0.5\mu m/s$ reduziert, was zu einem letztendlichen Wert von $2.5pN$ führte. Die Federkonstante des Cantilevers betrug an diesem Tag $0.009N/m$. Somit liegt das erwartete Hintergrundrauschen bei $5.96pN$. Das erwartete Hintergrundrauschen ist somit höher, als die Standardbweichung der Cantileverschwingung.

In Abbildungsteil B) wurde die Geschwindigkeit des Cantilevers lediglich zwischen $1.0\mu m/s$ und $2.0\mu m/s$ variiert. Abgesehen von der zweiten und der letzten Messung, fanden alle Messungen bei $1.0\mu m/s$ statt. Zwischen der dritten und der vierten Mes-

sung kommt es zu einem starken Abfall des Hintergrundrauschens um $1pN$. Dieser Wert bleibt über die nächsten zwei Messungen hinweg konstant. Danach kommt es zu einem weiteren Sprung, obwohl die Messgeschwindigkeit gleich bleibt. Dabei spaltet sich auch der Wert zwischen dem Hin- und Rückweg auf. Dieser beträgt für den Rückweg fast $5pN$ und für den Hinweg fast $6pN$. Auch bei dieser Messung ist die Federkonstante $0.009N/m$, was zu einem erwarteten Hintergrundrauschen von $5.98pN$ führt.

Abbildungsteil C) zeigt einen Anstieg des Hintergrundrauschens von $2pN$ auf $4pN$. Während diesem Anstieg wurde die Geschwindigkeit schrittweise von $1.0\mu m/s$ auf $7.0\mu m/s$ erhöht. Bei den letzten beiden Messungen wurde die Geschwindigkeit wieder auf $5.0\mu m/s$ beziehungsweise $3.0\mu m/s$ gedrosselt. Dabei sinkt der Wert des Hintergrundrauschens auf $3pN$. Die Federkonstante am 24. Mai 2022 war mit 0.0034 niedriger als die bisherigen Federkonstanten. Somit ist auch das erwartete Hintergrundrauschen mit $3.65pN$ niedriger.

In Abbildungsteil D) wird die Geschwindigkeit ebenfalls schrittweise von $0.1\mu m/s$ auf $7.5\mu m/s$ erreicht. Dabei steigt das Hintergrundrauschen von $0.5pN$ beziehungsweise $1.0pN$ auf $4.5pN$. Danach sinkt das Hintergrundrauschen erneut schrittweise auf $1.0pN$, wobei die Geschwindigkeit auf $0.5\mu m/s$ gedrosselt wird. Bei der vierten Messung lag die Federkonstante bei 0.0036 und somit das erwartete Hintergrundrauschen bei $3.77pN$.

In allen vier Fällen liegt das ermittelte Hintergrundrauschen etwa im Bereich des gemessenen Hintergrundrauschens. Es ist außerdem zu bedenken, dass es sich bei den verschiedenen Werten um Mittellungen über mehrere Messlinien handelt.

Tendenziell steigt das Hintergrundrauschen mit einer steigenden Cantilevergeschwindigkeit an. Dennoch bedeutet eine Verdoppelung der Geschwindigkeit nicht eine Verdoppelung des Hintergrundrauschens. Zudem ist es so, dass das Hintergrundrauschen im Verlauf der Messung nicht immer den gleichen Wert bei der gleichen Geschwindigkeit annimmt. Des Weiteren schwankt die Höhe des Hintergrundrauschens zwischen den einzelnen Messungen sehr stark. So schwankt das Hintergrundrauschen in Abbildungsteil A) zwischen $6pN$ und $2.5pN$ und in Abbildungsteil C) zwischen $4pN$ und $2pN$. Das Hintergrundrauschen schwankt somit auch unabhängig von der Cantilevergeschwindigkeit. Insgesamt ist das Hintergrundrauschen mit deutlich unter $10pN$ niedrig gegenüber einem Großteil der gemessenen DNA-Abrisskräfte. Es gäbe allerdings die Möglichkeit, dass das Hintergrundrauschen Abrissmomente mit geringer Abrisskraft verdeckt und man somit noch mehr Abrisse detektieren könnte.

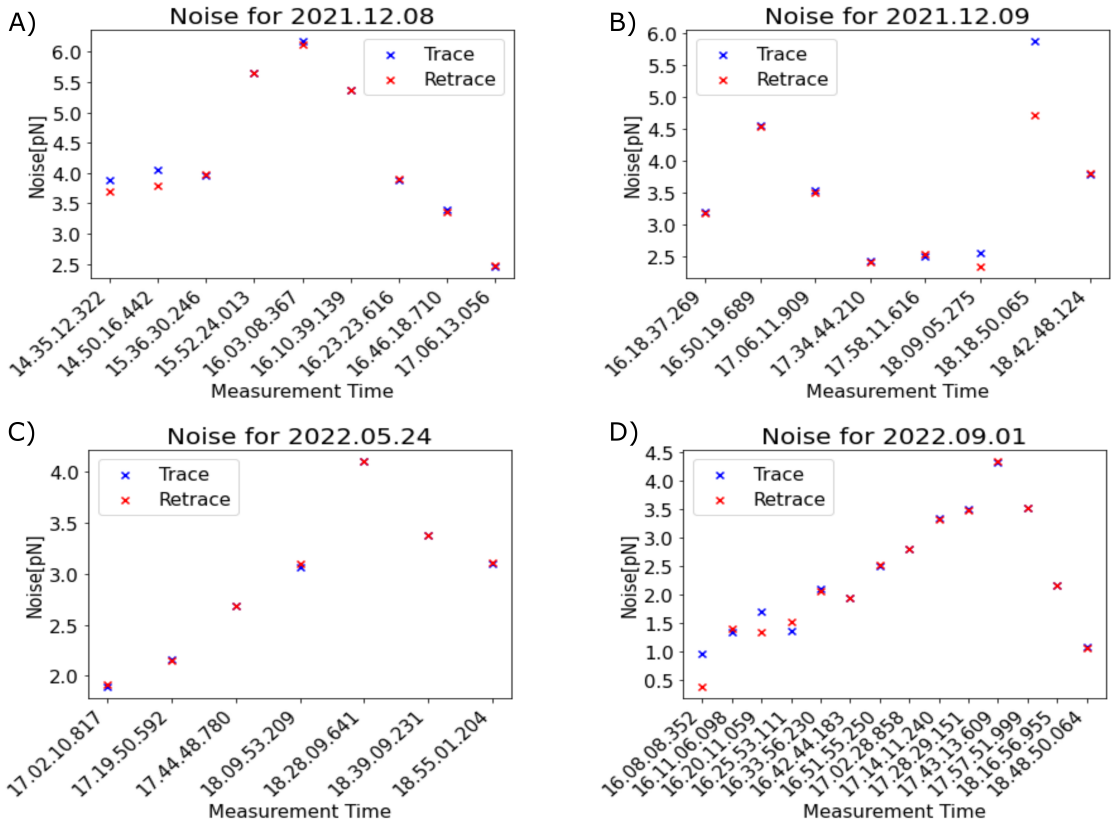


Abb. 97: Überblick über das Hintergrundrauschen an vier verschiedenen Messtagen. Der Messtag ist im jeweiligen Titel angegeben. Die Messuhrzeit der Messreihe ist auf der X-Achse angegeben. Das Format ist hierbei: HH.MM.SS.MSMSMSMS. (MS steht für Millisekunde) Das gemittelte Hintergrundrauschen ist für den Hinweg in Blau dargestellt und für den Rückweg in Rot.

Laterales Auslenkungssignal

Bis jetzt lag der Fokus der Datenanalyse auf der Untersuchung der vertikalen Auslenkung des Cantilevers. Die Auslenkung des Cantilevers in die laterale Richtung wurde bis jetzt vernachlässigt. Die Auswertung des Signals in laterale Richtung ist komplex, da die standardmäßige Kalibrierung des Cantilevers lediglich auf die vertikale Auslenkung spezialisiert ist. Das laterale Signal erweist sich oft als instabiler, weswegen eine Abrisssuche mit dem Auswertungsprogramm schwieriger ist. Das Signal wird deshalb im Folgenden in Volt dargestellt. Es sind nun vier verschiedene Beispielkurven abgebildet, bei denen das vertikale Signal mit dem lateralen Signal verglichen wird. Alle vier Aufnahmen stammen von der gleichen Messreihe, aber von unterschiedlichen Messlinien.

Abbildungsteil 98A) zeigt das vertikale Signal auf dem Hinweg. Zu sehen ist zu Beginn des Messweges ein Abrissmoment mit hoher Abrisskraft, der sich in zwei verschiedene Ausschläge aufspaltet. Die Abrisskraft beträgt $200pN$. Der Ausschlag

ist ebenfalls im lateralen Signal abgebildet. Dieser Ausschlag beträgt dort $15mV$ und setzt sich deutlich vom Hintergrundrauschen ab. Ebenfalls klar und deutlich zu erkennen ist die Aufspaltung in zwei verschiedene Spitzen. Der zweite Abriss am Ende der Linie im vertikalen Signal zeigt eine deutlich geringere Abrisskraft. Im lateralen Signal ist der Abrissmoment nicht zu erkennen. Dies könnte daran liegen, dass der Cantilever nicht stark genug in laterale Richtung ausgelenkt wurde und der Ausschlag im Hintergrundrauschen untergeht, oder dass es keinen Ausschlag gab.

Abbildungsteil 98B) zeigt erneut zwei Ausschläge im vertikalen Signal. Der erste weist eine Abrisskraft von $75pN$ auf. Die Abrisskraft ist somit halb so groß wie in dem ersten Abrissmoment in Abbildungsteil A). Bei dem lateralen Signal zeigt der Abrissmoment einen Ausschlag von $7mV$. Dies entspricht ungefähr der Hälfte der Amplitudenhöhe vom Ausschlag in Abbildungsteil A). Des Weiteren kann man erkennen, dass der Streckungsprozess während dem ersten Abrissmoment noch einen weiteren kurzen Ausschlag aufweist. Auch dieser zusätzliche Ausschlag ist im lateralen Signal vorhanden. Im vertikalen Signal finden sich außerdem zwei weitere Ausschläge, die sich im lateralen Signal nicht finden lassen. Sie weisen eine Abrisskraft von $40pN$ beziehungsweise $25pN$ auf und sind somit deutlich kleiner als die Abrisskraft des ersten Abrissmoments. Verfolgt man die These, dass die Amplitudengröße des Ausschlags im vertikalen Signal die Amplitudengröße im lateralen Signal vorgibt, müsste die Amplitude der Ausschläge im lateralen Signal halbiert beziehungsweise gedrittelt werden. Es ist allerdings kein Ausschlag zu erkennen. Dies könnte daran liegen, dass es entweder keinen gibt oder dass das Signal im Hintergrundrauschen untergeht.

Abbildungsteile C) und D) zeigen das Signal während dem Rückweg. In beiden Fällen ist jeweils ein Abrissmoment zu sehen. Der Abrissmoment in Abbildungsteil C) weist eine Abrisskraft von $35pN$ auf. Der Abrissmoment in Abbildungsteil D) zeigt eine Abrisskraft von $100pN$. In beiden Fällen kann man einen Ausschlag an der relativen Linienposition im lateralen Signal erkennen. Die Amplitude in C) ist fast $3mV$ hoch und in D) ungefähr $7.5mV$ hoch. Dies würde in beiden Fällen von der Ausschlagshöhe her passen. Des Weiteren ist auch die Form des Ausschlags passend. Bei Abbildungsteil C) handelt es sich um einen breiteren Peak, wohingegen der Peak in D) sehr schmal ist.

Auffällig bei den Messungen ist, dass die Ausschläge im lateralen Signal alle nach oben zeigen. Ein Schema in Abbildung 99 verdeutlicht, warum dies nicht unseren vorherigen Erwartungen entspricht. Während dem Hinweg bewegt sich der Cantilever von links nach rechts über die Oberfläche. Sobald die DNA gespannt wird, wird der Cantilever ausgelenkt, dies sowohl seitlich als auch nach unten. Auf dem Rückweg bewegt sich der Cantilever von rechts nach links. Der Cantilever lenkt sich erneut nach unten aus, was erklärt, warum die Ausschläge beim vertikalen Signal sowohl auf dem Hinweg als auch auf dem Rückweg in die gleiche Richtung verlaufen. Dies gilt jedoch nicht für das laterale Signal. Beim Rückweg lenkt sich der Cantilever auf die andere

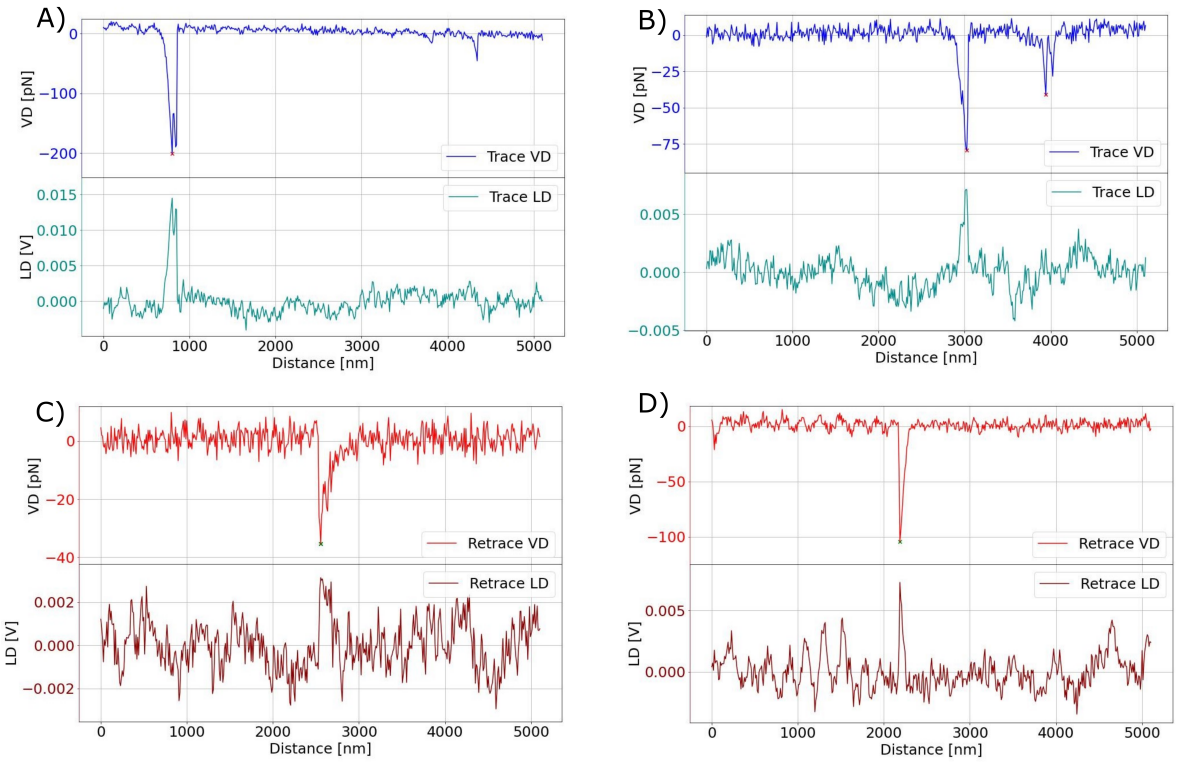


Abb. 98: Zusammenstellung von vier Beispielkurven, die in Signal der vertikalen Auslenkung und Signal der lateralen Auslenkung aufgeteilt sind. Das Signal der vertikalen Auslenkung ist in pN kalibriert und das Signal der lateralen Auslenkung in V. Es handelt sich in allen Abbildungsteilen jeweils entweder um den Hinweg oder um den Rückweg. Beim Hinweg ist das Signal in der vertikalen Auslenkung dunkelblau und bei der lateralen Auslenkung hellblau dargestellt. Beim Rückweg wird das Signal in vertikaler Richtung in Rot und in lateraler Richtung in Dunkelrot dargestellt.

Seite aus. Dies würde allerdings bedeuten, dass der Ausschlag im lateralen Signal in die andere Richtung verläuft. Dss ist beim lateralen Signal der Beispielkurven nicht der Fall. Sie verlaufen unabhängig von der Wegrichtung in die gleiche Richtung.

Oft wird angenommen, dass das laterale Signal bei triangulären Cantilevern schwächer ausgeprägt ist als bei rechteckigen Cantilevern. Dies würde erklären, warum es sehr viel öfter Ausschläge im vertikalen als im lateralen Signal gibt. Das ist jedoch nicht der Fall, wie Sader et al. ermittelten. [81] Bei gleicher Cantileversteifigkeit scheinen diese sogar verstärkt auf die laterale Auslenkung zu reagieren.

Des Weiteren wurde das Signal für den Vergleich mit dem Lateralen Signal in Volt rekalibriert, um die Ausschläge besser zu vergleichen. Die weiteren Werte beziehen sich auf die Beispielkurven in Abbildung 98. Die Abrisskraft der Ausschläge mit der höchsten Abrisskraft in Abbildungsteil A) und B) beträgt $0.4V$ und $0.2V$. In Abbildungsteil C) und D) liegen die Ausschläge bei einem Wert von $0.075V$ und

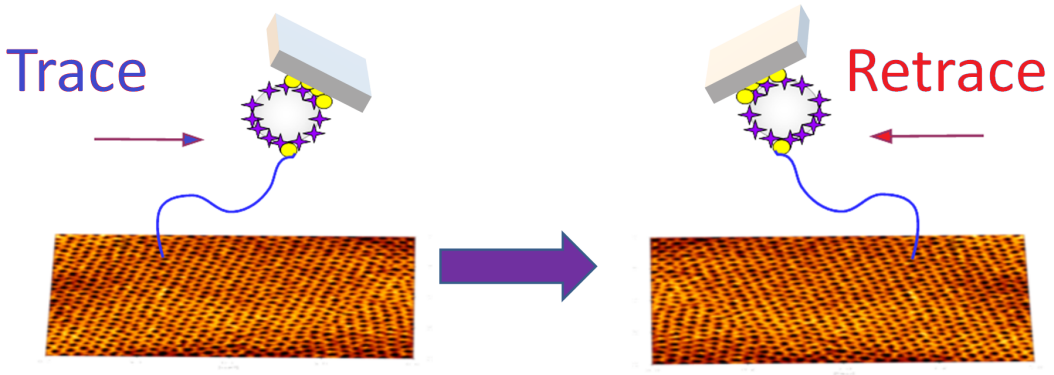


Abb. 99: Schema über den Ablauf der Reibungsmessungen. Während dem Hinweg (Trace) fährt der Cantilever von links nach rechts über die Oberfläche. Die DNA wird gespannt, wodurch der Cantilever zur Seite ausgelenkt wird. Beim Rückweg fährt der Cantilever in die andere Richtung von rechts nach links (Retrace). Der Cantilever wird dabei in die andere Richtung ausgelenkt.

$0.2V$. Die Abrisswerte im vertikalen Signal sind somit alle deutlich höher als die Abrisswerte im lateralen Signal.

Overstretching

Während den Reibungsmessungen auf poröser Membran konnten keine Kräfteplateaus als Zeichen für Overstretching festgestellt werden. Dies war auch bei den Abrissmomenten der Fall, die eine Abrisskraft von weit über $65pN$ aufwiesen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Adhäsionsmessungen auf der porösen Membran. Auch hier traten keine Kräfteplateaus auf, obwohl zum Teil Abrisskräfte von mehreren $100pN$ wirkten. Dies spricht erneut dafür, dass die Anbindung von beiden Leitersträngen der DNA dem Auftreten von Overstretching entgegenwirkt.

6.4.3 Reibungsmessungen auf Poly-L-Lysin

Die letzten Reibungsmessungen innerhalb dieser Arbeit fanden auf einer Glasoberfläche statt, die mit Poly-L-Lysin beschichtet war. Poly-L-Lysin ist dafür bekannt, dass es mit der DNA auf Grund seiner positiven Ladung reagiert. Somit handelt es sich hierbei um die gleiche Anbindungsart wie bei der porösen Membran. Auch hier wurde der DNA-Strang mehrfach auf dem Hinweg von links nach rechts und auf dem Rückweg von rechts nach links gezogen. Die Weglänge beträgt dieses Mal $10\mu m$ und somit das Doppelte der Weglänge auf Cellulosenitrat und der porösen Membran und das Vierfache der DNA-Länge. Diese Weglänge wurde verwendet, da die Oberfläche nicht komplett mit Poly-L-Lysin überzogen, sondern in Streifen unterteilt war, mit jeweils $4\mu m$ Breite. Die doppelte Weglänge sollte gewährleisten, dass die DNA über einen Bereich gezogen wird, der mit Poly-L-Lysin funktionalisiert ist. Des Weiteren startete die Cantileverhöhe bei ungefähr $250nm$, wurde allerdings im Verlauf der Messung reduziert, um gegebenenfalls mehr Abrisse zu detektieren.

Im Folgenden werden die Ergebnisse auf Poly-L-Lysin in Bezug auf Form, Position, Abrisskraft und Häufigkeit untersucht, um Unterschiede zwischen den einzelnen Oberflächen zu finden. Alle Messungen wurden bei einer Cantilevergeschwindigkeit von $1.0\mu m/s$ aufgenommen.

Beispielkurven

Zu Beginn werden in Abbildung 100 einige Beispielkurven auf Poly-L-Lysin vorgestellt. Bei den Kurven fällt zunächst auf, dass das Signal der vertikalen Auslenkung insgesamt stabiler ist als das Signal der lateralen Auslenkung. Dies traf bereits auf die Messungen auf den beiden anderen Oberflächen zu. Abbildungsteil A) zeigt eine Unregelmäßigkeit im Signal bei einer Weglänge von $4\mu m$, also der doppelten Länge der DNA. Die anderen Abrissmomente in B), C) und D) sind eher punktuelle Ausschläge mit einer Kraft von $5pN$. Des Weiteren erkennt man den Ausschlag im vertikalen Signal bei den Abbildungsteilen C) und D) ebenfalls in dem lateralen Signal. Dieser Ausschlag findet bei Abbildungsteil C) bei einer Weglänge von $6\mu m$

statt und bei Abbildungsteil D) bei einer Weglänge von $9\mu m$. Die Ausschläge gehen bei dem lateralen Signal erneut beide nach oben.

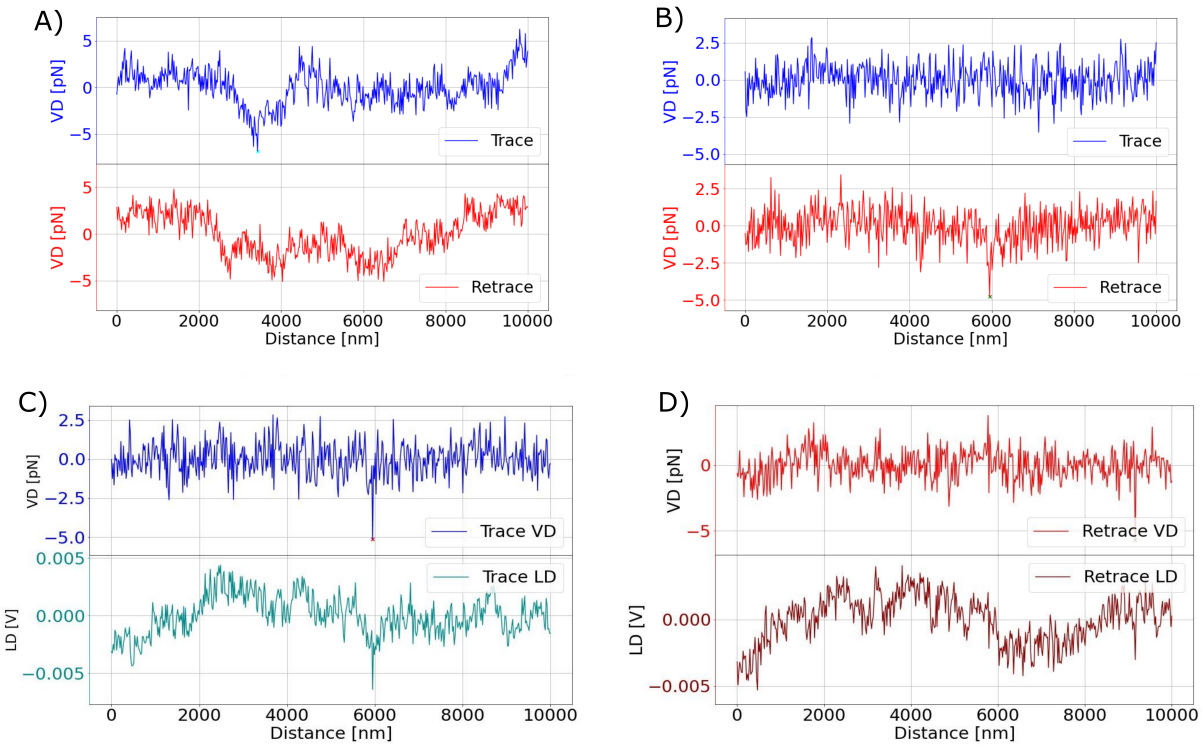


Abb. 100: Beispielkurven für die Messungen auf Poly-L-Lysin. Die Abbildungsteile A) und B) zeigen jeweils das Signal der vertikalen Auslenkung für den Hin- und Rückweg auf einer Linie. Abbildungsteile C) zeigt den Vergleich zwischen dem vertikalen und lateralen Auslenkungssignal auf dem Hinweg und D) den auf dem Rückweg. Der Abrissmoment wird in beiden Signalen detektiert.

Positionsabhängigkeit

Einer der Hauptunterschiede zwischen den Messungen auf der porösen Membran und den Messungen auf Poly-L-Lysin ist die Verbreitung der Andockmöglichkeiten. Auch wenn es während den Messungen Anzeichen dafür gab, dass die Ladung der Membran nicht komplett homogen verteilt war, gab es keine größeren Stellen, die komplett unfunktionalisiert waren. Dies führte dazu, dass es extrem schwierig war, die eigentliche Andockposition zu finden. Bei den Messungen auf Poly-L-Lysin handelt es sich hingegen um einzelne Streifen auf der Oberfläche, die mit Poly-L-Lysin beschichtet sind. Dies führt dazu, dass die DNA nur an den Stellen mit der Oberfläche interagiert, an denen die Streifen aufgedruckt sind.

Für einen besseren Überblick ist in Abbildung 101 ein Schema mit der Verteilung der Poly-L-Lysin-Streifen zu sehen. Die Streifen selbst sind zwischen 4 und $5\mu m$

dick und in Gelb markiert. Nur in diesem Gebiet sollte es der DNA möglich sein, mit der funktionalisierten Oberfläche zu interagieren. Die Stellen zwischen den einzelnen Streifen sind etwas über $10\mu m$ breit. Während den Reibungsmessungen wurde eine Strecke von $10\mu m$ abgefahren. Die Wahrscheinlichkeit ist also hoch, dass die DNA zu einem Zeitpunkt während der Messung über Poly-L-Lysin gezogen wurde. Von einer noch längeren Strecke wurde in diesem Fall abgesehen, um die Gefahr von zusätzlichem Drift zu vermeiden und die Messungen zwischen den einzelnen Oberflächen besser vergleichen zu können.

Durch das Anbringen von einzelnen Streifen sollte es bei den Messungen Regionen geben, in denen besonders viele Abrissmomente stattfinden, und Regionen, in denen es gar keine Abrissmomente gibt. Wenn der Cantilever von links nach rechts über die Oberfläche in Abbildung 101 fährt, gibt es, bis er das erste Mal über dem Streifen ist, kein Poly-L-Lysin, mit dem die DNA interagieren könnte. Solange die DNA über dem $5\mu m$ breiten Streifen ist, kann es zu Interaktionen kommen. Genauso wie ungefähr 2 bis $3\mu m$ nach Verlassen des Streifens. Das ist die Länge über die die DNA gespannt werden kann. Der Bereich, in dem Abrisse detektiert werden können, ist somit $8\mu m$ breit. Streifen mit einer geringeren Breite wären geeigneter gewesen, doch dies war auf Grund des Stempeldrucks nicht möglich.

Ein weiteres Problem war, dass die Streifen unter dem optischen Mikroskop nicht sichtbar waren. Es ist also möglich, dass die Messungen parallel zu den Streifen aufgenommen wurden oder die Streifen schräg zur Messrichtung lagen.

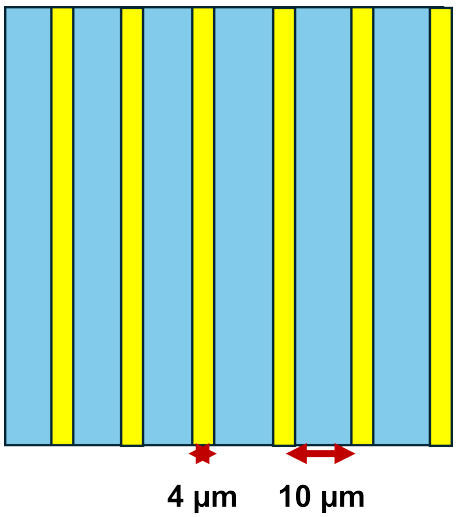


Abb. 101: Schema über die Verteilung der Poly-L-Lysin-Streifen in Gelb auf der Glasoberfläche. Die Streifen haben eine Dicke von $5\mu m$ und zwischen ihnen ist ein Abstand von etwas über $10\mu m$. Die Streifen sind unter dem optischen Mikroskop nicht detektierbar.

In Abbildung 102 sind die Abrisse in Abhängigkeit von der Position auf der Oberfläche angegeben. Abrissmomente auf dem Hinweg sind mit einem blauen Marker

gekennzeichnet, wobei der Farbton mit zunehmender Kraft intensiver wird. Abrissmomente auf dem Rückweg sind mit einem roten Marker gekennzeichnet, der ebenfalls mit steigender Kraft dunkler wird. Beide Messungen wurden an der gleichen Stelle aufgenommen. Zu sehen ist in Abbildungsteil A), dass die Abrissmomente homogen auf der Oberfläche verteilt sind. Es gibt keine größeren Bereiche ohne Abrissmomente. Des Weiteren gibt es keine Rechts-Links-Verschiebung zwischen den Abrissmomenten auf dem Hin- und Rückweg. In Abbildungsteil B) sind die Abrissmomente ebenfalls über die gesamte Messfläche hinweg verteilt. Es gibt eine leichte Häufung auf der linken Seite, die jedoch auch davon stammen könnte, dass das Signal leicht uneben war und dass dies die Auswertung verzerren kann. Die homogene Verteilung der Abrissmomente auf der Oberfläche könnte daran liegen, dass entweder parallel zu den Streifen gemessen wurde oder dass die Signale von einer Interaktion mit anderen Substanzen stammen. Dabei könnte es sich um Stempelrückstände handeln. Zum anderen wäre es möglich, dass das Glas geladen war und es deswegen zu leichten Ausschlägen gekommen ist.

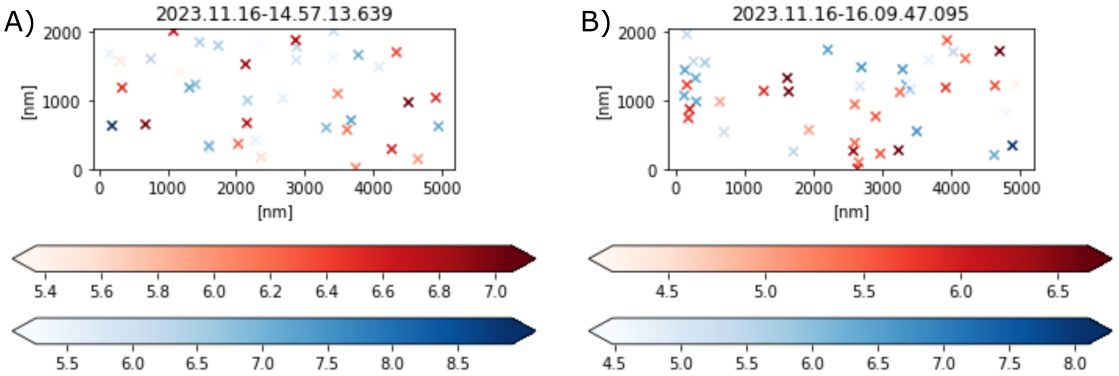


Abb. 102: Abrissverteilung auf der Messoberfläche. Jeder Abrissmoment auf dem Hinweg ist mit einem blauen Marker gezeichnet und jeder Abrissmoment auf dem Rückweg ist mit einem roten Marker gekennzeichnet.

Geschwindigkeitsabhängigkeit

Auch für die Messungen auf Poly-L-Lysin wurden die Abrisskräfte der detektierten Abrissmomente analysiert. Deren Aufschlüsselung ist in Abbildung 103 angegeben. Zu sehen ist, dass die meisten Abrissmomente eine Kraft zwischen 4 und 7pN aufweisen. Dies ist im Vergleich zu den Messungen auf der porösen Membran und denen auf Cellulosenitrat sehr gering. Es ist aber auch zu bedenken, dass lediglich vier Messungen auf insgesamt zwei Positionen durchgeführt wurden.

Die sehr geringen Abrisskräfte deuten an, dass es, sollte es zu Interaktionen zwischen DNA und Poly-L-Lysin gekommen sein, sich lediglich um sehr kurze Interaktionen mit einer schwachen Bindung handelt. Vielleicht würde die DNA mehr Zeit brauchen,

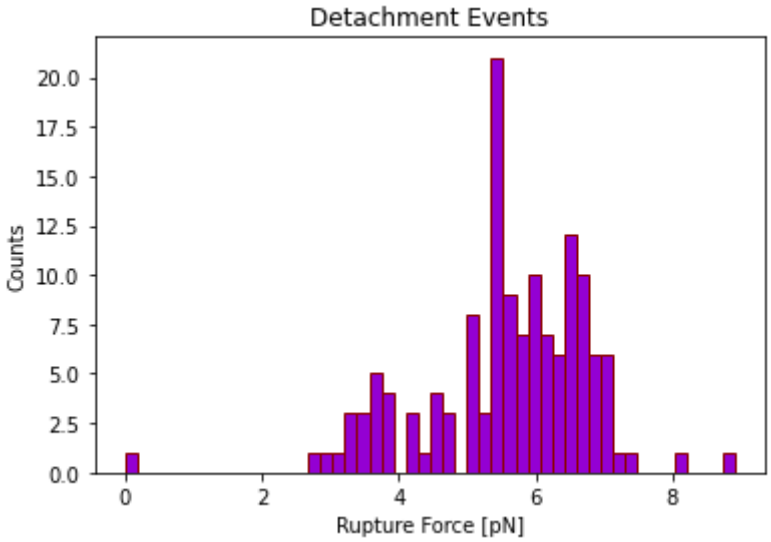


Abb. 103: Anzahl der Abrissmomente in Abhängigkeit von der gemessenen Abrisskraft. Die Abrisskräfte liegen größtenteils zwischen 4 und $7pN$ und sind somit sehr viel geringer als die gefundenen Abrisskräfte auf der Membran und der mit Cellulosenitrat beschichteten Oberfläche.

---

um eine stabile Bindung mit der DNA einzugehen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass nicht genug Poly-L-Lysin auf der Oberfläche aufgetragen war, das mit der DNA interagieren konnte.

6.4.4 Vergleich der Oberflächen

In dieser Arbeit wurden Reibungsmessungen auf drei verschiedenen Oberflächen aufgenommen. Bei den Messungen auf Cellulosenitrat gab es einzelne Abrissmomente die Anzeichen für Overstretching aufwiesen. Dies war bei den Abrissmomenten auf poröser Membran nicht der Fall, auch wenn die Abrisskräfte sehr viel höher als $65pN$ waren. Das deckt sich mit den Adhäsionsmessungen, bei denen Overstretching auch lediglich auf Cellulosenitrat stattfand. Man könnte dies dadurch erklären, dass die DNA auch bei den Reibungsmessungen mit beiden Strängen auf der porösen Membran andockt, im Gegensatz zu der Messung auf Cellulosenitrat. Die Messungen auf Poly-L-Lysin können dafür nicht hinzugezogen werden, da sie keine Abrisskräfte aufweisen, die hoch genug wären, um Overstretching aufzuweisen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Messungen ist auch, dass bei den Messungen auf Cellulosenitrat vor allem auf dem Rückweg Ausschläge im vertikalen Signal nach oben zu beobachten waren. Dies könnte, wie bereits oben beschrieben, von einer Instabilität der Probenoberfläche herrühren.

Eine weitere Parallele zwischen allen drei Messungen ist, dass das laterale Signal bei

den Ausschlägen auf dem Hin- und Rückweg immer in die gleiche Richtung zeigt. Auf Grund der Cantileverkippung seitlich zur Oberfläche müssten sie jedoch einmal nach oben und einmal nach unten zeigen.

Um die drei Oberlfächen besser zu vergleichen, müssten auf Poly-L-Lysin beziehungsweise auf dem Cellulosenitrat mehr Messungen aufgenommen werden. Des Weiteren müsste man den Analysecode für die Messungen auf Cellulosenitrat umschreiben, um die Ausschläge nach oben mit in die Analyse einzubeziehen.

7 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit war es möglich, einige interessante Dinge über das Abrissverhalten von DNA-Strängen von Oberflächen aufzuzeigen und zu analysieren. Zum einen war es uns möglich, die DNA-Stränge auf Grund der Beads und deren Bewegung unter dem Mikroskop zu entdecken und aufzusammeln. Zum anderen war es uns möglich das Ablösen der DNA-Stränge von der Oberfläche anhand der Auslenkung des Cantilevers zu detektieren. Zur Analyse wählten wir zwei verschiedene Methoden. Zum einen die Adhäsionsmessungen, bei denen sich die Abrisskraft lediglich aus der zur Oberfläche senkrecht stehenden Normalkraft zusammensetzt. Zum andern aus den Reibungsmessungen, bei denen sich die Gesamtkraft in deren lateralen und deren vertikalen Anteil aufspaltet. Des Weiteren war es uns möglich, Messungen auf verschiedenen Proben durchzuführen, mit denen die DNA aus unterschiedlichen Gründen interagierte. Dies lag zum einen an der chemischen Bindung zwischen dem mit Digoxigenin funktionalisierten DNA-Strang und der mit Anti-Digoxigenin beschichteten Oberfläche, zum anderen an der Interaktion zwischen der negativ geladenen DNA und den positiv geladenen Membranporen.

Besonders auffällig war bei den Adhäsionsmessungen das fehlende Overstretching auf der porösen Membran. Dies zeigt, dass die Anbindungsart eine signifikante Rolle beim Auftreten von Overstretching spielt. Auf der Cellulosenitratoberfläche konnte dies hingegen mehrfach festgestellt werden. Des Weiteren war es überraschend, eine so große Variation von Abrisslängen und Abrisskräften auf den Oberflächen vorzufinden. Auch interessant war die starke Ähnlichkeit der Abrissmomente zwischen den verschiedenen Ablösekurven auf der porösen Membran. Dies deutet erneut darauf hin, dass die DNA mehrmals auf die gleiche Weise mit der gleichen Stelle interagiert hat. Des Weiteren war es uns möglich, die Abrissmomente bei den Reibungsmessungen sowohl im vertikalen Signal als auch teilweise im lateralen Signal zu detektieren.

Die Messungen auf poröser Membran lassen darauf schließen, dass die Membran nicht perfekt homogen ist. Die Topographiemessungen und SEM-Aufnahmen lassen den Schluss zu, dass die Struktur der Poren homogen ist. Es könnte allerdings sein, dass die Porenwände nicht gleichmäßig methyliert sind, was die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Adhäsionsmessungen erklären würde. Dies würde außerdem die leichten Häufungen bei manchen Messungen erklären. Außerdem ließ sich ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Zugrate und der Abrisskraft finden. Genauso ein indirekter Zusammenhang zwischen der Abrissanzahl und der Cantileverhöhe beziehungsweise der Zuggeschwindigkeit.

Um das Abrissverhalten von DNA-Strängen noch besser zu verstehen, bedarf es noch vieler weiterer Experimente. So könnte man verschiedene Parameter bei Beibehaltung der bisherigen Proben verändern. Dies wäre zum Beispiel beim pH-Wert oder der Variation von gewissen Salzkonzentrationen möglich. In bisherigen Experimenten wurde bereits beobachtet, dass vor allem die Salzkonzentration einen Einfluss auf die Flexibilität der DNA hat. Bei der Variation des pH-Wertes müsste man zunächst beachten, dass die DNA bei einem zu säuerlichen oder zu basischem Wert keinen Schaden nimmt. Zudem könnte man die Charge der Membran mit einem geladenen Cantilever überprüfen oder die Größe der Poren variieren.

Einen großen Unterschied für jede weitere Messung würde es definitiv machen, wenn es möglich wäre, den Punkt zu definieren, an dem die DNA an der Oberfläche andockt. Dadurch wäre es möglich die genaue Abrisslänge zu bestimmen und auch möglich gewisse Abrisslängen zu forcieren, sofern sie nicht durch Overstretching extra verlängert werden. So ließen sich die Abrisskräfte zu den jeweiligen Abrisslängen besser untersuchen. Für diesen Fall könnte man versuchen, zum Beispiel klar definierte Linien zu ziehen, die auch unter dem Mikroskop sichtbar sind, und lediglich diese für die Reibungsmessungen zu funktionalisieren. Dadurch wäre es immer möglich die genaue Abrisslänge zu bestimmen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von anderen Proben, die auch andere mechanische Eigenschaften besitzen. So könnte man zum Beispiel Hydrogele verwenden, die sehr viel weicher und nachgiebiger sind als die Oberflächen, die wir bis jetzt verwendet haben. Durch ihre anderen mechanischen Eigenschaften würden sie die Messungen noch einmal zusätzlich beeinflussen. Man könnte diese Hydrogele zum einen ebenfalls mit Poly-L-Lysin beschichten oder sie zum anderen versuchen mit anderen Methoden positiv zu laden. Dann wäre ein Vergleich mit den Messungen auf harten Oberflächen wie zum Beispiel beschichtetem Glas möglich.

Ebenfalls möglich wäre es, die Messungen mit mehreren DNA-Strängen weiterzuführen. Man könnte mehrere DNA-Stränge miteinander verknüpfen und mit ihrer Hilfe eine Art Netz aufspannen. Wenn man nun an einem dieser DNA-Stränge zieht, würde dieser mit den anderen DNA-Strängen um ihn herum interagieren. Dies könnte das Abrissverhalten der einzelnen DNA-Stränge beeinflussen und vielleicht sogar eine Größenabhängigkeit von der Anzahl der beteiligten DNA-Stränge aufzeigen.

Abbildungsverzeichnis

1 Schema für den Versuchsaufbau der Adhäsionsmessungen auf poröser Membran und einer dazugehörigen Beispielkurve. Zur Bestimmung der Distanz zwischen Oberfläche und DNA wird der Cantilever ein erstes Mal auf die Probe gefahren und dann wieder nach oben. Danach wird er ein zweites Mal richtung Probe gefahren, wobei er dieses Mal mehrere 100 nm über der Probe anhält, sodass nur die DNA mit der Oberfläche interagiert und nicht der Bead. Nach dem Abwarten einer vorher vorgegebenen Pause fährt der Cantilever erneut nach oben und die DNA reißt von der Oberfläche ab. 6

2 Schema für den Versuchsaufbau für Reibungsmessungen. Dabei fährt der Cantilever lateral parallel in einer konstanten Höhe über die Oberfläche. Der DNA-Strang wird gespannt und reißt ab, was eine Auslenkung des Cantilevers in vertikale Richtung bedeutet. Danach fährt er die gleiche Stelle wieder zurück. Zusätzlich ist ein Beispiel für eine typische Kraftkurve abgebildet. Der Hinweg ist blau und der Rückweg rot dargestellt. In dieser sind während des Hinwegs zwei Abrissmomente und während des Rückwegs ein Abrissmoment erkennbar. [4] 7

3 Schema zur Strukturformel der DNA-Doppelhelix. Es gibt zwei komplementäre Basenpaare, die aus Adenin und Thymin beziehungsweise aus Guanin und Cytosin bestehen. Diese sind über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Das Außengerüst besteht aus Zucker beziehungsweise negativ geladenen Phosphatresten. [6] 11

4 Zu sehen ist, wie sich eine DNA-Doppelhelix um einzelne Nucleosomen wickelt und diese zusammen ein größeres Knäuel mit einem Durchmesser von um die 20-30 nm formen. Der Durchmesser von den einzelnen Nucleosomen beträgt um die 10 nm, der Durchmesser des DNA-Strangs 2 nm. [6] 12

5 Bildliche Darstellung der 5 Schritte zur Erstellung eines DNA-Origamis. a) Schema des Grundgerüstes aus den verschiedenen Doppelhelices. Die blauen Pfeile stellen die Verbindungen zwischen den einzelnen Doppehelices dar. b) Einfädelung der einzelsträngigen DNA (rot). Dadurch entstehen zwischen den einzelnen Doppelhelices noch weitere Verbindungspunkte. c) Einfügen von sogenannten Heftsträngen. Diese enthalten komplementäre Basen zu dem Einzelstrang. Zwischen den verschiedenen doppelsträngigen Segmenten bilden sich Nicks. Es sind alle Basen des Einzelstranges gebunden. d) und e) Optimierung des Konstruktes durch die Einfügung beziehungsweise die Entfernung von einzelnen Strängen. [8] 16

6 Die beiden oberen Reihen zeigen die schematische Anordnung des DNA-Origamis, die beiden unteren Reihen Topographiemessungen mittels AFM. Die dritte Reihe von oben immer ein enzelnes Konstrukt und die unterste Reihe mehrere Konstrukte. In Spalte a) und b) sind verhältnismäßig einfache Konstrukte zu sehen: Ein Quadrat und zwei Rechtecke, die über Brücken miteinander verbunden sind. Spalte c) zeigt ein Sternorigami und Spalte d) einen Smiley. Das schwierigste Konstrukt mit einer Erfolgsrate von unter 1% ist in Spalte e) zu sehen. Es handelt sich um ein Dreieck dessen Seiten aus Rechtecken bestehen. Die zweite Art, Dreiecke zu formen, ist in Spalte f) zu sehen. Hiebei bestehen die einzelnen Seiten aus Trapezen. [8] 17

7 Abbildungsteil (a) zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese. Der obere Streifen ist die Position der DNA-Stränge mit Schleife, der untere Streifen ist die Position der DNA-Stränge ohne Schleife. (b) Bindungrate, der mit Biotin und Streptavidin verbunden Schleifen. (c) Dissoziationsrate der Bindungen zwischen Biotin und Strepavidin. (d) Temperaturabhängigkeit der Messungen. Je höher die Temperatur desto schneller bilden sich Schlaufen oder lösen sich wieder auf. [9] . 17

8 Abbildungsteil A zeigt eine doppelsträngige DNA-Helix. Einer der beiden Stränge (blau) ist vollständig. Der andere Strang besteht aus zwei verschiedenen DNA-Sequenzen, die rot und grün eingefärbt sind. An der Stelle zwischen den beiden Sequenzen bildet sich eine Lücke. Die Basenpaare können sich somit auf einer Seite frei verschieben. In Abbildungsteil B werden sechs Möglichkeiten vorgestellt, wie sich zwei Basenpaare gegeneinander verschieben. Auf der linken Seite in Blau befinden sich zwei Basen, die an einem durchgängigen Strang befestigt sind. Die anderen beiden Basenpaare sind jeweils an einem anderen Leiterstrang befestigt. [12] 19

9 Schema zur kontinuierlichen Streckung einer DNA-Doppelhelix, die in einem Overstretching mündet. Die DNA-Doppelhelix wird zunächst gestreckt, wobei die einzelnen Leiterstränge gedehnt werden und die Spirale verbogen wird. Der Abstand zwischen den einzelnen Leitersprossen, also der einzelnen Basenpaare wird größer. Die Spirale wird zunehmend verformt, das Konstrukt insgesamt länger und teilweise kommt es zum Aufbrechen der einzelnen komplementären Basenpaare. 21

10 Abbildung einer Kraft-Distanzmessung, bei der eine einzelne DNA-Doppelhelix gespannt wird. Die DNA in dem Beispiel erreicht eine maximale Krafteinwirkung von um die 60 pN. Die verwendete DNA besitzt in diesem Fall zu Beginn der Messung eine Länge von 2,5 µm. Sie wird allerdings bis zu einer Länge von fast 4 µm gespannt, was für ein deutliches Overstretching spricht. Das Kräfteplateau zwischen 2,5 µm und 4 µm spricht dafür, dass die ursprüngliche DNA-Doppelhelix in diesem Intervall nicht mehr gespannt, sondern lediglich überstreckt wurde. 22

11 Verschiedene Arten der Haftung eines einzelnen Polymers auf einer fest-flüssigen Grenzfläche, während das Polymer lateral parallel zur Oberfläche gezogen wird. [24] 23

12 Abbildung a) zeigt die Kräftezerlegung vor (links) und während dem Ziehen (rechts) in die laterale Richtung. In Abbildung b) wird die Normalkraft F_z in Abhängigkeit von der Zuglänge dargestellt. Die Kraftdistanzkurve verläuft linear, was darauf schließen lässt, dass der Polymerstrang mit sehr geringer Reibung über die Oberfläche gleitet. Es handelt sich um „slip“. In Abbildung c) wird gezeigt, wie die Normalkraft in Abhängigkeit von der Zugdistanz kontinuierlich leicht absinkt und die Kraft in lateraler Richtung konstant ansteigt. Beide sinken am Schluss abrupt auf 0. Dies spricht dafür, dass der Polymerstrang zunächst auf der Obefläche haftete und dann kontinuierlich abgezogen wird. In Abbildung d) findet bis zu einer Zuglänge von ungefähr $2,6\mu m$ ein „desorption stick “ statt. Bei weiterem Ziehen ist die laterale Kraft groß genug, um die Reibungskraft zu überwinden und der DNA-Strang gleitet über die Oberfläche. Abbildung e) zeigt die Abhängkeit der Reibungskraft von der Zuggeschwindigkeit und Abbildung f) die Abhängigkeit der Reibungskraft von der Zahl der Monomere, die auf der Oberfläche haften. [24] 26

13 Eine kurze Zusammenfassung der verschiedenen Intearktionsmöglichkeiten zwischen dem einzelnen Polymerstrang und dem restlichen Netzwerk. In allen Fällen ist der einzelne Polymerstrang an einen Cantilever gebunden, der ihn aus dem Netzwerk herauszieht. In Abbildungsteil A ist ein Schema gezeigt, bei dem der Polymerstrang zwar in das Gel eingewoben, jedoch nicht verknotet ist. Der Strang gleitet somit lediglich an den Netzwerksträngen vorbei. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Kräfteplateaus. In Abbildungsteil B ist der Polymerstrang mit dem Netzwerk verknüpft, weswegen eine zusätzliche punktuelle Kraft auf ihn einwirkt, er gespannt beziehungsweise auch vom Gel abgerissen wird. 28

14 Ein einzelner Strang, der aus mehreren aneinandergereihten Graphenbändern besteht, wird an einem Cantilever befestigt über eine glatte Goldoberfläche gezogen. Dieser Prozess wird vorwärts und rückwärts wiederholt, wobei die Höhe des Cantilever Z variiert wird. [26] 30

15 In Abbildungsteil A wird der eigentliche Versuchsaufbau dargestellt. Die freie ss-DNA ist hierbei an einen Ende an der Goldspitze und am anderen Ende an der Graphitoberfläche angebunden. Bei Abbildungsteil B handelt es sich um eine aufgenommene Kraftdistanzkurve. In Rot ist der Extend dargestellt und in Blau der Retract in Abhängigkeit von der Trennungslänge (seperation). Die Trennungslänge ist hierbei der Abstand vom Cantilever zur Oberfläche. Das Peeling ist im linken Bereich zwischen 0 und $40nm$ deutlich zu sehen. [28] . . . 32

16 Abbildungsteil A stellt die Bildung einer Sekundärstruktur entlang des Teils des DNA-Strangs dar, der nicht an die Oberfläche gebunden ist. Im Gegensatz zu Abbildungsteil B, bei dem sich die Sekundärstruktur auf der Oberfläche befindet. Die Abbildungen C und D stellen eine Mischung aus verschieden willkürlichen Sekundärstrukturen dar, die für ein charakteristisches Stretchingverhalten sorgen. Die kleinen grünen Striche stellen mit Thiol funktionalisierte Polymerketten dar, die die ss-DNA an die Goldspitzen binden. [28] . 33

17 Zusammenfassung der fünf verschiedenen Messaufbauten. In Versuchsaufbau A ist der Proteinkristall nicht mit DNA funktionalisiert und der Cantilever ist nicht beschichtet. Versuchsaufbau B zeigt das genaue Gegenteil. Einen Proteinkristall, der mit DNA geladen ist, und einen Cantilever, der so beschichtet ist, dass er mit den zugehörigen Thiolgruppen der DNA-Stränge interagieren kann. In Versuchsaufbau C sind beide Seiten mit TCEP geblockt, wodurch keine Interaktion möglich ist. Im Falle von Versuchsaufbau D ist der Proteinkristall nicht mit DNA-Strängen geladen, allerdings ist der Cantilever beschichtet und nicht geblockt. Versuchsaufbau E zeigt eine Messmethode, bei der die DNA bereits an den beschichteten Cantilever gebunden und der Proteinkristall nicht mehr mit DNA geladen ist. Im Anschluss gab es noch einen letzten Versuch, in dem Kristall mit DNA geladen und der Cantilver nicht beschichtet war. Dieser Versuch wurde allerdings nicht schematisch dargestellt.[29] . 35

18 In Abbildungsteil A ist ein Polymer dargestellt, welches sich gemäß dem Worm-Like-Chainmodell verhält. Die Enden der einzelnen Kettensegmente sind durch rote Punkte dargestellt. Das Polymer ist nicht komplett gestreckt, weswegen die Konturlänge kürzer ist als der Abstand zwischen den äußeren Enden. Der Strang ist leicht gekrümmt. In Abbildungsteil B ist ein Polymer dargestellt, welches durch das Freely-Jointed-Chainmodell beschrieben wird. Die einzelnen Kettenglieder überlagern sich teilweise und die Freiheitsgrade zwischen den Gliedern sind höher. Das Polymer ist insgesamt viel flexibler als das Polymer in Abbildungsteil B. 37

19 Schema des Versuchsaufbau von Bell et al. Zu sehen ist ein einzelner Polymerstrang(rot), der an einer der beiden Oberflächen angebunden ist. Es gibt auf beiden Seiten jeweils eine Anbindungsmöglichkeit(lila). Die Anbindungsmöglichkeit auf der gleichen Oberfläche ist mit τ_{on} gekennzeichnet und die Anbindungsmöglichkeit auf der Seite gegenüber mit τ_2. 41

20 Strukturformel von Digoxigenin. Digoxigenin besteht aus mehreren aneinandergereihten Benzolringen, einem Cyclopentan, das wiederum an ein Cyclopenten mit integrierter Ethergruppe hängt. An das Cyclopenten ist ebenfalls ein eine Ketongruppe gebunden. An den Rest des Moleküls sind mehrere Hydroxygruppen beziehungsweise einzelne Wasserstoffatome gebunden. [46] 42

21 Histogramm über die Verteilung der Abrisskräfte für verschiedene Zugraten. Abbildungsteil a) zeigt die Abrissverteilung bei einer geringen Zugrate von 120 pN/s. Abbildungsteil b) und d) zeigen eine Abrissverteilung bei einer hohen Zugrate von 14950 pN/s beziehungsweise 63000 pN/s. Abbildungsteil c) kann mit einer Zugrate von 440 pN/s beiden zugeschrieben werden. Bei einer höheren Zugrate steigt die wahrscheinlichste Abrisskraft und die Kräfteverteilung verbreitert sich. [45]. 43

22 Strukturformel von Biotin. Es handelt sich um ein Dipentan. In das eine Cyclopentan ist ein Schwefelatom integriert und eine Pentylestergruppe hängt ran. An dem anderen Cyclopentan befindet sich eine Oxidgruppe und zwei Thiolgruppen. An der Schnittstelle zwischen den beiden Cyclopentanen befinden sich zwei Wassterstoffatome. [53] 45

23 Histogramme über die Abrisskräfteverteilung bei insgesamt 6 verschiedenen Zugraten zwischen 10 und 10^6 pN/s. Zu beachten ist hierbei, dass die wahrscheinlichste Abrisskraft mit zunehmender Zugrate stark anwächst. Des Weiteren flacht der Peak bei der wahrscheinlichsten Abrisskraft ab und auch die maximale und minimale Abrisskraft vervielfachen sich. [54] 45

24 Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Schritte. Die DNA wird an beiden Enden einmal mit Biotin beziehungsweise mit Digoxigenin funktionalisiert. Biotin wird in Gelb und Digoxigenin in Rot dargestellt. [55] 48

25 Schema zur Struktur der DNA. Die Enden sind jeweils mit Biotin beziehungsweise Digoxigenin funktionalisiert. Zwischen den einzelnen hinzugefügten Oligomeren bilden sich Nicks aus. Deren Position ist mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. [4] 51

26 Aufnahme eines MLCTO10-Cantilevers unter dem optischen Mikroskop. Zu sehen sind die vier unterschiedlich großen triangulären Spitzen links und die rectanguläre Spitze auf der rechten Seite. Die Probe befindet sich eingespannt in einen Glaskopf. Der bläulich schimmernde Hintergrund ist die poröse Membranoberfläche. 52

27 Strukturformel von Cellulosenitrat. Es besteht aus zwei Cyclopentanring mit einem eingeschlossenen Sauerstoffatom. Die beiden Ringe sind über ein Sauerstoffatom miteinander verbunden. An jedem Ring sind drei Stickstoffdioxidgrupppen über eine einzelnes Sauerstoffatom angebunden. [57] 55

28 Fluoreszenzmessung von aminomodifizierten Oligonukleotiden auf drei verschiedenen Oberflächen. Die Glasoberfläche ist mit Copoly(DMA-NAS-MAPS) modifiziert genau wie eine der beiden Cellulosenitratoberflächen. Die dritte Oberfläche ganz unten ist nur mit Cellulosenitrat versehen. Die Oligonukleotidkonzentration wird von links nach rechts und von oben nach unten auf den jeweiligen Probenoberflächen erhöht. Es zeigt sich, dass die Fluoreszenz mit steigender Konzentration ansteigt. Des Weiteren ist die Fluoreszenz auf den Glasoberflächen mit Cellulosenitrat höher wie auf der Glasoberfläche ohne Cellulosenitrat.[56] 55
29 Schemata für drei verschiedene Polymerarchitekturen. Oben sieht man ein Konstrukt, welches aus einem einzelnen Polymerstrang besteht, der an beiden Enden funktionalisiert ist. Darunter befindet sich ein AB-Blockcopolymer, welches aus zwei verschiedenen Polymersträngen besteht. Unten ist ein ABC-Blockcopolymer abgebildet, welches aus insgesamt drei verschiedenen Polymersträngen besteht. 57
30 Strukturformel von Poly-Lysin. Poly-Lysin besteht aus einer Heptankette an deren zweiter Stelle eine Ketongruppe sitzte, an der dritten Stelle eine Aminogruppe und an der letzten Stelle eine Sticktoffhydroxygruppe. [65] 58
31 Simulation der Formung eines Polyplexes, bestehend aus PLL(rechts) und DNA (links). Der pH-Wert liegt im neutralen Bereich bei 7.4. Die Zeitintervalle sind $5ns$, $10ns$, $20ns$ und $35ns$. Das PLL-Polymer nähert sich dem DNA-Komplex zuerst an und umschlingt ihn danach zunehmend. [61] 59
32 Schema der zu untersuchenden Probenoberfläche. Die mit Cellulosenitrat beschichtete Oberfläche wird mit Anti-Digoxigenin versehen, an dem die einzelnen DNA-Stränge andocken können. Auf der anderen Seite werden sie mit Beads mit einem Durchmesser von $1\mu m$ funktionalisiert. 60
33 Schema zur Befestigung des Glasplättchens. Auf dem Objektträger wird ein rechteckiges Stückchen Kaptonklebeband befestigt. Dieses hat in der Mitte ein Loch. Auf die andere Seite des doppelseiten Klebebands wird das Glasplättchen geklebt. 62
34 Darstellung einer einzelnen Pore, die aus verschiedenen Strängen besteht. Die Stränge selbst bestehen auf der einen Seite aus Polystyrol (grün) und Poly-(4-Vinyl-Pyridin (violett). Der P4VP-Anteil ist methyliert und somit positiv geladen. Anbei befindet sich die Strukturformel der Polymerketten. [4] 64
35 SEM-Aufnahmen einer porösen Membranoberfläche. Abbildungsteil A) zeigt die Oberfläche von oben. Die Poren sind gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Abbildungsteil B) zeigt einen Querschnitt von der porösen Membranoberfläche. Unterhalb der Oberfläche sieht man die Verästelungen der Poren, die sich zu einem Schwamm formen.[59] 65

36 Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Der Strahl wird zunächst auf den Cantilever projeziert. Das reflektierte Signal trifft auf eine Photodiode. Die Auslenkung der Cantilevers in laterale und horizontale Richtung wird durch die Auslenkung des Lasersignals auf der Photodiode signalisiert. [72]. 68

37 Beispiel für eine typische Kraftdistanzkurve bei den Kraftspektroskopiemessungen. Der Cantilever besitzt keine Spitze, sondern ist mit einem Bead und einem einzelnen DNA-Strang funktionalisiert. Die Annäherungskurve des Cantilevers ist in Blau, die Ablösekurve in Rot dargestellt. Die DNA reißt bei einem Abstand zur Oberfläche von ungefähr 2,5 µm von der Oberfläche ab. 70

38 A) Schemata für das Aufsammeln eines einzelnen DNA-Strangs auf der Cellulosenitratoberfläche. B) Aufnahme unter dem optischen Mikroskop von dem Cantilever direkt über der Obefläche. Bei den kleinen schwarzen Punkten handelt es sich um Beads.[4] 73

39 Schemata für den Verlauf der Adhäsionsmessungen. Zuerst wird eine erste Annäherung (A) durchgeführt, um die Entfernung zur Oberfläche herauszufinden. Danach wird der Cantilever zurückgezogen (B). Bei der zweiten Annäherung (C) stoppt der Cantilever einige hundert Nanometer vor der Oberfläche, sodass nur der DNA-Strang selbst, aber nicht der Bead in Kontakt mit der Oberfläche ist (D). Nach einer Pause wird der Cantilever erneut zurückgezogen und die DNA reißt ab (E). 73

40 Schema zum Aufbau der Reibungsmessung. Während dem Hinweg bewegt sich der Cantilever in einer bestimmten Höhe von links nach rechts über die Oberfläche. Beim Rückweg bewegt er sich in die andere Richtung. Von der Bewegungsrichtung hängt auch die Verkippung des Cantilevers in der lateralen Ebene ab. [4] 74

41 Schema mit den eigentlichen Größenverhältnissen während einer Beispielreibungsmessung. Der Bead befindet sich in einer Höhe von ungefähr $250nm$. Die DNA ist somit mit $2480nm$ ungefähr $10x$ länger als die eigentliche Messhöhe. Der Winkel α, der sich zwischen dem Vektor der Normalkraft und der Lateralkraft aufspannt wäre extrem klein und würde dafür sorgen, dass die Lateralkraft sehr viel größer sein müsste als die Normalkraft. 75

42 Schema für den allgemeinen Setup der Flowcell. Der mit PBS gefüllte Kanal auf der einen Seite mit der Spritzpumpe und auf der anderen Seite mit einer Pipettenspitze, die als Reservoir fungiert. Der Fluss innerhalb des Kanals und das Abrissverhalten der DNA-Stränge wird über die CCD-Kamera in der Mitte aufgezeichnet. 78

43 Schema über die Anbindung der Bead-DNA-Konstrukte mit und ohne Strömung. Abbildungsteil A) stellt die Anbindung der DNA dar, bevor die Strömung eingestellt wird. Die Beads sind inhomogen über die verschiedenen Anti-Digoxigeninstellen an der Oberfläche angebunden. Sie treiben um die Andockstelle herum wie kleine Bojen. Abbildungsteil B) zeigt den Messaufbau, sobald die Strömung eingestellt wurde. Die DNA-Moleküle werden ausgelenkt und die DNA-Stränge werden gespannt. Bei einer weiteren Erhöhung der Flussgeschwindigkeit werden die DNA-Stränge mitsamt den Beads abreißen. 78

44 Schema über den Aufbau des Kanals. Die beiden Glasplättchen sind übereinander gelegt und mit Kapton aufeinander geklebt. In dem Kapton befindet sich eine schmale Lücke mit einem Durchmesser von $1mm$ x $10mm$. An den Enden des Kanals befinden sich zwei Löcher, die als Ein- beziehungsweise Ausgang fungieren. Die verschiedenen Lösungen werden über die beiden Pipettenspitzen eingeführt. 79

45 A) C) AFM-Abbildungen der mit Poly-L-Ornithin und DNA beschichteten Glimmer-Oberfläche. Bei den hellen Schnüren handelt es sich um DNA. B) und D) sind die jeweiligen Höhenprofile der Topographiemessungen. 82

46 Abbildungsteil A) Topographiemessung auf Cellulosenitrat mit einer Fläche von $30\mu m$ x $30\mu m$. Zu sehen sind mehrere Löcher auf der Oberfläche, die nicht homogen verteilt sind. Zudem gibt es innerhalb der Oberfläche kreisförmige Anordnungen. Es sind drei Linien für Oberflächenquerschnitte angegeben. B) Abbildung der drei Oberflächenquerschnitte. Das zweite Linienprofil zeigt eine starke Erhöhung direkt in der Mitte von ungefähr $30nm$. Ansonsten ist die Oberfläche eher flach mit Höhenunterschieden von ungefähr $10nm$ 84

47 A) Aufnahmen auf der gleichen Oberfläche mit einer Fläche von $10\mu m$ x $10\mu m$. Es finden sich erneut Löcher, die relativ inhomogen auf der Oberfläche verteilt sind. In der Mitte befindet sich ein kreisförmiges Konstrukt. Abgegrenzt wird das Konstrukt durch einzelne Löcher und Erhöhungen. B) Linienprofil zu der Oberfläche in A). Die Oberfläche ist generell relativ flach mit Höhenunterschieden von maximal $20nm$. C) Eine weitere Topographieaufnahme an einer anderen Stelle mit weiteren verschieden kreisförmigen Anordnungen. Diese sind kleiner als in Abbildungsteil A). Zu sehen sind erneut inhomogen verteilte Poren. D) Das dazugehörige Linienprofil zu Abbildungsteil C). Abgesehen von einem Ausschlag in Linienprofil 3 auf der rechten Seite ist die Oberfläche sehr flach und weist lediglich Höhenunterschiede von um die $10nm$ auf. 85

48 A) Topographieaufnahme einer weiteren Stelle, diesmal mit einer Fläche von μm auf $5\mu m$. Sie zeigt eine kleinere kreisförmige Anordnung in der linken oberen Ecke und den Rand einer größeren kreisförmigen Anordnung in der rechten unteren Ecke. B). Die dazugehörigen Linienprofile. Die einzelnen Ausschläge zeigen die Breite der verschiedenen Löcher. Ihr Durchmesser sind wenige $100nm$ Im Linienprofil 3 ist die Erhöhung der kreisförmigen Anordnung auf der rechten Seite mit ungefähr $20nm$ angegeben. 87

49 SEM-Aufnahme der porösen Membran. Die Poren sind homogen auf der Oberfläche verteilt und auf der ganzen Oberfläche gleich groß. Des Weiteren sieht man keine Risse oder Unreinheiten auf der Oberfläche. Obwohl die Poren homogen auf der Membran verteilt sind, sind sie nicht linear aneinander gereiht, sondern innerhalb von verschiedenen Orientierungsdomänen. Generell sind die Poren ungefähr gleich groß, allerdings finden sich anhand der Korngrenzen verzogene und sehr kleine Poren, die zum Teil auch miteinander verbunden sind. [4] . . 89

50 A) Abbildung der Oberfläche als Topographiemessung mit den Maßen $30\mu m$ x $30\mu m$. B) Die gleiche Messung, jedoch diesmal als Phasenbild. C) Linescan der links oben gezeigten Topographiemessung. 90

51 A) Abbildung der Membran auf einer Skala von $5\mu m$ x $5\mu m$. Die Aufnahme wurde im Kontaktmodus aufgenommen. C) Der dazughörige Linescan. B) Abbildung der Membran an einer anderen Stelle. Diesmal im intermittierenden Modus mit $5\mu m$ x $5\mu m$. D) Der dazugehörige Linescan. 91

52 A) Topographiemessung auf einer Skala von $1\mu m$ x $1\mu m$. B) Der dazugehörige Linescan. Laut diesem liegt die Tiefe einer Pore bei ungefähr $2\mu m$. Generell wirkt es so, als ob die Oberfläche links etwas höher liegen würde als rechts. Die elliptische Form der Poren bleibt in diesem Fall beim Signal sowohl im Hinweg als auch im Rückweg konstant. 92

53 Schema zur besseren Verdeutlichung der Eindringtiefe des Cantilevers in die Pore. Abbildungsteil A) zeigt den Cantilever in einer Pore mit einem Durchmesser von 40 nm. Der Winkel der Spitze α beträgt 28°. Die maximale messbare Tiefe dementsprechend $37nm$. Die Spitze ist leicht abgerundet mir einer Spitzenbreite von um die $10nm$. In Abbildungsteil B) ist das durch den Cantilever abgebildete Höhenbild (lila) zu sehen. 93

54 A) und B) Topographiemessungen der Membran auf einer Skala von $250nm$ x $250nm$. C) und D) Die dazugehörigen Linescans. Zu erkennen ist, dass die Poren eine unterschiedliche Größe aufweisen. 94

55 A) Topographieaufnahme von einer Membranoberfläche, die über ein halbes Jahr ausgetrocknet war. Die Porenstruktur ist dennoch gut zu erkennen und es sind keine Salzkristalle abgebildet. B) 3D-Struktur der gleichen Membranoberfläche. Die Flächen zwischen den Poren sind nicht eben, sondern leicht erhöht. [4] 94

56 Abbildung der Poly-L-Lysin-Oberfläche. Zu sehen ist in Abbildungsteil A) eine Topographieaufnahme und in Abbildungsteil B) ein Phasenbild. Die Streifen sind unregelmäßig jedoch in beiden Aufnahmen zu erkennen. 95

57 Abbildungsteil A) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die einen einzelnen nicht konvexen Abriss zeigt. Sie zählt somit zu den Kurven „Single & eWLC “. Der Abriss zeigt einen Abrissmoment mit einer Abrisslänge von $2.8\mu m$. Abbildungsteil B) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die einen einzelnen konvexen Abriss zeigt. Sie zählt somit zu den Kurven „Single & Overstretching“. Der Abriss zeigt einen Abrissmoment mit einer Abrisslänge von etwas unter $3\mu m$. Vor dem Ablösen der DNA von der Oberfläche steigt die Kraft nicht linear an, sondern weist ein Plateau auf. Dieses Plateau deutet darauf hin, dass die DNA nicht nur gestreckt wird, sondern im Bereich des Plateaus auch überstreckt wird. Des Weiteren sieht man einen leichten Adhäsionspeak. Abbildungsteil C) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die mehrere Abrisse ohne Overstretching zeigt. Die Abrissmomente zählen somit zur Kategorie „Multiple & Overstretching“. Insgesamt kann man drei Abrissmomente feststellen. Abbildungsteil D) Beispiel für eine Kraft-Distanzkurve, die mehrere Abrissmomente zeigt, von denen einer der konvexen Sparte zugeordnet werden kann. Die ersten Abrisse zählen somit zu der Kategorie „Multiple & Overstretching“und der letzte Abriss auch zur Kategorie „Multiple & Overstretching “. 97

58 Heatmap über die verschiedenen Abrisse. Die einzelnen Abrisse werden unterteilt in Bezug auf die Abrisslänge und die Abrisskraft. Die Felder variieren in Bezug auf die Abrisslänge auf dem Cellulosenitrat zwischen $1\mu m$ und über $4\mu m$ und sind jeweils $0.5\mu m$ groß. Bezüglich der Abrisskraft variieren die Felder zwischen $0pN$ und über $250pN$, wobei die Felder jeweils $25pN$ umfassen. Die Anzahl der Abrissmomente pro Feld erstreckt sich von 0 bis 72. 99

59 Überblick über die Anzahl der Abrisse innerhalb einer aufgenommenen Kraft-Distanzkurve. 100

60 Übersicht über alle Abrissmomente in Abhängigkeit von der Abrisslänge und der Abrisskraft. Bei allen Abrissen wird unterschieden, ob sie in einer Kraft-Distanzkurve auftreten, in der mehrere oder nur ein Abriss vorherrschen, und ob innerhalb dieser Kraft-Distanzkurve Konvexe Abrisse vorhanden sind. 101

61 Übersicht über alle letzten Abrissmomente. Bei den Abrissmomenten wird erneut unterschieden, ob sie aus einer Kraft-Distanzkurve mit mehreren oder nur einem Abrissmoment stammen. Des Weiteren, ob es ein Konvexer Abriss ist oder nicht. Wenn es sich bei der Messkurve um eine Kraftkurve mit nur einem Abrissmoment handelte, wurde dieser Abriss gewählt. 102

62 Überblick über die Kraft-Distanzkurven, die mindestens einen Konvexen Abriss vorweisen. Abbildungsteil A) stellt das Verhältnis zwischen Kraftkurven dar, in denen es lediglich einen Abrissmoment gibt, der zusätzlich konvex ist, und Kraftkurven, die mehrere Abrissmomente aufweisen und bei denenmindestens einer davon konvex ist. Abbildungsteil B) zeigt, dass bei 95% der Mehrfachabrisskurven mit mindestens einem Konvexen Abriss der letzte Abriss ein Konvexer Abriss ist. 103

63 Schema über die verschiedenen Andockmöglichkeiten der DNA-Moleküle am Bead. Der Bead ist mit mehreren Strepavidinmolekülen beschichtet, sodass sich die DNA-Stränge auf unterschiedlichen Höhen befinden. Die Stränge, die sich weiter oben befinden, werden schneller gespannt als die Stränge weiter unten, weswegen es zu unterschiedlichen gemessenen Abrisslängen kommen kann. 104

64 Schema über die verschiedene Art und und Weise des Andockens der DNA an die Cellulosenitratoberfläche. Bei dem linken DNA-Molekül befindet sich das dazugehörige Anti-Digoxigenin nicht direkt unter dem Bead. Deswegen ist die Höhe des Cantilevers in diesem Fall nicht die gespannte Länge des Strangs. Es kommt somit zu zwei Längen. Der gemessenen Länge in Orange und der eigentlichen Länge in Blau. Zusätzlich kommt es zu einer Kräftezerlegung. Die Gesamtkraft ist nicht gleich der Normalkraft, sondern setzt sich aus dem lateralen und dem vertikalen Anteil zusammen. Bei dem rechten DNA-Strang befindet sich die zugehörige Andockstelle direkt unter dem Bead. Dadurch wird die DNA gerade nach oben gezogen und die eigentliche Länge der DNA entspricht der gemessenen Abrisslänge beziehungsweise der Höhe des Cantilevers. Die Gesamtkraft setzt sich nur aus der Normalkraft zusammen und es gibt keinen lateralen Anteil. 105

65 Gitter mit den verschiedenen Adhäsionsmesspunkten. Insgesamt besteht es aus 8 x 8 Messpunkten. Die erste Messung findet in der linken unteren Ecke statt. Der Cantilever rastert danach Linie für Linie von oben nach unten ab und endet in der oberen linken Ecke. Der Weg ist rot gekennzeichnet. Von besonderem Interesse ist die Position 20, also der 20 Messpunkt. Nur an dieser Stelle gab es Kraft-Distanzkurven mit Abrissen. 107

66 Verschiedene Kraft-Distanzkurven, die alle an der Position 20 aufgenommen wurden. Die Abrissmomente überlappen sich sehr stark, sind jedoch nicht identisch. Zwei der Kraft-Distanzkurven weisen Overstretching auf. Die Abrisskräfte liegen jedoch bei allen im Bereich von 30 bis $40pN$, obwohl das Overstretching in Kräftebereichen von $65pN$ liegen sollte. Die Abrisslänge variiert zwischen 2.5 und $3.5\mu m$. 108

67 Abbildung eines typischen Abrissmoments in Schwarz. Der DNA-Strang reißt bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $2.1\mu m$ und weist eine Abrisskraft von $25pN$ auf. Der dazugehörige eWLC-Fit ist in Rot eingezeichnet. Zusätzlich dazu ist ein Histogramm in der linken unteren Ecke eingefügt. Dies zeigt ein Histogramm, das die Persistenzlänge p von verschiedenen Kraftdistanzkurven dargestellt. Die meisten Kurven weisen eine Persistenzlänge von um die $10nm$ auf. Des Weiteren gibt es auch vereinzelt Persistenzlängen zwischen 20 und $30nm$. [55] 110

68 Abbildung der vier verschiedenen Kraftdistanzkurven während einer Beispielmessung. Die Messung startet mit einer ersten Annäherungskurve(hellblau). Danach wird der Cantilever hochgefahren (orange). In beiden Kurven wird der erhebliche Kräfteanstieg beziehungsweise Abfall wegen dem Kontakt mit der Oberfläche deutlich. Danach fährt der Cantilever erneut nach unten (dunkelblau), wobei er mehrere $100nm$ über der Oberfläche anhält. Der Cantilever wird erneut nach oben gefahren (rot). In beiden Ablösekurven sind Abrissmomente zu sehen. 112

69 Kraftzeitkurve der gleichen Messung wie in Abbildung 68. Diesmal ist die Kraft nicht in Abhängigkeit von der Cantileverhöhe, sondern von der Zeit dargestellt. Die Annäherungskurven sind erneut in Hellblau beziehungsweise Dunkelblau geplottet und die Ablösekurven in Orange beziehungsweise Rot. Hinzu kommt das Pausensignal, welches in diesem Fall $10s$ lang und in Gelb dargestellt ist. 114

70 Zusammenstellung von 4 repräsentativen Kraft-Distanzkurven aus Messung 1. Es ist jeweils nur die zweite Ablösekurve abgebildet. Die Abrisslänge liegt deutlich unter der Konturlänge und die Abrisskraft variiert stark zwischen 20 und $100pN$. 116

71 Darstellung von vier repräsentativen Ablösekurven aus Messung 2. Alle Kurven wurden mit einer Starthöhe von $300nm$ aufgenommen und weisen einen Abrissmoment bei ungefähr $2\mu m$ auf. 117

72 Abbildungsteil A) stellt die Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Abrisslänge für die Messung 1 dar. Abbildungsteil B) widmet sich den Abrissmomenten in Messung 2. Die Pausenzeiten variieren in beiden Fällen zwischen $0.05s$ und $10.0s$. 119

73 Darstellung von Ablösekurven der zweiten Messung. Es handelt sich bei den zweiten Ablösekurven jeweils um die Kurven aus Abbildung 71. Zu sehen ist die erste Ablösekurve in Orange und die zweite Ablösekurve in Rot. 122

74 Darstellung der gleichen Messpunkte von Abbildung 71 aus Messung 1. Dieses Mal sind Retract 1 (orange) und Retract 2 (rot) übereinander geplottet. Zu sehen ist bei allen Ablösekurven ein Abrissmoment bei einer Cantileverhöhe von $2\mu m$. 123

75 Vergleich der beiden ersten Ablösekurven in Messung 1 und Messung 2. Die Abrisskraft der Abrissmomente wird in Abhängigkeit von der Abrisslänge dargestellt. Die Cantileverhöhe erstreckt sich dabei auf bis zu $2.5\mu m$ und die maximale Kraft beträgt fast $800pN$. 124

76 Abrisslänge der Abrissmomente in Abhängigkeit vom Zeitverlauf. Dargestellt sind alle Abrissmomente der ersten Ablösekurve aus Messung 2 in Orange und alle Abrissmomente der zweiten Ablösekurve aus Messung 2 in Rot. Zu sehen sind insgesamt 4 verschiedene Messreihen, die durch die gestrichelten roten Linien voneinander getrennt sind. Es sind sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Ablösekurve bei der ersten und der zweiten Messreihe zwei Stufen zu erkennen und bei der ersten und der vierten Messreihe nur die untere der beiden Stufen. 125

77 Abbildung der Pausenzeit in Abhängigkeit vom Zeitverlauf. In Abbildungsteil A) ist der Verlauf der Cantileverauslenkung in vertikale Richtung zu sehen.(gelb) Abbildungsteil B) zeigt die gleiche Messung, diesmal handelt es sich um die Auslenkung des Cantilevers in die laterale Richtung.(grün) Die vertikale Auslenkung ist in pN angegeben und die laterale Auslenkung in V. Bei dem Pausensignal handelt es sich um ein Zeitintervall von $5.0s$. Die Aufnahme stammt aus der zweiten Messung. 126

78 Überblick über den Anteil von zweiten Ablösekurven mit einem Abrissmoment. Es wird hierbei unterschieden zwischen der ersten und der zweiten Messung. Die Messkurven mit Abrissmoment wurden in Abhängigkeit von der Pausenzeit zusammengefasst. In der Mitte der einzelnen Felder steht jeweils der Prozentsatz von Ablösekurven, die mindestens einen Abrissmoment vorwiesen. Des Weiteren sind die Felder in unterschiedlich starken Gelbtönen eingefärbt. Je dunkler der Ton, desto höher ist der Prozentsatz an Kurven, die einen Abrissmoment aufweisen. 128

79 Überblick über drei Anbindungsmöglichkeiten der DNA an die poröse Membran. In Abbildungsteil A) dockt die DNA mit dem untersten Ende des Strangs an. Dadurch wird beim späteren Abrissprozess die volle Länge des Moleküls gestreckt. B) Die DNA dockt mit einem anderen Teil des Strangs an. Dadurch kann nur noch ein kürzeres Stück der DNA gespannt werden. Der Rest des Stranges liegt auf der Oberfläche und wird ebenfalls durch die Interaktion zwischen den positiven und negativen Ladungen angebunden. C) Ähnlich wie in Abbildungsteil B) dockt die DNA relativ mittig auf der Oberfläche an, sodass nur ein kürzeres Stück gespannt werden kann. Der Rest der DNA liegt allerdings nicht auf der Oberfläche sondern treibt in der Pufferlösung. 131

80 Darstellung der Abrissmomente der zweiten Messung innerhalb der ersten Ablösekurve (orange) A) und der zweiten Ablösekurve (rot) B). Die Abrisskraft wird in Abhängigkeit von der Abrisslänge geplottet, wobei lediglich Abrissmomente mit einer Abrisslänge von über $1.6\mu m$ geplottet wurden. Beide Kurven werden anhand des eWLC-Modells gefittet. Einmal wird dabei die Konturlänge die erwartete Konturlänge verwendet und einmal die durch den Fit berechnete. 133

81 Kurze Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Adhäsionsmessungen, die mit Hilfe der Flowcell zurchgeführt wurden. Abbildungsteil A) zeigt den typischen Verlauf der Kraft-Distanzkurven. Zusehen ist dieser Ablauf in Form einer Art Heatmap. Die Häufigkeit von Kräften bei der angegebenen Länge wird alsFarbe dargestellt. Je häufiger eine Kraft bei einer gewissen Länge auftritt desto mehr liegt sie im rötlichem Anteil des Spektrums. Bereiche mit einer sehr niedrigen Häufigkeit liegen im blauen Bereich. Deutlich zu erkennen ist die Bildung eines Längenplateaus bei $2.5\mu m$. B) Aufschlüsselung der gemessenen Persistenzlänge der DNA. Die meisten DNA-Stränge weisen eine Persistenzlänge von $10nm$ auf. Einige wenige auch eine Persistenzlänge von bis zu knapp $30nm$. Anzahl der DNA-Stränge mit der jeweiligen Persistenzlänge bildet eine Gaußkurve. [55] 136

82 Abbildung des Cantileverhöhenverlaufs bei einer Reibungsmessung auf Cellulosenitrat. Auf der X-Achse ist der Zeitverlauf abgebildet und auf der Y-Achse die Cantileverhöhe. Aufgeteilt wird die Messreihe in 5 verschiedene Einzelmessungen bei unterschiedlichen Höhen. . . 138

83 Beispielkurven für die Messung bei einer Cantilverhöhe von $200nm$. Zu sehen ist in beiden Fällen das Signal der normalen Auslenkung, einmal für den Hinweg in Blau und für den Rückweg in Rot. Die Ausschläge im Signal zeigen nach oben und weisen eine rundliche Form auf. 139

84 A) Beispielkurven, die jeweils das Laterale Signal in Hellblau (LD) und das Verikale Signal in Dunkelblau (VD) für den Hinweg zeigen. B) Das Laterale Signal wird in Dunkelrot und das vertikale Signal in Hellrot für den Rückweg dargestellt. 140

85 Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $400nm$. Zu sehen sind in A), B) und C) sowohl Ausschläge nach oben, als auch nach unten. Lediglich in Abbildungsteil D) sind nur Ausschläge nach unten zu sehen. Die Ausschläge nach oben könnten Anzeichen für Topographie sein. Die Ausschläge nach unten ein Anzeichen für die Interaktion zwischen DNA und Oberfläche. 141

86 Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $400nm$. Verglichen werden jeweils das Signal der vertikalen und der lateralen Auslenkung miteinander. Das Signal in C) und D) wird zwischen der Auslenkung im vertikalen und im lateralen Teil perfekt gespiegelt. Bei dem Signal in A) und B) spiegeln sich lediglich die größeren Ausschläge. 142

87 Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $900nm$. Das Signal verläuft sowohl auf dem Hinweg, als auch auf dem Rückweg stabiler. Auf beiden Wegen gibt es Ausschläge, jedoch verlaufen die Ausschläge auf dem Hinweg bei den meisten Kurven nach unten und auf dem Rückweg nach oben. 144

88 Beispielkurven für eine Messung bei einer Cantileverhöhe von ungefähr $900nm$. Ein Vergleich zeigt, dass die Abrissmomente teilweise in der lateralen Auslenkung gespiegelt werden, jedoch nicht komplett. Insgesamt verlaufen beide Signale deutlich stabiler, als bei den vorherigen Höheneinstellungen. 144

89 Zusammenstellung von vier verschiedenen Beispielkurven für den Hinweg und Rückweg innerhalb von einer Linie. [4] 147

90 Zwei Beispiele für Abrissmomentverteilung in Abhängig von der Position innerhalb der Linie. Dargestellt sind ist die Anzahl der Abrisse in Abhängigkeit von der Position auf dem Hinweg in Blau beziehungsweise auf dem Rückweg in Rot. Insgesamt gibt es pro Linie 512 Messpunkte. Eine Messlinie erstreckt sich über $5\mu m$. 149

91 Histogramme für die Verteilung der Abrisse für alle Messtag in einem. Abbildungsteil A) zeigt dabei den Hinweg und B) den Rückweg . . . 150

92 Überblick über die Abrissverteilung auf der Oberfläche. Dargestellt ist jeweils eine Einzelmessung vom 16.07.2021 in A) und eine Einzelmessung vom 23.09.2021 in B). Die Kreuze markieren den Punkt auf der Oberfläche, an dem ein Abriss stattgefunden hat. Abrissmomente in Blau stammen vom Hinweg und Abrissmomente in Rot vom Rückweg. Je dunkler der Farbton, desto höher ist die Abrisskraft. In Abbildungsteil A) sind die Abrissmomente vor allem konzentriert auf den mittleren Bereich zwischen $1500nm$ und $4000nm$. Tendenziell liegen die Abrisskräfte auf dem Hinweg eher im rechten Teil und auf dem Rückweg im linken Abschnitt der Aufnahme. Bei Abbildungsteil B) liegen die Abrissmoment tendenziell eher im linken Bereich, sind allerdings eher homogen verteilt. [4] 152

93 Abbildung der Abrisskraft in Abhängigkeit von der Zugrate. Zu erkennen ist, dass die Abrisskräfte mit einer größer werdenden Zugrate ansteigen. Die Abrisskräfte liegen bei Messungen mit geringer Zugrate im Bereich von unter $10pN$ und wachsen schließlich auf über $30pN$ an. 153

94 Dichte der Abrissmomente pro Linie in Abhängigkeit von der Höhe des Cantilevers. Die Höhe wurde bei zwei Membranchargen zwischen $150nm$ und $900nm$ variiert. In den meisten Fällen wurden die Messungen bei einer Höhe von $250nm$ durchgeführt. Diese Messhöhe liegt auch im Rahmen des Gyrationsradius. 157

95 Anzahl der Abrissmomente pro Linie in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit, wobei mit Linie der Hinweg und der Rückweg gemeint sind. Die meisten Linien weisen weniger als einen Abrissmoment auf. 158

96 Überblick über das Hintergrundrauschen bei den verschiedenen Messtagen. Das Hintergrundrauschen ist in pN angegeben und auf der X-Achse ist der jeweilige Messtag angegeben. Dieser ist im Format „JJJJ.MM.TT“aufgezeichnet. Pro Messtag wird das durchschnittliche Hintergrundrauschen einmal auf dem Hinweg in Blau und einmal auf dem Rückweg in Rot dargestellt. Zu erkennen ist, dass das Hintergrundrauschen in den meisten Fällen um einen Wert von $5pN$ pendelt. Eine Ausnahme bildet das Hintergrundrauschen am 2. Februar 2023. In den meisten Fällen überlappen sich das Hintergrundrauschen vom Hinweg und vom Rückweg. Die einzige Ausnahme bildet erneut das Hintergrundrauschen am 2. Februar 2023. Das Hintergrundrauschen vom Hinweg liegt bei $35pN$ und beim Rückweg bei $50pN$. 161

97 Überblick über das Hintergrundrauschen an vier verschiedenen Messtagen. Der Messtag ist im jeweiligen Titel angegeben. Die Messuhrzeit der Messreihe ist auf der X-Achse angegeben. Das Format ist hierbei: HH.MM.SS.MSMSMSMS. (MS steht für Millisekunde) Das gemittelte Hintergrundrauschen ist für den Hinweg in Blau dargestellt und für den Rückweg in Rot. 163

98 Zusammenstellung von vier Beispielkurven, die in Signal der vertikalen Auslenkung und Signal der lateralen Auslenkung aufgeteilt sind. Das Signal der vertikalen Auslenkung ist in pN kalibriert und das Signal der lateralen Auslenkung in V. Es handelt sich in allen Abbildungsteilen jeweils entweder um den Hinweg oder um den Rückweg. Beim Hinweg ist das Signal in der vertikalen Auslenkung dunkelblau und bei der lateralen Auslenkung hellblau dargestellt. Beim Rückweg wird das Signal in vertikaler Richtung in Rot und in lateraler Richtung in Dunkelrot dargestellt. 165
99 Schema über den Ablauf der Reibungsmessungen. Während dem Hinweg (Trace) fährt der Cantilever von links nach rechts über die Oberfläche. Die DNA wird gespannt, wodurch der Cantilever zur Seite ausgelenkt wird. Beim Rückweg fährt der Cantilever in die andere Richtung von rechts nach links (Retrace). Der Cantilever wird dabei in die andere Richtung ausgelenkt. 166
100 Beispielkurven für die Messungen auf Poly-L-Lysin. Die Abbildungsteile A) und B) zeigen jeweils das Signal der vertikalen Auslenkung für den Hin- und Rückweg auf einer Linie. Abbildungsteile C) zeigt den Vergleich zwischen dem vertikalen und lateralen Auslenkungssignal auf dem Hinweg und D) den auf dem Rückweg. Der Abrissmoment wird in beiden Signalen detektiert. 168
101 Schema über die Verteilung der Poly-L-Lysin-Streifen in Gelb auf der Glasoberfläche. Die Streifen haben eine Dicke von $5\mu m$ und zwischen ihnen ist ein Abstand von etwas über $10\mu m$. Die Streifen sind unter dem optischen Mikroskop nicht detektierbar. 169
102 Abrissverteilung auf der Messoberfläche. Jeder Abrissmoment auf dem Hinweg ist mit einem blauen Marker gezeichnet und jeder Abrissmoment auf dem Rückweg ist mit einem roten Marker gekennzeichnet. 170
103 Anzahl der Abrissmomente in Abhängigkeit von der gemessenen Abrisskraft. Die Abrisskräfte liegen größtenteils zwischen 4 und $7pN$ und sind somit sehr viel geringer als die gefundenen Abrisskräfte auf der Membran und der mit Cellulosenitrat beschichteten Oberfläche. 171

Literaturverzeichnis

[1] Frederico Formenti. A review on the physics of ice surface friction and the development of ice skating. *Research in Sports Medicine*, 22:276–293, 2014. doi: 10.1080/15438627.2014.915833.

[2] E. C. Munksgaard, J. Nolte, and K. Kristensen. Adherence of chewing gum to dental restorative materials . *American Journal of dentistry*, 8:137–139, 1995.

[3] Claus Jeppesen, Joyce Y. Wong, Tonya L. Kuhl, Jacob N. Israelachvili, Nasreen Mullah, Samuel Zalipsky, and Carlos M. Marques. Impact of Polymer Tether Length on Multiple Ligand-Receptor Bond Formation. *Science*, 293:465–468, 2001. doi: 10.1126/science.293.5529.465.

[4] Kordula Schellnhuber, Johanna Blass, Hanna Hübner, Markus Gallei, and Roland Bennewitz. Single-polymer friction force microscopy of dsdna interacting with a nanoporous membrane. *Langmuir*, 40:968–974, 2024. doi: 10.1021/acs.langmuir.3c03190.

[5] Melanie Königshoff and Timo Brandenburger. *Kurzlehrbuch Biochemie*. Thieme, Leipzig, 2012.

[6] Georg Löffler. *Basiswissen Biochemie*. Springer Medizinverlag,Heidelberg, 2008.

[7] Wilfried Janning and Elisabeth Knust. *Genetik*. Thieme, Stuttgart, 2008.

[8] Paul W. K. Rothemund. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *nature*, 440(16):297–302, 2006. doi: 10.1038/nature04586.

[9] Mounir A. Koussa, Ken Halvorsen, Andrew Ward, and Wesley P. Wong. DNA nanoswitches: a quantitative platform for gel-biased biomolecular interaction analysis. *Nature methods*, 12(2):123–126, 2015. doi: 10.1038/nmeth.3209.

[10] Patrick Furrer, Jan Bednar, Alicja Z. Stasiak, Vsevolod Katritch, Didier Michoud, Andrzej Stasiak, and Jacques Dubochet. Opposite Effect of Counterions on the Persistence Length of Nicked and Non-nicked DNA. *Journal of Molecular Biology*, 266:711–721, 1997. doi: 10.1006/jmbi.1996.0825.

[11] John B. Hays and Bruno H. Zimm. Flexibility and Stiffness in nicked DNA. *Journal of Molecular Biology*, 48:297–317, 1970. doi: 10.1016/0022-2836(70)90162-2.

[12] Jae Young Lee, Young-Joo Kim, Chanseok Lee, Christiane Müstermann Hiromasa Yagyu, Oasamu Tabata, and Do-Nyun Kim. Investigating the sequence-dependent mechanical properties of DNA nicks for applications in twisted DNA nanostructure design. *Nucleic Acids Research*, 47(1):93–102, 2018. doi: 10.1093/nar/gky1189.

[13] Nancy Maizels and Luther Davis. Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Research*, 46(14):6962–6973, 2018. doi: 10.1093/nar/gky588.

[14] Michael R. Sawaya, Rajendra Prasad, Samuel H. Wilson, Joseph Kraut, and Huguette Pelletier. Crystal Structures of Human DNA Polymerase beta Complexed with Gapped and Nicked DNA: Evidence for an Induced Fit Mechanism. *Biochemistry*, 36:11205–11215, 1997. doi: 10.1021/bi9703812.

[15] L.Bongini, V. Lombardi, and P. Bianco. The transition mechanism of DNA overstretching: a microscopic view using molecular dynamics. *The Royal Society Publishing*, 11(97), 2014. doi: 10.1098/rsif.2014.0399.

[16] Joost van Mameren, Peter Gross, Geraldine Farge, Pleuni Hooijman, Mauro Modesti, Maria Falkenberg, Gijs J. L. Wuite, and Erwin J. G. Peterman. Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43):18231–18236, 2009. doi: 10.1073pnas.0904322106.

[17] Yongli Zhang and Donald M. Crothers. High-throughput approach for detection of DNA bending and flexibility based on cyclization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:3161–3166, 2003. doi: 10.1073pnas.0530189100.

[18] Julia Morfill, Ferdinand Kühner, Kerstin Blank, Robert A. Lugmaier, Julia Sedlmair, and Hermann E. Gaub. B-S Transition in Short Oligonucleotides. *Biophysical Journal*, 93(7):2400–2409, 2007. doi: 10.1529/biophysj.107.106112.

[19] Davide Demurtas, Arnaud Amzallag, Eric J. Rawdon, John H. Maddocks, Jacques Dubochet, and Andrzej Stasiak. Bending modes of DNA directly addressed by cryo-electron microscopy of DNA minicircles. *Nucleic Acids Research*, 37:2882–2893, 2019. doi: 10.1093/nar/gkp137.

[20] Vivek S. Jadhav, Dorothea Brüggemann, Florian Wruck, and Martin Hegner. Single-molecule mechanics of protein-labelled DNA handlers. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7:138–148, 2016. doi: 10.3762/bjnano.7.16.

[21] Thomas E. Ouldridge, Petr Sulc, Flavio Romano, Jonathan P. K. Doye, and Ard A. Louis. DNA hybridization kinetics: zippering, internal displacement and sequence dependence. *Nucleic Acids Research*, 41(19):8886–8895, 2013. doi: 10.1093/nar/gkt687.

[22] Matthias Rief, Hauke Clausen-Schaumann, and Hermann E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nature*, 6(4):346–349, 1999. doi: 10.1038/7582.

[23] Yandong Yin and Xin Sheng Zhao. Kinetcis and Dynamics of DNA Hybridization. *Accounts of chemical research*, 44(11):1172–1181, 2011. doi: 10.1021/ar200068j.

[24] Bizan N. Balzer, Markus Gallei, Moritz V. Hauf, Markus Stalhofer, Lorenz Wiegleb, Alexander Holleitner, Matthias Rehahn, and Thorsten Hugel. Nanoscale Friction Mechanisms at Solid-Liquid Interfaces. *Angewandte Chemie International Edition*, 52:6541–6544, 2013. doi: 10.1002/anie.201301255.

[25] Takaharu Okajima, Xiang-Ming Tao, Hiroaki Azehara, and Hiroshi Tokumoto. Force Spectroscopy on Single Polymer Incorporated into Polymer Gels. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7:790–795, 2007. doi: 10.1166/jnn.2007.525.

[26] Shigeki Kawai, Andrea Benassi, Enrico Gnecco, Hajo Söde, Remy Pawlak, Xinliang Feng, Klaus Müllen, Daniele Passerone, Carlo A. Pgnedoli, Pascal Ruffieux, Roman Fasel, and Ernst Meyer. Superlubricity of graphene nanoribbons on gold surfaces. *Science*, 351(6276):957–961, 2016. doi: 10.1126/science.aad9041.

[27] Franz J. Giessibl, S. Hembacher, H. Bielefeldt, and J. Mannhart. Subatomic Features on the Silicon (111)-(7x7) Surface Observed by Atomic Force Microscopy. *Science*, 289:422–425, 2000. doi: 10.1126/science.289.5478.422.

[28] Sara Iliafar, Kyle Wagner, Suresh Manohar, Anand Jagota, and Dmitri Vezenov. Quantifying Interactions between DNA Oligomers and Graphite Surface Using Single Molecule Force Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry*, 116: 13896–13903, 2012. doi: 10.1021/jp212326x.

[29] Dafu Wang, Julius D. Stuart, Alec A. Jones, Christopher D. Snow, and Matt J. Kipper. Measuring interactions of DNA with nanoporous protein crystals by atomic force microscopy. *Nanoscale*, 13:10871–10881, 2021. doi: 10.1039/d1nr01703a.

[30] M.Hegner and W.Grange. Mechanics and imaging of single DNA molecules. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23:367–375, 2002. doi: 10.1023/A:1023446103620.

[31] John F. Marko and Eric D. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28(26): 8759–8770, 1995. doi: 10.1021/ma00130a008.

[32] Joan Camunas-Soler, Marco Ribezzi-Crivellari, and Felix Ritort. Elastic Properties of Nucleic Acids by Single-Molecule Force Spectroscopy. *Annual Reviews*, 45(65):65–84, 2016. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-011158.

[33] J. E. Mark. *Physical Properties of Polymers Handbook*. Springer Science, New York, 2007.

[34] Sebastian Koltzenburg, Michael Maskos, and Oskar Nuyken. *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.

[35] Theo Odijk. Stiff chains and filaments under tension. *Macromolecules*, 28: 7016–7018, 1995. doi: 10.1021/ma00124a044.

[36] Douglas R. Tree, Abhiram Muralidhar, Patrick S. Doyle, and Kevin D. Dorfmann. Is DNA a Good Model Polymer. *Macromolecules*, 46:8369–8382, 2013. doi: 10.1021/ma401507f.

[37] Divakaran Murugesapillai, Serge Bouaziz, L. James Maher, Nathan e. Israeloff, Craig E. Cameron, and Mark C. Williams. Accurate nanoscale flexibility measurement of DNA and DNA-protein complexes by atomic force microscopy in liquid. *Nanoscale*, 9(31):11327–11337, 2017. doi: 10.1039/c7nr04231k.

[38] Yeonee Seol, Jinyu Li, Philip C. Nelson, Thomas T. Perkins, and M.D. Betterton. Elasticity of Short DNA Molecules: Theory and Experiment for Contour Lengths of 0.6-7µm. *Biophysical Journal*, 93:4360–4373, 2007. doi: 10.1529/biophysj.107.112995.

[39] Annael Brunet, Catherine Tardin, Laurence Salome, Philippe Rousseau, Nicolas Destainville, and Manoel Manghi. Dependence of DNA Persistence Length on Ionic Strength of Solutions with Monovalent and Divalent Salts: A Joint Theory-Experiment Study. *American Chemical Society*, 48(11):3641–3652, 2015. doi: 10.1021/acs.macromol.5b00735.

[40] Hui-Min Chuang, Jeffrey G. Reifenberger, Han Cao, and Kevin D. Dorfmann. Sequence-Dependent Persistence Length of Long DNA . *American Physical Society*, 119(5):227802, 2017. doi: 10.1103/PhysRevLett.119.227802.

[41] Samuel Bell and Eugene M. Terentjev. Kinetics of Tethered Ligands Bending to a Surface Receptor. *Macromolecules*, 50:8810–8815, 2017. doi: 10.1021/acs.macromol.7b01742.

[42] Jean-François Allemand, David Bensimon, and Vincent Croquette. Stretching DNA and RNA to probe their interactions with proteins . *Elsevier*, 13:266–274, 2003. doi: 10.1016/S0959-440X(03)00067-8.

[43] Mark C. Williams and Ioulia Rouzina. Force spectroscopy of single DNA and RNA molecules. *Elsevier*, 12:330–336, 2002. doi: 10.1016/s0959-440x(02)00340-8.

[44] Zev Bryant, Michael D Stone, Jeff Gore, Steven B Smith, Nicholas R Cozzarelli, and Carlos Bustamante. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature*, 424:338–341, 2003. doi: 10.1038/nature01810.

[45] G. Neuert, C. Albrecht, E. Pamir, and H. E. Gaub. Dynamic force spectroscopy of the digoxigenin-antibody complex. *Soft Matter*, 580(2):505–509, 2006. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.052.

[46] National Library of Medicine. Digoxigenin. `https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Digoxigenin`, . [Online; letzter Zugriff 04.07.2024].

[47] Felix Rico, Andreas Russek, Laura González, Helmut Grubmüller, and Simon Scheuring. Heterogeneous and rate-dependent streptavidin-biotin unbinding revealed by high-speed force spectroscopy. *PNAS*, 116(14):6594–6601, 2019. doi: 10.1073/pnas.1816909116.

[48] L. Deng, E. N. Kitova, and J. S. Classen. Dissociation Kinetics of the Streptavidin-Biotin Interaction Measured Using Direct Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis. *Journal of The Amercian Society for Mass Spectrometry*, 1(24):49–56, 2013. doi: 10.1007/s13361-012-0533-5.

[49] Steffen M. Sedlak, Magnus S. Bauer, Carleen Kluger, Leonard C. Schendel, Lukas F. Milles, Diana A. Pippig, and Hermann E. Gaub. Monodisperse measurement of the biotin-streptavidin interaction strength in a well-defined pulling geometry. *PLOS ONE*, 12, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0188722.

[50] Jürgen Falbe and Manfred Regitz. *Römpp Chemie Lexikon Band 5*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1991.

[51] Jürgen Falbe and Manfred Regitz. *Römpp Chemie Lexikon Band 1*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1989.

[52] Uwe Gröber. Biotin. *Zeitschrift für Orthomolekulare Medizin*, 7:25–26, 2009. doi: 10.1055/s-0029-1185296.

[53] National Library of Medicine. Biotin. `https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin`, . [Online; letzter Zugriff 04.07.2024].

[54] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, and K. Ritchie E. Evans. Energy landscape of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *nature*, 397 (6714):50–53, 1999. doi: 10.1038/16219.

[55] Michael Penth. *Parallele Kraftspektroskopie an hunderten von einzelnen DNA-Molekülen in einer Flusszelle*. PhD thesis, Universität des Saarlandes, 2019.

[56] Marina Cretich, Valentina Sedini, Francesco Damin, Maria Pelliccia, Laura Sola, and Marcella Chiari. Coating of nitrocellulose for colorimetric DNA microarrays. *Analytical Biochemistry Elsevier*, 397(1):84–88, 2009. doi: 10.1016/j.ab.2009.09.050.

[57] Abdul Latif Ahmad, Siew Chun Low, Syamsul Rizal Abd Shukor, Asma Isamail, and Sunarti Abd Rahman. Development of lateral flow membranes for immunoassay separation. *Desalination and Water Treatment - DESALIN WATER TREAT*, 5:99–105, 2009. doi: 10.5004/dwt.2009.585.

[58] Daniel Leibig, Jan Morsbach, Eduard Grune, Jana Herzberger, Axel H. E. Müller, and Holger Frey. Die lebende anionische Polymerisation. *Chemie in unserer Zeit*, 51:254–263, 2017. doi: 10.1002/ciuz.201700774.

[59] Markus Gallei, Sofia Rangou, Volkan Filiz, Kristian Buhr, Sabrina Bolmer, Clarissa Abetz, and Volker Abetz. The Influence of Magnesium Acetate on the Structure Formation of Polystyrene-block-poly(4-vinylpyridine)-Based Integral-Asymmetric Membranes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 214: 1037–1046, 2013. doi: 10.1002/macp.201200708.

[60] Hye Jin Lee, Alastair W. Wark, and Robert M. Corn. Utilizing ultrathin DNA/poly-lysine multilayer films to create liquid/liguid interfaces: spectroscopic characterization, interfacial reactions and nanoparticle adsorption. *Journal of Physics Condensed Matter*, 19:375107, 2007. doi: 10.1088/0953-8984/19/37/375107.

[61] Tudor Vasiliu, Corneliu Cojocaru, Alexandra Rtaru, Gabriela Pricope, Mariana Pinteala, and Lilia Clima. Optimization of Polyplex Formation between DNA Oligonucleotide and Poly(L-Lysine): Experimental Study and Modeling Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, page 1291, 2017. doi: 10.3390/ijms18061291.

[62] Robert M. Elder, Todd Emrick, and Arthi Jayaraman. Understanding the Effect of Polylysine Architecture on DNA Binding Using Molecular Dynamics Simulations. *American Chemical Society BioMacromolecules*, 12:3870–3879, 2011. doi: 10.1021/bm201113y.

[63] Karl-Heinz Hellwich. *Stereochemie Grundbegriffe*. Springer Berlin, Heidelberg, 2002.

[64] Jürgen Falbe and Manfred Regitz. *Römpp Chemie Lexikon Band 3*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1990.

[65] National Library of Medicine. Poly-L-Lysin. `https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5962`, . [Online; letzter Zugriff 04.07.2024].

[66] Ernst Wagner, Matt Cotten, and Roland FoisnerMax L. Birnstiel. Transferrin-polycation-DNA complexes: The effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Annual Review of Biophysics*, 88(10): 4255–4259, 1991. doi: 10.1073/pnas.88.10.4255.

[67] Andrew Hards, Chunqing Zhou, Markus Seitz, Christoph Bräuchle, and Andreas Zumbusch. Simultaneous AFM Manipulation and Fluorescence Imaging of Single DNA Strands. *ChemPhysChem*, 6:534–540, 2005. doi: doi.org/10.1002/cphc.200400515.

[68] Jingnan Zhang, Remping Zhao, Bin Li, Aleeza Farrukh, Markus Hath, Bin Qu, and Aranzazu del Campo. Micropatterned soft hydrogels to study the interplay of receptors and forces in T cell activation. *Acta Biomaterials*, 119: 234–246, 2021. doi: 10.1016/j.actbio.2020.10.028.

[69] G.Binnig, C.F.Quate, and C.Gerber. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–934, 1986. doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930.

[70] Nuno C. Santos and Filomena A. Carvalho. *Atomic Force Microscopy*. Springer Verlag, New York, 2019.

[71] Ernst Meyer, Hans Josef Hug, and Roland Bennewitz. *Scanning Probe Microscopy*. Springer-Verlag Berlin,Heidelberg, 2004.

[72] Bert Voigtländer. *Scanning Probe Microscopy*. Springer-Verlag Berlin,Heidelberg, 2015.

[73] Paolo Samori. *STM and AFM Studies on (Bio)molecular Systems: Unravelling the Nanoworld*. Springer Berlin,Heidelberg, 2010.

[74] JPK. *NanoWizard AFM Handbook*. JPK Instruments AG, 2009.

[75] Jeffrey L.Hutter and John Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tip. *The Review of Scientific Instruments*, 64(7):1868–1873, 1993. doi: 10.1063/1.1143970.

[76] Yuri L. Lyubchenko, Luda S.Shlyakhtenko, Tsunehiro Aki, and Sankar Adhya. Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GaIR and HU. *Nucleic Acids Research*, 25(4):873–876, 1997. doi: 10.1093/nar/25.4.873.

[77] Michael Penth, Kordula Schellnhuber, Roland Bennewitz, and Johanna Blass. Nanomechanics of self-assembled DNA building blocks. *Nanoscale*, 13:9371–9380, 2021. doi: 10.1039/D0NR06865A.

[78] George I. Bell. Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. *SCIENCE*, 200:618–627, 1978. doi: 10.1126/science.347575.

[79] Evan Evans and Ken Ritchie. Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds. *Biophysical Journal*, 72:1541–1555, 1997. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78802-7.

[80] Torsten Strunz, Krisztina Oroszlan, Rolf Schäfer, and Hans-Joachim Güntherodt. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:11277–11282, 1999. doi: 10.1073/pnas.96.20.11277.

[81] John Elie Sader. Susceptibility of atomic force microscope cantilevers to lateral forces. *Review of Scientific Instruments*, 74:2438–2443, 2003. doi: https://doi.org/10.1063/1.1544421.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen bedanken, ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre! Zu aller erst möchte ich mich bei meinem Chef Roland Bennewitz für die gute Betreuung, die vielen Konferenzen und die interessanten Diskussionen bedanken. Ein weiterer Dank gilt Inga Melnyk, da sie mir immer mit Rat und Tat beiseitestand und ihr wirklich niemals die Energie ausgeht. Außerdem möchte ich mich bei Johanna Blass für den wissenschaftlichen Austausch bedanken. Besonderer Dank gilt Markus Gallei und Hanna Hübner für die Bereitstellung der Membran und den sehr hilfreichen Austausch von Ansichten zwischen Physik und Chemie sowie Erbara Gjana für die Mithilfe bei der DNA-Herstellung. Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen im Büro Muniba Shahzad Bhatti, Michael Klos, Susanne Selzer und Thomas Kister für gute Unterhaltung und interessanten Austausch.

Außerdem danke ich natürlich all meinen Kollegen, insbesondere meiner Arbeitsgruppe für die Mithilfe, Kuchenmeetings, schöne Zeit auf Konferenzen und all die anderen Treffen.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Eltern Gottlieb und Brigitte Schellnhuber für den sprachlichen Feinschliff und meiner langjährigen Bekannten Susanna Kirchhoff für ihre immer hilfreichen Worte. Zu guter Letzt würde ich noch gerne meinem Partner Marco Menninger dafür danken, dass er mich immer unterstützt hat. Egal wie oft ich mit den gleichen Problemen zu ihm gegangen bin.