



Biomolecular based nano-manipulation with a combined atomic force microscope and single molecule fluorescence setup

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Richard Janissen

aus Viersen

Düsseldorf, Dezember 2008

aus dem Institut für physikalische Chemie II
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Jun. Prof. Dr. F. Oesterhelt
Koreferent: Prof. Dr. C.A.M. Seidel

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

Vieles kann man sich aus der Literatur aneignen, jedoch bedarf es letztendlich mehr als das, um sich als Wissenschaftler bezeichnen zu können. Bei meiner persönlichen Entwicklung und wissenschaftlichen Entfaltung haben Menschen und Kollegen beigetragen, denen ich an dieser Stelle mein Dankeschön aussprechen möchte:

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Filipp Oesterhelt für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken, insbesondere für die wissenschaftlichen Freiheiten und Möglichkeiten während meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe *AG Nanoanalytics*. Seine Begeisterung für ungelöste Probleme, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein Ideenreichtum haben zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

Des Weiteren möchte ich dem Institutsleiter der Molekularen Physikalischen Chemie, Herrn Prof. Dr. Claus Seidel meinen besonderen Dank aussprechen, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu dürfen und seine Hilfsbereitschaft.

Besonders danken möchte ich auch meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen, welche mich stets unterstützt haben und denen ich ein reichhaltiges Wissen und Erfahrung verdanke: Dr. Matthew Antonik, Dr. Ralf Kühnemuth, Dr. Aike Stortelder, Dr. Suren Feleykan, Dr. Marcelle König, Dr. Michael Schmitz, Dr. Paul Rothwell, Alessandro Valeri, Evangelos Sisamakias und Martin Schramm.

Meinen *Nanoanalytics*-Kollegen Leoni Oberbarnscheidt, Dmytro Rodnin und Dr. Olga Franco für die hervorragende Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und erheiternde Atmosphäre. Mit keinem würde ich das Büro lieber teilen als mit Euch!

Meinen interdisziplinären Korrekturlesern Stefan Marawske, Dennis Dörr und Leoni Oberbarnscheidt. Die unterschiedlichen Sichtweisen waren mir eine äußerst große Hilfe bei der Verfassung dieser Arbeit!

Marcel Merkwitz für die Hilfe in allen Belangen der IT. Bärbel Hofmann und Veronika Mendorf für alle organisatorischen Belange und die Bewältigung der komplexen Bürokratie.

Für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre mit unvergeßlichen Momenten: Stefan Marawske, Dennis Dörr, Heike Hornen, Andreas Renner, Evangelos Sisamakias, Daniela Pfiffi, Dr. Anna Wozniak, Dr. Alexander Gaiduk, Leoni Oberbarnscheidt, Alessandro Valeri, Sebastian Overmann, Stephanie Grabowski, Dr. Paul Rothwell und Dr. Stanislav Kalinin.

Ganz besonders auch meiner Familie und all meinen Freunden, welche mich unerlässlich unterstützten und mir stets den nötigen Ausgleich zur „Nanowelt“ gegeben haben.

1 – Einleitung

Die frühesten Anfänge des Lebens auf unserem Heimatplaneten reichen nahezu 4 Milliarden Jahre zurück [Ges99, Rus88, Tic06]. Heutzutage sind etwa 1,75 Millionen Tier- und Pflanzenarten [Cam97] beschrieben, die zum Teil unter extremen Umweltbedingungen vorzufinden sind [Whi98]. Trotz der Komplexität und der Mannigfaltigkeit der Natur ist die Anzahl der zum Aufbau verwendeten Bausteine minimal. Von den über 100 bekannten chemischen Elementen stellen lediglich sechs Elemente (C, H, O, N, S, P) die atomaren Grundstoffe dar, woraus die Biomoleküle zusammengesetzt sind, und aus denen lebende Materie nach den Prinzipien der molekularen Erkennung und der Selbstorganisation modular aufgebaut ist. Aufgrund verschiedenartiger inter- und intramolekularer Wechselwirkungen zwischen den einzelnen biomolekularen Bausteinen kommt es zur Bildung komplexer Systeme wie Zellen und ganzer Organismen. Das Verständnis der Lebensvorgänge auf molekularer Ebene gewinnt in den klassischen Naturwissenschaften als Forschungsschwerpunkt zunehmend an Bedeutung. Fachübergreifende Interaktionen zwischen den einzelnen naturwissenschaftlichen Disziplinen ermöglichen die umfassende Erforschung komplexer Biomoleküle und deren Zusammenspiel.

Die wesentlichen Modellvorstellungen bezüglich des Aufbaus und der Funktion der einzelnen Biomoleküle beschreiben die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen auf atomarer Ebene. Die Kenntnisse über die chemischen Struktur und Dynamiken stammen jedoch aus Untersuchungen von Molekülensembles, welche lediglich auf die durchschnittlichen Eigenschaften der einzelnen Moleküle schließen lassen. So konnten beispielsweise Atom- und Molekülspektren hochpräzise vermessen werden, Bindungsenergien kalorimetrisch bestimmt werden und sogar die Struktur von Biomolekülen durch Strukturuntersuchungen (X-Ray, NMR) auf Angström genau aufgelöst werden. Viele Eigenschaften und Informationen über die Zustände individueller Moleküle entziehen sich jedoch derartigen Ensemblemessungen und erfordern die direkte Messung am einzelnen Molekül.

Die mechanische Stabilität von Molekülen ist ebenfalls nicht im Ensemble meßbar. Um beispielsweise Bindungs- oder Faltungskräfte von Proteinen zu bestimmen, ist es nötig, direkt an einem einzelnen Molekül "greifen" zu können. Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren die Entwicklung verschiedener Einzelmolekültechniken vorangetrieben und gewährleistet neue und detaillierte Einblicke in die Welt der molekularen Biologie und das Zusammenspiel der einzelnen Grundbausteine des Lebens.

Bis heute stellt die optische Mikroskopie eine der wichtigsten Untersuchungsmethoden in der Biologie dar. Seit ihrer Erfindung im 16. Jahrhundert wurde die Entwicklung stetig weiter vorangetrieben und perfektioniert, was bis hin zur Detektion von einzelnen Molekülen durch die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie [Wei99] am Ende des letzten Jahrhunderts führte. Der besondere Vorteil in der optischen Einzelmolekülspektroskopie lag darin, daß einzelne Moleküle in physiologischer Umgebung untersucht werden konnten und unter anderem durch Verwendung der Methode des fluoreszenzresonanten Energietransfers (FRET) [För48] auf ihre Struktur und funktionsinduzierten Konformationsänderungen rückzuschließen war. Auch wenn es durch unterschiedliche Entwicklungen bezüglich des Aufbaus und der Detektion möglich wurde, die Detailauflösung stetig zu verbessern, ist die optisch maximal erreichbare Auflösung letztendlich durch das optische Beugungslimit begrenzt.

Eine fundamental andere Technik der Mikroskopie stellt die Rastersondenmikroskopie (SPM; Scanning Probe Microscopy) dar, welche in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts durch das Rastertunnelmikroskop [Bin86] Einzug fand. Rastersondenmikroskope verwenden eine Sonde mit einem Spitzenradius im Nanometerbereich und somit im Größenbereich einzelner Moleküle. Dabei wird die Kontur der Probenoberfläche mittels dieser Sonde, welche mit der Probe in Wechselwirkung steht, in einem Rasterprozess Punkt für Punkt abgetastet. Die sich für jeden einzelnen Punkt ergebenden Meßwerte werden somit zu einem einzigartigen topographischen Bild zusammengesetzt. Verglichen mit den alternativen, heutzutage möglichen optischen Methoden, erlaubt diese Technik eine deutlich höhere Bildauflösung. Aus der Familie der Rastersondenmikroskopie ist das Rasterkraftmikroskop (AFM; Atomic Force Microscope) durch sein hohes räumliches Auflösungsvermögen in biologisch relevanter physiologischer Umgebung am weitesten in der biologischen Forschung verbreitet. Außerdem ist es durch die Verwendung des AFM möglich, Interaktions-Kräfte zwischen der Sonde und der Oberfläche im Bereich von Piconewton zu messen, wodurch sich diese Technik für eine Vielzahl von Methoden eignet. Dennoch ist diese Technik in Bezug auf

das Auffinden und Identifizieren unterschiedlicher Probenobjekte limitiert, solange sie eine unterschiedliche Größe und Form aufweisen.

Die komplementären Stärken und Schwächen des AFM und der optischen Mikroskopie führen zu dem logischen Schluß, beide Techniken miteinander zu kombinieren. Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines solchen AFFM-Meßsystems (Atomic Force Fluorescence Microscope), welches optische Einzelmolekül-Fluoreszenzmethoden (Weitfeld-, TIR- und konfokale Fluoreszenzmikroskopie) mit simultaner, hochauflösender Kraftmikroskopie und -spektroskopie ermöglicht.

Das AFFM-Meßsystem wurde mit unterschiedlichen Zielsetzungen konstruiert. In Bezug auf die nano-analytische Methodik, galt es zur erweiterten Strukturaufklärung den archaebakteriellen Retinalproteinkomplex NpSRII:HtrII mit Hilfe der kraftspektroskopischen Komponente des Meßsystems unter unterschiedlichen Licht-Bedingungen zu entfalten, um so Einsicht in die intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb des Proteinkomplexes und die Änderungen durch Lichtaktivierung nachverfolgen zu können. Des Weiteren galt es das AFFM-Meßsystem durch AFM-Imaging mit gleichzeitiger Fluoreszenzdetektion an einzelnen, fluoreszierenden Nanopartikel und Molekülen seine Leistungsfähigkeit und seine Anwendungsmöglichkeiten zu erproben.

Während die ersten Untersuchungen durch das entwickelte Meßsystem prinzipiell auf ein Verständnis der molekularen Systeme durch reine Beobachtung abzielen, sollte weiter das Anwendungsspektrum zur gezielten Nanomanipulation für den zukünftigen Aufbau funktionaler Elemente mit molekularen Dimensionen zu erweitern, welches von generellem Interesse für die Forschung im Bereich der Life Sciences ist. Eine zwingende Voraussetzung ist eine qualitative hochwertige Funktionalisierung von Festkörpern zur kovalenten Immobilisierung unterschiedlicher Biomoleküle. Die Entwicklung eines reproduzierbaren Funktionalisierungsprozesses stellte ein weiteres, essentielles Teilprojekt dieser Arbeit auf dem Weg zum Einzelmolekültransport dar.

Die methodische Entwicklung einer Einzelmolekültransport-Technik anhand einzelner DNA-Oligonukleotide unter physiologischen Bedingungen galt es durch das Zusammenspiel von neuartigen AFFM-Meßtechniken und chemischer Funktionalisierung von Festkörperoberflächen zu realisieren. Eine solche Technik soll es in Zukunft ermöglichen, molekulare Bausteine mechanisch kontrolliert zu Strukturen aufzubauen und durch das zurückgreifen auf das von der Natur gegebene Repertoire an natürlichen „Nanomaschinen“ neuartige Systeme und Anwendungsmöglichkeiten auf Einzelmolekülniveau.

2 – Theoretische Grundlagen

2.1 Die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)

Das Rasterkraftmikroskop (SFM, Scanning Force Microscope) oder AFM (Atomic Force Microscope) wurde 1986 von Binnig, Quate und Gerber aus den Grundlagen der Rastertunnelmikroskopie heraus entwickelt und war im Gegensatz dazu in der Lage auch nichtleitende Proben zu untersuchen [Bin86].

Die Rasterkraftmikroskopie bildet das erste Fundament - neben der Fluoreszenzmikroskopie - der gegenwärtigen Untersuchungen. Beim Rasterkraftmikroskop werden Wechselwirkungskräfte zur Abbildung ausgenutzt: einerseits die anziehenden van-der-Waals Kräfte und andererseits die abstoßenden Coulomb'schen Wechselwirkungskräfte. Diese wirken auf eine Spitze an einem Federbalken (Cantilever), was eine Verschiebung des Federbalkens zur Folge hat - optisch nachweisbar mittels des Lichtzeiger-Prinzips: ein Laserstrahl trifft auf die im Normalfall mit Gold beschichtete Rückseite des Cantilevers und der Reflex dieses Laserstrahls trifft wiederum auf einen segmentierten Photodetektor. Da die Kraft zwischen Probe und Spitze – und somit die Verbiegung des Cantilevers – über eine elektronische Kontrolle konstant gehalten wird, kann die z-Position der Spitze registriert und im nachfolgenden analysiert werden. Für kleine Auslenkungen des Cantilevers ist die gemessene Spannungsdifferenz direkt proportional zur Auslenkung. Ist die Federkonstante der Blattfeder bekannt, lassen sich aus der Auslenkung direkt die Kräfte zwischen der Probe und der Spitze bestimmen. Der Radius der Spitze liegt im Nanometer-Bereich und liegt damit bereits in derselben Größenordnung wie einzelne Moleküle. Die Probe wird in x, y-Richtung unter Zuhilfenahme von präzisen Piezoelementen gerastert, so daß aus den Bewegungen in x, y,- und z-Richtung die dreidimensionale Oberflächenstruktur abgelesen werden kann, und dies – und das ist einer der Vorteile der Methode - auch unter physiologischen Bedingungen.

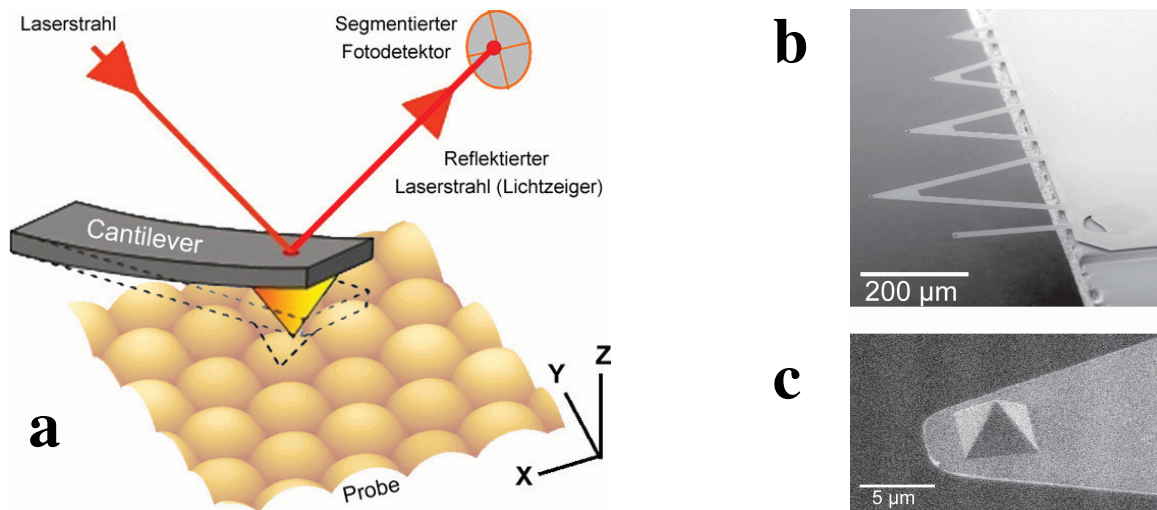


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops und REM-Aufnahmen eines Siliziumnitrid-Chips mit unterschiedlich langen Cantilevern. (a) Die Auslenkung des Cantilevers wird durch einen Lichtzeiger gemessen über einen segmentierten Photodetektor, welcher die Auslenkung direkt in ein Spannungssignal übersetzt. Mit Piezo-Stellelementen läßt sich die Probe so bewegen (x-y-z), dass die Spitze mit der Probe in Kontakt tritt und diese linear abrastert. (b) REM-Aufnahme eines Veeco MLCT Cantilever-Chips. Hierbei sind die unterschiedlichen Cantilever mit unterschiedlichen Längen und der daraus resultierenden Verbiegungsempfindlichkeit bzw. Steifigkeit zu erkennen. (c) REM-Aufnahme des Herzstücks des Rasterkraftmikroskops. Die feine, pyramidenförmige Spitze mit einigen Nanometern im Durchmesser rastert bei dieser Methode die Oberfläche der Probe ab.

In den letzten Jahren wurden für die Rasterkraftmikroskopie unterschiedliche Arbeitsmodi und Spitzen entwickelt, die ein weites Feld an Anwendungsgebieten erschließen. So kann das Rasterkraftmikroskop nicht nur die Topographie einer Probe abbilden, sondern teilweise parallel hierzu auch andere Eigenschaften wie z.B. Reibung, Elastizität oder Adhäsion messen.

2.1.1 Die Abbildungs-Modi der Rasterkraftmikroskopie

Mit AFM Spitzen kann man auf mehrere Arten abbilden, die in diesem Abschnitt vorgestellt werden sollen. Allen Methoden ist gemein, daß die Probe Linie für Linie zeilenweise abgerastert wird. Aus den verschiedenen Daten erstellt die Software ein Bild der Oberfläche, wobei der entsprechende Parameter *Höhe* oder *Wechselwirkung* entweder durch einen Farbverlauf oder durch eine dreidimensionale Darstellung visualisiert wird.

Beim Abbilden wird jede Linie des Bildes in der Regel zweimal abgetastet; einmal auf dem Hinweg (*Trace*) und einmal auf dem Rückweg (*Retrace*). Dabei wird besonders im reinen *Deflection* Bild (bei Darstellung des direkten unverarbeiteten Spannungssignals des Photodetektors) ein deutlicher Unterschied sichtbar, da es sich je nach Richtung um eine Steigung oder Senke handelt und der Balken nach oben oder unten verbogen wird. Grundlegend kann man drei verschiedene Abbildungsmethoden unterscheiden.

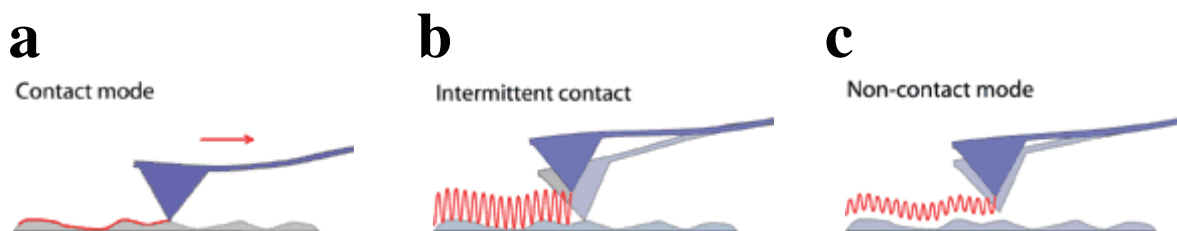


Abbildung 2: Die unterschiedlichen Abbildungs-Modi der Rasterkraftmikroskopie. (a) Contact-Modus. Hierbei hat die Spitze konstant physischen Kontakt mit der Probenoberfläche. (b) Im Intermittent Contact ist es möglich, mit Hilfe eines in Resonanz schwingenden Cantilevers atomare Auflösung zu erreichen mit minimalem Oberflächenkontakt. (c) Im Non-Contact Modus erfolgt die Auslenkung des oszillierenden Cantilevers durch Kraftgradienten zwischen der Spitze und der Probe ohne direkten, physischen Kontakt.

I. Messung der Oberflächentopographie im *Contact-Modus*

Dieser relativ unkomplizierte Modus eignet sich besonders für harte Oberflächen und für Messungen innerhalb eines Elektrolyten. Dabei wird die Spitze im physischen Kontakt mit kleinen Kräften über die Oberfläche gerastert, die Auslenkung der Feder detektiert und somit die Topographie direkt ausgewertet. Während der Abbildung der Oberfläche kann entweder die anliegende Kraft oder die Höhe der Spitze über der Probe kontrolliert und durch eine elektronische Rückkopplung als Referenz konstant gehalten werden, um die Höhendifferenzen zu messen. Die Kraft zwischen Spitze und Probe ist hierbei abstoßend.

II. Der *Intermittent-Contact-Modus*

In diesem Abbildungsmodus sind laterale Kräfte und Reibungen im Vergleich zum reinen Contact-Mode minimiert. Durch die Oszillation des Cantilevers durch ein piezoelektrisches Element, kommt es nur zu kurzem, periodischem Kontakt mit der Probenoberfläche. Die Kräfte, die auf die Probe wirken, sind somit sehr klein, so daß er sich z.B. gut für weiche und biologische Proben eignet, da diese in diesem Abbildungsmodus am wenigsten mechanischen Schaden erleiden. Befindet sich die in Resonanz schwingende Spitze sehr nahe an der Oberfläche, so kann auch wahre atomare Auflösung erreicht werden, was im Kontaktmodus nicht möglich ist [Gie95]. Dieser Modus der Abbildung wird im häufigsten Fall für Messungen an biologischen bzw. sensitiven Proben verwendet.

III. Der *Non-Contact-Modus*

Im sogenannten "Non-Contact Mode" werden die Kraftgradienten zwischen Spitze und Probe in einiger Entfernung von der Oberfläche gemessen. Diese können Van-der-Waals Kräfte, elektrostatische Kräfte oder Kräfte magnetischen Ursprungs sein. Zur Messung dieser durch den Abstand zwischen Spitze und Probe relativ schwachen Kräfte wird normalerweise der Cantilever durch ein piezoelektrisches Element in Schwingungen versetzt, wobei die Spitze die Probe nicht direkt berührt. Eine Kraft zwischen Spitze und Probe verändert die effektive Federkonstante des Cantilevers und damit die Resonanzfrequenz oder die Phase der Oszillation. Die elektromechanische Rückkopplung dient wie im Contact-Mode auch hierbei als Referenz, um Differenzen in den Signalen interpretieren zu können.

2.1.2 Die Kraftspektroskopie

Im Unterschied zum Abbilden mit dem Rasterkraftmikroskop wird bei der Kraftspektroskopie die Probe oder der Cantilever während der Messung nur in vertikaler Richtung bewegt. Als Meßsignale werden lediglich die vertikale Position und das Photodetektorsignal registriert. Als Ergebnis erhält man folglich statt eines Höhenprofils eine Kraft- Dehnungskurve. Wie in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte, liegt der besondere Einsatzbereich der

Kraftspektroskopie in der Analyse der Dehnungseigenschaften und Akzeptor-Ligand Wechselwirkungen einzelner Moleküle [Hin02, Kra03, Rie97b, Rie99, Oes00].

Alternative Methoden, wie die optische Pinzette, die sich insbesondere durch eine hohe Kraftauflösung auszeichnet, haben sich ebenfalls als sehr effizient bei der kraftspektroskopischen Untersuchung einzelner Moleküle erwiesen [Bus94, Bus04]. Für die Kraftspektroskopie sprechen jedoch seine deutlich bessere Positionsgenauigkeit im Vergleich zur optischen Pinzette und seine einfache Handhabung, insbesondere bei der mechanischen Untersuchung einzelner Moleküle.

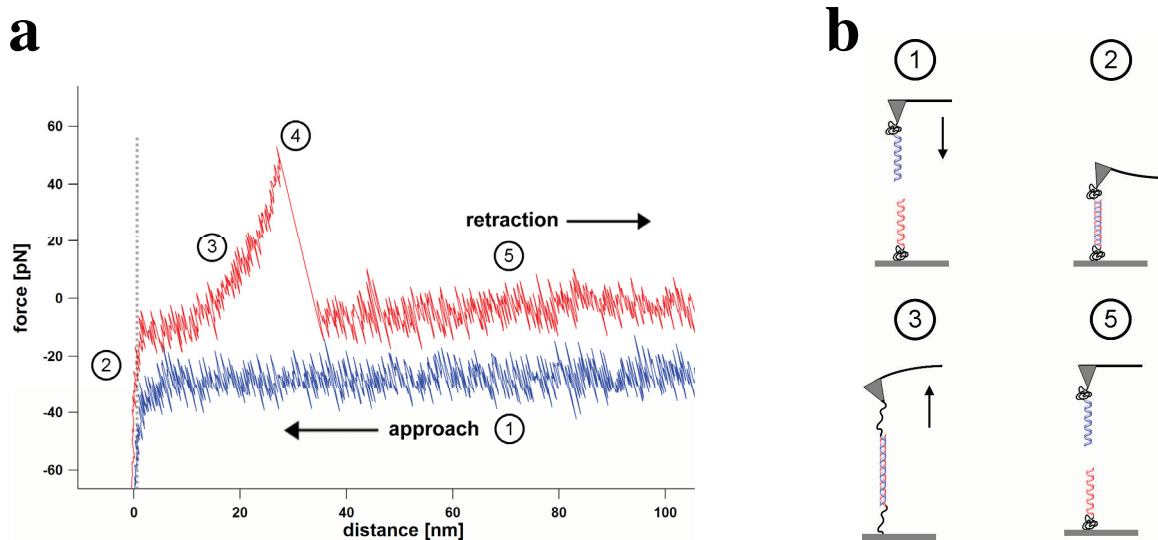


Abbildung 3: Kraft-Abstandskurve an DNA mit entsprechenden schematisch dargestellten Einzelereignissen. (a) Hier ist die Verbiegung bzw. die anliegende Kraft am Cantilever in Annäherung (Blau) und Entfernung (Rot) zur Probenoberfläche während einer Kraftkurve unterteilt. (b) Schematische Darstellung der einzelnen Ereignisse während einer Kraftkurve. (a) & (b) Eine Kraftkurve beginnt mit der Annäherung der Cantileverspitze and die Probenoberfläche (1) bist zum Kontakt (2). Bindet das Molekül in der Kontaktphase and die Spitze bzw. and die an der Spitze befestigten Liganden, wird das Molekülkonstrukt beim Zurückziehen gestreckt (3), was eine Verbiegung des Cantilevers zur Folge hat. Reißt das Molekülkonstrukt ab (4), schnappt die Cantileverspitze zurück in ihre Ausgangslage (5).

Bei Kraftkurven wird die Spitze bis zum Kontakt an die Oberfläche herangefahren (*approach, trace*) und nachfolgend von ihr weg gezogen (*retraction, retrace*). Während dieses Vorgangs werden die Höheninformation und die Verbiegung des Cantilevers registriert. Abbildung 3 (a) zeigt den Ablauf der Kurve und die schematisch dargestellten Ereignisse des Cantilevers

(Abbildung 3, b) am Beispiel eines Experiments, wobei zwei komplementäre 40b ssDNA Oligonukleotide auseinander gezogen werden. Zunächst wird der Cantilever parallel zur z-Piezo-Ausdehnung (waagerechter Verlauf der Kurve, Abbildung 3 (a), (1)) bewegt bis die Spitze die Unterlage berührt (Abbildung 3 (a) (2)). Wird die Spitze leicht auf die Unterlage gedrückt, verbiegt sich der Cantilever, wodurch es zum Ausschlag des Differenzsignals kommt. Der Wert der maximalen Eindrückung (*trigger force*) kann durch die Software eingestellt werden. Beim Erreichen des Trigger-Wertes ist der Umkehrpunkt (Abbildung 3 (a), dargestellt durch den Farbwechsel) erreicht und der z-Piezo wird wieder eingefahren. Durch die Adhäsion der Spitze an der Unterlage oder durch Wechselwirkungen mit den auf der Unterlage befindlichen Molekülen kommt es beim Zurückfahren des z-Piezoes zu einer Verbiegung des Cantilevers, abhängig von der Stärke der Adhäsion (Abbildung 3 (a) (3)). Dieser Effekt ist in Abbildung 3 (b) anhand einer experimentellen Konfiguration - wobei zwei komplementäre, 40 Basen lange ssDNA Stränge (verwendet in Kapitel 6) auseinandergezogen werden - zur Veranschaulichung übertrieben dargestellt, real ist die Veränderung der Cantilever-Verbiegung in Relation zur Länge des Cantilevers so gering (ca. 1-3 %), so daß das lineare Kraftgesetz gilt. Die dabei auftretenden Kräfte können direkt aus der Auslenkung bestimmt werden, wenn Empfindlichkeit und Federkonstante des Cantilevers bekannt sind (Kapitel 2.1.3). Reißt die Verbindung von Spitze und Unterlage bzw. den einzelnen Molekülen (Abbildung 3 (a) (4)), schnellt der Cantilever wieder in die Ausgangslage zurück (Abbildung 3 (a) (5)).

2.1.3 Bestimmung der gemessenen Kraft

Um das gemessene Spannungssignal des segmentierten Photodetektors in Kräfte umzurechnen, welche eine Funktion der Dehnung gemessene Kraft darstellt, sind die Empfindlichkeit und die Federkonstante des Cantilevers nötig.

Die Empfindlichkeit, auch Sensitivität genannt, bestimmt welche Auslenkung des Cantilevers der gemessenen Spannungsdifferenz entspricht. Dieser Umrechnungsfaktor wird definiert, indem die Spitze auf eine harte Unterlage gedrückt wird. Dabei ist der gefahrene Piezoweg proportional zu der Verbiegung des Cantilevers. Da durch das Signal der Induktionsspule (LVDT) der Weg des z-Piezoes bekannt ist, kann die Sensitivität S [nm/V]

durch die Steigung in der Referenzkraftkurve bestimmt werden und ist in der Regel für alle Kraftkurven eines Experiments konstant.

Die Federkonstante definiert eine aufzuwendende Kraft, um den Cantilever über eine gewisse Strecke zu verbiegen. Nach dem Hooke'schen Gesetz ($F = -k \Delta L$) ist die Kraft F , die durch den Cantilever ausgeübt wird, gegeben durch das Produkt der Kraftkonstante (oder Federkonstante) k [N/m] und der Auslenkung aus der Ruhelage L . Die Bestimmung der Federkonstante kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

I. Bestimmung der Federkonstante durch eine Referenzfeder

Zum einen kann, wie bei einer makroskopischen Feder, die erforderliche Kraft durch eine Referenz bestimmt werden. Dazu wird die Kraftkurve auf einer harten Unterlage und einer großen Feder aufgenommen, deren Federkonstante bekannt ist. Aus dem Verhältnis der gesamten Verbiegung und der Verbiegung des Cantilevers auf einer harten Unterlage kann somit die Federkonstante bestimmt werden. Bei den Dimensionen der Meßfeder ist es auch möglich, für die Referenzmethode Moleküle mit bekannten mechanischen Eigenschaften (wie z.B. Dextran oder poly(ethylenglykol)) zu vermessen [Rie97].

II. Bestimmung der Federkonstante durch die Resonanzfrequenz der Feder

Das thermische Rauschen versetzt den Cantilever in Resonanz einer bestimmten Frequenz f_0 , vergleichbar mit einer Gitarrensaite. Diese Resonanzfrequenz ist abhängig von der Kraftkonstante und der bewegten Masse. Somit kann die Kraftkonstante bestimmt werden, indem verschiedene Massen an der Feder befestigt werden und die resultierende Resonanzfrequenz bestimmt wird.

III. Bestimmung der Federkonstante durch das thermischen Rauschen der Feder

Der Cantilever ist wegen seiner kleinen Dimension von der Brown'sche Bewegung beeinflusst. Die Auslenkungen aus der Ruhelage wird thermisches Rauschen genannt. Je länger und weicher die Feder ist, desto größer ist die Auslenkung der Spitze aus der Ruhelage. Da das Kraftrauschen bei kleinen Kraftkonstanten aber gering ist, wird die Entwicklung von sehr kleinen, aber dennoch weichen Cantilevern weiter voran getrieben.

Für die Bestimmung der Kraftkonstante wird im Prinzip ausgenutzt, daß jeder Freiheitsgrad eines thermodynamischen Systems die Energie $k_B T/2$ besitzt. Durch eine Fast Fourier Transformation (FFT) des thermischen Rauschens des Cantilevers wird das Integral der ersten Resonanzfrequenz seiner Grundschiwingung bestimmt, woraus sich daraufhin die Kraftkonstante ableiten läßt [Col84, Bur99]. Wichtig für die richtige Bestimmung der Kraftkonstante ist, daß zunächst die Empfindlichkeit bestimmt wird und die thermische Schwingung des Cantilevers nicht durch die Nähe zur Oberfläche gedämpft wird.

Die Bestimmung der Kraftkonstante über das thermische Rauschen wird allgemein bevorzugt und findet Verwendung in den in dieser Arbeit und den Veröffentlichungen vorgestellten Experimenten.

2.1.4 Die Relevanz des AFM in der Molekularbiologie

Ganz neue Möglichkeiten bietet das Rasterkraftmikroskop auch für Chemie und Biologie: Zum einen ist es mit der Methode der Rasterkraftmikroskopie möglich, Oberflächen, wie z.B. biologische Membranen abzubilden und deren Struktur oder die Struktur der eingelagerten Membranproteine zu charakterisieren. Weiterhin ist es möglich, einzelne Moleküle zwischen einer Oberfläche und der Sonde eines Rasterkraftmikroskops zu befestigen. Mit Hilfe des Kraftmikroskops kann die Kraft bestimmt werden, die nötig ist, um beispielsweise ein Molekül oder eine Wechselwirkung zwischen einem Rezeptor-Ligand System zu zerreißen. So ein Experiment erlaubt die Messung der chemischen Bindungsenergie an einem einzelnen Molekül.

Im Folgenden werden einige Beispiele für die Verwendung im molekularbiologischen Bereich präsentiert.

2.1.5 Topographie biologischer Oberflächen

Mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops ist es möglich die Oberflächen verschiedener biologischer Objekte über mehrere Dimensionen hinweg abzubilden. So wurden Knochen, Gewebe, Zellverbände, lebendige Zellen, Membranen, DNA-Stränge und Proteine topographisch untersucht.

Durch das kontinuierliche Optimieren der Präparations- und Abbildungsbedingungen gelingt es, selbst Substrukturen einzelner Proteine abzubilden und mit atomaren Modellen zu vergleichen. Die hierbei erreichte räumliche Auflösung liegt unter einem Nanometer (10^{-9} m). Da die AFM-Spitze während des Abtastens mit dem Objekt wechselwirkt, besteht die Möglichkeit, die Oberflächenstruktur abzubilden und gleichzeitig völlig unterschiedliche biophysikalische sowie biochemische Eigenschaften der Oberfläche zu detektieren.

Am Beispiel des Membranproteins OmpF, welcher als Ionenkanal bei gram-neaktiven Bakterien in der Zellmembran vorkommt [Duf04], wird dargestellt, wie das AFM als mikroskopisches Instrument zur Kontrolle in der biochemischen oder molekularbiologischen Strukturforschung eingesetzt werden kann.

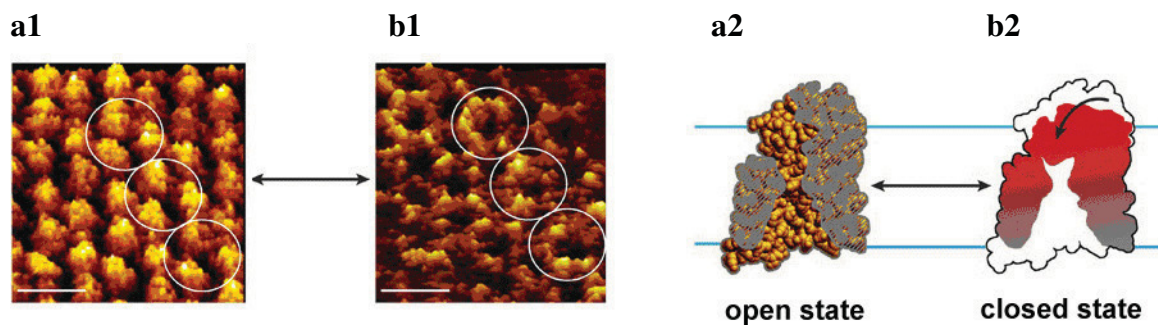


Abbildung 4: AFM-topographische Aufnahme des OmpF Porins an der extrazellulären Seite der Bakterienmembran *Escherichia coli* [Duf04]. (a1) AFM Aufnahme der Porine im geöffneten Normalzustand. Durch anlegen einer Spannung (b1) schließt sich der Ionenkanal. Mittels Strukturdaten kann der Modellmechanismus der spannungsinduzierten Konformationsänderung unter Zuhilfenahme der AFM-Aufnahmen genauer definiert werden (a2, b2).

Zwei weitere Trends der AFM-Technik zur Charakterisierung zellulärer Membranen zeichnen sich gegenwärtig ab: Zum einen werden zunehmend native Zellmembranen abgebildet, zum

anderen wird AFM eingesetzt, um Membranproteine bei der Ausübung ihrer Funktionen zu beobachten. Die direkte Beobachtung der Membranproteine mit dem AFM gibt einzigartige Einsichten in deren Struktur, ihrer Integration in der Zellmembran, ihrer strukturellen Anordnung und ihrer Funktionsweise [Eng00].

2.1.6 Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen

Die komplexen Wechselwirkungen von Molekülen, insbesondere bei Biomolekülen, beruhen nicht nur auf deren chemischer Zusammensetzung, sondern auch auf ihren strukturellen Eigenschaften. Makromoleküle, die aus einem begrenzten Satz von biochemischen Bausteinen entstehen, unterscheiden sich zumeist erheblich in der räumlichen Anordnung derselben. Man spricht von einer unterschiedlichen Konfiguration, wenn diese Strukturdifferenz im Aufbau festgelegt ist bzw. von einer anderen Konformation, wenn die verschiedenen Zustände (prinzipiell) durch Drehungen um Einfachbindungen ineinander überführt werden können. Die Ausbildung komplementärer Oberflächen und Vertiefungen im Rahmen ihrer Struktur ermöglicht es Biomolekülen, verschiedenartige Moleküle spezifisch zu erkennen und mit ihnen in Wechselwirkung zu treten. Diese Liganden können andere Proteine, DNA, Polysaccharide, kleinere organische Moleküle, aber auch gasförmige Moleküle oder Metallionen sein. Die molekulare Erkennung beruht prinzipiell auf komplementären Oberflächen: Der richtige Ligand kann die vorhandene Bindungsstelle des Rezeptors paßgenau ausfüllen. Die Bindung ist dabei eine Summe schwacher Wechselwirkungen: Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen, van-der-Waals Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen.

Eine häufige Reaktion von Proteinen auf die Bindung eines Liganden ist eine Konformationsänderung. Besitzt ein Protein mehrere räumlich getrennte Bindestellen, können diese häufig über solche Änderungen der Raumstruktur des Rezeptors miteinander kommunizieren. Enzyme katalysieren chemische Reaktionen und modifizieren dabei den gebundenen Liganden, Rezeptorproteine geben ein Signal an andere Proteine weiter.

Nachfolgend ist ein Beispiel für eine DNA-Protein Wechselwirkung gezeigt [Bar05], wobei das Protein für die Genregulation der Galactoglucan-Biosynthese des Bakteriums *Sinorhizobium meliloti* verantwortlich ist (Abbildung 5).

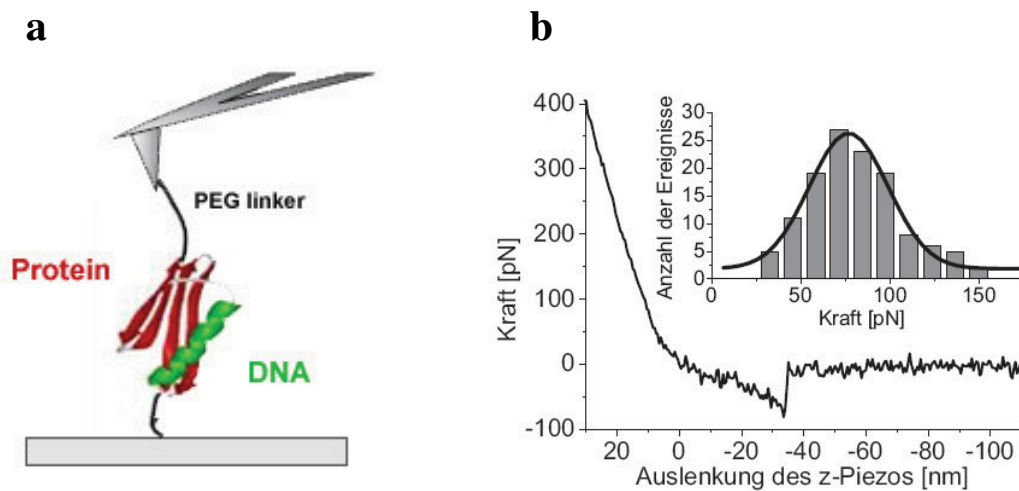


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Protein-DNA Wechselwirkungsexperiments mittels der Kraftspektroskopie und der resultierenden Kraftverteilung für die Bindungskraft [Bar05]. Der Rezeptor ist an die AFM-Spitzenoberfläche befestigt und interagiert mit dem Liganden (a), welcher an der Oberfläche immobilisiert wurde. Durch mehrmaliges Annähern und Auseinanderziehen des Komplexes ergibt sich eine Kraftverteilung (b), welcher die statistisch ermittelten Kraft Bindungskräfte darstellt.

Durch eine solche Methodik ist es möglich aus den gemessenen Kräften die Bindungsenergie, Spezifität, Affinität und mögliche Zahl an Bindungsstellen zu bestimmen. Durch die Möglichkeit, eine Vielzahl von Molekülen an die Oberfläche und an die AFM-Spitze zu binden, hat diese Form der Kraftspektroskopie eine enorme Bedeutung in der Biologie, Medizin, Pharmazie und Chemie erlangt.

2.1.7 Proteinfaltung mit dem AFM

Proteine gehören zu der wichtigsten Klasse an Biomolekülen in allen Organismen. Sie haben dort vielfältigste Aufgaben zu erfüllen. Alle Proteine erreichen ihre spezifische Funktion aufgrund der Ausbildung komplexer räumlicher Strukturen. Durch Faltung in mechanisch stabile Helix- oder Faltblattstrukturen (Sekundärstruktur), die sich zu kompakten Domänen formen (Tertiärstruktur), werden die unterschiedlichsten Werkzeuge geformt, die als Bindungstaschen, Motoren oder auch Kanäle funktionieren. Die zentrale Frage zum Verständnis von Proteinen ist somit, welche Kräfte und Wechselwirkungen die Faltung und Form dieser Moleküle treiben und stabilisieren, wie also aus einer Kette von Aminosäuren ein spezifisches Werkzeug wird. Gerade heute, wo bereits das gesamte menschliche Erbgut sequenziert wurde, wird die Frage nach der Funktion der darin kodierten Proteine immer dringlicher. Gleich wie eine unbekannt Sprache ist die Sequenz allein nichts als eine Abfolge von Buchstaben, wenn nicht auch das Verständnis für die verschlüsselte Information mit einhergeht.

Die Stabilität von Proteinen wird im Allgemeinen über ihre Beständigkeit gegenüber thermischer oder chemischer Denaturierung bestimmt. Für die tatsächliche mechanische Stabilität eines Proteins, die besonders auch bei Proteinen mit struktureller Funktion von Bedeutung ist, haben diese Methoden jedoch nur begrenzte Aussagekraft. Hier besteht mit der Kraftspektroskopie erstmals die Möglichkeit, Entfaltungskräfte und somit die mechanische Stabilität direkt zu messen. Konzeptionell hat das direkte Messen der Entfaltungskräfte auch den Vorteil, daß die Kraft als Vektor in verschiedene Richtungen angelegt werden kann und somit eine ungleich detaillierte Information über die komplizierten Energielandschaften von gefalteten Proteinen liefert, als dies beispielsweise kalorimetrische Messungen leisten.

Ein Protein, an dem bereits erfolgreich die Technik der Kraftspektroskopie (Abbildung 6) angewendet wurde, ist das lichtsensitive Membranprotein Bakteriorhodopsin (BR) aus der Purpurmembran des *Halobacterium salinarum* [Oes00].

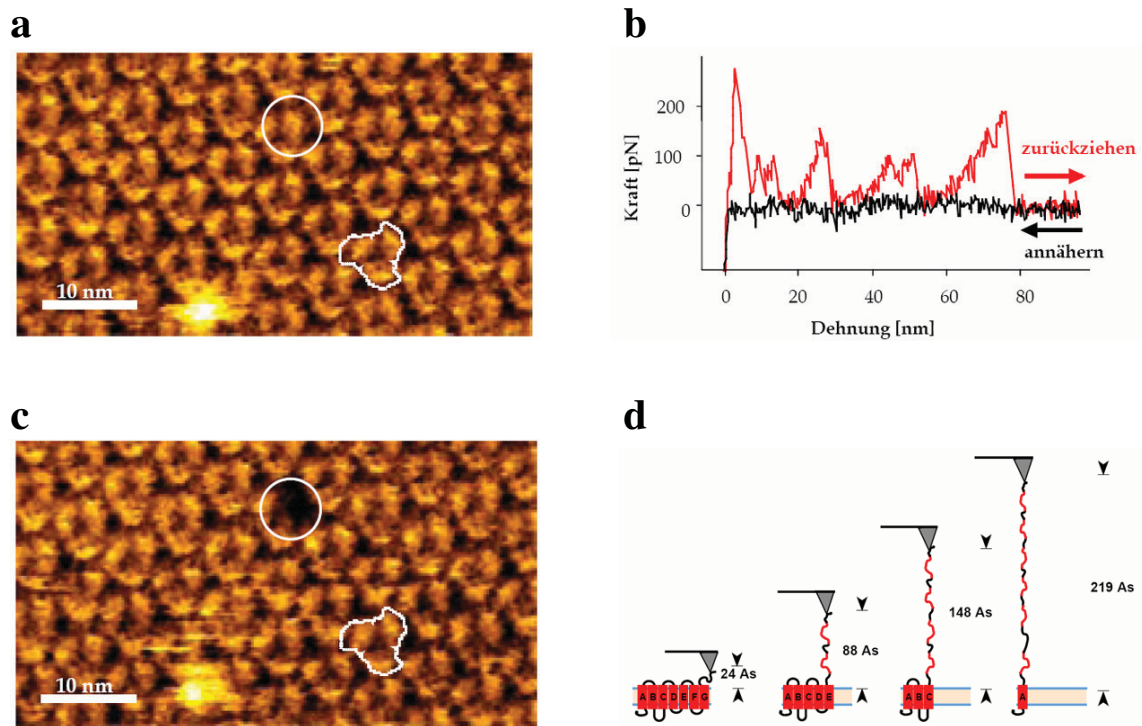


Abbildung 6: Entfaltung von Bakteriorhodopsin aus der Purpurmembran des *Halobacterium Salinarum* [Oes00]. AFM-Abbildung vor (a) und nach (c) dem Herausziehen eines Membranproteins (Kreis). Anhand der gemessenen Kraftkurve (b) sind deutlich mehrere Abrisse zu erkennen, welche die schrittweise Entfaltung (d) repräsentieren mit der Anzahl der jeweils entfaltenen Aminosäuren bei jedem Entfaltungsschritt.

Bakteriorhodopsin entfaltet unter mechanischer Belastung nicht auf einmal, sondern in drei Schritten mit drei stabilen Zwischenzuständen (Abbildung 6 (b), (d)). Im Anstieg der verschiedenen Kraftspitzen spiegelt sich das Dehnen des bereits entfaltenen Aminosäurestranges wieder. Ist die maximale Haltekraft der nächsten Zwischenstruktur erreicht, wird diese aufgebrochen und die entfaltete Aminosäurekette wird entsprechend länger. Zählt man vom C-Terminus beginnend die Anzahl der Aminosäuren, die man aus den Entfaltungskurven erhält, findet man mit dem Strukturmodell von BR diejenige Stelle im Protein, an der die Kraft an den jeweiligen Zwischenzuständen angreift.

In den gemessenen Kräften und Entfaltungsschritten äußert sich also die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Sekundärstrukturelementen des Proteins. Man hat durch diese Methode prinzipiell die Möglichkeit, Untersuchungen zur Struktur und Stabilisationsmechanismen innerhalb eines Proteins durchzuführen. Da mit der

Kraftspektroskopie neben Energien auch Konformationslängen gemessen werden können, stellt sie einen neuen bzw. ergänzenden Zugang zur Strukturinformation dar.

2.2 Fluoreszenz

Die Fluoreszenzmikroskopie bildet neben der Rasterkraftspektroskopie das zweite Fundament der gegenwärtigen Untersuchungen. Das vorliegende Kapitel widmet sich ihren Grundlagen, wobei maßgeblich jene Aspekte betrachtet werden, die zum Verständnis der nachfolgenden Kapitel und Experimente benötigt werden.

Fluoreszenz ist abgesehen von der Phosphoreszenz die zweite Art der Lumineszenz. Letztere beschreibt allgemein die Emission von Photonen aus angeregten Zuständen von Molekülen. Die Zuordnung in Fluoreszenz und Phosphoreszenz geschieht über die Natur des Grund- und des angeregten Zustandes.

Wird elektromagnetische Strahlung (z. B. Licht) auf ein Molekül gerichtet, kann das Molekül unter gewissen quantenmechanischen Bedingungen mit der Strahlung wechselwirken. Neben Rotationen (Mikrowellenspektroskopie) und Vibrationen (Infrarotspektroskopie) ist auch die elektronische Anregung möglich. Dabei wird das Molekül durch Absorption aus dem Grundzustand (S_0) in den elektronisch angeregten Zustand gebracht (Abbildung 7 (a)). Der Übergang zu dem ersten angeregten Zustand (S_1) ist dabei nach der Boltzmann Statistik der wahrscheinlichste. Das Prinzip der Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung läßt sich am anschaulichsten an dem von Aleksander Jabłoński entwickelten Energiediagramm erklären (Abbildung 7 (b)).

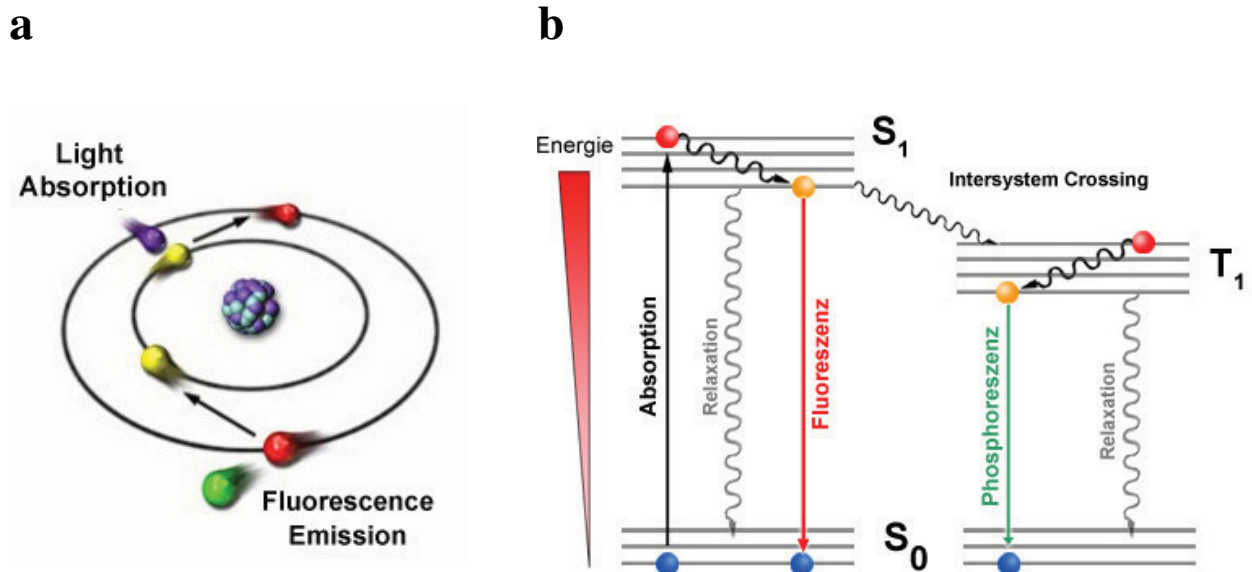


Abbildung 7: Veranschaulichung der Fluoreszenzemission anhand des Jablonski-Energiediagramms. Höhere Energieniveaus sind zur Vereinfachung nicht dargestellt. Nach der Anregung durch Absorption (a) kann die adsorbierte Energie durch verschiedene Mechanismen wieder abgegeben werden (b): Umwandlung in der Energie in Schwingungszustände gleichen Singulett-Zustands (Internal conversion), Fluoreszenz (rot) vom ersten Singulett-Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 , oder nach einem *Intersystem Crossing* in den Triplet-Zustand durch Phosphoreszenz. Möglich sind auch elektronische Übergänge durch strahlungslose Relaxation.

Der Grund- und der erste angeregte elektronische Singulett-Zustand sind mit S_0 und S_1 deklariert. Jeder dieser Zustände wird durch Schwingungen in weitere Vibrationsniveaus aufgespalten. Bei Anregung geht das Molekül vom untersten vibronischen Zustand S_0 in einen der vibronischen Zustände von S_1 oder in ein höheres Energieniveau über. Die Anregung erfolgt nahezu sofort ($\sim 10^{-16}$ s), so daß die Atomkerne dabei keine räumliche Verschiebung erfahren (Franck-Condon-Prinzip).

Die Überschneidung der Wellenfunktionen des Grund- und des angeregten Zustandes ergibt die Wahrscheinlichkeit für den jeweiligen Übergang und somit entsprechend die Intensität der Absorptionsbande. Nach erfolgter Absorption relaxiert das Molekül sehr schnell in den untersten Schwingungszustand des angeregten Zustandes S_1 (Regel von Kasha). Diese Relaxation geschieht strahlungslos (*Internal Conversion*). Aus dem S_1 -Zustand führen nun verschiedene Prozesse zur Depopulation. Neben einer erneuten internen Konversion kann das

Molekül auch über eine Fluoreszenzemission direkt in den Grundzustand zurückkehren. Befinden sich Moleküle im ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 , können diese des Weiteren über *Intersystem Crossing ISC* (engl.; Systemwechsel) durch weitere Strahlungsabsorption in den ersten angeregten Triplett-Zustand T_1 wechseln, welches jedoch energetisch ungünstiger ist. Die Depopulation des Triplett-Zustandes T_1 erfolgt durch einen Übergang in den Grundzustand unter Abgabe eines Photons, welches, bedingt durch das Symmetrieverbot, der Phosphoreszenz entspricht. Wie im Jablonski-Diagramm dargestellt (Abbildung 7), erfolgen Absorption und Emission meist aus unterschiedlichen Schwingungsniveaus heraus: Die Emission ist folglich energieärmer und führt zu einer bathochromen Verschiebung des Fluoreszenzspektrums in Lösung (Stokes-Shift). Die Fluoreszenz ist durch ihre Lebensdauer im Nanosekunden-Bereich und ihre meist recht hohe Quantenausbeute im Vergleich zu anderen Deaktivierungsprozessen von hohem Interesse für Strukturuntersuchungen.

Fluoreszenzerscheinungen spielen in den unterschiedlichsten Gebieten eine Rolle, z.B. in der Spektroskopie, zur biochemischen Analyse, bei der Röntgendurchleuchtung oder finden Verwendung in optischen Aufhellern.

2.2.1 Extrinsische Fluoreszenzfarbstoffe

Viele biologische Moleküle besitzen intrinsische Fluoreszenz (natürliche Eigenfluoreszenz); so z.B. die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin in Proteinen und Kofaktoren wie NADH und Riboflavin. Ihre Leuchtkraft ist jedoch nicht sehr groß und die Anregung liegt im Falle von Proteinen im UV-Bereich, was die Anregung mit herkömmlichen Lichtquellen erschwert.

Daraufhin sind kommerziell erhältliche künstliche, fluoreszierende Moleküle (kurz: Fluorohore) entwickelt worden, welche eine stärkere Leuchtkraft bzw. Quantenausbeute aufweisen und in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen des sichtbaren Lichts (ca. 380nm bis 780nm) absorbieren und emittieren. Diese Substanzen enthalten im Allgemeinen ein konjugiertes, delokalisiertes π -Elektronensystem, welches generell auch bei Molekülen mit aromatischem Charakter der Fall ist. Diese extrinsischen Fluoreszenzfarbstoffe weisen sich durch ihre Fähigkeit aus, elektromagnetische Strahlung aufnehmen und in Form von

Fluoreszenz wieder abgeben zu können. Die Wellenlängenbereiche, in denen der Farbstoff Strahlung absorbiert und emittiert, werden durch dessen Energiespektrum bestimmt. Dieses ist definiert durch die elektronischen Zustände des Farbstoffs, welche durch Schwingungs- und Rotationsbewegungen des Moleküls jeweils zusätzlich in Vibrations- und Rotationsniveaus aufgespalten sind. Da in Lösung eine inhomogene Verbreiterung der Spektrallinien auftritt, können Vibrations- und Rotationszustände nicht aufgelöst werden. Abbildung 8 zeigt das typische Absorptions- und Fluoreszenzspektrum eines extrinsischen Farbstoffs am Beispiel des im roten Wellenlängenbereich emittierenden ATTO647N (Atto-Tec, Siegen, Deutschland) in Lösung, welcher in den Experimenten dieser Arbeit und in den Veröffentlichungen weitgehend verwendet wurde.

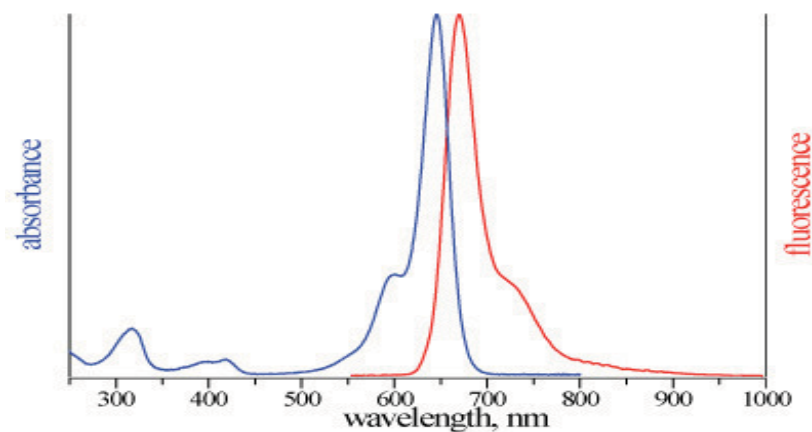


Abbildung 8: Überlagertes Adsorptions- (blau) und Fluoreszenz-Emissionsspektrum (rot) des extrinsischen Fluorophores ATTO647N in wässriger Lösung (nach Atto-Tec, Siegen, Deutschland).

Aufgrund der strahlungslosen Relaxation innerhalb von Schwingungszuständen des angeregten elektronischen Energieniveaus ist die Emissionsbande gegenüber der Absorptionsbande in den Bereich höherer Wellenlängen verschoben (Stokes-Verschiebung).

Weil angeregte Zustände eines Moleküls im Allgemeinen instabile Konfigurationen darstellen, besteht neben der bereits beschriebenen Relaxation die Möglichkeit der chemischen Reaktion aus dem angeregten Zustand heraus. Die Photozerstörung (*Bleaching*) der Fluoreszenzfarbstoffe stellt eine solche unerwünschte photochemische Reaktion dar. Sie ist abhängig von den verwendeten Anregungsleistungsdichten und irreversibel. Der Farbstoff kann den Anregungszyklus nicht mehr durchlaufen und geht dem Experiment verloren. Des

Weiteren kann die Anzahl der emittierten Photonen durch Wechselwirkungen mit Fremdmolekülen in geringem Abstand stark herabgesetzt werden. Man spricht in diesem Fall von einer Fluoreszenzlöschung (*fluorescence quenching*).

Um der Photozerstörung beizukommen, wird einerseits die Anregungsleistung herabgesetzt um den Anteil an Triplett-Ereignissen zu vermindern, zum anderen können Substanzen der Lösung beigesetzt werden, die eine mögliche Oxidation und eine damit einhergehende Photozerstörung vermindern [Vog08].

3 - Entwicklung des AFFM-Meßsystems

Die Kombination von Rasterkraftmikroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie ist von generellem Interesse für die Forschung im Bereich der Life Sciences. Beide Methoden liefern besondere und einzigartige Informationen über das beobachtete Untersuchungsobjekt und zudem Möglichkeiten zur Manipulation. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine verbreitete Anwendungsmethode, um spezifische Moleküle, Zellen oder sogar Bestandteile innerhalb lebender Zellen zu betrachten. Diese Methode allein besitzt jedoch Grenzen in der optischen Auflösung (Beugungsbegrenzt zwischen 200nm und 300nm) und durch die komplexe Probenpräparation, wobei intrinsische oder speziell gebundene extrinsische Fluoreszenzfarbstoffe nötig sind. Bei der Rasterkraftmikroskopie hingegen ist eine derart komplexe Probenpräparation nicht notwendig und diese Methode liefert dreidimensionale Informationen über das Untersuchungsobjekt mit einer Detailauflösung im Nanometerbereich (bis 1nm). Die Kombination beider Methoden und die Möglichkeit simultaner Verwendung bietet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten und eine sehr hohe Detailauflösung spezifischer Untersuchungsobjekte. Dabei ist man nicht nur auf die Bildgebung begrenzt, sondern auch im Bereich der Nanomanipulation ergeben sich neue Möglichkeiten in der Kombination beider Verfahren.

In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines AFFM (Atomic Force Fluorescence Microscope)-Meßsystems aufgezeigt und einige, teils unveröffentlichte Beispiele zur Demonstration der Möglichkeiten im Bereich der kombinierten Bildgebung und Nanomanipulation vorgestellt. Weiterhin beruhen alle in dieser Arbeit vorgestellten Experimente und Veröffentlichungen auf dieses kombinierte Meßsystem.

3.1 Aufbau und Charakterisierung des AFFM-Meßsystems

Die apparative Kombination beider Methoden ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Bei der Verknüpfung der Methoden ist es von außerordentlichem Interesse die einzelnen Bestandteile modular aufzubauen, um sowohl Weitfeld-, Nahfeld (TIR)- als auch Konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit dem AFM-System zu kombinieren und somit die Anwendungsmöglichkeiten erheblich zu erweitern.

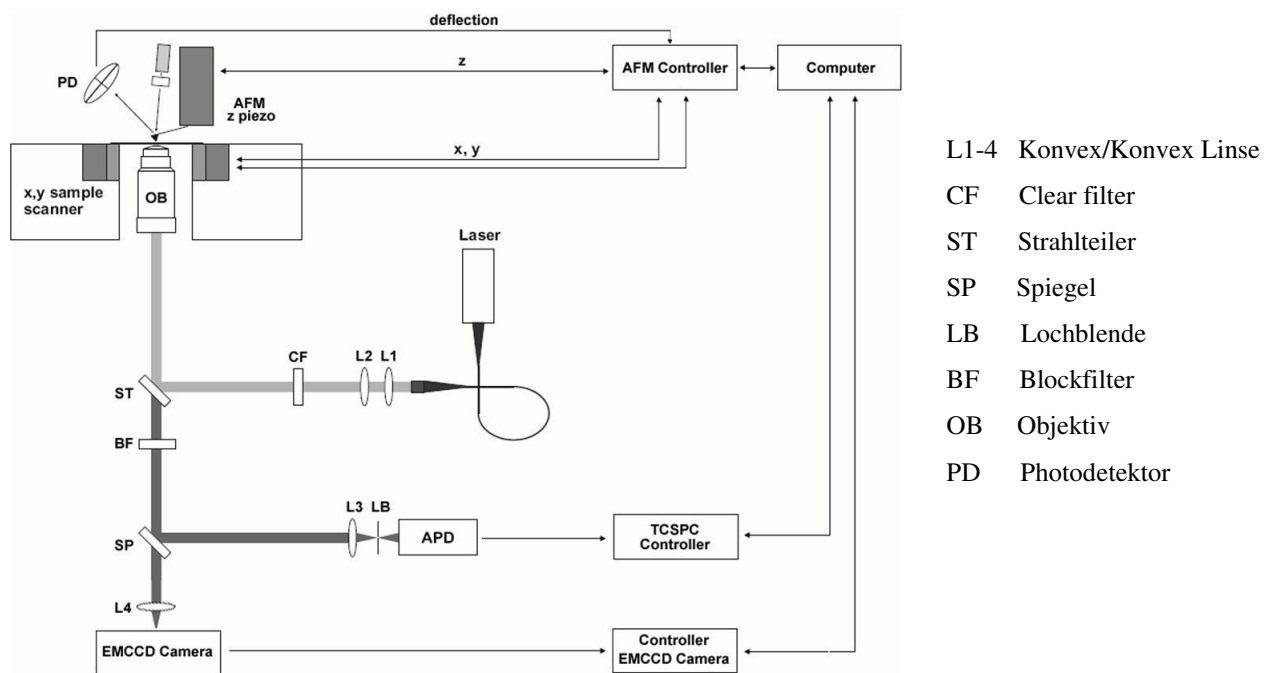


Abbildung 9: Schematische Darstellung des experimentellen AFFM (Atomic Force Fluorescence Microscopy) Meßsystems. Durch die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten ist es möglich durch die Wahl an unterschiedlichen Objektiven und Detektionssystemen die AFM-Meßmethode mit Weitfeld-, Nahfeld- und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu verknüpfen.

3.1.1 Die kraftspektroskopischen Komponenten des AFFM

Das Rasterkraftmikroskop (MFP3D, Asylum Research, USA) wurde einschließlich des positionspräzisen Probenscanners im Nanometerbereich für die simultane Durchlicht- und evaneszente Fluoreszenzmikroskopie auf ein invertiertes Mikroskop (IX71, Olympus, Hamburg) aufgesetzt, welches mit einer EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled

Device) Kamera (IXON, Andor, Irland) mit 512x512 Pixel verbunden wurde. Durch eine zusätzliche Öffnung im Filtermodulhalter wurde durch zwei zusätzliche Konvex/Konvex Linsen (Abbildung 9, L1& L2) des über einen Lichtleiter angekoppelten Lasers (58FCM-635, Schäfer & Kirchhoff, Hamburg, Deutschland) der Fokus und der Strahlengang der Laserlichtes für die Weitfeld- oder Nahfeld- Methode entsprechend moduliert. Für die Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie kam ein 40x und 60x Wasserimmersions-Objektiv (40x: NA 0,95; 60x: NA 1,2; Olympus, Hamburg) zum Einsatz. Für die evaneszente Methode wurde ein spezielles Ölimmersions-TIRF-Objektiv (NA 1,45; Olympus, Hamburg) verwendet und das Laserlicht entsprechend den Anforderungen modifiziert.

Dieser Aufbau kann dank seiner kompakten Bauweise auf einen aktiv-schwingungsdämpfenden Meßtisch (TS150, TableStable^{Ltd}, Amerbuch, Deutschland) gelagert werden, der die Meßapparatur in Bezug auf störende Vibrationen entkoppelt. Dieser montierte Aufbau wurde auf seine Störanfälligkeit durch Schwingungen jeglicher Art hin untersucht, indem die Schwingungen des in Oberflächenkontakt stehenden Cantilever-Tips registriert und die zeitabhängige Auslenkung durch eine Fast Fourier Transformation (FFT) in ein Frequenzspektrum umgerechnet wurden.

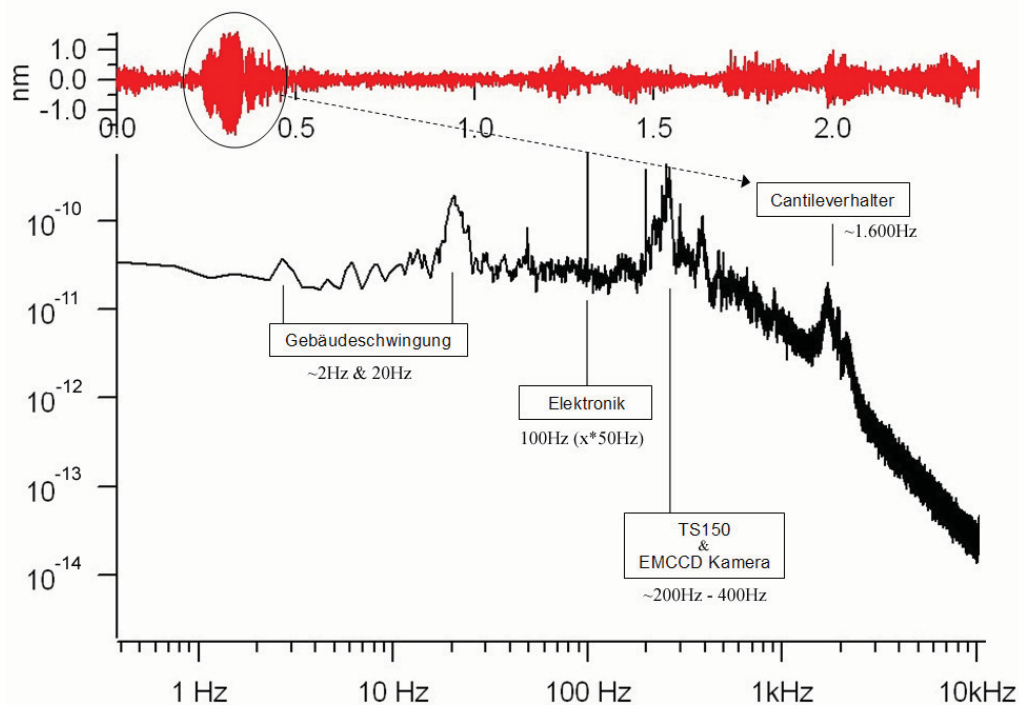


Abbildung 10: Frequenzspektrum der AFM-Cantileverspitze im Oberflächenkontakt. Das Schwingungsspektrum zeigt deutliche Störschwingungen, welche ihren Ursachen zugeordnet sind.

Wie in dem Frequenzspektrum in Abbildung 10 aufgezeigt, kam es durch die Kombination beider Methodiken zu zusätzlichen Störungen in unterschiedlichen Frequenzbereichen. Durch unterschiedliche Tests konnten folgende Ursachen zugeordnet und durch apparative Korrekturen behoben werden:

~2Hz & ~20Hz: Diese Störungen wurden durch die Gebäude-Eigenschwingung induziert. Die Meßapparatur wurde somit aus dem 3. Stockwerk in eine erdebene Etage verlagert.

100Hz: Diese und weitere Schwingung (50Hz, 200Hz, 300Hz, etc..) entstanden aus dem Vielfachen der Netzspannung, welche mit ca. 50Hz ihre Polarität ändert. Die Schwingungsübertragung konnte durch die Entkopplung des Verbindungskabels zum Rasterkraftmikroskop mit einer massiven Stahlklammer minimiert werden, in welcher das Steuerungskabel eingeklemmt wurde.

~200Hz - 400Hz: In diesem Frequenzbereich überlagerten sich störende Vibrationen durch die Luftkühlung der angeschlossenen EMCCD-Kamera und durch Eigenschwingungen des aktiven-schwingungsdämpfenden Meßtischs TS150, welche durch unsymmetrische Belastung entstand. Die Kühlung der EMCCD-Kamera wurde auf Wasserkühlung modifiziert und die Belastung der Meßapparatur auf dem Meßtisch symmetrisch ausgerichtet.

~1.600Hz: Diese Störschwingung entstand durch Eigenresonanz des AFM-Cantileverhalters. Das Design wurde daraufhin von der Herstellerfirma Asylum Research für die gesamte Baureihe verändert.

Schall: Aufgrund der zusätzlichen Sensibilität des AFM-Systems gegenüber Schallwellen, wurde zusätzlich der gesamte Meßaufbau in eine schallisierende Box (IGAM, Barleben, Deutschland) eingebaut, um störende Schwingungen des hörbaren Frequenzbereiches zu minimieren.

Durch die durchgeführten Veränderungen und Anpassungen des AFFM-Meßsystems und der einzelnen Komponenten konnten die störenden Schwingungen, welche eine Verschlechterung der Abbildungs- und Kraftauflösung des AFM-Systems als Folge hatten, effektiv verhindert werden, so daß sensitive Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen mit hoher Kraftauflösung bzw. hohem Signal-Rauschverhältnis dadurch ermöglicht wurde.

3.1.2 Die optischen Komponenten des AFFM

Im Anschluß der Optimierung des entwickelten Meßsystems in Bezug auf die rasterkraftspektroskopischen Komponenten wurden die einzelnen Komponenten der Fluoreszenzmikroskopie auf die neuen Anforderungen abgestimmt. Die vorhandenen Standard-Filtersets (F41-001 & F41-080, AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) waren für dieses kombinierte Meßsystem jedoch für das kombinierte System untauglich. Dabei wurde das Laserlicht des Rasterkraftmikroskops, welcher für die Detektion der Cantilever-Verbiegung verantwortlich ist, nicht blockiert und wurde ungehindert von der EMCCD Kamera mitdetektiert. Des Weiteren ließen diese Standardfilter das Raman-Streulicht des Deckglases als Probenträger und der wäßrigen Lösung ungehindert hindurch. Dadurch war die simultane Bilderfassung der Cantileverspitze und der fluoreszierenden Proben nicht möglich.

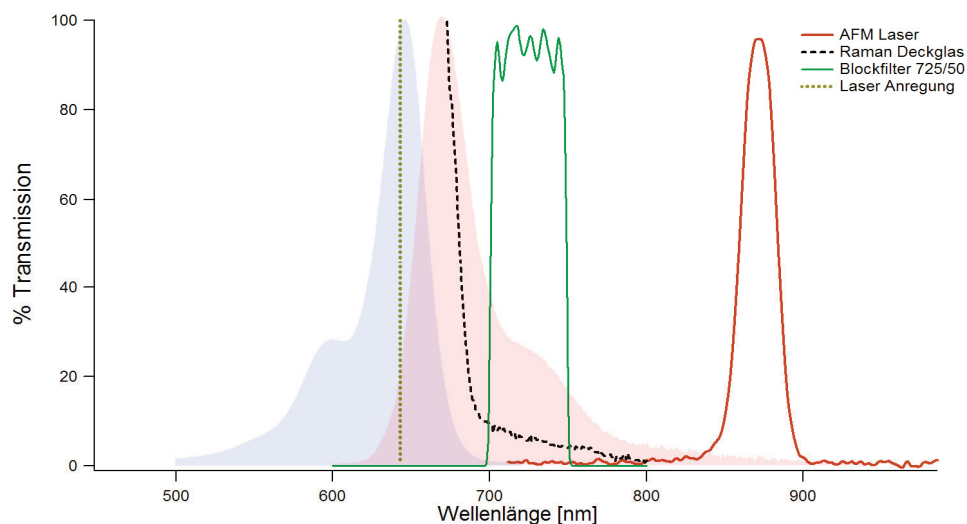


Abbildung 11: VIS-Spektrum der einzelnen fluoreszenzspektroskopisch relevanten Komponenten mit Absorptions- (Blau) und Emissionsverhalten (Rot) des ATTO647N-Fluorophors. Der Anregungslaser (*Ocker*) regt den Fluorophor im Absorptionsmaximum (*Blau*) an, um eine maximale Quantenausbeute zu erreichen. Die störende Raman-Streuung (*Schwarz*) des Probenträgers und der AFM-Laser (*Orange*) ergeben die Grenzen der störungsfreien Fluoreszenzdetektion. Unter Berücksichtigung des Emissionsverhaltens des Fluorophors (*Rot*) erlaubt der Blockfilter mit Durchlässigkeit zwischen 700nm und 750nm das beste Signal-Hintergrundverhältnis.

Anhand der Raman-Spektren des Anregungslasers für den Probenträger, des Emissionsverhaltens des ATTO647N- Fluorophores - welcher hauptsächlich in den vorgestellten Arbeiten Verwendung fand - und des Spektrums des AFM Lasers wurden Strahlteiler und Blockfilter entsprechend neu designed (Abbildung 11, AHF Analysentechnik). Zusätzlich wurde ein schmalbandiger Aufreinigungsfilter (Abbildung 9, CF) für den Anregungslaser und ein weiterer Filter für den AFM Laser verwendet, um die Bandbreite der Laserlinien zu verkleinern und mögliche, zusätzliche Störungsquellen im Bezug auf die Detektion der Untergrundstrahlung und zusätzlichem Streulicht zu verhindern. Diese Anpassung der fluoreszenzspektroskopischen Komponenten wurde stets für jeden verwendeten Fluoreszenzfarbstoff und fluoreszierenden Nanopartikel durchgeführt, um eine simultane Messung der Kombination beider Einzelsystemen zu gewährleisten (Kapitel 3.2 ff.).

3.2 Anwendungen und Leistungsfähigkeit des AFFM- Meßsystems

Die Kombinierbarkeit der Rasterkraftmikroskopie mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Methoden ist bei der Kombination beider Einzelsysteme vielfältig und für unterschiedliche Anwendungen durch geringe Veränderungen am gesamten, modular aufgebauten Meßsystem realisierbar. Im nachfolgendem werden die prinzipiellen Möglichkeiten an teils unveröffentlichten Beispielen dargestellt.

3.2.1 Simultanes AFM-Imaging mit Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Durch die im Vorfeld dargestellten Anpassungen beider Einzelsysteme aufeinander war es möglich, simultan die Probentopographie und das entsprechende Fluoreszenzbild zu erfassen. Dabei wurde die Probe zwischen dem Objektiv und der AFM Cantileverspitze durch den positionspräzisen Probenscanner zeilenweise abgerastert. Bei Verwendung von Objektträgern als Probenunterlage ist es lediglich möglich mit der Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie die fluoreszierende Probe zu detektieren aufgrund der Dicke von ca. 1mm. Limitierend dabei ist die geringe numerische Apertur des zu verwendenden 40x Objektivs (NA 0.95, Olympus, Hamburg). Bei Verwendung von Glasprobenträgern mit der Stärke #0 (150µm) ist die Verwendung eines 60x Wasserimmersionsobjektivs (NA: 1.2; Olympus, Hamburg) möglich,

welche eine höhere optische Auflösung bis hin zur Einzelmoleküldetektion bietet und hauptsächlich bei den Durchlicht-Aufnahmen in diesen Arbeiten verwendet wurde.

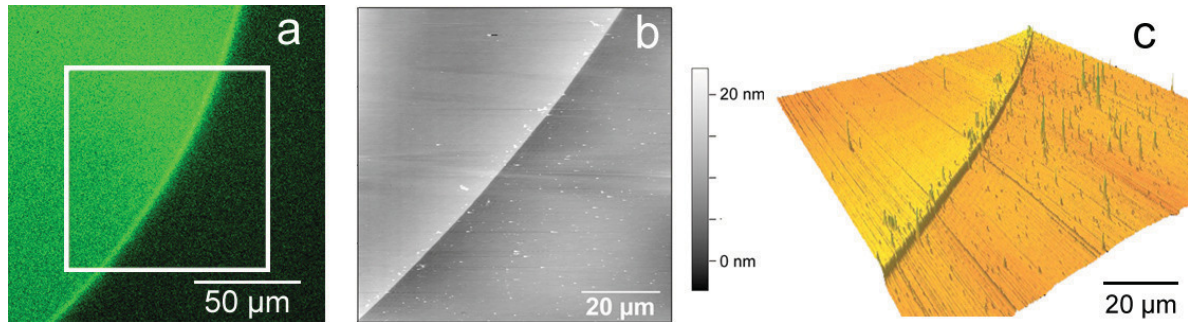


Abbildung 12: Weitefeld-Fluoreszenzaufnahme und AFM-Image flächig angebundener ssDNA-Oligonukleotide. Die DNA wurde Mithilfe des Fluoreszenzmarkers SybrGreen II markiert (a) und simultan zeilenweise mit dem AFM im markierten Bereich (a, weißer Rahmen) gescannt (b), da der maximal mögliche Scanbereich des Probenscanners auf 90µm begrenzt ist. Die DNA-Beschichtung ist deutlich auf dem rekonstruierten 3D-Bild (c) zu erkennen.

In diesem Beispiel (Abbildung 12) wurde ein Borisilikat-Objektträger mit einer Stärke von 1mm chemisch funktionalisiert und die immobilisierte DNA (5'-Amino-modifizierte ssDNA mit 40 Basen; Methode: Publikation I) mit SybrGreen II (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) fluoreszenzmarkiert. Abbildung 12 (a) zeigt das Fluoreszenzbild der kovalent angebondenen ssDNA, welche bei der Immobilisierung als ein Tropfen mit geringem Volumen (ca. 0,5µl) auf die funktionalisierte Glasoberfläche hinzugegeben wurde und die runde Abgrenzung deutlich zu erkennen ist. In dem markierten Bereich wurde simultan ein AFM-Oberflächenbild aufgenommen (Abbildung 12, b), welcher deutlich die flächige Erhöhung (Abbildung 12, c) durch die angebundene DNA zeigt und mit dem Fluoreszenzbild korreliert.

3.2.2 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie mit evaneszenter Anregung (TIRF)

Um oberflächennahe (bis ca. 200nm entfernt), fluoreszierende Moleküle oder fluoreszenzmarkierte Moleküle und Nanopartikel mit hoher optischer Auflösung detektieren zu können, wurde das Meßsystem in Anregung und Detektion insoweit angepaßt, daß ein 60x TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)-Objektiv (NA: 1.45; Olympus, Hamburg) verwendet und die Laseranregung daran angeglichen wurde durch die Verlagerung der vorangestellten Fokuslinse und des Strahlenführung. Die Vorzüge der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie mit evaneszenter Anregung (TIRF) im Vergleich zur herkömmlichen Durchlicht-Methode sind speziell für die Adressierung und Manipulation einzelner Moleküle und Nanopartikeln von Bedeutung (Kapitel 3.2.4 & Kapitel 3.2.5). Der Laserstrahl wird bei der TIRF-Methode im Deckglas totalreflektiert und lediglich eine evaneszente Welle dringt mit exponentiell abfallender Anregungsintensität ins Medium ein und regt in diesem sehr schmalen Bereich die Fluoreszenz an. Mit dieser Methode lassen sich auch einzelne Moleküle oder beispielsweise makroskopische Strukturen und Zellen untersuchen, bei denen normalerweise das oberflächennahe Signal vom Hintergrundstreulicht überdeckt werden würde.

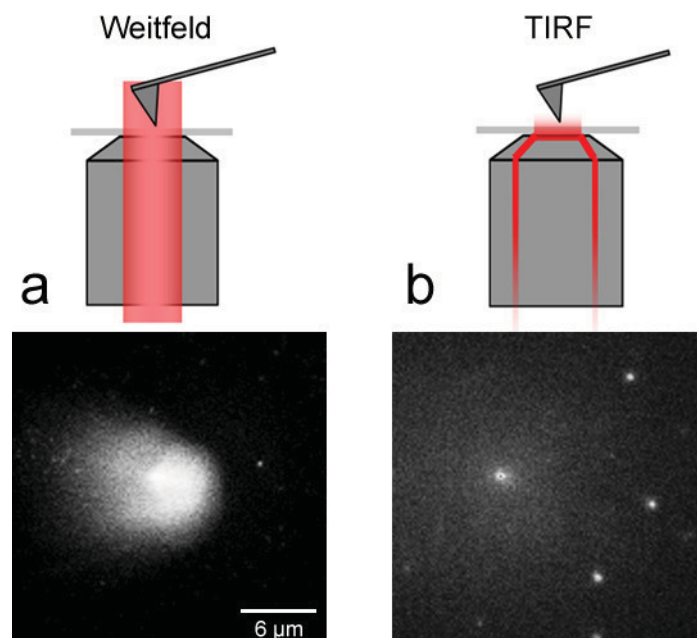


Abbildung 13: Vergleich zwischen Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie und mit evaneszenter Anregung. Im Gegensatz zur herkömmlichen Anregungsmethodik (a) sind die Cantileverspitze und die kovalent oberflächengebundenen fluoreszenzmarkierten DNA-Moleküle bei der evaneszenten Anregung (b) deutlich simultan erkennbar und auch unterscheidbar.

Der Unterschied zwischen der Standard-Anregung und der TIRF-Methode ist in Abbildung 13 anhand einer Cantileverspitze in Oberflächenkontakt auf einer mit fluoreszenzmarkierten, immobilisierten ssDNA Probenoberfläche dargestellt. Die Vorzüge der TIRF-Methode sind deutlich zu erkennen, da die Cantileverspitze und die Fluorophore im EMCCD-Kamerabild deutlich identifizierbar und unterscheidbar sind (Abbildung 13, b). Die gewöhnliche Weitfeld-Methode regt prinzipiell eine größere Fläche des Cantilevers an, unabhängig von ihrer Entfernung zur Probenoberfläche, wodurch die Detektion und Lokalisierung der Probenmoleküle und Cantileverspitze im gleichen Bild durch die hohe Autofluoreszenzintensität des Cantilevers deutlich erschwert wird (Abbildung 13, a).

Durch die Kombination mit evaneszenter Fluoreszenz-Anregung ist die Lokalisierung der Cantileverspitze und oberflächennaher Probenmoleküle mit hoher optischer Auflösung möglich und öffnet den Weg für Einzelmolekül-Anwendungen wie z.B. der Nanomanipulation (Kapitel 3.2.5 & Kapitel 6).

3.2.3 Simultanes AFM-Imaging mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Durch die modulare Bauweise der einzelnen Komponenten ist es weiterhin möglich, das AFM mit seinem Probenscanner optional auf einen eigens angefertigten MFD-Aufbau (Multi Fluorescence Detection) zu befestigen, wodurch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit der rasterkraftmikroskopischen Methode kombiniert werden kann. Die Vorteile der konfokalen Mikroskopie liegen darin, daß die indirekte, optische Auflösung höher ist als bei herkömmlichen weitfeldmikroskopischen Methoden und gleichzeitig die Möglichkeit besteht, quantitative zeitliche und räumliche Informationen über Bindungen und Interaktionen zwischen Biomolekülen (Proteine, Lipide, Enzyme, DNA und RNA) in vivo durch die FRET-Applikation (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) zu erhalten. Bei dieser Methode wird die Energie von einem angeregten, fluoreszierenden Donor-Molekül ohne Beteiligung eines Photons auf ein fluoreszierendes Akzeptor-Molekül übertragen (Förster, 1948). Dabei wird im Prinzip die Emission des Akzeptors durch die Energieübertragung des Donor-Moleküls ermöglicht, während gleichzeitig die Fluoreszenzemission des Donor-Moleküls selbst reduziert wird.

Bei der Kombination im AFFM-Meßsystem wird die Cantileverspitze des AFM auf die maximale Anregungsintensität, welches gleichzeitig der vertikale symmetrische Mittelpunkt des konfokalen Volumens darstellt, ausgerichtet (Abbildung 14, c), sodaß das

topographische AFM-Bild mit dem Fluoreszenzbild überlagert werden kann (Abbildung 14, a & b). Zu der gemessenen Oberflächenstruktur erhält man somit an jedem Punkt des Bildes die entsprechenden Fluoreszenzdaten.

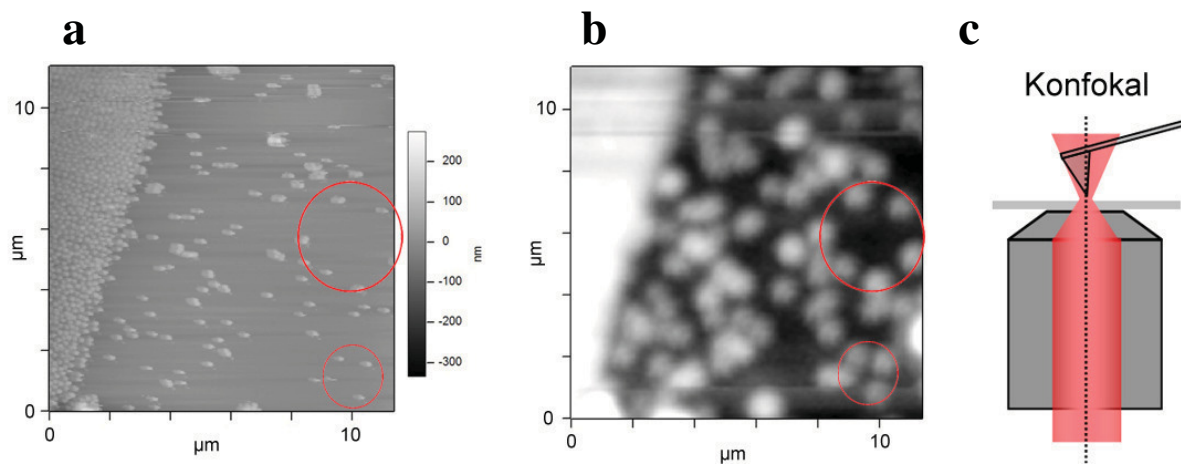


Abbildung 14: AFM-Imaging in Kombination mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie an kovalent angebondenen, fluoreszierenden Nanopartikel. (a) Topographische Aufnahme der oberflächengebundenen, fluoreszierenden Nanopartikel (FluoSpheres). Positionsgenau sind im Fluoreszenzbild (b) die fluoreszierenden Nanopartikel wiederzuerkennen. Die rot markierten Bereiche zeigen die gleiche Anzahl und Position der FluoSpheres aus beiden Datenmengen. Die Überlagerung des konfokalen Volumenmittelpunktes mit der AFM-Cantileverspitze ist schematisch in (c) dargestellt.

Die Charakterisierung dieses kombinierten Meßsystems erfolgte anhand von fluoreszierenden kovalent gebundenen Nanopartikeln mit einer Größe von 100nm (FluoSpheres F8803, Invitrogen, Paisley, United Kingdom), welche im grünen Spektralbereich fluoreszieren. Hierbei wurde wie in Abbildung 9 schematisch dargestellt, zunächst nur ein Photonendetektor (APD; Avalanche Photodiode) verwendet, welcher zu jedem Punkt im Verlauf des Probescans die entsprechende Photonenzahl liefert. Die aus der Topographie erkennbaren Nanopartikel (Abbildung 14, a; Rot umrandet) sind an der gleichen Bildposition im rekonstruierten Fluoreszenzbild zu erkennen (Abbildung 14, b; Rot umrandet).

Durch Variationen in der Anregung und Detektion ergeben sich vielfältige Möglichkeiten der kombinierten Anwendung sowohl für das bildgebene Verfahren als auch für die kraftspektroskopische Anwendung. Dazu gehören simultane FRET- Messungen oder auch Messungen zweier unterschiedlicher Fluorophore durch eine Zweistrahlenerregung mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen.

3.2.4 Adressierung und AFM-Imaging von Nanopartikel

In projektbezogener Zusammenarbeit mit Frau Dr. Olga Franco (AG Nanoanalytics, HHU) entwickelte sie eine erweiterte Softwarekomponente, wodurch es möglich wurde, aus dem EMCCD-Kamerabild durch zweidimensionalen Gauß'schem Fit die Positionen einzelner fluoreszierender Moleküle und Nanopartikel zu bestimmen. Zusätzlich ist es dadurch möglich, die Position der AFM-Cantileverspitze im Oberflächenkontakt relativ zu den weiteren Molekülen bzw. Partikeln im gleichen Bild zu bestimmen (Abbildung 15, a). Durch diese Methodik ist eine präzise Adressierung einzelner Moleküle, Partikel oder bestimmter fluoreszenzmarkierter Regionen makroskopischer Proben (z.B. Zellen) für kraftspektroskopische und nanomanipulatorische Anwendungen möglich.

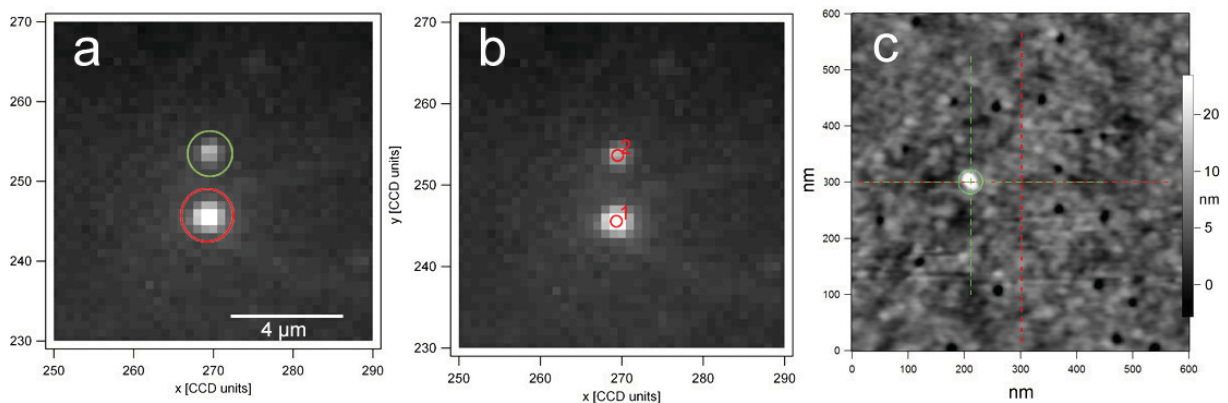


Abbildung 15: Positionsbestimmung von Nanopartikel und Cantileverspitze zur präzisen Adressierung. Die Fluoreszenz-Aufnahme von Partikeln auf der Oberfläche (a, grün) und der Cantilever-Spitze im Oberflächenkontakt (a, rot) ermöglicht das Adressieren der Probe anhand relativer Positionsbestimmung (b) zueinander. In diesem Beispiel wurden fluoreszierende, kristalline 20nm-QuantumDot-Kolloide (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) adressiert und topographisch mit dem AFM vermessen (c). Die AFM-Aufnahme wurde mit dem Sollmittelpunkt der Probe (rot gestrichelt) und dem realen Mittelpunkt (grün gestrichelt) überlagert, welcher unter Annahme einer kreisrunden Probe angenähert wurde (grüner Kreis). Es ergab sich eine Adressierungspräzision in diesem Beispiel von etwa $X=89.4\text{nm}$ und $Y=1.1\text{nm}$.

3.2.5 Nanomanipulation an unterschiedlichen Nanopartikeln

Im Zuge der Entwicklung des AFFM-Meßsystems mit dem Ziel eines Einzelmolekültransportes, wurde das Meßsystem auf seine manipulatorischen Fähigkeiten hin getestet und optimiert. Dabei war es Relevant, anhand der Fluoreszenzbilder die Positionen

für die Adressierung zu determinieren und simple manipulatorische Bewegungen auszuführen, welche für die grundlegende Methodik des Einzelmolekültransportes essentiell sind.

In diesem Zusammenhang wurden die schon zuvor in Kapitel 3.2.3 erwähnten FluoSpheres verwendet mit einem Durchmesser von 100nm und einer Fluoreszenzemission im grünen Wellenlängenbereich. Diese bestehen aus im Wesentlichen aus Polystyrol, in denen während des Herstellungsprozesses eine hohe Anzahl von Fluorophoren eingelagert werden. Die Nanopartikel wurden unspezifisch an eine 150µm starke Borosilikat-Glasunterlage gebunden, so daß prinzipiell ein Verschieben und Aufnehmen dieser Nanopartikel möglich war.

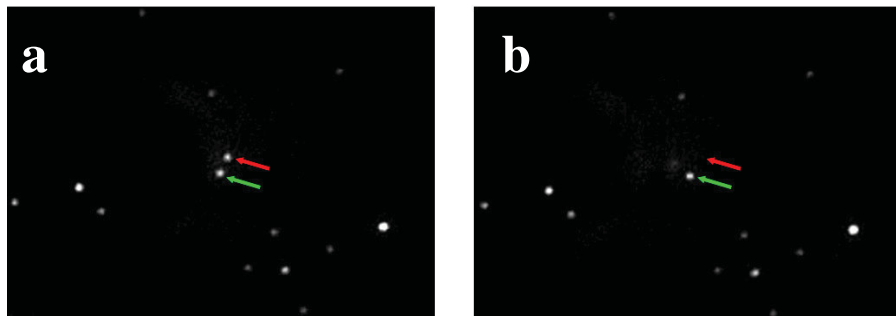


Abbildung 16: „Aufnehmen“ eines fluoreszierenden Nanopartikels mittels der AFM-Cantileverspitze. Fluoreszenzaufnahme von FluoSpheres an einer Glasoberfläche. Hierbei wurde die Position eines Nanopartikels bestimmt (a, roter Pfeil) und anschließend adressiert und durch unspezifische Bindung an der AFM-Cantileverspitze von der Oberfläche aufgenommen (b, roter Pfeil).

Mit Hilfe der TIRF-Methode wurde die Position dieser Nanopartikel bestimmt, mit der AFM-Cantileverspitze adressiert und durch die unspezifische Bindung der Nanopartikel an der Siliziumnitride-Spitze von der Oberfläche aufgenommen (Abbildung 16).

Für manipulatorische Anwendungen wurde anhand dieses Beispiels methodisch gezeigt, daß man diese Nanopartikel auch gerichtet verschieben kann. In diesem Beispiel wurde die Cantileverspitze neben einem Nanopartikel an die Oberfläche gebracht und gerichtet durch präzise Proben-scanner-Bewegungen verschoben (Abbildung 17).

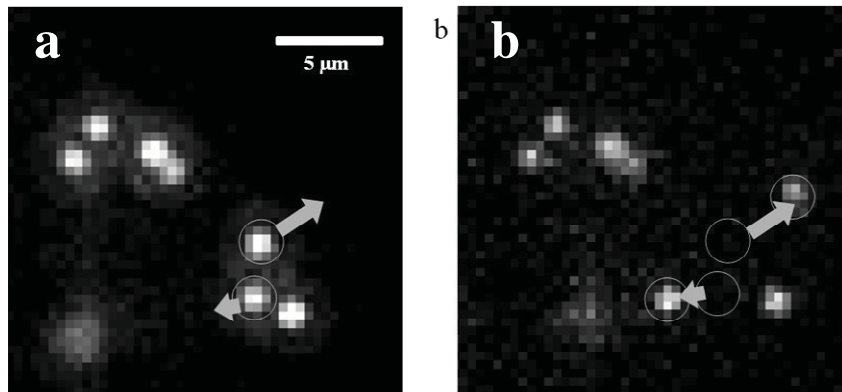


Abbildung 17: Gerichtetes Verschieben einzelner fluoreszierender Nanopartikel mit der AFM-Cantileverspitze. Fluoreszenzaufnahme von FluoSpheres an einer Glasoberfläche. Die Position der Nanopartikel wurde determiniert (a, Eingekreist) und in die vorherbestimmten Richtungen (Pfeile) um mehrere Mikrometer durch die AFM-Cantileverspitze verschoben (b).

Die Positionsbestimmung und präzise Adressierung einzelner Nanopartikel wurde auch gezeigt an Experimenten mit 100nm großen Goldpartikeln, welche auf 150µm starken Borosilikat-Deckgläser adsorbierten (Abbildung 18). Die Detektion der Partikel erfolgte über ihre Streulicht-Emission und die Positionsbestimmung über eine zweidimensionale Gaußanpassung der Fluoreszenzbilder.

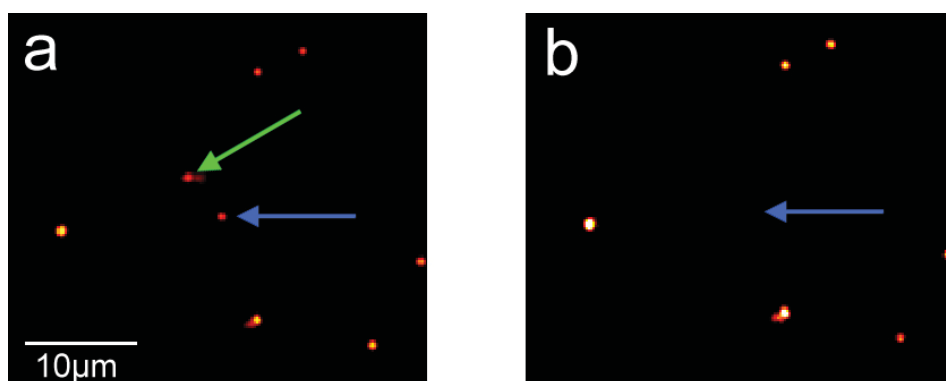


Abbildung 18: Adressierung und „Aufnehmen“ von Gold-Nanopartikel. Die relative Position des Goldpartikels (a, blauer Pfeil) zur AFM-Cantileverspitze (a, grüner Pfeil) wurde durch Gaußanpassung bestimmt und der Proben-scanner um diese x-y-Distanzen bewegt, so daß mit der Cantileverspitze an der exakten Position des Nanopartikels dieser durch unspezifische Bindung „aufgenommen“ werden konnte (b, blauer Pfeil).

Die präzise Adressierung und das Verschieben einzelner Probenbestandteile findet besondere Bedeutung bei lithographischen Methoden [Sun04, Sal07] und einfachen manipulatorischen Anwendungen, wie beispielsweise das kontrollierte „Schneiden“ von DNA-Strängen [Jun05]. Eine Erweiterung der Möglichkeiten ergibt sich durch die Oberflächenanbindung (Kapitel 5) von spezifischen Molekülen an der AFM-Cantileverspitze, wie beispielsweise das Erkennen bestimmter Moleküle durch spezifische Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen (Kapitel 6) bei dem systematischen Abrastern der Probenoberfläche durch eine Vielzahl von Kraftkurven (Molecular Force Recognition Spectroscopy) [Hin06].

3.3 Funktionserweiterungen durch eigene Softwareentwicklung

Für die unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten und Experimente wurde im Laufe der Entwicklung anwendungsspezifische Erweiterungen in der Entwicklungsumgebung IGOR (Wavemetrics, USA) programmiert, in welche die Steuerung des Rasterkraftmikroskopes integriert ist. In diesem Zusammenhang war die erweiterbare Steuerungssoftware der in Verbindung mit dem dazugehörigen Controller, welcher zusätzlich über die Software direkt angesteuert und programmiert werden konnte, von großer Bedeutung für die Entwicklung eines kombinierbaren und vielfältig einsetzbaren AFFM-Meßsystems. Im folgendem werden die Softwareerweiterungen gemäß ihrer Anwendungsmöglichkeit, welche in der Arbeit Verwendung fanden, näher erläutert.

3.3.1 Softwareerweiterungen für konfokale AFFM-Mikroskopie

Softwareerweiterungen spielten bei der AFM-Kombination mit der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie zur Registrierung, Speicherung und späterer positionsbezogener Korrelierung der Fluoreszenzdaten mit den topographischen Daten eine wichtige Rolle. Dabei werden die Signale der Photodioden (APD) durch Anschluß an den AFM-Controller gemeinsam mit aufgezeichnet. Die Speicherung der Topographie-Daten und der zusätzlichen Fluoreszenzdaten verlief synchron, so daß die positionsbezogenen Daten direkt überlagert werden konnten. Prinzipiell ist der Anschluß mehrerer Photodioden möglich, um auch

Methoden wie FRET und Zweistrahl-Anregung durchführen zu können. Ein Beispiel mit Daten einer einzigen Photodiode bei der konfokalen AFFM-Mikroskopie ist in Kapitel 3.2.3 (Abbildung 14) dargestellt.

3.3.2 Software für Rezeptor-Ligand Wechselwirkungsmessungen

Für diese Art der Anwendung wurde eine Erweiterung zur autonomen kraftmikroskopischen Messung programmiert, welche für alle Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen Verwendung finden und die auch bei der Messung der Proteinfaltung von NpSR II (Kapitel 4) verwendet wurde (Publikation III). Des Weiteren wurde der experimentelle Vorgang insoweit automatisiert, daß die programmierte Erweiterung (Abbildung 19) in der Lage war, über zuvor definierte Positionen (Pattern) eine unbegrenzte Anzahl an Kraftkurven kontinuierlich durchzuführen (auch als ForceVolume bezeichnet). Dabei konnte die Meßpunkt-Auflösung bzw. der Abstand zwischen den einzelnen Punkten bis in den Nanometerbereich definiert werden (Scale) und auch die absolute Position (Offset X, Offset Y) der Punktmatrix innerhalb des gesamten Scanbereiches (ca. 90µm). Die festgelegten Positionen konnten auf vorhandene Topographie-Messungen dargestellt werden (Show Pattern), um somit die Meßpunkte in experimentell relevanten Bereichen zu definieren (Beispiel: Kapitel 4, Abbildung 27). Während der Probenverschiebung zwischen den einzelnen Kraftmessungen konnte ein zusätzlicher Sicherheitsabstand (Safety withdraw distance) zwischen Cantilever-Spitze und Probenoberfläche eingestellt werden, um eventuelle Kollisionen mit Erhöhungen in der Probe oder durch eine Schräglage der Probe zu vermeiden.

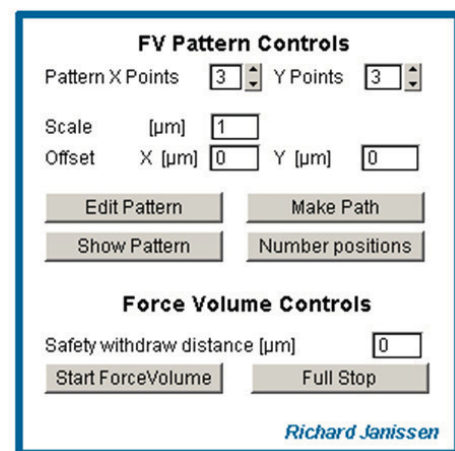


Abbildung 19: ForceVolume Steuerungs-Panel.

3.3.3 Software zur Steuerung der EMCCD-Kamera

Um die EMCCD-Kamera direkt durch die AFM-Software ansteuern und die Bilddaten einlesen zu können, wurde eine Treiberbibliothek für die Hardware-Schnittstelle und ein intuitives Steuerungspanel programmiert (Abbildung 20). Der enorme Vorteil dieser Softwareerweiterung liegt darin, daß eine kameraspezifische Zusatzsoftware nicht weiter notwendig ist und die Daten für die weitere Bildanalyse ohne zusätzliche Konvertierung und Zeitaufwand direkt vorliegen. Anhand der Softwareerweiterung können die wichtigsten Parameter zur Bildaufnahme und Kamera-Steuerung aus der Hardware ausgelesen und neu definiert werden. Das Aktualisierungsintervall für alle dynamischen Parameter (z. B. Temperatur, Peltierkühler-Zustand, Lüfterkontrolle, Kameraverschluß-Zustand) beträgt eine Sekunde, um das System in Bezug auf simultane kraftspektroskopische Anwendungen mit möglichst wenig Prozessorleistung zu belasten.

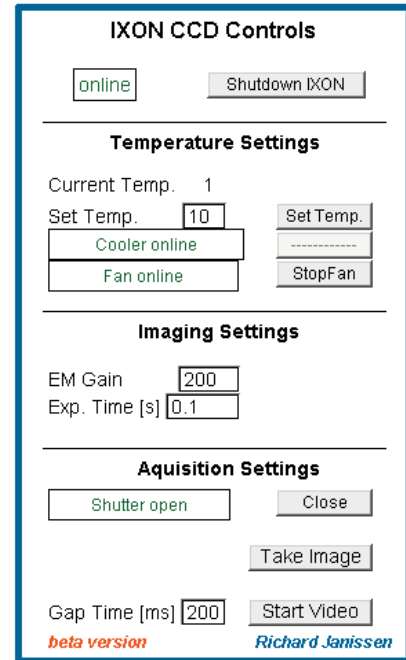


Abbildung 20: EMCCD Steuerungs-Panell

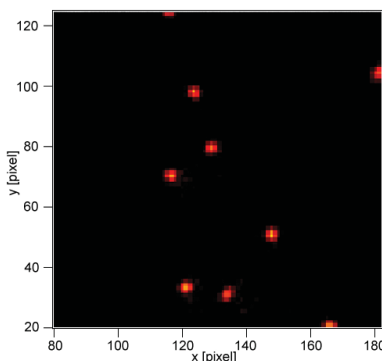


Abbildung 21: EMCCD-Aufnahme von adsorbierten Goldpartikel auf einer Borosilikat-Glasoberfläche.

Aufgrund von störenden Schwingungen des Kamera-Lüfters (Kapitel 3.1.1), welche sich negativ auf Kraftkurven und hochauflösende Oberflächentopographie-Messungen auswirken, kann dieser manuell abgeschaltet werden (StopFan), und durch eine schwingungsarme Wasserkühlung ersetzt werden. Aus Sicherheitsgründen wurde bei der Initialisierung der Kamera-Hardware auf eine automatische Abschaltung des Lüfters, die automatische Aktivierung des Peltier-Kühlers und die automatische Öffnung des Kamera-Verschlusses (Shutter)

absichtlich verzichtet, welche manuell je nach Anwendung aktiviert oder deaktiviert werden können. In dem Steuerungs-Panell werden die relevanten Parameter für die Bildaufnahme (Exposure Time, EM-Gain) definiert und es können sowohl Einzelaufnahmen (Beispiel: Abbildung 21), als auch „Videos“ mit definierbarer Bildrate (indirekt beeinflusst über Gap-Time, welches die Zeit zwischen mehreren Einzelaufnahmen definiert) durchgeführt werden.

3.3.4 Software für den Einzelmolekültransport

Bei dieser nanomanipulatorischen Anwendung (Kapitel 6) wurden die zuvor beschriebenen Softwareerweiterungen miteinander kombiniert und weiter ergänzt (Abbildung 22). Diese

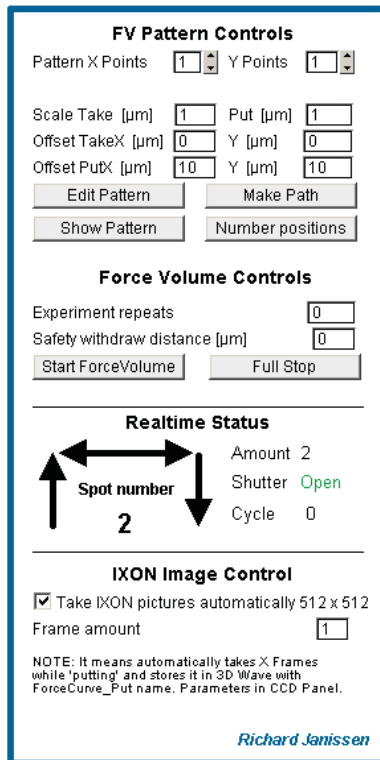


Abbildung 22: Erweiterte ForceVolume-Steuerung für den Einzelmolekültransport.

spezifische Erweiterung basiert prinzipiell auf der ForceVolume-Software (Kapitel 3.3.2), wobei in dieser Ergänzung zwei Meßpunkt-Matrizen gleicher Punktanzahl definiert werden. Dabei wird eine Matrix als *Take*-Matrix und eine weitere als *Put*-Matrix definiert. Im Falle des Einzelmolekültransports definieren diese die Bereiche des Aufnehmens und des Deponieren des Moleküls. Dabei kann jede Matrix über eine unterschiedliche Gesamtgröße bzw. Meßpunkt-Auflösung und Position verfügen, welches für die Methode zwingend notwendig ist. Das gesamte Experiment kann mehrfach wiederholt werden (Experiment repeats) und zeigt stets den aktuellen Status (Meßpunkt-Nummer, Wiederholung, Bewegungsrichtung des Cantilevers und des Probenscanners) in Echtzeit an. Eine der wichtigsten Ergänzungen in diesem Zusammenhang ist die Implementierung einiger Komponenten, welche für die simultane EMCCD-Bildaufnahme verantwortlich sind.

Somit ist es bei dieser Software möglich, die eingelesenen Bilddaten, welche bei dem Schritt der Einzelmolekül-Deponierung (Put) beginnen mit einer definierbaren Anzahl an Bildern (Frame amount), automatisch zu speichern. Das zuvor in Kapitel 3.3.3 erwähnte Steuerungs-Panels für die EMCCD-Kamera wird gleichzeitig mit dieser Software initialisiert und die relevanten Bildaufnahme-Parameter (EM-Gain, Exposure Time) werden entsprechend bei der automatischen Bildaufnahme übernommen. Gleichzeitig wird ein zusätzlicher Shutter, welcher sich im Laser-Strahlengang befindet, automatisch geöffnet, sobald die Bildaufnahme beginnt, und nach Beendigung der Kraftkurve wieder geschlossen. Dies dient zur Verringerung des Bleichens der Fluorophore. Die Daten der aufgenommenen Einzelbilder werden in einer dreidimensionalen Tabelle gespeichert, welche die gleiche fortlaufende Nummer in dem Tabellennamen trägt wie die entsprechende Kraftkurve, die für die Deponierung eines einzelnen Moleküls zuständig ist (*Put*-Prozeß). Somit wurde eine spätere Analyse der Bilddaten und der dazu entsprechenden Kraftkurvendaten deutlich vereinfacht.

Durch diese Software können somit Einzelmolekültransport-Experimente autonom mit simultaner Fluoreszenzdetektion und Speicherung sämtlicher fluoreszenz- und kraftspektroskopischer Daten standardmäßig durchgeführt werden.

4 – Entfaltung des Retinalproteins NpSRII

Dieses Kapitel basiert auf der Publikation III (II) im Anhang. Die Arbeiten zu diesem Thema erfolgten in projektbezogener Zusammenarbeit mit Frau Leoni Oberbarnscheidt M.Sc. (AG Nanoanalytics, HHU).

4.1 Einleitung

Die Entdeckung der Archaeobakterien Ende der 70er Jahre brachte die bis dahin allgemein akzeptierte Einteilung der Lebewesen in Prokaryoten (Bakterien) und Eukaryoten (Lebewesen mit Zellkernen) durcheinander, da Archaeen zwar offenbar Bakterien sind, aber genetisch enger mit den Eukaryoten verwandt sind, als die herkömmlich bekannten Bakterien, welche auch als Eubakterien bezeichnet werden [May98]. Archaeen sind vor allem deshalb von Interesse, weil sie in unterschiedlich extremen, äußerst lebensfeindlichen Bedingungen (Temperaturen über 100°C, saure Umweltbedingungen bei ca. pH 0, in gesättigten Salzlösungen) angetroffen werden, wo sie eine Vielzahl von Strategien zum Überleben und zur Energiegewinnung unter extremen Umständen entwickelt haben. Hierzu müssen sie Reize aus der Umgebung aufnehmen, sie verstärken, in zelluläre Signale umsetzen und schließlich muß die Antwort der Zelle auf die extrazelluläre Herausforderung gesteuert werden. Diese Reaktion kann sowohl genetischer als auch lokomotorischer Natur sein. Schon im ausgehenden 19. Jahrhundert wurde die Reaktion von Bakterien auf chemische Reize und Licht beschrieben [Eng82, Pfe83].

Zu den bekanntesten Vertretern der Archaeen zählen die Halobakterien mit ihrer charakteristischen Purpurfarbe. Sie sind in der Natur weit verbreitet und leben unter hoher Sonneneinstrahlung in gesättigten salzigen Lebensräumen. Das *Halobacterium salinarum* als Vertreter der Archaeen, besitzt in diesen extremen Umweltbedingungen neben der aeroben

Atmung zwei anaerobe Prozesse, die Argininfermentation und die Photosynthese. In seiner Zellmembran sind verschiedene Transmembranproteine eingebettet, welche unterschiedliche Funktionen übernehmen (Abbildung 23).

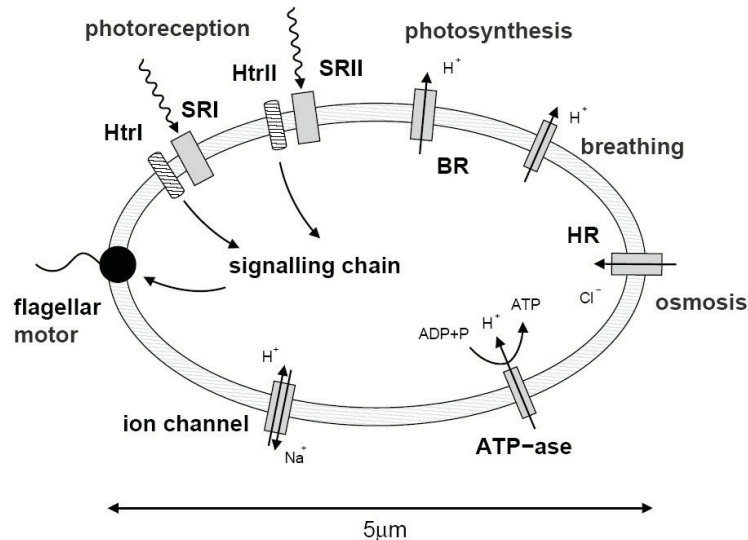


Abbildung 23: Schematische Darstellung des *Halobacterium salinarum* mit seinen wichtigsten Membranuntereinheiten als Beispiel für die Funktionen der verschiedenen Transmembranproteine (nach MPI Biochemie, Oesterhelt). In der Zellmembran befinden sich verschiedene Transmembranproteine: Bakteriorhodopsin (BR), Halorhodopsin (HR), Sensorrhodopsin I (SRI) und Sensorrhodopsin II (SRII), die ATPase, ein Flagellenmotor, sowie weitere Ionenkanäle.

Zu den Transmembranproteinen zählen vier verwandte Retinalproteine (Bakteriorhodopsine, Halorhodopsine, zwei Arten von Sensorrhodopsinen) sowie Ionenkanäle, ATP-asen zur ATP-Bildung und ein Flagellenmotor, mit dessen Hilfe sich die Zelle schwimmend fortbewegen kann. Das Archebakterium *Halobacterium salinarum* exprimiert vier verschiedene bakterielle Rhodopsine, die in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen, den Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR), sowie den sensorischen Rhodopsinen SRI und SRII aufgeteilt werden (Abbildung 24), welche auch bei einer Vielzahl anderer Achaeen gefunden werden konnten.

Besondere Aufmerksamkeit soll hier den archaebakteriellen, sensorischen Rhodopsinen (SRI & SRII) gewidmet werden. Sie zeigen die gleichen Strukturmerkmale, die sich für alle Rhodopsine finden lassen. Sie durchspannen die Membran in Form von sieben transmembranen α -Helizes, welche eine Bindungstasche für das kovalent über eine

protonierte Schiff'sche Base (SB) gebundene Retinal-Chromophor bilden. Die Einstrahlung sichtbaren Lichtes führt zu einer Aktivierung dieser Pigmente, die daraufhin einen sogenannten Photozyklus durchlaufen. Im Gegensatz zum Rhodopsin aus höheren Organismen, welches ein G-Protein bindet und darüber eine electrophysiologische Reaktion in Gang setzt, ist das archaebakterielle System einfacher aufgebaut und daher für Untersuchungen leichter zugänglich.

Dieser primitive bakterielle Sehprozeß, die sogenannte Phototaxis, läßt sich am Beispiel archaebakterieller Organismen, wie z.B. *Halobacterium salinarum* oder *Natronobacterium pharaonis* beobachten. Unter neutralen bzw. konstanten Lichtverhältnissen wechseln die zur Fortbewegung dienenden, rotierenden Flagellenbündel etwa alle 10 Sekunden ihre Drehrichtung. Dies führt zu einer ungerichteten, statistischen Bewegung des Bakteriums [Spu88]. Wird das Bakterium mit schädlichem blauem Licht bestrahlt, reagiert es mit einer Erhöhung dieser Schaltfrequenz, während eine Bestrahlung mit orangenem Licht zu einer Erniedrigung der Schaltfrequenz führt. Als Gesamteffekt läßt sich eine Fluchtbewegung weg von blauem Licht und hin zu orangefarbenem Licht beobachten. Damit versetzt die Fähigkeit zur Phototaxis diese Bakterien in die Lage, sich in Richtung der Lichtverhältnisse zu bewegen, die für die Funktion der ebenfalls in der Zellmembran befindlichen lichtgetriebenen Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) optimal sind [Hil75, Mar90]. Diese bakteriellen Rhodopsine nutzen das Sonnenlicht als Energiequelle für die Translokation von Protonen (BR) bzw. Chlorid-Ionen (HR) über die Zellmembran. Damit erzeugen sie eine protonenmotorische Kraft, welche das Bakterium zur Synthese des Energieträgers ATP nutzt.

Als Verantwortliche für die phototaktischen Fähigkeiten konnten die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII genauer identifiziert werden: SRI vermittelt die photophile Antwort des Bakteriums auf orangenes Licht, ebenso wie, über ein langlebiges Photointermediat, die photophobe Reaktion auf blaues bzw. UV- Licht. Das SRII wurde als zusätzlicher, ebenfalls für die photophobe Reaktion auf blaues bzw. UV-Licht verantwortlicher, Rezeptor identifiziert [Bog82, Spu84].

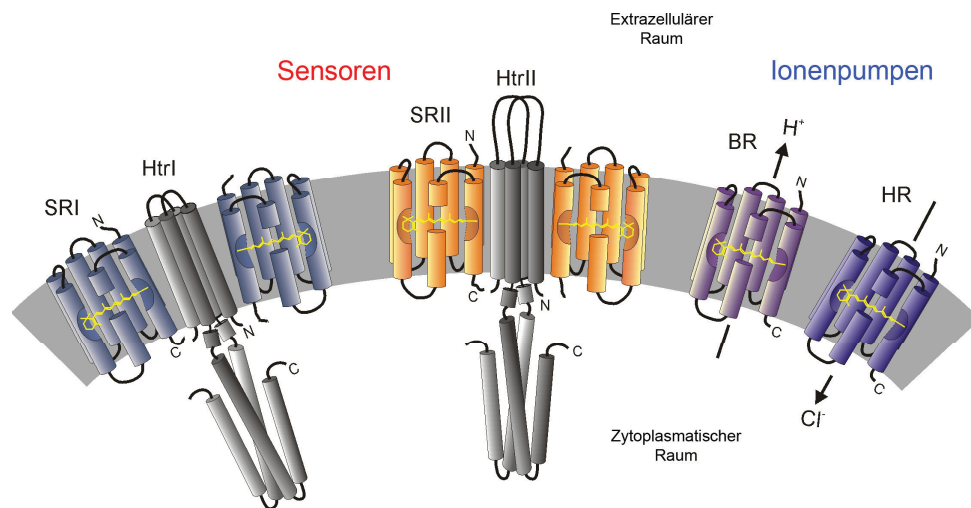


Abbildung 24: Schematische Darstellung der archaebakteriellen, transmembranen Retinalproteine [Kla04]. Die Darstellung der sensorischen Rhodopsine SRI und SRII mit ihren Transducern HtrI und HtrII als Komplexe mit einer 2:2 Stöchiometrie beruht auf Veröffentlichungen von Chen und Spudich [Che02] für (SRI:HtrI) sowie Wegener *et al.* [Weg01b] für (SRII:HtrII). Das Retinal als Chromophor der Retinalproteine ist gelb eingezeichnet.

Die sensorischen Rhodopsine bilden in der Plasmamembran jeweils einen 2:2 Komplex mit einem entsprechenden „halobacterial transducer protein“, welches folglich als HtrI bzw. als HtrII gekennzeichnet wird (Abbildung 24) [Che02, Weg01b, Gor02]. Diese homologen Transducer-Proteine weisen als Strukturelemente zwei transmembrane α -Helizes sowie eine große zytoplasmatische Domäne auf. Bei den Sensorrhodopsinen SRI und SRII ist die Signaltransduktion mit einer strukturellen Konformationsänderung verbunden, welche zur Signalübertragung an das gekoppelte Transducer-Protein führt [Mar99]. Diese sind für die Weiterleitung des detektierten Ereignisses an eine komplexe biochemische Signalkette im Zellinneren verantwortlich, die schließlich zu einer Steuerung der Zellbewegung führt.

Der SRII Photorezeptor aus *Natronobacterium pharaonis* (NpSRII) zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit gegenüber dem Rezeptor aus *Halobacterium salinarum* auf, besitzt jedoch eine höhere Stabilität in Bezug auf pH-Wert- und Ionenstärke-Variationen und ist daher als Untersuchungsobjekt besonders geeignet. Um den Mechanismus der Phototaxis zu untersuchen, wurden kristallographische Untersuchungen [Gor02] an dem Retinalprotein :Transducer Komplex NpSRII:HtrII durchgeführt. Aus der Analyse des NpSRII:NpHtrII-Komplexes konnte bisher jedoch nur der transmembrane Bereich des NpHtrII von Aminosäure 24 – 82 aufgelöst werden, so daß Strukturinformationen über die restlichen Bereiche noch fehlen. In der Abbildung 25 ist die bisher bekannte Kristallstruktur dargestellt,

wobei der rotationssymmetrische Aufbau des Komplexes deutlich wird (Abbildung 25, a). Das NpSRII (rot) und NpHtrII (grün) sind in der Membran über die beiden transmembranen Helizes TM1 und TM2 des Transducers und die Helizes F und G des Rezeptors assoziiert.

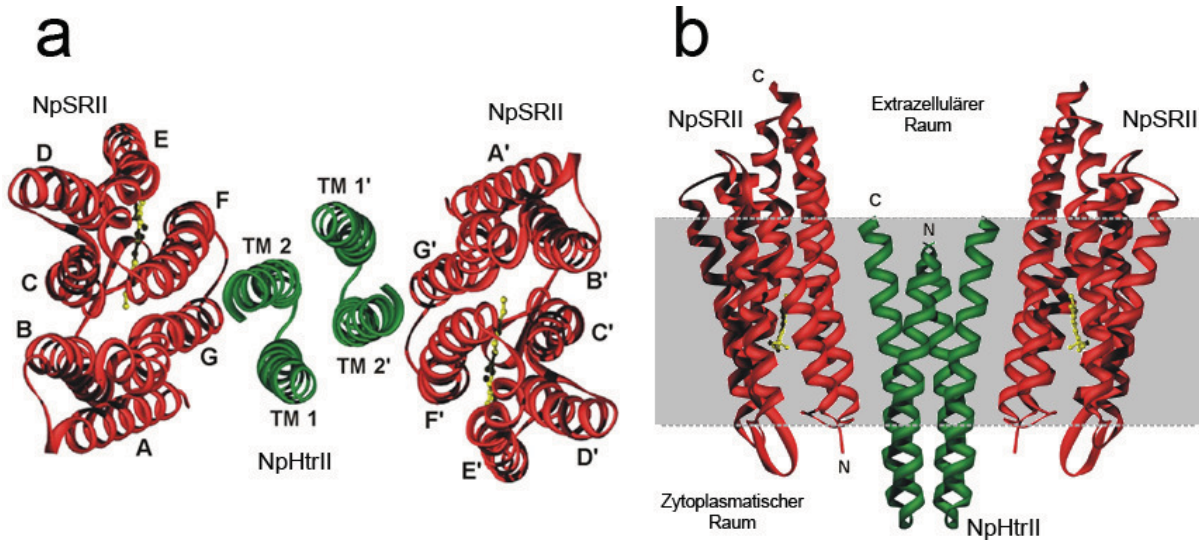


Abbildung 25: Kristallographisch ermittelte Struktur des 2:2 Komplexes aus NpSRII und NpHtrII [Kla04]. (a) Kristallstruktur des 2:2 Komplexes aus NpSRII (rot) mit dem Retinal-Chromophor (gelb) und NpHtrII₁₁₄ (grün) [Gor02]. Der Blick ist hierbei vom Zytoplasma auf den Komplex gerichtet. **(b)** Seitenansicht der Kristallstruktur des Komplexes innerhalb der Zellmembran (grau), welche die vorwiegend hydrophoben Bereiche der Proteine einschließen und sind nicht notwendigerweise identisch mit den Grenzen der Lipid-Doppelschicht.

Die Struktur des NpSRII ist weitestgehend identisch mit der NpSRII-Struktur im Komplex,

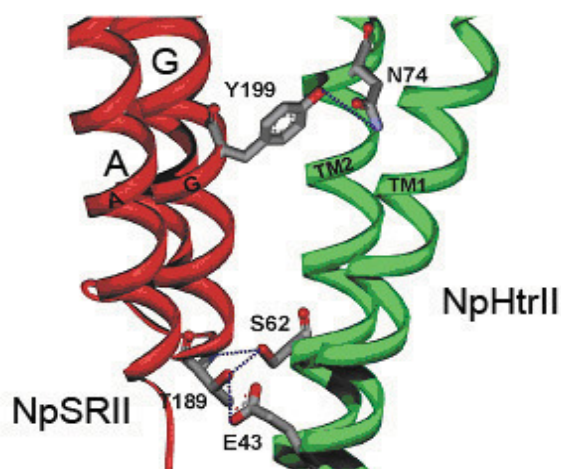


Abbildung 26: Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen NpSRII und NpHtrII [Kla04]. Die Helizes, sowie die an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten Seitenketten, sind entsprechend bezeichnet.

abgesehen von einer Ausnahme (Abbildung 26). Der aromatische Ring des Tyrosins in Position 189 der Helix G des Rezeptors verläßt seine ursprüngliche Ausrichtung und dreht sich um etwa 90° in Richtung des Transducers und geht dann eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff im Asparagin 74 der TM2 des Transducers ein. Darüber hinaus bestehen zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen als Ankerpunkte zwischen Thr-189 in der F-G-Loop-Region des NpSRII und Glu-43

(TM1), sowie Ser-62 (TM2) des Transducers. Ansonsten wird die Kontaktfläche zwischen Rezeptor und Transducer hauptsächlich von van der Waals-Wechselwirkungen bestimmt. Durch diese Wechselwirkungen sind die α -Helizes G des Rezeptors und TM2 des Transducers fest aneinander gekoppelt [Gor02].

Auch zwischen den vier Transducer-Helizes stabilisieren zahlreiche Interaktionen ausschließlich hydrophober Seitenketten den Komplex, die die Verbindung zwischen den beiden 1:1 Hetero-Dimeren bilden. Die Arbeiten von Klare *et al.* [Kla04] zeigen zusätzlich, daß TM1 selbst keine signifikanten lichtinduzierten Konformationsänderungen erfährt. Damit scheint die Transducer-Helix TM1, ebenso wie die Helix G des NpSRII, als Fixpunkte im Signaltransduktionsprozeß zu fungieren.

4.2 Experimentelle Durchführung

Die NpSRII und NpSRII:NpHtrII-Proben wurden von Swetlana Martell am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. M. Engelhard hergestellt. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in der Literatur [Hoh99]. Die Expression der Gene fand im Fall von NpSRII nicht in Eubakterien vom Typ *Escherichia coli* statt. Die mutierten Gene tragen am 3'-Ende eine zusätzliche Sequenz aus sechs Histidinen, welche bei der anschließenden Datenanalyse berücksichtigt wurde. Die Messungen wurden mit rekonstituierten Membranen der Retinalproteine durchgeführt.

Die Kraftmessungen wurden in 20mM TRIS/HCl (pH 7.8) in 300mM NaCl durchgeführt, wobei die Membranstücke zuvor auf einer Glimmer-Oberfläche absorbiert wurden. Die Messungen wurden einerseits ohne Lichtaktivierung, also im Dunkeln, durchgeführt und anschließend mit Lichtaktivierung durch eine 150Watt Xenon-Lampe mit einem Aufreinigungsfiler, welcher bläuliches Licht durchließ (λ : 460-500nm). Vor den Kraftmessungen wurde zunächst die Oberfläche nach zweckmäßigen Membranstücken durch Topographie-Messungen abgesucht (Abbildung 27, a). In geeigneten Regionen wurde mit Hilfe einer Softwareerweiterung (Kapitel 3.3.2) eine Matrix aus Punkten überlagert, an deren Stellen anschließend autonom Kraftkurven kontinuierlich aufgenommen wurden (Abbildung 27, b).

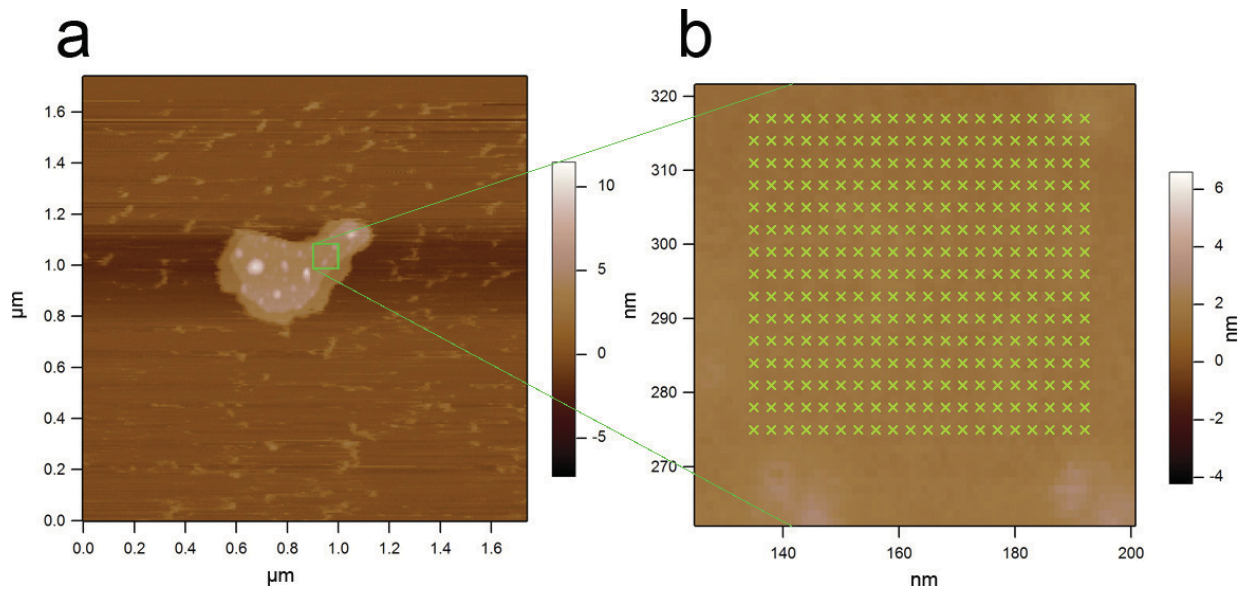


Abbildung 27: Topographisches AFM-Bild eines Membranpatches mit rekonstituiertem NpSR11 und Festlegung der Meßpunkte. Die Oberfläche wurde nach adsorbierten Membranstücken mit dem Retinalprotein NpSR11 durch AFM-Imaging abgesucht (a) und in einem geeigneten Bereich wurden die Meßpunkte für die autonome Kraftmessungen festgelegt (b, grüne Kreuze).

Die Eindrückkraft auf die Membranoberfläche betrug ca. 200pN und die Ziehgeschwindigkeit 400nm/s. Als AFM-Cantilever wurden Siliziumnitrid-Spitzen verwendet (OMCL TR400, Olympus, Hamburg) mit einer Federkonstante von ca. 20 ± 5 pN/nm. Durch unspezifische Adsorption des extrazellulären C-terminalen Endstückes der Retinalproteine an der AFM-Cantileverspitze konnte man somit das Retinalprotein beim Herausziehen aus der Membran entfalten und die dabei auftretenden Kräfte abhängig von den vorherrschenden intra- und intermolekularen Wechselwirkungen registrieren.

Bei den Kraftkurven wurde jeder Kraftpeak mit Hilfe des WLC (worm-like-chain) Modells mathematisch gefittet, wobei eine Monomerlänge von 3.6 \AA und eine Persistenzlänge von 4.0 \AA als Fitparameter eingesetzt wurden. Die Monomerlänge ergibt sich aus der Länge der Peptidkette zwischen der AFM-Cantileverspitze und der Membranoberfläche. Die erwarteten Längenunterschiede wurden anhand der Kristallstrukturen (pdb 1H2S, [Gor02]) korrigiert, um bei der Analyse unter Erstellung von Histogrammen die Aminosäurenposition mit der entsprechenden Kraft korrelieren zu können. Der statistische Fehler wurde hierbei durch eine Poissonverteilung abgeschätzt. Eine detailliertere Beschreibung der statistischen Analyse ist in der entsprechenden Publikation III zu entnehmen.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Zielsetzung dieser Arbeit war am Beispiel des photophoben SRII Rezeptor/Transducer-Komplexes aus *N. pharaonis* gewonnene Erkenntnisse über die Struktur und den Mechanismus der archaebakteriellen Phototaxis durch ergänzende Untersuchungen zu erweitern und einen Beitrag zum Verständnis der transmembranen Signaltransduktion zu leisten.

Ein großer Vorteil, welchen die Kraftspektroskopie in diesem Zusammenhang bietet, ist die Möglichkeit, eine große Anzahl einzelner Proteine und unter den unterschiedlichsten Bedingungen in physiologischer Umgebung messen zu können. Dabei wurde die Analyse über eine zusätzliche Softwareerweiterung verbessert, welche eine höhere Detailauflösung bietet und so in Bezug auf die strukturellen Begebenheiten des Retinalproteins sämtliche inter- und intramolekularen Wechselwirkungen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Bedingungen (Lichtaktivierung, Komplexbildung mit Transducer) erkannt werden können. Die Datenanalyse konzentrierte sich hierbei auf die α -Helizes F und G, da beim Herausziehen der einzelnen Helizes durch das Kraftmikroskop einerseits nur die Interaktionen dieser Beiden Helizes vollständig meßbar sind (durch weiteres Herausziehen ist die Gesamtstruktur des Retinalproteins prinzipiell zerstört) und andererseits, weil aus vorangegangenen Arbeiten und kristallographischen Untersuchungen als diejenigen Stellen identifiziert wurden, die an der Lichtaktivierung mit anschließender Signaltransduktion am stärksten beteiligt sind [Mou06, Bor07, Weg00].

Die Beobachtung zeigt eine Abnahme der Interaktionen am C-terminalen Ende des Retinalproteins NpSRII und im transmembranen Bereich der α -Helix G bei Lichtaktivierung ohne Transducer-Protein NpHtrII. Im Einklang dazu scheinen sich mehrere intramolekulare Interaktionen im transmembranen Bereich der Helix G zu konzentrieren. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung sind kaum Änderungen im transmembranen und am C-terminalen Bereich des Retinalproteins bei gebundenem Transducer NpHtrII und Lichtaktivierung zu erkennen. Dieses Resultat läßt darauf schließen, daß sich die intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb des Retinalproteins durch die lichtinduzierte Komplexbildung mit dem Transducer verändern. Im Vergleich dazu zeigen die kristallographischen Strukturen im lichtaktivierten Zustand eine leichte Ortsverschiebung der α -Helix G zur extrazellulären Seite hin. Aus EPR-Messungen [Kla04] heraus erkennbar, ändert sich in diesem Zusammenhang außerdem die Position der Helix F, welche im Gegensatz zu kristallographischen Untersuchungen stehen. Hierbei sind die α -Helizes G und F durch

intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Asparagin214 (Helix G) und Arginin162 (Helix F) (Abbildung 25) zusätzlich stabilisiert [Mou06]. Im Komplex sind die intermolekularen Helix-Interaktionen zwischen NpSRII und HtrII zu beobachten, welche jedoch nach Lichtaktivierung nicht mehr zu erkennen sind. Demnach könnte der Wegfall der Wechselwirkungen zwischen dem Retinalprotein und dem Transducer-Protein durch die Lichtaktivierung ein Effekt der erfolgten Signaltransduktion sein.

Zusammenfassend sind anhand der kraftmikroskopischen Daten Interaktionen im extrazellulären Teil der Helix G, in der Loop-Region zwischen den Helizes G und F und zwischen der Helix F und dem Transducer zu erkennen, welche im Einklang mit der kristallographischen Proteinstruktur stehen [Mou06]. Durch diese Wechselwirkungen könnte eine Bewegung der Helix F mit einer dadurch induzierten Schraubenbewegung der TM2-Helix möglich werden, wie zuletzt von Klare *et al.* postuliert wurde. In diesem Zusammenhang sind aus den Daten außerdem einige Interaktionen im transmembranen und extrazellulären Bereich der Helix F erkennbar, die bei einer Lichtaktivierung des Retinal-Chromophors verloren gehen und somit zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Wechselwirkungen die Signaltransduktion oder die zusätzliche Eigenschaft Protonen zu pumpen zu beeinflussen scheinen [Sch00], welche im Komplex inhibiert werden [Spu98].

Als Ergebnisse der reinen Grundlagenforschung sind diese Informationen zunächst wichtig für das weitere Verständnis auch anderer Retinalproteine wie z.B. dem Rhodopsin, dem Sehfärbstoff des Menschen. Der verbesserte Einblick in die Reaktionsabläufe erlaubt es aber auch, die Optimierung der Retinalproteine im Sinne der biomolekularen Nanotechnologie als maßgeschneiderter optische Schalter für die Datenverarbeitung, die Datenspeicherung und die Sicherheitstechnik weiter fortzuführen [Ham90, Ham00].

5 – Oberflächenanbindung von Biomolekülen

Dieses Kapitel basiert auf der Publikation I im Anhang. Für detaillierte Informationen, insbesondere bezüglich weiterer Einzelheiten über die Materialien und Methoden, sei an dieser Stelle darauf verwiesen. Zusätzlich befindet sich ein ausführliches Protokoll im Anhang der Publikation (Supplemental Information).

5.1 Einleitung

Die Beschichtung unterschiedlicher Oberflächen mit biologischen Molekülen ist mittlerweile bei einer Vielzahl von Applikationen, auch im kommerziellen Bereich der Life Sciences unverzichtbar geworden. Bei der Medizintechnik werden beispielsweise Implantate mit spezifischen Proteinen und Peptiden beschichtet, um eine Immunabwehr und die daraus resultierende Abstoßreaktion des Körpers weitgehend zu verhindern [Bal06, Ye08]. Im Bereich der Genetik und Molekularbiologie ist die DNA-Microarray-Technologie indes weitreichend bekannt und essentiell für Anwendungen in der Genomanalyse, der Diagnostik und bei Untersuchungen in der differentiellen Genexpression [Car06]. Bei diesen Anwendungen spielt die Anbindungseffektivität und die genaue Anzahl der angebondenen Biomoleküle eine untergeordnete Rolle, da diese Applikationen auf einer Vielzahl von Molekülen basieren. Für Einzelmolekültechniken, wie beispielsweise AFM, Molecular Recognition Spectroscopy und optical/magnetic tweezers ist es für Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungsmessungen unabdingbar, biologische Moleküle an unterschiedlichen Oberflächen mit hoher Anbindungseffizienz kovalent zu befestigen, ohne durch diesen Prozeß ihre Funktion zu beeinträchtigen. Darüber hinaus können mit solchen Immobilisierungstechniken auch Moleküle und Nanopartikel mit spezifischen Biomolekülen beschichtet werden, um diese als spezifische Biosensoren bzw. Sonden für ultra-sensitive Diagnostik zu verwenden.

Um die Anwendungsmöglichkeiten des AFM-Meßsystems in Bezug auf Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungsmessungen zu erweitern und einen Einzelmolekültransport (Kapitel 6) zu gewährleisten, wurde an einer Methode gearbeitet, um alle relevanten Biomoleküle (DNA, Peptide, Proteine) mit hoher Anbindungseffizienz, hoher Reproduzierbarkeit, hoher Langzeitstabilität und geringer Neigung zu unspezifischen Wechselwirkungen mit den Biomolekülen kovalent an Glas (Siliziumdioxid)- und Siliziumnitrid-Oberflächen zu fixieren (Abbildung 28).

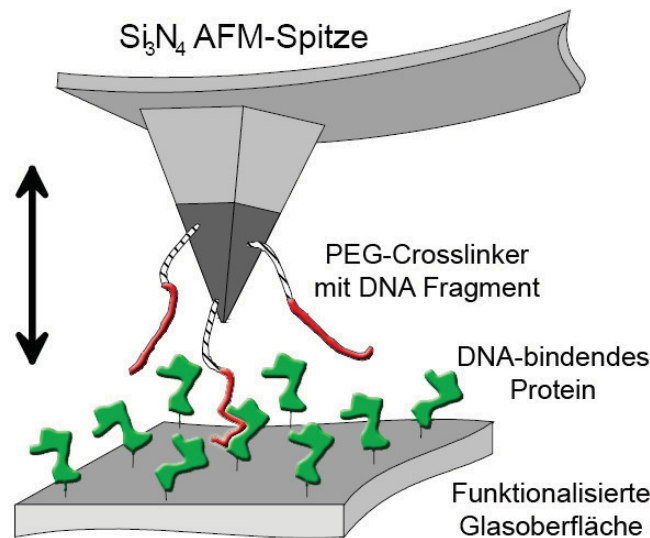


Abbildung 28: Schematische Darstellung einer Rezeptor-Ligand Wechselwirkungsmessung mittels AFM. Jeweils an die AFM-Cantileverspitze und an der Oberfläche sind die Rezeptoren und die entsprechenden Liganden chemisch immobilisiert, um ihre Wechselwirkungskräfte einzeln messen zu können und aus diesen auf ihre Eigenschaften (z.B. Affinität, Bindungsenergie, Spezifität) schließen zu können.

Dabei war es von außerordentlicher Bedeutung, einen allgemein gültigen Prozeß für alle Arten von Biomolekülen zu etablieren. Für solche Einzelmolekülapplikationen bedarf es an unterschiedlichen Eigenschaften und Voraussetzungen:

- Hohe Anbindungseffizienz
- Hohe Reproduzierbarkeit
- Passive Eigenschaften der Beschichtung gegenüber unspezifischer Adsorption
- Keine Beeinträchtigung der nativen Funktionen durch den chemischen Prozeß
- Homogene Beschichtung als Monolayer
- Einfache und zeiteffiziente Präparation

Zur kovalenten Immobilisierung von Molekülen hat sich bis hin zu kommerziellen Produkten eine Primärbeschichtung mit Silanen durchgesetzt, insbesondere durch die relativ einfache Handhabung. Diese binden kovalent an die Silanolgruppen (Si-OH) des amorphen Glases und können unterschiedliche funktionelle Gruppen an der oberflächenabgewandten Seite tragen, welche für die weitere, kovalente Immobilisierung von Molekülen als Ankerpunkt verwendet wird. Um die Anbindungseffizienz zu maximieren und diesen Prozeß für alle Biomoleküle zugänglich zu machen, wird die Methode in vier bedeutende Teilschritte unterteilt (Abbildung 29), welche für die Anbindung der einzelnen Arten von Biomolekülen (DNA, Peptid, Protein) jeweils optimiert wurde.

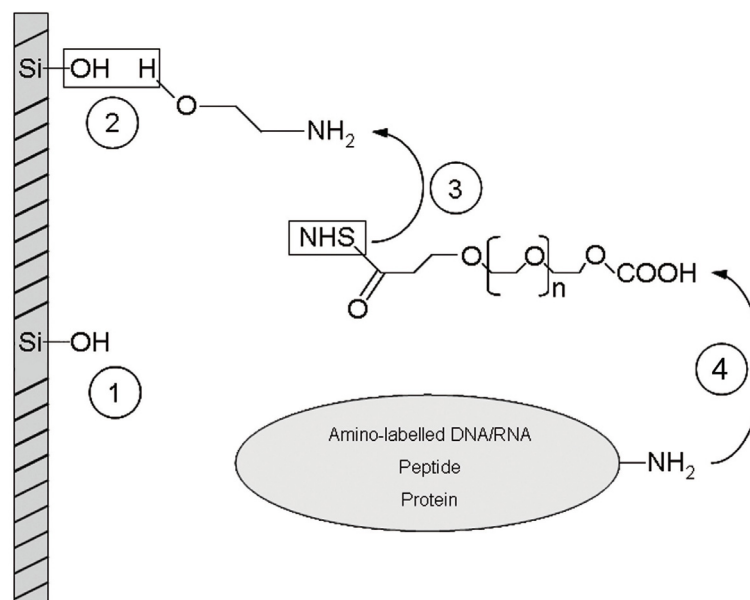


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Funktionalisierungs- und Immobilisierungsprozesses. Für die Primärbeschichtung mit Ethanolamin (2) ist eine Generierung von Silanolgruppen (Si-OH) an der Glas- bzw. Siliziumnitrid-Oberfläche nötig (1), welche als Ankerpunkt für die Primärbeschichtung dient. Im weiteren Prozeß wird zwischen der Anbindung der Biomoleküle (DNA, Peptide, Proteine) (4) ein chemisch und physikalisch inerte Poly(ethylenglykol)-Crosslinker an die primäre Monolayer-Beschichtung (3) gebunden.

Neben der Reinigung der Oberflächen wird die Bedeutsamkeit der Generierung von Silanolgruppen an den Oberflächensubstraten, welche als Ankerpunkt und erster Schritt für das gesamte Funktionalisierungssystem dienen, die in der Literatur weitgehend unterschätzt und vernachlässigt (Abbildung 29, 1). An diesem Präparationsschritt des Funktionalisierungsprozedere ist somit ein hohes Optimierungspotential anzutreffen.

Im weiteren Teilschritt des Prozesses wird ein molekularer Crosslinker kovalent an die Silanolgruppen der Oberfläche gebunden, welcher dazu dient eine andere funktionelle Gruppe für den weiteren Prozeß zur Verfügung zu stellen (Abbildung 29, 2). Am häufigsten werden hierbei Silane verwendet, welche eine primäre Aminogruppe oder eine amino-reaktive Epoxygruppe tragen, um Moleküle direkt anbinden zu können. Die dabei zur Verwendung kommenden Alkoxysilane mit typischerweise drei Ethylresten, neigen jedoch zur Auto-Polymerisation und bilden zyklische Oligomere und Polymerketten, so daß eine Monolage bzw. eine homogene Beschichtung daraus nur unter Umständen möglich ist und daher wenig reproduzierbar [Met06, Ish78]. Es wurde auch gezeigt, daß Amino-Alkoxysilane, welche häufig für solche Anwendungen kommerziell verwendet werden, dreidimensionale Strukturen und zusammenhängende Netzwerke bilden können, welches für die Einzelmolekülanwendung einen großen Nachteil darstellt [Van91, Wan92, Wan93]. Als eine mögliche Alternative zu Silanen bietet sich die Verwendung von Ethanolamin an, welches in einigen Fällen alternativ verwendet wird und auf seine Konkurrenzfähigkeit gegenüber Alkoxysilanen detailliert untersucht wurde [Ebn07]. Dabei zeigte sich, daß diese Substanz als molekularer Crosslinker gleichermaßen für die Funktionalisierung von Oberflächen verwendet werden kann und als Monolage homogen verteilt vorliegt. Somit bot sich in dieser Arbeit die Verwendung dieses Crosslinkers an, da mindestens zwei Kriterien für eine Oberflächenfunktionalisierung mit hoher Qualität dadurch erreichbar sind.

Im dritten Teilschritt (Abbildung 29, 3) vor der Anbindung der unterschiedlichen Biomoleküle, wurde ein weiterer molekularer Crosslinker verwendet, der aus drei Gründen zur Beschichtungsqualität beiträgt: zum einen ist es durch Erkenntnisse empirischer Messungen innerhalb der Entwicklung eines generell anwendbaren Funktionalisierungs-Prozesses von außerordentlicher Bedeutung, daß das entsprechend angebundene Biomolekül die Möglichkeit besitzt sich frei zu bewegen und zu orientieren und einen Abstand von einigen Nanometern zur Oberfläche aufweist, um seine native Struktur zu behalten und seine spezifische Funktion ausüben zu können. Weiterhin ist es bei der kraftspektroskopischen Anwendung nötig, daß ein dehnbares Polymer mit bekannter Elastizität verwendet wird, um die Daten detailliert analysieren und interpretieren zu können. Als weiterer Punkt ist eine Oberflächenpassivierung durch die Verwendung von chemisch und physikalisch inerten Polymerketten in diesem Zusammenhang von Vorteil, welcher unspezifische Bindungen mit organischen Molekülen und den Biomolekülen selbst deutlich verringert. Da als molekularer Crosslinker das Polymer Poly(ethylenglykol) in kraftspektroskopischen Methoden

weitreichend bekannt und charakterisiert ist und die erforderlichen Eigenschaften aufweist, wurde darauf bei der Entwicklung des Funktionalisierungsprozesses zurückgegriffen [Bla03, Xon07].

Im letzten Schritt des Prozesses (Abbildung 29, 4) existieren zwei häufig verwendete Möglichkeiten um Biomoleküle anzubinden, welche in der Literatur beschrieben sind. Verbreitet sind Methoden zur kovalenten Bindung zum einen mittels einer Aldehyd-Endgruppe des molekularen Crosslinkers an primäre Aminogruppen der Biomoleküle bzw. Amino-modifizierten Moleküle und zum anderen die über Schwefelatome induzierte Thiolbindung an Maleimid-Endgruppen. Letztere wird häufig verwendet, um Peptide zu binden. Da freie Carboxylgruppen im Vergleich zu Aldehydgruppen und Maleimidgruppen deutlich weniger unspezifische Bindungen mit organischen Molekülen in neutralen, wäßrigen Lösungen bilden [Zam00, Lind01, Kra03], wurde das Funktionalisierungsprotokoll mit Carboxylgruppen am heterobifunktionalen molekularen Crosslinker realisiert, wodurch die Biomoleküle mit primären Aminogruppen – sei es am N-terminalen Ende der Peptide und Proteine oder durch Amino-modifizierte, einzelsträngige DNA – durch die allgemein bekannte Peptidbindung bzw. Amidbindung kovalent gebunden werden können.

5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte ein effizientes Präparationsprotokoll entwickelt werden, welche für alle relevanten Biomoleküle anwendbar ist und die erforderlichen Qualitätskriterien vollständig erfüllt. Somit wurde innerhalb der Entwicklung gezeigt, daß einzelsträngige, Amino-modifizierte DNA, ein Peptid (16 AS) mit 10 Histidinen, welches als *His-Tag* dient und der Prion-Protein Antikörper IgG_{saf3}2 als Stellvertreter für die Klasse der Proteine kovalent an Glasoberflächen und Siliziumnitrid-Cantilever angebunden werden konnten (Abbildung 30).

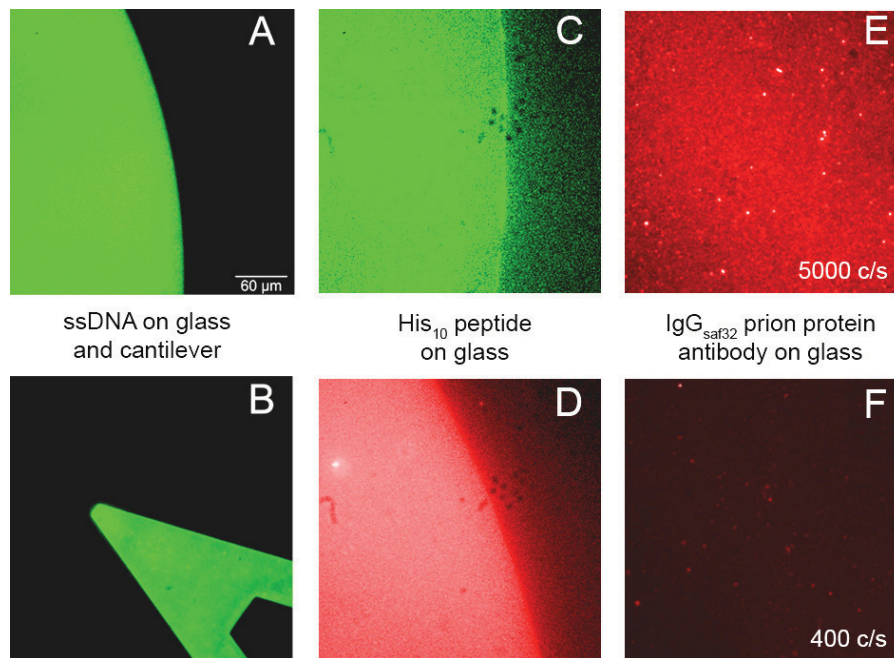


Abbildung 30: Fluoreszenzbilder von immobilisierten Biomolekülen an Glas und Siliziumnitrid-Cantilever. Einzelsträngige DNA wurde erfolgreich an die Glasoberfläche (A) und AFM-Cantilever (B) kovalent immobilisiert und mit fluoreszierendem SybrGreenII markiert. Das Peptid (16 AS) mit 10 Histidinen wurde an die Glasoberfläche immobilisiert und mit fluoreszenzmarkierten Penta-His-Antikörper (C) und ebenfalls markiertem Tris-NTA (D) nachgewiesen. Der Prion-Protein Antikörper IgG_{saf32} wurde nachgewiesen durch einen spezifischen, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (E). Der Antikörper wurde über die gesamte Oberfläche beschichtet. Die Negativkontrolle erfolgte über den Verzicht des Erstantikörpers IgG_{saf32}, woraus die unspezifischen Bindungen zwischen der PEG beschichteten Oberfläche und dem fluoreszierenden Zweitantikörper ersichtlich wurden. (F).

Bei der Entwicklung und der Optimierung der einzelnen Teilschritte des Funktionalisierungsprozesses (Abbildung 29) wurde die Generierung von Silanolgruppen auf dem Festkörper (Glas, Siliziumnitrid) mit 2.5M Natronlauge durchgeführt, was empirisch verglichen mit den Methoden in der Literatur zu einer Verbesserung der gesamten Anbindungseffizienz bis zu 151% führte. Da dieser Schritt der Ausgangspunkt der gesamten Präparation darstellt, ist er neben der Anbindungsstrategie der Biomoleküle mitunter der wichtigste, um eine hohe Anbindungseffizienz und homogene Beschichtung zu erhalten. Als elastischer molekularer Crosslinker wurde das NHS-PEG-COOH_{MW3.400} verwendet, welches alle Qualitätskriterien in Hinblick auf Oberflächenpassivierung (lediglich 3% unspezifische Bindung), bekannte Elastizität in Bezug auf die Kraftkurvenprofile und deren Analyse und einfaches Handling erfüllte. Auch bei der Anbindung dieses Polymers konnte die Bindungseffizienz weiter optimiert werden durch Variation der Lösungsmittel. Ein weiterer

Punkt für die Verwendung dieses Polymers mit einer Carboxylgruppe als Ausgangspunkt für die Anbindung über eine Amidbindung der einzelnen Biomoleküle, ist die deutlich höhere Anbindungsichte (bis zu 174% höher), verglichen mit den herkömmlichen Methoden, welche als Ausgangspunkt eine Aldehydgruppe oder ein Maleimid besitzen. Bei dieser Methode ist eine sterisch freie, primäre Aminogruppe des Biomoleküls notwendig, was dazu führt, daß Nukleinsäuren mit einer solchen funktionellen Gruppe modifiziert werden müssen. Im Hinblick auf die Peptide und Proteine ist darauf zu achten, daß das N-terminale Ende der Aminosäurenkette nicht sterisch durch benachbarte Aminosäuren mit großen Seitenketten blockiert ist.

Die unterschiedlichen Strategien für die einzelnen Biomoleküle sind nachfolgend in einem Flußdiagramm für jeden Teilschritt des Funktionalisierungsprozesses dargestellt (Abbildung 31).

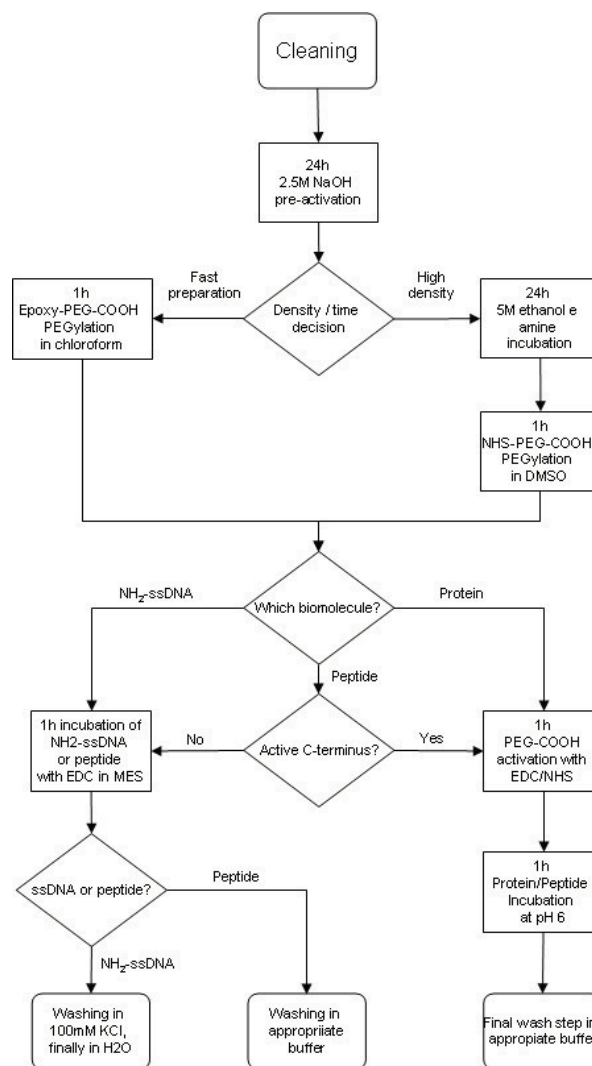


Abbildung 31: Flußdiagramm über die unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien, abhängig von den jeweils anzubindenden Biomolekülen.

Im Laufe der Entwicklung und Optimierung des Verfahrens wurde ein weiteres heterobifunktionelles Polymer verwendet, das insbesondere in Hinblick auf die erforderliche Präparationszeit Vorteile verschafft. Der dafür verwendete Epoxy-PEG-COOH_{MW3.400} Crosslinker ist durch die Eigenschaft des Epoxyringes in der Lage direkt kovalent an die Silanolgruppen der Oberflächen zu binden, wodurch die Primärbeschichtung mittels Ethanolaminhydrochlorid im zuvor beschriebenen Verfahren vernachlässigt werden kann. Die 8% niedrigere Anbindungseffizienz gegenüber dem beschriebenen Verfahren mit einer Primärbeschichtung verkürzt die Präparationszeit um 24 Stunden und diese Methode kann außerdem uneingeschränkt für Einzelmolekül-Applikationen als Alternative eingesetzt werden.

Im Zusammenhang mit biosensorischen Applikationen, wurden in der Entwicklung des Verfahrens weitere Anwendungsmöglichkeiten getestet (Abbildung 32). Dabei wurden zum einen fluoreszierende Nanopartikel (FluoSpheres) mit einer einzelsträngigen DNA mit einer spezifischen Erkennungssequenz funktionalisiert und auf Oberflächen hinzugegeben, welche mit der komplementären Nukleotidsequenz beschichtet wurden (Abbildung 32, a). Zur Verifizierung der spezifischen Erkennungseigenschaften eines solchen „Biosensors“, wurde die Kontrolle mit Hilfe einer Oberfläche durchgeführt, welche mit einer DNA mit falscher Sequenz beschichtet wurde (Abbildung 32, b). Als eine weitere Möglichkeit zur Verwendung im Zusammenhang mit FRET-Messungen wurde eine Glasoberfläche mit einer DNA beschichtet, welche eine Anbindungsstelle für die Klenotaq-Polymerase trägt. Dadurch konnte das Protein über eine längere Zeit gemessen werden, als wie es aufgrund der hohen Diffusionsgeschwindigkeit des Biomoleküls in wässriger Lösung bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie der Fall wäre (Abbildung 32, c).

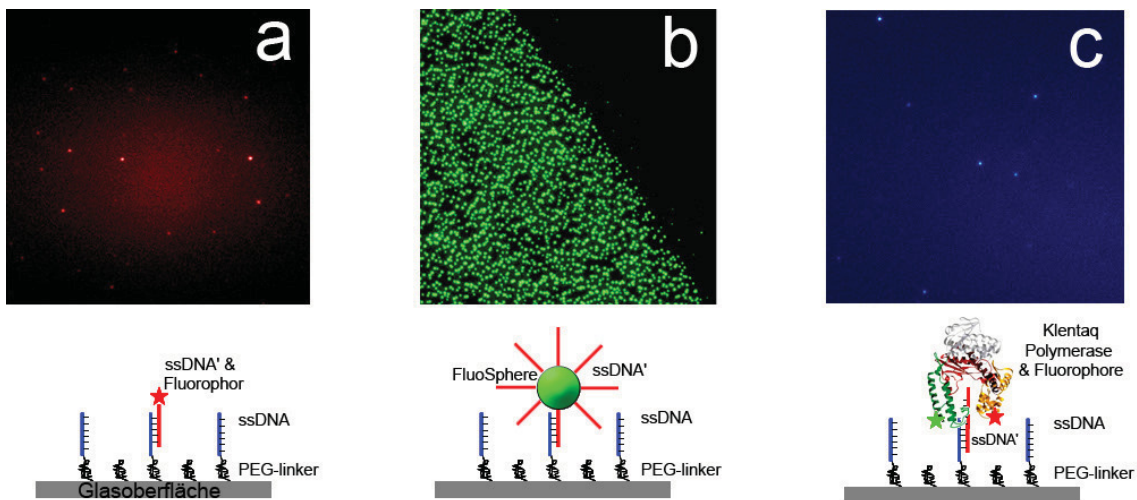


Abbildung 32: Beispiele biosensorischer Applikationen durch spezifische Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen. Als Beispiel für einfache, organische Moleküle als Sensoren wurde fluoreszenzmarkierte, einzelsträngige DNA mit komplementärer Sequenz auf eine mit niedriger Konzentration an ssDNA gebundene Glasoberfläche gegeben (**a**), um diese sensitiv nachzuweisen. Als Beispiel für die Verwendung von beschichteten Nanopartikel als Biosensoren, wurden FluoSpheres mit komplementärer ssDNA beschichtet und auf eine mit ssDNA beschichtete Glasoberfläche (**b**) gegeben. Deutlich ist die Grenze der an der Oberfläche gebundenen ssDNA zu erkennen und die niedrige, unspezifische Wechselwirkung zwischen Biosensor und dem Bereich ohne ssDNA. Zur temporären Fixierung von Biomolekülen wurde die doppel-fluoreszenzmarkierte Klenotaq-Polymerase auf eine mit DNA beschichtete Glasoberfläche (**c**) in niedriger Konzentration gegeben, welche über einen längeren Zeitraum mit FRET gemessen werden können, als es bei frei diffundierenden Proteinen der Fall ist.

Zusammenfassend konnte ein einfaches und für alle relevanten Biomoleküle anwendbares Protokoll entwickelt werden, was eine reproduzierbare, effiziente und qualitativ hochwertige Anbindung sicherstellt. Im empirischen Vergleich konnte die Anbindungseffizienz zu den herkömmlichen Methoden in der Literatur um ein dreifaches erhöht werden. Außerdem konnte eine Alternative vorgestellt werden, welche die Präparationszeit um ca. 70% verkürzt. Dieses Verfahren eignet sich für die molekulare Beschichtung sowohl von Glasoberflächen, als auch von Siliziumnitrid-Oberflächen und ist für eine Vielzahl von Einzelmolekül-Applikationen, welche auf Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen beruhen, verwendbar. Für den in Kapitel 6 beschriebenen Einzelmolekültransport ist ein solch qualitativ hochwertiges Funktionalisierungsverfahren eine zwingende Voraussetzung.

6 – DNA-Einzelmolekültransport

Dieses Kapitel basiert auf die Publikation IV im Anhang. Für weitere Details und ergänzende Informationen sei an dieser Stelle darauf verwiesen.

6.1 Einleitung

Die mechanischen Eigenschaften der molekularen Komponenten, welche die Natur in den vorausgegangenen 4 Milliarden Jahren hervorgebracht hat [Ges99, Rus88, Tic06], sind vielfältig. Auch in den Bereichen der Informationsspeicherung und der Informationsverarbeitung sind die Leistungen der Natur der heutigen technischen Lösungen weit voraus. Die kognitiven Fähigkeiten höherer Lebewesen, insbesondere des menschlichen Intellekts, sind prinzipiell nicht erfaßbar, und es wird wohl noch eine lange Zeit dauern, bis künstliche Intelligenz auch nur ansatzweise existiert [Tur50]. Die komplexen Steuerungs- und Regelungsmechanismen (z. B. die Immunantwort), die indes unbewußt in Lebewesen ablaufen und ein Leben in einer ständig sich ändernden Umwelt ermöglichen, sind bislang nur ansatzweise verstanden.

Die makroskopischen Formen (z. B. das Strömungsprofil von Fischen), die Dimensionen (z. B. das Verhältnis von Kopfgröße zu Halsdurchmesser) und die Lösungswege (z. B. der Fortbewegungsapparat von Bakterien) der verschiedenen Organismen sind ihrem jeweiligen Lebensraum evolutionär angepaßt [All07, Bir02]. Die Grundprinzipien, auf denen das Leben basiert, sind hervorragende Beispiele einer hochentwickelten Nanotechnologie. Gemessen an dem Leistungsspektrum lebender Organismen ist es nicht weiter verwunderlich, daß die molekulare Nanotechnologie als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts angesehen wird.

Trotz der Komplexität und der Vielfalt des Lebens ist die Anzahl der zum Aufbau verwendeten Bausteine minimal. Von den über 100 bekannten chemischen Elementen stellen die sechs Elemente Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Sauerstoff (O), Stickstoff (N), Schwefel

(S) und Phosphor (P) gut 99 % der Gesamtmasse eines Organismus. Aus diesen sechs Elementen sind die sogenannten Biomoleküle aufgebaut, die sich einteilen lassen in Lipide, Kohlenhydrate, Polypeptide, Nukleotide und Porphine. Diese fünf Stoffklassen bilden die molekularen Bausteine, aus denen lebende Materie nach den Prinzipien der molekularen Erkennung und der Selbstorganisation (*Self-assembly*) in einem *Bottom-up*-Ansatz modular aufgebaut ist.

Ähnlich wie in die Natur, unterliegt auch die moderne Technik einer technologischen Evolution mit starkem Innovationsdruck. Insbesondere die Anforderungen aufgrund knapp werdender Ressourcen und die daraus resultierenden Forderungen nach einer Effizienzsteigerung stellen die zentralen Herausforderungen der nahen Zukunft dar. Aus diesem Grund werden seit einigen Jahren die Wirkungsmechanismen der biologischen Selbstorganisation und der molekularen Erkennung nicht mehr nur alleine von Biologen, sondern in zunehmendem Maße auch von Physikern, Medizinern und Chemikern in einem hochgradig interdisziplinären Umfeld untersucht. Speziell durch die Entwicklung verschiedener Einzelmolekültechniken, wie Atomic Force Microscopy [Bin86], Magnetic/Optical tweezers [Smi92, Ash86] und der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie [Wei99] konnten neue und detaillierte Einblicke in die molekulare Biologie gewonnen werden. So konnte beispielsweise durch Einzelmolekül-Fluoreszenzexperimente der *Hand-over-Hand*-Fortbewegungsmechanismus von Kinesin-Motorproteinen aufgeklärt werden [Yil04]. Durch die Einzelmolekülkraftspektroskopie wurden die mechanischen Eigenschaften des DNA-Moleküls [Ess97, Kra03, Mor07, Smi92, Rie99], die mechanische Stabilität von Proteinen [Die04, Die06, Rie97] und die Dissoziationseigenschaften vieler Rezeptor-Ligand-Systeme auf Einzelmolekülniveau untersucht [Flo94, Mor07b, Moy94].

Dem DNA-Molekül wird aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften ein besonders großes Potential bei der Herstellung nanoskaliger Elemente und Strukturen eingeräumt. Die einfache und doch hochselektive A-T- und G-C-Basenpaarbindung erlaubt es beispielsweise, Rezeptor-Ligand-Systeme in beliebiger Vielfalt zu „programmieren“, deren Dissoziationseigenschaften durch die Sequenz frei einstellbar sind. Auf diese Weise konnte das DNA-Molekül beispielsweise als Kraftsensor in molekularen Kraftwaagen [Alb03, Dos07] eingesetzt und DNA-basierte molekulare Motoren entwickelt werden [Tur03, Yur00]. Da die räumliche Struktur eines DNA-Moleküls leicht berechenbar ist durch thermodynamische Modellsysteme, konnten zweidimensionale Strukturen [Rot06, Win98] sowie einfache dreidimensionale Nanostrukturen [Che91] erzeugt werden.

Ein weiterer Grund, weshalb dem DNA-Molekül eine so große Bedeutung in den Nanowissenschaften zukommt, liegt daran, daß die Natur einen umfangreichen Satz an „Werkzeugen“ (z. B. Ligasen, Nukleasen und Restriktionsendonukleasen) zur Manipulation des DNA-Moleküls zur Verfügung stellt. Bei allen Möglichkeiten, die das DNA-Molekül aufgrund seiner Fähigkeit zur Selbstorganisation zum Aufbau von Nanostrukturen bietet, ist es jedoch für viele Anwendungen zwingend nötig, den Aufbau nanoskaliger Elemente von außen auf Einzelmolekülniveau kontrollieren zu können. Eine solche Technologie würde es zum Beispiel ermöglichen, interaktiv Prozesse zu steuern und Fehler bei der Assemblierung zu korrigieren.

Bisher gelang es jedoch nicht, eine Technologie zu entwickeln, mit der es möglich ist, unter physiologischen Bedingungen einzelne Biomoleküle auf Oberflächen kontrolliert zu plazieren. Das hauptsächliche Ziel dieser Arbeit war, eine solche Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, molekulare DNA-Bausteine mechanisch kontrolliert und Sequenzspezifisch aufzunehmen und zu plazieren, um so Strukturen im Baukastenprinzip aufzubauen. Um bei späteren Anwendungen auf das gesamte Repertoire der von der Natur gegebenen biomolekularen „Nanomaschinen“ zurückgreifen zu können, ist es notwendig, diese Technik unter physiologischen Bedingungen durchzuführen. Da es auf Einzelmolekülniveau prinzipiell nicht möglich ist, Moleküle vollständig zu kontrollieren [Sma01], sollte die Methode zudem die Möglichkeit bieten, Anzahl und Ort der einzeln assemblierten Bausteine in Echtzeit zu bestimmen, um indirekt größtmögliche Kontrolle über Assemblierung zu erhalten.

6.2 Experimentelle Durchführung

Das zentrale Prinzip des Einzelmolekültransportes beruht auf einem Kraftsystem auf DNA-Basis. Das hierbei verwendete Konstrukt von Anker-DNA (an Oberfläche und AFM-Spitze) und der Transport-DNA ist prinzipiell reversibel (Abbildung 33) mit zwei Basenpaarsystemen aufgebaut. Einzelsträngige DNA-Moleküle, welche als entkoppeltes Transfersystem dienen, werden über eines (S') der zwei 40 Basenpaar lange Ankersequenzen thermodynamisch stabil durch Hybridisierung (durch Wasserstoffbrückenbildung, Stapel-Wechselwirkung der Basen und Entropiegewinn des Lösungsmittels) an mit der komplementären DNA (S) beschichteten Glasoberfläche in einem definierten Depotbereich (Abbildung 34) mit Hilfe eines DNA-Microarray-Roboters angebunden, welcher definierte Spots mit einem Durchmesser von ca.

80µm auf die beschichtete Glasoberfläche aufbringt (BMFZ, Düsseldorf). Das prinzipielle Sequenz-Design der DNA Moleküle erfolgte über thermodynamische DNA-Strukturvorhersagen (DNAfold, Zuker *et al.*), um mögliche Sekundärstrukturen zu vermeiden,

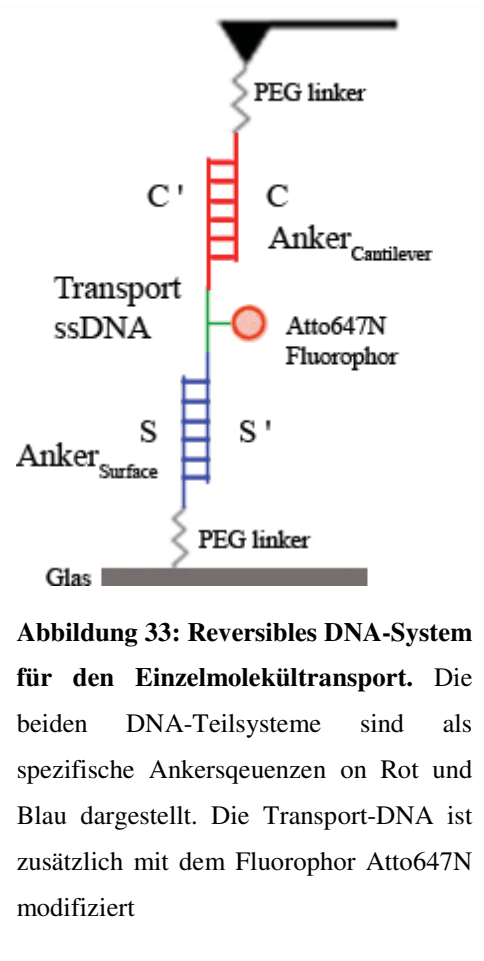


Abbildung 33: Reversibles DNA-System für den Einzelmolekültransport. Die beiden DNA-Teilsysteme sind als spezifische Ankersequenzen in Rot und Blau dargestellt. Die Transport-DNA ist zusätzlich mit dem Fluorophor Atto647N modifiziert

welche die Hybridisierungseffizienz negativ beeinflussen würden. Die mittlere Schmelztemperatur (T_m) der beiden Basenpaarsequenzen des verwendeten DNA-Konstrukts betrug nach durchgeführten Denaturierungskurven in 20mM TRIS/HCl (mit 150mM NaCl, pH 8) ca. 85°C. Die Transfer-DNA besitzt zusätzlich zur 40 Basenpaar langen Oberflächen-Ankersequenz (S') eine weitere 40 Basenpaar lange Ankersequenz (C') mit gegenläufiger Basensequenzabfolge für die Bindung an die komplementäre Ankersequenz der funktionalisierten AFM-Spitze und ist zusätzlich zwischen den beiden Ankersequenzen mit dem Fluorophor Atto647N markiert worden, um die Transfer-DNA durch Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit beobachten zu können. Zusätzlich wurde zu dem Meßpuffer zwei Antioxidantien gegeben (1mM Methylviologen, 1mM Ascorbinsäure), welche das

Photobleaching des Fluorophors deutlich verringern [Vog08], um die Fluorophore über eine längere Zeit beobachten zu können und somit durch die Fluoreszenzmikroskopie einen erfolgreichen Transport nachweisen zu können. Die zur Transport-DNA komplementär Ankersequenzen an der Glasoberfläche (Moleküldichte von ca. 200 DNA-Molekülen pro μm^2) und der Siliziumnitrid-Cantileverspitze wurden kovalent befestigt (Methodik: Kapitel 5).

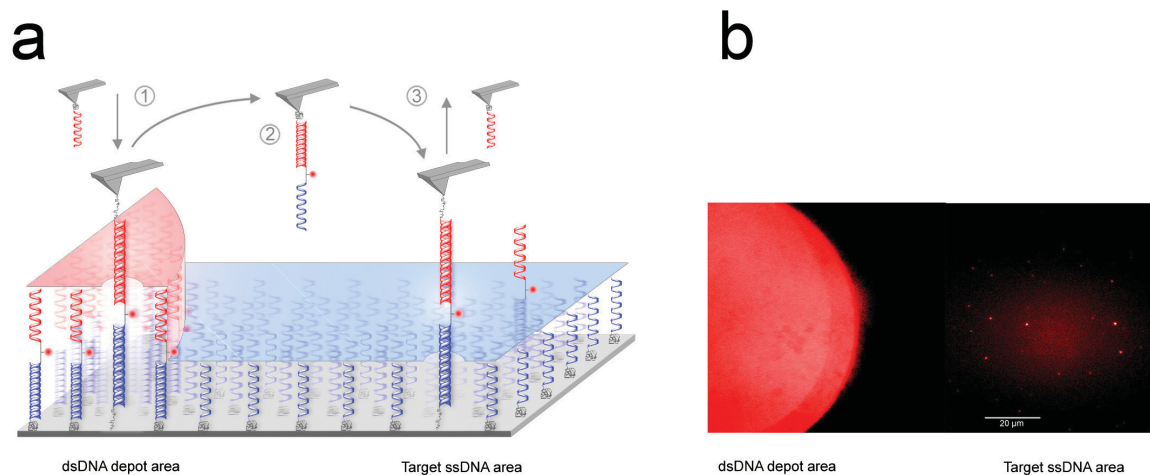


Abbildung 34: Darstellung des DNA-Einzelmolekültransportes. Über einem Depotbereich mit ca. 80µm Durchmesser angebundenen DNA-Transportmoleküle werden mit der spezifischen DNA-Ankersequenz am AFM-Cantilever aufgenommen (a, 1) und in den Depositionsbereich gefahren (a, 2) wo durch die Hybridisierung mit der Ankersequenz der Glasoberfläche das DNA-Transportmolekül abgelegt werden kann (a, 3). Die TIR-Fluoreszenzaufnahme (b) zeigt deutlich den Depotbereich und einen Zielbereich mit geringer Konzentration an hybridisierten DNA-Transportmolekülen.

Wird die funktionalisierte AFM-Cantileverspitze mit dem Depotbereiche in Kontakt gebracht, hybridisiert die Ankersequenz der Transport-DNA (C') mit der Anker-DNA (C) der Cantileverspitze (Abbildung 34, a, 1). Beim Rückziehen der AFM-Spitze (600nm Distanz, 400nm/s Ziehgeschwindigkeit) werden beide doppelsträngigen DNA-Teile des DNA-Konstruktes gleichzeitig und gleichmäßig belastet. Durch die vergleichbare thermodynamische Stabilität beider DNA-Teilkonstrukte, ist ihr Dissoziationsverhalten ebenso vergleichbar und es ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 50% eines Abrisses (ca. 45pN) für jeweils eine der beiden Teilsequenzen.

Nach einem Abriß, welche im Kraftkurvenprofil erkennbar ist, wird der mit der Transport-DNA beladene AFM-Cantilever positionsgenau zu dem Zielbereich bewegt (Softwareerweiterung siehe Kapitel 3.3.4) und wiederum in Kontakt mit der Oberfläche gebracht, welche mit einer entsprechenden, komplementären Ankersequenz (S) zum zweiten Teilbereich des Transport-Oligonulkeotids (S') funktionalisiert ist (Abbildung 34, a, 2). Dort hybridisiert die freie Ankersequenz (S') der Transport-DNA mit der Anker-DNA der Oberfläche (S). Bei abermaligem Zurückziehen der AFM-Spitze kommt es mit wiederum 50%iger Wahrscheinlichkeit zu einem Abriß des DNA-Teilkonstruktes an der Cantilever-

Spitze zugewandten Seite, wonach das DNA-Transportmolekül erfolgreich transportiert und abgelegt wurde (Abbildung 34, a, 3). Dieser Vorgang wurde beliebig oft wiederholt mit gleichzeitiger Beobachtung durch TIRF-Fluoreszenzmikroskopie mit angekoppelter EMCCD-Kamera zur Detektion und Aufnahme von Videosequenzen.

6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Eigenschaft des DNA-Moleküls, aus zwei zueinander komplementären Strängen, selbstfindend eine Doppelhelix zu formen, wurde verwendet, um ein reversibles DNA-Kraftsystem zu etablieren. Dabei wurde ausgenutzt, daß die mechanische Stabilität eines Doppelstranges von der Sequenz, Anzahl der Basenpaare und der Belastungsgeometrie abhängt [Ess97, Kra03, Mor07, Rie99].

Einzelsträngige Transfer-DNA-Moleküle wurden mit Hilfe einer Ankersequenz in einem definierten Depot sequenzspezifisch angebunden. Die Transfer-DNA besaß zusätzlich zur Ankersequenz_{Cantilever} noch eine weitere Ankersequenz_{Surface}, die es ermöglichte, einzelne Transfer-DNA-Moleküle mit einem AFM-Cantilever (funktionalisiert mit der komplementären DNA) vom Depot aufzupicken. Anschließend wurde die Transfer-DNA mit Nanometerpräzision an die Zielstelle bewegt und durch Hybridisierung an eine komplementäre DNA abgesetzt (Abbildung 35).

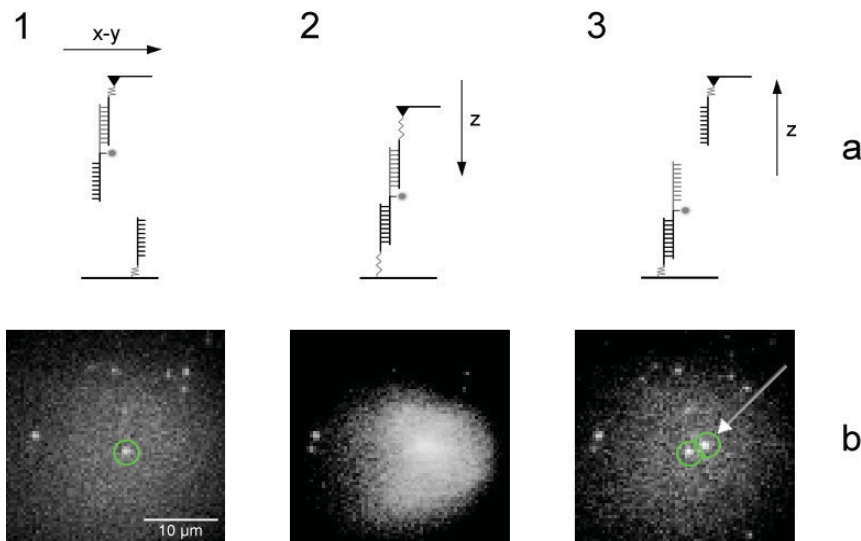


Abbildung 35: Fluoreszenzaufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei der Deposition des DNA-Transportmoleküls. Als Erkennungsreferenz wurde der mit der Transport-DNA beladene AFM-Cantilever (**a**, **1**) in einen Bereich gefahren, wo ein Transportmolekül an der Oberfläche hybridisiert vorliegt (**b**, **1**). Zum Zeitpunkt des Kontaktes der AFM-Spitze mit der DNA-beschichteten Oberfläche (**b**, **2**) hybridisieren die Ankersequenzen der Oberfläche und des Transportmoleküls (**a**, **2**). Beim zurückziehen reißt die Ankersequenz an der AFM-Spitzenzugewandten Seite (**a**, **3**) und das DNA-Transportmolekül ist an der Oberfläche gebunden (**b**, **3**)

Auf diese Weise war es möglich, mit einer einzigen AFM-Spitze mehrere Transport-Zyklen durchzuführen. Da anhand der Kraftkurvenprofile allein kein eindeutiger Nachweis eines gelungenen Einzelmolekültransportes erfolgen kann aufgrund derselben Abrißwahrscheinlichkeit beider Ankersequenzen, erfolgte der eindeutige Nachweis über die (TIR)-fluoreszenzmikroskopische Beobachtung des an dem Transportmolekül gebundenen Fluorophors Atto637N. Dieser wurde bei einem erfolgreichen Transport über eine längere Zeit bis zu seinem Bleichen hin beobachtet, um sicherzugehen, daß es sich um einen einzigen Fluorophor handelt und somit um ein einziges, transportiertes DNA-Molekül (Abbildung 36).

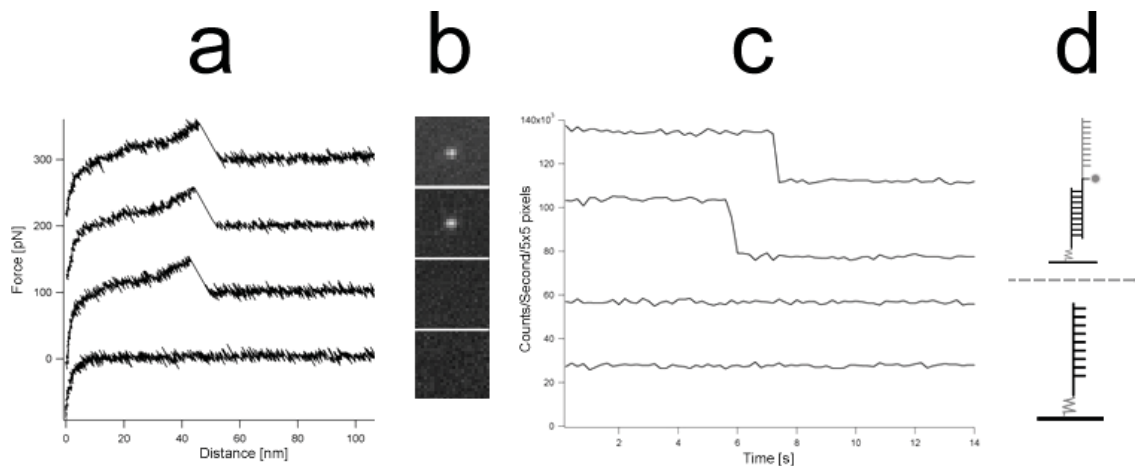


Abbildung 36: Darstellung der unterschiedlichen Kraftkurven- und Fluoreszenzdaten im Verlauf der Deposition des DNA-Transportmoleküls. Anhand der DNA-typischen Kraftkurvenprofile (a) kann ein Abriß von einer der beiden Anker-Teilsequenzen (d) registriert werden. Durch die Beobachtung des am Transportmoleküle gebundene Fluorophor im Fluoreszenzbild (b) und durch die Beobachtung eines einzelnen Bleichschrittes (c) kann der gelungene Einzelmolekültransport und somit der Abriß an der AFM-Spitzenzugewandten Seite nachgewiesen werden.

Die folgenden Zustände nach einem Transportzyklus konnten somit beobachtet und durch die zusätzlichen Fluoreszenzdaten interpretiert werden: Bei einem erfolgreichen Transport ist ein typische Kraftkurvenprofil beim Ablegen der Transport-DNA zu beobachten (Abbildung 36, a), was auch auf der Fluoreszenzaufnahme zu erkennen ist nach dem Zurückziehen des AFM-Cantilevers (Abbildung 36, b). Die Beobachtung der Fluoreszenzintensität in dem Depositionsbereich läßt zusätzlich durch einen einzigen Bleichschritt erkennen, daß es sich um ein individuelles Transportmolekül handelt (Abbildung 36, c), welches an der Ankersequenz der Glasoberfläche hybridisierte (Abbildung 36, d).

Da dieselbe Abrißwahrscheinlichkeit beider DNA-Teilsequenzen auch dazu führen kann, daß im Depositionsbereich das Konstrukt an der oberflächenzugewandten Seite reißen kann, wird das Transportmolekül mit dem Zurückziehen das AFM-Cantilevers aus dem Focusbereich der Fluoreszenzaufnahme nicht mehr zu beobachten sein, was anhand des Fluoreszenzbildes und dessen zeitabhängiges Intensitätsprofil deutlich zu erkennen ist. In diesem Stadium liegt das Transportmolekül immer noch hybridisiert an der AFM-Ankersequenz vor.

Im selben Kontext kann dieselbe Abrißwahrscheinlichkeit auch dazu führen, daß das Transportmolekül nicht erfolgreich im Depotbereich aufgenommen werden konnte, so daß

weder ein typisches Kraftkurvenprofil, noch der Fluorophor im Depositionsbereich zu beobachten ist.

Es gelang einen Einzelmolekültransport an einem reversiblen molekularbiologischem System durchzuführen, welches erlaubt auch einzelne Moleküle zu detektieren, aufzunehmen und an gewünschte Positionen abzulegen. In diesem Zusammenhang ist man von einem Depotbereich mit einer Vielzahl von Transportmolekülen unabhängig und dient als hervorragendes Werkzeug für die Nano-Strukturierung und den Aufbau biomolekularer Strukturen auf Festkörpern.

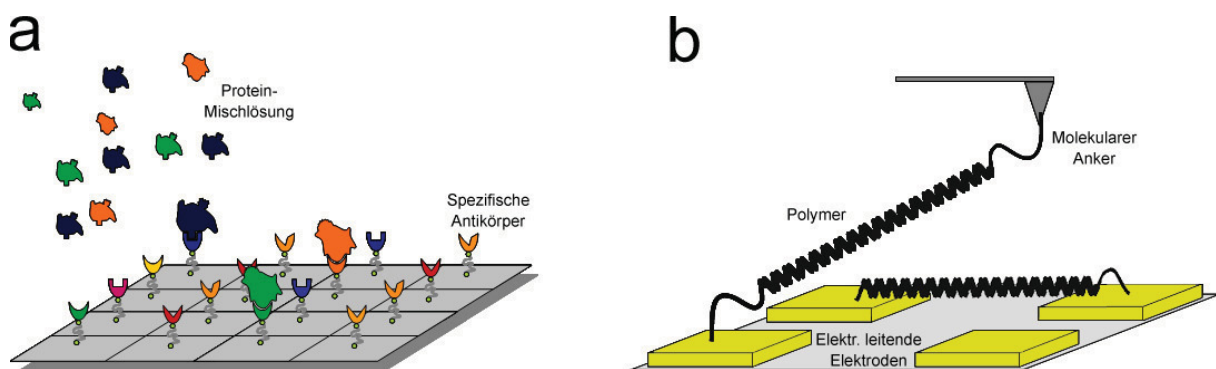


Abbildung 37: Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten durch die Nano-Strukturierung mit Hilfe des Einzelmolekül-Transportsystems. Für die sensitive Diagnostik im Bereich der Life Sciences ist es durch diese Methode prinzipiell Möglich, sogenannte Biochips (a) zu verwirklichen, welche auf einzelne, spezifische Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen basieren. Weiterhin wäre eine Synergie zwischen organischen Polymeren und nano-elektronischen Bauteilen (b) durch das Aufspannen von Netzwerken auf elektronische Schaltungen durchführbar.

Durch die Möglichkeit, anstatt des Fluorophores auch andere Moleküle, Polymere oder Nanopartikel and das Transportmoleküle zu binden, können durch diese Direct-Single-Molecule-Translocation (DSMT)-Methode beispielsweise Strukturen aufgebaut werden oder Polymere zwischen zwei Ankerpunkten gespannt werden, welche in der ultrasensitiv-diagnostischen und bio-elektronischen Nanotechnologie im Bereich der Life Sciences Verwendung finden können (Abbildung 37). Im diesem Zusammenhang ist auch die Verwendung anderer biomolekularer Ankersysteme möglich. Hier sei beispielsweise das Rezeptor-Ligand System Dodecin/Flavin hervorgehoben, welche anhängig vom angelegten, elektronischen Potential miteinander koppeln oder die molekulare Kopplung trennen [Gri08]. Dadurch wäre ebenfalls eine kontrollierte Kopplungsstrategie für die nano-Strukturierung molekularer Elemente prinzipiell möglich.

7 – Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die apparativen und methodischen Voraussetzungen zu mechanischen Einzelmoleküluntersuchungen mit simultaner, optischer Kontrolle und kontrollierter Nanomanipulation zur Assemblierung einzelner biomolekularer Bausteine unter physiologischen Bedingungen geschaffen. Dafür wurde ein kombiniertes AFFM-Meßsystem (Atomic Force Fluorescence Microscope) entwickelt, welches optische Einzelmolekülfluoreszenzmethoden mit simultaner, hochauflösender Rasterkraftmikroskopie und –spektroskopie ermöglicht. Durch die Kombination der komplementären Stärken beider Methoden ist es somit möglich, einzelne Moleküle und biologische Komplexe gleichzeitig optisch und mechanisch zu untersuchen. Dies ermöglicht Untersuchungen zu Strukturen, Dynamiken, Kinetiken und molekularer Wechselwirkungen einzelner Moleküle und Komplexe, welche genauere Aussagen über die individuellen Zustände ermöglichen als herkömmliche Methoden an Molekülensembles, die lediglich eine Auskunft über ein statistisches Mittel geben können.

Es wurden kraftspektroskopische Einzelmoleküluntersuchungen an dem Retinalproteinkomplex NpSRII:HtrII durchgeführt, welcher an der bakteriellen Phototaxis des Achaebakteriums *Natronobacterium pharaonis* als Initiator der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt ist. Das transmembrane Retinalprotein ist strukturell eng verwandt mit Bakteriorhodopsin, welches in einer Vielzahl von Eubakterien anzutreffen ist und zu den eukaryotischen Rhodopsinen höherer Lebewesen eine hohe genetische Verwandtschaft aufweist. Die Untersuchung an dem Sensorhodopsin-Transducer-Komplex zeigen ergänzende intra- und intermolekulare Wechselwirkungen - insbesondere während des Initialzustands der Signaltransduktion durch die induzierte Lichtaktivierung des Retinals. Einige davon konnten in Kristallstrukturen und ESR-Messungen in der Literatur bisher nicht eindeutig aufgezeigt werden.

Neben der Proteinfaltung und Elastizitätsmessungen einzelner Moleküle durch die Kraftspektroskopie sind Untersuchungen an spezifischen Rezeptor-Ligand-Systemen auf Einzelmolekülbasis für das Verständnis bezüglich des Aufbaus und der Funktion einzelner Biomoleküle auf atomarer Ebene erforderlich. Die wesentliche Voraussetzung für solche Untersuchungen stellt die kovalente Anbindung von biologischen Molekülen an Festkörperoberflächen dar, welche innerhalb dieser Arbeit optimiert und weiterentwickelt wurde. Es wurde ein allgemein gültiger Funktionalisierungsprozeß entwickelt, wodurch es prinzipiell möglich wurde, einzelne Vertreter der drei Klassen an Biomolekülen (DNA, Peptide, Proteine) mit hoher Reproduzierbarkeit für Einzelmolekültechniken mit hoher Anbindungsichte (bis zu einer dreifach höheren Dichte im Vergleich zu den Methoden in der Literatur) und hoher Passivität gegenüber unspezifischer Physisorption (ca. 3%) an Glas und Siliziumnitrid-Sonden anzubinden, ohne ihre native Struktur und Funktion durch den Vorgang zu beeinflussen. Anhand dieser Methodik wurden auch erste Versuche für die Herstellung sensitiver Biosensoren durchgeführt und dienten zugleich als Basis für nanomanipulatorische Methoden.

In diesem Zusammenhang wurden neben dem präzisen Adressieren, Verschieben und Aufnehmen einzelner Gold-Nanopartikel und fluoreszierenden Polystyrol-Sphären auch einzelne DNA-Moleküle kontrolliert mechanisch transportiert. Dabei wurde die Eigenschaft des DNA-Moleküls, aus zwei komplementären Strängen selbstfindend eine Doppelhelix zu formen, verwendet, um ein Kraftsystem zu etablieren. Mit Hilfe kovalent gebundener DNA-Ankersequenzen an der Glas- und Siliziumnitrid-Sondenoberfläche wurde eine fluoreszenzmarkierte, einzelsträngige Transfer-DNA von einem Depotbereich in unterschiedliche Zielbereiche transferiert. Die Reversibilität des DNA-Systemkonstrukts ermöglicht eine kontinuierliche Wiederholung und somit können Strukturen molekülweise aufgebaut werden. Ein entscheidender Vorteil ergibt sich dadurch, daß die Transfer-DNA mit einer Vielzahl unterschiedlicher Gruppen bzw. *Tags* modifiziert werden kann und somit die Möglichkeit entsteht, durch das entkoppelte DNA-Transfersystem prinzipiell auch unterschiedliche molekulare Bausteine transportieren und plazieren zu können.

Diese innerhalb dieser Arbeit entwickelten apparativen und methodischen Entwicklungen ermöglichen somit den prinzipiellen Aufbau molekularer Strukturen, welche insbesondere in den Bereichen der Life Sciences und molekularen Nanoelektronik zukünftig Verwendung finden werden, welche zu den Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts gehören.

8 – Summary

In this thesis, the technical and methodical requirements for single molecule force studies with simultaneous optical control were developed. In addition, controlled nano-manipulation for surface assembly of single molecular components under physiological conditions was performed. In this context an Atomic Force Fluorescence Microscopy (AFFM) setup was developed. This technique combines optical single molecular methodology with high resolution AFM-imaging and force spectroscopy. Due to the complementary strengths of both methods it is possible to investigate single molecules and molecular complexes optically and mechanically with single molecular resolution. This allows the study of dynamics, kinetics, structure and interactions of biomolecules, which are typically non-detectable by bulk measurements due to averaging.

Protein unfolding experiments were performed on the retinal protein complex NpSRII:HtrII of the archaebacteria *Natronobacteria pharaonis* using force spectroscopy. The sensory rhodopsin with its transducer is involved in the intracellular signal transduction pathway due to the photophobic behaviour of the bacteria. The structure shows a high degree of similarity with bacteriorhodopsin. Both proteins show a strong sequence homology with rhodopsins from higher organisms. The investigation of the NpSRII:HtrII complex revealed further intra- and intermolecular interactions, which have not been observed in studies using other structural techniques, such as crystallography and electron spin resonance.

The investigation of receptor-ligand interactions are essential for the understanding of the molecular composition and function of biomolecules at the atomic level. For such measurements the covalent immobilization of biomolecules to solid-state supports is essential. The functionalization process was optimized and further developed to immobilize a variety of biomolecules (DNA, peptides, proteins) reproducibly on glass and silicon nitride surfaces. The optimization of this immobilization procedure results in a high binding density (up to 3-fold higher density compared to the methods described in literature) as well as passive surface coating due to unspecific interactions (approx. 3%) without changing the molecules native

structure and function. With this process, studies were undertaken to develop sensitive biosensors which formed also the basis of nano-manipulating methods.

In addition, this technique has been used for the precise addressing, moving and picking-up of single gold particles and fluorescent polystyrol beads. This principle method also has been utilized for the manipulation of single DNA molecules which can be mechanically translocated under optical control. For the studies using DNA, the properties of the two complementary single stranded DNA annealing to form a double helix in physiological conditions was utilized to establish a DNA force system. With covalently bound anchor DNA sequences on glass and silicon nitride supports it was possible to acquire and translocate a single stranded transport-DNA. Because of the reversibility of the designed DNA-system it is possible to repeat this procedure continuously, building structures one molecule after another. The important advantage herein is the fact, that the transport-DNA can be modified with functional groups or different *tags*. In principle it is thus possible to build structures with other molecular components decoupled from the DNA transfer-system.

The technical and scientific developments within this work facilitate the procedure of building molecular structures. This has an important impact in the area of life sciences and molecular nano-electronics which are the key technologies for this century and beyond.

9 – Literaturverzeichnis

- [Alb03] C. Albrecht, K. Blank, M. Lalic-Multhaler, S. Hirler, T. Mai, I. Gilbert, S. Schaumann, T. Bayer, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. **DNA: A Programmable ForceSensor**. *Science* **301**(5631), 367-370, (2003)
- [All07] C. D. Allis, T. Jenuwein, and D. Reinberg. **Epigenetics**. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, (2007)
- [Ash86] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. **Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles**. *Optics Letters* **11**(5), 288, (1986)
- [Bal06] G. Balasundaram, T. J. Webster. **Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications**. *Nanomedicine* **1**(2), 169-176, (2006)
- [Bar05] F. W. Bartels. **BINDUNGSSTUDIEN AN EINZELNEN PROTEIN-DNA-KOMPLEXEN**. *Dissertation*, (2005)
- [Bin86] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber. **Atomic force microscope**. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930, (1986)
- [Bir02] A. Bird. **DNA methylation patterns and epigenetic memory**. *Genes Development* **16**(1), 6-21, (2002)
- [Bla03] K. Blank, T. Mai, L. Gilbert, S. Schiffmann, J. Rankl, R. Zivin, C. Tackney, T. Nicolaus, K. Spinnler, F. Oesterhelt, M. Benoit, H. Clausen-Schaumann and H.E. Gaub. **A force-based protein biochip**. *PNAS* **100** (20), 11356, (2003)
- [Bog82] Bogomolni, R. A. & Spudich, J. L. **Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium***. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6250-6254, (1982)

- [Bor07] E. Bordignon, Johann P. Klare, J. Holterhues, S. Martell, A. Krasnaberski, M. Engelhard and H. J. Steinhoff. **Analysis of Light-induced Conformational Changes of *Natronomonas pharaonis* Sensory Rhodopsin II by Time Resolved Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy.** *Photochem. Photobiol.* **83(2)** 263-72, (2007)
- [Bur99] Burnham N.A., Chen X., Hodges C.S., Matei G.A., Thoreson E.J., Roberts C.J., Davies M.C., Tendler S.J.B. **Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers.** *Nanotechnology* **14**, 1-6, (2003)
- [Bus94] Bustamante, C., Marko, J.F., Siggia, E.D. & Smith, S. **Entropic elasticity of lambdaphage DNA.** *Science* **265**, 1599-600, (1994).
- [Bus04] Bustamante, C., Chemla, Y.R., R., F.N. & D., I. **Mechanical processes in biochemistry.** *Annu Rev Biochem* **73**, 705-48, (2004).
- [Cam97] N. A. Campbell. **Biologie.** Spektrum Akademischer Verlag, (1997)
- [Car06] Carolyn R Cho, Mark Labow, Mischa Reinhardt, Jan van Oostrum and Manuel Peitsch. **The application of systems biology to drug discovery.** *Current Opinion in Chemical Biology* **10**, 294-302, (2006)
- [Che02] Chen, X. & Spudich, J. L. **Demonstration of 2:2 Stoichiometry in the Functional SRIHtrI Signaling Complex in *Halobacterium* Membranes by Gene Fusion Analysis.** *Biochemistry* **41**, 3891-3896, (2002)
- [Che91] J. Chen and N. C. Seeman. **Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube.** *Nature* **350**, 631-633, (1991)
- [Col84] Colton R.J., Engel A., Frommer J., Gaub H.E., Gewirth A.A., Guckenberger R., Heckl W., Parkinson B., Rabe J. **Procedures in scanning probe microscopes.** Wiley-VCH, (1998)
- [Die04] H. Dietz and M. Rief. **Exploring the energy landscape of GFP by singlemolecule mechanical experiments.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101(46)**, 16192-16197, (2004)
- [Die06] H. Dietz and M. Rief. **Protein structure by mechanical triangulation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103(5)**:1244-1247, (2006)
- [Dos07] C. Dose, D. Ho, H. E. Gaub, P. B. Dervan, and C. H. Albrecht. **Recognition of Mirror-Image DNA by Small Molecules.** *Angewandte Chemie International Edition* **46(44)**, 8384-8387, (2007)

- [Duf04] Yves F. Dufrêne. **Using nanotechniques to explore microbial surfaces.** *Nature Reviews Microbiology* **2**, 451-460 (2004)
- [Ebn07] A. Ebner, P. Hinterdorfer and H.J. Gruber. **Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers.** *Ultramicroscopy* **107**, 922, (2007)
- [Eng82] Engelmann, T.W. **Über Licht- und Farbenperception niedrigster Organismen.** *Plügers Arch.* **29**, 387–400, (1882)
- [Eng00] Engel, A., & Müller, D. J. **Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope.** *Nat. Struct. Biol.* **7**, 715–718, (2000)
- [Ess97] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot. **Mechanical separation of the complementary strands of DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(22), 11935-11949, (1997)
- [Flo94] E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub. **Adhesion forces between individual ligandreceptorpairs.** *Science* **264**(5157), 415-417, (1994)
- [För48] T. Förster. **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.** *Annalen der Physik* **6**(2), 55-75, (1948)
- [Ges99] R. F. Gesteland, T. R. Cech, and J. F. Atkins. **The RNA World.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, (1999)
- [Gie95] F. J. Giessibl. **Atomic Resolution of the Silicon (111)-(7x7) Surface by Atomic Force Microscopy.** *Science* **267**, 68, (1995)
- [Gor02] Gordeliy, V. I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A. J., Klare, J. P. & Engelhard, M. **Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex.** *Nature* **419**, 484-487, (2002)
- [Gri08] M. Grininger, G. Nöll, S. Trawöger, E.-K. Sinner, D. Oesterhelt. **Redox Dependent Switching of the Flavoprotein Dodecin at Electrode Surfaces.** *Biointerphases* **3**, 51-58, (2008)
- [Ham90] N. Hampp, C. Bräuchle, D. Oesterhelt. **Bacteriorhodopsin Wildtype and Variant Aspartate-96 → Asparagine as Reversible Holographic Media.** *Biophys. J.* **58**, 83-93, (1990)
- [Ham00] N. Hampp. **Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories.** *Chemical Reviews* **100**, 1755-1776, (2000)

- [Hil75] Hildebrand, E. & Dencher, N. A. **Two photosystems controlling behavioural responses in *Halobacterium***. *Nature* **257**, 46-49, (1975)
- [Hin02] P. Hinterdorfer, H. J. Gruber, F. Kienberger, G. Kada, C. Riener, C. Borken and H. Schindler. **Surface attachment of ligands and receptors for molecular recognition force microscopy**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **23**(2), 115-123, (2002)
- [Hin06] P. Hinterdorfer, Y. F. Dufrêne. **Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy**. *Nature Methods* **3**, 347 - 355, (2006)
- [Hoh99] I. P. Hohenfeld, A. A. Wegener, and M. Engelhard. **Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in escherichia coli**. *FEBS Lett.* **442**, 198-202, (1999)
- [Ish78] H. Ishida and J.L. Koenig. **Evaluation of surface treatments for glass fibers in composite materials**. *Polymer Engineering and Science* **18**, 128, (1978)
- [Jun05] L. Jun-Hong; L. Hai-Kuo; A. Hong-Jie; W. Guo-Hua; W. Ying; L. Min-Qian; Z. Yi; L. Bin; H. Jun. **Nano-manipulation of single DNA molecules based on atomic force microscopy**. *Engineering in Medicine and Biology Society* **27**, 7478 - 7481, (2005)
- [Kla04] Klare, J.P., Bordignon, E., Engelhard, M., & Steinhoff, H.-J. **Sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin: Light activated helix F movement**. *Photochemical and Photobiological Sciences* **3**, 543-547, (2004)
- [Kra03] R. Krautbauer, M. Rief and H.E. Gaub. **Unzipping DNA oligomers**. *Nano Letters* **3**, 493, (2003)
- [Lind01] K. Lindroos, U. Liljedahl, M. Raitio and A. Syvanen. **Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries**. *Nucleic Acids Research* **29**, e69, (2001)
- [Mar87] Y. Martin, H.K. Wickramasinghe. **Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale**. *Appl. Phys. Lett.* **50** (20), 1455-1457, (1987)
- [Mar90] Marwan, W. & Oesterhelt, D. **Signal transduction in *Halobacterium halobium***. *Cambridge University Press* **46**, 219-239, (1990)
- [Mar99] W. Marwan and D. Oesterhelt. **Biochemische Mechanismen einer einfachen Verhaltensreaktion**. *Chemie in unserer Zeit* **33**(3), 140-151, (1999)

- [May98] E. Mayr. **Two empires or three?** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 9720-9723, (1998)
- [Met06] E. Metwalli, D. Haines, O. Becker, S. Conzone and C.G. Pantano. **Surface characterizations of mono-, di-, and tri-aminosilane treated glass substrates.** *J. of Colloid and Interface Science* **298**, 825, (2006)
- [Mor07] J. Morfill, F. Kuhner, K. Blank, R. A. Lugmaier, J. Sedlmair, and H. E. Gaub. **B-S Transition in Short Oligonucleotides.** *Biophysical Journal* **93**(7), 2400-2409, (2007)
- [Mor07b] J. Morfill, K. Blank, C. Zahnd, B. Luginbuhl, F. Kuhner, K. E. Gottschalk, A. Pluckthun, and H. E. Gaub. **Affinity-Matured Recombinant Antibody Fragments Analyzed by Single-Molecule Force Spectroscopy.** *Biophysical Journal* **93**(10), 3583-3590, (2007)
- [Mou06] R. Moukhametzianov, J. P. Klare, R. Efremov, C. Baeken, A. Göppner, J. Labahn, M. Engelhard, G. Büldt and V. Gordeliy. **Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer** *Nature* **440**, 115-119, (2006)
- [Moy94] V. T. Moy, E. L. Florin, and H. E. Gaub. **Intermolecular forces and energies between ligands and receptors.** *Science* **266**(5183), 257-259, (1994)
- [Oes00] Oesterhelt, F., Oesterhelt, D., Pfeiffer, M., Engel, A., Gaub, H.E. and Müller, D.J. **Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins.** *Science* **288**, 143-146, (2000)
- [Pfe83] Pfeiffer, W. **Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize.** *Ber. Deut. Botan. Ges.* **1**, 524–53, (1883)
- [Rie97] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub. **Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM.** *Science* **276**(5315), 1109-1112, (1997)
- [Rie97b] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub. **Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy.** *Science* **275**, 1295-1297, (1997)
- [Rie99] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. **Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules.** *Nature Structural Biology* **6**(4), 346, (1999)

- [Rot06] P. W. K. Rothemund. **Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns.** *Nature* **440**(7082), 297-302, (2006)
- [Rus88] M. J. Russell, A. J. Hall, A. G. Cairns-Smith, and P. S. Braterman. **Submarine hot springs and the origin of life.** *Nature* **336**, 117, (1988)
- [Sal07] K. Salaita, Y. Wang, C. A. Mirkin. **Applications of dip-pen nanolithography.** *Nature Nanotechnology* **2**(3), 145-155, (2007)
- [Sch00] Schmies, G., Luttenberg, B., Chizhov, I., Engelhard, M., Becker, A., and Bamberg, E. **Sensory rhodopsin II from the haloalkaliphilic Natronobacterium pharaonis: light-activated proton transfer reactions.** *Biophys. J.* **78**, 967–976.(2000)
- [Sma01] R. E. Smalley. **Of Chemistry, Love and Nanobots.** *Scientific American* **285**(3), 76-77, (2001)
- [Smi92] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. **Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads.** *Science* **258**(5085), 1122-1126, (1992)
- [Spu84] Spudich, J. L. & Bogomolni, R. A. **Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin.** *Nature* **312**, 509-513, (1984)
- [Spu88] Spudich, J. L. & Bogomolni, R. A. **Sensory Rhodopsins of Halobacteria.** *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 193-215, (1988)
- [Spu98] Spudich, J.L. **Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins.** *Mol. Microbiol.* **28**, 1051–105, (1998)
- [Sun04] D. Sundrani, S. B. Darling, S. J. Sibener. **Hierarchical assembly and compliance of aligned nanoscale polymer cylinders in confinement.** *Langmuir* **20** (12), 5091–5099, (2004)
- [Tic06] M. M. Tice and D. R. Lowe. **Photosynthetic microbial mats in the 3,416-Myr-old ocean.** *Nature* **431**, 549-552, (2006)
- [Tur03] A. J. Turberfeld, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, M. I. Blakey, and F. C. Simmel. **DNA Fuel for Free-Running Nanomachines.** *Physical Review Letters* **90**(11), 118102, (2003)
- [Tur50] A. M. Turing. **Computing machinery and intelligence.** *Mind* **59**, 433-460, (1950)

- [Van91] E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing and I. Lundström. **Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide.** *Journal of Colloid and Interface Science* **147**, 103, (1991)
- [Vog08] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld. **A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes.** *Angewandte Chemie International Edition* **47**(29), 5465 - 5469, (2008)
- [Wan92] D. Wang, F.R. Jones and P. Denison. **Surface analytical study of the interaction between γ -amino propyl triethoxysilane and E-glass surface I.** *J. of Materials Science* **27**, 36, (1992)
- [Wan93] D. Wang and F.R. Jones. **Surface analytical study of the interaction between γ -amino propyl triethoxysilane and E-glass surface II.** *J. of Materials Science* **28**, 2481, (1993)
- [Weg00] A. A. Wegener, I. Chizhov, M. Engelhard and H.J. Steinhoff. **Time-resolved Detection of Transient Movement of Helix F in Spin-labelled Pharaonis Sensory Rhodopsin II** *J. Mol. Biol.* **301**, 881-891, (2000)
- [Weg01b] Wegener, A. A., Klare, J. P., Engelhard, M. & Steinhoff, H. J. **Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis.** *EMBO J.* **20**, 5312-5319, (2001)
- [Wei99] S. Weiss. **Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules.** *Science* **283**(5408), 1676-1683, (1999)
- [Whi98] W. B. Whitman, D. C. Coleman, and W. J. Wiebe. **Prokaryotes: The unseen majority.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(12), 6578-6583, (1998)
- [Win98] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, and N. C. Seeman. **Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals.** *Nature* **394**, 539-544, (1998)
- [Ye08] S. H. Ye, C. A. Johnson, J. R. Woolley, T. A. Snyder, L. J. Gamble, W. R. Wagner. **Covalent surface modification of a titanium alloy with a phosphorylcholine-containing copolymer for reduced thrombogenicity in cardiovascular devices.** *Jornal of Biomed. Mater, Res A*, in Print, (2008)
- [Yil04] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin. **Kinesin Walks Hand-Over-Hand.** *Science* **303**(5658), 676-678, (2004)

- [Yur00] B. Yurke, A. J. Turberfeld, A. P. Mills, F. C. Simmel, and J. L. Neumann. **A DNAfuelled molecular machine made of DNA.** *Nature* **406**, 605-608, (2000)
- [Xon07] X. Yong-Mei, H. Zhi-Shan, S. Onnop, B. Ayse and G. Erdogan. **Minimizing the surface effect of PDMS-glass microchip on polymerase chain reaction by dynamic polymer passivation.** *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **82**, 33, (2007)
- [Zam00] N. Zammatteo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi and J. Remacle. **Comparison between Different Strategies of Covalent Attachment of DNA to Glass Surfaces to Build DNA Microarrays.** *Analytical Biochemistry* **280**, 143, (2000)

10 – Veröffentlichungen

- I. R. Janissen, L. Oberbarnscheidt, F. Oesterhelt. **Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications.** *Journal of Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71, 200-207 (2009)
- II. L. Oberbarnscheidt, R. Janissen, F. Oesterhelt. **Direct and Model Free Calculation of Force Dependent Dissociation Rates and Free Energy Barriers from Force Spectroscopic Data.** *Submitted to Biophysical Journal*, October 2008
- III. L. Oberbarnscheidt, R. Janissen, Svetlana Martell, Martin Engelhard, Filipp Oesterhelt. **Atomic Force spectroscopy measures light activation and transducer binding induced structural changes in the Sensory Rhodopsin II.** *Submitted to JMBE*, December 2008
- IV. R. Janissen, F. Oesterhelt. **Directed Deposition of Single Molecules on Surfaces.** *Submitted to Nanoscience and Nanotechnology*, Januar 2009

Poster-Präsentationen

- R. Janissen*, V. Arning*, M. Sára, U. Sleytr, F. Oesterhelt. **Controlled Positioning of Biomolecules with AFM: Proof of Concept.** *Bunsentagung Mai 2005*, Frankfurt am Main, Deutschland
- R. Janissen*, V. Arning*, F. Oesterhelt. **Controlled Positioning of Biomolecules with AFM.** *International Conference of Scanning Probe Microscopy September 2005*, München, Deutschland. **Auszeichnung: Zweitbeste Präsentation**
- R. Janissen*, V. Arning*, F. Oesterhelt. **Towards Nanomanipulation with Atomic Force Microscopy and Fluorescence Control.** *Annual Linz Winter Workshop Februar 2006*, Linz, Österreich
- R. Janissen*, V. Arning*, F. Oesterhelt. **Specific and controlled positioning of single biomolecules with Atomic Force Microscopy.** *International Conference of Scanning Probe Microscopy September 2006*, Dresden, Deutschland
- R. Janissen*, V. Arning*, F. Oesterhelt. **Controlled nanomanipulation of single biomolecules with AFM.** *Annual Linz Winter Workshop Februar 2007*, Linz, Österreich
- R. Janissen, F. Oesterhelt. **Specific and controlled nanomanipulation of single biomolecules with Atomic Force Fluorescence Microscopy.** *International Euro AFM Workshop September 2007*, Münster, Deutschland. **Auszeichnung: Beste Präsentation**

I



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications

Richard Janissen, Leoni Oberbarnscheidt, Filipp Oesterhelt*

Institute of Physical Chemistry II, Heinrich-Heine University, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2008

Received in revised form 5 February 2009

Accepted 10 February 2009

Available online 21 February 2009

Keywords:

Surface chemistry

Protein immobilization

DNA immobilization

Peptide immobilization

Atomic force microscopy

ABSTRACT

Covalent chemisorption of biomolecules to surfaces with high density and low unspecific background is prerequisite for most optical and mechanical single molecule experiments and accordingly, many recipes have been developed. However, new establishment of the surface functionalization process in the lab usually is still difficult and time consuming due to the complex procedures containing many pitfalls. Therefore, based on the known recipes, we developed and optimized a simple straight forward protocol. We demonstrated it resulting in a high density of the coupled biomolecules, homogeneous surfaces and a low unspecific background when binding nucleic acids, peptides and proteins.

The protocol was optimized for borosilicate cover glasses and silicon nitride atomic force microscope cantilevers commonly used in single molecule experiments and takes advantage of commonly used chemicals. It consists of only four steps, silanol group generation, amination, grafting of poly(ethylene glycol) to the surface and biomolecule coupling. All individual steps were optimized comparing different variations partially described in the literature. Finally, a detailed description is provided which allows avoiding most sources of contamination, often being a main hurdle on the way to single molecule experiments.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Due to the exceptional sensitivity of single molecule detection and its ability to detect unique events in an ensemble of molecules it presents a huge potential for the study of biorecognition processes. The development of biosensors and supports with conjugated biomolecules has important applications in areas such as environmental science and biomedical research.

However, due to problems associated with the sensitivity, reproducibility, long-term stability, and non-specific binding of biomolecules to surfaces, biosensors for DNA, peptides and proteins are not widely available from commercial sources. In order to circumvent these problems new approaches have to be developed to create biosensors with high chemical stability, high reproducibility and fewer non-specific surface adsorption artefacts.

Attachment of DNA, peptides and proteins to a solid support is of great interest for biotechnological, molecular biological and

sensitive diagnostic applications. Different solid supports, such as glass, silicon, silicon nitride, magnetic beads and polymers are used for single molecule application studies. Different immobilization methods, including entrapment, adsorption and chemical binding are applied to couple different biomolecules both covalently and non-covalently to surfaces. Due to the high background resulting from non-specific adsorption with non-covalent immobilization methods, covalent immobilization which selectively links biomolecule probes to solid supports is the method of choice for single molecule applications.

To allow easy access to bio-functionalized surfaces we developed a simple straight forward protocol for coupling different biomolecules (DNA, peptides and proteins) to silicon nitride AFM tips and borosilicate glasses with different biomolecules (DNA, peptides and proteins) in only three steps (Fig. 1): (i) generation of amino groups as grafting sites on the surface, (ii) attachment of a heterobifunctional PEG linker with its one end using a pre-activated carboxylic group, and (iii) coupling of biomolecules via a peptide bond formation. These three steps and the pre-activation of glass and silicon nitride surfaces to generate silanol groups before amination have been analyzed and optimized to gain a reproducible and high coupling efficiency and homogenous surface functionalization.

A comparison of surface amination through amino silane (APTES) and silanol group esterification with ethanolamine hydrochloride is described in the literature [1] and both methods

Abbreviations: AFM, atomic force microscope (or microscopy); BSA, bovine serum albumin; DMSO, dimethylsulfoxide; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; H₂O₂, hydrogen peroxide; H₂SO₄, sulphuric acid; HCl, hydrogen chloride; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; MeOH, methanol; NHS, N-succinimidyl; PBS, phosphate buffered saline; PEG, poly(ethylene glycol); SSC, saline-sodium citrate.

* Corresponding author. Tel.: +49 211 81 14387; fax: +49 211 81 14623.

E-mail address: filipp.oesterhelt@uni-duesseldorf.de (F. Oesterhelt).

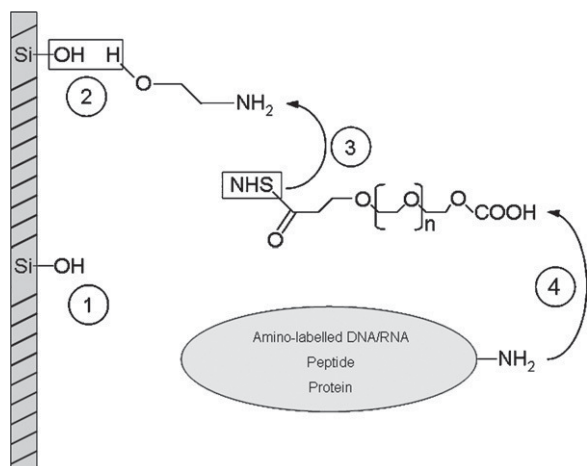


Fig. 1. Scheme of the immobilization procedure. Freshly cleaned and pre-activated support was incubated for 24 h in solution of 5 M ethanolamine hydrochloride in water-free DMSO at room temperature (1). After the esterification reaction of ethanolamine hydrochloride to the surface silanol groups, the supports were washed in DMSO, pure ethanol and water and then dried in a nitrogen stream (2). Aminated supports were immersed for 1 h in a dry DMSO solution containing 2 mM of heterobifunctional poly(ethylene glycol)-linker (NHS-PEG-COOH_{MW3400}) and 0.5% (v/v) triethylamine. The supports were washed afterwards in chloroform and water (3). Covalent immobilization of different biomolecules with free accessible amino groups was achieved via peptide bond formation. Here one-step direct coupling with EDC or a two-step indirect coupling with pre-activated carboxylic groups through EDC/NHS-activation was performed, which depends on the desired biomolecule for immobilization. After immobilization, the surfaces were washed stringent with an adequate washing procedure, dependent on the attached biomolecule (4).

were proven to be equally suitable to create an acceptable number of amino grafting sites for poly(ethylene glycol) attachment. However, ethanolamine hydrochloride serves better as amination substance in respect to the overall binding rate and has shown homogeneous coating compared to silanization in our observations. Generally, alkoxysilane molecules hydrolyze rapidly in water forming isolated monomers, cyclic oligomers and large intramolecular cycles [2,3], whereas the dominating species is dependent on the silane type, concentration, pH, temperature and reaction time as well as storage conditions. It has been shown, that silanization with amino ethoxy silane on solid surfaces produces no homogeneous surfaces, but “islands” with large dimensions [4]. The polysiloxane structure inside such islands is also non-uniform and is composed of a 3D network of polysilane [5,6]. However, most single molecule applications and ligand–receptor investigations with AFM, optical tweezers and magnetic tweezers require a well-defined linker length, which is difficult to achieve using silanes because of their high tendency of self-polymerization. Instead we used ethanolamine hydrochloride, which creates homogeneous monolayers, an important prerequisite for homogeneous functionalization procedures.

To allow the immobilized biomolecules to interact with other molecules in their native way a distance of several nanometres between the biomolecule and the surface through flexible linkers is needed. Linear PEG chains have been commonly used to attach single biomolecules to glass surfaces, beads and AFM tips [7–12]. In comparison to other linker molecules, such as carboxyamyllose [13] or dextran [14], poly(ethylene glycol) is simpler in handling, well characterized and chemically and physically inert. Additionally, it allows a rapid and free re-orientation of the attached biomolecule and also shields the surface due to non-specific interactions between biomolecules and surface [15,16]. The carboxylic group of the custom-synthesized heterobifunctional NHS-PEG-COOH applied here can be used for biomolecule immobilization and reacts less often non-specifically compared to the more commonly used amino and aldehyde end groups [11,17–19].

In this study, the binding capacity of three different PEG linkers (NHS-PEG-COOH_{MW3400}, NHS-PEG-Aldehyde_{MW800} and NHS-PEG-Maleimide_{MW3400}) was compared with different immobilization strategies.

The final step in the immobilization process was also analyzed and optimized depending on the desired biomolecule to be attached. In this study an NH₂-labelled ssDNA oligonucleotide, a His₁₀ containing peptide as His-tag and the prion-protein antibody IgG_{Saf32} were tested to establish a general functionalization method for all kinds of biomolecules. For the final biomolecule attachment, the known method of peptide binding [20] including the use of EDC and sulfo-NHS with a high covalent binding rate [7] was applied reproducibly, without damaging the biomolecules or affecting their native behavior.

In this study a general “easy-to-use-protocol” for reliable and improved surface functionalization with ssDNA oligonucleotides was developed and evaluated by quantitative comparison to existing protocols. Finally, the applicability of the optimized method was demonstrated also for the immobilization of peptides and proteins.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

Super pure-grade materials were used, when commercially available. Si₃N₄ AFM tips (MLCT series) were bought from Veeco Instruments (Dourdan, France). NHS-PEG-COOH_{MW3400} was custom-synthesized by LaysanBio (AL, USA). Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} was purchased from Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). NHS-PEG-Aldehyde_{MW800} was synthesized by Hermann Gruber (Keppeler-University Linz, Austria). NHS-PEG-Maleimide_{MW3400} was purchased from Rapp Polymere (Tübingen, Germany). Borosilicate glass slides were purchased from Schott (Jena, Germany). Used DNA oligonucleotides (sequence of binding-ssDNA: 5'-NH₂-CCACTCGTGACGCATTACCTCAGC-AGCACTCTCTCGG-3'; complementary fluorophore labelled ssDNA: 5'-CCGAGGAGGAGTGCTGCTGAGGTGAATGCCTCAGAGTGG-Atto647N-3') were synthesized by PURIMEX (Gebenstein, Germany). Antibody IgG_{Saf32} were purchased from SpiBio (Montigny-le-Bretonneux, France). His₁₀ containing peptide (sequence: N-GGSGSGHHHHHHHHHHH-C) was synthesized at the BMFZ (Heinrich-Heine University, Germany). SybrGreenII was bought from Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany). Hellmanex cleaning detergent was purchased from Hellma (Mühlheim, Germany). Labelled Penta-His antibody labelled with Alexa488 was bought from Qiagen (Hilden, Germany). Alexa Fluor 633 F(ab')-fragment of goat anti-mouse IgG (H + L) was purchased from Invitrogen (Karlsruhe, Germany). Ultra pure water was gained from the water processing apparatus Arium 611 from Sartorius (Goettingen, Germany).

2.2. Glass supports

The experiments in this study were done with glass slides due to their simpler handling compared to cover slips commonly used in single molecule experiments. Since cover glasses are generally made of borosilicate, the experiments were consequently done on borosilicate cover slides. Furthermore, an approximately 15% higher immobilization density on borosilicate glass slides was achieved compared to common used soda-lime glass slides (data not shown).

2.3. General cleaning procedure of borosilicate glass supports and silicon nitride AFM tips

Cleaning before pre-activation and amination with ethanolamine hydrochloride is important for glass and silicon

nitride surfaces. The glass cleaning procedure was developed in the Institute of Physical Chemistry (Heinrich-Heine University) for both, cleaning and reducing fluorescence background and controlled via TIRF measurements. Glass surfaces were covered in 5% (v/v) Hellmanex solution and sonicated for 20 min at 37 °C. After washing 10 times with water, the surfaces were covered in pure acetone and sonicated for further 20 min. After an additional washing step in water a 20 min ultrasonication in pure ethanol was performed. The plate was washed again with water before a final 20 min ultrasonication step in pure water. After cleaning, the surfaces were dried in a nitrogen flow. The silicon nitride AFM tips were just washed twice in dry chloroform and dried in a nitrogen stream before further functionalization.

2.4. Working protocol for surface functionalization and immobilization of ssDNA oligonucleotides

This easy to use surface functionalization and amino-labelled oligonucleotide immobilization protocol is based on different published protocols and is used in the following as a starting point in the detailed protocol optimization process (Fig. 1).

Pre-activation of a cleaned surface is important in order to generate a high density of silanol groups on the surfaces, which allows surface amination through an esterification reaction. The borosilicate glass and silicon nitride supports were pre-activated in piranha solution (3:1 (v/v), H₂SO₄:H₂O₂) for 30 min at room temperature. After washing shortly in pure water and drying in a nitrogen flow, the supports were immersed in 5 M ethanolamine hydrochloride in water-free DMSO for 24 h at room temperature for homogeneous amination. This procedure was based on studies where ethanolamine amination was tested with different molarities and temperatures [1]. After amination, the supports were washed in dry DMSO, in pure ethanol and finally 5 times with ultra pure water and dried again in a nitrogen flow. In the second step of functionalization, the amino-reactive heterobifunctional poly(ethylene glycol) NHS-PEG-COOH_{MW3400} was immobilized on the supports which serves as a linker between the surface and the amino-labelled ssDNA oligonucleotide. 2 mM of the PEG linker was dissolved in water-free chloroform with 0.5% (v/v) triethylamine and the supports were incubated for 1 h at room temperature in this PEGylation solution. The supports were washed several times in ultra pure water after the PEGylation process. As our standard process, amino-labelled ssDNA oligonucleotides were immobilized to the free accessible carboxylic groups of the PEG linker via peptide binding. The peptide binding method is based on the one-step method with EDC in acidic buffer as carboxyl activation substance [7] to achieve the highest possible ssDNA immobilization rate. 10 μM amino-labelled ssDNA oligonucleotide was dissolved in 100 mM MES buffer (pH 4.75) with 50 mM EDC and added to the PEGylated supports. After 1 h reaction time at room temperature, the supports were washed for 5 min with ultra pure water, 10 min in a 100 mM KCl solution and finally again 5 min with ultra pure water.

2.5. Sample preparation and specific ligand binding

For the sample preparation and the optimization of the protocol in this study, the following sample configuration was used.

The 40b ssDNA oligonucleotide was covalently bound to the surface according to the working protocol (Fig. 2A and C) as a volume defined droplet of 0.5 μl. To test non-specific binding of ssDNA to the PEGylated surface, complementary 40b fluorophor labelled ssDNA was given on the support with a drop of about 20 μl volume in a wet atmosphere which covered a wider area around the previously immobilized ssDNA to allow simultaneous control of unspecific background interactions. The hybridization was done with a concentration of about 10 μM on the prepared surface in

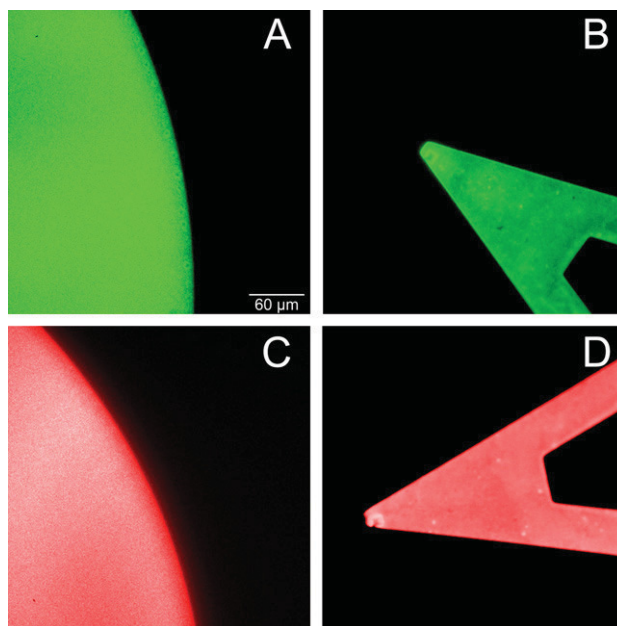


Fig. 2. Immobilization of 40b ssDNA oligonucleotide on borosilicate glass slides and silicon nitride AFM tips. On glass slides (A and C), 40b amino-labelled oligonucleotide was covalently bound to the PEG-modified surface in a round spot (approximately 200 μm). On silicon nitride supports (B and D), 40b amino-labelled ssDNA was covalently bound to the entire PEG-modified cantilever. (A and B) Fluorescence control was done via 0.02 × single strand DNA staining SybrGreen. (C and D) A complementary 40b ssDNA oligonucleotide, labelled with Atto647N fluorophor was given to the supports.

20 mM TRIS/HCl hybridization buffer (pH 8.4) containing 100 mM NaCl and washed afterwards to remove non-specific ssDNA surface adsorptions in 2 × SSC buffer at 65 °C (10 °C below the melting temperature) for 5 min, in 0.01 × SSC buffer at room temperature for another 5 min and finally stored in the hybridization buffer for further measurement.

The silicon nitride AFM tips were completely covered in the ssDNA binding and hybridization solutions because of their small dimensions (Fig. 2B and D).

To analyse the peptide immobilization quality, the immobilized His₁₀ containing peptide was detected via the fluorophor labelled His-tag specific Penta-His-antibody labelled with an Alexa488 fluorophor.

The IgG_{saf32} antibody immobilization was verified through an Alexa633-labelled second antibody of goat anti-mouse IgG. The experimental procedure is described in detail in the respective description.

2.6. Experimental evaluation procedure

To evaluate the successful immobilization, the overall binding efficiency and the homogeneity of the functionalization procedure, the surfaces and AFM tips were analyzed via fluorescence detection of fluorophor labelled specific ligands binding to the immobilized biomolecules.

The samples were measured using an inverted microscope (Olympus IX71, Hamburg, Germany) with a peltier-cooled ECCD camera (Andor IXON, 512 × 512 pixels, Belfast, Ireland). Fluorophor excitation was achieved by a 150 W Xenon-lamp with the specific filter sets (AHF, Tübingen, Germany) due to the different fluorophores of the counter molecules (F41-054 for Alexa488, F41-008 for Alexa633 and Atto647N). On each sample the fluorescence intensity (in counts/s) was measured by taking the average over five areas of 10 × 10 pixels. Each experiment was performed five times to test the reproducibility.

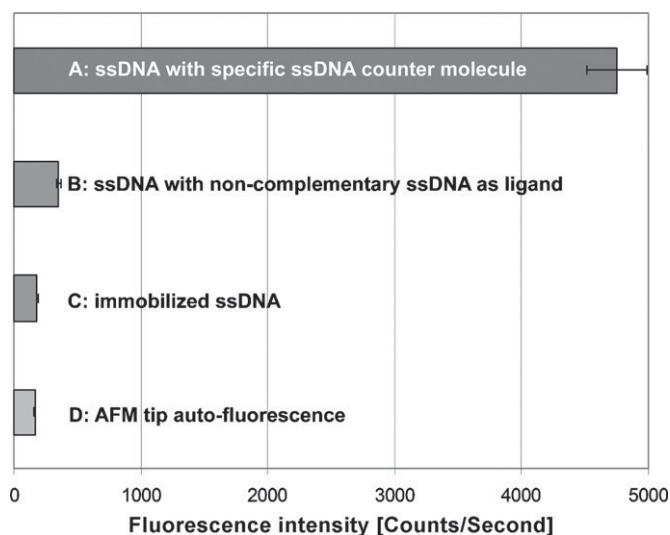


Fig. 3. DNA immobilization on silicon nitride AFM tips. (A) Immobilized 40b amino-labelled ssDNA, hybridized with complementary Atto647N-labelled oligonucleotide. (B) Same functionalization as in (A), but hybridized with non-complementary Atto647N-labelled ssDNA. (C) Immobilized ssDNA as in (A) and (B), but without further treatment with fluorescent counter molecule. (D) Auto-fluorescence of cleaned silicon nitride AFM tips.

2.7. Verification via atomic force microscopy measurements

We used combined TIR (total internal reflection) fluorescence microscopy with an atomic force microscope (MFP3D, Asylum Research, USA) to verify the immobilization of biomolecules on surface and the topography change of glass supports due to different pre-activation substances.

2.8. Supplemental information

A brief flowchart with the functionalization and biomolecule immobilization strategy and a commented protocol for each step of the process can be found in the [supplemental information](#).

3. Results and discussions

3.1. Covalent immobilization of ssDNA oligonucleotides to glass and silicon nitride supports

The amino-labelled 40b ssDNA oligonucleotide was successfully immobilized covalently to PEG-functionalized borosilicate glasses and silicon nitride supports with the described working protocol. The results from this preparation will be taken as reference data when varying the protocol in the further described optimization process. The immobilization on borosilicate glass and silicon nitride AFM cantilevers, which was analyzed by SybrGreenII ssDNA staining and by hybridization of complementary Atto647N labelled ssDNA as ligand, is shown in Fig. 2. The immobilization is homogeneous with low fluorescence background of about 3% on borosilicate glass by analysis via complementary fluorophor labelled ssDNA oligonucleotide. This low background ratio demonstrates that the used NHS-PEG-COOH linker also passivates the surface in respect to non-specific binding. The non-specific adsorption could occur from the complementary oligonucleotide itself or due to the attached Atto647N fluorophor, adsorbing to the PEG chain or the carboxylic end groups of the PEG linker.

The ssDNA immobilization with NHS-PEG-COOH_{MW3400} as linker molecule was applied to silicon nitride AFM cantilevers in the same way (Fig. 3) as to borosilicate glass slides. For detailed analysis of the immobilization and detection quality, the ssDNA immobi-

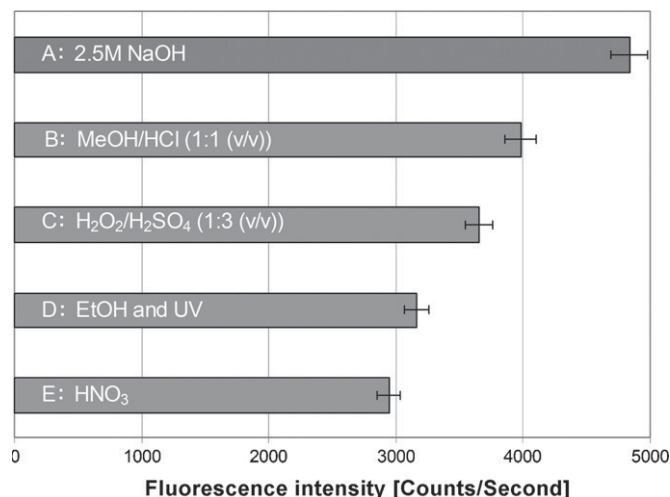


Fig. 4. Comparison of different methods to generate silanol groups on borosilicate glass surface. Solutions and treatment prior to the amination step were varied. (A) 24 h in 2.5M NaOH at room temperature. (B) 1 h in 1:1 (v/v) MeOH:HCl at room temperature. (C) 30 min in piranha solution (1:3 (v/v) H₂O₂/H₂SO₄). (D) 30 min in ethanol, dried with N₂, and 1 h exposed to UV. (E) 1 h in nitric acid in boiling water bath. All surfaces were washed afterwards shortly in ultra pure water and dried with N₂ before further functionalization.

lization experiments were repeated five times. To determine the amount of non-specific ssDNA and linked fluorophor interaction with the functionalized silicon nitride surface, three negative tests were simultaneously performed. In the first negative test ssDNA functionalized silicon nitride AFM tips were incubated in a solution with non-complementary Atto647N-labelled ssDNA, in a second, ssDNA functionalized cantilevers were measured without further treatment and finally, the auto-fluorescence of cleaned cantilevers was determined.

The auto-fluorescence of the silicon nitride support and the immobilization without fluorescent ligand molecule shows an equal non-specific adsorption amount of 3% in respect to the immobilization on borosilicate glass slides. The successful and reproducible immobilization on silicon nitride AFM cantilevers agrees with the binding characteristics observed on borosilicate glass surfaces (Fig. 4C).

3.2. Optimizing the single functionalization steps to achieve higher immobilization efficiency

For optimizing the surface functionalization protocol, all individual steps in the entire functionalization process were varied systematically with respect to the working protocol, detecting the density and homogeneity via the complementary fluorophor labelled DNA oligonucleotides hybridized to the immobilized ssDNA. The images were taken with the IXON EMDDC camera and results are given in camera counts/s.

3.3. Pre-activation of supports

Already the pre-activation, which aims for silanol group generation on the substrate, is a very important step with respect to the amount of biomolecules finally bound to the surface. Thus, we compared four different protocols described in the literature to pre-activate borosilicate glass supports (Fig. 4) with our approach of using sodium hydroxide as pre-activation substance. Freshly cleaned borosilicate glass slides (see methodical part) were (i) covered in nitric acid (65%) in a boiled water bath for 1 h [7]; (ii) treated in pure ethanol for 10 min, dried in nitrogen stream and exposed to UV-light (UVO-Cleaner 42-220, Jelight Company Inc.,

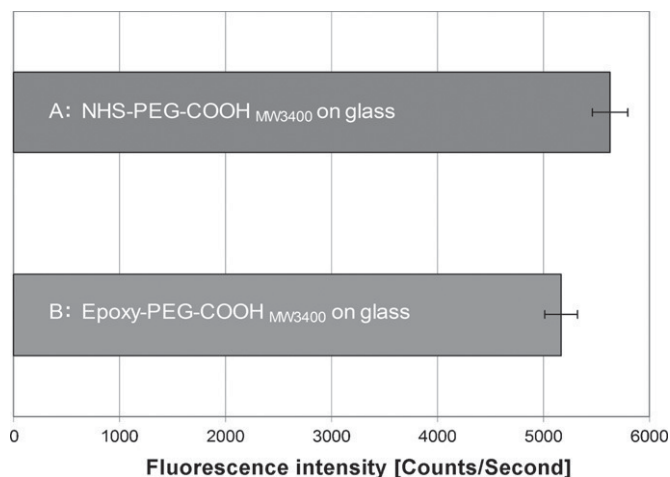


Fig. 5. Comparison between direct coupling of Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} to clean, pre-activated glass surface and the use of NHS-PEG-COOH_{MW3400} with ethanolamine hydrochloride aminated surface. (A) Indirect coupling of NHS-PEG-COOH_{MW3400} to prior aminated surface in dry DMSO solvent with 0.5% (v/v) triethylamine. (B) Direct coupling of Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} in dry CHCl₃ solvent with 0.5% (v/v) triethylamine.

Irvine, USA) for 1 h [11]; (iii) deposited in fresh piranha solution for 30 min at room temperature [8,17]; (iv) incubated for 1 h in 1:1 (v/v) MeOH:HCl [14] and (v) stored for 24 h in 2.5 M NaOH at room temperature. After treatment, the pre-activated glass supports were rinsed quickly with ultra pure water and dried in a nitrogen flow. Further treatment was performed as described in Section 2.4.

The comparison showed that the use of 2.5 M NaOH over 24 h was the best method to generate a high number of silanol groups on borosilicate glass supports, which allows a high density of amination and further covalent biomolecule immobilization. The commonly used piranha solution, which was also applied in our standard functionalization procedure, results in 24% less fluorescence intensity compared to the NaOH pre-activation.

Additionally, the surface roughness of cleaned and NaOH-activated glass was investigated with an AFM to determine, if the strong alkalise treatment significantly changes the surface topography, which would be a disadvantage of this pre-activation method. However, the AFM measurements showed no difference in the surface topography and the roughness of about 1.0 ± 0.2 nm in average was equal to non-treated cleaned glass.

3.4. Direct coupling of silanol-reactive PEG linker to glass and silicon nitride supports

We took advantage of the general property of epoxy rings to bind covalently to amino groups and hydroxyl groups, and also tested the direct coupling of a heterobifunctional PEG linker which bears an active epoxy ring to the silanol groups of the pre-activated glass surfaces and silicon nitride AFM tips. This alternative functionalization procedure saves preparation time and possible contamination in respect to the used substances and solvents for the additional functionalization and washing steps.

2 mM Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} was dissolved in dry CHCl₃ with 0.5% (v/v) triethylamine and was let to react with the pre-activated glass (Fig. 5) and silicon nitride supports (Fig. 6) for 1 h at room temperature. Here, all supports were pre-cleaned as described before, pre-activated with 2.5 M NaOH for 24 h, washed shortly with ultra pure water and were then either directly used for PEGylation with Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} or functionalized with ethanolamine hydrochloride and NHS-PEG-COOH_{MW3400}. Further treatment was performed as described in Section 2.4.

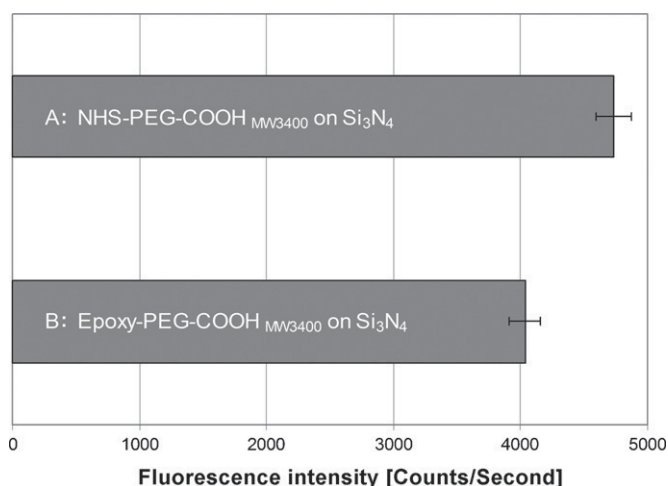


Fig. 6. Comparison between direct coupling of Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} to clean, pre-activated silicon nitride AFM tips and the use of NHS-PEG-COOH_{MW3400} with ethanolamine aminated surface. (A) Indirect coupling of NHS-PEG-COOH_{MW3400} to prior aminated AFM tip in dry DMSO solvent with 0.5% (v/v) triethylamine. (B) Direct coupling of Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} in dry CHCl₃ solvent with 0.5% (v/v) triethylamine.

The direct binding of the Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} linker to the pre-activated silanol groups showed successful oligonucleotide immobilization. Compared to the three-step procedure immobilization yielded approximately 91% on the borosilicate glass supports (Fig. 5) and 85% on silicon nitride AFM tips (Fig. 6). Thus, this two-step functionalization procedure serves as a suitable alternative depending on the desired density of immobilized biomolecules for both supports. The loss in binding yield may be explained by hydroxylation of the epoxy group during binding and the use of non-modified or non-reactive PEG linkers during synthesis. These unmodified or abreacted PEG molecules could adsorb to the surface during the binding process and hinder other PEG linkers to bind.

3.5. Effect of solvent for NHS-PEG-COOH linker attachment

The use of the polymeric linkers plays also an important role with respect to the passivation against non-specific interactions of the biomolecules with the surface. At this point, the density of the used linkers is a crucial factor. Thus, beside the coupling chemistry also the reaction condition, especially the solvent is important for covalent surface coupling of the used polymeric linkers. Therefore, after cleaning, pre-activation and amination of the borosilicate glasses according to the working protocol given above, the NHS-PEG-COOH_{MW3400} linker was dissolved in either water-free chloroform or water-free DMSO containing 0.5% (v/v) triethylamine and was given to the fresh, aminated supports for 1 h at room temperature for covalent attachment (Fig. 7). Further treatment was performed as described in Section 2.4.

Generally, using dry solvents is crucial for obtaining high binding yields of the PEG linker. However, the comparison of dry chloroform and dry DMSO (Fig. 7) shows, that DMSO as reaction solvent leads to an approximately 42% higher number of successfully bound heterobifunctional PEG linkers on aminated borosilicate glass. The PEG itself is less soluble in DMSO as in chloroform and accordingly for larger NHS-PEG-COOH chains (MW 35,000) it was observed, that DMSO was not a suitable solvent any more. Short PEG linkers lead to a less extended coil of the solvated polymer and thus enable a more tight packing on the surface.

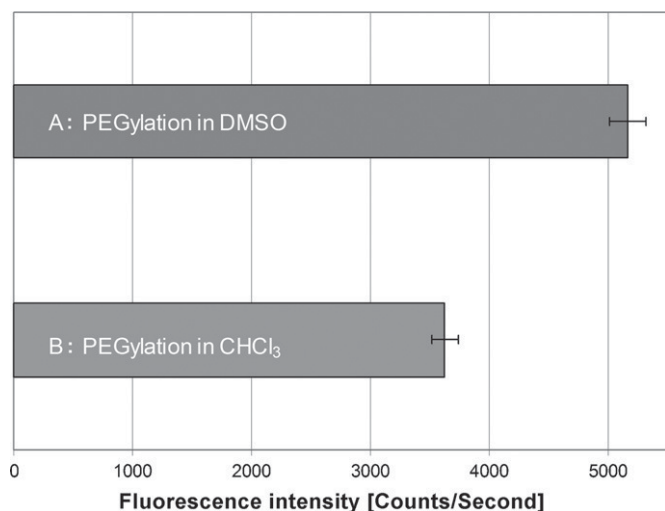


Fig. 7. Comparison of two solvents for the covalent PEG linker coupling on aminated surfaces. The surfaces were functionalized with amino-labelled 40b ssDNA and hybridized with complementary fluorescent Atto647N-labelled ssDNA as counter molecule. (A) NHS-PEG-COOH_{MW3400} coupled in dry DMSO with 0.5% (v/v) triethylamine. (B) NHS-PEG-COOH_{MW3400} bound in dry chloroform with 0.5% (v/v) triethylamine.

3.6. Biomolecular coupling chemistry

For the immobilization of biomolecules most commonly aldehyde and maleimide groups [11,17–19] are used. Thus, the use of the NHS-PEG-COOH_{MW3400} linker was compared quantitatively with the two commonly used poly(ethylene glycol) linkers, NHS-PEG-Aldehyde_{MW800} and NHS-PEG-Maleimide_{MW3400}. The cleaning, pre-activation, amination and PEGylation steps were done on borosilicate glass according to the working protocol given above.

For amino-labelled ssDNA coupling to the aldehyde end group of the NHS-PEG-Aldehyde_{MW800} linker, the pegylated supports were treated with 10 μM of the same amino-labelled oligonucleotide which was used for the standard immobilization procedure in PBS buffer (pH 7.4). Additionally, 1 μl of chemical elimination solution, which contains 450 μl H₂O, 50 μl 100 mM NaOH and 32 mg NaCNBH₃, was added to the ssDNA coupling solution. After 1 h reac-

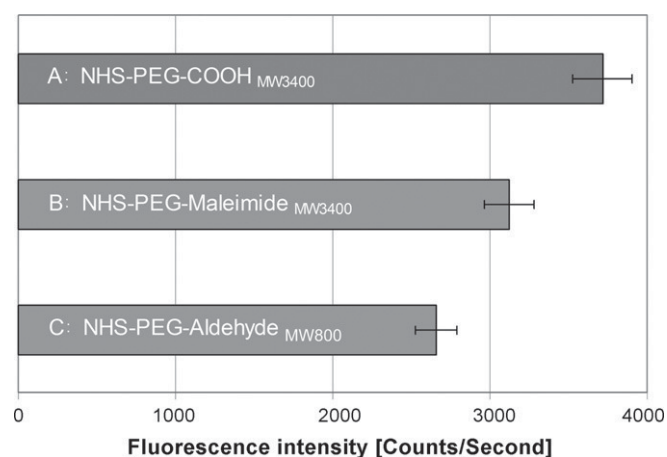


Fig. 8. Comparison between three immobilization strategies with different PEG linker molecules. (A) NHS-PEG-COOH_{MW3400} as PEG linker with immobilized amino-labelled ssDNA oligonucleotide. (B) NHS-PEG-Maleimide_{MW3400} as linker molecule with coupled thiol-labelled oligonucleotide with the same sequence as in (A). (C) NHS-PEG-Aldehyde_{MW800} linker with same bound amino-labelled ssDNA as in (A). Fluorescence emission data results due to hybridized complementary ssDNA labelled with Atto647N as fluorophor.

tion time at room temperature, the washing of the surfaces was done by immersing in ultra pure water for 5 min, 10 min in a 100 mM KCl solution and finally again 5 min in ultra pure water.

For immobilization of ssDNA to the NHS-PEG-Maleimide_{MW3400} linker, thiol-modified ssDNA oligonucleotides were given to the supports in PBS buffer at pH 7.4 at room temperature for 1 h reaction time. The surfaces were washed afterwards with the same procedure as described for aldehyde coupling.

Further hybridization with the complementary fluorescent ssDNA was done for all surfaces equally and measured as described in the methodical part.

Using a carboxyl end group for coupling the amino-labelled ssDNA oligonucleotides, an approximately 28% higher amount of coupled molecules compared to the binding via NHS-PEG-Aldehyde_{MW800} (Fig. 8) was detected in spite of the fact, that the smaller molecular weight of the aldehyde linker in principle might favor a more dense packing on the surface. Compared to the use of NHS-PEG-Maleimide_{MW3400}, still a 16% higher amount was observed. Thus, the use of NHS-PEG-COOH_{MW3400} appears as the best choice as reactive group for immobilization of biomolecules to the PEGylated surface with respect to a high immobilization efficiency and high reproducibility.

3.7. Optimized protocol for surface functionalization and DNA immobilization

On summary, the optimization process resulted in the following optimized protocol: The pre-activation has to be done with both, the borosilicate glass and silicon nitride supports in 2.5 M NaOH for 24 h at room temperature. After rinsing quickly with ultra pure water, the supports have to be incubated in 5 M ethanolamine hydrochloride solution with dry DMSO as solvent and containing 0.5% (v/v) triethylamine for another 24 h at room temperature. PEGylation with 2 mM NHS-PEG-COOH_{MW3400} was performed in dry DMSO as solvent and 0.5% (v/v) triethylamine for 1 h reaction time at room temperature. Alternatively, the supports can be directly coated with 2 mM Epoxy-PEG-COOH_{MW3400} linker in dry chloroform with 0.5% (v/v) triethylamine for 1 h at room temperature. The PEG coated surfaces should be washed several times with ultra pure water afterwards. Amino-labelled ssDNA, dissolved in 100 mM MES buffer (pH 4.75) with 50 mM EDC, should be given to the PEGylated supports for 1 h at room temperature. Finally, the supports have to be washed 5 min with ultra pure water, 10 min with 100 mM KCl and again 5 min with ultra pure water. The supports can be stored at this point in appropriate buffer or in dried state.

3.8. Surface functionalization and DNA immobilization validation via AFM imaging

Finally we applied an additional quality control via AFM imaging and manipulation. Therefore we functionalized a standard borosilicate cover slide commonly used in single molecule fluorescence and AFM experiments according to our optimized functionalization protocol. Subsequently, we immobilized 40b ssDNA oligonucleotides onto a spot with approximately 3 mm of diameter. AFM imaging of the edge of the spot revealed the height difference between the only PEG coated glass slide and the spot, originating from the additional layer thickness due to the immobilized ssDNA oligonucleotides (Fig. 9A).

In our total internal reflection fluorescence setup routinely used for single fluorophor detection and AFM based nano-manipulation experiments we imaged the spot after hybridizing the fluorophor labelled complementary 40b ssDNA oligonucleotides. Before imaging, we used the nano-manipulation setup to scratch out a rectangular area of about 5 μm × 3.5 μm with a force of about 7 nN. Fig. 9B clearly shows the removal of the fluorophor labelled

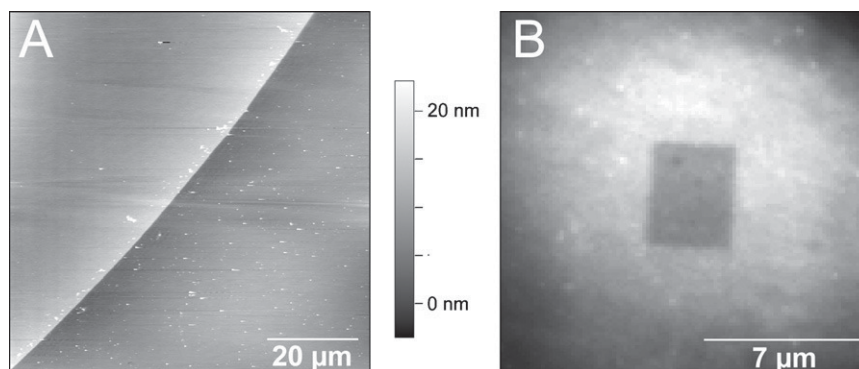


Fig. 9. (A) Topography image of dense immobilized 40b amino-labelled ssDNA oligonucleotides on a prepared PEGylated surface. (B) Fluorescence TIRF image of the same prepared surface as in (A), after hybridization of complementary fluorophor (Atto647N) labelled DNA oligonucleotide. A rectangular area with $5 \mu\text{m} \times 3.5 \mu\text{m}$ in dimensions was scrapped free of DNA via the AFM tip with a contact force of 7 nN.

oligonucleotides as a dark rectangular area within the fluorescent surface.

3.9. Covalent peptide immobilization on PEG-functionalized supports

For immobilization of biomolecules via the peptide binding method, the carboxyl groups of the PEG linker on the surface were activated prior to immobilization. If the biomolecules to be immobilized bears no accessible carboxyl groups at the C-terminus, the activation can be done in one step with the immobilization by adding just EDC to the buffer. Otherwise carboxyl groups have to be activated in an additional previous step to avoid polymerization of the biomolecules. To demonstrate that the immobilization protocol developed here also serves for peptide coupling and to compare the two step pre-activation procedure with the one-step binding method, a 16 amino acids peptide containing 10 histidine (N-GGSGSGHHHHHHHHHH-C) was immobilized according to the optimized protocol. The C-terminus of the peptide was protected by an amide modification to prevent polymerization of the peptides during surface coupling. For comparison, the same peptide was immobilized with pre-activation of the surface bound carboxyl groups of the PEG linker, which may serve as an example for coupling peptides without inactivated C-terminus. Here, the carboxylic end group of the PEG linker was activated with NHS in presence of EDC in 100 mM MES buffer (pH 4.75) prior to the peptide binding in PBS buffer [7].

In the one-step method, analogue to the ssDNA immobilization, 10 mM of the peptide with protected C-terminus was let to react in 100 mM MES buffer (pH 4.75) with 50 mM EDC to the surface for 1 h at room temperature. In the two-step method, the carboxylic groups of the PEG linker were pre-activated with 50 mM EDC and 50 mM NHS in 100 mM MES buffer (pH 4.75) for 1 h. After washing shortly in ultra pure water, 10 μM of the peptide was given to the pre-activated surface in slight basic HEPES buffer (pH 8) at room temperature for 1 h reaction time.

The peptide immobilization was detected via binding of a histidine specific antibody (Penta-anti-HIS, Qiagen) labelled with Alexa488 and fluorescence imaging (Fig. 10).

The one-step immobilization procedure led to an approximately 29% higher number of immobilized peptides compared to the two-step procedure. This may happen due to hydrolyzation of NHS during the activation of the carboxylic groups and the washing procedure prior to peptide immobilization. While studying peptide immobilization, we also tried to immobilize a His₆ peptide without the additional N-GGSGS-C linker sequence. However, in that case the N-terminus of the His₆ was not accessible for coupling to the surface bound carboxyl groups. Only by adding the linker

sequence N-GGSGS-C to the N-terminus the peptide could be bound covalently to the carboxylic groups of the NHS-PEG-COOH_{MW3400} linker.

3.10. Covalent protein immobilization on PEG-functionalized supports

The optimized protocol for surface functionalization was also tested for the coupling of proteins by immobilizing the prion-protein antibody IgG_{saf32} (Fig. 11) analogue to the two-step immobilization procedure of peptides described before.

After pre-activation of the carboxyl groups of the PEG-functionalized glass surface through 50 mM EDC and 50 mM NHS in 100 mM MES buffer (pH 4.75) for 45 min, 1 mM IgG_{saf32} was given to the surface in PBS buffer with a moderate lower pH of about 6 for 1 h at room temperature and washed afterwards four times in PBS buffer (pH 7.4). For fluorescent analysis, 125 mM Alexa633-labelled second antibody of goat anti-mouse IgG fragment (H + L) in PBS buffer (pH 7.4) with 1.5% (v/v) BSA was given to the surface at room temperature for 1 h and washed again four times with PBSTT buffer (PBS (pH 7.4), 0.05% Tween 20, 0.2% Triton X100) and finally three times in PBS buffer (pH 7.4).

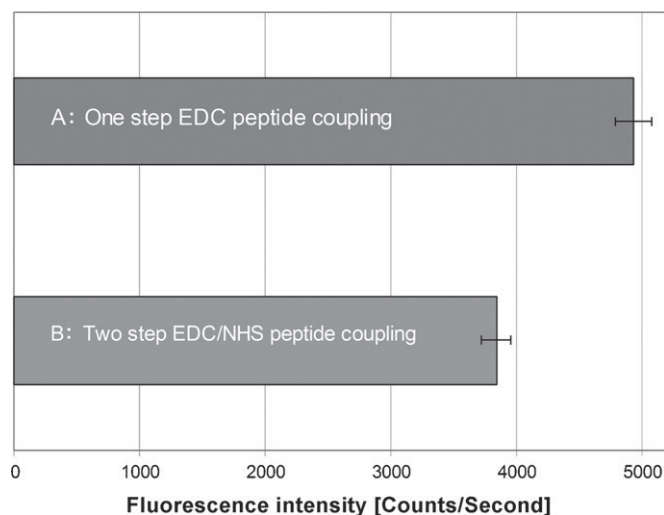


Fig. 10. Covalent immobilization of a 16 amino acid peptide containing 10 histidine and fluorescence analysis via a Penta-anti-His antibody labelled with Alexa488 fluorophor. Comparison between the direct and indirect coupling method. (A) Peptide with protected carboxylic group (amide modification) was immobilized directly in 100 mM MES buffer (pH 4.75) and 50 mM EDC for 1 h. (B) Carboxylic group of PEG linker was pre-activated with 50 mM EDC and 50 mM NHS in 100 mM MES buffer (pH 4.75). Peptide was immobilized in HEPES buffer (pH 8) for 1 h reaction time.

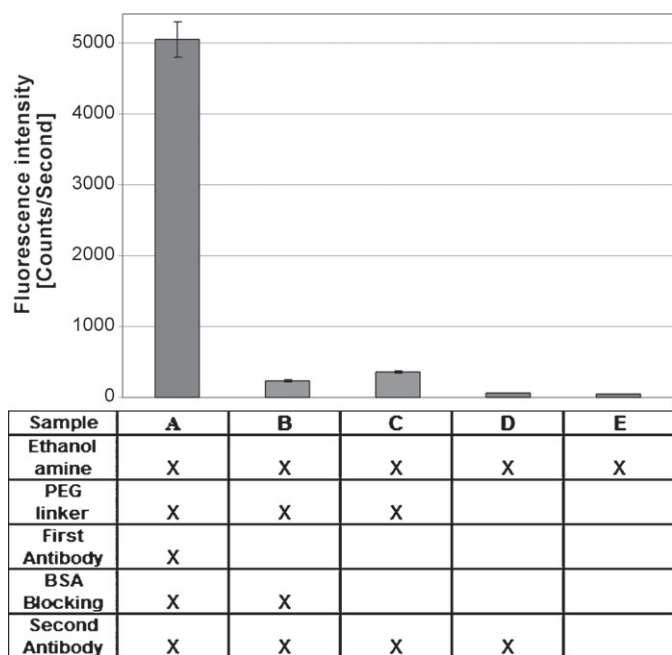


Fig. 11. Prion-antibody IgG_{saf32} was immobilized through the two-step EDC/NHS-coupling method to PEGylated surface with NHS-PEG-COOH_{MW3400}. Fluorescence measurements were performed using fluorescent second antibody Alexa Fluor 633 F(ab') fragment of goat anti-mouse IgG (H + L). (A–F) Different sample compositions with positive and negative controls. Sample conditions specified in table below.

To investigate the amount of non-specific interactions, the passivation characteristics of the NHS-PEG-COOH_{MW3400} linker and the influence of additional BSA (3% in H₂O) in respect to surface blocking after protein immobilization, several additional negative tests were performed and compared (Fig. 11).

Similar to the two-step EDC/NHS binding method of peptides, the antibody IgG_{saf32} was successfully immobilized on the NHS-PEG-COOH_{MW3400} modified glass support (Fig. 11A), where the different experimental compositions are also shown.

The negative tests show an overall low background signal (Fig. 11E) of ethanolamine hydrochloride as amination substance and low non-specific physisorption of the fluorescent second antibody (Fig. 11D) on the amine surface layer. A low, but still significant adsorption about 5.9% (Fig. 11C) of the fluorescent second antibody was observed on the PEGylated surface which can be explained through spontaneous low-rate peptide binding and non-specific adsorption to the carboxylic end groups of the PEG linker. However, it can be reduced down to approximately 3.4% by additional BSA (3%) blocking (Fig. 11B).

Additionally, previous experiments have shown (data not shown), that directly bound proteins using epoxy silane without a PEG linker in-between, were not accessible for second antibody counter molecules, which shows that a linker is important for the immobilized protein accessibility for applications in sensing and interaction detection.

4. Conclusions

In this study, a ubiquitous, simple and straight forward coupling procedure of biomolecules (DNA, peptides and proteins) with a heterobifunctional poly(ethylene glycol) linker to borosilicate glass and silicon nitride supports was developed. In addition, the passivation character of the PEG linker which prevents the non-specific adsorption of the different biomolecules to the functionalized surfaces was proven. In respect to the commonly used functionalization methods which were compared in this study for each single step in the entire functionalization process, we yield

an increase up to 3-fold in binding efficiency by optimizing each functionalization step and using a NaOH solution of high molarity for pre-activation and heterobifunctional NHS-PEG-COOH_{MW3400} as biomolecule linker molecule. By applying a silanol-reactive PEG linker, which offers a faster and easier preparation effort, we still achieve a significant higher coupling density up to 173%, compared to the common methods, although the binding efficiency is slightly lower than our optimized three-step procedure with ethanolamine as surface linker molecule.

The reliable functionalization procedure is highly reproducible and leads to homogeneously modified surfaces, which is important for single molecule applications, biosensors and other sensitive ligand–receptor interaction studies. Especially for this kind of research, the demonstrated modification method does not influence or harm the native structure and behavior of the individual biomolecules. Also, the use of the PEG linker to depart the biomolecules from the surface is essential as it allows steric freedom and thus fully operating molecules and also leads to low non-specific adsorption. Taken together, the insights from this study provide a great approach to bio-functionalization of any probes with single molecules.

Acknowledgments

Franziska Henke is acknowledged for help in developing the protein immobilization. Peter Hinterdorfer is acknowledged for the synthesis of NHS-PEG-Aldehyde. This work was supported by the BMBF nanotechnology competition project no. 03N8714.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.colsurfb.2009.02.011.

References

- [1] A. Ebner, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber, *Ultramicroscopy* 107 (2007) 922.
- [2] E. Metwalli, D. Haines, O. Becker, S. Conzone, C.G. Pantano, *Journal of Colloid and Interface Science* 298 (2006) 825.
- [3] H. Ishida, J.L. Koenig, *Polymer Engineering and Science* 18 (1978) 128.
- [4] E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundström, *Journal of Colloid and Interface Science* 147 (1991) 103.
- [5] D. Wang, F.R. Jones, P. Denison, *Journal of Materials Science* 27 (1992) 36.
- [6] D. Wang, F.R. Jones, *Journal of Materials Science* 28 (1993) 2481.
- [7] M.K. Walsh, X. Wang, B.C. Weimer, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 47 (2001) 221.
- [8] A.S.M. Kamruzzahan, A. Ebner, L. Wildling, F. Kienberger, C.K. Riemer, C.D. Hahn, P.D. Pollheimer, P. Winklehner, M. Hölzl, B. Lackner, D.M. Schörkl, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber, *Bioconjugate Chemistry* 17 (2006) 1473.
- [9] C.K. Riemer, C.M. Stroh, A. Ebner, C. Klampft, A.A. Gall, C. Romanin, Y.L. Lyubchenko, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber, *Analytica Chimica Acta* 479 (2003) 59.
- [10] P. Hinterdorfer, H.J. Gruber, F. Kienberger, G. Kada, C. Riemer, C. Borken, H. Schindler, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23 (2002) 115.
- [11] T. Strunz, K. Orozland, R. Schäfer, H.J. Güntherodt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 9 (1999) 11277.
- [12] C. Albrecht, M. Lalic-Mühlaler, S. Hirler, T. Bayer, H. Clausen-Schaumann, H.E. Gaub, *Science* 301 (2003).
- [13] F. Kühner, L.T. Costa, P.M. Bisch, S. Thalhammer, W.M. Heckl, H.E. Gaub, *Biophysical Journal* 8 (2004) 2683.
- [14] P. Vermette, T. Gengenbach, U. Divisekera, P.A. Kambouris, H.J. Griesser, L. Maegher, *Journal of Colloid and Interface Science* 259 (2003) 13.
- [15] K. Blank, T. Mai, L. Gilbert, S. Schifmann, J. Rankl, R. Zivin, C. Tackney, T. Nicolaus, K. Spinnler, F. Oesterheld, M. Benoit, H. Clausen-Schaumann, H.E. Gaub, *Proceedings of the National Academy of Science* 100 (20) (2003) 11356.
- [16] X. Yong-Mei, H. Zhi-Shan, S. Onnop, B. Ayse, G. Erdogan, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82 (2007) 33.
- [17] N. Zammattio, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, J. Remacle, *Analytical Biochemistry* 280 (2000) 143.
- [18] K. Lindroos, U. Liljedahl, M. Raitio, A. Syvanen, *Nucleic Acids Research* 29 (2001) e69.
- [19] R. Krautbauer, M. Rief, H.E. Gaub, *Nano Letters* 3 (2003) 493.
- [20] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H.E. Gaub, *Science* 283 (1999) 1727.

II

Direct and Model Free Calculation of Force Dependent Dissociation Rates and Free Energy Barriers from Force Spectroscopic Data

Leoni Oberbarnscheidt, Richard Janissen, Filipp Oesterhelt

Institute of Molecular Physical Chemistry, Heinrich-Heine University, 40225 Düsseldorf, Germany

ABSTRACT Force spectroscopy allows testing out the free energy landscapes of molecular interactions. Usually the dependency of the most probable rupture force on the force rate or the shape of the rupture force histogram is fitted with different models that contain approximations and basic assumptions. We present a simple and model free approach to extract the force dependent dissociation rates and free energies directly from the force curve data. Using the Ni-NTA-His₆ interaction as a model system we demonstrate, that the dissociation rates at any force are given directly by the ratio of the number of detected rupture events to the total time of force action. To calculate the total times of acting forces, all force curve data points are taken into account, significantly increasing the amount of information, which is considered for data analysis compared to other methods. Moreover, by providing force dependent dissociation rates this method allows direct testing and validating any energy landscape models.

Received for publication "Staff will complete" and in final form "Staff will complete"

Address reprint requests and inquiries to Filipp Oesterhelt, email: filipp.oesterhelt@uni-duesseldorf.de

When the first single molecule force measurements were done in the mid ninetieth soon a debate came up why different groups got different rupture forces for the same receptor ligand complex. It was Evan Evans who came up with Bells formula which describes the change of the interaction potential under a constant applied force (1). Here the pulling force adds an energy term which is given by the product of the applied force times the distance x the ligand moves in direction of the pulling force, $f \cdot x$. Thus the energy barrier of the binding potential is reduced by $f \cdot \Delta x$, where Δx is the width of the potential, i.e. the distance between its minimum and the maximum of the energy barrier. Assuming Δx to be independent of the force as a first approximation, the dissociation rate of such a complex under force load is given by

$$k_{\text{diss}} = v_0 \cdot \exp(-\Delta G(f)/k_B T) = v_0 \cdot \exp(-(\Delta G - f \cdot \Delta x)/k_B T) \quad [1]$$

Here v_0 is an attempt frequency and ΔG the height of the free energy barrier. In Single Molecule Force Spectroscopy the length of the molecular system is increased continuously until rupture occurs, detecting the applied force at the time of rupture. Due to the fact, that the dissociation of the complex is governed by thermal fluctuations, neither the individual nor the average measured rupture forces itself are a characteristic parameter of the interaction. Pulling slowly leaves enough time for the system to dissociate at low forces while fast pulling increases the applied force to high values before the system had enough time to dissociate. On the basis of Bells formula, Evans developed a formula, describing the

dependency of the most probable rupture force F on the force rate F^* by which the force is increased with time (2):

$$F = k_B T / \Delta x \cdot \ln(F^* \cdot \Delta x / (k_B T \cdot k_{\text{diss}})) \quad [2]$$

Thus, linear fitting the most probable rupture force versus the logarithm of the force rate reveals the dissociation rate at zero force k_0 and the width of the binding potential Δx . The Bell-Evans formula assumes that the applied force increases linear with time when pulling with a constant speed. This would be valid only if all elastic components in the experimental system, also the linkers used for tethering the receptor and the ligand to the support and the AFM tip, respectively, are harmonic springs or in the case of using very short linkers where the elasticity of the soft cantilever dominates the whole system. On the other hand using long, usually anharmonic linkers bares several important advantages for single molecule force measurements. By fitting the individual peaks in the force curves with a model known to describe the elasticity of the used linkers, it is possible to identify single molecule events and eliminate multiple interactions from data analysis (Fig. 1a).

In the literature recently attempts have been described which take the chain elasticity into account to derive a modified Bell-Evans formula (3). There, the elasticity of the polymeric linker was taken into account describing them via the worm like chain and the freely jointed chain models.

A more direct way to measure the force dependent dissociation rates and to determine the potential width is known as the force clamp technique. There, the force applied to the molecular system is hold at a constant level

while measuring the characteristic survival time of the bond. But these experiments require a special setup, which allows to control the cantilever drift. At a given constant force and the force dependent rate k_{diss} the measured bond survival times follow an exponential decay. The probability to find here the rupture after the time t_i is given by:

$$P(t_i | k_{\text{diss}}) = k_{\text{diss}} * \exp(-t_i * k_{\text{diss}}) \quad [3]$$

According to Bayes' theorem this may also be read as $P(k_{\text{diss}} | t_i) * P(t_i) / P(k_{\text{diss}})$, i.e. the probability that the system is governed by the rate k_{diss} when the rupture was found at the time t_i . Here $P(t_i)$ serves as normalisation factor and $P(k_{\text{diss}})$ equals 1. The most likely rate in this case is given by $k_{\text{diss}} = 1/t_i$. The probability to find the N survival times $\{t_1 \dots t_N\}$ is given by the product

$$P(\{t_1 \dots t_N\} | k_{\text{diss}}) = \prod_i P(t_i | k_{\text{diss}}) = P(t_{\text{av}} | k_{\text{diss}})^N \quad [4]$$

Here $t_{\text{av}} = \sum t_i$ is the average measured survival time and N the number of measured dissociation events. $P(t_{\text{av}} | k_{\text{diss}})^N$ again has its maximum probability at $k_{\text{diss}} = 1/t_{\text{av}}$. Thus, instead of fitting the obtained survival times by a mono exponential decay, the most likely dissociation rate k_{diss} may be calculated directly from the average survival time $k_{\text{diss}} = N / \sum t_i$.

In fact, this can directly be calculated also from force spectroscopy data. When pulling on a molecular bond, each data point of the pulling force curve may be regarded as an individual poisson experiment, i.e. as a system which has a given probability $k_{\text{diss}}(f) \cdot \Delta t$ that the bond ruptures within the time Δt . Choosing a timerange Δt per data point, which is short compared to the bond survival time, the probability that two ruptures should occur within Δt is negligible. Thus, the result of each of these poisson experiments is either one or zero ruptures. Since these poisson experiments are completely independent of each other and the rupture probability is proportional to the time of observation Δt , all data points taken at the same force f may be merged and described as one poisson experiment with a dissociation rate $k_{\text{diss}}(f)$ given by

$$k_{\text{diss}}(f) = N(f) / \sum_i t_i(f) \quad [5]$$

Thus, taking all data points from all measured force curves into account the force dependent dissociation rates may directly be obtained from the rupture force distribution histogram and the histogram of durations of acting forces.

To obtain the force dependent dissociation rates it is important to take all fluctuations in the applied force into account, since the dissociation rates increase exponentially with the applied force. Therefore it is important to calculate the forces truly acting on the molecular bond. At low forces

the noise introduced by thermal fluctuations to the force detection system, here the cantilever, may easily result in negative force values (Fig. 1a), while the pulling forces truly acting on the bond will never be negative.

The fluctuations of the cantilever are driven by thermal noise of the whole system and do not reflect active pulling of the stretched polymer spacers due to its own length fluctuations. Assuming the polymer fluctuating much faster than the cantilevers resonance frequency, it may be regarded as being in the equilibrium state all the time and adapting its own length to the varying tip-surface distance, which fluctuates due to the brownian motion of the cantilever.

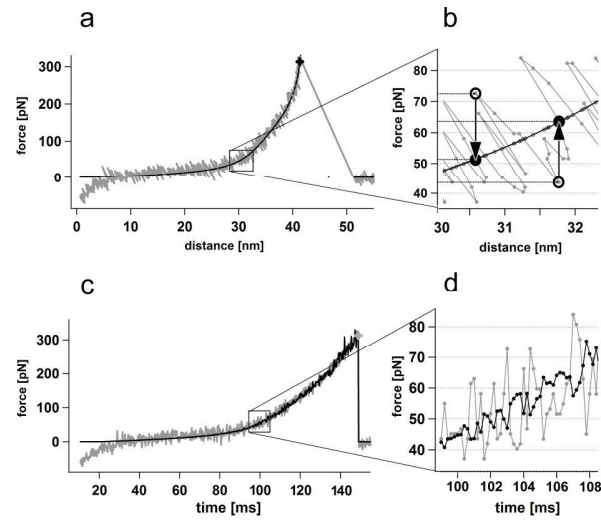


FIGURE 1 a) Typical force of PEG fitted with the freely jointed chain plus two states model given in ref (4). b) Calculation of forces truly acting on the bond. c) The same force curve displayed versus time. The black curve shows the increasing noise in the truly acting forces. d) Thermal fluctuation of the cantilever towards higher pulling forces corresponds with a reduced tip surface distance and thus a lower truly acting force.

In the force curve displayed in figure 1a, the average bending of the cantilever towards the surface as induced by pulling forces is displayed as positive values. A bending towards the surface due to thermal fluctuations shows up in the force curve in the same way as a positive pulling force, but in fact the length of the polymer shortens in accordance with the reduced tip-surface distance. Thus, the stretching force acting on the polymer, depending only on the polymers end to end distance, is reduced. Consequently, the actual force acting on the bond, is given by the average force at the actual tip surface distance, i.e. by the vertical projection of each data point in the force curve onto a fit which describes the force derived from the average cantilever deflection (Fig. 1b). Hence, to obtain the truly acting forces no model describing the polymer is explicitly

required. Any curve that describes the average force can be used.

Fig. 1c and d show the same force curve displayed as force vs time (grey). The black curve shows the truly acting force calculated for each data point. The thermal noise visible in a force curve is high at low forces, decreasing with increasing forces due to the stiffening of the stretched polymer. In contrast, the noise in the truly acting force is minimal at low forces increasing significantly with the applied force. This corroborates the importance of taking the true force fluctuations into account.

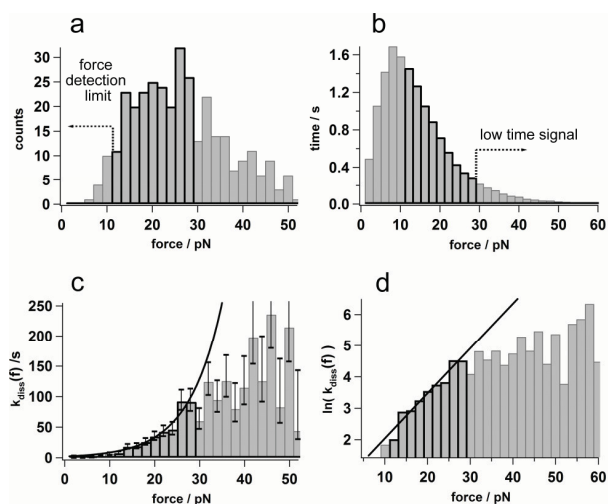


FIGURE 2 a) Force histogram of detected NTA-His₆ ruptures. The force range with sufficient signal compared to noise which was taken into account for fitting is indicated by black bars b) Total times of acting force. c) Calculated dissociation rates and exponential fit of the data. The error bars are calculated from the width of a poisson distribution for the respective rate k_{diss} . d) Logarithm of the dissociation rates which is a direct measures of force dependent potential energies $\Delta G(f) = (\ln(v_0) - \ln(k_{diss}(f))) \cdot k_B T$.

We applied this procedure to the analysis of force spectroscopic data measured on the Ni-NTA-Histidine complex. A His₆- modified tip was presented to a surface covered with Ni-NTA-chelator heads in HBS-buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.5) using an atomic force microscope (MFP-3D, Asylum Research, Santa Barbara, USA). The chelator heads were covalently bound to a cleaned glass surface via PEG (MW6000) as described previously (5) and kindly provided by Prof. J. Piehler, university Osnabrück. In order to modify the tip, silicon nitride atomic force microscopy cantilevers (MLCT-AU, Veeco Instruments, Dourdan, France) were activated in 5M ethanolamine hydrochloride in water-free dimethylsulfoxide (DMSO) for 24 hours and washed with chloroform. Again, PEG (MW3400) was used as linker. To optimize the number of molecules on the tip such, that the force curves show only one or no peak per force curve, a

mixture of NHS-PEG-COOH and cystein binding NHS-PEG-Mal (LayasanBio, Alabama, USA) in a ratio of 1/25 in chloroform with 0.5 % (v/v) triethylamine was let to react with its NHS group to the aminofunctionalized tip for one hour. After washing in chloroform and water, the cantilever was left in a 100 μ M peptide solution (N'-HHHHHHSGGGSGGGCG-C') for twenty minutes to let the peptides selectively bind to the NHS-PEG-Mal only. The force dependent offrates (fig. 2c) were calculated by dividing the number of rupture events counted at each force (fig. 2a) with the total time each force was applied for (fig. 2b). Boundaries for the force range which can be used for fitting different models to the calculated dissociation rates are 10 pN because lower rupture events could not be observed due to noise and 30 pN as the total times of acting force are too low due to the low number of events with higher forces.

Assuming the Bell model (eq. 1) the force dissociation rates can be fitted with a mono exponential curve yielding a dissociation rate at zero force of $k_0 = 2.2 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$. This is in very good agreement with the offrate obtained from fluorescence decay experiments $k_0 = 1.8 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ (5). The obtained potential width $\Delta x = 0.13 \pm 0.02 \text{ nm}$ agrees well with other force spectroscopic experiments that used the Bell-Evans approach (6).

In conclusion we want to point out, that the approach presented here for deriving the force dependent dissociation rates is completely model free. Thus, the force dependent potential energies (fig. 2d) calculated from the dissociation rates may directly be used for testing different energy landscape models.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. J. Piehler for providing us NTA functionalised glass slides. This work was supported by the BMBF nanotechnology competition project no. 03N8714.

REFERENCES

- Bell, G. I. 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 200:618-627
- Evans, E., and Ritchie, K. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* 72:1541-1555
- Ray, C., Brown, J. R., and Akhremitchev, B. B. 2007. Correction of Systematic Errors in Single-Molecule Force Spectroscopy with Polymeric Tethers by Atomic Force Microscopy. *J. Phys. Chem. B* 111:1963-1974
- Oesterhelt, F., Rief M., and Gaub H. E. 1999. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water. *New Journal of Physics* 1:6.1-6.11
- Lata, S., Reichel, A., Brock, R., Tampe, R., and Piehler, J. 2005. High-Affinity Adaptors for Switchable Recognition of Histidine-Tagged Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 127:10205-10215
- Kienberger, F., Kada, G., Gruber, H. J., Pastushenko, V. Ph., Riener, C., Trieb, M., Knaus, H., Schindler, H. and Hinterdorfer, P., 2000. Recognition Force Spectroscopy Studies of the NTA-His6 Bond. *Single Mol.* 1 1:59-65

III

Atomic force spectroscopy measures structural changes induced by light activation and transducer binding in Sensory Rhodopsin II

Leoni Oberbarnscheidt*, Richard Janissen*, Swetlana Martell^o, Martin Engelhard^o, Philipp Oesterhelt*

*Institut für molekulare physikalische Chemie, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^oMax-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Otto-Hahn-Str. 11, 44227 Dortmund, Germany

Contact:

Email: Filipp.Oesterhelt@uni-duesseldorf.de

Tel.: +49 (0)211 81 14387

Fax: +49 (0)211 81 12803

Keywords: sensory rhodopsin (SR); atomic force microscopy (AFM); single molecule force spectroscopy (SMFS); membrane protein complex

Abstract

Microbial rhodopsins are a family of seven-helical transmembrane proteins containing retinal as chromophore. Sensory rhodopsin II triggers two very different responses upon light excitation depending on the presence or absence of its cognate transducer HtrII: Whereas light activation of the *Np*SRII/*Np*HtrII-complex activates a signalling cascade which initiates the photophobic response, *Np*SRII alone acts as a proton-pump.

Using single-molecule-force-spectroscopy we analysed the stability of *Np*SRII and its complex with the transducer in dark and under illumination. By improving the force spectroscopic data analysis we were able to reveal the localisation of occurring forces within the protein chain with a resolution of about six amino acids. Distinct regions in helices G and F were affected differently depending on the experimental conditions. The results are generally in line with previous data on the molecular stability of *Np*SRII. Interestingly, under light excitation new interaction sites were identified whose functional importance is discussed in detail.

Introduction

Sensory rhodopsin II (SRII) is a member of the large family of microbial rhodopsins (reviewed in Sharma et al., 2006; Klare et al., 2008). These type-1 rhodopsins are seven- α -helical transmembrane proteins, which occur in all three domains of life. An all-trans-retinal covalently bound to the middle of the seventh helix absorbs light and its resulting isomerisation to the 13-cis form induces different responses, such as ion pumping activity by bacteriorhodopsin and halorhodopsin or mediation of a phototactic response of SRI and SRII in halophilic archaea in order to trigger phototaxis.

In microbial rhodopsins the process of light activation includes the isomerisation of the retinal and rearrangements in the active site, which finally leads to an outward movement of helix F (reviewed by Klare 2004, 2008). The excitation, isomerisation and return to the all-trans state of retinal is organised in a photocycle comprising several intermediate states named K, L, M1, M2, N, O first described for the BR photocycle (Haupt et al., 1997; Haupt et al., 1999; Klare, 2008). Complex conformational changes, especially of helix F, during the second part of the photocycle have been described which open the cytoplasmatic channel and change the accessibility of the active side to enable ion pumping (Spudich, 1998).

Interestingly, *Np*SRII from *Natromonas pharaonis* has two distinct functions depending on the presence of its cognate transducer *Np*HtrII. In the absence of the transducer *Np*SRII acts as a proton pump (Schmies et al., 2001; Sudo et al., 2001) although weaker than that of bacteriorhodopsin. In order to mediate phototaxis *Np*SRII binds tightly to *Np*HtrII, which then activates a signalling cascade homologous to the two-component system of eubacterial chemotaxis (Rudolph and Oesterhelt, 1995, 1996). The transducer consists of a transmembrane domain of two α -helices (TM1 and TM2), which bind to the receptor and a large cytoplasmatic domain, which is responsible for signal transfer (reviewed by Klare 2004, Spudich et al., 2006). Certain residues in helices F and G were identified to be crucial for

both, transducer binding and signal transfer (Sudo and Spudich, 2006). However, open questions and contradictory arguments remain about the exact movement of helix F, a possible involvement of an helix G movement as well as the precise molecular influence on the transducer.

We performed single molecule force spectroscopy (SMFS) measurements on *NpSRII*, in presence and in absence of *NpHtrII* and compare it to spectra measured in its inactive state in dark and in the illuminated state. *NpSRII* is stable in dark and light and retains its native absorption spectrum and photocycle in different membranes (Spudich and Luecke, 2002). We used the truncated form of the transducer *HtrII*₁₁₄ which allowed us to minimise unwanted interaction of the transducer with the atomic force microscopy (AFM) tip. This form lacks most of its cytoplasmic domain, but interacts with *NpSRII* and was shown to be functional *in vitro* (Wegener et al., 2001).

In a previous SMFS study unfolding of *NpSRII* has revealed a similar pattern as observed for other archaeal rhodopsins (Oesterhelt et al., 2000; Kedrov et al., 2007; Cisneros et al., 2008) and has shown that binding of the transducer stabilises helices G and F. Here we present changes in stability upon light activation and their dependency on the presence of the transducer, which were obtained by a an optimised SMFS data analysis. By taking the changes in probability of peak occurrence as a measure for changes in protein stability, we are able to detect and localise structural changes that alter intra- and intermolecular bonds.

Results

Single Molecule Force Spectroscopy of NpSRII

We determined the light dependent reorganisation of interactions that stabilise structural regions of *NpSRII* and *NpSRII* bound to a truncated form of its transducer (*NpHtrII*₁₁₄) by

applying single molecule force spectroscopy (SMFS) as described previously for *NpSR*II and other archaeal rhodopsins (Oesterhelt et al., 2000, Kedrov et al., 2007, Cisneros et al. 2008). Briefly, force distance measurements were performed on membrane patches with reconstituted *NpSR*II or *NpSR*II/*NpHtr*II which were adsorbed on mica support. The tip was pushed into the membrane to allow unspecific interaction between the tip and the C-terminus of the protein (as previously described by Oesterhelt et al., 2000 and Müller et al., 2002). Retraction of the tip led to sequential unfolding of *NpSR*II, which was recorded by detecting the bending of the cantilever. For each force curve the sample was shifted by 10 nm to ensure that *NpSR*II was always unfolded from an unperturbed part of the membrane. Force-distance traces showing successful unfolding were selected as described by Cisneros et al., 2008.

The experiments were conducted first in the dark, and then under exposure to blue light ($\lambda = 460\text{-}500$ nm). The intensity was chosen such that saturation occurs and about 25 % of *NpSR*II are in its activated state (passing the M to O state) (Klare, 2008). A total number of 103 and 87 force-distance curves for *NpSR*II alone and 94 and 103 force-distance curves for the *NpSR*II/*NpHtr*II₁₁₄ complex was collected in the dark and under blue light, respectively. The probability of peak occurrence in each data set was analysed separately and then compared to the others.

Peak positions reflect the localisation of inter- and intramolecular interactions

An overlay of the force curves shows the characteristic pattern of four main peaks (fig. 1a) as already described for rhodopsins (Oesterhelt, et al, 2000; H. Janovjak et al., 2006) and sensory rhodopsin in particular (Cisneros et al., 2008): Each main peak represents the unfolding of an α -helix pair pulled out from the cytoplasmatic side (Oesterhelt, et al, 2000). Additionally, most force curves reveal further side peaks representing unfolding intermediates and

alternative unfolding pathways (fig. 1b), which differ depending on the experimental condition (Müller et al. 2002; Cisneros et al. 2008; Kedrov et al., 2007; Janovjak, 2006).

Each force peak detected in the individual force distance curves was fitted using the worm like chain (WLC) model with a fixed persistence length of 0.4 nm, which is known to fit an unfolded amino acid chain (Müller et al., 2002) well above 50 pN . The contour length as derived from the WLC fit can be converted into the number of stretched amino acids, giving the unfolded portion of the polypeptide chain and thus elucidates the remaining intermediate structure.

However, the rupture often occurs in the middle of the membrane. The contour length derived from the WLC fit only reflects that part of the unfolded peptide chain that ranges from the tip to the upper surface of the membrane and neglects the part inside the membrane (Oesterhelt et al., 2000; Müller et al. 2002). To correct for the complete chain length we calculated the expected measured lengths for all amino acids according to their z-positions in the crystal structure (pdb 1H2S (Gordeliy et al., 2002)).

Averaged Shifted Histograms (ASH) with varying bin widths allow higher resolution in peak occurrence probabilities

To visualise the peak occurrence probabilities, the fitted rupture lengths are usually displayed as standard histograms. However, the shape of standard histograms significantly depends on the bin width and the chosen starting point, especially at an overall low number of counts. To avoid artefacts due to an arbitrarily chosen starting point and to accurately reflect the density of rupture lengths measured with SMFS, we displayed the rupture lengths data as an average shifted histogram (Scott, 1992). In the case of a mono-modal data distribution an optimal histogram bin width may be calculated from the standard deviation of the data (Scott, 1979; Freedman et al., 1981; Diaconis, 1981; Isenman, 1991). However, the length distributions

obtained from protein unfolding experiments are always multi-modal. Thus, we extended the average shifted histogram to variable bin widths which were selected such, that always 20 events were collected per bin. This kept the noise at a level that allowed the comparison of the various data sets also at rupture lengths where only a low number of events were detected. The heights of the histogram bins in fig. 1c were calculated such that the area of each bin was normalised to the constant number of 20 counts per bin.

The errors to detect a given number of force peaks at a fixed length are given by the standard deviation of the respective probability distribution. With the assumption of a fixed probability to detect an unfolding event of a length within a given range, the probability to obtain any number of events from the whole dataset is given by a poisson distribution. Therefore the error bars can be estimated as the square root of the number of detected events per bin (estimated error limits in fig. 1c).

The force peak histograms (fig. 1c) show the typical pattern of the unfolding of archaeal rhodopsins as previously described by Cisneros et al., 2008. The unfolding of an α -helix pair can be traced in the four main peaks. Additionally, the average shifted histograms give a more detailed picture of the unfolding of smaller substructures, which is revealed in the multi sub peaks.

SMFS reveals manifold changes of interactions in helices F and G upon light excitation

To quantify the change in peak probability between the four experimental conditions, we calculated the difference curves between $NpSR_{II}$ and $NpSR_{II}/Htr_{II}$, $NpSR_{II}$ and $NpSR_{II}_{light}$ as well as $NpSR_{II}/Htr_{II}$ and $NpSR_{II}/Htr_{II}_{light}$ (fig. 2a-c, lower curves) after having normalised each average shifted histogram on the respective number of measured force curves.

Since both data sets have errors, the one sigma errors for comparing the two data sets

(estimated error limits in fig. 2, 3), can be calculated by an error propagation as the square root of the sum of both squared standard deviations. They give the error limits above or below which changes in the peak occurrence frequency between the different data sets may be regarded as significant, indicating a structural change in the protein.

Under all four experimental conditions *NpSRII* exhibits different probabilities for force peak detection (fig. 2). As already known from SMFS experiments on other α -helical membrane proteins in the absence of the transducer the strongest peak occurrence probability is observed at the onset of the helices with respect to the pulling direction. This is changed upon transducer binding, where an increase of the peak occurrence probability is observed in the second half of the helices reflecting a stabilising effect of the transducer. Also, light activation shows distinct changes in stabilising interactions. However, they are smaller than those induced upon transducer binding, which may also be due to the fact that only about 25 % of the illuminated proteins are in their activated state. Interestingly, light induced changes observed in the presence of the transducer are stronger than those observed in its absence.

Of special interest are the first peaks, which reflect structural changes occurring to helices F and G, since these are involved in both, transducer binding and the formation of the intramolecular hydrogen bond network, which plays an important role in proton transfer in the absence of the transducer (Klare et al., 2008). The superposition of the peak probability histograms for helices G and F are shown in figure 3 and reveal similarities and differences between all four datasets: Light activation and transducer binding leads in both, *NpSRII* alone and in complex, to a decrease in rupture events in helix G (figure 3, region 2) and in the C-terminus. Regarding the receptor alone, light activation and transducer binding lead to a decrease in the middle of helix G (figure 3, region 1) and an increase in the loop region (figure 3, region 4). The only region in which changes occur upon *NpHtrII* binding but not upon light activation is in the extracellular part of helix G (figure 3a, region 3) where the peak

probability decreases. While almost no rupture events were measured in helix F in the absence of the transducer, rupture events occurred almost as frequently as compared to the extracellular side of helix G in its presence (figure 3, region 5). However, upon light activation, the number of rupture events decreases in regions of helix F again (figure 3, region 5a and 5b). Altogether, these results reveal the complex changes in the localised stabilising interactions upon light activation which are again modulated by the presence of the transducer.

Discussion

Advanced single molecule force spectroscopy data analysis

*NpSR*II has already been well studied, but still some open questions concerning the tilt of helix F and details about the signal transfer between receptor and transducer remain (reviewed by Klare, 2008). In contrast to many techniques which require *NpSR*II to be in solution to investigate its structure-function relationship, we are able to study interactions of wild type *NpSR*II inside the membrane using the AFM. Thus we avoid artefacts due to the influence of artificial solubilisation (Klare et al., 2006).

Former AFM studies on membrane proteins and especially rhodopsins revealed their unfolding pathways, from which a high homology of their structural elements could be concluded (Oesterhelt et al., 2000; Müller et al., 2002). As previously shown the unfolding pattern of *NpSR*II is similar to that of other archaeal rhodopsins (Cisneros et al., 2008). In this previous study ensemble averaged forces were calculated by multiplying the frequency of rupture events with the peak, which revealed a partial stabilisation of helices G and F upon transducer binding. Here, we present changes upon light activation and introduce an improved force curve analysis, which allows us to achieve a more detailed view of the interaction pattern alone from the rupture frequency, not requiring ensemble average calculation.

As known from the crystal structure (Gordeliy et al, 2002) helices G and F are in close proximity to *NpHtrII*. Thus, in our analysis we concentrated on the changes in stability of helices F and G, which reflect the direct interactions with the transducer. Applying our data analysis procedure to the sensory rhodopsin II unfolding data we could reveal five different regions within helices G and F that responded independently to transducer binding as well as light induction.

The conformational answer after light activation varies with transducer binding

Upon transducer binding we observe a loss of stabilising interactions in the cytoplasmatic half of helix G (region 1, Fig. 3a, table 1). In contrast a stabilisation is found in the F-G loop (region 4), the extracellular half of helix G (region 2 and 3) and throughout the helix F (region 5). The comparison with crystallographic data (Gordeliy et al., 2002) revealed that the hydrogen bonds between *NpSRII* and *NpHtrII* existing in these regions may contribute to the observed stabilisations. Thr189 (end of F-G loop) is reported to bind to Glu43 (TM1) and Ser62 (TM2) and Tyr199 (extracellular half of helix G) to Asn74 (TM2). In addition EPR, ITC and fluorescence resonance energy transfer (Wegener et al., 2000; Hippler-Mreyen et al., 2003; Yang et al., 2004) revealed an interaction of the cytoplasmatic side of helix F with the cytoplasmatic extension of the transducer which was not resolved in the crystal structure.

The regions identified here only on the basis of the peak occurrence probability necessarily differ from those identified on the basis of calculated ensemble forces (Cisneros et al., 2008). The probability of peak occurrence, which reflects the probability that a specific interaction exists at the distinct moment, depends on the corresponding on and off rate. In contrast, the measured forces depend on the off rate and the width of the binding potential and thus reflect different characteristics of the molecular interactions.

To address the molecular changes upon light activation we compare light induced stabilisation or destabilisation of the protein in dependence of the presence and the absence of the

transducer. We find changes in stability, which are independent of transducer binding as well as those, which are dependent on it.

Independent of *Np*HtrII binding light activation always decreases the molecular stability in region 2 in the middle of helix G. This region harbours the retinal binding site and includes the amino acids Lys205 and Asp201 which form hydrogen bonds towards the central water cluster, as shown by the crystal structure of the *Np*SRII/*Np*HtrII complex (Moukhametzianov et al., 2006). The structure of the M state revealed that these bonds are broken upon light excitation. This is in good agreement with the decrease in stability we observed for this region.

In contrast, in all other regions the answer after light activation is modulated by the binding of the transducer. In the cytoplasmatic half of helix G (region 1) light activation induces destabilisation of *Np*SRII alone, while no change is observed in the *Np*SRII/HtrII complex. Considering the literature quite contradictory results are presented for this region. EPR measurements have shown an increase of the mobilisation of a spin labelled side chain between helices F and G upon light activation for *Np*SRII alone and in complex (Bordignon et al., 2007) indicating an increase in the distance of helices G and F. In contradiction, the crystal structure of the light activated receptor in its M state shows that helices F and G are stabilised by a hydrogen bond of Asp214 (helix G) and Arg162 (helix F) (Moukhametzianov et al., 2006).

In all other regions in which light activation shows an effect on stability (region 4, 5a and 5b), transducer binding causes the inversion of the observed effect. Light activation and transducer binding alone lead to an increase in stabilisation. Interestingly, light activation in presence of the transducer reduces the strong stabilisation which has been induced by transducer binding. However, results from FRET and EPR measurements show a close proximity of the EF-loop

and transducer helix TM2 which is increased upon light activation (Wegener et al., 2000; Yang et al., 2004).

Force spectroscopy data reveal new locations of structural changes upon light excitation

The mechanism of signal transduction upon light activation as generally discussed includes isomerisation of the retinal, outward movement of the cytoplasmic half of helix F and a clockwise rotation of the transducer helix TM2 (reviewed by Klare, 2008; Sasaki and Spudich, 2008). This model is based on fluorescence resonance energy transfer (FRET), fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, isothermal titration calorimetry (ITC) and molecular dynamics (MD) simulations (Yang et al., 2004; Kamada et al., 2006; Wegener et al., 2000; Bordignon et al., 2007; Hippler-Mreyen, 2003; Inoue et al., 2008). However, a different structural rearrangement was found in the crystal structure of the excited state (Moukhametzianov et al., 2006).

After light absorption the retinal isomerises and the water cluster next to the retinal binding in the extracellular part of the channel is reorganised. This is likely to be the reason for the reduced stability observed in region 2, as expected it is found both in the presence and absence of the transducer.

The crystal structure revealed a hydrogen bond between Thr204 which is located in region 2 and Tyr174 in helix F in region 5a that is described to be crucial for signalling (Sudo et al., 2006). Interestingly, in the complex light activation strongly decreases the stability in region 5a, which harbours the retinal binding pocket and is adjacent to region 2 (figure 3c). However, this decrease is not due to a loss of interactions with helix G as this helix is already unfolded at this point of the measurement. While hardly any stable unfolding intermediates are observed in region 5 in *Np*SRII alone, transducer binding strongly stabilises this region. Thus, it is likely that the decrease observed in region 5a upon light activation is due to a

weaker binding between this region of helix F and the transducer helix TM2. Other measurements revealed an increased dissociation constant of the light activated protein complex (Sudo et al, 2001), which our data might assign to a weakening of binding in this region. We observe a similar decrease in stability in the loop regions of helix F (region 4 and 5b). Since the crystal structure does not resolve any interactions between the cytoplasmic end of helix F and TM2 it is likely that the stabilisation we have observed upon complex formation is due to intramolecular interactions which are induced by transducer binding. Intramolecular rearrangements upon light activation as revealed by EPR measurements might explain the decrease in interactions in region 5b as observed in our experiment. Interestingly, in regions 4, 5a and 5b we observe an inverse behaviour upon light activation if the transducer is absent; here an increase is found upon light activation indicating intramolecular stabilisation.

Destabilising effects are observed at the cytoplasmic half of helix G upon light activation (region 1) only in the absence of the transducer, but not in the complex. This might be responsible for the opening of the cytoplasmic cleft which allows the proton pumping activity of this protein (Schmies et al., 2000). That this effect is not observed when *Np*HtrII is bound might be another hint to explain its proton pumping inhibition (Spudich et al., 1999, Schmies et al. 2001; Hippler-Mreyen et al., 2004).

Our data presented here reveal several regions that react differently to light activation and transducer binding. Most of the observed changes in stability are in good agreement with previously published results obtained with different biophysical methods. The additionally identified regions might be very interesting for further investigation with other techniques in more detail.

Experimental Procedures

Sample Preparation

*NpSR*II and *NpHtr*II₁₁₄ from *N. pharaonis* were overexpressed as His-tagged proteins in *E. coli* and purified by affinity chromatography using a Ni-NTA agarose column (QIAGEN, Hilden, Germany). *NpSR*II was then reconstituted into purple membrane lipids with a 1:35 (w/w) protein-to-lipid ratio (Hohenfeld et al., 1999). *NpSR*II/*NpHtr*II₁₁₄ complexes were prepared by mixing *NpSR*II and *NpHtr*II₁₁₄ at a ratio of 1:1 followed by reconstitution into lipids (Wegener et al., 2001).

Force Measurements

Force distance measurements were performed in 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.8 on membrane patches with reconstituted *NpSR*II or *NpSR*II/*NpHtr*II which were adsorbed on mica support. To activate the protein the sample was illuminated with blue light using a high intensity arc lamp with a filter of $\lambda = 460\text{-}500$ nm and $290 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

The tip was pushed into the sample with a force of ~ 200 pN to allow coupling of the C-terminus of *NpSR*II (as previously described by Oesterhelt et al., 2000 and Müller et al., 2002) and was retracted with 400 nm/s. The cantilever deflection was recorded over the distance with a sampling rate of 33 kHz.

Si₃N₄ cantilevers (model OMCL TR400, spring constant 20 pN/nm, Olympus) were used and the spring constant was determined using the equipartition theorem (Butt et al., 1995).

To couple the C-terminus to the tip we took advantage of unspecific interactions. Since the C-terminus has 23 amino acids outside the membrane, while the N-terminus is embedded in the membrane, the probability of attaching the tip to the N-terminal end is neglectable. So it is assured that we unfold only those *NpSR*II which are oriented with the C-terminus on the upper side (Cisneros et al., 2008).

To include only those curves where *NpSR*II was attached with the terminus to the tip we selected the longest force curves (> 60 nm) according to the criteria described by Oesterhelt et al. (Oesterhelt et al., 2000 and Cisneros et al., 2008). Under each condition (light/dark, presence/absence of HtrII) ~ 100 curves were taken into account for further analysis.

Data Analysis

Selected force curves were analysed by fitting each force peak with the worm like chain (WLC) model using a monomer length of 3.6 \AA and a persistence length of 4.0 \AA (Oesterhelt et al., 2000; Rief et al., 1997) using self written procedures in IGOR.

The WLC model with a persistence length of 4 \AA fits unfolded amino acid chains best above forces of 50 pN . At lower forces as measured for the unfolding of the last helix this model overestimates the chain length. However, this effect is neglectable at the unfolding of helices G and F. To eliminate chain length variations that originate from a randomly varying anchoring point within the C-terminus, we aligned all curves by superposing on the second and third force peak.

Acknowledgments

L.O. is a fellow of the NRW Research School BioStruct. This work was supported by grants from the Ministry of Innovation, Science, Research and Technology of the German Federal State North Rhine-Westphalia (NRW) and from the Entrepreneur Foundation at the Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Literature

Bergo, V., Spudich, E.N., Spudich, J.L., and Rothschild, K.J. (2003). Conformational changes detected in a sensory rhodopsin II-transducer complex. *J. Biol. Chem.* 278, 36556–36562.

Bordignon, E., Klare, J. P., Holterhues, J., Martell, S., Krasnaberski, A., Engelhard, M., and Steinhoff, H.-J. (2007). Analysis of Light-induced Conformational Changes of *Natronomonas pharaonis* Sensory Rhodopsin II by Time Resolved Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 83(2), 263-72.

Butt, H.J., Jaschke, M., and Ducker, W. (1995). Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 38, 191–201.

Cisneros, D. A., Oberbarnscheidt, L., Pannier, A., Klare, J.P., Helenius, J., Engelhard, M., Oesterhelt, F., and Muller, D. J. (2008). Transducer Binding Establishes Localized Interactions to Tune Sensory Rhodopsin II. *Structure*, 6;16(8), 1206-13.

Edman, K., Royant, A., Nollert, P., Maxwell, C. A., Pebay-Peyroula, E., Navarro, J., Neutzeand R., and Landau, E. M. (2002). Early Structural Rearrangements in the Photocycle of an Integral Membrane Sensory Receptor. *Structure* 10, 473–482.

Freedman, D., and Diaconis, P. (1981). On the histogram as a density estimator: L2 theory. *Zeitschrift für Wahrscheinlichkeitstheorie und verwandte Gebiete* 57 (4), 453–476.

Gordeliy, V.I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Buldt, G., Savopol, T., Scheidig, A.J., Klare, J.P. and Engelhard, M. (2002). Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* 419, 484-487.

Haupts, U., Tittor, J., Bamberg, E., and Oesterhelt, D. (1997). General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer (IST) model. *Biochemistry* 7, 36(1) 2- 7.

Haupts, U., Tittor, J., and Oesterhelt, D. (1999). Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 28 367-99.

Hippler-Mreyen, S., J. P. Klare, A. A. Wegener, R. Seidel, C. Herrmann, G. Schmies, G. Nagel, E. Bamberg and Engelhard, M. (2003). Probing the sensory rhodopsin II binding domain of its cognate transducer by calorimetry and electrophysiology. *J. Mol. Biol.*, 330 1203–1213.

Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A., and Engelhard, M. (1999). Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 442 198–202.

Janovjak, H., Kedrov, A., Cisneros, D. A., Sapra, K. T., Struckmeier, J., and Muller, D. J. (2006). Imaging and detecting molecular interactions of single transmembrane proteins. *Neurobiology of Aging*, 27 546–561.

Jung, K.-H., Spudich, E.N., Trivedi, V.D., and Spudich JL (2001). An archaeal photosignal-transducing module mediates phototaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183 6365-6371.

Kamada, K., Furutani, Y., Sudo, Y., Kamo, N., and Kandori, H., (2006). Temperature- dependent interactions between photoactivated pharaonis phoborhodopsin and its transducer. *Biochemistry*, 45 15 4859-66.

Kedrov, A., Janovjak, H., Sapra, K.T., and Muller, D.J., (2007). Deciphering molecular interactions of native membrane proteins by single-molecule force spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36 233–260.

Klare, J. P., Gordeliy, V. I., Labahn, J., Buldt, G., Steinhoff, H.-J., and Engelhard, M. (2004). The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer. *FEBS Letters* 564 219-224.

Inoue, K., Sasaki, J., Spudich, J.L., Terazima, M., (2008). Signal transmission through the HtrII transducer alters the interaction of two alpha-helices in the HAMP domain. *J. Mol. Biol.* 29 376(4) 963-70.

Izenman, A. J., (1991). Recent development in nonparametric density estimation. *Journal of the American Statistical Association* 86, 205–224.

Johann P. Klare, Enrica Bordignon, Meike Doebber, Jörg Fitter, Jana Kriegsmann, Igor Chizhov, Heinz-Jürgen Steinhoff and Martin Engelhard, (2006). Effects of Solubilization on the Structure and Function of the Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex. *J. Mol. Biol.* 356, 1207–122.

Klare JP, Chizhov I, Engelhard M, (2008). Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors. *Results Probl Cell Differ.* 45 73-122.

Luecke, H., Schobert, B., Lanyi, J. K., Spudich, E. N., and Spudich, J. L (2001). Crystal Structure of Sensory Rhodopsin II at 2.4 Angstroms: Insights into Color Tuning and Transducer Interaction. *Science* 293, 1499

Moukhametzianov, R., Klare, J. P., Efremov, R., Baeken, C., Göppner, A., Labahn, J., Engelhard, M., Büldt, G., and Gordeliy, V., (2006). Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature* 4520 440 115-119.

Rudolph J, and Oesterhelt D. (1995). Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.*14(4):667-73.

Rudolph J & Oesterhelt D. (1996) Deletion analysis of the che operon in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *J. Mol. Biol.* 258(4) 548-54.

Muller, D.J., Kessler, M., Oesterhelt, F., Moller, C., Oesterhelt, D. and Gaub, H. (2002). Stability of bacteriorhodopsin alpha-helices and loops analyzed by single-molecule force spectroscopy. *Biophys J* 83 3578-3588.

Oesterhelt, F., Oesterhelt, D., Pfeiffer, M., Engel, A., Gaub, H.E. and Müller, D.J. (2000). Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science*, 288, 143-146.

Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J.M., Gaub, H.E., (1997). Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276 5315 1109-12.

Schmies, G., Luttenberg, B., Chizhov, I., Engelhard, M., Becker, A., and Bamberg, E., (2000). Sensory rhodopsin II from the haloalkaliphilic *Natronobacterium pharaonis*: light-activated proton transfer reactions. *Biophys. J.* 78, 967–976.

Schmies, G., Engelhard, M., Wood, P.G., Nagel, G., Bamberg, E. (2001). Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 1555–1559.

Scott, D. W. (1979). On optimal and data-based histograms. *Biometrika* 66 (3): 605–610.

Scott, D. (1992). *Multivariate Density Estimation*. *John Wiley*

Spudich, J.L., (1998). Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol. Microbiol.* 28, 1051–1058.

Sharma, A. K., Spudich, J. L. and Doolittle, W. F. (2006). Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends in Microbiology* 14, 463-469.

Spudich, J. L., and Luecke, H. (2002). Sensory rhodopsin II: functional insights from structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 12 540–546.

Spudich, J. L. (2006). The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends in Microbiology* 14, 480-487.

Sudo, Y., Furutani, Y., Kandori, H., and Spudich, J. L. (2006). Functional Importance of the Interhelical Hydrogen Bond between Thr204 and Tyr174 of Sensory Rhodopsin II and Its Alteration during the Signaling Process. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 453-423.

Sudo Y., and Spudich, J. L. (2006). Three strategically placed hydrogen-bonding residues convert a proton pump into a sensory receptor. *PNAS*, 103 44 16129–16134.

Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., and Kamo, N. (2001). Pharaonis phoborhodopsin binds to its cognate truncated transducer even in the presence of a detergent with a 1:1 stoichiometry. *Photochem Photobiol.* 74(3) 489-94.

Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M., and Kamo, N. (2001). Photo-induced proton transport of pharaonis phoborhodopsin (sensory rhodopsin II) is ceased by association with the transducer. *Biophys. J.* 80 916–922.

Wegener, A.-A., Chizhov, I., Engelhard M., and Steinhoff, H.-J. (2000). Time-resolved Detection of Transient Movement of Helix F in Spin-labelled Pharaonis Sensory Rhodopsin II. *J. Mol. Biol.* 301, 881-891.

Wegener, A.A., Chizhov, I., Engelhard, M., and Steinhoff H.J., (2000). Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin- labelled pharaonis sensory rhodopsin II. *J. Mol. Biol.* 301 881–891.

Wegener A.A., Klare, J.P., Engelhard, M., and Steinhoff, H.J. (2001). Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J*, 20 5312-5319.

Yang, C.-S., O. Sineschekov, E. N. Spudich and J. L. Spudich, (2004). The cytoplasmic membrane-proximal domain of the HtrII transducer interacts with the E-F loop of photoactivated *Natronomonas pharaonis* sensory rhodopsin II. *J. Biol. Chem.* 279 42970–42976.

Figure legends

Figure 1: Illustration of the force curve analysis procedure

A: Overlaid force curves measured on *NpSRII* alone in the dark state. The data are displayed as a dot plot.

B: Single force curve; The rupture force peaks (crosses) were detected by searching for minima in the smoothed derivative of the force curve. The left hand sides of the force peaks were fitted with the WLC model (dotted black line) (monomer length = 3.6 Å, persistence length = 4.0 Å) to obtain the corresponding chain lengths.

C: Histogram showing the peak frequency of the monomer lengths derived from the WLC fit (bars; 1 bar = 20 events); An “averaged shifted histogram” is overlaid, which is created by shifting the starting point of the binnings in steps of one (black line). The errors were estimated assuming a Poisson distribution (dotted black line). Raw data (i.e. the individual fitted chain lengths of the rupture event) are shown as sticks below the histogram.

Figure 2: Peak occurrence probabilities for unfolding of *NpSRII*

A: Comparison of the unfolding of *NpSRII* alone (green) and in a complex with its transducer *NpHtrII* (blue). **B:** Comparing the unfolding of *NpSRII* in the dark (dark green) and the light activated state (light green). **C:** Comparing the unfolding of the *NpSRII/NpHtrII* complex in the dark (dark blue) and the light activated state (light blue).

Under the curves the differences of the respective peak occurrence probabilities are plotted as black lines, whereas the estimated errors of the curves are shown in red. The vertical dotted lines indicate the range of the transmembrane α -helices (Gordeliy et al., 2002).

Figure 3: Zoom to the peak occurrence probabilities in helices G and F

Figures A to C (1) show a zoom to the peak occurrence probabilities in helices G and F as shown in figure 2 (same colour code used). A to C (2) show the respective localisation of significant changes in the crystal structure (PDB 1H2S, Gordeliy et al., 2002). The colour code next to the crystal structure indicates the strength of the change in stabilisation of the respective regions.

Table 1: Overview of changes in interactions upon light activation in helices G and F

Increase in a region with interactions is indicated as plus (+), a decrease as minus (-).

region	Helix	# of aa from C-terminus	# of aa from N-terminus	Transducer binding	Light activation in receptor	Light activation in complex
1	G	31-37	208-214	-	-	
2	G	38-43	202-207	+	-	-
3	G	44-55	190-201	+		
4	Loop G-F	56-67	178-189	+	+	-
5	F	68-93	177-152	+	(+)	
5A	F	71-77	168-174	+	(+)	-
5B	F	88-93	152-157	+	(+)	-

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

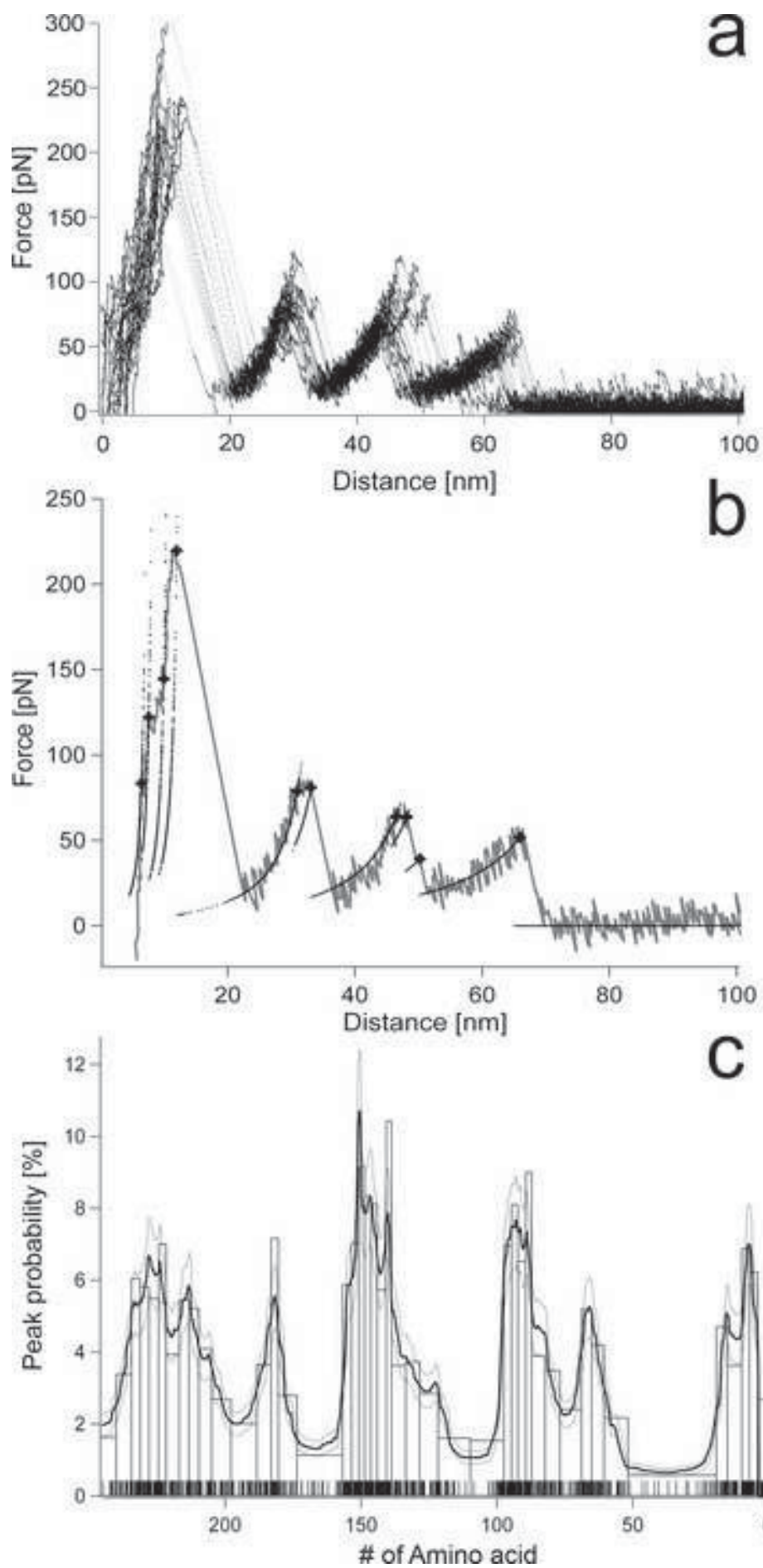
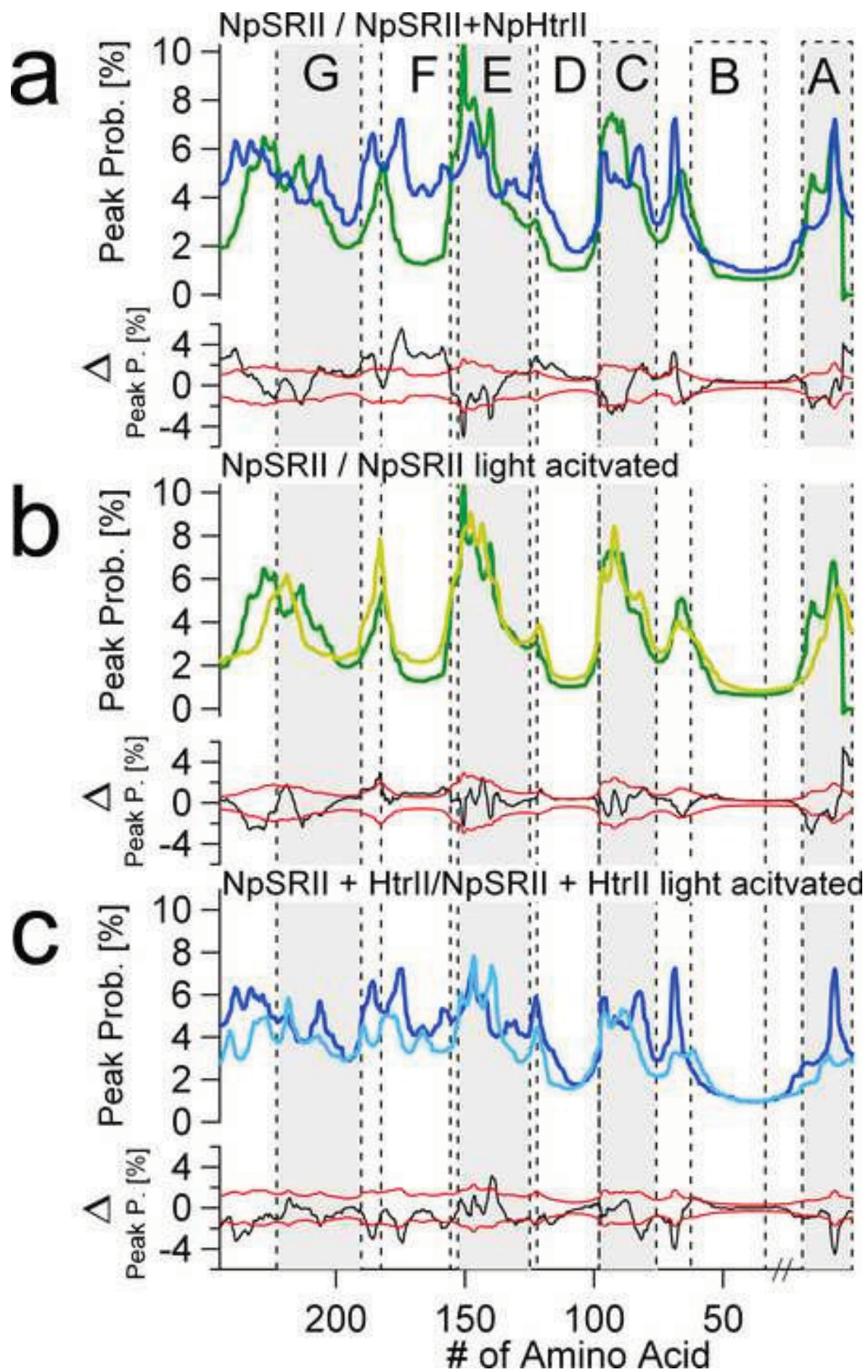
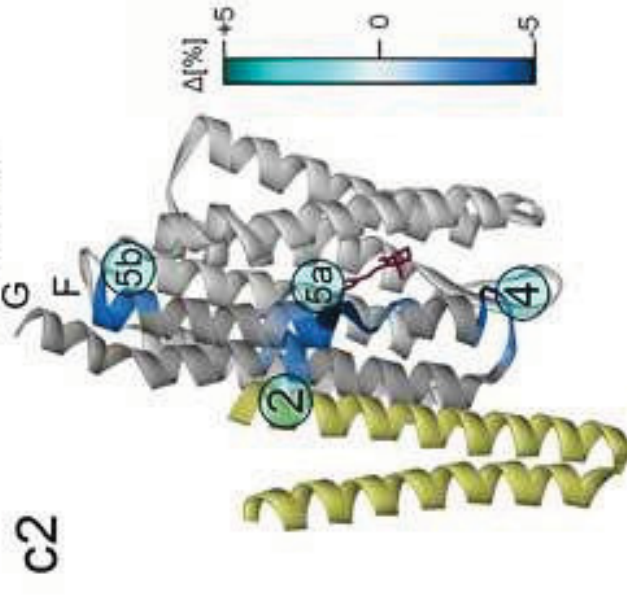
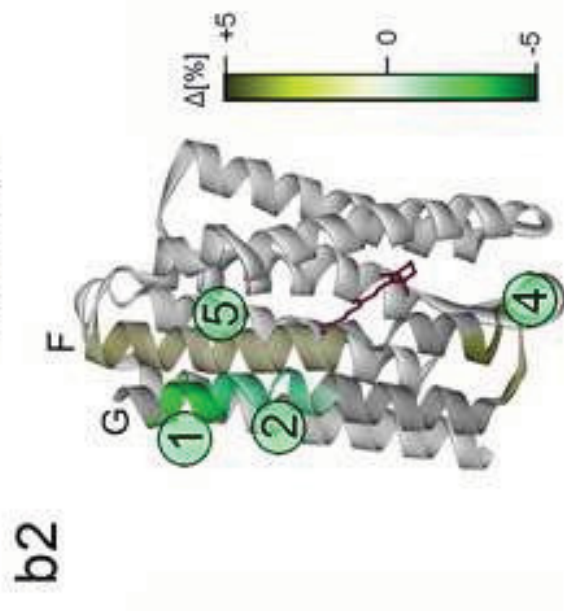
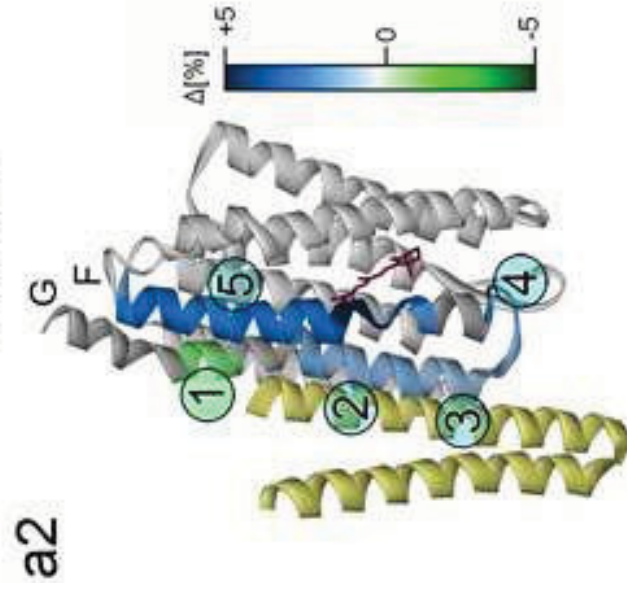
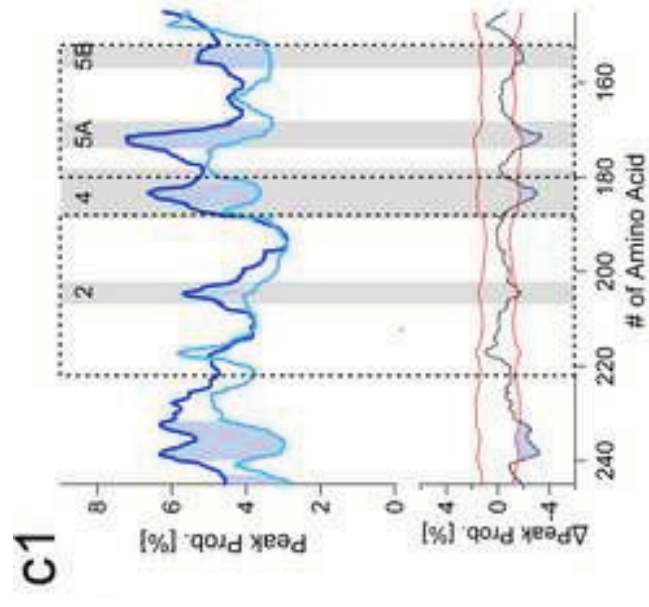
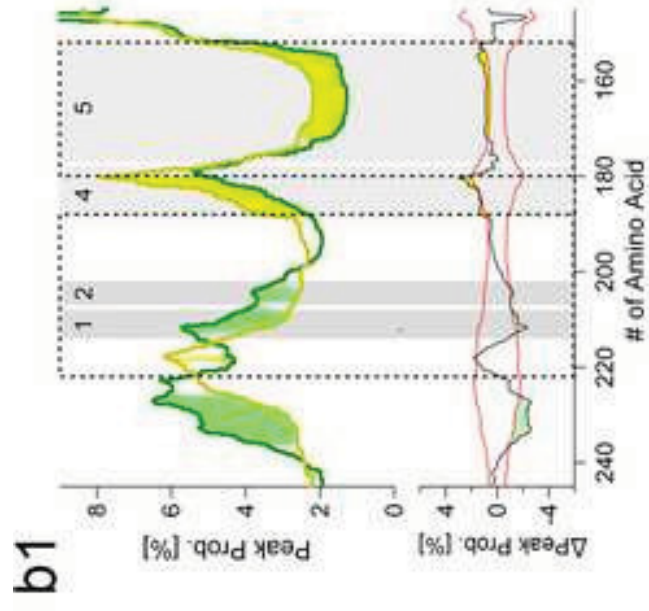
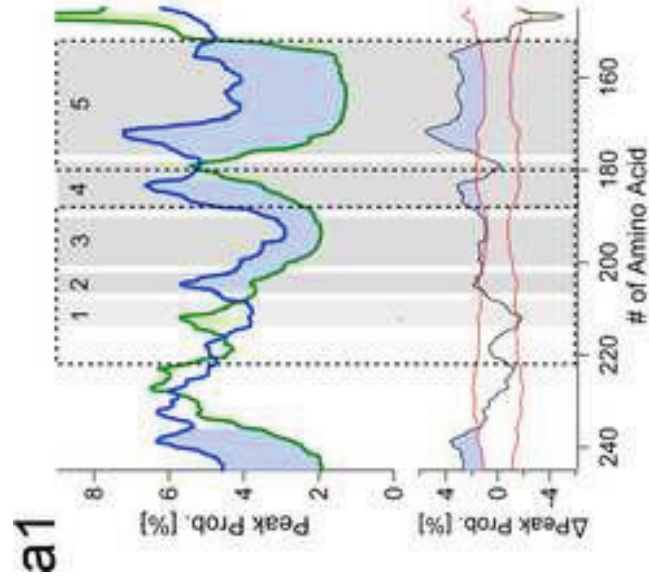


Figure
[Click here to download high resolution image](#)





IV

Directed Deposition of Single Molecules on Surfaces

Richard Janissen, Philipp Oesterhelt*

Institute of Molecular Physical Chemistry, Heinrich-Heine University, 40225 Düsseldorf, Germany

* Corresponding author. At the Institute of Physical Chemistry 2 in 40225 Düsseldorf. Phone: +49 (211) 81-14387. Fax: +49 (211) 81-14623. E-mail: filipp.oesterhelt@uni-duesseldorf.de.

Pre-submission inquiry version

ABSTRACT

Scanning probe microscopy-based techniques can address and manipulate individual molecules. This makes it possible to use them for building nanostructures by assembling single molecules. Recently the formation of surface structures by positioning single molecules with the Atomic Force Microscope (AFM) was demonstrated. These methods rely on an irreversible delivery process to guarantee the deposition of the molecules at the desired position. This inherits the drawback, that the transfer has to occur between differently functionalized surfaces and allows no proofreading of the built structures. Here we demonstrate a procedure for directed deposition of single DNA molecules, which intrinsically allows a reversible positioning. This method uses specific interactions between complementary DNA oligonucleotides for symmetric coupling of the transport molecules to the support and AFM tip, respectively. Thus, it allows for a simple "drag-and-drop" procedure, which relies on the statistical breakage of the molecular interaction under a force load. In addition delivery of the transport molecules was observed in real-time by single-molecule fluorescence microscopy.

The ultimate physical limit in building nanostructures can be reached by assembling one by one molecule^{1,2}. Recently, two practical approaches have been demonstrated that make use the atomic force microscope to manipulate single organic molecules and deliver them in a precisely controlled manner to a specific target area³⁻⁵. Both techniques rely on an irreversible delivery process to guarantee the deposition of the molecule in the target area. This guarantees a high efficiency of the transport process, but has some drawbacks. It allows no proofreading of the delivery, e.g. the removal of molecules that were transported unintentionally by diffusion. More complex delivery processes as the delivery of long DNA molecules that would require a separate positioning of both ends are therefore prohibited. Additionally, separate depots would be required for each type of molecule that has to be delivered.

Here we demonstrate the directed delivery of single DNA molecules using a procedure that intrinsically allows a reversible positioning (see Figure 1, a) The DNA to be transported is coupled to the support or the AFM tip using

specific molecular interactions between complementary DNA oligonucleotides. This system allows for a simple "drag-and-drop" procedure, which relies on the statistical breakage of the molecular interaction under a force load and does not require any external optical or electrical triggering⁶. Two single stranded DNA oligonucleotides, both with 30 basepairs but different sequences are covalently bound to poly(ethylene glycol) (PEG) coated silicon nitride AFM tips serving as specific anchors for the transport DNA to be transported and to PEG coated glass slides forming a grid for reversible deposition. At the same time the PEG linkers guarantee free accessibility of the DNA strands and passivate the surface against unspecific adsorption^{7,8}. The transport DNA itself consists of two sequences, one complementary to the tip anchor, the other to the surface grid DNA. Thus, the molecule can be bound on the surface via one sequence, still leaving the other sequence free to interact with its complementary anchor sequence at the AFM tip and vice versa. Both exhibit equal binding forces of about 45pN (see Figure 3, a) due to the same sequence length and A:T/G:C content. The sequences

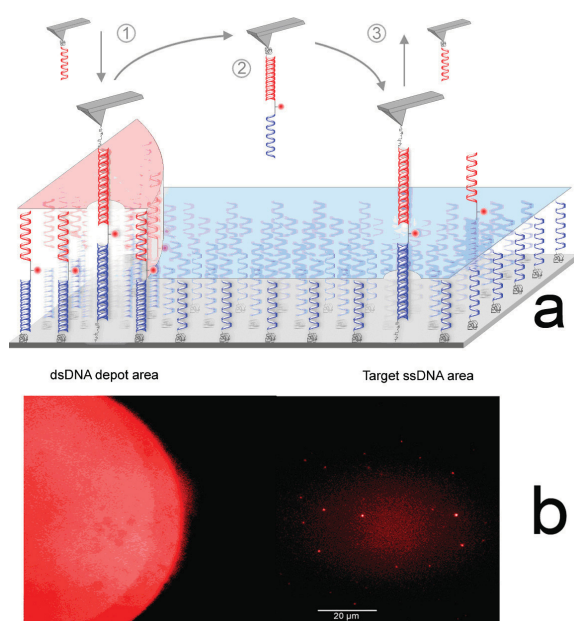


Figure 1: For demonstration of the reversible deposition process, transport DNA oligonucleotides were taken from an area where they were deposited with a high density (b) with a commercial microarray spotter. Functionalized AFM-tip with complementary anchor sequence acquires (a, 1) the transport DNA unit and translocates it (a, 2) to a target area containing only the surface anchor sequence (b). After bringing the DNA transfer-unit in contact with the surface and retraction of the AFM tip (a, 3), the deposition can be observed by single-molecule fluorescence with evanescent excitation (TIRF) of the attached fluorophore (b).

are chosen such, that the hybridization of both sequences with their complementary strands results in a so-called “shear” geometry in which all base pairs of the duplex are loaded in parallel upon forced unbinding (see Figure 2, a2).

Thus, contacting a transport DNA which is hybridized to the surface with the functionalized AFM tip results in the formation of a molecular bridge between tip and surface. Upon retraction of the tip one of the two hybridizations will break, either leaving the transport DNA on the surface or dragging it away. Due to the equal strength of the two anchors, there is an equal probability of 50% for both cases. This inherently guarantees that the process is completely reversible and can be repeated at any number of times until the desired result is achieved. The same situation comes across for the deposition process at the desired target area.

The experiments were performed by a combined Atomic Force Fluorescence Microscopy setup with total internal reflection fluorescence (TIRF) imaging which allows monitoring the deposition process in real-time. For observation of individual transport DNA molecules they were modified with a single Atto647N fluorophore. To minimize photobleaching effects the excitation via the laser diode was triggered together with the camera, being switched on only for fluorescence data acquisition at the deposition process.

For demonstrating the deposition of single DNA oligonucleotides the transport DNA was spotted to the surface with a commercial Microarray-spotter, forming a depot area by hybridisation to the surface bound DNA grid (see Figure 1, b) with an optimized average molecular distance of approximately 30nm.

For taking up a molecule, the functionalized tip was brought in surface contact at the depot area allowing to hybridize with the fluorescently labelled transport DNA, dragging it away upon tip retraction (see Figure 2). The force peaks measured upon tip retraction verified, that the transport DNA had formed a molecular bridge between surface and tip. After transporting the DNA over a distance of about 80μm the DNA was dropped in an area where a few molecules are visible, serving as a spatial reference. The process of deposition was monitored simultaneously by an EMCCD camera based fluorescence microscopy showing the fluorescence signal of the single molecule at the predicted position (see Figure 2, b3). This ensures that it is the result of directed delivery and not of random diffusion of unbound oligonucleotides (see Figure 1, b). The deposition of only one molecule (Figure 3, b), was verified by the fluorescence time trace which exhibits a clear indication of a single bleaching step (see Figure 3, c). In addition the force peak measured again upon tip retraction verifies that the DNA in fact had been coupled specifically to the surface. One complete transfer cycle takes 4 seconds, containing 1.5 s for taking up and depositing and 0.5 s for changing the lateral position. In each force curve the AFM probe tip was kept in gentle contact with the surface for 0.5 seconds to increase the probability of duplex formation between the anchors and the complementary part of the transport DNA. Figure 3 (a) shows force curves measured upon deposition, which are

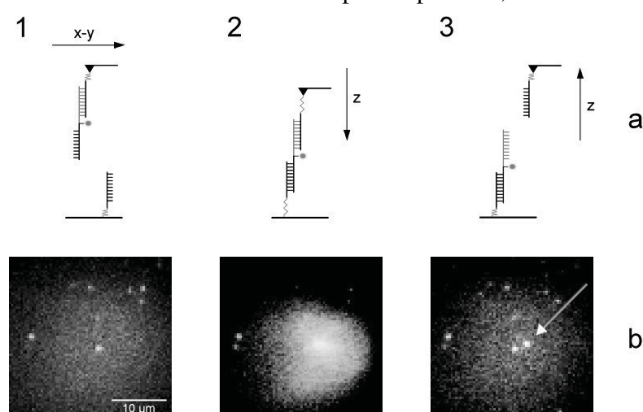


Figure 2: Scheme and TIR fluorescence images of successful single 30b ssDNA oligonucleotide transport divided in the corresponding single steps. Schematic overview of the incidents during the deposition procedure (a) corresponding to the EMCCD fluorescence images (b). 1: Target area after moving the functionalized AFM tip with fluorophor labelled ssDNA transport molecule in x-y position. 2: Tip approach to the surface for surface ssDNA anchor and ssDNA transport unit. 3: Fluorescence image of individual deposited DNA unit (white arrow) after AFM tip retraction from surface.

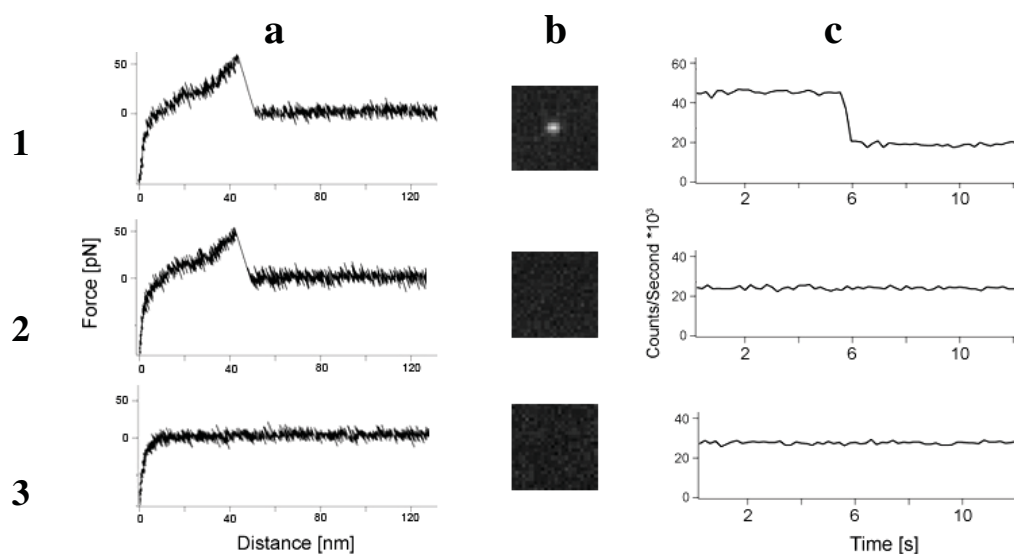


Figure 3: Experimental data of several transport cycles. Force curves (a) measured by depositing the transferDNA unit which corresponds to the single molecule TIR fluorescence images (b) of the target area. The time trace of the Atto647N fluorophore emission for each experimental deposition procedure data is shown in (c) containing the single photobleaching events of deposited transfer units. The first row (1) relates to successful transport ssDNA deposition, the second (2) and third (3) row illustrates the non-deposition state due to surface site rupture or non-transport and the last row the situation without acquired transfer DNA unit at the AFM probe tip.

typical for the rupture of a short antiparallel DNA duplex.

Due to the intrinsic 50% probability for taking up a molecule or leaving it on the surface, the maximum efficiency for delivering a molecule with a single transport cycle amounts to 25%. In addition, the probability to form a specific interaction during tip-surface contact is reflected in the frequency of observing a force peak, which appeared approximately at every second surface contact. Bleaching of the fluorophores during DNA labeling and sample preparation and observation as well as incomplete labeling of the DNA oligonucleotides further reduce the probability to observe a directed delivery event. Estimating these bleaching effects to be in the range of 20 - 50%, the total probability to observe a directed delivery event is given by the product of the single probabilities and results in 3-5% which agrees well with the experimentally observed frequency of 1 in 25 tries.

In the presented procedure the need for optical control of the successful deposition is balanced by the advantage that individual molecules can be reassembled on the same surface not necessarily requiring specific depot areas. The method can be applied to the directed deposition of other molecules and nanoparticles by modification of the transport DNA or by modifying the respective transport unit with the two DNA anchor sequences. In addition the deposited molecules can be used as a template for further self-assembly of other components using specific recognition. This addresses a wide field of applications ranging from ultra sensitive diagnostics in Life Sciences by assembling single molecule based sensors up to applications in nanoelectronics concerning the coupling of molecular components to nanoelectrodes.

ACKNOWLEDGEMENTS

Jürgen Mehrens from the BMFZ (Biomedical Research Centre, Düsseldorf, Germany) is acknowledged for ssDNA spotting via a Microarray-Spotter. Financial support by BMBF Nanotechnology 03N8714 is gratefully acknowledged.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

DNA sequences, surface binding protocol, experimental setup and real-time video of DNA deposition. This material is available via the Internet.

REFERENCES

1. D. M. Engler, E. K. Schweizer. *Nature* **1990**, *344*, 524
2. S. J. Greissl ET AL. *J. Phys. Chem B* **2004**, *108*, 11556
3. A. S. Duwez, S. Cuenot, C. Jerome, S. Gabriel, R. Jerome, S. Rapino, F. Zerbetto. *Nature Nanotechnology* **2006**, *1*, 122
4. S. K. Kufer, E. M. Puchner, H. Gump, T. Liedl, H. E. Gaub. *Science* **2008**, *319*, 594
5. E. M. Puchner, S. K. Kufer, M. Strackharn, S. W. Stahl, H. E. Gaub. *Nano Letters* **2008**, *8* (11), 3692
6. C. P. Collier, G. Mattersteig, E. W. Wong, Y. Luo, K. Beverly, J. Sampaio, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, J. R. Heath. *Science* **2000**, *289*, 1172
7. K. Blank, T. Mai, L. Gilbert, S. Schiffmann, J. Rankl, R. Zivin, C. Tackney, T. Nicolaus, K. Spinnler, F. Oesterheld, M. Benoit, H. Clausen-Schaumann, H.E. Gaub. *PNAS* **2003**, *100* (20), 11356
8. X. Yong-Mei, H. Zhi-Shan, S. Onnop, B. Ayse, G. Erdogan. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2007**, *82*, 33