

Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln zur gezielten Wechselwirkung mit Biomolekülen

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Meike Roskamp
aus Papenburg
Januar 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Sabine Schlecht
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Reißig

Disputation am 02.03.2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Sabine Schlecht im Zeitraum von Oktober 2006 bis Januar 2010 an der Freien Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, angefertigt.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Sabine Schlecht für die Betreuung dieser Arbeit, die hervorragende Unterstützung in allen Fragen der Nanochemie und die Möglichkeit, viele Ideen umsetzen zu können.

Prof. Dr. Hans-Ulrich Reißig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die gute Zusammenarbeit bei der Suche nach Selektin-bindenden Nanopartikeln.

Prof. Dr. Beate Kokschi danke ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Peptid-induzierten Aggregation von Nanopartikeln.

Für ein nettes Arbeitsklima und zahlreiche Anregungen danke ich meinen Kollegen Christoph Erk, Marina Artamonova, Denis Petri, Ivan Angelov, Weizhe Meng und Biswa Nath Gosh. Insbesondere möchte ich meinem Laborkollegen und guten Freund Christoph Erk für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen, das Korrekturlesen dieser Arbeit, die aufmunternden Worte und die Unterstützung in jeder Lebenslage danken.

Den Mitarbeitern der AG Lentz, insbesondere Christian Ehm, Stefanie Fritz, Moritz Kühnel und Thomas Hügler, danke ich ebenfalls für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, auch zu ungewöhnlichen Arbeitszeiten, und für die intensive Unterstützung bei der NMR-Spektroskopie.

Sara Wagner möchte ich für die Synthese der Peptide und die Zusammenarbeit bei der Peptid-induzierten Aggregation von NP danken.

Fabian Pfrengle, Shahla Yekta, Fei Yu und Vjekoslav Dekaris aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-U. Reißig danke ich für die Synthese verschiedenster Amine.

Dr. Sven Enders danke ich für die Durchführung des kompetitiven Bindungsassays sowie für die hilfreichen Diskussionen zur Interpretation der Ergebnisse.

Dr. Jens Dervedde danke ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Selektin-bindenden Nanopartikel und die Untersuchungen zur Toxizität der Nanopartikel.

Bei Ilona Papp möchte ich mich für eine gute Zusammenarbeit und ihre große Hilfsbereitschaft bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Serviceabteilungen des Instituts für Chemie und Biochemie bedanken, besonders Dr. Johann Spandl für die Einarbeitung in das IR-Spektrometer und Rita Friese für die Durchführung der TGA.

Michael Stasiak danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die moralische Unterstützung beim Schreiben.

Den Studenten Nelly Rivas, Franziska Buchner, Kathera Hazin, Mareike Noah und Christina Lüders danke ich für ihre synthetische Unterstützung.

Meiner besten Freundin Annette Brunsen danke ich für die trotz großer Entfernung immer vorhandene Unterstützung und ihren positiven Einfluss auf mein Organisationsvermögen.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Fritz Wilhelm Wernicke danke ich für die Verschönerung des Rückflusskühlers, die Zettelchen auf meinem Schreibtisch und die Stadtführungen, für seine Unterstützung und seine Geduld.

Inhaltsverzeichnis

1 Motivation	7
2 Einführung in das Arbeitsgebiet	10
2.1 Synthese und Charakterisierung von Nanopartikeln	10
2.1.1 Synthese von Nanopartikeln	10
2.1.2 Charakterisierung von Nanopartikeln	13
2.2 Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln	17
2.2.1 Ligandenaustauschreaktionen	18
2.2.2 Reaktionen an der Ligandperipherie	20
2.2.3 Adsorption von Molekülen an der Ligandenhülle	24
2.2.4 Kombination mehrerer Methoden der Oberflächenfunktionalisierung	25
2.3 Mehrdimensionale Nanopartikel-Architekturen	27
2.4 Nanopartikel in der Medizin	31
2.4.1 Nanovektoren	32
2.4.2 Toxizität	36
2.5 Überblick über das bearbeitete medizinische Gebiet	40
3 Ergebnisse und Diskussion	46
3.1 Synthese der Nanopartikel	46
3.1.1 Synthese und Charakterisierung von Au-Kolloiden	47
3.1.2 Synthese und Charakterisierung von Ag-Kolloiden	55
3.1.3 Synthese und Charakterisierung von Au/Ag-Alloy-Kolloiden	56
3.1.4 Synthese und Charakterisierung von CdS-Kolloiden	59
3.2 Peptid-induzierte Aggregation von Nanopartikeln	61
3.2.1 Struktur und Eigenschaften der verwendeten Peptide	62
3.2.2 Geladene Nanopartikel als Baustein für die elektrostatische Anordnung	68
3.2.3 Überführung und Stabilität der Nanopartikel in Puffer	75
3.2.4 VW05-induzierte Anordnung negativ geladener NP	80
3.2.5 Nanopartikel-induzierte Fibrillenbildung	98
3.3 Selektin-bindende Nanopartikel	109

3.3.1	Abhängigkeit der Inhibition vom Sulfatierungsgrad	119
3.3.2	Reproduzierbarkeit der IC ₅₀ -Werte	124
3.3.3	Einfluss der Struktur des bindenden Liganden	126
3.3.4	Einfluss der Peptidbindung	135
3.3.5	Einfluss der Kettenlänge	137
3.3.6	Einfluss der Nanopartikelgröße	142
3.3.7	Vergleich des Einflusses der untersuchten Faktoren auf den IC ₅₀ -Wert	146
3.3.8	TEM-Untersuchungen	149
3.3.9	Zelltoxizität der NP	152
3.3.10	Immobilisierung der NP in Polymerfasern	153
4	Zusammenfassung und Ausblick	156
5	Summary	159
6	Experimenteller Teil	161
6.1	Abkürzungen	161
6.2	Lösungsmittel und Reagenzien	162
6.3	Synthesen	165
6.3.1	NP-Synthesen	165
6.3.2	Ligandenaustauschreaktionen	171
6.3.3	Kovalente Modifikation der NP	178
6.3.4	Synthesen der Liganden	190
6.4	Verwendete Geräte und Messverfahren	201
6.4.1	Dialyse	201
6.4.2	Gelelektrophorese	201
6.4.3	NMR-Spektrometer	202
6.4.4	IR-Spektrometer	202
6.4.5	Thermogravimetrische Analyse (TGA)	203
6.4.6	Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM)	203
6.4.7	UV/Vis-Spektrometer	203
6.4.8	Kompetitiver SPR-basierender Bindungsassay	204
7	Literaturverzeichnis	205
8	Anhang	216

1 Motivation

Die Ziele der vorliegenden Arbeit lassen sich in zwei Gebiete gliedern. Zum einen wurden die peptidinduzierte Aggregation von Nanopartikeln (NP) und die Möglichkeiten zum Aufbau geordneter Architekturen mit dieser Methode untersucht. Zum anderen wurden funktionale NP mit biologischer Aktivität synthetisiert. Grundlage für das Gelingen stellt in beiden Fällen die Synthese möglichst monodisperser Kolloide und die Funktionalisierung von NP mit einer geeigneten Ligandenhülle dar.

Aufbau mehrdimensionaler NP-Architekturen

Beruhend auf elektrostatischen Wechselwirkungen sollen im ersten Teil der Arbeit Architekturen aus NP und Peptid aufgebaut werden. Durch elektrostatische Selbstorganisation lassen sich NP in ausgedehnte, geordnete Strukturen ordnen. Auch alternierende Strukturen aus unterschiedlichen NP können mit dieser Methode erzeugt werden [1]. Des Weiteren ist das Trägern kleiner Metall- und Halbleiter-NP auf großen NP durch elektrostatische Wechselwirkungen literaturbekannt [2].

Während DNA, welche in vielen Arbeiten als strukturgebende Komponente dient, aufgrund der Phosphatgruppen im Zuckerphosphat-Rückgrat immer negativ geladen ist, kann bei Peptiden durch Variation der Aminosäurezusammensetzung die Nettoladung sowohl positiv als auch negativ sein. Außerdem lässt sich auf diese Weise die Höhe der Nettoladung eines Peptids durchstimmen. Bei dem Aufbau von Architekturen aus NP und Peptid kann daher entweder das Kolloid positiv und das Peptid negativ geladen sein oder umgekehrt. Beide Fälle sollen im Rahmen dieses Projektes näher untersucht werden. Einen weiteren interessanten Faktor stellt der Einfluss der Peptidstruktur auf die Struktur der sich bildenden NP-Peptid-Aggregate dar. Während doppelsträngige DNA in den meisten Fällen als lineares oder ringförmiges Molekül vorliegt, bieten Peptide eine größere Vielfalt möglicher Struktur motive. Durch Variation von Parametern wie pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke lassen sich Strukturänderungen in Peptiden auslösen welche ebenfalls einen Einfluss auf die NP-Peptid-Aggregate haben dürften. Elektrostatisch geladene Peptide mit unterschiedlichen Strukturen (*coiled-coil*-Motiv, Fibrillen) wurden von Sara Wagner synthetisiert.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten auf diesem Gebiet [3 - 6] wird in dieser Arbeit nicht der Austausch der NP-Ligandenhülle durch das strukturgebende Peptid, sondern eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen NP-Ligandenhülle und Peptid angestrebt. Der Vorteil dieses Konzepts liegt in der einfacheren Synthese und vor allem Charakterisierung der verwendeten Komponenten.

Ziel dieses Projektteils ist zunächst die Synthese monodisperser, geladener Kolloide aus unterschiedlichen Materialien (Metall- und Halbleiter-NP) und Ligandenhüllen. Die Stabilität wässriger Kolloide hängt stark von Parametern wie Konzentration des Kolloids, pH-Wert und Gesamtionenstärke der Lösung ab [7, 8]. Um aussagekräftige Ergebnisse über die NP-Peptid-Aggregate zu erhalten, müssen daher zunächst Bedingungen gefunden werden, bei denen die einzelnen Komponenten stabil sind und die gewünschte Nettoladung tragen. Die Optimierung dieser Bedingungen muss aufgrund der hohen Sensibilität der Kolloide gegenüber diesen Einflüssen für jedes System neu erfolgen. Nach Einstellung der Bedingungen soll dann die Aggregation der Kolloide nach Peptidzugabe abhängig von verschiedenen Parametern wie Zeit, pH-Wert und Stöchiometrie von NP zu Peptid sowie die Schaltbarkeit der Aggregation untersucht werden.

Synthese funktionaler Nanopartikel mit biologischer Aktivität

Polyvalente Interaktionen haben sich in biologischen Systemen als vorteilhaft erwiesen, vor allem im Bereich von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. In vielen Fällen wurde eine deutliche Bindungsverstärkung des multivalent bindenden Liganden im Vergleich zum monovalenten Analogon festgestellt, beispielsweise von *Whitesides et al.* bei einem trivalenten Oligosaccharid-Liganden [9]. Viele synthetische Systeme, unter anderem Dendrimere [10] und Goldoberflächen [11, 12], wurden daher auf ihre Fähigkeit zu multivalenten Wechselwirkungen untersucht.

Funktionalisierte, biokompatible NP stellen ebenfalls eine Möglichkeit der multivalenten Präsentation funktioneller Gruppen dar und finden bereits Anwendung in vielen medizinischen Gebieten, beispielweise in der medizinischen Diagnostik und als Therapeutikum [13]. Die Entwicklung funktionaler Nanobiokonjugate basiert hauptsächlich auf der Verwendung von Nucleinsäuren [14 - 16] und Proteinen [17, 18], aber auch Kohlenhydrate als biologisch aktive Moleküle können auf NP immobilisiert werden.

Oligosaccharide wurden kovalent auf der Oberfläche von Gold- und Gold-Eisenoxid-Nanopartikeln gebunden und die magnetischen Eigenschaften dieser Konjugate untersucht [19].

Derzeit wird Heparin, ein sulfatiertes Glycosaminglycan, welches als Gerinnungshemmer und zur Prävention und Behandlung von Thrombosen¹ in klinischer Anwendung ist, als antiinflammatorischer Wirkstoff untersucht. Die polymere Struktur von Heparin, und somit die multivalente Präsentation von Sulfatgruppen, führt zu einer guten Bindung an die zur Entzündungshemmung zu inhibierenden Selektine [20]. Neben einer uneinheitlichen Struktur, welche aus der Gewinnung aus tierischen Geweben (Schweinedarm oder Rinderlunge) resultiert und für medizinische Anwendungen unerwünscht ist, hat Heparin den Nachteil, dass Nebenwirkungen wie beispielsweise schwere Blutungen auftreten können [21].

Mit NP lässt sich auch bei Größen im Nanometerbereich eine verhältnismäßig einheitliche Struktur realisieren und sie bieten aufgrund des großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses eine ideale Oberfläche zur multivalenten Präsentation funktioneller Gruppen. Durch Variation der Partikelgröße kann Einfluss auf die Anzahl der präsentierten Gruppen genommen werden. Neben der globulären lassen sich auch verschiedenste weitere Formen realisieren, welche sich auf das Zirkulationsverhalten der Partikel in biologischen Systemen auswirken. Auf diese Weise können Zirkulationsdauer und Anreicherungsart der Partikel auf die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden. Die Verwendung von anorganischen NP ermöglicht zudem die Einführung weiterer nützlicher, beispielsweise magnetischer oder optischer Eigenschaften.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Synthese unterschiedlich funktionalisierter biokompatibler NP und der Untersuchung der Bindungseigenschaften dieser NP an Selektin in Abhängigkeit von Größe und Oberflächenfunktionalisierung.

¹ Thrombose: Verschluss eines Gefäßes durch ein Blutgerinnsel (Thrombus).

2 Einführung in das Arbeitsgebiet

2.1 Synthese und Charakterisierung von Nanopartikeln

Im Folgenden werden zunächst verschiedene Methoden zur Synthese von Nanomaterialien vorgestellt und im Speziellen auf Möglichkeiten zur Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel (NP) eingegangen. Im Anschluss wird dann ein Überblick über Methoden zur Charakterisierung der erhaltenen Substanzen gegeben.

2.1.1 Synthese von Nanopartikeln

Aufgrund der starken Abhängigkeit der Materialeigenschaften von Größe, Form und Dispersität und den daraus resultierenden zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, welche zu einem großen Interesse in der Wissenschaftswelt geführt haben, sind die im Laufe der Zeit entwickelten Synthesemethoden für Nanomaterialien sehr vielfältig. Zwei grundlegende Syntheseprinzipien werden dabei unterschieden: Zum einen kann die Erzeugung von Nanomaterialien durch die Zerkleinerung des Ausgangsmaterials erreicht werden. Dieser Ansatz wird „Top-Down“ genannt. Ein Beispiel hierfür ist das Mahlen von Mikropartikeln in Kugelmøhlen. Zum anderen können Nanomaterialien durch Zusammenlagerung kleinerer Bausteine wie Atome oder Moleküle aufgebaut werden. Dieser Ansatz wird als „Bottom-Up“ bezeichnet. Eine mögliche Synthese ist die nasschemische Präparation, bei der die Clusterung der Bausteine, beispielsweise Metallatome oder Halbleiterbausteine, in Gegenwart von Liganden erfolgt, welche an die Oberfläche der Cluster binden, diese somit blockieren und eine Aggregation in makroskopische Dimensionen verhindern. Alle in dieser Arbeit synthetisierten Nanopartikel wurden nach dieser Methode hergestellt.

Einige Arbeitsgruppen, beispielsweise *Chichkov*, verfolgen auch den Ansatz NP durch Laserablation zu synthetisieren [22]. Trotz vieler Vorteile, beispielsweise der hohen Reinheit der erzeugten Partikel, der einfachen Materialvariabilität und Darstellbarkeit größerer Mengen, ist die Methode allerdings aufgrund der notwendigen technischen Ausstattung nicht in jedem Labor einsetzbar.

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt vor allem auf der Synthese von Metallnanopartikeln, im Speziellen von Gold-NP. Obwohl bereits eine Vielzahl von Synthesen für Gold-NP unterschiedlichster Größe existieren [23], beschäftigen sich immer noch viele Arbeitsgruppen mit der Weiter- und Neuentwicklung von Synthesemethoden. Besonders Dispersität und Form der erzeugten Partikel liegen dabei im Interesse der Forscher. Dies liegt nicht zuletzt an den interessanten optischen Eigenschaften und den daraus resultierenden zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise im Bereich der biologischen Bildgebung und Biomedizin [24] sowie bei der Einzelmoleküldetektion und als colorimetrische Sensoren [25]. Eine häufig für die Synthese von Gold-NP eingesetzte Methode ist die von *Turkevich* [26] 1951 eingeführte und von *Frens* [27] 1973 weiterentwickelte Synthese durch Reduktion von HAuCl_4 mittels Citrat in Wasser. Citrat dient hierbei nicht nur als Reduktionsmittel, sondern auch als Stabilisator der sich bildenden Nanopartikel. Eine detaillierte Untersuchung des Mechanismus zeigte, dass außerdem das durch die Citratreduktion gebildete Aceton an der Partikeloberfläche koordinieren und somit die sich bildenden Partikel stabilisieren kann [28]. Abhängig vom verwendeten Verhältnis von Au-Salz zu Citrat und mit leichten Variationen im Syntheseweg lassen sich auf diese Weise unterschiedlich große Nanopartikel in einem Größenbereich zwischen 2.5 nm und einigen 100 nm erzeugen. Auch der Einsatz verschiedener zusätzlicher Reduktionsmittel wie beispielsweise Natriumborhydrid wurde erfolgreich untersucht und erweiterte das Spektrum der auf diesem Weg zu synthetisierenden Partikelgrößen und -formen. Diese Synthesemethode lässt sich mit leichten Variationen in Temperatur und Konzentrationen auch auf die Synthese anderer Metallnanopartikel, beispielsweise Silbernanopartikel [29], übertragen und wird vor allem dann verwendet, wenn eine verhältnismäßig schwach gebundene Ligandenhülle benötigt wird.

Eine Möglichkeit zur Synthese annähernd monodisperser hydrophober Au-Nanopartikel mit Durchmessern von 2 bis 8 nm von *Stucky et al.* [30] basiert auf der Reduktion von Goldtriphenylphosphinchlorid durch tert -Butylaminboran-Komplex in Gegenwart von Dodecanthiol. Diese Synthese liefert sphärische Kolloide mit einer sehr engen Größenverteilung, welche zur Ausbildung von Kolloidkristallen geeignet sind. *Stucky et al.* konnten außerdem zeigen, dass neben der Reaktionstemperatur auch die Stärke des Reduktionsmittels einen starken Einfluss auf die Dispersität der sich bildenden Kolloide hat.

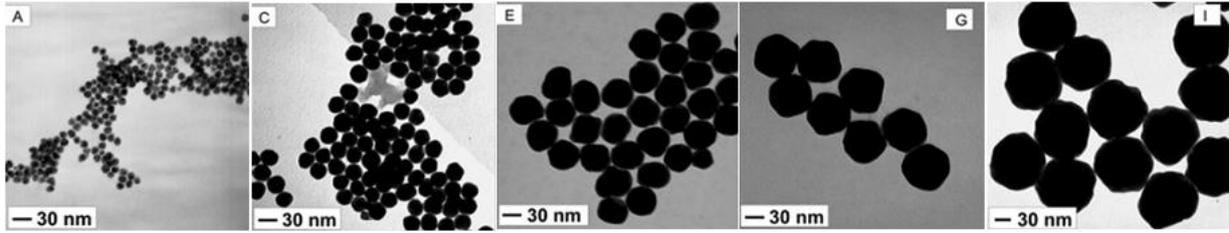


Abbildung 2.1: Zusammenstellung von Goldnanopartikeln verschiedener Größe aus einem Artikel von *Njoki et al.* [31].

Allen nasschemischen Synthesen von Nanopartikeln, bei der molekulare Vorläufer in Gegenwart eines stabilisierenden Liganden zersetzt werden, ist die starke Abhängigkeit der resultierenden Partikelgröße von einer Reihe von Parametern gemeinsam. Unterschiedliche Partikelgrößen können beispielsweise durch Variation der Heizzeit, in der die Nanopartikel langsam heranwachsen, erhalten werden. Je länger die Precursorlösung erhitzt wird, desto größer werden die Partikel. Auch eine Variation der Wachstumstemperatur hat eine Änderung der Partikelgröße zur Folge. Mit steigender Wachstumstemperatur nimmt der Durchschnittsradius der Partikel zu [32]. Weitere Faktoren welche die Größe der entstehenden Partikel mitbestimmen sind Art und Konzentration des anfänglichen Materials, Lösungsmittel und pH-Wert [33]. Unterschiedliche Partikelformen können durch Variation des stabilisierenden Liganden erzielt werden [25]. Abbildung 2.1 zeigt Goldnanopartikel verschiedenster Größe, eine Auswahl von Goldnanopartikeln mit interessanten Formen ist in Abbildung 2.2 zu sehen.

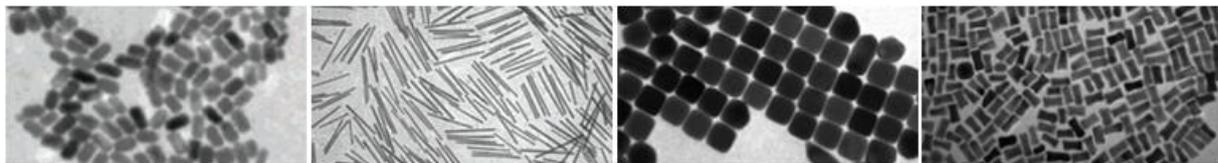


Abbildung 2.2: Zusammenstellung von Goldnanopartikeln verschiedener Form aus einem Artikel von *Murphy et al.* [25].

Ein 2004 erschienener Artikel von *Cushing et al.* [34] gibt eine allgemeine Einführung in nasschemische Synthesemethoden für anorganische Nanopartikel und erläutert die theoretischen Hintergründe. Verschiedenste Synthesen für Goldnanopartikel in unterschiedlichen Größen und Formen werden unter anderem in Artikeln von *Daniel* und *Astruc* [35] aus dem Jahr 2004 sowie von *Dykman* und *Bogatyrev* [23] aus dem Jahr 2007 vorgestellt.

2.1.2 Charakterisierung von Nanopartikeln

Es stehen verschiedene Methoden zur Charakterisierung von Nanopartikeln zur Verfügung. Bei Partikeln mit einem Kern-Ligand-Aufbau, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, kann mit den meisten Methoden nur ein Bestandteil des Partikels, nämlich entweder der Kern oder der Ligand, charakterisiert werden. In diesem Fall ist die Anwendung mehrerer Methoden notwendig, um eine genaue Aussage über die Beschaffenheit des Partikels machen zu können.

Zur Bestimmung von Struktur und Form des Kerns eignet sich besonders die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM). Hierbei wird das Probenmaterial mit hochenergetischen Elektronen durchstrahlt, welche beim Passieren der Probe an den Kernen der Probenatome gestreut werden. Dabei entstehen Intensitätsverluste. Experimentell werden oft die Elektronen für den Bildaufbau verwendet, die die Probe ohne Streuung passieren. Elektronenoptische Linsensysteme erzeugen mit diesen Elektronen eine stark vergrößerte Abbildung auf einem Leuchtschirm (Hellfeld-Abbildung). Der Bildkontrast entsteht dadurch, dass die Anzahl der gestreuten Elektronen unter anderem von Dicke, Kristallorientierung und chemischer Zusammensetzung der Probe abhängt. Durch die hohe Beschleunigungsspannung (zwischen 200 und 400 keV bei materialwissenschaftlichen Untersuchungen und zwischen 80 und 120 keV bei biologischen Materialien) und die kleine Wellenlänge der Elektronen können mit diesem Verfahren bei kontrastreichen Proben sogar einzelne Atome aufgelöst werden [36]. TEM-Aufnahmen mit einer niedrigen Auflösung ermöglichen einen Überblick über die statistische Verteilung von Größe und Form der Partikelkerne in einer Probe, bei Hochauflösung (HRTEM) können einzelne Exemplare auf ihre Form und innere Struktur untersucht werden. Das Vorhandensein von Netzebenen ermöglicht die Aussage, dass es sich um kristallines Material handelt und durch Abzählen der Netzebenen kann eine relativ genaue Abschätzung der Größe erfolgen. Die präzise Berechnung der Gitterkonstanten aus dem mittels TEM bestimmten Netzebenenabstand ist allerdings kritisch zu hinterfragen, denn die Beziehung zwischen dem beobachteten Interferenzmuster und dem zugrunde liegenden Kristallgitter kann komplex sein [37]. Aufgrund des organischen Materials der Ligandenhülle kann es in einigen Fällen bei Kern-Ligand-Partikeln sehr schwierig bis unmöglich sein, die Netzebenen eines kristallinen Materials zu erkennen. Die genaue Abgrenzung eines Kerns von seiner Umgebung ist dann schwierig, eine Größenbestimmung wird in diesen Fällen ungenauer. Ab welcher Größe Partikel auf TEM-Aufnahmen zu erkennen sind, hängt unter

anderem vom Gerät, der Partikelstruktur, den enthaltenen Elementen und der Reinheit der Probe ab.

Die Analyse der Oberflächenplasmonen-Bande von Metallnanopartikeln bzw. der Bandlücke von Halbleiternanopartikeln mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie ermöglicht durch Vergleich mit Referenzwerten Aussagen über Größe, Struktur und Aggregationszustand der Partikel. Die Lage der Absorptionsbande ist neben der Partikelgröße auch von der Partikelform abhängig. Ursache für diese optischen Eigenschaften ist der Größenquantisierungseffekt [38]. Mit abnehmendem Partikeldurchmesser verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu höheren Energien und somit zu kleineren Wellenlängen. Makroskopisches Cadmiumsulfid beispielsweise ist ein Eigenhalbleiter mit einer Bandlücke von 2.6 eV, dies entspricht 477 nm. Das Absorptionsmaximum von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 2 nm liegt bei 355 nm [39]. Abbildung 2.3 zeigt UV/Vis-Spektren von Gold-NP verschiedener Größe. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 519 zu 569 nm mit steigender Partikelgröße.

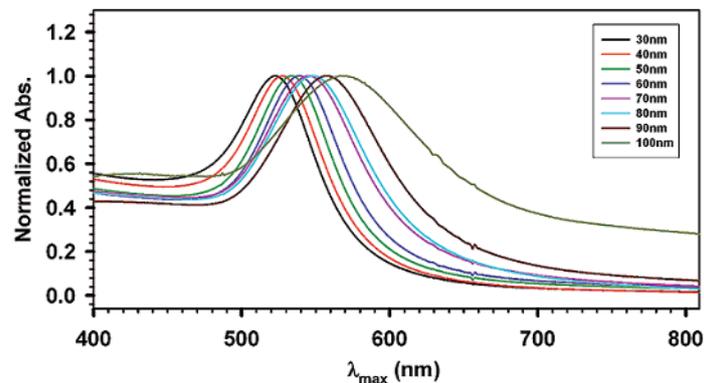


Abbildung 2.3: UV/Vis-Spektren (normalisiert) von Au-Nanopartikeln verschiedener Größe in wässriger Lösung [31].

Über die Intensität der Absorption lässt sich außerdem durch Vergleich mit Referenzspektren die Konzentration der Kolloidlösung bestimmen. Voraussetzung für eine gute Abschätzung sowohl von Größe als auch Konzentration der Nanopartikel ist allerdings das Vorhandensein eines Vergleichsspektrums der zu untersuchenden Halbleiter- oder Metallnanopartikel. Diese kann man einer Reihe von Arbeiten entnehmen, welche sich mit den optischen Eigenschaften von Nanopartikeln in Abhängigkeit verschiedener Parameter beschäftigen [24, 25, 40]. *Njoki et al.* [31] untersuchten 2007 beispielsweise detailliert den Zusammenhang zwischen der Lage des Absorptionsmaximums und der Größe von Au-Nanopartikeln im Größenbereich von 10 – 100 nm Durchmesser. *Liu et al.* untersuchten nicht nur den Einfluss der Größe, sondern auch

der Liganden und des Lösungsmittels auf den Extinktionskoeffizienten [41]. Obwohl die Mie-Theorie [42] eine Abhängigkeit der Plasmonenresonanzabsorption der Nanopartikel von der dielektrischen Umgebung der Partikel und somit von einigen weiteren Parametern, z.B. Lösungsmittel und Ligandstruktur, vorhersagt, konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Beiträge zum Extinktionskoeffizienten der Oberflächenplasmonenbande gefunden werden. Einen umfassenden Überblick über die optischen Eigenschaften von Metallnanopartikeln liefert ein 2008 erschienener Artikel von *Bryant et al.* [43].

Weitere Methoden zur Untersuchung der Kernstruktur sind die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (Small Angle X-Ray Scattering, SAXS) und die Weitwinkel-Röntgenstreuung (Wide Angle X-Ray Scattering, WAXS). Im Gegensatz zu TEM-Aufnahmen, bei denen einzelne Partikel vermessen werden können, liefern SAXS und WAXS Daten, die aus der Messung einer statistisch großen Zahl von NP entstehen.

Auch für die Charakterisierung der Liganden steht eine Reihe von Messmethoden zur Verfügung. Es können NMR-Spektren aufgenommen werden, vorausgesetzt es besteht eine ausreichend hohe Löslichkeit der Partikel in einem deuterierten Lösungsmittel. *Hostetler et al.* benutzten beispielsweise ^1H -NMR-Spektren zur Kontrolle der Ligandenaustauschreaktionen [44]. Typische Effekte in Nanopartikel-NMR-Spektren sind deutliche Linienverbreiterungen und Tieffeldverschiebungen der Resonanzen des gebundenen Liganden im Vergleich zu ungebundenem Ligand. Ungebundene Verunreinigungen behalten ihre scharfen Resonanzen und können so von gebundenem Ligand unterschieden und identifiziert werden [45].

Sinnvoll ist in manchen Fällen die Aufnahme von IR-Spektren, sofern funktionelle Gruppen mit charakteristischen, intensiven Banden vorhanden sind. Das Massenverhältnis von Ligand zu Kern, und somit die Menge Ligand in einer Probe zur Aufnahme eines IR-Spektrums, hängt vom Durchmesser des Kerns ab. Es ist daher zu erwarten, dass bei sehr großen Kernen relativ intensive Banden notwendig sind, um eine eindeutige Identifizierung einer funktionellen Gruppe vornehmen zu können.

Des Weiteren kann bei einem hohen Verhältnis von Ligand zu Kern, also bei sehr kleinen Partikeln, eine Elementaranalyse weiterhelfen, wobei allerdings eine relativ große Probenmenge (im mg-Bereich) notwendig ist, welche nach der Untersuchung nicht mehr für weitere Anwendungen zur Verfügung steht. Die Elementaranalyse gibt Aufschluss über die gemittelte Ligandzusammensetzung der Partikel [46].

Die Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) liefert den hydrodynamischen Radius der Partikel. Die zu untersuchende Kolloidlösung wird hierbei kontinuierlich mit einem Laser bestrahlt, dessen Licht von den Kolloiden gestreut wird. Sind die Partikel klein im Verhältnis zur Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes, wird das Licht gleichmäßig in alle Richtungen gestreut (Rayleigh-Streuung), für größere Partikel mit einem durchschnittlichen Radius über ca. 125 nm ist die Streuintensität winkelabhängig (Mie-Streuung). Das kohärente und monochromatische Licht des Lasers ermöglicht unter Verwendung eines Photomultipliers die Beobachtung zeitabhängiger Fluktuationen in der Streuintensität, die auf die Bewegung der Partikel im Lösungsmittel zurückzuführen sind. Die Fluktuationen werden umso schneller, je schneller die Partikel sich bewegen. Bei Kenntnis der Viskosität des Lösungsmittels kann über den Diffusionskoeffizienten der hydrodynamische Radius der Partikel berechnet werden. Diese Methode steht bei der Vermessung sehr kleiner Kolloide vor Problemen, da die Streuintensität mit sinkender Partikelgröße deutlich abnimmt. Die untere Partikelgrößengrenze hängt von den Streueigenschaften der zu untersuchenden Partikel im jeweiligen Medium, der einfallenden Lichtintensität und den Detektoreigenschaften ab und ist daher abhängig vom verwendeten Gerät [47].

Für einige Anwendungen von Kolloiden mit einer Kern-Ligand-Struktur ist neben der vollständigen Charakterisierung von Kern und Ligand auch die Kenntnis des Verhältnisses der beiden Komponenten zueinander von großer Bedeutung. Hierzu kann eine thermogravimetrische Analyse (TGA) durchgeführt werden. Bei geeigneter Wahl des Temperaturprofils desorbieren die Liganden von der Kolloidoberfläche und im Idealfall bleibt nur das Kernmaterial zurück. Der gemessene Gewichtsverlust stellt die Masse an in der Probe enthaltenem organischem Material, also bei verunreinigungsfreien Partikeln die Masse an Ligand, im Verhältnis zur zurückgebliebenen Kernmasse dar. Bei Kenntnis der durchschnittlichen Partikelgröße kann aus diesen Daten die Anzahl der Liganden pro Nanopartikel berechnet werden (Rechenweg siehe Abschnitt 8.4) [45].

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Anzahl gebundener Liganden pro Partikelkern ist die Auswertung der Integrale von NMR-Spektren durch Vergleich mit einer vor der Messung zugefügten Referenz. Dabei ist es wichtig, dass keine Wechselwirkungen zwischen Nanopartikel und Referenz auftreten, welche die Messung beispielsweise durch teilweise Fällung der Partikel verfälschen. Desweiteren sollten die zu integrierenden Signale deutlich von anderen, nicht quantifizierbaren Signalen getrennt sein. Vorteil dieser Methode ist die im

Verhältnis zu einer TGA geringe benötigte Probenmenge. Auch Lösungsmittelreste, welche zum Beispiel bei stark hygroskopischen Partikeln die Ergebnisse einer TGA verfälschen könnten, stellen in der Regel kein Problem dar.

2.2 Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, können NP mit den unterschiedlichsten Oberflächenfunktionalitäten hergestellt werden. Beispiele für stabilisierende Ligandensysteme sind hydrophobe Monolagen [48, 49], positiv und negativ geladene hydrophile Monolagen [50 - 52] und Polymerlagen [53 - 56]. Obwohl aus den stark reduzierenden Bedingungen bei der Nanopartikelsynthese starke Einschränkungen für den Einsatz funktioneller Gruppen resultieren, kann durch im Anschluss erfolgende Ligandenaustauschreaktionen oder Reaktionen an der Ligandperipherie praktisch jede Funktionalität auf die Oberfläche des Nanopartikels eingeführt werden [57]. Neben dem Schutz reduktionsempfindlicher funktioneller Gruppen hat eine Funktionalisierung nach der Synthese den Vorteil, dass die Größe des Partikelkerns erhalten bleibt. Dies ist bei Variation des stabilisierenden Liganden während der Synthese nicht immer der Fall [58].

Die Oberfläche bestimmt im Wesentlichen die chemische Reaktivität und Löslichkeit der Nanopartikel [57]. In der Regel nehmen Kolloide das Löslichkeitsverhalten des lösungsmittlexponierten Teils der auf ihrer Oberfläche immobilisierten Moleküle an. Durch die Immobilisierung auf der Kolloidoberfläche können aber auch neue Eigenschaften entstehen, welche die immobilisierten Moleküle im ungebundenen Zustand nicht aufweisen. Ligandenaustauschreaktionen sowie Reaktionen an der Ligandenperipherie ermöglichen somit die Erzeugung von Nanopartikeln mit unterschiedlichster chemischer Reaktivität. In einer 2003 erschienenen Arbeit von *Shenhar* und *Rotello* werden neben Anwendungen und Synthesen auch zusammenfassend die wichtigsten Methoden zur Funktionalisierung von Nanopartikeln vorgestellt [59].

Die unterschiedlichen Methoden der Oberflächenfunktionalisierung von zuvor synthetisierten Kolloiden lassen sich grob drei Strategien zuordnen. Eine Umfunktionalisierung der Partikel kann durch Ligandenaustauschreaktionen, Reaktionen an der Ligandperipherie oder durch Adsorption von Molekülen an der Ligandenhülle erreicht werden. Im Folgenden werden diese Strategien anhand einiger Beispiele näher erläutert.

2.2.1 Ligandenaustauschreaktionen

Besitzt das auf der Oberfläche zu immobilisierende Molekül eine zur Bindung auf der Kolloidoberfläche fähige Gruppe, z.B. im Fall von Goldkolloiden eine Thiol-Funktion, so besteht die Möglichkeit eines direkten Austauschs auf die Kolloidoberfläche. Dabei wird der vorhergehende Ligand von der Oberfläche verdrängt. Auch Mischungen unterschiedlicher zu immobilisierender Moleküle können hierbei eingesetzt werden [46]. Für diese Art der Oberflächenfunktionalisierung sollte das Kolloid vor dem Austausch eine Ligandenhülle mit einer möglichst geringen Affinität zur Oberfläche besitzen. Gut geeignet sind die auch in dieser Arbeit als Startmaterial verwendeten Citrat- oder 4-(Dimethylamino)pyridin(DMAP)-koordinierten Au-Kolloide. *Bellino et al.* beispielsweise untersuchten 2004 die Adsorptionskinetiken verschiedener geladener Thiole auf Gold-NP, wobei Citrat-koordinierte Au-Kolloide als Ausgangsmaterial dienen [60]. Weitere Beispiele sind in den Arbeitsgruppen von *Porta* [61] sowie *Mirkin* und *Letsinger* [62] zu finden. Vielfältige Möglichkeiten des Ligandenaustauschs an DMAP-koordinierten Gold-NP wurden 2006 von *Lennox et al.* vorgestellt (siehe Abbildung 2.4). [63]

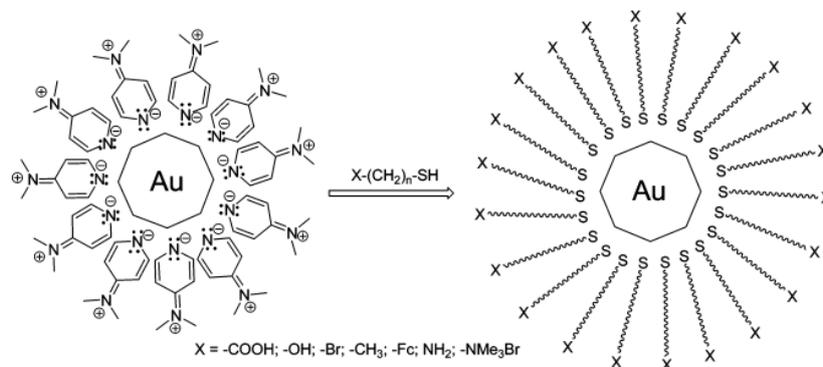


Abbildung 2.4: DMAP-koordinierte Gold-NP können als Startmaterial für unterschiedlich funktionalisierte Thiol-koordinierte Gold-NP dienen [63].

Durch Einsatz großer Überschüsse an Zielligand ist es aber auch möglich, stärkere Liganden quantitativ von der Oberfläche zu verdrängen. So eignen sich durchaus Alkanthiol-funktionalisierte Au-Kolloide für den Austausch gegen andere Thiole. Fluoreszierende und bioaktive Nanopartikel wurden auf diese Weise bereits synthetisiert [64]. Die Geschwindigkeit des Austauschs hängt von Kettenlänge und Sterik sowohl des austretenden als auch des eintretenden Liganden ab. Desweiteren spielt die Ladung des Nanopartikels eine wichtige Rolle [35]. *Murray et al.* zeigten einige dieser Effekte bereits 1999 anhand

unterschiedlichster Thiole in einer Untersuchung zum Mechanismus dieser Austauschreaktionen [44]. *Montalti et al.* bestätigten 2003 mittels Fluoreszenzspektroskopie, dass es sich dabei, wie von *Murray et al.* bereits vorgeschlagen, um einen „S_N2“-artigen assoziativen Mechanismus handelt. Hierzu wurde die Verdrängung eines über ein Thiolat gebundenen Pyren-Derivats von der Oberfläche von Au-NP durch Decanthiol spektroskopisch beobachtet [65]. Auch *Lennox et al.* untersuchten 2006 den Mechanismus dieses Ligandenaustauschs [64]. Im Unterschied zu den vorangegangenen Studien unterschieden sich die beiden eingesetzten Thiole nur in der Kettenlänge.

Abhängig vom Löslichkeitsverhalten des Kolloids und des neuen Liganden kann der Austausch in einem Einphasen- oder einem Zweiphasensystem stattfinden. Lösen sich beide Komponenten in einem Lösungsmittel, bietet sich ein Einphasensystem an. Hierbei werden beide Komponenten mit einem Überschuss des zu immobilisierenden Liganden in einem Lösungsmittel, in dem beide Komponenten gut löslich sind, gelöst und bis zum vollständigen Austausch des austretenden Liganden gerührt. Ein Beispiel für den Ligandenaustausch im Einphasensystem stellt die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellte Arbeit von *Bellino et al.* dar. Im Anschluss müssen ausgetretener und überschüssiger neuer Ligand abgetrennt werden.

Hierzu stehen verschiedenste Methoden zur Verfügung. Die Wahl des Reinigungsverfahrens hängt stark von Stabilität und Löslichkeitsverhalten des entstandenen Kolloids sowie der abzutrennenden Liganden ab. Aufgrund der stark variierenden Löslichkeiten der synthetisierten Kolloide werden im Rahmen dieser Arbeit einige Methoden vorgestellt. Lösen sich Kolloid und zu immobilisierendes Molekül in unterschiedlichen, nicht mischbaren Lösungsmitteln, kann der Austausch in einem Zweiphasensystem durchgeführt werden. Hierzu werden die jeweiligen Lösungen der einzelnen Komponenten in einem Gefäß vereint und beide Phasen durch intensives Rühren in engen Kontakt gebracht. Dabei findet ein teilweiser bis vollständiger Austausch der Ligandenhülle statt, welcher zu einer Änderung im Löslichkeitsverhalten und somit zu einem Phasentransfer der Kolloide führt. Der austretende Ligand bleibt im Idealfall in seiner Phase zurück und kann so nach Phasenseparation leicht von den Kolloiden abgetrennt werden. *Caruso et al.* stellen in einer 2003 erschienenen Arbeit einige Phasentransferreaktionen von Goldnanopartikeln vor [66]. Weitere Beispiele, auch für Silber- und Platinpartikel, sind in einer Arbeit von *Rao et al.* zu finden [67]. 2001 nutzten *Gittins* und *Caruso* einen Phasentransferprozess für die Synthese von DMAP-kordinierten Gold-NP aus Tetraoctylammoniumbromid(TOAB)-funktionalisierten Gold-NP [68]. 2005

untersuchten *Gandubert* und *Lennox* die Stabilität der auf diese Weise hergestellten DMAP-koodinierten Gold-NP, welche wie bereits erwähnt aufgrund der verhältnismäßig geringen und zudem pH-abhängigen Affinität von DMAP zur Goldoberfläche gut für Ligandenaustauschreaktionen eingesetzt werden können (siehe Abbildung 2.4) [69].

Neben dem vollständigen Austausch besteht auch die Möglichkeit eines partiellen Austauschs der Ligandenhülle. Diese Vorgehensweise führt zu Partikeln mit gemischten Ligandenhüllen. Abbildung 2.5 zeigt hierfür ein allgemeines Syntheschema.

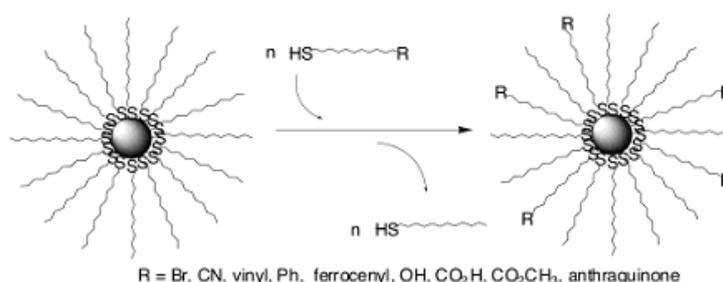


Abbildung 2.5: Allgemeines Schema für den partiellen Ligandenaustausch zwischen Alkanthiol-koodinierten Gold-NP und verschiedenen funktionalisierten Thiolen [35].

Die Anzahl ausgetauschter Liganden pro Partikel kann dabei durch Zugabe verschiedener Äquivalente an eintretendem Ligand variiert werden [44].

Ein partieller Austausch der Ligandenhülle kann auch zur Immobilisierung von Nanopartikeln auf Trägermaterialien verwendet werden. Dies findet beispielsweise Anwendung im Bereich der Katalyse. Durch Ligandenaustauschreaktion auf eine Polymermatrix aufgebrachte Citrat-koodinierte Au-Nanopartikel können beispielsweise die Reduktion einer Reihe aromatischer Nitrokomponenten katalysieren [70]. Entscheidend für die katalytische Aktivität dieser Partikel ist die schwache Wechselwirkung zwischen Citrat und Goldoberfläche, die den Nitrokomponenten einen leichten Zugang zur Goldoberfläche ermöglicht. Die Immobilisierung der Nanopartikel verhindert eine Agglomeration, welche die Effizienz der Katalyse durch den Verlust von Goldoberfläche stark herabsetzen würde.

2.2.2 Reaktionen an der Ligandperipherie

Funktionelle Gruppen an der Ligandperipherie können eine Vielzahl von Reaktionen eingehen. Kovalente Bindungen zwischen Ligand und zu immobilisierendem Molekül können beispielsweise durch nukleophile Substitution [71] oder Cycloadditionsreaktionen [72]

erhalten werden. Diese Methode bietet sich insbesondere dann an, wenn die für eine Austauschreaktion notwendige Synthese des vollständigen Liganden, beispielsweise ω -funktionalisierter Alkanthiolderivate, sehr aufwendig oder die Isolierung sehr schwierig ist [71], denn die Abtrennung von Nebenprodukten bei Reaktionen an der Kolloidoberfläche gestaltet sich häufig einfacher und es werden teilweise keine Schutzgruppen benötigt. Voraussetzung ist allerdings, dass die an der Reaktion beteiligten Komponenten unter mit dem Kolloid vereinbaren Bedingungen miteinander reagieren. Außerdem ist zu beachten, dass eine Abtrennung nicht umgesetzter terminaler Gruppen nur schwer bis unmöglich ist. Daher sollte die Reaktion für die meisten Anwendungen quantitativ ablaufen [73].

Die funktionelle Gruppe auf der Kolloidoberfläche kann in einigen Fällen bereits während der Synthese durch Wahl eines entsprechenden Liganden eingeführt werden. In vielen Fällen, beispielsweise bei reduktionsempfindlichen funktionellen Gruppen, geht allerdings der Reaktion an der Ligandperipherie eine Ligandenaustauschreaktion, wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, voraus.

Bei ω -Halogen-funktionalisierten Nanopartikeln bieten sich nukleophile Substitutionen an. In einer von *Murray et al.* durchgeführten Studie [74] zum Einfluss sterischer Effekte auf die S_N2 -Reaktivität solcher funktionalisierter Gold-NP wurde festgestellt, dass, anders als bei planaren funktionalisierten Goldoberflächen, in den untersuchten Fällen die Reaktivität der auf einem Nanopartikel immobilisierten Liganden vergleichbar ist mit der Reaktivität der monomeren, ungebundenen Form. Untersucht wurde die Reaktion ω -Brom-funktionalisierter Gold-NP mit primären Aminen (siehe Abbildung 2.6). Sowohl der sterische Anspruch des Nukleophils (in diesem Fall des Amins) als auch eine Variation der Kettenlänge der ω -Brom-Alkanthiolate sowie der benachbarten, unfunktionalisierten Alkanthiolate zeigten einen deutlichen Einfluss auf die S_N2 -Reaktivität.

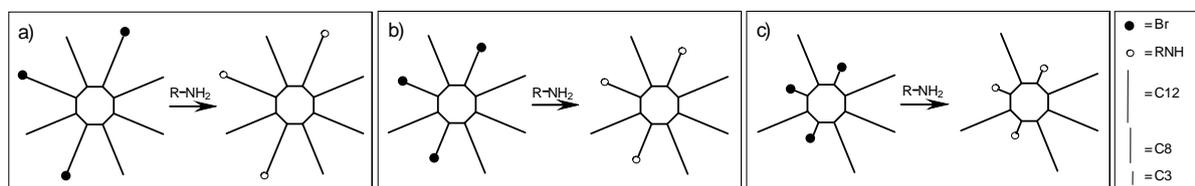


Abbildung 2.6: Schema der Reaktion ω -Brom-funktionalisierter Gold-NP mit primären Aminen [74].

Kupplungsreaktionen zwischen Alkoholen oder Aminen mit ω -Carboxylat-funktionalisierten Nanopartikeln bzw. zwischen Carbonsäuren und ω -Alkohol-funktionalisierten Nanopartikeln stellen weitere häufig eingesetzte Reaktionen der Oberflächenmodifizierung dar. Durch die

Vielzahl bekannter aktivierender Reagenzien können sowohl Veresterungen als auch Amidbindungsknüpfungen unter sehr milden Bedingungen durchgeführt werden [71]. Die resultierenden Bindungen weisen zudem eine gute Stabilität gegenüber Standardbedingungen auf. *Murray et al.* zeigten 1998 die Effizienz dieser Vorgehensweise anhand diverser Substrate und entwickelten allgemeine Arbeitsvorschriften für diese Klasse von Reaktionen [73].

Nicht nur kleine Moleküle, auch große Strukturen lassen sich auf diese Weise fest auf der Oberfläche von Nanopartikeln verankern und können so multivalent präsentiert werden. Ein Beispiel für die Immobilisierung eines sehr komplexen organischen Moleküls, dem Chemotherapeutikum Paclitaxel, auf 2 nm großen Gold-NP durch Veresterung wurde 2007 von *Gibson et al.* vorgestellt [75].

Die Gruppe der Click-Reaktionen hat sich ebenfalls als sehr geeignet zur Oberflächenmodifikation durch kovalente Bindungsknüpfung erwiesen. *Wang et al.* geben in einem 2008 erschienenen Artikel einen Überblick über verschiedene Click-Reaktionen und Beispiele für deren Anwendung zur Funktionalisierung verschiedenster NP [72]. Das von *Sharpless* 2001 [76] eingeführte Konzept der Click-Chemie umfasst Kupplungsreaktionen, welche einfach durchzuführen sind, hohe Ausbeuten aufweisen, aufgrund nicht oder nur sehr gering anfallender Nebenprodukte keine oder minimale Aufarbeitung benötigen und ohne den Einsatz von Schutzgruppen auskommen. Reaktionen dieses Typs erfüllen somit die zu Beginn dieses Kapitels aufgeführten Bedingungen für Reaktionen an Nanopartikeln.

Vier große Klassen von Click-Reaktionen sind bisher identifiziert worden: Cycloadditionen, nukleophile Ringöffnungen, Carbonyl-Chemie des „non-aldol“-Typs sowie Additionen an Kohlenstoff-Mehrfachbindungen. Von diesen ist die Kupfer^I-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden und terminalen Alkinen unter Bildung eines 1,2,3-Triazols die am weitesten verbreitete Reaktion.

Brennan et al. [77] verwendeten diese Reaktion zur Immobilisierung von Lipase auf Azid-funktionalisierten Au-Kolloiden. Mit einem fluorometrischen Lipase-Aktivitäts-Assay konnten sie zudem zeigen, dass die enzymatische Aktivität bei der Immobilisierung erhalten bleibt. Dies ist bei kovalenter Bindung von Enzymen an NP häufig nicht der Fall [78].

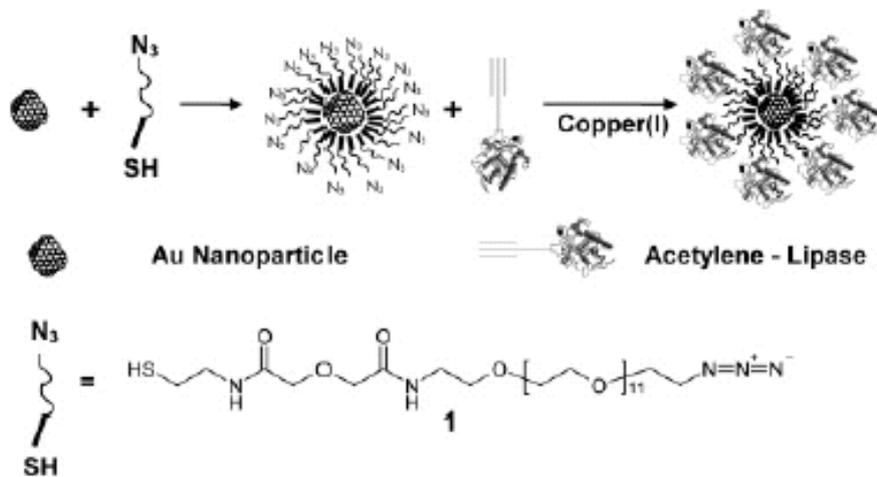


Abbildung 2.7: Herstellung Lipase-koordinierter Au-Nanopartikel mittels Click-Chemie [77].

Eine Untersuchung der Kinetik der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Azid und Alkin auf der Oberfläche von Gold-NP wurde von *Thode* und *Williams* durchgeführt (Schema siehe Abbildung 2.8) [79]. Variiert wurden hierbei neben dem Lösungsmittel auch die Substituenten am Alkineton, die Kettenlänge des Linkers, d. h. dem verbindenden Molekülteil, zwischen Azidgruppe und NP-Oberfläche sowie die Dichte der Azidgruppen auf der Partikeloberfläche. Ein umfassender Vergleich zwischen der Reaktion in Lösung und auf einer Partikeloberfläche wurde nicht durchgeführt, die Raten der Umsetzung scheinen allerdings sehr ähnlich zu sein [80]. Interessanterweise hatte eine Veränderung der Besetzungsdichte an funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche einen größeren Effekt auf die erzielte Ausbeute als alle anderen in dieser Studie untersuchten Parameter.

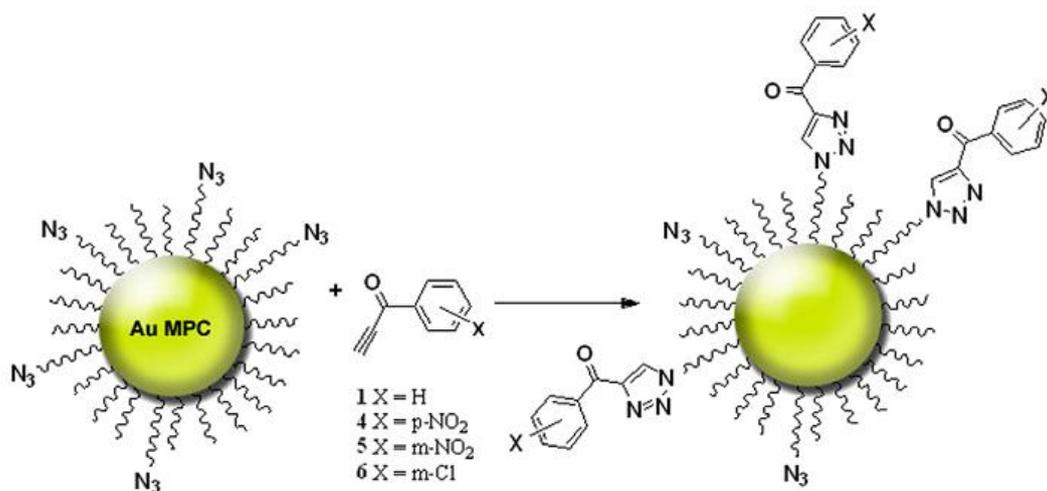


Abbildung 2.8: Allgemeines Schema für die Triazol-Bildung auf Gold-NP [79].

In Abbildung 2.9 sind alle in diesem Abschnitt näher vorgestellten Kupplungsreaktionen zwischen Nanopartikel und auf der Oberfläche zu immobilisierendem Molekül noch einmal zusammengefasst. Allgemein kann festgestellt werden, dass funktionalisierte Nanopartikel in voraussehbarer Weise reagieren und somit eine Vielzahl bekannter Reaktionen, eventuell nach Modifikation der Reaktionsbedingungen, auf die Reaktion von NP mit diesen Molekülen übertragen werden können.

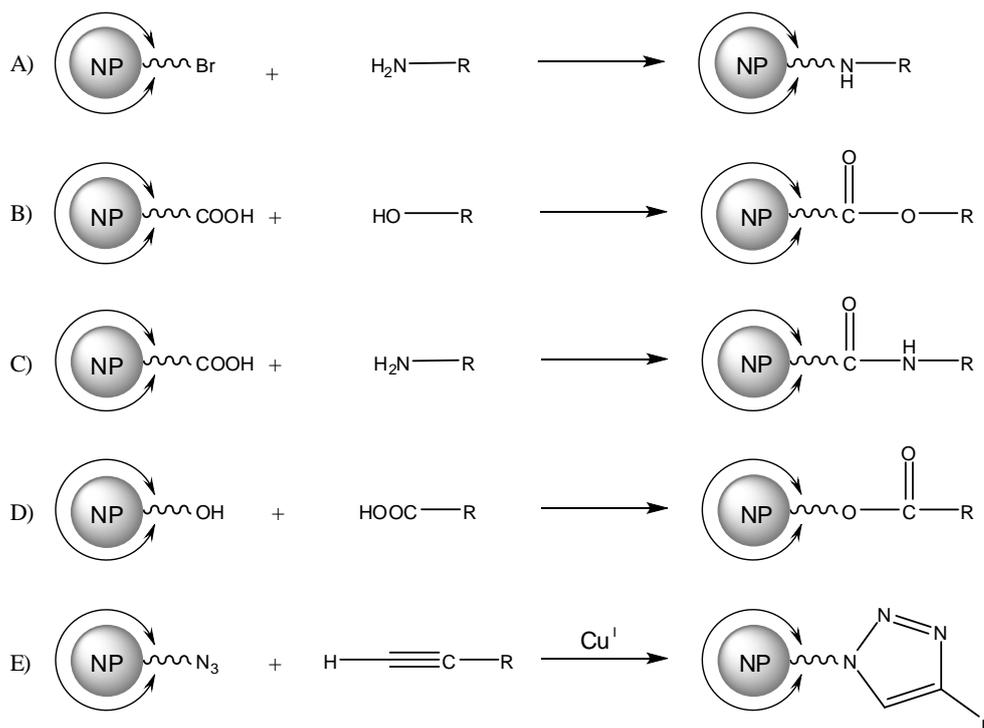


Abbildung 2.9: Allgemeine Reaktionsgleichungen für mögliche kovalente Verknüpfungen von Molekülen auf NP.

2.2.3 Adsorption von Molekülen an der Ligandenhülle

Auch die Adsorption von Molekülen an der Partikeloberfläche durch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen stellt eine Form der Oberflächenmodifizierung dar [81]. Dieser Prozess spielt vor allem eine Rolle in biologischen Systemen (siehe Abschnitt 1.4.2) und wird häufig zur Immobilisierung von Proteinen und Enzymen auf Nanopartikeln eingesetzt. In einem Übersichtsartikel von *Medintz et al.* über Quantenpunkt-Biokonjugate werden verschiedene Synthesemethoden, welche unter anderem auch auf diesen Wechselwirkungen beruhen, sowie einige Anwendungsbeispiele vorgestellt [82].

Proteine mit einer positiv geladenen Domäne können beispielsweise auf der Oberfläche von negativ geladenen NP durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden werden. Dieser Ansatz hat sich bei einer Vielzahl von rekombinanten Proteinen als erfolgreich erwiesen. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings die aufgrund fehlender homogener Anbindung heterogene Orientierung der Moleküle auf der Oberfläche. Dies kann bei der Immobilisierung von Enzymen zu einer deutlichen Reduktion der enzymatischen Aktivität führen. Desweiteren variiert in der Regel die Anzahl der pro Partikel gebundenen Moleküle und die Stabilität der Bindung ist stark abhängig von Ionenstärke und Polarität des Lösungsmittels.

2.2.4 Kombination mehrerer Methoden der Oberflächenfunktionalisierung

In vielen Fällen wird nicht nur eine der in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung eingesetzt, sondern eine Kombination mehrerer Methoden. Auf diese Weise lässt sich nahezu jede gewünschte Ligandstruktur erzeugen. Bei der am häufigsten verwendeten Methodenkombination folgt einer Ligandenaustauschreaktion die chemische Umsetzung der neu eingeführten funktionellen Gruppe.

Für viele Anwendungen interessant ist beispielsweise die Synthese von NP mit gemischten Ligandenhüllen. Neben Partikeln mit statistisch auf der Oberfläche verteilten Mischungen von Liganden, welche vor allem für pharmazeutische Zwecke synthetisiert werden, lassen sich durch mehrstufige Prozesse auch sogenannte Januskopf-Partikel erzeugen. Dabei handelt es sich um Nanopartikel, deren Liganden in zwei getrennten Domänen auf der Oberfläche verteilt sind. *Vilain et al.* stellen in einem Übersichtsartikel einige Januskopf-Metallpartikel vor und beschreiben die Synthese und optischen Eigenschaften solcher Systeme [83]. Der anisotrope Charakter dieser Partikel macht sie interessant für die Anordnung von Nanopartikeln in geordnete Strukturen. Die Synthese ist allerdings anspruchsvoll, denn Prozesse wie Ligandenaustauschreaktionen oder Diffusion der Liganden auf der Oberfläche können die räumlich geteilte Anordnung der funktionellen Gruppen zerstören.

Mirkin et al. synthetisierten beispielsweise durch Kombination mehrerer Funktionalisierungsmethoden Partikel mit zwei unterschiedlichen Oligonucleotiden, wobei ein Oligonucleotid nur in einer sehr geringen Anzahl pro Partikel und in einer Region lokalisiert vorlag, und erzeugten so eine ausgeprägte Anisotropie [84]. Die Synthesestrategie ist in Abbildung 2.10 gezeigt.

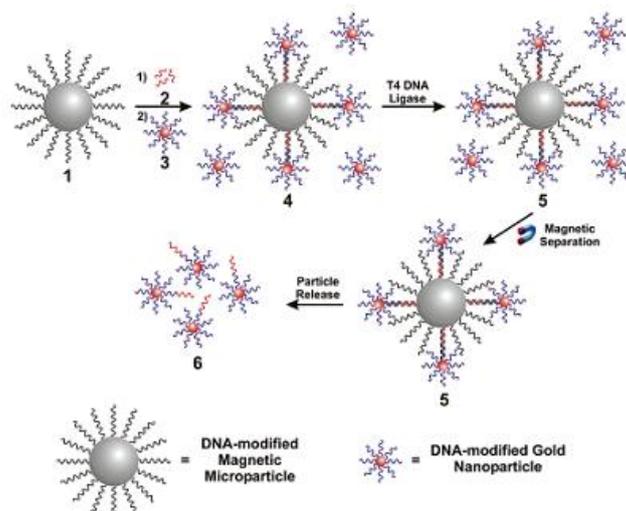


Abbildung 2.10: Schema für die Synthese anisotrop funktionalisierter Gold-NP nach Mirkin [84].

Einen Extremfall von Januskopf-Partikeln stellen monofunktionalisierte Nanopartikel dar. Verschiedene Methoden zur Synthese monofunktionalisierter Gold-NP werden in einem Übersichtsartikel von *Huo* und *Worden* vorgestellt [85].

Ein vielbearbeitetes Gebiet im Bereich der Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln ist auch die Immobilisierung von Katalysatoren. In Abschnitt 2.2.1 wurde bereits ein Beispiel (Citrat-koord. Au-NP auf einer Polymermatrix) für die Fixierung von Gold-NP auf einem Trägermaterial zu Katalysezwecken genannt. Die Immobilisierung eines Katalysators auf einer Matrix bietet die Möglichkeit der einfachen Abtrennung aus der Reaktionsmischung und somit der Regenerierung des oft teuren Katalysators. In vielen Fällen liegt die Aktivität des heterogen immobilisierten Katalysators allerdings unter der des homogenen Katalysators, vermutlich aufgrund eines eingeschränkten Zugangs zum katalytisch aktiven Zentrum. Nanopartikel bieten im Vergleich zu polymergebundenem Katalysator, bei dem viele aktive Zentren im Inneren des Polymerrückgrats gebunden sind, einen einfacheren Zugang.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Immobilisierung eines chiralen Katalysators auf der Oberfläche von Nanopartikeln durch Kombination mehrerer Oberflächenfunktionalisierungsmethoden ist die Immobilisierung von (R)-BINOL auf ca. 5 nm großen Gold-NP [86]. Der auf diesen NP durch Zugabe von $\text{Ti}(\text{O}-i\text{-Pr})_4$ hergestellte Ti-BINOLat-Komplex katalysiert die asymmetrische Alkylierung von Benzaldehyd mit Et_2Zn und liefert das Produkt in bis zu 98 % Ausbeute mit einem Enantiomerenüberschuss von 86 %. Dies entspricht fast der Aktivität des löslichen Ti-BINOLat-Komplexes. Nach beendeter Reaktion können die BINOL-funktionalisierten Nanopartikel durch Ausfällen aus Ethanol regeneriert werden.

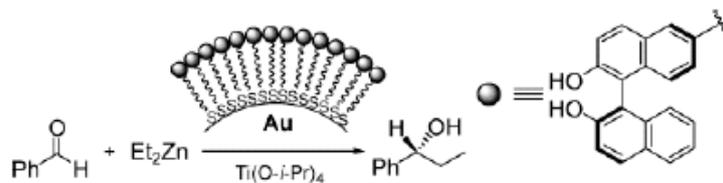


Abbildung 2.11: Katalyse einer asymmetrischen Alkylierung durch (R)-BINOL-funktionalisierte Au-Nanopartikel [86].

Weitere Beispiele sind die Immobilisierung eines Ru-Carben-Komplexes auf der Oberfläche von ca. 2.5 nm großen Au-Nanopartikeln zur Katalyse von Ringschluss-Olefin-Metathesen [87] und eines chiralen Rh-diphosphin-Komplexes auf der Oberfläche von Gold-NP ähnlicher Größe zur Katalyse der asymmetrischen Hydrogenierung von Enamiden [88].

2.3 Mehrdimensionale Nanopartikel-Architekturen

Nicht nur die Eigenschaften einzelner Nanopartikel sind von großem wissenschaftlichen Interesse, sondern auch die einzigartigen neuen Materialien, welche aus der Anordnung von Nanopartikeln in mehrdimensionale Architekturen entstehen können. Entscheidend für die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Materials sind hierbei neben der chemischen Zusammensetzung und Größe der verwendeten Bausteine auch die Art der Verknüpfung der Nanopartikel miteinander und der Abstand der einzelnen Bausteine zueinander, welche durch Wahl geeigneter Liganden eingestellt werden können. Die Eigenschaften der so erzeugten mehrdimensionalen kolloidalen Architekturen können sich dabei deutlich von den Eigenschaften der Einzelbausteine unterscheiden und so zu neuartigen Anwendungen führen. Neue kollektive Eigenschaften, die durch die Aggregation von Nanopartikeln entstehen, können beispielsweise gekoppelte Plasmonenabsorption, Energieübertragung zwischen den Partikeln und Elektronentransfer sein [35, 89].

Ein der Natur nachempfunder Prozess zum Aufbau solcher Architekturen ist die Selbstorganisation von Nanopartikeln, welche die ordnungsinduzierenden Eigenschaften der Bausteine ausnutzt anstatt Ordnung von einer externen Quelle in das System einzuführen. Voraussetzung für die Herstellung über Selbstanordnungsprozesse ist allerdings das Vorhandensein hinreichend stabiler und gut charakterisierter Bausteine, welche zudem eine einheitliche Form und Größe aufweisen. Die chemische Stabilität der Bausteine ist entscheidend, um Abbauprozesse wie partielle Oxidation und unerwünschtes Sintern zu

verhindern. Um eine große Bandbreite potentieller Anwendungen zu ermöglichen, sollten die Bausteine außerdem chemisch vielfältig sein und verschiedenste Reaktionen eingehen können [90]. In Abschnitt 2.2 wurde anhand vieler Beispiele, im Speziellen an Metallkolloiden, gezeigt, dass anorganische Nanopartikel diese Voraussetzungen bestens erfüllen.

Zum Aufbau mehrdimensionaler Nanopartikel-Architekturen durch Selbstorganisation können verschiedene Strategien eingesetzt werden, welche sich in den maßgeblich für die Überstrukturbildung verantwortlichen Wechselwirkungen unterscheiden.

In vielen Fällen sind die Haupttriebkkräfte zur Überstrukturbildung van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Partikeln. Die ersten erfolgreichen Selbstanordnungen von Nanopartikeln wurden auf diese Weise mit Metallnanopartikeln erreicht, denn die starken Dispersionswechselwirkungen zwischen Metallpartikeln führen auch bei einer breiteren Größenverteilung zur Ausbildung geordneter Strukturen. So sind verschiedene zwei- und dreidimensionale Anordnungen von Metallnanopartikeln bekannt, beispielsweise von Ag [91, 92], Au [93], und Pt [94]. Geordnete Strukturen aus Halbleiternanopartikeln können nur mit nahezu monodispersen Bausteinen erhalten werden, denn die van-der-Waals-Wechselwirkungen sind hier deutlich schwächer im Vergleich zu Metallpartikeln. Nach einer Verschmälerung der erzielbaren Größenverteilung konnten aber auch hier Molekülkristalle aus kleinen CdS- [95] und CdSe-Clustern [96] sowie dünne Filme aus angeordneten InP-Partikeln [97] hergestellt werden. Inzwischen ist sogar die Anordnung verschiedener binärer Systeme aufgrund von van-der-Waals-Wechselwirkungen gelungen. Ursache für die Ausbildung einer regelmäßigen Struktur sind dabei die Größenunterschiede der beteiligten NP [90]. In Abbildung 2.12 ist die Anordnung verschiedener Thiol-kordinierter NP mit mono- sowie bimodaler Größenverteilung zu sehen.

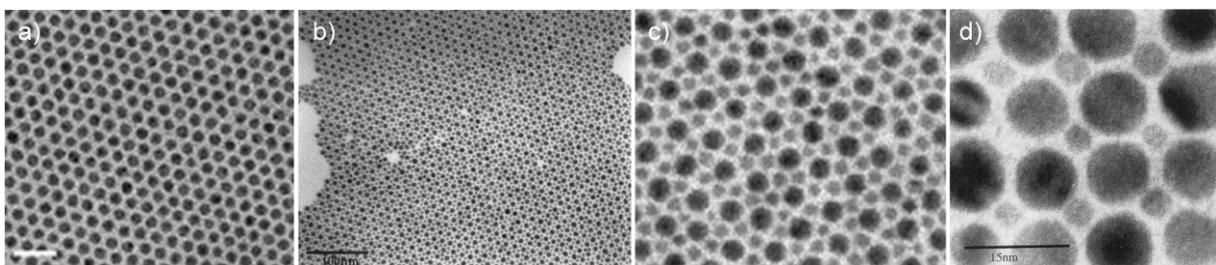


Abbildung 2.12: a) TEM-Aufnahme von Dodecanthiol-stabilisierten Gold-NP (Maßstab: 20 nm), b) TEM-Aufnahme von Decanthiol-stabilisierten Gold-NP mit einer bimodalen Größenverteilung, welche in einer AB₂-Struktur angeordnet sind (Maßstab: 100 nm), c) vergrößerter Ausschnitt aus b), d) TEM-Aufnahme von Decanthiol-stabilisierten Silber-NP mit einer bimodalen Größenverteilung, welche in einer AB-Struktur angeordnet sind [90].

Auch eine kovalente Verknüpfung der Nanopartikel kann zur Ausbildung mehrdimensionaler NP-Strukturen eingesetzt werden. Da die Anforderungen identisch sind mit denen für eine kovalente Modifizierung der Ligandenhülle, eignen sich hierzu die in Abschnitt 2.2.2 bereits aufgeführten Reaktionstypen. In der Literatur sind drei mögliche Strategien zu finden, welche in Abbildung 2.13 schematisch gezeigt sind und im Folgenden näher erläutert werden.

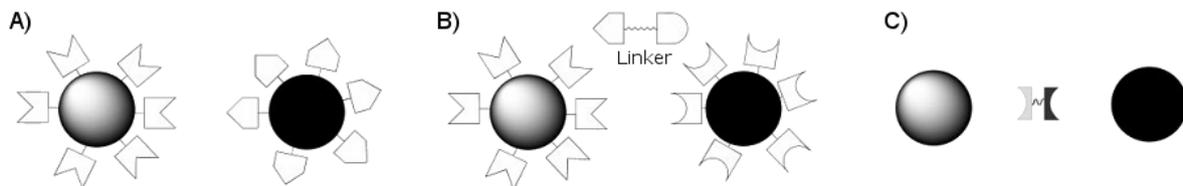


Abbildung 2.13: Schema zu verschiedenen Möglichkeiten der Verknüpfung von Nanopartikeln [98].

Beispielsweise bilden zwei Sorten NP, welche mit zueinander komplementären Ligandenhüllen funktionalisiert wurden, ausgedehnte Netzwerke aus (siehe Schema A in Abbildung 2.13). Die Reaktion eines zu beiden Ligandenhüllen komplementären Linkers mit den Nanopartikeln führt ebenfalls zu einer kovalenten Bindungsknüpfung zwischen zwei unterschiedlich funktionalisierten Partikelsorten (siehe Schema B in Abbildung 2.13). Ein weiterer Weg ist die Reaktion von Kolloiden mit bifunktionalen Molekülen, welche mit den Oberflächen von zwei verschiedenen Nanopartikeln wechselwirken können und so beide Partikel miteinander verbinden (siehe Schema C in Abbildung 2.13). Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von Alkandithiolen zur Verknüpfung von Gold-NP [99]. Sinnvoll ist eine kovalente Verknüpfung auch bei der schrittweisen Anordnung von Partikeln auf einem Substrat [100]. Ein Vorteil der kovalenten Verknüpfung im Vergleich zu den im vorangegangenen Absatz beschriebenen, durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zusammengehaltenen, Systemen ist die große Stabilität der resultierenden Strukturen. Die Realisierung einer Fernordnung in diesen Strukturen gestaltet sich allerdings sehr schwierig und gelang bisher nicht.

Elektrostatische Wechselwirkungen stellen eine weitere Möglichkeit für die Haupttriebkraft zur Überstrukturbildung dar und auch hierbei entstehen Strukturen mit einer im Vergleich zu durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zusammengehaltenen Systemen großen Stabilität. Darüber hinaus können diese Strukturen aber auch einen hohen Grad an Fernordnung aufweisen. *Kalsin et al.* erhielten durch elektrostatische Wechselwirkung von negativ geladenen Gold-NP mit positiv geladenen Silber-NP binäre Nanopartikelkristalle mit einer Größe im Mikrometerbereich [1].

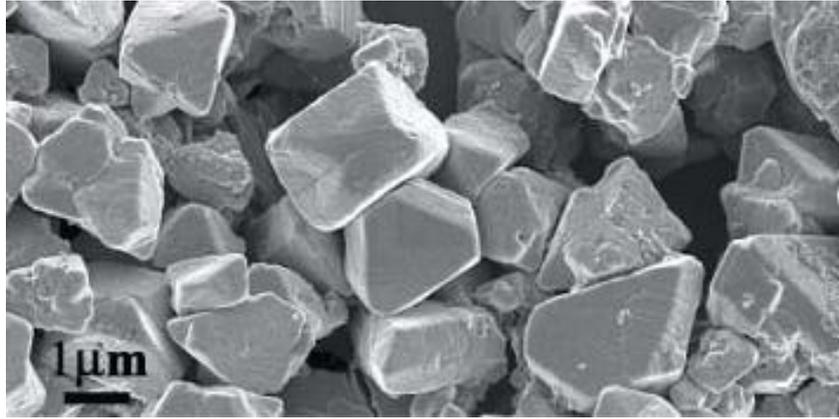


Abbildung 2.14: Binäre Nanopartikelkristalle aus positiv geladenen Ag-NP und negativ geladenen Au-NP [1].

Stellen in Abbildung 2.13 die zwei unterschiedlichen Symbole für die Oberflächenfunktionalisierung positive und negative Ladungen dar, dann zeigen Schema A und B die zwei für elektrostatische Wechselwirkungen möglichen Strategien. Im Gegensatz zu den attraktiven van-der-Waals-Wechselwirkungen können elektrostatische Wechselwirkungen sowohl attraktiv als auch repulsiv sein. Eine asymmetrisch verteilte Oberflächenladung kann die elektrostatischen Wechselwirkungen nach außen sogar gerichtet erscheinen lassen. Außerdem besteht die Möglichkeit, Stärke und Reichweite elektrostatischer Wechselwirkungen durch Wahl eines entsprechenden Lösungsmittels, und somit der dielektrischen Konstante, sowie Konzentration und chemischer Natur der Gegenionen einzustellen [101].

Mehrdimensionale NP-Strukturen können außerdem durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen als Haupttriebkraft erzeugt werden. DNA-Moleküle haben sich hierbei als sehr leistungsfähige und vielseitige Linker herausgestellt [102]. Sowohl *Mirkin* [103] als auch *Gang* [104] glückte beispielsweise 2008 die Kristallisation von DNA-funktionalisierten NP. Ein Schema zur Vorgehensweise von *Gang* ist in Abbildung 2.15 dargestellt.

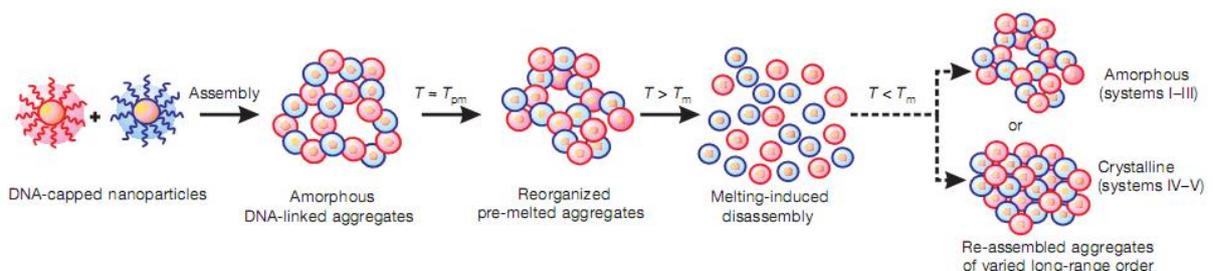


Abbildung 2.15: Schema zur DNA-induzierten Aggregation von Nanopartikeln nach *Nykypanchuk et al.* [104].

Auch die Wechselwirkung zwischen D-Biotin und Streptavidin kann zum Aufbau von NP-Strukturen verwendet werden, wie beispielsweise von *Fitzmaurice* gezeigt wurde [105].

Bei allen bisher aufgeführten Beispielen für durch Selbstorganisation aufgebaute Strukturen handelt es sich um isotrope Nanopartikelarchitekturen. Interessant sind aber auch anisotrope Strukturen. Diese können beispielsweise durch eine anisotrope Funktionalisierung der NP [57, 106] oder den Einsatz anisotroper Moleküle als Linker zwischen den NP erzeugt werden. Metall- und Halbleiternanopartikel haben ähnliche Dimensionen wie Proteine und DNA. Daher liegt die Verwendung dieser Moleküle als strukturinduzierender Baustein für die Anordnung von Nanomaterialien in anisotrope Strukturen sehr nahe. Die strukturbestimmenden Wechselwirkungen können dabei sowohl elektrostatisch, wie im Fall von Proteinen [107 - 109], als auch kovalent sein [110], oder, wenn beispielsweise DNA als verbindendes Molekül verwendet wird [111], auf Wasserstoff-Brücken-Bindungen beruhen.

Neben den verwendeten Komponenten und der Art der sie verbindenden Wechselwirkungen stellt die Präparationsmethode ein weiteres wichtiges Kriterium dar, welches die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Nanopartikelarchitekturen stark beeinflusst. Abhängig von der Präparationsmethode kann ein Material einen hohen Grad von Fernordnung (Überstrukturen), eine Nahordnung oder einen hohen Grad an Unordnung aufweisen, wobei jede Anordnung mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften verbunden ist [100]. In einem Artikel von *Zabet-Khosousi et al.* [100] werden verschiedene Präparationsmethoden zur Herstellung von Nanopartikelarchitekturen vorgestellt sowie die Vor- und Nachteile jeder Methode beleuchtet.

2.4 Medizinische Anwendungen von Nanopartikeln

Die Anwendung von Nanotechnologie in der Medizin hat in den vergangenen Jahren zu einer Vielzahl neuer medizinischer Produkte geführt, welche entweder bereits vorhandene Technologien in miniaturisierter oder verbesserter Form ersetzen oder andererseits vollkommen neue, ohne Nanotechnologie nicht denkbare, Aufgaben erfüllen. *Riehemann et al.* publizierten zu diesem Thema 2009 einen sehr informativen Übersichtsartikel [13]. Die Verwendung von nanostrukturierten Materialien auf diesem Gebiet bietet sich aufgrund der

ähnlichen Größe von biologischen Systemen und Nanomaterialien an: Zellkompartimente liegen größentechnisch im Submikrometerbereich, Proteine sind durchschnittlich ca. 5 nm groß [112]. Zellen können aus diesem Blickwinkel daher auch als ein komplexes System aus interagierenden Nanomaschinen betrachtet werden [113].

Konkrete Anwendungsgebiete von Nanomaterialien in der Medizin sind beispielsweise die medizinische Diagnostik (z.B. Halbleiter-NP als leistungsstarke Fluoreszenz-Marker [114]), sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, nanostrukturierte Oberflächen (z.B. die Oberfläche künstlicher Knochen [112]) und die Therapie. Auf letzteren Punkt und die dabei aufkommende Frage nach der Toxizität solcher Materialien soll in den folgenden Abschnitten etwas genauer eingegangen werden.

2.4.1 Nanovektoren [13]

Nanopartikel, die in der Lage sind, ein oder mehrere biologisch aktive Moleküle zu transportieren und freizusetzen, werden als Nanovektoren bezeichnet und in der Therapie eingesetzt. Moleküle mit geringer *in vivo* Stabilität, beispielsweise siRNAs (Small interfering RNAs), können von der schützenden Funktion einer solchen Einkapselung profitieren. Mit einigen Materialien lässt sich auch gezielt die Freisetzungskinetik aus solchen Partikeln steuern [115]. Viele potenzielle Arzneistoffe sind auch schlecht wasserlöslich. Damit solche Stoffe ihren Wirkungsort überhaupt in signifikanten Mengen erreichen können, müssen sie entweder in sehr großen Mengen als wässrige oder ethanolische Lösung oder in Verbindung mit Tensiden verabreicht werden. Die Immobilisierung in Nanopartikeln stellt bei diesem Problem eine weitere Alternative dar [116].

Derzeit eingesetzte und untersuchte Nanovektoren können in drei Gruppen, auch Generationen genannt, eingeteilt werden. Die erste Generation Nanovektoren (Schema siehe Abbildung 2.16a) besitzt kein aktives Auslieferungssystem, sondern wird passiv, beispielsweise durch verstärkte Durchlässigkeit oder Retention von Zellen, im Zielgewebe angereichert. Die bestbekanntesten Repräsentanten dieser Gruppe, welche sich auch bereits in klinischer Anwendung befinden, sind Liposomen. Für Nanovektoren, welche unter Ausnutzung dieses EPR(enhanced retention and permeability)-Effekts passiv das Endothel² überwinden sollen, liegt die maximal sinnvolle Größe zwischen 100 und 300 nm, weil für

² Endothel: Zellen der Innenwand von Lymph- und Blutgefäßen. Alle Gefäße des Herz-Kreislauf-Systems sind mit einer einzelligen Schicht aus Endothelzellen ausgekleidet.

größere Partikel der passive Transport durch das Endothel sehr unwahrscheinlich wird [117]. Nanovektoren der zweiten Generation (Schema siehe Abbildung 2.16b) besitzen spezifische zusätzliche Funktionalitäten, welche die molekulare Erkennung des Zielgewebes oder die aktive Freisetzung der Nutzlast ermöglichen. Beispiele hierfür sind Antikörper-funktionalisierte Liposomen oder Nanopartikel, welche durch Wechselwirkung mit dem jeweiligen Antigen die aktive Anreicherung im Zielgewebe ermöglichen. Diese Strategie, auch als „vascular targeting“ bekannt, hat den Vorteil, dass sie auch bei Krankheitsbildern eingesetzt werden kann, bei denen keine Änderung der Blutgefäßpermeabilität vorhanden ist. Außerdem können größere Partikel verwendet werden, welche eine größere Nutzlast tragen können [117]. Einen weiteren Fortschritt stellen Nanovektoren der dritten Generation (Schema siehe Abbildung 2.16c) dar. Nanopartikel dieser Gruppe sind in der Lage komplexe mehrstufige Funktionen auszuführen, beispielsweise eine zeitkontrollierte Freisetzung von biologisch aktiven Nanopartikeln nach Überwindung verschiedener biologischer Barrieren.

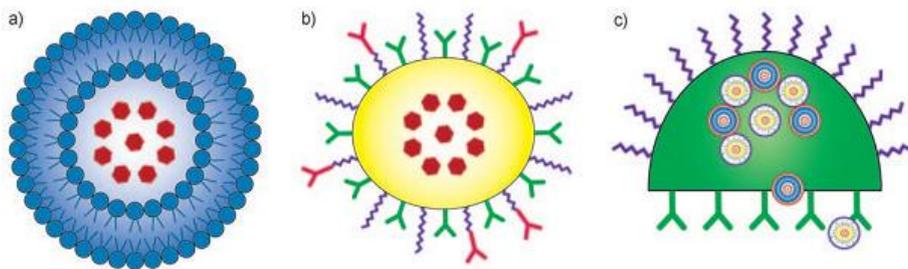


Abbildung 2.16: Schema von einem Nanovektor a) der ersten Generation, b) der zweiten Generation und c) der dritten Generation [13].

Größe, Form, Kernmaterial sowie Art und Dichte der Oberflächenfunktionalisierung sind die entscheidenden Faktoren beim Design von Nanovektoren [118]. Für Anwendungen *in vivo* muss dabei nicht nur die Wechselwirkung mit dem Zielmolekül selbst berücksichtigt werden, auch der Weg zum Zielgewebe und das Verhalten der Partikel nach Wechselwirkung mit dem Zielmolekül spielen eine entscheidende Rolle. Die Arbeitsgruppen von *Ferrari* und *Decuzzi* haben sich mathematisch mit der Problematik auseinandergesetzt und Modelle entwickelt, welche Abschätzungen über Adhäsionsverhalten und Zellaufnahme der Nanovektoren in Abhängigkeit von den oben genannten Designparametern ermöglichen [119]. Dabei entstehen Design-Karten (Beispiel siehe Abbildung 2.17), welche dem synthetischen Chemiker für die jeweilige Aufgabe aus der sehr großen Anzahl denkbarer Nanovektoren (Ohne Berücksichtigung aller Variationen errechnet *Ferrari* bereits ca. 10^{11} mögliche Kandidaten! [118]) vielversprechende Parameterkombinationen selektiert.

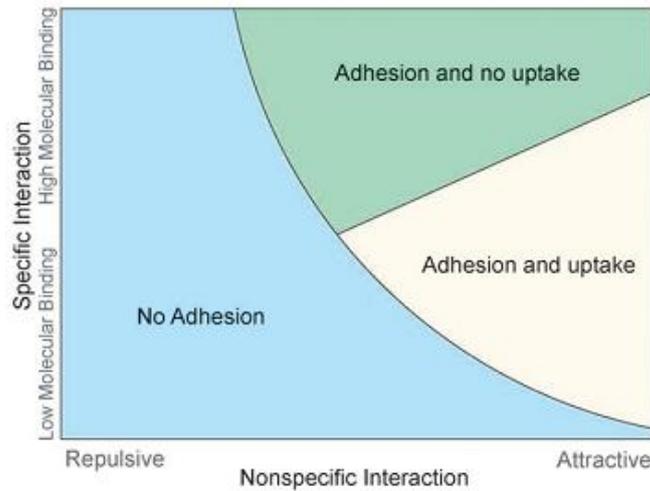


Abbildung 2.17: Design-Karte für Nanovektoren [118].

Ein wichtiges Ergebnis der mathematischen Studien von *Ferrari* und *Decuzzi* ist die Tatsache, dass von allen sphärischen Partikeln solche mit einem Durchmesser von ca. 100 nm am schlechtesten den zentralen Blutstrom verlassen und Wechselwirkungen mit dem Endothel eingehen. Dies bedeutet, dass diese Partikel von allen sphärischen Partikeln mit der geringsten Wahrscheinlichkeit auf ein Zielmolekül auf der Oberfläche des Endothels treffen und somit besonders ungeeignet sind für den zielgerichteten Transport von Therapeutika [120].

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der mathematischen Studien von *Ferrari* und *Decuzzi* ist die Tatsache, dass sphärische Partikel besonders schlecht geeignet sind für die Adhäsion an das Endothel. Dies stellt aber den entscheidenden Schritt für den zielgerichteten Transport eines Therapeutikums dar. Bereits eine kleine Abweichung in Richtung abgeflacht spheroider oder zylindrischer Form verbessert deutlich die Adhäsionsfähigkeit des Nanovektors [121]. Interessanterweise weisen nahezu alle derzeit klinisch eingesetzten Nanovektoren eine sphärische Form auf [118].

Unabhängig von der Strategie (passiver oder zielgerichteter Transport) müssen erfolgversprechende Nanovektoren eine Erkennung und Eliminierung durch das retikuloendotheliale System (RES)³ minimieren und im optimalen Fall verhindern. Bei dem RES handelt es sich um ein komplexes System aus phagozytierenden Zellen⁴, welche die Sinusoide⁵ der Leber überziehen. Die Größe der Partikel hat dabei einen enormen Einfluss auf

³ Die Aufgabe des RES ist die Aufnahme und Verdauung von Fremdstoffen und die Bildung von Antikörpern. Zum RES gerechnet werden die Kapillarendothelien sowie die Zellen des retikulären Bindegewebes und von ihnen abstammende freie Zellen.

⁴ Phagozyten: Zellen, die feste Partikel aufnehmen und verdauen können.

⁵ Sinusoid: Kleines Blutgefäß, das einer erweiterten Kapillare entspricht. Sinusoide kommen beispielsweise in der Leber, der Milz oder im Knochenmark vor.

die Erkennung durch das RES [117]. In vielen Fällen fördert das Opsonisieren, das heißt die Bedeckung der Partikel mit im Blut vorhandenen Faktoren, beispielsweise Immunglobulinen und Proteinen des Komplementsystems, zudem die Erkennung der Partikel durch das RES. Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm und größer aktivieren besonders effizient das Komplementsystem und werden daher schneller durch das RES aus dem Blut entfernt als kleinere Partikel [122]. Eine klassische Vorgehensweise zur Erhöhung der Zirkulationsdauer von Nanovektoren im Submikrometerbereich stellt die Dekoration der Partikel mit Polymerketten, vor allem Polyethylenglycol (PEG), dar. Dabei wird die Erkennung der Partikel durch Makrophagen⁶ durch eine Reihe komplexer Mechanismen unterdrückt. 2001 veröffentlichten *Moghini et al.* einen Übersichtsartikel, der sich mit lange im Körper zirkulierenden Partikeln beschäftigt und beispielsweise die PEG-Funktionalisierung von Liposomen vorstellt [123].

Die Funktionalisierung von Nanovektoren mit Polymerketten kann auch ein weiteres Problem beheben, welches aus der hohen Oberflächenenergie solch kleiner Partikel resultiert: die Aggregation von Nanopartikeln in biologischer Umgebung. Dendrimere und Halbleiternanopartikel sind bekannt für dieses Verhalten [122]. Eine Oberflächenmodifikation mit unterschiedlichsten hydrophilen Polymeren führt beispielsweise zu in Serum löslichen, fein verteilten und stabilen Halbleiternanopartikeln [124].

Schon seit einigen Jahren werden große Fortschritte in der Medizin mit Hilfe der Nanotechnologie von Experten vorhergesagt [125]. Inzwischen existieren zahlreiche Beispiele für die erfolgreiche Anwendung nanostrukturierter Wirkstoffe am Patienten. Dabei handelt es sich in erster Linie um Nanovektoren der ersten Generation. In der Tumorthherapie konnten beispielsweise deutliche Verbesserungen durch zytostatikahaltige Arzneimittel auf Basis von Liposomen erzielt werden. Die Immobilisierung des Zytostatikums in Liposomen verhindert den biologischen Abbau des Wirkstoffs und vermindert unspezifische Wechselwirkungen mit gesundem Gewebe und Plasmaproteinen. Verbunden mit der Funktionalisierung der Liposomen mit Zirkulationsdauer verlängernden Polymerketten ermöglicht dies eine lange Verweildauer im Körper und, durch den *Enhanced Permeability and Retention* (EPR)-Effekt, eine effizientere Anreicherung im Tumorgewebe. Für die Anwendung am Patienten zugelassene Liposomen-basierende Zytostatika sind beispielsweise DaunoXome[®], Myocet[®] und Doxil[®]/Caelyx[®] [126].

⁶ Makrophagen: Makrophagen gehören zu den Phagozyten und sind als weiße Blutkörperchen Zellen des Immunsystems. Sie dienen der Beseitigung von Mikroorganismen durch Phagozytose.

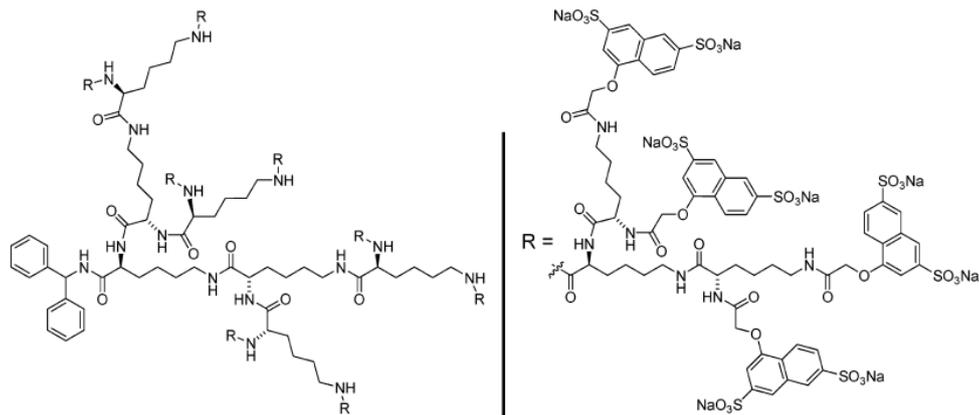


Abbildung 2.18: Chemische Struktur von SPL7013, dem antiviralen Dendrimer in VivaGel [127].

Ein weiteres Beispiel für ein medizinisches Präparat mit Nanovektor-Komponente, welches in klinischen Studien bereits gute Ergebnisse geliefert hat, ist das Produkt VivaGel des Unternehmens *Starpharma*. Die antiviralen Eigenschaften dieses Produkts bei Infektionen mit humanem Immundefizienz-Virus (HIV) und Herpes-simplex-Virus (HSV) sind auf dessen Dendrimerkomponente (Abbildung 2.18 zeigt die chemische Struktur) zurückzuführen, welche durch multivalente Wechselwirkungen mit Proteinen auf der Virusoberfläche eine Infektion verhindert [127]. Es handelt sich somit um einen Nanovektor der zweiten Generation. VivaGel stellt das erste Dendrimer-basierte Arzneimittel dar, welches bei der *United States Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen wurde.

2.4.2 Toxizität

Die Fragestellung nach der Toxizität von Nanopartikeln bei der Anwendung dieser Materialien in der Medizin stellt einen wichtigen Teilbereich der Nanomedizin dar. *In vitro* Anwendungen erlauben eine weniger strenge toxikologische Charakterisierung, aber für die Verwendung von Nanopartikeln *in vivo* ist ein gründliches Verständnis der Kinetiken und Toxikologie dieser Materialien zwingend notwendig [128].

Im Zuge der wachsenden Anzahl medizinischer Anwendungen wurden zahlreiche *in vitro* Zytotoxizitätsstudien an Nanopartikeln veröffentlicht, welche allerdings auf ein weites Gebiet an Konzentrationen und Einwirkzeiten zurückgreifen. Desweiteren werden von unterschiedlichen Gruppen auch unterschiedliche Zelllinien und Kulturbedingungen verwendet, was den Vergleich dieser Studien untereinander schwierig gestaltet. *Lewinski et al.* fassten 2008 in einem Artikel die bis dahin vorhandenen Studien zur Zytotoxizität von

Nanopartikeln, im speziellen von Kohlenstoff-, Metall- und Halbleiter-basierten Nanopartikeln, zusammen und stellen einige Tendenzen heraus [128]. Allgemein können Zellen eine kurzzeitige Aussetzung mit niedrigen Konzentration von Nanopartikeln ($< 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) überleben. Bei hohen Konzentrationen traten aber für alle in diesem Artikel untersuchten Partikel bei einigen Gruppen mengen- und zeitabhängig zytotoxische Effekte auf. Während die Ursachen für den zunehmenden Zelltod bei hohen Konzentrationen und längeren Einwirkzeiten materialspezifisch waren, traten immer ein Einfluss der Zellaufnahme von Partikeln und die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies auf.

Einige Nanomaterialien, beispielsweise Halbleiternanopartikel, sind intrinsisch toxisch, weil sie aus toxischen Elementen wie Cadmium, Blei oder Arsen aufgebaut sind, welche beim Abbau der Partikel freigesetzt werden können [129, 130]. Auch die auf der Oberfläche vorhandenen Stabilisatoren können toxisch sein, beispielsweise Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), welches zur Synthese von Goldnanostäben eingesetzt wird [131] und nach Freisetzung von der Partikeloberfläche zum Zelltod führen kann. Wie der vorangegangene Abschnitt 2.4.1 bereits vermuten lässt, spielen aber neben den Einzelkomponenten des Partikels, also Kernmaterial und Struktur des Liganden, auch Faktoren wie Größe und Form sowie Art und Dichte der Oberflächenfunktionalisierung bei der Toxizität von Nanopartikeln eine entscheidende Rolle, denn chemisches Verhalten und Verteilung im Körper haben auch in diesem Fall einen wichtigen Einfluss.

Bei der Abschätzung der Toxizität von Nanopartikeln muss berücksichtigt werden, dass für den Eintritt in den menschlichen Körper verschiedene Öffnungen (Haut, Lunge und Intestinaltrakt) zur Verfügung stehen, welche unterschiedlich starke Barrieren für Nanopartikel darstellen. Während die Haut ausschließlich als Barriere zu sehen ist, erlauben Lunge und Intestinaltrakt den passiven oder aktiven Transport verschiedenster Substanzen wie beispielsweise Wasser oder Sauerstoff [132]. *Hoet et al.* geben in ihrem Übersichtsartikel aus dem Jahr 2004 eine gute Zusammenfassung über die Mechanismen, welche verschiedene Nanopartikel bei Kontakt mit den unterschiedlichen Körperöffnungen überwinden müssen, bevor sie das Körperinnere erreichen können [132]. Ein wichtiges Beispiel in diesem Zusammenhang ist die Verwendung von Titandioxid-Nanopartikeln in Sonnencreme. Obwohl 2006 *Long et al.* bei Zellkulturexperimenten mit TiO_2 -Partikeln auf Indizien für eine Neurotoxizität dieser Partikel [133] gestoßen sind, wurde 2007 von dem Projekt „Nanoderm“, welches von der europäischen Kommission ins Leben gerufen wurde, in ihrem Abschlussbericht die Verwendung dieser Partikel auf gesunder Haut als unbedenklich

eingestuft [134]. Die Begründung liegt darin, dass kein Transport der untersuchten Nanopartikel durch gesunde Haut beobachtet werden konnte. Für verletzte oder kranke Haut, welche eine deutlich höhere Permeabilität aufweist, wurde allerdings keine Unbedenklichkeit ausgesprochen. Zur Beurteilung der Toxizität in diesen Fällen sind weitere Untersuchungen, nämlich neben der Penetrationsfähigkeit auch das Verhalten der Partikel nach Überwindung der Haut, notwendig.

Welche Barrieren Nanopartikel überwinden, hängt in der Medizin von der Darreichungsform ab. Ein Nanopartikel, welcher nicht in der Lage ist, die Haut zu durchdringen, kann in einer Salbe auf der Haut aufgetragen unbedenklich sein, aber intravenös verabreicht durchaus toxisch wirken, ähnlich wie beispielsweise die soeben vorgestellten Titandioxidpartikel. Ein zentraler Faktor bei der Beurteilung von Toxizität ist demnach auch die Applikationsform.

Welche Barrieren überwunden werden können und somit welche Orte im menschlichen Körper für die Toxizität eines bestimmten Partikels eine Rolle spielen, hängt neben der Applikationsform maßgeblich von Größe, Form und Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel ab.

Die Oberfläche der Nanopartikel bestimmt einen Großteil ihrer Bioaktivität und somit auch ihrer Toxizität. Eine wichtige Rolle hierbei spielt die Oberflächenladung der Partikel: Kationische Nanopartikel sind in der Regel toxischer als anionische, am besten biokompatibel sind tendenziell neutrale Partikel [128]. Antikörper [135], Proteine [136] und DNA [103, 137, 138] können auf der Oberfläche von Nanopartikeln immobilisiert werden. Auf diese Weise wird häufig eine Stabilisierung der Partikel in biologischer Umgebung erreicht [139], aber vor allem führt dies zu Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen.

Wie bereits in Abschnitt 2.4.1 näher erläutert, besteht die Möglichkeit, dass Nanopartikel unterschiedlichste Moleküle auf ihrer Oberfläche adsorbieren. Welche Moleküle bevorzugt adsorbiert werden und in welchem Maße hängt wiederum von der Oberflächenfunktionalisierung (Ladung und Hydrophobizität [115]) und Größe des Partikels ab. *Dobrovolskaia et al.* haben die Wechselwirkung kolloidaler Goldnanopartikel mit menschlichem Blut in Abhängigkeit von ihrer Größe untersucht und die an die Partikel bindenden Proteine isoliert [140]. Diese Veränderung der Partikeloberfläche kann bei medizinischen Anwendungen nicht nur die Wechselwirkung mit dem eigentlichen Ziel verhindern, auch die Toxizität eines Partikels kann sich aufgrund der neuen Oberfläche deutlich verändern. Biologische Abbauprozesse können ebenfalls die Oberfläche von Nanopartikeln verändern und zu neuen chemischen und physikalischen Eigenschaften

führen [128]. Adsorptionsverhalten und Abbaubarkeit eines Partikels in biologischer Umgebung stellen somit weitere wichtige Kriterien für die Abschätzung seiner Toxizität dar. Polymerketten auf der Oberfläche von Nanopartikeln können die Absorption von Serumproteinen und somit den biologischen Abbau und eine Erkennung durch Macrophagen verhindern (siehe Abschnitt 2.4.1).

Bei aus Kern-Schale-Struktur aufgebauten Nanomaterialien, beispielsweise den in diesem Projekt verwendeten Metall- und Halbleiternanopartikeln, stellt die Schnittstelle zwischen anorganischem Material und Ligandenhülle einen weiteren zu berücksichtigenden Punkt bei Toxizitätsuntersuchungen dar. Ligandenaustausch, Veränderung der Ligandendichte oder gar der vollständige Verlust der Ligandenhülle können maßgeblich die chemische Reaktivität des Materials verändern. Nicht durch Liganden abgesättigte Metall- oder Halbleiteroberflächen sind in vielen Fällen katalytisch aktiv. Während diese, durch das große Oberfläche-zu-Volumenverhältnis und die hohe Anzahl an Defektstellen von Nanomaterialien besonders effektive, katalytische Aktivität in vielen Anwendungen ausgenutzt wird (Ein Beispiel hierfür wurde in Abschnitt 2.2 gegeben [70]), kann sie in biologischen Systemen zur unerwünschten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen. Können diese aufgrund erhöhter Anzahl nicht mehr von den natürlichen Schutzmechanismen der Zelle abgebaut werden, lösen sie oxidativen Stress aus und führen somit in nicht-resistenten Zellen zum Zelltod. Ein Beispiel hierfür sind die in diesem Abschnitt etwas weiter oben genannten Titandioxid-Partikel. In einer Studie von *Long et al.* wurde gezeigt, dass Titandioxidpartikel mit einem mittleren Durchmesser von ca. 30 nm in Mikrogliazellen (Zellen des zentralen Nervensystems) die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies stimulieren [133]. Eine Arbeit von *Nel et al.* [141] vergleicht die Toxizität verschiedener Nanopartikel anhand ihrer Fähigkeit zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.

Der Einfluss der Partikelgröße auf die Zytotoxizität wurde von *Simon und Jahnen-Dechent et al.* am Beispiel von Goldnanopartikeln untersucht [142].

Au-NP mit einer Größe zwischen 1 und 2 nm waren dabei besonders toxisch, sowohl kleinere Goldkomponenten (Natriumaurothiomalat) als auch größere (15 nm im Durchmesser) Goldkolloide wiesen eine deutlich geringere (im Vergleich keine) Toxizität auf, unabhängig vom getesteten Zelltyp. Diese Studie und auch andere [143] zeigen, dass die Größe einen wesentlichen Einfluss auf die Toxizität von Nanopartikeln hat. Ebenfalls entscheidend ist die Form der Nanopartikel bzw. ihr Aspektverhältnis. In einem 2008 erschienenen Artikel von *Simon und Jahnen-Dechent* wird hierfür Asbest als Beispiel genannt [129].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Vielzahl von Faktoren über die Biokompatibilität von Nanopartikeln entscheidet. Eine Gewichtung der einzelnen Faktoren ist schwierig, die bisherigen Untersuchungen erlauben allerdings eine fundierte Vermutung, ob eine neue Partikelsorte toxisch sein könnte oder eher nicht. Systematische Studien zur Toxizität von Nanopartikeln unterstützen so beispielsweise beim rationalen Design neuer Nanovektoren.

2.5 Überblick über das bearbeitete medizinische Gebiet

Die Entwicklung einer effektiven Chemotherapie, welche die Blockierung eines Rezeptors anstrebt, lässt sich in mehrere Phasen gliedern. Kurz zusammengefasst wird, nach Identifikation und Isolierung des verantwortlichen Rezeptors, zunächst der Minimal-Ligand, das heißt der kleinste noch bindende Ausschnitt aus dem natürlichen Liganden, identifiziert. Die Bestimmung der kritischen funktionellen Gruppen in diesem Minimal-Ligand ermöglicht dann die Synthese von Mimetika, deren Eigenschaften (beispielsweise das Bindungsverhalten) durch Variation von Struktur oder Multimerisierung weiter optimiert werden [144]. Für das Krankheitsbild Entzündung, welches in dieser Arbeit von Interesse ist, wurden bereits Minimal-Liganden isoliert und auch Mimetika entworfen.

Im Folgenden werden daher diese Krankheit und ihre Ursachen kurz beschrieben, die zu blockierenden Rezeptoren herausgestellt und die auf diesem Gebiet bereits vorhandenen Kenntnisse zu Minimal-Liganden und Mimetika zusammengefasst.

Der Entzündungsprozess ist eine komplexe Antwort des vaskulären Gewebes und der Entzündungszellen auf Impulse wie beispielsweise Pathogene und geschädigte Zellen. Er fördert die Heilung von beschädigtem Gewebe und die Eliminierung eingedrungener Pathogene. Wird allerdings die empfindliche Balance zwischen Entzündung und Heilung gestört, kann die Entzündung zu chronischen Krankheiten wie Asthma oder Arthritis führen. Wissenschaftler fanden bei der eingehenden Ursachenforschung für Herzinfarkt, Krebs und Alzheimer auch Zusammenhänge zwischen diesen Erkrankungen und Entzündungsprozessen [145]. Diese Erkenntnisse führten zu neuem Interesse an der Entwicklung entzündungshemmender Medikamente.

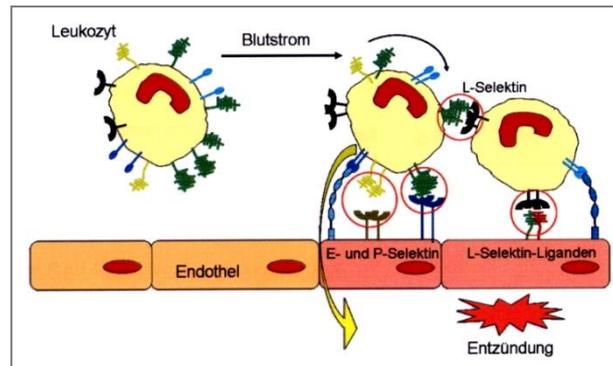


Abbildung 2.19: Selektin-vermittelte Leukozytenbindung an das vaskuläre Endothel während des Entzündungsprozesses [146].

Die Selektin-vermittelte Bindung von Leukozyten an das Endothel stellt im menschlichen Körper den entscheidenden ersten Schritt des komplexen Entzündungsprozesses dar [147, 148] (siehe Abbildung 2.19). Daher streben viele entzündungshemmende Therapien die Inhibierung dieses Schlüsselschritts durch künstliche Selektin-Binder an, welche eine Wechselwirkung zwischen den Selektinen und ihren natürlichen Liganden, und somit eine Bindung der Leukozyten an das Endothel, verhindern. Ein weiterer Vorteil dieser Strategie ist die weitgehend örtliche und zeitliche Begrenzung der Selektin-Expression auf entzündetes Gewebe, welche mögliche Nebenreaktionen in anderen Geweben verhindert [149].

Lindhorst publizierte 2000 einen Übersichtsartikel über die Struktur und Funktion von Kohlenhydraten, in welchem neben den Selektinen auch der Entzündungsprozess in komprimierter Form vorgestellt wird [150]. Selektine sind eine Gruppe Calcium-abhängiger Kohlenhydrat-bindender Membranproteine. Bisher sind drei verschiedene Selektine bekannt: L(Leukozyten)-, E(Endothel)- und P(Platelet)-Selektin, benannt nach dem Zelltyp, auf dem sie zuerst beschrieben wurden. Alle weisen eine recht ähnliche grundsätzliche Struktur auf [150], welche in Abbildung 2.20 schematisch dargestellt ist.

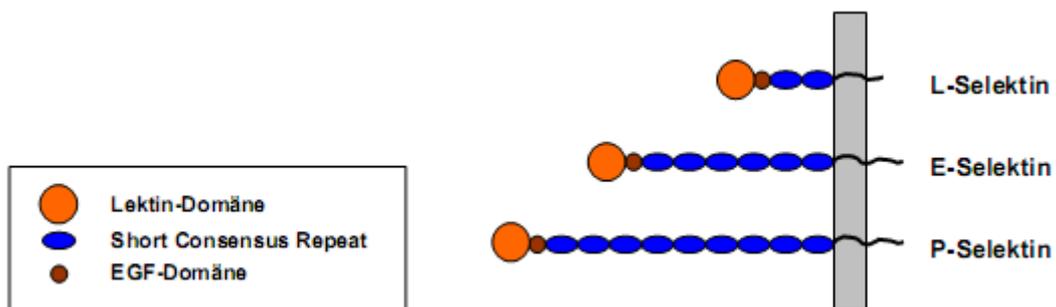


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der Selektine [149].

Der extrazelluläre Teil aller Selektine ist aus drei verschiedenen Arten von Proteindomänen aufgebaut. Der Amino-Terminus wird von einer Lektin-Domäne gebildet, welche aus ca. 120 Aminosäuren besteht und in der die Bindungstasche für den Zuckerliganden lokalisiert ist. Dieser Domäne folgt eine Sequenz aus 35-40 Aminosäuren, welche erstmals im epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) gefunden wurde. An diese Domäne schließt sich eine variable Anzahl an sich wiederholenden Elementen an (Short Consensus Repeat), jede ca. 60 Aminosäuren lang, deren genaue Funktion bisher nicht bekannt ist. Die Anzahl variiert nicht nur mit dem Selektin-Typ (L-, E- oder P-Selektin), sie ist auch speziesabhängig. Während menschliches P-Selektin neun Elemente dieser Art besitzt, existieren bei Mäusen, Ratten und Schafen nur acht Elemente. Alle Selektine sind mit einer einzigen Transmembran-Region, gefolgt von einem kurzen zytoplasmatischen Ende (17 Aminosäuren bei L-Selektin, 32 bei menschlichem E-Selektin und 35 bei menschlichem P-Selektin), in der Zellmembran verankert [148].

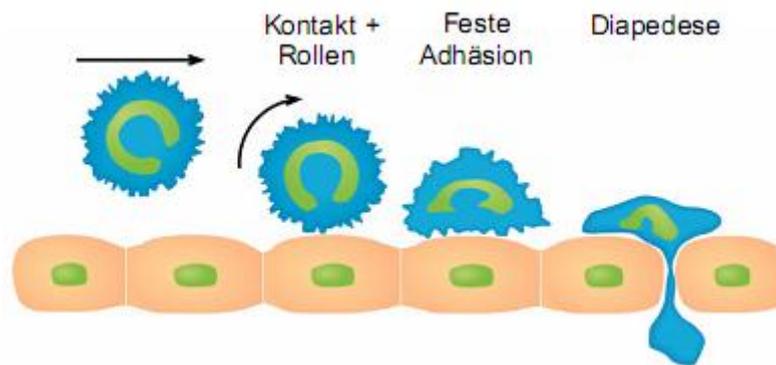


Abbildung 2.21: Adhäsionskaskade der Leukozyten [151].

Selektine haben die Aufgabe die Bindung von Leukozyten aus dem fließenden Blutstrom und ihr anschließendes Rollen auf der vaskulären Oberfläche herbeizuführen, um eine Migration der Leukozyten in das beschädigte Gewebe zu ermöglichen. In Abbildung 2.21 sind die entscheidenden Phasen dieses Vorgangs schematisch gezeigt. Aufgrund der dabei auftretenden Scherkräfte ist für die Kontaktbildung zwischen Leukozyten und Endothelzellen ein spezieller molekularer Mechanismus notwendig. Damit eine sich im Fluss befindende Zelle an das Endothel binden kann, muss ein Selektin seinen Liganden finden und wechselwirken, bevor der Fluss die Moleküle wieder trennt. Damit die Zelle dann auf dem Endothel rollen kann, müssen neue Bindungen geknüpft werden, welche die sich lösenden alten Bindungen ersetzen. Die verschiedenen Selektine haben in dieser Kaskade unterschiedliche Aufgaben. Die Affinitätskonstanten und Bindungskinetiken für die

Wechselwirkung der Selektine mit ihren Liganden sind der jeweiligen Aufgabe angepasst und unterscheiden sich daher bei L-, P- und E-Selektin. Anhand von Untersuchungen mit beispielsweise synthetischen Oligosacchariden konnte allerdings allgemein festgestellt werden, dass Selektine schnelle Bindungsassoziations- und Bindungsdissoziationskonstanten für die Wechselwirkung mit ihren Liganden aufweisen. Die geringe Bindungsaffinität (Assoziationskonstanten im millimolaren Bereich [152]) der einzelnen Bindungen, welche durch die multivalente Präsentation der Liganden ausgeglichen wird [153], ist charakteristisch für alle Kohlenhydrat-Wechselwirkungen. Untersuchungen zum Bindungsmechanismus sowie einige hochaffine Glycoprotein-Liganden werden in einer Arbeit von *Vestweber* und *Blanks* vorgestellt [148].

Seit der ersten Entdeckung der Selektine im Jahr 1989 wurde eine Reihe von Liganden identifiziert [144]. Einen Überblick über natürliche Selektinliganden sowie Mimetika gibt ein 1998 von *Simanek et al.* publizierter Artikel [144]. Der 1993 entdeckte P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) ist der bestuntersuchte natürliche Selektinligand und der Hauptligand von P-Selektin. Es handelt sich um ein homodimeres Sialomuzin, dessen Selektinbindungsepitop sich am N-Terminus befindet und zwei Bindungsmotive aufweist: Zum einen ein für die Bindung an P-Selektin entscheidendes Tyrosinsulfatmotiv und zum anderen eine Glykanstruktur, welche ein endständiges Sialyl Lewis x (SiaLe^x) trägt [151]. In Abbildung 2.22 ist die Struktur von SiaLe^x , einem Tetrasaccharid, welches als Minimalligand für die Bindung an Selektin identifiziert wurde, gezeigt.

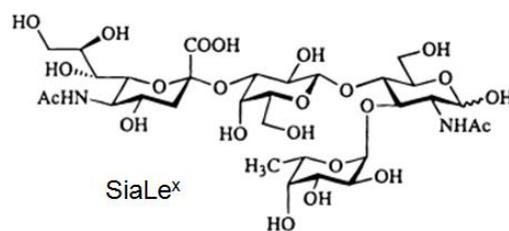


Abbildung 2.22: Strukturformel von SiaLe^x ($\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4(Fuc}\alpha 1\text{-3)GlcNAc}$) [154].

Das Tyrosinsulfatmotiv enthält drei Tyrosinreste, von denen mindestens eins für eine hochaffine Bindung mit P-Selektin sulfatiert sein muss. Die Bindung von PSGL-1 an L-Selektin erfolgt über dieselben Bindungsepitope wie bei P-Selektin. Für die Bindung von E-Selektin an PSGL-1 ist dagegen nur die Glykanstruktur entscheidend, das Tyrosinsulfatmotiv wird nicht benötigt [151].

Aufbauend auf den Untersuchungen der molekularen Bindungseigenschaften der Selektine konnte gezielt nach natürlichen und synthetischen Inhibitoren gesucht werden. Heparin beispielsweise wurde schon 1989 als Bindungspartner für P-Selektin identifiziert. Dabei handelt es sich um ein stark sulfatiertes Polysaccharid aus der Gruppe der Glycosaminoglykane mit einem Molekulargewicht zwischen 3000 und 30000 kDa. Die Strukturformel von Heparin ist in Abbildung 2.23 dargestellt. Neben P-Selektin wird auch L-Selektin *in vitro* effektiv von Heparin inhibiert. *In vivo* konnte bereits eine antiinflammatorische Aktivität nachgewiesen werden [149].

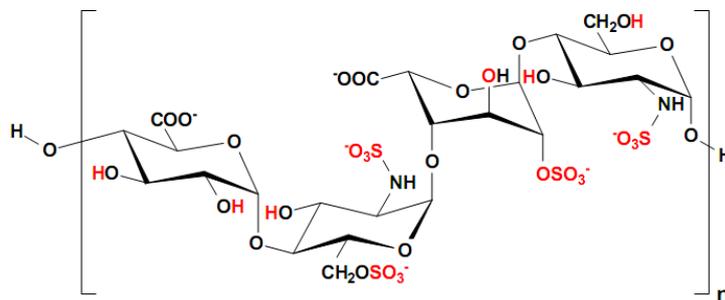


Abbildung 2.23: Allgemeine Strukturformel von Heparin. Mögliche Sulfatierungsstellen sind die N-, 3- und 6-Positionen des Glucosamins sowie die 2- und 3-Positionen der Uronsäuren (rot markiert) [149].

Eine 2002 veröffentlichte Studie von *Esko et al.* stellte eine Korrelation zwischen dem Sulfatierungsgrad, der Selektin-Bindung und der antiinflammatorischen Aktivität von Heparin fest [155]. Beim von *Linhardt et al.* durchgeführten Vergleich der Selektin-Bindungseigenschaften von unfractioniertem und niedermolekularem fractioniertem Heparin wird außerdem die Abhängigkeit der Bindungseigenschaften von der Anzahl präsentierter Bindungsstellen pro Molekül, und somit der Multivalenzeffekt, deutlich: Kleine Heparin-Fragmente sind weniger effektive Selektin-Inhibitoren als größere [156].

Obwohl mit Kohlenhydraten gute Bindungseigenschaften erreicht werden können, stellen sie keine idealen Kandidaten für Arzneimittel dar: Sie sind aufwendig zu synthetisieren, binden nur schwach und haben eine geringe orale Verfügbarkeit aufgrund der labilen glykosidischen Bindung und schlechter Zellaufnahme [144]. Eine Möglichkeit zur Verbesserung dieser Eigenschaften stellt die Trägerung von Mono- und Oligosacchariden auf Nanopartikeln dar. Diese glykokonjugierten Nanopartikel sind in der Regel sehr gut wasserlöslich, langzeitstabil in Lösung (keine Koagulation) und weisen eine hohe Polyvalenz auf mit Kontrolle über die Anzahl der Liganden und der Partikelgröße. Zudem sind sie in vielen Fällen resistent gegenüber enzymatischem Abbau [153]. In der Arbeitsgruppe von *Penadés* wurden sowohl

glycokonjugierte Goldnanopartikel [153, 157] als auch Cadmiumsulfid-Nanopartikel [158] hergestellt und auf ihre antiadhäsiven Fähigkeiten bzw. im Fall der Halbleiternanopartikel ihre Eignung zur Zellmarkierung untersucht. Ziel dieser Arbeitsgruppe ist das bessere Verständnis von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen [159], aber auch die Beeinflussung von Kohlenhydrat-vermittelten Zell-Zell-Adhäsionsprozessen wie beispielsweise des Entzündungsprozesses.

Auch Polymer-Partikel können als Träger für Mono- und Oligosaccharide dienen. *Haag et al.* zeigten 2008, dass Galaktose-funktionalisierte Polyglycerol-Partikel in der Lage sind die Selektin-Bindung zu inhibieren [160]. Neben einer Abhängigkeit vom Funktionalisierungsgrad der Partikel wurde in dieser Arbeit auch eine deutliche Verbesserung der Bindungseigenschaften nach Sulfatierung der Galaktose-Reste festgestellt. Diese Beobachtung deckt sich mit den in der Arbeit von *Linhardt et al.* für Heparin gemachten Beobachtungen (siehe oben).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese der Nanopartikel

Für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten Ziele ist die Synthese monodisperser Nanopartikel in verschiedenen Größen und aus unterschiedlichen Materialien erforderlich, um eine breite Anwendbarkeit der zu entwickelnden Architekturen und Oberflächenfunktionalitäten zu zeigen. Die Funktionalisierung der Partikel nach der Synthese wurde aus den bereits in Abschnitt 1.2 aufgeführten Gründen einer Funktionalisierung während der Synthese vorgezogen. Die Oberfläche der als Ausgangsmaterial hergestellten Kolloide sollte daher möglichst leicht durch die dort vorgestellten Methoden zu modifizieren sein.

Die Oberflächenplasmonenbande von Metallnanopartikeln, deren Lage von Größe und Aggregationszustand der NP abhängt (siehe Abschnitt 1.1.2), ermöglicht eine Beobachtung des Aggregationsverhaltens dieser Kolloide. Dies ist vor allem für die Erzeugung von Nanopartikel-Peptid-Hybridmaterialien eine interessante Eigenschaft. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Synthesen für monodisperse Au-NP in verschiedensten Größen und Formen publiziert (siehe Abschnitt 1.1.1). In dieser Arbeit wurden Au-NP mit mittleren Durchmessern zwischen 1.5 und 25 nm als Baustein für die Peptid-induzierte Anordnung von NP synthetisiert. Au-NP haben sich zudem in einer Reihe von Beispielen als biokompatibel erwiesen [161, 162] und finden bereits in einigen medizinischen Gebieten Anwendung [163, 164]. Als Kernmaterial für medizinisch wirksame Nanopartikel wurde daher ebenfalls Gold gewählt.

Desweiteren wurden Alloy-NP aus Gold und Silber sowie reine Silber-NP mit mittleren Durchmessern im Größenbereich zwischen 30 und 40 nm synthetisiert, so dass NP mit Absorptionsmaxima im Wellenlängenbereich von 410 bis 530 nm für dieses Projekt zur Verfügung standen.

CdS-Kolloide mit einem Durchmesser zwischen 1.5 und 5 nm, welche aufgrund ihrer elektronischen Struktur sowohl als einzelner Partikel als auch in mehrdimensionalen Anordnungen interessante optische Eigenschaften aufweisen, stellen einen weiteren sinnvollen möglichen Baustein für geordnete NP-Strukturen dar. Die Synthese dieser Partikel, auch mit unterschiedlich geladenen Ligandenhüllen, wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit [165] optimiert.

3.1.1 Synthese und Charakterisierung von Au-Kolloiden

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf verschiedene sphärische Au-NP-Sorten, welche sich in ihrem mittleren Durchmesser unterscheiden, als Ausgangsmaterial für weitere Funktionalisierungen synthetisiert. Alle Synthesen beruhen auf demselben Prinzip, nämlich der Reduktion eines Goldsalzes in Gegenwart eines Stabilisators. Der resultierende Partikeldurchmesser wird durch geeignete Wahl des Liganden, der Lösungsmittelpolarität, der Reaktionstemperatur und -dauer sowie der Konzentration und Stöchiometrie der Edukte eingestellt. Alle im Folgenden genannten Konzentrationen von Kolloidlösungen beziehen sich, soweit nicht anders gekennzeichnet, auf die Konzentration an Partikeln in der Lösung.

Die Darstellung monodisperser Au-Kolloide mit einem mittleren Durchmesser von 1.5 nm erfolgte nach einer 2006 von *Stucky et al.* publizierten Synthese (Syntheschema siehe Abbildung 3.24) [166].

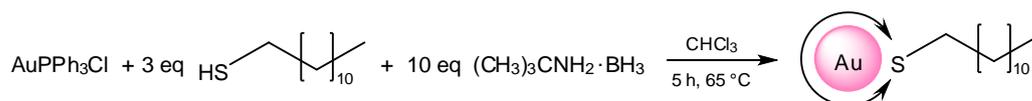


Abbildung 3.24: Reaktionsschema der Synthese Dodecanthiol-koordinierter Au-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 1.5 nm.

AuPPh₃Cl wurde in Chloroform gelöst und in Gegenwart von Dodecanthiol (DT) mit tert.-Butylamin-Boran-Komplex zu den Au-NP reduziert. Die Aufarbeitung der dabei entstehenden braunen Lösung erfolgte mittels Dialyse gegen Chloroform. Die Partikel wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 4-8 °C in Form einer ca. 5 μmolaren Lösung in Chloroform gelagert. Aufgrund der guten Stabilisierung durch die Thiol-Ligandenhülle lassen sich die Partikel auch nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels rückstandsfrei in neuem Lösungsmittel wieder dispergieren. Eine Funktionalisierung dieser hydrophoben Au-NP kann durch Ligandenaustauschreaktionen gegen andere Thiole, wie in Abschnitt 1.2.1 vorgestellt, erzielt werden.

Die Charakterisierung des Partikelkerns erfolgte mit Hilfe von TEM-Aufnahmen (siehe Abbildung 3.35), welche sphärische Kolloide zeigen. Der Partikeldurchmesser variiert zwischen 1 und 2 nm, sehr vereinzelt sind etwas größere Partikel (zwischen 4 und 5 nm im Durchmesser) zu sehen. Eine exakte Größenbestimmung fällt allerdings aufgrund der

geringen Größe der Partikel und dem daraus resultierenden schlechten Kontrast der TEM-Aufnahmen schwer.



Abbildung 3.25: TEM-Aufnahme von DT-koord. Au-NP mit einem Durchmesser von 1.5 nm.

Zur Charakterisierung der Ligandenhülle dieser Partikel wurden ^1H -NMR-Spektren und IR-Spektren aufgenommen (Ergebnisse siehe Abschnitt 5.3.1). In beiden Spektren sind keine Verunreinigungen, sondern ausschließlich die für DT zu erwartenden Signale zu sehen.

Die Synthese monodisperser Au-Kolloide mit einem mittleren Durchmesser von 6 nm erfolgte nach einer sehr ähnlichen Synthese, ebenfalls von *Stucky et al.* [166] (Syntheschema siehe Abbildung 3.26).

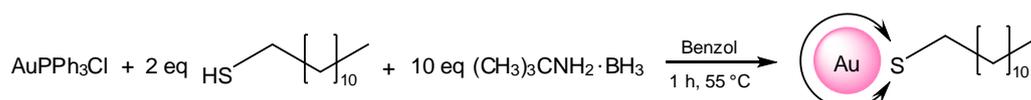


Abbildung 3.26: Reaktionsschema für die Synthese DT-koordinierter Au-NP ($\text{\O} = 6 \text{ nm}$).

Die aus dieser Vorschrift resultierenden Partikel weichen chemisch von den zuvor Beschriebenen im Wesentlichen nur in ihrer Größe ab, der sie stabilisierende Ligand ist identisch. Im Unterschied zur vorangegangenen Synthese wurde hier Benzol als Lösungsmittel verwendet, die Lösungsmittelpolarität somit deutlich reduziert, und außerdem die Reaktionstemperatur erhöht. Beide Faktoren führen bei identischem Reduktionsmittel und Ligand zu einer Vergrößerung der erhaltenen Partikeldurchmesser.

Die Reaktionslösung färbt sich, ähnlich der zuvor beschriebenen Synthese, direkt nach Zugabe des Reduktionsmittels zunächst braun, was auf die Bildung kleinerer Au-NP zurückzuführen ist. Nach wenigen Minuten tritt allerdings ein Farbwechsel zu tiefrot auf. Der

Farbton verändert sich danach kaum noch bis zum Ende der Reaktion. Ursache hierfür ist die bei Au-NP dieser Größe (ab ca. 2 nm [167]) bereits vorhandene Oberflächenplasmonenbande. Nach der Synthese wurden die erhaltenen Partikel zunächst durch Zugabe einer dem Benzol äquivalenten Menge Ethanol gefällt, durch Zentrifugation von der überstehenden Lösung getrennt und der schwarze Rückstand mindestens dreimal mit Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Partikel in Chloroform resuspendiert. Auch die 6 nm großen DT-koord. Au-NP lösen sich nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels rückstandsfrei in neuem Lösungsmittel wieder auf. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in diesem Fall bei 4-8 °C in Form einer ca. 0.8 μ molaren Lösung in Chloroform.

Stabilität und Reaktivität sind denen der kleineren DT-koord. Au-NP aufgrund des identischen stabilisierenden Liganden sehr ähnlich. Eine Funktionalisierung dieser Partikel kann demzufolge ebenfalls durch Ligandenaustauschreaktionen gegen andere Thiole erzielt werden.

Größe und Dispersität der 6 nm großen DT-koordinierten Au-NP wurden mittels TEM-Aufnahmen bestimmt (siehe Abbildung 3.35). Es handelt sich um sphärische Partikel mit einer sehr geringen Dispersität, der Partikeldurchmesser variiert zwischen 5.5 und 6.5 nm. Die Anordnung der Partikel auf dem TEM-Grid in hexagonale Muster deutet auf einen hohen Reinheitsgrad der Partikel hin.

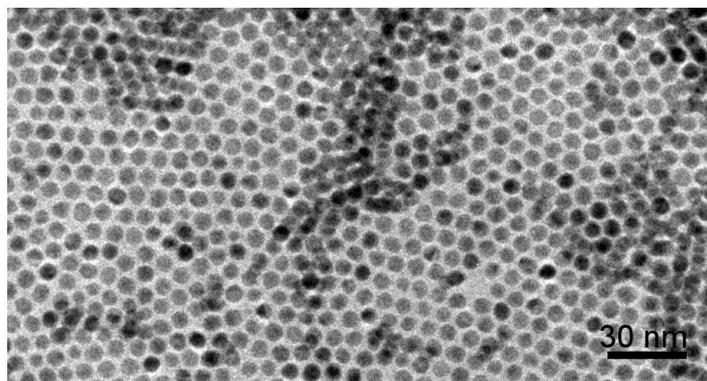


Abbildung 3.27: TEM-Aufnahme von DT-koord. Au-NP mit einem Durchmesser von 6 nm.

Das Absorptionsmaximum liegt nach Ligandenaustausch gegen den wasserlöslichen Liganden 11-Mercaptoundecansäure (MUDS) bei 521 nm (siehe Abbildung 3.34). Die Ligandenhülle der Partikel wurde mittels ^1H -NMR-Spektren und IR-Spektren charakterisiert (Ergebnisse siehe Abschnitt 5.3.2). Es wurden keine Verunreinigungen, sondern nur der gewünschte Ligand gefunden.

Die Anzahl der durchschnittlich auf einem Kolloid gebundenen Liganden wurde mittels TGA bestimmt (Rechnung und Messkurve siehe Anhang). Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 näher erläutert, ist bei geeigneter Wahl des Temperaturprofils der Gewichtsverlust beim Erhitzen der Kolloidprobe auf die Verbrennung der organischen Ligandenhülle zurückzuführen, der Goldkern bleibt als Restmasse zurück. Aus dem gemessenen Gewichtsverlust von 14 % und einer Goldkern-Masse von $2.18 \cdot 10^{-24}$ g pro Nanopartikel folgt eine Anzahl von ca. 1100 Liganden pro NP.

Durch Erhöhung der in der Synthese eingesetzten Thiol-Äquivalente lässt sich die Partikelgröße auf ca. 5 nm reduzieren. Die gute Dispersität der Partikel ändert sich dabei nicht.

Neben DT-koodinierten Au-Kolloiden wurden auch 4-Dimethylaminopyridin(DMAP)-koodinierte Au-Kolloide hergestellt. Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von *Lennox et al.* [168] und lieferte Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 5 nm. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 3.28 gezeigt.

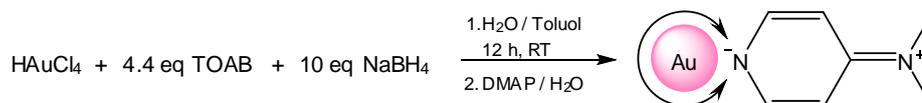


Abbildung 3.28: Reaktionsschema für die Synthese DMAP-koodinierter Au-NP ($\text{Ø} = 5 \text{ nm}$).

Tetrachlorogoldsäure wurde in Wasser gelöst und mit einer Lösung von Tetraoctylammoniumbromid (TOAB) in Toluol gemischt. Innerhalb weniger Sekunden findet ein vollständiger Phasentransfer des Goldsalzes in das organische Lösungsmittel statt, deutlich zu erkennen am Farbwechsel der Phasen. Während die wässrige Phase sich entfärbt, wird die Toluolphase rot. Nach Zugabe einer frischen Lösung von Natriumborhydrid in Wasser verstärkt sich die rote Farbe der Toluolphase, welche nach 30 min Reaktionszeit von der wässrigen Phase getrennt und mit verdünnter Schwefelsäure, verdünnter Natronlauge und schließlich mit Wasser gewaschen wird.

Prinzipiell können die auf diese Weise synthetisierten TOAB-koodinierten Au-NP bereits als Startmaterial für Ligandenaustauschreaktionen verwendet werden. Ein schwerwiegender Nachteil dieser Kolloide ist allerdings, dass TOAB sich aus vielen Reaktionslösungen nur sehr schlecht abtrennen lässt. Dieses literaturbekannte [169] Problem wurde auch im Rahmen dieser Arbeit bei Austauschversuchen gegen MUDS beobachtet. MUDS ließ sich zwar auf der

Oberfläche der Partikel immobilisieren. Eine vollständige Entfernung des TOAB konnte aber auch nach intensiver Dialyse nicht erreicht werden, wie $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Kolloide zeigten.

Dieses Problem kann umgangen werden, wenn nicht die TOAB-funktionalisierten Au-NP selbst, sondern die aus ihnen durch Ligandenaustausch herstellbaren DMAP-koodinierten Au-NP als Startmaterial verwendet werden. Die in Toluol gelösten TOAB-koodinierten Au-NP wurden hierzu mit einer 0.1 M Lösung von DMAP in Wasser gemischt, wobei erneut ein Phasentransfer stattfindet, diesmal von der organischen in die wässrige Phase. Nach abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Kolloidlösung mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4-8 $^\circ\text{C}$ gelagert. Aufgrund der im Anschluss geringeren Stabilität der Partikel erfolgte eine Abtrennung des überschüssigen Liganden, sofern notwendig, direkt vor dem nächsten Arbeitsschritt durch Dialyse gegen Wasser.

TEM-Aufnahmen der DMAP-koodinierten Au-NP zeigen, dass die Partikel sphärisch, aber im Vergleich zu den ähnlich großen DT-kood. Au-NP in ihrer Größe deutlich disperser sind (siehe Abbildung 3.35). Der Partikeldurchmesser variiert zwischen 3.2 und 8.5 nm. Auch diese Partikel ordnen sich auf dem TEM-Grid in hexagonale Strukturen.

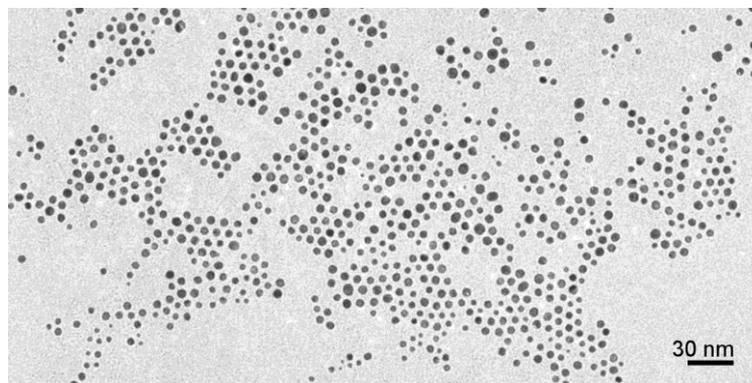


Abbildung 3.29: TEM-Aufnahme von DT-kood. Au-NP mit einem Durchmesser von 6 nm.

Das Absorptionsmaximum dieser Partikel liegt bei 519 nm. Die Ligandenhülle der Partikel wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektren charakterisiert (Ergebnisse siehe Abschnitt 5.3.3). In dem Spektrum sind keine Verunreinigungen, sondern ausschließlich die für DMAP zu erwartenden Signale zu sehen.

Eine für Ligandenaustauschreaktionen positive Eigenschaft von DMAP-koodinierten Au-NP liegt in der im Vergleich zu Thiolen geringeren Affinität des DMAP zur Au-Oberfläche, so dass ein quantitativer Austausch der Ligandenhülle auch gegen schwach stabilisierende

Liganden, beispielsweise Pyridine oder sterisch sehr anspruchsvolle Thiole, möglich ist. Die Affinität von DMAP zur Au-Oberfläche ist zudem pH-abhängig. Die protonierte Form des DMAP verliert die negative Partialladung auf dem endozyklischen N-Atom und bindet daher deutlich schlechter an die Goldoberfläche als die neutrale Form des DMAP (Schema siehe Abbildung 3.30).

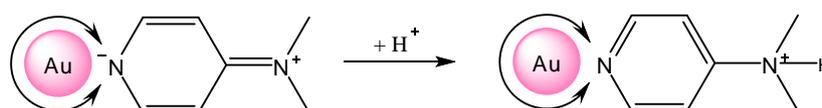


Abbildung 3.30: Schema zur Protonierung DMAP-koord. Au-NP.

Durch Erniedrigung des pH-Wertes lässt sich DMAP daher noch effizienter von der NP-Oberfläche verdrängen. Die größere Dispersität dieser Partikel im Vergleich zu den ähnlich großen DT-koord. Au-NP wurde aus diesem Grund in einigen Fällen zugunsten einer effizienten Funktionalisierung mit schwach bindenden oder sterisch anspruchsvollen Liganden in Kauf genommen.

Die Synthese größerer Au-NP erfolgte, angelehnt an die von *Turkevich* bereits 1951 vorgestellte Vorschrift [26], in Wasser durch Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mit Natriumcitrat. Citrat-koordinierte Au-Kolloide mit einem mittleren Durchmesser von 14 nm wurden nach einer Vorschrift von *Porta et al.* [170] hergestellt. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 3.31 gezeigt.

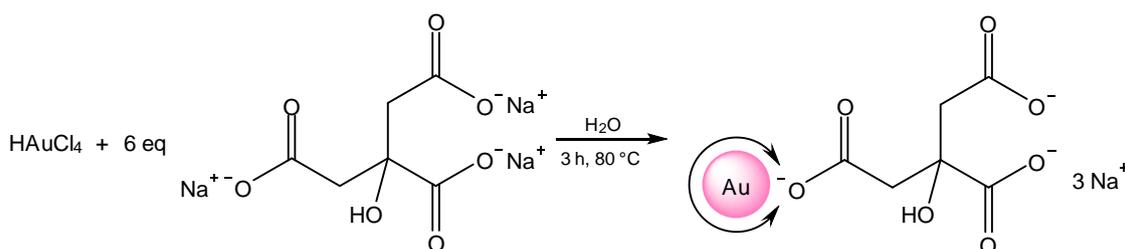


Abbildung 3.31: Reaktionsschema für die Synthese Citrat-koordinierter Au-NP ($\text{\O} = 14 \text{ nm}$).

Für die Synthese 25 nm großer Au-Kolloide wurde eine Vorschrift von *Panigrahi et al.* [40] verwendet. Ein Schema dieser Reaktion ist in Abbildung 3.32 gezeigt.

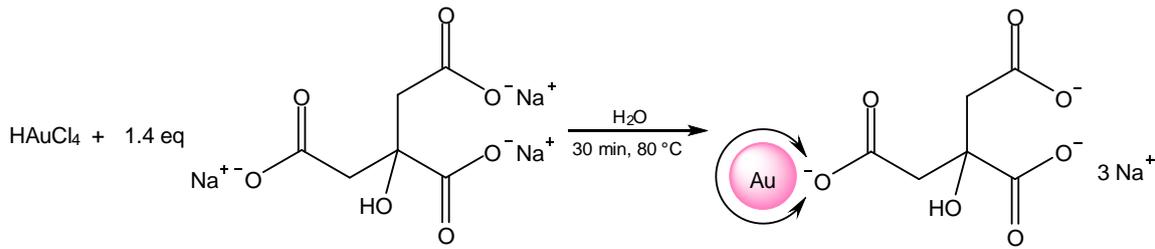


Abbildung 3.32: Reaktionsschema für die Synthese Citrat-koordinierter Au-NP ($\text{Ø} = 25 \text{ nm}$).

Die beiden Synthesen unterscheiden sich in den Natriumcitrat-Äquivalenten und der Reaktionsdauer, die Vorgehensweise ist allerdings in beiden Fällen identisch. Zunächst wurde eine stark verdünnte (ca. 0.25 mM) wässrige Tetrachlorogoldsäure-Lösung hergestellt. Bei 80°C erfolgte dann unter heftigem Rühren die Zugabe einer frisch hergestellten wässrigen Natriumcitrat-Lösung und es wurde weitere 3 h (im Fall der 14 nm großen Partikel) bzw. 30 min (im Fall der 25 nm großen Partikel) bei dieser Temperatur gerührt. Schnelles Abkühlen der Reaktionslösung mit einem Wasser- oder Eisbad beendete schließlich die Reaktion. Zur Abtrennung des überschüssigen Natriumcitrats können die NP gegen Wasser dialysiert werden. Für die meisten Anwendungen ist dies allerdings nicht notwendig. Aufgrund der geringeren Stabilität der Partikel nach der Dialyse wurde daher in der Regel darauf verzichtet. Die Partikel wurden in den meisten Fällen zeitnah weiterverwendet, aber eine Lagerung bei $4\text{--}8^\circ\text{C}$ oder RT ist auch möglich.

TEM-Aufnahmen der 14 nm großen Citrat-koordinierten Au-NP (siehe Abbildung 3.35 a) zeigen, dass die Partikel größtenteils sphärisch sind, sehr vereinzelt sind trigonale Plättchen zu sehen. Der Partikeldurchmesser variiert zwischen 12 und 15 nm, die Dispersität ist somit sehr gering. Im Unterschied dazu weisen die größeren, ca. 25 nm großen Citrat-koordinierten Au-NP (siehe Abbildung 3.35 b) große Abweichungen von der sphärischen Form auf und die Partikel sind stark dispers. Der Partikeldurchmesser variiert zwischen 19 und 35 nm.

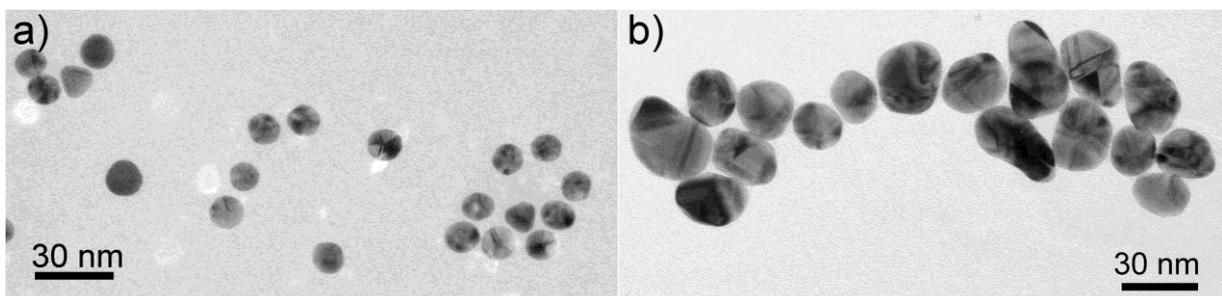


Abbildung 3.33: TEM-Aufnahmen von Citrat-koord. Au-NP mit (a) 14 nm und (b) 25 nm Durchmesser.

Die Charakterisierung der Kolloide erfolgte außerdem mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie (Abbildung 3.11). Die Absorptionsmaxima in den UV/Vis-Spektren der Kolloide liegen bei 521 nm für die 14 nm großen Kolloide und bei 537 nm für die 25 nm großen Kolloide.

In Abbildung 3.11 sind alle UV/Vis-Spektren der im Rahmen dieses Projektes weiterverwendeten Au-NP zusammengestellt. Um alle Absorptionsspektren in Wasser aufnehmen zu können wurde bei den DT-koordinierten Au-NP zuvor die Ligandenhülle gegen den wasserlöslichen Liganden MUDS ausgetauscht (die Vorgehensweise wird in Abschnitt 3.2 beschrieben).

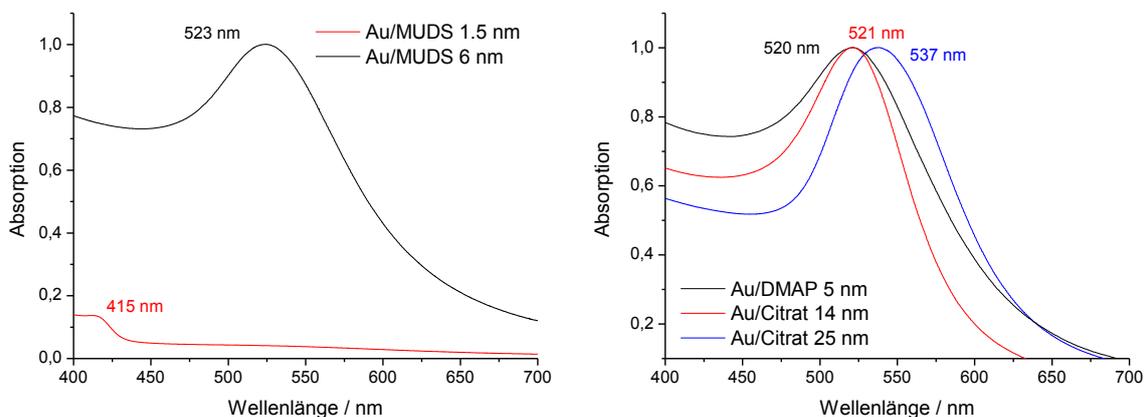


Abbildung 3.34: links: Absorptionsspektren von aus DT-koordinierten Au-NP durch Ligandenaustausch hergestellte MUDS-koordinierten Au-NP (gemessen in Wasser, normiert), rechts: Absorptionsspektren der DMAP- und Citrat-koordinierten Au-NP (gemessen in Wasser, normiert).

Das Absorptionsmaximum verschiebt sich erwartungsgemäß mit steigendem Partikeldurchmesser zu höheren Wellenlängen. Wie bereits an der Farbe der NP-Lösung zu erkennen, weisen die 1.5 nm großen Au-NP keine ausgeprägte Oberflächenplasmonenbande auf. Das kleine Maximum bei 415 nm ist auf den kleinen Anteil etwas größerer (ca. 4 nm großer) NP zurückzuführen. Ein qualitativer Vergleich der Halbwertsbreiten der Banden lässt Rückschlüsse auf die Dispersität der Partikel zu. Die Ergebnisse der TEM-Aufnahmen werden hier wiederspiegelt. Die größte Halbwertsbreite weisen die auch auf den TEM-Aufnahmen polydispers erscheinenden 25 nm großen Au-NP auf. Besonders schmal ist die Bande der 14 nm großen Au-NP, welche sich auch bei Auswertung der TEM-Aufnahmen als monodispers erwiesen.

In Abbildung 3.12 sind alle TEM-Aufnahmen der für die folgenden Projekte zur Verfügung stehenden Kolloide zusammengestellt.

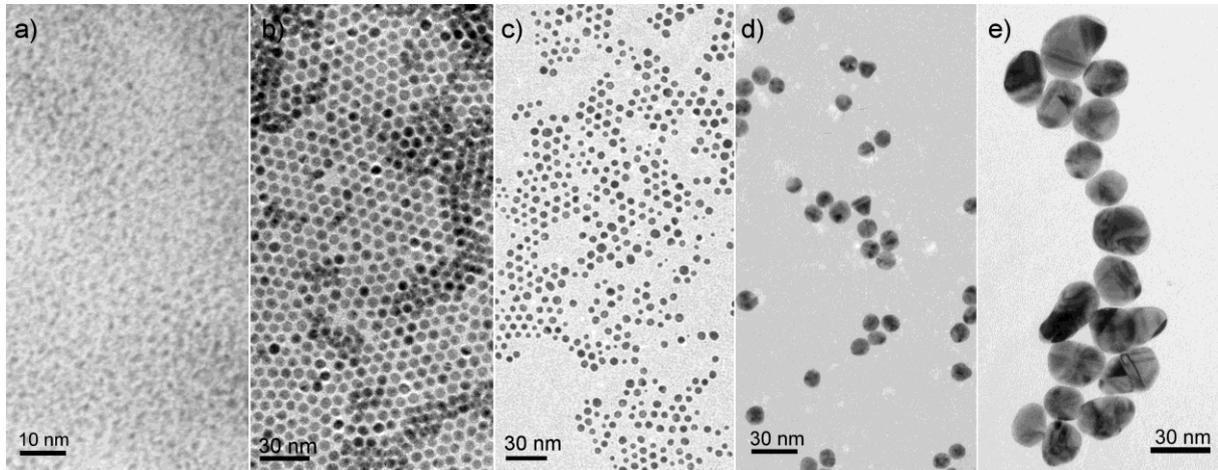


Abbildung 3.35: TEM-Aufnahmen von a) DT-kordinierten Au-NP mit einem Durchmesser von 1,5 nm, b) DT-kordinierten Au-NP mit einem Durchmesser von 6 nm, c) DMAP-kordinierte Au-NP mit einem Durchmesser von 5 nm, d) Citrat-kordinierten Au-NP mit einem Durchmesser von 14 nm, e) Citrat-kordinierten Au-NP mit einem Durchmesser von 25 nm.

3.1.2 Synthese und Charakterisierung von Ag-Kolloiden

Angelehnt an die Synthese der Citrat-kordinierten Au-NP wurden Ag-NP synthetisiert. Anstelle des Goldsalzes Tetrachlorogoldsäure wurde das Silbersalz Silbernitrat in wässriger Lösung mittels Citrat reduziert. Bei den gewählten Reaktionsbedingungen entstanden ca. 30 nm große Ag-NP. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 3.36 gezeigt.

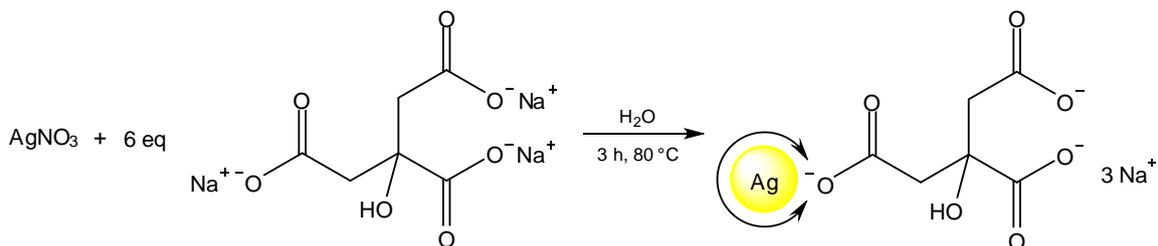


Abbildung 3.36: Reaktionsschema für die Synthese Citrat-kordinierter Ag-NP ($\text{\O} = 30 \text{ nm}$).

Die Vorgehensweise war mit der für Citrat-kordinierte Au-NP identisch. Silbernitrat wurde in Wasser gelöst und bei 80 °C unter heftigem Rühren mit Natriumcitrat versetzt. Nach 3 h wird die Reaktionslösung mit einem Eisbad schnell auf RT abgekühlt, mit einem Spritzenaufsatzfilter (0,2 μm) filtriert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4-8 °C gelagert.

Die erhaltenen Partikel wurden mittels TEM und UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert. Den TEM-Aufnahmen der Ag-NP (siehe Abbildung 3.14) kann entnommen werden, dass es sich um annähernd sphärische Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 30 nm handelt. Vereinzelt sind auch kurze Stäbchen vorhanden. Die Dispersität der Partikel ist zudem relativ hoch. Der Partikeldurchmesser variiert zwischen 24 und 50 nm.

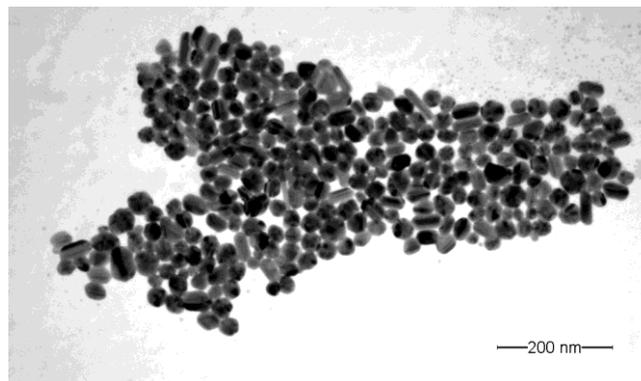


Abbildung 3.37: TEM-Aufnahme der Citrat-koodinierten Ag-NP ($d = 30$ nm).

Das Absorptionsspektrum der Ag-NP ist in Abbildung 3.40 gezeigt, zusammen mit den im nächsten Abschnitt vorgestellten Au/Ag-Alloy-NP. Das Absorptionsmaximum der Partikel liegt bei 413 nm.

Vorschriften für die postpräparative Umfunktionalisierung dieser Partikel durch Ligandenaustauschreaktionen sind in der Literatur zu finden. Bevorzugt als neuer Ligand eingesetzt werden auch hier Thiole [171, 172].

3.1.3 Synthese und Charakterisierung von Au/Ag-Alloy-Kolloiden

Au/Ag-Alloy-Kolloide können auf verschiedenste Weise hergestellt werden. Am weitesten verbreitet ist die Reduktion der entsprechenden Salzmischung in Gegenwart eines Stabilisators, zum Beispiel einer Mischung von Silbernitrat und Tetrachlorogoldsäure durch Natriumborhydrid in Gegenwart von Natriumcitrat [173]. Eine weitere Möglichkeit ist die von *Smetana et al.* vorgestellte Überführung einer Mischung der entsprechenden Metallnanopartikel in die Alloy-NP durch Heizen auf 198 °C in Gegenwart von DT [174]. In dieser Arbeit erfolgte die Synthese in Anlehnung an die zuerst genannte Methode durch Ko-Reduktion von Silbernitrat und Tetrachlorogoldsäure in wässriger Lösung durch

Natriumcitrat. Auf Natriumborhydrid als zusätzliches Reduktionsmittel wurde verzichtet. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 3.38 gezeigt.

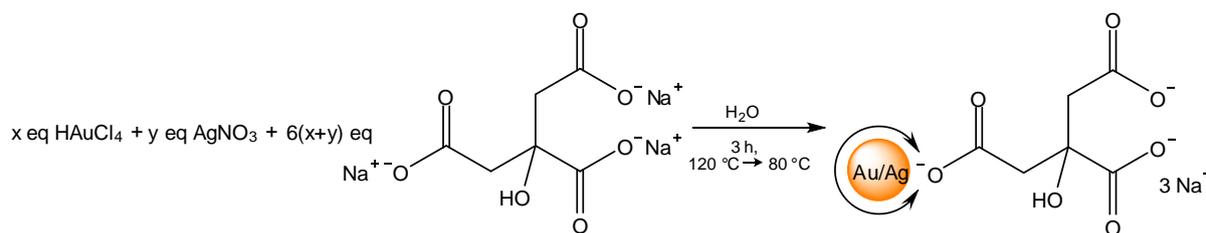


Abbildung 3.38: Reaktionsschema für die Synthese Citrat-koordinierter Au/Ag-Alloy-NP ($\varnothing = 42 - 54 \text{ nm}$).

Tetrachlorogoldsäure wurde in Wasser gelöst und auf 120 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur erfolgte die Zugabe von Silbernitrat und sofort im Anschluss, d.h. so schnell wie möglich, die Zugabe der frisch hergestellten wässrigen Natriumcitrat-Lösung. Die Geschwindigkeit ist an dieser Stelle entscheidend, da sich nach Zugabe des Silbernitrats zu der Tetrachlorogoldsäure-Lösung das in Wasser schwerlösliche Silberchlorid bildet, welches bei zu langsamer Zugabe von Natriumcitrat einen weißen Niederschlag bildet. Die Temperatur wurde nach Hinzufügung aller Komponenten langsam auf 80 °C gesenkt und die Reaktionsmischung insgesamt 3 h gerührt. Die Farbe der Lösung gegen Reaktionsende hängt stark vom gewählten Verhältnis von Au zu Silber ab (siehe Abbildung 3.40) und variiert mit steigendem Goldanteil von gelb über orange bis rot. Nach Abkühlung mit einem Eisbad wurde die Kolloidlösung mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4-8 °C gelagert.

Drei unterschiedliche Verhältnisse von Tetrachlorogoldsäure zu Silbernitrat wurden gewählt (3:1, 1:1 und 1:3). Die Charakterisierung der Partikel erfolgte mittels TEM und UV/Vis-Spektroskopie.

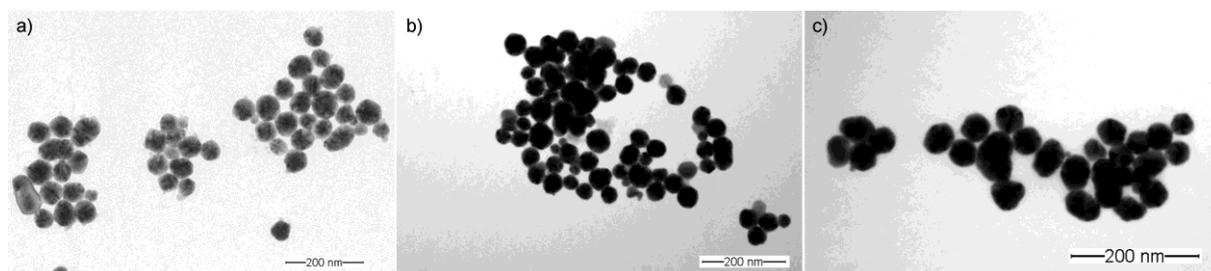


Abbildung 3.39: TEM-Aufnahmen der Citrat-koordinierten Au/Ag-Alloy-NP: a) Au/Ag = 1:3 ($d = 54 \text{ nm}$), b) Au/Ag = 1:1 ($d = 42 \text{ nm}$), c) Au/Ag = 3:1 ($d = 45 \text{ nm}$).

Den TEM-Aufnahmen (siehe Abbildung 3.39) ist zu entnehmen, dass die Partikel größtenteils sphärisch sind, aber eine im Vergleich zu den auf ähnliche Weise hergestellten Au-NP hohe Dispersität aufweisen. Der Partikeldurchmesser variiert bei den Au/Ag-3:1-NP zwischen 36 und 58 nm, bei den Au/Ag-1:1-NP zwischen 29 und 61 nm und bei den Au/Ag-1:3-NP zwischen 26 und 77 nm. Die Dispersität der Partikel nimmt demzufolge mit steigendem Silbergehalt zu. Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt bei den Au/Ag-3:1-NP 45 nm, bei den Au/Ag-1:1-NP 42 nm und bei den Au/Ag-1:3-NP 54 nm. Außerdem liegen die Partikel nicht vereinzelt auf dem TEM-Grid, sondern in kleinen Aggregaten. Dies ist vermutlich weitgehend auf den Eintrocknungsprozess bei der Grid-Präparation zurückzuführen.

Eine Zusammenstellung der Absorptionsspektren von Au-, Ag- und Au/Ag-Alloy-NP ist in Abbildung 3.40 zu sehen. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums der NP nimmt, wie bereits kurz beschrieben, mit steigendem Goldanteil zu und variiert zwischen 413 nm für die Ag-NP und 521 nm für die Au-NP.

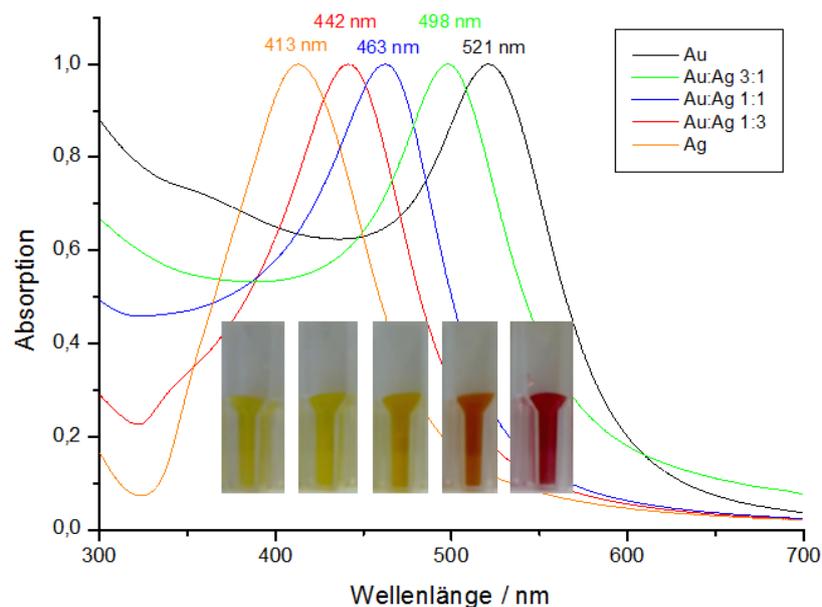


Abbildung 3.40: Absorptionsspektren (normiert) und Fotos von Au-, Ag- und Au/Ag-Alloy-NP ähnlicher Größe.

Trotz leicht unterschiedlicher mittlerer Durchmesser (zwischen 15 nm bei den Au-NP und 54 nm bei den Au/Ag(1:3)-NP) und großen Unterschieden in der Dispersität der Partikel (siehe TEM-Aufnahmen), welche ebenfalls einen Einfluss auf die Lage des Absorptionsmaximums haben und somit die Auswertung leicht verfälschen, ist der literaturbekannte [173, 175] lineare Zusammenhang zwischen der Lage des

Absorptionsmaximums und dem prozentualen Goldanteil gut zu erkennen. In Abbildung 3.41 ist die Lage des Absorptionsmaximums gegen den Goldanteil aufgetragen. Mittels der Funktion der Ausgleichsgeraden lässt sich das Absorptionsmaximum eines Au/Ag-Alloy-NP dieser Größe somit vorhersagen und Partikel mit einem Absorptionsmaximum zwischen 413 und 521 nm gezielt synthetisieren.

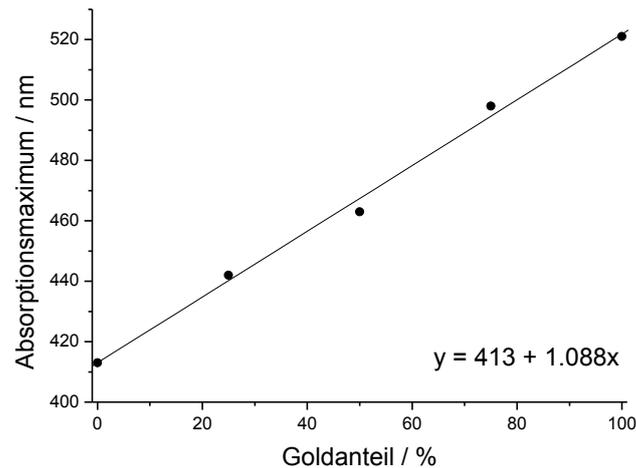


Abbildung 3.41: Auftragung der Lage des Absorptionsmaximums gegen den prozentualen Goldanteil der jeweiligen NP.

Auch für Ag-NP sind in der Literatur Vorschriften für die Umfunktionalisierung durch Ligandenaustauschreaktionen zu finden. *Hostetler et al.* [176] publizierten beispielsweise eine Methode, die, wie bei den Gold- und Silber-NP, Thiole zur Verankerung des Liganden auf der Kolloidoberfläche verwendet.

3.1.4 Synthese und Charakterisierung von CdS-Kolloiden

Die Synthese funktionalisierter CdS-NP erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift für Glutathion(GSH)-koordinierte CdS-Kolloide von *Müller et al.* [177] durch Hydrolyse von Bis(trimethylsilyl)sulfid (HMDST) in Gegenwart von Cadmiumchlorid und einem Stabilisator. Das allgemeine Reaktionsschema ist in Abbildung 3.42 gezeigt. Als Liganden für die Synthese negativ geladener CdS-Kolloide wurden 11-Mercaptoundecansäure (MUDS) und GSH, für die Synthese positiv geladener CdS-Kolloide N,N-Dimethylaminoethanthiol Hydrochlorid (DMAET) und Thiocholin (TC) verwendet.

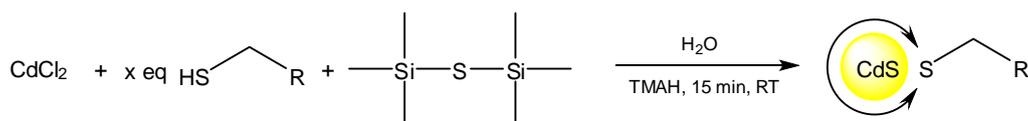


Abbildung 3.42: Allgemeines Reaktionsschema für die Synthese von Thiol-koordinierten CdS-Kolloiden ($\text{R} = \text{---}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$ ($x = 1.9 \text{ eq}$), $\text{---CH}(\text{CONHCH}_2\text{COOH})(\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{COOH}))$ ($x = 3 \text{ eq}$), $\text{---CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ ($x = 6 \text{ eq}$), $\text{---CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ ($x = 5 \text{ eq}$)).

Detaillierte Informationen zum Ablauf der Synthesen sind in einer vorangegangenen Arbeit zu finden [165]. Bei den gewählten Reaktionsbedingungen entstanden DMAET-koord. NP mit einem Durchmesser zwischen 3 und 4.5 nm, TC-koord. NP mit einem Durchmesser zwischen 2.5 und 4 nm, MUDES-koord. NP mit einem Durchmesser zwischen 3 und 5 nm sowie GSH-koord. NP mit einem Durchmesser zwischen 1.5 und 2 nm. Nach der Synthese wurden die Kolloide mittels Dialyse gereinigt, wobei die Anzahl der Dialyseschritte, das verwendete Lösungsmittelvolumen und die Dialysezeit vom jeweiligen Liganden abhängig waren. Erwartungsgemäß weisen die positiv geladenen CdS-Kolloide aufgrund der kürzeren Kohlenstoffkette eine deutlich geringere Stabilität auf als die negativ geladenen CdS-Kolloide, wodurch sich mögliche Dialysezeit und Anzahl von Dialyseschritten deutlich verringern. Die Lagerung der Partikel erfolgte in konzentrierten Lösungen unter Lichtausschluss bei 4-8 °C.

Die Charakterisierung der Kolloidkerne erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie und TEM, die Charakterisierung der Ligandenhülle mittels Gelelektrophorese, ATR-IR und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie [165]. Abbildung 3.20 zeigt eine Zusammenstellung der TEM-Aufnahmen.

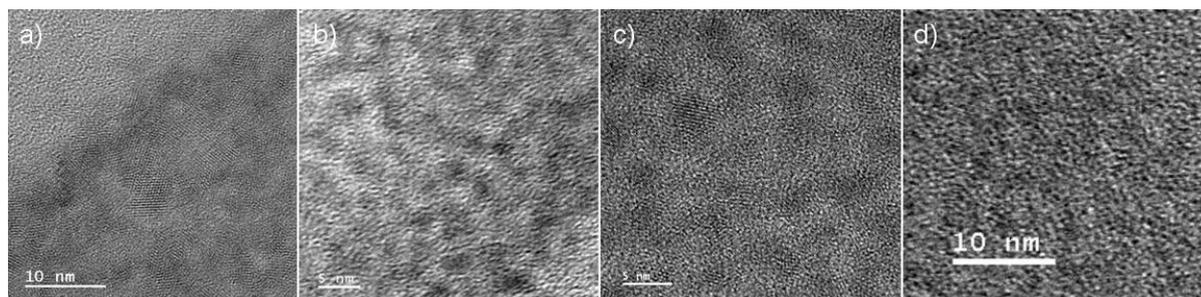


Abbildung 3.43: HR-TEM-Aufnahmen der CdS-NP: a) DMAET-koord. CdS-NP ($d = 3\text{-}4.5 \text{ nm}$), b) TC-koord. CdS-NP ($d = 2.5\text{-}4 \text{ nm}$), c) MUDES-koord. CdS-NP ($d = 3\text{-}5 \text{ nm}$), d) GSH-koord. CdS-NP ($d = 1.5\text{-}2 \text{ nm}$) [165].

In Abbildung 3.21 sind die normierten Absorptionsspektren der synthetisierten CdS-NP zu sehen. Das Absorptionsmaximum hängt auch bei diesen Partikeln stark von Kerngröße und

Ligandstruktur ab und variiert für die in diesem Projekt hergestellten Partikel zwischen 318 und 373 nm.

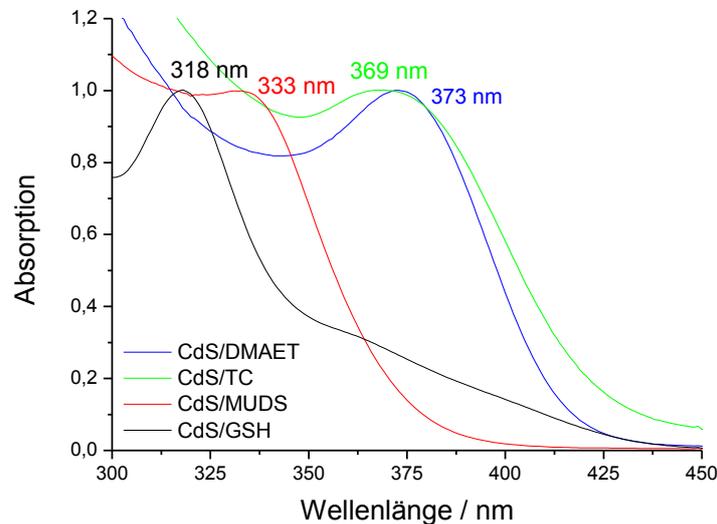


Abbildung 3.44: Absorptionsspektren (normiert) der CdS-NP mit den jeweiligen Absorptionsmaxima.

Im Gegensatz zu den meisten anderen NP dieses Projekts wurden die CdS-NP bereits in Gegenwart des funktionalisierten Liganden synthetisiert. Eine weitere Modifizierung der Ligandenhülle war aus diesem Grund nicht notwendig.

3.2 Peptid-induzierte Aggregation von Nanopartikeln

Für die Peptid-induzierte Anordnung von NP wurden sowohl positiv als auch negativ geladene NP aus verschiedensten Materialien synthetisiert. Neben Oberflächenladung und Kernmaterial wurde auch die Größe der Partikel variiert. Als strukturgebende Bausteine dienten sowohl das *coiled-coil*-Peptid VW05 als auch das α -fibrilläre Peptid VW19. Die strukturinduzierende Wirkung von VW05 wurde mit der des gleichgeladenen *random-coil*-Peptids SR05 verglichen. Kontrollversuche zu den strukturinduzierenden Eigenschaften von VW19 fanden mit dem bei gleichem pH-Wert entgegengesetzt geladenen Peptid RR01 statt. Die Peptide wurden von Sara C. Wagner synthetisiert, charakterisiert und bereitgestellt.

Im Folgenden sind zunächst Struktur und Eigenschaften der verwendeten Peptide sowie die Funktionalisierung und Charakterisierung der NP-Bausteine vorgestellt. Im Anschluss werden dann die Ergebnisse der Mischversuche beider Komponenten diskutiert.

3.2.1 Struktur und Eigenschaften der verwendeten Peptide

3.2.1.1 Die Peptide VW05 und SR05

Das Peptid VW05 weist das α -helikale *coiled coil* – Faltungsmotiv auf, bei dem sich zwischen 2 und 5 Helices linksgängig umeinander winden. Die Superspiralisierung führt zu einer im Vergleich zur α -Helix verringerten Anzahl von 3,5 Aminosäureresten pro Helixwindung und erzeugt eine Periodizität von sieben Aminosäuren, welche mit der Bezeichnung (a-b-c-d-e-f-g)_n wiedergegeben wird (siehe Abbildung 3.22 b). Für die Ausbildung dieser Struktur sind hydrophobe Aminosäuren in Position a und d notwendig, welche einen hydrophoben Kern bilden und somit einen Großteil der thermodynamischen Triebkraft liefern. Des Weiteren befinden sich in Position e und g oft geladene Aminosäuren, welche durch elektrostatische Wechselwirkungen zur Stabilisierung des Strukturmotivs beitragen und für die parallele oder antiparallele Orientierung der Helices entscheidend sind. Die Positionen b, c und f sind solvensexponiert und spielen für die Stabilität des *coiled coil* – Motivs nur eine untergeordnete Rolle. An diesen Positionen können daher unterschiedlichste, beispielsweise positiv oder negativ geladene, Aminosäuren eingebaut werden, welche für die Wechselwirkungen mit Nanopartikeln zur Verfügung stehen.

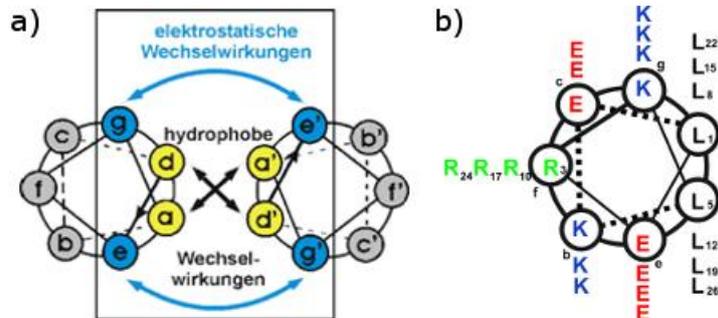


Abbildung 3.22: a) *Helical wheel* - Darstellung eines *coiled coil* – Dimers mit den Wechselwirkungen, die zur Ausbildung des *coiled coil* – Motivs führen, b) *Helical wheel* – Darstellung von VW05 [178].

Die Peptide VW05 und SR05 sind aus 26 Aminosäuren aufgebaut. Ihre Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 3.1 zu finden. Die Primärstruktur von VW05 ist so gewählt, dass es in wässriger Lösung mit sich selbst das *coiled coil* – Faltungsmotiv ausbilden kann (siehe Abbildung 3.22 a). An den Positionen a und d befindet sich ausschließlich das hydrophobe Leucin und an den Positionen e und g die geladenen Aminosäuren Glutaminsäure und Lysin. Über die an der solvensexponierten Position f platzierte Aminosäure Arginin

können bei geeignetem pH-Wert elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen NP auftreten. Die Faltung in das *coiled-coil*-Motiv richtet die Arginine und somit die positiven Ladungen dieses Peptids entlang der äußeren Flanken aus und ermöglicht so eine gute Wechselwirkung mit den negativ geladenen NP.

Das für Kontrollversuche synthetisierte Peptid SR05 ist aus den gleichen Aminosäuren aufgebaut, aber in einer anderen Sequenz, welche die Ausbildung des *coiled coil* – Faltungsmotivs nicht ermöglicht.

Tabelle 3.1: Aminosäuresequenz der Peptide VW05 (*coiled coil*) und SR05 (*random coil*) [179].

VW05	H ₂ N-Abz-LERKLEKERKLEKERKLEKERKL-COOH
SR05	H ₂ N-Abz-LKKELKKERLLEREKLERELREKKLL-COOH

Beide Peptide sind am N-Terminus mit Anthranilsäure (Abz) fluoreszenzmarkiert, um eine einfache Bestimmung der Peptidkonzentration und eine Verfolgung der Peptidbande bei niedrigen Konzentrationen im Agarosegel zu ermöglichen.

Die Nettoladung der Peptide spielt für die elektrostatische Wechselwirkung mit entgegengesetzt geladenen Nanopartikeln eine entscheidende Rolle und ist stark abhängig vom pH-Wert. In Tabelle 3.2 ist die berechnete Nettoladung der Peptide in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgeführt. Da beide Peptide aus den gleichen Aminosäuren aufgebaut sind, sind die Werte für VW05 und SR05 identisch.

Tabelle 3.2: Nettoladung von VW05 und SR05 in Abhängigkeit vom pH-Wert [179].

pH-Wert	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0
Nettoladung [e / Peptid]	8.502	5.059	4.122	4.008	3.959	3.614	1.631	-2.425	-4.920	-7.174

Bis zu einem pH-Wert von ca. 10 weisen die Peptide eine positive Nettoladung auf. Ab ca. pH 11 ist die Nettoladung negativ und es sind keine attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen mehr zwischen Peptid und negativ geladenem Nanopartikel zu erwarten. VW05 eignet sich somit bis zu einem pH-Wert von ca. 10 für die Anordnung negativ

geladener Nanopartikel. Für Kontrollversuche mit gleichgeladenen Bausteinen eignen sich pH-Werte über 10.

Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen und den in einem folgenden Abschnitt (Abschnitt 3.2.2) vorgestellten Ergebnissen zur Stabilität der NP wurden für die Mischversuche von VW05 mit negativ geladenen Nanopartikeln zwei pH-Werte ausgewählt: pH 9 und pH 12. Bei pH 9 ist eine Aggregation aufgrund der attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv geladenem Peptid und negativ geladenem Nanopartikel zu erwarten. Mischversuche bei pH 12 sollten zu keinen Wechselwirkungen zwischen Peptid und Nanopartikel führen, da bei diesem pH-Wert beide Komponenten negativ geladen sind.

Die Struktur der Peptide bei den in den Versuchen gegebenen Bedingungen wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.23 zu sehen. VW05 bildet erwartungsgemäß bei pH-Werten von 9 und 12 mit sich selbst das *coiled coil* – Faltungsmotiv, zu erkennen an den zwei Minima bei 208 und 222 nm. Ungefaltete Peptide weisen im CD-Spektrum ein Minimum bei 195 nm auf. Bei pH 9 liegt das Minimum von SR05 bei ca. 205 nm. Dies entspricht keiner vollständig ungefalteten Struktur, sondern einem α -helikalen Gehalt von ca. 21 %.⁷

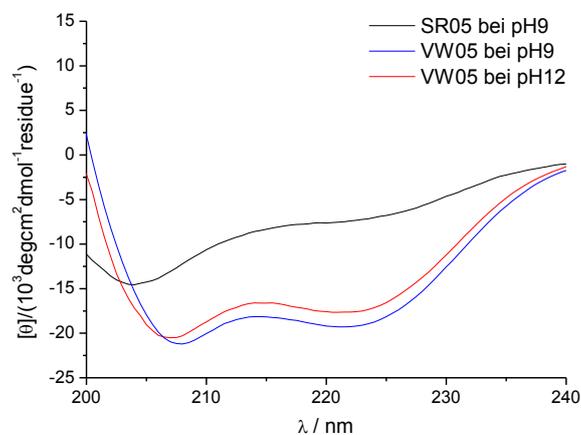


Abbildung 3.23: CD-Spektren von 100 μM VW05 bei pH 9 und pH 12 sowie von 100 μM SR05 bei pH 9 [179].

Mittels analytischer Ultrazentrifugation konnte außerdem gezeigt werden, dass VW05 unter den beschriebenen Bedingungen als trimerer Komplex vorliegt. Die ungefähre Länge des VW05-Trimers wurde aus der Ganghöhe einer α -Helix berechnet und beträgt ca. 3 nm. Eine Oligomerisierung von SR05 konnte mit dieser Methode ausgeschlossen werden [179].

⁷ Der α -helikale Gehalt wurde von Sara Wagner unter Bezug auf eine Arbeit von Yang und Chan [180] aus der molaren Elliptizität bei 222 nm berechnet.

3.2.1.2 Die Peptide VW19 und RR01

Neben dem in Lösung als Trimer vorliegenden Peptid VW05 sollten auch auf dem *coiled-coil*-Motiv basierende, zur Fibrillenbildung neigende Peptide zur Anordnung von NP genutzt werden können. Durch geschicktes Peptiddesign lässt sich die zur Wechselwirkung mit NP vorgesehene Ladung auf der Faseraußenseite dieser Strukturen positionieren. Die Immobilisierung von NP auf fibrillären Strukturen wurde, beispielsweise anhand eines Collagen-verwandten Peptids als Oberfläche für Metall-NP [181], bereits gezeigt.

In Tabelle 3.3 ist die Aminosäuresequenz der Peptide VW19 und RR01 wiedergegeben. Auch diese beiden Peptide sind aus 26 Aminosäuren aufgebaut und am N-Terminus mit Anthranilsäure (Abz) fluoreszenzmarkiert, um eine einfache Bestimmung der Peptidkonzentration und eine Verfolgung der Peptidbande bei niedrigen Konzentrationen im Agarosegel zu ermöglichen.

Tabelle 3.3: Aminosäuresequenz der Peptide VW19 und RR01 [179].

VW19	H ₂ N-Abz-LKVELKELKKELVVLKSELKELKKEL-COOH
RR01	H ₂ N-Abz-LKVELKELKEELVVLKSELKELKEEL-COOH

Im Unterschied zu VW05 besitzen VW19 und RR01 Strukturelemente, welche sowohl eine stabile α -helikale Faltung als auch eine β -Faltblattbildung ermöglichen. Die Aminosäuresequenzen basieren, wie bei VW05, auf dem α -helikalen *coiled-coil*-Faltungsmotiv (siehe hierzu Abbildung 3.22 a). In Abbildung 3.24 ist die *Helical wheel*-Darstellung beider Peptide gezeigt. In Position a und d befindet sich jeweils die hydrophobe Aminosäure Leucin. Durch Wechselwirkung mit bis zu fünf weiteren α -Helices wird der hydrophobe Kern gebildet, welcher die Struktur stabilisiert. Die Positionen e und g werden von den geladenen Aminosäuren Glutaminsäure und Lysin besetzt, welche durch attraktive elektrostatische Wechselwirkungen weitere Beiträge zur Stabilisierung der Struktur liefern. Die Positionen b, c und f sind solvensexponiert und stehen somit, ebenfalls wie bei VW05, der Wechselwirkung mit NP zur Verfügung. VW19 besitzt an diesen Positionen neben Glutaminsäure überwiegend Lysinreste, welche bei entsprechendem pH-Wert eine positive Ladung tragen können. RR01 weist entgegengesetzt dazu neben Lysin- überwiegend

Glutaminsäurereste auf, welche bei entsprechendem pH-Wert eine negative Ladung tragen. Im Unterschied zu VW05 werden diese Positionen neben der Vermittlung der gewünschten Ladung aber auch zur Vermittlung eines weiteren Strukturelements genutzt. Der Einbau der Aminosäure Valin, sowohl bei VW19 als auch bei RR01, steigert die Tendenz zur Ausbildung eines β -Faltblatts und ermöglicht so eine von äußeren Faktoren abhängige und somit schaltbare Faltung der Peptide. Die dichte Anordnung der geladenen Reste und somit die Ausbildung stark geladener Domänen vermittelt beispielsweise eine pH-Sensitivität der Peptidstruktur.

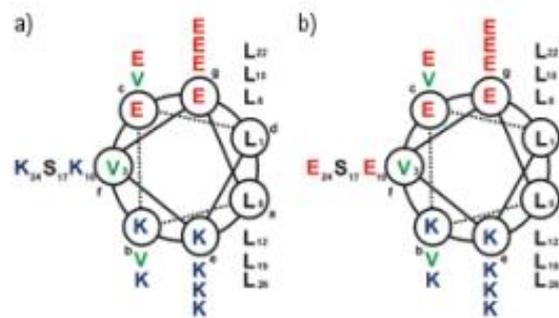


Abbildung 3.24: *Helical wheel*- Darstellung von a) VW19 und b) RR01.

Die Faltung beider Peptide ist daher erwartungsgemäß stark pH-Wert- und konzentrationsabhängig. In Tabelle 3.4 ist die Faltung von VW19 und RR01 bei hohen Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert angegeben.

Tabelle 3.4: Faltung der Peptide VW19 und RR01 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Unterhalb der Grenzkonzentration (500 μ M für VW19 und 200 μ M für RR01) sind beide Peptide ungefaltet.

	pH 4	pH 7.4	pH 9
VW19 ($c > 500 \mu$ M)	β	α	β
RR01 ($c > 200 \mu$ M)	α	β	<i>ungefaltet</i>

Unterhalb einer vom Peptid abhängigen Grenzkonzentration liegen beide Peptide ungefaltet vor. Für VW19 beträgt diese Konzentration 500 μ M, für RR01 200 μ M. CD-Spektren der 50 μ molaren Lösungen beider Peptide sind in Abbildung 3.25 zu sehen. Beide weisen ein für ungefaltete Peptide charakteristisches Minimum bei 195 nm auf.

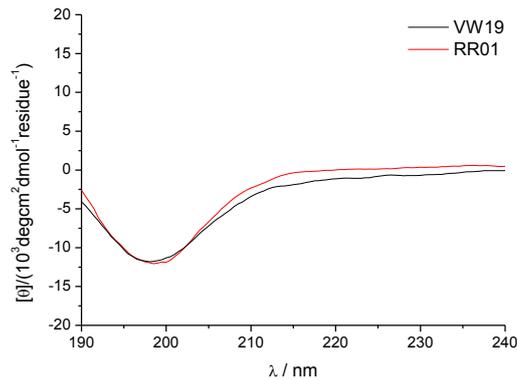


Abbildung 3.25: CD-Spektren von 50 μM VW19 und 50 μM RR01 bei pH 7.4.

Eine detailliertere Beschreibung der Strukturen von VW19 und RR01 in Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert kann Publikationen von *Pagel et al.* entnommen werden [182, 183].

In Tabelle 3.5 ist die berechnete Nettoladung der Peptide in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgeführt. VW19 ist unterhalb von pH 10 positiv und oberhalb davon negativ geladen. RR01 ist bereits ab ca. pH 5 negativ geladen. Während VW19 in neutralen Lösungen demzufolge mit einer positiven Nettoladung vorliegt und somit attraktive elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen NP eingehen wird, besitzt RR01 in diesem pH-Wert-Bereich eine negative Nettoladung, welche repulsive elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen NP vermuten lässt. Umgekehrt verhält es sich mit positiv geladenen NP. Mit RR01 treten in diesem pH-Wert-Bereich attraktive elektrostatische Wechselwirkungen auf, während bei VW19 repulsive elektrostatische Wechselwirkungen zu erwarten sind.

Tabelle 3.5: Nettoladung der Peptide VW19 und RR01 bei verschiedenen pH-Werten [179].

pH-Werte	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0
Nettoladung VW19 [e/Peptid]	5.9	2.9	2.1	2.0	2.0	1.6	-0.6	-5.0	-6.7	-7.0
Nettoladung RR01 [e/Peptid]	3.1	-0.8	-1.9	-2.0	-2.0	-2.4	-4.1	-7.5	-8.8	-9.0

3.2.2 Geladene NP als Baustein für die elektrostatische Anordnung

Für die elektrostatische Anordnung von NP werden, wie bereits erwähnt, geladene Nanopartikel großer Stabilität benötigt. Alle in Abschnitt 3.1 vorgestellten NP lassen sich durch Ligandenaustausch in positiv oder negativ geladene NP hinreichender Stabilität überführen oder besitzen bereits, wie im Fall der CdS-NP, eine hinreichend stabile geladene Ligandenhülle.

Durch die Wahl eines Liganden mit einer möglichst hohen Affinität zum Partikel wird nicht nur eine gute Stabilität, sondern auch eine möglichst geringe Konzentration des freien Liganden in Lösung angestrebt. Diese Eigenschaft ist wichtig, damit keine ungewollten Wechselwirkungen zwischen freiem Ligand und Peptid auftreten, welche die Wechselwirkung zwischen Peptid und NP verhindern könnten.

Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 näher erläutert, weisen Thiole eine sehr große Affinität zur Goldoberfläche auf und sind daher besonders gut zur Stabilisierung dieser Partikel geeignet. Die Fähigkeit eines Liganden zur Oberflächenstabilisierung hängt aber nicht nur von der koordinierenden funktionellen Gruppe, sondern auch von der Beschaffenheit seines organischen Restes und hierbei vor allem von der Kettenlänge und dem Verzweigungsgrad ab. Langkettige, unverzweigte organische Reste ermöglichen durch Ausbildung geordneter Phasen um den Partikel eine deutlich bessere Stabilisierung als kurz- oder verzweigt-kettige Liganden. Durch die Schichtdicke der Ligandenhülle und einer erschwerten Diffusion zum anorganischen Kern der Kolloide bieten langkettige Liganden zusätzlich einen Schutz vor Fotokorrosion und chemischer Zersetzung [184].

Ausgehend von diesen Voraussetzungen wurden die in Abbildung 3.26 gezeigten Liganden für die Funktionalisierung der Au-NP ausgewählt. Alle drei weisen eine unverzweigte C₁₁-Kette auf, welche für eine gute Stabilität der resultierenden Partikel sorgt. Die feste Verankerung auf der Goldoberfläche erfolgt über die in jedem Ligand an einem Ende vorhandene Thiol-Funktion. An der entgegengesetzten Seite befindet sich jeweils eine Gruppe, welche die elektrostatische Ladung der Partikel vermittelt. MUDS und MUDSulfat wurden für die Synthese negativ geladener Partikel verwendet, N,N,N-Trimethyl(11-mercaptoundecyl)ammoniumchlorid(TMA)-koord. NP sind immer positiv geladen.

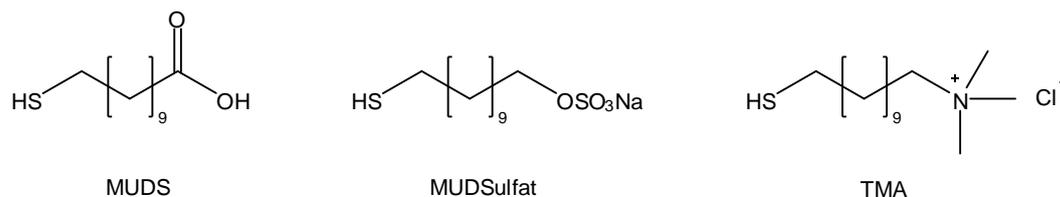


Abbildung 3.26: Liganden für die Synthese geladener Au-NP.

MUDS ist ein in der Kolloidchemie weit verbreiteter Ligand und konnte käuflich erworben werden. Natrium-11-Mercaptoundecanylsulfat (MUDSulfat) wurde in zwei Stufen aus 11-Bromoundecanol auf dem in Abbildung 3.27 gezeigten Weg synthetisiert. Einer Sulfatierung der Alkoholfunktion mittels SO₃-DMF-Komplex folgte die nukleophile Substitution des Broms durch Kaliumthioacetat. Die basische Entschützung zum Thiol mittels 0.1 M NaOH stellte den letzten Schritt der Synthese dar.

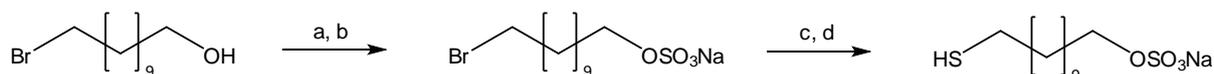


Abbildung 3.27: Synthese von MUDSulfat. Reagenzien und Bedingungen: a) SO₃ · DMF, DMF, RT, 24 h; b) 0.1 M NaOH, 89 %; c) KSCOCH₃, DMF, RT, 1 h; d) 0.1 M NaOH, RT, 6 h, 35 %.

Im Vergleich zur korrespondierenden Säure der Carboxylgruppe besitzt die korrespondierende Säure der Sulfatgruppe in Wasser einen deutlich niedrigeren pK_S-Wert (pK_S (CH₃COOH) = 4.75, pK_S (H₂SO₄) = - 3.0 [185]), so dass MUDSulfat-koord. NP über einen deutlich weiteren pH-Bereich negativ geladen sind als MUDS-koord. NP. Bei gleichem pH-Wert und ähnlicher Belegungsdichte der Liganden auf dem NP sind die MUDSulfat-koord. NP somit auch stärker negativ geladen (abgesehen von pH-Werten oberhalb der vollständigen Deprotonierung von MUDS).

Die Synthese des positiv geladenen Liganden TMA erfolgte nach einer Vorschrift von *Tien et al.* [186] in zwei Stufen aus 10-Undecenylbromid. Das Schema zur Synthese ist in Abbildung 3.28 gezeigt.

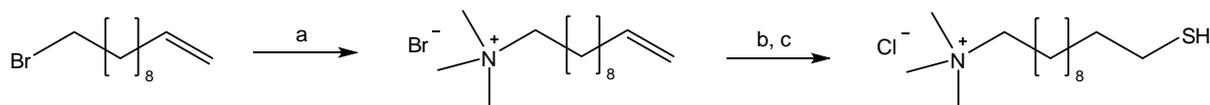


Abbildung 3.28: Synthese von TMA (nach einer Vorschrift von *Tien et al.* [186]). Reagenzien und Bedingungen: a) NMe₃, MeOH, RT, 2 d; b) KSCOCH₃, *h · v*, CH₂Cl₂, 6 h; c) 10 % HCl, 1 h.

Durch Austauschreaktionen wurden die soeben vorgestellten Liganden auf den Au-NP immobilisiert. Abhängig von der Löslichkeit des Ausgangs-NP fanden diese im Ein- oder

Zweiphasensystem statt. In Abbildung 3.29 ist die Funktionalisierung der DT-koord. Au-NP gezeigt. Dieser Ligandenaustausch erfolgt im Zweiphasensystem. Da alle Liganden wasserlöslich sind, war die Vorgehensweise für alle sehr ähnlich. Bei MUDS wurde allerdings, um die im protonierten Zustand geringe Löslichkeit zu erhöhen, Base in Form von Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) oder NaOH zu der im ersten Schritt anzufertigenden wässrigen Lösung gegeben.

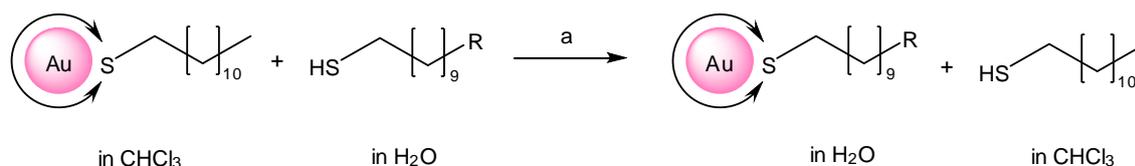


Abbildung 3.29: Funktionalisierung DT-koord. Au-NP durch Ligandenaustausch. Reagenzien und Bedingungen: R = -COOH: a) TMAH, CHCl₃/H₂O, RT, 2 h; R = -COSO₃Na: a) TMAH, CHCl₃/H₂O, RT, 2 h; R = -CH₂N(CH₃)₃Cl: a) CHCl₃/H₂O, RT, 2 h.

Die wässrige Lösung des Liganden wurde durch heftiges Rühren mit einer Lösung der DT-koord. Au-NP in Chloroform vermischt. Nach einer vom jeweiligen Liganden und der Rührgeschwindigkeit abhängigen Zeit (zwischen ca. 30 Sekunden und 60 Minuten) fand ein vollständiger Phasentransfer der NP von der organischen in die wässrige Phase statt. Bei den 6 nm großen Partikeln lässt sich dieser Prozess sehr einfach durch den Wechsel der roten Farbe von der organischen in die wässrige Phase beobachten. Ab diesem Zeitpunkt wird das Reaktionsgemisch mindestens noch weitere 2 h gerührt, bevor nach Phasenseparation die Partikel durch Abtrennung der organischen Phase isoliert wurden. Bei den 1.5 nm großen Au-NP kann der Zeitpunkt des vollständigen Phasentransfers aufgrund der nicht vorhandenen Oberflächenplasmonenbande auf diesem Weg nicht bestimmt werden. Austauschreaktionen an diesen Partikeln wurden daher deutlich länger (in der Regel über Nacht) gerührt, um sicherzustellen, dass der Austausch vollständig stattgefunden hat.

Die wässrige Kolloidlösung wird zur Abtrennung von im Überschuss eingesetztem Ligand und anderer Additive (TMAH oder NaOH) gegen Wasser dialysiert. Eine Besonderheit stellen hier die TMA-koord. Au-NP dar. Aufgrund ihrer positiven Ladung bedecken sie von innen den negativ geladenen Dialyseschlauch (Cellulosemembran). Um den Partikelverlust bei dieser Reinigungsmethode so gering wie möglich zu halten, wurde die Lösung der TMA-koord. NP vor der Dialyse weitestmöglich konzentriert.

Die Charakterisierung der NP erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektren, Absorptionsspektren und TEM-Aufnahmen. In den ¹H-NMR-Spektren sind ausschließlich die für den jeweiligen

Ligand zu erwartenden Signale zu sehen, so dass von einem vollständigen Ligandenaustausch ausgegangen werden kann. Es ist keine Veränderung von Partikeldurchmesser oder Dispersität der Kolloide nach der Funktionalisierung auf den TEM-Aufnahmen zu beobachten und weder auf den TEM-Aufnahmen noch in den Absorptionsspektren lassen sich Hinweise auf eine Aggregation finden.

Die Funktionalisierung Citrat-koord. Au-NP erfolgte im Einphasensystem nach dem in Abbildung 3.30 gezeigten Schema. Auch hier gibt es aufgrund des in Wasser ähnlichen Löslichkeitsverhaltens kaum Unterschiede in der Vorgehensweise für die drei unterschiedlichen Liganden.

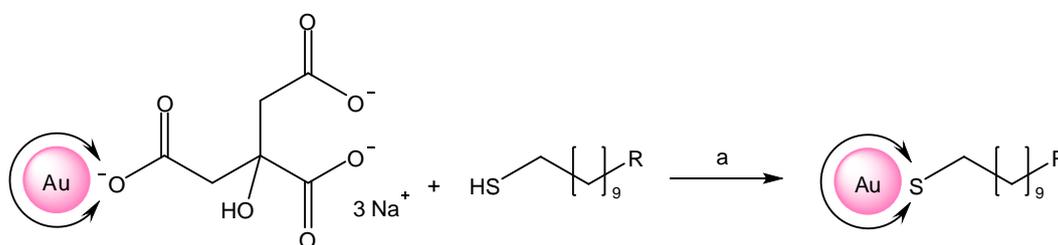


Abbildung 3.30: Funktionalisierung Citrat-koord. Au-NP durch Ligandenaustausch. Reagenzien und Bedingungen: R = -COOH: a) TMAH, H₂O, RT, 72 h; R = -COSO₃Na: a) H₂O, RT, 72 h; R = -CH₂N(CH₃)₃Cl: a) H₂O, RT, 72 h.

Bei RT wurde der Ligand in fester Form oder in wenig Wasser gelöst zu der verdünnten wässrigen Kolloidlösung gegeben und die Reaktionslösung mindestens 12 h heftig gerührt. Direkt nach Zugabe des Liganden dunkelt die Farbe der Lösung leicht ab. Wie auch im Zweiphasensystem erfordert der Austausch gegen MUDS außerdem die Zugabe von kleinen Mengen TMAH, um den pH-Wert und somit die Löslichkeit von MUDS und dem MUDS-koord. Kolloid zu erhöhen. Bei Verkürzung der Reaktionszeit von 12 auf 2 h wurde im Fall von MUDS ein Kolloid mit gemischter Ligandenhülle erhalten, bei dem MUDS und Citrat im Verhältnis von ca. 9:1 auf der Oberfläche gebunden waren.

Die Abtrennung von Citrat und freiem Ligand erfolgte mittels Dialyse gegen Wasser. Hierzu wurde die niedrig konzentrierte Reaktionslösung zunächst am RV eingeeengt, bevor sie in den Dialyseschlauch überführt wurde. Das Lösungsmittelvolumen durfte vor der Dialyse allerdings nicht auf unter ca. ein Viertel des ursprünglichen Volumens eingeeengt werden, denn sonst entfärbte sich die Lösung spontan und es fiel ein schwarzer, unlöslicher Niederschlag aus.

Bei der Dialyse der TMA-koodinierten NP traten die gleichen Probleme auf wie bereits bei den TMA-kood. 6 nm großen NP beschrieben. Da der Verlust in diesem Fall nicht durch besonders starkes konzentrieren der NP-Lösung reduziert werden konnte, wurde nach weiteren Möglichkeiten der Aufarbeitung gesucht. Die 14 nm großen NP lassen sich bereits durch Zentrifugieren abtrennen. Allerdings sind die hierzu benötigten Drehzahlen sehr hoch und die Zeit dennoch sehr lang, so dass sich die Kolloidlösung bei ungekühlter Zentrifugation merklich aufwärmt. Die über dem roten Rückstand stehende Lösung ist zudem immer rosa gefärbt, so dass auch mit dieser Methode keine vollständige Isolierung der Partikel möglich ist. Sie stellt aber, vor allem bei kleinen Volumina, eine sinnvolle Alternative zur Dialyse dar. Nach der Dialyse ließen sich problemlos von allen Partikeln konzentrierte Lösungen herstellen. Die Charakterisierung der NP erfolgte mittels TEM-Aufnahmen, Absorptionsspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren. Auch bei diesen Partikeln ist keine Veränderung von Partikeldurchmesser oder Dispersität nach der Funktionalisierung zu beobachten. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestätigen den vollständigen Ligandenaustausch und weder auf TEM-Aufnahmen noch in den Absorptionsspektren wurden Hinweise für eine Aggregation der Partikel gefunden. In den meisten Fällen wurden auch diese NP direkt nach der Synthese weiterverwendet.

Der Ligandenaustausch an Citrat-kood. Ag-NP sowie deren Aufarbeitung erfolgte analog der für die Citrat-kood. Au-NP beschriebenen Vorgehensweise.

Die Funktionalisierung DMAP-koodinierter Au-NP verläuft, wie die Funktionalisierung Citrat-kood. Au-NP, im Einphasensystem. Aufgrund der größeren Dispersität im Vergleich zu den ähnlich großen DT-kood. Au-NP wurde nach ersten Versuchen mit diesen Partikeln für diesen Projektteil auf deren Synthese verzichtet. Von den drei zur Verfügung stehenden Liganden wurde daher auch nur MUDS auf diesen Partikeln immobilisiert. Ein Schema hierzu ist in Abbildung 3.31 zu sehen.

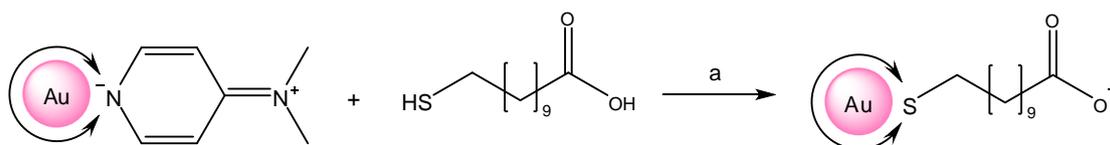


Abbildung 3.31: Funktionalisierung DMAP-kood. Au-NP durch Ligandenaustausch gegen MUDS. Reagenzien und Bedingungen: a) TMAH, H_2O , RT, 10 min.

Der Vergleich von Abbildung 3.31 und Abbildung 3.30 zeigt, dass die Vorgehensweise für den Ligandenaustausch an DMAP-koord. Au-NP nahezu identisch ist mit der Vorgehensweise bei Citrat-koord. Au-NP. Zu einer wässrigen Lösung von MUDS, deren pH-Wert durch Zugabe einiger Tropfen TMAH im basischen Bereich lag, wurde die wässrige Lösung DMAP-koord. Au-NP gegeben und die Reaktionsmischung ca. 10 min gerührt. Die Aufarbeitung der Partikel wurde allerdings auf unterschiedliche Weise durchgeführt. Während die Aufarbeitung bei Ligandenaustausch an Citrat-koord. Au-NP ausschließlich mittels Dialyse erfolgte, wurden aus DMAP-funktionalisierten Au-NP hergestellte MUDS-koord. Au-NP zuvor durch langsame Zugabe von Essigsäure gefällt, der lilafarbene Rückstand abzentrifugiert und in Wasser durch Zugabe von TMAH wieder gelöst. Die so vorgereinigten Partikel wurden dann gegen Wasser dialysiert. Löslichkeitsverhalten und Stabilität sind erwartungsgemäß identisch mit den ähnlich großen aus DT-koord. Au-NP hergestellten MUDS-koord. Au-NP. Die Lagerung erfolgte konsequenterweise ebenfalls unter Lichtausschluss bei 4-8 °C.

Auch die Charakterisierung dieser NP erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, Absorptionsspektren und TEM-Aufnahmen. In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind ausschließlich die für den jeweiligen Ligand zu erwartenden Signale zu sehen, so dass auch hier von einem vollständigen Ligandenaustausch ausgegangen werden kann. Es ist keine weitere Verschlechterung der Größendispersität der Kolloide nach der Funktionalisierung auf den TEM-Aufnahmen zu beobachten (siehe Abbildung 3.32), auch der mittlere Partikeldurchmesser hat sich nicht verändert. Hinweise auf eine Aggregation sind weder auf den TEM-Aufnahmen noch in den Absorptionsspektren zu finden, so dass von in Lösung vereinzelt vorliegenden Partikeln ausgegangen werden darf.

In Abbildung 3.32 sind TEM-Aufnahmen der 1.5 nm, 6 nm und 14 nm großen Au-NP vor (obere Reihe) und nach (untere Reihe) dem Ligandenaustausch gegen MUDS gezeigt. Wie bereits in Abschnitt 1.2 als positive Eigenschaft des Ligandenaustauschs vorgestellt und bei der Auswertung der jeweiligen Ligandenaustauschreaktion beschrieben, verändern sich weder der mittlere Partikeldurchmesser noch die Dispersität der Partikel. Außerdem ist keine Aggregation der Partikel festzustellen.

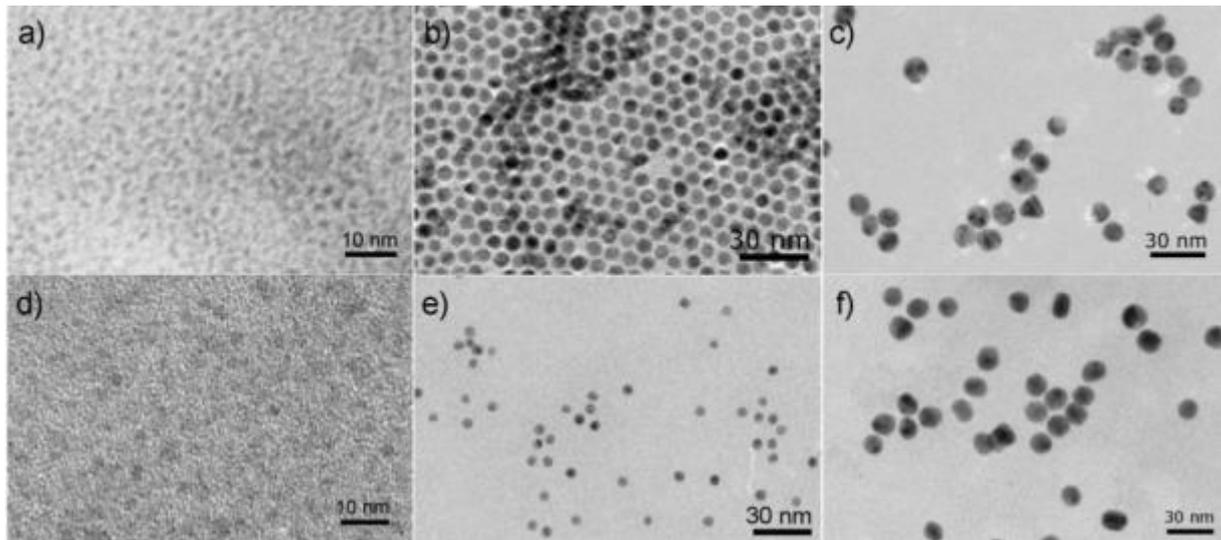


Abbildung 3.32: TEM-Aufnahmen verschiedener Au-NP vor [(a) 1.5 nm DT-koord. NP, b) 6 nm DT-koord. NP, c) 14 nm Citrat-koord. NP] und nach [(d) 1.5 nm MUDS-koord. NP, e) 6 nm MUDS-koord. NP, f) 14 nm MUDS-koord. NP] einer Ligandenaustauschreaktion gegen MUDS.

In Abbildung 3.33 a sind die Absorptionsspektren der unterschiedlich großen Au-NP nach Ligandenaustausch gegen MUDS gezeigt. Das Absorptionsspektrum der 1.5 nm großen MUDS-koord. Au-NP, welches aufgrund der geringen Partikelgröße keine intensive Oberflächenplasmonenbande aufweist, wurde bereits in Abbildung 3.11 gezeigt und zugunsten der Übersichtlichkeit in dieser Zusammenstellung nicht berücksichtigt.

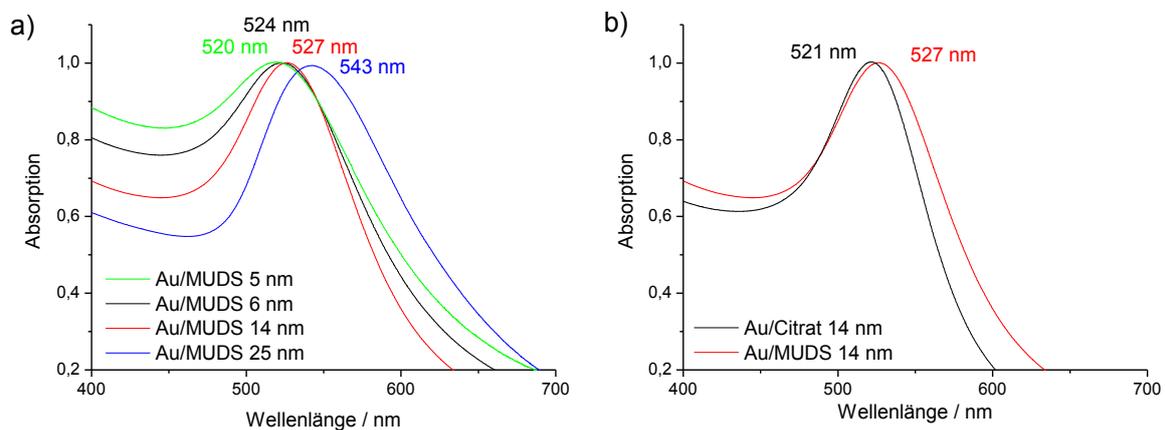


Abbildung 3.33: a) Absorptionsspektren der MUDS-koordinierten Au-NP; b) Absorptionsspektren 14 nm großer Au-NP vor und nach dem Ligandenaustausch gegen MUDS.

Ein qualitativer Vergleich der Halbwertsbreiten dieser Spektren spiegelt den aus den TEM-Aufnahmen bereits ermittelten Trend bezüglich der Partikeldispersitäten wieder. Nahezu monodispers sind die Au-NP mit einem Durchmesser von 14 und 6 nm. Diese weisen auch

die schmalsten Banden im Absorptionsspektrum auf. Breiter ist die Bande der ca. 5 nm großen aus DMAP-Kolloiden hergestellten Au-NP, welche nach Auswertung der TEM-Aufnahmen auch eine größere Dispersität besitzen. Die Partikel mit der größten Dispersität und einem Durchmesser von ca. 25 nm weisen die breiteste Absorptionsbande auf.

Die Lage des Absorptionsmaximums verschiebt sich, wie auch bei den Absorptionsspektren der Ausgangskolloide, mit steigendem Partikeldurchmesser zu höheren Wellenlängen. Außerdem wurde beobachtet, dass sich das Absorptionsmaximum durch den Ligandenaustausch ebenfalls leicht (um wenige nm) verschiebt. Abbildung 3.33 b zeigt exemplarisch die Absorptionsspektren der 14 nm großen Partikel vor und nach dem Ligandenaustausch. Die leichte Verschiebung des Absorptionsmaximums von 521 auf 527 nm ist auf die durch den Ligandenaustausch verursachte Veränderung der Dielektrizitätskonstanten zurückzuführen (siehe Abschnitt 1.1.2).

Chechik publizierte 2004 eine Arbeit zur reduzierten Aktivität von gealterten Au-NP in Ligandenaustauschreaktionen [187]. Dieses Phänomen wurde auch bei den in diesem Projekt als Ausgangsmaterial verwendeten Thiol-funktionalisierten Au-NP beobachtet. Die für einen vollständigen Ligandenaustausch an zuvor DT-funktionalisierten Au-NP notwendige Zeit hing stark vom Alter der Partikel ab. Daher wurden hierzu in der Regel nur frisch hergestellte Thiol-funktionalisierte Au-NP verwendet. Alle in dieser Arbeit für Ligandenaustauschreaktionen vorgestellten Reaktionszeiten beziehen sich auf Umsetzungen an frisch hergestellten Partikeln.

3.2.3 Überführung und Stabilität der NP in Puffer

Um sicherzustellen, dass der pH-Wert konstant bleibt, fanden alle Aggregationsversuche mit Peptid in Puffer statt. Hierzu wurden die funktionalisierten NP vor der Mischung mit Peptid mittels Dialyse in Puffer überführt. Puffer können sich allerdings negativ auf die Stabilität von elektrostatisch stabilisierten NP auswirken, wie ausführlich von *Döllefeld et al.* [8] anhand von Halbleiternanopartikeln untersucht wurde. *Dasog* und *Scott* untersuchten die Stabilität von Au-NP und stellten fest, dass in Gegenwart von Sauerstoff und Halogenidionen eine langsame Oxidation der Partikel stattfindet [188]. Daher wurde zunächst anhand von

Absorptionsspektren geprüft, in welchem Puffer die Partikel bei dem gewählten pH-Wert über den bei den späteren Aggregationsversuchen beobachteten Zeitraum stabil sind.

3.2.3.1 Untersuchungen zur Stabilität von CdS-NP in Puffer

Aufgrund ihrer besonders geringen Größe, welche mit 1.5 – 2 nm unterhalb der Größe von dem Peptid VW05 liegt (vergleiche Abschnitt 3.2.1.1), und einem im Vergleich zu den anderen zur Verfügung stehenden Liganden kleinen pK_S -Wert von 2.12 für GSH [185], wurden von den CdS-Kolloiden die GSH-kordinierten NP für Mischversuche mit dem *coiled coil* – Peptid VW05 ausgewählt und ihre Stabilität bei verschiedenen pH-Werten, verschiedenen Konzentrationen und in unterschiedlichen Puffern getestet. Da bei allen in diesem Projekt verwendeten NP die Stabilisierung in Lösung durch gegenseitige elektrostatische Abstoßung erfolgte, sind bei den negativ geladenen Partikeln besonders die niedrigen pH-Werte kritisch, bei denen die Liganden nicht mehr vollständig deprotoniert vorliegen und somit die Ladung der Partikel gering ist. Wünschenswert für eine hohe Stabilität dieser Partikel ist somit ein möglichst hoher pH-Wert. Wie bereits in Abschnitt 3.2.1.1 näher erläutert, muss der pH-Wert aber unter pH 10 liegen, damit VW05 eine positive Nettoladung aufweist und somit zur Aggregation negativ geladener Partikel geeignet ist. Um bei einem pH-Wert arbeiten zu können, bei dem noch eine deutlich positive Nettoladung des Peptids gewährleistet ist, wurden bei den GSH-koord. CdS-NP die pH-Werte 7 und 8 näher untersucht.

Hierzu wurden bei diesen beiden pH-Werten Absorptionsspektren von Lösungen des Kolloids in Tris/HCl- (T), Acetat- (A) und Phosphatpuffer (P) sowie von der pufferfreien wässrigen Kolloidlösung (H) in drei unterschiedlichen NP-Konzentrationen über einen Zeitraum von fünf Tagen aufgenommen. Die Beurteilung der Partikelstabilität erfolgte anhand der Lage und Intensität des Absorptionsmaximums sowie der Form der Absorptionsbande im Vergleich zur Lösung direkt nach der Synthese. Im Anhang ist eine Zusammenstellung der wesentlichen Spektren dieser Untersuchung zu finden (Abschnitt 8.1.1).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die konzentrierten Lösungen (Absorption von 0.6 am Absorptionsmaximum) sich als stabiler erwiesen als die weniger konzentrierten Lösungen. Bei niedrigen Partikelkonzentrationen wirkte sich die Verwendung von Puffer in einigen Fällen sogar positiv auf die Stabilität aus im Vergleich zu gleichkonzentrierten

Lösungen in reinem Wasser. Erwartungsgemäß waren die Kolloide unabhängig vom verwendeten Puffer bei pH 8 stabiler als bei pH 7. Den besten Kompromiss zwischen Stabilität der Kolloide und Kompatibilität mit dem Peptid stellte die 10 mM Tris/HCl-gepufferte Lösung bei pH 8 mit der mittleren Partikelkonzentration (Absorption von 0.3 am Absorptionsmaximum) dar. In Abbildung 3.34 sind die zu dieser Bedingung bei verschiedenen Zeitpunkten aufgenommenen Absorptionsspektren gezeigt.

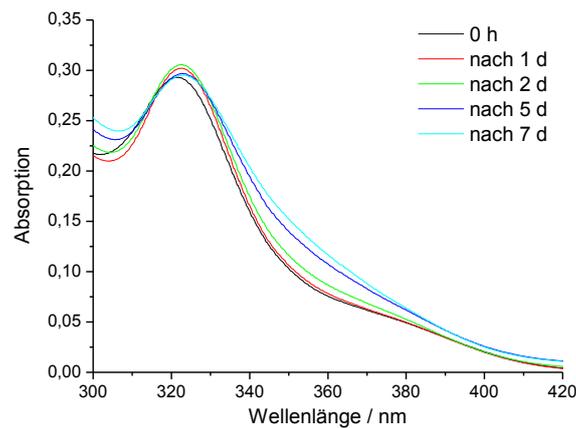


Abbildung 3.34: Absorptionsspektren GSH-koord. CdS-NP in 10 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 8 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Da die Spektren sich nach 2 Tagen bereits leicht und nach 5 Tagen deutlich von dem Spektrum direkt nach Mischung der Partikel mit dem Puffer unterscheiden, wurde der Zeitraum, in dem nachfolgende Mischversuche beobachtet wurden, auf einen Tag beschränkt. Innerhalb dieser Zeitspanne sind kaum Veränderungen im Absorptionsspektrum der Kolloide beobachtbar.

3.2.3.2 Untersuchungen zur Stabilität von Au-NP in Puffer

Von den verschiedenen in Abschnitt 3.2.2 vorgestellten Au-NP wurden die MUDES-koord. NP für Mischversuche mit dem *coiled coil* – Peptid VW05 ausgewählt. Die Stabilitätsuntersuchung dieser NP in verschiedenen Puffern wurde anhand der ca. 5 nm großen, aus DMAP-koord. Au-NP hergestellten Kolloiden durchgeführt. Da auch diese Partikel durch ihre negative Ladung stabilisiert werden und ihre Wasserlöslichkeit erhalten, treffen die im vorangegangenen Abschnitt aufgeführten Überlegungen zur Stabilität der

Partikel bei verschiedenen pH-Werten auf diese Partikel genauso zu. Für eine hohe kolloidale Stabilität der MUDS-koodinierten Au-NP ist eine möglichst vollständige Deprotonierung der Säurefunktion und somit ein möglichst hoher pH-Wert erstrebenswert. Der pK_S -Wert von MUDS in Monolagen auf Goldoberflächen beträgt ca. 6-8 [99]. Das Peptid VW05 ist nach Nettoladungstabelle (Tabelle 2) bis zu einem pH-Wert von ca. 10 positiv geladen. Für die Stabilitätsuntersuchungen in Puffer wurden daher die pH-Werte 8,0, 8,5, 9,0 und 9,5 gewählt. Da der 10 mM Tris/HCl-Puffer sich bereits bei den CdS-NP als geeignet erwiesen hat und zudem in diesem pH-Bereich eine gute Pufferkapazität besitzt, wurde die Untersuchung auf diesen Puffer beschränkt. Getestet wurden zwei unterschiedliche Partikelkonzentrationen (mit Absorptionen von ca. 0,4 und 0,8 am Absorptionsmaximum). Die nach 0 und 5 h erhaltenen Spektren wurden jeweils mit den Spektren der Partikel in Wasser verglichen.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die MUDS-kood. Au-NP in 10 mM Tris/HCl-Puffer deutlich stabiler sind als die GSH-kood. CdS-NP. Nach 5 h Inkubationszeit bei pH 8,0 deutete ein starker Anstieg der Absorption (von 0,46 auf 0,63 am Absorptionsmaximum) und eine leichte Verformung der Bande im Bereich von 600 bis 700 nm auf eine Aggregation der Partikel hin. Ab pH 8,5 waren im beobachteten Zeitraum allerdings keine signifikanten Veränderungen der Absorptionsspektren mehr zu erkennen. In Abbildung 3.35 sind die Absorptionsspektren der MUDS-kood. Au-NP bei pH 9 in 10 mM Tris/HCl-Puffer gezeigt. Im Anhang (Abschnitt 8.1.2) ist eine Zusammenstellung aller zur Stabilität von MUDS-kood. Au-NP aufgenommenen Spektren zu finden.

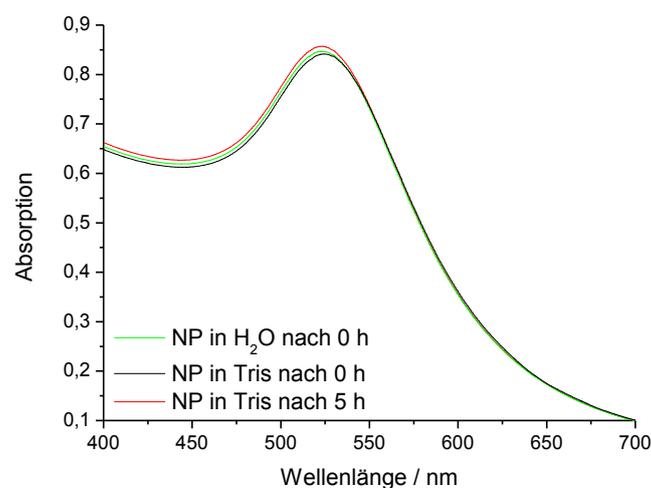


Abbildung 3.35: Absorptionsspektren von MUDS-kood. Au-NP (d = 5 nm) in H₂O und in 10 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 9 nach 0 und 5 h.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die in Abschnitt 3.2.4 vorgestellten Mischversuche bei pH 9 mit MUDS-funktionalisierten Au-NP in 10 mM Tris/HCl-Puffer durchgeführt. Der langsame Zerfall der MUDS-koord. Au-NP in Tris/HCl-Puffer konnte auch in TEM-Aufnahmen, welche direkt nach der Überführung in Puffer (Abbildung 3.36 a) sowie 7 Tage später (Abbildung 3.36 b) angefertigt wurden, nachgewiesen werden. Die Dispersität der Partikel nahm in dieser Zeit stark zu und es bildeten sich einige sehr kleine NP.

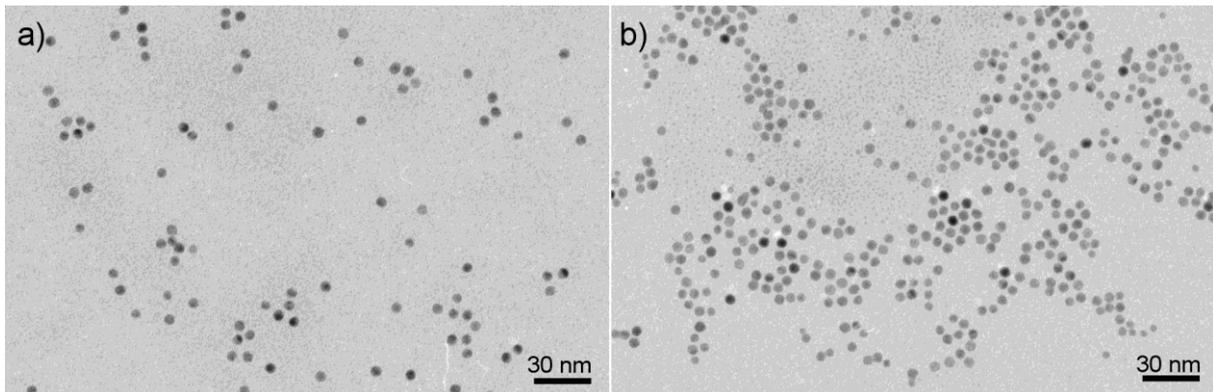


Abbildung 3.36: MUDS-koord. Au-NP (d = 6 nm) in Tris-Puffer bei pH 9 a) direkt nach Überführung in Puffer und b) 7 d nach Überführung in Puffer.

Um eine Verschlechterung der Partikeldispersität zu vermeiden und im zeitlichen Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen zu bleiben, wurden die Partikel daher erst direkt vor den Mischversuchen in Puffer überführt.

Kontrollversuche unter stark basischen Bedingungen, bei denen keine Aggregation der Partikel auftreten sollte, wurden zu Beginn ebenfalls in Tris/HCl-Puffer, welcher mit Natronlauge auf pH 11 gestellt wurde, durchgeführt. Die Partikel wiesen unter diesen Bedingungen eine von bei pH 9 nicht zu unterscheidende Stabilität auf. In diesem stark alkalischen pH-Bereich besitzt Tris/HCl-Puffer allerdings keine Pufferkapazität mehr. Deshalb wurde getestet, ob die Partikel bei pH 12 auch in Phosphatpuffer über den beobachteten Zeitraum stabil sind. Hierzu wurden die deutlich weniger dispersen aus DT-koord. NP hergestellten MUDS-koord. Au-NP (d = 6 nm) in 10 mM Phosphatpuffer überführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 6 h, 1 d) Absorptionsspektren aufgenommen. Die Spektren hierzu sind im Anhang (Abschnitt 8.1.2) zu finden. Es waren keine signifikanten Veränderungen im Absorptionsspektrum der Partikel zu beobachten, so dass alle folgenden Kontrollversuche unter stark basischen Bedingungen in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 12 durchgeführt wurden.

MUDSulfat-koord. Au-NP wurden zur Untersuchung der NP-induzierten Fibrillenbildung verwendet und mit den Peptiden VW19 und RR01 gemischt. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Diese Partikel sind aufgrund des sehr kleinen pK_S -Wertes der zur Sulfatgruppe korrespondierenden Säure (pK_S (H_2SO_4) = -3.0 [185]) bis zu tiefen pH-Werten negativ geladen und somit weniger pH-empfindlich als die MUDS-koord. Au-NP. Ein Arbeiten bei physiologischem pH-Wert (pH 7.4) sollte daher möglich sein. Unter Berücksichtigung der guten Ergebnisse mit 10 mM Tris/HCl-Puffer sowohl bei den CdS- als auch bei den MUDS-koord. Au-NP wurde die Stabilität MUDSulfat-koord. Au-NP in 10 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 7.4 untersucht. Im beobachteten Zeitraum wurde keine signifikante Veränderung des Absorptionsspektrums beobachtet, so dass diese Bedingungen für die Mischversuche mit Peptid übernommen wurden. Die Absorptionsspektren hierzu sind im Anhang (Abschnitt 8.1.3) zu finden.

Bei allen bisher in Puffer überführten NP handelte es sich um negativ geladene NP. Als positiv geladener NP-Baustein sollten TMA-stabilisierte Au-NP in Puffer überführt werden. Aufgrund der auf dem quarternären Stickstoff fixierten positiven Ladung des Liganden sollten die Partikel, ähnlich den MUDSulfat-koord. Au-NP, über einen weiten pH-Bereich stabil sein. In wässriger Lösung traf dies auch für beide Partikelgrößen (6 und 14 nm) zu. Die Überführung in den bisher als sehr NP-kompatibel aufgefallenen Tris/HCl-Puffer bei pH 7.4 gelang allerdings nicht. Kurz nach Wechsel der Dialyseflüssigkeit von Wasser auf Tris/HCl-Puffer fielen die Partikel als schwarzer Niederschlag aus und ließen sich auch nach mehreren Waschgängen mit Wasser nicht mehr lösen. Die für Aggregationsversuche mit Peptid notwendige Suche nach einem geeigneten Puffer für diese Partikel konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr fortgeführt werden.

3.2.4 VW05-induzierte Anordnung negativ geladener Kolloide

Als strukturinduzierender Baustein für die Aggregation negativ geladener NP wurde das Peptid VW05, welches das *coiled-coil*-Strukturmotiv aufweist, gewählt. Erste Versuche einer VW05-induzierten Aggregation von negativ geladenen NP erfolgten mit den 1.5 - 2 nm großen GSH-koord. CdS-NP. Ein Schema hierzu ist in Abbildung 3.37 gezeigt.

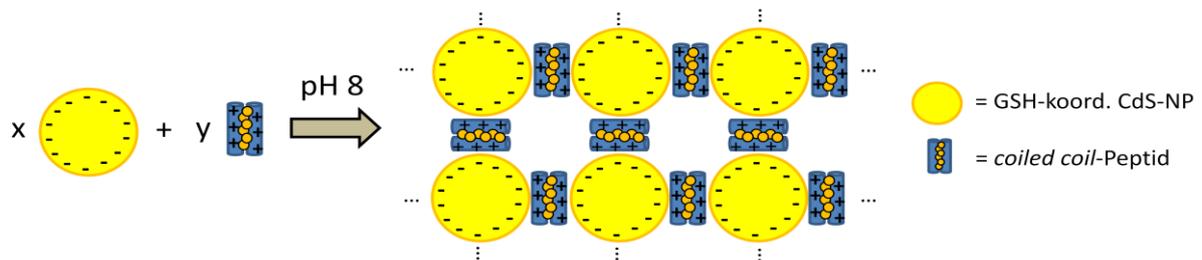


Abbildung 3.37: Schema für die VW05 - induzierte Anordnung von GSH-kooordinierten CdS-NP (nicht maßstabgetreu).

Die Versuche wurden bei pH 8 und in 10 mM Tris/HCl-Puffer durchgeführt, also bei den Reaktionsbedingungen, welche sich in den in Abschnitt 3.2.3.1 vorgestellten Versuchen zur Stabilität der NP in Puffer als besonders geeignet erwiesen hatten. Die Konzentration der GSH-koord. CdS-NP wurde so gewählt, dass die Absorption der NP am Absorptionsmaximum ca. 0.3 betrug. Die konzentrierte Kolloidlösung wurde mit Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt, zu der entsprechenden Menge Peptid in Festform gegeben und kurz kräftig geschüttelt. Getestet wurden vier unterschiedliche Peptidkonzentrationen zwischen 5 und 100 μM . Jeweils direkt nach Mischung sowie 1 min, 2 min, 5 min und 1 d später wurden Absorptionsspektren der Mischungen aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind exemplarisch anhand der Spektren mit 50 μM VW05 in Abbildung 3.38 gezeigt. Die übrigen Spektren dieser Messreihe sind im Anhang (Abschnitt 8.1.4) zu finden.

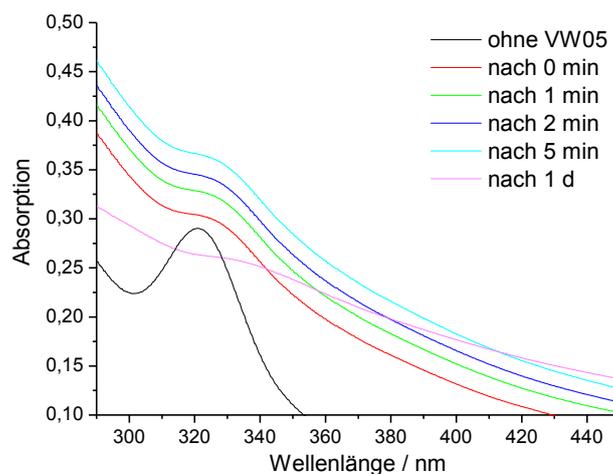


Abbildung 3.38: Absorptionsspektren von GSH-koord. CdS-NP ($d = 1.5 - 2 \text{ nm}$) in Gegenwart von 50 μM VW05 bei pH 8 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Während die GSH-koord. CdS-NP vor Zugabe von VW05 eine schmale Absorptionsbande mit einem Maximum bei 321 nm aufwies, trat nach Mischung beider Komponenten, unabhängig von der Peptidkonzentration, eine starke Verbreiterung der Absorptionsbande auf. Elektronische Wechselwirkungen zwischen den NP können die Ursache für eine solche Verbreiterung der Absorptionsbande sein [189]. Die Lage des Absorptionsmaximums blieb, ebenfalls unabhängig von der Peptidkonzentration, erhalten. Die kontinuierliche Zunahme der Absorptionsintensität über den gesamten beobachteten Wellenlängenbereich mit steigender Inkubationszeit ist auf die Bildung immer größerer NP-Peptid-Aggregate zurückzuführen, an denen das Licht gestreut wird. Dieser Trend war auch an der kontinuierlich zunehmenden Trübung zu beobachten. Einen Tag nach Mischung der Komponenten setzte sich bereits ein Teil des Niederschlags am Boden der Küvetten ab. Daher war die Absorption in diesen Spektren für alle Peptidkonzentrationen deutlich geringer als in den Messungen vom Vortag. Anhand der Ergebnisse der Absorptionsmessungen kann zusammenfassend festgestellt werden, dass Wechselwirkungen zwischen NP und Peptid auftreten, welche zur Bildung von Aggregaten führen. Eine Untersuchung der NP-Peptid-Aggregate aus VW05 und GSH-koord. CdS-NP mittels TEM, welche Aufschlüsse über die Ordnung in den Aggregaten hätte bringen können, war aufgrund des schlechten Kontrastes der CdS-NP in Kombination mit den größeren Mengen organischen Materials nicht möglich. Somit konnten auch keine Erkenntnisse über die Struktur der NP-Peptid-Aggregate, welche sich bei Zugabe von VW05 zu negativ geladenen NP bilden, gewonnen werden. Ein weiterer Nachteil der CdS-Kolloide war die unbekannte Kolloidkonzentration, welche eine Bestimmung des Verhältnisses von NP zu Peptid unmöglich machte.

Im Gegensatz zu den CdS-NP besitzen die größeren im Rahmen dieses Projektes synthetisierten Au-NP einen hohen Kontrast im TEM und die Partikelkonzentration kann aufgrund der vollständigen Umsetzung des Goldsalzes während der Synthese näherungsweise errechnet werden. Die nächsten Versuche wurden daher mit MUDS-koord. Au-NP durchgeführt. In Abbildung 3.39 ist ein Schema zu der VW05-induzierten Anordnung MUDS-koord. Au-NP gezeigt. Im Unterschied zu den Versuchen mit GSH-koord. CdS-Kolloiden wurde hier bei pH 9 gearbeitet, um eine ausreichende Stabilität dieser NP zu gewährleisten. Außerdem wurde das Peptid nicht mehr in fester Form, sondern als 100 μ molare Lösung in Tris/HCl-Puffer mit den NP gemischt, um eine schnellere und somit homogene Verteilung des Peptids in der Reaktionsmischung zu erhalten.

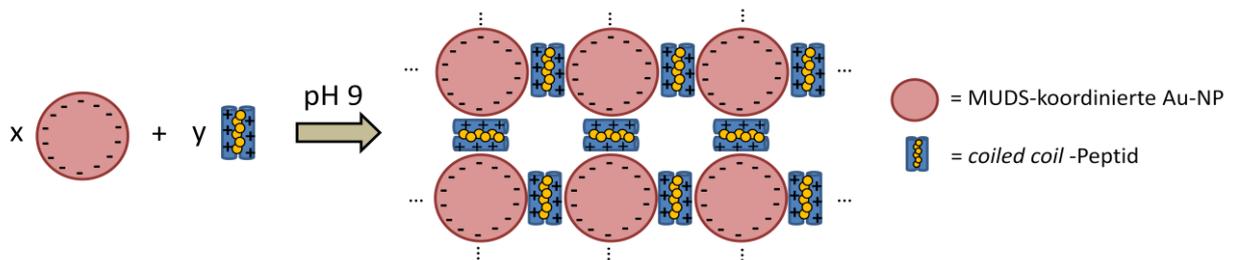


Abbildung 3.39: Schema für die VW05 - induzierte Anordnung von MUDS-koodinierten Au-NP.

Die Mischung der etwas disperseren ca. 5 nm großen MUDS-koodinierten Au-NP mit einer Lösung von VW05 bei pH 9 führte, analog zu den GSH-kood. CdS-NP, sofort zu einer Aggregation der Partikel, welche ab einer Konzentration von ca. 10 μM VW05 deutlich an einem Farbwechsel der Lösung von rot zu lila zu erkennen war. Am Boden der Küvetten, in denen auch diese Mischversuche durchgeführt wurden, bildete sich ab dieser Konzentration ein lilafarbener Niederschlag. In Abbildung 3.40 sind TEM-Aufnahmen der Partikel in Ab- (a) und Anwesenheit (b und c) von 30 μM VW05 gezeigt. In Anwesenheit des Peptids verschwanden die hexagonalen Muster, in denen sich die MUDS-kood. Au-NP ohne Peptid anordnen. Stattdessen waren große Aggregate aus ungeordneten NP zu finden.

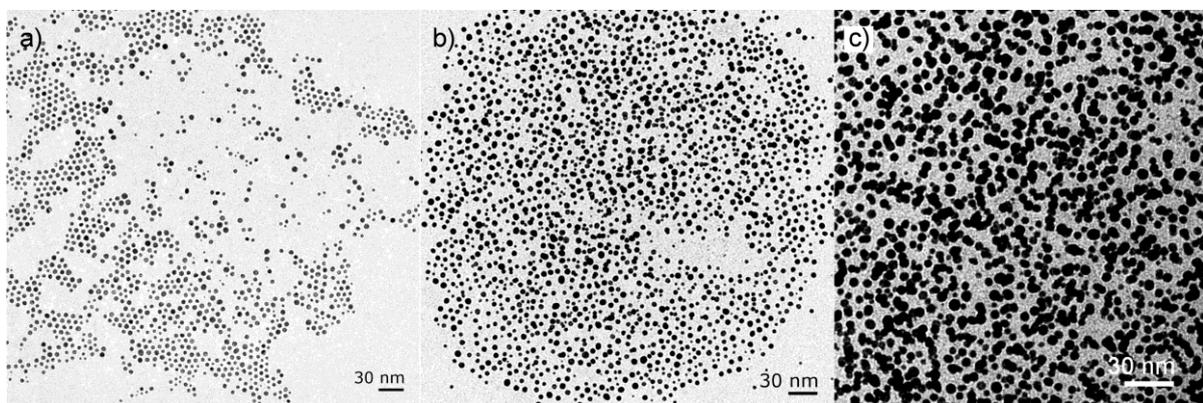


Abbildung 3.40: TEM-Aufnahmen von MUDS-kood. Au-NP ($d = 5 \text{ nm}$) bei pH 9 in 10 mM Tris/HCl-Puffer (a) in Abwesenheit und (b und c) in Anwesenheit von 30 μM VW05.

Die Aggregation wurde auch bei den Au-NP mittels Absorptionsspektroskopie verfolgt. In Anwesenheit des Peptids fand eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums statt, welche auf eine starke Annäherung und somit auf eine Aggregation der Partikel schließen lässt.

Die Vorversuche haben gezeigt, dass VW05 bei pH 9 eine Aggregation MUDS-kood. Au-NP induzieren kann und dass eine Beobachtung mittels UV/Vis-Spektroskopie und TEM möglich ist. Es konnte allerdings keine Ordnung innerhalb der NP-Aggregate beobachtet werden. Dies

könnte, neben anderen Ursachen, auch auf die hohe Dispersität der Partikel zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurden für die im Folgenden beschriebene intensive Untersuchung der VW05-induzierten Aggregation die nahezu monodispersen 6 nm großen MUDS-koord. Au-NP verwendet.

Um nachzuweisen, dass die Aggregation ausschließlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten zurückzuführen ist, wurden die Versuche bei zwei unterschiedlichen pH-Werten, pH 9 und pH 12, durchgeführt. Während bei pH 9 NP und Peptid entgegengesetzt geladen vorliegen, sind bei pH 12 beide Komponenten negativ geladen und es können daher keine attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen ihnen auftreten. Bei pH 12 sollte daher keine Aggregation der Komponenten zu beobachten sein, wenn ausschließlich elektrostatische Wechselwirkungen für die Aggregation verantwortlich sind.

In Abbildung 3.41 sind Absorptionsspektren von 0.05 μ molaren Lösungen MUDS-koord. Au-NP ($d = 6$ nm) mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids VW05 bei pH 9 (a) und pH 12 (b) gezeigt. Wie bereits bei Vorversuchen beobachtet, verschob sich bei pH 9 mit steigender Peptidkonzentration das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen. Besonders gut ist dieser Trend bei Auftragung der Lage des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration zu sehen (Abbildung 3.41 c). Dieses Phänomen ist auf eine starke Annäherung und somit auf eine Aggregation der Partikel zurückzuführen, welche mit steigender Peptidkonzentration immer weiter zunimmt. Bei sehr hohen Peptidkonzentrationen (ab ca. 30 μ M VW05) im Vergleich zur NP-Konzentration verschiebt sich das Absorptionsmaximum allerdings wieder in Richtung des vor Zugabe des Peptids vorhandenen Absorptionsmaximums zurück. Vermutlich nimmt die Dicke der zwischen den NP vorhandenen Peptidschicht bei diesen Konzentrationen zu, weil alle NP bereits mit einer Peptidschicht umgeben sind, so dass der Abstand zwischen den Partikeln wieder wächst und die Annäherung der NP für eine Verschiebung des Absorptionsmaximums immer weniger ausreicht.

Die mit steigender Peptidkonzentration starke Zunahme der Absorptionsintensität über den gesamten beobachteten Wellenlängenbereich ist auf Streuung des Lichts an den großen NP-Aggregaten zurückzuführen. Bei hohen Peptidkonzentrationen ist die Trübung der Lösung durch den sich bildenden Niederschlag bereits mit dem Auge zu erkennen. Ab einer Peptidkonzentration von 40 μ M (nicht mehr gezeigt) setzt sich ein Teil des Niederschlags auf

dem Boden der Küvette ab und die Intensität der Spektren sinkt wieder aufgrund der geringeren Partikelkonzentration.

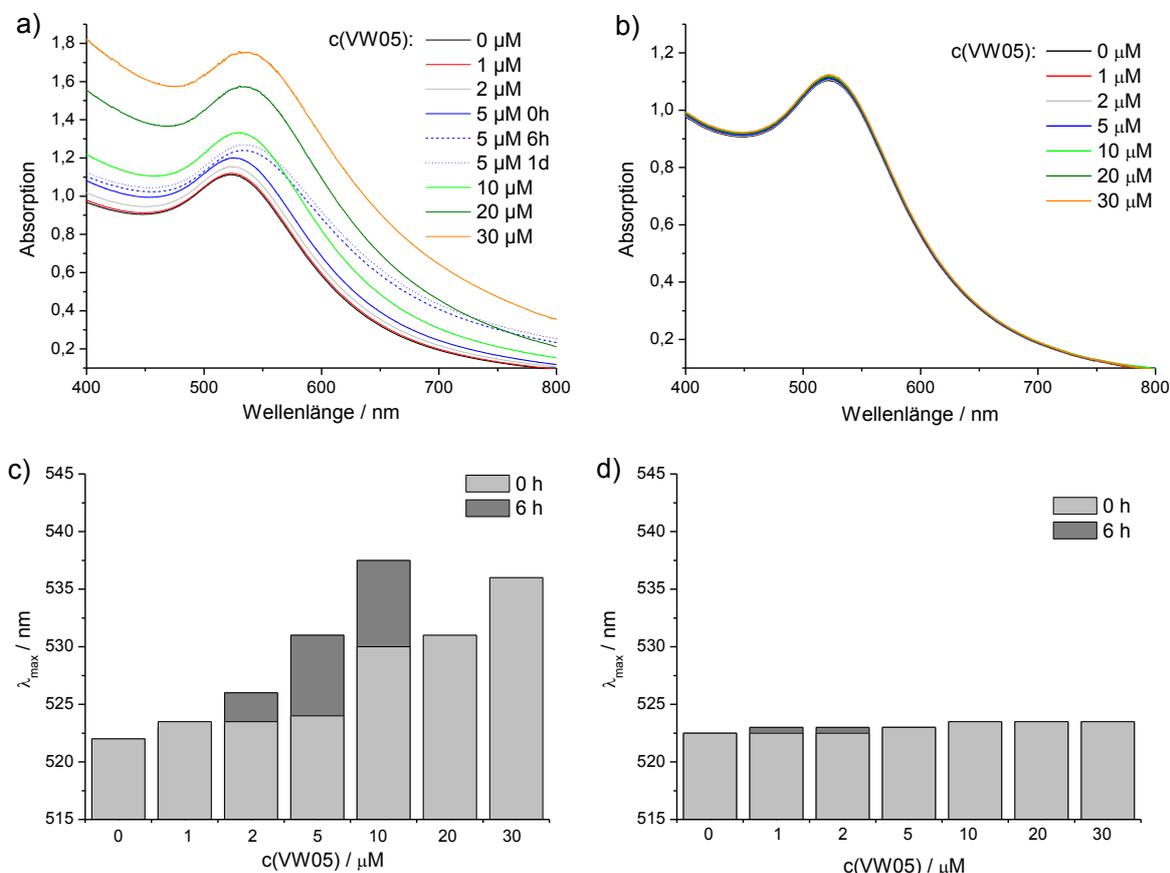


Abbildung 3.41: Absorptionsspektren von 0,05 µM MUDES-koordinierten Au-NP ($d = 6$ nm) (a) bei pH 9 mit versch. Konzentrationen VW05 direkt nach Mischung der Komponenten (bei 5 µM VW05 außerdem nach 6 h und 1 d) und (b) bei pH 12 mit versch. Konzentrationen VW05 direkt nach Mischung der Komponenten; Balkendiagramme zur Lage der Absorptionsmaxima in Abhängigkeit von der VW05-Konzentration direkt nach Mischung der Komponenten sowie nach 6 h bei (c) pH 9 und (d) pH 12.

Im Gegensatz hierzu waren alle bei pH 12 aufgenommenen Absorptionsspektren unabhängig von der Peptidkonzentration nahezu identisch. Es war weder eine Verschiebung des Absorptionsmaximums (siehe Abbildung 41 d) noch eine Zunahme der Absorptionsintensität zu beobachten. Bei gleichgeladenen Komponenten findet somit keine Aggregation statt. Die Versuche bei pH 12 zeigen, dass es sich bei der bei pH 9 beobachteten Aggregation nicht um ein unspezifisches Aggregationsphänomen der Partikel handelt, sondern dass diese auf den attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen NP und dem positiv geladenen Peptid beruht.

Die VW05-induzierte Aggregation MUDS-koord. Au-NP wurde außerdem mittels Gelelektrophorese untersucht. Hierzu wurden die für die UV/Vis-Spektroskopie verwendeten Proben auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen und sowohl bei pH 9 (Tris/HCl-Puffer, 0.1 M) als auch bei pH 12 (Phosphatpuffer, 0.05 M) einer Elektrophorese unterzogen. Die Dokumentation der Bandenlage erfolgte einerseits mit Weißlicht zur Detektion der Au-NP, und andererseits mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm zur Detektion des Peptids.

Bei pH 9 war eine starke Veränderung des Laufverhaltens der Proben mit zunehmender Peptidkonzentration zu beobachten (siehe Abbildung 3.42). In Abwesenheit des Peptids bewegten sich die negativ geladenen MUDS-koordinierten Au-NP Richtung Anode (Abbildung 3.42, Nr. 1). Mit zunehmender Peptidkonzentration verringerte sich die Laufstrecke der Au-NP (Abbildung 3.42, Nr. 2-3). Dies ist auf die Bildung von Peptid-NP-Aggregaten zurückzuführen, welche aufgrund ihrer Größe und der durch Ladungskompensation mit dem positiv geladenen Peptid sinkenden Nettoladung eine geringere Laufstrecke zurücklegten. Ein weiteres Indiz für die Bildung dieser Peptid-NP-Aggregate ist die Abwesenheit der bei Anregung mit UV Licht in Abwesenheit der NP deutlich erkennbaren Peptidbande (Abbildung 3.42, Nr. 10). Die Fluoreszenz von VW05 wird vermutlich durch die Nähe zu den Au-NP ausgelöscht. Ab einem 200-fachen Überschuss von Peptid zu NP (entsprechend einer Peptidkonzentration von 10 μM bei 0.05 μM Au-NP) war keine Wanderung der Bande mehr festzustellen, die Peptid-NP-Aggregate blieben in den Taschen des Gels liegen (Abbildung 3.42, Nr. 4-6). Sie haben an diesem Punkt eine Größe erreicht, die ihnen den Eintritt in das Gel unmöglich macht. Ab einem 1000-fachen Überschuss von Peptid zu NP bewegte sich ein Teil des Peptids zur Kathode, während die NP-Peptid-Aggregate in den Taschen liegen blieben. Ab diesem Punkt kann das Peptid nicht mehr vollständig an den NP gebunden werden. Die Intensität dieser Peptidbande nimmt erwartungsgemäß mit steigender Peptidkonzentration weiter zu (Abbildung 3.42, Nr. 7-9) und die Laufstrecke ist der von 100 μM VW05 ohne NP (Abbildung 3.42, Nr. 10) sehr ähnlich. Ein Vergleich der Banden von VW05 ohne NP bei zwei verschiedenen Konzentrationen (Abbildung 3.42, Nr. 10-11) zeigte außerdem, dass das Laufverhalten des Peptids konzentrationsabhängig ist. Da die Nettoladung des einzelnen Peptids nicht verändert wurde, ist dieser Effekt auf eine Änderung der Quartärstruktur von VW05 in Abhängigkeit von der Konzentration zurückzuführen.

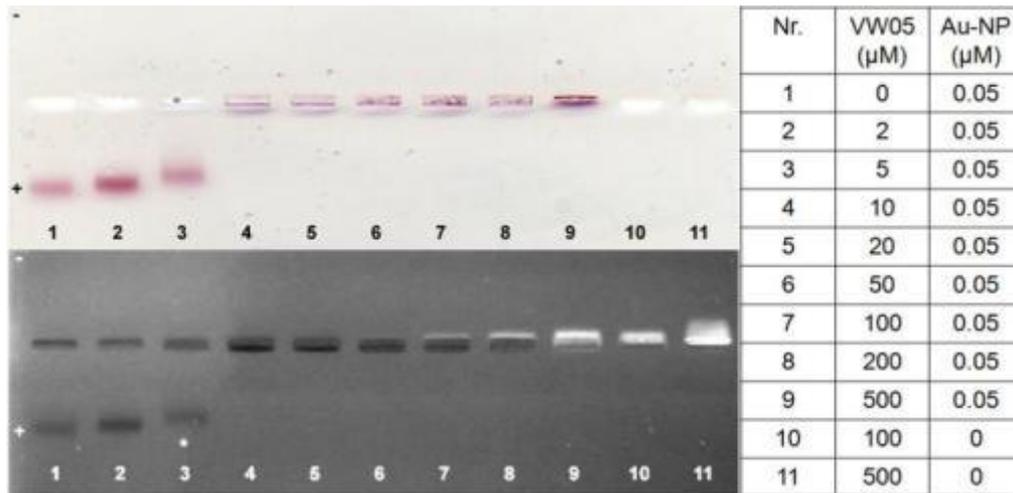


Abbildung 3.42: Gelelektrophorese an Mischungen von MUDS-koodinierten Au-NP und VW05 bei pH 9, links oben: Agarosegel belichtet mit Weißlicht, links unten: Agarosegel belichtet mit 254 nm UV-Licht, rechts: Tabelle mit den Mischungsverhältnissen der aufgetragenen Proben.

Im Vergleich hierzu erwies sich bei pH 12 das Laufverhalten der NP erwartungsgemäß als nahezu unabhängig von der Peptidkonzentration (siehe Anhang, Abschnitt 8.2.1). Alle NP-Banden bewegten sich mit identischer Laufstrecke Richtung Anode. Da das Peptid VW05 bei pH 12 negativ geladen war, bewegte sich auch dieses Richtung Anode. Die zurückgelegte Laufstrecke war unabhängig von der Peptidkonzentration. Die bei pH 9 beobachtete Auslöschung der Fluoreszenz bei großer Nähe des Peptids zu den NP trat nicht auf, die Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht konnte bei allen Peptidkonzentrationen über 5 µM detektiert werden. Dies ist ein weiteres deutliches Zeichen, dass bei pH 12 keine enge räumliche Nähe und somit keine attraktiven Wechselwirkungen zwischen NP und Peptid auftreten. Zusammengefasst bestätigen die gelelektrophoretischen Untersuchungen bei pH 9 und pH 12 die aus den Absorptionsspektren gewonnenen Erkenntnisse.

Die Struktur der NP-Peptid-Aggregate wurde mittels TEM-Aufnahmen näher untersucht. In Abbildung 3.43 sind TEM-Aufnahmen der MUDS-kood. Au-NP ($d = 6$ nm) bei pH 9 in 10 mM Tris/HCl-Puffer (a) sowie von einer Mischung dieser Partikel unter identischen Bedingungen mit 10 µM VW05 (b-d) gezeigt.

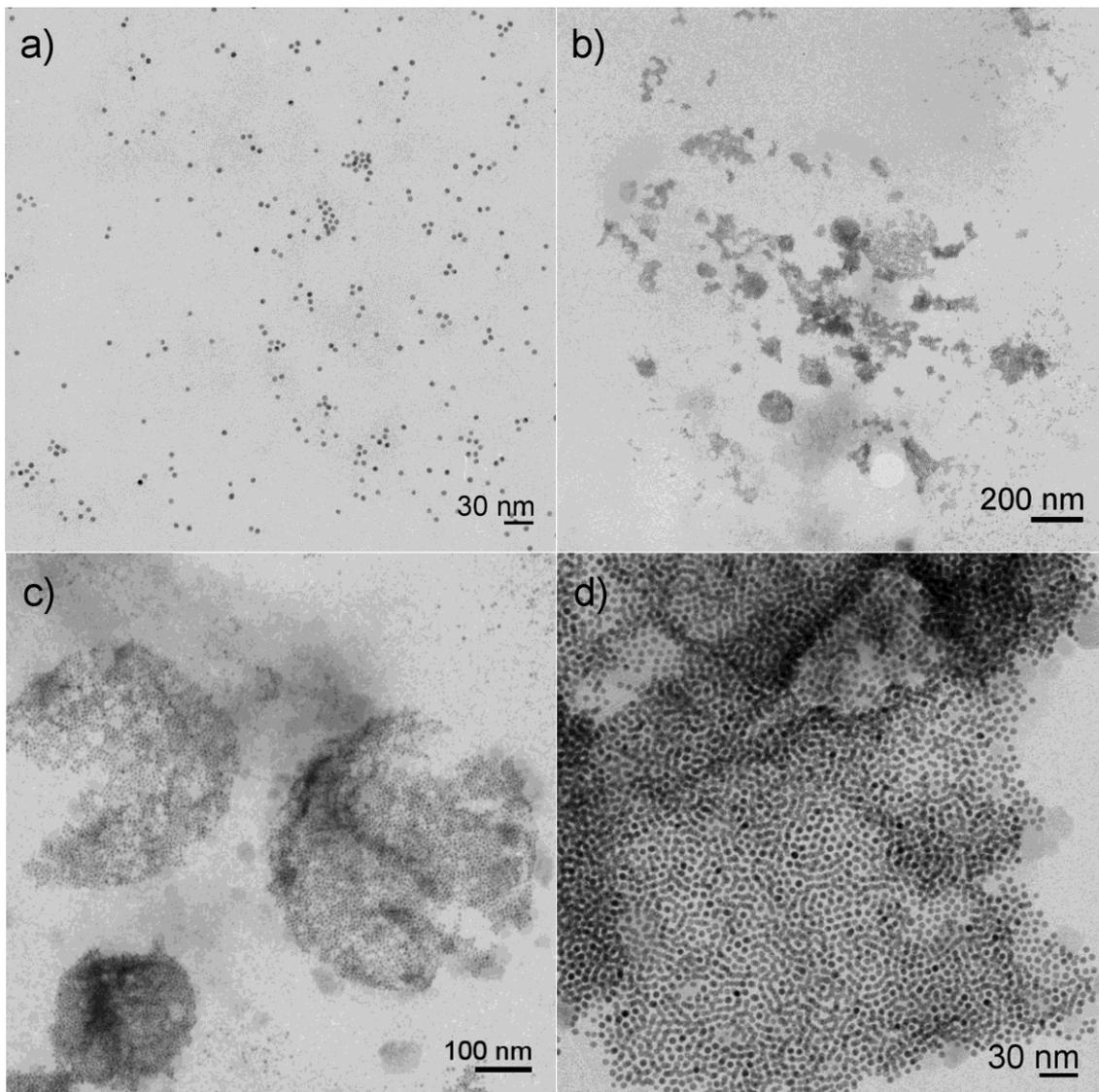


Abbildung 3.43: TEM-Aufnahmen von MUDS-koord. Au-NP ($d = 6$ nm) bei pH 9 in 10 mM Tris/HCl-Puffer (a) ohne und (b,c und d) mit $10 \mu\text{M}$ VW05.

Während die NP ohne Peptid vereinzelt und relativ gleichmäßig auf dem TEM-Grid verteilt lagen, war bei Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ VW05 eine deutliche Aggregation der Partikel zu erkennen. Neben den mehrere 100 nm großen NP-Peptid-Aggregaten sind bei dieser Peptidkonzentration und Präparation auch einige einzeln liegende NP zu finden. Im Vergleich zu den TEM-Aufnahmen aus den Vorversuchen (Abbildung 3.40) scheint die Struktur der Aggregate stellenweise eine gewisse Nahordnung aufzuweisen (siehe Abbildung 3.43 d), aber eine Fernordnung der Partikel ist trotz deutlich verbesserter Dispersität der Partikel nicht vorhanden.

Das Eintrocknen der Probe bei der Grid-Präparation kann zu Aggregationseffekten führen, welche in Lösung nicht auftreten. Auf diese Weise präparierte Proben lassen daher in Bezug auf den Aggregationszustand der Komponenten nur begrenzt Rückschlüsse über die Situation

in Lösung zu. Das Entfernen des Lösungsmittels kann außerdem zum Einsturz geordneter Strukturen führen, wenn, wie von NP-DNA-Aggregaten bekannt [104], ein hoher Prozentteil der Struktur von Lösungsmittelmolekülen belegt wird. Somit muss der Ordnungsgrad der NP-Peptid-Aggregate in Lösung nicht unbedingt mit dem auf derartig präparierten TEM-Aufnahmen entsprechen. Kryo-TEM-Aufnahmen haben den Vorteil, dass die Probe nicht getrocknet, sondern eingefroren wird, so dass die Probe während der Messung bezüglich der Abstände zwischen den vorhandenen Komponenten in einem der Lösung vergleichbaren Zustand vorliegt. Die Kryo-TEM-Aufnahmen der Mischung MUDS-koord. Au-NP und VW05 bei pH 9 sind in Abbildung 3.44 gezeigt und liefern im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse bezüglich des Aggregationsverhaltens der NP sowie deren Ordnungsgrad in den Aggregaten wie in Abbildung 3.43 zu sehen.

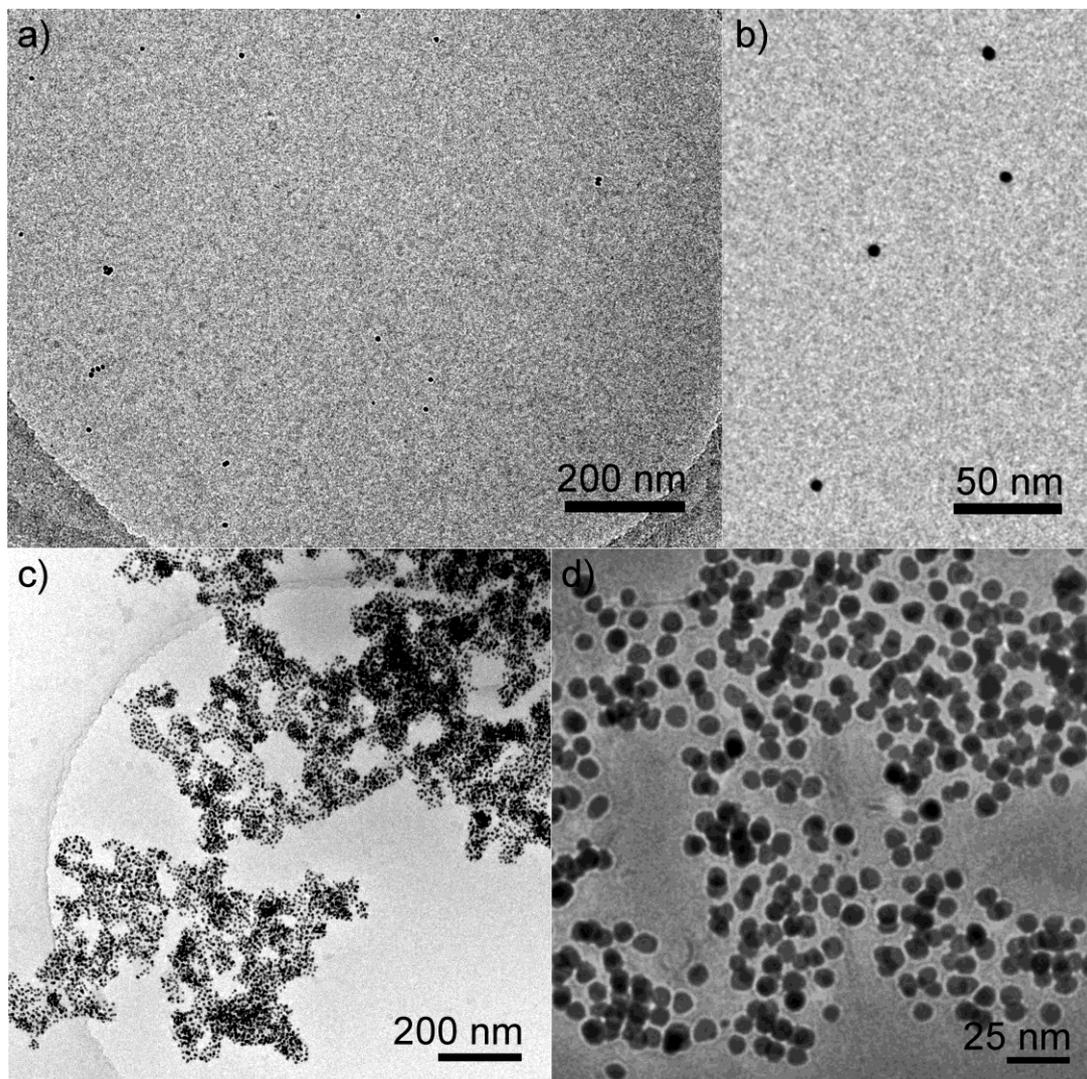


Abbildung 3.44: Kryo-TEM-Aufnahmen von $0.05 \mu\text{M}$ MUDS-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) bei pH 9 und verschiedenen Vergrößerungen (a und b) ohne VW05 und (c und d) mit $10 \mu\text{M}$ VW05.

Die Gridpräparation scheint in diesem Fall keinen Einfluss auf die Ordnung der Aggregate gehabt zu haben. Zusätzlich kann allerdings bei den Kryo-TEM-Aufnahmen das Peptid zwischen den NP visualisiert werden (Abbildung 3.44 d). Es handelt sich dabei um Peptidstränge, welche deutlich größer sind als die VW05-Trimere. In Anwesenheit der NP scheint sich das Peptid teilweise in größere, fibrillenartige Strukturen geordnet zu haben, welche sich netzwerkartig um die NP legen.

Die Struktur der sich bildenden Aggregate hängt neben dem Verhältnis von NP zu Peptid auch von der Präparation ab. So sollte es beispielsweise bei sonst identischen Bedingungen einen Unterschied machen, ob die NP-Lösung bei Zugabe der Peptidlösung gerührt wird oder nicht. Auch die Entscheidung, welche Lösung vorgelegt und welche zugegeben wird, spielt eine wichtige Rolle für die Struktur der sich bildenden Aggregate. Neben einer Veränderung der Mischbedingungen können aber auch die Aufarbeitung der Partikel variiert und somit die Eigenschaften der Probe beeinflusst werden. In Abbildung 3.45 sind TEM-Aufnahmen der aus diesen drei Präparationsmöglichkeiten resultierenden NP-Peptid-Aggregate gezeigt.

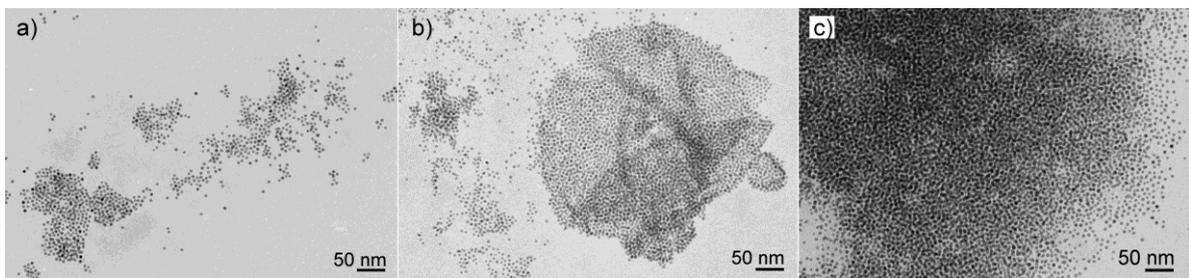


Abbildung 3.45: TEM-Aufnahmen verschiedener Präparationsmethoden bei pH 9: a) Unter Rühren wurden MUDS-koord. Au-NP ($d = 6$ nm) mit VW05 versetzt (Endkonz.: $0.05 \mu\text{M}$ NP, $5 \mu\text{M}$ VW05); b) Zentrifugation der Mischung von $0.05 \mu\text{M}$ MUDS-koord. Au-NP ($d = 6$ nm) und $5 \mu\text{M}$ VW05 und Abtrennung des Niederschlags; c) $0.1 \mu\text{M}$ MUDS-koord. Au-NP ($d = 6$ nm) werden unter Rühren zu einer $20 \mu\text{M}$ Lösung von VW05 getropft, dann Zentrifugation und Abtrennung des Niederschlags.

Wurde die Lösung MUDS-koord. Au-NP bei Zugabe der VW05-Lösung gerührt (Abbildung 3.45 a), so waren die resultierenden NP-Peptid-Aggregate deutlich kleiner im Vergleich zu der ungerührten Probe mit identischem Verhältnis von NP zu Peptid. Im Gegensatz dazu führte das Vorlegen der Peptidlösung und langsames Zutropfen der NP-Lösung zu besonders großen Aggregaten (Abbildung 3.45 c). Durch Zentrifugieren und Resuspendieren des dabei erhaltenen lilafarbenen Niederschlags bei der für die Absorptionsspektroskopie verwendeten Probenpräparation konnte eine deutliche

Verringerung des Anteils einzelner Partikel erzielt werden, die vollständige Abtrennung gelang allerdings nicht (Abbildung 3.45 b).

Obwohl die verschiedenen Präparationsvarianten zu unterschiedlich großen NP-Peptid-Aggregaten führten, blieb die Nah- und Fernordnung der Partikel optisch identisch. Publikationen mit DNA-funkt. Au-NP [103, 104, 190] haben gezeigt, dass die Temperatur einen wesentlichen Einfluss auf die Struktur von NP-Aggregaten haben kann, wenn diese durch Hybridisierung komplementärer DNA-Fragmente zusammengehalten werden. Wurden die komplementär funktionalisierten Au-NP unterhalb der Schmelztemperatur der DNA gemischt, so entstanden zunächst ungeordnete NP-Aggregate. Das Heizen dieser Aggregate über den Schmelzpunkt der DNA und anschließendes Abkühlen führte bei geeigneter Länge und Flexibilität des Linkers zu geordneten NP-Strukturen. Dieser Effekt beruht auf der Tatsache, dass bei dieser Temperatur die Wechselwirkungen zwischen den DNA-Fragmenten sehr schwach werden und entropische Faktoren die Bildung der Struktur bestimmen. Voraussetzung hierfür ist die reversible Auflösung und Bildung der Aggregate während der Heiz- und Kühlzyklen.

Auch die aggregationsinduzierende Wirkung von VW05 sollte sich durch Erwärmung auf Temperaturen in der Nähe und über den Schmelzpunkt von VW05 deutlich reduzieren lassen, denn sie beruht auf der *coiled coil* - Struktur von VW05, welche unter diesen Bedingungen verloren geht. Daher wurden die mit VW05 bei pH 9 erhaltenen Aggregate bei 80 °C getempert. TEM-Aufnahmen der Aggregate mit (Abbildung 3.46) und ohne Tempern (Abbildung 3.43) weisen jedoch keine großen Unterschiede bezüglich der NP-Ordnung auf. Im Vergleich zu den ungetemperten Proben sind die Aggregate nach dem Tempern allerdings deutlich kompakter und größer. Eventuell lässt sich durch eine weitere Erhöhung der Temperatur die Ordnung in den NP-Aggregaten erhöhen, denn bei 80 °C ist der Schmelzpunkt von VW05 noch nicht ganz erreicht. Bei 80 °C liegen erst 30 % des Peptids ungefaltet vor, bei 100 °C sind es 65 %. Schmelzkurven von VW05 haben außerdem gezeigt, dass in Gegenwart der NP der Schmelzpunkt von VW05 deutlich zu höheren Temperaturen verschoben wird (Schmelzkurven von VW05 in Ab- und Anwesenheit neg. geladener NP siehe Anhang, Abschnitt 8.3). In Gegenwart von 7 nM negativ geladener (MUDSulfat-koord.) Au-NP liegen bei 100 °C nur noch 47 % des Peptids ungefaltet vor, also 18 % weniger im Vergleich zur Probe ohne NP. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für andere Peptide in der Literatur beschrieben [191]. Um bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt von VW05

arbeiten zu können wäre daher ein Lösungsmittelwechsel erforderlich. Versuche hierzu waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

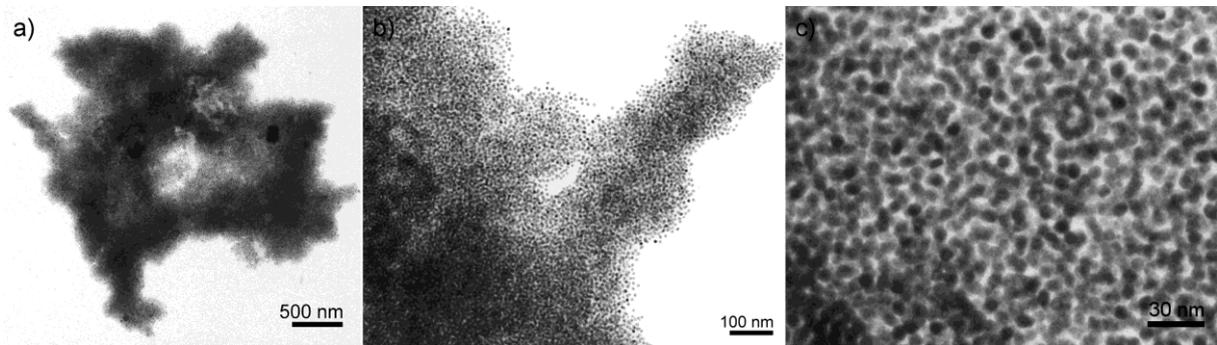


Abbildung 3.46: TEM-Aufnahmen einer bei 80 °C getemperten Mischung von 0.05 μM MUDS-koord. Au-NP und 10 μM VW05.

Eine weitere interessante Beobachtung wurde bei der Behandlung des Niederschlags mit Ultraschall gemacht. Die zuvor lilafarbene, trübe Lösung wurde durch Behandlung mit Ultraschall wieder klar und rot. Fotos einer Suspension der Aggregate vor und nach Ultraschallbehandlung sind in Abbildung 3.47 gezeigt. Nach kurzer Zeit (ca. 10 min) bildeten sich der Niederschlag und die lila Farbe wieder zurück. Ob dieser Prozess lediglich auf die mechanische Zerkleinerung der Aggregate oder eine Ultraschall-induzierte Änderung in der Peptidkonformation zurückzuführen ist, ist noch nicht geklärt.

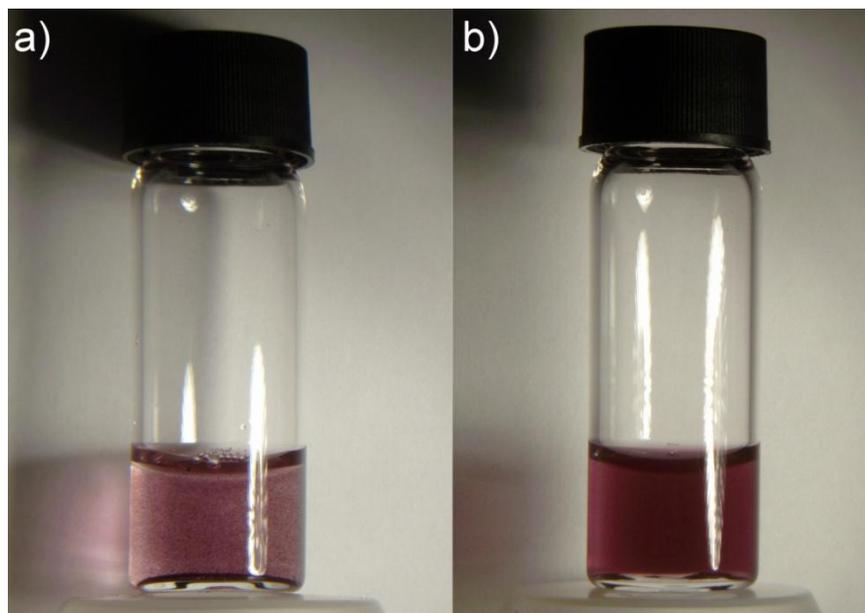


Abbildung 3.47: Fotos einer Mischung von 0.05 μM MUDS-koord. Au-NP mit 10 μM VW05 (a) vor und (b) nach ca. 20 Sekunden Ultraschallbehandlung.

Zu Kontrollzwecken wurden die MUDS-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) auch bei pH 12 mit VW05 gemischt und die Lösung mittels TEM untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.48 gezeigt und stimmen mit denen aus der gelelektrophoretischen Untersuchung und den Absorptionsspektren überein. Es findet keine Aggregation der NP statt. Die TEM-Aufnahmen der NP mit und ohne Peptid sind kaum voneinander zu unterscheiden. Die Partikel sind gleichmäßig auf dem TEM-Grid verteilt.

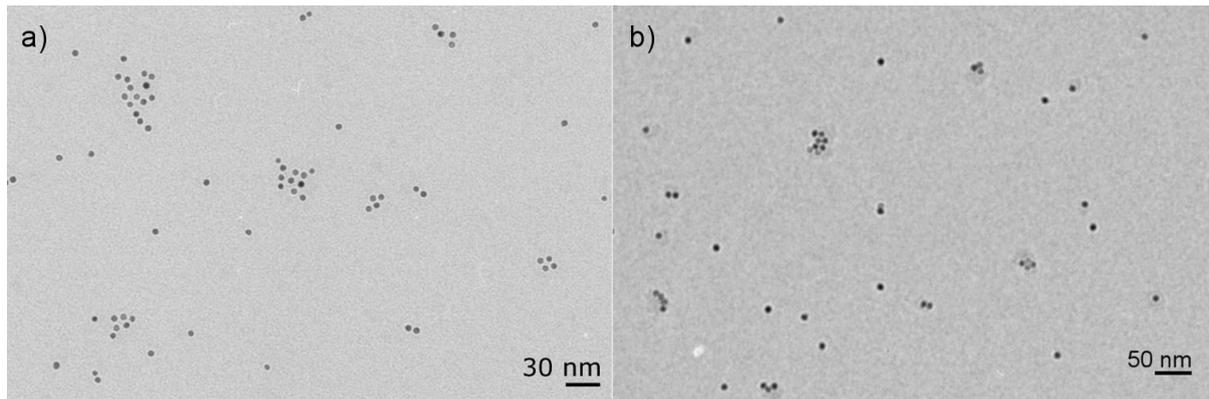


Abbildung 3.48: TEM-Aufnahmen MUDS-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) bei pH 12 (a) in Abwesenheit von VW05 und (b) mit $10 \mu\text{M}$ VW05.

Um nachzuweisen, dass die räumliche Ausrichtung der positiven Ladungen und somit das *coiled-coil*-Motiv des Peptids verantwortlich ist für die Bildung der Aggregate, wurden die Aggregationsversuche außerdem unter identischen Bedingungen mit einem anderen Peptid, SR05, wiederholt. Dieses ist aus den gleichen Aminosäuren aufgebaut, aber in einer anderen Sequenz (siehe Tabelle 3.1). SR05 besitzt somit den gleichen pI-Wert wie VW05, liegt aber unter den gegebenen Bedingungen aufgrund der veränderten Sequenz überwiegend ungefaltet vor. Mittels Absorptionsspektren, Gelelektrophorese und TEM-Aufnahmen konnte nachgewiesen werden, dass mit dem Peptid SR05 keine signifikante Aggregation MUDS-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) induziert werden kann.

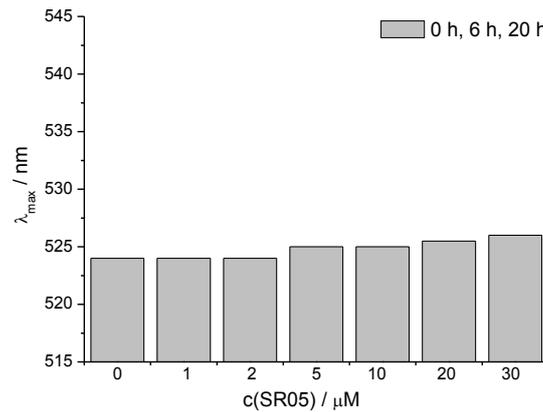


Abbildung 3.49: Absorptionsmaxima von $0.05 \mu\text{M}$ MUDS-koord. Au-NP in Abhängigkeit von der SR05-Konzentration bei pH 9 (10 mM Tris/HCl-Puffer) direkt nach Mischung der Komponenten sowie nach 6 h und 20 h.

Zwischen dem positiv geladenen Peptid SR05 und den negativ geladenen NP fanden zwar attraktive elektrostatische Wechselwirkungen statt, welche in den Absorptionsspektren zu einer leichten Zunahme der Absorption (siehe Abbildung 3.49 sowie die Spektren im Anhang, Abschnitt 8.1.5) und bei der Gelelektrophorese zu einer leichten Retardierung der NP-Banden mit steigender Peptidkonzentration (siehe Abbildung 3.50) führten. Im Gegensatz zu Versuchen mit VW05 konnte aber keine Niederschlagsbildung und keine signifikante Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachtet werden.

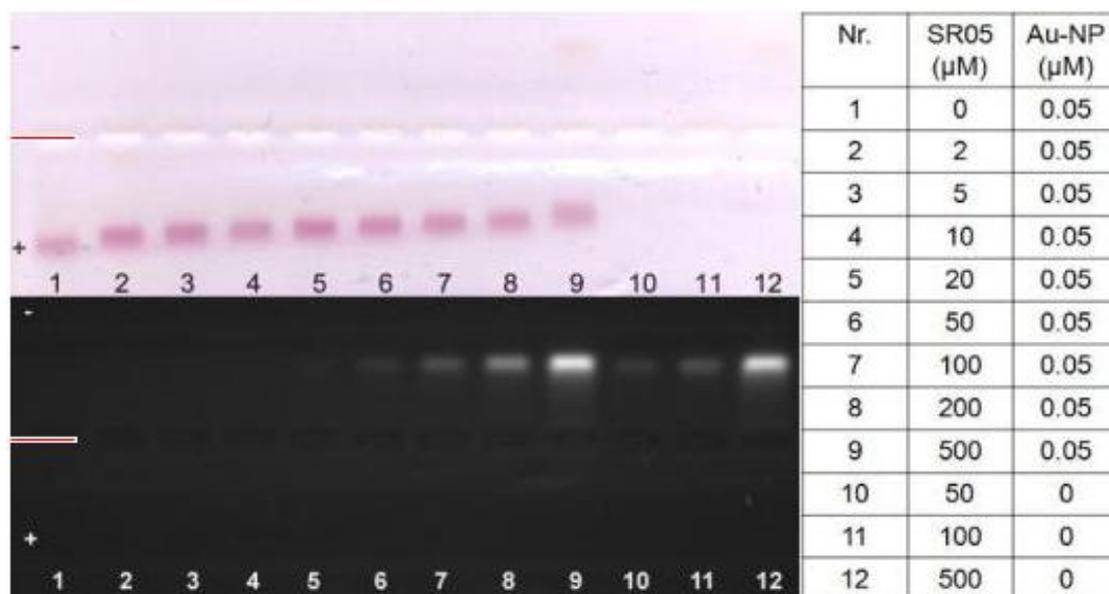


Abbildung 3.50: Gelelektrophorese an Mischungen von MUDS-koordinierten Au-NP und SR05 bei pH 9, links oben: Agarosegel belichtet mit Weißlicht, links unten: Agarosegel belichtet mit 254 nm UV-Licht, rechts: Tabelle mit den Mischungsverhältnissen der aufgetragenen Proben. Die Lage der Taschen ist mit einem roten Strich markiert.

Auch auf TEM-Aufnahmen der Mischung von MUDS-koord. Au-NP und SR05 bei pH 9 sind nur vereinzelt liegende NP und keine NP-Aggregate zu finden. In Abbildung 3.51 ist eine TEM-Aufnahme hiervon (b) sowie zum Vergleich eine TEM-Aufnahme mit VW05 unter identischen Bedingungen (a) zu sehen. Die räumliche Ausrichtung der positiven Ladung auf dem Peptid, in diesem Beispiel durch das *coiled-coil*-Motiv, erwies sich somit als notwendige Voraussetzung, damit eine Aggregation negativ geladener NP durch das Peptid induziert werden kann.

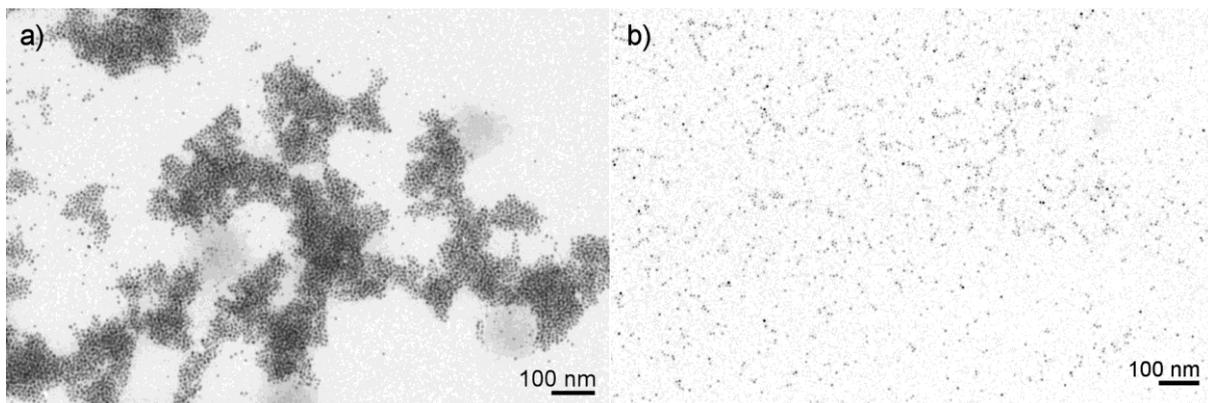


Abbildung 3.51: TEM-Aufnahmen MUDS-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) bei pH 9 in Abwesenheit von (a) VW05 und (b) SR05.

Für Anwendungen könnte nicht nur die Bildung von NP-Peptid-Aggregaten, sondern auch die Schaltbarkeit dieser Aggregation, beispielsweise durch pH-Wert-Änderung, interessant sein. Voraussetzung für eine hohe Anzahl möglicher Zyklen ist hierbei, dass sich die bei pH 9 gebildeten Aggregate durch pH-Wert-Erhöhung auf pH 12 wieder vollständig auflösen lassen. Daher wurde anhand von Absorptionsspektren untersucht, ob und wenn ja ab welchem pH-Wert sich die Aggregate aus VW05 und MUDS-koordinierten Au-NP wieder auflösen lassen. Hierzu wurde der pH-Wert einer Suspension aus VW05 ($10 \mu\text{M}$) und MUDS-koordinierten Au-NP ($0.05 \mu\text{M}$) in 10 mM Tris/HCl-Puffer ca. 1 h nach Mischung von pH 9 in kleinen Schritten (in 0.5 pH-Einheiten) auf pH 12 angehoben. Die Inkubationszeit zwischen jedem Schritt betrug ca. 5 min. Um einen Einfluss der pH-Wert-Änderung auf den Aggregationszustand der Au-Kolloide und somit auf die Lage des Absorptionsmaximums im Absorptionsspektrum ausschließen zu können, wurde außerdem eine Lösung der MUDS-koordinierten Au-Kolloide ohne VW05 unter identischen Bedingungen (10 mM Tris/HCl-Puffer, $c(\text{NP}) = 0.05 \mu\text{M}$) bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Messergebnisse beider Messreihen sind in Abbildung 3.52 gezeigt.

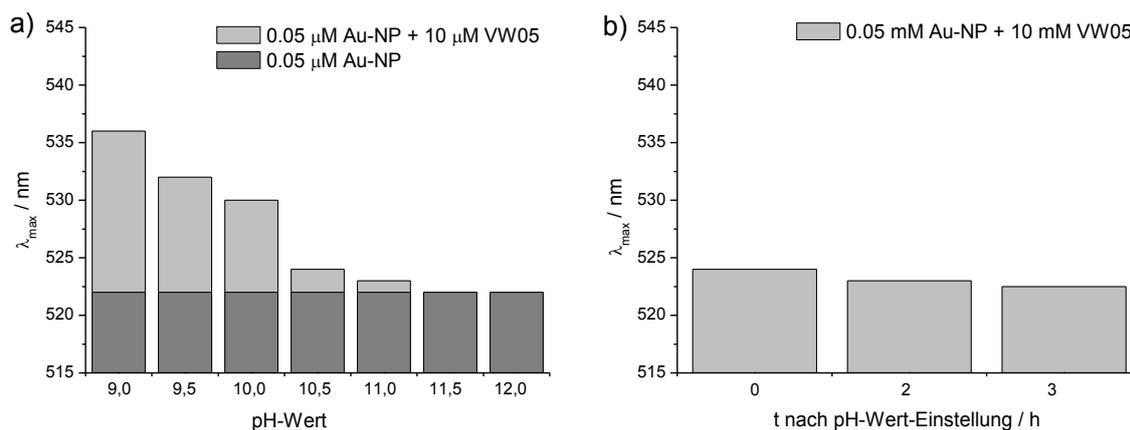


Abbildung 3.52: a) Lage des Absorptionsmaximums von 0.05 µM Au-NP in An- und Abwesenheit von 10 µM VW05 bei versch. pH-Werten; b) Lage des Absorptionsmaximums von 0.05 µM Au-NP und 10 µM VW05 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Wechsel des pH-Wertes von pH 9 auf pH 12.

In Abwesenheit des Peptids verändern sich die Absorptionsspektren nicht, das Absorptionsmaximum liegt unabhängig vom pH-Wert bei 522 nm. Der pH-Wert hat demzufolge im beobachteten pH-Bereich keinen Einfluss auf den Aggregationszustand der MUDS-kooordinierten Au-Kolloide. Die in Anwesenheit des Peptids zu beobachtenden Veränderungen des Absorptionsspektrums sind demzufolge ausschließlich auf Wechselwirkungen zwischen Peptid und NP zurückzuführen.

Mit steigendem pH-Wert verschiebt sich in Anwesenheit des Peptids das Absorptionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen. Bei pH 12 erreicht die Lage des Absorptionsmaximums fast die Lage des Absorptionsmaximums in Abwesenheit des Peptids. Ein weiterer wichtiger Hinweis ist die Verringerung der Streuintensität mit steigendem pH-Wert, zu erkennen an einer sinkenden Intensität über den gesamten Wellenlängenbereich. Die Aggregate aus VW05 und MUDS-kooordinierten Au-NP lösen sich demnach mit steigendem pH-Wert nahezu vollständig wieder auf.

Für eine vollständige Auflösung der Peptid-NP-Aggregate spielt aber nicht nur der pH-Wert, sondern auch die Zeit eine wesentliche Rolle. Daher wurde die Auflösung der Aggregate nicht nur pH-Wert-abhängig, sondern auch zeitabhängig untersucht. Hierzu wurde eine bei pH 9 angesetzte Mischung aus 0.05 µM MUDS-koord. Au-NP und 10 µM VW05 ca. 1 h inkubiert, bevor durch Zugabe von 0.1 molarer Natronlauge der pH-Wert auf pH 12 gestellt wurde. Sofort nach beendeter pH-Wert-Einstellung sowie 2 und 3 h später wurden Absorptionsspektren aufgenommen. In Abbildung 3.52 b sind die Lage der Absorptionsmaxima in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei pH 12 dargestellt. Das Absorptionsmaximum liegt nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 12 bei 524 nm. Im Verlauf

von drei Stunden findet eine weitere Blauverschiebung zu 522 nm statt. Dies entspricht der Lage des Absorptionsmaximums bei der Au-Kolloidprobe ohne Peptid. Es findet demnach innerhalb von drei Stunden eine vollständige Auflösung der Peptid-NP-Aggregate statt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine vollständige Auflösung der Peptid-NP-Aggregate durch Anhebung des pH-Wertes von pH 9 auf pH 12 möglich ist, wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob sich der Aggregationsprozess *wiederholt* durch pH-Wert-Änderung induzieren und auflösen lässt. Ein Schema hierzu ist in Abbildung 3.53 gezeigt.

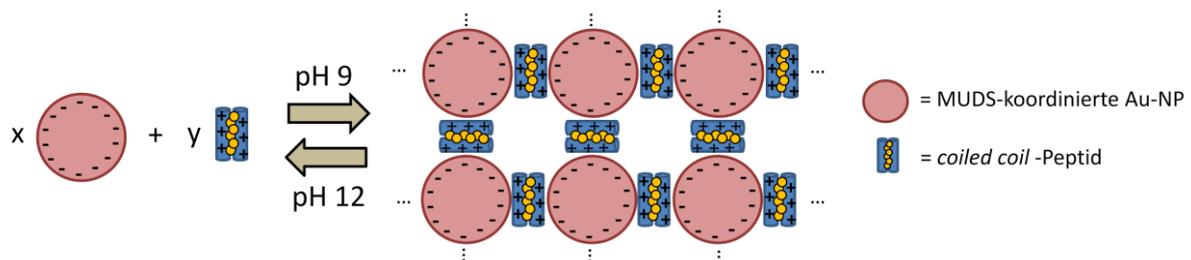


Abbildung 3.53: Schema für die pH-abhängige *coiled coil* – Peptid induzierte Anordnung von MUDS-koord. Au-NP.

Eine Mischung aus 30 μM VW05 und 0.05 μM MUDS-koordinierten Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) in 10 mM Tris/HCl-Puffer wurde bei pH 9 angesetzt und dann der pH-Wert mehrere Male mit 0.1 M Natronlauge bzw. konzentrierter Salzsäure zwischen pH 12 und pH 9 hin und her titriert. Die Farbe der NP-Peptid-Mischung wechselt dabei ebenfalls zwischen violett bei pH 9 und rot bei pH 12 hin und her. Die Inkubationszeit zwischen den pH-Wert-Wechseln betrug jeweils ca. 5 min. Die Veränderung des Aggregationszustands der Kolloide wurde mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie dokumentiert. Die Abhängigkeit der Lage des Absorptionsmaximums vom pH-Wert ist in Form eines Balkendiagramms in Abbildung 3.54 gezeigt. Die reversible Verschiebung der Lage des Absorptionsmaximums zwischen 537 nm (bei pH 9) und 523 nm (bei pH 12) zeigt, dass sich die Peptid-NP-Aggregate durch Variation des pH-Wertes mehrfach hintereinander bilden und auflösen lassen. Der Aggregationsprozess lässt sich somit pH-induziert schalten.

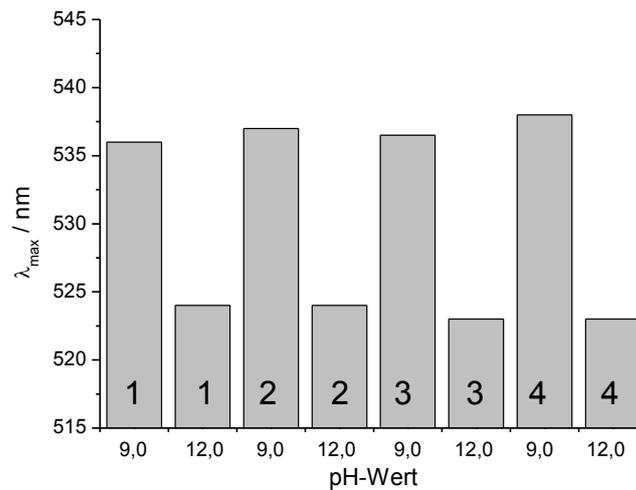


Abbildung 3.54: Lage des Absorptionsmaximums bei vier Zyklen einer reversiblen Schaltung der NP-Aggregate aus 0.05 μM MUDS-koordinierten Au-NP und 30 μM VW05 zwischen pH 9 und pH 12.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das *coiled-coil*-Peptid VW05 geeignet ist, um eine Aggregation negativ geladener NP zu induzieren. Versuche bei zwei verschiedenen pH-Werten haben gezeigt, dass die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Peptid und NP die entscheidende Kraft für diese Aggregation darstellt. Durch Vergleich mit einem unstrukturierten Peptid gleicher Nettoladung wurde nachgewiesen, dass die Präsentation der positiven Ladung in einer für die Wechselwirkung mit dem NP günstigen Position Voraussetzung ist für eine Anordnung der NP in mehrdimensionale Netzwerke. Die pH-Abhängigkeit der Peptidstruktur ermöglicht außerdem das reversible Schalten der Aggregation.

3.2.6 Nanopartikel-induzierte Fibrillenbildung

Neben dem in Lösung als Trimer vorliegenden Peptid VW05 wurden auch die auf dem *coiled-coil*-Motiv basierenden, zur Fibrillenbildung neigenden Peptide VW19 und RR01 auf ihre Wechselwirkungen mit NP untersucht. Die fibrillären Strukturen bilden sich nur unter bestimmten Bedingungen und erst nach einer Inkubationszeit, welche vom jeweiligen Peptid abhängt. Es gibt daher zwei mögliche Präparationswege. Zum einen kann das Peptid nach der Inkubationszeit in α -fibrillärer Form zu den NP gemischt werden. In diesem Fall sollten sich die NP an den bei Zugabe bereits vorhandenen α -Fibrillen anlagern. Zum anderen kann das

Peptid vor der Bildung der α -fibrillären Struktur zugegeben werden. Im ungefalteten Zustand ist zwar aufgrund der fehlenden räumlichen Anordnung der auf dem Peptid lokalisierten elektrostatischen Ladungen, welche für eine effiziente Wechselwirkung mit geladenen NP notwendig ist, zunächst keine aggregationsinduzierende Wirkung der Peptide zu erwarten. Kürzlich erschienene Publikationen [192 - 194] zeigen aber, dass NP in der Lage sind, den Nukleationsprozess der Fibrillenbildung deutlich zu beschleunigen. In Anwesenheit von NP kann bei Konzentrationen eine Fibrillenbildung eingeleitet werden, bei denen in Abwesenheit von NP noch keine stattfindet. Die Anwesenheit der NP kann somit in diesem Fall die Bildung der Struktur beeinflussen und dieser Einfluss der NP auf die sich bildende Peptidstruktur untersucht werden.

Im Rahmen dieses Projekts wurde der zweite Fall näher untersucht. Um bei physiologischem pH-Wert und mit stark geladenen NP arbeiten zu können, wurden die negativ geladenen MUDSulfat-koord. Au-NP mit einem mittleren Durchmesser von 6 nm für diese Mischversuche ausgewählt. Gearbeitet wurde bei pH 7.4 in 10 mM Tris/HCl-Puffer, welcher sich in Untersuchungen zur Stabilität der Partikel (siehe Abschnitt 3.2.3.2) als geeignet erwiesen hatte. Unter diesen Bedingungen ist VW19 positiv (Nettoladung: 2.0) und RR01 negativ (Nettoladung: -2.0) geladen.

Analog der Versuche mit VW05 wurden die Mischungen von MUDSulfat-koordinierten Au-NP ($d = 6$ nm) mit VW19 oder RR01 zunächst mittels Absorptionsspektroskopie untersucht. Das Peptid wurde hierzu in Form einer 100 μ molaren Lösung zu der verdünnten Kolloidlösung pipettiert und kurz kräftig geschüttelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden dann Absorptionsspektren der Mischungen aufgenommen. Die NP-Konzentration wurde in allen Proben konstant bei 0.05 μ M gehalten und die Peptidkonzentration von 0 bis 50 μ M variiert.

Die Ergebnisse dieser Messungen für VW19 sind in Abbildung 3.55 gezeigt. Unabhängig von der Peptidkonzentration blieben die Spektren nach Zugabe von VW19 zunächst unverändert (siehe Abbildung 3.55 a). Es wurde weder eine Verschiebung des Absorptionsmaximums noch eine Zunahme der Absorption beobachtet. Auch 24 h nach Mischung beider Komponenten konnte in keiner der Proben eine Verschiebung des Maximums zu höheren Wellenlängen beobachtet werden. Die Proben mit niedrigen Peptidkonzentrationen zeigten auch weiterhin keine Veränderung in der Stärke der Absorption, während bei den Proben mit viel Peptid eine leichte Zunahme der Absorption über den gesamten untersuchten Wellenlängenbereich zu beobachten war.

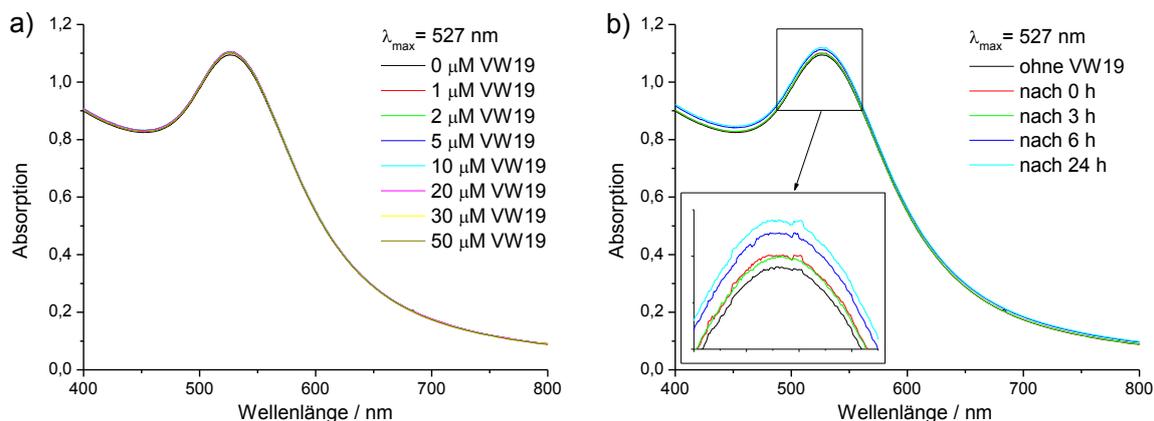


Abbildung 3.55: Absorptionsspektren einer Mischung von 0.05 μM Au/MUDSulfat und VW19 in 10 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 7.4 a) mit unterschiedlichen VW19-Konzentrationen direkt nach Mischung beider Komponenten und b) mit 50 μM VW19 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Exemplarisch sind in Abbildung 3.55 b die Spektren der Mischungen mit 50 μM VW19, der höchsten in dieser Versuchsreihe angesetzten Peptidkonzentration, zu unterschiedlichen Zeitpunkten gezeigt. Nach Zugabe des Peptids nimmt die Intensität des Maximums leicht (um 1 %) zu, über einen Zeitraum von 24 h steigt sie bei dieser Peptidkonzentration um weitere 1.7 %. Dieses Phänomen wurde auch in den Absorptionsspektren von MUDS-koord. Au-NP mit SR05 gefunden und deutet auf eine Wechselwirkung zwischen Peptid und NP hin, welche allerdings nicht zu einer Aggregation der Partikel führt. Dieses Ergebnis entspricht dem, was aufgrund der bei Zugabe nicht vorhandenen Faltung des Peptids VW19 zu erwarten war. Die Situation ist mit der von SR05 und MUDS-koord. Au-NP zu vergleichen. Die entgegengesetzten Ladungen ermöglichen eine attraktive elektrostatische Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten, welche aber aufgrund der fehlenden Faltung des Peptids in fibrilläre Strukturen und der somit fehlenden Ausrichtung der positiven Ladungen nicht zu einer Aggregation führen können.

In Abbildung 3.56 sind die Ergebnisse der Absorptionsspektroskopie an Mischungen von RR01 und MUDSulfat-koord. Au-NP gezeigt. Sie sind denen der Versuche mit VW19 sehr ähnlich.

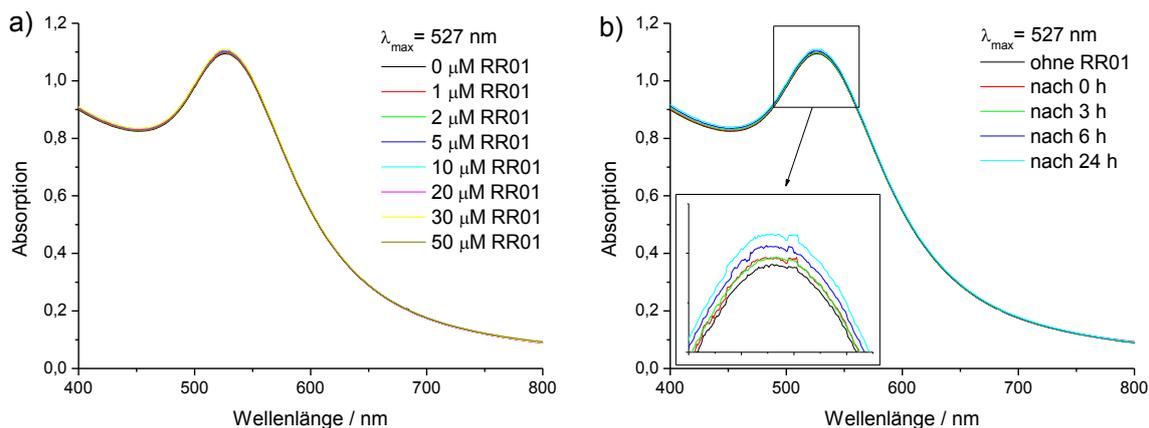


Abbildung 3.56: Absorptionsspektren einer Mischung von 0.05 µM MUDSulfat-koord. Au-NP (d = 6 nm) in 10 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 7.4 a) mit unterschiedlichen RR01-Konzentrationen direkt nach Mischung beider Komponenten und b) mit 50 µM RR01 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Auch mit RR01 trat bei keiner Peptidkonzentration und zu keinem Zeitpunkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen auf. Eine starke Annäherung der NP kann somit auch in diesem Fall ausgeschlossen werden. Die Proben mit niedrigen Peptidkonzentrationen zeigten erneut keine Veränderung in der Stärke der Absorption, während bei den Proben mit viel Peptid eine leichte Zunahme der Absorption über den gesamten untersuchten Wellenlängenbereich zu beobachten war. Dieser Trend ist exemplarisch an den Spektren der Mischungen mit 50 µM RR01 in Abbildung 3.56 b gezeigt. Nach Zugabe des Peptids nimmt die Intensität am Absorptionsmaximum leicht (um 1 %) zu, über einen Zeitraum von 24 h steigt sie bei einer Peptidkonzentration von 50 µM RR01 um weitere 0.2 %. Im Vergleich zu den Proben mit VW19 ist diese Zunahme allerdings deutlich geringer.

Obwohl Peptid und NP im Fall von RR01 unter den gegebenen Bedingungen gleichgeladen sind, scheinen den Ergebnissen der Absorptionsspektroskopie zufolge Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten aufzutreten. Dies verwundert zunächst, vor allem in Anbetracht der Ergebnisse bei Mischung von VW05 und MUDS-koord. Au-NP bei pH 12. Hierbei waren ebenfalls beide Komponenten negativ geladen und es wurden keine Wechselwirkungen festgestellt. Im Unterschied zu VW05 weist RR01 allerdings trotz negativer Nettoladung bei Faltung in das *coiled-coil*-Motiv eine positiv geladene Domäne auf. Auf diese Weise kann RR01 trotz negativer Nettoladung attraktive elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen NP eingehen, während dies für VW05 bei pH 12 nicht möglich ist. Aufgrund der fehlenden Faltung des Peptids in eine fibrilläre

Struktur führen diese Wechselwirkungen aber, genau wie bei VW19, zunächst nicht zu einer Aggregation der NP.

Von der Mischung MUDSulfat-koord. Au-NP mit VW19 wurden Proben mit im Vergleich zu den Proben für die Absorptionsspektroskopie deutlich höheren Peptidkonzentrationen (200 und 300 μM VW19) angesetzt. 9 Tage nach der Mischung von NP und Peptid bildete sich bei diesen Proben ein sichtbarer Niederschlag, die überstehende Lösung war farblos. Im Gegensatz zu dem Niederschlag, der bei Mischung von MUDS-koordinierten Au-NP und VW05 entstand, war dieser Niederschlag aus MUDSulfat-koordinierten Au-NP und VW19 allerdings rosa und nicht violett. Dies ist ein Zeichen dafür, dass der Abstand zwischen den Partikeln in den VW19-haltigen NP-Peptid-Aggregaten deutlich größer ist als in den VW05-haltigen. Alle Lösungen mit geringerer Peptidkonzentration blieben weiterhin klar und wiesen keine mit dem Auge sichtbaren Unterschiede in der Farbe auf.

Um nachzuweisen, dass auch bei den kleineren Peptidkonzentrationen attraktive elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Peptid und NP auftreten, wurden die für die Absorptionsspektroskopie angesetzten Proben nach 9 Tagen Inkubationszeit auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch untersucht. Das Ergebnis für die VW19-haltigen Proben ist in Abbildung 3.57 zu sehen.

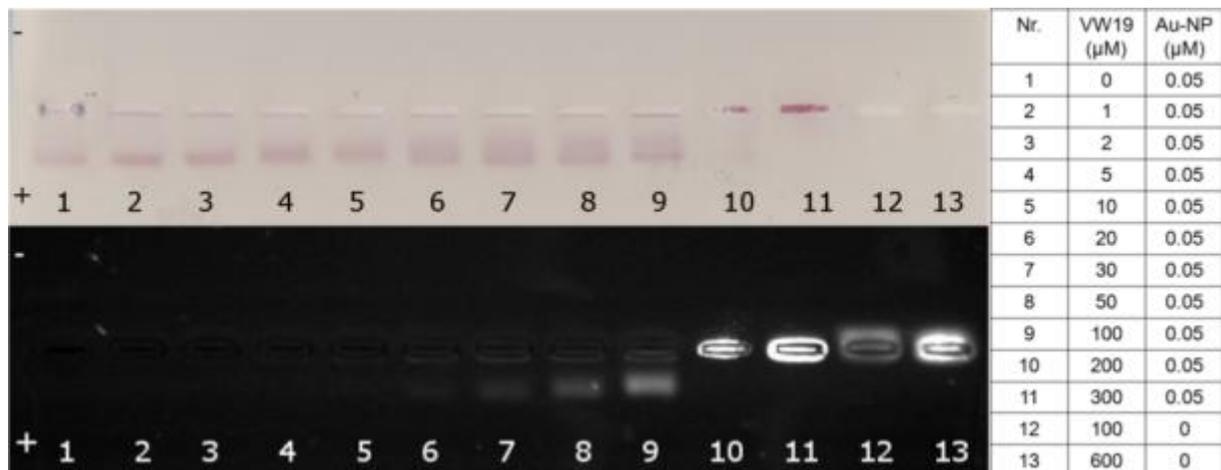


Abbildung 3.57: Gelelektrophorese an Mischungen von MUDSulfat-koord. Au-NP und variierenden Konzentrationen von VW19 bei pH 7.4 in 100 mM Tris/HCl-Puffer (9 Tage nach Mischung), links oben: Agarosegel belichtet mit Weißlicht, links unten: Agarosegel belichtet mit 254 nm UV-Licht, rechts: Tabelle mit den Mischungsverhältnissen der aufgetragenen Proben.

Die Einzelkomponenten bewegen sich erwartungsgemäß in entgegengesetzte Richtungen, die MUDSulfat-koordinierten Au-NP (Bahn 1) zur Anode und VW19 (Bahn 12 und 13) zur

Kathode, wobei die Laufstrecke der NP ca. viermal so lang ist wie die des Peptids. Desweiteren ist bei VW19 eine leichte Abhängigkeit der Laufstrecke von der Peptidkonzentration festzustellen, welche auf einen höheren Oligomerisierungsgrad mit steigender Peptidkonzentration schließen lässt. Aufgrund der kurzen Laufstrecke ist die Differenz zwischen 100 μM und 600 μM Peptid aber nur sehr klein. Eine genauere Untersuchung hierzu wurde mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der im Gel zu sehenden Tendenz.

Mit zunehmender Peptidkonzentration beginnen die NP-Banden deutlich breiter zu werden. Bei einer 100 $\mu\text{molaren}$ Peptidkonzentration (Bahn 9) ist die NP-Bande ca. 3.5 mal breiter als die NP-Bande in Abwesenheit des Peptids. Die Laufstrecke der NP verkürzt sich allerdings bis zu dieser VW19-Konzentration nicht signifikant, sie beträgt noch 85 % der ursprünglichen Länge. Ab einer Peptidkonzentration von 200 μM bleiben die NP-Peptid-Aggregate vollständig in der Tasche liegen. Auch der Vergleich der Bandenlagen von Peptid und Nanopartikel zeigt deutlich, dass sich das Peptid an den Nanopartikeln befindet. In Anwesenheit der NP bewegt sich die Peptidbande in Richtung Anode und befindet sich exakt auf Höhe der Nanopartikelbande. Interessanterweise wird die Fluoreszenz des Peptids in diesen Aggregaten nicht ausgelöscht, während bei den Aggregaten aus VW05 und MUDS-koord. Au-NP bei identischen Peptidkonzentrationen keine Peptidbande auf Höhe der NP visualisiert werden konnte. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sich Peptid in den Aggregaten befindet, welches einen für den Auslöschungseffekt zu großen Abstand von den NP besitzt und dessen Fluoreszenz aus diesem Grund detektiert werden kann. Der daraus folgende Schluss, dass der Peptidgehalt in den VW19-NP-Aggregaten im Vergleich zu den VW05-NP-Aggregaten deutlich größer sein muss, steht wiederum im Einklang mit der Farbe der Aggregate und der zur Bildung eines Niederschlags notwendigen Peptidkonzentration.

Nach einer Inkubationszeit von 9 Tagen weisen die Mischproben mit RR01 keinen mit dem Auge erkennbaren Unterschied von der NP-Probe ohne Peptid auf. Dies war allerdings bei den Proben mit VW19 bei den hier untersuchten Peptidkonzentrationen auch nicht der Fall. Die Proben wurden ebenfalls elektrophoretisch untersucht (Abbildung 3.58). Es wird deutlich, dass trotz fehlender optischer Veränderungen Wechselwirkungen zwischen den NP und dem Peptid stattgefunden haben.

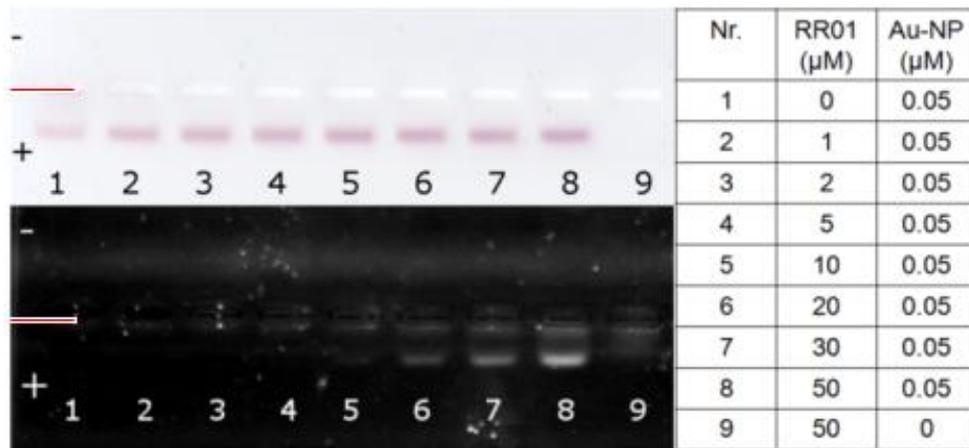


Abbildung 3.58: Gelelektrophorese an Mischungen von MUDSulfat-koordinierten Au-NP und RR01 bei pH 7.4 in 100 mM Tris/HCl-Puffer (9 Tage nach Mischung), links oben: Agarosegel belichtet mit Weißlicht, links unten: Agarosegel belichtet mit 254 nm UV-Licht, rechts: Tabelle mit den Mischungsverhältnissen der aufgetragenen Proben. Die Lage der Taschen ist mit einem roten Strich markiert.

Erwartungsgemäß bewegen sich beide Einzelkomponenten (NP (Bahn 1) und Peptid (Bahn 9)) zur Anode, wobei das Peptid nur 70 % der Laufstrecke der NP zurücklegt. Die Laufstrecke der Nanopartikelbande verkürzt sich mit steigender Peptidkonzentration nur sehr geringfügig, sie beträgt bei 50 μmolarer Peptidkonzentration (Bahn 8) noch 92 % der ursprünglichen Länge. Die Anregung mit UV-Licht zeigt allerdings deutlich, dass sich das Peptid an den NP befindet. Die Peptidbande liegt exakt über der Nanopartikelbande (Bahn 5 – 8), obwohl sich das Peptid in Abwesenheit der NP deutlich weniger weit Richtung Anode bewegt. Auch in diesem Fall lässt sich das Peptid neben den NP detektieren. Trotz gleichsinniger Ladung bei pH 7.4 sind somit Wechselwirkungen zwischen MUDSulfat-koordinierten Au-NP und RR01 nachzuweisen.

Die größten Eigenschaftsunterschiede der in diesem Abschnitt betrachteten NP-Peptid-Mischungen treten bei einem hohen Verhältnis von Peptid zu NP auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich bei diesen Bedingungen eine dichte Schicht des Peptids um den NP ausbilden kann. Die Peptidkonzentration übersteigt hier lokal die für die Fibrillenbildung notwendige Konzentration und es können sich Nukleationskeime bilden [192]. Auf diese Weise wird, trotz einer in Bezug auf die gesamte Lösung betrachtet unter der Grenzkonzentration liegenden Peptidkonzentration, die Faltung der Peptide in fibrilläre Strukturen und somit die Aggregation der NP induziert oder beschleunigt. Mit steigendem Verhältnis von NP zu Peptid wird die Anzahl der pro NP gebundenen Peptide immer geringer, so dass auch immer weniger Nukleationskeime entstehen können. Ab einem bestimmten

Verhältnis von NP zu Peptid wird die Peptidschicht um den NP so dünn und löchrig, dass keine Bildung von Nukleationskeimen mehr stattfinden kann und somit auch keine Fibrillenbildung mehr induziert wird.

Neben dem Verhältnis von NP zu Peptid hängt die Faltung des Peptids und somit der Aggregationsgrad der NP stark von der Zeit ab. Um zu untersuchen, was direkt nach Mischung beider Komponenten passiert, wurden Proben mit einem im Vergleich zu den vorangegangenen Proben deutlich höheren Verhältnis von Peptid zu NP einer Gelelektrophorese unterzogen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen elektrophoretischen Untersuchungen fanden diese direkt nach Mischung der Komponenten statt. Die Konzentration der Peptide wurde konstant bei 50 μM gehalten und die NP-Konzentration zwischen 0 und 40 nM variiert.

Das Ergebnis dieser Untersuchung für VW19 ist in Abbildung 3.59 gezeigt. Das Peptid ohne NP (Bahn 1) bewegt sich Richtung Kathode, während die NP ohne Peptid Richtung Anode wandern (so wie bereits in dem in Abbildung 3.57 gezeigten Gel). Erst ab einer Konzentration von 10 nM (Bahn 4) konnten die NP mit dem Scanner detektiert werden. Die Anwesenheit sehr kleiner Konzentrationen von NP (Bahn 2 und 3) führte zu einer Aufspaltung der Peptidbande in die reine Peptidbande und eine Bande auf Taschenhöhe, welche auf die Bildung von NP-Peptid-Konjugaten zurückzuführen ist. Diese starke Reduktion der Laufstrecke resultiert aus der neutralisierenden Wirkung der stark negativ geladenen NP und der größeren Ausmaße der sich bildenden Aggregate im Vergleich zum Peptid. Mit zunehmender NP-Konzentration verschwindet die reine Peptidbande und die Bande der NP-Peptid-Aggregate bewegt sich Richtung Anode (Bahn 5 bis 7). Ab diesem Verhältnis von NP zu Peptid (zwischen 5000 und 2500 mal mehr Peptid als NP) wird das Peptid vollständig an den NP gebunden. Bei weiter steigendem Verhältnis von NP zu Peptid wird immer weniger Peptid pro NP gebunden, die Nettoladung der NP-Peptid-Konjugate sinkt immer weiter und die zur Anode zurückgelegte Laufstrecke wird immer größer. Der NP-Bande kann entnommen werden, dass sich das Peptid zu allen Zeitpunkten auf Höhe der NP befindet. Bei einer NP-Konzentration von 40 nM nähert sich die Laufstrecke der NP-Peptid-Konjugate der Laufstrecke der NP in Abwesenheit von Peptid.

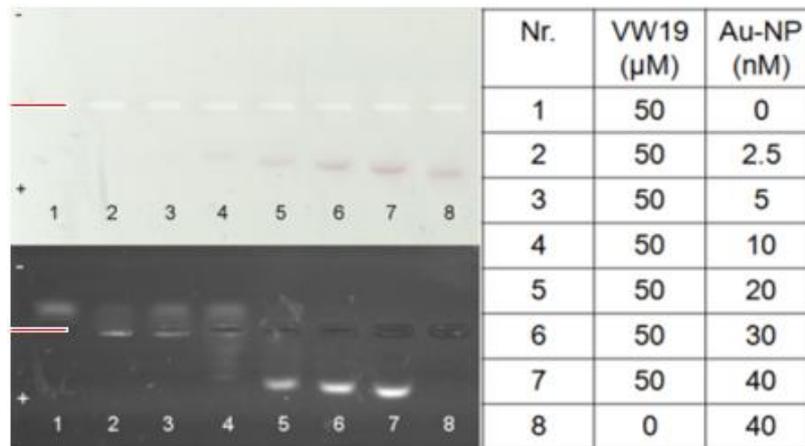


Abbildung 3.59: Gelelektrophorese an Mischungen von VW19 und variierenden Konzentrationen MUDSulfat-koord. Au-NP bei pH 7.4, links oben: Agarosegel belichtet mit Weißlicht, links unten: Agarosegel belichtet mit 254 nm UV-Licht, rechts: Tabelle mit den Mischungsverhältnissen der aufgetragenen Proben. Die Lage der Taschen ist mit einem roten Strich markiert.

Das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchung für RR01 ist in Abbildung 3.60 gezeigt. Beide Einzelkomponenten bewegen sich Richtung Anode, wobei die Laufstrecke des Peptids aufgrund des geringeren Betrags der Nettoladung deutlich kürzer ist als die der NP (Bahnen 1 und 12). Nach Zugabe kleinerer Mengen NP verändert sich die Lage der Peptidbande zunächst nicht (Bahnen 2 bis 4). Die NP-Konzentration ist in diesen Fällen noch zu gering, um vom Scanner detektiert werden zu können. Bei einem 2500 fachen Überschuss von NP zu Peptid beginnt sich eine zweite, zunächst sehr verschmierte Peptidbande zu bilden (Bahn 5), welche mit zunehmender NP-Konzentration immer schärfer und intensiver wird. Parallel dazu wird die Bande des reinen Peptids immer schwächer, bis sie bei einer NP-Konzentration von 0.1 µM nahezu verschwindet. Die zweite Peptidbande ist, wie auch bei VW19, auf die Bildung von NP-Peptid-Konjugaten zurückzuführen, welche eine deutlich negativere Nettoladung aufweisen als das reine Peptid. Dieser Zusammenhang wird auch von der Tatsache bestätigt, dass sich die NP-Banden auf derselben Höhe befinden wie die sich bildende zweite Peptidbande.

Die Proben mit VW19 und RR01 verhalten sich in den elektrophoretischen Untersuchungen sehr ähnlich. Im Vergleich zu VW19 wird allerdings bei RR01 eine größere Menge NP benötigt, um das in der Probe vorhandene Peptid vollständig zu binden. Während ca. 2500 VW19-Moleküle pro NP gebunden werden können, werden bei RR01 maximal ca. 500 Peptidmoleküle pro NP gebunden.

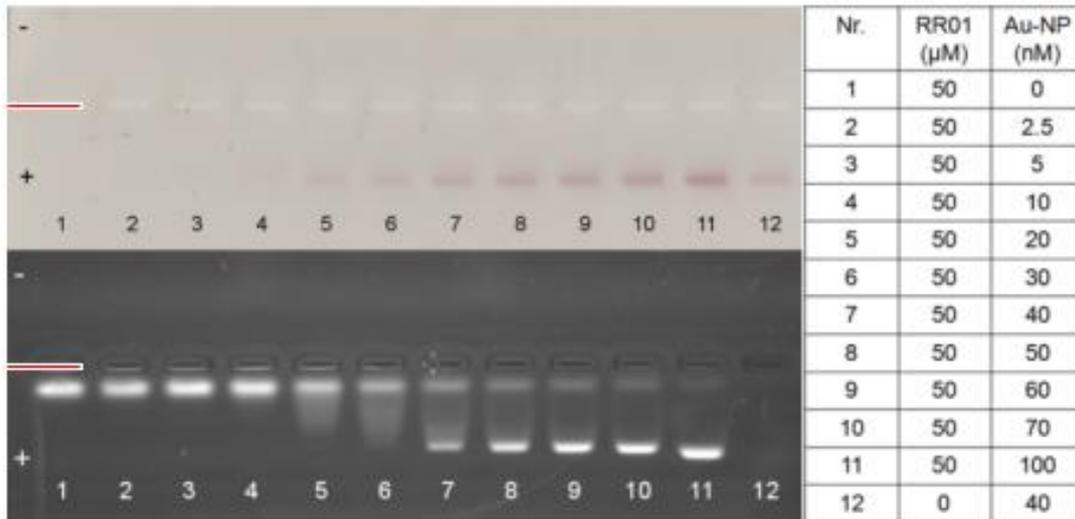


Abbildung 3.60: Gelelektrophorese an Mischungen von RR01 und variierenden Konzentrationen MUDSulfat-koord. Au-NP bei pH 7.4 (9 Tage nach Mischung), links oben: Agarosegel belichtet mit Weißlicht, links unten: Agarosegel belichtet mit 254 nm UV-Licht, rechts: Tabelle mit den Mischungsverhältnissen der aufgetragenen Proben. Die Lage der Taschen ist mit einem roten Strich markiert.

Nach drei Wochen Inkubationszeit wurden TEM-Aufnahmen von $0.04 \mu\text{M}$ MUDSulfat-koord. Au-NP in Gegenwart von $50 \mu\text{M}$ VW19 aufgenommen (Abbildung 3.61 b und c). Deutlich sind Fibrillen zu erkennen, welche sich aus dem zum Zeitpunkt der Mischung ungefalteten VW19 gebildet haben. Es ist auffällig, dass die NP sich räumlich immer an einer Fibrille befinden. Das vollständige Fehlen vereinzelt liegender NP ist allerdings vermutlich auf die Gridpräparation zurückzuführen.

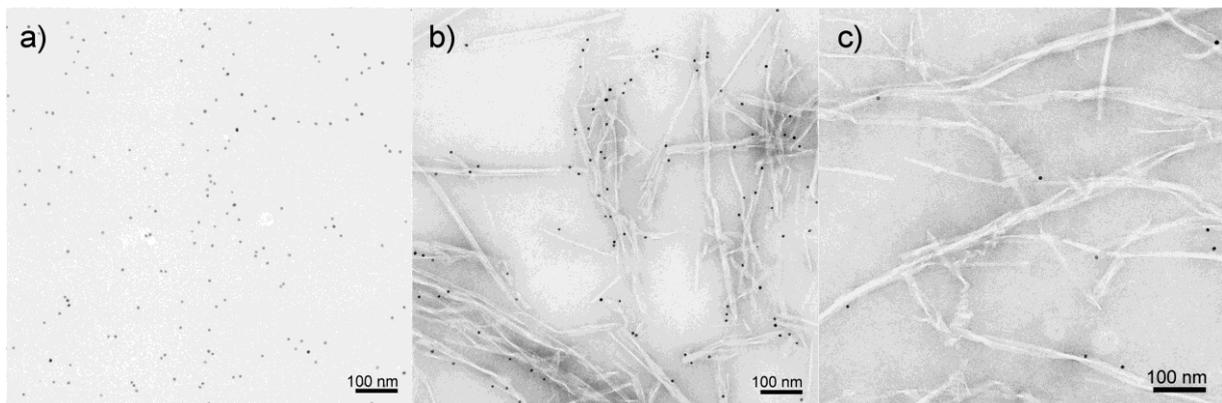


Abbildung 3.61: TEM-Aufnahmen bei pH 7.4 in 10 mM Tris/HCl-Puffer von $0.04 \mu\text{M}$ MUDSulfat-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) a) in Abwesenheit von VW19 und b und c) in Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ VW19. Die Proben wurden vor der Grid-Präparation drei Wochen inkubiert.

Eine Mischung von $0.04 \mu\text{M}$ MUDSulfat-koord. Au-NP in Gegenwart von $50 \mu\text{M}$ RR01 wurde ebenfalls nach drei Wochen Inkubationszeit mittels TEM untersucht. Eine Zusammenstellung der Aufnahmen ist im Anhang zu finden (Abschnitt 7.2). Auch hier sind

Fibrillen zu finden, allerdings trotz identischer Peptid- und NP-Konzentration deutlich weniger als bei VW19. Die NP liegen außerdem zu großen Teilen vereinzelt, nur einige wenige befinden sich räumlich direkt an einer Fibrille. Die TEM-Aufnahmen bestätigen somit, dass auch bei RR01 und MUDSulfat-koord. Au-NP trotz negativer Nettoladung beider Komponenten attraktive Wechselwirkungen, vermutlich über die positiv geladene Domäne des RR01, welche sich bei Faltung in das *coiled-coil*-Motiv ausbildet, stattfinden.

In Gegenwart von Peptiden mit einer entsprechenden Tendenz induzieren die in diesem Projekt untersuchten NP folglich die Fibrillenbildung bei Konzentrationen, welche ohne die NP hierzu noch nicht ausreichen würden. Mittels CD-Spektroskopie wurde außerdem der Einfluss von Faktoren wie pH-Wert, Stöchiometrie von NP zu Peptid und Ionenstärke der Lösung auf die Faltung und Fibrillenbildung untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in der Doktorarbeit von *Sara Wagner* näher vorgestellt und decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Mit steigender Ionenstärke der Lösung und mit steigendem Verhältnis von NP zu Peptid nimmt die Tendenz zur Fibrillenbildung stark ab. Bei ausreichend hoher Ionenstärke oder Verhältnis von NP zu Peptid tritt dieser Effekt sogar gar nicht mehr auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zur Fibrillenbildung neigende Peptide nicht zur räumlich dichten Anordnung von NP geeignet sind. Das für die Bildung von Fibrillen maximal mögliche Verhältnis von NP zu Peptid war zu gering für eine effiziente Belegung der Fasern. Aber auch bei vorheriger Bildung der Fasern in Abwesenheit von NP wären Größe und Form der Fasern nicht einheitlich genug, um geordnete Strukturen erzeugen zu können. Die Anordnung der NP entlang von Peptidfibrillen ist allerdings gelungen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass geladene NP eine beschleunigende Wirkung auf die Fibrillenbildung ausüben können, vermutlich durch Erzeugung von Nukleationskeimen an der Oberfläche der NP aufgrund der lokal hohen Konzentration von Peptid. Durch Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke und Verhältnis von NP zu Peptid kann dieser Effekt reguliert werden und so Einfluss auf die Struktur der sich bildenden Fibrillen genommen werden. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist die Tatsache, dass nicht nur die Nettoladung, sondern, wie auch bereits bei den Versuchen mit VW05 gesehen, die Ausbildung geladener Domänen auf dem Peptid entscheidend ist für die elektrostatische Wechselwirkung mit anderen Komponenten.

3.3 Selektin-bindende Nanopartikel

Untersuchungen zum Entzündungsprozess haben in letzter Zeit aufgrund neuer Erkenntnisse zu den schädlichen Konsequenzen chronischer Entzündungen an Bedeutung gewonnen. Die Selektin-vermittelte Bindung der Leukozyten an das Endothel stellt den ersten ausschlaggebenden Schritt der Inflammationskaskade [148] und somit einen Schlüsselschritt in der Bekämpfung von Entzündungen dar [195]. Für die antiinflammatorische Therapie werden daher künstliche Selektin-bindende Stoffe gesucht, welche eine Wechselwirkung zwischen Selektin und seinen natürlichen Liganden und somit den Entzündungsprozess verhindern.

Multivalente Interaktionen haben sich hierbei als besonders effizient erwiesen. Unter Multivalenz wird in diesem Zusammenhang die chemische Wechselwirkung von Liganden mit mehreren identischen Bindungsstellen an eine mehrfach präsentierte Akzeptoreinheit verstanden. Die hierbei entstehende Bindung zwischen Ligand und Bindungsstelle ist in vielen Fällen deutlich stärker als die reine Addition der Einzelbeiträge vermuten lässt. Diese überproportionale Verstärkung der Bindungskonstanten wird in vielen biologischen Systemen zum Aufbau sehr stabiler Strukturen verwendet und soll im Folgenden für die Erzeugung von Selektininhibitoren mit besonders hohen Bindungskonstanten ausgenutzt werden.

Ein Beispiel für die Effizienz dieses Prinzips bei der Inhibierung von Selektinen stellt Heparin, ein polysulfatiertes Glykan, dar, welches Sulfate multivalent präsentiert und auf diese Weise sowohl P- als auch L-Selektin effektiv inhibiert. Das Glykangerüst dient hierbei als Templat für die räumliche Ausrichtung der funktionellen Gruppen. Wünschenswerte Eigenschaften solcher Template sind ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, damit möglichst viele funktionelle Gruppen pro Templatmaterial für Wechselwirkungen zur Verfügung stehen, sowie eine einfache Synthese und eine hohe Stabilität des Materials. Kohlenhydrate stellen daher keine idealen Template zur multivalenten Präsentation dar. Sie sind in den meisten Fällen aufwendig zu synthetisieren und werden aufgrund der labilen glykosidischen Bindung schnell abgebaut. Das große Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis von NP im Vergleich zu bulk-Materialien, in Kombination mit einer verhältnismäßig einfachen Synthese und einer hohen chemischen Beständigkeit bei geeigneter Materialwahl, macht anorganische NP zu einem idealen Templat für die multivalente Präsentation funktioneller Gruppen. Im Idealfall lassen sich durch das Kernmaterial vermittelte optische oder magnetische Eigenschaften mit den Selektin-bindenden Eigenschaften der Ligandenhülle

kombinieren. In dieser Arbeit wurden Au-NP verschiedener Größen, welche sich durch eine hohe Biokompatibilität und chemische Beständigkeit in biologischen Systemen auszeichnen, als Templat gewählt.

Das Bindungsverhalten der unterschiedlich funktionalisierten Au-NP an L-, P- und E-Selektin wurde von Dr. Sven Enders aus der Arbeitsgruppe *Dernedde* anhand eines kompetitiven SPR-basierenden Bindungsassays untersucht. Hierzu wurde Selektin-IgG auf Au-NP mit einem mittleren Durchmesser von ca. 13 nm immobilisiert. Nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Inhibitors wurden diese dann über einen Selektin-bindenden Chip geleitet. Dies führte zu einem Signal, welches in Abwesenheit eines Inhibitors 100 % Bindung der Selektin-funkt. Au-NP an der Chipoberfläche entspricht. Die Bindung eines Inhibitors an die Selektin-funkt. Au-NP verhindert die Bindung dieser Partikel an der Chipoberfläche und führte somit zu einem reduzierten Bindungssignal. Bei dem in dieser Arbeit zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens verglichenen IC_{50} -Wert handelt es sich um die Inhibitorkonzentration, bei der das Bindungssignal noch 50 % der Ausgangsstärke beträgt [151]. Eine detailliertere Beschreibung des Assays ist im Anhang (Abschnitt 5.4.8) zu finden.

Um eine Vorstellung von der zur Bindung an Selektine geeigneten Struktur einer Ligandenhülle zu bekommen, wurden zunächst die aus der Literatur bekannten Informationen zu den Eigenschaften der Bindungstaschen näher betrachtet. Im Fall von E- und P-Selektin wurden Kristallstrukturen von Konstrukten aus EGF und Lektin-Domäne publiziert [196, 197], welche Informationen über die räumliche Struktur der Bindungsstellen dieser Selektine liefern. Wie die ca. 60 %-ige Sequenzidentität bereits vermuten lässt, nehmen beide Konstrukte eine ähnliche Gesamtkonformation ein. Die Kohlenhydrat-Bindungsstelle ist in beiden Strukturen hoch konserviert. Die Lektindomäne besitzt eine globuläre Struktur mit einer flachen, oberflächlichen Bindungstasche für den Zuckerliganden [198]. Kleine Unterschiede in der Struktur werden durch veränderte Positionen einiger Schleifen der EGF-Domäne und einem veränderten Winkel zwischen den beiden Domänen verursacht. Auch in den Bindungstaschen sind Positionen mit unterschiedlichen Oberflächenladungen aufgrund unterschiedlicher Aminosäuren zu finden, welche die Unterschiede im Bindungsverhalten von P- und E-Selektin erklären. Kristallstrukturen der Lektindomänen von P- und E-Selektin im Komplex mit SiaLe^x zeigen, dass SiaLe^x von beiden Selektinen an der gleichen Stelle gebunden wird und dass das Tetrasaccharid dabei eine ähnliche Konformation einnimmt.

Dennoch werden für die Bindung von SiaLe^x an P-Selektin andere Positionen verwendet als für die Bindung an E-Selektin. Für L-Selektin wurde bisher keine Kristallstruktur publiziert. Die Konservierung der Aminosäurereste in der Kohlenhydrat-Bindungstasche sowie die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen L- und P-Selektin lassen allerdings auf eine vergleichbare und somit flache und oberflächliche Form der Bindungstasche schließen. Die Zuckerspezifitäten von L- und P-Selektin scheinen zudem sehr ähnlich zu sein [150].

Ein weiterer für die Bindungseigenschaften entscheidender struktureller Unterschied zwischen L-, P- und E-Selektin ist die Verbindung zwischen EGF- und Lektindomäne. Im Vergleich zur EGF-Domäne von E- und L-Selektin schränkt die EGF-Domäne von P-Selektin die Bewegungsfreiheit ihrer Lektindomäne deutlich weniger ein, denn es werden im Vergleich zu E- und L-Selektin weniger intermolekulare Kontakte in Form von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Domänen ausgebildet. Von allen drei Selektinen besitzt P-Selektin daher vermutlich die höchste Flexibilität in dieser Region. Aufgrund dieser hohen Bewegungsfreiheit der Lektindomäne können bei P-Selektin durch die Bindung eines Liganden Konformationsänderungen in der P-Selektinstruktur induziert werden und somit eine Anpassung der Bindungstasche an verschiedene Substrate erfolgen [197].

Neben der Struktur der Bindungstaschen wurden für die Wahl zur Selektin-Bindung geeigneter Ligandenhüllen auch die bekannten bindungsrelevanten Epitope der verschiedenen Selektine in Kombination mit deren natürlichen Liganden näher betrachtet, beispielsweise P-Selektin und dessen natürlicher Ligand P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1)⁸, welche in Abbildung 3.62 gezeigt sind.

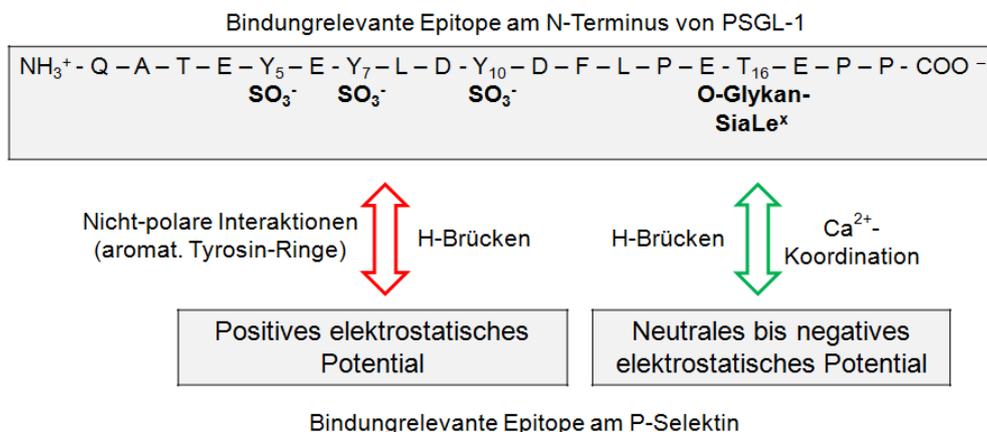


Abbildung 3.62: Bindungsrelevante Epitope von PSGL-1 und P-Selektin [198].

⁸ PSGL-1: Ein Mucin-ähnliches homodimeres Glykoprotein, welches von allen drei Selektinen erkannt wird [197].

Ein Vergleich der bekannten Selektin-Liganden zeigt, dass diese kein einheitliches Wirkprinzip für eine hochaffine Bindung besitzen [198]. Es können aber dennoch gewisse Tendenzen festgestellt werden. Für die Bindung an alle drei Selektine spielen beispielsweise elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle [197, 199]. P-Selektin weist zwei unterschiedliche Bindungstaschen auf, eine davon mit positivem elektrostatischem Potential. Die sulfatierten Tyrosinreste von PSGL-1 adressieren dieses Bindungsepitop. Auch L-Selektin benötigt die sulfatierten Tyrosinreste zur effektiven Bindung von PSGL-1. Für E-Selektin wurden keine Wechselwirkungen mit den Sulfatgruppen gefunden [197]. Weitere Beispiele negativ geladener Inhibitoren für P-Selektin sind sulfatierte Polysaccharide wie Fucoidan, Dextransulfat und Heparin [199]. Die räumliche Orientierung der Bindungsepitope, wie beispielsweise im Fall von PSGL-1 auf einem Gerüstprotein, wirkt sich ebenfalls auf die Bindungseigenschaften aus. Weitere bindungsrelevante Strukturen sind Saccharide. Im Fall von PSGL-1 adressiert eine SiaLe^x-haltige Glykanstruktur das Bindungsepitop von P-Selektin mit negativem bis neutralem elektrostatischem Potential. Auffällig ist hierbei die für hochaffine Wechselwirkungen notwendige konzentrierte Präsentation dieser Zuckerstrukturen [198].

Die Bindung zwischen Selektin und seinen natürlichen Liganden kann auch durch einige negativ geladene funktionalisierte Monosaccharide, z. B. Mannose-6-phosphat, blockiert werden [200]. In der Arbeitsgruppe *Reißig* wurde *Syn3*, ein Aminopyran, synthetisiert, welches ein Kohlenhydratmimetikum darstellt [201, 202]. Die Strukturformel von *Syn 3* ist in Abbildung 3.63 gezeigt.

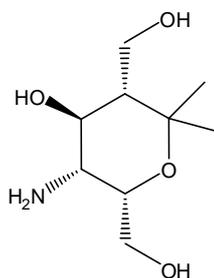


Abbildung 3.63: Strukturformel von *Syn 3*. *Syn3* weist eine D-Idose-Konfiguration auf.

Syn 3 weist keine mit dem kompetitiven Bindungsassay messbare Bindungsaffinität zu den Selektinen auf. In einem ersten Versuch wurde untersucht, ob sich durch multivalente Präsentation von *Syn 3* auf Au-NP die Bindungseigenschaften dieser Verbindung verbessern lassen. Die Immobilisierung erfolgte durch Amidbindungsknüpfung zwischen der

Aminfunktion des Aminopyrans und einer auf der NP-Oberfläche präsentierten Aktivesterfunktion. Der Selektin-erkennende Strukturteil von *Syn 3* bleibt bei dieser chemischen Transformation unverändert und befindet sich nach der Immobilisierung solvensexponiert.

Für die Herstellung entsprechend funktionalisierter Au-NP wurde zunächst ein durch Ligandenaustausch auf der Oberfläche von Au-NP zu immobilisierender Aktivester, ein N-Hydroxysuccinimidester, in einer N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid(DCC)-aktivierten Umsetzung von MUDS mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) synthetisiert. Ein Schema zur Synthese ist in Abbildung 3.64 gezeigt. Die Umsetzung verlief in guten Ausbeuten.

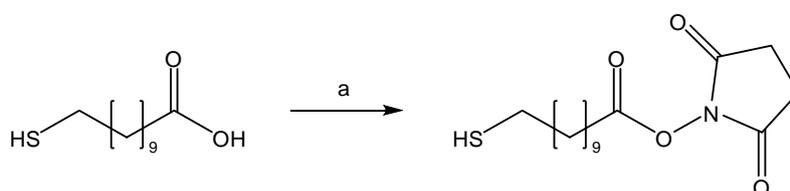


Abbildung 3.64: Synthese von 11-Mercaptoundecansäure-N-hydroxysuccinimidester. Reagenzien und Bedingungen: a) DCC, NHS, CH₂Cl₂, RT, 24 h, 99 %.

Neben der für die Kupplung mit Aminen notwendigen Aktivesterfunktion besitzt 11-Mercaptoundecansäure-N-hydroxysuccinimidester (MUDHSE) eine Thiolfunktion, welche durch Ausbildung der sehr starken Bindung zwischen Au und Schwefel eine verhältnismäßig feste Immobilisierung des Liganden auf Au-NP ermöglicht. Die lange lineare Alkylkette (insgesamt 10 CH₂-Gruppen) sorgt für eine hohe Stabilität der resultierenden NP gegenüber Aggregation und chemischer Zersetzung.

Voraussetzung für die Verwendung der NP als Selektin-Inhibitoren in biologischen Systemen ist die Biokompatibilität der NP. Hierzu müssen diese unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei pH-Werten zwischen 6 und 8 sowie Temperaturen zwischen 20 und 40 °C, und bei starker Verdünnung stabil sein. Körperflüssigkeiten haben außerdem eine hohe Ionenstärke (100-150 mM [203]), welche zu einer Aggregation der NP führen kann. Zu vermeiden sind zudem eine unspezifische Aggregation der NP an Biomolekülen oder Zellwänden. Aus diesem Grund ist die durch das Design des Aktivesters vermittelte Grundstabilität entscheidend für die spätere Anwendbarkeit der NP in biologischen Systemen.

Der Ligandenaustausch erfolgte an DT-kordinierten Au-NP mit einem mittleren Durchmesser von 6 nm (siehe Abbildung 3.65 a). MUDHSE wurde in DMF gelöst und unter rühren mit einer Lösung der DT-kordinierten Au-NP in Chloroform versetzt. Der Großteil

des Chloroforms wurde dann entfernt, um eine bessere Löslichkeit der NP nach erfolgtem Ligandenaustausch zu erzielen, und die rote Lösung 24 h bei RT gerührt. In einem Lösungsmittelgemisch von Chloroform und DMF bildeten die MUDHSE-funktionalisierten Au-NP mit zunehmender Reaktionszeit langsam Aggregate, welches deutlich an der Farbänderung der Lösung von rot nach violett zu erkennen war. Unter diesen Bedingungen konnte kein vollständiger Ligandenaustausch stattfinden. Dieses Lösungsmittelgemisch ist daher für diese Reaktion ungeeignet. Um einen vollständigen Ligandenaustausch zu erreichen wurde der eintretende Ligand MUDHSE in großem (mind. 10^5 eq. pro NP) Überschuss eingesetzt.

DT und im Überschuss eingesetzter Ligand wurden mittels Dialyse gegen DMF entfernt. ^1H -NMR- und IR-Spektren der dialysierten Kolloide weisen ausschließlich die stark verbreiterten Signale von MUDHSE auf. Es ist somit von einem vollständigen Ligandenaustausch auszugehen. TEM-Aufnahmen dieser Kolloide zeigen außerdem eine den Ausgangskolloiden vergleichbare Größendispersität des Partikelkerns.

Die Aktivester-funktionalisierten Au-NP wurden durch nukleophile Substitution mit dem primären Amin *Syn 3* umgesetzt. Das Schema zur Reaktion ist in Abbildung 3.65 b gezeigt. Da eine Abtrennung nicht umgesetzter Liganden auf dem NP unmöglich ist, wurde auch bei dieser Umsetzung ein Überschuss (ebenfalls mind. 10^5 eq. pro NP) an Amin eingesetzt.

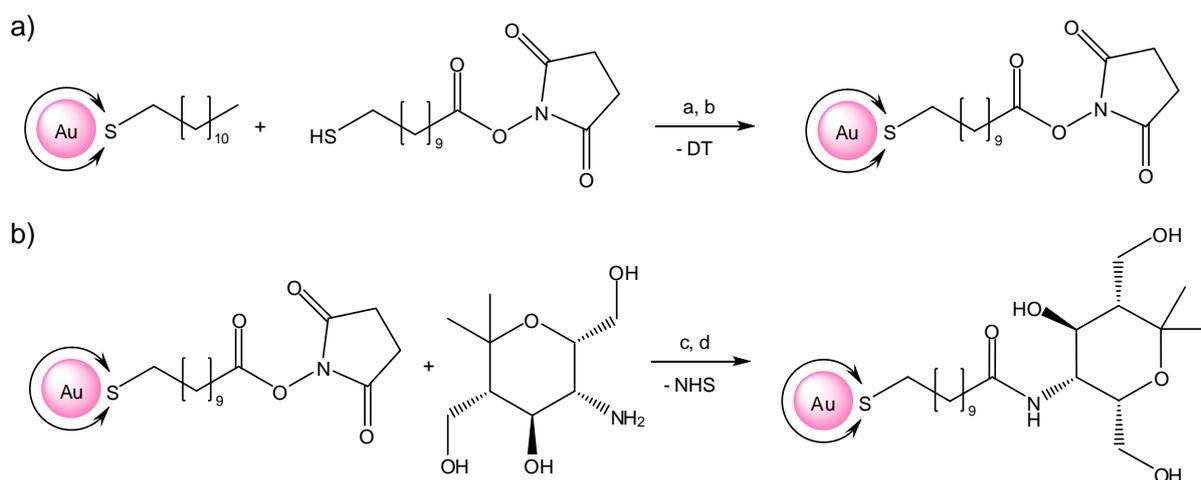


Abbildung 3.65: Herstellung *Syn 3*-funktionalisierter Au-NP ($d = 6$ nm) (NP1). Reagenzien und Bedingungen: a) DMF, RT, 24 h, b) Dialyse gegen DMF, c) NEt_3 , DMF, RT, 24 h, d) Dialyse gegen DMF.

Die Umsetzung der MUDHSE-funktionalisierten Au-NP mit *Syn 3* erfolgte direkt im Anschluss an deren Synthese. Zum einen kann bei den MUDHSE-koodinierten Au-NP bei längerem Stehen in nicht absolutiertem DMF eine Hydrolyse der Aktivesterfunktion zur

Carbonsäure erfolgen. Zum anderen sind diese Kolloide nicht elektrostatisch stabilisiert und somit aggregationsanfällig. Aus diesem Grund birgt die Überführung der Partikel in absolutiertes DMF nach der Dialyse das Risiko einer irreversiblen Aggregation der Partikel.

Auch für diese Reaktion wurde DMF als Lösungsmittel gewählt. DMF eignet sich besonders gut für diese Reaktion, da die MUDHSE-funktionalisierten Au-NP in diesem Lösungsmittel eine verhältnismäßig gute Löslichkeit aufweisen. DMF solvatisiert zudem selektiv nur Kationen und steigert somit die Nukleophilie des Anions in nukleophilen Substitutionen [204].

Bei RT und unter starkem Rühren wurde die Kolloidlösung mit *Syn 3*, welches zuvor in wenig DMF gelöst wurde, versetzt. Nach ca. 10 Minuten wurde Triethylamin (TEA) zugegeben und die Reaktionslösung 24 h gerührt. Die Farbe der Kolloidlösung änderte sich hierbei nicht. Bei der Reaktion entsteht als Nebenprodukt NHS, welches gemeinsam mit TEA und dem im Überschuss eingesetzten *Syn 3* mittels Dialyse gegen DMF entfernt wurde. ¹H-NMR- und IR-Spektren der dialysierten Kolloide zeigen eine vollständige Funktionalisierung der NP mit *Syn 3*. TEM-Aufnahmen konnte entnommen werden, dass die Größendispersität des Partikelkerns sich während der Funktionalisierung nicht verändert hat.

Die *Syn 3*-funktionalisierten Au-Kolloide (**NP1**) sind in DMF mehrere Wochen stabil. Für biologische Anwendungen und die Bestimmung eines IC₅₀-Wertes mit dem kompetitiven Bindungsassay ist allerdings die Überführung in Wasser und die rückstandslose Entfernung des toxischen DMF notwendig. Hierzu wurde die geringkonzentrierte (30 nM NP) Kolloidlösung intensiv gegen Wasser dialysiert. Aufgrund der zahlreichen Alkoholfunktionen auf der Kolloidoberfläche neigen diese Partikel in Wasser zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, welche zwischen den NP verbrückend wirken, und somit zu einer Aggregation der Kolloide. Entscheidend für den Aggregationsgrad nach der Dialyse ist die Konzentration der Kolloide. Bei einer Kolloidkonzentration von ca. 30 nM entsteht eine rosafarbene Milch, in der Aggregate der NP fein suspendiert vorliegen. Nach ca. 1 Tag bildeten sich violette Flocken, welche sich langsam an Rand und Boden des Gefäßes absetzten, und die überstehende Suspension wurde immer klarer. Nach ca. 2 Tagen war die überstehende Lösung farblos und die Kolloide hatten sich vollständig in aggregierter Form am Boden des Gefäßes abgesetzt. Konzentriertere Kolloidlösungen bildeten bereits bei der Dialyse flockig ausfallende Aggregate. Das Erscheinungsbild ähnelte dem der verdünnten Kolloidlösung nach ca. 2 Tagen. Eine weitere Möglichkeit der Überführung in Wasser stellt das vollständige Entfernen des DMF im Hochvakuum (HV) und anschließende

Suspendierung des Rückstands in Wasser dar. Auch mit dieser Methode ließ sich keine fein verteilte Suspension, sondern nur ein flockiger Niederschlag mit einer klaren überstehenden Lösung erzeugen. Eine Ultraschallbehandlung dieses violetten Niederschlags mit dem Ziel einer mechanischen Verkleinerung der Aggregate führte zu keiner optischen Veränderung des Niederschlags und nicht, wie erhofft, zu der Erzeugung einer feineren Suspension. Nur durch Zugabe von 1 M Natronlauge und somit Deprotonierung der Alkoholfunktionen ließ sich der violette Niederschlag wieder vollständig auflösen. Der pH-Wert dieser Lösung lag dann allerdings weit über dem physiologischen pH-Wert (ca. pH 12) und bei Absenkung des pH-Wertes ohne Veränderung der NP-Konzentration bildete sich der violette Niederschlag zurück.

Für die Wechselwirkung mit Selektinen sollte ein möglichst großer Teil der funktionalisierten Oberfläche zur Verfügung stehen. Da mit steigendem Aggregationsgrad der Kolloide die solvensexponierte Oberfläche stark sinkt, sollten mit den am wenigsten aggregierten funktionalisierten NP die besten IC_{50} -Werte erzielt werden. Für den kompetitiven Bindungsassay wurde daher die Dialyse der verdünnten Kolloidlösung als Methode zur Überführung in Wasser gewählt und die Messung von **NP1** noch am Tag der Dialyse gegen Wasser durchgeführt.

Ziel dieses Projektes ist neben der Synthese eines möglichst effizienten Inhibitors auch der Nachweis eines multivalenten Effekts bei der Bindung des Inhibitors an Selektin. Der direkte Vergleich der IC_{50} -Werte von *Syn 3* und **NP1** ist hierzu nicht ideal, da die hydrophobe Kette des *Syn 3*-funktionalisierten Liganden (**LigSyn3**) ebenfalls einen Einfluss ausüben könnte. Aus diesem Grund wurde von Shahla Yekta **LigSyn3** in Abwesenheit der NP synthetisiert [205]. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 3.66 gezeigt.

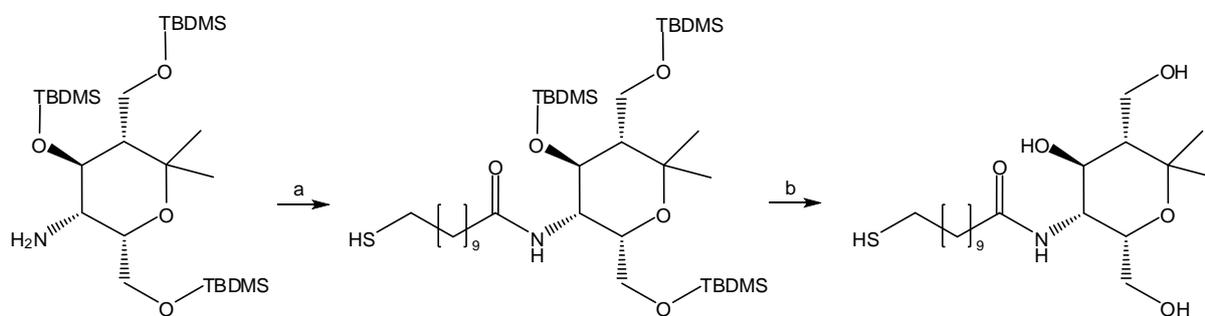
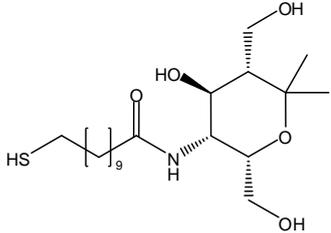
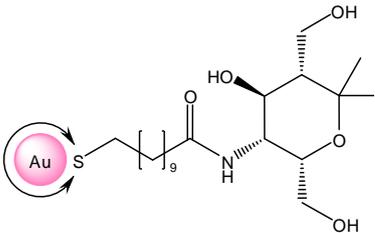


Abbildung 3.66: Reaktionsschema zur Synthese von **LigSyn-3**. Reagenzien und Bedingungen: a) MUDS, BOP, Pyridin, RT, 15 h, 81 %, b) HF·Pyridin, Pyridin, RT, 20 h, 94 %.

In Tabelle 3.6 sind die IC_{50} -Werte von **LigSyn3** und **NP1** aufgeführt. Während für den Ligand ohne NP, wie auch für *Syn 3*, kein inhibitorischer Effekt im gemessenen Konzentrationsbereich (d.h. bis zu einer Konzentration von 0.1 mM) beobachtet wurde, konnte für **NP1** ein IC_{50} von 10 nM bestimmt werden.

Tabelle 3.6: Vergleich der IC_{50} -Werte ohne und mit Immobilisierung auf Au-NP mit einem Durchmesser von ca. 6 nm (N.I. = nicht inhibierend). Die Konzentrationsangabe bei den NP bezieht sich auf die NP-Konzentration, nicht die Ligandkonzentration.

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50} L-Selektin	IC_{50} P-Selektin	IC_{50} E-Selektin
	LigSyn 3	N.I.	N.I.	N.I.
	NP1	N.I.	10 nM	N.I.

Die multivalente Präsentation ermöglicht somit die Inhibierung der P-Selektinbindung mit einer Struktur, welche monovalent keine Inhibition erzielt. Der IC_{50} liegt mit 10 nM sogar deutlich unter dem Wert für andere bekannte Inhibitoren, z.B. Heparin ($IC_{50} = 4 \mu\text{M}$ [206]).

Für medizinische Anwendungen sind **NP1** dennoch schlecht geeignet. Die nach der Dialyse erhaltene Suspension in Wasser ist nur in einem kleinen Temperaturbereich (von ca. 0 - 30 °C) und wenige Stunden (maximal zwei Tage bei 4 °C) stabil. Es bildeten sich langsam ein lilafarbener Niederschlag und eine fast klare überstehende Lösung. Die Aggregation der NP in Wasser verringert zudem die zur Selektinwechselwirkung zur Verfügung stehende Oberfläche. Desweiteren ist die Größe der NP-Aggregate stark zeit- und präparationsabhängig und somit schlecht reproduzierbar.

Eine deutliche Veränderung dieser Eigenschaften kann durch die Sulfatierung der Alkoholfunktionen des Liganden erreicht werden, welche zu einer mit hoher Stabilität

verbundenen elektrostatischen Stabilisierung der NP führt. In neutralen wässrigen Lösungen findet keine Aggregation der Partikel mehr statt. Außerdem weisen, wie in Abbildung 3.62 gezeigt, Sulfatgruppen eine hohe Affinität zu der Selektinbindungstasche mit positivem elektrostatischem Potential auf. Somit sollte sich eine Sulfatierung der NP nicht nur positiv auf die Stabilität, sondern auch auf die Bindungseigenschaften der NP auswirken.

Die Sulfatierung von **NP1** erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von *Futaki et al.* [207] bei RT mit SO_3 -DMF-Komplex in absolutiertem DMF. Ein Reaktionsschema ist in Abbildung 3.67 gezeigt.

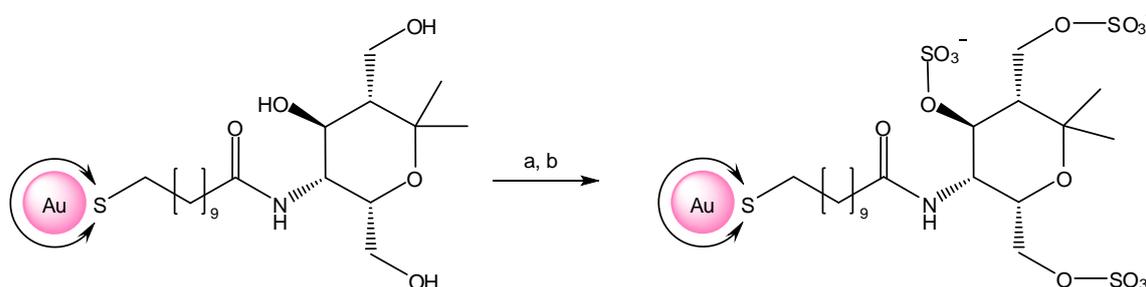


Abbildung 3.67: Sulfatierung von **NP1** ($d = 6$ nm). Reagenzien und Bedingungen: a) 5 eq. SO_3 -DMF-Komplex, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 24 h, b) Dialyse gegen DMF und H_2O .

Nach 24 h Reaktionszeit wurden die NP zuerst gegen DMF und dann gegen Wasser dialysiert. Im Gegensatz zu den nicht sulfatierten Au-NP blieb die Lösung auch bei hohen Kolloidkonzentrationen klar. Die vollständige Sulfatierung der NP wurde mittels ^1H -NMR- und IR-Spektren der dialysierten Kolloide kontrolliert. TEM-Aufnahmen konnte entnommen werden, dass die Größendispersität des Partikelkerns sich während der Reaktion nicht verändert hat.

Messungen mit dem kompetitiven Bindungsassay haben gezeigt, dass die Sulfatierung von *Syn 3* auf dem Kolloid nicht nur zu einer Verbesserung der Stabilität führt, sondern auch zu einer deutlichen Verbesserung des Selektin-Bindungsvermögens. Neben P-Selektin wird von den sulfatierten *Syn 3*-funktionalisierten Au-NP (**NP2**) auch L-Selektin inhibiert. Die gemessenen IC_{50} -Werte betragen 350 pM für L-Selektin und 35 pM für P-Selektin. Dies entspricht einer starken Reduktion der IC_{50} -Werte im Vergleich zu **NP1**.

Die bisherigen Ergebnisse veranschaulichen deutlich die Effizienz einer multivalenten Präsentation und liefern Anlass für den Versuch einer weiteren Optimierung der Bindungseigenschaften. In den folgenden Abschnitten werden Untersuchungen zum Einfluss weiterer Faktoren auf die Bindungseigenschaften der NP vorgestellt.

3.3.1 Abhängigkeit der Inhibition vom Sulfatierungsgrad

Der Sulfatierungsgrad hat den vorangegangenen Ergebnissen zufolge einen großen Einfluss auf die Selektinbindungseigenschaften der Kolloide. Dieser wurde im Folgenden näher untersucht, indem die *Syn* 3-funktionalisierten Au-NP (**NP1**) mit einem Durchmesser von 6 nm unterschiedlich stark sulfatiert wurden. Die Sulfatierungen erfolgten analog dem in Abbildung 3.6 gezeigten Schema, allerdings mit unterschiedlichen Äquivalenten SO_3 -DMF-Komplex (1, 2, 3 und 5 eq. SO_3 -DMF-Komplex). Nach 24 h Reaktionszeit wurden die Kolloide zuerst gegen DMF und dann gegen Wasser dialysiert. Die Kolloidlösung blieb in allen Fällen rot und klar.

Ergänzend zur ^1H -NMR- und IR-Spektroskopie wurden die erhaltenen Kolloide zur Charakterisierung auf ein Agarosegel aufgetragen und bei pH 7 einer Gelelektrophorese unterzogen. Je stärker die Partikel sulfatiert sind, desto höher ist ihre negative Ladung bei pH 7 und desto länger ist somit ihre Laufstrecke. Eine Weißlichtaufnahme des Gels nach der Elektrophorese ist in Abbildung 3.68 gezeigt.

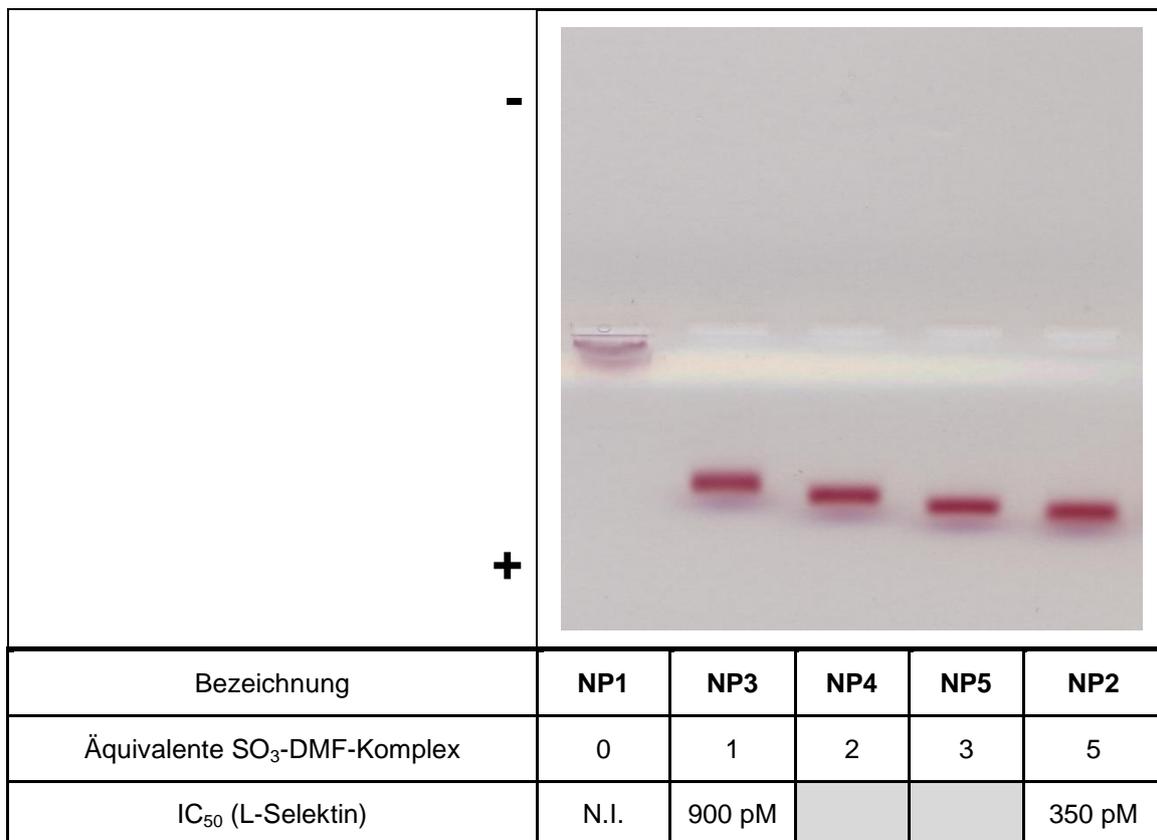


Abbildung 3.68: Agarosegel unterschiedlich stark sulfatierter *Syn* 3-funktionalisierter Au-NP sowie einige IC_{50} -Werte für L-Selektin (N.I. = nicht inhibierend).

Alle auf diesem Gel aufgetragenen NP bewegen sich aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Laufstrecken der Kolloide auf dem Agarosegel unterscheiden sich dabei deutlich voneinander. Die *Syn 3*-funktionalisierten Au-NP (**NP1**) legen aufgrund ihrer geringen Nettoladung bei pH 7 und der Größe der sich in Wasser bildenden NP-Aggregate nur eine kurze Wegstrecke zurück. Mit zunehmenden Äquivalenten SO_3 -DMF-Komplex steigt erwartungsgemäß der Sulfatierungsgrad der Kolloide und die zurückgelegte Laufstrecke verlängert sich. Besonders groß ist der Unterschied zwischen **NP1** und der ersten Sulfatierungsstufe (**NP3**). Hier trägt nicht nur die erheblich gestiegene Nettoladung der Partikel nach der Sulfatierung, sondern auch das Vorliegen als vereinzelt Partikel und somit eine starke Größenreduktion im Vergleich zu den in Aggregaten vorliegenden **NP1** zu der deutlich längeren Laufstrecke bei. Zwischen 3 und 5 Äquivalenten SO_3 -DMF-Komplex ist kaum noch ein Unterschied zu erkennen. Die etwas längere Laufstrecke der mit 5 eq. SO_3 -DMF-Komplex sulfatierten NP (**NP2**) im Vergleich zu den mit 3 eq. sulfatierten NP (**NP5**) weist darauf hin, dass bei den gewählten Bedingungen für eine vollständige Sulfatierung der drei Hydroxyfunktionen von *Syn 3* ein leichter Überschuss an SO_3 -DMF-Komplex benötigt wird. Eine weitere Steigerung des Sulfatierungsgrades und somit eine Verlängerung der Laufstrecke ist mit diesem Liganden nicht mehr möglich.

Der unterschiedlich starke Sulfatierungsgrad der Kolloide machte sich auch im Bindungsassay bemerkbar. Mit steigendem Sulfatierungsgrad sank der IC_{50} -Wert. Während die vollständig sulfatierten Aminopyran-kordinierten Au-Kolloide (**NP2**) einen IC_{50} von 350 pM für L-Selektin aufwiesen, stieg der IC_{50} -Wert für die geringer sulfatierten *Syn 3*-funkt. Kolloide (**NP3**) auf 900 pM. Die vollständige Sulfatierung der NP lieferte im Fall von *Syn 3*-funktionalisierten Au-NP somit den geringsten IC_{50} -Wert.

Der gleiche Trend wurde auch von *Enders* [151] und *Papp et al.* [160] bei der Untersuchung sulfatierter dendritischer Polyglycerole gefunden. Die beste Inhibition wurde mit dem höchstmöglichen Sulfatierungsgrad erzielt. Die bisherigen Ergebnisse sowie der Vergleich mit der Arbeit von *Enders* und *Papp et al.* ließ daher die Frage aufkommen, ob ausschließlich eine möglichst dichte multivalente Präsentation von Sulfatgruppen für eine effektive Bindung an L- und P-Selektin notwendig ist oder ob ein für die Selektinbindung optimaler Abstand zwischen den Sulfatgruppen existiert. Auf NP ist durch geschickte Wahl des Liganden ein sehr hoher Funktionalisierungsgrad realisierbar, wie anhand von **NP2** bereits gezeigt werden konnte. Sie eignen sich daher ideal zur Bearbeitung dieser Fragestellung.

Die Au-NP mit einem mittleren Kerndurchmesser von 6 nm wurden mit drei unterschiedlichen azyklischen Aminen funktionalisiert, welche sich in der Anzahl vorhandener Alkoholfunktionen unterscheiden. Das die Alkoholfunktionen präsentierende Gerüst wurde dabei möglichst einfach und raumsparend gehalten. Die Funktionalisierung der Aktivester-koord. Partikel mit diesen Aminen konnte analog der Reaktion mit *Syn 3* durchgeführt werden. Ein allgemeines Syntheschema ist in Abbildung 3.69 gezeigt. Die primären Amine Ethanolamin (EA, R = -CH₂(CH₂OH)), Serinol (SER, R = -CH(CH₂OH)₂) und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, R = -C(CH₂OH)₃), wurden auf diese Weise unter Ausbildung einer Amid-Bindung auf der Kolloidoberfläche immobilisiert. Die Charakterisierung dieser NP erfolgte mittels ¹H-NMR- und IR-Spektroskopie. In beiden Spektren sind keine Verunreinigungen, sondern ausschließlich die für den jeweiligen Liganden zu erwartenden Signale zu sehen.

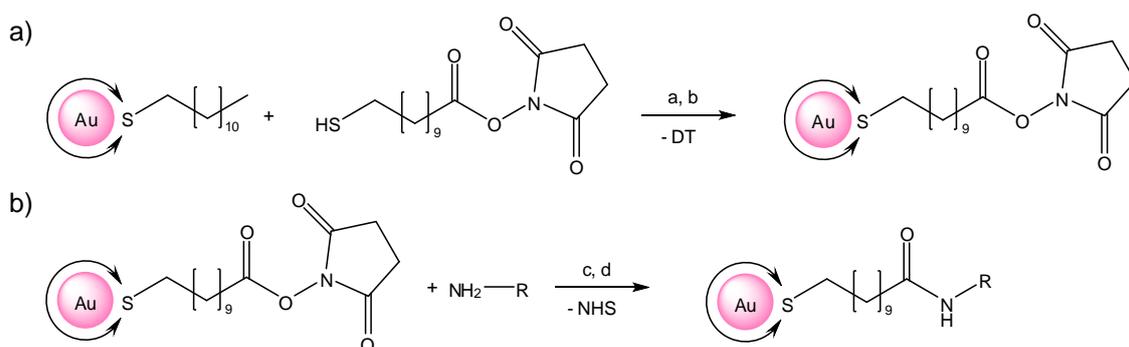


Abbildung 3.69: Allgemeines Reaktionsschema zur Immobilisierung primärer Amine auf Au-NP.
 Reagenzien und Bedingungen: a) DMF, b) Dialyse gegen DMF, c) NET₃, DMF, RT, 24 h, d) Dialyse gegen DMF.

Auch die Sulfatierung der NP konnte ohne weitere Modifikationen analog der Reaktion mit *Syn 3*-funktionalisierten Au-NP durchgeführt werden. Ein allgemeines Syntheschema hierzu ist in Abbildung 3.70 gezeigt. Die resultierenden NP wiesen eine hohe Stabilität in Wasser auf und waren optisch und in ihrem Löslichkeitsverhalten von den sulfatierten *Syn 3*-funkt. Au-NP nicht zu unterscheiden.

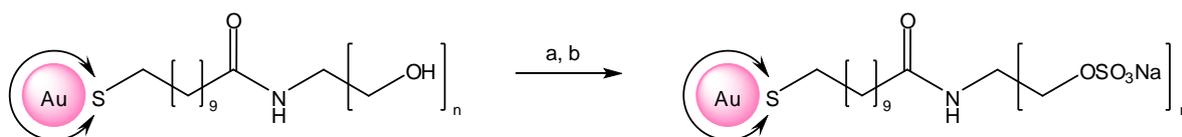


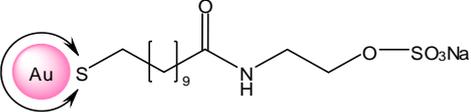
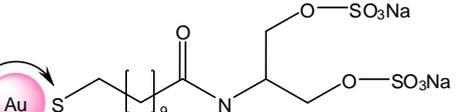
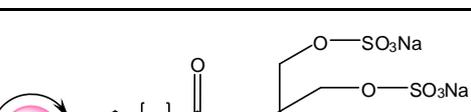
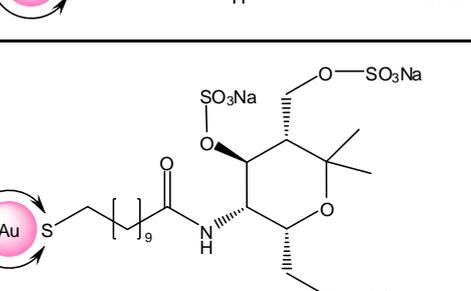
Abbildung 3.70: Allgemeines Reaktionsschema zur Sulfatierung Alkohol-funktionalisierter Au-NP
 (n = 1-3). Reagenzien und Bedingungen: a) SO₃-DMF-Komplex, DMF, RT, 1 h, b) Dialyse gegen DMF und H₂O.

Ergänzend zur $^1\text{H-NMR}$ - und IR-Spektroskopie wurde auch bei diesen Kolloiden der Sulfatierungsgrad gelelektrophoretisch untersucht (siehe Anhang, Abschnitt 8.2.2). Zu Vergleichszwecken wurden auf diesem Gel außerdem erneut die Kolloide **NP2** und **NP3** aufgetragen. Die sulfatierten Tris-funktionalisierten Au-NP (**NP8**) wiesen die höchste und mit **NP2** identische elektrophoretische Mobilität auf, dicht gefolgt von den sulfatierten SER-funktionalisierten Au-NP (**NP7**) und den EA-funktionalisierten Au-NP (**NP6**), welche eine nahezu identische Laufstrecke zurücklegten. Mit Abstand die kürzeste Laufstrecke besaß **NP3**.

Der Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von **NP3** und **NP6** zeigt deutlich, dass die Anzahl der auf dem NP gebundenen Liganden abhängig ist vom sterischen Anspruch des Liganden. Bei gleichbleibender Ligandenanzahl pro NP sollte es zwischen diesen beiden Kolloiden kaum einen Unterschied in der Nettoladung geben, doch die elektrophoretische Mobilität der Partikel unterscheidet sich deutlich. **NP6** weisen einen höheren Sulfatierungsgrad auf als **NP3**. Da der Partikeldurchmesser für beide Partikelsorten identisch ist und beide Liganden jeweils eine Sulfatgruppe tragen, müssen daher auf **NP6** mehr Liganden gebunden sein als auf **NP3**. Dieser Effekt lässt sich auch daran beobachten, dass der Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität zwischen **NP2** und **NP3** deutlich größer ist als zwischen **NP8** und **NP6**. Für diese Betrachtungen wurden die Unterschiede im hydrodynamischen Radius der Partikel, welcher mittels DLS bestimmt wurde, vernachlässigt. Dieser variiert allerdings nur zwischen ca. 10 (für **NP6**) und 14 nm (für **NP2**) und die Porengröße des 1 %-igen Agarosegels ist mit ca. 440 nm (Extrapolation von mittels AFM bestimmter Porengrößen für Agarosegele [208]) deutlich größer, so dass tatsächlich kein Einfluss dieses Faktors auf die elektrophoretische Mobilität dieser Partikel zu erwarten ist.

Die Unterschiede im Sulfatierungsgrad machen sich auch im Fall der **NP 6-8** beim Selektinbindungsvermögen bemerkbar. Allerdings wiederholt sich der für die **NP 1-3** gefundene Trend des mit steigendem Sulfatierungsgrad sinkenden IC_{50} -Wertes nicht. In Tabelle 3.7 sind die für diese NP erhaltenen IC_{50} -Werte für L- und P-Selektin aufgeführt.

Tabelle 3.7: IC₅₀-Werte verschieden stark sulfatierter Au-NP. Der Kerndurchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC ₅₀ L-Selektin	IC ₅₀ P-Selektin
	NP6	180 pM	215 pM
	NP7	20 pM	30 pM
	NP8	70 pM	90 pM
	NP2	350 pM	35 pM

Während der IC₅₀-Wert unterschiedlich stark sulfatierter *Syn 3*-funktionalisierter Au-NP kontinuierlich mit steigendem Sulfatierungsgrad sinkt und bei vollständiger Sulfatierung ein Minimum erreicht, lässt sich dieser Trend bei den **NP 6-8** nicht beobachten. Aufgrund des hohen möglichen Funktionalisierungsgrads von Metallnanopartikeln wird hier das Optimum an negativen Ladungen bereits vor der maximal möglichen Funktionalisierung erreicht. Entscheidend für eine effiziente Wechselwirkung scheinen bei dieser Dichte funktioneller Gruppen die Kombination aus Anzahl, Abstand und Flexibilität der Sulfatgruppen zu sein. Den besten inhibitorischen Effekt für beide untersuchten Selektine zeigte **NP7** mit einem IC₅₀-Wert von 20 pM für L-Selektin und 30 pM für P-Selektin. **NP7** weist zwar einen geringeren Sulfatierungsgrad auf als **NP2** und **NP8**, dafür ist die Flexibilität der Sulfatgruppen aber deutlich höher. Die Kombination aus Ladung, Flexibilität und sterischem Anspruch des Liganden scheinen bei **NP7** von den hier untersuchten NP am besten zu sein.

Alle Kolloide, welche mit azyklischen Liganden funktionalisiert wurden (**NP 6-8**), weisen einen niedrigeren IC₅₀-Wert für L-Selektin auf als **NP2**. Eine Kohlenhydrat-ähnliche

Grundstruktur ist demzufolge nicht notwendig für eine starke Bindung an L-Selektin. Bei P-Selektin wird der beste inhibitorische Effekt ebenfalls von einem Kolloid mit azyklischem Ligand, **NP7**, erzielt. Der IC_{50} -Wert für P-Selektin von **NP2** liegt allerdings mit 35 pM nur sehr knapp (5 pM) darüber. Für P-Selektin scheint die zyklische Ligandstruktur die wechselwirkenden Sulfatgruppen räumlich besonders passend zu orientieren. **NP8**, welche einen ähnlichen Sulfatierungsgrad besitzen wie **NP2**, binden nur mit einem IC_{50} -Wert von 90 pM an P-Selektin. Die geringere Flexibilität dieses Liganden von **NP2** im Vergleich zu dem Liganden von **NP7** scheint in diesem Fall keinen negativen Effekt auf die Bindungseigenschaften zu haben.

NP2 weist außerdem von den hier untersuchten NP die beste Selektivität zwischen L- und P-Selektin auf. Während **NP2** mit 350 pM für L-Selektin den schlechtesten hier untersuchten Inhibitor darstellt, gehört es mit 35 pM für P-Selektin zu den besten Inhibitoren für dieses Selektin. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Kohlenhydratmimetikum die lokalen Anforderungen der P-Selektin-Bindungstasche besser erfüllt als die der L-Selektin-Bindungstasche. **NP7** kann sich aufgrund der hohen Flexibilität des Liganden beiden Bindungstaschen gut anpassen. Die IC_{50} -Werte für L- und P-Selektin unterscheiden sich bei diesem Kolloid kaum.

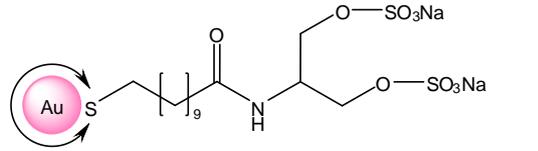
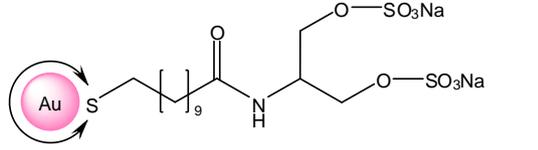
3.3.2 Reproduzierbarkeit der IC_{50} -Werte

Alle in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten NP wurden aus einer NP-Charge hergestellt. Durchschnittliche Größe und Größendispersität waren somit für diese Partikel identisch. Aufgrund des bis zur Umsetzung mit dem jeweiligen Amin ähnlichen Synthesewegs ist außerdem von einer sehr ähnlichen Oberflächenbelegung der NP auszugehen. In diesem Fall unterscheiden sich die Partikel ausschließlich durch ihre Oberflächenfunktionalisierung. Die Vergleichbarkeit der IC_{50} -Werte im Hinblick auf den Einfluss der Oberflächenfunktionalität ist daher in diesem Fall maximal. Im Folgenden werden aber auch NP vorgestellt, welche aus anderen NP-Chargen hergestellt wurden. Durchschnittliche Größe und Größendispersität dieser Partikel sind zwar denen anderer auf die gleiche Weise hergestellter Chargen sehr ähnlich, leichte Unterschiede zwischen den NP-Chargen sind jedoch aufgrund der hohen Sensibilität der Synthese nicht auszuschließen. Dies kann unter anderem zu Ungenauigkeiten in der Konzentrationsbestimmung der Kolloide

führen (Konzentrationsbestimmung siehe Anhang, Abschnitt 8.5). Die Konzentration der Gold-NP wurde zum einen aus der bei der Kolloidsynthese eingesetzten Menge Goldsalz berechnet. Zum anderen wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen und die Intensität am Absorptionsmaximum verglichen.

Um einen Eindruck von dem Einfluss dieser Faktoren auf die Reproduzierbarkeit dieser Werte zu bekommen, wurde aus jeder NP-Charge das Kolloid **NP7** synthetisiert. Ein Vergleich der in Tabelle 3.8 aufgeführten IC_{50} -Werte von **NP7** aus zwei verschiedenen NP-Chargen zeigt, dass der IC_{50} -Wert trotz identischem Erscheinungsbild der NP in TEM-Aufnahmen deutlich von Charge zu Charge variiert. In diesem Fall vervierfachen sich die für L- und P-Selektin bestimmten Werte.

Tabelle 3.8: IC_{50} -Werte von **NP7** aus unterschiedlichen NP-Chargen. Der Kerndurchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}
		L-Selektin	P-Selektin	E-Selektin
	NP7 (Charge 1)	20 pM	30 pM	
	NP7 (Charge 2)	80 pM	130 pM	N.I.

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich das Bindungsverhalten stark mit kleinsten Änderungen der NP-Größe verändern könnte. Ein weiterer entscheidender Faktor könnte aber auch die Dichte der Oberflächenbelegung mit funktionalisiertem Ligand sein. Ein Indiz dafür, dass insbesondere der letztgenannte Faktor große Auswirkungen auf das Bindungsverhalten der NP haben könnte, liefert auch eine weitere Beobachtung. Der mit dem kompetitiven Bindungsassay bestimmte IC_{50} -Wert für ein Kolloid vergrößert sich leicht, wenn die Stammlösung nicht direkt vor der Messung, sondern bereits einige Minuten (maximal 3,5 h) zuvor verdünnt wurde. Bei Verdünnung der Stammlösung direkt vor der Messung wies beispielsweise das Kolloid **NP19** (MUDSulfat-koord. Au-NP mit einem Durchmesser von ca. 6 nm) eine 39 %-ige Inhibition bei 100 pM auf. Wurde die Messung mit einer Inkubationszeit nach der Verdünnung durchgeführt, dann betrug die Inhibition bei 100 pM nur noch 17 %.

Ursache hierfür könnte eine durch die Verdünnung ausgelöste leichte Ausdünnung der Funktionalisierung auf der NP-Oberfläche sein. Bei NP welche aus einer Kern-Schale-Struktur aufgebaut sind, besteht ein Gleichgewicht des Liganden zwischen NP-Oberfläche und Lösung. Wird eine solche Kolloidlösung verdünnt, findet eine Gleichgewichtseinstellung statt, für die sich Ligand von der NP-Oberfläche lösen muss und welche daher zu einer leichten Ausdünnung der Liganden auf der NP-Oberfläche führt.

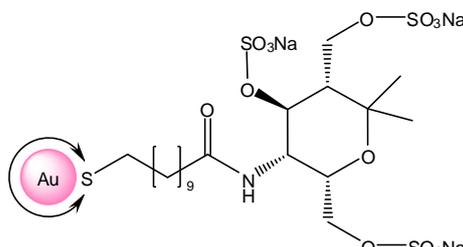
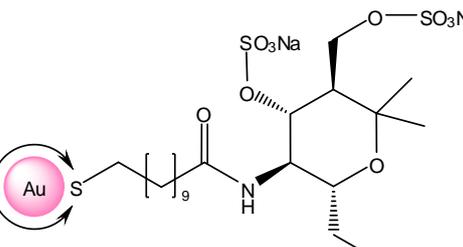
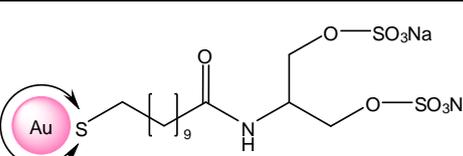
Obwohl die Absolutwerte sich stark von NP-Charge zu NP-Charge verändern, bleibt der für unterschiedliche Funktionalisierungen beobachtete Trend innerhalb der IC_{50} -Werte aber in allen Chargen erhalten. Ein direkter Vergleich unterschiedlich funktionalisierter NP ist somit zwar nur innerhalb einer NP-Charge sinnvoll. Durch Vergleich mit **NP7**, welches aus jeder Charge synthetisiert wurde, lassen sich aber auch ein qualitativer Vergleich von NP aus unterschiedlichen Chargen realisieren und somit Chargen-übergreifend Trends für das Bindungsverhalten unterschiedlich funktionalisierter Au-NP ermitteln.

3.3.3 Einfluss der Struktur des bindenden Liganden

Der Vergleich des Bindungsvermögens von **NP 6-8** und **NP2** zeigt deutlich, dass die Struktur des Liganden und somit die räumliche Anordnung der wechselwirkenden Gruppen eine wesentliche Rolle für die effiziente Inhibierung der Selektine spielt. Auch die Selektivität zwischen L- und P-Selektin wird maßgeblich von der Struktur bestimmt. Um den Einfluss der räumlichen Orientierung der Sulfatgruppen näher zu untersuchen, wurden unterschiedlichste Strukturen durch Amidbindungsknüpfung auf Au-NP mit einem mittleren Kerndurchmesser von ca. 6 nm immobilisiert, sulfatiert und die IC_{50} -Werte der NP bestimmt. Die Länge der als Linker zwischen NP-Oberfläche und Amidbindung fungierenden Alkylkette wurde dabei nicht verändert. Die Funktionalisierung und Sulfatierung der Kolloide erfolgte analog den in Abbildung 3.69 und Abbildung 3.70 gezeigten Reaktionsschemata. Alle im Folgenden vorgestellten Kolloide waren nach der Sulfatierung wasserlöslich und bildeten tiefrotgefärbte Lösungen. Die Charakterisierung der NP erfolgte mittels TEM, 1H -NMR- und IR-Spektroskopie. Der aus den TEM-Aufnahmen ermittelte mittlere Partikeldurchmesser betrug ca. 6 nm. In den 1H -NMR- und IR-Spektren sind keine Verunreinigungen, sondern ausschließlich die für den jeweiligen Liganden zu erwartenden Signale zu sehen.

Als erstes Beispiel für den Einfluss der räumlichen Orientierung der Sulfatgruppen auf die Bindungseigenschaften sind in Tabelle 3.9 die IC_{50} -Werte eines Kolloids aufgeführt, welches mit einem Diastereomer von *Syn3* funktionalisiert und dann sulfatiert wurde. Trotz identischer Konstitution, und somit identischer Anzahl an Sulfatgruppen, besitzt dieses Kolloid (**NP9**) für L-Selektin einen im Vergleich zu **NP2** um den Faktor 2,5 höheren IC_{50} -Wert. Für P-Selektin wurde sogar ein im Vergleich zu **NP2** knapp sechsfach höherer IC_{50} -Wert bestimmt. Die veränderte Orientierung der Sulfatgruppen wirkt sich somit negativ auf die Bindungseigenschaften der NP, sowohl für L- also auch für P-Selektin, aus. Der beobachtete Effekt ist vergleichbar stark mit dem einer unvollständigen Sulfatierung der NP und somit einer Reduktion der pro Ligand zur Bindung zur Verfügung stehenden Anzahl Sulfatgruppen bei gleichbleibender Gerüststruktur. Der IC_{50} -Wert von **NP9** für L-Selektin ist mit dem für **NP3**, den teilsulfatierten *Syn3*-funktionalisierten NP, bestimmten Wert vergleichbar.

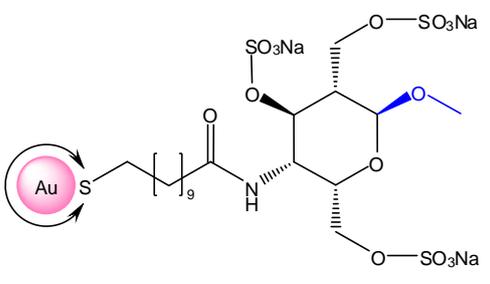
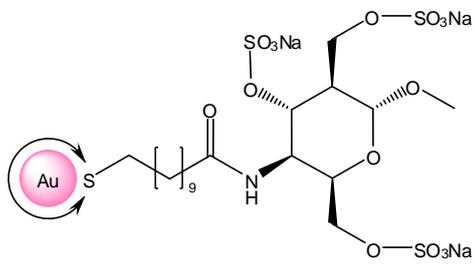
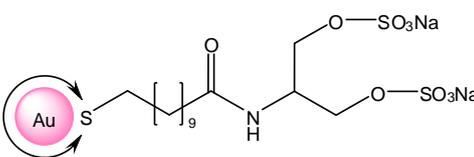
Tabelle 3.9: IC_{50} -Werte sulfatierter Au-NP. Der Kerndurchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50} L-Selektin	IC_{50} P-Selektin
	NP2	350 pM	35 pM
	NP9	900 pM	200 pM
	NP7	20 pM	30 pM

Verallgemeinert zeigt der Vergleich der Bindungseigenschaften von **NP9** und **NP2**, dass bei gleichbleibender Konstitution durch Änderungen in der Konfiguration, und somit in der Ausrichtung der Sulfatgruppen, eine Veränderung des Bindungsverhaltens der Au-NP erzielt werden kann.

Anhand der in Tabelle 3.10 vorgestellten Kolloide wurde der Einfluss der vermutlich nicht an der Bindung beteiligten Strukturelemente untersucht. Das auf **NP10** immobilisierte Amin unterscheidet sich von *Syn3* dadurch, dass zwei Methylgruppen durch eine Methoxygruppe ersetzt wurden (in Tabelle 3.10 blau markiert). Diese Veränderung führt ebenfalls zu einer Erhöhung der IC_{50} -Werte im Vergleich zu **NP2** (ca. um den Faktor 1,5 für L-Selektin und den Faktor 4 für P-Selektin). Der Effekt ist allerdings deutlich geringer als der für eine Änderung der Ausrichtung der Sulfatgruppen oder Reduktion der Anzahl von Sulfatgruppen beobachtete. Allgemein scheinen sich Änderungen in der Struktur des immobilisiertenamins stärker auf die Bindung an P-Selektin auszuwirken als auf die Bindung an L-Selektin.

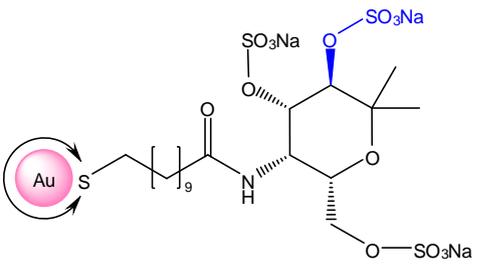
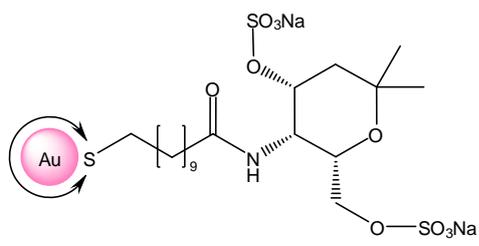
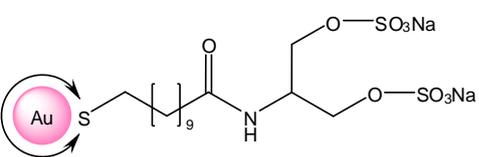
Tabelle 3.10: IC_{50} -Werte sulfatierter Au-NP. Der Kerndurchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50} L-Selektin	IC_{50} P-Selektin
	NP10	550 pM	130 pM
	NP11	600 pM	120 pM
	NP7	20 pM	30 pM

NP11 wurde mit dem Enantiomer des auf **NP10** immobilisierten Amins funktionalisiert und dann sulfatiert. Die IC_{50} -Werte dieser beiden Kolloide (siehe Tabelle 3.10), sowohl für L- als auch für P-Selektin, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Enantiomere weisen somit in diesem Beispiel identische Bindungseigenschaften auf.

In Tabelle 3.11 sind die IC_{50} -Werte von zwei weiteren Aminopyran-funktionalisierten Kolloiden aufgeführt. **NP12** und **NP13** unterscheiden sich in der Anwesenheit einer Sulfatgruppe (in Tabelle 3.11 blau markiert). Während **NP12** drei Sulfatgruppen pro Ligand präsentiert, besitzt der Ligand von **NP13** bei ansonsten identischer Struktur nur zwei.

Tabelle 3.11: IC_{50} -Werte sulfatierter Au-NP. Der Kerndurchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm. Die grün markierten Werte wurden mit einer anderen NP-Charge bestimmt, aber für diese Tabelle rechnerisch angepasst.

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50} L-Selektin	IC_{50} P-Selektin	IC_{50} E-Selektin
	NP12	200 pM	460 pM	N.I.
	NP13	120 pM	300 pM	N.I.
	NP7	80 pM	130 pM	N.I.

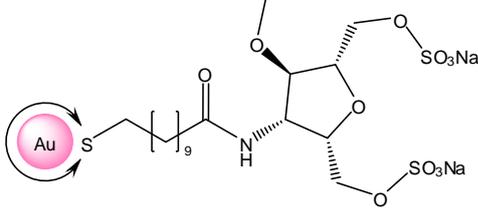
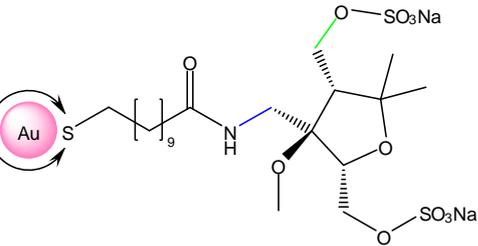
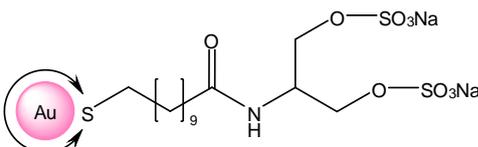
Die IC_{50} -Werte der beiden Kolloide, sowohl für L- als auch für P-Selektin, unterscheiden sich nur leicht voneinander. **NP12** weist für beide Selektine um den Faktor 1,5 höhere IC_{50} -Werte auf. Diese Veränderung ist vergleichbar mit der für L-Selektin bei Variation eines vermutlich nicht an der Bindung beteiligten Strukturelements beobachteten Veränderung des IC_{50} -Wertes (vergleiche **NP2** und **NP10**). Im Gegensatz zu den *LigSyn3*-koordinierten Au-NP (**NP2** und **NP3**), welche bei vollständiger Sulfatierung die besten Bindungseigenschaften aufwiesen, wirkt sich die Entfernung der Sulfatgruppe in diesem Fall sogar leicht positiv auf die Bindungseigenschaften aus.

Die Selektivität zwischen L- und P-Selektin von **NP12** und **NP13** ist im Vergleich zu **NP2** weniger stark ausgeprägt. Während die Struktur von **NP12** und **NP13** besser an die Bindungstasche von L-Selektin angepasst zu sein scheint, bevorzugt die Bindungstasche von P-Selektin die auf **NP2** präsentierte Struktur.

NP13 weist außerdem in Bezug auf die Sulfatgruppen eine strukturelle Ähnlichkeit zu **NP7** auf. Auch **NP7** bindet L-Selektin besser als P-Selektin und weist, ähnlich wie **NP13**, eine deutlich geringere Selektivität zwischen den Selektinen auf als **NP2**. Die etwas kleineren IC_{50} -Werte von **NP7** im Vergleich zu **NP13** sind vermutlich auf die größere Flexibilität und somit höhere Anpassungsfähigkeit an die Bindungstaschen von **NP7** zurückzuführen.

In Tabelle 3.12 sind die IC_{50} -Werte zweier Aminofuran-funktionalisierter Au-NP sowie zum Vergleich der bei dieser NP-Charge für **NP7** bestimmte IC_{50} -Wert aufgeführt. Beide Kolloide präsentieren zwei Sulfatgruppen pro Ligand und weisen für L-Selektin einen höheren IC_{50} -Wert auf als **NP7**. Für P-Selektin liegt nur der von **NP15** weit über dem von **NP7** (um ca. den Faktor drei), **NP14** erzielt einen ähnlichen IC_{50} -Wert wie **NP7**. Während **NP14** besser an P-Selektin bindet als an L-Selektin, verhält es sich bei **NP15** genau umgekehrt. **NP15** besitzt im Unterschied zu allen anderen im Rahmen dieses Projektes vorgestellten Kolloiden eine CH_2 -Gruppe zwischen Amidfunktion und Ring (in Tabelle 3.12 blau markiert). Die Anordnung der Sulfatgruppen im Ligand von **NP15** ähnelt der von **NP13** (siehe Tabelle 3.11). Auch die IC_{50} -Werte dieser beiden Kolloide liegen, trotz unterschiedlich großer Ringsysteme und einer in **NP15** zusätzlichen Methylengruppe (in Tabelle 3.12 grün markiert), nicht sehr weit auseinander. **NP13** weist geringfügig kleinere IC_{50} -Werte für L- und P-Selektin auf als **NP15**.

Tabelle 3.12: IC₅₀-Werte Aminofuran-funktionalisierter Au-NP. Der Kerndurchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm.

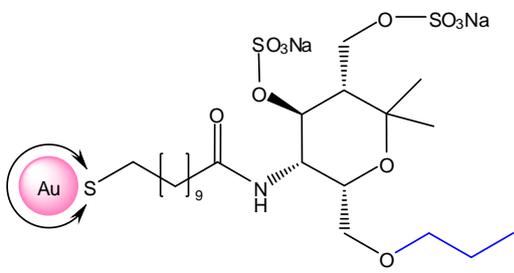
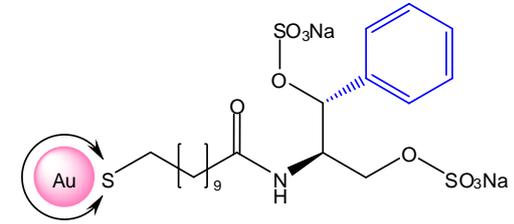
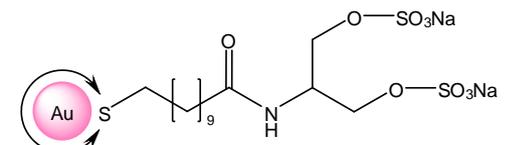
Inhibitor	Bezeichnung	IC ₅₀ L-Selektin	IC ₅₀ P-Selektin	IC ₅₀ E-Selektin
	NP14	200 pM	140 pM	N.I.
	NP15	150 pM	400 pM	N.I.
	NP7	80 pM	130 pM	N.I.

Anhand der in Tabelle 3.13 vorgestellten Kolloide wurde der Einfluss zusätzlicher hydrophober Strukturelemente auf die Bindungseigenschaften der NP untersucht. **NP16** ähnelt strukturell **NP2**. Im Unterschied zu **NP2** wurde bei **NP16** eine Sulfatgruppe durch eine Propoxygruppe ersetzt (in Tabelle 3.13 blau markiert). **NP16** weist im Gegensatz zu **NP2** keine ausgeprägte Selektivität zwischen L- und P-Selektin auf. Die Bindung an L-Selektin ist nur leicht besser als die Bindung an P-Selektin.

NP17 weist strukturelle Ähnlichkeit mit **NP7** auf, besitzt aber im Unterschied zu **NP7** zusätzlich eine Phenylgruppe (in Tabelle 3.13 blau markiert). Diese scheint allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungseigenschaften der NP auszuüben. Die IC₅₀-Werte für **NP17** und **NP7**, sowohl für L- als auch für P-Selektin, liegen sehr dicht beieinander. Auch die leichte Bevorzugung von L- gegenüber P-Selektin tritt bei beiden Kolloiden auf.

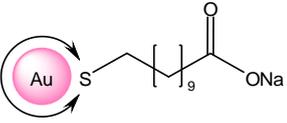
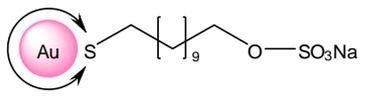
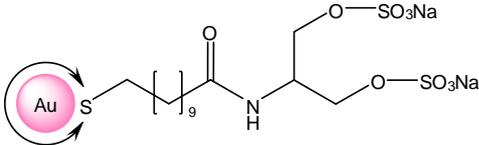
Die Bindungseigenschaften aller drei in Tabelle 3.13 aufgeführten Kolloide sind sich sehr ähnlich.

Tabelle 3.13: IC₅₀-Werte von sulfatierten Au-NP mit Liganden, welche hydrophobe Komponenten tragen. Der Kerndurchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC ₅₀ L- Selektin	IC ₅₀ P- Selektin	IC ₅₀ E- Selektin
	NP16	110 pM	130 pM	N.I.
	NP17	100 pM	150 pM	N.I.
	NP7	80 pM	130 pM	N.I.

Interessanter Weise sind auch MUDS-koodinierte Au-Kolloide (**NP18**) in der Lage die Bindung von L- und P-Selektin zu inhibieren. Ein Nachteil von MUDS-koodinierten Au-NP ist ihre geringe Aggregationsstabilität bei pH-Werten kleiner 9. Erst bei sehr kleinen Konzentrationen lassen sich Lösungen von MUDS-koodinierten Au-NP herstellen, welche aber nur kurz lagerbar sind. Für die hier vorgestellten Experimente wurde eine 30 nmolare Lösung (bezogen auf die NP-Konzentration) hergestellt und innerhalb von 24 h untersucht. Die IC₅₀-Werte für MUDS-kood. Au-NP mit einem Kerndurchmesser von ca. 6 nm sind in Tabelle 3.14 aufgeführt. Zum Vergleich wurden auch hier die IC₅₀-Werte von **NP7** sowie von den MUDSulfat-koodinierten Au-NP (**NP19**) mit einem Kerndurchmesser von ca. 6 nm bestimmt. Die Synthesen von **NP18** und **NP19** wurden bereits in Abschnitt 3.2.2 vorgestellt (Schema zum Ligandenaustausch siehe Abbildung 3.29).

Tabelle 3.14: IC₅₀-Wert von MUDS-koord. Au-NP mit einem mittleren Kerndurchmesser von ca. 6 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC ₅₀ L-Selektin	IC ₅₀ P-Selektin	IC ₅₀ E-Selektin
	NP18	100 pM	30 pM	N.I.
	NP19	150 pM	30 pM	> 1 nM
	NP7	20 pM	30 pM	N.I.

Der IC₅₀-Wert für L-Selektin von **NP19** ist mit 150 pM um den Faktor 1,5 größer als der für **NP18** gemessene Wert von 100 pM. Beide Werte liegen deutlich über dem für **NP7** in dieser Charge bestimmten IC₅₀-Wert für L-Selektin und stellen somit keine Optimierung der Struktur dar. Der Vergleich von **NP18** und **NP19** zeigt, dass bei mit Ausnahme von der solvens exponierten funktionellen Gruppe identischer Ligandstruktur Carboxylatgruppen besser an L-Selektin binden als Sulfatgruppen. Für P-Selektin ist dieser Trend nicht zu finden. Die IC₅₀-Werte aller drei Kolloidsorten für P-Selektin sind identisch und betragen 30 pM. Für die Bindung an P-Selektin scheint es somit, zumindest bei sehr einfachen Strukturen, keine Rolle zu spielen, ob eine Sulfat- oder eine Carboxylat-Funktion angeboten wird. Die Selektivität beider NP-Sorten für P-Selektin ist vermutlich auf die Abwesenheit der Amidbindung zurückzuführen. Eine eingehendere Untersuchung und Erklärungsansätze hierzu werden im nächsten Abschnitt (Abschnitt 3.3.4) ausgeführt.

Für biologische Anwendungen sind aufgrund ihres deutlich besseren Löslichkeitsverhaltens bei physiologischem pH-Wert die MUDSulfat-koord. Au-NP den MUDS-koordinierten Au-Kolloiden vorzuziehen, auch wenn der IC₅₀-Wert für L-Selektin größer ist. In Abschnitt 3.2.3.2 wurde die Löslichkeit beider Kolloidsorten bei unterschiedlichen pH-Werten ausführlich diskutiert.

Wie entscheidend die passende räumliche Ausrichtung der wechselwirkenden Gruppen für die Bindung an Selektin ist, zeigt auch der Vergleich des Bindungsverhaltens MUDS-koord. Au-

NP mit dem Citrat-koodinierter Au-NP, welche ebenfalls Carboxylatfunktionen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Während die MUDS-koord. Au-NP für L- und P-Selektin IC_{50} -Werte im pikomolaren Bereich aufweisen, konnte keine Inhibierung der Selektinbindung in Anwesenheit der Citrat-koord. Au-NP beobachtet werden. Neben der negativ-geladenen Teilstruktur müssen demnach weitere Voraussetzungen erfüllt werden, um eine gute Bindungsaffinität zu erzielen. Es genügt nicht, ein negativ geladenes Teilchen in einem bestimmten Größenbereich für die Bindung anzubieten.

Das Bindungsverhalten der Citrat-koord. Au-NP deutet bereits darauf hin, dass die gemessenen Ergebnisse nicht auf unspezifische Wechselwirkungen des Selektins mit den Nanopartikeln zurückzuführen sind. In Abbildung 3.71 sind zwei weitere Beispiele für NP aufgeführt, welche im kompetitiven Bindungsassay keine inhibitorische Wirkung zeigten.

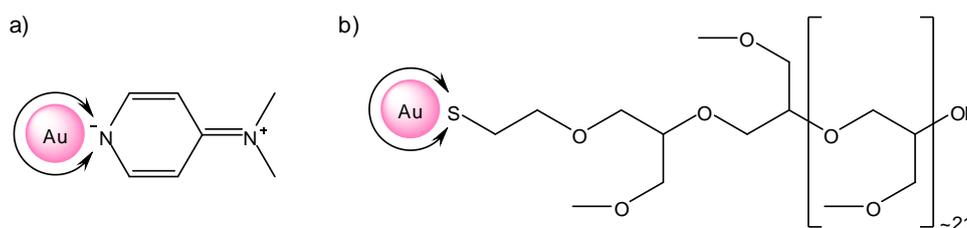


Abbildung 3.71: a) DMAP-koord. Au-NP und b) Pol1-koord. Au-NP⁹.

Auch bei hohen NP-Konzentrationen wurde nach Inkubation der nicht bindenden Au-NP mit L-Selektin eine relative Bindung von 100 % und somit keine Inhibition erhalten. Es treten demzufolge keine messbaren unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Selektin und den NP auf.

Zusammenfassend wurden unabhängig von der Struktur für alle hier untersuchten polysulfatierten NP IC_{50} -Werte im pikomolaren Bereich erzielt. Die Struktur des Liganden und hierbei insbesondere die räumliche Anordnung der für die Bindung an Selektin zur Verfügung stehenden Gruppen übten einen starken Einfluss auf die Bindungseigenschaften der NP aus. Mit komplexeren Strukturen konnte außerdem ein selektives Bindungsverhalten an L- und P-Selektin erhalten werden. P-Selektivität trat dabei besonders bei leicht formbaren und sterisch wenig anspruchsvollen Liganden auf. Einfache Strukturen inhibierten beide Selektine mit ähnlichen IC_{50} -Werten. Eine zuverlässige Voraussage der

⁹ Das Polymer Pol1 wurde von Marie Weinhardt synthetisiert.

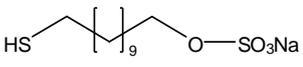
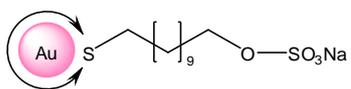
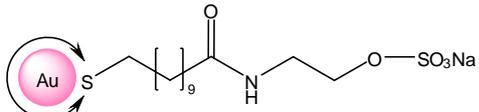
Bindungseigenschaften eines auf einem NP immobilisierten Moleküls gestaltet sich jedoch schwierig, denn einige für die Bindungseigenschaften entscheidende Parameter können sich während des Bindungsprozesses verändern. Die Bindungstasche kann sich beispielsweise bis zu einem bestimmten Grad an das angebotene Substrat anpassen. Außerdem können Konformationswechsel der auf dem NP präsentierten Strukturen induziert werden, welche eine andere räumliche Orientierung der bindenden Gruppen zur Folge haben können. Eine Korrelation zwischen bindender Struktur und Struktur der Bindungstasche gestaltet sich daher schwierig.

3.3.4 Einfluss der Peptidbindung

In diesem Projekt wurde die Amidbindung als verbindende Gruppe zwischen stabilisierender Alkylkette und funktioneller Gruppe gewählt. Zum einen beruhte diese Entscheidung, wie bereits in Abschnitt 3.1 näher erläutert, auf der Vielzahl literaturbekannter Kupplungsreaktionen, welche die für die NP-Funktionalisierung notwendigen Voraussetzungen erfüllen. Zum anderen weist die Amidbindung eine hohe Biokompatibilität auf. Sie ist stabil unter physiologischen Bedingungen und kommt in allen biologischen Systemen vor.

Die räumliche Nähe auf der NP-Oberfläche kann zu Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidbindungen der Liganden führen. Diese führen vermutlich zu einer geringeren Flexibilität der Liganden auf der NP-Oberfläche und auf diese Weise zu einer Versteifung der Ligandenhülle. Um zu untersuchen, welchen Einfluss dieser Effekt auf die Bindungseigenschaften der NP ausübt, wurden die IC_{50} -Werte MUDSulfat-koordinierter Au-NP für L-, P- und E-Selektin bestimmt. Die Synthese des Liganden (siehe Abbildung 3.27) sowie die Kolloidfunktionalisierung (siehe Abbildung 3.29) wurden bereits in Abschnitt 3.2.2 vorgestellt. Die Struktur von MUDSulfat ähnelt der des Liganden von **NP6** (siehe Tabelle 3.15). Die Gesamtlänge von MUDSulfat ist aufgrund der geringeren Anzahl an CH_2 -Gruppen etwas kürzer, aber beide Liganden werden über eine Thiol-Funktion an die Goldoberfläche gebunden und präsentieren solvensexponiert eine Sulfat-Funktion. Im Unterschied zum Liganden von **NP6** besitzt MUDSulfat keine Peptidbindung. In Tabelle 3.15 sind die IC_{50} -Werte von MUDSulfat, MUDSulfat-koordinierten Au-NP (**NP19**) und **NP6** aufgeführt.

Tabelle 3.15: Vergleich der IC₅₀-Werte ohne und mit Peptidbindung (N.I. = nicht inhibierend). Der Durchmesser der Au-NP beträgt ca. 6 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC ₅₀ L-Selektin	IC ₅₀ P-Selektin	IC ₅₀ E-Selektin
	MUDSulfat	30 µM	40 µM	N.I.
	NP19	150 pM	30 pM	> 1 nM
	NP6	180 pM	215 pM	nicht gemessen

Sogar in monomerer Form besitzt MUDSulfat einen IC₅₀-Wert im µmolaren Bereich. Die multivalente Präsentation verbessert aber auch in diesem Fall die Bindung an die untersuchten Selektine, so dass **NP19** für L- und P-Selektin IC₅₀-Werte im pikomolaren Bereich erzielt. Während die für **NP19** und **NP6** ermittelten IC₅₀-Werte für L-Selektin sich nicht signifikant unterscheiden, wurde für P-Selektin ein deutlicher Unterschied festgestellt. **NP6** bindet P-Selektin nur geringfügig schlechter als L-Selektin. Der IC₅₀-Wert für P-Selektin ist um den Faktor 1,2 größer als der für L-Selektin. **NP19** dagegen bindet P-Selektin deutlich besser als L-Selektin. Der IC₅₀-Wert für L-Selektin ist um den Faktor 5 größer als der für P-Selektin.

Eine mögliche Erklärung für diese starke Abhängigkeit des Einflusses der Peptidbindung vom jeweiligen Selektin liefert die nähere Betrachtung der an der Bindung an L- und P-Selektin beteiligten Wechselwirkungen. Eine Arbeit von *Klopocki et al.* [209] beschäftigt sich unter anderem mit dem Einfluss hydrophober Wechselwirkungen auf die Bindungseigenschaften von PSGL-1 an L- und P-Selektin. Dabei wurde festgestellt, dass bei der Bindung von PSGL-1 an P-Selektin hydrophobe Wechselwirkungen zwischen zwei Leucin- und einem Prolinrest des PSGL-1 und einem Histidinrest des P-Selektins auftreten. Vergleichbare Wechselwirkungen wurden im Fall von L-Selektin nicht gefunden. Hiervon abgesehen schienen die bei der Bindung von PSGL-1 beteiligten Oberflächen auf L- und P-Selektin kraftfreien Messungen zufolge ähnlich zu sein. Die Anwesenheit der Peptidbindung reduziert oder verhindert vermutlich bei **NP6** die hydrophoben Wechselwirkungen der Alkylkette mit P-Selektin, während die Alkylkette bei **NP19** für hydrophobe Wechselwirkungen zur Verfügung steht. Dies kann zum einen auf die größere räumliche Distanz der hydrophoben Kette von der Bindungstasche zurückzuführen sein. Zum anderen könnte aber auch die

Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidbindungen der Liganden den Zugang zur hydrophoben Kette erschweren. Dies würde erklären, warum die Anwesenheit der Amidbindung keinen signifikanten Einfluss auf den IC_{50} -Wert bei L-Selektin aufweist, aber zu einem detektierbar schlechteren IC_{50} -Wert bei P-Selektin führt.

Auch die in Anwesenheit der Amidbindung vermutlich geringere Beweglichkeit der Liganden könnte für die Bindung der NP an P-Selektin nachteilhaft sein, während dieser Parameter für die Bindung an L-Selektin offensichtlich keine große Rolle spielt. Die höhere Flexibilität der Liganden ermöglicht **NP19** eventuell eine bessere Anpassung der Ausrichtung der funktionellen Gruppen an die Bindungstasche von P-Selektin. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits bei der Untersuchung des Einflusses der Ligandstruktur gemacht. Auch hier führten die flexibleren, sterisch weniger anspruchsvollen Liganden zu deutlich niedrigeren IC_{50} -Werten für P-Selektin.

3.3.5 Einfluss der Kettenlänge

Neben dem solvensexponierten Molekülteil des Liganden kann auch die Länge der hydrophoben Alkylkette verändert werden. Hydrophobe Wechselwirkungen spielen, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert, bei der Interaktion von Selektinen, insbesondere von P- [209] und E-Selektin [210, 211], mit ihren Liganden eine Rolle und können bei den in diesem Projekt untersuchten Liganden vermutlich durch die zur Stabilisierung der NP notwendige unverzweigte Alkylkette adressiert werden. Eine Veränderung der Kettenlänge könnte sich daher auf die Bindungseigenschaften der NP auswirken. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt näher beschrieben, wirkt sich die Anwesenheit einer Peptidbindung zwischen solvensexponierter funktioneller Gruppe und Alkylkette allerdings negativ auf die Bindungseigenschaften der NP an P-Selektin aus, vermutlich indem sie die hydrophoben Wechselwirkungen der Alkylkette mit P-Selektin reduziert oder verhindert. Aber selbst in Abwesenheit hydrophober Wechselwirkungen zwischen NP und Selektin könnte die Länge der Alkylkette eine wesentliche Rolle spielen, denn sie wirkt sich auch auf die Ordnung der Liganden auf der NP-Oberfläche aus [212]. Dieser Effekt könnte aufgrund veränderter Flexibilität der Endgruppen sowie einer veränderten Zugänglichkeit zur Alkylkette ebenfalls zu veränderten Bindungseigenschaften der NP an die Selektine führen.

In weiteren Versuchen wurde anhand von drei unterschiedlichen Kettenlängen (C_6 , C_8 und C_{11}) der Einfluss der Alkylkettenlänge auf die Bindungseigenschaften der NP untersucht. Da **NP7** sich in den bisherigen Untersuchungen als das Kolloid mit den besten Bindungseigenschaften ausgezeichnet hat, wurde der Serinol-funktionalisierte Ligand als solvensexponierte funktionelle Gruppe ausgewählt.

Die vollständige Verdrängung des DT von der Kolloidoberfläche durch Liganden mit einer deutlich kürzeren Alkylkette gestaltet sich schwierig. Daher wurden in diesem Fall nicht die 6 nm großen DT-koord. Au-NP, sondern die 14 nm großen Citrat-koord. Au-NP als Ausgangsmaterial verwendet. Citrat lässt sich auch durch kurzkettinge Thiole vollständig von der NP-Oberfläche verdrängen. Problematisch ist allerdings der Ligandenaustausch von Citrat gegen einen N-Hydroxysuccinimidester-funktionalisierten Liganden. Die Citrat-koordinierten Au-NP ließen sich nicht aggregationsfrei in DMF überführen und der Versuch einer Funktionalisierung mit MUDHSE in einem DMF-Wasser-Gemisch führte ebenfalls zu Partikeln, welche in DMF Aggregate bildeten. Aus diesem Grund wurden Amidbindungs-knüpfung und Sulfatierung der Liganden in Abwesenheit der Partikel durchgeführt, so dass der anschließende Ligandenaustausch problemfrei im Einphasensystem in Wasser durchgeführt werden konnte.

Die Synthese der Liganden erfolgte nach den in Abbildung 3.72 und Abbildung 3.73 gezeigten Schemata. Durch nukleophile Substitution mit Kaliumthioacetat wurde aus der ω -Bromocarbonsäure die S-Acetyl-Sulfanylcarbonsäure hergestellt, welche dann durch Umsetzung mit NHS und DCC in den S-Acetyl-Sulfanylalkyl-N-Hydroxysuccinimidester überführt wurde (Abbildung 3.72).

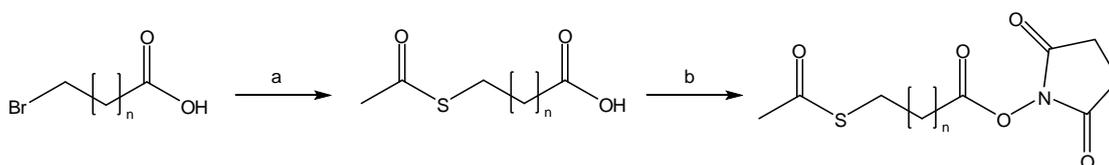


Abbildung 3.72: Allgemeines Reaktionsschema zur Synthese von S-Acetyl-Sulfanylalkyl-N-Hydroxysuccinimidestern mit verschiedenen Kettenlängen ($n = 4, 6, 9$). Reagenzien und Bedingungen:
 a) Kaliumthioacetat, DMF, RT, 2 h, ($n = 4$: 72 %; $n = 6$: 60 %; $n = 9$: 86 %), b) DCC, NHS, CH_2Cl_2 , RT, 18 h ($n = 4$: 99 %; $n = 6$: 92 %; $n = 9$: 99 %).

Die S-Acetyl-Sulfanylalkyl-N-Hydroxysuccinimidester wurden dann mit Serinol unter Amidbindungs-knüpfung umgesetzt (Abbildung 3.73 a), mit SO_3 -DMF-Komplex sulfatiert und ohne weitere Aufarbeitung mit Natronlauge entschützt (Abbildung 3.73 b).

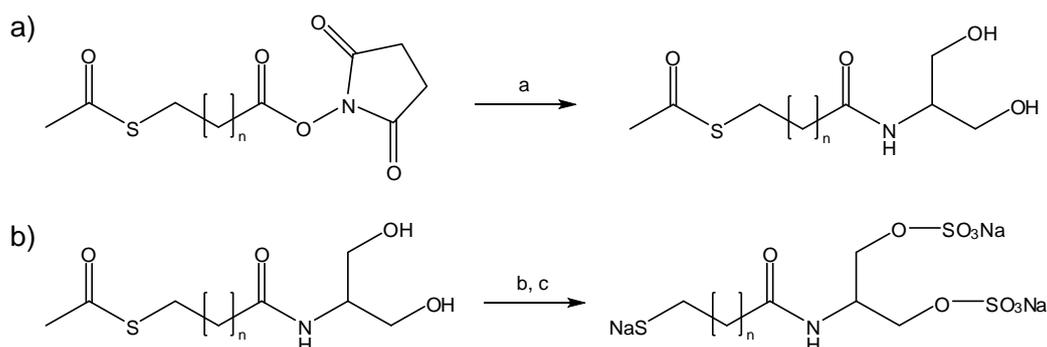


Abbildung 3.73: Allgemeines Reaktionsschema zur Umsetzung der S-Acetyl-Sulfanylalkyl-N-Hydroxysuccinimidester mit Serinol und anschließende Sulfatierung (n = 4, 6, 9). Reagenzien- und Bedingungen: a) Serinol, DMF, RT, 16 h, (n = 4: 30 %; n = 6: 47 %; n = 9: 85 %), b) SO₃·DMF, DMF, RT, 1 h, c) 0.2 M NaOH, 5 h, (n = 9: 48 %).

Aufgrund des variierenden Löslichkeitsverhaltens in Abhängigkeit von der Alkylkettenlänge gestaltete sich die Aufarbeitung unterschiedlich. Eine Optimierung der Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen wurde nicht durchgeführt. Da in DC-Kontrollen keine Edukte mehr nachgewiesen wurden, sollte insbesondere eine Verbesserung der Isolierungsmethoden zu deutlichen Ausbeutegewinnen führen.

Die Liganden wurden durch Ligandenaustausch, wie in Abbildung 3.74 beschrieben, auf den Au-NP immobilisiert. Hierzu wurde der Ligand in wenig Wasser gelöst und unter starkem Rühren zu der Kolloidlösung gegeben. Nach 24 h wurde die Kolloidlösung auf ca. die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingengt und die resultierenden wasserlöslichen Kolloide mittels Dialyse gegen Wasser gereinigt.

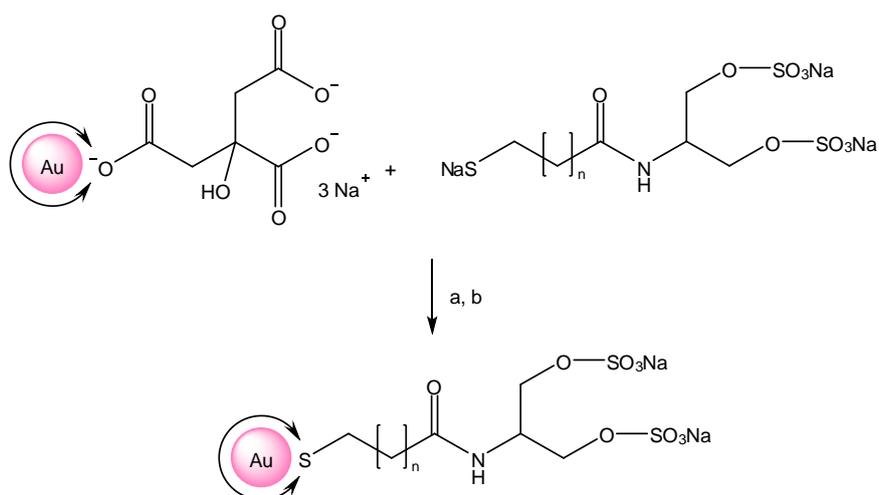
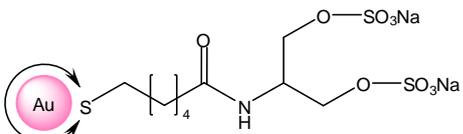
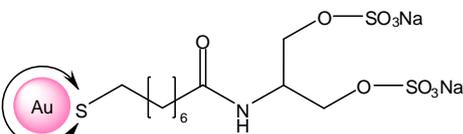
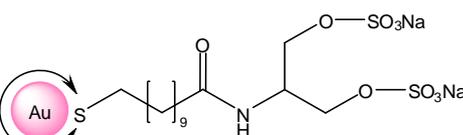


Abbildung 3.74: Funktionalisierung Citrat-koordin. Au-NP mit Liganden, welche unterschiedlich lange Alkylketten aufweisen, durch Ligandenaustausch (d = 14 nm) (NP20-22). Reagenzien und Bedingungen: a) H₂O, RT, 24 h, b) Dialyse gegen H₂O.

In Tabelle 3.16 sind die IC_{50} -Werte für die Kolloide mit unterschiedlich langen Alkylketten aufgeführt. Im Fall von L-Selektin unterscheiden sich die Werte für **NP21** und **NP22** nicht signifikant, während der IC_{50} -Wert für **NP20** sich verdoppelt. Es ist somit auch für L-Selektin ein Einfluss der Alkylkettenlänge auf die Bindungseigenschaften zu beobachten, obwohl für L-Selektin nach den in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Ergebnissen keine Beteiligung der Alkylkette an der Bindung zu erwarten wäre. P-Selektin wird von allen drei Kolloiden schlechter gebunden als L-Selektin. Die IC_{50} -Werte nehmen hier mit sinkender Kettenlänge stark zu. Interessanterweise wird auch E-Selektin von den beiden NP mit kürzerer Alkylkettenlänge gebunden, während für **NP22** keine Wechselwirkungen mit E-Selektin beobachtet wurden.

Tabelle 3.16: Vergleich der IC_{50} -Werte bei unterschiedlich langen Kettenlängen. Der Durchmesser der Au-NP beträgt ca. 14 nm.

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50} L-Selektin	IC_{50} P-Selektin	IC_{50} E-Selektin
	NP20	160 pM	540 pM	470 pM
	NP21	70 pM	220 pM	250 pM
	NP22	65 pM	95 pM	N.I.

Im Bereich von C_6 bis C_9 sinkt der IC_{50} -Wert für L- und P-Selektin demzufolge mit steigender Alkylkettenlänge und verbessert sich somit das Bindungsverhalten der untersuchten NP an L- und P-Selektin. Die für eine gute Stabilisierung der NP notwendige Alkylkette übt demzufolge ebenfalls einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften aus. Vorteilhafterweise für spätere Anwendungen der NP sind die längeren Alkylketten auch besser zur Stabilisierung der NP geeignet.

Der beobachtete Effekt ist vermutlich eher auf eine Veränderung der Ligandordnung auf der NP-Oberfläche zurückzuführen als auf veränderte Wechselwirkungen zwischen Selektin und

Alkylkette. Hierfür spricht, dass sich nicht nur die IC_{50} -Werte für P- und E-Selektin, sondern auch die von L-Selektin deutlich verändern. Die Liganden aller in Tabelle 3.16 aufgeführten NP besitzen Amidbindungen zwischen Alkylkette und solvensexponierter funktioneller Gruppe. Starke Wechselwirkungen zwischen der Alkylkette und Selektin waren daher nicht zu erwarten.

Eine Verkürzung der Alkylkette könnte auch zu einer im Vergleich zu den Liganden mit längerer Alkylkette geringeren Anzahl funktioneller Gruppen pro Fläche führen, denn der pro Ligand beanspruchte Raum vergrößert sich etwas. Ein allgemeines Schema hierzu ist in Abbildung 3.76 gezeigt.

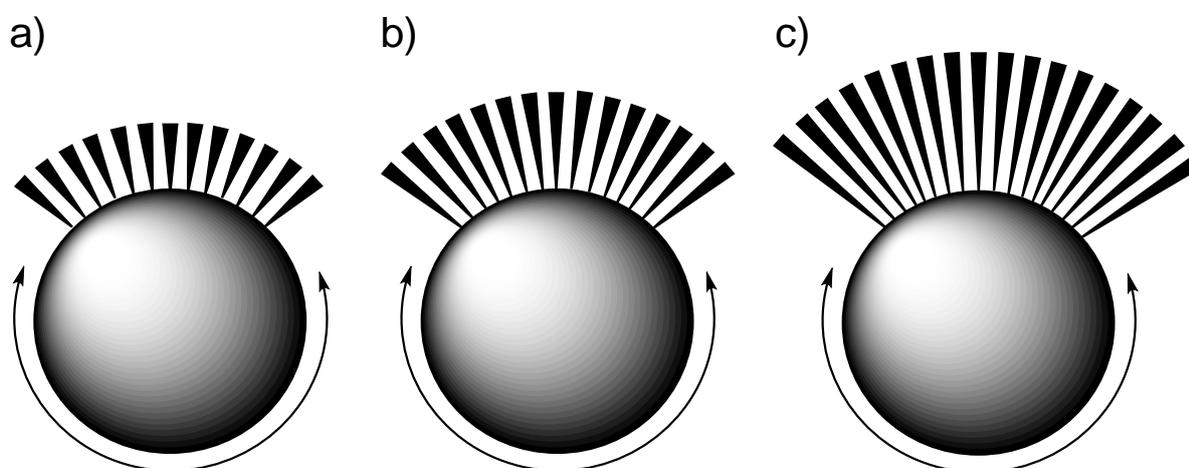


Abbildung 3.76: Schema zum Einfluss der Kettenlänge auf die Anzahl der Liganden pro Fläche auf der NP-Oberfläche. Der Raumanpruch der Liganden wird durch einen Kegel symbolisiert. Von a) nach c) nimmt die Länge der Liganden bei gleichbleibender Endgruppe zu. Dadurch kann die Anzahl der pro Fläche gebundenen Liganden bei gleichbleibendem Abstand der Endgruppen zunehmen.

Die starke Abhängigkeit der Bindungseigenschaften der NP von der Anzahl der auf der Oberfläche gebundenen Liganden deutete sich bereits mehrfach an, beispielsweise bei den unterschiedlichen IC_{50} -Werten für verschiedene NP-Chargen (Abschnitt 3.3.2).

Durch Variation der Alkylkettenlänge wird allerdings auch der hydrodynamische Radius der Partikel verändert. Mit zunehmender Alkylkettenlänge des Liganden steigt der hydrodynamische Radius der NP. Eine genauere Untersuchung des Einflusses dieses Faktors auf die Bindungseigenschaften der NP wird im folgenden Abschnitt vorgestellt. Für 6 und 14 nm große NP wurden bei identischer Funktionalisierung unterschiedliche IC_{50} -Werte gemessen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der bei Variation der Alkylkettenlänge beobachtete Effekt auch auf die Veränderung der NP-Größe zurückzuführen ist.

3.3.6 Einfluss der Nanopartikelgröße

Aufgrund der positiven Ergebnisse mit den 6 nm-großen Au-Kolloiden wurde zur weiteren Optimierung der IC_{50} -Werte der Einfluss der Partikelkerngröße untersucht. Hierzu wurden die in Abschnitt 3.1 vorgestellten Au-NP mit 6 und 14 nm Kerndurchmesser mit drei unterschiedlichen Liganden funktionalisiert. Als zu immobilisierende Amine wurden Ethanolamin, Serinol und Tris ausgewählt.

Die Funktionalisierung der 6 nm großen Au-NP mit diesen primären Aminen wurde bereits in Abschnitt 3.3.1 näher beschrieben (siehe Abbildung 3.69 und Abbildung 3.70). Eine Übertragung dieser Funktionalisierungsmethode auf die Citrat-koord. Au-NP ist nicht möglich. In Abschnitt 3.3.5 wurden die Gründe hierfür bereits näher erläutert. Für die Funktionalisierung der Au-NP mit einem im Durchmesser 14 nm großen Kern wurden daher Amidbindungsknüpfung und Sulfatierung in Abwesenheit der NP durchgeführt und der vollständig synthetisierte Ligand durch Ligandenaustauschreaktion auf den Citrat-koord. Au-NP immobilisiert.

Die Synthese der Liganden erfolgte in Analogie zur Synthese der in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Liganden. S-Acetyl-Sulfanylundecansäure wurde durch nukleophile Substitution mit Kaliumthioacetat aus 11-Bromoundecansäure hergestellt und mit NHS und DCC in den S-Acetyl-Sulfanylundecansäure-N-Hydroxysuccinimidester überführt (siehe Abbildung 3.77 a).

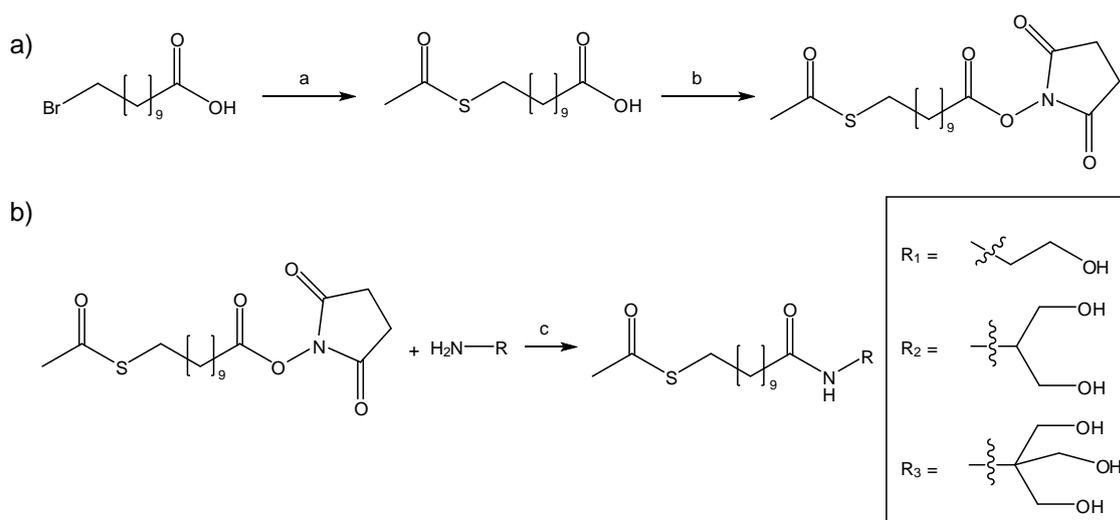


Abbildung 3.77: Reaktionsschema (a) zur Synthese von S-Acetylsulfanylundecansäure-N-hydroxysuccinimidester und (b) die anschließende Umsetzung mit verschiedenen primären Aminen ($R_1 =$ Ethanolamin, $R_2 =$ Serinol, $R_3 =$ Tris). Reagenzien und Bedingungen: a) Kaliumthioacetat, DMF, RT, 2 h, 86 %, b) DCC, NHS, CH_2Cl_2 , RT, 18 h, 99 %, c) DMF, RT, 3-18 h, (R_1 : 82 % ; R_2 : 85 % ; R_3 : 73 %).

Der S-Acetyl-Sulfanylundecansäure-N-Hydroxysuccinimidester wurde dann mit den verschiedenen primären Aminen unter Amidbindungsknüpfung umgesetzt (Abbildung 3.77 b), mit $\text{SO}_3\text{-DMF}$ -Komplex sulfatiert und ohne weitere Aufarbeitung mit Natronlauge entschützt (Abbildung 3.78).

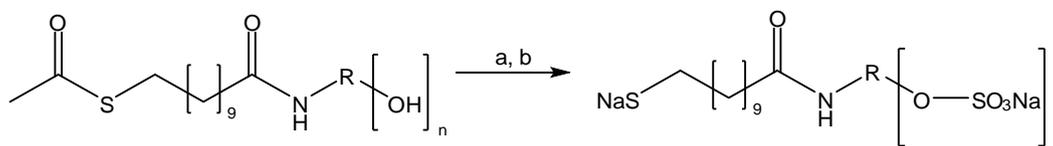


Abbildung 3.78: Allgemeines Reaktionsschema zur Sulfatierung verschiedener alkoholhaltiger Liganden ($n = 1 - 3$). Reagenzien und Bedingungen: a) $\text{SO}_3\cdot\text{DMF}$, DMF, RT, 1 h, b) 0.2 M NaOH, 5 h, (R_1 : 55 % ; R_2 : 48 % ; R_3 : 53 %).

Die Immobilisierung der Liganden auf den Citrat-koord. Au-NP erfolgte, wie in Abbildung 3.79 beschrieben, durch Ligandenaustausch im Einphasensystem. Hierzu wurde der Ligand in wenig Wasser gelöst und unter starkem Rühren zu der Kolloidlösung gegeben. Nach 24 h wurde die Kolloidlösung auf ca. die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingengt und die resultierenden wasserlöslichen Kolloide mittels Dialyse gegen Wasser gereinigt.

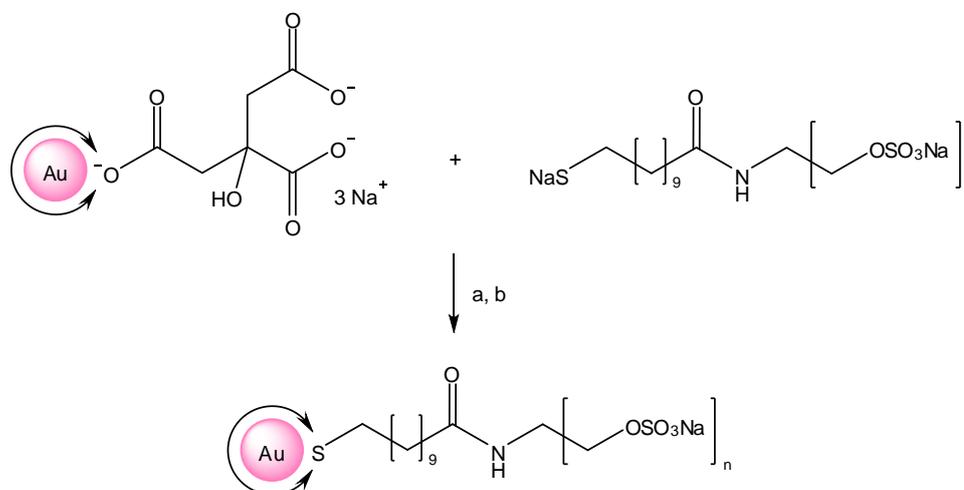
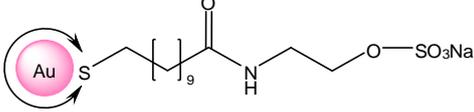
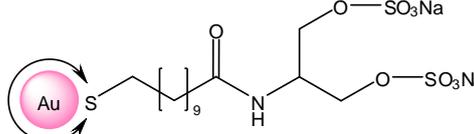
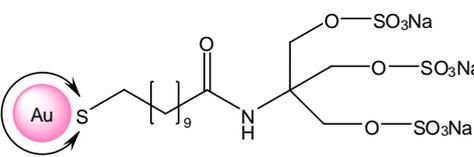


Abbildung 3.79: Funktionalisierung Citrat-koord. Au-NP mit Liganden, welche unterschiedlich viele ($n = 1 - 3$) Alkoholfunktionen aufweisen, durch Ligandenaustausch ($d = 14$ nm) (NP26-28). Reagenzien und Bedingungen: a) H_2O , RT, 24 h, b) Dialyse gegen H_2O .

Die Bindungseigenschaften der unterschiedlich funktionalisierten 6 nm und 14 nm großen Au-NP gegenüber L- und P-Selektin wurden mit dem kompetitiven Bindungsassay untersucht. In Tabelle 3.17 sind die auf diese Weise bestimmten IC_{50} -Werte für L-Selektin aufgeführt.

Tabelle 3.17: IC_{50} -Werte von Au-NP mit unterschiedlichen Nettoladungen und Durchmessern.

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50} L-Selektin (d = 6 nm)	IC_{50} L-Selektin (d = 14 nm)
	NP6 NP23	180 μ M	125 μ M
	NP7 NP22	20 μ M	65 μ M
	NP8 NP24	70 μ M	200 μ M

Wie bereits für die 6 nm großen Au-NP beobachtet, führt auch bei den 14 nm großen Au-NP die Funktionalisierung mit dem Diol Serinol zu den niedrigsten IC_{50} -Werten. Bei den aus Serinol (**NP7** und **NP22**) und aus Tris (**NP8** und **NP24**) hergestellten sulfatierten NP besaßen jeweils die kleineren NP die niedrigeren IC_{50} -Werte und somit das bessere Bindungsverhalten an L-Selektin. Die aus Ethanolamin hergestellten NP (**NP6** und **NP23**) wiesen dagegen für die größeren NP den kleineren IC_{50} -Wert auf.

Eine Erklärung für die Abhängigkeit der Bindungseigenschaften von der NP-Größe könnte die Veränderung des Krümmungsradius der Partikeloberfläche sein. Mit steigendem Partikeldurchmesser sinkt der Krümmungsgrad der Partikeloberfläche und die Liganden können sich in immer dichteren Schichten zusammenlagern. Dieser Effekt wurde von *Daniel* und *Astruc* am Beispiel von DT-koodinierten Au-NP [35] und von *Cederquist* und *Keating* an DNA-funktionalisierten Au-NP [213] gezeigt. Dabei sinkt der Abstand der funktionellen Gruppen zueinander (siehe Abbildung 3.80).

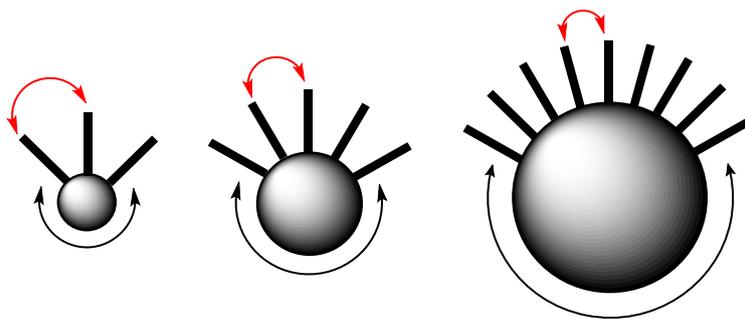


Abbildung 3.80: Schema zur Veränderung des Abstands zwischen den solvensexponierten Liganden in Abhängigkeit von der Partikelgröße.

Die Ergebnisse dieser Messreihe weisen somit darauf hin, dass der Abstand der negativ geladenen funktionellen Gruppen voneinander eine wesentliche Rolle bei der Stärke der Wechselwirkung spielt. Ein ähnlicher Effekt wird auch durch Ausdünnung der Ligandenhülle erzielt. Auch dabei wird der Abstand zwischen den solvensexponierten Enden der Liganden vergrößert. Ein Indiz dafür, dass die Ausdünnung der Ligandenhülle vermutlich einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften ausübt, wurde bereits vorgestellt.

Die für die medizinische Anwendung optimale NP-Größe wird aber nicht nur von den besten Bindungseigenschaften bestimmt, sondern auch von dem Verhalten der Partikel in dem für die jeweilige Anwendung relevanten biologischen System. Die Größe der NP spielt eine wesentliche Rolle für die Toxizität der NP und die Verteilung und Aufenthaltsdauer in biologischen Systemen. Dabei ist zu beachten, dass in jeder Charge NP eine innewohnende Polydispersität vorhanden ist, welche für ein vorhersagbares Verhalten der NP kontrolliert werden muss. Die Größe der NP kann sich zudem nach der Synthese durch die Überführung in biologische Flüssigkeiten weiter verändern, beispielsweise durch Aggregation, und dabei verschiedenste Größen und Formen annehmen.

Eine Möglichkeit den für die Bindungseigenschaften optimalen Krümmungsgrad der Oberfläche beizubehalten, aber gleichzeitig den Durchmesser des medizinisch wirksamen Partikels zu vergrößern, um eine bessere Bioverfügbarkeit zu erzielen oder den vorzeitigen Abbau der Partikel zu verhindern, ist die Trägerung der Partikel auf einem größeren. Bei den stark negativ geladenen Partikeln bietet sich beispielsweise die Trägerung auf positiv geladenen Silicapartikeln an. Eine Verringerung der Oberflächenkrümmung bei gleichbleibender oder kleinerer NP-Größe könnte beispielsweise durch geschickte Wahl anderer Partikelformen, beispielweise eines Würfels, erzielt werden. Hierbei ist allerdings wiederum zu beachten, dass das Verhalten der NP, insbesondere in fließenden biologischen Systemen, auch durch die Partikelform beeinflusst wird.

3.3.7 Vergleich des Einflusses der untersuchten Faktoren auf den IC_{50} -Wert

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Bindung zwischen Selektin und einigen potentiellen Bindungspartnern untersucht, wobei der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf den mit einem kompetitiven Bindungsassay erhaltenen IC_{50} -Wert bestimmt wurde. Während die verschiedenen untersuchten Liganden in ihrer freien Form keine oder nur eine geringe inhibierende Wirkung gegenüber Selektinen aufwiesen, wurde durch Immobilisierung dieser Strukturen auf einem NP eine deutliche Bindungsverstärkung für L- und P-Selektin mit IC_{50} -Werten im pikomolaren Bereich erzielt. Die multivalente Präsentation der funktionellen Gruppen stellt somit von den in diesem Projekt behandelten Faktoren denjenigen mit dem größten Einfluss auf das Bindungsverhalten dar.

In Abbildung 3.81 ist schematisch der Aufbau des Kolloids **NP7** gezeigt, welches von den hier untersuchten NP die besten IC_{50} -Werte für L- und P-Selektin aufwies. Mögliche Variationsstellen dieser Ligandstruktur sind im Schema farblich markiert. Mit Ausnahme der Kopfgruppe, welche der Immobilisierung des Liganden auf der NP-Oberfläche diene, wurden für die einzelnen Komponenten verschiedene Strukturen getestet. Eine hohe Stabilität der Kolloide gegenüber Aggregation und Ligandverlust ist Voraussetzung für eine hohe Biokompatibilität und somit für die medizinische Anwendbarkeit der NP. Daher wurden die Liganden aller hier untersuchten Kolloide über eine Thiofunktion, welche eine hohe Affinität zur Goldoberfläche besitzt, an die Partikeloberfläche gebunden.

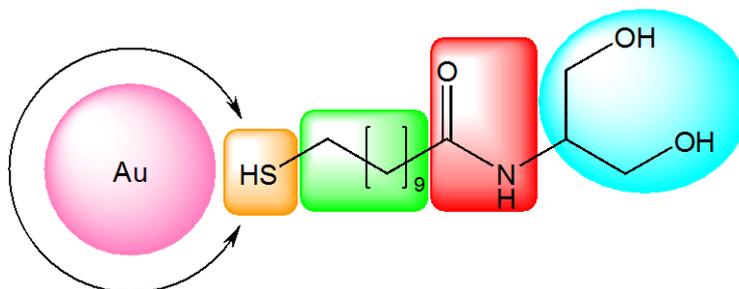


Abbildung 3.81: Schema zu den unterschiedlichen variierbaren Bauteilen der in diesem Projekt untersuchten NP am Beispiel von NP7, dem Kolloid mit dem niedrigsten IC_{50} -Wert. Komponenten: NP-Größe und -Material, Kopfgruppe, Alkylkette, Verknüpfung, Selektin-bindende Endgruppe.

Anhand unterschiedlichster Amine wurde der Einfluss der Struktur der Selektin-bindenden Endgruppe untersucht. Auf der Oberfläche von Au-NP immobilisiert konnten sogar solch einfache Strukturen wie sulfatiertes Serinol (**NP7**) beeindruckende IC_{50} -Werte liefern. Im Vergleich zu den komplexen Strukturen der physiologischen Selektinliganden und den derzeit

klinisch angewandten antiinflammatorischen Pharmazeutika wurde die Struktur der hier untersuchten neuen Liganden auf die essentiellen Bindungsepitope reduziert und somit deutlich vereinfacht. Entscheidend für möglichst niedrige IC_{50} -Werte und somit gute Bindungseigenschaften an die Selektine erwies sich die Präsentation von Sulfatgruppen auf der Oberfläche der NP. Auch mit Carboxylatgruppen wurden im Fall von MUDS-koord. Au-NP IC_{50} -Werte im pikomolaren Bereich erzielt. Die Funktionalisierung mit Polyalkoholen führte zu in Wasser unlöslichen NP, welche nicht inhibierend wirkten (im Fall von L-Selektin) oder deutlich höhere IC_{50} -Werte aufwiesen (im Fall von P-Selektin) als deren sulfatierte Analoga. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass nicht nur die polyanionische Struktur der Ligandenhülle, sondern auch die Ausrichtung der negativen Ladungen auf der Oberfläche entscheidend ist für eine starke Selektin-NP-Wechselwirkung. Während Citrat-koord. Au-NP keine messbaren Wechselwirkungen mit den Selektinen eingingen, wurde mit MUDS-koord. Au-NP identischer Größe (siehe Anhang, Abschnitt 8.6) eine starke Inhibition von L-Selektin beobachtet. Beide Liganden präsentieren Carboxylat-Funktionen auf ihrer Oberfläche, unterscheiden sich aber in deren Verknüpfung an den NP und der räumlichen Orientierung zueinander. Sulfatierung der NP und zur Bindung geeignete Ausrichtung dieser Gruppen lieferten somit nach der multivalenten Präsentation die zweitgrößten Beiträge zu den Bindungseigenschaften der NP.

Bei den einfachen, aber sterisch anspruchsvolleren sulfatierten Strukturen wie Serinol oder Tris wiesen die entsprechenden über eine Amidbindung funktionalisierten Kolloide für L- und P-Selektin ein ähnliches Bindungsverhalten auf. Dagegen wurde bei einigen auf NP immobilisierten und sulfatierten Aminopyranen (**NP2** und **NP9**) und einem Aminofuran (**NP15**) eine Präferenz für eines der Selektine beobachtet. Ob L- oder P-Selektin bevorzugt gebunden wurde, hing dabei von der Struktur des immobilisierten Moleküls ab. Obwohl die synthetisch einfacheren Strukturen ähnliche oder teilweise sogar bessere IC_{50} -Werte für L- und P-Selektin liefern, bleibt daher auch die weitere Untersuchung der sulfatierten Kohlenhydratmimetika-funktionalisierten Au-NP interessant. Die Ähnlichkeit dieser NP-Oberfläche zu natürlich vorkommenden Substanzen könnte sich auch positiv auf die Verträglichkeit der NP im Körper auswirken. Zudem sind unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen aufgrund der komplexeren Struktur weniger wahrscheinlich.

Bei der Immobilisierung verschiedener Amine diente die Amidgruppe als Verknüpfung zwischen Selektin-bindender Gruppe und stabilisierender Alkylkette. Der Vergleich von MUDSulfat-koord. Au-NP (**NP19**), welche keine Amidbindung aufweisen, mit dem sehr

ähnlichen Kolloid **NP6**, welches keine Amidbindung besitzt, zeigte, dass sich die Anwesenheit dieser Gruppe, trotz ihrer nicht solvensexponierten Position, stark auf das Bindungsverhalten der NP auswirkt. Die Anwesenheit der Amidbindung hatte keinen signifikanten Einfluss auf den IC_{50} -Wert bei L-Selektin, führt aber zu einem detektierbar größeren IC_{50} -Wert bei P-Selektin. Dadurch wurde auch die Selektivität der NP für L- und P-Selektin beeinflusst. **NP6** weisen eine leichte Präferenz für L-Selektin auf, **NP19** dagegen eine deutlich Präferenz für P-Selektin.

Von den drei untersuchten Alkylkettenlängen (C_6 , C_8 und C_{11} , in Abbildung grün markiert) besaß das Kolloid mit der längsten Kette die besten Bindungseigenschaften, sowohl für L- als auch für P-Selektin. Im Gegensatz zu allen anderen in diesem Projekt untersuchten Kolloiden wurde bei den beiden mit kürzeren Alkylkettenlängen (C_6 und C_8) für E-Selektin eine Inhibition beobachtet. In weiterführenden Versuchen muss nun geklärt werden, ob sich diese Eigenschaft auch für andere Selektin-bindende Gruppen reproduzieren lässt.

Als weiterer entscheidender Faktor erwies sich die Größe der NP. Ob bei identischer Funktionalisierung größere oder kleinere Partikel bessere Bindungseigenschaften besaßen, hing stark von der Art der Funktionalisierung ab. Vermutlich ist dieser Effekt auf die Oberflächenkrümmung zurückzuführen, deren Optimum vom sterischen Anspruch des Liganden abhängt. Die Oberflächenbelegung des NP mit Liganden spielt dabei voraussichtlich ebenfalls eine Rolle.

Für weiterführende Anwendungen muss die Ursache für die von NP-Charge zu NP-Charge unterschiedlichen IC_{50} -Werte für identisch funktionalisierte Au-NP geklärt werden. Eine Untersuchung der Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes von der Oberflächenbelegung könnte auch hier Aufschluss bringen.

In einer 2009 publizierten Arbeit wurden sulfatierte sphärische Polymere untersucht, welche mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich (bezogen auf die Polymerpartikel-Konzentration) im Vergleich zu Heparin eine deutlich höhere Affinität zu L- und P-Selektin aufweisen [160]. Bei diesen Polymeren konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die Bindungsaffinität mit steigender Anzahl bindender Einheiten pro Polymer zunimmt und dass eine Sulfatierung der Partikel die Bindungsaffinität weiter erhöht. Auf NP lassen sich durch Wahl geeigneter Liganden deutlich höhere Funktionalisierungs- und somit Sulfatierungsgrade realisieren. Mit den sulfatierten Au-NP konnte auch eine weitere Verbesserung der Bindungsaffinität im Vergleich zu den Polymerpartikeln erzielt werden. Im Unterschied zu den sulfatierten

sphärischen Polymeren wurde mit den Au-NP sogar ein Sulfatierungsgrad erreicht, welcher den optimalen Sulfatierungsgrad überschreitet. Ein weiterer Vorteil von NP ist die mögliche Einführung weiterer nützlicher, beispielsweise magnetischer oder optischer, Eigenschaften über eine Variation des Partikelkern-Materials. Die Selektin-bindende Struktur müsste hierzu nicht wesentlich verändert werden.

Im Anhang (Abschnitt 8.6) sind alle auf Selektin-Bindung untersuchten Kolloidsorten mit ihren IC_{50} -Werten zusammenfassend aufgeführt.

3.3.8 TEM-Untersuchungen

Ergänzend zur quantitativen Bestimmung mit Hilfe des kompetitiven Bindungsassays wurde das Bindungsverhalten der Inhibitornanopartikel auch qualitativ mittels TEM untersucht. Mit dieser Methode kann ein Einblick in die Struktur der sich bildenden Aggregate gewonnen und deren Größe in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration bestimmt werden.

Aufgrund ihres besonders geringen IC_{50} -Wertes für L-Selektin wurden die sulfatierten Serfunkt. Au-NP (**NP7** und **NP22**) als Beispiel für Inhibitornanopartikel ausgewählt. Diese wurden unter mit dem Bindungsassay vergleichbaren Mischbedingungen und Inkubationszeiten mit L-Selektin-funkt. Au-NP gemischt und die resultierende Lösung mittels TEM untersucht. Zwei verschiedene Stöchiometrien der NP zueinander wurden dabei betrachtet. Zum einen wurden die Aggregate bei der IC_{50} -Konzentration und zum anderen bei einer deutlich höheren Konzentration an Inhibitornanopartikeln untersucht.

In Abbildung 3.82 sind Übersichts-TEM-Aufnahmen der Mischungen von **NP7** und L-Selektin-funkt. Au-NP gezeigt. Ohne **NP7** (Abbildung 3.82 a) liegt eine homogene Verteilung der im Durchschnitt 13 nm großen L-Selektin-funkt. Au-NP auf dem TEM-Grid vor. Da die Partikel sich in Puffer befinden und keine vollständige Abtrennung des organischen Materials nach der Funktionalisierung mit L-Selektin erfolgt, ist das TEM-Grid außerdem mit einer dünnen Schicht eines amorphen Materials überzogen.

In Anwesenheit von **NP7** findet eine Aggregation der NP statt, wobei die Größe der Aggregate mit zunehmender **NP7**-Konzentration steigt (Abbildung 3.82 b und c). Bei 20 pM **NP7**, welches der IC_{50} -Konzentration entspricht, bestehen die Aggregate durchschnittlich aus ca. 21 NP und besitzen eine durchschnittliche Größe von ca. 136 nm. Zwischen diesen Aggregaten liegen homogen verteilt einzelne L-Selektin-funkt. Au-NP. Das Verhältnis von

vereinzelt (und somit vermutlich zur Bindung auf der Chipoberfläche fähigen) und aggregierten L-Selektin-funkt. Au-NP liegt bei ca. 1:1. Dieses Verhältnis entspricht den Erwartungen, da bei dieser **NP7**-Konzentration noch 50 % der L-Selektin-funkt. Au-NP an der Chipoberfläche gebunden werden.

Deutlich größer sind die Aggregate bei einer **NP7**-Konzentration von 4.3 nM, welche im kompetitiven Bindungsassay zu einem vollständigen Verlust des Bindungssignals führt. Die TEM-Aufnahme bei diesen Bedingungen (Abbildung 3.82 c) zeigt ein großes Aggregat mit einem Durchmesser von ca. 2.3 μm . Nur wenige L-Selektin-funkt. Au-NP liegen vereinzelt auf dem Grid. Vermutlich sind diese durch Wechselwirkungen mit freiem Ligand, welcher sich durch Ablösen von der Partikeloberfläche in geringen Konzentrationen in der Lösung bildet, blockiert und daher nicht mehr in der Lage an die auf dem Chip präsentierten Liganden zu binden.

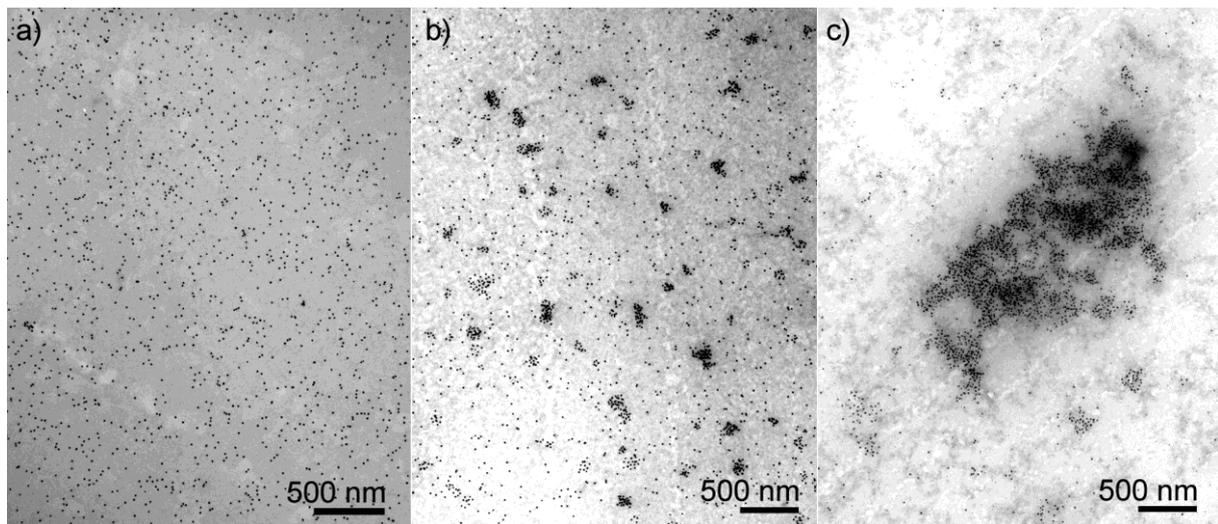


Abbildung 3.82: TEM-Aufnahmen der Mischungen von L-Selektin-funktionalisierten Au-NP und (a) 0 nM, (b) 20 pM und (c) 4.3 nM NP7.

Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich auch die im Durchschnitt nur ca. 6 nm großen **NP7** lokalisieren (siehe Abbildung 3.83). Diese sind bei der IC_{50} -Konzentration nahezu vollständig in den Aggregaten gebunden und in der Regel von 6 bis 8 L-Selektin-funktionalisierten Au-NP umgeben. Bei 4.3 nM **NP7** ist die Konzentration dieser NP in den Aggregaten deutlich höher im Vergleich zu den Aggregaten bei 20 pM **NP7**. Außerdem sind viele einzelne ca. 6 nm große Au-NP zu finden. Auch dies ist in guter Übereinstimmung mit den aus dem kompetitiven Bindungsassay ermittelten Werten. Bereits ab einer **NP7**-Konzentration von ca. 1 nM ist keine Bindung zwischen L-Selektin-funktionalisierten Au-NP und Chipoberfläche

mehr nachweisbar. Daher ist bei dieser ca. 4-fachen Konzentration eine große Zahl ungebundener **NP7** zu erwarten.

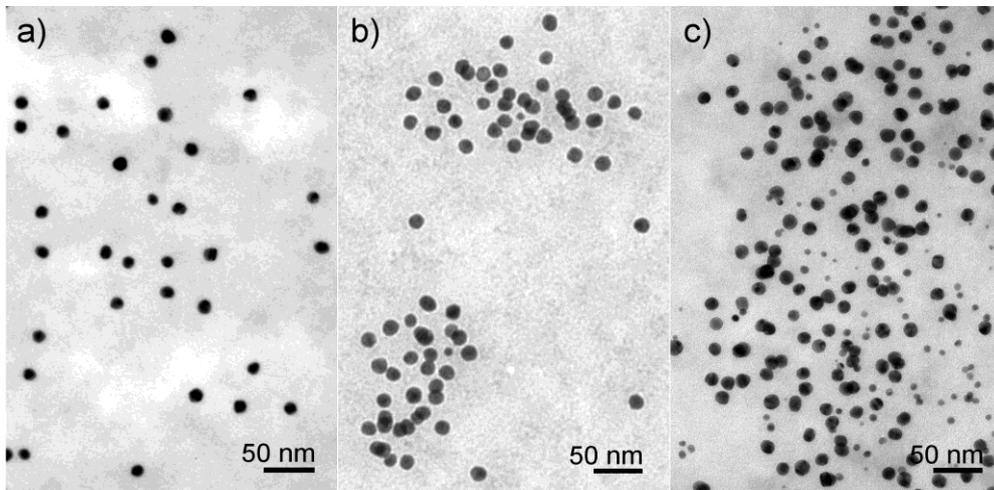


Abbildung 3.83: Vergrößerte Ausschnitte aus TEM-Aufnahmen der Mischungen von L-Selektin-funktionalisierten Au-NP und (a) 0 nM, (b) 20 pM und (c) 4.3 nM NP7.

Unabhängig von der **NP7**-Konzentration lassen sich in einigen Aggregaten keine **NP7** finden. Dies kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass durch die zweidimensionale Aufnahme die kleinen NP überdeckt werden und somit trotz Anwesenheit nicht visualisiert werden könnten. Eine exaktere Aussage über die Umgebung der **NP7** in Lösung könnten eventuell Kryo-TEM-Aufnahmen liefern.

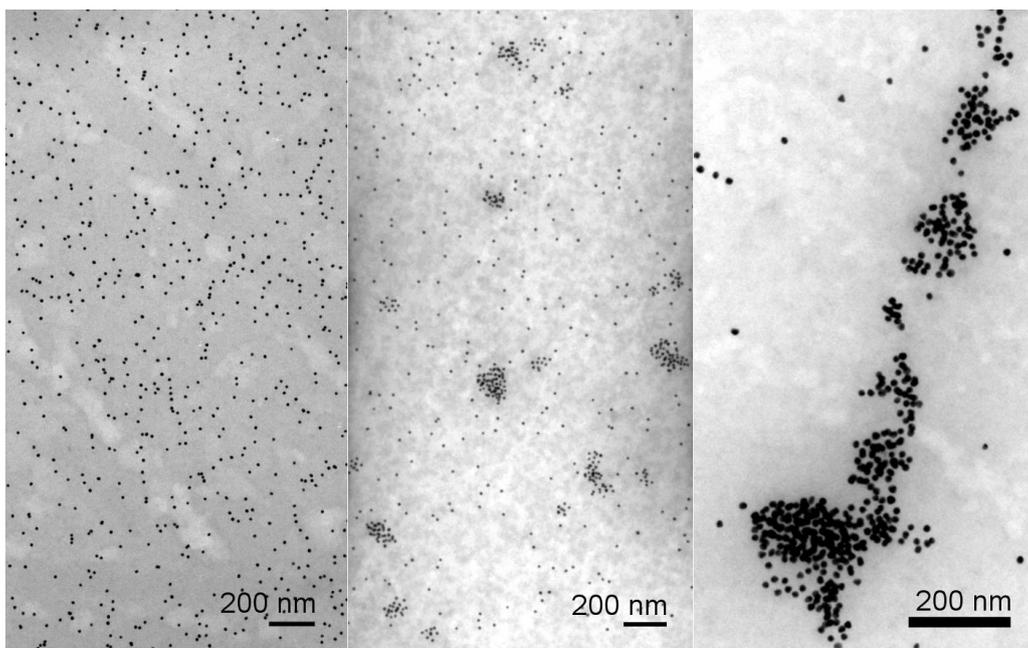


Abbildung 3.84: TEM-Aufnahmen der Mischungen von L-Selektin-funktionalisierten Au-NP und (a) 0 nM, (b) 75 pM und (c) 1.43 nM NP22.

Auch von Mischungen der sulfatierten Ser-funkt. Au-NP (**NP22**) mit einem mittleren Durchmesser von 14 nm und den 13 nm großen L-Selektin-funkt. Au-NP wurden TEM-Aufnahmen gemacht. Die Übersichtsaufnahmen (siehe Abbildung 3.84) zeigen ebenfalls eine mit steigender Inhibitoranopartikelkonzentration zunehmende Aggregation der Partikel. Aufgrund des geringen Größenunterschieds der Partikel kann allerdings nicht zwischen den beiden Partikelsorten unterschieden werden. Vergrößerte Ausschnitte dieser Aggregate liefern daher keine weiterführenden Informationen.

3.3.9 Zelltoxizität der NP

Neben den Bindungseigenschaften, der Stabilität und der Verteilung der NP in biologischen Systemen ist für *in vivo* – Anwendungen vor allem die Toxizität der NP eine entscheidende Größe. Daher wurde für eine erste Abschätzung die Zytotoxizität der NP an der L-Selektin exprimierenden Lymphozyten-Zelllinie *Jurkat* untersucht. Ermittelt wurde der Einfluss der Substanzen in Konzentrationen von 3-30000 pM auf die Zellproliferation (CellTiter 96A_{Queous} One Solution Cell Proliferation Assay der Firma *Promega*). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.18 gezeigt.

Tabelle 3.18: Zellvitalität in Gegenwart verschiedener NP-Konzentrationen. Untersucht wurden NP mit einem 6 nm großen Au-Kern und drei verschiedenen Ligandsystemen.

NP-Konzentration [pM]	Vitalität [%]		
	Au/MUDS (NP18)	Au/Ser sulf. (NP7)	Au/Syn3 sulf. (NP2)
0	100	100	100
30000	108	94	86
3000	99	98	96
300	94	107	105
30	81	109	101
3	82	86	98

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wird die Zellproliferation nur geringfügig beeinträchtigt. Interessanterweise scheint es zudem jeweils einen Konzentrationsbereich zu geben, der die Vitalität der Zellen eher positiv beeinflusst (Vitalität > 100 %). Ursache hierfür könnte sein, dass bei diesen Konzentrationen neben L-Selektin auch Wachstumsfaktoren von den Liganden optimal gebunden und den *Jurkat*-Zellen als Wachstumsstimulus präsentiert werden.

Die Partikel wiesen somit in den durchgeführten Experimenten keine messbare Zytotoxizität auf. Ihr Potential als medizinischer Wirkstoff wurde dadurch weiter ausgebaut. In einem Tiermodell soll nun die Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung der NP erfolgen.

3.3.10 Immobilisierung der NP in Polymerfasern

Für die spätere Anwendung einer Komponente spielt neben den medizinisch wirksamen Eigenschaften auch die Verabreichungsform eine wichtige Rolle. Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Ergebnisse deuten bereits stark auf eine antiinflammatorische Wirkung der dort beschriebenen NP hin, welche in einem Tiermodell weiter untersucht werden soll. Wünschenswert ist neben einer hohen Wirksamkeit aber auch eine einfache Möglichkeit der Verabreichung. Eine derzeit in der Arbeitsgruppe von *Wendorff* im Rahmen anderer Projekte untersuchte Lösung stellt die Immobilisierung von Wirkstoffen in Polymerfasern dar.

Polymerfasern mit Durchmessern im Nanometerbereich können durch Elektrospinnen erzeugt werden. Diese Technik wird in einem Übersichtsartikel von *Greiner* und *Wendorff* [214] näher beschrieben und in Abbildung 3.85 ist der Aufbau eines solchen Experiments schematisch dargestellt. An den Tropfen einer Polymerlösung oder –Schmelze, welcher sich an der Spitze einer Düse ausbildet, wird ein starkes elektrisches Feld angelegt. Die Spitze stellt dabei eine der Elektroden dar. Die Aufladung der Flüssigkeit führt zu einer konischen Verformung des Tropfens und schließlich zum Ausstoß eines Flüssigkeitsstrahls von der Spitze der Düse, welcher Richtung Gegenelektrode beschleunigt wird. Durch Verlängerung und Verdunstung des Lösungsmittels wird der Strahl immer dünner, bis sich feste Fasern auf dem Substrat, welches sich auf der Gegenelektrode befindet, ablagern [215].

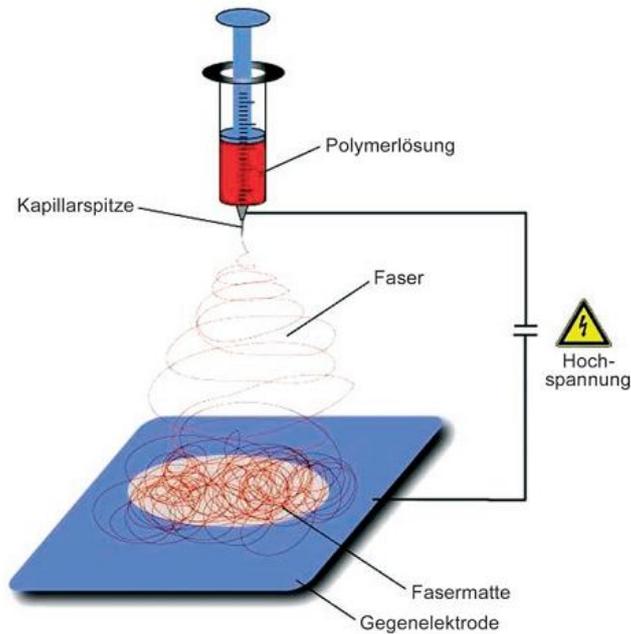


Abbildung 3.85: Schematischer Aufbau eines Elektrospinnexperiments [214].

Elektrospinnen ermöglicht auf diese Weise die Beschichtung unterschiedlichster Materialien mit einer dünnen Schicht von Polymerfasern. Ob eine Freisetzung der Additive aus diesen Polymerfasern erfolgt, hängt von der Stabilität der Fasern in den gegebenen Umgebungsbedingungen ab. Mit bioerodierbaren Polymeren wie beispielsweise Polylaktid und Poly(ϵ -caprolacton) lassen sich wirkstoffabgebende Vliese für biomedizinische Anwendungen herstellen [216, 217]. Eine Immobilisierung der NP in solchen Polymerfasern könnte somit eine über die Geschwindigkeit des Abbauprozesses gesteuerte zeitabhängige Freisetzung der NP ermöglichen.

Durch Variation des Aufbaus lassen sich unterschiedlichste Materialien in den Fasern immobilisieren, zum Beispiel Katalysatoren, Farbstoffe, Medikamente, Viren, lebende Bakterien und auch NP [218]. In den meisten Arbeiten, welche die Immobilisierung von NP in Polymerfasern durch Elektrospinnen beschreiben, werden die NP erst nach dem Spinnprozess, beispielsweise durch Reduktion eines coverspinnenen Metallsalzes, erzeugt. *Xu et al.* beispielsweise immobilisierten antibakterielle Ag-NP durch Reduktion von Silbernitrat in Polylaktidfasern [218]. Im Gegensatz zu dieser Methode, welche in der Regel zu Partikeln mit hoher Größendispersität führt, bietet das Verspinnen zuvor synthetisierter NP den Vorteil, dass Größe und Dispersität der Partikel besser kontrolliert und beeinflusst werden können und eine komplexe Funktionalisierung der NP möglich ist. Auf diese Weise wurden beispielsweise Co- [219] und ZnSe-NP [220] in Polymerfasern immobilisiert.

Um festzustellen, ob die im Rahmen dieses Projektes synthetisierten Au-NP den Bedingungen des Elektrosplinnens standhalten, wurden diese in Polyethylenoxid(PEO)-Fasern immobilisiert. Aufgrund ihrer besonders niedrigen IC_{50} -Werte wurden für diese Testversuche die sulfatierten Ser-funktionalisierten Au-NP, sowohl mit einem Durchmesser von 6 als auch 14 nm, verwendet. Versponnen wurde eine Lösung dieser NP in PEO (Bedingungen: 4 % PEO in Wasser).

Ein erstes Indiz für die erfolgreiche Immobilisierung lieferte die Farbe der Fasern. Dicke Faserschichten wiesen einen leichten Rot-Ton auf. Die so erhaltenen Fasern wurden mittels TEM charakterisiert. Aufnahmen beider Partikelsorten in PEO-Fasern sind in Abbildung 3.86 gezeigt. Die Partikel lagen, unabhängig von ihrer Größe, in den Fasern größtenteils vereinzelt vor.

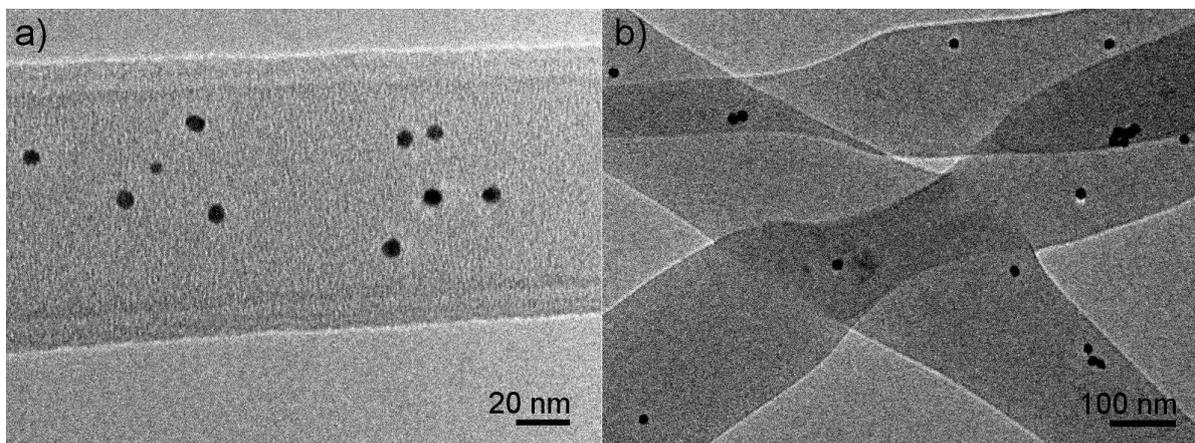


Abbildung 3.86: (a) NP7 und (b) NP22 in PEO-Fasern.

Die Vorversuche zeigen, dass eine Immobilisierung der funktionalisierten NP in Polymerfasern durch Elektrosplinnen möglich ist und dass diese annähernd homogen in den Fasern verteilt sind. Eine Charakterisierung der organischen Ligandenhülle der Partikel in den Fasern ist nicht möglich. Erst nach erneuter Freisetzung lässt sich prüfen, ob die antiinflammatorischen Eigenschaften der NP bei diesem Prozess erhalten bleiben. Die positiven Ergebnisse mit anderen Additiven [216, 221] legen allerdings die Vermutung nahe, dass die Ligandenhülle nicht verändert wurde.

Aus PEO-Fasern werden die NP in biologischen Systemen aufgrund der unter diesen Bedingungen hohen Stabilität von PEO nicht freigesetzt, so dass sich dieses Polymer nicht als Matrix für medizinische Anwendungen eignet. In fortführenden Versuchen soll daher das PEO gegen ein bioerodierbares Polymer, beispielsweise Polylaktid, ausgetauscht werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Nanotechnologie hat in den letzten Jahren deutlich an Interesse gewonnen. Obwohl sie noch am Anfang ihrer Entwicklung steht, zeigen erste erfolgreiche Anwendungen, beispielsweise bei optischen Systemen, in der chemischen Industrie und Automobilindustrie, bei der Umwelttechnik oder der Medizin [13], ihr großes Potenzial. Das Interesse an Nanomaterialien in den verschiedensten Bereichen beruht auf den einzigartigen optischen, elektronischen und katalytischen Eigenschaften, welche durch eine Nanostrukturierung erzielt werden können [102]. Das große Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis macht Nanomaterialien auch zu idealen Templaten für die Präsentation funktioneller Gruppen. In der vorliegenden Arbeit wurden NP unterschiedlicher Größe mit schmalen Größenverteilungen für zwei unterschiedliche Anwendungsbereiche synthetisiert und funktionalisiert.

Beruhend auf elektrostatischen Wechselwirkungen wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine Peptid-induzierte Aggregation von NP vorgestellt. Die Aggregation wurde dabei durch Zugabe verschiedener Peptide, welche eine *coiled-coil*-Struktur aufwiesen, induziert, die Struktur der sich bildenden Aggregate mit verschiedenen Methoden untersucht und durch Variation verschiedener Parameter die Möglichkeiten zum Aufbau geordneter Architekturen aus diesen Aggregaten analysiert. Die Verwendung von Peptiden als strukturinduzierendem Baustein zur Erzeugung schaltbarer mehrdimensionaler NP-Architekturen hat sich dabei als erfolgreich erwiesen. Die Schaltbarkeit dieses Materials wurde durch eine pH-Abhängigkeit der *coiled-coil*-Struktur des Peptids erzielt. Mittels pH-Titration konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich bei dem Bildungs- und Auflösungsprozess der NP-Aggregate um einen reversiblen Prozess handelt. Die Notwendigkeit der *coiled-coil* Struktur des Peptids für die Ausbildung der Aggregate wurde durch Versuche mit einem ungefalteten Peptid gleicher Aminosäurezusammensetzung, aber veränderter Sequenz, nachgewiesen. Die Ausbildung einer Struktur aus NP und Peptid mit Fernordnung wurde im Rahmen dieses Projektes, auch mit Temperversuchen und Variation der Versuchsbedingungen, nicht erreicht. Eventuell könnte eine Variation der Nettoladung der NP durch gemischte Ligandenhüllen und somit eine Anpassung der Nettoladungen von NP und Peptid hier zum Erfolg führen. Weiterführende Arbeiten könnten sich daher mit der Erzeugung von NP-Peptid-Netzwerken mit einheitlicher Geometrie beschäftigen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung unterschiedlich funktionalisierter Au-NP als Selektin-Inhibitoren vorgestellt. Die multivalente Präsentation Selektin-bindender Strukturen auf den NP führte zu einer deutlichen Verbesserung der Bindungseigenschaften im Vergleich zu den entsprechenden monovalenten Molekülen. Durch Trägerung auf den NP konnte eine Bindungsverstärkung um den Faktor 10^6 erzielt werden. Selbst die Trägerung nicht bindender Substanzen führte zu NP mit starken inhibitorischen Eigenschaften. Eine Sulfatierung der NP wirkte sich nicht nur positiv auf die Löslichkeit der NP in wässrigem Medium, sondern auch auf die Bindungseigenschaften an L- und P-Selektin aus. Mit geeignet funktionalisierten Au-NP wurden IC_{50} -Werte für L- und P-Selektin im pikomolaren Bereich erzielt. Als entscheidend für eine starke Selektin-NP-Bindung hat sich dabei nicht nur eine polyanionische Struktur der Ligandenhülle, sondern auch die Ausrichtung der negativen Ladungen auf der NP-Oberfläche erwiesen. Obwohl auch mit einfachen Strukturen wie beispielsweise sulfatiertem Serinol beeindruckende IC_{50} -Werte erzielt wurden, bleibt die Immobilisierung komplexerer Strukturen wie Kohlenhydratmimetika sehr interessant, denn mit diesen NP ließ sich eine Selektivität des Bindungsverhaltens zwischen L- und P-Selektin realisieren. Die funktionalisierten NP wiesen keine Zelltoxizität auf und sind somit für die Anwendung *in vivo* geeignet. In weiteren Tests muss nun das Verhalten der Partikel *in vivo* untersucht werden.

Das Ziel weiterführender Arbeiten auf diesem Gebiet besteht darin, die Wechselwirkung zwischen Selektin und NP besser zu verstehen und durch eine Optimierung der Wechselwirkungen eine weitere Verbesserung des Bindungsverhaltens der NP an die verschiedenen Selektine zu erzielen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch die Immobilisierung sehr einfacher, biologisch inaktiver Verbindungen für die Synthese biologischer Wirkstoffe in Betracht gezogen werden sollten. Eine Erweiterung der zur Immobilisierung zur Verfügung stehenden Moleküle könnte durch den Einsatz eines sulfatierten und somit wasserlöslichen Aktivesters ermöglicht werden.

Neben Gold existieren eine Reihe weiterer Materialien, welche sich in nanopartikulärer Form aufgrund ihrer magnetischen oder optischen Eigenschaften für spezielle medizinische Anwendungen als besonders geeignet erwiesen haben, beispielsweise Eisenoxid als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie [222] und zur Krebstherapie mittels Hyperthermie [223] sowie Halbleiter-NP zur Detektion medizinisch relevanter Moleküle *in vivo* [114, 224 - 226]. Da die Selektin-bindenden Eigenschaften der in diesem Projekt untersuchten NP nicht vom Kernmaterial abhängen, sondern maßgeblich auf die Struktur der

Ligandenhülle zurückzuführen sind, ist eine Übertragung der Ligandenhülle auf andere Kernmaterialien unter Funktionserhalt denkbar. Auf diese Weise lassen sich die guten Bindungseigenschaften der NP mit weiteren sinnvollen Attributen, beispielsweise der Möglichkeit zur Beobachtung des Aufenthaltsortes der NP im Körper, kombinieren oder auch die Biokompatibilität weiter erhöhen.

5 Summary

The interest in nanotechnology has significantly increased in recent years. Although still at the beginning of its development first successful results, for example with optical systems, in chemical and automobile industry, in environmental technology and medicine [13], indicate the big potential of this research area.

The interest in nanomaterials results from the unique optical, electronic and catalytic properties, which can be achieved by nanostructuring [102]. Due to their remarkably big surface-to-volume ratio nanomaterials are well suited as templates for the presentation of functional groups. In this work nanoparticles of different sizes with small size distributions have been synthesized and functionalized for two types of applications.

In the first part of this work the peptide-induced aggregation of nanoparticles based on electrostatic interactions was presented. The aggregation was induced by addition of different *coiled-coil*-structured peptides. The structure of the forming aggregates was investigated by different methods. The possibilities for building regular structures of this material were analyzed by variation of several parameters. The use of peptides as structure-imposing building blocks for the creation of switchable multidimensional nanoparticle architectures was successful. The switchability of this material was achieved by the pH-dependency of the peptides *coiled-coil*-structure. Furthermore, the reversibility of the formation and disaggregation process was shown by pH-titration. The necessity of the peptide's *coiled-coil*-structure for the formation of aggregates was demonstrated by experiments with an unfolded peptide composed of the same amino acids but in different sequence. Even with annealing of the aggregates and variation of the test conditions the formation of a material composed of nanoparticles and peptide with long range order could not be achieved during this work. Perhaps a variation of the nanoparticle net charge by mixed ligand shells and thereby an adjustment of the net charges of nanoparticle and peptide might be successful here. Future work might deal with the formation of nanoparticle-peptide-networks of uniform geometry.

In the second part of this work the application of different functionalized gold nanoparticles for the inhibition of selectins was presented. The multivalent presentation of selectin-binding structures on the surface of nanoparticles led to highly improved binding properties compared to the monovalent structures. An amplification of binding by a factor of 10^6 was achieved by immobilization on gold nanoparticles. Even the immobilization of non-binding structures led to particles with strong inhibitory effects. Sulphation of the particles improved not only the

solubility in aqueous media, but also the binding properties to L- and P-selectin. IC₅₀ values in the picomolar range were thus achieved. The polyanionic structure of the ligand shell in combination with the arrangement of the negative charges on the particle surface were decisive for a strong selectin-nanoparticle-binding. Although as simple structures as sulphated serinol also yielded impressive IC₅₀ values the immobilization of more complex structures like carbohydrate mimetics remains interesting because with these structures a selectivity of the binding properties to L- and P-selectin can be realized. The functionalized particles showed no cell toxicity and thereby proved their applicability *in vivo*. Further tests are necessary to investigate the behaviour of the particles *in vivo*.

The goal of related work on this topic is to better understand the interaction of selectin and particles and to optimize these interactions in order to improve the binding properties of the nanoparticles to the different selectins. The results of the present work demonstrate that the immobilization of simple, biologically inactive compounds should be considered for the synthesis of biologically active agents. A more extensive set of available compounds might be achieved by the use of a sulphated and thereby water soluble active ester.

Due to their magnetic or optical properties other nanostructured materials besides gold have proven to be useful in special medical applications, for example iron oxide as contrast agent for magnetic resonance imaging [222] and for cancer therapy by hyperthermia [223] as well as semiconductor nanoparticles for the detection of medically relevant molecules *in vivo* [114, 224 - 226]. The transfer of the ligand shell to other nanostructured materials under preservation of function should be possible because the selectin-binding properties of the here synthesized particles primarily depend on the structure of the shell and not on the core material. Thereby the good binding properties of the nanoparticles presented here can be combined with further desirable attributes, for example the possibility to localize the particles in the body, or the biocompatibility can be further improved.

6 Experimenteller Teil

6.1 Abkürzungen

Ø	Durchmesser
Abz	Anthranilsäure
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMAET	N,N-Dimethylaminoethanthiol Hydrochlorid
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Dodecanthiol
EA	Ethanolamin
eq	Äquivalente
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
h	Stunde(n)
HMDST	Bis(trimethylsilyl)sulfid
HR-TEM	hochaufgelöste Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
HV	Hochvakuum
IC ₅₀	Wert, bei dem 50 % der Selektine gebunden werden
IR	Infrarot
min	Minute(n)
MUDHSE	11-Mercaptoundecansäure-N-hydroxysuccinimidester
MUDS	11-Mercaptoundecansäure
MWCO	moleculare weight cut off
NA	Neuraminidase
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz
NP	Nanopartikel
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PG _x	Polyglycerol (x = Molekulargewicht)
PSGL-1	P-Selektin Glycoprotein Ligand-1

Rcf	relative centrifugal force
RES	reticuloendotheliales System
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RV	Rotationsverdampfer
SER	Serinol
SiaLe ^x	Sialyl Lewis x
TC	Thiocholin
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
TGA	Thermogravimetrische Analyse
TMA	N,N,N-Trimethyl(11-mercaptoundecyl)ammoniumchlorid
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid (25 Gew.-% Lösung in Wasser)
TOAB	Tetraoctylammoniumbromid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

6.2 Lösungsmittel und Reagenzien

Für die Synthesen und zum Spülen der Glasgeräte wurde Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma *Millipore* (Milli-Q Academic) verwendet.

Die Lösungsmittel Dichlormethan, Chloroform, Ethanol, Ethylacetat, Hexan, Methanol und Toluol wurden vor der Verwendung am Rotationsverdampfer destilliert. Alle anderen Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

- Agarose ME für Biochemie der Firma *acros organics*
- (1R,2R)-2-Amino-1-phenyl-1,3-propandiol der Firma *acros organics* mit einem Reinheitsgrad von 98 %
- Benzol der Firma *Merck* mit dem Reinheitsgrad reinst
- Bis(trimethylsilyl)sulfid der Firma *acros organics* mit einem Reinheitsgrad von 95 %
- 6-Bromohexansäure der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 98+ %
- 8-Bromooctansäure der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 97 %

- 11-Bromoundecanol der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 98 %
- 11-Bromoundecansäure der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 99 %
- 11-Bromo-1-undecen der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 95 %
- ^{tert}Butylamin-Boran-Komplex der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 97 %
- $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ der Firma *acros organics* mit dem Reinheitsgrad p.a.
- N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 99 %
- N,N-Dimethylaminoethanthiol Hydrochlorid der Firma *Fluka* mit einem Reinheitsgrad von ≥ 97 %
- 4-(Dimethylamino)pyridin der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von ≥ 99 %
- N,N-Dimethylformamid der Firma *Fisher Scientific* mit HPLC-Reinheitsgrad
- 1-Dodecanthiol der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 98+ %
- Ethanolamin der Firma *Sigma-Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von ≥ 98 %
- Glutathion (reduzierte Form) der Firma *Fluka* mit einem Reinheitsgrad von ≥ 97 %
- Kaliumthioacetat der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 98 %
- 11-Mercaptoundecansäure der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 95 %
- Natriumborhydrid der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 98 %
- Tri-Natriumcitrat-5,5-hydrat der Firma *Merck* mit dem Reinheitsgrad reinst
- Natriumhydroxid der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 98 %
- N-Hydroxysuccinimid der Firma *Sigma-Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von ≥ 98 %
- Salzsäure der Firma *Fisher Scientific* mit analytischem Reinheitsgrad
- Schwefelsäure der Firma *Fisher Scientific* mit analytischem Reinheitsgrad
- Serinol der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 98 %
- Silbernitrat der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von ≥ 99.0 %
- SO_3 -DMF-Komplex der Firma *Fluka* mit einem Reinheitsgrad von ≥ 97 %
- Tetrachlorogoldsäuretrihydrat der Firma *Sigma-Aldrich* mit ACS-Reinheitsgrad
- Tetramethylammoniumhydroxid (25 Gew.-% Lösung in Wasser) der Firma *Aldrich*
- Tetraoctylammoniumbromid der Firma *Aldrich* mit einem Reinheitsgrad von 98 %
- Thioessigsäure der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 97 %
- Triethylamin der Firma *Merck* mit synthetischem Reinheitsgrad
- Trimethylamin (3 Gew.-% Lösung in Ethanol) der Firma *alfa aesar*
- Triphenylphosphingold(I)chlorid der Firma *Chempur* (Au-%: 39.65)

- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan der Firma *alfa aesar* mit einem Reinheitsgrad von 99 %

Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel (CDCl_3 , DMSO-d_6 , D_2O) der Firma *euriso-top* verwendet.

Weitere Chemikalien wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-U. Reißig synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Von Shahla Yekta wurde hergestellt:

- ((2S,3R,4S,5S)-3-Amino-4-hydroxy-6,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*Syn3*, immobilisiert auf **NP1** und **NP2**)
- *LigSyn3*

Von Fei Yu wurde hergestellt:

- ((2S,3S,4R,5R)-3-Amino-4-hydroxy-6,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*Anti3*, immobilisiert auf **NP9**)
- (3S,4S,5R,6S)-5-Amino-3-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-6-(propoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-4-ol (*Amin 7*, immobilisiert auf **NP16**)

Von Vjekoslav Dekaris wurde hergestellt:

- ((2S,3S,4R,5S)-3-Amino-4-methoxytetrahydrofuran-2,5-diyl)dimethanol (*Amin 5*, immobilisiert auf **NP14**)

Von Fabian Pfengle wurde hergestellt:

- ((2R,3R,4R)-3-(Aminomethyl)-3-methoxy-5,5-dimethyltetrahydrofuran-2,4-diyl)dimethanol (*Amin 6*, immobilisiert auf **NP15**)
- ((2S,3R,4S,5S,6S)-3-Amino-4-hydroxy-6-methoxytetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*Amin1*, immobilisiert auf **NP10**)
- ((2R,3S,4R,5R,6R)-3-Amino-4-hydroxy-6-methoxytetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*Amin2*, immobilisiert auf **NP11**)
- (3R,4S,5R,6S)-5-Amino-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydro-2H-pyran-3,4-diol (*Amin 3*, immobilisiert auf **NP12**)

- (4R,5R,6S)-5-Amino-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydro-2H-pyran-4-ol
(*Amin 4*, immobilisiert auf **NP13**)

Von Marie Weinhardt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Haag wurde *Poll* synthetisiert.

Von Sara Wagner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beate Kokschi wurden die Peptide VW05, SR05, VW19 und RR01 synthetisiert.

6.3 Synthesen

6.3.1 NP-Synthesen

6.3.1.1 Synthese DT-koordinierter Au-Kolloide ($\varnothing = 1.5$ nm)

(nach einer Literaturvorschrift von *Stucky et al.* [166])

Unter Argon wurden AuPPh₃Cl (55.72 mg, 0.1 mmol, 1 eq) und DT (66 μ l, 0.3 mmol, 3 eq) in 2.8 ml Chloroform gelöst. Dann wurde eine Lösung von *tert*-Butylamin-Boran-Komplex (94.12 mg, 1 mmol, 10 eq) in einer Mischung von 2.8 ml Chloroform und 1.1 ml Ethanol zugegeben und die Reaktionsmischung 5 h bei 65 °C gerührt. Die Aufarbeitung der Kolloide erfolgte mittels Dialyse (MWCO: 4000-6000, drei mal drei Stunden gegen jeweils 200 ml Chloroform). Zur Lagerung wurde die dialysierte Kolloidlösung mit Chloroform auf 27 ml verdünnt ($\hat{=}$ 5 μ M NP).

TEM: Abbildung 3.2, $d = 1.5$ nm.

UV/Vis - Spektrum (nach Ligandenaustausch gegen MUDS): Abbildung 3.11, $\lambda_{\max} = 415$ nm.

6.3.1.2 Synthese DT-kordinierter Au-Kolloide ($\varnothing = 6$ nm)

(nach einer Literaturvorschrift von *Stucky et al.* [166])

Unter Argon wurden AuPPh₃Cl (120.9 mg, 0.24 mmol) und Dodecanthiol (125 μ l, 0.5 mmol, 2 eq) in 20 ml Benzol gelöst. Dann wurde *tert*-Butylamin-Boran-Komplex (212.2 mg, 2.4 mmol, 10 eq) als Pulver zugegeben und die Reaktionsmischung 1 h bei 55 °C gerührt. Die Lösung färbte sich innerhalb weniger Minuten dunkelrot. Die Reaktionsmischung wurde auf RT abgekühlt und mit 20 ml Ethanol versetzt. Der dabei entstehende schwarze Niederschlag wurde abzentrifugiert (1.5 rpm, 2 min) und dreimal mit Ethanol (ca. 10 ml) gewaschen und anschließend im HV getrocknet. Der Rückstand wurde in 20 ml Chloroform aufgenommen, wobei eine dunkelrote Lösung mit einer Konzentration von 0.77 μ M NP entstand.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.86 (*bs*, CH₃), 1.2 – 1.4 (*bs*).

ATR-IR: 2957 cm⁻¹ und 2917 cm⁻¹ und 2850 cm⁻¹ (*s*, ν (C-H)), 1730 cm⁻¹ (*w*), 1457 cm⁻¹ (*w*), 795 cm⁻¹ (*s*).

TEM: Abbildung 3.4, d = 6 nm.

UV/Vis - Spektrum (nach Ligandenaustausch gegen MUDS): Abbildung 3.11, $\lambda_{\max} = 523$ nm.

6.3.1.3 Synthese DMAP-kordinierter Au-Kolloide ($\varnothing = 5$ nm)

(nach einer Literaturvorschrift von *Lennox et al.* [168])

Eine wässrige Lösung von HAuCl₄ (125 mg in 10 ml H₂O) wurde mit einer Lösung von TOAB (0.761 g) in Toluol (25 ml) gemischt. Nach ca. 2 Minuten wurde eine frisch hergestellte wässrige NaBH₄-Lösung (131.25 mg in 7.5 ml H₂O) langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 18 Stunden bei RT gerührt.

Die wässrige Phase wurde abgetrennt und die organische Phase jeweils zweimal mit 100 ml 0.1 M H₂SO₄ und H₂O (bidest.) gewaschen. Dann wurde die Kolloidlösung mit 120 ml einer 0.1 M 4-Dimethylaminopyridin-Lösung versetzt und 30 Minuten gerührt. Es fand ein vollständiger Phasentransfer der Kolloide in die wässrige Phase statt. Die wässrige Phase

wurde von der organischen Phase getrennt und mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert. Die Lagerung der Kolloidlösung erfolgte bei 4-8 °C.

Für die Bestimmung der Bindungseigenschaften mit dem kompetitiven Bindungsassay wurden die DMAP-koord. Au-NP gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H₂O, jeweils 3 h).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 8.06 (*d*, 2H, J = 5.2 Hz), 6.64 (*d*, 2H, J = 5.2 Hz), 2.97 (*s*, 6H).

TEM: Abbildung 3.6, d = 5 nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.11, $\lambda_{\text{max}} = 520$ nm.

6.3.1.4 Synthese Citrat-koordinierter Au-Kolloide ($\varnothing = 14$ nm)

(nach einer Literaturvorschrift von *Porta et al.* [170])

Eine Lösung von HAuCl₄·3H₂O (34.32 mg, 0.087 mmol, 1 eq) in 360 ml Wasser wurde 20 Minuten refluxiert. Unter starkem Rühren wurde dann schnell eine Lösung von Natriumcitrat (187 mg, 0.524 mmol, 6 eq) in 1.8 ml Wasser zugegeben und 3 h bei 80 °C refluxiert. Dabei färbte sich die Lösung langsam rot. Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert. Die klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 2.6 nM NP wurde bei 0 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

Für die Bestimmung der Bindungseigenschaften mit dem kompetitiven Bindungsassay wurden die Citrat-koord. Au-NP gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H₂O, jeweils 3 h).

TEM: Abbildung 3.10, d = 14 nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.11, $\lambda_{\text{max}} = 521$ nm.

6.3.1.5 Synthese Citrat-kordinierter Au-Kolloide ($\varnothing = 25$ nm)

(nach einer Literaturvorschrift von *Panigrahi et al.* [40])

Eine Lösung von $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (35.55 mg, 0.09 mmol, 1 eq) in 360 ml Wasser wurde 10 Minuten refluxiert. Unter starkem Rühren wurde dann schnell eine Lösung von Natriumcitrat (45 mg, 0.126 mmol, 1.4 eq) in 4.5 ml Wasser zugegeben und 30 Minuten bei 80 °C refluxiert. Direkt nach Zugabe färbte sich die Lösung bläulich, im Verlauf der 30 Minuten wurde die Lösung dann violett.

Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert. Die klare, violette Lösung mit einer Konzentration von 0.246 nM NP wurde bei 0 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

TEM: Abbildung 3.10, $d = 25$ nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.11, $\lambda_{\text{max}} = 537$ nm.

6.3.1.6 Synthese Citrat-kordinierter Ag-Kolloide ($\varnothing = 30$ nm)

Eine Lösung von AgNO_3 (6.2 mg, 0.036 mmol, 1 eq) in 150 ml Wasser wurde 20 Minuten refluxiert. Unter starkem Rühren wurde dann schnell eine frisch hergestellte Lösung von Natriumcitrat (78 mg, 0.219 mmol, 6 eq) in 742 μl Wasser zugegeben und 3 h bei 80 °C refluxiert. Dabei färbte sich die Lösung langsam gelb. Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert. Die klare, gelbe Lösung mit einer Konzentration von ca. 0.3 μM NP wurde bei 0 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

TEM: Abbildung 3.14, $d = 30$ nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.17, $\lambda_{\text{max}} = 413$ nm.

6.3.1.7 Synthese Citrat-kordinierter Au/Ag-1:3-NP ($\varnothing = 54$ nm)

Eine Lösung von $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (3.6 mg, 0.009 mmol, 1 eq) in 150 ml Wasser wurde auf 120 °C erwärmt. Unter starkem Rühren wurde dann zuerst eine Lösung von AgNO_3 (4.7 mg, 0.027 mmol, 3 eq) in 178 μl Wasser und sofort danach eine Lösung von Natriumcitrat (78.15 mg, 0.219 mmol, 24 eq) in 742 μl Wasser zugegeben. Die Temperatur wurde langsam von 120 °C auf 80 °C reduziert und die Reaktionslösung insgesamt 3 h gerührt. Dabei färbte sich die Lösung allmählich gelb.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert. Die klare, mittelgelbe Lösung wurde bei 0 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

TEM: Abbildung 3.16, $d = 54$ nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.17, $\lambda_{\text{max}} = 442$ nm.

6.3.1.8 Synthese Citrat-kordinierter Au/Ag-1:1-NP ($\varnothing = 42$ nm)

Eine Lösung von $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (7.1 mg, 0.018 mmol, 1 eq) in 150 ml Wasser wurde auf 120 °C erwärmt. Unter starkem Rühren wurde dann zuerst eine Lösung von AgNO_3 (3.1 mg, 0.018 mmol, 1 eq) in 170 μl Wasser und sofort danach eine Lösung von Natriumcitrat (78.15 mg, 0.219 mmol, 24 eq) in 742 μl Wasser zugegeben. Die Temperatur wurde langsam von 120 °C auf 80 °C reduziert und die Reaktionslösung insgesamt 3 h gerührt. Dabei färbte sich die Lösung allmählich dunkelgelb.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert. Die klare, dunkelgelbe Lösung wurde bei 0 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

TEM: Abbildung 3.16, $d = 42$ nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.17, $\lambda_{\text{max}} = 463$ nm.

6.3.1.9 Synthese Citrat-kordinierter Au/Ag-3:1-NP ($\varnothing = 45$ nm)

Eine Lösung von $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10.6 mg, 0.027 mmol, 3 eq) in 150 ml Wasser wurde auf 120 °C erwärmt. Unter starkem Rühren wurde dann zuerst eine Lösung von AgNO_3 (1.6 mg, 0.009 mmol, 1 eq) in 85 μl Wasser und sofort danach eine Lösung von Natriumcitrat (78.15 mg, 0.219 mmol, 24 eq) in 742 μl Wasser zugegeben. Die Temperatur wurde langsam von 120 °C auf 80 °C reduziert und die Reaktionslösung insgesamt 3 h gerührt. Dabei färbte sich die Lösung allmählich orange.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 μm) filtriert. Die klare, orange Lösung wurde bei 0 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

TEM: Abbildung 3.16, $d = 45$ nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.17, $\lambda_{\text{max}} = 498$ nm.

6.3.1.10 Synthese GSH-kordinierter CdS-NP ($\varnothing = 1.5$ -2 nm)

(in Anlehnung an eine Literaturvorschrift von *Barglik-Chory et al.* [227])

In einem ausgeheizten und mit Argon gefluteten Schlenkkolben wurden Glutathion (0.544 g, 1.80 mmol, 3.0 eq) und $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ (0.135 g, 0.59 mmol, 1.0 eq) in bidestilliertem Wasser (30 ml) gelöst und 5 Minuten bei RT gerührt. Dann wurden TMAH (1.4 ml, 3.4 mmol) und Ethanol (53 ml) zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten Rühren bei RT wurde schnell HMDST (124 μl , 0.59 mmol, 1.0 eq) zugegeben.

Nach 15 Minuten wurde die Reaktionsmischung in einen Dialyseschlauch überführt und viermal gegen je 300 ml bidestilliertes Wasser dialysiert. Filtrieren mit einem 0.2 μm -Filter lieferte eine klare, hellgelbe Lösung, die bei 4 °C mehrere Wochen stabil blieb.

ATR-IR: 3244 cm^{-1} (w, $\nu(\text{N-H})$), 1750-1100 cm^{-1} (w, $\nu(\text{CO}_2^-)$) und $\delta(\text{C-H})$ und $\delta(\text{N-H})$), 1072 cm^{-1} (w).

TEM: Abbildung 3.20, $d = 1.5 - 2$ nm.

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.21, $\lambda_{\text{max}} = 318 \text{ nm}$.

6.3.2 Ligandenaustauschreaktionen

6.3.2.1 MUDES-koord. Au-NP ($\text{\O} = 1.5 \text{ nm}$) aus DT-koord. Au-NP

Zu einer Lösung von MUDES (65.5 mg, 0.3 mmol, $2 \cdot 10^5 \text{ eq}$) und TMAH (200 μl , 0.56 mmol, $16.8 \cdot 10^5 \text{ eq}$) in 10 ml Millipore-Wasser wurden unter Rühren DT-koodinierte Au-NP (1.5 nmol NP, $d = 2.5 \text{ nm}$) in 200 μl CHCl_3 getropft. Das Zwei-Phasen-System wurde 48 h bei RT gerührt. Dabei fand ein Phasentransfer der Au-NP von der organischen in die wässrige Phase statt. Die wässrige Phase wurde auf 30 ml verdünnt, die organische Phase auf 15 ml. Dann wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase gegen Millipore-Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 200 ml H_2O , jeweils 3 h). Es wurde eine farblose Lösung erhalten, welche bei 4 °C mehrere Wochen stabil ist.

Die Ligandenhülle dieser Partikel wurde nicht weiter charakterisiert. Dass ein Ligandenaustausch stattgefunden hat, kann allerdings der Veränderung des Löslichkeitsverhaltens der NP entnommen werden.

6.3.2.2 MUDES-koord. Au-NP (**NP18**, $\text{\O} = 6 \text{ nm}$) aus DT-koord. Au-NP

Zu einer Lösung von MUDES (44 mg, 0.2 mmol, $6 \cdot 10^5 \text{ eq}$) und TMAH (200 μl , 0.56 mmol, $16.8 \cdot 10^5 \text{ eq}$) in 10 ml Wasser wurden unter Rühren DT-koodinierte Au-NP (3 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 1 ml CHCl_3 getropft. Das Zwei-Phasen-System wurde 2 h bei RT gerührt. Dabei fand ein vollständiger Phasentransfer der Au-NP von der organischen in die wässrige Phase statt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase gegen Millipore-Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 200 ml H_2O , jeweils 3 h). Es wurde eine rote Lösung erhalten, welche bei $\text{pH} \geq 10$ und 4 °C mehrere Wochen stabil ist.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 3.17 (*s*, 16H, TMAH), 2.76 (*t*, 2H), 2.16 (*t*, 2H), 1.73 (*quin*, 2H), 1.54 (*m*, 2H), 1.40 (*m*, 2H), 1.30 (*bs*, 10H).

ATR-IR: 2914 cm^{-1} und 2840 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1685 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1407 cm^{-1} (*s*), 1254 cm^{-1} (*s*), 1090 cm^{-1} (*s*), 1015 cm^{-1} (*s*), 798 cm^{-1} (*s*), 718 cm^{-1} (*w*).

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 3.11, $\lambda_{\text{max}} = 523 \text{ nm}$.

6.3.2.3 MUDSulfat-koord. Au-NP (**NP19**, $\varnothing = 6 \text{ nm}$) aus DT-koord. Au-NP

Zu einer Lösung von Natrium-11-Mercaptoundecanylsulfat (29.8 mg, 0.1 mmol, $3 \cdot 10^5 \text{ eq}$) und TMAH (50 μl , 0.14 mmol, $4.2 \cdot 10^5 \text{ eq}$) in 5 ml Millipore-Wasser wurden unter Rühren DT-koordinierte Au-NP (3 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 1 ml CHCl_3 getropft. Das Zwei-Phasen-System wurde 2 h bei RT gerührt. Dabei fand ein vollständiger Phasentransfer der Au-NP von der organischen in die wässrige Phase statt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase gegen Millipore-Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 200 ml H_2O , jeweils 3 h). Es wurde eine rote Lösung erhalten, welche bei 4 °C mehrere Wochen stabil ist.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.06 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-OSO}_3^-$), 2.73 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-SH}$), 1.71 (*bs*), 1.34 (*bs*).

ATR-IR: 3602 cm^{-1} (*w*), 3040 cm^{-1} (*w*), 2916 cm^{-1} und 2849 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1490 - 1468 cm^{-1} und 1220 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1066 – 950 cm^{-1} (*s*), 783 cm^{-1} (*s*), 623 cm^{-1} (*s*), 577 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: Abbildung 8.6, $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$.

6.3.2.4 TMA-koord. Au-NP ($\varnothing = 6 \text{ nm}$) aus DT-koord. Au-NP

Zu einer Lösung von TMA (70.5 mg, 0.25 mmol, $5 \cdot 10^4 \text{ eq}$) in 5 ml Wasser wurden unter Rühren DT-koordinierte Au-NP (5 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 5 ml CHCl_3 getropft. Das Zwei-Phasen-System wurde 2 h bei RT gerührt. Dabei fand ein vollständiger Phasentransfer der Au-NP von der organischen in die wässrige Phase statt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 200 ml H_2O , jeweils 3 h). Ein Teil der NP blieb an der Dialysemembran haften, daher verringerte sich die NP-

Konzentration in der Lösung. Es wurde eine rote Lösung erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

Da der Ligand aufgrund der geringen Stabilität der Partikel nicht vollständig entfernt werden konnte, wurde die Ligandenhülle der erhaltenen NP nicht weiter charakterisiert. Dass ein Ligandenaustausch stattgefunden hat, kann allerdings der Veränderung des Löslichkeitsverhaltens der NP entnommen werden.

6.3.2.5 MUDES-koord. Au-NP (NP24, $\varnothing = 14$ nm) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (34.3 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.09 nmol NP) wurden MUDES (104 mg, 0.468 mmol, $5 \cdot 10^6$ eq) und TMAH (0.5 ml, 1.4 mmol, $15 \cdot 10^6$ eq) gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H₂O, jeweils 3 h). Nach der Dialyse wurde das Lösungsmittelvolumen am HV auf 15 ml eingengt. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 6 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 2.76 (*t*, 2H), 2.16 (*t*, 2H), 1.73 (*quin*, 2H), 1.56 (*m*, 2H), 1.5-1.25 (*m*, 12H).

6.3.2.6 MUDESulfat-koord. Au-NP ($\varnothing = 14$ nm) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (27 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.07 nmol NP) wurde eine Lösung von MUDESulfat (27.6 mg, 0.09 mmol, $1.3 \cdot 10^6$ eq) in 2 ml Wasser gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H₂O, jeweils 3 h). Nach der Dialyse betrug das Lösungsmittelvolumen 28 ml. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 2.5 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 4.04 (*bs*, CH₂-OSO₃⁻), 2.53 (*bs*, CH₂-SH), 1.66 (*bs*), 1.58 (*bs*), 1.4 - 1.2 (*bs*).

6.3.2.7 TMA-koord. Au-NP ($\varnothing = 14$ nm) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (50 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.125 nmol NP) wurde eine Lösung von TMA (100 mg, 0.4 mmol, $3.2 \cdot 10^6$ eq) in 2 ml Wasser gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H₂O, jeweils 3 h). Nach der Dialyse betrug das Lösungsmittelvolumen 18 ml. Ein Teil der NP blieb an der Dialysemembran haften, daher verringerte sich die NP-Konzentration in der Lösung. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von ca. 7 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

Da der Ligand aufgrund der geringen Stabilität der Partikel nicht vollständig entfernt werden konnte, wurde die Ligandenhülle der erhaltenen NP nicht weiter charakterisiert.

6.3.2.8 MUDS-koord. Au-NP (**NP25**, $\varnothing = 25$ nm) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (30 ml einer 0.246 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.0074 nmol NP) wurden MUDS (86.4 mg, 0.396 mmol, $5 \cdot 10^7$ eq) und TMAH (0.85 ml, 2.38 mmol, $32 \cdot 10^7$ eq) gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H₂O, jeweils 3 h). Nach der Dialyse wurde das Lösungsmittelvolumen am HV auf 26.5 ml eingeengt.

Es wurde eine klare violette Lösung mit einer Konzentration von 0.28 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\max} = 542$ nm.

6.3.2.9 MUDS-koord. Au-Kolloide ($\varnothing = 5$ nm) aus DMAP-koord. Au-NP

MUDS (10 mg, 0.046 mmol, $7 \cdot 10^3$ eq) wurde durch Zugabe einiger Tropfen TMAH (10 Gew.-% in MeOH) in 10 ml H₂O gelöst. Unter heftigem Rühren wurden ca. 6.6 nmol DMAP-koord. Au-NP ($d = 5$ nm), gelöst in 4 ml H₂O, zugegeben. Nach 10 min wurde die Lösung bis zum Ausfall eines flockigen, violetten Niederschlags mit Essigsäure versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert und in 10 ml Wasser unter Zugabe einiger Tropfen TMAH

(10 Gew.-% in MeOH) wieder gelöst. Die NP-Lösung wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO 4000-6000, dreimal je 400 ml H₂O, jeweils 3 h) und im Anschluss mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 µm) filtriert. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 0.47 µM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

¹H-NMR: 2.69 (*t*, 2H), 2.33 (*t*, 2H), 1.73 (*quin*, 2H), 1.56 (*m*, 2H), 1.5-1.25 (*m*, 12H).

6.3.2.10 MUDHSE-koordinierte Au-NP (Ø = 6 nm)

Zu einer Lösung von MUDHSE (0.189 g, 0.6 mmol, 10⁵ eq) in 40 ml wasserfreiem DMF wurden unter Rühren DT-koordinierte Au-NP (4 ml einer 1.5 µM Lösung in Chloroform, d = 6 nm) getropft. Nach 10 Minuten wurde die Lösung am HV auf 30 ml eingengt und weitere 24 h bei RT gerührt. Dann wurde die Partikellösung gegen DMF dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 200 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten, welche sich nach Überführung in wasserfreies DMF bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 2.80 (*s*, 4H), 2.65 (*t*, 2H), 2.22 (*m*, 2H), 1.8 - 1.4 (*m*), 1.4 - 1.2 (*m*).

6.3.2.11 Synthese von *Poll*-koord. Au-NP

Zu einer Lösung von *Poll* (150 mg, 0.08 mmol, 2·10⁵ eq) in 4 ml Methanol wurde bei RT eine Lösung von 0.36 nmol DMAP-koord. Au-NP in 500 µL Wasser getropft. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt. Die NP-Lösung wurde erst gegen Methanol (MWCO 4000-6000, dreimal je 400 ml Methanol, jeweils 3 h) und dann gegen Wasser dialysiert (MWCO 4000-6000, dreimal je 400 ml H₂O, jeweils 3 h) und im Anschluss mit einem Spritzenaufsatzfilter (0.2 µm) filtriert. Nach der Dialyse wurde die NP-Lösung mit Wasser auf ein Endvolumen von 12 ml verdünnt. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 0.03 µM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 3.7 – 3.5 (*m*), 3.5 - 3.33 (*m*), 3.32 (*s*).

6.3.2.12 Synthese von **NP20** ($\varnothing = 14$ nm) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (50 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.125 nmol NP) wurde **Lig20** (0.2 mmol, $1.6 \cdot 10^6$ eq), gelöst in 6 ml einer Natronlauge-DMF-Mischung, gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H_2O , jeweils 3 h). Nach der Dialyse betrug das Lösungsmittelvolumen 55 mL. Die NP-Lösung wurde am HV auf 10 ml eingengt. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 12.7 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.38 (*m*, 1H), 4.09 (*m*, 4H), 2.71 (*m*, 2H), 2.44 (*t*, 0.7H), 2.26 (*t*, 1.3H), 1.66 (*m*, 2H), 1.59 (*m*, 2H), 1.37 (*m*, 2H).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 524$ nm.

6.3.2.13 Synthese von **NP21** ($\varnothing = 14$ nm) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (50 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.125 nmol NP) wurde **Lig21** (0.2 mmol, $1.6 \cdot 10^6$ eq), gelöst in 10 ml Wasser, gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H_2O , jeweils 3 h). Nach der Dialyse betrug das Lösungsmittelvolumen 56 ml. Die NP-Lösung wurde am HV auf 10 ml eingengt. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 12.7 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.37 (*m*, 1H), 4.09 (*m*, 4H), 2.72 (*m*, 2H), 2.24 (*m*, 2H), 1.64 (*m*, 2H), 1.56 (*m*, 2H), 1.36 (*m*, 2H), 1.25 (*bs*).

ATR-IR: 2919 cm^{-1} und 2845 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1744 und 1626 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1526 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1526 cm^{-1} (*s*), 1467 - 1412 cm^{-1} und 1209 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1145 cm^{-1} (*s*), 991 cm^{-1} (*s*), 797 cm^{-1} (*s*), 575 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$.

6.3.2.14 Synthese von **NP22** ($\varnothing = 14 \text{ nm}$) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (50 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.125 nmol NP) wurde eine Lösung von **Lig22** (13 mg, 0.2 mmol, $1.6 \cdot 10^6 \text{ eq}$) in 2 ml Wasser gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H_2O , jeweils 3 h). Nach der Dialyse betrug das Lösungsmittelvolumen ca. 53 ml. Die NP-Lösung wurde am HV auf 10 ml eingengt. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 12.7 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.40 (*bs*, 1H), 4.11 (*d*, 4H), 2.67 (*t*, 2H), 2.26 (*t*, 2H), 1.66 (*quin*, 2H), 1.58 (*bs*, 2H), 1.37 (*bs*, 2H), 1.28 (*bs*, 10H).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$.

6.3.2.15 Synthese von **NP26** ($\varnothing = 14 \text{ nm}$) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (50 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.125 nmol NP) wurde eine Lösung von **Lig26** (7.3 mg, 0.2 mmol, $1.6 \cdot 10^6 \text{ eq}$) in 2 ml Wasser gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H_2O , jeweils 3 h). Nach der Dialyse betrug das Lösungsmittelvolumen ca. 53 ml. Die NP-Lösung wurde am HV auf 10 ml eingengt. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 12.7 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.04 (*bs*, 2H, 13- CH_2), 3.43 (*bs*, 2H, 12- CH_2), 2.70 (*bs*, 2H, 2- CH_2), 2.20 (*bs*, 2H, 11- CH_2), 1.63 + 1.53 (*bs*, 4H, 3+10- CH_2), 1.25 (*bs*, 4-9- CH_2).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$.

6.3.2.16 Synthese von **NP27** ($\text{Ø} = 14 \text{ nm}$) aus Citrat-koord. Au-NP

Zu einer wässrigen Lösung Citrat-koordinierter Au-NP (50 ml einer 2.6 nM Lösung, $\hat{=}$ 0.125 nmol NP) wurde eine Lösung von **Lig27** (16 mg, 0.2 mmol, $1.6 \cdot 10^6 \text{ eq}$) in 2 ml Wasser gegeben und 72 h bei RT gerührt. Dann wurde gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je 600 ml H_2O , jeweils 3 h). Nach der Dialyse betrug das Lösungsmittelvolumen ca. 53 ml. Die NP-Lösung wurde am HV auf 10 ml eingengt. Es wurde eine klare rote Lösung mit einer Konzentration von 12.7 nM NP erhalten, welche sich bei 4 °C mehrere Wochen optisch nicht veränderte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.32 (*bs*, 6H), 2.74 (*t*, 2H), 2.46 (*t*, 0.6H, Anteil Thiolat), 2.22 (*t*, 1.4H, Anteil Disulfid), 1.68 (*m*, 2H), 1.57 (*bs*, 2H), 1.37 (*bs*, 2H), 1.28 (*bs*, 12H).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$.

6.3.3 Kovalente Modifikationen von NP

6.3.3.1 Synthese *LSyn3*-koordinierter Au-NP ($\text{Ø} = 6 \text{ nm}$) (**NP1**)

Zu einer Lösung des Aminopyrans ((2S,3R,4S,5S)-3-Amino-4-hydroxy-6,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*Syn3*) (0.02 mmol, $5 \cdot 10^5 \text{ eq}$) in 0.5 ml wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koordinierten Au-NP (1 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 6.6 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (20 μl , 0.14 mmol, $35 \cdot 10^5 \text{ eq}$) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 4000-

6000, dreimal je 200 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine rote Lösung erhalten, welche bei 4 °C mehrere Tage optisch stabil war.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.92 (*m*), 3.75 – 3.50 (*m*), 3.45 (*m*), 2.99 (*m*), 2.08 (*m*), 1.28 (*bs*), 1.13 (*bs*).

Die Signale des ¹H-NMR-Spektrums sind aufgrund der hohen Aggregationsempfindlichkeit dieser Kolloide schlecht aufgelöst. Aufgeführt sind daher nur die eindeutig dem Kolloid zuweisbaren Signale.

6.3.3.2 Sulfatierung *Syn3*-funktionalisierter Au-NP (Ø = 6 nm) (NP2)

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung *Syn3*-funktionalisierten Au-Kolloide (1 nmol NP, d = 6 nm) in 10 ml wasserfreiem DMF wurde langsam eine Lösung von SO₃-DMF (15.3 mg, 0.1 mmol, 5 eq) in 1 ml wasserfreiem DMF getropft. Nach 24 h bei RT wurde die Reaktionsmischung erst gegen DMF (MWCO: 4000-6000, 200 ml DMF), dann gegen Millipore-Wasser (MWCO: 4000-6000, dreimal je 200 ml H₂O, jeweils 3 h) dialysiert. Es wurde eine rote Lösung erhalten, welche bei 4 °C mehrere Wochen optisch stabil war.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 4.54 (*m*), 4.46 (*m*), 4.18 (*m*), 4.01 (*m*), 2.76 (*bs*, CH₂-SH), 2.39 (*q*), 2.30 (*bt*, CH₂-CONH), 1.68 (*m*), 1.59 (*m*), 1.47 (*s*), 1.32 (*s*), 1.30 (*bs*).

ATR-IR: 3448 cm⁻¹ (*w*, ν(O-H)), 3075 cm⁻¹ (*w*), 2923 cm⁻¹ und 2852 cm⁻¹ (*s*, ν(C-H)), 2484 cm⁻¹ (*w*), 1687 und 1647 cm⁻¹ (*s*, ν(C=O)), 1529 cm⁻¹ (*s*, δ(N-H)), 1467 cm⁻¹ und 1207 cm⁻¹ (*s*, R-O-SO₂-OR'), 1058 cm⁻¹ (*s*), 985 cm⁻¹ (*s*), 810 cm⁻¹ (*s*), 582 cm⁻¹ (*s*).

UV/Vis - Spektrum: λ_{max} = 525 nm.

6.3.3.3 Synthese **NP6** ($\varnothing = 6$ nm)

Ethanolamin (9 μ l, 0.15 mmol, $1.5 \cdot 10^5$ eq) wurde in einer Lösung von MUDHSE-koordinierten Au-Kolloiden (1 nmol NP, $d = 6$ nm) in 6 ml DMF gelöst. Nach 30 Minuten wurde TEA (20 μ l, 0.14 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben und weitere 24 h bei RT gerührt. Die klare Reaktionslösung wurde dann gegen DMF dialysiert (MWCO: 14000, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.125 μ M NP erhalten.

Die Ethanolamin-funktionalisierten Au-Kolloide (1 nmol NP, 2 ml einer 0.5 μ M Lösung in DMF, $d = 6$ nm) wurden in 2 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von SO_3 -DMF-Komplex (300 mg, 2.0 mmol, $2 \cdot 10^5$ eq) in 1 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Das LM wurde im HV entfernt und der Rückstand in 3 ml einer 1 M wässrigen NaOH-Lösung wieder gelöst. Die Kolloidlösung wurde dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 14000, 6 mal je 1000 ml Wasser, erst 3 mal 30 min, dann drei mal 3 h). Es wurde eine klare, rote Lösung der NP in Wasser mit einer Konzentration von 0.25 μ M NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen optisch stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $c_{\text{NP}} = 1$ μ M): 4.06 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-OSO}_3^-$), 3.45 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$), 2.69 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-SH}$), 2.22 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-CONH}$), 1.56 (*bs*), 1.25 (*bs*).

ATR-IR: 3302 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{N-H})$), 2918 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1686 und 1639 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1532 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1465 - 1452 cm^{-1} und 1211 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1066 cm^{-1} (*s*), 1020 cm^{-1} (*s*), 959 cm^{-1} (*w*), 719 cm^{-1} (*s*), 579 cm^{-1} (*s*).

6.3.3.4 Synthese von **NP7** ($\varnothing = 6$ nm)

2-Amino-1,3-propandiol (27 mg, 0.3 mmol, 10^5 eq) wurde in einer Lösung von MUDHSE-koordinierten Au-Kolloiden (3 nmol NP, $d = 6$ nm) in 20 ml DMF gelöst. Nach 30 Minuten wurde TEA (60 μ l, 0.42 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben und weitere 24 h bei RT gerührt. Die klare Reaktionslösung wurde dann gegen DMF dialysiert (MWCO: 4000-6000, dreimal je

300 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.15 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Tage optisch stabil war.

Serinol-funktionalisierte Au-Kolloide (1.5 nmol NP, 10 ml einer 0.15 μM Lösung in DMF, $d = 6$ nm) wurden in 8 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde langsam eine Lösung von SO_3 -DMF-Komplex (230 mg, 1.5 mmol, 10^6 eq) in 5 ml wasserfreiem DMF zugetropft und 1.5 h bei RT gerührt. Das LM wurde im HV entfernt und der Rückstand in einer Mischung aus 10 ml Wasser und 1 ml TMAH (2.8 mmol) wieder gelöst. Die Kolloidlösung wurde dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 4000-6000, 6 mal je 600 ml Wasser, erst 3 mal 30 min, dann drei mal 3 h). Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.15 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.43 (*bs*, $\text{CH}-(\text{CH}_2\text{OSO}_3^-)_3$), 4.15 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-OSO}_3^-$), 2.89 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-SH}$), 2.30 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-CONH}$), 1.62 (*bs*), 1.32 (*bs*).

ATR-IR: 3482 und 3294 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{O-H})$), 3039 cm^{-1} (*w*), 2924 cm^{-1} und 2853 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1683 und 1653 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1539 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1490 cm^{-1} (*s*), 1465 - 1453 cm^{-1} und 1218 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1004 cm^{-1} (*s*), 950 cm^{-1} (*s*), 788 cm^{-1} (*s*), 577 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 522$ nm.

6.3.3.5 Synthese von NP8 ($\emptyset = 6$ nm)

Tromethamin (18.2 mg, 0.15 mmol, $1.5 \cdot 10^5$ eq) wurde in einer Lösung von MUDHSE-koordinierten Au-Kolloiden (1 nmol NP, $d = 6$ nm) in 6 ml DMF gelöst. Nach 30 Minuten wurde TEA (80 μl , 0.56 mmol, $5.6 \cdot 10^5$ eq) zugegeben und weitere 24 h bei RT gerührt. Die klare Reaktionslösung wurde dann gegen DMF dialysiert (MWCO: 14000, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.125 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Tage stabil war.

Tromethamin-funktionalisierte Au-Kolloide (1 nmol NP, 2 ml einer 0.5 μM Lösung in DMF, $d = 6$ nm) wurden in 2 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von SO_3 -

DMF-Komplex (300 mg, 2.0 mmol, $2 \cdot 10^5$ eq) in 1 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Das LM wurde im HV entfernt und der Rückstand in 3 ml einer 1 M wässrigen NaOH-Lösung wieder gelöst. Die Kolloidlösung wurde dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 14000, 6 mal je 1000 ml Wasser, erst 3 mal 30 min, dann drei mal 3 h). Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von $0.25 \mu\text{M}$ NP erhalten, welche bei 0°C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $c_{\text{NP}} = 1 \mu\text{M}$): 4.3 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-O-SO}_3^-$), 2.90 (*bs*), 2.24 (*bs*, $\text{CH}_2\text{-S}$), 1.59 (*bs*), 1.29 (*bs*).

ATR-IR: 3291 cm^{-1} (*w*, $\nu(\text{N-H})$), 2920 cm^{-1} und 2851 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 2465 cm^{-1} (*w*, $\nu(\text{S-H})$), 1682 und 1633 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1528 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), $1466 - 1453 \text{ cm}^{-1}$ und 1210 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1002 cm^{-1} (*s*), $801 - 774 \text{ cm}^{-1}$ (*s*), 578 cm^{-1} (*s*).

6.3.3.6 Synthese von NP9

Zu einer Lösung des Aminopyrans ((2S,3S,4R,5R)-3-Amino-4-hydroxy-6,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*Anti3*) (0.05 mmol, 10.5 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 1.25 ml wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 6.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 μl , 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *Anti3*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von $\text{SO}_3\text{-DMF}$ -Komplex (76.6 mg, 0.5 mmol, $2 \cdot 10^5$ eq) in 153 μl wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 12.5 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von $0.2 \mu\text{M}$ NP erhalten, welche bei 0°C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.02 (*m*), 2.22 (*m*), 2.04 (*m*), 1.65 (*m*), 1.56 (*m*), 1.38 (*s*), 1.31 (*s*), 1.27 (*bs*).

ATR-IR: 3286 cm^{-1} (*w*), 2919 cm^{-1} und 2855 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1670 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1467 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1402 cm^{-1} (*w*), 1224 (*w*), 1165 cm^{-1} (*w*), 1040 cm^{-1} (*s*), 971 cm^{-1} (*s*), 867 cm^{-1} (*s*), 802 cm^{-1} (*s*), 575 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$.

6.3.3.7 Synthese von **NP10**

Zu einer Lösung des Aminopyrans ((2S,3R,4S,5S,6S)-3-Amino-4-hydroxy-6-methoxytetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*AminI*) (0.05 mmol, 10.4 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 625 μl wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 6.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 μl , 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *AminI*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von $\text{SO}_3\text{-DMF}$ -Komplex (76.6 mg, 0.5 mmol, $2 \cdot 10^5$ eq) in 153 μl wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 12.5 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.2 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.50 (*m*), 4.23 (*m*), 4.16 (*m*), 3.43 (*s*), 2.37 (*m*), 2.28 (*m*), 1.66 (*m*), 1.57 (*m*), 1.4 – 1.2 (*m*).

ATR-IR: 2919 cm^{-1} und 2850 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1701 und 1634 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1518 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1465 - 1450 cm^{-1} und 1151 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1041 (*s*), 860 cm^{-1} (*s*), 575 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$.

6.3.3.8 Synthese von **NP11**

Zu einer Lösung des Aminopyrans ((2R,3S,4R,5R,6R)-3-Amino-4-hydroxy-6-methoxytetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)dimethanol (*Amin2*) (0.05 mmol, 10.4 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 625 μl wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koordinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 6.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 μl , 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *Amin2*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von $\text{SO}_3\text{-DMF}$ -Komplex (76.6 mg, 0.5 mmol, $2 \cdot 10^5$ eq) in 153 μl wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 12.5 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.2 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.50 (*m*), 4.23 (*m*), 4.10 (*m*), 3.43 (*m*), 2.39 (*m*), 2.29 (*bs*), 1.62 (*bs*), 1.57 (*bs*), 1.4 – 1.2 (*bs*).

ATR-IR: 2919 cm^{-1} und 2850 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1701 und 1634 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1518 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1465 - 1450 cm^{-1} und 1151 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1041 (*s*), 860 cm^{-1} (*s*), 575 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 524 \text{ nm}$.

6.3.3.9 Synthese von NP12

Zu einer Lösung des Aminopyrans (3R,4S,5R,6S)-5-Amino-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydro-2H-pyran-3,4-diol (*Amin 3*) (0.05 mmol, 9.56 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 1.25 ml wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6$ nm) in 8.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 μ l, 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *Amin 3*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von SO₃-DMF-Komplex (45.9 mg, 0.3 mmol, $1.2 \cdot 10^5$ eq) in 10 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 17.5 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.143 μ M NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 4.51 (*m*), 4.24 (*m*), 4.14 (*m*), 3.98 (*m*), 2.78 (*t*), 2.37 (*m*), 2.18 (*t*), 1.69 (*m*), 1.55 (*m*), 1.41 (*s*), 1.32 (*m*).

ATR-IR: 2914 cm⁻¹ und 2849 (*s*, ν (C-H)), 1601 cm⁻¹ (*w*), 1561 cm⁻¹ (*s*, δ (N-H)), 1422 cm⁻¹ (*s*, R-O-SO₂-OR'), 1224 (*w*), 1145 cm⁻¹ (*w*), 956 cm⁻¹ (*s*), 877 cm⁻¹ (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\max} = 522$ nm.

6.3.3.10 Synthese von NP13

Zu einer Lösung des Aminopyrans (4R,5R,6S)-5-Amino-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydro-2H-pyran-4-ol (*Amin 4*) (0.05 mmol, 8.76 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 1.25 ml wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6$ nm) in 8.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei

RT gerührt bevor Triethylamin (50 μ l, 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *Amin 4*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von SO_3 -DMF-Komplex (30.6 mg, 0.2 mmol, $8 \cdot 10^4$ eq) in 10 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 16.5 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.15 μ M NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.53 (*m*), 4.23 (*m*), 4.00 (*m*), 2.78 (*m*), 2.36 (*m*), 2.16 (*m*), 2.03 (*m*), 1.7 – 1.5 (*m*), 1.35 (*s*), 1.33 (*m*).

ATR-IR: 3286 cm^{-1} (*w*), 2914 cm^{-1} und 2850 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1640 cm^{-1} (*w*), 1561 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1412 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1256 – 1219 cm^{-1} (*w*), 1145 cm^{-1} (*w*), 976 cm^{-1} (*s*), 872 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 522$ nm.

6.3.3.11 Synthese von **NP14**

Zu einer Lösung des Aminofurans ((2S,3S,4R,5S)-3-Amino-4-methoxytetrahydrofuran-2,5-diyl)dimethanol (*Amin 5*) (0.05 mmol, 8.9 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 625 μ l wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6$ nm) in 6.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 μ l, 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *Amin 5*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von SO₃-DMF-Komplex (76.6 mg, 0.5 mmol, 2·10⁵ eq) in 10 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 12.5 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.2 µM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 4.80 (*m*), 4.42 (*m*), 4.1 – 4.3 (*m*), 4.10 (*m*), 3.87 (*m*), 3.48 (*s*), 2.78 (*t*), 2.31 (*m*), 2.18 (*t*), 1.70 (*m*), 1.63 (*m*), 1.55 (*m*), 1.41 (*s*), 1.3 (*m*).

ATR-IR: 2923 cm⁻¹ und 2852 (*s*, ν(C-H)), 2512 (*w*, ν(S-H)), 1701 und 1644 cm⁻¹ (*s*, ν(C=O)), 1546 cm⁻¹ (*s*, δ(N-H)), 1466 - 1453 cm⁻¹ und 1200 cm⁻¹ (*s*, R-O-SO₂-OR'), 1136 cm⁻¹ (*s*), 1056 cm⁻¹ (*s*), 993 cm⁻¹ (*s*), 578 cm⁻¹ (*s*).

UV/Vis - Spektrum: λ_{max} = 522 nm.

6.3.3.12 Synthese von **NP15**

Zu einer Lösung des Aminofurans ((2R,3R,4R)-3-(Aminomethyl)-3-methoxy-5,5-dimethyltetrahydrofuran-2,4-diyl)dimethanol (*Amin 6*) (0.05 mmol, 11 mg, 2·10⁴ eq) in 1.25 ml wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, d = 6 nm) in 8.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 µl, 0.35 mmol, 1.4·10⁵ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *Amin 6*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von SO₃-DMF-Komplex (30.6 mg, 0.2 mmol, 8·10⁴ eq) in 10 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse

betrug 16 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.156 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.31 (*m*), 4.13 (*m*), 3.97 (*m*), 3.50 (*m*), 3.44 (*s*), 2.78 (*m*), 2.30 (*s*), 2.18 (*t*), 1.70 (*m*), 1.65 – 1.5 (*m*), 1.44 (*s*), 1.35 (*s*), 1.4 – 1.3 (*m*).

ATR-IR: 3281 cm^{-1} (*w*), 2914 cm^{-1} und 2849 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1626 cm^{-1} (*w*), 1566 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1417 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1259 – 1224 cm^{-1} (*w*), 1135 cm^{-1} (*w*), 922 cm^{-1} (*s*), 872 cm^{-1} (*s*), 624 cm^{-1} (*w*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 523 \text{ nm}$.

6.3.3.13 Synthese von **NP16**

Zu einer Lösung des Aminopyrans (3S,4S,5R,6S)-5-Amino-3-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-6-(propoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-4-ol (*Amin 7*) (0.05 mmol, 13 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 1.8 ml wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 8.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 μl , 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die *Amin 7*-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von $\text{SO}_3\text{-DMF}$ -Komplex (30.6 mg, 0.2 mmol, $8 \cdot 10^4$ eq) in 10 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 9 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.278 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 4.58 (*t*), 4.38 (*m*), 4.23 (*m*), 3.53 (*m*), 2.83 (*t*), 2.73 (*m*), 2.59 (*m*), 2.42 (*m*), 2.34 (*m*), 2.21 (*m*), 1.73 (*m*), 1.62 (*m*), 1.52 (*s*), 1.36 (*bs*), 0.93 (*t*).

ATR-IR: 2920 cm^{-1} und 2851 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1640 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1538 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1464 - 1453 cm^{-1} und 1217 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1066 cm^{-1} (*s*), 982 cm^{-1} (*s*), 819 cm^{-1} (*s*), 584 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$.

6.3.3.14 Synthese von **NP17**

Zu einer Lösung von (1R,2R)-2-Amino-1-phenyl-1,3-propandiol (0.05 mmol, 8.36 mg, $2 \cdot 10^4$ eq) in 1.8 ml wasserfreiem DMF wurde eine Lösung von MUDHSE-koodinierten Au-NP (2.5 nmol NP, $d = 6 \text{ nm}$) in 8.8 ml wasserfreiem DMF getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt bevor Triethylamin (50 μl , 0.35 mmol, $1.4 \cdot 10^5$ eq) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 h Rühren wurde die Reaktionsmischung gegen DMF dialysiert (MWCO: 12400, zweimal je 400 ml DMF, jeweils 3 h). Es wurde eine klare rote Lösung erhalten.

Die (1R,2R)-2-Amino-1-phenyl-1,3-propandiol-funktionalisierten Kolloide (2.5 nmol NP) wurden in 5 ml wasserfreies DMF überführt. Dann wurde eine Lösung von $\text{SO}_3\text{-DMF}$ -Komplex (30.6 mg, 0.2 mmol, $8 \cdot 10^4$ eq) in 10 ml wasserfreiem DMF zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Ein Teil des LM wurde im HV entfernt und die Kolloidlösung dann gegen Wasser dialysiert (MWCO: 12400, 6 mal je 500 ml Wasser, erst 6 mal 10 min, dann drei mal 3 h). Das Endvolumen nach der Dialyse betrug 9.25 ml. Es wurde eine klare, rote Lösung mit einer Konzentration von 0.27 μM NP erhalten, welche bei 0 °C mehrere Wochen stabil war.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 7.5 – 7.4 (*m*, 5H), 5.47 (*bs*, 1H), 4.57 (*m*, 1H), 4.25 (*m*, 1H), 4.02 (*m*, 1H), 2.81 (*m*, 2H), 2.25 (*m*, 3H), 1.74 (*m*, 2H), 1.62 (*m*, 2H), 1.5 – 1.2 (*m*).

ATR-IR: 3109 cm^{-1} (*w*, $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H})$), 2920 cm^{-1} und 2850 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1650 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1559 cm^{-1} (*s*, $\delta(\text{N-H})$), 1451 - 1410 cm^{-1} und 1219 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1068 cm^{-1} (*s*), 998 cm^{-1} (*s*), 811 cm^{-1} (*s*), 698 cm^{-1} (*s*), 579 cm^{-1} (*s*).

UV/Vis - Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$.

6.3.4 Synthesen der Liganden

6.3.4.1 Synthese von Natrium-11-Bromoundecanylsulfat

11-Bromoundecanol (1.256 g, 5 mmol, 1 eq) wurde in 30 ml wasserfreiem DMF gelöst und tropfenweise mit SO₃-DMF-Komplex (1.1487 g, 7.5 mmol, 1.5 eq), gelöst in 10 ml wasserfreiem DMF, versetzt. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel am HV entfernt und der Rückstand in 15 ml einer 1 M NaOH gelöst. Nach wenigen Minuten bildete sich ein weißer Niederschlag. Die Suspension wurde über Nacht bei 4-8 °C gelagert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und am HV getrocknet. Es wurden 1.576 g eines weißen Feststoffes erhalten (89 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.65 (*t*, 2H), 3.50 (*t*, 2H), 1.77 (*quin*, 2H), 1.5 - 1.4 (*m*, 2H), 1.4 - 1.3 (*m*, 2H), 1.3 - 1.15 (*bs*, 12H).

6.3.4.2 Synthese von Natrium-11-Mercaptoundecanylsulfat (MUDSulfat)

11-Bromoundecanylsulfat (0.700 g, 2 mmol, 1 eq) wurde in 80 ml wasserfreiem DMF gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Dann wurde eine Lösung von Kaliumthioacetat (0.274 g, 2.4 mmol, 1.2 eq) in 25 ml DMF langsam zugetropft. Nach 7 h Rühren bei RT wurden 50 ml einer 0.1 M Natronlauge zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert (drei mal 100 ml). Das Lösungsmittel wurde zunächst am RV, dann im HV entfernt. Der Rückstand wurde in 100 ml 0.1 M NaOH gelöst und 6 h bei RT gerührt. Dann wurde mit Ethylacetat (drei mal 100 ml) extrahiert und das LM im HV entfernt. Der Rückstand wurde durch Kristallisation aus Ethylacetat gereinigt und es wurde ein weißer Feststoff erhalten (35 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.65 (*t*, 2H), 2.44 (*t*, 2H), 1.3 - 1.2 (*m*, 4H), 1.2 - 1.1 (*m*, 14H).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 65.68, 38.00, 29.30, 29.27, 29.20, 29.18, 29.04, 28.84, 28.76, 27.97, 25.77.

ATR-IR: 2914 cm^{-1} und 2845 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1695 cm^{-1} (*s*, $\nu(\text{C=O})$), 1472 cm^{-1} und 1269 – 1214 cm^{-1} (*s*, $\text{R-O-SO}_2\text{-OR}'$), 1135 cm^{-1} (*w*), 1110 cm^{-1} (*w*), 1065 cm^{-1} (*s*), 1000 cm^{-1} (*s*), 962 cm^{-1} (*s*), 798 cm^{-1} (*s*), 758 cm^{-1} (*s*), 624 cm^{-1} (*s*), 589 cm^{-1} (*s*), 565 cm^{-1} (*s*).

6.3.4.3 Synthese von N,N,N-Trimethyl(11-mercaptoundecyl)ammoniumchlorid (TMA)

(nach einer Literaturvorschrift von *Tien et al.* [186])

Eine 33 Gew.-% ige Lösung von Trimethylamin (4 mL, 1 g, 17 mmol, 3.2 eq) in Ethanol wurde in 5 mL Methanol gelöst und mit 10-Undecenylbromid (1.25 mL, 5.3 mmol, 1 eq) versetzt. Die klare Lösung wurde 3 d bei RT gerührt. Dann wurden Lösungsmittel und überschüssiges Trimethylamin im HV entfernt. Es blieb ein weißer Feststoff zurück, welcher in 3 mL CH_2Cl_2 gelöst wurde. Bei Zugabe von 50 mL Hexan fiel ein weißer Niederschlag aus, welcher sich am Boden absetzte. Der Niederschlag wurde abfiltriert und am HV getrocknet. Es wurden 1.12 g eines weißen Feststoffs erhalten (72 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): 5.79 (*m*, 1H), 5.0 - 4.88 (*m*, 2H), 3.36 - 3.25 (*m*, 2H), 3.13 (*s*, 9H), 2.04 (*m*, 2H), 1.79 (*m*, 2H), 1.45 – 1.3 (*m*, 12H).

N,N,N-Trimethyl(10-undecenyl)ammoniumbromid (1 g, 4.7 mmol, 1 eq) wurde in 7 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit Thioessigsäure (0.7 mL, 55.7 mmol, 11.9 eq) versetzt. Die klare Lösung wurde 8 h bei RT mit einer Quecksilbertauchlampe bestrahlt. Dann wurden Lösungsmittel und andere flüchtige Komponenten am HV entfernt. Der weiße Rückstand wurde mit Diethylether gewaschen und die Lösungsmittelreste am HV entfernt. Der weiße Rückstand wurde in 7 ml einer 5 M Salzsäure gelöst und bei 70 °C ca. 1 h gerührt. Die Salzsäure wurde am HV entfernt. Es wurden 741 mg eines hellgelben Rückstands erhalten (56 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 3.33 (*m*, 2H), 3.09 (*s*, 9H), 2.50 (*t*, 2H), 1.75 (*m*, 2H), 1.56 (*m*, 2H), 1.45 – 1.3 (*m*, 12H).

6.3.4.4 Synthese von 11-Mercaptoundecansäure-N-hydroxysuccinimidester

N-Hydroxysuccinimid (0.500 g, 4.35 mmol, 1 eq) wurde in 250 ml Dichlormethan gelöst. Zu der klaren Lösung wurde die in 5 ml Dichlormethan gelöste 11-Mercaptoundecansäure (0.950 g, 4.35 mmol, 1 eq) gegeben. Dann wurde eine Lösung von 1,3-Dicyclocarbodiimid (0.985 g, 4.75 mmol, 1.1 eq) in 25 ml Dichlormethan langsam zugetropft. Nach ca. 30 Minuten begann die Reaktionsmischung trüb zu werden. Nach 24 h Rühren bei RT wurde der Niederschlag durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel des Überstands am RV entfernt. Der Rückstand wurde in DMF aufgenommen und der unlösliche Rückstand durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel wurde am HV entfernt und 1.4 g eines blaßgelben Rückstands erhalten (99 %), welcher noch Reste von Dicyclohexylharnstoff enthielt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 2.80 (*s*, 4H), 2.66 (*t*, 2H), 2.44 (*t*, 2H), 2.21 (*m*, 1H), 1.75 - 1.4 (*m*, 4H), 1.4 - 1.2 (*m*, 12H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 170.1, 168.9, 33.5, 30.2, 29.0, 28.9, 28.6, 28.1, 27.6, 25.5, 25.3, 24.3, 23.8.

ATR-IR: 2919 cm^{-1} und 2850 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1819 cm^{-1} (*w*), 1786 cm^{-1} (*w*), 1725 cm^{-1} (*s*), 1653 cm^{-1} (*s*), 1516 (*w*), 1465 cm^{-1} (*w*), 1431 cm^{-1} (*w*), 1407 cm^{-1} (*w*), 1383 cm^{-1} (*w*), 1207 cm^{-1} (*s*), 1075 cm^{-1} (*s*), 1046 cm^{-1} (*s*), 995 cm^{-1} (*w*), 867 cm^{-1} (*w*), 813 cm^{-1} (*w*), 719 cm^{-1} (*w*), 651 cm^{-1} (*s*).

6.3.4.5 Synthese von 6-Acetylsulfanylhexansäure

6-Bromohexansäure (1.500 g, 7.69 mmol, 1 eq) wurde in 15 ml DMF (wasserfrei) gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von Kaliumthioacetat (1.317 g, 11.53 mmol, 1.5 eq) in DMF (15 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im HV entfernt, der Rückstand mit Wasser versetzt und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden am RV eingeengt und das verbleibende Lösungsmittel am HV entfernt. Es wurden 1063 mg Produkt erhalten (72 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.85 (*t*, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.33 (*t*, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.30 (*s*, 3H), 1.63 (*quin*, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.57 (*quin*, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.45 - 1.35 (*m*, 2H).

6.3.4.5 Synthese von 6-Acetylsulfanylhexansäure-N-hydroxysuccinimidester

NHS (708 mg, 6.15 mmol, 1.1 eq) wurde in 100 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit S-Acetylsulfanylhexansäure (1.063 g, 5.59 mmol, 1 eq) versetzt. DCC (1.269 g, 6.15 mmol, 1.1 eq) wurde in 5 mL CH_2Cl_2 gelöst und zugetropft. Nach wenigen Minuten fiel ein weißer Niederschlag aus. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am RV (40 °C, 550 mbar) entfernt, der Rückstand in wenig CH_2Cl_2 gelöst und der dabei zurückbleibende Feststoff durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde am RV (40 °C, 550 mbar) und dann im HV entfernt. Es wurden 1.550 g eines braunen Öls erhalten (99 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.86 (*t*, 2H, 2- CH_2), 2.82 (*s*, 4H, 7- CH_2), 2.59 (*t*, 2H, 6- CH_2), 2.30 (*s*, 3H, 1- CH_3), 1.74 (*quin*, 2H, 5- CH_2), 1.61 (*quin*, 2H, 3- CH_2), 1.46 (*m*, 2H, 4- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 169.0, 168.4, 30.7, 30.6, 29.0, 28.7, 27.8, 25.5, 24.0.

6.3.4.9 Synthese von Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-hexyl]ester

S-Acetylsulfanylhexansäure-N-hydroxysuccinimidester (1.623 g, 5.6 mmol) wurde in 20 mL DMF gelöst und mit Serinol (765 mg, 8.4 mmol, 1.5 eq) versetzt. Nach wenigen Minuten wurde die Lösung trüb. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am HV entfernt und der Rückstand in 50 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wurde über Nacht bei 4-8 °C gelagert. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, am HV getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (LM: CH_2Cl_2 , $R_f = 0.17$). Es wurden 448 mg eines weißen Feststoffs erhalten (30 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 3.92 (*quin*, 1H, 7- CH_2), 3.72 (*ddd*, 4H, 8- CH_2), 2.82 (*t*, 2H, 2- CH_2), 2.29 (*s*, 3H, 1- CH_3), 2.19 (*t*, 2H, 6- CH_2), 1.62 (*quin*, 2H, 3- CH_2), 1.55 (*quin*, 2H, 5- CH_2), 1.34 (*quin*, 2H, 4- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 196.6, 174.0, 62.8, 52.4, 36.3, 30.7, 29.2, 28.8, 28.1, 25.0.

6.3.4.10 Synthese von **Lig20**

Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-hexyl]ester (52.7 mg, 0.2 mmol, 1 eq) wurde in 2 ml DMF gelöst und tropfenweise mit SO_3 -DMF-Komplex (123 mg, 0.8 mmol, 4 eq), gelöst in 1 ml DMF, versetzt. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt.

Dann wurde 3.2 ml 1 M Natronlauge zugegeben und 5 h bei RT gerührt. Die vollständige Umsetzung wurde mittels DC kontrolliert. Das Produkt wurde nicht aus dieser Lösung isoliert, sondern direkt mit den NP umgesetzt.

6.3.4.5 Synthese von 8-Acetylsulfanyloctansäure

8-Bromooctansäure (1.116 g, 5 mmol, 1 eq) wurde in 15 ml DMF (wasserfrei) gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von Kaliumthioacetat (857 mg, 7.5 mmol, 1.5 eq) in DMF (15 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im HV entfernt und der Rückstand in Wasser suspendiert. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 660 mg eines weißen Feststoffs erhalten (60 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.83 (*t*, 2H, 2- CH_2), 2.32 (*t*, 2H, 8- CH_2), 2.30 (*s*, 3H, 1- CH_3), 1.60 (*quin*, 2H, 7- CH_2), 1.54 (*quin*, 2H, 3- CH_2), 1.31 (*bs*, 6H, 4-6- CH_2).

6.3.4.5 Synthese von 8-Acetylsulfanyloctansäure-N-hydroxysuccinimidester

NHS (279 mg, 2.42 mmol, 1.1 eq) wurde in 150 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit S-Acetylsulfanyloctansäure (562 mg, 2.2 mmol, 1 eq) versetzt. DCC (500 mg, 2.42 mmol, 1.1 eq) wurde in 5 mL CH₂Cl₂ gelöst und zugetropft. Nach wenigen Minuten fiel ein weißer Niederschlag aus. Die Reaktionsmischung wurde 3 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am RV (40 °C, 550 mbar) entfernt, der Rückstand in wenig CH₂Cl₂ gelöst und der dabei zurückbleibende Feststoff durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde am RV (40 °C, 550 mbar) und dann im HV entfernt. Es wurden 641 mg eines hellgelben Öls erhalten (92 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.84 (*t*, 2H, 2-CH₂), 2.80 (*s*, 4H, 9-CH₂), 2.58 (*t*, 2H, 8-CH₂), 2.30 (*s*, 3H, 1-CH₃), 1.72 (*quin*, 2H, 7-CH₂), 1.53 (*quin*, 2H, 3-CH₂), 1.45 - 1.3 (*m*, 6H, 4-6-CH₂).

6.3.4.9 Synthese von Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-octyl]ester

S-Acetylsulfanyloctansäure-N-hydroxysuccinimidester (460 mg, 1.46 mmol) wurde in 10 mL DMF gelöst und mit Serinol (273 mg, 3 mmol, 2 eq) versetzt. Nach wenigen Minuten wurde die Lösung trüb. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am HV entfernt und der Rückstand in 50 ml Wasser suspendiert. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 200 mg eines weißen Feststoffs erhalten (47 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 6.30 (*s*, 1H, NH), 3.94 (*m*, 1H, 9-CH₂), 3.75 – 3.86 (*ddd*, 4H, 10-CH₂), 2.82 (*t*, 2H, 2-CH₂), 2.30 (*s*, 3H, 1-CH₃), 2.22 (*t*, 2H, 8-CH₂), 1.62 (*quin*, 2H, 7-CH₂), 1.52 (*quin*, 2H, 3-CH₂), 1.30 (*bm*, 6H, 4-6-CH₂).

6.3.4.10 Synthese von **Lig21**

Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-octyl]ester (203 mg, 0.7 mmol, 1 eq) wurde in 5 ml DMF gelöst und tropfenweise mit SO₃-DMF-Komplex (429 mg, 2.8 mmol, 4 eq), gelöst in 5 ml DMF, versetzt. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt.

Dann wurden 100 ml einer 0.2 M Natronlauge zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Die vollständige Umsetzung wurde mittels DC kontrolliert. Das Lösungsmittel wurde am RV und am HV entfernt. Das Produkt wurde nicht isoliert, sondern direkt mit den NP umgesetzt.

6.3.4.7 Synthese von S-Acetylsulfanylundecansäure

11-Bromoundecansäure (1.000 g, 3.77 mmol, 1 eq) wurde in 150 ml DMF (wasserfrei) gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von Kaliumthioacetat (1.4 g, 9 mmol, eq) in DMF (15 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt. Dann wurde Wasser zugegeben bis die Lösung deutlich trüb wird. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 963 mg eines weißen Feststoffs erhalten (86 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.83 (*t*, 2H, 2-CH₂), 2.33 (*t*, 2H, 11-CH₂), 2.31 (*s*, 3H, 1-CH₃), 1.59 (*quin*, 2H, 3-CH₂), 1.54 (*quin*, 2H, 10-CH₂), 1.4 - 1.2 (*m*, 12H, 4-9-CH₂).

ATR-IR: 2914 cm⁻¹ und 2845 (*s*, *v*(C-H)), 1685 cm⁻¹ (*s*), 1462 cm⁻¹ (*w*), 1432 cm⁻¹ (*w*), 1407 cm⁻¹ (*w*), 1284 cm⁻¹ (*w*), 1135 cm⁻¹ (*w*), 1100 cm⁻¹ (*w*), 966 - 922 cm⁻¹ (*w*), 728 cm⁻¹ (*w*), 619 cm⁻¹ (*s*).

6.3.4.8 Synthese von S-Acetylsulfanylundecansäure-N-hydroxysuccinimidester

NHS (367 mg, 3.17 mmol, 1.1 eq) wurde in 200 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit S-Acetylsulfanylundecansäure versetzt. DCC (654 mg, 3.17 mmol, 1.1 eq) wurde in 15 mL CH₂Cl₂ gelöst und zutropft. Die Reaktionsmischung wurde 18 h bei RT gerührt. Nach ca. 1 h begann die klare Lösung langsam trüb zu werden. Das Lösungsmittel wurde am RV (40 °C, 550 mbar)

entfernt, der weiße Rückstand in wenig CH_2Cl_2 (ca. 10 mL) gelöst, der dabei zurückbleibende Feststoff durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde am RV (40 °C, 550 mbar) und dann im HV entfernt. Der weiße Rückstand wurde mit Pentan gewaschen und getrocknet. Es wurden 1.016 g eines weißen Feststoffs erhalten (99 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.84 (*t*, 2H, 2- CH_2), 2.83 (*s*, 4H, 12- CH_2), 2.58 (*t*, 2H, 11- CH_2), 2.30 (*s*, 3H, 1- CH_3), 1.72 (*quin*, 2H, 10- CH_2), 1.54 (*quin*, 2H, 3- CH_2), 1.4 - 1.2 (*m*, 12H, 4-9- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 195.9, 169.2, 168.5, 30.6, 30.4, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8, 28.7, 28.5, 28.4, 25.4, 24.3.

ATR-IR: 3321 cm^{-1} (*w*), 2914 cm^{-1} und 2845 (*s*, $\nu(\text{C-H})$), 1814 cm^{-1} (*w*), 1784 cm^{-1} (*w*), 1730 cm^{-1} (*s*), 1680 cm^{-1} (*s*), 1621 (*w*), 1576 (*w*), 1462 cm^{-1} (*w*), 1412 cm^{-1} (*w*), 1204 cm^{-1} (*s*), 1155 cm^{-1} (*w*), 1130 cm^{-1} (*s*), 1070 cm^{-1} (*s*), 1046 cm^{-1} (*s*), 956 cm^{-1} (*w*), 881 cm^{-1} (*w*), 807 cm^{-1} (*w*), 723 cm^{-1} (*w*), 639 cm^{-1} (*s*).

6.3.4.9 Synthese von Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-decyl]ester

S-Acetylsulfanylundecansäure-N-hydroxysuccinimidester (1.016 g, 2.84 mmol) wurde in 20 mL DMF gelöst und mit Serinol (388 mg, 4.26 mmol, 1.5 eq) versetzt. Nach ca. 1 h wurde die Lösung trüb. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt. Dann wurde Wasser (ca. 100 ml) zugegeben bis sich erst der vorhandene Niederschlag löst und dann ein voluminöser weißer Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 803 mg eines weißen Feststoffs erhalten (85 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 6.21 (*bs*, 1H, 15-NH), 3.96 (*m*, 1H, 12- CH_2), 3.80 (*ddd*, 4H, 13- CH_2), 2.84 (*t*, 2H, 2- CH_2), 2.30 (*s*, 3H, 1- CH_3), 2.21 (*t*, 2H, 11- CH_2), 1.61 (*quin*, 2H, 10- CH_2), 1.53 (*quin*, 2H, 3- CH_2), 1.4 - 1.2 (*m*, 12H, 4-9- CH_2).

6.3.4.10 Synthese von **Lig22**

Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-decyl]ester (334 mg, 1 mmol, 1 eq) wurde in 10 ml DMF gelöst und tropfenweise mit SO₃-DMF-Komplex (613 mg, 4 mmol, 4 eq), gelöst in 20 ml DMF, versetzt. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt.

Dann wurden 100 ml 0.2 M Natronlauge zugegeben und 5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am RV eingengt und der Rückstand mit Ethanol verdünnt. Dabei fiel ein weißer Niederschlag aus. Die Suspension wurde über Nacht bei 4-8 °C gelagert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und am HV getrocknet. Es wurden 248.5 mg eines weißen Pulvers erhalten (48 %).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 4.40 (*m*, 1H), 4.12 (*d*, 4H), 2.53 (*t*, 2H), 2.28 (*t*, 2H), 1.59 (*m*, 4H), 1.4 - 1.2 (*m*, 12 H).

6.3.4.11 Synthese von Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-ethylcarbamoyl)-decyl]ester

S-Acetylsulfanylundecansäure-N-hydroxysuccinimidester (1.000 g, 2.8 mmol) wurde in 25 mL DMF gelöst und mit Ethanolamin (292 µL, 4.8 mmol, 1.5 eq) versetzt. Nach ca. 5 min wurde die Lösung trüb. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt. Dann wurde Wasser zugegeben bis sich ein voluminöser weißer Niederschlag bildet. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 702 mg eines weißen Feststoffs erhalten (82 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 6.05 (*bs*, 1H, 15-NH), 3.70 (*t*, 2H, 13-CH₂), 3.40 (*qua*, 2H, 12-CH₂), 2.81 (*t*, 2H, 2-CH₂), 2.75 (*bs*, 1H, 14-OH), 2.30 (*s*, 3H, 1-CH₃), 2.18 (*t*, 2H, 11-CH₂), 1.60 (*quin*, 2H, 10-CH₂), 1.53 (*quin*, 2H, 3-CH₂), 1.4 - 1.2 (*m*, 12H, 4-9-CH₂).

ATR-IR: 3290 cm⁻¹ (*s*, ν(O-H)), 3088 cm⁻¹ (*w*), 2916 cm⁻¹ und 2847 cm⁻¹ (*s*, ν(C-H)), 1643 (*s*, ν(C=O)), 1555 cm⁻¹ (*s*, δ(N-H)), 1460 cm⁻¹, 1232 cm⁻¹, 1057 cm⁻¹ (*s*), 1035 cm⁻¹ (*s*), 720 cm⁻¹ (*s*).

6.3.4.12 Synthese von **Lig26**

Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-ethylcarbamoyl)-decyl]ester (303.5 mg, 1 mmol, 1 eq) wurde in 10 ml DMF gelöst und tropfenweise mit SO₃-DMF-Komplex (306 mg, 2 mmol, 2 eq), gelöst in 5 ml DMF, versetzt. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt.

Dann wurden 100 ml 0.2 M Natronlauge zugegeben und 5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am RV eingengt und der Rückstand mit Ethanol verdünnt. Dabei fiel ein weißer Niederschlag aus. Die Suspension wurde über Nacht bei 4-8 °C gelagert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und am HV getrocknet. Es wurden 200 mg eines weißen Pulvers erhalten (55 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.65 (*t*, 2H, 13-CH₂), 3.17 (*qua*, 2H, 12-CH₂), 2.66 (*t*, 2H, 2-CH₂), 2.02 (*t*, 2H, 11-CH₂), 1.56 (*quin*, 2H, 3-CH₂), 1.44 (*m*, 2H, 10-CH₂), 1.4 - 1.2 (*m*, 10H, 5-9-CH₂).

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): 172.2, 64.4, 38.6, 35.3, 33.5, 29.0, 28.9, 28.8, 28.7, 28.5, 27.8, 25.3, 23.8.

ATR-IR: 3628 cm⁻¹ (*w*), 3489 cm⁻¹ (*w*), 3301 cm⁻¹ (*s*), 2914 cm⁻¹ und 2845 cm⁻¹ (*s*, *v*(C-H)), 1645 - 1630 (*s*, *v*(C=O)), 1536 cm⁻¹ (*s*, *δ*(N-H)), 1467 cm⁻¹ (*w*), 1407 cm⁻¹ (*w*), 1209 cm⁻¹ (*s*), 1085 cm⁻¹ (*s*), 1026 cm⁻¹ (*s*), 956 cm⁻¹ (*s*), 892 (*w*), 783 (*s*), 723 cm⁻¹ (*w*), 624 cm⁻¹ (*s*), 589 cm⁻¹ (*s*).

6.3.4.13 Synthese von Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1,1-bis-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-decyl]ester

S-Acetylsulfanylundecansäure-N-hydroxysuccinimidester (1.000 g, 2.8 mmol) wurde in 20 mL DMF gelöst und mit Tris (509 mg, 4.2 mmol, 1.5 eq), gelöst in einer Mischung aus 1 mL H₂O und 20 ml DMF, versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 18 h bei RT gerührt. Dann wurde Wasser zugegeben bis sich ein voluminöser weißer Niederschlag bildet. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 740 mg eines weißen Feststoffs erhalten (73 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 6.47 (*bs*, 1H, 15-NH), 3.64 (*s*, 6H, 12- CH_2), 2.83 (*t*, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2- CH_2), 2.30 (*s*, 3H, 1- CH_3), 2.23 (*t*, $J = 7.5$ Hz, 2H, 11- CH_2), 1.60 (*quin*, $J = 7.5$ Hz, 2H, 10- CH_2), 1.53 (*quin*, $J = 7.5$ Hz, 2H, 3- CH_2), 1.4 - 1.2 (*m*, 12H, 4-9- CH_2).

6.3.4.14 Synthese von **Lig27**

Thioessigsäure-S-[10-(2-hydroxy-1,1-bis-hydroxymethyl-ethylcarbamoyl)-decyl]ester (363 mg, 1 mmol, 1 eq) wurde in 10 ml DMF gelöst und tropfenweise mit SO_3 -DMF-Komplex (919 mg, 6 mmol, 6 eq), gelöst in 25 ml DMF, versetzt. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt.

Dann wurden 100 ml 0.2 M Natronlauge zugegeben und 5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am RV eingengt und der Rückstand mit Ethanol verdünnt. Dabei fiel ein weißer Niederschlag aus. Die Suspension wurde über Nacht bei 4-8 °C gelagert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und am HV getrocknet. Es wurden 344 mg eines weißen Pulvers erhalten (53 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 3.65 (*t*, 2H, 13- CH_2), 3.17 (*qua*, 2H, 12- CH_2), 2.66 (*t*, 2H, 2- CH_2), 2.02 (*t*, 2H, 11- CH_2), 1.56 (*quin*, 2H, 3- CH_2), 1.44 (*m*, 2H, 10- CH_2), 1.4 - 1.2 (*m*, 10H, 5-9- CH_2).

6.4 Verwendete Geräte und Messverfahren

6.4.1 Dialyse

Zur Dialyse wurden verschiedene Membranen aus regenerierter Cellulose verwendet, deren Spezifikationen in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

<i>Firma</i>	<i>Reinheitsgrad</i>	<i>MWCO (Da)</i>
<i>Roth</i>	frei von Spurenelementen wie Glycin und Schwermetallsulfiden	5000
<i>Roth</i>	mit Glycerin behandelt, kann Spuren von Glycin und Schwermetallsulfiden enthalten	4000-6000
<i>aldrich</i>	kann mehr als Spuren von Glycin und Schwefel enthalten	12400

Vor dem Einfüllen der zu dialysierenden Lösung wurde die Cellulosemembran den Herstellerangaben entsprechend vorbehandelt, d.h. in der Regel ca. eine Stunde bei RT in Reinstwasser eingeweicht und anschließend mit Reinstwasser gespült.

Die Dialyse erfolgte bei RT, wobei Menge des Lösungsmittels und Dauer der Dialyse dem jeweiligen Lösungsvolumen und der Kolloidsorte angepasst wurde.

6.4.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde bei RT mit einem *Labnet Gel XL Ultra V-2* Elektrophoresesystem (horizontaler Versuchsaufbau) durchgeführt. Hierzu wurde ein 1% iges Agarosegel verwendet. Die angelegte Spannung betrug 100 V. Für die Elektrophorese bei pH 7.1 wurde ein 0.05 molarer Phosphatpuffer, für pH 9 ein 0.1 molarer Tris/HCl-Puffer und für pH 12 ein 0.05 M Phosphat-Puffer verwendet.

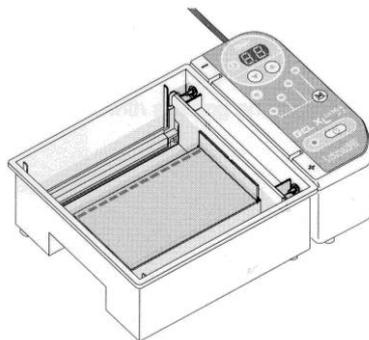


Abbildung 45: Aufbau eines horizontalen Elektrophoresesystems.

Es wurde jeweils ein Probenvolumen von 20 μl in die Taschen des Gels pipettiert. Mischungen von Peptid und Kolloid wurden erst kurz vor dem Auftragen gemischt und erst nach dem Mischen mit PEG 4000 versetzt.

Die Gelelektrophorese wurde abgebrochen, sobald die Banden anfangen breiter zu werden (nach ca. 10-15 Minuten, abhängig von der Kolloidsorte). Die Dokumentation erfolgte durch Belichtung mit 314 nm und/oder mit Weißlicht.

6.4.3 NMR-Spektrometer

NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur auf einem *JL 400 FT* – NMR-Spektrometer der Firma *JEOL* (400 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard ($\delta = 0$ ppm) angegeben. Die Multiplizitäten werden mit *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplet), *qua* (Quartett), *quin* (Quintett), *m* (Multipllett) und *br.* (verbreitertes Signal) bezeichnet. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hz angegeben. Die Kalibrierung erfolgte anhand des Lösungsmittelsignals ($\delta(\text{CDCl}_3) = 7.24$ ppm, $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 2.49$ ppm, $\delta(\text{H}_2\text{O}) = 4.82$ ppm, $\delta(\text{MeOD-}d_4) = 3.30$ ppm).

6.4.4 IR-Spektrometer

Für die Aufnahme von ATR-IR-Spektren wurde ein Fouriertransform-Infrarot-Spektrometer *Nexus* der Firma *Nicolet* verwendet. Die Lage der Absorptionsbanden (*s* = stark, *m* = mittel und *w* = schwach) wurde in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben.

Die ATR-IR-Spektroskopie wird zur Untersuchung der Oberfläche von Materialien oder, wie in diesem Fall, für die Untersuchung von Proben, welche für eine Transmissions-Spektroskopie zu stark absorbieren, eingesetzt. Die Nanopartikel wurden hierzu im HV getrocknet und in fester Form auf einen Diamanten aufgetragen.

6.4.5 Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Thermogravimetrische Untersuchungen von Kolloiden zur Bestimmung der Ligandenzahl pro Nanopartikel wurden mit einer Thermowaage *TG 209* der Firma *Netzsch* durchgeführt. Die Aufheizrate betrug 10 K/min. Der Temperaturbereich und das Temperaturprofil wurden der jeweiligen Probe angepasst.

Die Proben wurden entweder als Feststoff in den Korund- oder Aluminiumtiegel eingewogen (im Fall DT-koordinierter Partikel) oder in Form einer sehr konzentrierten Lösung in den Tiegel überführt und das Lösungsmittel im Anschluss am HV entfernt (im Fall der wasserlöslichen Partikel).

6.4.6 Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM)

Die TEM-Aufnahmen wurden mit einem *Philips CM12* Transmissions-Elektronen-Mikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV aufgenommen. Für alle Proben wurden Kohle-Lochfilm-Kupfergrids verwendet.

Zur Präparation der Proben wurden 6 μl der Probelösung auf beglimmte 400-mesh Kupfergrids getropft und nach einer Minute geblottet. Anschließend wurden die präparierten Grids an der Luft getrocknet.

6.4.7 UV/Vis-Spektrometer

Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren erfolgte mit einem *CARY 50* Spektrophotometer der Firma *VARIAN*. Die Spektren wurden im Bereich von 400-800 nm mit einer Schrittweite von

0.25 nm aufgenommen. Alle Spektren wurden um die Absorption des Lösungsmittels bzw. Puffers korrigiert.

Für die Untersuchung der Peptid-induzierten Anordnung von Nanopartikeln wurde die Konzentration der Kolloide so gewählt, dass am Absorptionsmaximum (ca. 524 nm) eine Absorption von ca. 1.1 erreicht wurde. Bei Kolloiden mit einem Durchmesser von 6 nm entspricht dies einer Konzentration von ca. 0.05 $\mu\text{mol/l}$.

6.4.8 Kompetitiver SPR-basierender Bindungsassay

Die Experimente wurden mit dem Gerät BIACORE X der Firma *Biacore AB* durchgeführt. Die Temperatur während der Experimente betrug 25 °C. Als Puffer wurde 20 mM HEPES-Puffer, versetzt mit 150 mM NaCl und 1 mM CaCl₂, verwendet.

Für die Messung verschiedener Inhibitorkonzentrationen beim kompetitiven Bindungsassay wird eine Stammlösung der Kolloide auf die jeweilige Konzentration verdünnt. Im Fall der NP mit einem mittleren Kerndurchmesser von ca. 6 nm beträgt die Konzentration dieser Stammlösung 0.03 μM . Die Verdünnung hat einen leichten Einfluss auf die gemessenen IC₅₀-Werte. Wird die Kolloidlösung direkt vor der Messung verdünnt, werden etwas niedrigere IC₅₀-Werte gemessen im Vergleich zu Lösungen desselben Kolloids, welche bereits Stunden vor der Messung auf die entsprechende Konzentration verdünnt wurden. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die Gleichgewichtseinstellung des Liganden zwischen Kolloidoberfläche und Lösung zurückzuführen, welche bei Verdünnung der Kolloidlösung zu einem Abdiffundieren eines Teils der Liganden in die Lösung führt. Die Verringerung der Ligandendichte auf der Oberfläche der Kolloide führt zu dem etwas schlechteren Bindungsverhalten. Die Abweichungen in den Messwerten sind allerdings so gering, dass sie für die Ermittlung der IC₅₀-Werte keine Rolle spielen. Für die in dieser Arbeit aufgeführten Messungen wurden die Kolloidlösungen kurz vor der Messung aus der Stammlösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kalsin, A. M., Fialkowski, M., Paszewski, M., Smoukov, S. K., Bishop, K. J., Grzybowski, B. A. *Science* **2006**, *312*, 420-424.
- [2] Roskamp, M., Schaper, A. K., Wendorff, J. H., Schlecht, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *17*, 2496-2499.
- [3] Aili, D., Enander, K., Rydberg, J., Nesterenko, I., Björefors, F., Baltzer, L., Liedberg, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (17), 5780-5788.
- [4] Aili, D., Enander, K., Rydberg, J., Lundström, I., Baltzer, L. & Liedberg, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (7), 2194-2195.
- [5] Si, S., Kotal, A. & Mandal, T. K. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 1248-1255.
- [6] Tessier, P. M., Jinkoji, J., Cheng, Y., Prentice, J. L., Lenhoff, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3106-3112.
- [7] Lévy, R., Thanh, N. T. K., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., Brust, M., Fernig, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10079-10084.
- [8] Döllefeld, H., Hoppe, K., Kolny, J., Schilling, K., Weller, H., Eychmüller, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4* (19), 4747-4753.
- [9] Sigal, G. B., Mammen, M., Dahmann, G., Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (16), 3789-3800.
- [10] Landers, J. J., Cao, Z., Lee, I., Piehler, L., Myc, P. P., Hamouda, T., Galecki, A. T., Baker, J. R. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1222-1230.
- [11] de Jong, M. R., Huskens, J., Reinhoudt, D. N. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4164-4170.
- [12] Boal, A. K., Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 734-735.
- [13] Riehemann, K., Schneider, S. W., Luger, T. A., Godin, B., Ferrari, M., Fuchs, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 872-897.
- [14] Coles, D. J., Yang, S., Esposito, A., Mitchell, D., Minchin, R. F., Toth, I. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 12207-12214.
- [15] Ghosh, P. S., Kim, C., Han, G., Forbes, N. S., Rotello, V. M. *Nano* **2008**, *2* (11), 2213-2218.
- [16] De, M., Gosh, P. S., Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (22), 4225-4241.
- [17] Srivastava, S., Verma, A., Frankamp, B. L., Rotelle, V. M. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (5), 617-621.
- [18] Slocik, J. M., Naik, R. R. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1988-1992.

- [19] de la Fuente, J. M., Alcántara, D., Eaton, P., Crespo, P., Rojas, T. C., Fernández, A., Hernando, A., Penadés, S. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13021-13028.
- [20] Nelson, R. M., Cecconi, O., Roberts, W. G., Aruffo, A., Linhardt, R. J., Bevilacqua, M. *P. Blood* **1993**, *82* (11), 3253-3258.
- [21] Belmiro, C. L. R., Castelo-Branco, M. T. L., Melim, L. M. C., Schanaider, A., Elia, C., Madi, K., Pavao, M. S. G., de Souza, H. S. P. *J. biol. Chem.* **2009**, *284* (17), 11267-11278.
- [22] Hahn, A., Barcikowski, S., Chichkov, B. N. *JLMN* **2008**, *3* (2), 73-77.
- [23] Dykman, L. A., Bogatyrev, V. A. *Russ. Chem. Rev.* **2007**, *76* (2), 181-194.
- [24] Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238-7248.
- [25] Murphy, C. J., Sau, T. K., Gole, A. M., Orendorff, C. J., Gao, J., Gou, L., Hunyadi, S. E., Li, T. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857-13870.
- [26] Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J. *Disc. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55-75.
- [27] Frens, G. *Nature: Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20-22.
- [28] Kumar, S., Gandhi, K. S., Kumar, R. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 3128-3136.
- [29] Sun, Y., Xia, Y. *Analyst* **2003**, *128*, 686-691.
- [30] Zheng, N., Fan, J., Stucky, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (20), 6550-6551.
- [31] Njoki, P. N., Lim, I. S., Mott, D., Park, H., Khan, B., Mishra, S., Sujakumar, R., Luo, J., Zhong, C. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (40), 14664-14669.
- [32] Murray, C. B., Norris, D. J., Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706-8715.
- [33] Eychmüller, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *104*, 6514-6528.
- [34] Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., O'Connor, C. J. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3893-3946.
- [35] Daniel, M., Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346.
- [36] <http://www.uni-kl.de/IFOS/verfahren/TEM.html> (**2006**).
- [37] Murray, C. B., Kagan, C. R., Bawendi, M. G. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545-610.
- [38] Efros, A. L., Rosen, M. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 475-521.
- [39] Murakoshi, K., Hosokawa, H., Saitoh, M., Wada, Y., Sakata, T., Mori, H., Satoh, M., Yanagida, S. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94* (4), 579-586.
- [40] Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., Schatz, G. C. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668-677.
- [41] Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q. *Colloids Surf., B* **2007**, *58*, 3-7.
- [42] Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, *25* (3), 377-445.
- [43] Pelton, M., Aizpurua, J., Bryant, G. *Laser & Photon. Rev.* **2008**, *2* (3), 136-159.

- [44] Hostetler, M. J., Templeton, A. C., Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 3782-3789.
- [45] Dass, A., Guo, R., Tracy, J. B., Balasubramanian, R., Douglas, A. D., Murray, R. W. *Langmuir* **2008**, *24*, 310-315.
- [46] Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P., Murray, R. W., Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir* **2009**.
- [47] Lüddecke, E., Horn, D. *Chem.-Ing.-Tech.* **1982**, *54* (3), 266-267.
- [48] Badia, A., Singh, S., Demers, L., Cuccia, L. B. G. R., Lennox, R. B. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 359-363.
- [49] Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J., Kiely, C. J. *Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1655-1666.
- [50] Yao, H., Momozawa, O., Hamatani, T., Kimura, K. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4692-4697.
- [51] Templeton, A. C., Chen, S., Gross, S. M., Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 66-76.
- [52] Kim, K., Yamada, M., Park, D., Miyake, M. *Chem. Lett.* **2004**, *33* (3), 344-345.
- [53] Miyazaki, A., Nakano, Y. *Langmuir* **2000**, *16*, 7109-7111.
- [54] Wuelfing, W. P., Gross, S. M., Miles, D. T., Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12696-12697.
- [55] Teranishi, T., Kiyokawa, I., Miyake, M. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 596-599.
- [56] Chechik, V., Crooks, R. M. *Langmuir* **1999**, *15*, 6364-6369.
- [57] Perepichka, D., Rosei, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6006-6008.
- [58] Hostetler, M. J., Green, S. J., Stokes, J. J., Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4212-4213.
- [59] Shenhar, R., Rotello, V. M. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 549-561.
- [60] Bellino, M. G., Calvo, E. J., Gordillo, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 424-428.
- [61] Porta, F., Speranza, G., Krpetic, Z., Dal Santo, V., Francescato, P., Scari, G. *Mater. Sci. Eng., B* **2007**, *140*, 187-194.
- [62] Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959-1964.
- [63] Rucareanu, S., Gandubert, V. J., Lennox, R. B. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4674-4680.
- [64] Kassam, A., Bremner, G., Clark, B., Ulibarri, G., Lennox, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3476-3477.
- [65] Montalti, M., Prodi, L., Zaccheroni, N., Baxter, R., Teobaldi, G., Zerbetto, F. *Langmuir* **2003**, *19*, 5172-5174.
- [66] Mayya, K. S., Caruso, F. *Langmuir* **2003**, *19*, 6987-6993.

- [67] Sarathy, K. V., Kulkarni, G. *Chem. Commun.* **1997**, 537-538.
- [68] Gittins, D. I., Caruso, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (16), 3001-3004.
- [69] Gandubert, V. J., Lennox, R. B. *Langmuir* **2005**, *21*, 6532-6539.
- [70] Panigrahi, S., Basu, S., Praharaj, S., Pande, S., Jana, S., Pal, A., Kumar Ghosh, S., Pal, T. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 4596-4605.
- [71] Templeton, A. C., Wuelfing, W. P., Murray, R. W. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 27-36.
- [72] Hein, C. D., Liu, X., Wang, D. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (10), 2216-2230.
- [73] Templeton, A. C., Hostetler, M. J., Warmoth, E. K., Chen, S., Hartshorn, C. M., Krishnamurthy, V. M., Forbes, M. D. E., Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4845-4849.
- [74] Templeton, A. C., Hostetler, M. J., Kraft, C. T., Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1906-1911.
- [75] Gibson, J. D., Khanal, B. P., Zubarev, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11653-11661.
- [76] Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [77] Brennan, J. L., Hatzakis, N. S. T. T. R., Dirvianskyte, N., Razumas, V., Patkar, S., Vind, J., Svendsen, A., Nolte, R. J. M., Rowan, A. E., Brust, M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1373-1375.
- [78] Hong, R., Fischer, N. O., Goodman, C. M., Emrick, T., Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 739-743.
- [79] Thode, C. J., Williams, M. E. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *320*, 346-352.
- [80] Chechik, V. *Annu. Rep. Prog. Chem.* **2008**, *Sect. B*, *104*, 331-348.
- [81] Irrgang, J., Ksienczyk, J., Lapiene, V., Niemeyer, C. M. *Chem. Phys. Chem.* **2009**, *10*, 1483-1491.
- [82] Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., Matoussi, H. *Nat. Mat.* **2005**, *4*, 435-446.
- [83] Vilain, C., Goettmann, F., Moores, A., Le Floch, P., Sanchez, C. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 3509-3514.
- [84] Xu, X., Rosi, N. L., Wang, Y., Huo, F., Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9286-9287.
- [85] Huo, Q., Worden, J. G. *J. Nanopart. Res.* **2007**, *9*, 1013-1025.
- [86] Marubayashi, K., Takizawa, S., Kawakusu, T., Arai, T., Sasai, H. *Org. Lett.* **2003**, *5* (23), 4409-4412.
- [87] Lee, B. S., Namgoong, S. K., Lee, S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4501-4503.
- [88] Belser, T., Stöhr, M., Pfaltz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8720-8731.

- [89] Shipway, A. N., Katz, E., Willner, I. *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 18-52.
- [90] Brust, M., Kiely, C. J. *Colloids Surf., A* **2002**, *202*, 175-186.
- [91] Wang, Z. L., Harfenist, S. A. W. R. L., Bentley, J., Evans, N. D. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3068-3072.
- [92] Taleb, A., Petit, C., Pileni, M. P. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 950-959.
- [93] Martin, J. E., Wilcoxon, J. P., Odinek, J., Provencio, P. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9475-9486.
- [94] Petroski, J. M., Green, T. C., El-Sayed, M. E. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 5542-5547.
- [95] Lee, G. S. H., Craig, D. C., Ma, I., Scudder, M. L., Bailey, T. D., Dance, I. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4863-4864.
- [96] Behrens, S., Bettenhausen, M., Eichhöfer, A., Fenske, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36* (24), 2797-2799.
- [97] Micic, O. I., Jones, K. M., Cahill, A., Nozik, A. J. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9791-9796.
- [98] Niemeyer, C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128-4158.
- [99] Brust, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., Kiely, C. J. *Adv. Mater.* **1995**, *7* (9), 795-797.
- [100] Zabet-Khosousi, A., Dhirani, A. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4072-4124.
- [101] Bishop, K. J., Wilmer, C. E., Soh, S., Grzybowski, B. A. *Small* **2009**, *5* (14), 1600-1630.
- [102] Katz, E., Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (45), 6042-6108.
- [103] Park, S. Y. L. A. K. R., Lee, B., Weigand, S., Schatz, G. C., Mirkin, C. A. *Nature* **2008**, *451*, 553-556.
- [104] Nykypanchuk, D., Maye, M. M., van der Lelie, D., Gang, O. *Nature* **2008**, *451*, 549-552.
- [105] Cobbe, S., Connolly, S., Ryan, D., Nagle, L., Eritja, R., Fitzmaurice, D. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 470-477.
- [106] DeVries, G. A., Brunnbauer, M., Hu, Y., Jackson, A. M., Long, B., Neltner, B. T., Uzun, O., Wunsch, B. H., Stellacci, F. *Science* **2007**, *315*, 358-361.
- [107] Sharma, N., Top, A., Kiick, K. L., Pochan, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7078-7082.
- [108] Fu, X., Wang, Y., Huang, L., Sha, Y., Gui, L., Lai, L., Tang, Y. *Adv. Mater.* **2003**, *15* (11), 902-906.
- [109] Bhattacharya, R., Patra, C. R., Wang, S., Lu, L., Yaszemski, M. J., Mukhopadhyay, D.,

- Mukherjee, P. *Adv. Func. Mater.* **2006**, *16*, 395-400.
- [110] Fischler, M., Sologubenko, A., Mayer, J., Clever, G., Burley, G., Gierlich, J., Carell, T., Simon, U. *Chem. Commun.* **2008**, 169-171.
- [111] Ofir, Y., Samantra, B., Rotello, V. M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1814-1825.
- [112] Salata, O. V. *J. Nanobiotechnol.* **2004**, *2*:3.
- [113] Mann, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2-17.
- [114] Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., Weiss, S. *Science* **2005**, *307*, 538-544.
- [115] Rao, J. *Nano* **2008**, *2* (10), 1984-1986.
- [116] Türk, H., Shukla, A., Rodrigues, P. C. A., Rehage, H., Haag, R. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4187-4196.
- [117] Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W., Ferrari, M. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (1), 235-243.
- [118] Ferrari, M. *Small* **2008**, *4* (1), 20-25.
- [119] Decuzzi, P., Ferrari, M. *Biomaterials* **2008**, *29*, 377-384.
- [120] Decuzzi, P., Gentile, F., Granaldi, A., Curcio, A., Causa, F., Indolfi, C., Netti, P., Ferrari, M. *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2* (4), 689-696.
- [121] Decuzzi, P., Ferrari, M. *Biomaterials* **2006**, *27*, 5307-5314.
- [122] Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C. *FASEB J.* **2005**, *19* (3), 311-330.
- [123] Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283-318.
- [124] Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P., Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 79-86.
- [125] Gzásó, A., Greßler, S., Schiemer, F. (2007). *Nano*. Vienna: Springer-Verlag/Wien.
- [126] Müller, R. S., Langer, K. *Pharmazeutische Zeitung online* **2009**, *4*.
- [127] McCarthy, T. D., Karellas, P., Henderson, S. A., Giannis, M., O'Keefe, D. F., Heery, G., Paull, J. R. A., Matthews, B. R. H. G. *Mol. Pharmaceutics* **2005**, *2* (4), 312-318.
- [128] Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. *Small* **2008**, *4* (1), 26-49.
- [129] Jahnke-Dechent, W., Simon, U. *Nanomedicine* **2008**, *3* (5), 601-603.
- [130] Derfus, A. D., Chan, W. C. W., Bhatia, S. N. *Nano Lett.* **2004**, *4* (1), 11-18.
- [131] Alkilany, A. M., Nalaria, P. K., Hexel, C. R. S. T. J., Murphy, C. J., Wyatt, M. D. *Small* **2009**, *5* (6), 701-708.
- [132] Hoet, P. H. M., Brüske-Hohlfeld, I., Salata, O. V. *J. Nanobiotechnol.* **2004**, *2*:12.
- [133] Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry, G. V., Veronesi, B. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (14), 4346-4352.

- [134] http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/Downloads/Nanoderm_Final_Summary.pdf (2009).
- [135] Ryan, J. A., Overton, K. W., Speight, M. E., Oldenburg, C. N., Loo, L., Robarge, W., Franzen, S., Feldheim, D. L. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9150-9159.
- [136] Levy, R., Thanh, N. T. K., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., Brust, M., Ferning, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10076-10084.
- [137] Kanaras, A. G., Wang, Z., Brust, M., Cosstick, R., Bates, A. D. *Small* **2007**, *3* (4), 590-594.
- [138] Qin, W. J., Yung, L. Y. L. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 385-390.
- [139] Jin, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (36), 6750-6753.
- [140] Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K., Zheng, J., Clogston, J. D., Ayub, N., Aggarwal, P., Neun, B., Hall, J., McNeil, S. E. *Nanomedicine* **2009**, *5*, 106-117.
- [141] Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., Nel, A. E. *Nano Lett.* **2006**, *6* (8), 1794-1807.
- [142] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnen-Dechent, W. *Small* **2007**, *3* (11), 1941-1949.
- [143] Yen, H., Hsu, S., Tsai, C. *Small* **2009**, *5* (13), 1553-1561.
- [144] Simanek, E. E., McGarvey, G. J., Jablonowski, J. A., Wong, C. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833-862.
- [145] Gorman, C., Park, A. D. K. *The Fires Within* **2004**.
- [146] Dervede, J., Enders, S., Reißig, H., Roskamp, M., Schlecht, S., Yekta, S. *Chem. Commun.* **2009**, *28* (8), 932-934.
- [147] Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 379-387.
- [148] Vestweber, D., Blanks, J. E. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 181-213.
- [149] Schumacher, G. *Dissertation*, Halle (Saale) **2003**.
- [150] Lindhorst, T. K. *Chem. unserer Zeit* **2000**, *34* (1), 38-52.
- [151] Enders, S. *Dissertation*, Berlin **2007**.
- [152] Lis, H., Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- [153] Rojo, J., Díaz, V., de la Fuente, J. M., Segura, I., Barrientos, A. G., Riese, H. H., Bernad, A., Penadés, S. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 291-297.
- [154] Tsukida, T., Hiramatsu, Y., Tsujishita, H., Kiyoi, T., Yoshida, M., Kurowaka, K., Moriyama, H., Ohmoto, H., Wada, Y., Saito, T., Kondo, H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3534-3541.

- [155] Wang, L., Brown, J. R., Varki, A., Esko, J. D. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110* (1), 127-136.
- [156] Koenig, A., Norgard-Sumnicht, K., Linhardt, R., Varki, A. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101* (4), 877-889.
- [157] Barrientos, A. G., de la Fuente, J. M., Rojas, T. C., Fernández, A., Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909-1921.
- [158] de la Fuente, J. M., Penadés, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 387-391.
- [159] de la Fuente, J. M., Penadés, S. *Glycoconjugate J.* **2004**, *21*, 149-163.
- [160] Papp, I., Dervedde, J., Enders, S., Haag, R. *Chem. Commun.* **2008**, 5851-5853.
- [161] Zhang, X., Guo, M., Wu, H., Sun, Y., Ding, Y., Feng, X., Zhang, L. *Int. J. Nanomed.* **2009**, *4*, 165-173.
- [162] Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., Sastry, M. *Langmuir* **2005**, *21*, 10644-10654.
- [163] Cheng, Y., Samia, A. C., Meyers, J. D., Panagopoulos, I., Fei, B., Burda, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10643-10647.
- [164] Cai, Q., Kim, S. H., Choi, K. S., Kim, S. Y., Byun, S. J., Kim, K. W., Park, S. H., Juhng, S. K., Yoon, K. *Investigative Radiology* **2007**, *42* (12), 797-806.
- [165] Roskamp, M. *Diplomarbeit, Marburg* **2006**.
- [166] Hampson, A. W., Mackenzie, J. S. *Med. J. Aust.* **2006**, *185* (10), 39-43.
- [167] Pong, B., Elim, H. I., Chong, J., Ji, W., Trout, B. L., Lee, J. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6281-6287.
- [168] Lakadamyali, M., Rust, M. J., Zhuang, X. *Microbes and Infection* **2004**, *6*, 929-936.
- [169] Waters, C. A., Mills, A. J., Johnson, K. A., Schiffrin, D. J. *Chem. Commun.* **2003**, 540-541.
- [170] Choi, S. M. M., Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103-4111.
- [171] Amendola, V., Polizzi, S., Meneghetti, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 6766-6770.
- [172] Keum, C., Ishii, N., Michioka, K., Wulandari, P., Tamada, K., Furusawa, M., Fukushima, H. *J. Nonlinear Opt. Phys. Mater.* **2008**, *17* (2), 131-142.
- [173] Mallin, M. P., Murphy, C. J. *Nano Lett.* **2002**, *2* (11), 1235-1237.
- [174] Smetana, A. B., Klabunde, K. J., Sorensen, C. M., Ponce, A. A., Mwale, B. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2155-2158.
- [175] Zhang, Q., Lee, J. Y., Yang, J., Boothroyd, C., Zhang, J. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 245605.
- [176] Hostetler, M. J., Zhong, C., Yen, B. K. H., Anderegg, J., Gross, S. M., Evans, N. D.,

- Porter, M., Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9396-9397.
- [177] Remenyi, C. *Diplomarbeit*. Würzburg **2002**.
- [178] Die Abbildungen wurden von Sara Wagner zur Verfügung gestellt.
- [179] Wagner, S., Roskamp, M., Cölfen, H., Böttcher, C., Schelcht, S., Kokschi, B. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 46-51.
- [180] Yang, J. T., Chan, K. H. *Biochemistry* **1974**, *13*, 3350-3359.
- [181] Gottlieb, D., Morin, S. A., Raines, R. T. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3865-3870.
- [182] Pagel, K., Wagner, S. C., Samedov, K., von Berlepsch, H., Böttcher, C. K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2196-2197.
- [183] Pagel, K., Wagner, S. C., Araghi, R. R., von Berlepsch, H., Böttcher, C., Kokschi, B. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11442-11451.
- [184] Aldana, J., Wang, Y. A., Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8844-8850.
- [185] Lide, D. R. (2009). *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition*. Boca Raton: CRC Press / Taylor and Francis.
- [186] Tien, J., Terfort, A., Whitesides, G. M. *Langmuir* **1997**, *13*, 5349-5355.
- [187] Chechik, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7780-7781.
- [188] Dasog, M., Scott, R. W. J. *Langmuir* **2007**, *23*, 3381-3387.
- [189] Döllefeld, H., Weller, H., Eychmüller, A. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 267-269.
- [190] Hurst, S. J., Hill, H. D., Macfarlane, R. J., Wu, J., Dravid, V. P., Mirkin, C. A. *Small* **2009**, *5* (19), 2156-2161.
- [191] Asuri, P., Karajanagi, S. S., Yang, H. Y. T., Kane, R. S., Dordick, J. S. *Langmuir* **2006**, *22*, 5833-5836.
- [192] Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W., Lynch, I., Lindman, S., Thulin, E., Radford, S. E., Dawson, K. A. *PNAS* **2007**, *104* (21), 8691-8696.
- [193] Capriotti, L. A., Beebe, T. P., Schneider, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5281-5287.
- [194] Verma, A., Nakade, H., Simard, J. M., Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10806-10807.
- [195] Ley, K., Bullard, D. C., Arbonès, M. L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T. F., Beaudet, A. L. *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 669-675.
- [196] Graves, B. J., Crowther, R. L., Chandran, C., Rumberger, J. M., Li, S., Huang, K., Presky, D. H., Familletti, P. C., Wolitzky, B. A., Burns, D. K. *Nature* **1994**, *367*, 532-538.
- [197] Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D., Camphausen, R. T. *Cell* **2000**, *103*, 467-479.
- [198] Schumacher, G. *Dissertation*, Halle (Saale) **2003**.

- [199] Fritzsche, J., Alban, S., Ludwig, R. J., Rubant, S., Boehncke, W., Schumacher, G., Bendas, G. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 72, 474-485.
- [200] Stoolman, L. M., Tenforde, T. S., Rosen, S. D. *J. Cell Biol.* **1984**, 99, 1535-1540.
- [201] Al-Harrasi, A., Reißig, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44 (38), 6227-6231.
- [202] Yekta, S., Prisyazhnyuk, V., Reißig, H. *Synlett* **2007**, 13, 2069-2072.
- [203] Cortese, J. D., Voglino, A. L., Hackenbrock, C. R. *J. Cell Biol.* **1991**, 113 (6), 1331-1340.
- [204] Carey, F. A., Sundberg, R. J., Schäfer, H. J. *Organische Chemie* **1995**. Weinheim [u.a.]: VCH.
- [205] Yekta, S. *nicht publizierte Ergebnisse*.
- [206] Wang, J., Geng, J. *Thrombosis and Haemostasis* **2003**, 90 (2), 309-316.
- [207] Futaki, S., Taike, T. Y. T., Ogawa, T., Akita, T., Kitagawa, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 6, 1739-1744.
- [208] Pernodet, N., Maaloum, M., Tinland, B. *Electrophoresis* **1997**, 18, 55-58.
- [209] Klopocki, A. G., Yago, T., Mehta, P., Yang, J., Wu, T., Leppänen, A., Bovin, N. V., Cummings, R. D., Zhu, C., McEver, R. P. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (17), 11493-11500.
- [210] Tsujishita, H., Hiramatsu, Y., Kondo, N., Ohmoto, H., Kondo, H., Kiso, M., Hasegawa, A. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 362-369.
- [211] Wong, C., Moris-Varas, F., Hung, S., Marron, T. G., Lin, C., Gong, K. W., Weitz-Schmidt, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8152-8158.
- [212] Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., Beattie, D. A. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 331, 251-262.
- [213] Cederquist, K. B., Keating, C. D. *Nano* **2009**, 3 (2), 256-260.
- [214] Greiner, A., Wendorff, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (30), 5670-5703.
- [215] Dersch, R., Graeser, M., Greiner, A., Wendorff, J. H. *Aust. J. Chem.* **2007**, 60, 719-728.
- [216] Agarwal, S., Greiner, A., Wendorff, J. H. *Chemie Ingenieur Technik* **2008**, 80 (11).
- [217] Agarwal, S., Wendorff, J. H., Greiner, A. *Polymer* **2008**, 49, 5603-5621.
- [218] Xu, X., Yang, Q., Wang, Y., Yu, H., Chen, X., Jing, X. *Eur. Polym. J.* **2006**, 42, 2081-2087.
- [219] Kriha, O., Becker, M., Lehman, M., Kriha, D., Krieglstein, J., Yosef, M., Schlecht, S., Wehrspohn, R. B., Wendorff, J. H., Greiner, A. *Adv. Mater.* **2007**, 19, 2483-2485.
- [220] Schlecht, S., Tan, S., Yosef, M., Dersch, R., Wendorff, J. H., Jia, Z., Schaper, A. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 809-814.

- [221] Stasiak, M., Studer, A., Greiner, A., Wendorff, J. H. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6150-6156.
- [222] Na, H. B., Song, I. C., Hyeon, T. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (21), 2133-2148.
- [223] Thiesen, B., Jordan, A. *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24* (6), 467-474.
- [224] Law, W., Yong, K., Roy, I., Ding, H., Hu, R., Zhao, W., Prasad, P. N. *Small* **2009**, *5* (11), 1302-1310.
- [225] Yong, K., Roy, I., Ding, H., Bergey, E. J., Prasad, P. N. *Small* **2009**, *5* (17), 1997-2004.
- [226] Wang, F., Liu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (17), 5642-5643.
- [227] Barglik-Chory, C., Buchold, D., Schmitt, M., Kiefer, W., Heske, C., Kumpf, C., Fuchs, O., Weinhardt, L., Stahl, A., Umbach, E., Lentze, M., Geurts, J., Müller, G. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, 443-451.

8 Anhang

8.1 Absorptionsspektren

8.1.1 Zusammenstellung der Absorptionsspektren GSH-koord. CdS-NP in versch. Puffern

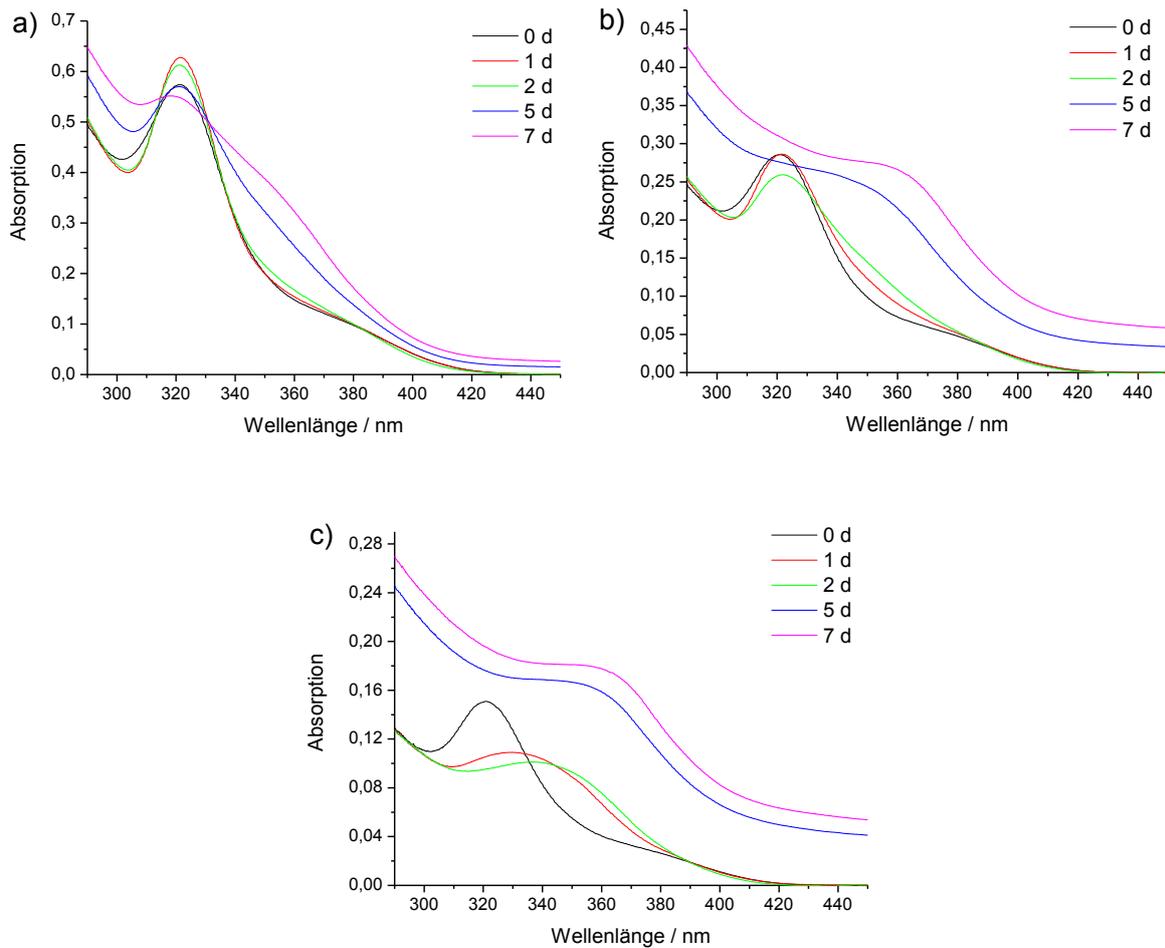


Abbildung 8.1: Absorptionsspektren von GSH-koord. CdS-NP ($d = 1.5 - 2$ nm) in Wasser bei pH 8 (mit TMAH eingestellt) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach Zugabe und 1, 2, 5 und 7 d nach Zugabe) bei drei verschiedenen NP-Konzentrationen: a) hohe Konzentration ($A_{\max} = 0.57$), b) mittlere Konzentration ($A_{\max} = 0.29$), c) niedrige Konzentration ($A_{\max} = 0.15$).

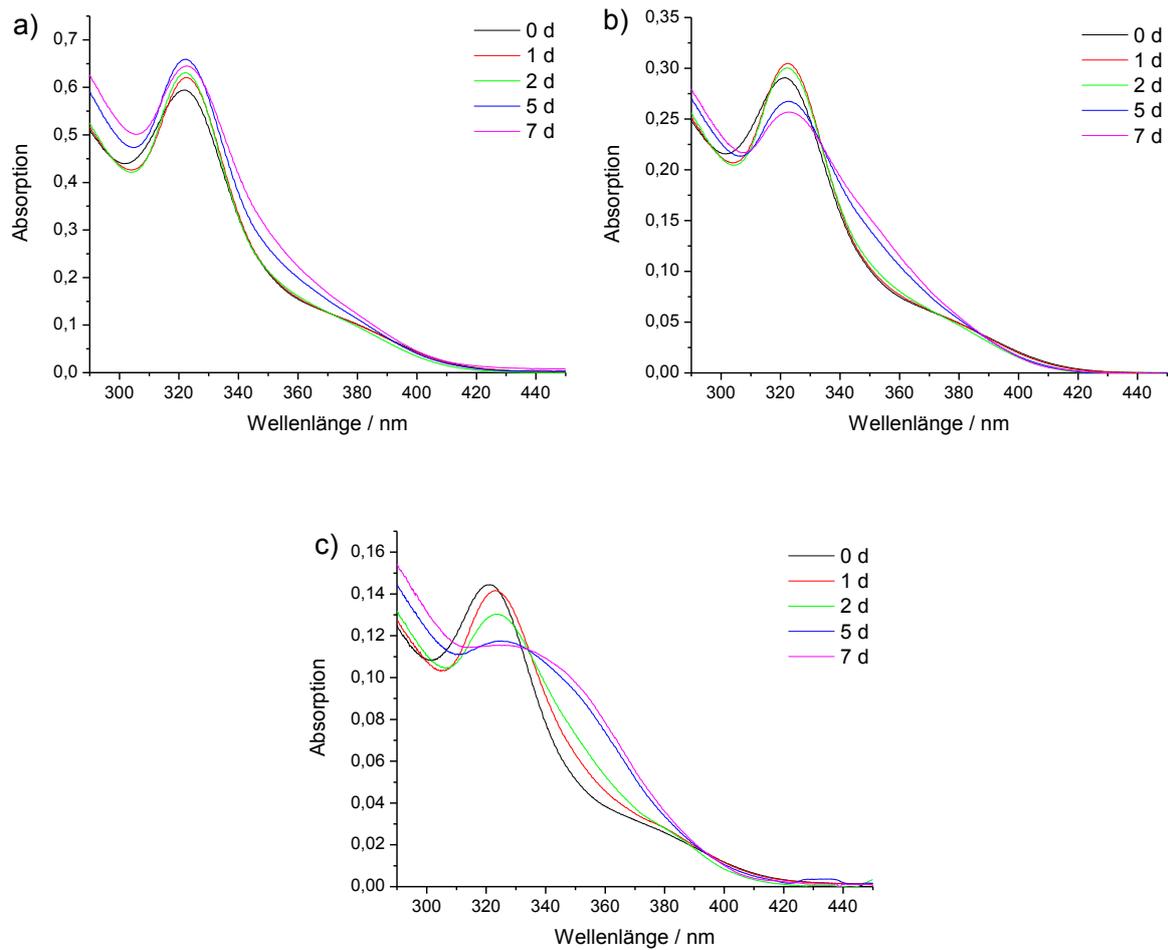


Abbildung 8.2: Absorptionsspektren von GSH-koord. CdS-NP ($d = 1.5 - 2$ nm) in Acetatpuffer bei pH 8 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach Zugabe und 1, 2, 5 und 7 d nach Zugabe) bei drei verschiedenen NP-Konzentrationen: a) hohe Konzentration ($A_{\max} = 0.57$), b) mittlere Konzentration ($A_{\max} = 0.29$), c) niedrige Konzentration ($A_{\max} = 0.15$).

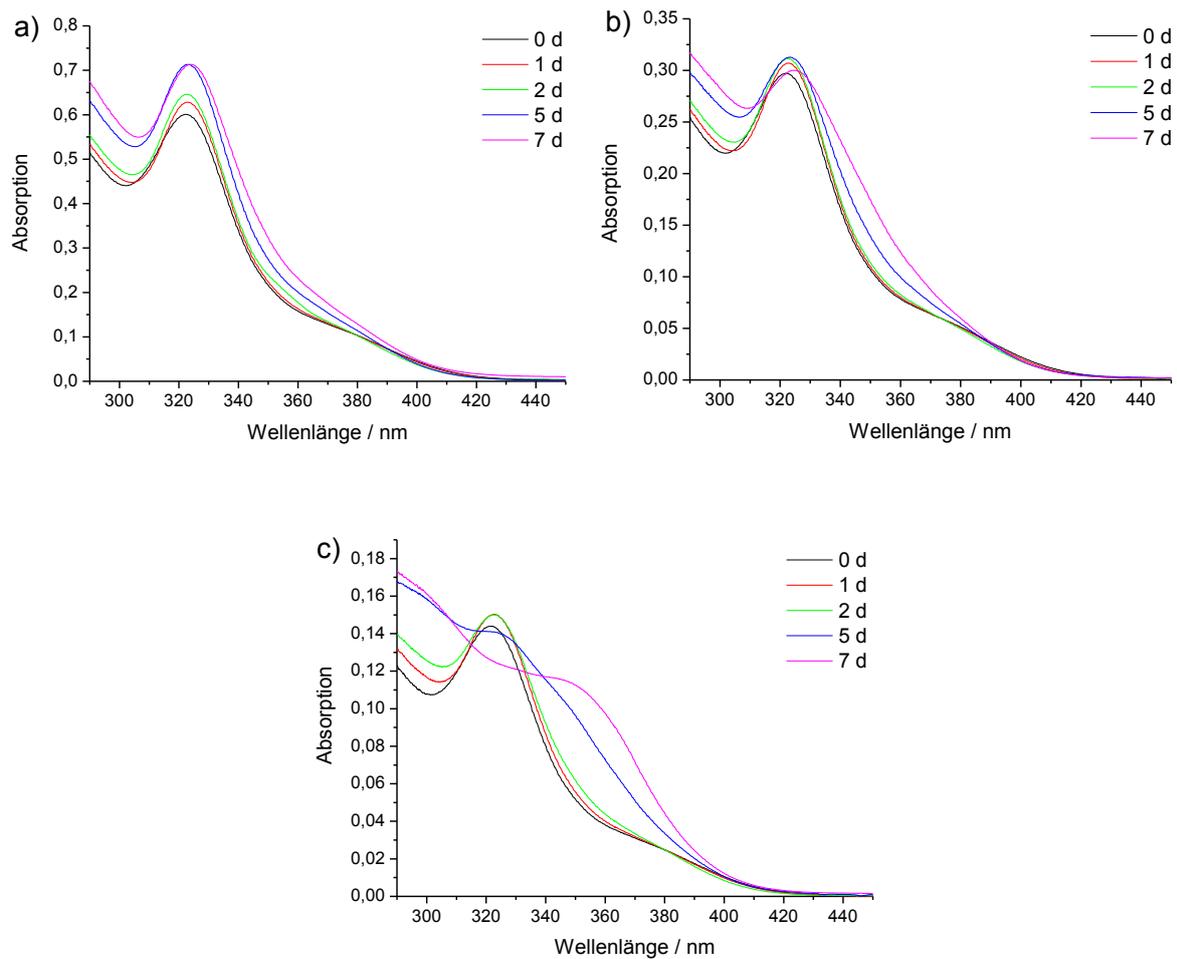


Abbildung 8.3: Absorptionsspektren von GSH-koord. CdS-NP ($d = 1.5 - 2$ nm) in Phosphatpuffer bei pH 8 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach Zugabe und 1, 2, 5 und 7 d nach Zugabe) bei drei verschiedenen NP-Konzentrationen: a) hohe Konzentration ($A_{max} = 0.57$), b) mittlere Konzentration ($A_{max} = 0.29$), c) niedrige Konzentration ($A_{max} = 0.15$).

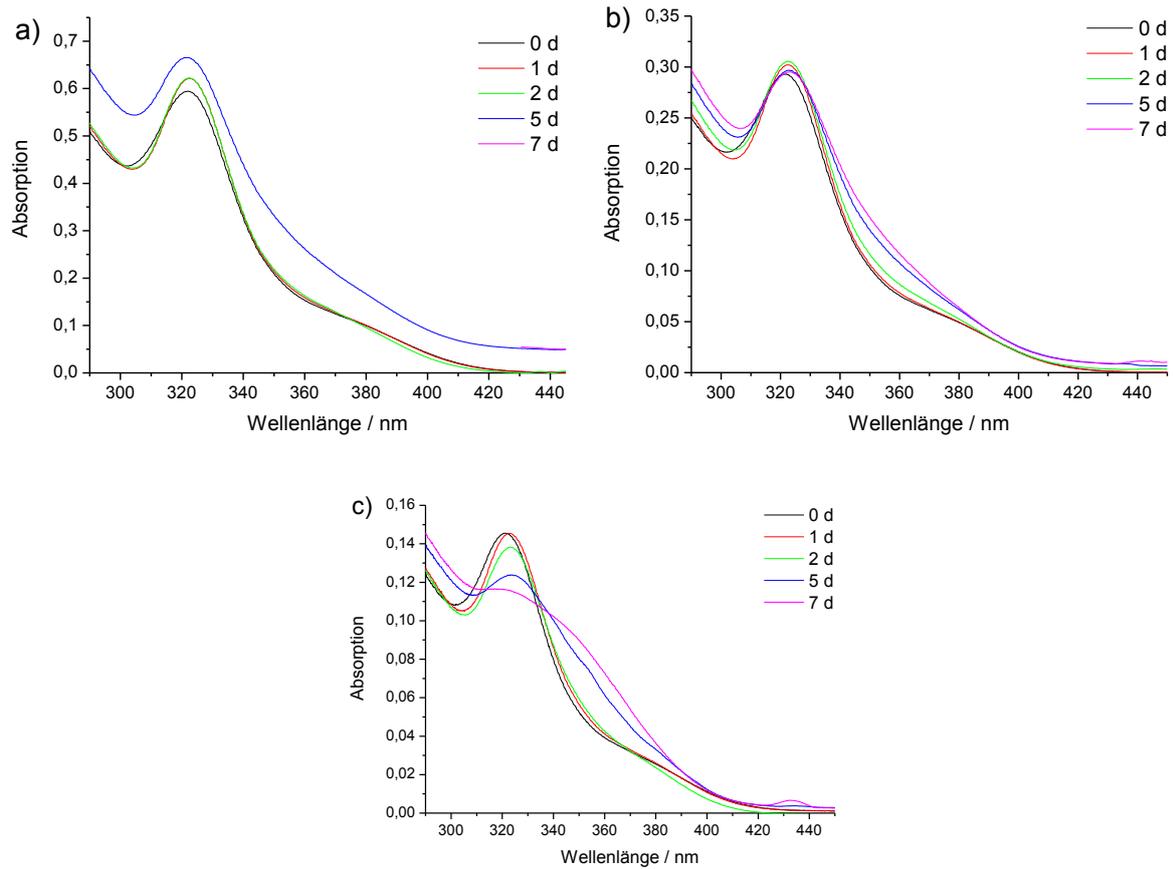


Abbildung 8.4: Absorptionsspektren von GSH-koord. CdS-NP ($d = 1.5 - 2$ nm) in Tris/HCl-Puffer bei pH 8 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach Zugabe und 1, 2, 5 und 7 d nach Zugabe) bei drei verschiedenen NP-Konzentrationen: a) hohe Konzentration ($A_{\max} = 0.57$), b) mittlere Konzentration ($A_{\max} = 0.29$), c) niedrige Konzentration ($A_{\max} = 0.15$).

8.1.2 Absorptionsspektren MUDS-koord. Au-NP in Tris/HCl-Puffer (pH 9) und Phosphatpuffer (pH 12)

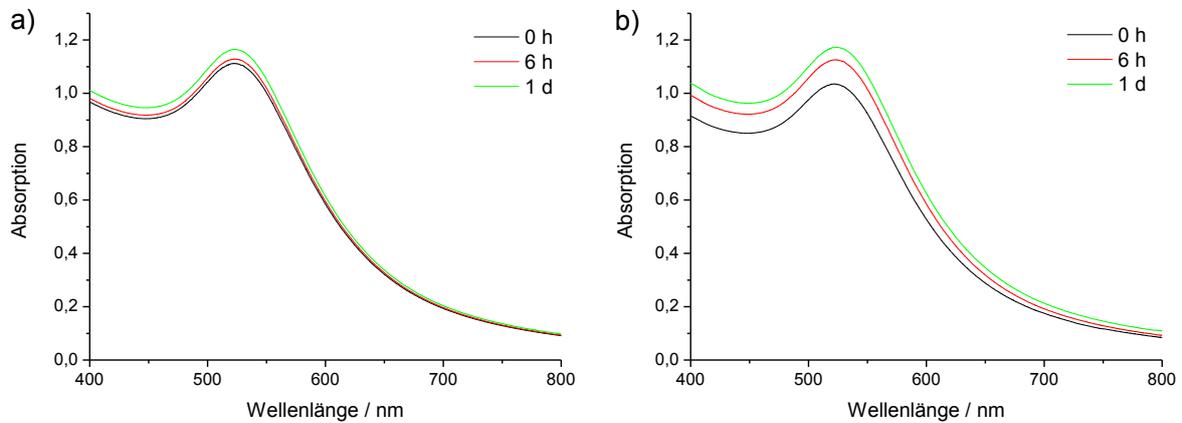


Abbildung 8.5: Absorptionsspektren von MUDS-koord. Au-NP (d = 6 nm) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach Zugabe, 6 h und 1 d) in (a) Tris-Puffer bei pH 8 und (b) Phosphatpuffer bei pH 12.

8.1.3 Absorptionsspektren MUDSulfat-koord. Au-NP in Tris/HCl-Puffer (pH 9)

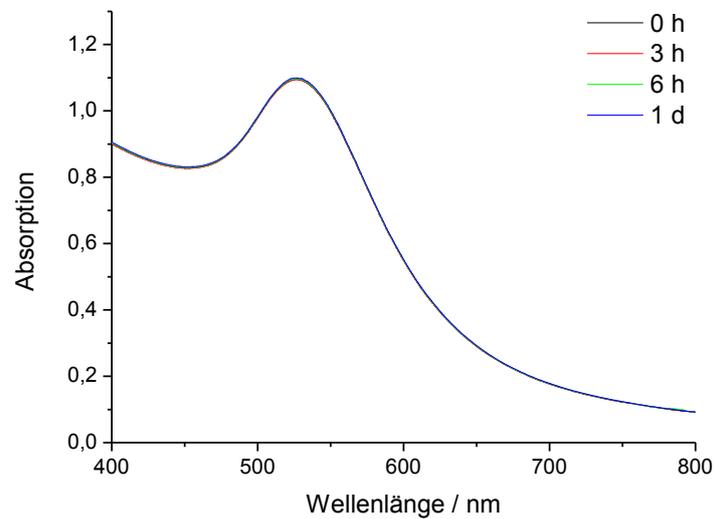


Abbildung 8.6: Absorptionsspektren von MUDSulfat-koord. Au-NP (d = 6 nm) in Tris/HCl-Puffer bei pH 9 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach Zugabe, 3 h, 6 h und 1 d).

8.1.4 Absorptionsspektren GSH-koord. CdS-NP bei pH 8 in Gegenwart versch. Konzentrationen von VW05

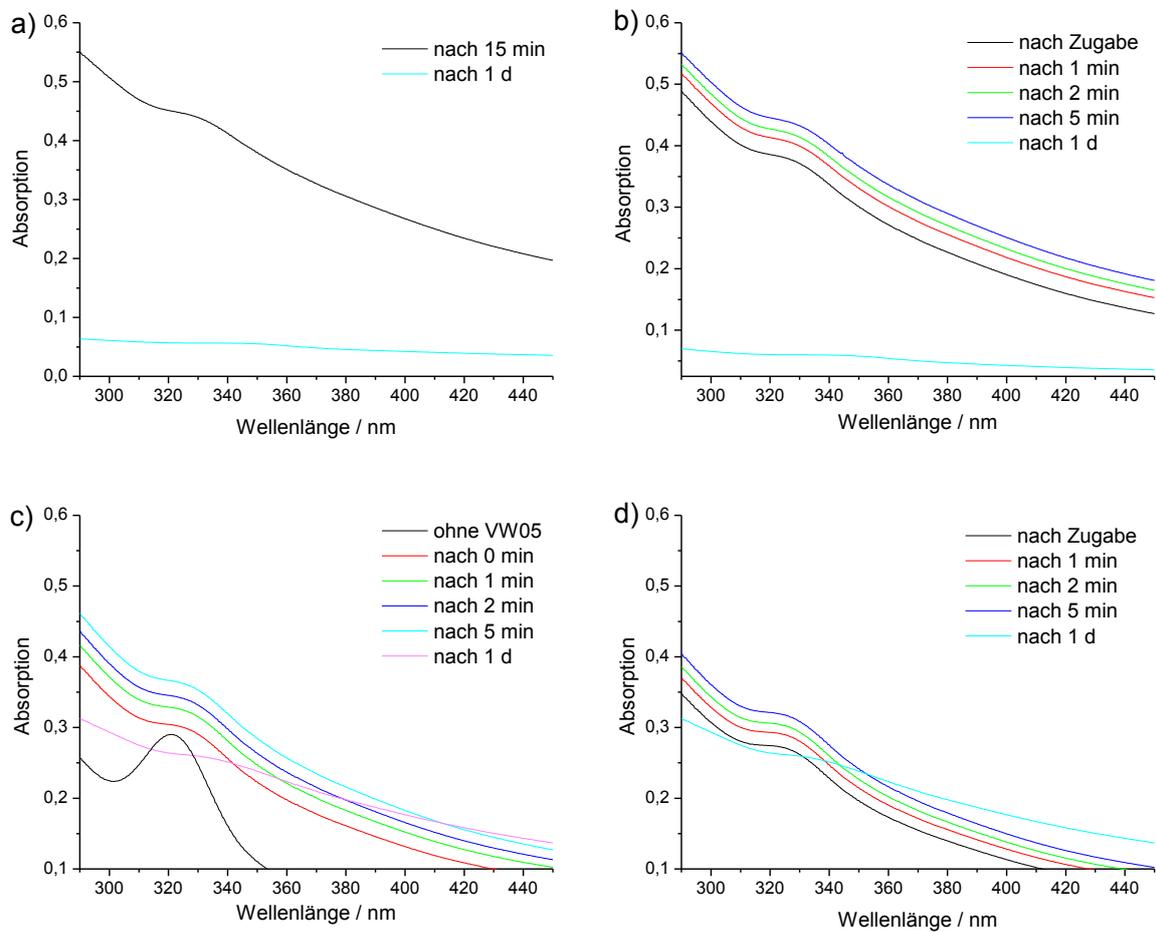


Abbildung 8.7: Absorptionsspektren einer Mischung von GSH-koord. CdS-NP ($d = 1.5 - 2 \text{ nm}$) in 10 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 8 und verschiedenen Konzentrationen VW05: a) $5 \mu\text{M}$ VW05, b) $20 \mu\text{M}$ VW05, c) $50 \mu\text{M}$ VW05 und d) $100 \mu\text{M}$ VW05.

8.1.5 Vergleich der Absorptionsspektren MUDS-koord. Au-NP bei pH 9 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von SR05 und VW05

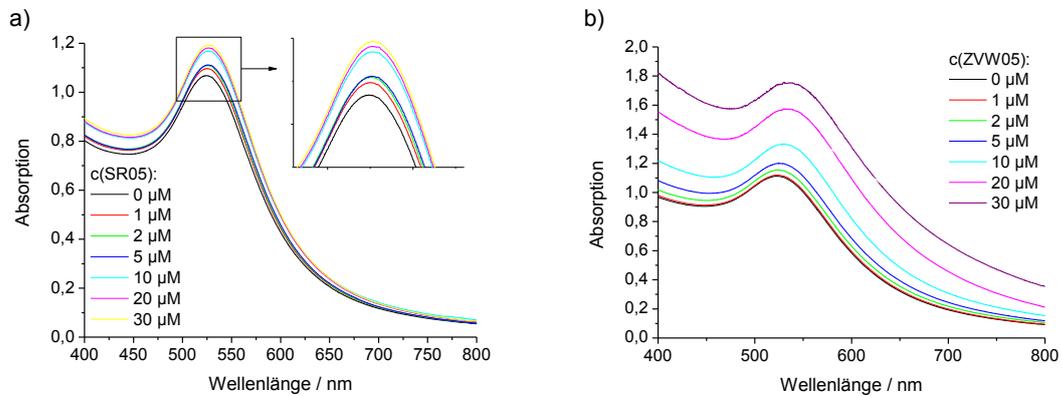


Abbildung 8.8: Absorptionsspektren einer 0,05 µM Lösung MUDS-koordinierter Au-NP (d = 6 nm) in 10 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 9 und verschiedenen Konzentrationen von a) SR05 (*random coil*) und b) VW05 (*coiled-coil*). Die Spektren wurden kurz nach Mischung der Komponenten aufgenommen.

8.1.6 Vergleich der Absorptionsspektren MUDS-koord. Au-NP bei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart von 10 µM VW05

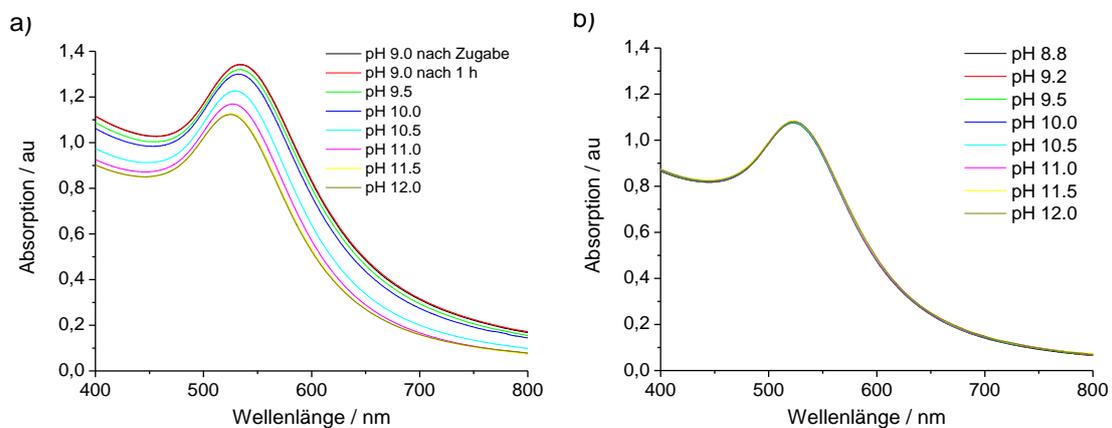


Abbildung 8.9: Absorptionsspektren einer Lösung von MUDS-koordinierter Au-NP (0,05 µM, d = 6 nm) in 10 mM Tris-Puffer bei verschiedenen pH-Werten (15 min Inkubationszeit) a) mit 10 µM VW05 und b) ohne VW05.

8.1.7 Absorptionsspektren zur Zeitabhängigkeit der Auflösung von Aggregaten aus MUDS-koord. Au-NP und VW05 nach pH-Wert-Wechsel

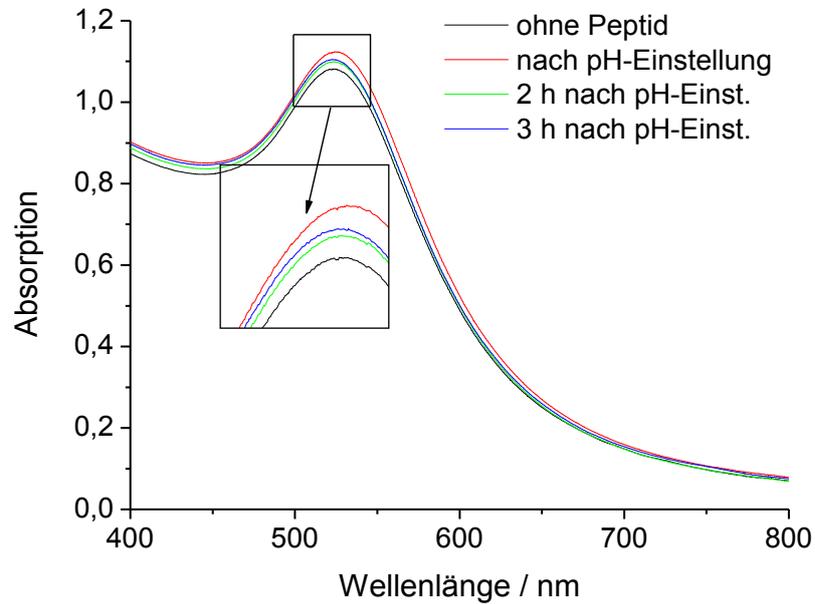


Abbildung 8.10: Absorptionsspektren einer Mischung von 10 µM VW05 und MUDS-koordinierten Au-Kolloiden, welche bei pH 9 gemischt und nach einer Stunde auf pH 12 gestellt wurde, zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

8.2 Agarosegele

8.2.1 Agarosegel von MUDS-koord. Au-NP und VW05 bei pH 12

In Abbildung 8.11 ist ein 1 %-iges Agarosegel von Mischungen von MUDS-koord. Au-NP und VW05 bei pH 12 gezeigt. Die NP-Konzentration betrug in allen Proben 0.05 μM NP, die Peptidkonzentration wurde zwischen 0 und 50 μM variiert. Die Lage der Taschen ist mit einem schwarzen Strich markiert.

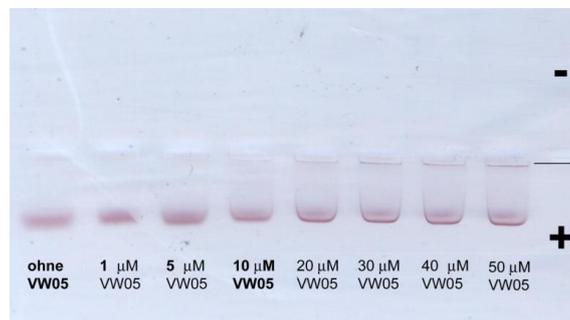


Abbildung 8.11: Gelelektrophorese an Mischungen von MUDS-koordinierten Au-NP und VW05 bei pH 12, belichtet mit Weißlicht.

8.2.2 Agarosegel von NP2, NP3, NP 6 - NP8 und NP 19

In Abbildung 8.12 ist ein 1 %-iges Agarosegel unterschiedlich funktionalisierter Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) bei pH 7.2 gezeigt. Es wurde 0.05 M Phosphatpuffer als Laufpuffer verwendet.

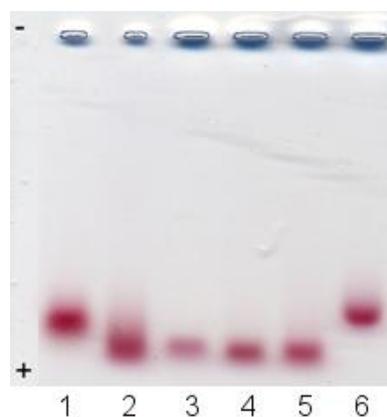


Abbildung 8.12: Agarosegel unterschiedlich funktionalisierter Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$). Bahn 1: NP19, Bahn 2: NP6, Bahn 3: NP7, Bahn 4: NP8, Bahn 5: NP2, Bahn 6: NP3.

8.3 Schmelzkurven von VW05 in Ab- und Anwesenheit neg. geladener NP

In Abbildung 8.13 sind die Schmelzkurven von VW05 bei pH 8.8 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von MUDSulfat-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) gezeigt. Die Konzentration der NP-Stammlösung betrug ca. $0.33 \mu\text{M}$ NP, die VW05-Konzentration betrug $50 \mu\text{M}$. Die CD-Spektren wurden nach einer Inkubationszeit von ca. 1 h aufgenommen. Die Versuche wurden von Sara Wagner durchgeführt.

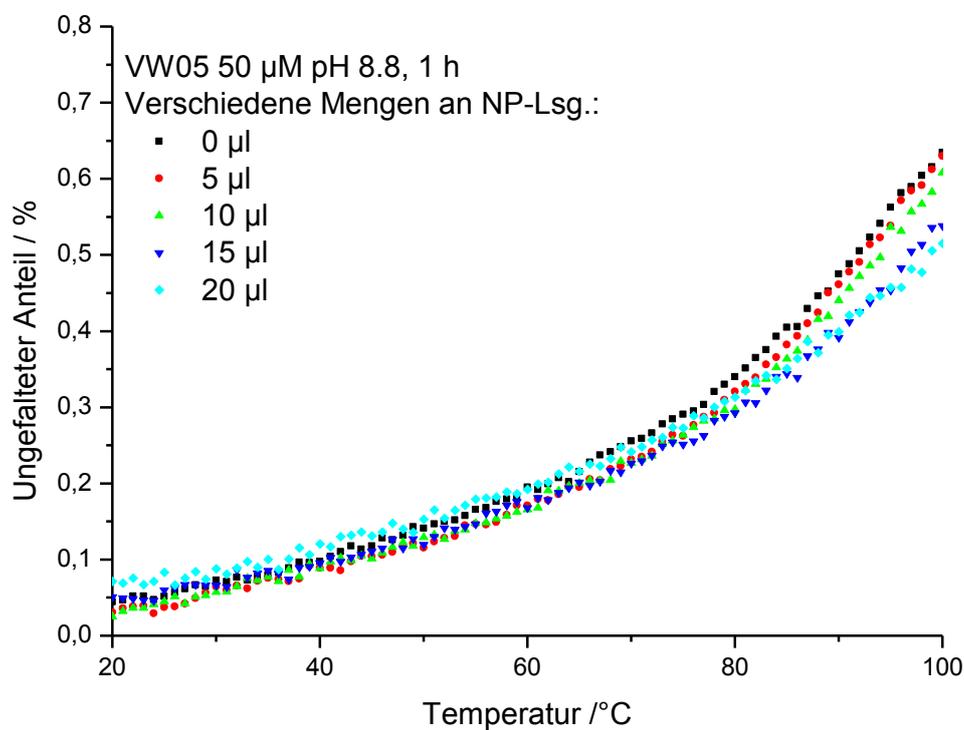


Abbildung 8.13: Schmelzkurven von VW05 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von MUDSulfat-koord. Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$).

Die in Abbildung 8.13 gezeigten Schmelzkurven zeigen, dass bei pH 8.8 mit steigender Konzentration an negativ geladenen Au-NP ($d = 6 \text{ nm}$) der Anteil an ungefaltetem VW05 bei einer Temperatur über $70 \text{ }^\circ\text{C}$ immer geringer wird.

8.4 TGA-Daten

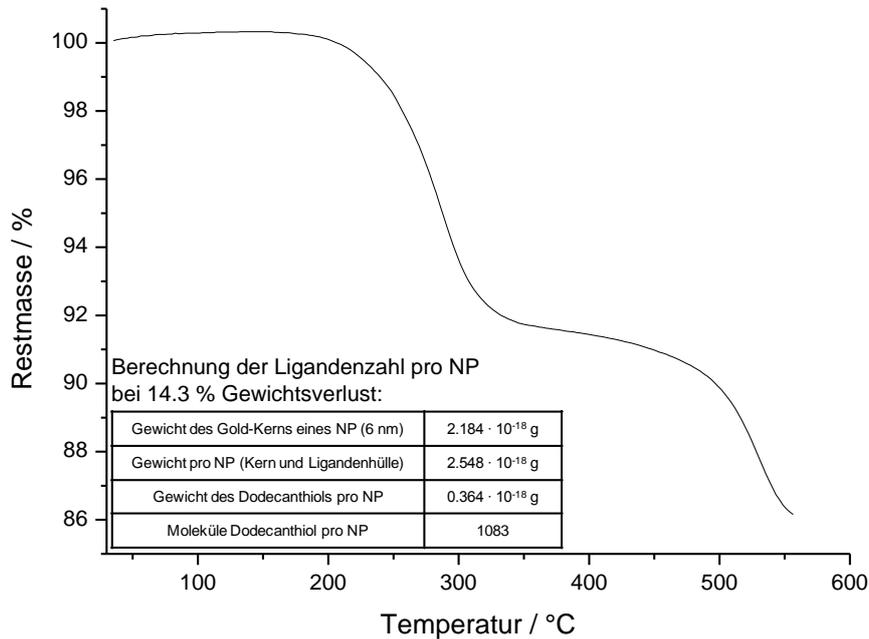


Abbildung 8.14: TGA von DT-kordinierten Au-NP mit einem Durchmesser von 6 nm. Der Gewichtsverlust beträgt 14,3 %. Dies entspricht einer Anzahl von ca. 1100 DT-Molekülen pro NP.

8.5 Konzentrationsbestimmung von Goldkolloidlösungen

Die Konzentration der NP-Lösungen wurde berechnet unter der Annahme, dass das bei der Reaktion eingesetzte Goldsalz vollständig zu NP umgesetzt wurde. Hierzu wurde zunächst mit den folgenden Formeln die Molanzahl Gold pro NP berechnet:

$$\text{Volumen eines NP:} \quad V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$\text{Masse pro NP:} \quad m = \rho \cdot V \quad \rho(\text{Au}) = 19,32 \text{ g/cm}^3$$

$$\text{Mol Au pro NP:} \quad n(\text{Au pro NP}) = \frac{m}{M} \quad M(\text{Au}) = 197 \text{ g/mol}$$

Durch Division der bei der Synthese eingesetzten Molanzahl Gold durch die Molanzahl Gold pro NP wurde die bei der Synthese insgesamt erhaltene Anzahl NP ermittelt:

$$\text{Anzahl NP insg.:} \quad N(\text{NP insg.}) = \frac{n(\text{Au insg.})}{n(\text{Au pro NP})}$$

Die Molanzahl NP im Gesamtvolumen wurde durch Division der Anzahl an NP durch die Avogadro-Konstante N_A berechnet:

$$\text{Mol NP in Gesamtvolumen: } M(NP \text{ insg.}) = \frac{N(NP \text{ insg.})}{N_A} \quad N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

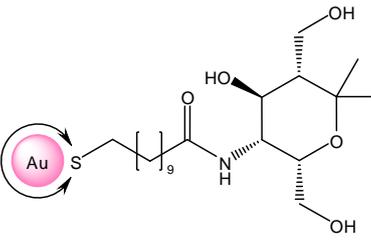
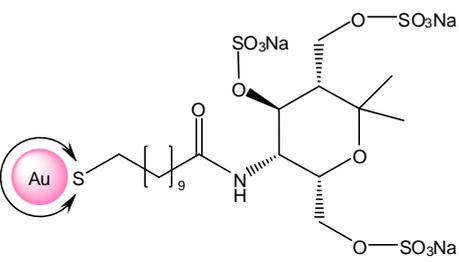
Durch Division der Molanzahl NP durch das Lösungsmittelvolumen V , in dem sich die NP befanden, wurde die Konzentration der NP bestimmt:

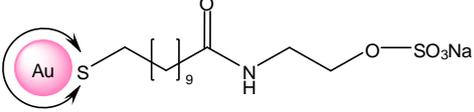
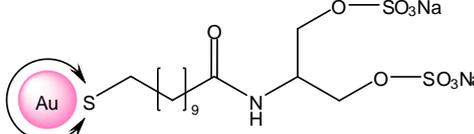
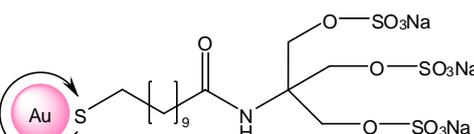
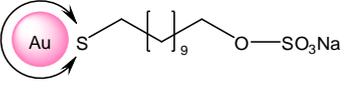
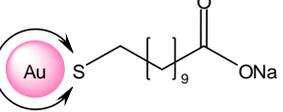
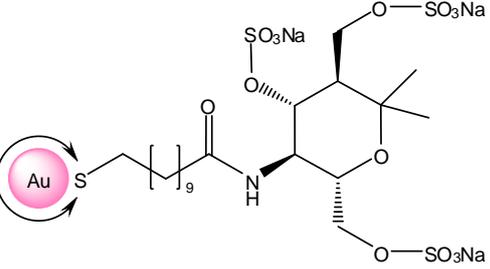
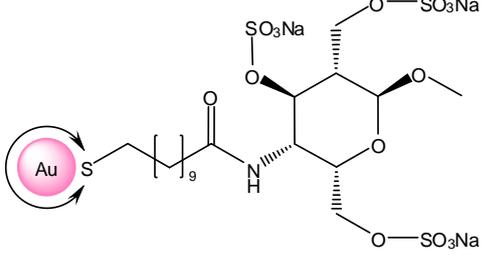
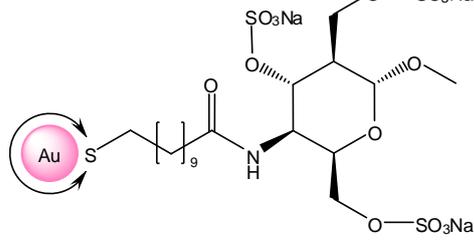
$$\text{Konzentration der NP: } c(NP) = \frac{M(NP \text{ insg.})}{V}$$

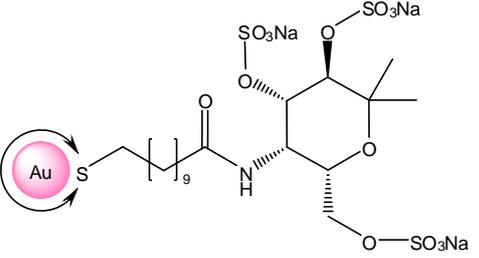
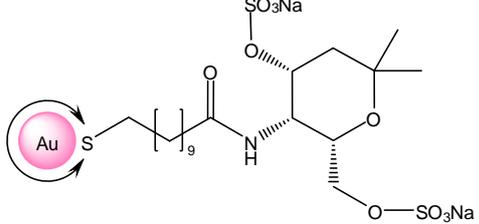
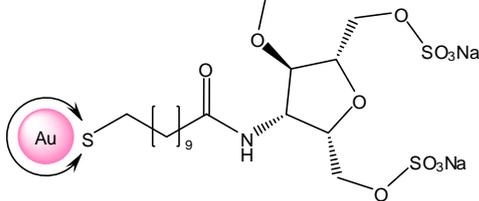
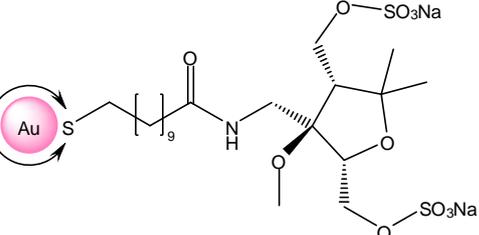
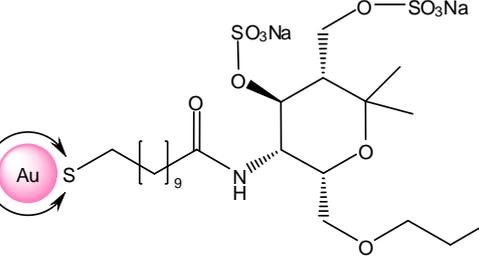
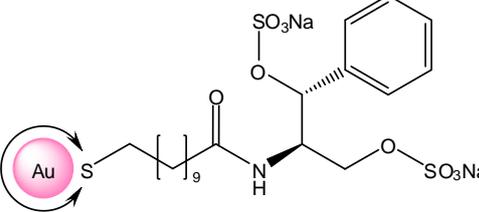
8.6 Zusammenstellung der IC_{50} -Werte

Die NP mit schwarz eingefärbten IC_{50} -Werten gehören zu Charge 1, die NP mit grün eingefärbten IC_{50} -Werten zu Charge 2.

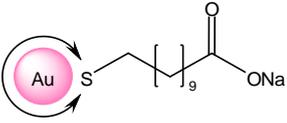
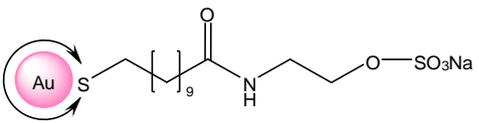
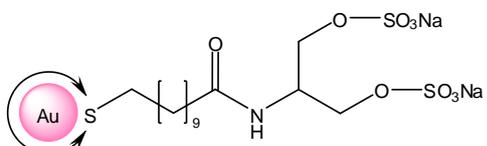
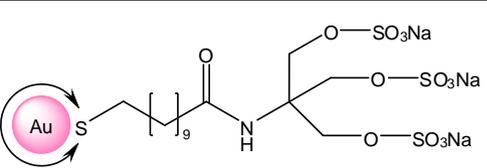
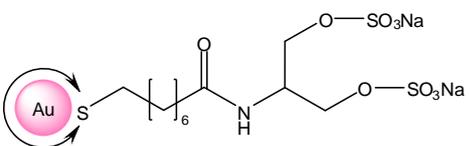
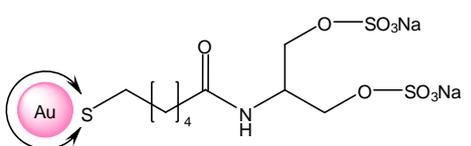
IC_{50} -Werte der Au-NP mit ca. 6 nm Durchmesser:

Inhibitor	Bezeichnung	IC_{50} L- Selektin	IC_{50} P- Selektin	IC_{50} E- Selektin
	NP1	N.I.	10 nM	N.I.
	NP2	350 pM	35 pM	
Au/Syn3 sulf. 1 eq.	NP3	900 pM		

	NP6	180 pM	215 pM	
	NP7	20 pM 80 pM	30 pM 130 pM	N.I.
	NP8	70 pM	90 pM	
	NP19	150 pM	30 pM	> 1 nM
	NP18	100 pM	30 pM	N.I.
	NP 9	900 pM	200 pM	
	NP10	550 pM	130 pM	
	NP11	600 pM	120 pM	

	NP12	200 pM	460 pM	N.I.
	NP13	120 pM	300 pM	N.I.
	NP14	200 pM 390 pM	140 pM 50 pM	N.I.
	NP15	150 pM	400 pM	N.I.
	NP16	110 pM	130 pM	N.I.
	NP17	100 pM	150 pM	N.I.

IC₅₀-Werte der Au-NP mit ca. 14 nm Durchmesser:

Inhibitor	Bezeichnung	IC ₅₀ L-Selektin	IC ₅₀ P-Selektin	IC ₅₀ E-Selektin
	NP25	2 pM		
	NP23	125 pM		
	NP22	75 pM	95 pM	N.I.
	NP24	200 pM		
	NP21	70 pM	220 pM	250 pM
	NP20	160 pM	540 pM	470 pM

8.7 Publikationen, Posterbeiträge und Vorträge

Publikationen

Patentanmeldung WO 2009030492 "Functionalized nanoparticles for the inhibition of selectin-mediated cell adhesion", Reißig, Dervedde, Schlecht, Roskamp, Enders, Yekta, **2009**.

Patentanmeldung WO 2009141142 "Nanoparticles functionalized with sulfated amino alcohols for the inhibition of selectin-mediated cell adhesion", Schlecht, Dervedde, Reißig, Roskamp, **2009**.

J. Dervedde, S. Enders, H.-U. Reissig, M. Roskamp, S. Schlecht, S. Yekta: „Inhibition of selectin binding by colloidal gold with functionalized shells“, *Chem. Commun.* **2009**, 932-934.

S. C. Wagner, M. Roskamp, H. Cölfen, C. Böttcher, S. Schlecht, B. Kokschi: „Switchable electrostatic interactions between gold nanoparticles and coiled coil peptides direct colloid assembly“, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 46-51.

M. Roskamp, A. K. Schaper, J. H. Wendorff, S. Schlecht: „Colloidal CdS/SiO₂ Nanocomposite Particles from Charged Colloids of CdS and Silica“, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2496-2499.

Posterbeiträge

„Click-Chemie zur Transformation funktioneller Gruppen an Liganden von Au-Kolloiden“, Tag der Chemie 2007, Technische Fachhochschule Berlin, Deutschland, **2007**.

„Coiled Coil peptides and nanoparticles: A bionanosystem affected by protein folding“, Eighth Tetrahedron Symposium, Berlin, Deutschland, **2007**.

„Switchable coiled coil peptide-induced organization of gold nanoparticles“, Sixth International Conference on Inorganic Materials, Dresden, Deutschland, **2008**.

„Inhibition of selectin binding by functionalized gold nanoparticles“, NanoMed 2009, Berlin, Deutschland, **2009**.

Vorträge

„Funktionalisierte Au-NP als Selektin-Inhibitoren“, Nanotage 2008, Berlin, **2008**.