

# **Nanoskopie zur Strukturaufklärung von DNA**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena von Diplom-Chemikerin (FH)

**Regina Treffer**

geboren am 29.11.1981 in Recklinghausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Volker Deckert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

2. Prof. Dr. Jürgen Popp (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. September 2013

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung
2. Grundlagen
  - 2.1. DNA – Aufbau und Struktur
  - 2.2. Rasterkraftmikroskopie (AFM)
  - 2.3. Der Raman-Effekt
  - 2.4. Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)
  - 2.5. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS)
3. Material und Methoden
  - 3.1. TERS Aufbau und Messprinzip
  - 3.2. Spitzenpräparation
4. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS) zur nanoskaligen Analyse von DNA-Strängen
  - 4.1. DNA-Protein-Unterscheidung
  - 4.2. DNA-Konformationsanalyse und Quadruplexbildung
  - 4.3. DNA-Basen-Unterscheidung
  - 4.4. Richtung Sequenzierung – Detektion des Basenübergangs in einem synthetischen DNA-Strang
  - 4.5. Betrachtungen zur erreichbaren Auflösung sowie Verstärkung mittels TERS
5. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS) in Malaria-infizierten Erythrozyten
  - 5.1. Dünnschnitte von Malaria-infizierten Erythrozyten

## 5.2. Detektion Morphologie-sensitiver Raman-Moden von Hämozoin in Malaria-infizierten behandelten und unbehandelten Erythrozyten

### 6. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Literatur

Danksagung

Selbständigkeitserklärung

Lebenslauf

## 1. Einleitung

Die DNA dient in allen Organismen zur Speicherung und Weitergabe der Erbinformation, das heißt ihre Zusammensetzung und Struktur hat direkten Einfluss auf die Replikation und den Stoffwechsel und auch damit verbundene Krankheiten. Somit sind die DNA-Sequenzierung und Strukturaufklärung wichtige Werkzeuge in wissenschaftlichen Bereichen wie z. B. der Genom- und Evolutionsforschung, Forensik, Epidemiologie und Diagnose, sowie angewandte Therapeutik [1]. Neben ihrer Sequenz besitzt die DNA auch andere interessante Eigenschaften, wie zum Beispiel die Fähigkeit, Sekundärstrukturelemente auszubilden. Es existieren strukturell unterschiedliche DNA-Formen, die A-, B- und Z-DNA, wobei A- und B-DNA rechtshändige Doppelhelices ausbilden und Z-DNA linkshändige. Unter stark hydratisierten Bedingungen herrscht die B-Form vor, unter reduzierter Hydratisierung oder der Zugabe von Salzen oder organischen Lösemitteln jedoch die A-Form. Der Name der Z-DNA ergibt sich aus dem Zickzack-förmigen Verlauf ihres Phosphatrückgrates. Sie bildet sich unter hohen Salzkonzentrationen in Sequenzen mit alternierenden Purinen und Pyrimidinen [2]. Etablierte Methoden zur Analyse der verschiedenen DNA-Konformationen sind vor allem die Kristallstrukturanalyse mittels Röntgenbeugung [2-7] und die NMR-Spektroskopie (Kernspin-Resonanz-Spektroskopie, *nuclear magnetic resonance*) [8-10]. Ein Nachteil dieser Methoden ist die benötigte Menge an Probe, welche Amplifizierungs-Schritte notwendig macht. Außerdem erfolgt die Röntgenstrukturanalyse an Kristallen, was weit von der DNA-Struktur unter natürlichen Bedingungen entfernt ist. In Kapitel 4.2 dieser Arbeit wird gezeigt, daß eine Konformationsanalyse auf einem einzelnen DNA-Strang möglich ist.

Eine weitere strukturelle Eigenschaft von DNA zeigt sich in der Bildung von Quadruplex-Strukturen. Diese bilden sich bevorzugt in Guanin-reichen DNA-Sequenzen und bestehen aus Guanin-Tetraden, die über Wasserstoff-Brückenbindungen miteinander verbunden sind. Um diese zu untersuchen können Methoden wie die NMR-Spektroskopie [11-16], Röntgenkristallographie [16, 17], Zirkulardichroismus (CD) [18, 19], Massen-Spektrometrie [20-22], UV- [23], IR- [24, 25] und Fluoreszenz-Spektroskopie [26, 27] herangezogen werden. Von den schwingungsspektroskopischen

Methoden hat sich besonders die Raman-Spektroskopie bewährt [28-34]. Mittels CD-Spektroskopie kann zwischen Quadruplexen mit paralleler und anti-paralleler Orientierung der Stränge unterschieden werden, sie ist allerdings ungeeignet bei Verwendung von Phosphat-, Acetat-, Sulfat- und Carbonat-Puffern, da diese bei den gebräuchlichsten Wellenlängen stark absorbieren [16]. Eine weitere Schwäche dieser Methode zeigt sich bei der Analyse komplexerer Quadruplex-bildender DNA-Sequenzen. Sobald mehr als eine Quadruplex-Spezies (parallel oder anti-parallel) vorliegt, ist eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich [16]. Ähnliches gilt für NMR Methoden. Hier sind in Lösung kinetisch stabile Spezies nötig, das Vorliegen verschiedener Quadruplex-Strukturen limitiert die strukturelle Aussagekraft [16]. Wird zur Analyse hingegen die Röntgenkristallographie verwendet, muß zunächst eine kristallisierbare Quadruplex-bildende Probe gefunden werden, weiterhin kann hier nicht unbedingt sichergestellt werden, daß sich die Topologie der DNA während des Kristallisationsprozesses nicht ändert [35]. Die Schwingungs-Spektroskopie eignet sich gut zur Analyse von DNA-Sekundärstrukturen, da die verschiedenen Konformationen durch Änderungen im Phosphat-Rückgrat und der Nukleinsäuren charakterisiert sind und diese in den entsprechenden Schwingungsfrequenzen zum Ausdruck kommen. Weil aber auch für die Raman-Spektroskopie ein recht großes Probenvolumen benötigt wird und die Spektren immer ein über viele Analyt-Moleküle gemitteltes Bild wiedergeben, wird in dem zweiten Teil von Kapitel 4.2 dieser Arbeit gezeigt, daß die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie ermöglicht, die Bildung von Quadruplex-Strukturen auf einem einzelnen DNA-Strang zu detektieren.

Die Entwicklung von Methoden zur Sequenzierung von DNA ist ebenfalls ein wichtiges Feld in der Wissenschaft. Hier zeigt sich eine Tendenz zu Einzelmolekül-Sequenzierungs-Techniken. Diese nutzen beispielsweise die Fluoreszenz. Diese Technik erfordert die Einführung von entsprechenden Fluoreszenz-Labeln. Bei der exonukleolytischen Degradation werden mit Fluoreszenz-Labeln versehene DNA Einzelstränge über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an Trägerkügelchen fixiert. Eine dieser präparierten Kügelchen wird mit einer optischen Pinzette in einem Mikrofluidik-Kanal festgehalten und der sequenzielle Abbau des DNA-Stranges durch ein Enzym gestartet. Dieses Enzym ist eine Exonuklease, die eine Base nach der anderen vom

freien Ende des Stranges abspaltet. Das Fluoreszenz-Signal der Label wird nach Anregung mit einem Laser detektiert und der jeweiligen Base zugeordnet [36]. Nachteile dieser Methode bestehen allerdings in dem Hintergrund-Rauschen fluoreszierender Verunreinigungen und der Schwierigkeit der Detektion aller Basen, da die abgespaltenen Monomere unspezifisch an den Wänden des Mikrofluidik-Kanals adhären können [37]. Daneben existieren Methoden, die während der DNA-Synthese sequenzieren (*sequencing-by-synthesis*). Diese beinhalten das Potential, für kommerziell erhältliche Sequenzierungs-Automaten verwendet zu werden. Ein Ansatz basiert auf dem Förster Resonanz-Energie-Transfer (*Förster resonance energy transfer*, FRET). Hier wird eine Polymerase mit einem Donor-Fluorophor gelabelt und die DNA-Basen jeweils mit entsprechend unterschiedlichen Akzeptor-Fluorophoren. Sobald die Polymerase ein Nukleotid anfügt, entsteht durch die Nähe von Donor- und Akzeptor-Fluorophor ein für die jeweilige Base charakteristisches FRET-Signal [1, 38]. Für das sogenannte *true single-molecule sequencing* (tSMS<sup>TM</sup>) werden die zu sequenzierenden DNA-Stränge fragmentiert und denaturiert und die Einzelstränge immobilisiert [39]. Diese sind an ihrem freien Ende mit einem Farbstoff-Label versehen, so daß ihre Position mit einer CCD-Kamera festgehalten werden kann. Nachdem das Label abgespalten wurde, werden DNA-Polymerase und sukzessive die einzelnen, ebenfalls gelabelten, DNA-Nukleotide zugegeben. Nach jedem Schritt wird durch einen Anregungslaser die Position erfasst, an der ein Nukleotid angebunden wurde. Danach werden die Farbstoff-Label abgespalten und das nächste Nukleotid hinzugegeben [40]. Diese Methode konnte bereits erfolgreich eingesetzt werden, um ein Hefe Transkriptom zu quantifizieren [41], das M13 Virus-Genom zu resequenzieren [42] und ein menschliches Genom zu sequenzieren [43]. Eine ähnliche Strategie verfolgt das *single-molecule real-time sequencing* (SMRT<sup>TM</sup>) [44]. Hier wurde bereits gezeigt, wie eine DNA-Polymerase in einer Templat-gesteuerten Synthese verschiedene Fluoreszenz-gelabelte Nukleotide angebunden hat [45]. An einen DNA-Einzelstrang (Templat) gebundene DNA-Polymerasen werden jeweils einzeln auf dem Boden von null-Moden Wellenleitern (*zero-mode waveguides*) immobilisiert, die als Array von tausenden organisiert sein können [46]. Anschließend werden die Nukleotide hinzugegeben, die mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenz-Labeln versehen sind. Die Polymerasen

beginnen mit der Synthese an den einzelsträngigen DNA-Templaten und während das Wellenleiter-Array durch einen Laser beleuchtet wird, erzeugt jedes Bindungs-Ereignis ein basenspezifisches Fluoreszenz-Signal. Das sehr geringe Detektionsvolumen der Wellenleiter von 20 zL ( $10^{-21}$  L) erlaubt die Detektion jedes einzelnen Nukleotids [47]. Eine weitere Einzelmolekül-Sequenzierungsmethodik benötigt keine Fluoreszenz-Label sondern beruht darauf, daß einzelne DNA-Stränge durch Nanoporen gefädelt werden [48]. Während dieses Prozesses wird eine Spannung an die Nanopore angelegt und während die DNA diese passiert werden die Änderungen in der Leitfähigkeit gemessen. Schwierigkeiten entstehen bei dieser Methode durch stochastische Bewegungen des DNA-Stranges und durch eine mögliche zu hohe Geschwindigkeit, in der das Molekül die Pore durchquert, die eine Detektion der einzelnen Basen verhindert [49]. Eine weitere Sequenzierungsmöglichkeit bietet eine Bewegungs-basierte Methode, die die Bewegungen einer RNA-Polymerase registriert [1]. Hierfür werden das Enzym und das einzelsträngige DNA-Templat jeweils an Polystyrol-Kügelchen angebunden diese dann mit Hilfe von zwei optischen Fallen fixiert. Anschließend wird eines der DNA-Nukleotide hinzugegeben und die Polymerase beginnt mit dem Einbau an der entsprechenden Stelle mit der komplementären Nukleobase. Bei diesem Transkriptionsprozess bewegt sich das Enzym entlang des DNA-Stranges und damit verkürzt sich der Abstand zwischen den beiden Polystyrol-Kügelchen, welcher wiederum über die optischen Fallen mit großer Genauigkeit gemessen werden kann. Für eine vollständige Sequenzierung müssen die einzelnen Nukleotide iterativ zugegeben werden und jeweils die Stop-Punkte der Polymerase aufgezeichnet, damit aus dieser Information die Sequenz rekonstruiert werden kann [50]. Weitere nicht-Fluoreszenz-basierte Einzelmolekül-Sequenzierungsmethoden nutzen beispielsweise die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) [51] oder die Rastertunnel-Spektroskopie (*scanning tunneling spectroscopy* - STS) [52, 53]. Mittels STS kann die elektronische Struktur von DNA aufgelöst werden [52]. Basierend auf dieser Methode konnte gezeigt werden, daß Guanin in DNA-Strängen mittels hochauflösender Rastertunnel-Mikroskopie und -Spektroskopie identifiziert werden kann [53]. Guanin besitzt von allen DNA-Basen das niedrigste Ionisierungspotential und ist daher am leichtesten detektierbar [54]. Es bleibt

allerdings offen, ob diese Methode auch zur Identifizierung der übrigen Basen verwendet werden kann [1].

Prinzipielle Vorteile der Einzelmolekül-Sequenzierung liegen in der sehr geringen Probenmenge und damit nicht benötigter Amplifizierungs-Schritte, dem reduzierten Verbrauch an Reagenzien und sie sollen einen einfacheren, schnelleren und preisgünstigeren Sequenzierungs-Prozess ermöglichen. Allerdings zeigen sich je nach verwendeter Methode auch Nachteile, wie zum Beispiel die Aktivität und Zuverlässigkeit von Enzymen, wenn beispielsweise eine Polymerase oder Exonuklease verwendet wird [1]. Fluoreszenz-basierte Techniken erfordern immer einen *Labeling*-Schritt und hier kann Hintergrundrauschen das Erreichen der Einzel-Molekül-Empfindlichkeit erschweren [1].

Als eine auf der Raman-Spektroskopie basierende potentielle Sequenzierungsmethode umgeht die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (*tip-enhanced Raman spectroscopy* - TERS) als Kombination der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (*surface-enhanced Raman spectroscopy* - SERS) und der Rastersonden-Mikroskopie einige der zuvor diskutierten Nachteile. Sie besitzt dennoch ebenfalls Einzel-Molekül-Empfindlichkeit. Jede Nukleobase besitzt einen charakteristischen spektralen Fingerabdruck und es besteht keine Notwendigkeit eines Labels. Erste TERS-Experimente wurden auf Adenin Nano-Kristallen durchgeführt und auch Effekte durch den Druck der TERS-Spitze auf die Probe berücksichtigt [55]. Quantenchemische Modellierung wurde hierbei genutzt, um Normalmoden von acht Raman-Banden des Adenins zu identifizieren. Weiterhin wurden mögliche Komplexe des Adenins und des Silbers der TERS-Spitze untersucht und Shifts der Raman-Banden einer Deformation des Adenins unter der TERS-Sonde zugeordnet. Darüber hinaus wurde bereits hier die Erreichbarkeit einer molekularen Auflösung mittels Schwingungs-Spektroskopie postuliert. Der nächste Schritt umfasste die Aufnahme von TERS-Spektren auf Nano-Kristallen der DNA-Basen Cytosin und Thymin, aber auch einen Vergleich sowohl der Nahfeld- und Fernfeld-Beiträge, als auch von TERS, SERS und Raman-Spektren [56]. In weiteren TERS-Experimenten wurden Spektren auf (sub-) Monolagen aller DNA-Basen, Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin, aufgenommen [57].

Diese Ergebnisse zeigen bereits das Potential der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie zur Einzelmolekül-Detektion [37]. Es konnte an Hand von TERS-Experimenten auf Adenin Nano-Kristallen mit einer Anregungswellenlänge von 266 nm gezeigt werden, daß auch Resonanz-TERS für die DNA-Analyse geeignet ist [58]. Um biologische Moleküle während der Messung nicht zu zerstören ist es wichtig, mit einer geringen Laser-Leistung zu arbeiten. In einem DNA-Doppelstrang sind die Basen der Einzelstränge über Wasserstoff-Brückenbindungen miteinander verknüpft. Diese Art der Bindung kann mittels TERS untersucht werden. Dies wurde für Adenin und Thymin gezeigt, die an ein kristallines Gold (III)-Substrat gebunden sind, um die Geometrie der Wechselwirkung der Moleküle hinsichtlich der Metalloberfläche und auch die Stärke der Wasserstoff-Brückenbindungen abzuschätzen [59]. Nach den TERS-Messungen auf isolierten Nukleobasen war der nächste Schritt ein TERS-Experiment auf einem RNA-Strang aus poly-Cytosin [60]. Hier konnten durch die Aufnahme von Spektren an verschiedenen Punkten auf dem Strang die Stabilität des Messaufbaus und die Reproduzierbarkeit der Spektren gezeigt werden. Durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis konnte darüber hinaus Einzelbasen-Sensitivität nachgewiesen werden. Nachfolgende TERS-Experimente auf einzelnen Strängen aus poly-Adenin und poly-Uracil konnten die Reproduzierbarkeit der Messungen und Einzelmolekül-Empfindlichkeit der Messmethode bestätigen [61]. Diese TERS-Experimente sind die Grundlage für die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse. In Kapitel 4.3 wird durch TERS-Messungen auf Kalbsthymus-DNA gezeigt, daß spektrale Beiträge aller Basen detektiert werden können und die deutlich unterschiedlichen Raman Streuquerschnitte der Nukleobasen kein Hindernis sind [61]. Dies ist eine substantielle Voraussetzung für TERS als Sequenzierungsmethode. In einem weiteren Schritt wird anschließend in Kapitel 4.4 die Detektion des Basenüberganges von Adenin zu Cytosin auf einem synthetischen DNA-Einzelstrang aus  $(A_{10}C_{15})_8$  gezeigt [37].

## **2. Grundlagen**

DNA ist ein in der Wissenschaft häufig untersuchtes Molekül. Sie ist ein Polymer, das aus Nukleotiden aufgebaut ist, die aus der jeweiligen Base, Deoxyribose und dem Phosphatrest bestehen. Im Folgenden wird der Fokus auf den Aufbau und die Struktur von DNA gerichtet. Anschließend werden die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* - AFM), Raman-Spektroskopie und oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) beschrieben. Durch die Kombination dieser Techniken wird die Grundlage für die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie gelegt, auf die ebenfalls eingegangen wird.

### **2.1. DNA – Aufbau und Struktur**

Die Nukleotide, aus denen DNA aufgebaut ist, bestehen aus einer Purin oder Pyrimidin Base, Zucker (Ribose) und einem Phosphatrest. Zucker und Phosphat bilden das Rückgrat dieses Makromoleküls. Die Basen, wie in Abbildung 2.1.1 dargestellt, sind Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin. Bei der Nomenklatur wird zwischen Nukleotiden, die aus Base, Zucker und Phosphat bestehen, und Nukleosiden aus Base und Zucker unterschieden. Die spezifische Abfolge der Nukleotide bildet die Sequenz der DNA, die auch als Primärstruktur bezeichnet wird.

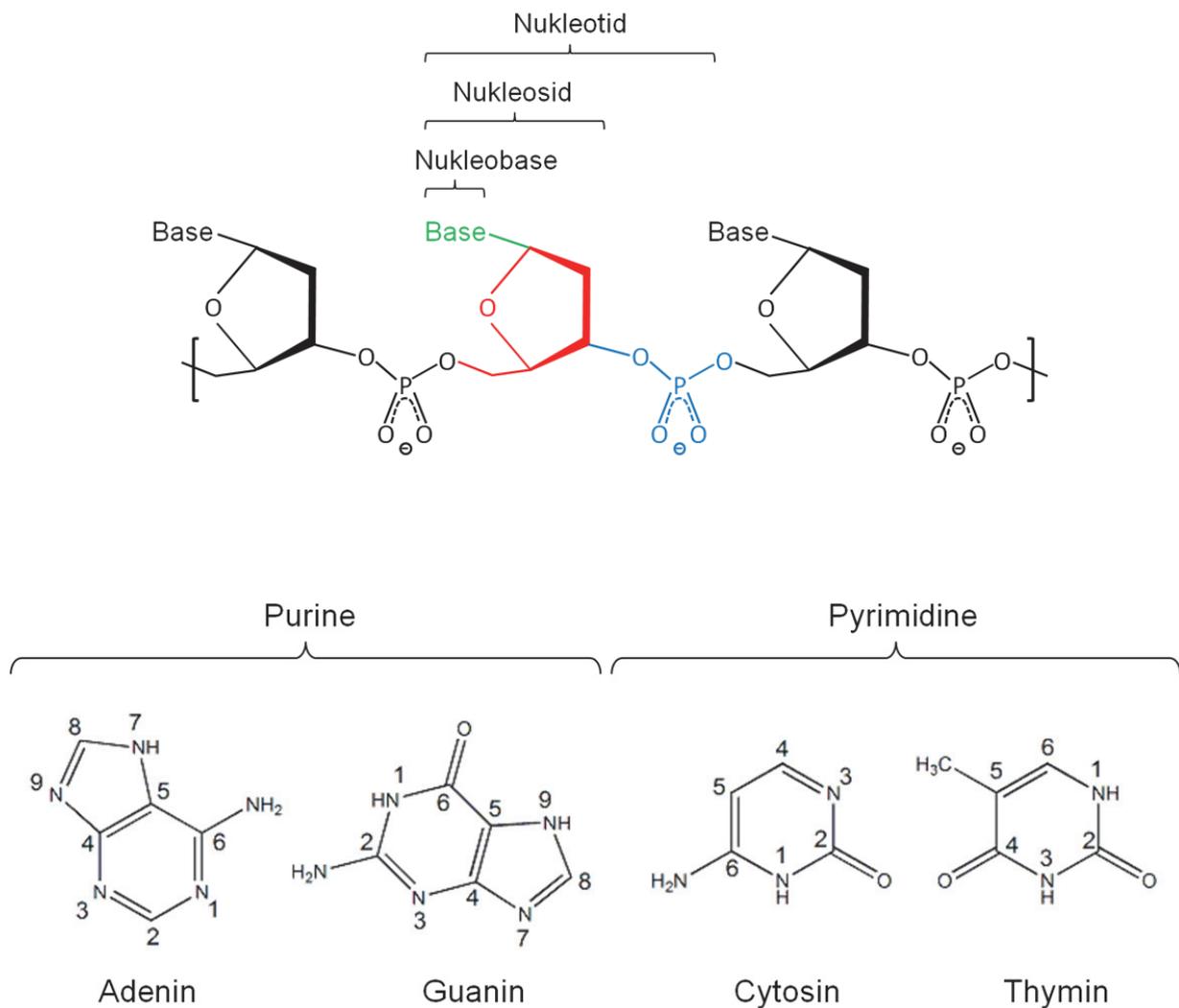


Abbildung 2.1.1: Aufbau eines DNA-Stranges und Struktur der DNA Nucleobasen

Üblicherweise liegt DNA als Doppelstrang in ihrer sogenannten B-Form vor, einer rechtshändigen Doppelhelix. Hierbei sind die komplementären Einzelstränge durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. Die Struktur wurde von James Watson und Francis Crick hergeleitet, die auch die jeweilige Paarung von Adenin und Thymin, sowie Cytosin und Guanin beschrieben [3]. Hierbei sind Adenin und Thymin durch zwei, Cytosin und Guanin durch drei Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. Der Abstand zwischen zwei Basenpaaren beträgt hier 0.34 nm, der Helixdurchmesser 2.37 nm [62]. Neben der B-Form existieren auch eine A- und eine Z-Form. Die Strukturaufklärung der

B-DNA erfolgte in stark hydratisiertem Zustand, A-DNA tritt auf, wenn die relative Feuchtigkeit bei unter ca. 75 % liegt. Sie ist ebenfalls eine rechtshändige Doppelhelix aus zwei antiparallelen Strängen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen entsprechend der Watson-Crick-Basenpaarung zusammengehalten wird. Weiterhin ist sie im Vergleich zur B-Form breiter, ihr Helixdurchmesser beträgt 2.55 nm. Der Basenabstand wird hier mit 0.23 nm angegeben und auch die Ribose-Einheiten sind unterschiedlich gefaltet [62]. Die Z-DNA besteht wie die beiden bereits beschriebenen Formen der DNA aus zwei antiparallelen Strängen in Watson-Crick-Basenpaarung, ist jedoch im Gegensatz als linkshändige Helix formiert. Ihr Name ist in dem Zickzackförmigen Verlauf des Phosphatrückgrates begründet. Eine Ausbildung der Z-Form findet in Sequenzen mit alternierenden Purinen und Pyrimidinen unter hohen Salzkonzentrationen statt. Die entstandene Helix ist dünner und langgestreckter als A- und B-Form (Helixdurchmesser 1.84 nm, Basenabstand 0.38 nm) [62].

Guanin-reiche Sequenzen können sich als Tetraden organisieren und sogenannte Quadruplexe bilden. Hierbei verbinden sich jeweils vier Guanin Basen über Hoogsteen Wasserstoffbrückenbindungen, dargestellt in Abbildung 2.1.2. Die Hoogsteen Wasserstoffbrückenbindungen stellen eine Variation der Basenpaarung dar, bei der die Basen durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind, wobei die beteiligten Atome nicht dem Watson-Crick-Schema entsprechen. Diese Konfiguration ermöglicht zum Beispiel die Bildung von Triplex- und Quadruplex-Strukturen [63].

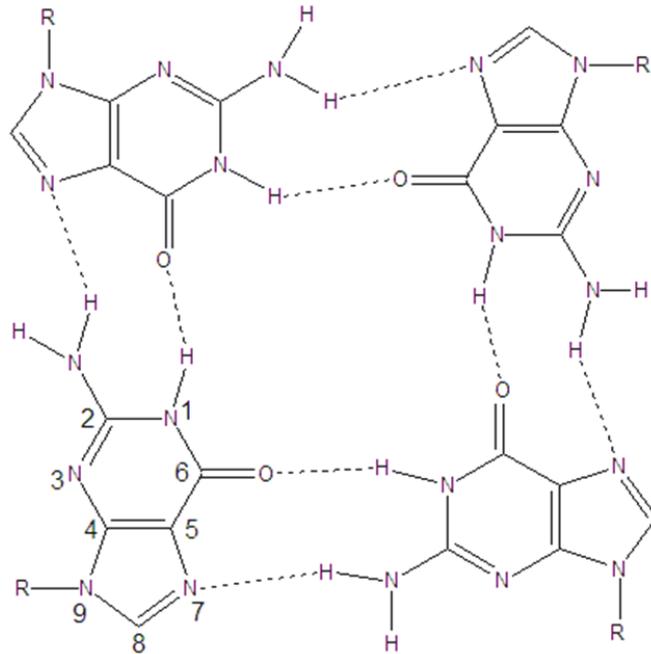


Abbildung 2.1.2: Guanin-Tetrade aus Guanin Molekülen, die über Hoogsteen Wasserstoffbrückenbindungen gebildet wird (Abbildung variiert nach [29])

Guanin-reiche Sequenzen treten zum Beispiel in Regionen mit Immunoglobulin Klassenwechsel-Sequenzen auf, auch in Gen-Promotor Bereichen, sowie in Telomeren chromosomaler DNA, beeinflussen also die Replikation, Transkription und DNA Rekombination [34, 64]. Als Telomere schützen sie die Enden der Chromosome vor Abbau durch Nukleasen, Rekombination und Fusion [65]. Telomere stehen in engem Bezug zu Krebs, Alterung und genetischer Stabilität. Quadruplex-Strukturen könnten hier ein vielversprechendes Ziel therapeutischer Strategien sein, als sogenannte Aptamere, also RNA oder DNA Oligonukleotide, die spezifisch Liganden binden [66]. Sie können an den Telomer-Enden durch Medikamente stabilisiert werden und dadurch die Instandhaltung der Telomere in Tumorzellen behindern, da die Telomerase, ein Enzym, das an der Erhaltung der Telomere teilhat und in ~85 % der Krebszellen aktiv ist, weniger effizient anbinden kann [33, 67-69]. Verschiedene Quadruplexe besitzen außerdem selbst ein therapeutisches Potential. Einige gefaltete Quadruplexe können das rasche Zellwachstum von Tumorzellen hemmen, indem sie die Anbindung von

Nukleolin beeinflussen, einem Protein, das in das Zellwachstum eingebunden ist [70]. Außerdem können sie als Träger für Krebs-Pharmazeutika dienen und diese spezifisch durch Nukleolin-vermittelte Internalisierung in Krebszellen einbringen [66]. Weiterhin ist ein tetramerer Quadruplex fähig, auf das Enzym HIV Integrase abzielen, welches die virale DNA in das Wirtsgenom einfügt [71].

## **2.2. Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Seit ca. 30 Jahren bietet die Rasterkraftmikroskopie, kurz AFM (*atomic force microscopy*), einen schonenden und zerstörungsfreien Zugang für die hochauflösende Darstellung diverser Oberflächen [72, 73]. Dabei ist das Herzstück eines jeden AFM der Cantilever. Dies ist eine Blattfeder, an deren Ende sich eine nanoskopisch kleine Nadel, die AFM-Spitze, befindet. Während einer Messung wird der Cantilever mit der an ihm befindlichen AFM-Spitze in einem periodischen Zeilenmuster piezoelektrisch über die Probe geführt. Dabei sind die zwischen Probenoberfläche und Mess-Sonde wirkenden attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen Ursache für eine Auslenkung des Cantilevers. Diese wird typischerweise durch einen Laser registriert, der so auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert ist, daß die hiervon ausgehende Reflektion auf das Zentrum einer Photodiode fällt. Das optische Mess-Signal wird anschließend durch geeignete Steuerelektronik in eine Bildinformation der Probenoberfläche umgewandelt. Abbildung 2.2.1 ist eine Zusammenfassung des Funktionsprinzips des Rasterkraftmikroskops.

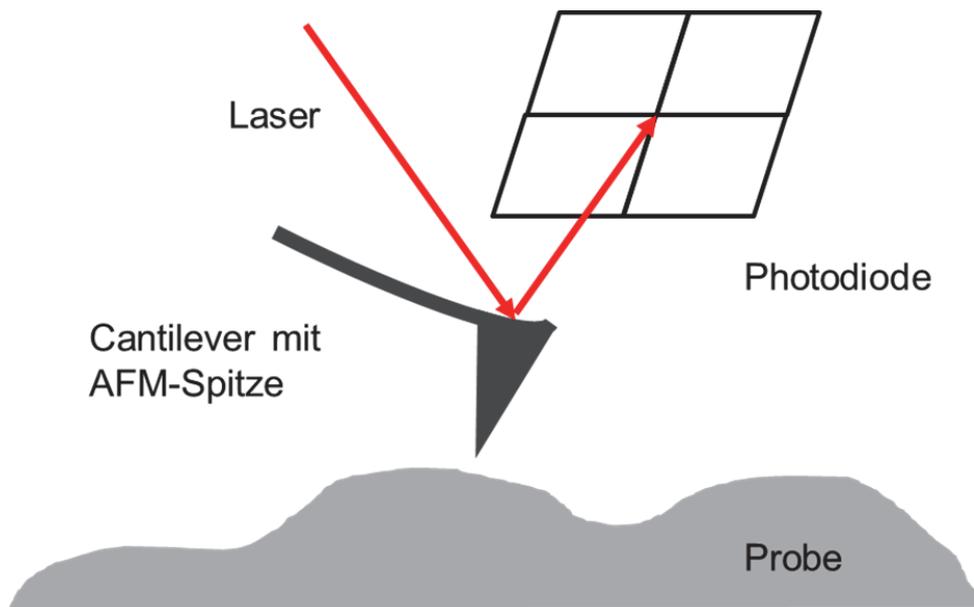


Abbildung 2.2.1: Schematisches Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops. Der Cantilever mit AFM-Spitze wird zeilenweise über die Probe geführt. Dabei wird eine Auslenkung des Cantilevers, welche proportional zur Höhe der Probenoberfläche ist, durch eine veränderte Reflexion eines Lasers mit einer Photodiode registriert

Für den Betrieb eines AFM kann in Abhängigkeit von den zu adressierenden Fragestellungen zwischen verschiedenen Messmodi gewählt werden. Diese lassen sich durch den unterschiedlichen Arbeitsabstand der Mess-Sonde zur Probenoberfläche einteilen. In Abbildung 2.2.2 ist die Summe der während der Messung auf die Sonde wirkenden Kräfte in Abhängigkeit vom Oberflächenabstand in einer Art Lennard-Jones-Potential dargestellt. Die einzelnen im Folgenden beschriebenen Modi sind hier berücksichtigt. Zunächst besteht die Möglichkeit, die Messung im sogenannten Kontakt-Modus ausschließlich in dem repulsiven Abstandsregime (roter Punkt) durchzuführen. Die Mess-Sonde wird hierbei meist mit einer konstanten Kraft über die Probe geführt, so daß hohe und niedrige Oberflächenbereiche eine Auf- bzw. Niederbewegung des Cantilevers zur Folge haben. Der Kontakt-Modus arbeitet dabei üblicherweise mit recht weichen Cantilevern (kleine Kraftkonstante) und besitzt das Potential für eine atomare Auflösung, jedoch werden robuste Proben benötigt. Eine geringere Probenbeanspruchung, oftmals speziell für biologische Fragestellungen sehr

bedeutend, erfordert der Intermittierende-Kontakt Modus. Dieses dynamische Verfahren verwendet oszillierende Cantilever, die nahe ihrer Resonanzfrequenz betrieben werden. Durch die Art der Oszillation wird dabei ein großer Abstandsbereich (grüne Linien) im attraktiven und auch repulsiven Regime durchlaufen und die Probe periodisch berührt. Während in diesem Modus die topographische Information im Wesentlichen durch die Dämpfung der Schwingung nahe der Oberfläche erhalten wird, können zusätzlich mechanische Unterschiede verschiedener Bereiche durch die registrierte Phasenverschiebung der Mess-Sonde detektiert werden. Der letzte in Abbildung 2.2.2 dargestellte Messmodus ist der sogenannte Nicht-Kontakt Modus. Hier oszilliert der Cantilever ausschließlich in einem attraktiven Arbeitsabstand nahe der Probenoberfläche, ohne diese jedoch zu berühren. Dieses Verfahren ist im Vergleich zu den anderen vorgestellten Modi am wenigsten verbreitet, da durch die permanent wirkenden attraktiven Kräfte die Gefahr besteht, daß die Spitze zur Oberfläche überspringt.

Durch das hohe Auflösungsvermögen [74] der Rasterkraftmikroskopie hat dieses Verfahren auch eine Anwendung für zahlreiche Fragestellungen DNA-basierter Forschung gefunden [75-77]. Sie kann beispielsweise zum Strecken einzelner Biopolymere [78] und zur Untersuchung elastischer Eigenschaften von DNA genutzt werden [79], dennoch können weiterführende Probleme durch die fehlende oder geringe chemische Information nicht gelöst werden. Um chemische Informationen zu erhalten kann die Raman-Spektroskopie eingesetzt werden. Sie wird im folgenden Kapitel beschrieben.

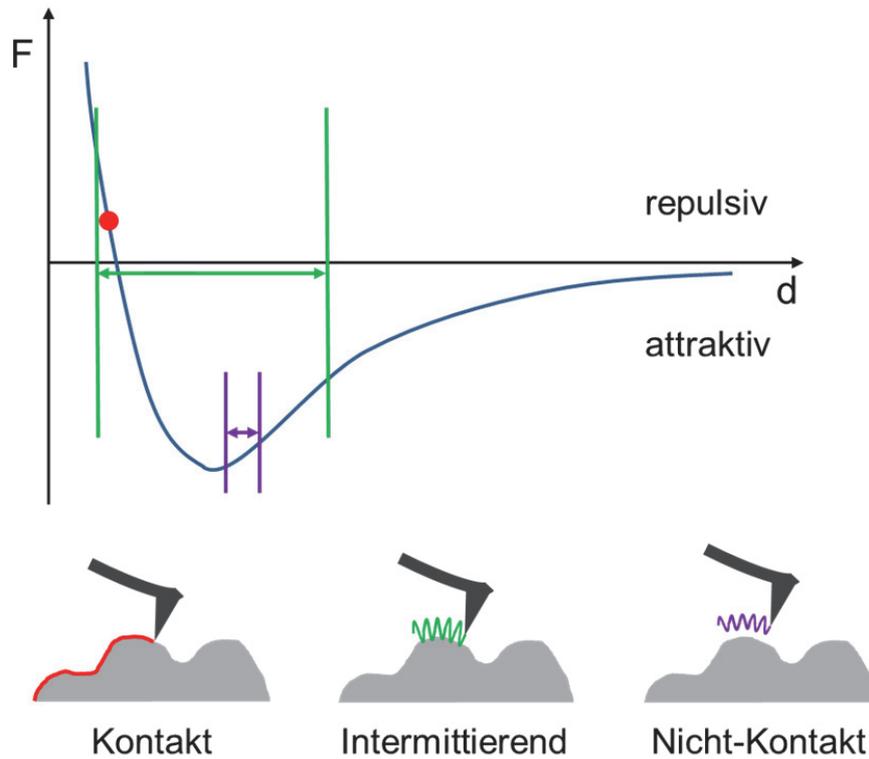


Abbildung 2.2.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Betriebs-Modi eines AFM in Abhängigkeit vom Arbeitsabstand. Während im Kontakt-Modus die Spitze die Probenoberfläche permanent berührt, kommt die im Intermittierenden- und Nicht-Kontakt Modus oszillierende Spitze mit der Probe nur teilweise bzw. nie in Berührung

### 2.3. Der Raman-Effekt

Der Raman-Effekt, benannt nach dem indischen Physiker Chandrasekhara Venkata Raman, basiert auf der inelastischen Streuung von monochromatischem Licht an Materie [80]. Dabei wird ein Molekül zunächst durch ein einfallendes Photon ( $\nu_L$ ) in ein virtuelles Niveau angeregt. Aus diesem Niveau fällt es instantan durch einen Streueffekt in den elektronischen Grundzustand zurück. In den meisten Fällen beginnt und endet dieser Prozess im gleichen Schwingungszustand, so daß eine elastische Streuung vorliegt (Rayleigh Streuung). Bei einem aus  $10^7$  Photonen wird jedoch beobachtet, daß das gestreute Licht in seiner Frequenz um die Energie einer molekularen Schwingung ( $\nu_n$ ) moduliert ist. In diesem Fall kommt es zu einer inelastischen Streuung. Für diesen Mechanismus sind im Wesentlichen zwei Varianten zu berücksichtigen. Das Molekül kann durch den inelastischen Streuprozess ausgehend von dem Schwingungsgrundzustand über die Anregung in ein virtuelles Niveau in einem angeregten Schwingungszustand enden (Stokes Raman-Streuung). Jedoch ist es auch möglich, daß sich das Molekül bereits in dem angeregten Schwingungszustand befindet und durch den Streuprozess in den Grundzustand zurück fällt (Anti-Stokes Raman-Streuung). Basierend auf der Boltzmann-Verteilung ist jedoch ersichtlich, daß sich bei Raumtemperatur der Großteil der Moleküle im Grundzustand befindet und die Stokes Raman-Streuung als Form der inelastischen Streuung überwiegt. Abbildung 2.3.1 fasst die beschriebenen Prozesse zusammen.

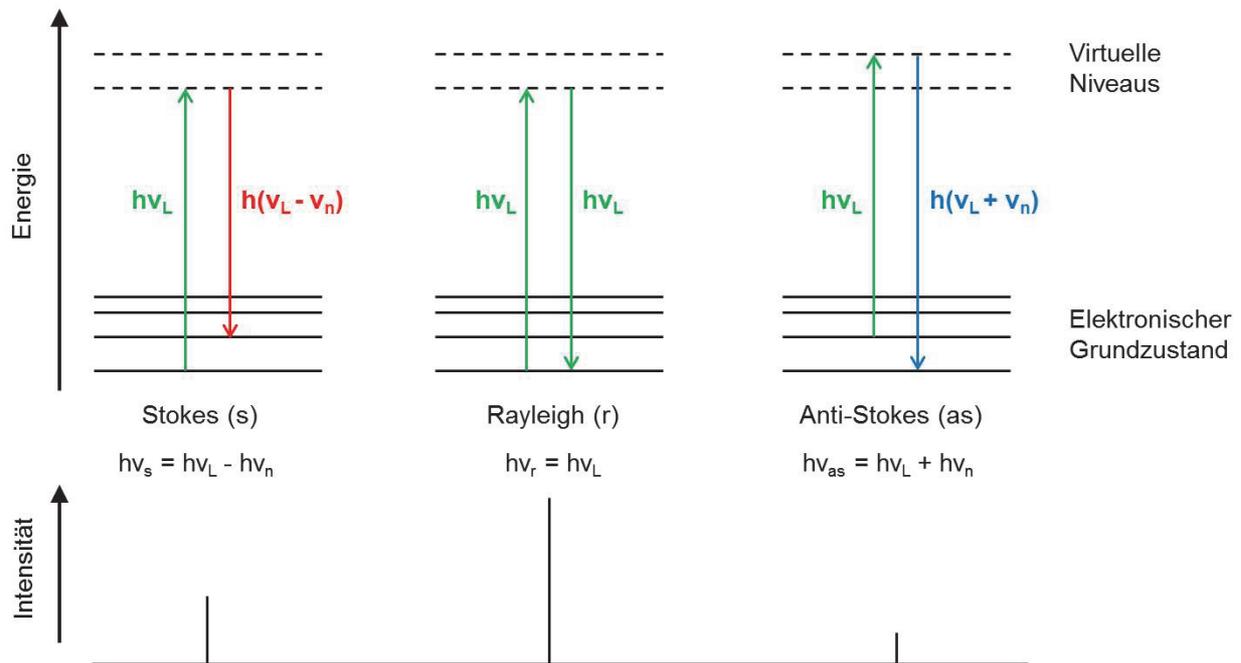


Abbildung 2.3.1: Übergänge im Energie-Niveau-Diagramm der Rayleigh- und Raman-(Stokes und Anti-Stokes) Streuung

Für die klassische Beschreibung des Raman-Effektes wird zunächst das einfallende elektromagnetische Feld  $E$  betrachtet ( $E_0$  – Amplitude,  $t$  – Zeit,  $\nu_L$  – Frequenz der einfallenden monochromatischen Strahlung):

$$E = E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_L t) \quad (1)$$

Dieses induziert wiederum ein elektromagnetisches Dipolmoment  $\mu_{ind}$  im Molekül ( $\alpha$  – Polarisierbarkeitstensor des Moleküls):

$$\mu_{ind} = \alpha \cdot E = \alpha \cdot E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_L t) \quad (2)$$

Der Polarisierbarkeitstensor  $\alpha$  erfährt dabei eine Modulation durch die Frequenz  $\nu_n$  der  $n$ -ten Mode des Moleküls über die Zeit  $t$  ( $\alpha_0$  – Polarisierbarkeit im Gleichgewichtszustand,  $\alpha_n$  – Polarisierbarkeitsänderung durch molekulare Schwingung bei  $\nu_n$ ):

$$\alpha = \alpha_0 + \alpha_n \cdot \cos(2\pi\nu_n t) \quad (3)$$

Dadurch lässt sich Gleichung (3) für das induzierte Dipolmoment entsprechend umformulieren:

$$\mu_{ind} = \alpha_0 + \alpha_n \cdot \cos(2\pi\nu_n t) \cdot E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_L t) \quad (4)$$

Unter bestimmten Näherungen kann diese Gleichung abschließend in 3 Terme entwickelt werden:

$$\mu_{ind} = \alpha_0 \cdot E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_L t) \rightarrow \text{Rayleigh Streuung (elastisch)}$$

$$+ 0.5 \alpha_n \cdot E_0 \cos 2\pi(\nu_L - \nu_n) \rightarrow \text{Stokes Streuung (inelastisch)}$$

$$+ 0.5 \alpha_n \cdot E_0 \cos 2\pi(\nu_L + \nu_n) \rightarrow \text{Anti-Stokes Streuung (inelastisch)}.$$

Neben den drei Termen für die mögliche Re-Emission eines Photons nach Anregung in ein virtuelles Niveau wird durch diese Gleichung auch die allgemeine Auswahlregel für die Raman-Aktivität einer Schwingungs-Mode definiert. Die Voraussetzung ist eine Änderung der Polarisierbarkeit  $\alpha$  während einer Schwingung bei  $\nu_n$  ( $\alpha_n \neq 0$ ).

Durch die beschriebene monochromatische Anregung ( $\nu_L$ ) eines Moleküls wird die eingestrahlte elektromagnetische Welle allerdings nicht nur durch eine isolierte Frequenz  $\nu_n$  moduliert. Vielmehr tragen alle Raman-aktiven Moden einen Anteil zur Frequenzmodulation bei, so daß ein komplettes Spektrum entsteht. Das Raman-Spektrum ist dabei hoch spezifisch für ein einzelnes Molekül und kann als dessen Fingerabdruck verstanden werden. Dennoch bleibt die beschriebene geringe inelastische Streueffizienz von einem aus  $10^7$  Photonen ein wesentlicher Nachteil der Raman-Spektroskopie. Im einfachsten Fall lässt sich dies durch eine gesteigerte Anzahl an Probenmolekülen oder eingestrahlter Leistung der üblicherweise eingesetzten Laser umgehen. Jedoch existieren weitaus elegantere Methoden, welche die gleiche Zielstellung verfolgen und sogar die Detektion einzelner Moleküle basierend auf dem Raman-Streuprozess ermöglichen.

## 2.4. Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)

Im folgenden Kapitel wird beschrieben, wie sich die Sensitivität der Raman-Spektroskopie durch die Verwendung nanoskalierter Metallstrukturen deutlich verbessern lässt. Es werden die Grundlagen der Oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS – *surface enhanced Raman spectroscopy*), sowie die Weiterführung zur Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS - *tip-enhanced Raman spectroscopy*) erläutert.

### 2.4.1. SERS - Mechanismus

Generell basiert die Oberflächenverstärkte Raman Spektroskopie (SERS – *surface enhanced Raman spectroscopy*) auf der Verwendung nanoskopisch skaliertes oder strukturierter Metalloberflächen in unmittelbarer Nähe der zu untersuchenden Moleküle [81-83]. Dies wurde experimentell erstmals 1974 von Fleischmann *et al.* durch den Einsatz aufgerauter Silberelektroden für den Nachweis von Pyridin in einer wässrigen Lösung beschrieben [84]. Drei Jahre später konnten durch zusätzliche Ergebnisse das Verständnis und die Auswirkung der zu Grunde liegenden Prozesse erweitert werden [85, 86].

Die wesentlichen Prinzipien von SERS lassen sich sehr gut durch die Proportionalität des Raman-Signals zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments ( $\mu = E \cdot \alpha$ ) erläutern. Wird einer der beiden Faktoren ( $\alpha$  – Polarisierbarkeit des betrachteten Moleküls,  $E$  – einfallendes elektromagnetisches Feld) erhöht, lässt sich ein verstärktes Raman-Signal erzielen. Dabei wird die E-Feld Modulation durch den elektromagnetischen Verstärkungsmechanismus beschrieben [87, 88]. Zusätzlich wird durch den chemischen Mechanismus der Einfluss der metallischen Nano-Strukturen auf die Polarisierbarkeit des zu untersuchenden Moleküls formuliert [89]. Da grundsätzlich beide Mechanismen gleichzeitig wirken, lassen sie sich nicht voneinander trennen. Vielmehr sind es teilweise vereinfachte Modelle und es fehlt eine einheitliche Theorie der Gesamtverstärkung. Dennoch wird in der Literatur eindeutig dem elektromagnetischen Mechanismus der bedeutendere Beitrag zur Gesamtverstärkung

des Raman-Signals zugesprochen. Diese kann je nach verwendetem System bis zu 11 Größenordnungen betragen [90].

Für eine einfache Beschreibung des elektromagnetischen Mechanismus der Verstärkung wird eine Metallkugel mit einer Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_m$  umgeben von einem Medium mit der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_0$  dargestellt. Dabei sind die Dimensionen des sphärischen Metallpartikels klein, verglichen mit der Wellenlänge des einfallenden elektromagnetischen Feldes  $E_0$ . Die induzierten Oszillationen der Leitungselektronen des Metallpartikels gegen den Hintergrund der ionischen Metallrümpfe werden als lokalisiertes Oberflächen-Plasmon-Polariton (LSPP – *localized surface plasmon polariton*) bezeichnet. Entscheidende Randbedingungen für die Anregung dieser LSPP-Moden sind dabei das verwendete Metall, Größe und Form der Nanostruktur sowie das umgebende Medium. Als plasmonische Materialien konnten sich vor allem die Münzmetalle Gold, Silber und Kupfer etablieren, da sie günstige Verstärkungseigenschaften im sichtbaren Spektralbereich besitzen. Unter Berücksichtigung der komplexen Natur der Dielektrizitätskonstante des Metalls wird allgemein die Plasmonenresonanzbedingung für die Erzeugung der LSPP-Moden formuliert:

$$\text{Re}(\epsilon_m) \approx -2\epsilon_0, \text{Im}(\epsilon_m) \ll 1.$$

Abbildung 2.4.1.1 fasst den Mechanismus der elektromagnetischen Verstärkung zusammen. Das einfallende elektromagnetische Feld  $E_0$  führt zur Anregung der LSPP-Moden im metallischen Nanopartikel. Hierdurch wird wiederum ein verstärktes elektromagnetisches Feld  $E_{\text{out}}$  auf der Partikeloberfläche induziert. Durch dessen evaneszentes Abklingverhalten kann es für die Detektion der Raman-Signale von Molekülen in unmittelbarer Nähe des Metall-Nanopartikels genutzt werden [91]. Wie in Abbildung 2.4.1.1 zu sehen ist, würde ein Beobachter zunächst einen Teil des inelastisch gestreuten Lichtes  $E_1$  des Moleküls nach Anregung durch das verstärkte elektromagnetische Feld  $E_{\text{out}}$  registrieren. Da das betrachtete Molekül jedoch entsprechend der Abstrahlcharakteristik eines Hertz'schen Dipols in alle Raumrichtungen wirkt, kommt es zusätzlich zu einer zweiten Verstärkung an dem Metallpartikel [88, 92]. Somit setzt sich der Gesamtbeitrag des registrierten SERS-

Signals aus den Teilen des unmittelbar ( $E_1$ ) sowie sekundär verstärkten ( $E_2$ ) Lichtes zusammen.

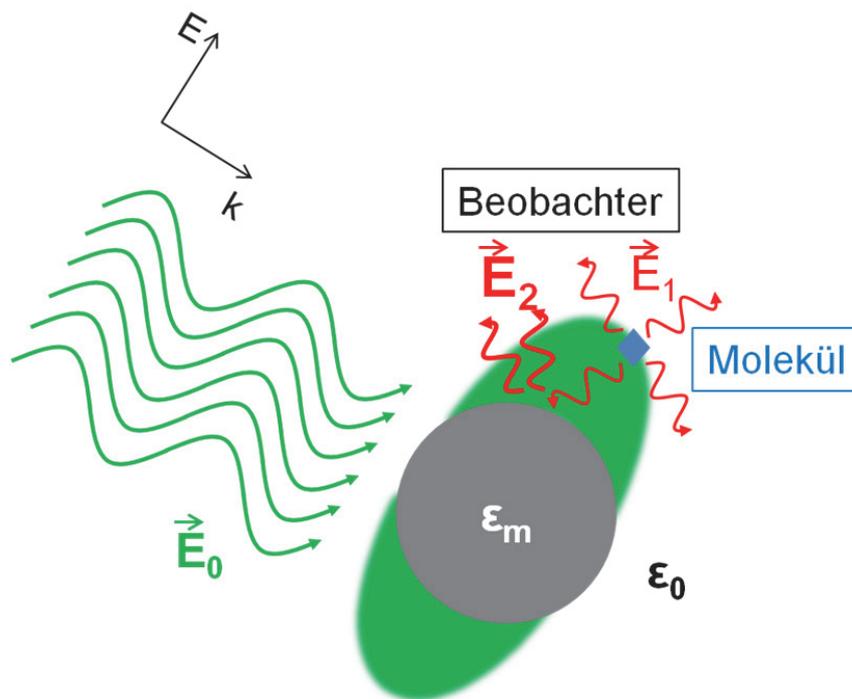


Abbildung 2.4.1.1: Schematische Darstellung der elektromagnetischen Verstärkung (Größenverhältnisse (Dimension Nanopartikel, Molekül und Wellenlänge von  $E_0$ ,  $E_1$  und  $E_2$ ) für Darstellbarkeit angepasst)

Für die Gesamtverstärkung muß der Beitrag des chemischen Mechanismus mit berücksichtigt werden [89, 93]. Anders als der elektromagnetische Mechanismus verlangt der chemische Mechanismus einen direkten Kontakt von Analytmolekül und metallischer Nanostruktur unter Ausbildung eines Adsorbat-Metall-Komplexes. Dies führt zu einer gegenseitigen Beeinflussung der elektronischen Zustände, was bereits allein zu einer signalverstärkenden Veränderung der Polarisierbarkeit  $\alpha$  des Moleküls führen kann. Als wesentlicher Anteil der chemischen Verstärkung wird allerdings die resonante Anregung eines Charge-Transfer (CT) Übergangs des Adsorbat-Metall-Komplexes

beschrieben. Somit kann dieser Beitrag des chemischen Mechanismus durch den Resonanz-Raman Effekt verstanden werden. Durch die Anregung in ein reelles elektronisches Niveau lassen sich prinzipiell höhere Besetzungszahlen erreichen. Die für den chemischen Mechanismus erzielbaren Verstärkungsfaktoren werden üblicherweise mit  $10^2$  geschätzt.

Der Einsatz nanoskaliger Metallstrukturen in der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie führt jedoch nicht nur zu einer reinen Verstärkung der intrinsisch schwachen Raman-Signale, vielmehr müssen eine Reihe von Effekten berücksichtigt werden, durch die sich das Erscheinungsbild der SERS-Spektren deutlich von den Raman-Spektren der gleichen Spezies unterscheiden können. Entscheidend ist hierbei zunächst der evaneszente Charakter des verstärkten elektromagnetischen Feldes  $E_{\text{out}}$  auf der Partikeloberfläche. Der vorliegende Feldgradient führt zu einer Abstandsabhängigkeit der zu detektierenden Moleküle relativ zu dem Metallpartikel [91], zum anderen wird berichtet, daß inaktive Raman-Moden detektiert werden können [94]. Ein zusätzlich entscheidendes Kriterium kann die Orientierung des Analytmoleküls sein [95, 96]. Dabei kommt es zunächst zu einer Veränderung des Polarisierbarkeitstensors des Moleküls, wenn sich dieses nahe der Metalloberfläche befindet. Durch eine Dominanz von Tensorcomponenten senkrecht zu dieser werden vornehmlich Raman-Moden verstärkt, die entsprechend zur Metalloberfläche orientiert sind.

#### **2.4.2. SERS-Substrate**

Um die beschriebenen Effekte für die Verstärkung der Raman-Signale durch die Anregung lokalisierter Oberflächen-Plasmonen-Polaritonen (LSPP) zu nutzen, stehen verschiedene Substrattypen zur Verfügung. Dabei kann die optimale Anregungswellenlänge durch die Wahl des Materials sowie der Form des Substrats im ultravioletten- [58, 97], sichtbaren- [98] bis in den NIR-Bereich [99-101] liegen. Für die meisten Anwendungen wird allerdings eine Anregung im sichtbaren Spektralbereich bevorzugt, da hierdurch konventionelle Lasersysteme eingesetzt werden können.

Historisch betrachtet bildeten aufgeraute Elektroden die ersten SERS Substrate. Die Rauigkeit wird dabei durch einen vorgeschalteten Oxidations-Reduktionszyklus erreicht [84, 85]. Eine ähnliche Substratvariante sind dünne Metallfilme, die durch eine Metall-Vakuumabscheidung auf geeignete Trägermaterialien hergestellt werden [102]. Die Lage der Plasmonenresonanz wird entscheidend durch die Schichtdicke sowie Partikelgröße und Partikelabstand bestimmt. Die letzten beiden Parameter lassen sich dabei durch die Bedingungen bei dem meist durchgeführten Tempern der Metallfilme beeinflussen. Das Hauptproblem dieser Substrattypen für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen ist allerdings die unzureichende Reproduzierbarkeit der Oberflächenstrukturierung. Daraus resultiert eine uneinheitliche Verteilung der Intensität der SERS-Signale. Um sich der Herausforderung einer homogenen Verteilung plasmonisch aktiver Bereiche zu stellen wurden Verfahren entwickelt, die auf der selbstorganisierten Abscheidung sphärischer Polystyrol und Siliziumdioxidpartikel beruhen. Diese können nach anschließend erfolgter Metallabscheidung von üblicherweise Gold oder Silber entfernt werden [103-105] oder verbleiben auf dem Trägermaterial (*film-over-nanosphere* Substrate) [106, 107]. Obwohl sich dadurch homogen strukturierte Substratoberflächen über einige  $\mu\text{m}$  einstellen lassen, begrenzen Strukturdefekte basierend auf Baufehlern innerhalb der Maske die einheitlichen Bereiche. Ein weiterer Ansatz für die reproduzierbare Herstellung von SERS-Substraten auf Trägermaterialien ist die Elektronenstrahl-Lithographie [98, 108, 109]. Dieses Verfahren erlaubt eine sehr genaue Kontrolle der optischen Eigenschaften des Substrates und ist somit sehr gut für die Untersuchung grundlegender plasmonischer Effekte geeignet [92]. Allerdings erschweren die hohe Komplexität sowie die Kosten den Zugang zur Routine-Analytik.

Eine weitere, sehr bedeutende Klasse von SERS-Substraten sind Metallkolloide und Sole [102, 110]. Hier befinden sich die plasmonisch aktiven Strukturen nicht auf einer Oberfläche wie bei den bisher beschriebenen Substratvarianten, vielmehr liegen die Kolloide als isolierte oder teilweise aggregierte Nanopartikel in Lösung vor. Ihr Vorteil liegt in der einfachen Präparation und den damit verbundenen niedrigen Kosten. Üblicherweise lassen sie sich durch die Reduktion von Metallionen ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{AuCl}_4^-$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) in Verbindung mit Reduktionsmitteln wie Natrium-Citrat herstellen, wobei die

Citrat-Ionen zusätzlich eine Aggregation der entstehenden Nanopartikel erschweren. Nachteile der Metallkolloide sind die unzureichende Stabilität der Signalverstärkung über die Zeit (Alterungseffekte) und Unterschiede bezüglich der Verstärkung zwischen verschiedenen Chargen. Daher existiert seit einiger Zeit ein Ansatz, der die kolloidbasierte SERS-Spektroskopie mit der Mikrofluidik unter Verwendung eines internen Standards kombiniert und die genannten Nachteile minimiert [111]. Zusätzlich können auf diese Weise weitere Anwendungsgebiete erschlossen werden.

Bei der Betrachtung der verschiedenen Substrattypen ist auffällig, daß das wesentliche Hauptaugenmerk auf der reproduzierbaren Verstärkung der Raman-Signale liegt. Eine weitere Steigerung der maximalen Verstärkung erscheint dagegen weniger bedeutsam, da bereits in zahlreichen Experimenten die notwendige Sensitivität für eine Einzelmoleküldetektion erreicht wurde [81, 112, 113]. Neben der beschriebenen homogenen Strukturierung von Oberflächen ist es weiterhin auch denkbar, ein einzelnes isoliertes Metall-Nanopartikel für die Detektion einheitlich verstärkter SERS-Signale zu verwenden. Ein solcher Aufbau wurde erstmals 1985 von Wessel in einem Gedankenexperiment formuliert [114]. Er schlug die Verwendung einer plasmonischen Nanoantenne in einem Rastertunnelmikroskop (*scanning tunneling microscope* - STM) vor und beschrieb somit die Grundlage der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (*tip-enhanced Raman spectroscopy* – TERS). Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen, Eigenschaften, verschiedenen experimentellen Ansätze und Anwendungen der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie beschrieben.

## 2.5. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS)

Allgemein steht die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie für die Kombination von Rastersondenverfahren (*scanning probe microscopy* – SPM) wie der Rastertunnelmikroskopie oder der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* – AFM) und SERS. Erste experimentelle Ergebnisse konnten im Jahr 2000 nahezu gleichzeitig von drei Gruppen berichtet werden [115-117].

Idealerweise ist für die Detektion der TERS-Signale lediglich ein einzelnes metallisches Nanopartikel am Ende der Mess-Sonde verantwortlich. Daher korreliert das Detektionsvolumen und somit die erreichbare kompositionelle Auflösung mit der Dimension des Spitzendurchmessers und der Reichweite des verstärkten elektromagnetischen Feldes an diesem (das Ende metallischer Sonden kann in diesem Zusammenhang auch als einzelnes Nanopartikel verstanden werden). Bis heute wurden in Abhängigkeit von den gewählten experimentellen Parametern sowie zu untersuchenden Objekten Werte für die spektrale Unterscheidung zweier Punkte von ca. 5 – 20 nm berichtet [118]. Dabei ist allerdings die topographische Auflösung durch die notwendige Metallbeschichtung der Mess-Sonden gegenüber den zu Grunde liegenden Rastersondenverfahren verschlechtert. Auch die erreichbare Verstärkung der Raman-Signale wird in der Literatur für die verschiedenen Messanordnungen mit bis zu sechs Größenordnungen angegeben, kann jedoch variieren [119]. Für die SERS-Spektroskopie werden Verstärkungsfaktoren von maximal  $10^{11}$  berichtet [90], allerdings konnte bereits mit einem Verstärkungsfaktor von  $10^7$  unter Verwendung statistischer Verfahren Einzelmolekül-Sensitivität mittels SERS erreicht werden [120]. Auch die TERS-Methodik hat trotz geringerer Verstärkungsfaktoren bereits mehrfach ihr Potential für eine Einzelmoleküldetektion zeigen können [60, 121, 122]. Dabei profitiert das Verfahren in diesem Zusammenhang von der eindeutigen topographischen Charakterisierung der untersuchten Objekte. Auch wurden bisher viele TERS-Experimente an fixierten Proben durchgeführt, wodurch längere Messzeiten an einem Punkt gewählt werden konnten.

Durch das hohe Auflösungspotential und die im Vergleich zur Raman-Spektroskopie gesteigerte Sensitivität konnte sich TERS für verschiedene Problemstellungen

bewähren. Dabei haben Untersuchungen halbleitender Materialien wie *single walled carbon nanotubes* (SWNT) [123-125] oder siliziumbasierter Strukturen [126] eine hochaufgelöste Beschreibung der lokalen Symmetrie oder vorhandener Dotanden ermöglicht. Durch diese Experimente können beispielsweise hochaufgelöste Informationen über die elektronische Struktur dieser Halbleiter-Materialien gewonnen werden [127]. Weiterhin wurde in den letzten Jahren in vielen Bereichen auch ein Zugang zu biochemischen Fragestellungen aufgezeigt. Dabei lag die Zielstellung nicht nur auf der Untersuchung von Objekten, deren Größe mit dem Auflösungsvermögen von TERS korreliert. Vielmehr konnten erstmals humane [128, 129] und bakterielle [130, 131] Zellen oberflächensensitiv untersucht werden. Neben der reinen Unterscheidung membranbildender Bestandteile wie Lipide und Proteine konnte in weiterführenden Experimenten an isolierten Zellorganellen auch eine Proteinspezifizierung erreicht werden [132]. Gelangt die komplette zu untersuchende Struktur in den Nahfeld-Fokus besteht mit Hilfe von TERS unter Minimierung nanoskaliger Effekte auch die Möglichkeit, spektrale Fingerabdrücke dieser zu generieren. Dies konnte am Beispiel der Charakterisierung einzelner Virus-Partikel mittels TERS gezeigt werden [133, 134]. Jedoch erlaubt das Auflösungsvermögen eine noch exaktere Beschreibung des Aufbaus biochemischer Strukturen. Beispielsweise konnten einzelne Abschnitte biologischer Polymere wie DNA [60, 61] oder Fibrillen [135, 136] hochortsaufgelöst untersucht werden. Die Grundlage hierzu wird durch die TERS-basierte Charakterisierung der einzelnen Bausteine dieser Biopolymere, wie DNA-Basen [56, 57] oder Aminosäuren [137-139], gelegt. Das Ziel der Untersuchung biologischer Polymere ist dabei in beiden Fällen, den Zugang zu einem labelfreien Sequenzierungsansatz aufzuzeigen. Der Vorteil liegt dabei auch in der extrem geringen Probenmenge, die benötigt wird. Neben der schwingungsspektroskopischen Unterscheidung der einzelnen Sequenzabschnitte liegt eine große Herausforderung in der eindeutigen Charakterisierung etwaiger Sekundärstrukturen und deren Einfluss auf die TERS-Resultate.

Um die Möglichkeiten, die sich durch die Kombination von SPM-Verfahren und SERS-Spektroskopie ergeben haben, weiter auszubauen und an gezielte Fragestellungen anzupassen, gibt es verschiedene Ansätze einer Realisierung. In Abbildung 2.5.1 ist ein

Messaufbau in der sogenannten Transmissionsgeometrie schematisch dargestellt [37, 115, 118]. Diese Variante der Spitzenbeleuchtung ist die historisch älteste Form. Geeignet für die Untersuchung transparenter Proben ist die Transmissionsgeometrie hinsichtlich der Verstärkung der Raman-Informationen der wohl effizienteste Zugang zur TERS-Methodik. Dabei wird das Licht für die Anregung der LSPP-Moden im endständigen Nanopartikel durch ein Ölimmersionsobjektiv hoher numerischer Apertur (NA) von unten kommend durch die Probe eingestrahlt. Dadurch wird zum einen der unvermeidbare Fernfeldbeitrag minimiert, zum anderen bewirkt die hohe NA und der dadurch große Einfallswinkel  $\alpha$  eine lokale Feldverstärkung (p-Polarisation) am endständigen Nanopartikel, die geeignet für die Wechselwirkung mit der Probe ist. Durch die Kombination dieser Eigenschaften konnte sich die Transmissionsgeometrie für eine Reihe von Fragestellungen sehr gut etablieren, ist aber für die Untersuchung nicht transparenter Proben ungeeignet. Da diese Variante für die Arbeiten in dieser Dissertation genutzt wurde, ist die weiterführende Implementierung in den kompletten Messaufbau im Kapitel Material und Methoden ausführlich beschrieben.

Für die Untersuchung nicht transparenter Proben existieren weitere Messanordnungen. Die Reflektionsgeometrie verwendet dabei eine seitliche [127, 140] oder apikale [141, 142] Anregung, welche nicht die Probe passiert. In beiden Konfigurationen werden allerdings Objektive mit einem langem Arbeitsabstand verwendet, um einen mechanischen Kontakt mit der Probe zu vermeiden. Daraus resultiert wiederum ein größeres Hintergrundsignal. Eine weitere, jedoch deutlich aufwendigere, Methode für die Untersuchung nicht transparenter Objekte basiert auf der Verwendung eines Parabolspiegels [143-145]. Über diesen wird ein aufgeweiteter Laserstrahl auf die TERS-Sonde fokussiert und das rückgestreute Licht wieder eingesammelt. Durch den größeren Raumwinkel der für die Detektion zur Verfügung steht resultiert eine gute Sammeleffizienz.

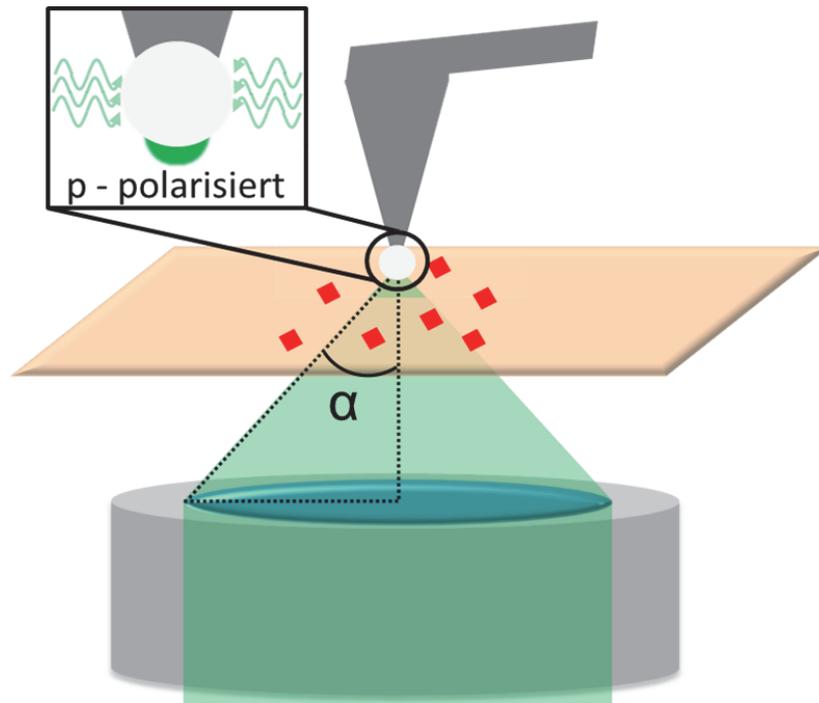


Abbildung 2.5.1: Schematische Darstellung der Transmissionsgeometrie für die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie. Das Licht wird von unten durch die Probe mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur (großer Öffnungswinkel  $\alpha$ ) eingestrahlt, so daß ein Teil des verstärkten EM-Feldes p-polarisiert ist

Eine weitere sehr interessante Variante der TERS-Methodik basiert auf einer Modifikation der TERS-Sonde [146]. Durch ein periodisches Gitter am Schaft kommt es zu einer lokalen Trennung von Anregung und Detektion. Durch einen auf das Gitter fokussierten Laser werden propagierende Oberflächen-Plasmon Polaritonen (PSPP – *propagating surface plasmon polariton*) erzeugt, die auf die Spitze der Sonde gerichtet sind. Dadurch lässt sich das übliche Hintergrundsignal unterbinden und ein hoher Kontrast (Verhältnis TERS- zu Hintergrundsignal) erzielen.

Generell zeigen diese Arbeiten, daß die Modifikation der verwendeten Mess-Sonden neben der Beleuchtungsgeometrie ein weiteres bedeutendes Entwicklungsfeld darstellt. Die standardisierten Herstellungsverfahren zielen dabei auf einen möglichst hohen Durchsatz. Für die AFM-basierten TERS-Verfahren wird dies beispielsweise durch die Beschichtung kommerziell erhältlicher Sonden mit Silber [37, 118] oder auch Gold [140]

im Vakuum erreicht. Die Details der vakuumbasierten Silberbeschichtung der in dieser Arbeit verwendeten TERS-Sonden sind im Kapitel Material und Methoden ausführlich beschrieben. Wird für die Detektion der Topographie ein STM gewählt, definiert die finale Form der TERS-Spitze nicht direkt die maximal erreichbare Ortsauflösung. Hier konnten im TERS-Experiment beispielsweise einzelne Farbstoff-Moleküle mit einer lateralen Auflösung von ca. 1.5 nm dargestellt werden [121]. Für STM-basierte TERS-Technologien können robustere Verfahren der Sonden-Modifikation gewählt werden, die auf dem elektrochemischen Ätzen von Metalldrähten beruhen [147]. Darüber hinaus existieren zahlreiche zum Teil deutlich aufwendigere Ansätze. Beispielsweise lassen sich einkristalline Silber-Nanodrähte durch Dielektrophorese an einer Mess-Sonde befestigen, so daß Abnutzungserscheinungen während der Messung nicht automatisch zu Signalverlusten führen [148]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, goldbeschichtete tetraedrische Glaskörper zu verwenden. Dabei erlaubt die TERS-Sonde eine Beleuchtung von oben durch den Glaskörper, so daß dadurch prinzipiell eine Alternative zur Reflektionsgeometrie aufgezeigt ist [149, 150]. Letztlich lässt sich jedoch feststellen, daß das Ziel der TERS-Sonden-Entwicklung neben der Erfüllung der jeweiligen applikativen Vorgabe immer eine Verbesserung der plasmonischen Eigenschaften hinsichtlich Signalverstärkung und Reproduzierbarkeit ist.

### 3. Material und Methoden

In dem folgenden Kapitel werden der Aufbau und das Messprinzip der verwendeten Methode beschrieben. Weiterhin wird auf die Präparation der TERS-Spitzen eingegangen.

#### 3.1. TERS Aufbau und Messprinzip

In Abbildung 3.1.1 ist die für die Arbeiten dieser Dissertation verwendete TERS-Messanordnung dargestellt. Die einzelnen Untersuchungen wurden dabei an zwei verschiedenen Kombinationen eines Mikro-Raman Spektrometers (1. Set-up: LabRam, Jobin Yvon Horiba; 2. Set-up: S & I GmbH) und eines Rasterkraftmikroskops (1. Set-up: Nano Wizard I; 2. Set-up Nano Wizard II, beide JPK Instruments) durchgeführt, die nach dem beschriebenen Aufbau arbeiten. Das zu Grunde liegende Prinzip der Transmissionsgeometrie ist im Grundlagenkapitel ausführlich beschrieben.

Für die Messung wird monochromatisches Laserlicht (L) eingestrahlt, das zunächst durch variable Kombinationen von Graufiltern (GF) in seiner Intensität verschieden stark abgeschwächt wird. Die verwendeten Wellenlängen (532 nm – NdYAG Diodenlaser, 568 nm – Kr Ionenlaser, 633 nm – HeNe Laser) sind dabei an das Plasmonenabsorptionsprofil der Silberbeschichtung angepasst. Das Laserlicht wird mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels (ST1) in ein Ölimmersionsobjektiv (60x, NA 1.45, Olympus Japan) (O) geführt und von hier durch die Probe (P) auf die Spitze der silberbeschichteten Mess-Sonde fokussiert. Das inelastisch gestreute Raman Licht wird durch das gleiche Objektiv in 180° Rückstreugeometrie wieder gesammelt. Dabei muß es auf dem Weg in das Spektrometer einen Notchfilter (N) passieren, so daß die spektrale Region ( $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ ) um die Laserwellenlänge und somit die Rayleigh-Streuung unterdrückt werden kann. Im Spektrometer wird das inelastisch gestreute Licht durch ein Gitter (G) in seine einzelnen Wellenlängen aufgeteilt. Anschließend werden die individuellen Beiträge durch eine CCD- Kamera (CCD – *charge coupled device*) registriert und die Kombination der einzelnen Signale über einen Computer (PC) als Spektrum dargestellt.

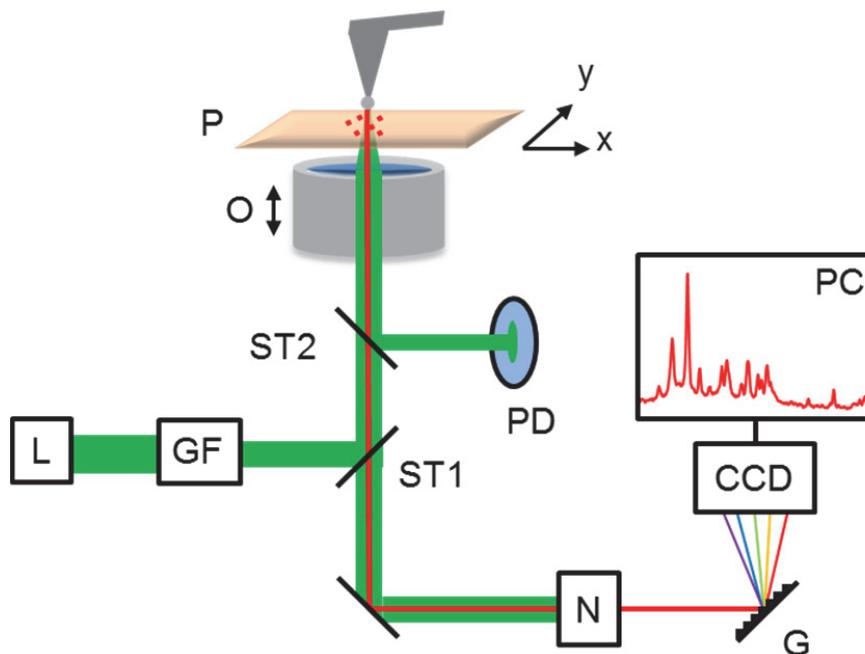


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung der verwendeten TERS-Messanordnung. Die Funktion und das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten (L – Laser; GF – Graufilter; ST1,2 – Strahlteiler 1,2; O – Objektiv; P – Probe; PD – Photodiode; N – Notchfilter; G – Gitter; CCD – CCD-Kamera; PC – Computer) ist ausführlich im Text beschrieben

Eine wesentliche Herausforderung an dieses Set-up ist eine optimale und konstante Fokussierung des Lasers auf die Spitze der Mess-Sonde. Um dies zu gewährleisten wird die silberbeschichtete Sonde vor jeder Messung zunächst lateral durch den Laserstrahl geführt. Dabei kann die Reflektion gemessen werden, da ein Teil des rückgestreuten Lichtes über einen Strahlteiler (ST2) auf eine Photodiode (P) gelangt. In Abbildung 3.1.2 ist ein repräsentatives Reflektionsbild einer TERS-Sonde gezeigt, die durch den Laserfokus geführt wurde. Anschließend wird die relative laterale Position zwischen Sonde und Objektiv in einer Art und Weise fixiert, daß sich die Spitze der Sonde im Bereich maximaler Reflektion befindet. Für die TERS-Messungen wird anschließend lediglich die Probe in x-y-Richtung verfahren (sample stage). Zusätzlich kann das Objektiv den vertikalen Bewegungen der TERS-Sonde in z-Richtung folgen, so daß der Abstand zwischen beiden konstant bleibt. Dieses Justageverfahren muß für

jede einzelne Sonde durchgeführt werden. Anschließend werden verschiedene Bereiche im intermittierenden Kontakt-Modus topographisch charakterisiert, um geeignete Proben-Strukturen zu finden. Für die eigentliche TERS Messung wird dann die Mess-Sonde punktweise in einem periodischen Gitter über diese geführt und die jeweilige spektrale Information detektiert. Nach jeder Messung wird neben der Proben-Struktur ein Referenz-Spektrum aufgenommen, um eine Kontamination der TERS-Sonde auszuschließen. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden Laser-Leistungen von 200  $\mu\text{W}$  - 1 mW sowie Integrationszeiten zwischen 1 – 20 s verwendet.

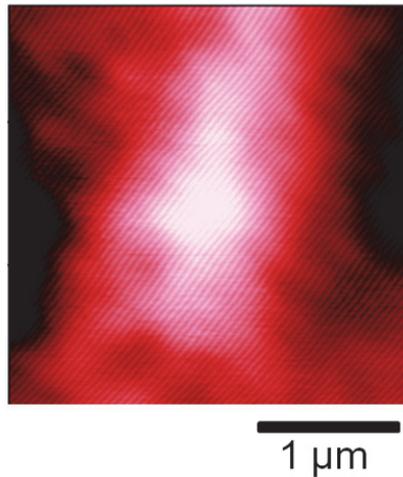


Abbildung 3.1.2: Reflektionsbild einer TERS-Spitze, nachdem sie durch den Laser-Fokus geführt wurde

### 3.2. Spitzenpräparation

Für die Präparation der Mess-Sonden wurden kommerziell erhältliche AFM-Spitzen (NSG 10, Resonanzfrequenz 140 – 390 kHz, Kraftkonstante  $k \sim 12$  N/m, NT – MDT) mit einer 20 – 25 nm dicken Silberschicht (Reinheit: 99,99%, Balzer Materials) belegt. Dies wurde durch thermisch induziertes Aufdampfen mit einer Rate von ca. 0.05 nm/s durchgeführt (BAL-TEC MDS 020, BAL-TEC GmbH). Um Alterungserscheinungen durch die Oxidation des Silbers zu minimieren wurden die TERS-Sonden in einer Argonatmosphäre gelagert und innerhalb von maximal 2 Tagen verwendet. In Abbildung 3.2.1 sind Rasterelektronenmikroskopie (REM) – Aufnahmen einer mit 20 nm Silber beschichteten AFM-Sonde mit steigender Auflösung gezeigt. Wie im Teil b zu sehen ist, liegt der Spitzendurchmesser nach der Silberbeschichtung bei ca. 20 nm.

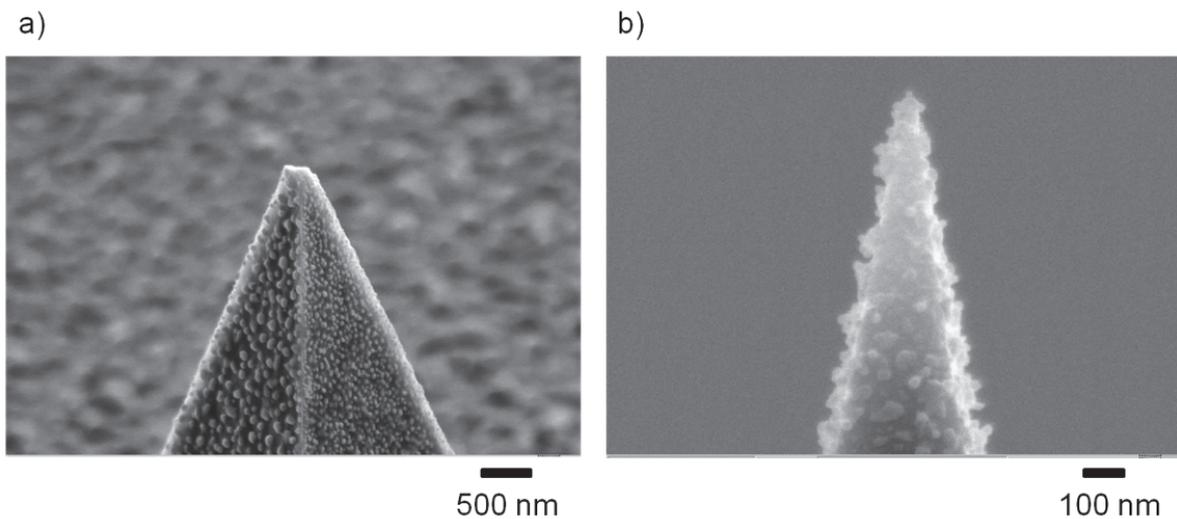


Abbildung 3.2.1: Rasterelektronenmikroskop (REM) – Aufnahmen einer mit 20 nm Silber beschichteten AFM-Sonde mit steigender Auflösung von a) nach b)

#### **4. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS) zur nanoskaligen Analyse von DNA-Strängen**

Tendenziell ist das Augenmerk aktueller Methodenentwicklung für die DNA-Analyse auf einzelne Moleküle gerichtet [1]. Neben den bereits beschriebenen Fluoreszenz-basierten Techniken zur Sequenzierung bietet die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie zusätzlich zu dem Verzicht auf Amplifizierung der DNA den Vorteil der Label-Unabhängigkeit. Im Folgenden wird die Anwendung von TERS auf verschiedenste DNA-Proben und Fragestellungen zu diesen beschrieben.

##### **DNA-Origami**

Prinzipiell genügt ein einziges Molekül zur Analyse mittels TERS, wobei die DNA ein breites Anwendungsfeld bietet. Da DNA in ihrem nativen Umfeld mit Proteinen assoziiert ist, soll ein TERS-Experiment zeigen, daß eine Unterscheidung auf der Nanometer-Skala anhand von spezifischen Marker-Banden möglich ist. Hierzu wurde als artifizielles System DNA-Origami herangezogen. Der Prozess der Selbstorganisation eines DNA-Origamis umfasst die Faltung eines langen, einzelsträngigen DNA Moleküls (oft aus dem M13mp18 Phagen) als Grundgerüst in grundsätzlich jede gewünschte Form, durch Hilfe einer Vielzahl kurzer Helfer-Oligonukleotide [151]. Weiterhin ist eine chemische Modifizierung und Funktionalisierung möglich. Durch biotinylierte Helfer-Oligonukleotide kann spezifisch das Protein Streptavidin an ausgewählten Positionen des Origamis angebunden werden. Eine solche Struktur wurde erstmals für TERS Messungen zur DNA-Protein-Unterscheidung verwendet und ist in Kapitel 4.1 detailliert dargestellt.

##### **DNA-Konformationen und Sekundärstruktur**

DNA kann eine Vielzahl an Konformationen und Sekundärstrukturelementen ausbilden. An einem einzelnen synthetischen DNA-Strang mit repetierenden A<sub>10</sub>G<sub>10</sub>-Einheiten kann zum ersten Mal mittels TERS die Bildung von Guanin Quadruplex-Strukturen

gezeigt werden. Auch hier konnten spezifische Markerbanden identifiziert werden, die Aufschluss über die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guaninen und damit der Quadruplex-Bildung geben. Zum Vergleich dienen TERS Spektren, die auf reiner Guanin Quadruplex DNA aufgenommen wurden, und im Zusammenhang damit der Abgleich mit durch Raman-Spektroskopie ermittelten Markerbanden. Weiterhin kann erstmals durch TERS Experimente auf Quadruplex DNA durch die Detektion von Konformationsmarkerbanden eine hoch orts aufgelöste Aussage über das Vorliegen bestimmter Konformationen getroffen werden.

### **Basenunterscheidung in DNA**

Weitere TERS Experimente befassen sich mit reiner DNA, die nicht mit Proteinen assoziiert ist und keine Sekundärstruktur-Elemente aufweist. An einem Kalbsthymus-DNA Einzelstrang, der alle vier Nukleotide enthält, wird gezeigt, daß es möglich ist, auf einem einzelnen DNA-Strang anhand von Markerbanden spektrale Beiträge aller Basen zuzuordnen und zu differenzieren, obwohl sich ihre Raman Streuquerschnitte deutlich unterscheiden [61].

Schließlich kann in einem weiteren Experiment ein Schritt Richtung Sequenzierung aufgezeigt werden, indem auf einem einzelnen synthetischen DNA-Strang aus alternierenden  $A_{10}C_{15}$ -Einheiten der Übergang zwischen diesen detektiert wird.

#### 4.1. DNA-Protein-Unterscheidung

Die Eigenschaft von DNA sich selbst zu organisieren und nanoskalige Strukturen auszubilden wird für die Herstellung von DNA-Origamis genutzt, welche sich wiederum durch ihre definierte Form als Modellsystem für TERS Experimente eignen. Der Name „Origami“ indiziert bereits die Fähigkeit, DNA gezielt zu Strukturen höherer Ordnung zu falten. Um die für diese Arbeit freundlicherweise von Antti-Pekka Eskelinen und Christian Leiterer zur Verfügung gestellten Origamis herzustellen wurden zunächst rechteckige Origami-Strukturen aus einzelsträngiger DNA aus dem M13mp18 Virus erzeugt. Von den hierbei verwendeten Helfer-Oligonukleotiden sind ausgewählte mit Biotin modifiziert. Nach thermischem *Annealing* und einem Ligationsschritt, der die thermische und mechanische Stabilität der Origamis erhöhen soll, wird über die Biotin-Modifizierung Streptavidin angebunden, so daß ein Origami mit 23 Streptavidin-Pixeln entsteht [152]. Diese formen zwei senkrecht zueinander stehende Linien aus jeweils 11 und 12 Streptavidin-Molekülen. In Abbildung 4.1.1 ist der Aufbau eines solchen DNA-Origamis schematisch dargestellt. Die roten Punkte symbolisieren die Streptavidin-Moleküle, der DNA Einzelstrang ist schwarz und die Helfer-Oligonukleotide sind blau.

Zusätzlich zeigt Abbildung 4.1.1 eine AFM-Aufnahme im intermittierenden Kontakt-Modus der Topographie eines DNA-Origamis mit L-förmiger Anordnung von Streptavidin-Molekülen. Diese Messung erfolgte bereits mit einer mit Silber bedampften TERS-Spitze mit einem Spitzendurchmesser von ca. 20 nm, daher sind die einzelnen Streptavidin-Moleküle, deren Abstand voneinander weniger als 1 nm beträgt, topographisch nicht aufgelöst.

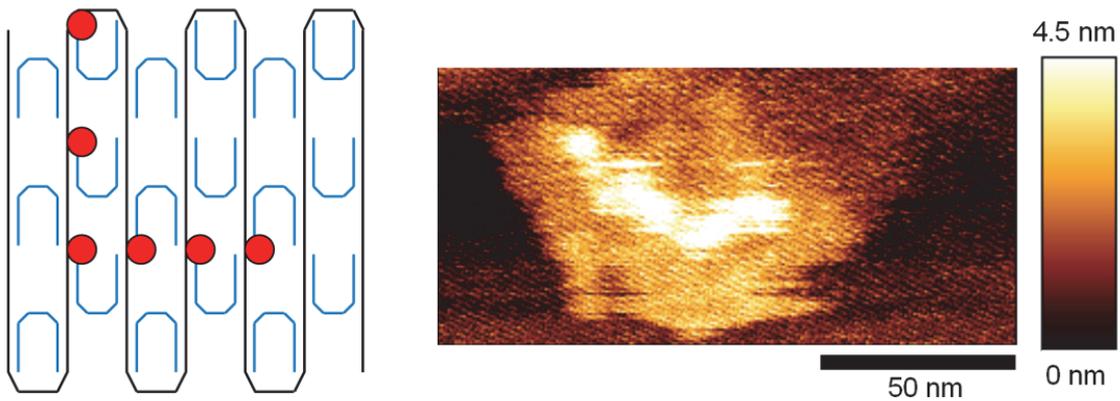


Abbildung 4.1.1: Links: Schematische Darstellung des DNA-Origamis. Schwarze Linie – DNA-Einzelstrang, blaue Linien – Helfer-Oligonukleotide, rote Punkte – Streptavidin. Rechts: Topographischer AFM-Scan eines DNA-Origamis mit 23 L-förmig angeordneten Streptavidin-Molekülen

Auf dem in Abbildung 4.1.1 gezeigten DNA-Origami wurden TERS-Messungen durchgeführt. Da eine Unterscheidung zwischen DNA und Protein anhand von spezifischen Markerbanden – unterstützt durch die topographische Information – untersucht werden soll, ist der Übergang zwischen diesen beiden Bestandteilen der Probe besonders interessant.

Abbildung 4.1.2 zeigt, an welchen Stellen auf dem Origami TERS Spektren aufgenommen wurden. Die Messungen erfolgen Punktweise, jeweils in einer Linie von unten nach oben über die Streptavidin-Struktur.

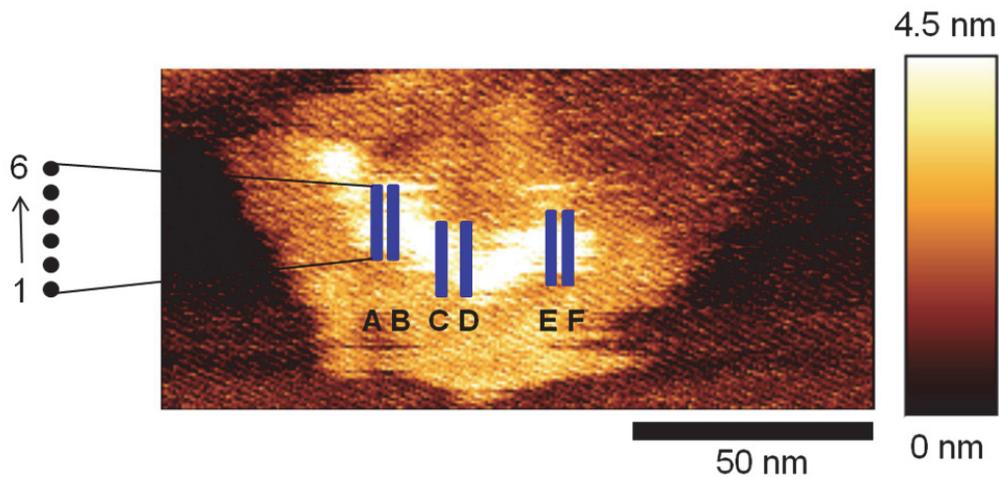


Abbildung 4.1.2: AFM-Aufnahme des DNA-Origamis, die blauen Balken markieren die Messpositionen

Es wurden sechs solcher Messungen durchgeführt, in der Abbildung 4.1.2 gekennzeichnet durch die Buchstaben A bis F. Hierbei wurden auf einer Länge von 12.5 nm jeweils sechs TERS-Spektren aufgenommen, der Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten beträgt also 2.5 nm, was ca. der Hälfte der Abmessungen des Streptavidin entspricht ( $50 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA}$ ). Die durch die AFM-Aufnahme ermittelte Höhe des Proteins gegenüber der DNA ergibt jedoch nur ca. 3 nm. Dieser Höhenunterschied gegenüber der Angabe in der Literatur lässt sich durch ein Einsinken des Streptavidin in die darunter liegende DNA-Struktur, bzw. einer Deformation des Proteins durch die mechanische Einwirkung der TERS-Sonde erklären, eindeutige Beschreibungen dieses Effektes fehlen aber in der Literatur. Der laterale Abstand zwischen Messung A und B, bzw. E und F, beträgt 2.8 nm, der Abstand zwischen C und D 5.6 nm. Im Folgenden werden zunächst die Messungen A und B unter Berücksichtigung spezifischer Markerbanden ausführlich beschrieben und anschließend jeweils Messung C und D, sowie E und F zusammengefasst. Abschließend erfolgt eine detaillierte Betrachtung des DNA-Protein-Überganges anhand aller Banden der Spektren von Messung B.

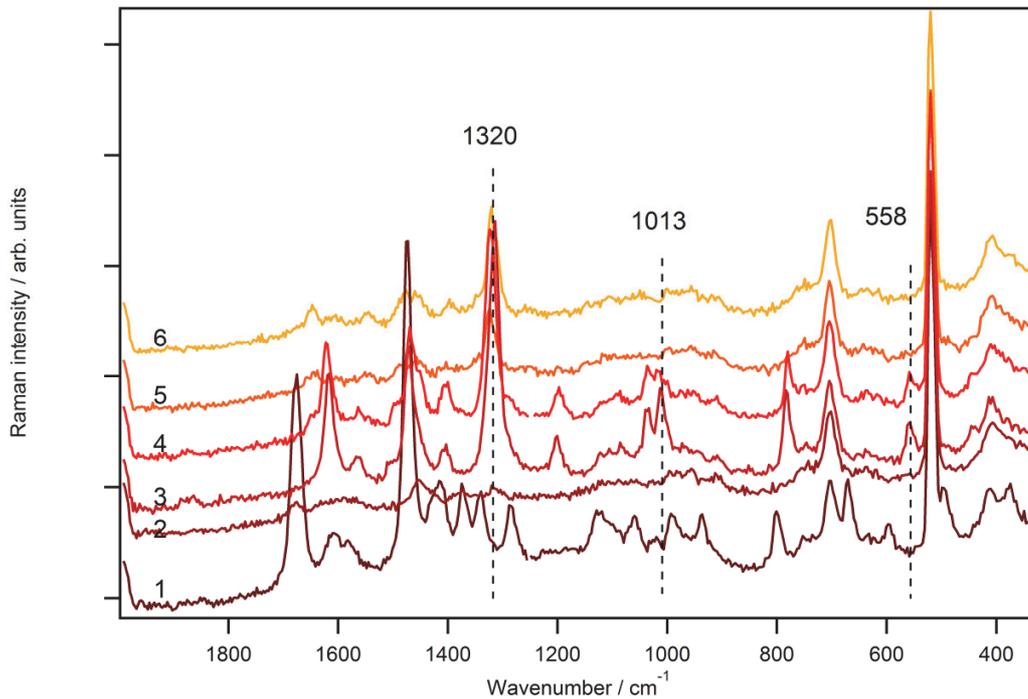


Abbildung 4.1.3: Spektren der Messung A, von unten nach oben mit jeweils 2.5 nm Abstand aufgenommen ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $p = 900 \text{ }\mu\text{W}$ ,  $t = 5 \text{ sec}$ ). Signifikante Protein-Markerbanden sind markiert

In Abbildung 4.1.3 sind die TERS Spektren von Messung A gezeigt. Drei Banden sind markiert, die für diese Messungen als Markerbanden von Aminosäuren potentiell verwendet werden können:  $558 \text{ cm}^{-1}$  Valin / Tryptophan,  $1013 \text{ cm}^{-1}$  Tryptophan / Phenylalanin / Alanin und  $1320 \text{ cm}^{-1}$  Serin [153]. Der Intensitätsverlauf dieser drei Banden in Abbildung 4.1.3 gibt einen eindeutigen Hinweis, daß sie dem Verlauf der topographischen AFM-Aufnahme folgen. Die Spektren, in denen diese Banden am intensivsten sind, sind auf dem Streptavidin aufgenommen worden. Da sich das Protein auf der DNA befindet beträgt der Abstand der TERS-Sonde zu der DNA mindestens 3 nm. Dadurch ist eine potentiell mögliche Zuordnung der Banden bei  $558 \text{ cm}^{-1}$  und  $1320 \text{ cm}^{-1}$  zu DNA auf Grund ihres Intensitätsverlaufs unwahrscheinlich. Um anhand dieser Banden den Verlauf von Origami-DNA und Streptavidin nachzuvollziehen, wurden diese mit einer Lorentz-Funktion angefitet und die jeweilige Messposition

gegen die Wellenzahl aufgetragen, wobei die Größe des Punktes in der Grafik der Fläche entspricht. Für Messung A sind die Fit-Ergebnisse in Abbildung 4.1.4 dargestellt.

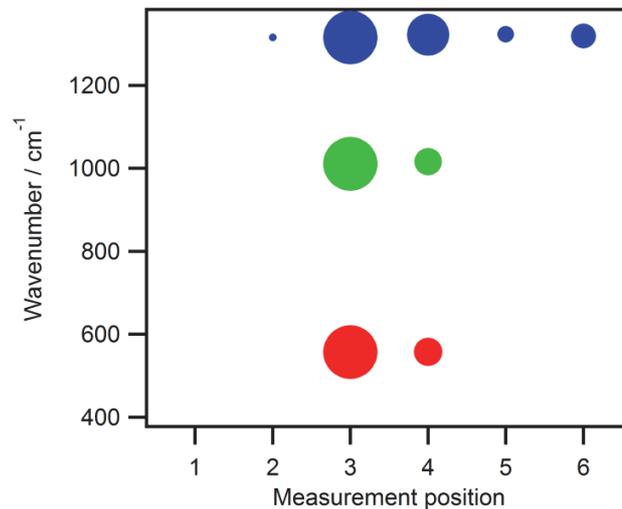


Abbildung 4.1.4: Fit-Ergebnisse von Messung A, Bandenposition am jeweiligen Messpunkt, die Größe der Punkte entspricht der Fläche. Blau –  $1320\text{ cm}^{-1}$ , grün –  $1013\text{ cm}^{-1}$  und rot –  $558\text{ cm}^{-1}$

Die blauen Punkte beschreiben den Verlauf der Bande um  $1320\text{ cm}^{-1}$ . Die Messpunkte in der Abbildung 4.1.4 von links nach rechts entsprechen den Messpunkten 1 - 6 in 4.1.3 und 4.1.2 (A) von unten nach oben. Schon in der Abbildung 4.1.3 ist ersichtlich, daß sich das TERS-Spektrum an der ersten Position in seinem spektralen Erscheinungsbild von den anderen unterscheidet. In dem betrachteten Wellenzahlbereich befindet sich keine Protein-Markerbande bei  $1320\text{ cm}^{-1}$ , deshalb konnte keine Bande für Abbildung 4.1.4 angefitet werden. Beide die Wellenzahl  $1320\text{ cm}^{-1}$  flankierenden Banden in diesem ersten Spektrum,  $1340\text{ cm}^{-1}$  und  $1288\text{ cm}^{-1}$ , können DNA zugeordnet werden. Dabei beschreiben beide Banden charakteristische Ringmoden von Adenin und Guanin ( $1340\text{ cm}^{-1}$ ), bzw. Cytosin ( $1288\text{ cm}^{-1}$ ) [56, 61, 154-158]. Eine spektrale Zugehörigkeit zu Streptavidin ist bei diesen Banden zwar auch möglich [153], wird hier aber auf Grund der topographischen Information ausgeschlossen. Das zweite Spektrum enthält kaum spektrale Beiträge. Den

Messaufbau zugrunde legend kann davon ausgegangen werden, daß die TERS-Spitze nicht im Feedback war und damit nicht hinreichend nah an der Probe, um ein Nahfeldsignal zu geben. Die TERS-Sonde befand sich hier an einer Position, an der der Übergang von DNA zu Streptavidin stattfindet und somit eine Stufe von ca. 3 nm vorhanden ist. Dennoch wird hier eine schwache Proteinbande bei  $1316\text{ cm}^{-1}$  detektiert und in Abbildung 4.1.4 entsprechend mit einem kleinen Kreis gekennzeichnet. Im Verlauf der weiteren Messpunkte von Messung A ist ein deutlicher Intensitätsanstieg der Protein-Markerbande um  $1320\text{ cm}^{-1}$  erkennbar, gefolgt von einem Intensitätsabfall nach seinem Zenit bei Position 3. An Position 3 und 4 ist die Intensität am höchsten, es kann also davon ausgegangen werden, daß sich hier das Streptavidin befindet. Dies bestätigt sich darüber hinaus durch die Topographie in der AFM-Aufnahme.

Die zweite betrachtete Bande, dargestellt durch die grünen Punkte in Abbildung 4.1.4, liegt bei  $1013\text{ cm}^{-1}$ . Auch hier zeigt das erste Spektrum kein Signal an genau dieser Position, es wurde daher auch hier keine Bande zum Anfitten gewählt. Die Bande neben dieser Position bei  $988\text{ cm}^{-1}$  kann einer  $\text{NH}_2$ -Deformations-Schwingung der DNA-Base Thymin zugeordnet werden [56, 57, 61, 154, 159]. Das zweite Spektrum besitzt kaum spektrale Information, eine Bande bei  $995\text{ cm}^{-1}$  ist zwar schwach erkennbar, sollte aber aufgrund ihrer mangelnden Aussagekraft zurückhaltend betrachtet werden. Der Verlauf der weiteren Messpunkte ist dem der ersten betrachteten Bande sehr ähnlich, auch hier besitzen die Signale bei  $1013\text{ cm}^{-1}$  an Position 3 und 4 die höchste Intensität, die dann bei den nachfolgenden Messpunkten wieder abfällt. Diese Bande wird durch eine weitere bei  $1036\text{ cm}^{-1}$  begleitet. Dies wird in Streptavidin-Spektren beobachtet [153], aber auch DNA zeigt diese Bande [154, 156]. Unter Berücksichtigung der topographischen Information kann sie jedoch Streptavidin zugeordnet werden.

Die dritte betrachtete Bande liegt bei  $558\text{ cm}^{-1}$  und tritt nur in den TERS-Spektren an den Positionen 3 und 4 auf. Ihr Intensitätsverlauf ist analog zu den beiden bereits beschriebenen.

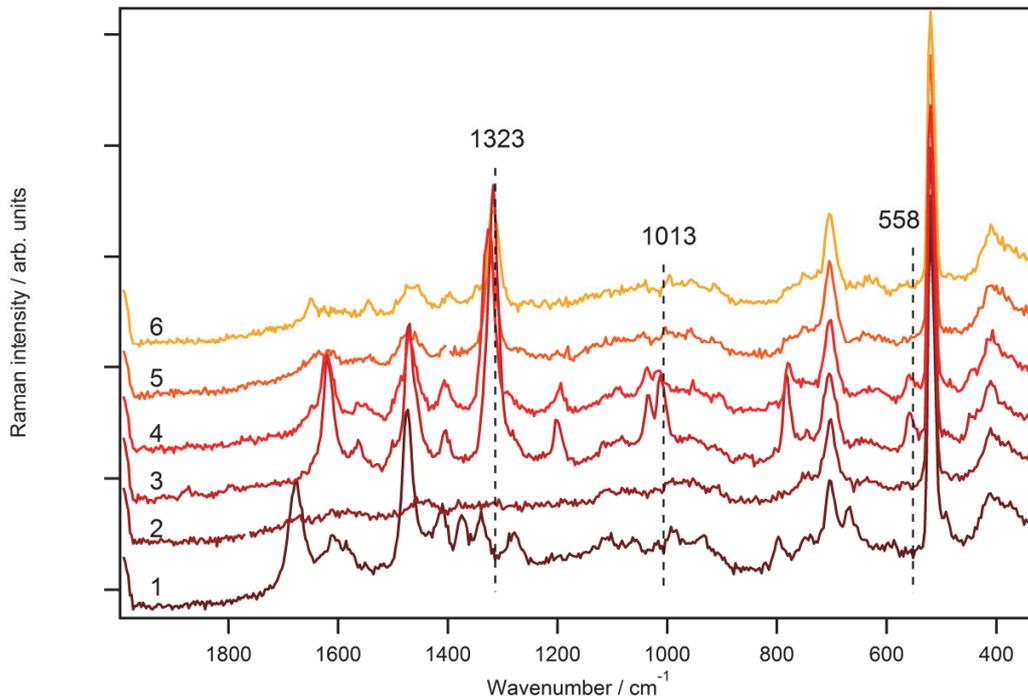


Abbildung 4.1.5: Spektren der Messung B, von unten nach oben mit jeweils 2.5 nm Abstand aufgenommen, 2.8 nm rechts von Messung A ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $p = 900 \mu\text{W}$ ,  $t = 5 \text{ sec}$ ). Signifikante Protein-Markerbanden sind markiert

Abbildung 4.1.5 zeigt die TERS Spektren der Messung B. Auch hier sind, wie in Messung A, die betrachteten Protein-Markerbanden markiert. Diese Spektren wurden in einem Abstand von 2.8 nm von denen der Messung A aufgenommen und liegen ebenfalls jeweils 2.5 nm auseinander. Ihr spektrales Erscheinungsbild ähnelt dem der Messung A in Abbildung 4.1.3, es wurden auch die gleichen Protein-Markerbanden für einen Fit herangezogen. Es wurden die gleichen Parameter verwendet wie für Messung A und die Ergebnisse sind in dem gleichen Schema in Abbildung 4.1.6 dargestellt.

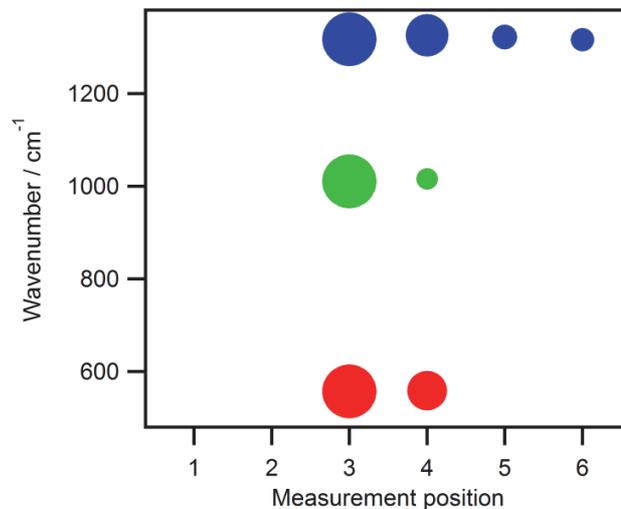


Abbildung 4.1.6: Fit-Ergebnisse von Messung B, Bandenposition am jeweiligen Messpunkt, die Größe der Punkte entspricht der Fläche. Blau –  $1323 \text{ cm}^{-1}$ , grün –  $1013 \text{ cm}^{-1}$  und rot –  $558 \text{ cm}^{-1}$

Analog zu Messung A zeigen die blauen Punkte den Verlauf der Bande um  $1323 \text{ cm}^{-1}$ . In dem ersten Spektrum kann keine Bande zum Fitten herangezogen werden, es zeigt nur eine Bande bei  $1339 \text{ cm}^{-1}$ . Wie bereits für Messung A erwähnt ist diese eine typische DNA-Bande. Außerdem ist bei  $1288 \text{ cm}^{-1}$  wie schon im ersten Spektrum von Messung A eine weitere DNA-Bande sichtbar. Das zweite Spektrum wurde nicht zur Auswertung herangezogen, da es kaum spektrale Information enthält. Auch hier kann davon ausgegangen werden, daß sich die TERS-Sonde nicht im Feedback befand. Grund hierfür kann wiederum die Position der Messung sein, die sich genau am Übergang von DNA zu Protein befindet, da an dieser Stelle eine Stufe von ca. 3 nm vorhanden ist. Wie auch bei Messung A ist hier im weiteren Verlauf der Messpunkte ein deutlicher Anstieg der Intensität der Protein-Markerbande um  $1320 \text{ cm}^{-1}$  erkennbar, der sein Maximum wiederum bei den Messpositionen 3 und 4 erreicht und danach abfällt.

Die grünen Punkte in Abbildung 4.1.6 beschreiben den Verlauf der Bande um  $1013 \text{ cm}^{-1}$ . In Spektrum 1 ist nur eine Bande bei  $988 \text{ cm}^{-1}$  erkennbar, die, wie schon in Messung A, nicht für den Fit herangezogen wird. Das zweite Spektrum kann auch hier nicht berücksichtigt werden. Die darauf folgenden Spektren an den Positionen 3 und 4 zeigen in Abbildung 4.1.5 die Doppelbande bei  $1013 \text{ cm}^{-1}$  und  $1036 \text{ cm}^{-1}$ , wobei die

erstere gefittet und in Abbildung 4.1.6 dargestellt wird. Wie auch in Messung A ähnelt der Verlauf dem der Bande um  $1320\text{ cm}^{-1}$ .

Die roten Punkte in Abbildung 4.1.6 zeigen den Verlauf der Bande bei  $558\text{ cm}^{-1}$ . Wie ebenfalls in Messung A beobachtet erscheint diese nur in den Spektren an den Messpositionen 3 und 4 und zeigt ebenfalls einen ähnlichen Verlauf zu den beiden vorher beschriebenen.

Ein weiteres interessantes Merkmal dieser Messung B zeigt sich im kleineren Wellenzahlbereich. In Abbildung 4.1.5 zeigt das erste, unterste Spektrum Banden bei  $666\text{ cm}^{-1}$  und  $797\text{ cm}^{-1}$ , die in den weiteren Spektren nicht mehr erscheinen. Beide sind nicht im Streptavidin detektierbar [153], sondern typische DNA-Moden. Die Bande bei  $666\text{ cm}^{-1}$  kann der Guanin Ringatmung zugeordnet werden [61, 156], die bei  $797\text{ cm}^{-1}$  der Ringatmung von Cytosin [56, 154, 159] bzw. Thymin [56, 156, 159, 160]. Dabei ist auffällig, daß nicht die Ringatmungsmoden aller DNA-Basen erkennbar sind. Ursache hierfür können die individuelle Sequenz an der Messposition und Orientierungseffekte der jeweiligen Basen zur TERS-Sonde sein [61, 161].

Abbildung 4.1.7 zeigt die TERS-Spektren der Messungen C und D. Es ist eine deutliche Ähnlichkeit zu den Messungen A und B erkennbar, die Spektren beinhalten die gleichen Markerbanden. Wie zuvor werden die markierten Banden angefittet und im rechten Teil der Abbildung 4.1.7 dargestellt. Im Vergleich zu den Messungen A und B ist auffällig, daß die höchste Intensität der Protein-Markerbanden an den Messpositionen 3 bis 5 vorliegt. Aus diesen bislang betrachteten Messungen ist ersichtlich, daß die jeweils räumlich nah beieinander liegenden Messreihen A und B, bzw. C und D, die größte Ähnlichkeit untereinander aufweisen.

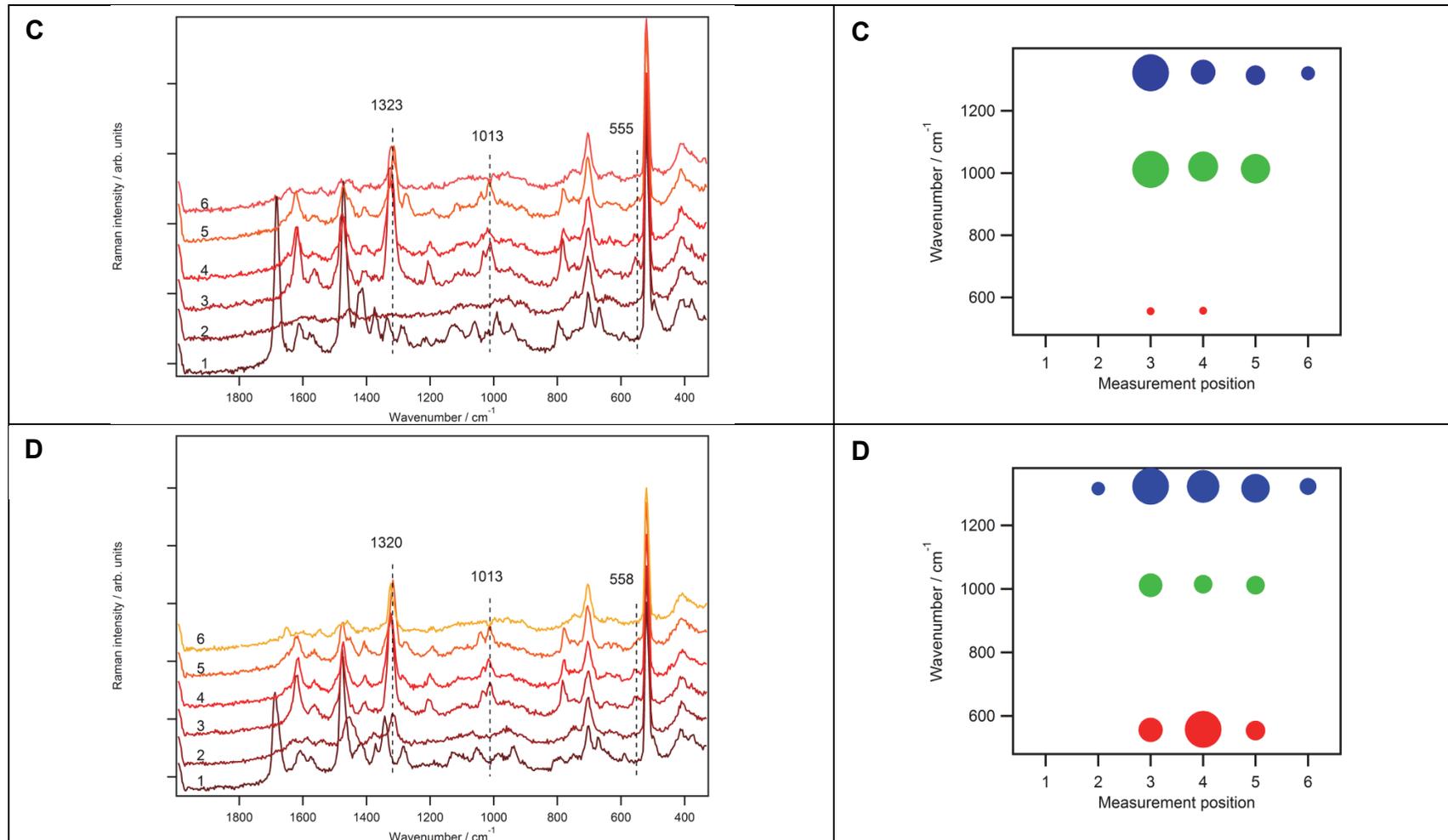


Abbildung 4.1.7: Links: Spektren der Messungen C und D, von unten nach oben mit jeweils 2.5 nm Abstand aufgenommen ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $p = 900 \mu\text{W}$ ,  $t = 5 \text{ sec}$ ). Signifikante Protein-Markerbanden sind markiert. Rechts: Fit-Ergebnisse der Messungen C und D, Bandenposition am jeweiligen Messpunkt, die Größe der Punkte entspricht der Fläche. Blau –  $1323 \text{ cm}^{-1}$ , grün –  $1013 \text{ cm}^{-1}$  und rot –  $555 \text{ cm}^{-1}$

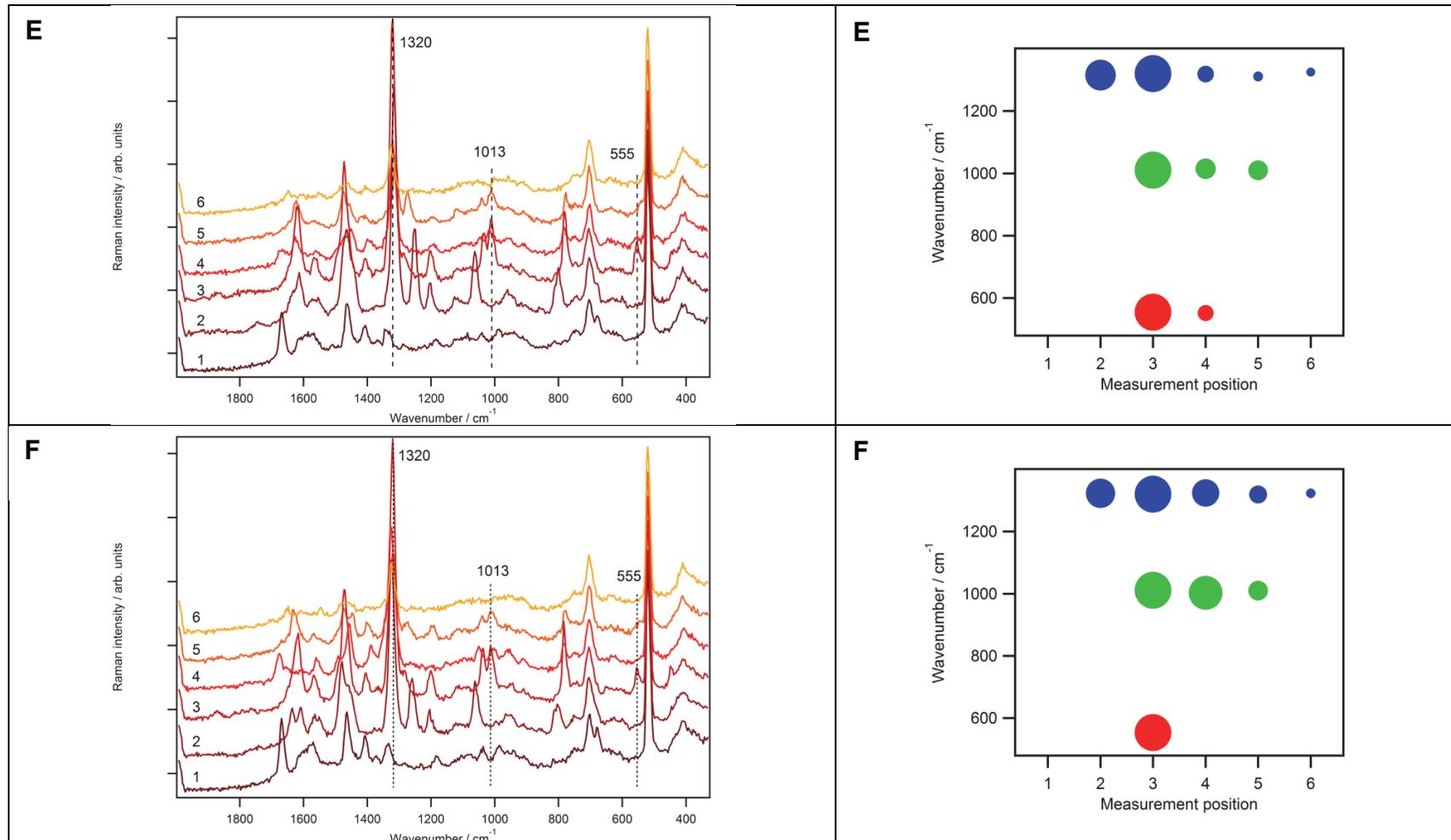


Abbildung 4.1.8: Links: Spektren der Messungen E und F, von unten nach oben mit jeweils 2.5 nm Abstand aufgenommen ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $p = 900 \mu\text{W}$ ,  $t = 5 \text{ sec}$ ). Signifikante Protein-Markerbanden sind markiert. Rechts: Fit-Ergebnisse der Messungen E und F, Bandenposition am jeweiligen Messpunkt, die Größe der Punkte entspricht der Fläche. Blau –  $1320 \text{ cm}^{-1}$ , grün –  $1013 \text{ cm}^{-1}$  und rot –  $555 \text{ cm}^{-1}$

Im linken Teil von Abbildung 4.1.8 sind die TERS-Spektren der Messungen E und F dargestellt. Es ist eine deutliche Ähnlichkeit zu den davor diskutierten Messungen erkennbar. Die hier hervorgehobenen Markerbanden werden zur Auswertung wie zuvor beschrieben angefittet und im rechten Teil von Abbildung 4.1.8 dargestellt. Hier liegt die größte Intensität der Protein-Markerbanden an den Messpositionen 2 bis 4, allerdings wird dieser Verlauf nur durch die Bande bei  $1320\text{ cm}^{-1}$  vollständig nachvollzogen, die übrigen Marker-Banden sind in Spektrum 2 nicht detektierbar. Dieser Unterschied zu den ersten vier diskutierten Messungen kann erneut durch die räumliche Distanz zu diesen erklärt werden, wobei sich jedoch die direkt benachbarten Messreihen E und F sehr ähnlich sind.

Eine Gemeinsamkeit aller betrachteten Messungen liegt in der Intensitätsverteilung der Protein-Markerbanden, deren Maxima jeweils zwei bis drei Messpunkte umfassen. Unter Berücksichtigung der Abstände zwischen den Messpunkten von  $2.5\text{ nm}$  spiegeln diese Ergebnisse die Abmessungen des Streptavidins von  $50\text{ \AA} \times 45\text{ \AA} \times 45\text{ \AA}$  [164, 165] recht genau wider. Durch die eindeutige Unterscheidung Protein- und DNA-dominierter Spektren sind diese Ergebnisse gleichzeitig ein Hinweis auf das erzielbare Auflösungsvermögen von mindestens  $2 - 3\text{ nm}$ . Auf dieses Thema wird im Rahmen weiterer Messungen mit kleinerer Schrittweite an DNA-Einzelsträngen noch gezielter eingegangen. Ein weiteres Merkmal, das in allen Messungen zu finden ist, ist der Übergang von dem ersten bzw. den ersten beiden TERS Spektren mit einem spektralen Erscheinungsbild, das von DNA Banden geprägt ist, zu den folgenden Spektren, die überwiegend Proteinbanden aufweisen. Eine vollständige Zuordnung der Banden ist in Tabelle 4.1.1 gegeben.

Tabelle 4.1.1: Bandenzuordnung der TERS-Spektren der Messungen A bis F

Bandenposition [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung	
	DNA	Protein
520	Silizium (TERS Spitze)	
555	C / T (Ring Def) [61]	Streptavidin (Trp / Val) [153] / Biotin [166]
667	G (Ringatmung (Imidazol)) [154- 156]	Biotin [166]
705	Glimmer (Substrat)	
753	T (Ringatmung) [61, 158, 159, 167]	Streptavidin (Trp) [153, 168]
784	C (Ringatmung / OPO Str) [154- 156]	Biotin [166]
797	C (Ringatmung / OPO Str) [154, 156]	
933	A / G / C (NH <sub>2</sub> rocking) / Deoxyribose) [61, 156, 159]	Streptavidin (Trp / Glu / Asp) [153]
953	A (NH <sub>2</sub> rocking / Deoxyribose) [154, 155]	Streptavidin (Trp / Val) [153]
993	T (C-CH <sub>3</sub> rocking) [154]	
1013		Streptavidin (Trp / Phe / Ala) [153] / Biotin [166]
1036	A / C / G (C-N Str) [56, 154, 156]	Streptavidin (Phe / Ser) [153]
1063	Deoxyribose [155, 156]	
1086	PO <sub>2</sub> - [155]	Streptavidin (Glu / Thr) [153] / Biotin [166]
1102	PO <sub>2</sub> - [155]	
1194	A / G (C-C Str) [154, 156]	Streptavidin (Phe / Tyr / Val) [168]
1204	T (Ring Str) [61, 154, 156]	Biotin [166]

1278	C (C-N Str, Ring Str) [61, 154]	Streptavidin (Amid III) [153] / Biotin [166]
1320	A / G (C-N Str (Imidazol)) [61]	Streptavidin (Ser CH2 Def) [153, 168] / Biotin [166]
1339	A / G (Ringmode) [154, 155, 169]	Streptavidin (Trp) [153]
1375	A / C / G / T (C-N Str (Pyrimidin)) [154, 155]	
1406	A (C-N Str (Pyrimidin)) [61]	Biotin [166]
1454	C (C=N Str) [154-156]	Streptavidin (CH2 Def / CH3 Def) [153]
1473	A (C=N Str) [154-156]	Streptavidin (CH2 Def / CH3 Def) [168]
1545	T (Ring Str) [61]	Streptavidin (Trp) [153] / Biotin [166]
1564	A / C / G / T (Ring Str (Pyrimidin)) [61, 154]	Streptavidin (Amid II) [168]
1610	A / C (NH2 Def) [155, 156]	Streptavidin (Trp / Phe) [153]
1620	A / C (NH2 Def) [157]	
1650	C / T (C=O Str, C=C Str) [56, 154]	
1675	A (NH2 scissoring) [156]	Streptavidin (Amid I) [153]

Def – Deformationsschwingung, Str – Streckschwingung, Bieg – Biegeschwingung, Trp – Tryptophan, Val – Valin, Phe – Phenylalanin, Ser – Serin, Tyr – Tyrosin, Ala – Alanin, Glu – Glutaminsäure, Thr – Threonin, Asp – Asparaginsäure

Anhand dieser Bandenzuordnung soll nun der Übergang zwischen DNA und Protein detailliert betrachtet werden. Da die gezeigten Messungen ähnlich sind, wird hierfür exemplarisch Messung B herangezogen. In Abbildung 4.1.9 sind die TERS Spektren dieser Messung mit vollständiger Bandenbezeichnung dargestellt.

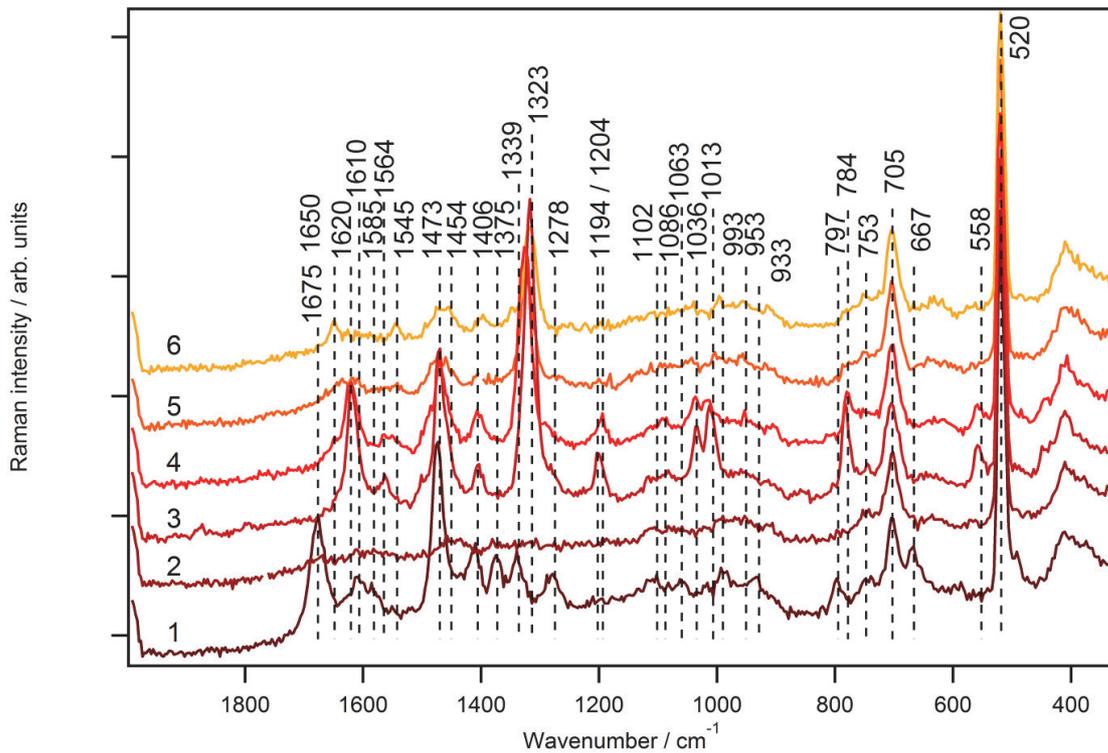


Abbildung 4.1.9: TERS Spektren der Messung B mit vollständiger Bandenbezeichnung

Das erste, in Abbildung 4.1.9 unterste, Spektrum ist von spektralen Beiträgen von DNA dominiert und unterscheidet sich von den darauf folgenden Spektren. Im Bereich der kleineren Wellenzahlen zeigt das erste Spektrum Banden bei  $667\text{ cm}^{-1}$ ,  $753\text{ cm}^{-1}$  und  $797\text{ cm}^{-1}$ . Die Bande bei  $753\text{ cm}^{-1}$  erscheint auch in den anderen Spektren und kann sowohl DNA, also auch Streptavidin zugeordnet werden. Die beiden anderen Banden sind nur in dem ersten Spektrum sichtbar und eindeutig DNA zuzuordnen. In dem dritten und vierten Spektrum überwiegt der spektrale Anteil von Streptavidin, hier sind die Protein-Banden am stärksten. Diese beiden Spektren zeigen Banden bei  $558\text{ cm}^{-1}$  und  $784\text{ cm}^{-1}$ . Die erstere kann eindeutig Streptavidin zugeordnet werden, die zweite kann sowohl von Biotin [166], als auch von DNA stammen. Im weiteren Verlauf zeigt das erste Spektrum eine Bande bei  $933\text{ cm}^{-1}$ , die wiederum Protein und DNA zugeordnet werden kann. Dies gilt auch für die Bande bei  $953\text{ cm}^{-1}$  in den letzten drei Spektren. Wenn auch hier wieder das gesamte spektrale Erscheinungsbild, unterstützt

durch die topographische Information, zu Grunde gelegt wird, kann die Bande bei  $933\text{ cm}^{-1}$  im ersten Spektrum DNA zugeordnet werden, die Bande bei  $953\text{ cm}^{-1}$  in den übrigen Spektren Streptavidin. Eine Bande bei  $993\text{ cm}^{-1}$  erscheint in dem ersten und in dem letzten Spektrum. Sie kann eindeutig DNA zugeordnet werden und flankiert dadurch die durch Protein-Beiträge dominierten mittleren Spektren. Ein markanter spektraler Bereich wird durch die Doppelbande bei  $1013\text{ cm}^{-1}$  und  $1036\text{ cm}^{-1}$  gebildet. Diese ist in den Spektren 3 und 4 am intensivsten. Die Bande bei  $1013\text{ cm}^{-1}$  kann, wie zuvor bereits beschrieben, eindeutig Streptavidin bzw. Biotin zugeordnet werden, die Bande bei  $1036\text{ cm}^{-1}$  kann von Streptavidin oder DNA stammen. Da diese Banden nur in den Protein-dominierten Spektren erscheinen, ist die Zuordnung zu Streptavidin sehr sicher und wird darüber hinaus durch die topographische Information unterstützt. Weiterhin ist diese Doppelbande ein bereits beobachtetes Motiv von Streptavidin-Spektren [153, 170]. Eine weitere DNA-Bande bei  $1063\text{ cm}^{-1}$  erscheint im ersten Spektrum und ist in den anderen nicht sichtbar. Die daneben liegende Bande bei  $1086\text{ cm}^{-1}$  hingegen ist in allen Spektren vertreten und kann allen möglichen Bestandteilen, Streptavidin, Biotin und DNA, zugeordnet werden. Eine Tendenz kann wieder jeweils aus dem Gesamterscheinungsbild der Spektren abgeleitet werden. Nachfolgend zeigt das erste Spektrum eine Bande bei  $1102\text{ cm}^{-1}$ , die der Phosphatgruppe des Rückgrades der DNA zugeordnet werden kann. Das dritte und vierte Spektrum zeigen Banden bei  $1194\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1204\text{ cm}^{-1}$ . Die erstere kann Streptavidin zugeordnet werden [168], die zweite Biotin und DNA. Im weiteren Verlauf zeigt das erste Spektrum eine Bande bei  $1278\text{ cm}^{-1}$ , die in den anderen Spektren nicht vertreten ist. Sie kann Streptavidin, Biotin und DNA zugeordnet werden, aber auch hier legt das spektrale Erscheinungsbild DNA als Ursprung dieser Bande nahe. Im weiteren Verlauf erscheint die schon zuvor beschriebene Bande bei  $1323\text{ cm}^{-1}$ . Sie ist die prominenteste Bande in dieser Messung und kann der CH-Deformationsschwingung von Serin zugeordnet werden [153, 168], aber auch Biotin. Sie dient als eine der Protein-Markerbanden. Auf diese Bande folgt in dem ersten TERS Spektrum ein Signal bei  $1339\text{ cm}^{-1}$ , welches, wie bereits diskutiert, eine typische DNA-Mode ist, und in den nachfolgenden Spektren nicht mehr erscheint. Diese Bande kann zwar auch Streptavidin zugeordnet werden, aber auch hier wird durch das spektrale Erscheinungsbild nahegelegt, daß eine DNA-Mode

vorliegt. Ebenfalls nur im ersten Spektrum sichtbar ist die daneben liegende Bande bei  $1375\text{ cm}^{-1}$ . Sie kann eindeutig DNA zugeordnet werden. Neben dieser liegt eine nicht so eindeutige Bande bei  $1406\text{ cm}^{-1}$ , die in allen Spektren außer dem zweiten erscheint. Ihre Zuordnung ist nicht eindeutig, sie kann eine DNA-Bande sein, aber auch die  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung von Biotin [166]. Die Bande bei  $1454\text{ cm}^{-1}$  erscheint eher als Schulter in den Spektren drei bis sechs. Auch hier ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, es kann eine Streptavidin- oder DNA-Mode vorliegen. Die daneben liegende Bande bei  $1473\text{ cm}^{-1}$  erscheint in allen Spektren außer dem zweiten und ist in den Spektren eins, drei und vier besonders intensiv. Auch diese Mode kann nicht eindeutig einem der Bestandteile der Probe zugeordnet werden. Sie kann eine DNA-Bande sein, aber auch die  $\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Deformationsschwingung von Streptavidin [168]. Die daneben liegende Bande bei  $1545\text{ cm}^{-1}$  erscheint nur in den letzten drei Spektren, davon in den Spektren vier und fünf nur schwach. Auch diese Bande kann nicht eindeutig zugeordnet werden, sie kann von Streptavidin, Biotin und DNA stammen. Die Bande bei  $1564\text{ cm}^{-1}$  erscheint in dem dritten und vierten TERS Spektrum. Sie kann DNA zugeordnet werden, aber auch der Amid II Schwingung von Streptavidin [168]. Dabei wird die Amid I Schwingung nicht beobachtet. Die Amid III Bande kann als Schulter der Mode bei  $1323\text{ cm}^{-1}$  auftreten. Wenn das gesamte spektrale Erscheinungsbild zugrunde gelegt wird, kann die Bande bei  $1564\text{ cm}^{-1}$  dem Protein zugeordnet werden. Diese Annahme wird ebenfalls unterstützt durch ein sehr ähnliches Muster der Protein-Markerbanden, die ebenfalls in diesen beiden Spektren am intensivsten sind. Die daneben liegende Bande bei  $1585\text{ cm}^{-1}$  kann Streptavidin und DNA zugeordnet werden, da sie aber nur im ersten Spektrum erscheint, liegt die Zuordnung als DNA-Mode nahe. Die Bande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  liegt im ersten Spektrum vor, als Schulter im vierten und schwach im fünften. Hier ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, da diese Mode in Spektren von Streptavidin und DNA zu finden ist. Die Spektren drei und vier, die von Protein-Moden dominiert sind, zeigen eine intensive Bande bei  $1620\text{ cm}^{-1}$ . Diese kann Streptavidin und DNA zugeordnet werden, das spektrale Erscheinungsbild legt jedoch eine Zuordnung zu Streptavidin nahe. Im obersten TERS Spektrum ist eine Bande bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  sichtbar, die DNA zugeordnet werden kann und somit einen lateralen Übergang von Protein zu DNA indiziert. Das erste Spektrum zeigt noch eine Bande bei  $1675\text{ cm}^{-1}$ , die

wiederum einerseits der Amid I Schwingung von Streptavidin, andererseits DNA zugeordnet werden kann. Das spektrale Erscheinungsbild unterstützt hier die Zuordnung zu DNA.

Zusammenfassend zeigen diese erstmals auf DNA-Origami durchgeführten TERS-Messungen anhand von Markerbanden, gestützt durch die topographische Information, einen lateralen Übergang von DNA zu Streptavidin und wieder zu DNA. In den gezeigten sechs Messreihen mit jeweils sechs TERS-Spektren sind jeweils die unteren Spektren (1 - 2) von DNA-Banden dominiert, die mittleren beiden, Spektrum 3 und 4, zeigen intensive Protein-Beiträge, und im letzten Spektrum sind wieder DNA-Banden sichtbar. Diese spektralen Ergebnisse werden durch eine Erhöhung in der topographischen Abbildung an den Positionen 3 und 4 unterstützt und bieten gleichzeitig einen Hinweis auf das erreichbare Auflösungsvermögen von TERS (2 - 3 nm). Hierbei stimmen die vertikalen Abstände der Messpositionen der einzelnen Messungen von jeweils 2.5 nm gut mit den Abmessungen des Streptavidins von 50 Å x 45 Å x 45 Å überein. Diese Untersuchungen zeigen somit, daß DNA Origamis ideale Modellsysteme für die Protein-DNA-Unterscheidung mittels TERS darstellen. Dies ist eine grundlegende Voraussetzung für die Analyse von DNA in nativem Umfeld, wie zum Beispiel in Zellschnitten, da sie dort mit Proteinen (Histone) assoziiert ist.

## 4.2. DNA-Konformationsanalyse und Quadruplexbildung

Eine weitere Form der Selbstorganisation von DNA zeigt sich in der Bildung von Quadruplex-Strukturen. Die grundlegende biologische und medizinische Relevanz dieser DNA-Form ist noch nicht vollständig aufgeklärt, dennoch sind Guanin-Tetraden ein vielversprechender Baustein molekularer Nanodrähte (*nanowires*) zur Anwendung in der Nanoelektronik [171, 172]. Raman-Spektroskopie und SERS sind bereits zur Analyse von Quadruplex-Strukturen angewendet worden, z. B. [28-34, 173, 174], geben aber methodenbedingt nur ein über viele Quadruplexe gemitteltes spektrales Bild. Hier eignet sich TERS gut für eine Untersuchung einzelner Guanin-Quadruplex-Stränge.

Die hier verwendeten, freundlicherweise von Christian Leiterer zur Verfügung gestellten, Guanin-Quadruplexe wurden aus enzymatisch hergestellten poly(G)-poly(C)-Molekülen nach deren Separation und anschließender Aufreinigung synthetisiert [175]. Die Auftrennung der DNA-Stränge erfolgt bei einem hohem pH-Wert von 13 und bei nachfolgender langsamer Erniedrigung des pH-Wertes zu pH = 7 falten sich die poly(G)-Einzelstränge zu Guanin-Quadruplex-Strängen. Anschließend werden sie auf Glimmer als Substrat immobilisiert.

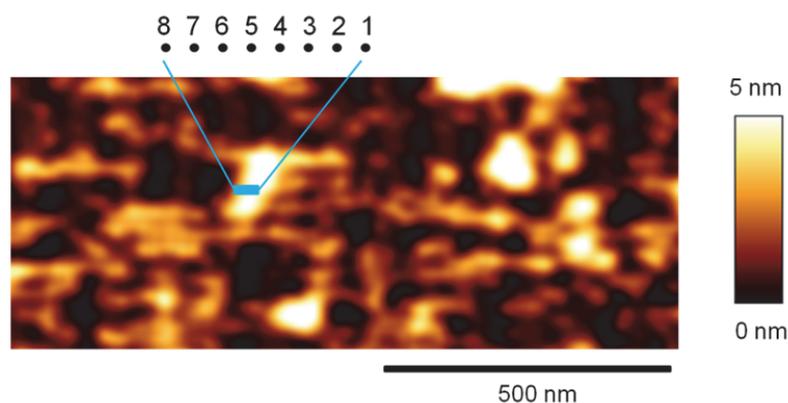


Abbildung 4.2.1: Topographischer AFM-Scan eines Guanin-Quadruplex DNA-Stranges, immobilisiert auf Glimmer, zur besseren Visualisierung geglättet durch einen Tiefpass-Filter (Gauß'scher Weichzeichner). Blau markiert und nummeriert sind die Messpositionen des TERS-Experimentes

Abbildung 4.2.1 zeigt den AFM-Scan eines Guanin-Quadruplex-Stranges. Diese Aufnahme erfolgte bereits mit der TERS-Spitze und aufgrund der nicht optimalen Qualität wurde das Bild geglättet und die Konturen des Stranges mit einem Tiefpass-Filter hervorgehoben. Nachfolgend wird ein TERS-Experiment betrachtet, in dem an den in Abbildung 4.2.1 markierten Positionen acht TERS-Spektren aufgenommen wurden. Diese Spektren sind in Abbildung 4.2.2 dargestellt. Sie wurden jeweils mit einem Abstand von 1.25 nm gemessen. Auch diese Spektren weisen spezifische Markerbanden auf, auf die im Folgenden eingegangen wird.

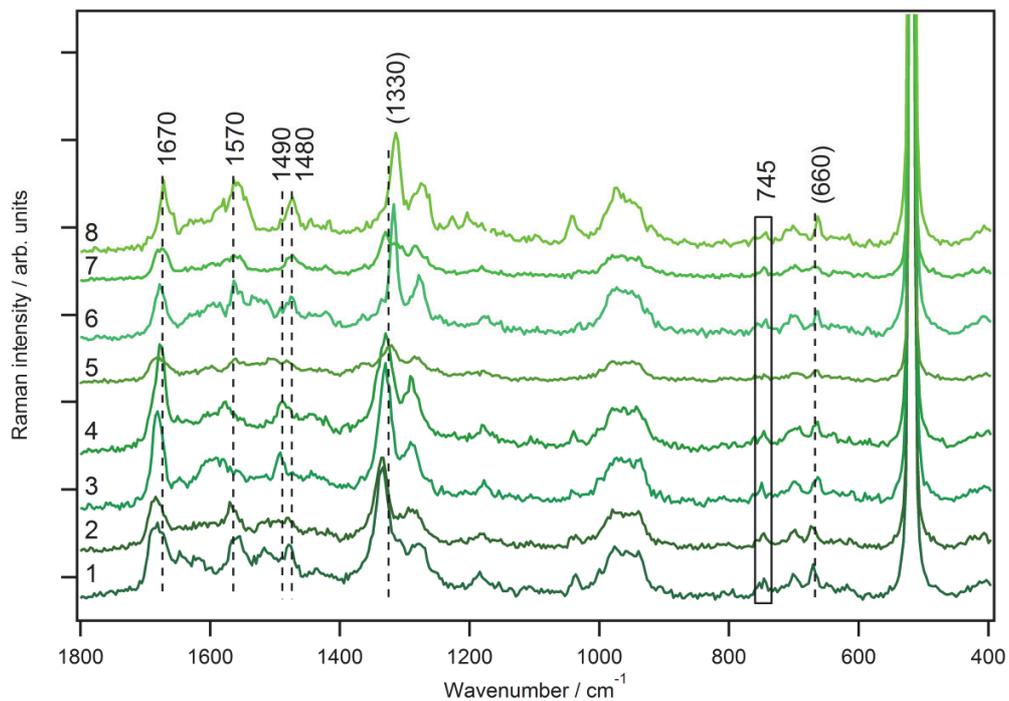


Abbildung 4.2.2: TERS-Spektren von dem Quadruplex-Strang, aufgenommen wie in Abbildung 4.2.1 skizziert ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $p = 740 \text{ }\mu\text{W}$ ,  $t = 5 \text{ sec}$ ). Signifikante Marker-Banden sind gekennzeichnet

Guanin Quadruplexe sind bereits intensiv mittels Raman-Spektroskopie und SERS untersucht worden. Hierbei stehen Banden im Mittelpunkt, mit Hilfe derer Aussagen über die Bildung von Quadruplexen und deren Konformation getroffen werden können.

Die beobachteten Markerbanden bieten Anhaltspunkte für die Auswertung der TERS-Messungen auf einem einzelnen Quadruplex-Strang. Die in Abbildung 4.2.2 bezeichneten Banden sind in Tabelle 4.2.1 zugeordnet. Hierbei wird teilweise differenziert zwischen Banden, die jeweils typisch sind für Guanin-Quadruplexe oder Guanin, welches sich nicht in einer Quadruplex-Anordnung befindet.

Tabelle 4.2.1: Bandenzuordnung von Guanin-Quadruplex- und Guanin-Banden

Bandenposition [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung
660	Guanin Ringatmung
~1330	Guanin Ringmode
~1480 (Quadruplex)	C8=N7 Streckschwingung (Starke Wasserstoffbrückenbindung (Quadruplex-Bildung))
~1490	(Schwache Wasserstoffbrückenbindung (Verlust der Quadruplex-Struktur))
1570	Pyrimidin Ringstreckschwingung
1670 (Quadruplex)	C6=O (Starke Wasserstoffbrückenbindung (Quadruplex-Bildung))
1690 (Raman)	(Schwache Wasserstoffbrückenbindung (Verlust der Quadruplex-Struktur))
1640 (SERS)	

Wie bereits beschrieben und in Abbildung 4.2.3 gezeigt werden die Guanin-Moleküle in den Tetraden durch Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. In dieser Abbildung sind ebenfalls charakteristische Schwingungsfrequenzen markiert. Diese geben insbesondere indirekt Auskunft über die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen, die die Guanin-Moleküle als Tetraden und zusammenhalten. Die Quadruplex-Bildungs-Markerbande liegt bei 1480 cm<sup>-1</sup>. Hier sind die Wasserstoffbrückenbindungen stark und folglich kommt es zu einer Verringerung der Elektronendichte zwischen C8 und N7.

Dies verursacht die Rotverschiebung der C=N Streckschwingung und zeigt an, daß eine Quadruplex-Struktur ausgebildet ist. Eine Verschiebung dieser Bande hin zu  $1490\text{ cm}^{-1}$  bedeutet somit eine Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung und damit den Verlust der Quadruplex-Struktur und gibt also Auskunft über das Vorhandensein von Quadruplexen. Ein analoger Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und der Rotverschiebung der beeinflussten Raman-Mode durch Elektronendichteverringering gilt auch für eine weitere Markerbande bei  $1670\text{ cm}^{-1}$  (Quadruplex), bzw.  $1690\text{ cm}^{-1}$  (kein Quadruplex).

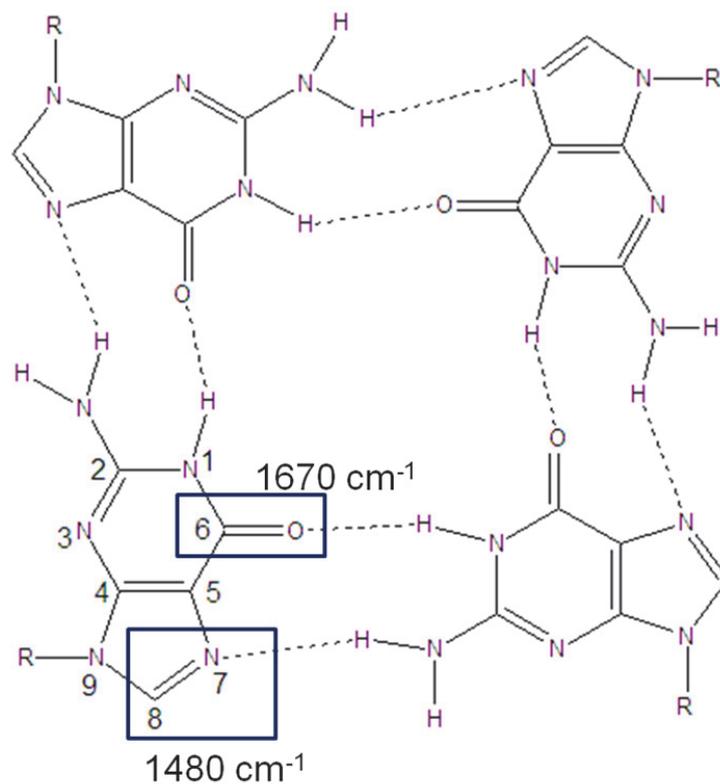


Abbildung 4.2.3: Über Hoogsteen-Wasserstoffbindungen gebildete Guanin-Tetrade mit charakteristischen Schwingungsfrequenzen

In den in Abbildung 4.2.2 gezeigten TERS Spektren ist die Bande bei  $1480\text{ cm}^{-1}$  gut erkennbar. In dem dritten und vierten Spektrum ist sie jeweils nach  $1490\text{ cm}^{-1}$

verschoben. Da die Bande bei  $1480\text{ cm}^{-1}$  wie in Abbildung 4.2.3 angedeutet der Streckschwingung der C8=N7 Bindung der Guanin Tetrade zugeordnet werden kann, dient sie im Folgenden als Markerbande für die Quadruplex-Struktur [28, 29, 33]. Auch weitere Banden der TERS Spektren in Abbildung 4.2.2 sind typisch für Guanin Quadruplexe, sie sind ebenfalls in Tabelle 4.2.1 zugeordnet. Hierzu gehört auch die Carbonyl-Schwingung C6=O. Sie liegt bei Quadruplex-Strukturen bei  $1670\text{ cm}^{-1}$  [28, 29] und wird für Guanin bei  $1690\text{ cm}^{-1}$  (Raman [156, 176] / SERS [155]) bzw.  $1640\text{ cm}^{-1}$  (SERS [156] / TERS [61]) angegeben. Andere Moden, wie zum Beispiel die Ringatmung bei  $660\text{ cm}^{-1}$  und die Ringmode bei  $\sim 1330\text{ cm}^{-1}$ , erlauben hier keine Differenzierung bezüglich der Quadruplex-Bildung und sind damit bei beiden Strukturen gleich.

Die in Abbildung 4.2.2 gezeigten TERS Spektren von Guanin Quadruplex DNA weisen neben der Quadruplex-Bildungs-Markerbande bei  $1480\text{ cm}^{-1}$  eine weitere Besonderheit auf, die mit einem Kasten markierte Bande bei  $745\text{ cm}^{-1}$ . Sie stellt eine der Banden dar, die Aufschluss über die Konformation der Quadruplex DNA geben. In Tabelle 4.2.2 sind die Quadruplex DNA Konformations-Markerbanden zusammengefasst.

Tabelle 4.2.2: Quadruplex DNA Konformations-Markerbanden [28]

Bandenposition [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Zuordnung Konformation
745	Z-Konformation (O-P-O)
807	A-Konformation (O-P-O)
835	B-Konformation (O-P-O)
1092	B-Konformation ( $\text{PO}_2^-$ )
1095	Z-Konformation ( $\text{PO}_2^-$ )
1099	A-Konformation ( $\text{PO}_2^-$ )

Alle Konformations-Markerbanden sind Moden des Phosphat-Rückgrates der DNA. Diese Moden sind durch die jeweilige Konformation der DNA am meisten betroffen,

denn diese beeinflusst die Form des Phosphat-Rückgrates in der entsprechenden Helix. Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben ist die A-Form der DNA breiter und kürzer als die B-Form, beide jedoch rechtshändig, die Z-DNA bildet hingegen eine linkshändige Helix mit Zickzack-förmigem Verlauf des Phosphatrückgrates. Also kennzeichnen die DNA Phosphat-Markerbanden (Phosphodiester O-P-O und Phosphat  $\text{PO}_2^-$ ) die lokale Geometrie des DNA Stranges. Allerdings ist, wie in Tabelle 4.2.2 erkennbar, der Unterschied in der Frequenz der jeweiligen Konformationen für die Phosphodiester-Mode signifikanter als für die Phosphat-Mode, insbesondere wenn die für TERS zu erwartenden nanoskaligen Effekte, die eine Bandenverschiebung verursachen können, in Betracht gezogen werden [118].

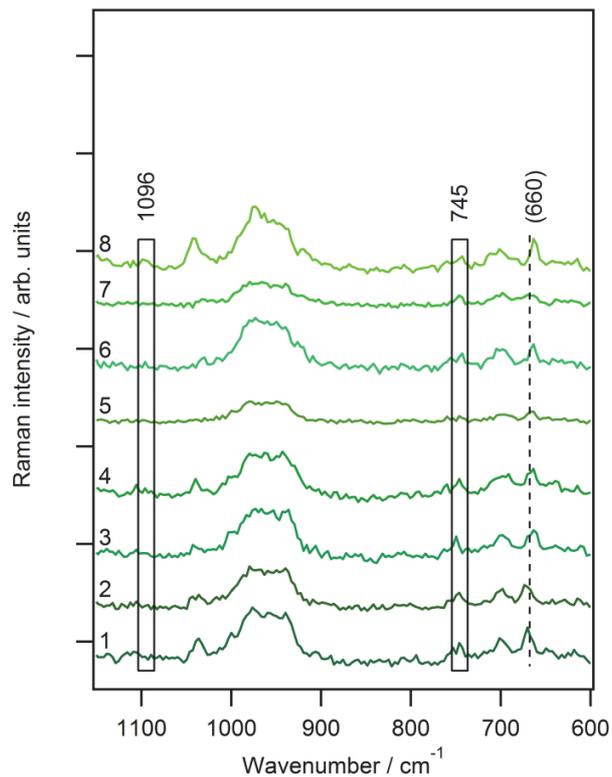


Abbildung 4.2.4: Vergrößerung des für Konformations-Markerbanden interessanten Bereiches der TERS-Spektren von dem Quadruplex-Strang, aufgenommen wie in Abbildung 4.2.1 skizziert. Konformations-Markerbanden sind gekennzeichnet

In Abbildung 4.2.4 ist der Wellenzahlbereich der Konformations-Markerbanden vergrößert dargestellt. Die Phosphodiester-Mode der Z-Konformation ist bei  $745\text{ cm}^{-1}$  gut erkennbar, Banden der Phosphat-Mode sind nur teilweise schwach sichtbar, zum Beispiel in dem zweiten, vierten und sechsten Spektrum. Diese Banden der Phosphat-Schwingung liegen bei  $1096\text{ cm}^{-1}$ , was ebenfalls auf die Z-Konformation hindeutet, aber, wie schon beschrieben, stellen sie keine signifikanten Banden zur Identifizierung bestimmter Konformationen mittels TERS dar, dienen also eher zur Unterstützung der Phosphodiester-Banden.

Die Detektion dieser Konformations-Markerbanden auf einem einzelnen DNA-Quadruplex-Strang zeigen die Anwendbarkeit der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie für die Konformationsanalyse zur hoch-ortsaufgelösten Bestimmung der lokalen Geometrie von DNA.

In dem nächsten Experiment soll mittels TERS anhand der Marker-Banden die Bildung einer Quadruplex-Struktur untersucht werden. Hierzu wird ein synthetischer DNA-Strang aus  $(A_{10}G_{10})_4$  verwendet, in dem sich die Guanin-Moleküle als Quadruplexe organisieren können. Zur Immobilisierung wurde  $1\text{ }\mu\text{L}$  in Wasser gelöster DNA ( $10^{-5}\text{ M}$ ) auf frisch gespaltenes Glimmer getropft und an dem schräg gestellten Substrat herunterlaufen lassen. Dieses wurde dann 10 Minuten unter Argon-Atmosphäre inkubiert, zwei Mal mit jeweils  $50\text{ }\mu\text{L}$  VE-Wasser gewaschen und anschließend unter Argon getrocknet.

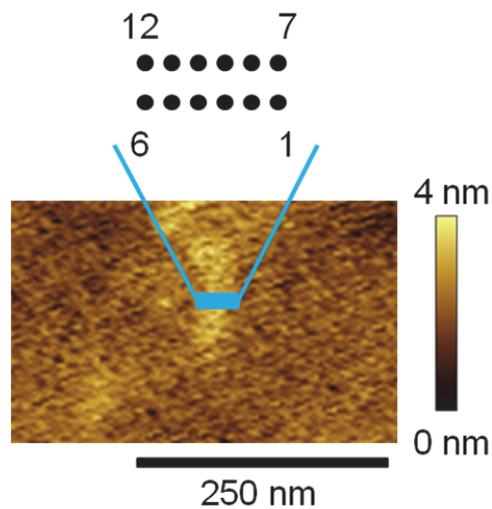


Abbildung 4.2.5: Topographischer AFM-Scan eines DNA-Stranges aus alternierenden Adenin- und Guanin-Blöcken, immobilisiert auf Glimmer. Die Positionen für die TERS-Messungen sind gekennzeichnet

In Abbildung 4.2.5 ist ein AFM-Scan des synthetischen DNA-Stranges aus  $(A_{10}G_{10})_4$  gezeigt. Ebenfalls sind in dieser Abbildung die Messpositionen des TERS-Experimentes skizziert. Hierbei werden punktweise jeweils sechs Spektren an den gekennzeichneten Positionen senkrecht zur Strangachse aufgenommen. Der Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten beträgt 5 nm, der zwischen den beiden Messreihen 12 nm.

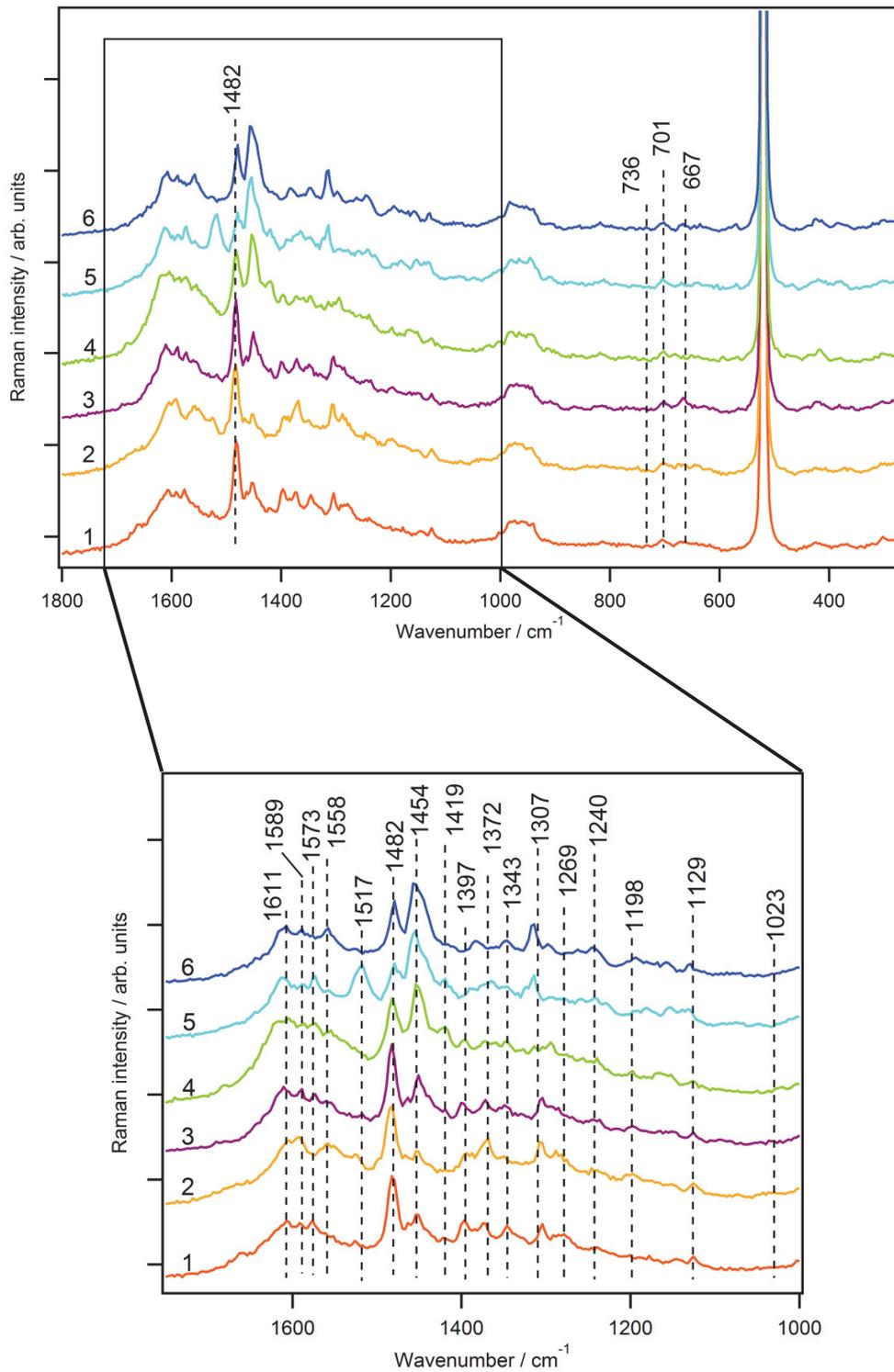


Abbildung 4.2.6: TERS-Spektren der Punkte 1 bis 6, wie in Abbildung 4.2.5 skizziert, mit vollständiger Bandenbezeichnung ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $p = 980 \text{ }\mu\text{W}$ ,  $t = 10 \text{ sec}$ ). Der Abstand zwischen den einzelnen Spektren beträgt 5 nm

In Abbildung 4.2.6 sind die TERS-Spektren 1 bis 6 der ersten Messreihe mit vollständiger Bandenbezeichnung dargestellt, entsprechend der Skizzierung in Abbildung 4.2.5. Die für die Betrachtung des Guanins, bzw. der Guanin-Quadruplex-Bildung, relevante Bande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$  ist zu besseren Übersicht im oberen Teil der Abbildung 4.2.6 separat markiert. Der Wellenzahlbereich von  $1000\text{ cm}^{-1}$  bis  $1750\text{ cm}^{-1}$  ist im unteren Teil vergrößert gezeigt. Die dazugehörige Bandenzuordnung ist in Tabelle 4.2.3 beschrieben. Die Abstände zwischen den einzelnen Spektren betragen jeweils  $5\text{ nm}$ . Bei  $667\text{ cm}^{-1}$  ist zunächst als kleine Bande die Ringatmungsschwingung des Guanins zu sehen. Ein schwacher spektraler Beitrag kommt ebenfalls von der Ringatmungsschwingung des Adenins bei  $736\text{ cm}^{-1}$ , allerdings nur in den Spektren 3 und 4. Die darauf folgenden Banden bei  $1023\text{ cm}^{-1}$ ,  $1129\text{ cm}^{-1}$ ,  $1198\text{ cm}^{-1}$ ,  $1240\text{ cm}^{-1}$  und  $1269\text{ cm}^{-1}$  sind Guanin und Adenin zuordnebar und erlauben somit keine spektrale Differenzierung zwischen diesen beiden DNA Komponenten. Die nächste Bande liegt bei  $1307\text{ cm}^{-1}$  und wird Adenin zugeordnet. Sie bleibt in allen Spektren, die in Abbildung 4.2.6 gezeigt sind, bezüglich ihrer Lage und Intensität relativ konstant. Die daneben liegenden Banden bei  $1343\text{ cm}^{-1}$  und  $1372\text{ cm}^{-1}$  sind wiederum beiden DNA-Basen zuzuordnen und dienen somit nicht zu deren Unterscheidung. Die Bande daneben bei  $1397\text{ cm}^{-1}$  jedoch ist eindeutig Adenin zuzuordnen. Ähnlich zu der bereits beschriebenen Adenin-Mode bei  $1307\text{ cm}^{-1}$  ändert sich ihre Lage und Intensität im Verlauf der Messreihe kaum. Die beiden nachfolgenden Banden liegen bei  $1419\text{ cm}^{-1}$  und  $1454\text{ cm}^{-1}$  und sind wieder Guanin und Adenin zuzuordnen. Die nächste Bande ist die bereits beschriebene Guanin-Quadruplex Markerbande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$ . Sie ist in allen Spektren der Messreihe erkennbar und variiert zwar leicht in ihrer Intensität, bleibt aber bezüglich ihrer Position nahezu konstant. Die nachfolgenden Banden bei  $1517\text{ cm}^{-1}$ ,  $1558\text{ cm}^{-1}$  und  $1573\text{ cm}^{-1}$  sind sowohl Guanin als auch Adenin zuordnebar, ebenso wie die Bande bei  $1611\text{ cm}^{-1}$ . Die Bande bei  $1589\text{ cm}^{-1}$  ist nur Adenin zuzuordnen, liefert aber nur einen schwachen spektralen Beitrag.

Tabelle 4.2.3: Bandenzuordnung der TERS Spektren der (A<sub>10</sub>G<sub>10</sub>)<sub>4</sub> DNA

Bandenposition [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung	
	Guanin	Adenin
520	Silizium (TERS Spitze)	
667	Ringatmung (Imidazol) [154-156]	
701	Glimmer (Substrat)	
736		Ringatmung [56, 61, 154-156]
1023	C-N Str [31, 33, 156]	C-N Str, NH <sub>2</sub> rocking [56, 61, 154, 159, 169]
1129	Guanin [56]	C-N Str, N-H Def, C-H Def [61, 154, 159]
1198	Guanin [56]	C-N Str [154, 158]
1240	C-N Str [61]	C-N Str [56, 57, 155]
1269	C-N Str [156]	C-N Str, C-H Bieg [154, 169]
1307		Adenin [61, 154, 155, 158, 177]
1343	C-N Str [56, 154-157]	C-N Str [58, 154-156, 158]
1372	C-N Str [31, 33, 61]	C-N Str [61, 154-156, 158, 159]
1397		C-N Str [56, 61, 154, 169]
1419	C-N Str [155]	C-C Str [61, 154, 155, 158, 159]
1454	C-N Str [154]	C-N Str, C-H Bieg [56, 154]
1482	C=N Str [28, 33]	
1517	C=N Str [154]	C=N Str [154, 155]
1558	Ring Str (Pyrimidin) [61]	Ring Str (Pyrimidin) [57, 61, 156]
1573	Ring Str (Pyrimidin) [24, 33, 154, 156, 157]	Ring Str (Pyrimidin) [61]
1589		NH <sub>2</sub> Def [61, 154, 158, 159]
1611	N-H in plane Bieg [24, 33, 154, 155]	Ring Str, N-H Def [58, 155, 159]

Def – Deformationsschwingung, Str – Streckschwingung, Bieg – Biegeschwingung

Wie bereits beschrieben sind die meisten Banden in der ersten Messreihe sowohl Guanin als auch Adenin zuordnebar und erlauben somit keine spektrale Differenzierung der beiden DNA-Basen. Andere Banden sind wiederum eindeutig einer der beiden Komponenten zuzuordnen. Die Ringatmungsschwingung zum Beispiel ist für die jeweilige Base charakteristisch, in den hier betrachteten TERS-Spektren aber nicht dominant. Adenin-Banden sind bei  $1307\text{ cm}^{-1}$  und  $1397\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. In dieser Messreihe zeigen sie kaum Veränderungen in ihrer Lage und Intensität. Die für die Betrachtung des Guanins, bzw. der Guanin-Quadruplexe, relevante Bande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$  ist zur besseren Übersicht in den Spektren der ersten Messreihe im oberen Teil der Abbildung 4.2.6 separat markiert.

Die Quadruplex-Markerbande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$  verhält sich ähnlich zu den bereits beschriebenen Adenin-Banden, sie variiert leicht in ihrer Intensität, aber ihre Position bleibt nahezu konstant. Dies zeigen auch die Ergebnisse in Abbildung 4.2.7. Hier wurde diese Bande mit einer Lorentz-Funktion angefitet und die jeweilige Messposition gegen die Wellenzahl aufgetragen, wobei die Größe des Punktes in der Grafik der Fläche entspricht.

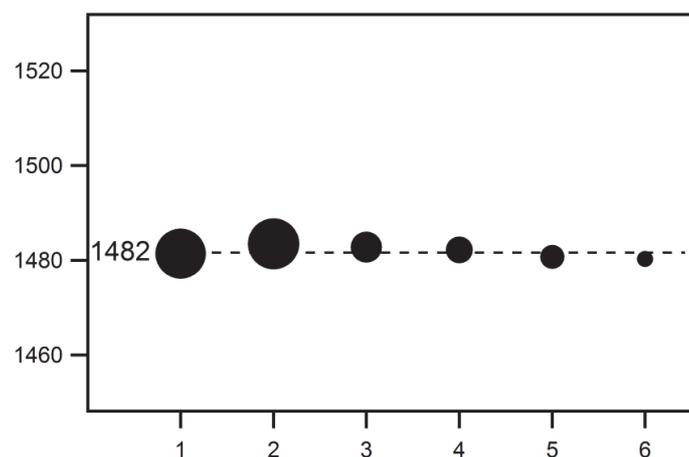


Abbildung 4.2.7: Fit-Ergebnisse der Bande um  $1482\text{ cm}^{-1}$  der Spektren 1 bis 6

Die Ergebnisse dieser TERS-Messung legen nahe, daß sich an dieser Stelle des DNA-Stranges eine stabile Quadruplex-Struktur mit starken Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet hat.

In Abbildung 4.2.8 sind die TERS-Spektren der zweiten Messreihe von 7 bis 12 dargestellt. Auch hier betragen die Abstände zwischen den einzelnen Messpositionen 5 nm. In diesen Spektren ist ebenfalls die Quadruplex-Markerbande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$  markiert, ebenso wie die Bande bei  $1492\text{ cm}^{-1}$ , die schwache Wasserstoffbrückenbindungen und damit den Verlust der Quadruplex-Struktur indiziert. Der Verlauf der Quadruplex-Markerbande unterscheidet sich deutlich von dem in den Spektren der ersten Messreihe.

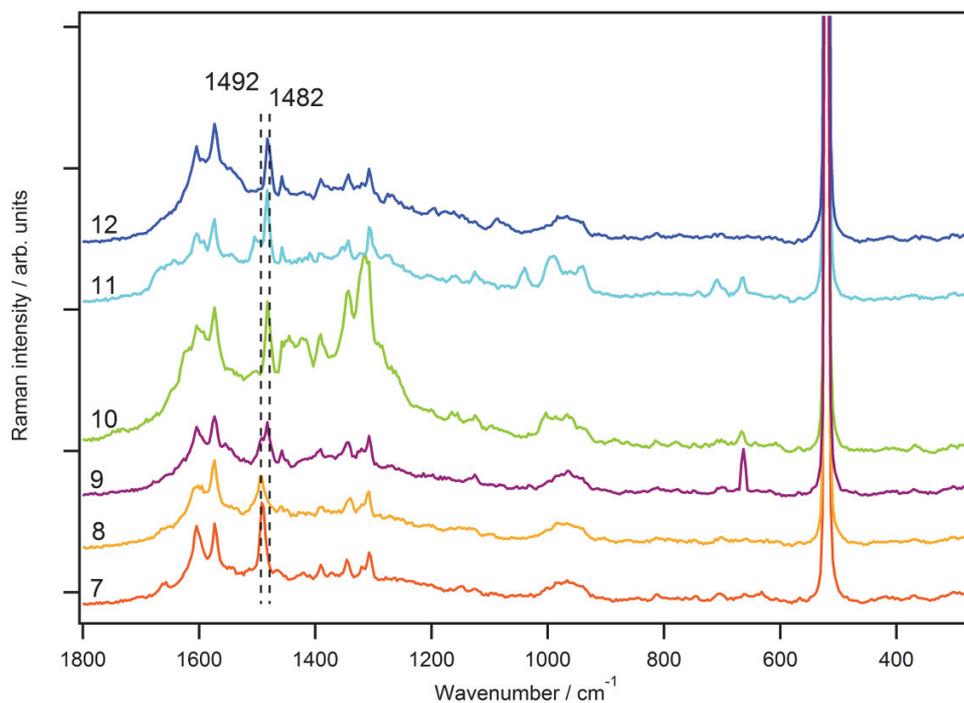


Abbildung 4.2.8: TERS-Spektren der Punkte 7 bis 12, wie in Abbildung 4.2.5 skizziert ( $\lambda = 530\text{ nm}$ ,  $p = 980\text{ }\mu\text{W}$ ,  $t = 10\text{ sec}$ ). Der Abstand zwischen den einzelnen Spektren beträgt 5 nm. Die Quadruplex-Markerbande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$  ist markiert, ebenso wie die Markerbande für den Verlust der Quadruplex-Struktur, bei  $1492\text{ cm}^{-1}$

Eine Tendenz des Auftretens der Markerbanden ist bereits in den Spektren in Abbildung 4.2.8 erkennbar. Die ersten zwei Spektren zeigen eine Lage der Markerbande bei  $1492\text{ cm}^{-1}$ , die im Spektrum 9 eine Schulter der Markerbande um  $1482\text{ cm}^{-1}$  wird und in den darauf folgenden Spektren ist nur die Bande um  $1482\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. Um den Verlauf der beiden Markerbanden zu verdeutlichen werden diese wieder angefittet und die Ergebnisse in Abbildung 4.2.9 dargestellt.

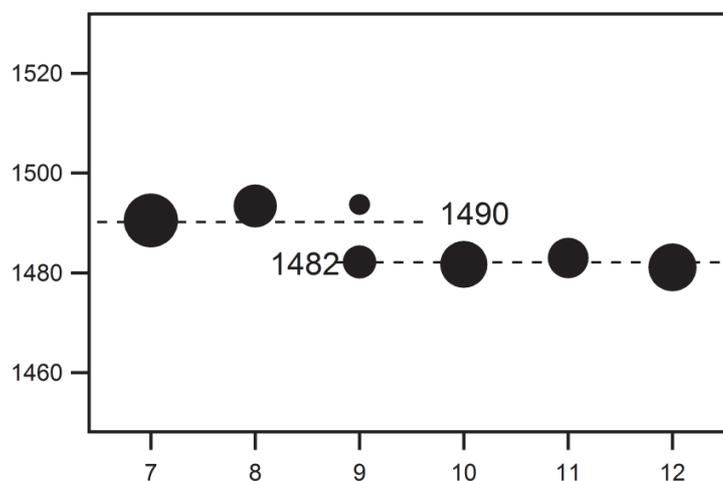


Abbildung 4.2.9: Fit-Ergebnisse der Banden um  $1490\text{ cm}^{-1}$  und  $1482\text{ cm}^{-1}$  der Spektren 7 bis 12

Die Beobachtungen aus den Spektren in Abbildung 4.2.8 bestätigen sich in den Fit-Ergebnissen, die in Abbildung 4.2.9 gezeigt sind. In den ersten zwei Spektren bleibt die Position der Quadruplex Markerbande um  $1490\text{ cm}^{-1}$  nahezu konstant und zeigt hiermit schwache Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guanin-Molekülen und keine Quadruplex-Bildung an. In Spektrum 9 beginnt der Übergang zu einer Quadruplex-Struktur. Hier ist die Bande bei  $1492\text{ cm}^{-1}$  nur noch eine Schulter der Quadruplex-Markerbande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$ , welche starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guaninen und damit die Bildung von Quadruplexen anzeigt. In den nachfolgenden TERS-Spektren ist nur noch die Quadruplex-Markerbande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$  sichtbar, aus der geschlossen werden kann, daß hier stabile Quadruplex-Strukturen vorliegen.

In einem DNA Einzelstrang kann von einem Basenabstand von 0.4 nm [49, 178] ausgegangen werden. Also beträgt die Länge des Blockes aus den zehn Adeninen 4 nm. Der Block aus den zehn Guaninen kann zwei Quadruplexe bilden, wobei zwei nicht hieran beteiligt sind. Für DNA Quadruplexe kann ein Basenabstand von jeweils 0.33 nm [65] angenommen werden, für die einzelnen Guanine wiederum 0.4 nm. Also beträgt die Länge aus einem Adenin- und einem Guanin-Block, bestehend aus zehn Adeninen, zwei Guanin-Quadruplexen und zwei Guaninen, 5.46 nm.

In Abbildung 4.2.10 ist die Struktur des DNA-Stranges aus alternierenden  $A_{10}G_{10}$ -Blöcken unter Berücksichtigung der Bildung von Guanin Quadruplex-Strukturen im Rahmen des TERS-Experimentes schematisch dargestellt. Die erste Messreihe zeigt in allen Spektren die Quadruplex-Markerbande bei  $1482\text{ cm}^{-1}$ . Es liegt also nahe, daß sich diese Messpunkte in einem Quadruplex-Block befinden. In der zweiten Messreihe ist der Übergang zur Quadruplex-Struktur erkennbar, auch dies ist entsprechend in Abbildung 4.2.10 skizziert.

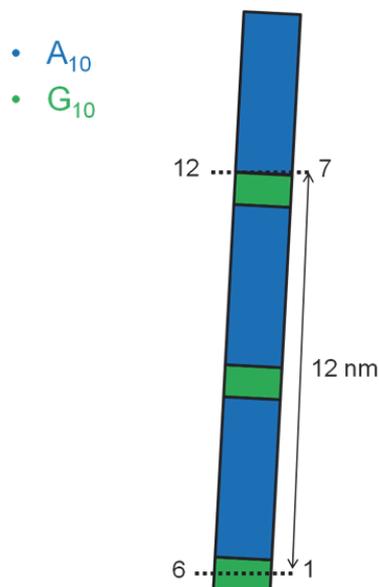


Abbildung 4.2.10: Schematische Darstellung der alternierenden Adenin- und Guanin-Blöcke des DNA-Stranges unter Berücksichtigung der Bildung von Guanin Quadruplex-Strukturen. Die Messreihen des TERS-Experimentes sind ebenfalls skizziert

Der Abstand zwischen den beiden Messreihen beträgt 12 nm. Werden die bereits beschriebenen Größenverhältnisse der beteiligten DNA-Komponenten berücksichtigt, beträgt die Länge eines DNA-Fragmentes aus jeweils zwei Adenin- und Guanin-Blöcken 10.92 nm. Da noch ein Teil eines weiteren Guanin-Blockes zwischen den Messreihen mit umfasst wird, beschreibt die schematische Darstellung in Abbildung 4.2.10 sehr gut die Ergebnisse des TERS-Experimentes. Die beiden Messreihen umfassen jeweils einen Bereich von 25 nm. Dies ist größer als in vorangegangenen Messungen beobachtet [61] und kann einerseits darin begründet sein, daß die Messung nicht senkrecht zum DNA-Strang verlief, andererseits kann eine in Folge der Beanspruchung durch die Messung abgeflachte Spitzen-Geometrie dafür verantwortlich sein.

Zusammenfassend zeigen diese Messungen die Anwendbarkeit der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie für die Konformationsanalyse zur hoch-ortsaufgelösten Bestimmung der lokalen Geometrie von einzelnen DNA-Strängen durch die Detektion spezifischer Konformations-Markerbanden. Weiterhin ermöglicht diese Methode, ebenfalls durch die Detektion von Markerbanden, die Bestimmung und Lokalisierung bestimmter Formen von DNA, wie Quadruplex-Strukturen. In dem hier beschriebenen TERS-Experiment wird die Ausbildung einer Quadruplex-Struktur innerhalb von 10 nm gezeigt. Die Auflösung ist dabei durch die gewählte Schrittweite der Messpunkte von 5 nm bestimmt. Es ist jedoch davon auszugehen, daß durch eine entsprechend kleinere Schrittweite in einer Messung entlang der Strangachse eine bessere Auflösung erzielt werden kann.

### 4.3. DNA- Basen-Unterscheidung

Nicht nur die Konformationsanalyse, sondern insbesondere auch die Bestimmung der DNA-Sequenz ist ein wichtiges Thema in verschiedensten Forschungsgebieten [1]. Die aktuelle Methodenentwicklung zeigt einen Trend hin zur Einzelmolekül-Sequenzierung, wobei allerdings die meisten dieser Sequenzierungs-Methoden eine Art von *Labelling* benötigen [1]. Die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie bietet die Möglichkeit einer direkten und labelfreien Sequenzierungstechnik. Voraussetzungen hierfür sind die Kombination der spektralen Informationen mit hoher lateraler Auflösung, sowie Reproduzierbarkeit, Stabilität und die spektrale Unterscheidbarkeit der einzelnen DNA Basen anhand ihrer spezifischen Markerbanden.

SERS-Experimente zeigen, daß der Raman Streuquerschnitt der vier Nukleobasen große Unterschiede aufweist. Wenn sie in äquimolarer Menge vorliegen verhalten sich die Intensitäten der Ringatmungsmoden wie folgt: Adenin > Cytosin >> Guanin > Thymin [157]. In einer vergleichenden SERS-Messung zweier DNA-Moleküle mit unterschiedlichem Adenin-Gehalt (15.5 % und 44.3 %) wurde eine Dominanz der Adenin-Beiträge gezeigt [179]. Aus diesem Grund wurde angenommen, daß auch in TERS-Experimenten auf nativer DNA nur Signale des Adenins detektiert werden [180].

Im Folgenden soll an einem Kalbsthymus-DNA Einzelstrang, der alle vier Nukleotide enthält, gezeigt werden, daß es möglich ist, auf einem einzelnen DNA-Strang anhand von Markerbanden spektrale Beiträge aller Basen zuzuordnen und zu differenzieren, obwohl sich ihre Raman Streuquerschnitte deutlich unterscheiden.

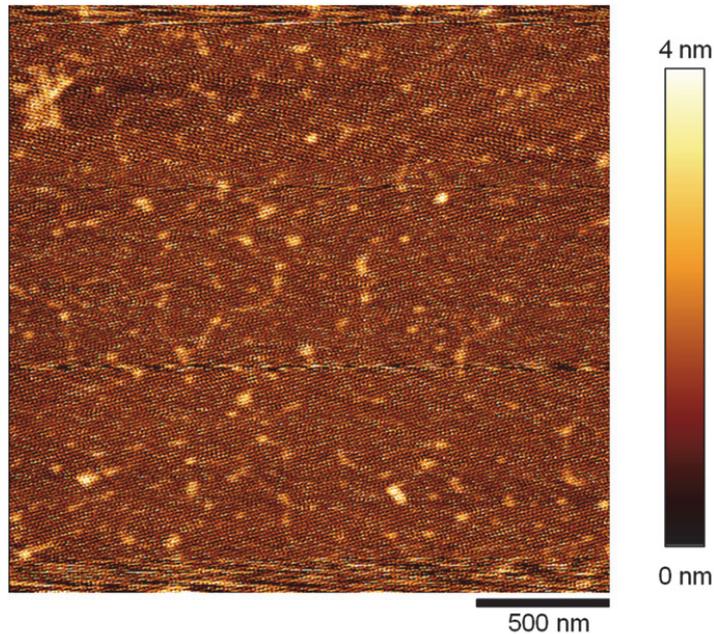


Abbildung 4.3.1: Topographischer AFM-Scan von Kalbsthymus-DNA Einzelsträngen, immobilisiert auf Glimmer

In Abbildung 4.3.1 ist ein topographischer AFM-Scan von Kalbsthymus-DNA Einzelsträngen gezeigt, die auf Glimmer immobilisiert wurden. Die Immobilisierungsprozedur ist analog zu der für die  $(A_{10}G_{10})_4$ -DNA beschriebene. Auch in diesem Fall wurde 1  $\mu$ L in Wasser gelöster DNA ( $10^{-5}$  M) auf Glimmer getropft, unter Argon inkubiert, mit VE-Wasser gewaschen und unter Argon getrocknet. Auf diesen DNA-Strängen wurden 26 TERS-Spektren aufgenommen, von denen vier repräsentative in Abbildung 4.3.2 dargestellt sind. In diesen Spektren zeigen sich spektrale Beiträge aller vier Nukleobasen und sind entsprechend farblich hervorgehoben. Grüne Balken markieren Adenin-Banden, violette Guanin, gelbe Cytosin und rote Thymin. Eine vollständige Bezeichnung der Banden in den Spektren ist ebenfalls eingefügt, die Zuordnung erfolgt in Tabelle 4.3.1. Die vier TERS-Spektren unterscheiden sich deutlich voneinander. Dies ist eine Folge der unterschiedlichen Basenzusammensetzung in dem Bereich unter der TERS-Spitze.

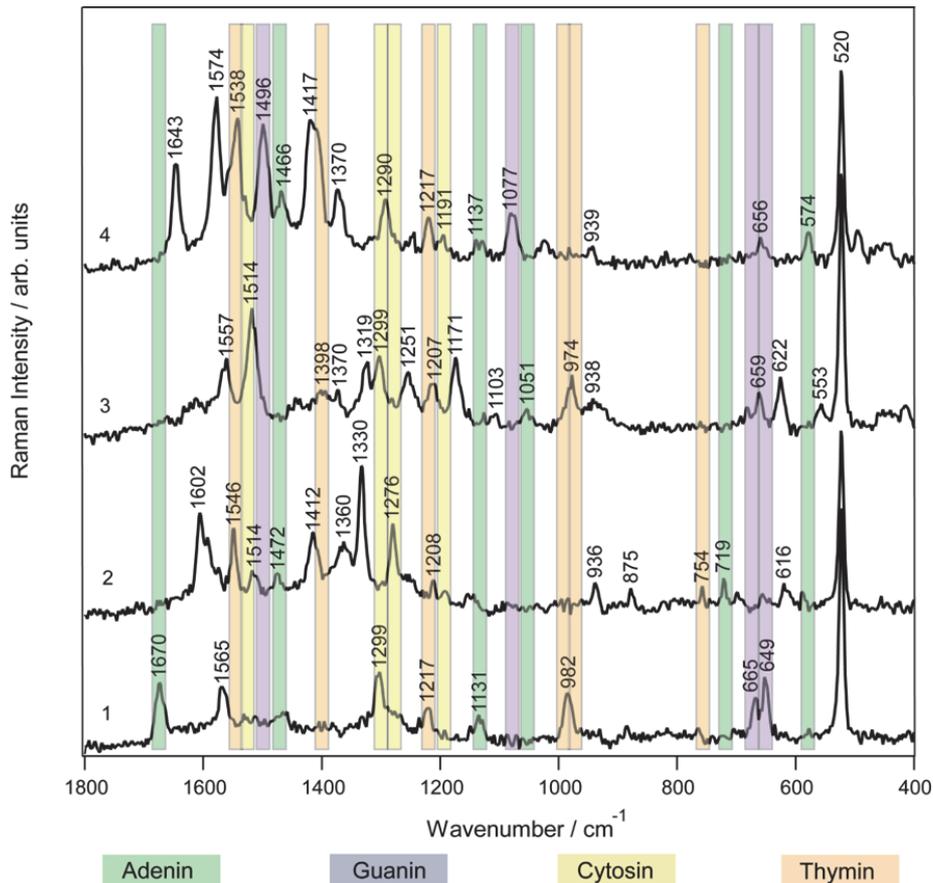


Abbildung 4.3.2: TERS-Spektren der Kalbsthymus-DNA Stränge ( $\lambda = 568 \text{ nm}$ ,  $p = 1 \text{ mW}$ ,  $t = 10 \text{ sec}$ ). Markerbanden der jeweiligen Nucleobasen sind markiert, Adenin grün, Guanin violett, Cytosin gelb, Thymin rot (Abbildung variiert nach [61])

Die Kalbsthymus-DNA ist unspezifisch über das Phosphat-Rückgrat auf dem Glimmer immobilisiert, es können jedoch aus dem spektralen Erscheinungsbild Rückschlüsse auf die jeweilige Art der Anbindung gezogen werden. Von den aufgenommenen 26 Spektren zeigen fünf Ringatmungs-Moden der Nucleobasen, aber keine spektralen Beiträge des Phosphates oder Ribose. An diesen Stellen kann davon ausgegangen werden, daß die DNA über das Phosphat-Rückgrat auf dem Glimmer immobilisiert ist und die Nucleobasen entsprechend in Richtung TERS-Spitzen zeigen [61]. Sieben der gemessenen Spektren zeigen Beiträge von Phosphat und Ribose, aber keine Ringatmungs-Moden. Schwingungen, bei denen sich die Polarisierbarkeit parallel zur

Achse der TERS-Spitze ändert, werden mehr verstärkt als senkrecht orientierte Schwingungen, also kann die Ursache für eine nicht sichtbare Ringatmungsschwingung eine flache Orientierung der Ringe auf dem Substrat sein [61, 138]. Folglich sind die Nukleobasen an diesen Stellen vorzugsweise senkrecht zu der TERS-Spitze orientiert, liegen also flach auf der Oberfläche des Substrats, und nur das Rückgrat kann mit der TERS-Spitze wechselwirken. Weiterhin lassen sich Spektren beobachten wie Spektrum 3 in Abbildung 4.3.2, in denen Banden von Ringatmungsschwingungen, Phosphat und Ribose zugeordnet sind. Diese indizieren entweder eine unspezifische Anbindung an das Substrat oder Windungen der DNA-Stränge.

Tabelle 4.3.1: Bandenzuordnung der TERS Spektren der Kalbsthymus-DNA in Abbildung 4.3.2 [61]

1 [cm <sup>-1</sup> ]	2 [cm <sup>-1</sup> ]	3 [cm <sup>-1</sup> ]	4 [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung
520	520	520	520	Silizium (TERS Spitze)
		553		C / T (Ring Def)
			574	A (C–H, N–H Def ( <i>wagging</i> ))
	616	622		A / T (Ring Def)
649		659	656	G (Ringatmung)
665				G (Ringatmung (Im))
	719			A (Ringatmung)
	754			T (Ringatmung)
	875			Deoxyribose Ring
	936	938	939	A / C / G (NH <sub>2</sub> Def ( <i>rocking</i> )) / Deoxyribose
		974		T (CC Str, CO Str, Ribose)
982				T ( <i>out-of-plane</i> NH <sub>2</sub> Def ( <i>wagging</i> ))
		1051		A (N–Zucker Str)
			1077	G
		1103		PO <sub>2</sub> symmetrische Streckschwingung
1131			1137	A (C–N Str, N–H, C–H Def)

		1171		A / G (C–C Str)
			1191	C
	1208	1207		T (Ring Str)
1217			1217	T ( <i>in-plane</i> Ring-CH <sub>3</sub> Str)
		1251		A / C / G (C–N Str) / T (Ring Str)
	1276			C (C–NH <sub>2</sub> Str + Ring Str)
1299		1299	1290	C (C–N Str)
		1319		A / G (C–N Str (Im))
	1330			A / G (Ring Mode)
	1360	1370	1370	A / C / G / T (C–N Str (Py))
		1398		T (NH Def / CH <sub>3</sub> Def)
	1412		1417	C (C–C Str) / A / T
	1472		1466	A (C=N Str (Py))
			1496	G (C=N Str (Im))
	1514	1514		C (NH <sub>2</sub> Def)
	1546		1538	T ( <i>in-plane</i> Ring Str)
1565		1557	1574	A / C / G / T (Ring Str (Py))
	1602			A / C / G (NH <sub>2</sub> Def)
			1643	C / G / T (C=O Str, C=C Str)
1670				A (NH <sub>2</sub> Def ( <i>scissoring</i> ))

A – Adenin, G – Guanin, C – Cytosin, T – Thymin, Def – Deformationsschwingung, Str – Streckschwingung, Im – Imidazol, Py – Pyrimidin

Eine eindeutige Bandenzuordnung ist im Fall von DNA nicht immer möglich, da teilweise in der Literatur unterschiedliche Zuordnungen angegeben werden. Ein Beispiel dafür ist die Bande bei 1251 cm<sup>-1</sup> in Spektrum 3 in Abbildung 4.3.2. Sie kann der (C8–H, N9–H) Deformationsschwingung, der (N7–C8) Streckschwingung von Adenin [159], einer Ringmode des Adenins oder Cytosins [155], der (C8–N9) Streckschwingung von Guanin [156] oder der *in-plane* Ring-Streckschwingung von Thymin [159] zugeordnet werden. Die ähnliche Struktur der einzelnen Nukleobasen verleiht ihnen

auch ein ähnliches spektrales Erscheinungsbild. Dennoch können viele Banden eindeutig zugeordnet werden und damit als Markerbanden dienen. Andere, wie zum Beispiel die Bande bei  $938\text{ cm}^{-1}$  in den Spektren 2, 3 und 4, können keiner der Basen eindeutig zugeordnet werden, sondern der  $\text{NH}_2$  Deformationsschwingung von Adenin, Guanin und Cytosin. Somit kann in diesem Fall Thymin ausgeschlossen werden.

Die Bande bei  $650\text{ cm}^{-1}$  wird der Guanin Ringatmungs-Schwingung zugeordnet. Sie ist in Raman und SERS Spektren die intensivste Bande, aber auch abhängig von Polarisations- und Orientierungseffekten, und daher in den TERS Spektren hier weniger dominierend. In der Literatur wird bezüglich der Guanin Ringatmungsschwingung die Detektion von zwei relevanten Banden beschrieben, die bei  $650\text{ cm}^{-1}$  und  $688\text{ cm}^{-1}$  liegen [157]. In normalen Raman Spektren liegt die Ringatmungsbande des freien Guanins bei  $680\text{ cm}^{-1}$  und in SERS Spektren bei  $650\text{ cm}^{-1}$ , daher können unterschiedliche Konfigurationen des adsorbierten Moleküls angenommen werden. Sind beide Banden in einem DNA-Spektrum erkennbar, ist dies ein Hinweis auf sterische Einflüsse des Rückgrates bei der Adsorption der DNA-Stränge [157]. In den hier gemessenen TERS Spektren kommen in keinem Fall beide Banden in einem Spektrum vor und nur in einem wurde die Bande bei  $686\text{ cm}^{-1}$  detektiert.

Die Banden bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 2 und bei  $1319\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 3 können jeweils Adenin und Guanin zugeordnet werden. Um die Entscheidung für die Zuordnung zu unterstützen müssen auch die Informationen aus den übrigen Banden hinzugezogen werden. In Spektrum 2 ist die Ringatmungsschwingung des Adenins bei  $719\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, was die Zuordnung der Bande bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  zu Adenin unterstützt. In Spektrum 3 ist hingegen die Guanin Ringatmungsschwingung erkennbar, was eine Zuordnung der Bande bei  $1319\text{ cm}^{-1}$  zu Guanin unterstreicht. Allerdings muß hier das Erscheinen der Bande bei  $1051\text{ cm}^{-1}$  berücksichtigt werden, die eindeutig Adenin zugeordnet wird. Hierdurch ist an dieser Position das Vorliegen beider Basen nebeneinander im Fokus der TERS-Sonde wahrscheinlich.

Ähnlich wie die Ringatmungsmode des Guanins kann auch die des Thymins verschiedene Bandenpositionen einnehmen. Die Bande bei  $754\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 2 wird der Thymin Ringatmungsmode zugeordnet [155, 159], aber in der Literatur ist auch

eine Position dieser Bande um  $800\text{ cm}^{-1}$  beschrieben [56, 159, 181]. Auch hier können die unterschiedlichen Bandenpositionen durch orientierungs- beziehungsweise sterische Effekte erklärt werden.

Die bereits beschriebenen unterschiedlichen Raman Streuquerschnitte der einzelnen Nucleobasen spiegeln sich in den TERS Spektren wider, da mehr spektrale Beiträge von Adenin, Guanin und Cytosin erkennbar sind und nur recht wenige von Thymin. Dennoch wurden Signale aller Basen detektiert und somit ein wichtiger Grundstein für eine mögliche direkte Sequenzierungsmethode gelegt. Eine sequenzspezifische TERS Messung erfordert nun noch eine entsprechend hohe laterale Auflösung und ein hinreichend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis an den einzelnen Messpositionen.

#### 4.4. Richtung Sequenzierung – Detektion des Basenübergangs in einem synthetischen DNA-Strang

Da TERS eine hohe Auflösung bietet und eine spektrale Unterscheidbarkeit der einzelnen Nukleobasen nachgewiesen werden konnte, soll nun an einem synthetischen DNA Strang aus Adenin und Cytosin der Übergang zwischen Blöcken in der Sequenz gezeigt werden. Für dieses Experiment wurde ein DNA Strang aus  $(A_{10}C_{15})_8$  gewählt. Zur Immobilisierung wurde 1  $\mu\text{L}$  der in VE-Wasser gelösten DNA ( $10^{-5}$  M) auf Glimmer getropft, unter Argon inkubiert, mit VE-Wasser gewaschen und unter Argon getrocknet. Ein Vorteil dieses Moleküls ist die geringe Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Sekundärstruktur-Elementen, da die beiden Basen nicht komplementär sind und auch nicht zur Bildung von Quadruplex-Strukturen neigen, wie das Guanin.

In Abbildung 4.4.1 ist ein topographischer AFM-Scan der  $A_{10}C_{15}$  DNA dargestellt. Ein einzelner Strang aus acht  $A_{10}C_{15}$  Blöcken ist 80 – 100 nm lang, der in der Abbildung gezeigte Strang ist jedoch deutlich länger. Die topographischen Erhöhungen auf dem Strang weisen aber darauf hin, daß hier mehrere Einzelstränge aneinander liegen. In dem TERS-Experiment wurden neun Spektren im Abstand von jeweils 0.3 nm, was ungefähr einem Basen-Abstand entspricht, auf dem DNA Strang aufgenommen, die Messpositionen sind in Abbildung 4.4.1 angedeutet.

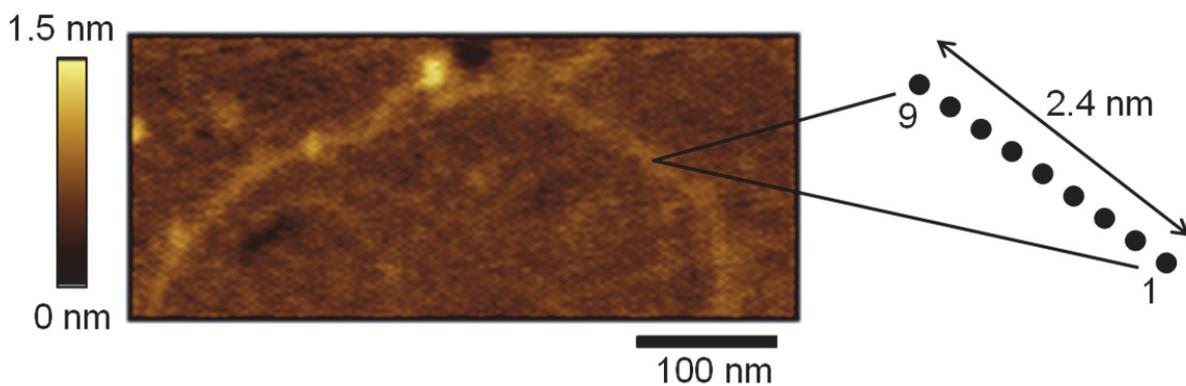


Abbildung 4.4.1: Topographischer AFM-Scan eines  $(A_{10}C_{15})_8$  Einzelstranges. Die Messpositionen des TERS-Experiments sind skizziert

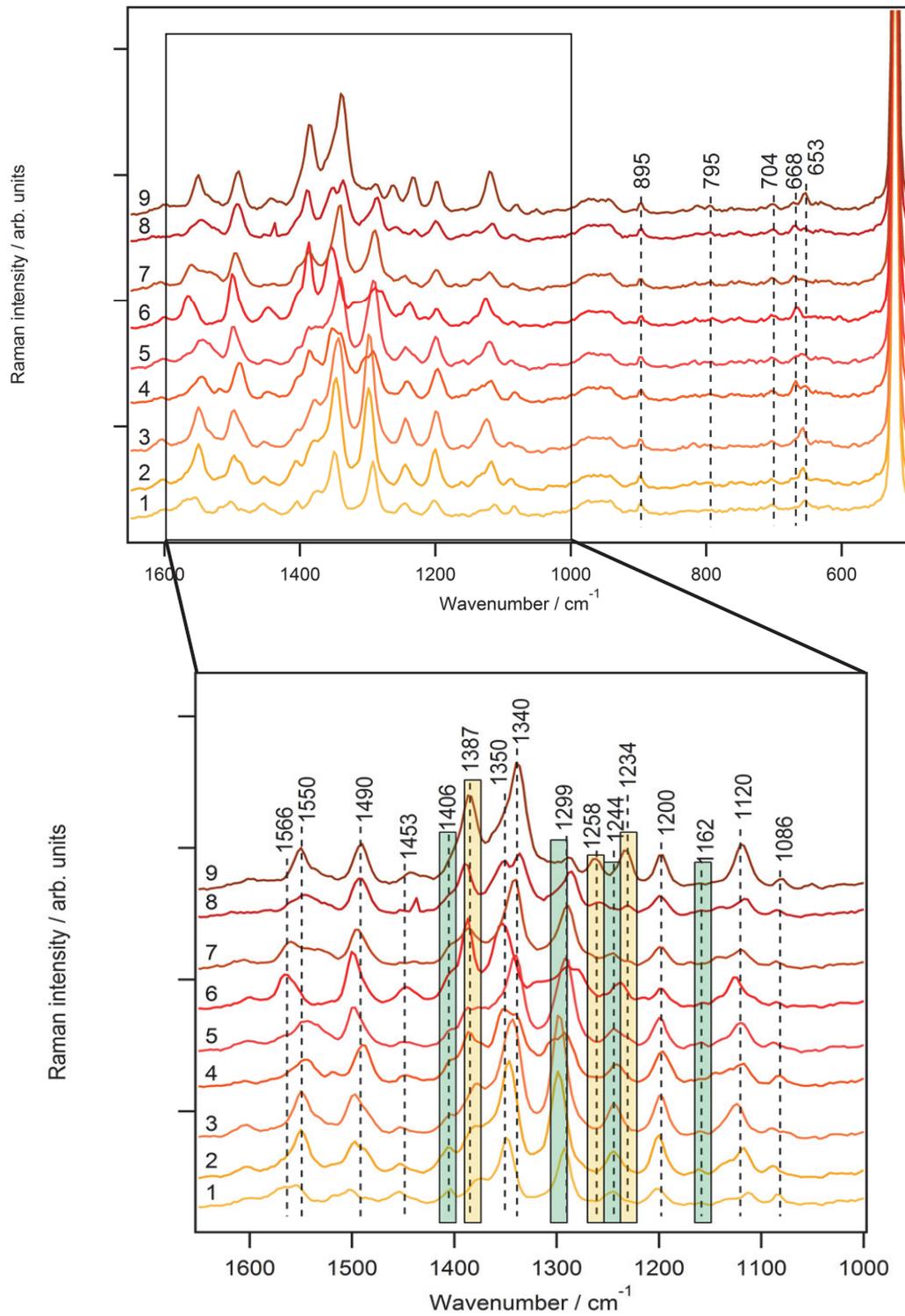


Abbildung 4.4.2: TERS-Spektren der Messpositionen 1 bis 9 mit vollständiger Bandenbezeichnung ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ,  $p = 750 \mu\text{W}$ ,  $t = 10 \text{ sec}$ ). Adenin-Banden sind grün markiert, Cytosin-Banden gelb

Die aufgenommenen TERS-Spektren sind in Abbildung 4.4.2 mit vollständiger Bandenbezeichnung dargestellt. Zur besseren Übersicht und Verdeutlichung sind die basenspezifischen Moden gekennzeichnet (Adenin – grün, Cytosin – gelb). Die Zuordnung der Banden erfolgt in Tabelle 4.4.1.

Auch bei dieser Messreihe sollen spezifische Markerbanden die spektrale Zugehörigkeit der jeweiligen TERS Spektren zu entweder Adenin oder Cytosin klären, bzw. in spektraler Mischform den Übergang von einem Block zum nächsten beschreiben.

Tabelle 4.4.1: Bandenzuordnung der TERS-Spektren der A<sub>10</sub>C<sub>15</sub> DNA

Bandenposition [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung	
	Adenin	Cytosin
520	Silizium (TERS Spitze)	
653	Ring Def [158, 162]	
668	Ring Def [158, 162]	
704	Glimmer (Substrat)	
795		Ringatmung (Pyrimidin) [56, 154-157, 159, 182]
895	CH <sub>2</sub> rocking [158, 159, 162]	
1086	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Rückgrat [155, 158, 167]	
1120	C-N Str [56, 154, 159]	C-N Str [154]
1162	C-C Str [37, 61, 156, 158, 159]	
1200	C-N Str, C-N-H Bieg [154, 158]	C-N Str, C-H Bieg [154]
1234		C-C Str [37, 154, 156]
1244	C-N Str [37, 56, 57, 61, 155, 158]	
1258	C-N Str, C-H Def, N-H Def [155, 158, 159]	C-H Def, in-plane Ring Str [37, 56, 155, 159, 167]
1289		C-N Str [156, 157]
1299	Adenin [37, 57, 61, 155]	

1340 - 1350	C-N Str (Imidazol) [154-156, 158, 159, 167]	C-N Str [56, 154, 182]
1387		C-H Def [37, 60, 159, 182]
1406	C-N Str (Pyrimidin) [37, 56, 154, 156]	
1444 - 1453	C=N Str (Pyrimidin) [57, 158, 162]	in-plane Ring Str [56, 57, 154, 156, 159]
1490	C=N Str (Pyrimidin) [155, 158, 159]	Ring Def [60, 154, 156]
1550	Ring Str (Pyrimidin) [156]	NH2 Def [60]
1566	NH2 Def [57]	Ring Str (Pyrimidin) [156]

Def – Deformationsschwingung, Str – Streckschwingung, Bieg - Biegeschwingung

In Abbildung 4.4.3 sind die Spektren 2 und 9 der Messreihe dargestellt. Der Abstand zwischen diesen beiden Spektren beträgt 2.1 nm. Hier sind nur noch die signifikanten Banden markiert und bezeichnet. In dem unteren Wellenzahl-Bereich erscheint die Ringatmungsschwingung des Cytosin bei  $795\text{ cm}^{-1}$  und ist in Spektrum 2 kaum, dafür in Spektrum 9 deutlich zu erkennen. Die Adenin-Bande bei  $895\text{ cm}^{-1}$  hingegen besitzt in Spektrum 2 eine höhere Intensität als in Spektrum 9. Die übrigen Banden in dieser Region gehören zum Substrat Glimmer ( $704\text{ cm}^{-1}$ ) oder zum Phosphat-Rückgrat der DNA ( $1086\text{ cm}^{-1}$ ) und bleiben konstant. Die Banden bei  $1120\text{ cm}^{-1}$  und  $1200\text{ cm}^{-1}$  sind sowohl Adenin, als auch Cytosin zuzuordnen und bleiben ebenfalls verhältnismäßig konstant. Die Bande bei  $1162\text{ cm}^{-1}$  hingegen stammt eindeutig von Adenin und ist in Spektrum 2 deutlich erkennbar, verschwindet aber in Spektrum 9. Dieses weist dann eine Bande bei  $1234\text{ cm}^{-1}$  auf, die eindeutig Cytosin zugeordnet wird und in Spektrum 2 nicht erkennbar ist. Die Bande daneben bei  $1244\text{ cm}^{-1}$  zeigt sich nicht in Spektrum 9, dafür aber intensiv in Spektrum 2. In der Literatur finden sich in SERS-Messungen Zuordnungen zu sowohl Adenin, als auch Cytosin, im TERS-Experiment ist diese Bande jedoch eindeutig Adenin zuzuordnen [57]. Daher kann auch in dem hier betrachteten Spektrum davon ausgegangen werden, daß die Bande von Adenin

stammt. Ähnliches muß auch für die Bande bei  $1258\text{ cm}^{-1}$  angenommen werden. Sie erscheint nur in Spektrum 9, nicht aber in Spektrum 2. In der Literatur finden sich Zuordnungen aus SERS-Spektren für beide, Adenin und Cytosin, und auch aus TERS-Spektren ergibt sich keine eindeutige Zuordnung dieser Bande. Allerdings kann in diesem Fall aus dem spektralen Erscheinungsbild darauf geschlossen werden, daß diese Bande von Cytosin stammt. Die nächste sehr intensive Bande in Spektrum 2 liegt bei  $1299\text{ cm}^{-1}$  und kann unter Berücksichtigung von in der Literatur bekannten TERS-Spektren Adenin zugeordnet werden. Die weniger intensive Bande bei  $1289\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 9 kann Cytosin zugeordnet werden [156]. Die Bande um  $1340 - 1350\text{ cm}^{-1}$  kann beiden Nukleobasen zugeordnet werden, besitzt also bezüglich des Basen-Wechsels in der Sequenz keine Aussagekraft. Die Bande bei  $1387\text{ cm}^{-1}$  hingegen wird eindeutig Cytosin zugeordnet. Sie ist in Spektrum 2 nur schwach als Schulter erkennbar, aber intensiv in Spektrum 9. Die Bande bei  $1406\text{ cm}^{-1}$  wird eindeutig Adenin zugeordnet und findet sich in Spektrum 2 als deutlich sichtbare Schulter, nicht aber in Spektrum 9. Die nächsten Banden liegen bei  $1444\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 9 und  $1453\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 2. Ihr Abstand ist zu klein, um eine eindeutige Aussage über die Zuordnung zu erlauben, allerdings findet sich in der Literatur die Adenin-Bande bei höheren Wellenzahlen als die des Cytosin [56, 57, 154, 156]. Dies unterstützt die hier beschriebene spektrale Erscheinungsform, in der Spektrum 2 durch Adenin-Banden dominiert ist und Spektrum 9 durch Cytosin-Banden. Alle weiteren Banden zeigen keine spektrale Veränderung und sind jeweils beiden Nukleobasen zuordnebar, erlauben also keine eindeutige Aussage über ihre Zugehörigkeit zu einer Base.

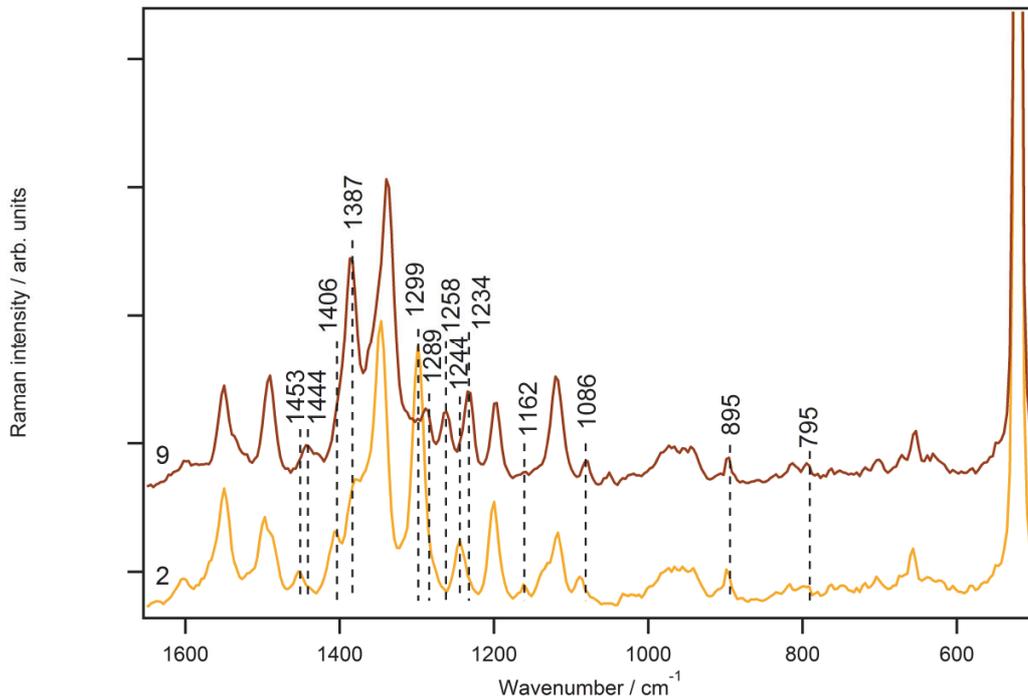


Abbildung 4.4.3: TERS-Spektren der Punkte 2 und 9 mit Bezeichnung der signifikanten Banden ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ,  $p = 750 \mu\text{W}$ ,  $t = 10 \text{ sec}$ ). Der Abstand zwischen den beiden Spektren beträgt 2.1 nm

Zusammenfassend zeigen diese Messungen die Detektion eines Übergangs in der Sequenz eines DNA-Stranges aus  $A_{10}C_{15}$ -Blöcken innerhalb von 2.1 nm. Hierbei ist das Spektrum 2 von spektralen Beiträgen des Adenins dominiert und das Spektrum 9 zeigt überwiegend spektrale Charakteristika von Cytosin. Typische Adenin-Banden sind bei  $1162 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1244 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1299 \text{ cm}^{-1}$  und  $1406 \text{ cm}^{-1}$  [37]. Charakteristische Banden für Cytosin befinden sich bei  $1234 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1258 \text{ cm}^{-1}$  und  $1387 \text{ cm}^{-1}$  [37].

Das hohe Auflösungsvermögen, Sensitivität und Spezifität der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie ermöglichen nanoskalige Untersuchungen einzelner DNA-Stränge und zeigen das Potential in Kombination mit leistungsstarken Dekonvolutions-Algorithmen eine direkte Sequenzierungs-Methode zu bieten. Im Folgenden werden die Ergebnisse zum Auflösungsvermögen der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie durch theoretische Untersuchungen ergänzt.

#### 4.5. Betrachtungen zur erreichbaren Auflösung sowie Verstärkung mittels

##### TERS

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse der Untersuchung des  $(A_{10}C_{15})_8$  Einzelstrangs hinsichtlich erzielter Auflösung und Verstärkung mit theoretischen Resultaten verglichen. Hierfür können freundlicherweise Auszüge einer Simulation von Dr. Matthias Zeisberger (IPHT - Jena) verwendet werden.

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben konnte der Übergang zwischen Adenin und Cytosin innerhalb von ca. 2 nm spektroskopisch abgebildet werden. Diese Auflösung wurde durch eine Verstärkung der Raman-Signale um den Faktor  $1.26 \times 10^5$  ermöglicht. Die Berechnung dieses Verstärkungsfaktors erfolgte an Hand von Spektrum 2 aus Abbildung 4.4.3 nach einem von Budich et al. vorgeschlagenen Verfahren [183] und ist im Folgenden beschrieben. Das für diese Berechnung herangezogene unter gleichen Bedingungen gemessene Raman-Spektrum enthält keine Informationen im betrachteten Spektralbereich.

Für die Berechnung wurde zunächst die Standardabweichung der Intensität des Spektrums 2 aus Abbildung 4.4.3 im Bereich über  $1800 \text{ cm}^{-1}$  bestimmt, da in dieser Region keine Banden zu beobachten sind. Zur Sicherheit wurde dieser Wert mit dem Faktor drei multipliziert ( $s \times 3 = 100 \text{ arb. units}$ ) und mit der um den Untergrund korrigierten maximalen Intensität ( $5040 \text{ arb. units}$ , gemessen bei ca.  $1340 \text{ cm}^{-1}$ ) ins Verhältnis gesetzt. Hierdurch kann eine relative Verstärkung von ca. 50 ermittelt werden. Für die Berechnung der absoluten Verstärkung müssen jedoch auch die unterschiedlichen Interaktionsbereiche berücksichtigt werden. Hierfür schlägt Budich et al. einen Faktor von 2500 vor. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis der Größe des Laser-Spots ( $1 \mu\text{m}$ , gemessen bei  $568 \text{ nm}$ ) sowie des Durchmessers des endständigen Nanopartikels der TERS-Sonde ( $20 \text{ nm}$ , approximiert an Hand von REM-Aufnahmen). Dadurch ergibt sich für die absolute Verstärkung der genannte Faktor von  $1.26 \times 10^5$ . Da die Oszillation der Spitze während der Messung hierbei nicht berücksichtigt wird ist davon auszugehen, daß dieser Wert als untere Grenze für die absolute Verstärkung während dieser Messung angenommen werden kann.

Diese experimentell ermittelten Parameter sollen nun mit einer Simulation zur Feldverteilung an einer TERS-Spitze verglichen werden. Im Rahmen eines Dipol/Spiegeldipol-Modells wird hierbei eine Silberkugel (Durchmesser 20 nm) betrachtet, welche sich in Luft befindet. Die Anregung des evaneszenten Feldes um dieses Partikel erfolgt durch eine ebene p-polarisierte elektromagnetische Welle ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ), welche durch ein Substrat ( $\epsilon_s = 2.13$ ) mit einem Einfallswinkel nahe dem Grenzwinkel der Totalreflexion eingestrahlt wird ( $44^\circ$ ). Dabei befindet sich das Silber-Partikel in einem variablen Abstand  $h$  zur Substratoberfläche. Das von dem Silber-Partikel erzeugte Feld kann, da das anregende Feld in seiner Umgebung als homogen betrachtet wird (quasistatisches Modell), als Dipolfeld beschrieben und der Einfluß des Substrates durch einen Spiegeldipol modelliert werden. In Abbildung 4.5.1 ist eine Zusammenfassung des betrachteten Modells dargestellt.

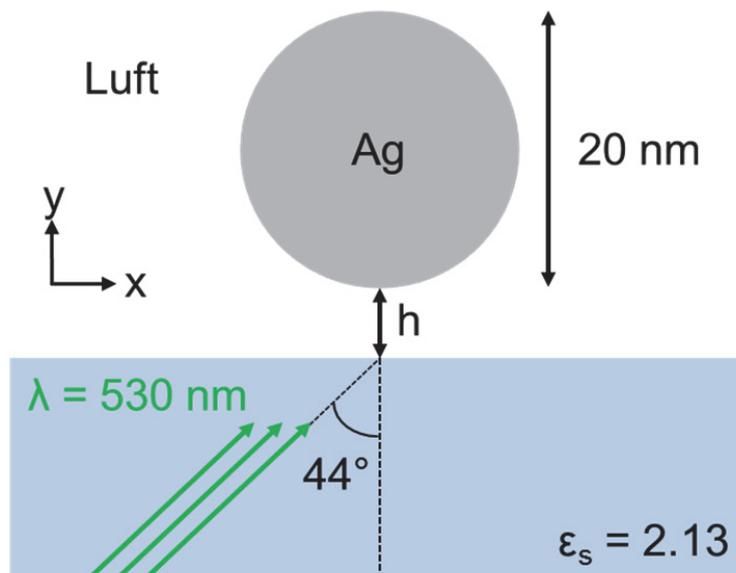


Abbildung 4.5.1 (Idee und Konzeption Dr. Matthias Zeisberger – IPHT Jena): Verwendetes Modellsystem zur Simulation der Feldverteilung um einen Silber-Partikel (Durchmesser 20 nm) nach Einstrahlen einer p-polarisierten EM-Welle ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ) unter einem Winkel von  $44^\circ$  (nahezu Totalreflexion)

Für den Vergleich mit den experimentellen Parametern wird nun die Verteilung der vierten Potenz der normierten Feldstärke um das Partikel nach beschriebener Anregung betrachtet. Dabei wird die Proportionalität zur TERS-Intensität unter der Voraussetzung  $\lambda_{\text{Anregung}} \approx \lambda_{\text{Raman}}$  für die Vergleichbarkeit genutzt [184]. Die Normierung erfolgte auf den Wert des zur Anregung genutzten Feldes  $E_{\text{EV}}$ . In Abbildung 4.5.2 ist der Verlauf der vierten Potenz der erzeugten Feldstärke entlang der x-Koordinate unmittelbar auf der Substratoberfläche dargestellt. Dabei werden verschiedene Abstände  $h$  (0.2 nm – 10 nm) des Silber-Partikels zur Substratoberfläche berücksichtigt.

Es zeigt sich, daß es für  $h \leq 2$  nm zu erheblichen Steigerungen der vierten Potenz der erzeugten Feldstärke und somit der zu erwartenden Raman-Verstärkung kommt. Allerdings spiegeln die Werte für den kleinsten betrachteten Abstand zwischen Silber-Partikel und Substratoberfläche (0.2 nm) nicht die beobachtete absolute Verstärkung von  $> 10^5$  wieder. Im Maximum wird direkt unter dem Silber-Partikel ( $x = 0$ ) eine theoretische Verstärkung von 3200 erhalten. Dabei fällt das Signal der vierten Potenz des erzeugten Feldes innerhalb der ersten 2 nm entlang der x-Koordinate um ca. 50 % ab. Berücksichtigt man diesen Verlauf auch in die entgegengesetzte Richtung, können für die Auflösung 4 nm als Richtwert dieser theoretischen Messanordnung approximiert werden. Im Vergleich dazu konnte im Rahmen der experimentellen Untersuchungen an dem  $(A_{10}C_{15})_4$ -Einzelstrang mit ca. 2 nm eine deutlich schärfere Auflösung erzielt werden, insbesondere da die hier für die Detektion des Basenwechsels verwendeten Markerbanden in dem Spektrum der jeweils anderen Nukleobase nahezu vollständig abgeklungen sind.

Folglich beschreiben die Ergebnisse des theoretischen Modells mit den gewählten Parametern (Annahme eines Silber-Partikels mit Durchmesser 20 nm, abgeschätzt mittels REM-Aufnahmen (vgl. Abbildung 3.2.1) die experimentellen Resultate durch einen zu wenig intensiven und zu breiten Verlauf der vierten Potenz des erzeugten Feldes zwischen Silber-Partikel und Substratoberfläche nur im Ansatz. Es wird jedoch ersichtlich, daß es erst ab  $h \leq 2$  nm zu einer merklichen Verstärkung von  $E^4$  kommt. Dabei legt der Vergleich die Vermutung nahe, daß der wesentliche Beitrag der Verstärkung in dem im Modell nicht betrachteten Abstandsbereich  $< 0.2$  nm erzeugt

wird. Dies würde zu einer deutlichen Vergrößerung des Maximums bei  $x = 0$  führen. Unter Berücksichtigung des Verlaufs ergäbe sich dadurch ein wesentlich schärferes Profil der vierten Potenz des resultierenden Feldes, was zu einer besseren Beschreibung der beobachteten lateralen Auflösung führen würde. Darüber hinaus ist die Annahme einer idealen Kugel als Silber-Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm an der TERS-Spitze eine Näherung. Wenn ihre tatsächliche Form eine unebene Oberfläche mit Kanten aufweist, kann eben dort die Feldverstärkung deutlich höher und auf kleinere räumliche Gebiete konzentriert sein. Ebenso kann die Größe des Partikels variieren. Zusätzlich werden in diesem Model Verstärkungseffekte auf Grund des chemischen Mechanismus nicht betrachtet.

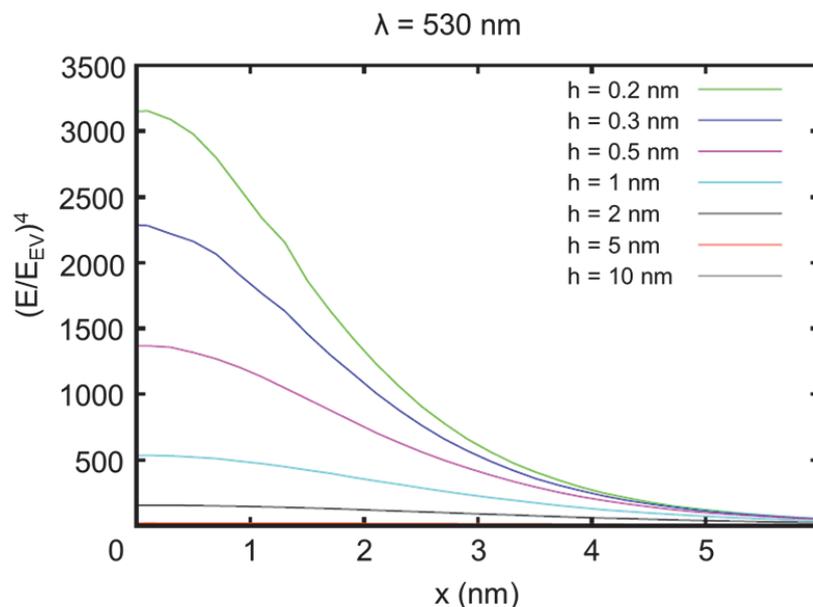


Abbildung 4.5.2: Verlauf der vierten Potenz der erzeugten Feldstärke entlang der x-Koordinate für verschiedene Abstände  $h$  (Partikel – Substratoberfläche) nach beschriebener Anregung bei 530 nm. Die Werte sind auf die Intensität des zur Anregung genutzten Feldes normiert

## 5. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS) in Malaria-infizierten Erythrozyten

Laut Information der Weltgesundheitsorganisation (*WHO – World Health Organization*) gab es 2010 geschätzte 219 Millionen Fälle von Malaria (Unsicherheitsbereich 154 - 289 Millionen) und geschätzte 660 000 Todesfälle (Unsicherheitsbereich 490 000 - 836 000) [185]. Seit dem Jahr 2000 ist die globale Sterblichkeitsrate bei Malaria-Infektionen bereits mehr als 25 % gefallen und aktuelle Forschungen beschäftigen sich weiterhin mit der Entwicklung wirksamer Medikamente gegen Malaria. Allerdings existiert bis heute kein zugelassener Impfstoff gegen Malaria, einer wird aktuell klinisch getestet und mit Ergebnissen kann 2014 – 2015 gerechnet werden [186]. Zurzeit besteht weiterhin die Problematik einer weltweiten Ausbreitung von Resistenzen gegenüber etablierten Wirkstoffen [187, 188], so daß die Aufklärung des exakten chemischen Anbindungsmechanismus der Wirkstoffmoleküle an die biologischen Zielstrukturen zu einer zielgerichteten Erforschung neuer, effektiver Wirksubstanzen beitragen könnte.

Nachdem der Malaria Parasit *Plasmodium falciparum* (neben vier weiteren Erregern der klinisch bedeutsamste und für den Menschen bedrohlichste) durch den Stich einer infizierten weiblichen Anopheles Mücke auf den Menschen übertragen wird, gelangt er über den Blutkreislauf zur Leber. Hier dringt er in die Leberzellen ein und es werden zahlreiche Merozoiten gebildet. Diese werden anschließend beim Zerfall des Leberschizonten in die Blutbahn freigesetzt und befallen hier die Erythrozyten. Hierbei verstoffwechselt der Parasit bis zu 80 % des Hämoglobins seiner Wirtszelle [189]. Dabei entsteht neben Aminosäuren auch das für den Parasiten toxische freie Häm (Ferriprotoporphyrin IX) [190], welches durch einen nachfolgenden Entgiftungsprozess mittels Bio-Kristallisation zu dem Malaria-Pigment Hämozoin umgewandelt wird [191]. Dieses besitzt ein synthetisches, spektroskopisch äquivalentes, Analogon, das  $\beta$ -Hämatin [189]. Dieses besteht aus Häm-Dimeren, die über reziproke Eisen-Carboxylat-Bindungen an eine der Propionsäure-Seitenketten des Porphyrins gebunden sind. Diese Dimere verbinden sich als Elementarzellen mittels Wasserstoffbrücken-Bindungen zu einem triklinen Kristall, dem Malariapigment Hämozoin [192]. Anti-Malaria Wirkstoffe wie zum Beispiel Chloroquin verhindern das Kristallwachstum und somit

reichert sich für den Parasiten toxisches freies Häm in der Zelle an [189, 193]. Diese innerzellulären Wechselwirkungen und ihr Verständnis auf molekularer Ebene ist Gegenstand zahlreicher Arbeiten.

Hier bietet die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie ein sensitives Werkzeug zur hochauflösenden spektroskopischen Analyse der Wechselwirkungen des Anti-Malaria Wirkstoffes, sowie der entsprechenden strukturellen Folgen für den Hämoglobin-Kristall. Im Folgenden werden Dünnschnitte von mit Malaria infizierten Erythrozyten betrachtet, sowohl in unbehandeltem Zustand, als auch mit einem Anti-Malaria Wirkstoff behandelt. Dadurch wird gezeigt, daß das extrem gute räumliche Auflösungsvermögen der TERS-Technologie neben der Untersuchung „kleiner“ Proben, wie einzelner DNA-Stränge, auch die oberflächensensitive Charakterisierung komplexer Systeme erlaubt.

### 5.1. Dünnschnitte von Malaria-infizierten Erythrozyten

Um eine exakte Vorstellung des Inneren der mit Malaria infizierten Erythrozyten zu erlangen und in der Zelle abgelagerte Hämozoin-Kristalle zu untersuchen, werden Dünnschnitte dieser herangezogen, die freundlicherweise von Dr. Torsten Frosch zu Verfügung gestellt wurden, und mittels Rasterkraft-Mikroskopie (AFM) analysiert. Im Folgenden wird auf die topographischen Begebenheiten in zwei unterschiedlichen Arten von Zellen eingegangen. Einerseits werden infizierte und unbehandelte Erythrozyten betrachtet, insbesondere das Hämozoin in der Zelle, andererseits werden infizierte und mit dem Anti-Malaria Wirkstoff Chloroquin behandelte Erythrozyten dargestellt. Auch hier liegt der Fokus auf den Hämozoin-Kristallen in den Zellen.

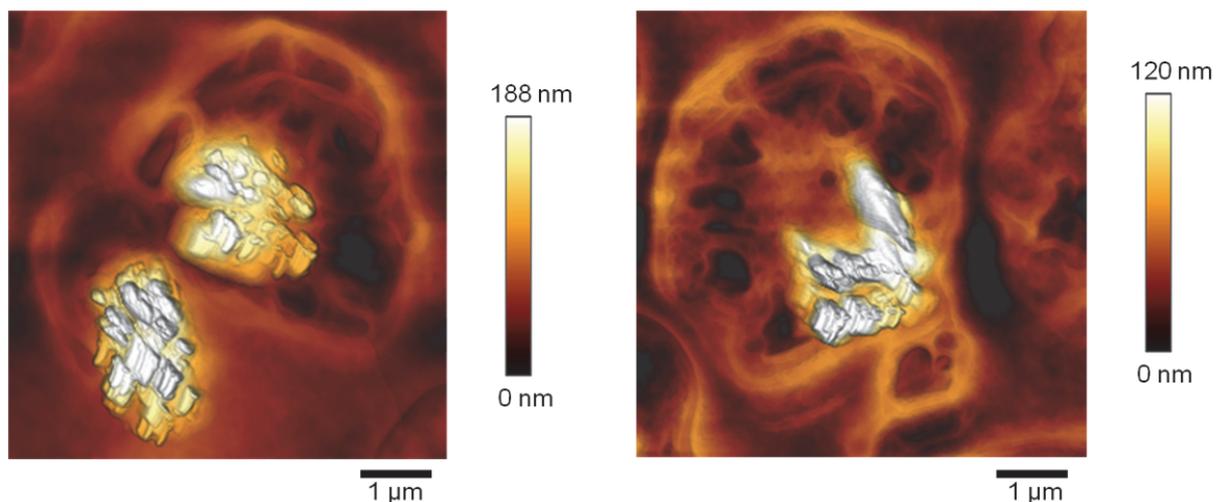


Abbildung 5.1.1: AFM Scans von Dünnschnitten unbehandelter Malaria-infizierter Erythrozyten (zur besseren Visualisierung geglättet und in 3D-Darstellung)

In Abbildung 5.1.1 sind AFM Aufnahmen von Dünnschnitten einzelner Malaria-infizierter unbehandelter Erythrozyten dargestellt. Zur besseren Visualisierung wurden diese Scans sowie alle in diesem Kapitel folgenden AFM Aufnahmen mit der Software JPK Data Processing, Version spm-4.2.53, zunächst geglättet und anschließend als 3D-Bild dargestellt (Parameter X-, Y- und Z-Achsendrehung 0°, Höhe der Z-Achse: Z-Verhältnis

1200 %). Gut erkennbar sind die Abgrenzungen der Zellen und einzelne Zellkompartimente innerhalb. Ebenfalls ersichtlich sind die Hämozoin-Kristalle, die sich in der Verdauungsvakuole des Parasiten befinden. Das äußere Erscheinungsbild zeigt typische triklinen Strukturen. Das Kristallwachstum wurde in diesem Fall nicht beeinträchtigt.

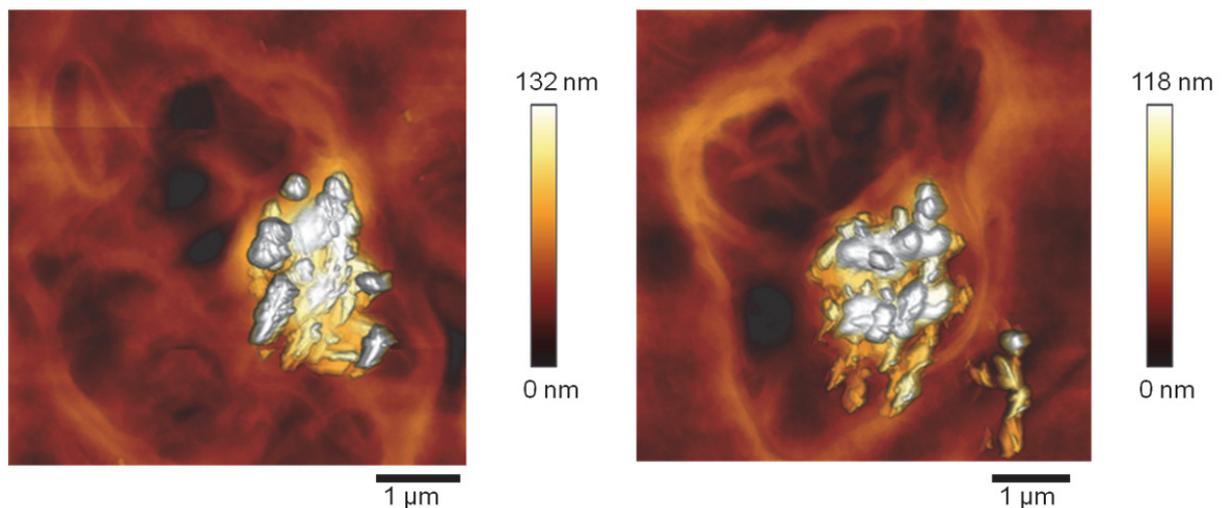


Abbildung 5.1.2: AFM Scans von Dünnschnitten behandelter Malaria-infizierter Erythrozyten (zur besseren Visualisierung geglättet und in 3D-Darstellung)

Abbildung 5.1.2 zeigt AFM Aufnahmen von Dünnschnitten einzelner Malaria-infizierter Erythrozyten, die mit dem Anti-Malaria Wirkstoff Chloroquin behandelt wurden. Auch hier sind die äußere Zellmembran und die inneren Kompartimente gut erkennbar, ebenso wie die Hämozoin-Kristalle. Diese Kristalle unterscheiden sich topographisch von denen der unbehandelten Zellen. Sie zeigen keine ausgeprägte triklinen Außenkontur und es sind keine Endflächen erkennbar, sondern abgerundete und leicht spitz zulaufende Strukturen mit weicher Kontur. Dieses Erscheinungsbild der Hämozoin-Kristalle ist in einem gestörten Kristallwachstum begründet, welches durch den Einsatz des Chloroquin bewirkt wird. Diese topographischen Informationen sollen

im Folgenden durch spektrale Analysen ergänzt werden. Hierfür werden zunächst eine Reihe Morphologie-sensitiver Raman Moden beschrieben.

## **5.2. Detektion Morphologie-sensitiver Raman-Moden von Hämозoin in Malaria-infizierten behandelten und unbehandelten Erythrozyten**

Hämозoin ist bereits mittels Raman- und Resonanz-Raman-Spektroskopie untersucht worden. Das Absorptionsspektrum von Hämозoin zeigt eine Absorption im gesamten sichtbaren Spektralbereich mit einem breiten Maximum bei 430 nm [189]. Dies führt bei geeigneter Anregung zur resonanten Verstärkung verschiedener Raman Signale [189]. Bisherige TERS Experimente innerhalb von Zellschnitten auf Hämозoin-Kristallen mit Malaria infizierter Erythrozyten nutzten zur Anregung die Wellenlänge 530 nm [194]. In dem Bereich kleinerer Wellenzahlen ( $300\text{ cm}^{-1} - 700\text{ cm}^{-1}$ ) sind, wie in Abbildung 5.2.1 gezeigt, in den Raman-Spektren von Hämозoin kaum Banden sichtbar und die TERS-Messungen konzentrierten sich nicht auf diesen Bereich [189, 193]. Prominente Signale finden sich hier eher im höheren Wellenzahlbereich, wie zum Beispiel die Bande bei  $1372\text{ cm}^{-1}$ , die der symmetrischen Pyrrol Ringatmungsschwingung zugeordnet wird [194]. Diese Bande gilt als Elektronendichte-Marker, oder auch Oxidationszustands-Marker. Sie wird einer Schwingung der vier Pyrrole zugeordnet, die an der Stelle überlappen, an der die beiden Hämatin-Einheiten, aus denen Hämозoin besteht, aneinander gebunden sind [189, 190, 195]. Die Informationen über den Oxidationszustand des Zentralatoms des Häms, Eisen (II bzw. III), werden dabei über Rückbindungseffekte verursacht, die die elektronische Dichte in den Pyrrol-Ringen beeinflussen [193, 196, 197]. Weitere Banden im Wellenzahlbereich zwischen  $1500\text{ cm}^{-1}$  und  $1650\text{ cm}^{-1}$  werden Schwingungen des Porphyrin Skeletts zugeordnet [193, 198].

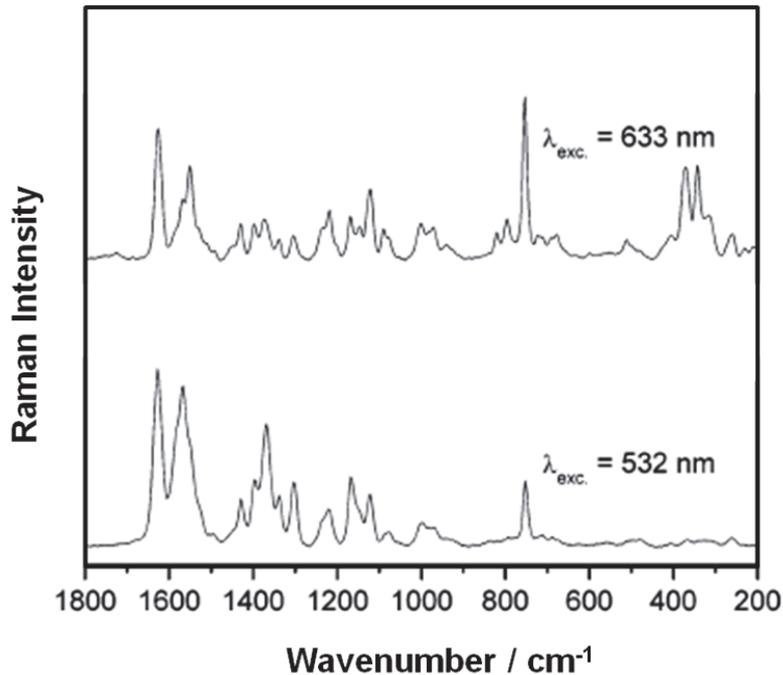


Abbildung 5.2.1: Raman-Spektren des Malaria-Pigments Hämозoin bei Anregungswellenlängen von 633 nm und 532 nm (Abbildung variiert nach [190])

Durch eine Anregung im Roten (633 nm, 647 nm) werden in Raman Spektren auch Morphologie-sensitive Moden im kleineren Wellenzahlbereich zwischen  $300 \text{ cm}^{-1}$  und  $500 \text{ cm}^{-1}$  verstärkt. Es konnte bereits gezeigt werden, daß die Intensität dieser Banden mit der Anregungswellenlänge von 568 nm über 633 nm zu einer maximalen Verstärkung mit 647 nm ansteigt und bei einer Anregung mit 676 nm wieder abfällt [189]. Hier spiegelt sich das bereits beschriebene Absorptionsverhalten des Hämозoins wider. Diese verstärkten Banden liegen in den Spektren bei  $313 \text{ cm}^{-1}$ ,  $343 \text{ cm}^{-1}$ ,  $368 \text{ cm}^{-1} / 375 \text{ cm}^{-1}$  und  $405 \text{ cm}^{-1}$  [189]. Hierbei ist die Verstärkung der Banden bei  $343 \text{ cm}^{-1}$  und  $368 \text{ cm}^{-1}$  am stärksten, daher wurden DFT-Rechnungen für die Zuordnung herangezogen. In Abbildung 5.2.2. sind die Schwingungsbilder (Pfeile charakterisieren die Bewegung der verschiedenen Molekülteile) der beiden Moden gezeigt.

Die Normalmode bei  $343\text{ cm}^{-1}$  besteht aus zwei spiegelbildlichen Teilen der beiden Hämatin-Einheiten und ist damit eine symmetrische Schwingung des gesamten Dimers [189]. Zusätzlich beinhaltet diese Mode Beiträge aus einer *out-of-plane* Schwingung des Tetrapyrrol-Rückgrates, welche gegenläufig zu der Schwingung des Zentralatoms Eisen in die Ebene des Porphyrin-Rings ist [189]. Die Bewegung des Eisens wiederum verursacht eine Streck- und Biegeschwingung der Eisen-Carboxylat-Bindung. Weitere Beiträge konnten von Biegeschwingungen rund um das Porphyrin, sowie Streck- und Biegeschwingungen der Propionsäure-Seitenketten, identifiziert werden [189]. Der dreidimensionale Charakter dieser verstärkten Hämoxin-Mode soll Aufschluss über eventuelle Veränderungen der Morphologie geben, da das Auftreten dieser Mode auf eine intakte Dimer-Struktur innerhalb des Malaria-Pigmentes Hämoxin verweist.

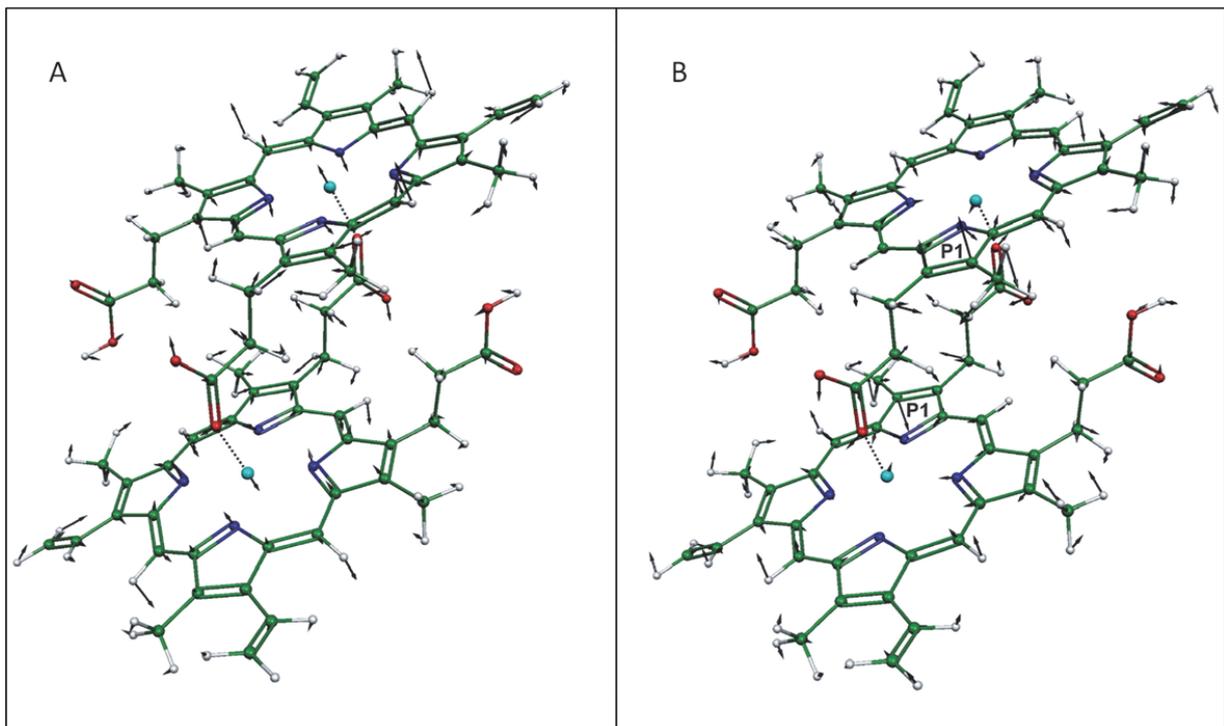


Abbildung 5.2.2: Mittels DTF berechnete Schwingungsmoden von Hämoxin, A wird der Raman Bande bei  $343\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet, B der Raman Bande bei  $368\text{ cm}^{-1}$  (variiert nach Abbildung 5 aus [189] mit freundlicher Genehmigung des Autors)

Die Normalmode bei  $368\text{ cm}^{-1}$  ist ebenfalls eine in beiden Hämatin-Einheiten, und damit im gesamten Dimer, symmetrische Schwingung [189]. Sie unterscheidet sich jedoch deutlich von der zuvor betrachteten Mode bei  $343\text{ cm}^{-1}$ . Die beiden in Abbildung 5.2.2 B mit P1 gekennzeichneten Pyrrole, an denen die Propionsäure-Seitenketten angebunden sind, schwingen in einer *out-of-plane* Bewegung. Weitere *out-of-plane* Schwingungen, wie die der CH- und CH<sub>2</sub>-Gruppen der Pyrrole, und Biegeschwingungen der Propionat-Bindungen, tragen ebenfalls zu dieser Mode bei. Wie die Mode bei  $343\text{ cm}^{-1}$  ist auch die Mode bei  $368\text{ cm}^{-1}$  an eine intakte Dimer-Struktur gebunden und kann somit zu Aussagen bezüglich der Morphologie des Malaria-Pigments herangezogen werden. Im Folgenden werden erstmals TERS-Untersuchungen von Dünnschnitten mit Chloroquin behandelte Malaria-infizierter Erythrozyten vorgestellt. Zusätzlich werden diese Ergebnisse mit Untersuchungen an Dünnschnitten nicht behandelte Erythrozyten verglichen. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf einer spektroskopischen Unterscheidung der Morphologie durch die Verwendung einer Anregung bei 633 nm. Durch das extrem gute räumliche Auflösungsvermögen der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie sind bereits lokale morphologische Veränderungen an der Kristalloberfläche ausreichend, um Hinweise auf die Wirkungsweise des Wirkstoffes Chloroquin zu geben.

Abbildung 5.2.3 zeigt die AFM-Aufnahme eines mit Malaria infizierten und mit dem Anti-Malaria Wirkstoff Chloroquin behandelte Erythrozyten. Die Topographie wurde mit einer Silber-bedampften TERS-Spitze aufgenommen. Im oberen Teil ist der Übersichtsscan dargestellt, im unteren der Detailscan. Auf dem mit grünem Stern gekennzeichneten Hämozoin-Kristall wurden in einem Abstand von jeweils 1 nm acht TERS-Spektren aufgenommen, welche in Abbildung 5.2.4 gezeigt sind. Eine detaillierte Bandenzuordnung findet sich in Tabelle 5.2.1. Die geringe Variation der Spektren untereinander ist zum einen durch den Abstand von 1 nm begründet, weiterhin verweist dies auf eine homogene Zusammensetzung der Kristalloberfläche. Die Detektion der TERS-Spektren auf dieser Art von Proben erfolgte erstmals mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm.

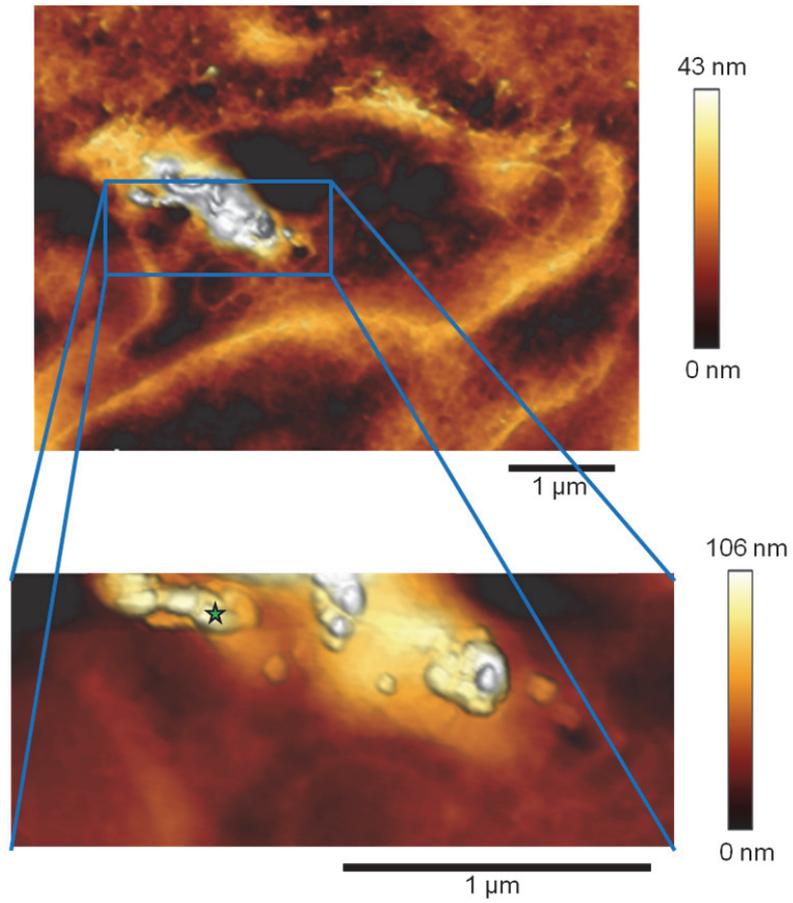


Abbildung 5.2.3: AFM Scans eines mit Malaria infizierten und mit Chloroquin behandelten Erythrozyten (Dünnschnitt). Der obere Teil zeigt einen Übersichtsscan, der untere Teil den Detailscan. Die Position, an der die acht TERS-Spektren aufgenommen wurden, ist mit dem grünen Stern markiert

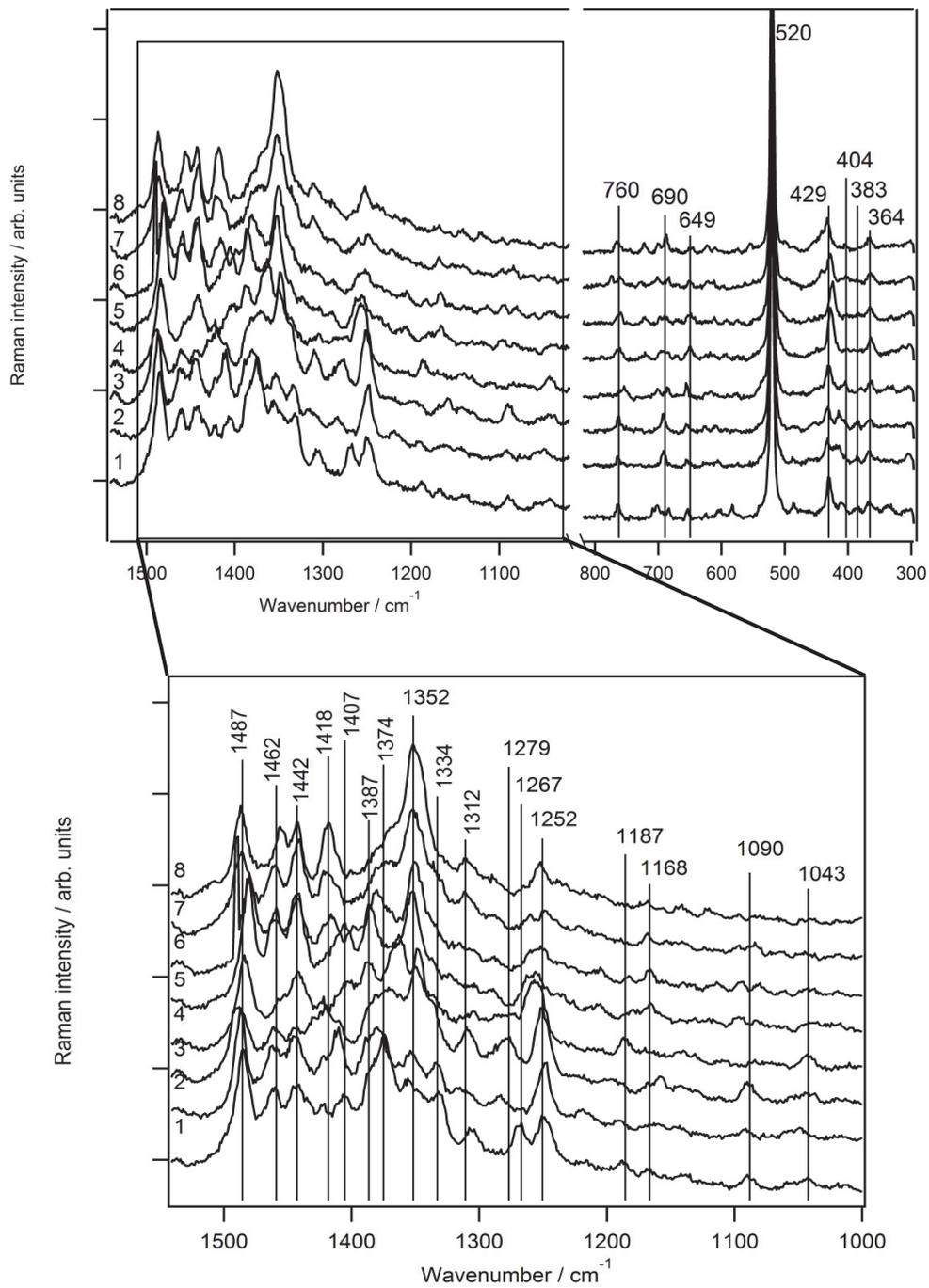


Abbildung 5.2.4: Acht TERS-Spektren ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ,  $p = 1.12 \text{ mW}$ ,  $t = 1 \text{ sec}$ ) mit Bandenbezeichnungen, die auf dem in Abbildung 5.2.2 gekennzeichneten Hämozoïn-Kristall eines mit Malaria infizierten, behandelten Erythrozyten aufgenommen wurden. Der Abstand zwischen den einzelnen Spektren beträgt jeweils  $1 \text{ nm}$ . Der nicht dargestellte Bereich zwischen  $800 \text{ cm}^{-1}$  und  $1000 \text{ cm}^{-1}$  enthält keine spektralen Informationen der Probe

Tabelle 5.2.1: Bandenzuordnung der TERS-Spektren auf Hämозoin

Bandenposition [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung	Bandenposition [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung
306	(sw) [190]	1187	(sw) $\nu$ (C-C), $\nu$ (C-N) [190]
364	(sw) / (m) $\delta$ (C <sub><math>\beta</math></sub> C <sub><math>c</math></sub> C <sub><math>d</math></sub> ) [189, 190, 199]	1252	(m) $\nu_{13}$ [193, 199]
383	(sw) ?	1267	(m) $\nu_{42}$ [190]
404	(sw) / (m) [189]	1279	(m) $\delta$ (CH <sub>2</sub> ) [190, 199]
429	(m) $\delta$ (C <sub><math>\beta</math></sub> C <sub><math>\alpha</math></sub> C <sub><math>\beta</math></sub> ) + $\delta$ (C <sub><math>\beta</math></sub> Me) [199]	1312	(sw) $\nu_{21}$ [190, 193]
520	Silizium (TERS Spitze)	1334	(sw) $\nu_{41}$ [190]
649	(sw) [199]	1352	(st) $\nu_{12}$ [198]
690	(sw) / (m) $\delta$ (Pyr) <sub>sym</sub> [190]	1374	(m) $\nu_4$ [189, 190, 193]
738	(m) [190]	1387	(sw) $\nu_{20}$ [198]
745	(m) $\nu_{16}$ [198]	1407	(sw) $\nu_{29}$ [190]
760	(m) $\nu_{15}$ [189, 190]	1418	(m) [193, 199]
1043	(sw) $\nu_5$ [190]	1442	(m) $\nu_{40}$ [190]
1090	(sw) $\nu_{44}$ [190]	1462	(m) $\nu_{28}$ [190, 193]
1168	(sw) $\nu_{30}$ [190, 199]	1487	(st) $\nu_3$ [190]

Abkürzungen: sw – schwach; m – mittel; st – stark; Pyr – Pyrrol

Bei der Untersuchung der detektierten TERS-Spektren fällt auf, daß die in den Resonanz-Raman-Spektren beobachtete intensive Bande bei 343 cm<sup>-1</sup> ist in den TERS-Spektren auf dem Hämозoin-Kristall des behandelten mit Malaria infizierten Erythrozyten nicht sichtbar ist, die Bande bei 368 / 375 cm<sup>-1</sup> ist jedoch bei 364 cm<sup>-1</sup> vorhanden. Ebenfalls vergleichbar mit dem spektralen Erscheinungsbild in Raman-Spektren ist die Bande bei 404 cm<sup>-1</sup>. Die Banden bei 649 cm<sup>-1</sup> und 690 cm<sup>-1</sup> werden Hämозoin zugeordnet. Eine der intensivsten Banden in Raman-Spektren auf Hämозoin

ist die der Pyrrol Ringatmung bei  $755\text{ cm}^{-1}$  [189]. Sie ist in den TERS-Spektren als schwaches Signal bei  $760\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. Die reduzierte Intensität dieser Bande kann durch Orientierungs-Effekte erklärt werden; fehlende oder sehr schwache Banden der Ringatmungsschwingung wurden schon bei aromatischen Aminosäuren und bei DNA beobachtet und in der Literatur beschrieben [61, 138]. Der Wellenzahlbereich von  $1200\text{ cm}^{-1}$  bis  $1500\text{ cm}^{-1}$  der TERS-Spektren enthält verschiedene intensive Banden, die auch bei Raman-Messungen beobachtet werden. Weiterhin gibt es Ähnlichkeiten zu TERS-Spektren, die mit einer Anregungswellenlänge von  $530\text{ nm}$  auf Hämoxoin-Kristallen aufgenommen wurden. Die Banden bei  $1252\text{ cm}^{-1}$ ,  $1267\text{ cm}^{-1}$ ,  $1312\text{ cm}^{-1}$ ,  $1334\text{ cm}^{-1}$ ,  $1374\text{ cm}^{-1}$ ,  $1407\text{ cm}^{-1}$  und  $1462\text{ cm}^{-1}$  gehören zu den in TERS-Spektren bei beiden Anregungswellenlängen,  $633\text{ nm}$  und  $530\text{ nm}$ , sichtbaren Signalen. Die Bande bei  $1374\text{ cm}^{-1}$  ist nur in dem ersten, unteren Spektrum intensiv sichtbar. Sie ist als Elektronendichte- bzw. Oxidationszustands-Markerbande bekannt, da sie empfindlich gegenüber des Oxidationszustandes des Zentralatoms des Häms, Eisen, ist. Hier zeigt sie an, daß sich das Eisen in dem  $\text{Fe}^{3+}$  befindet. Die intensive Bande bei  $1352\text{ cm}^{-1}$  in den übrigen TERS-Spektren zeigt hingegen den  $\text{Fe}^{2+}$ -Zustand an [196, 200].

Um nun die Banden im niedrigen Wellenzahlbereich zwischen  $300\text{ cm}^{-1}$  und  $800\text{ cm}^{-1}$  genauer zu betrachten, werden zu den bereits diskutierten TERS-Spektren behandelte Malaria-infizierte Zell-Dünnschnitte zusätzlich TERS-Ergebnisse unbehandelte Zellen im relevanten Spektralbereich gezeigt und verglichen. In Abbildung 5.2.5 zeigt die obere AFM-Aufnahme den Dünnschnitt eines unbehandelten Malaria-infizierten Erythrozyten. Das entsprechende TERS-Spektrum wurde in dem mit Stern gekennzeichneten Bereich detektiert und als Spektrum 2 in Abbildung 5.2.5 dargestellt. Spektrum 1 wurde aus Abbildung 5.2.4 übernommen. Es ist dem unteren AFM-Scan des Dünnschnittes der behandelten Malaria-infizierten Zelle zuzuordnen, wie es bereits in Abbildung 5.2.3 gezeigt ist.

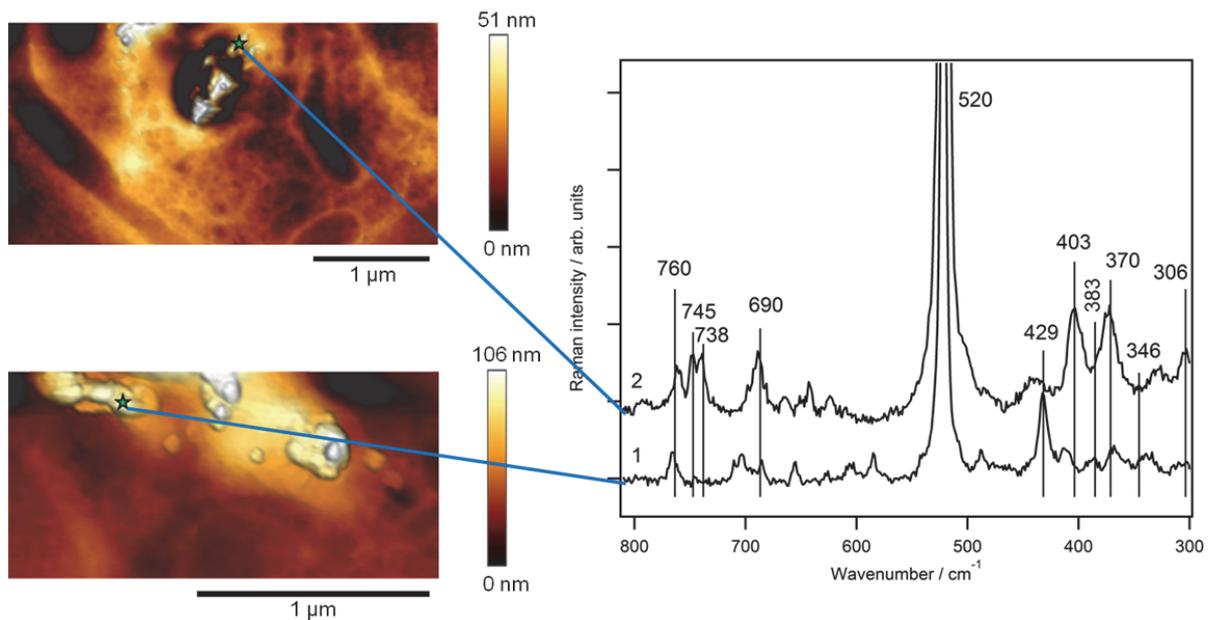


Abbildung 5.2.5: Links: AFM Scans mit Malaria infizierter Erythrozyten; oben unbehandelt, unten behandelt. Rechts: TERS-Spektren, die an den mit grünen Sternen gekennzeichneten Positionen aufgenommen wurden (Spektrum 1:  $\lambda = 633 \text{ nm}$ ,  $p = 1.12 \text{ mW}$ ,  $t = 1 \text{ sec}$ , Spektrum 2:  $\lambda = 633 \text{ nm}$ ,  $p = 1.19 \text{ mW}$ ,  $t = 5 \text{ sec}$ )

Im Vergleich der beiden TERS-Spektren in Abbildung 5.2.5 verhält sich die Pyrrol Ringatmungsmode bei  $760 \text{ cm}^{-1}$  bezüglich ihrer Intensität sehr ähnlich. Große Unterschiede hingegen zeigen die Banden im Wellenzahlbereich zwischen  $300 \text{ cm}^{-1}$  und  $450 \text{ cm}^{-1}$ . Spektrum 2, welches auf dem Hämozoin-Kristall eines unbehandelten mit Malaria infizierten Erythrozyten aufgenommen wurde, ist hier erwartungsgemäß den Resonanz-Raman Spektren recht ähnlich, was auch der Vergleich mit dem oberen Spektrum in Abbildung 5.2.1 zeigt. Die Bande bei  $368 \text{ cm}^{-1}$  erscheint in Spektrum 2 in Abbildung 5.2.5 leicht verschoben bei  $370 \text{ cm}^{-1}$ , ist aber deutlich intensiver als die Pyrrol Ringatmungsmode bei  $760 \text{ cm}^{-1}$ . Im Gegensatz hierzu ist die Bande bei  $370 \text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 1 der behandelten Zelle weniger intensiv als die Pyrrol Ringatmungsmode. Die in Resonanz-Raman Spektren sehr intensive Bande bei  $343 \text{ cm}^{-1}$  ist in dem TERS-Spektrum des unbehandelten Erythrozyten nur schwach bei  $346 \text{ cm}^{-1}$  erkennbar, in dem TERS-Spektrum des behandelten Erythrozyten fehlt sie hingegen vollkommen. Im

Gegensatz dazu ist das in den Raman-Spektren eher schwache Signal bei  $403\text{ cm}^{-1}$  in dem TERS-Spektrum des unbehandelten Erythrozyten verstärkt sichtbar [189]. In dem TERS-Spektrum des behandelten Erythrozyten ist diese Bande nicht vorhanden.

Diese TERS-Experimente, die zum ersten Mal mit einer Anregungswellenlänge von  $633\text{ nm}$  auf Hämozoin-Kristallen von behandelten und unbehandelten mit Malaria infizierten Erythrozyten durchgeführt wurden, zeigen die Anwendbarkeit dieser Methode zur Detektion Morphologie-sensitiver Raman-Moden mit hoher lateraler Auflösung. Das Hauptaugenmerk des Vergleichs behandelter und unbehandelter Zellen liegt dabei auf den Morphologie-sensitiven Moden bei  $343\text{ cm}^{-1}$  und  $368\text{ cm}^{-1}$ , die wie beschrieben dem gesamten Dimer zuzuordnen sind. Es zeigt sich, daß diese Banden auf den behandelten Proben nicht bzw. weniger intensiv detektiert werden konnten. Dies ist ein erster Hinweis auf die Wirkungsweise des Anti-Malaria Wirkstoffes Chloroquin, da es offensichtlich zu einer Unterbindung der Dimer-Bildung auf der Kristalloberfläche gekommen ist. Dadurch zeigen diese Ergebnisse, daß der hochauflösende Charakter der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie neben der Charakterisierung hinreichend kleiner Objekte auch die lokal begrenzte Untersuchung komplexer Proben erlaubt. Zukünftige TERS-Experimente auf behandelten und unbehandelten mit Malaria infizierten Erythrozyten müssen die hier erstmals beschriebenen Beobachtungen bestätigen und eine oberflächensensitive Aussage zur Veränderung der Morphologie des vollständigen Hämozoin-Kristalls liefern.

## 6. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Arbeit haben das breite Potential der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) für die Lokalisation und Strukturaufklärung von DNA aufgezeigt. Durch die Kombination topographischer und hochauflösender spektraler Informationen konnte der Zugang zur Klärung verschiedener Fragestellungen bezüglich der Primär-, wie auch Sekundärstruktur von DNA hergestellt werden. Durch die Verstärkung der Raman-Signale im betrachteten Nahfeld-Bereich unter der Mess-Sonde sind hierzu selbst einzelne DNA-Stränge ausreichend.

Zunächst konnte an Hand eines artifiziellen DNA-Origami erstmals eine DNA-Protein-Unterscheidung mittels TERS realisiert werden. Hierbei wurde die spektrale Differenzierung durch die topographische Information unterstützt und es konnte im Rahmen der gewählten Schrittweite eine Auflösung von 2 - 3 nm erreicht werden. Dies bildet die Grundlage für die Untersuchung von DNA in ihrem nativen Umfeld, wo sie oftmals mit Proteinen assoziiert auftritt.

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit konnten Strukturelemente der DNA selbst beschrieben werden. Diese Experimente zeigen, daß für die Etablierung von TERS für das Verständnis der DNA-Struktur nicht nur ihre lineare Sequenz ausschlaggebend ist, sondern zusätzlich Sekundärstruktur-Elemente eine wichtige Rolle spielen. Dabei konnte erstmals die lokal begrenzte Ausbildung sogenannter Quadruplex-Strukturen in poly-G-Strängen und in  $(A_{10}G_{10})_4$ -Strängen mit Hilfe von TERS aufgezeigt werden. Diese Guanin-Tetraden sind das Ergebnis einer Selbstorganisation von DNA und können durch die Position einer charakteristischen C-N-Streckschwingung im entsprechenden TERS-Spektrum bestimmt werden. Ein analoger Einsatz von TERS zur Bestimmung der Konformation von DNA wird durch die spezifische Detektion der Konformations-Markerbanden des Phosphat-Rückgrades aufgezeigt.

Zusätzlich konnten in dieser Arbeit wichtige Ergebnisse für die Analyse der Primärstruktur von DNA, ihrer Sequenz, gewonnen werden. Mit der Untersuchung eines Kalbsthymus-DNA-Einzelstranges konnte erstmals die Detektion aller vier DNA Basen

auf einem Strang gezeigt werden, obwohl sich diese in ihren Streuquerschnitten deutlich unterscheiden. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für eine DNA-Sequenzierung mit Hilfe von TERS. In einem weiterführenden TERS-Experiment auf einem  $(A_{10}C_{15})_8$ -Einzelstrang konnte anschließend der Basenwechsel von Adenin zu Cytosin schrittweise innerhalb von 2.4 nm spektral abgebildet werden. Zum Einen sind diese Ergebnisse ein Maß für die notwendige Separation zweier DNA-Basen für eine spektrale Differenzierung, zum Anderen wird hierdurch das erreichbare Auflösungsvermögen von TERS beschrieben. Dies liegt mit 2.4 nm unter den für diese Methode angegebenen 5 – 20 nm [118]. Diese Diskrepanz der beschriebenen Auflösungsvermögen erklärt sich durch die konservative Abschätzung in der Literatur, der fortlaufenden Methodenentwicklung, sowie an diese Fragestellung besser angepasste Experimente.

Ergänzt werden die Ergebnisse zur Strukturaufklärung von DNA durch die Untersuchung von Dünnschnitten behandelte und unbehandelte mit Malaria infizierte Erythrozyten mit Hilfe von TERS. Hierdurch konnte das Potential zur lokal begrenzten Charakterisierung komplexer Proben, wie zellulärer Strukturen, gezeigt werden. Im Einzelnen wurden die spektralen Informationen aus Messungen auf Hämzoin-Kristallen verglichen. Dabei wurden Hinweise auf die oberflächensensitive Wirkungsweise des zur Behandlung verwendeten Anti-Malaria Wirkstoffes Chloroquin gefunden. Charakteristische Raman-Markerbanden, welche die Häm-Dimer-Bildung im Hämzoin anzeigen, wurden im Vergleich zur behandelten Probe deutlich schwächer detektiert.

Generell können bis heute durch die hohe technische Komplexität von TERS-Experimenten speziell für die Untersuchung biologischer Proben nur geringe Datenmengen generiert werden. Dies bedingt in den meisten Fällen eine unzureichende statistische Auswertung, so daß auch für die hier vorgestellten Experimente zu empfehlen ist, durch zusätzliche TERS-Messungen das vorhandene Datenvolumen zu vergrößern. Weiterhin sind die in dieser Arbeit diskutierten Untersuchungen Grundlage für darauf aufbauende Experimente. Beispielsweise ist der Nachweis der Ausbildung von Quadruplex-Strukturen entlang der Strangachse eines Guanin-reichen DNA-

Segmentes zu klären, ebenso bildet die Detektion einer isolierten Base zwischen zwei Blöcken definierter Länge einer zweiten Base (zum Beispiel  $(C_{15}A)_n$ ) eine interessante Fragestellung.

## Literatur

1. R. Treffer and V. Deckert, "Recent advances in single-molecule sequencing," *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 4-11 (2010).
2. W. Saenger, W. N. Hunter, and O. Kennard, "DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups," *Nature* **324**, 385-388 (1986).
3. J. D. Watson and F. H. C. Crick, "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid," *Nature* **171**, 737-738 (1953).
4. S. C. Ha, K. Lowenhaupt, A. Rich, Y.-G. Kim, and K. K. Kim, "Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases," *Nature* **437**, 1183-1186 (2005).
5. D. Svozil, J. Kalina, M. Omelka, and B. Schneider, "DNA conformations and their sequence preferences," *Nucl. Acids Res.* **36**, 3690-3706 (2008).
6. R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, and M. L. Kopka, "The anatomy of A-, B-, and Z-DNA," *Science* **216**, 475-485 (1982).
7. B. F. Eichman, G. P. Schroth, B. E. Basham, and P. S. Ho, "The intrinsic structure and stability of out-of-alternation base pairs in Z-DNA," *Nucl. Acids Res.* **27**, 543-550 (1999).
8. M. H. Werner, M. E. Bianchi, A. M. Gronenborn, and G. M. Clore, "NMR Spectroscopic Analysis of the DNA Conformation Induced by the Human Testis Determining Factor SRY," *Biochemistry* **34**, 11998-12004 (1995).
9. A. J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, G. van der Marel, J. H. van Boom, and A. Rich, "Left-handed double helical DNA: variations in the backbone conformation," *Science* **211**, 171-176 (1981).
10. J. Feigon, A. H. Wang, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, and A. Rich, "Z-DNA forms without an alternating purine-pyrimidine sequence in solution," *Science* **230**, 82-84 (1985).
11. K. Y. Wang, S. McCurdy, R. G. Shea, S. Swaminathan, and P. H. Bolton, "A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA," *Biochemistry* **32**, 1899-1904 (1993).
12. K. Y. Wang, S. H. Krawczyk, N. Bischofberger, S. Swaminathan, and P. H. Bolton, "The tertiary structure of a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity," *Biochemistry* **32**, 11285-11292 (1993).
13. R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, and J. Feigon, "Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution," *PNAS* **90**, 3745-3749 (1993).
14. P. Schultze, R. F. Macaya, and J. Feigon, "Three-dimensional Solution Structure of the Thrombin-binding DNA Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG)," *Journal of Molecular Biology* **235**, 1532-1547 (1994).
15. Y. Wang and D. J. Patel, "Solution Structure of a Parallel-stranded G-Quadruplex DNA," *Journal of Molecular Biology* **234**, 1171-1183 (1993).
16. S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, and S. Neidle, "Quadruplex DNA: sequence, topology and structure," *Nucleic Acids Research* **34**, 5402-5415 (2006).

17. K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, and A. Tulinsky, "The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer," *J. Biol. Chem.* **268**, 17651-17654 (1993).
18. B. I. Kankia and L. A. Marky, "Folding of the Thrombin Aptamer into a G-Quadruplex with Sr<sup>2+</sup>: Stability, Heat, and Hydration," *Journal of the American Chemical Society* **123**, 10799-10804 (2001).
19. S. Nagatoishi, Y. Tanaka, and K. Tsumoto, "Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions," *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**, 812-817 (2007).
20. M. Vairamani and M. L. Gross, "G-Quadruplex Formation of Thrombin-Binding Aptamer Detected by Electrospray Ionization Mass Spectrometry," *Journal of the American Chemical Society* **125**, 42-43 (2002).
21. F. Rosu, V. Gabelica, H. Poncelet, and E. De Pauw, "Tetramolecular G-quadruplex formation pathways studied by electrospray mass spectrometry," *Nucl. Acids Res.* **38**, 5217-5225 (2010).
22. G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw, and V. Gabelica, "Electrospray Mass Spectrometry of Telomeric RNA (TERRA) Reveals the Formation of Stable Multimeric G-Quadruplex Structures," *Journal of the American Chemical Society* **132**, 9328-9334 (2010).
23. J.-L. Mergny, A.-T. Phan, and L. Lacroix, "Following G-quartet formation by UV-spectroscopy," *FEBS Letters* **435**, 74-78 (1998).
24. J. A. Mondragon-Sanchez, J. Liquier, R. H. Shafer, and E. Taillandier, "Tetraplex structure formation in the thrombin-binding DNA aptamer by metal cations measured by vibrational spectroscopy," *J. Biomol. Struct. Dyn.* **22**, 365-373 (2004).
25. M. R. Guzmán, J. Liquier, S. K. Brahmachari, and E. Taillandier, "Characterization of parallel and antiparallel G-tetraplex structures by vibrational spectroscopy," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **64**, 495-503 (2006).
26. H. Arthanari, S. Basu, T. L. Kawano, and P. H. Bolton, "Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA," *Nucl. Acids Res.* **26**, 3724-3728 (1998).
27. M. Di Antonio, R. I. Rodriguez, and S. Balasubramanian, "Experimental approaches to identify cellular G-quadruplex structures and functions," *Methods* (2012).
28. T. Miura and G. J. Thomas, "Structural Polymorphism of Telomere DNA: Interquadruplex and Duplex-Quadruplex Conversions Probed by Raman Spectroscopy," *Biochemistry* **33**, 7848-7856 (1994).
29. T. Miura and G. J. Thomas, "Structure and Dynamics of Interstrand Guanine Association in Quadruplex Telomeric DNA," *Biochemistry* **34**, 9645-9654 (1995).
30. L. Laporte and G. J. Thomas, "Structural Basis of DNA Recognition and Mechanism of Quadruplex Formation by the beta Subunit of the Oxytricha Telomere Binding Protein," *Biochemistry* **37**, 1327-1335 (1998).
31. C. Krafft, J. M. Benevides, and G. J. Thomas, "Secondary structure polymorphism in Oxytricha nova telomeric DNA," *Nucl. Acids Res.* **30**, 3981-3991 (2002).

32. C. V. Pagba, S. M. Lane, and S. Wachsmann-Hogiu, "Raman and surface-enhanced Raman spectroscopic studies of the 15-mer DNA thrombin-binding aptamer," *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, 241-247 (2010).
33. C. V. Pagba, S. M. Lane, and S. Wachsmann-Hogiu, "Conformational changes in quadruplex oligonucleotide structures probed by Raman spectroscopy," *Biomed. Opt. Express* **2**, 207-217 (2011).
34. G. Rusciano, A. C. De Luca, G. Pesce, A. Sasso, G. Oliviero, J. Amato, N. Borbone, S. D'Errico, V. Piccialli, G. Piccialli, and L. Mayol, "Label-Free Probing of G-Quadruplex Formation by Surface-Enhanced Raman Scattering," *Analytical Chemistry* **83**, 6849-6855 (2011).
35. A. T. Phan and D. J. Patel, "Two-Repeat Human Telomeric d(TAGGGTTAGGGT) Sequence Forms Interconverting Parallel and Antiparallel G-Quadruplexes in Solution: Distinct Topologies, Thermodynamic Properties, and Folding/Unfolding Kinetics," *Journal of the American Chemical Society* **125**, 15021-15027 (2003).
36. K. Dörre, S. Brakmann, M. Brinkmeier, K.-T. Han, K. Riebeseel, P. Schwille, J. Stephan, T. Wetzel, M. Lapczynska, M. Stuke, R. Bader, M. Hinz, H. Seliger, J. Holm, M. Eigen, and R. Rigler, "Techniques for single molecule sequencing," *Bioimaging* **5**, 139-152 (1997).
37. R. Treffer, R. Böhme, T. Deckert-Gaudig, K. Lau, S. Tiede, X. Lin, and V. Deckert, "Advances in TERS (tip-enhanced Raman scattering) for biochemical applications," *Biochemical Society Transactions* **40**(2012).
38. "Visigen Biotechnologies Houston, TX, USA", retrieved <http://visigenbio.com/>.
39. I. Braslavsky, B. Hebert, E. Kartalov, and S. R. Quake, "Sequence information can be obtained from single DNA molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3960-3964 (2003).
40. A. Kahvejian and S. Kellett, "Making Single-Molecule Sequencing a Reality," *American Laboratory* **40**, 48-53 (2008).
41. D. Lipson, T. Raz, A. Kieu, D. R. Jones, E. Giladi, E. Thayer, J. F. Thompson, S. Letovsky, P. Milos, and M. Causey, "Quantification of the yeast transcriptome by single-molecule sequencing," *Nat Biotech* **27**, 652-658 (2009).
42. T. D. Harris, P. R. Buzby, H. Babcock, E. Beer, J. Bowers, I. Braslavsky, M. Causey, J. Colonell, J. DiMeo, J. W. Efcavitch, E. Giladi, J. Gill, J. Healy, M. Jarosz, D. Lapen, K. Moulton, S. R. Quake, K. Steinmann, E. Thayer, A. Tyurina, R. Ward, H. Weiss, and Z. Xie, "Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome," *Science* **320**, 106-109 (2008).
43. D. Pushkarev, N. F. Neff, and S. R. Quake, "Single-molecule sequencing of an individual human genome," *Nat Biotech* **27**, 847-850 (2009).
44. "Pacific Biosciences, PacBio, Menlo Park, CA, USA", retrieved <http://www.pacificbiosciences.com>.
45. J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. deWinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K.

- Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach, and S. Turner, "Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules," *Science* **323**, 133-138 (2009).
46. M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, and W. W. Webb, "Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations," *Science* **299**, 682-686 (2003).
  47. P. K. Gupta, "Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research," *Trends in Biotechnology* **26**, 602-611 (2008).
  48. J. Clarke, H.-C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, and H. Bayley, "Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing," *Nat Nano* **4**, 265-270 (2009).
  49. D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, and J. A. Schloss, "The potential and challenges of nanopore sequencing," *Nat Biotech* **26**, 1146-1153 (2008).
  50. W. J. Greenleaf and S. M. Block, "Single-Molecule, Motion-Based DNA Sequencing Using RNA Polymerase," *Science* **313**, 801 (2006).
  51. "ZS Genetics North Reading, MA, USA", retrieved <http://zsgenetics.com/application/GenSeq/index.html>.
  52. E. Shafir, H. Cohen, A. Calzolari, C. Cavazzoni, D. A. Ryndyk, G. Cuniberti, A. Kotlyar, R. Di Felice, and D. Porath, "Electronic structure of single DNA molecules resolved by transverse scanning tunnelling spectroscopy," *Nat Mater* **7**, 68-74 (2008).
  53. H. Tanaka and T. Kawai, "Partial sequencing of a single DNA molecule with a scanning tunnelling microscope," *Nat Nano* **4**, 518-522 (2009).
  54. X. Yang, X.-B. Wang, E. R. Vorpapel, and L.-S. Wang, "Direct experimental observation of the low ionization potentials of guanine in free oligonucleotides by using photoelectron spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17588-17592 (2004).
  55. H. Watanabe, Y. Ishida, N. Hayazawa, Y. Inouye, and S. Kawata, "Tip-enhanced near-field Raman analysis of tip-pressurized adenine molecule," *Phys. Rev. B* **69**, 155418 (2004).
  56. A. Rasmussen and V. Deckert, "Surface- and tip-enhanced Raman scattering of DNA components," *J. Raman Spectrosc.* **37**, 311-317 (2006).
  57. K. F. Domke, D. Zhang, and B. Pettinger, "Tip-Enhanced Raman Spectra of Picomole Quantities of DNA Nucleobases at Au(111)," *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6708-6709 (2007).
  58. A. Taguchi, N. Hayazawa, K. Furusawa, H. Ishitobi, and S. Kawata, "Deep-UV tip-enhanced Raman scattering," *Journal of Raman Spectroscopy* **40**, 1324-1330 (2009).
  59. D. Zhang, K. F. Domke, and B. Pettinger, "Tip-Enhanced Raman Spectroscopic Studies of the Hydrogen Bonding between Adenine and Thymine Adsorbed on Au (111)," *ChemPhysChem* **11**, 1662-1665 (2010).

60. E. Bailo and V. Deckert, "Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Single RNA Strands: Towards a Novel Direct-Sequencing Method," *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 1658-1661 (2008).
61. R. Treffer, X. Lin, E. Bailo, T. Deckert-Gaudig, and V. Deckert, "Distinction of nucleobases – a tip-enhanced Raman approach," *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2**, 628-637 (2011).
62. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 6 ed. (Spektrum Akademischer Verlag, 2007).
63. J. E. Johnson, J. S. Smith, M. L. Kozak, and F. B. Johnson, "In vivo veritas: Using yeast to probe the biological functions of G-quadruplexes," *Biochimie* **90**, 1250-1263 (2008).
64. D. Sen and W. Gilbert, "Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis," *Nature* **334**, 364-366 (1988).
65. J. T. Nielsen, K. Arar, and M. Petersen, "NMR solution structures of LNA (locked nucleic acid) modified quadruplexes," *Nucl. Acids Res.* **34**, 2006-2014 (2006).
66. W. O. Tucker, K. T. Shum, and J. A. Tanner, "G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Application," *Current Pharmaceutical Design* **18**, 2014-2026 (2012).
67. S. Neidle and G. Parkinson, "Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery," *Nat Rev Drug Discov* **1**, 383-393 (2002).
68. E. M. Rezler, D. J. Bearss, and L. H. Hurley, "Telomere inhibition and telomere disruption as processes for drug targeting," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 359-379 (2003).
69. N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, and J. W. Shay, "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer," *Science* **266**, 2011-2015 (1994).
70. P. J. Bates, J. B. Kahlon, S. D. Thomas, J. O. Trent, and D. M. Miller, "Antiproliferative Activity of G-rich Oligonucleotides Correlates with Protein Binding," *J. Biol. Chem.* **274**, 26369-26377 (1999).
71. M. Koizumi, R. Koga, H. Hotoda, T. Ohmine, H. Furukawa, T. Agatsuma, T. Nishigaki, K. Abe, T. Kosaka, S. Tsutsumi, J. Sone, M. Kaneko, S. Kimura, and K. Shimada, "Biologically active oligodeoxyribonucleotides. Part 11: The least phosphate-modification of quadruplex-forming hexadeoxyribonucleotide TGGGAG, bearing 3'- and 5'-end-modification, with anti-HIV-1 activity," *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **6**, 2469-2475 (1998).
72. G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, "Atomic Force Microscope," *Physical Review Letters* **56**, 930-933 (1986).
73. D. J. Müller and Y. F. Dufrene, "Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology," *Nat Nano* **3**, 261-269 (2008).
74. L. Gross, F. Mohn, N. Moll, P. Liljeroth, and G. Meyer, "The Chemical Structure of a Molecule Resolved by Atomic Force Microscopy," *Science* **325**, 1110-1114 (2009).

75. J. Mou, D. M. Czajkowsky, Y. Zhang, and Z. Shao, "High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix," *FEBS Letters* **371**, 279-282 (1995).
76. M. J. Allen, E. M. Bradbury, and R. Balhorn, "AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica," *Nucleic Acids Research* **25**, 2221-2226 (1997).
77. H. Sanchez, Y. Suzuki, M. Yokokawa, K. Takeyasu, and C. Wyman, "Protein-DNA interactions in high speed AFM: single molecule diffusion analysis of human RAD54," *Integrative Biology* **3**, 1127-1134 (2011).
78. T. E. Fisher, P. E. Marszalek, and J. M. Fernandez, "Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope," *Nat Struct Mol Biol* **7**, 719-724 (2000).
79. J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, "Stretching DNA and RNA to probe their interactions with proteins," *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 266-274 (2003).
80. U. Jayasooriya and R. Jenkins, "Introduction to Raman Spectroscopy," in *An Introduction to Laser Spectroscopy*, D. Andrews and A. Demidov, eds. (Springer US, 2002), pp. 77-104.
81. J. Kneipp, H. Kneipp, and K. Kneipp, "SERS-a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics," *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1052-1060 (2008).
82. S. Pahlow, A. März, B. Seise, K. Hartmann, I. Freitag, E. Kämmer, R. Böhme, V. Deckert, K. Weber, D. Cialla, and J. Popp, "Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy," *Engineering in Life Sciences* **12**, 131-143 (2012).
83. D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, and J. Popp, "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends," *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 27-54 (2012).
84. M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163-166 (1974).
85. D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne, "Surface Raman spectroelectrochemistry. Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **84**, 1-20 (1977).
86. M. G. Albrecht and J. A. Creighton, "Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode," *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215-5217 (1977).
87. K. A. Willets and R. P. Van Duyne, "Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing," *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267-297 (2007).
88. M. Kerker, D.-S. Wang, and H. Chew, "Surface enhanced Raman scattering (SERS) by molecules adsorbed at spherical particles: errata," *Appl. Opt.* **19**, 4159-4174 (1980).
89. L. Jensen, C. M. Aikens, and G. C. Schatz, "Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering," *Chemical Society reviews* **37**, 1061-1073 (2008).
90. B. Pettinger, "Single-molecule surface- and tip-enhanced raman spectroscopy," *Mol. Phys.* **108**, 2039-2059 (2010).
91. M. Tsen and L. Sun, "Surface-enhanced Raman scattering from functionalized self-assembled monolayers: Part 1. Distance dependence of enhanced Raman

- scattering from a terminal phenyl group," *Analytica Chimica Acta* **307**, 333-340 (1995).
92. D. Cialla, J. Petschulat, U. Hübner, H. Schneidewind, M. Zeisberger, R. Mattheis, T. Pertsch, M. Schmitt, R. Möller, and J. Popp, "Investigation on the Second Part of the Electromagnetic SERS Enhancement and Resulting Fabrication Strategies of Anisotropic Plasmonic Arrays," *ChemPhysChem* **11**, 1918-1924 (2010).
  93. A. Otto, "The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering," *J. Raman Spectrosc.* **36**, 497-509 (2005).
  94. E. J. Ayars, H. D. Hallen, and C. L. Jahncke, "Electric Field Gradient Effects in Raman Spectroscopy," *Physical Review Letters* **85**, 4180 (2000).
  95. M. Moskovits and J. S. Suh, "Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver," *J. Phys. Chem.* **88**, 5526-5530 (1984).
  96. X. Gao, J. P. Davies, and M. J. Weaver, "Test of surface selection rules for surface-enhanced Raman scattering: the orientation of adsorbed benzene and monosubstituted benzenes on gold," *The Journal of Physical Chemistry* **94**, 6858-6864 (1990).
  97. T. Dörfer, M. Schmitt, and J. Popp, "Deep-UV surface-enhanced Raman scattering," *Journal of Raman Spectroscopy* **38**, 1379-1382 (2007).
  98. D. Cialla, U. Hübner, H. Schneidewind, R. Möller, and J. Popp, "Probing innovative microfabricated substrates for their reproducible SERS activity," *ChemPhysChem* **9**, 758-762 (2008).
  99. S. J. Oldenburg, S. L. Westcott, R. D. Averitt, and N. J. Halas, "Surface enhanced Raman scattering in the near infrared using metal nanoshell substrates," *The Journal of Chemical Physics* **111**, 4729-4735 (1999).
  100. R. Liu, Y. Xiong, W. Tang, Y. Guo, X. Yan, and M. Si, "Near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy (NIR-SERS) studies on oxyhemoglobin (OxyHb) of liver cancer based on PVA-Ag nanofilm," *Journal of Raman Spectroscopy* **44**, 362-369 (2013).
  101. N. G. Greeneltch, A. S. Davis, N. A. Valley, F. Casadio, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, and N. C. Shah, "Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (NIR-SERS) for the Identification of Eosin Y: Theoretical Calculations and Evaluation of Two Different Nanoplasmonic Substrates," *The Journal of Physical Chemistry A* **116**, 11863-11869 (2012).
  102. G. C. Schatz and R. P. van Duyne, "Electromagnetic Mechanism of Surface-enhanced Spectroscopy," *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (Wiley & Sons, Chichester) **1**, 759-774 (2002).
  103. A. J. Haes, C. L. Haynes, A. D. McFarland, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, and S. Zou, "Plasmonic Materials for Surface-Enhanced Sensing and Spectroscopy," *MRS Bulletin* **30**, 368-375 (2005).
  104. J. C. Hulteen and R. P. Van Duyne, "Nanosphere lithography: A materials general fabrication process for periodic particle array surfaces," *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* **13**, 1553-1558 (1995).

105. S. Mahajan, J. J. Baumberg, A. E. Russell, and P. N. Bartlett, "Reproducible SERRS from structured gold surfaces," *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 6016-6020 (2007).
106. L. Baia, M. Baia, J. Popp, and S. Astilean, "Gold Films Deposited over Regular Arrays of Polystyrene Nanospheres as Highly Effective SERS Substrates from Visible to NIR," *J. Phys. Chem. B* **110**, 23982-23986 (2006).
107. X. Zhang, J. Zhao, A. V. Whitney, J. W. Elam, and R. P. Van Duyne, "Ultrastable Substrates for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Overlayers Fabricated by Atomic Layer Deposition Yield Improved Anthrax Biomarker Detection," *Journal of the American Chemical Society* **128**, 10304-10309 (2006).
108. D. Cialla, R. Siebert, U. Hübner, R. Möller, H. Schneidewind, R. Mattheis, J. Petschulat, A. Tünnermann, T. Pertsch, B. Dietzek, and J. Popp, "Ultrafast plasmon dynamics and evanescent field distribution of reproducible surface-enhanced Raman-scattering substrates," *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**, 1811-1818 (2009).
109. U. Huebner, R. Boucher, H. Schneidewind, D. Cialla, and J. Popp, "Microfabricated SERS-arrays with sharp-edged metallic nanostructures," *Microelectron. Eng. FIELD Full Journal Title:Microelectronic Engineering* **85**, 1792-1794 (2008).
110. P. C. Lee and D. Meisel, "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols," *J. Phys. Chem.* **86**, 3391-3395 (1982).
111. A. März, B. Mönch, P. Rösch, M. Kiehntopf, T. Henkel, and J. Popp, "Detection of thiopurine methyltransferase activity in lysed red blood cells by means of lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LOC-SERS)," *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**, 2755-2761 (2011).
112. E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin, "Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy," *Annual Review of Physical Chemistry* **63**, 65-87 (2012).
113. S. Nie and S. R. Emory, "Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering," *Science* **275**, 1102-1106 (1997).
114. J. Wessel, "Surface-enhanced optical microscopy," *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **2**, 1538-1541 (1985).
115. R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, and R. Zenobi, "Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **318**, 131-136 (2000).
116. N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, and S. Kawata, "Metallized tip amplification of near-field Raman scattering," *Opt. Commun.* **183**, 333-336 (2000).
117. M. S. Anderson, "Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope," *Appl. Phys. Lett.* **76**, 3130-3132 (2000).
118. E. Bailo and V. Deckert, "Tip-enhanced Raman scattering," *Chem. Soc. Rev.* **37**, 921-930 (2008).
119. D. Roy, J. Wang, and C. Williams, "Novel methodology for estimating the enhancement factor for tip-enhanced Raman spectroscopy," *Journal of Applied Physics* **105**, 013530-013536 (2009).
120. E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, and P. G. Etchegoin, "Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study," *J. Phys. Chem. C* **111**, 13794-13803 (2007).

121. J. Steidtner and B. Pettinger, "Tip-Enhanced Raman Spectroscopy and Microscopy on Single Dye Molecules with 15 nm Resolution," *Phys. Rev. Lett.* **100**, 236101/236101-236101/236104 (2008).
122. C. C. Neacsu, J. Dreyer, N. Behr, and M. B. Raschke, "Scanning-probe Raman spectroscopy with single-molecule sensitivity," *Physical Review B* **73**, 193406 (2006).
123. N. Anderson, A. Hartschuh, S. Cronin, and L. Novotny, "Nanoscale Vibrational Analysis of Single-Walled Carbon Nanotubes," *Journal of American Chemical Society* **127**, 2533-2537 (2005).
124. I. O. Maciel, N. Anderson, M. A. Pimenta, A. Hartschuh, H. Qian, M. Terrones, H. Terrones, J. Campos-Delgado, A. M. Rao, L. Novotny, and A. Jorio, "Electron and phonon renormalization near charged defects in carbon nanotubes," *Nat Mater* **7**, 878-883 (2008).
125. T. Ichimura, S. Fujii, P. Verma, T. Yano, Y. Inouye, and S. Kawata, "Subnanometric Near-Field Raman Investigation in the Vicinity of a Metallic Nanostructure," *Physical Review Letters* **102**, 186101 (2009).
126. A. Tarun, N. Hayazawa, and S. Kawata, "Tip-enhanced Raman spectroscopy for nanoscale strain characterization," *Anal Bioanal Chem* **394**, 1775-1785 (2009).
127. D. Roy, J. Wang, and M. E. Welland, "Nanoscale imaging of carbon nanotubes using tip enhanced Raman spectroscopy in reflection mode," *Faraday Discuss.* **132**, 215-225 (2006).
128. R. Böhme, M. Richter, D. Cialla, P. Rösch, V. Deckert, and J. Popp, "Towards a specific characterisation of components on a cell surface—combined TERS-investigations of lipids and human cells," *J. Raman Spectrosc.* **40**, 1452-1457 (2009).
129. M. Richter, M. Hedegaard, T. Deckert-Gaudig, P. Lampen, and V. Deckert, "Laterally Resolved and Direct Spectroscopic Evidence of Nanometer-Sized Lipid and Protein Domains on a Single Cell," *Small* **7**, 209-214 (2011).
130. U. Neugebauer, P. Rösch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. Rasmussen, C. Budich, and V. Deckert, "On the Way to Nanometer-Sized Information of the Bacterial Surface by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy," *ChemPhysChem* **7**, 1428-1430 (2006).
131. T. Deckert-Gaudig, R. Böhme, E. Freier, A. Sebesta, T. Merkendorf, J. Popp, K. Gerwert, and V. Deckert, "Nanoscale distinction of membrane patches – a TERS study of *Halobacterium salinarum*," *Journal of Biophotonics* **5**, 582-591 (2012).
132. R. Böhme, M. Mkandawire, U. Krause-Buchholz, P. Rösch, G. Rödel, J. Popp, and V. Deckert, "Characterizing cytochrome c states - TERS studies of whole mitochondria," *Chem. Commun.* **47**, 11453-11455 (2011).
133. D. Cialla, T. Deckert-Gaudig, C. Budich, M. Laue, R. Möller, D. Naumann, V. Deckert, and J. Popp, "Raman to the limit: tip-enhanced Raman spectroscopy investigations of a single tobacco mosaic virus," *J. Raman Spectrosc.* **40**, 240-243 (2009).
134. P. Hermann, A. Hermelink, V. Lausch, G. Holland, L. Moeller, N. Bannert, and D. Naumann, "Evaluation of tip-enhanced Raman spectroscopy for characterizing different virus strains," *Analyst* **136**, 1148-1152 (2011).

135. C. Gullekson, L. Lucas, K. Hewitt, and L. Kreplak, "Surface-Sensitive Raman Spectroscopy of Collagen I Fibrils," *Biophys. J.* **100**, 1837-1845 (2011).
136. T. Deckert-Gaudig, E. Kämmer, and V. Deckert, "Tracking of nanoscale structural variations on a single amyloid fibril with tip-enhanced Raman scattering," *Journal of Biophotonics* **5**, 215-219 (2012).
137. T. Deckert-Gaudig, E. Bailo, and V. Deckert, "Tip-enhanced Raman scattering (TERS) of oxidised glutathione on an ultraflat gold nanoplate," *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 7360-7362 (2009).
138. T. Deckert-Gaudig, E. Rauls, and V. Deckert, "Aromatic Amino Acid Monolayers Sandwiched between Gold and Silver: A Combined Tip-Enhanced Raman and Theoretical Approach " *J. Phys. Chem. C* **114**, 7412-7420 (2009).
139. T. Deckert-Gaudig and V. Deckert, "Tip-enhanced Raman scattering studies of histidine on novel silver substrates," *Journal of Raman Spectroscopy* **40**, 1446-1451 (2009).
140. D. Mehtani, N. Lee, R. D. Hartschuh, A. Kisliuk, M. D. Foster, A. P. Sokolov, and J. F. Maguire, "Nano-Raman spectroscopy with side-illumination optics," *J. Raman Spectrosc.* **36**, 1068-1075 (2005).
141. J. Stadler, T. Schmid, and R. Zenobi, "Nanoscale Chemical Imaging Using Top-Illumination Tip-Enhanced Raman Spectroscopy," *Nano Lett.* **10**, 4514-4520 (2010).
142. Z. D. Schultz, S. J. Stranick, and I. W. Levin, "Tip-Enhanced Raman Spectroscopy and Imaging: An Apical Illumination Geometry," *Applied Spectroscopy* **62**, 1173-1179 (2008).
143. D. Zhang, X. Wang, K. Braun, H.-J. Egelhaaf, M. Fleischer, L. Hennemann, H. Hintz, C. Stanciu, C. J. Brabec, D. P. Kern, and A. J. Meixner, "Parabolic mirror-assisted tip-enhanced spectroscopic imaging for non-transparent materials," *Journal of Raman Spectroscopy* **40**, 1371-1376 (2009).
144. M. Sackrow, C. Stanciu, M. A. Lieb, and A. J. Meixner, "Imaging Nanometre-Sized Hot Spots on Smooth Au Films with High-Resolution Tip-Enhanced Luminescence and Raman Near-Field Optical Microscopy," *ChemPhysChem* **9**, 316-320 (2008).
145. J. Steidtner and B. Pettinger, "High-resolution microscope for tip-enhanced optical processes in ultrahigh vacuum," *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 103104/103101-103104/103108 (2007).
146. C. C. Neacsu, S. Berweger, R. L. Olmon, L. V. Saraf, C. Ropers, and M. B. Raschke, "Near-Field Localization in Plasmonic Superfocusing: A Nanoemitter on a Tip," *Nano Letters* **10**, 592-596 (2010).
147. B. Ren, G. Picardi, B. Pettinger, R. Schuster, and G. Ertl, "Tip-enhanced raman spectroscopy of benzenethiol adsorbed on Au and Pt single-crystal surfaces," *Angew. Chem., Int. Ed.* **44**, 139-142 (2005).
148. Y. You, N. A. Purnawirman, H. Hu, J. Kasim, H. Yang, C. Du, T. Yu, and Z. Shen, "Tip-enhanced Raman spectroscopy using single-crystalline Ag nanowire as tip," *J. Raman Spectrosc.* **41**, 1156-1162 (2010).
149. E. G. Bortchagovsky, S. Klein, and U. C. Fischer, "Surface plasmon mediated tip enhanced Raman scattering," *Applied Physics Letters* **94**, 063118-063113 (2009).

150. S. Klein, J. Reichert, H. Fuchs, and U. Fischer, "Near-field Raman spectroscopy using a tetrahedral SNOM tip," *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **6195**, 61951F/61951-61951F/61957 (2006).
151. B. Saccà and C. M. Niemeyer, "DNA Origami: The Art of Folding DNA," *Angewandte Chemie International Edition* **51**, 58-66 (2012).
152. A.-P. Eskelinen, A. Kuzyk, T. K. Kaltiaisenaho, M. Y. Timmermans, A. G. Nasibulin, E. I. Kauppinen, and P. Törmä, "Assembly of Single-Walled Carbon Nanotubes on DNA-Origami Templates through Streptavidin–Biotin Interaction," *Small* **7**, 746-750 (2011).
153. C. Fagnano, A. Torreggiani, and G. Fini, "Raman spectroscopic studies of the anhydrous complexes of avidin and streptavidin with biotin," *Biospectroscopy* **2**, 225-232 (1996).
154. C. Otto, T. J. J. Vandentweel, F. F. M. Demul, and J. Greve, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA Bases," *Journal of Raman Spectroscopy* **17**, 289-298 (1986).
155. W. Ke, D. Zhou, J. Wu, and K. Ji, "Surface-Enhanced Raman Spectra of Calf Thymus DNA Adsorbed on Concentrated Silver Colloid," *Applied Spectroscopy* **59**, 418-423 (2005).
156. N. H. Jang, "The coordination chemistry of DNA nucleosides on gold nanoparticles as a probe by SERS," *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**, 11 (2002).
157. M. Green, F.-M. Liu, L. Cohen, P. Kollensperger, and T. Cass, "SERS platforms for high density DNA arrays," *Faraday Discuss.* **132**, 269-280 (2006).
158. L. Movileanu, J. M. Benevides, and G. J. Thomas, "Temperature dependence of the Raman spectrum of DNA. Part I—Raman signatures of premelting and melting transitions of poly(dA–dT)·poly(dA–dT)," *J. Raman Spectrosc.* **30**, 637-649 (1999).
159. Y. Badr and M. A. Mahmoud, "Effect of silver nanowires on the surface-enhanced Raman spectra (SERS) of the RNA bases," *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **63**, 639-645 (2006).
160. R. Escobar, P. Carmona, and M. Molina, "Raman spectroscopic determination of thymidine nucleoside structures in nucleotides," *Analyst* **121**, 105-109 (1996).
161. T. Deckert-Gaudig, E. Rauls, and V. Deckert, "Aromatic Amino Acid Monolayers Sandwiched between Gold and Silver: A Combined Tip-Enhanced Raman and Theoretical Approach " *J. Phys. Chem. C* **114**, 7412-7420 (2010).
162. B. Giese and D. McNaughton, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopic and Density Functional Theory Study of Adenine Adsorption to Silver Surfaces," *J. Phys. Chem. B* **106**, 101-112 (2002).
163. A. Torreggiani and G. Fini, "The binding of biotin analogues by streptavidin: A Raman spectroscopic study," *Biospectroscopy* **4**, 197-208 (1998).
164. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. (Springer, 2006).
165. A. Arakaki, S. Hideshima, T. Nakagawa, D. Niwa, T. Tanaka, T. Matsunaga, and T. Osaka, "Detection of biomolecular interaction between biotin and streptavidin on a self-assembled monolayer using magnetic nanoparticles," *Biotechnology and Bioengineering* **88**, 543-546 (2004).

166. F. Liu, H. Gu, X. Yuan, Y. Lin, and X. Dong, "Chloride ion-dependent surface-enhanced Raman scattering study of biotin on the silver surface," *Journal of Physics: Conference Series* **277**, 012025 (2011).
167. G. J. Thomas Jr, J. M. Benevides, S. A. Overman, T. Ueda, K. Ushizawa, M. Saitoh, and M. Tsuboi, "Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations," *Biophysical Journal* **68**, 1073-1088 (1995).
168. R. Böhme, D. Cialla, M. Richter, P. Rosch, J. Popp, and V. Deckert, "Biochemical imaging below the diffraction limit--probing cellular membrane related structures by tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS)," *J. Biophoton.* **3**, 455-461 (2010).
169. H. Watanabe, Y. Ishida, N. Hayazawa, Y. Inouye, and S. Kawata, "Tip-enhanced near-field Raman analysis of tip-pressurized adenine molecule," *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **69**, 155418/155411-155418/155411 (2004).
170. J. Clarkson, D. N. Batchelder, and D. A. Smith, "UV resonance Raman study of streptavidin binding of biotin and 2-iminobiotin: Comparison with avidin," *Biopolymers* **62**, 307-314 (2001).
171. M. A. Keniry, "Quadruplex structures in nucleic acids," *Biopolymers* **56**, 123-146 (2000).
172. J. T. Davis, "G-Quartets 40 Years Later: From 5'-GMP to Molecular Biology and Supramolecular Chemistry," *Angewandte Chemie International Edition* **43**, 668-698 (2004).
173. M. A. Ochsenkühn and C. J. Campbell, "Probing biomolecular interactions using surface enhanced Raman spectroscopy: label-free protein detection using a G-quadruplex DNA aptamer," *Chemical Communications* **46**, 2799-2801 (2010).
174. T. Miura, J. M. Benevides, and G. J. Thomas Jr, "A phase diagram for sodium and potassium ion control of polymorphism in telomeric DNA," *Journal of Molecular Biology* **248**, 233-238 (1995).
175. A. B. Kotlyar, N. Borovok, T. Molotsky, H. Cohen, E. Shapir, and D. Porath, "Long, Monomolecular Guanine-Based Nanowires," *Advanced Materials* **17**, 1901-1905 (2005).
176. R. Santamaria, E. Charro, A. Zacarías, and M. Castro, "Vibrational spectra of nucleic acid bases and their Watson-Crick pair complexes," *Journal of Computational Chemistry* **20**, 511-530 (1999).
177. J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenabeele, and L. Moens, "Reference database of Raman spectra of biological molecules," *Journal of Raman Spectroscopy* **38**, 1133-1147 (2007).
178. A. Abu-Arish, D. Frenkiel-Krispin, T. Fricke, T. Tzfira, V. Citovsky, S. G. Wolf, and M. Elbaum, "Three-dimensional Reconstruction of Agrobacterium VirE2 Protein with Single-stranded DNA," *Journal of Biological Chemistry* **279**, 25359-25363 (2004).
179. A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, and N. J. Halas, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA," *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5523-5529 (2008).
180. B.-S. Yeo, J. Stadler, T. Schmid, R. Zenobi, and W. Zhang, "Tip-enhanced Raman Spectroscopy - Its status, challenges and future directions," *Chem. Phys. Lett.* **472**, 1-13 (2009).

181. D. Zhang, K. F. Domke, and B. Pettinger, "Tip-Enhanced Raman Spectroscopic Studies of the Hydrogen Bonding between Adenine and Thymine Adsorbed on Au(111)," *ChemPhysChem* **11**, 1662-1665 (2010).
182. S. Sánchez-Cortés and J. V. Garcia-Ramos, "SERS of cytosine and its methylated derivatives on metal colloids," *Journal of Raman Spectroscopy* **23**, 61-66 (1992).
183. C. Budich, U. Neugebauer, J. Popp, and V. Deckert, "Cell wall investigations utilizing tip-enhanced Raman scattering," *J. Microsc.* **229**, 533-539 (2008).
184. A. Downes, D. Salter, and A. Elfick, "Finite Element Simulations of Tip-Enhanced Raman and Fluorescence Spectroscopy," *J. Phys. Chem. B* **110**, 6692-6698 (2006).
185. "World Malaria Report 2011" (WHO Press, World Health Organization), retrieved 2013.
186. "Malaria (Fact sheet N°94)" (WHO Media centre, January 2013), retrieved 2013.
187. N. J. White, "Artemisinin resistance - the clock is ticking," *The Lancet* **376**, 2051-2052 (2010).
188. I. M. Hastings, P. G. Bray, and S. A. Ward, "A Requiem for Chloroquine," *Science* **298**, 74-75 (2002).
189. T. Frosch, S. Koncarevic, K. Becker, and J. Popp, "Morphology-sensitive Raman modes of the malaria pigment hemozoin," *Analyst* **134**, 1126-1132 (2009).
190. T. Frosch, S. Koncarevic, L. Zedler, M. Schmitt, K. Schenzel, K. Becker, and J. Popp, "In situ localization and structural analysis of the malaria pigment hemozoin," *J Phys Chem B* **111**, 11047-11056 (2007).
191. D. E. Goldberg, "Hemoglobin degradation in Plasmodium-infected red blood cells," *Seminars in Cell Biology* **4**, 355-361 (1993).
192. S. Pagola, P. W. Stephens, D. S. Bohle, A. D. Kosar, and S. K. Madsen, "The structure of malaria pigment  $\beta$ -haematin," *Nature* **404**, 307-310 (2000).
193. B. R. Wood, E. Bailo, M. A. Khiavi, L. Tilley, S. Deed, T. Deckert-Gaudig, D. McNaughton, and V. Deckert, "Tip-Enhanced Raman Scattering (TERS) from Hemozoin Crystals within a Sectioned Erythrocyte," *Nano Lett.* **11**, 1868-1873 (2011).
194. B. R. Wood, E. Bailo, M. A. Khiavi, L. Tilley, S. Deed, T. Deckert-Gaudig, D. McNaughton, and V. Deckert, "Tip-Enhanced Raman Scattering (TERS) from Hemozoin Crystals within a Sectioned Erythrocyte," *Nano Letters* **11**, 1868-1873 (2011).
195. T. G. Spiro, *Biological Applications of Raman Spectroscopy* (John Wiley & Sons Canada, Limited, 1988).
196. T. Yamamoto, G. Palmer, D. Gill, I. T. Salmeen, and L. Rimai, "The Valence and Spin State of Iron in Oxyhemoglobin as Inferred from Resonance Raman Spectroscopy," *Journal of Biological Chemistry* **248**, 5211-5213 (1973).
197. T. C. Streckas and T. G. Spiro, "Hemoglobin resonance Raman excitation profiles with a tunable dye laser," *Journal of Raman Spectroscopy* **1**, 387-392 (1973).
198. M. Abe, T. Kitagawa, and Y. Kyogoku, "Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and meso-deuterated and  $^{15}\text{N}$  substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis," *The Journal of Chemical Physics* **69**, 4526-4534 (1978).

199. E. Bailo, "Nanoscale Tip-enhanced Raman Scattering (TERS) for biomolecular analyses," Dissertation (TU Dortmund, Dortmund, 2009).
200. B. R. Wood, M. Asghari-Khiavi, E. Bailo, D. McNaughton, and V. Deckert, "Detection of Nano-Oxidation Sites on the Surface of Hemoglobin Crystals Using Tip-Enhanced Raman Scattering," *Nano Letters* **12**, 1555-1560 (2012).

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Volker Deckert für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, mit viel Gestaltungsfreiraum diese interessanten Themen zu bearbeiten. Weiterhin bedanke ich mich für die Gelegenheiten, an Tagungen im In- und Ausland teilzunehmen. Darüber hinaus bedanke ich mich für das Nahebringen des Innenlebens der Instrumente, Basteln und Herumschrauben, sowie viele interessante Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Jürgen Popp für die Übernahme der Zweitbegutachtung sowie die Möglichkeit, an Veranstaltungen seiner Arbeitsgruppe teilzunehmen und die vorhandene Infrastruktur zu nutzen.

Für die umfangreiche Einführung in die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie danke ich neben Prof. Dr. Volker Deckert insbesondere Frau Dr. Elena Bailo und Frau Dr. Tanja Deckert-Gaudig, ebenso für die Unterstützung bei technischen und applikativen Fragestellungen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Deckert und Popp. In Dortmund am ISAS danke ich Frau Pulvermacher, Herrn Gosciniak und Herrn Herzog für das Beschichten der AFM-Spitzen, für REM-Messungen, Einführung in das Ätzen von Fasern und für alle weitere Unterstützung.

Für die Beschichtung der AFM-Spitzen danke ich Herrn Konstantin Kirsch und Herrn Dr. Hendrik Schneidewind, ebenso wie für eine gute Zeit beim Drachenboot fahren.

Bei Christian Leiterer und Antti-Pekka Eskelinen bedanke ich mich dafür, daß sie mir die DNA Origami-Proben zur Verfügung gestellt haben. Darüber hinaus danke ich Christian für die Bereitstellung der Guanin Quadruplex-Proben.

Herrn Dr. Torsten Frosch danke ich für die Bereitstellung der Dünnschnitte mit Malaria infizierter Erythrozyten, sowie die fruchtbare und interessante Diskussion der TERS-Ergebnisse.

Herrn Dr. Matthias Zeisberger danke ich dafür, daß ich Teile seiner Simulationen zu Feldverteilung an TERS-Spitze in dieser Arbeit verwenden durfte und für die Korrektur des entsprechenden Kapitels.

Herrn apl. Prof. Dr. Michael Schmitt möchte ich besonders für die Hilfe bei fachlichen Fragen danken.

Frau Dr. Tanja Deckert-Gaudig und Herrn Dr. René Böhme danke ich für das Lesen und Korrigieren meiner Doktorarbeit.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des IPC, besonders bei Frau Persch, Frau Kielmann, Frau Backhaus, Frau Dr. Truckenbrodt und Frau Dr. Kriltz für die Unterstützung bei der Betreuung von Praktika. Frau Krause und Antje Raabe danke ich für die Unterstützung bei organisatorischen und bürokratischen Fragen. Herrn Dr. Dirk Bender danke ich für die Hilfe bei Software- und Computer-Problemen. Bei den Mitarbeitern der Werkstatt, insbesondere Frau Jacob, Herr Fähndrich, Herr Gause und Herr Hopfe, möchte ich mich für schnelle, unbürokratische und kreative Unterstützung bedanken.

Bei Evelyn möchte ich mich für die gemeinsame (Mess-) Zeit und moralische Unterstützung bedanken.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich unterstützt haben und auch in schwierigen Zeiten zur Seite standen. Ganz besonders danke ich René, der mit unheimlich viel Unterstützung und Motivation vor allem während des Zusammenschreibens für mich da war.

## **Selbständigkeitserklärung**

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Lebenslauf

August 1992 – Juni 2001	Schul Ausbildung: Städtisches Gymnasium Haltern am See  Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
August 2001 – Juli 2004	Ausbildung zur Chemielaborantin  Chemisches Untersuchungsamt der Kreisverwaltung Recklinghausen
September 2004 – August 2008	Chemiestudium: Fachhochschule Gelsenkirchen, Abteilung Recklinghausen  Abschluss als Diplom-Chemikerin (FH)
Oktober 2006 – März 2007	Praxissemester  Vital Health Foods, Kuilsriver, South Africa
April 2008 – Juli 2008	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz  Titel der Arbeit: „Bionanofunktionalisierung von Titandioxid-Oberflächen“
Dezember 2008 – April 2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter  ISAS – Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften, Dortmund
Mai 2009 – August 2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Doktorand  IPHT – Institut für Photonische Technologien, Jena
September 2012 – August 2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter  Carl Zeiss SMT GmbH, Oberkochen, Beauftragte der euro engineering AG
Seit September 2013	Entwicklungsingenieurin  Carl Zeiss SMT GmbH, Oberkochen

## Publikationen

- R. Treffer and V. Deckert, "Recent advances in single-molecule sequencing," *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 4-11 (2010)
- R. Treffer, X. Lin, E. Bailo, T. Deckert-Gaudig, and V. Deckert, "Distinction of nucleobases – a tip-enhanced Raman approach," *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2**, 628-637 (2011)
- R. Treffer, R. Böhme, T. Deckert-Gaudig, K. Lau, S. Tiede, X. Lin, and V. Deckert, "Advances in TERS (tip-enhanced Raman scattering) for biochemical applications," *Biochemical Society Transactions* **40**(2012)
- V. Deckert, T. Deckert-Gaudig, M. Richter, R. Treffer, and X. Lin, "Label free investigation of biomolecules on the nanometer scale using tip-enhanced Raman spectroscopy," *Proceedings of SPIE* **7560 (Biomedical Vibrational Spectroscopy IV: Advances in Research and Industry)**, 75600J-75600J (2010)

## Posterbeiträge

- R. Treffer und V. Deckert, "Tip-enhanced Raman Spectroscopy on DNA", Symposium "Scanning Probe and Optical Tweezers in Life Sciences" (Berlin), 10/2009
- T. Deckert-Gaudig, E. Kämmer, X. Lin, R. Treffer und V. Deckert, "Towards direct sequencing of DNA and proteins with Tip-enhanced Raman scattering", *Photonics4life* (Barcelona), 11/2009
- X. Lin, T. Deckert-Gaudig, R. Treffer und V. Deckert, "Tip-enhanced Raman scattering (TERS) of uracil strands", ICORS (International Conference of Raman Spectroscopy) (Boston), 08/2010

- R. Treffer, X. Lin, T. Deckert-Gaudig und V. Deckert, "Tip-enhanced Raman scattering on DNA and RNA strands", NFO (Near Field Optics) (Schanghai), 08/2010
- R. Treffer, E. Bailo, X. Lin, T. Deckert-Gaudig und V. Deckert, "Tip-enhanced Raman spectroscopy for reproducible distinction of nucleobases", Anakon (Zürich), 03/2011
- R. Treffer, E. Bailo, T. Deckert-Gaudig, E. Kämmer, X. Lin und V. Deckert, "Distinction of nucleobases and amino acids using tip-enhanced Raman scattering", Molecular Plasmonics (Jena), 05/2011
- X. Lin, R. Treffer, T. Deckert-Gaudig und V. Deckert, "Distinction of Nucleobases - a Tip-Enhanced Raman Approach", FT-IR Meeting "FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics" (Berlin), 10/2011
- R. Treffer, Ch. Leiterer, T. Deckert-Gaudig, W. Fritzsche und V. Deckert, "Tip-enhanced Raman scattering for nanoscale DNA analysis", ICORS (International Conference of Raman Spectroscopy) (Bangalore), 08/2012