

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Lisa Maus

aus Bonn

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2010

Entwicklung stabiler Gold Nanopartikel-Peptid-
Konjugate zur Untersuchung von Rezeptor-Liganden
Wechselwirkungen im zellulären System

Gutachter: Prof. Dr. Joachim P. Spatz
Prof. Dr. Hilmar Bading

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | I |
| Summary | II |
| 1 Motivation | 1 |
| 1.1 Strategie | 4 |
| 2 Theorie und Hintergrund | 5 |
| 2.1 Gold Nanopartikel..... | 5 |
| 2.1.1 Plasmonresonanz | 6 |
| 2.1.2 Anwendung von Nanopartikeln in der Biologie | 7 |
| 2.1.3 Synthese sphärischer Nanokristalle | 10 |
| 2.1.4 Stabilität kolloidaler Suspensionen | 13 |
| 2.1.5 Stabilisierung der Nanopartikel Suspension..... | 15 |
| 2.1.6 Biofunktionalisierung der Nanopartikel | 20 |
| 2.1.7 Methoden zur Charakterisierung der Konjugate..... | 23 |
| 2.2 Das biologische System | 26 |
| 2.2.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren..... | 26 |
| 2.2.2 Der Aufbau der NMDA-Rezeptoren..... | 26 |
| 2.2.3 Der Einfluss der Zusammensetzung der NMDA-Rezeptor Untereinheiten..... | 28 |
| 2.2.4 Die Funktion der NMDA-Rezeptoren | 28 |
| 2.2.5 Neuroprotektive Signalwege versus Exzitotoxizität | 29 |
| 2.2.6 Conantokin G | 31 |
| 3 Ergebnisse und Diskussion | 34 |
| 3.1 Synthese der Nanopartikel | 35 |
| 3.1.1 Direkte Synthese | 35 |
| 3.1.2 Keimvermittelte Synthese | 40 |
| 3.2 Stabilisierung der Gold Nanopartikel | 44 |
| 3.2.1 Niedermolekulare Liganden | 46 |
| 3.2.2 Polyethylenglykol Derivate | 46 |
| 3.2.3 Untersuchung der Stabilität mittels UV/Vis-Spektroskopie | 48 |
| 3.3 Charakterisierung der Schichtdicke..... | 51 |
| 3.4 Fluoreszenz-basierte Charakterisierung der Anzahl reaktiver Liganden | 57 |
| 3.4.1 Charakterisierung der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel..... | 58 |
| 3.4.2 Untersuchung der Passivierungsschicht in Abhängigkeit der Zeit..... | 63 |
| 3.5 Peptid-Funktionalisierung der stabilisierten Partikel..... | 67 |
| 3.6 Bestimmung der Anzahl an gebundenen Peptiden..... | 72 |
| 3.6.1 Zeitabhängige Charakterisierung der Anzahl an gebundenen Peptiden | 77 |
| 3.7 Anwendung im Modellsystem der HEK 293 Zellen..... | 78 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.7.1 | Plasmide der NR1 und NR2B Untereinheit..... | 79 |
| 3.7.2 | Auswahl des Antagonisten..... | 80 |
| 3.7.3 | Optimierung der Transfektion von HEK293 Zellen | 83 |
| 3.7.4 | Nachweis der NR1 Untereinheit..... | 90 |
| 3.7.5 | Bindungsnachweis mittels REM..... | 95 |
| 3.7.6 | Bindungsstudie | 96 |
| 3.8 | Anwendung im neuronalen System | 102 |
| 3.8.1 | Primäre hippocampale Neuronen..... | 102 |
| 3.8.2 | Bestimmung des Zelltods | 104 |
| 3.8.3 | Auswertung der Bindung mittels REM | 109 |
| 4 | Zusammenfassung und Ausblick | 111 |
| 5 | Material und Methoden | 113 |
| 5.1 | Messtechniken..... | 113 |
| 5.2 | Materialien | 117 |
| 5.3 | Experimenteller Teil..... | 118 |
| 5.3.1 | Herstellung der Nanopartikel..... | 118 |
| 5.3.2 | Charakterisierung der Nanopartikel | 121 |
| 5.3.3 | DNA Präparation..... | 127 |
| 5.3.4 | HEK 293 Zellen..... | 128 |
| 5.3.5 | Bindungsnachweis..... | 130 |
| 5.3.6 | Neuronale Zellen..... | 131 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 133 |
| 7 | Anhang | 148 |
| 8 | Danksagung | 149 |

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird eine neuartige Syntheseroute zur Herstellung biokompatibler und hochstabiler Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate entwickelt, die der gezielten Untersuchung von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen in hippocampalen Neuronen dienen. Aktivierte NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren vermitteln vermutlich abhängig von ihrer räumlichen Lage in der postsynaptischen Zelle verschiedene Signalkaskaden: Die Aktivierung synaptischer NMDA-Rezeptoren fördert das Überleben der Zelle, während die Aktivierung der extrasynaptischen Rezeptoren zum programmierten Zelltod führt. Um diese Hypothese der positionsabhängigen Funktion der unterschiedlich lokalisierten NMDA-Rezeptoren zu untersuchen, werden Nanopartikel entwickelt, die aufgrund ihrer Ausdehnung nicht in den synaptischen Spalt diffundieren können. Werden diese Nanopartikel mit einem selektiven NMDA-Rezeptorantagonisten funktionalisiert, sollten ausschließlich die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren blockiert werden ohne die synaptischen NMDA-Rezeptoren zu erreichen. Zunächst wird daher in dieser Arbeit die gezielte Darstellung von Gold Nanopartikeln mit einem vorher bestimmtem Durchmesser (≥ 30 nm) optimiert, die zudem eine geringe Größenverteilung besitzen. Um die synthetisierten Nanopartikel vor Aggregation zu schützen, werden sie mit einer gemischten Monolage aus Amino- und Carbonsäure terminierten thiolierten Polyethylenglykol (PEG)-Liganden versehen. Diese stabilisieren die Partikel einerseits aufgrund sterischer und elektrostatischer Effekte der Carbonsäure, während die Aminogruppen der weiteren Biofunktionalisierung dienen. Das synthetisierte Alkyl-PEG 600 System wird hierzu mit dem kommerziell erhältlichen PEG 3000 System verglichen. Die resultierenden Nanopartikel beider Systeme besitzen eine hohe Stabilität bezüglich Aggregation in hochkonzentrierten Salzlösungen sowie Zellkulturmedium. Neben der Charakterisierung der Schichtdicke der Polymere werden die Nanopartikel auf ihre chemische Zusammensetzung der Passivierungsschicht untersucht. Hierzu dient ein in der vorliegenden Arbeit entwickeltes, neuartiges fluoreszenz-basiertes Verfahren. Die Anzahl reaktiver Aminogruppen auf der Oberfläche kann so quantitativ bestimmt werden, wodurch die Desorption der thiolierten Liganden mit der Zeit von der Goldoberfläche beobachtet wird. Weiterhin wird gezeigt, dass die Anzahl der gebundenen Aminogruppen beeinflusst und kontrolliert werden kann. In einem analogen fluoreszenz-basierten Verfahren wird die durchschnittliche Anzahl an bioaktiven Peptiden pro Partikel bestimmt - eine wichtige Information zur Untersuchung von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen im Hinblick auf multivalente Liganden. Das Verfahren zeigt erstmals, dass das Alkyl-PEG 600 System eine direkte Bindung der Peptide an die Oberfläche der Partikel unterbindet, während im kommerziellen PEG 3000 System eine solche unerwünschte direkte Bindung nicht verhindert werden kann. Damit ist das Alkyl-PEG 600 System für die kontrollierte und definierte Darstellung von Peptid-Nanopartikel-Konjugaten besser geeignet, als das kommerziell erhältliche PEG3000 System.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung der Peptid-funktionalisierten Nanopartikel mit NMDA-Rezeptoren wird ein Modellsystem eingesetzt, in welchem HEK 293 Zellen transient mit Plasmiden der NMDA-Rezeptoruntereinheiten transfiziert werden. In diesen Zellexperimenten kann die spezifische Wechselwirkung der Peptid-funktionalisierten Gold Nanopartikel sowohl qualitativ mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen, als auch quantitativ in einer Bindungsstudie nachgewiesen werden. Zudem wird die Bindungskonstante der Konjugate bestimmt, die um einen Faktor 1000 größer ist, als die des löslichen Antagonisten. Damit wird bestätigt, dass die hergestellten biofunktionalisierten Nanopartikel für die Anwendung im biologischen System bestens geeignet sind.

Summary

The goal of this thesis is the design of stable and biocompatible gold nanoparticles functionalized with active peptides to enable the study of cell death pathways in primary hippocampal neurons. Activated NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) receptors are thought to trigger different signalling pathways that are dependent on the receptor location within the postsynaptic cell: Synaptic NMDA receptors play an important role in cell survival processes whereas extrasynaptic NMDA receptors are thought to promote cell death pathways.

In order to prove this hypothesis of differential signalling, a special antagonist for extrasynaptic NMDA receptors has to be designed. Gold nanoparticles are therefore synthesized which are excluded from the synaptic cleft due to their size. If these particles are functionalized with a selective NMDA receptor antagonist, these particles should allow exclusive blockage of extrasynaptic NMDA receptors thereby blocking cell death pathways leaving synaptic receptors unaffected.

Initially, the synthesis of large (≥ 30 nm) gold nanoparticles is optimized which allows the preparation of monodisperse, spherical particles with a predefined size. In order to prevent aggregation of the nanoparticles, the obtained particles are passivated with a mixed monolayer composed of amino and carboxylic acid terminated thiolated poly(ethylene) glycol (PEG) derivatives. The carboxylic acid groups essentially stabilize the particles due to electrostatic repulsion, whereas the amino groups allow for further functionalization. Here, the commercially available PEG 3000 passivation system is compared to a synthesized Alkyl-PEG 600 system. Both ligands prevent aggregation of the particles in high ionic strength solutions up to a salt concentration of 2 M NaCl. Furthermore, these passivated particles show an increased stability in cell culture medium for at least 24 hours compared to non-passivated particles which immediately aggregate upon addition of cell culture medium. The size of the resulting particles including the polymer coat, as well as the chemical composition of the passivation layer is characterized. The latter is achieved by the development of a novel quantitative fluorescence-based assay to analyze the number of reactive amino groups in the passivation shell. Time dependent analysis of the passivated particles indicates desorption of the thiol-bearing passivation ligands over time. Moreover, it is shown that the amount of reactive amino groups in the ligand shell can be defined and controlled. Similar to this fluorescence-based assay it is shown herein that the average number of conjugated bioactive peptides can be analyzed and tuned accordingly. The average number of bioactive peptides per particle is indeed of importance for exploring the influence of multivalent ligands. Interestingly, the Alkyl-PEG 600 passivation system prevents the direct binding of the thiol containing peptide, whereas the incubation of peptides with PEG 3000 passivated particles leads to a detectable amount of peptides bound directly to the nanoparticle core. The PEG 3000 passivation system is therefore not equally suited for the controlled and defined functionalisation of gold nanoparticles.

In order to study the bio-applicability of the peptide functionalized particles designed in this thesis, as well as to evaluate the activity of the prepared conjugates, we utilized a model system of HEK 293 cells which are transiently transfected with NMDA receptor subunits. We clearly observe significantly higher binding of the particles to the transfected cells compared to all control experiments. Additionally, the binding constant of these conjugates is determined to be significantly higher than the binding constant of the soluble peptides. These results clearly demonstrate that the engineered system of peptide-functionalized nanoparticles is well suited to study receptor-ligand interactions in hippocampal neurons.

1 Motivation

Das zentrale Nervensystem (ZNS) höherer Wirbeltiere besitzt eine faszinierende und extrem komplexe Struktur, die Wahrnehmung, motorische Koordination und kognitive Eigenschaften ermöglicht. Im adulten Stadium besteht das ZNS aus etwa 100 Milliarden Neuronen, die über spezielle Kontaktstellen, den Synapsen, miteinander kommunizieren können. Strukturell wird eine Synapse in drei Elemente unterteilt: Die präsynaptische Zelle, die postsynaptische Zelle, sowie eine Kontaktzone, die etwa 20-40 nm breit ist (synaptischer Spalt). Für die Weiterleitung der Information an den Synapsen spielt besonders die vorübergehende Umwandlung von elektrischen in chemische Signale eine wichtige Rolle. Eine Änderung des Membranpotentials der präsynaptischen Zelle führt zu einer Freisetzung von Neurotransmittern, die durch den synaptischen Spalt diffundieren und an spezielle Rezeptormoleküle der postsynaptischen Zelle binden. Die verschiedenen Neurotransmitter, welche die synaptische Signaltransduktion vermitteln, sowie die Vielzahl an funktionellen Rezeptoren verleihen dem Nervensystem eine Komplexität, die bis heute nicht vollständig verstanden ist.^{1,2}

Die transmembranständigen Ionenkanäle der postsynaptischen Zelle regulieren beispielsweise den Ionenstrom in die der Synapse nachgeschalteten Zelle, der sich auf verschiedene Prozesse im Nervensystem auswirkt. Ein Anstieg an Calciumionen in der postsynaptischen Zelle, ausgelöst durch synaptische Aktivität, beeinflusst Prozesse wie synaptische Plastizität und fördert das Überleben der Zelle. Unter Anderem sind hier NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren involviert, die als transmembranständige Ionenkanäle eine hohe Permeabilität für Calciumionen besitzen. Diese funktionellen Rezeptoren sind im synaptischen Spalt akkumuliert, verteilen sich jedoch gleichzeitig über die gesamte Membran der postsynaptischen Zelle. Werden wiederum diese extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren als Folge von Glutamatausschüttung in den extrazellulären Raum aktiviert, erfolgt wiederum eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Einer Hypothese nach ist der Calciumeinstrom, der durch diese extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren vermittelt wird, nicht an Signalkaskaden gekoppelt, die das Überleben der Zellen fördern, sondern an Signalwege, die letztendlich zum Zelltod führen (Abbildung 1 a).³⁻⁶ Dieser Vorgang wird beispielsweise bei ischämischen Zuständen wie Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma für Gehirnschäden verantwortlich gemacht, da in diesem Fall der Neurotransmitter Glutamat in den extrazellulären Raum austritt und dort die Aktivierung der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren initiiert.

Ob also eine Nervenzelle durch Calciumeintritt überlebt oder stirbt, könnte von der Position der aktivierten NMDA-Rezeptoren und somit von der Region des Calciumeintritts abhängen. Ein tieferes Verständnis der verschiedenen Prozesse, die über das Schicksal des Neurons entscheiden, kann demnach genutzt werden, um die pro-Überlebens Signale von den Zelltod-Signalen zu differenzieren und so selektive Pharmaka zu entwickeln, die letztendlich das Überleben der Zellen sichern können.⁷⁻⁹ Um die Hypothese der ambivalenten Rolle des NMDA-Rezeptors und die unterschiedlichen Signalkaskaden untersuchen zu können, müssen der extrasynaptische und der synaptische NMDA-Rezeptor aufgrund ihrer Position in der postsynaptischen Zelle unterschieden werden.

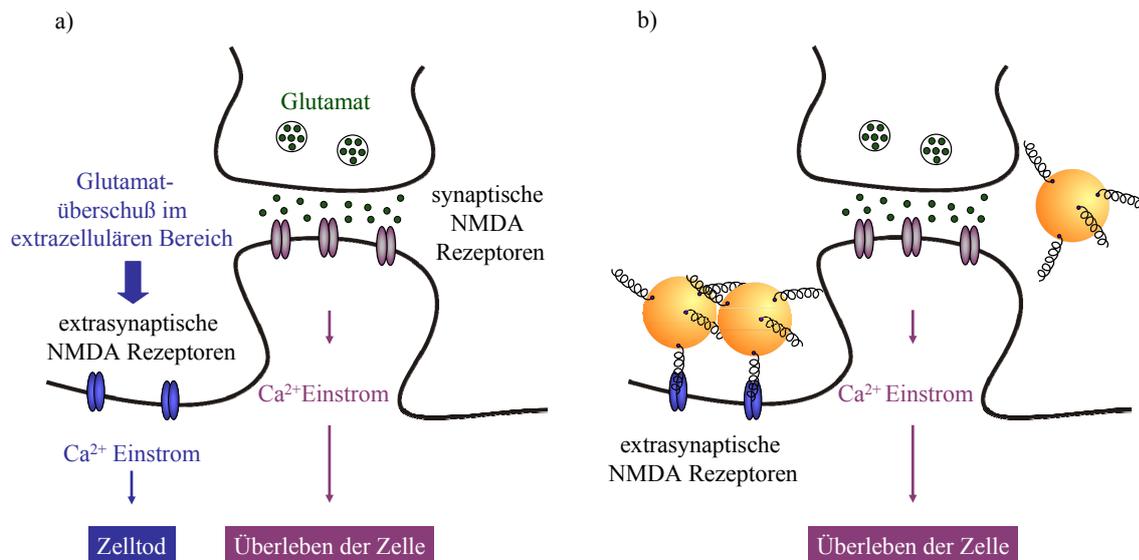


Abbildung 1: Unterschiedliche Funktionen der synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen und die Strategie zur Unterscheidung dieser Rezeptoren. a) Aktivierung der NMDA-Rezeptoren fördert je nach Lokalisation der Rezeptoren den Zelltod (extrasynaptisch) oder das Überleben der Zelle (synaptisch) b) Sterisch anspruchsvolle Gold Nanopartikel, funktionalisiert mit einem bioaktiven Peptid, blockieren ausschließlich extrasynaptische NMDA-Rezeptoren und sollen so eine Unterscheidung der synaptischen und extrasynaptischen Signalwege in hippocampalen Neuronen ermöglichen.

Hierfür soll ein neuartiger Antagonist entwickelt werden, der eine Unterscheidung zwischen synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren erreichen kann, und so ausschließlich die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren spezifisch blockiert. Voraussetzung für diese Differenzierung ist der Einsatz eines Antagonisten, der statt einer niedermolekularen Ausdehnung eine Größe im Nanometer Bereich besitzt. Durch die deutlich größere räumliche Ausdehnung des Antagonisten wird eine Diffusion in den synaptischen Spalt unterbunden, der einen Durchmesser von etwa 23 nm besitzt. Um dies zu gewährleisten, sollen Nanopartikel eingesetzt werden, deren Durchmesser größer ist, als die Ausdehnung des synaptischen Spalts (s. Abbildung 1 b). Für diese Aufgabe müssen die entsprechenden Nanopartikel verschiedene Merkmale aufweisen: Wie oben beschrieben müssen die Nanopartikel sterisch anspruchsvoll sein (≥ 30 nm), um den Eintritt in den synaptischen Spalt zu unterbinden. Weiterhin sollten die eingesetzten Partikel eine geringe Toxizität und eine stabile Bindung zum Antagonisten aufweisen, um einerseits dessen Funktionalität nicht einzuschränken und andererseits die spontane Ablösung des Antagonisten zu verhindern. Diese spontane Freisetzung des Antagonisten in zellulärer Umgebung würde die selektive Blockierung der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren verhindern. Eine Unterscheidung der extrasynaptischen und synaptischen NMDA-Rezeptoren wäre dann nicht mehr möglich.

Nanopartikel haben sich in den letzten Jahren zu wichtigen Werkzeugen in der biologischen und medizinischen Forschung entwickelt.¹⁰⁻¹⁴ Durch die Kombination von Nanopartikeln mit ihren besonderen optischen Eigenschaften und verschiedenen Biomolekülen, wie Proteinen oder DNA mit ihren einzigartigen Erkennungsmechanismen, entstehen völlig neue Materialien, die eine gezielte Untersuchung von biologischen Prozessen erlauben. Nanomaterialien weisen charakteristische Eigenschaften auf, die sich von denen des makroskopischen Materials unterscheiden, da die Oberflächen- bzw. Grenzflächeneigenschaften gegenüber Volumeneigenschaften des Materials eine immer größere Rolle spielen.¹⁵ So zeigen Gold

Nanopartikel beispielsweise eine ausgeprägte Plasmonresonanz, die empfindlich auf den interpartikulären Abstand sowie Veränderungen des Umgebungsmediums reagiert. Diese Sensitivität wird besonders im Bereich der Biosensorik genutzt und findet beispielsweise Anwendung im Bereich der Diagnostik.^{10, 13, 16-18} Aufgrund ihrer hohen elektronischen Dichte sind Gold Nanopartikel zudem elektronenmikroskopisch leicht detektierbar und wurden schon früh als Marker in der Histochemie und Cytochemie eingesetzt.¹² Im Vergleich zu anderen Nanopartikeln zeichnen sich Gold Nanopartikel durch eine hohe Stabilität, Biokompatibilität und ihre starke, kovalente Bindung mit Thiolen aus. Diese Eigenschaften sind im Besonderen für Untersuchungen am biologischen System relevant und sind verantwortlich für die vielfältige Anwendung der Gold Nanopartikel.^{11, 19-22}

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die gezielte Darstellung und Charakterisierung von biofunktionalisierten Gold Nanopartikeln zur Herstellung eines neuartigen NMDA-Rezeptor Antagonisten durchgeführt werden, um die konträre Rolle der unterschiedlich lokalisierten NMDA-Rezeptoren bei ischämischen Zuständen zu untersuchen. Der funktionalisierte Gold Nanopartikel-Antagonist soll derart gestaltet werden, dass er den extrasynaptischen Rezeptor blockiert, während der synaptische NMDA-Rezeptor aufgrund der Größe der Nanopartikel nicht erreicht und beeinflusst werden kann.

1.1 Strategie

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Gold Nanopartikel-Biomolekül-Konjugate für gezielte Untersuchungen von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen hergestellt werden. Für diese Aufgabe bedarf es Nanopartikel, die über eine hohe Stabilität sowie maßgeschneiderte Oberflächenfunktionalitäten verfügen, um im biologischen System eingesetzt werden zu können. Abbildung 2 skizziert die geplante Funktionalisierungsstrategie. Im ersten Schritt werden Nanopartikel mit einem Durchmesser von ~ 13 nm durch Reduktion eines Goldsalzes synthetisiert, die in einer Keim-Wachstums-Reaktion auf einen Durchmesser von 30-40 nm vergrößert werden. Da diese unfunktionalisierten Nanopartikel im Zellkulturmedium nicht stabil sind, werden die generierten Nanopartikel mit einer gemischten Monolage aus bifunktionalen Polyethylenglykol (PEG)-Thiolen passiviert. Diese PEG-Thiole sind zum Einen mit einer Carbonsäure substituiert, welche aufgrund der negativen Ladung in Abhängigkeit des pH-Werts zu einer elektrostatischen Abstoßung der Partikel führt. Zum Anderen werden Aminogruppen eingesetzt, welche als Ankergruppen der Biofunktionalisierung dienen. Über ein Linkersystem wird im nächsten Schritt das als Antagonist für NMDA-Rezeptoren bekannte Peptid, Conantokin G (Con-G) an der äußeren Peripherie der Monolage immobilisiert.

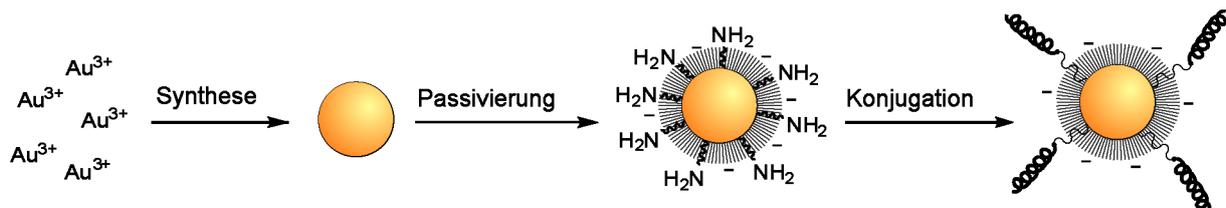


Abbildung 2: Darstellung der Gold Nanopartikel-Biomolekül-Konjugate. Zunächst werden die Gold Nanopartikel synthetisiert und mit einer gemischten Monolage an Polyethylenglykolderivaten passiviert, um sie vor Aggregation zu schützen. Im Weiteren erfolgt die Konjugation der Peptide an die Peripherie der Nanopartikel.

Um die Funktionalität der Gold Nanopartikel-Biomolekül-Konjugate zu prüfen, wird ein Modellsystem eingeführt, in welchem HEK 293 Zellen transient mit Plasmiden transfiziert werden, die NMDA-Rezeptoruntereinheiten kodieren. In diesem nicht-neuronalen Modellsystem kann die Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung der funktionalisierten Gold Nanopartikel untersucht werden ohne auf das System der komplexen primären Neurone zurückgreifen zu müssen. Neben dem Vorteil der Anwendung einer Zelllinie kann anhand des Modellsystems die selektive Wechselwirkung der funktionalisierten Nanopartikel verglichen mit den Primärzellen einfacher beobachtet werden, da HEK 293 Zellen keine weiteren NMDA-Rezeptortypen exprimieren.

2 Theorie und Hintergrund

2.1 Gold Nanopartikel

Bereits in der Antike fanden rubinrote Lösungen von Gold Nanopartikeln für künstlerische und medizinische Zwecke Verwendung. „Lösliches“ Gold wurde als medizinisches Wundermittel gepriesen und zugleich zur Verzierung von Keramiken eingesetzt.²³ Ein prominentes Beispiel ist der römische Lycurgus Kelch, der, datiert auf das vierte Jahrhundert v. Chr., lange Zeit durch seine unterschiedliche Färbung Rätsel aufgab. Wird der Kelch von innen beleuchtet, erhält er eine rötliche Färbung. Befindet sich hingegen die Lichtquelle außerhalb des Kelches, so wirkt er opalgrün. Diese Farbänderung in Abhängigkeit der Beleuchtung ist auf die Wechselwirkung des Lichts mit beigemengten Gold und Silber Nanopartikel zurückzuführen.²⁴ Ohne eine physikalische Erklärung der Färbung und das Wissen um die Existenz von Nanopartikeln, wurden demnach Gold Nanopartikel schon früh für die Verzierung von Gegenständen genutzt.



Abbildung 3: Lycurgus Kelch, viertes bis fünftes Jahrhundert v. Chr. befindet sich heute im Britischen Museum, London. Aufgrund von Beimischungen von Gold Nanopartikeln im Glas erscheint der Kelch bei Durchlicht (Transmission) rot, bei Auflicht (Reflektion) grün.²⁵

Wachsendes wissenschaftliches Interesse an den optischen Eigenschaften farbiger kolloidaler Lösungen initiierte spätestens Michael Faraday 1857, der durch seine Untersuchungen der optischen Eigenschaften von kolloidalen Goldfilmen und anderen Metallen einen Grundstein für die moderne Kolloidwissenschaft legte.²⁶ In einer Zweiphasenreaktion stellte Faraday kolloidales Gold her, indem er eine wässrige Lösung Tetrachloraurats mit Phosphor gelöst in Kohlenstoffdisulfid reduzierte. Aufgrund der rubinroten Färbung der Lösung schloss Faraday, dass „fein verteiltes Gold“ vorliegen müsse.²⁷ Etwa hundert Jahre später konnte durch hochauflösende Elektronenmikroskopie die Anwesenheit von Nanopartikeln mit einer Größe von 3-30 nm bestätigt werden.²⁸ Heute faszinieren Gold Nanopartikel mehr denn je und werden aufgrund ihrer besonderen optischen Eigenschaften und der verbesserten Synthesemöglichkeiten in immer neuen Forschungsgebieten eingesetzt.²⁹

Im Weiteren soll zunächst auf die Eigenschaften der Gold Nanopartikel eingegangen werden, gefolgt von Anwendungsbeispielen der Nanopartikel-Biomolekül-Konjugate sowie deren Herstellung und Funktionalisierung. Anschließend werden einige Methoden zur Charakterisierung der Nanopartikel-Biomolekül-Konjugate vorgestellt.

2.1.1 Plasmonresonanz

Die Wechselwirkung der Nanopartikel mit Licht führt zu interessanten optischen Eigenschaften, die sich von denen des makroskopischen Materials deutlich unterscheiden.³⁰ Im Besonderen sind hier Plasmonen zu nennen, die für die intensive Färbung der Lösung verantwortlich sind. Diese Plasmonen beruhen auf kollektiven Schwingungen der Leitungsbandelektronen und können in verschiedenen Metallen beobachtet werden. In Edelmetallen wie Gold und Silber liegen diese im sichtbaren Spektralbereich.³¹ Teilchenplasmonen lassen sich anhand des in Abbildung 4 dargestellten einfachen Modells beschreiben. Da die Eindringtiefe^a einer elektromagnetischen Welle im sichtbaren Spektralbereich in der Größenordnung des Partikeldurchmessers liegt, kann die elektromagnetische Welle das Partikel annähernd vollständig durchdringen. Das Wechselfeld induziert eine kollektive Oszillation der freien Leitungsbandelektronen des Metalls (Abbildung 4). Es erfolgt demnach eine Auslenkung der Elektronen relativ zum positiv geladenen Atomrumpf in Abhängigkeit der Frequenz des einfallenden Lichtes. Die Coulomb Anziehung zwischen negativ geladenen Elektronen und dem positiv geladenen Atomrumpf stellt die Rückstellkraft des oszillierenden Systems dar. Ist die Frequenz der anregenden Welle in Resonanz mit der Eigenfrequenz dieser kollektiv oszillierenden Elektronen, führt bereits ein geringes Anregungsfeld zu einer starken Oszillation. Die spektrale Lage des Resonanzmaximums wird von der Stärke der Rückstellkraft des oszillierenden Systems beeinflusst. Diese hängt von intrinsischen Eigenschaften ab, wie der geometrischen Form, der Größe und damit der Ladungstrennung auf der Teilchenoberfläche und des Materials. Weiterhin hängt die Lage des Resonanzmaximums von der Polarisierbarkeit der Umgebung des Partikels ab. Daher können Plasmonen zur Detektion der Nanopartikel genutzt werden, indem die Partikel als Sonden eingesetzt werden.³² Die Dunkelfeld-Spektroskopie eignet sich als optische Methode, bei der einzelne Nanopartikel visualisiert werden können. Hierbei wird nur das Streulicht der Nanopartikel im optischen Mikroskop detektiert.^{33,34} Da die Farbe des Streulichts von der Größe und Form des Nanopartikels abhängt, können diese für Mehrfachmarkierung genutzt werden. Die spektrale Lage der Plasmonresonanz hängt zudem von dem Brechungsindex der Partikelumgebung ab. Dieser Effekt kann genutzt werden, um Biomoleküle spezifisch nachzuweisen.

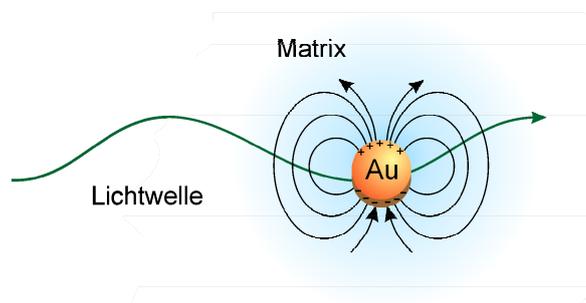


Abbildung 4: Anregung von Teilchenplasmonen in Metall Nanopartikeln. Die elektromagnetische Welle durchdringt das Partikel; durch das induzierte elektrische Wechselfeld werden die Leitungsbandelektronen relativ zum positiv geladenen Kern ausgelenkt. Die attraktive Wechselwirkung zwischen den Leitungsbandelektronen und dem Atomrumpf führt zu einer Rückstellkraft des oszillierenden Systems. Analog zu einem hertzischen Dipol werden die Elektronen permanent aus ihrer Gleichgewichtslage heraus beschleunigt und strahlen Energie in Form einer elektromagnetischen Welle aus.³¹

^a Die Eindringtiefe bei optischen Frequenzen liegt für Gold und Silber etwa bei 30 nm.

2.1.2 Anwendung von Nanopartikeln in der Biologie

Gold Nanopartikel finden heutzutage weitverbreitete Anwendung in verschiedenen Bereichen der Biologie.^{17, 35-37} Sie werden unter Anderem als Marker, als sensoraktive Substanzen und als Transportvehikel eingesetzt. Mit molekularen Wirkstoffen beladen sind Nanopartikel beispielsweise für die Krebstherapie interessant. Verschiedene biologische Molekülklassen werden an Nanopartikeln immobilisiert, wie Karbohydrate, Oligonukleotide, Proteine und Peptide. Karbohydrat-funktionalisierte Nanopartikel, auch Glyconanopartikel genannt, sind ein sehr junges aber vielversprechendes Forschungsgebiet, in dem Karbohydrat-vermittelte biologische Prozesse untersucht werden.³⁸⁻⁴⁰ Die spezifische Wechselwirkung von Kohlenhydrat-Epitopen mit korrespondierenden endogenen Glycoproteinen der Zelloberfläche spielt eine fundamentale Rolle bei verschiedenen intrazellulären Erkennungsprozessen sowie beispielsweise bei Adhäsionsprozessen der Tumor-Metastasierung. Auch Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sind in diesen Prozess involviert. Zwar ist die Karbohydrat-Protein-Wechselwirkung im Vergleich zum Biotin/Streptavidin Modellsystem relativ schwach, sie kann jedoch durch multivalente Wechselwirkung verstärkt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass polyvalente Lactose-Nanopartikel die experimentelle Metastasierung von Lungenkrebs inhibieren.⁴¹ Biologische Makromoleküle, wie DNA oder RNA bieten sich ebenfalls als Liganden an und werden bereits zur Manipulation in biologischen Systemen *in vitro* genutzt (s.u.). Selektive Bindung von Proteinen oder Peptiden an Nanopartikel eröffnet die Möglichkeit, Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen basierend auf Protein-Protein oder Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen sowie Enzymaktivitäten zu untersuchen. Einige Anwendungsmöglichkeiten sind in Abbildung 5 zusammen gefasst und werden im Weiteren erläutert.

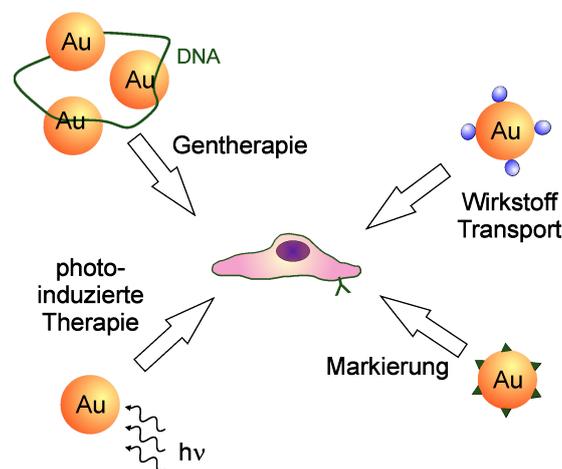


Abbildung 5: Verschiedene Anwendungen von funktionalisierten Gold Nanopartikeln in der Biologie. Sie dienen der Markierung von Proteinen, werden als Gen- oder Wirkstoff-Transportsysteme eingesetzt und sind als Wärmequelle potentielle Kandidaten für die Krebstherapie.³⁵

Gold Nanopartikel als Marker

Ein etabliertes Verfahren, welches noch vor der Geburtsstunde der Nanobiotechnologie eingeführt wurde, nutzt die hohe Elektronendichte des Goldes, um Zellstrukturen und Zellbestandteile im Elektronenmikroskop zu markieren. Dabei werden Gold Nanopartikel mit Antikörpern funktionalisiert, die durch molekulare Erkennung spezifisch an das Zielmolekül

binden. In diesem Immunogold-Verfahren können biologische Strukturen, die aufgrund der schwachen Elektronenstreuung der leichten Elemente, wie Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Sauerstoff, generell einen geringen Kontrast besitzen durch die spezifische Bindung der Gold Nanopartikel mittels elektronenmikroskopischer Betrachtung visualisiert werden.⁴²⁻⁴⁴ Durch den starken Kontrast der Nanopartikel und die hohe laterale Auflösung der Elektronenmikroskopie werden so Strukturen bis hin zu individuellen Rezeptoren aufgelöst. Der hohe Kontrast wird durch die Zugabe von Silber noch zusätzlich verstärkt, so dass die Visualisierung bereits mit optischer Mikroskopie erfolgen kann.⁴⁵⁻⁴⁷ Dieses Verfahren erlaubt beispielsweise die Untersuchung der Expression und Dichteverteilung von ionotropen Glutamaterezeptoren wie AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) und NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren in hippocampalen oder neocortikalen Synapsen. Unter Verwendung von Nanopartikeln mit verschiedenen Größen gelingt hier die gleichzeitige Markierung und Quantifizierung beider Rezeptor-Typen.^{48, 49}

Gold Nanopartikel als Gen- und Medikamenten-Transporter

Ein wichtiges Forschungsgebiet befasst sich mit der gezielten Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen und im Besonderen in den Zellkern.⁵⁰⁻⁵² Der Zellkern, eines der Organellen in Eukaryonten, stellt das Steuerzentrum einer Zelle dar und enthält die genetische Information. Daher ist er ein wichtiges Zielobjekt beispielsweise für die Krebstherapie, in der Wirkstoffe gezielt und in hoher Anreicherung im Zellkern appliziert werden sollen. Diese Therapeutika können oftmals aufgrund der Größe und Ladung die Zellmembran nicht passieren oder sie werden in der Zelle durch Lysosomen abgefangen, bevor sie den Zellkern erreichen.⁵³ Nanopartikel werden abhängig von ihrer Größe und Funktionalisierung von Zellen aufgenommen und bieten somit eine Möglichkeit, den Transport von Wirkstoffen zu unterstützen.⁵⁴⁻⁵⁶ Auch bei dem Transport von Partikeln müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Um die Zellmembran zu passieren, können die Nanopartikel mit Peptiden funktionalisiert werden, die die spezifische Aufnahme der Nanopartikel beispielsweise durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (RME) steuern.⁵⁷ Durch Variation der Hydrophobie und Ladung der Ligandenhülle kann die Aufnahme der Nanopartikel ebenfalls beeinflusst werden.⁵⁸ Anschließend müssen sie dem endosomalen oder lysosomalen Stoffwechselweg ausweichen und in den Zellkern vordringen. Diesbezüglich eignet sich eine Funktionalisierung mit Peptiden, die über Signalsequenzen mit dem nukleären Kernkomplex in Wechselwirkung treten.^{59, 60} Da die Kernpore eine Größe von etwa 30 nm besitzt, sollten die Partikel entsprechend kleiner sein, um die Kernmembran zu passieren.⁶¹

Nanopartikel basierte Wirkstoff-Transport-Systeme können aufgrund der großen Oberfläche mit einer hohen Konzentration an Wirkstoff beladen und dann kontinuierlich abgegeben werden. Somit kann die Wirkstoffkonzentration in einer Depotwirkung über einen längeren Zeitraum im therapeutisch wirksamen Bereich gehalten werden. Um im Zellinneren den Wirkstoff freizusetzen und damit eine effiziente Therapie zu gewährleisten, benötigt es einer externen oder internen Stimulierung. So zeigte Rotello *et al.* in einer Studie, dass Gold Nanopartikel geeignete Trägersysteme zum Transport von Therapeutika darstellen. Sie werden mit thioliertem Dipyromethenbordiäthylfluorid (bodipy), einem Fluoreszenzfarbstoff funktionalisiert, der als Modellsystem für hydrophobe Wirkstoffe dient. Zusätzlich wurden die Nanopartikel mit einer Monolage aus Tetraethylglykol-basierten, kationischen Liganden konjugiert, die die Aufnahme

der Nanopartikel in die Zellen erleichtern. Da in der Zelle die Konzentration an Glutathion, einem thiolhaltigen Tripeptid, wesentlich höher ist als im extrazellulären Bereich, wird durch diesen internen Stimulus der Fluoreszenzfarbstoff mittels Ligandenaustausch an der Oberfläche der Partikel in der Zelle freigesetzt. Die Fluoreszenz der gebundenen Farbstoffe wird durch die Nähe zum Gold gelöscht. Werden diese jedoch durch den Ligandenaustausch mit Glutathion von der Goldoberfläche abgelöst, kann die Freisetzung der Liganden und damit die Zunahme an Fluoreszenzsignal detektiert werden.⁶²

Neben dem Ansatz, kleine molekulare Therapeutika mittels Nanopartikeln zu transportieren, eignen sich diese auch für die Gentherapie, in der DNA oder RNA aktiv in die Zelle transportiert werden sollen.^{63, 64} Viren sind als natürliche Gen-Transporter sehr effizient, können jedoch unvorhersehbare Immun-Antworten und Zytotoxizität auslösen. Daher sind synthetische Gen-Transporter den Natürlichen vorzuziehen.³⁶ Um aktive Substanzen in den Zellkern zu überführen, müssen die Nanopartikel nicht zwingend diesen selbst erreichen. Sie können auch ausschließlich als Transporter genutzt werden, der die Wirkstoffe erfolgreich durch die Zellmembran schleust. In der Zelle wird der Wirkstoff anschließend von der Oberfläche der Nanopartikel durch geeignete Funktionalisierung gespalten und freigesetzt, um anschließend in den Zellkern einzudringen. Rotello *et al.* zeigten, dass schaltbare Gold Nanopartikel genutzt werden können, um DNA in den Zellkern zu transportieren. Die Partikel, welche mit einem Liganden bestehend aus photolabilem Linker (*o*-Nitrobenzyl-Ester) und quartärem Ammoniumsalz als Endgruppe funktionalisiert werden, binden durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladene DNA. Nach der Aufnahme in die Zellen, werden die positiven Liganden photo-induziert abgespalten, wodurch negativ geladene Carboxylate an der Partikeloberfläche generiert werden. Die DNA wird somit durch einen externen Stimulus von den Partikeln gelöst und kann anschließend im Zellkern nachgewiesen werden.³⁷ In gleicher Weise können Krebstherapeutika wie 5-Fluorouracil in die Zelle gebracht und freigesetzt werden.⁶⁵

Erste Untersuchungen zur Genregulierung mittels Interferenz RNA (RNAi) werden unter anderem von Mirkin *et al.* berichtet, die Gold Nanopartikel mit einer gemischten Monolage aus Polymeren und thiolierter siRNA funktionalisieren.⁶⁶⁻⁶⁸ Diese eleganten Transportsysteme beeinflussen effektiv die Genregulation *in vitro* und gelten als zukunftsweisend für weitere Applikationen.

Gold Nanopartikel als lokale Wärmequelle

Die Absorption von Licht führt zu einer Erwärmung der Nanopartikel, wenn die oszillierenden Leitungsbandelektronen relaxieren und die Energie strahlungsfrei auf das Kristallgitter übertragen. Schließlich wird die Wärmeenergie an die Umgebung abgeführt. Diese lokale Erwärmung, auch Hyperthermie genannt, kann ebenfalls in der Krebstherapie eingesetzt werden, da Zellen sehr sensitiv auf einen Temperaturanstieg reagieren.^{17, 69} Werden Partikel mit rezeptorspezifischen Liganden funktionalisiert, die in Krebszellen überexprimiert werden, so können diese im Tumorgewebe angereichert werden. Durch externe Stimulierung mittels eines Lasers werden die Nanopartikel anschließend erwärmt, wodurch die Temperatur in ihrer unmittelbaren Nähe ansteigt. Durch diesen gezielten Temperaturanstieg und die vorherige spezifische Bindung der Nanopartikel an Tumorgewebe können Krebszellen selektiv zerstört werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene orale Plattenepithelkarzinom-Zelllinien durch laserinduzierte

photo-thermale Therapie mittels Gold Nanopartikeln abgetötet werden können.⁷⁰ Im Vergleich zu einer gutartigen Epithelzelllinie ist für die Zerstörung der Tumorzelllinie weniger Energie erforderlich. Mit diesem Prinzip liegt ein guter Ansatz vor, Krebszellen selektiv im Gewebe zerstören zu können, ohne sie operativ entfernen zu müssen.¹⁹

Neben der Herausforderung Gold Nanopartikel selektiv im Tumorgewebe anzureichern, gilt es jedoch zudem als schwierig, in tieferem Gewebe liegende Partikel zu erreichen: Licht im sichtbaren Spektralbereich und sogar Infrarotlicht werden vom Gewebe absorbiert, so dass der externe Stimulus das Gewebe nur oberflächlich durchdringen kann.

Die photoinduzierte Erwärmung von Nanopartikeln wird in weiteren Bereichen der Nanobiotechnologie eingesetzt. Die lokale Erwärmung kann genutzt werden, um eine „ferngesteuerte“ Wirkstofffreisetzung herbeizuführen. In diesem Fall werden Gold Nanopartikel zusammen mit dem Wirkstoff in Polymerkapseln eingeschlossen. Die anschließende Anregung führt zu einer Erwärmung der Nanopartikel und die Polymerbindungen in lokaler Nähe der Partikel werden gebrochen.^{71, 72} Die durch die induzierte Wärme poröse Polymerkapsel erlaubt die Freisetzung des Wirkstoffs. Diese ferngesteuerte Wirkstofffreisetzung konnte bereits *in vitro* umgesetzt werden.⁷³

Gold Nanopartikel als Sensor

Die Plasmonresonanz (s. Kapitel 2.1.1) hängt nicht nur von der Form und der Größe der Nanopartikel ab, sondern ebenfalls sensitiv von dem Abstand zweier Partikel, sowie von dem Brechungsindex der Umgebung. Daher bieten sich Nanopartikel als sensoraktive Substanzen an.⁷⁴ Das bekannteste Beispiel eines goldbasierten Sensors geht auf Mirkin *et al.* zurück, die die Detektion von DNA mittels Plasmonresonanz etablieren konnten. Hierzu werden Gold Nanopartikel mit DNA Sequenzen konjugiert, die komplementär zu dem 5' und 3' Ende der zu detektierenden DNA Sequenz sind. Die funktionalisierten Gold Nanopartikel sind in Lösung frei dispergiert, wodurch diese rot erscheint. Wird nun die Analyt-DNA zugegeben, hybridisiert diese unter Aggregatbildung mit der an die Nanopartikel immobilisierten DNA. Durch die räumliche Nähe der Nanopartikel zueinander, ändert sich die Plasmonresonanz der Partikel und die Lösung erhält eine violett-blaue Färbung. Diese Farbänderung kann detektiert werden und ist reversibel, wenn das System über die Schmelztemperatur der DNA erhitzt wird.⁷⁵⁻⁷⁷

2.1.3 Synthese sphärischer Nanokristalle

Die vorgestellten optischen, aber auch magnetische oder elektronische Eigenschaften verschiedener Nanopartikel zeigen eine starke Größenabhängigkeit. Daher ist eine gezielte Synthese monodisperser Nanopartikel kombiniert mit einem tieferen Verständnis für die mechanistischen Vorgänge der Reaktion von großer Bedeutung. Verschiedene kolloidchemische Verfahren zur Synthese von Nanokristallen – kristallinen Partikeln von 1 bis 100 nm Durchmesser – konnten etabliert werden;⁷⁸⁻⁸¹ die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Generell lässt sich die Herstellung von Nanopartikeln in zwei wesentliche Vorgänge unterteilen: Nukleation und Wachstum.⁸⁰ Bei der Nukleation werden durch Dichtefluktuationen aus

gebildeten Monomeren, den kleinsten Untereinheiten des Kristalls, thermodynamisch stabile Keime gebildet. Diese wachsen im Weiteren durch Anlagerung bereits gebildeter Vorläufer.⁸²

Die Nukleation kann durch Fremdkeime wie vorhandene Nanopartikel als Substrate aber auch Staubkörner oder Blasen induziert werden (heterogene Keimbildung) oder spontan in einer homogenen Lösung auftreten (homogene Keimbildung). Bei der homogenen Keimbildung ist die Energiebarriere der Nukleation vergleichsweise hoch, da das System spontan von einer homogenen Phase in eine heterogene Phase übergehen muss. Die heterogene Keimbildung hingegen kann als katalysierte Nukleation verstanden werden, bei der eine zweite Phase auf der Oberfläche der bereits existierenden Phase wächst. Da das Volumen des anlagernden Materials geringer ist als im Fall der homogenen Nukleation, sinkt dadurch die Barriere. Dies bedeutet, dass in einer homogenen Synthese stets frei von Fremdkeimen gearbeitet werden muss, um die Steuerung der Größenverteilung zu gewährleisten.

Ein Konzept der Steuerung der Größenverteilung wurde von LaMer und Mitarbeitern geprägt, die Ölaerosole und Schwefelhydroxide untersuchten.⁸³ Dieses Konzept der homogenen Synthese kann auf die Synthese von Nanokristallen verschiedenster Materialien übertragen werden. Hierbei ist von Bedeutung, dass in diesem Prozess viele Kristallisationskeime schlagartig gebildet werden (*engl.* burst nucleation), die anschließend wachsen, ohne dass eine weitere Keimbildung stattfindet. Werden die Partikel gleichzeitig und in einem kurzen Zeitraum zu Beginn der Synthesephase gebildet, verläuft das anschließende Wachstum synchron und es ist möglich, die Größenverteilung gering zu halten. Gelingt es nicht, die Nukleation von der Wachstumsphase zeitlich zu trennen, entstehen immer wieder neue Wachstumskeime mit kleinen Durchmessern, die neben den gewachsenen Partikeln vorliegen. Damit ist eine Kontrolle der Größenverteilung unmöglich. Abbildung 6 veranschaulicht schematisch die homogene Keimbildung, in der die Übersättigung gegen die Zeit aufgetragen ist. Die Übersättigung ergibt sich aus der Differenz der chemischen Potentiale der Lösung und des Kristalls und ist unter anderem abhängig von der Konzentration der Monomere.

Zunächst nimmt die Konzentration der in der Lösung gebildeten Monomere kontinuierlich zu (Phase I) bis sie einen Grad der kritischen Übersättigung S_c überschritten hat. In Phase II setzt die Keimbildung ein; der Grad an Übersättigung S_c ist hoch genug, die Energiebarriere zu überwinden, so dass stabile Kristallisationskeime entstehen, die nicht durch Ostwald-Reifung wieder aufgelöst werden. Direkt nach der Keimbildung beginnt auch das Wachstum der Keime durch Anlagerung weiterer Monomere. Keimbildung und Wachstum treten als konkurrierende Reaktionen in Phase II auf, wodurch sich die Konzentration an freien Monomeren schneller verringert, als diese nachgebildet werden können. Die Gesamtkonzentration an Monomeren sinkt, und damit nimmt die Übersättigung allmählich ab. Gelangt die Monomer-Konzentration unterhalb eines Schwellenwertes, sinkt die Keimbildungsgeschwindigkeit der Kristallisationskeime rapide ab und das System geht in die Wachstumsphase (Phase III) über. In dieser Phase tritt ausschließlich Wachstum auf, solange eine Übersättigung der Lösung vorliegt ($S=1$). Verschiedene Methoden zur Synthese von sphärischen Gold Nanopartikeln in wässrigem Medium sind in der Literatur bekannt. Besonders häufig wird die Synthese von Turkevich eingesetzt, in der Gold(III)-chlorid mit Natriumzitrat zu elementarem Gold reduziert wird.^{84, 85} Hierbei dient Natriumzitrat nicht nur als Reduktionsmittel, sondern gleichfalls als Stabilisator der entstandenen Nanopartikel, in dem es mit der positiv geladenen Oberfläche der Nanopartikel wechselwirkt.

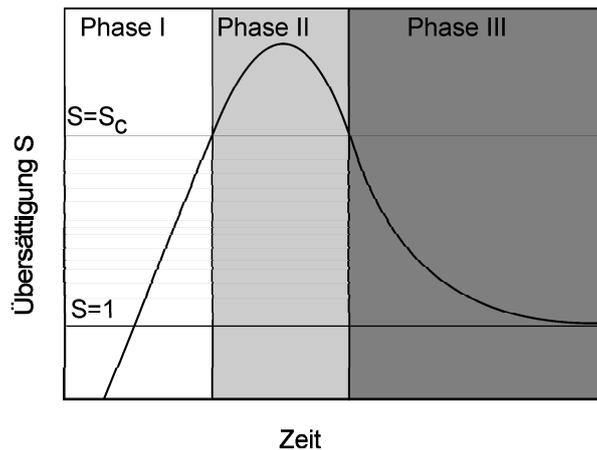


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Verlaufs der Übersättigung in Abhängigkeit von der Zeit. In Phase I nimmt die Konzentration der Monomere kontinuierlich zu, wodurch auch die Übersättigung stetig steigt. In Phase II ist die kritische Übersättigung erreicht, das System geht in die Keimbildung über. Dadurch nimmt die Konzentration an Monomeren schneller ab, als sie nachgebildet werden kann und die Übersättigung sinkt. In Phase III sinkt die Übersättigung unterhalb den Wert der kritischen Übersättigung S_c und das System geht in den Bereich des Wachstums über. Wird Phase II kurz gehalten, können monodisperse Nanopartikel dargestellt werden.⁸³

Frens *et al.* entwickelten diese Methode weiter, indem sie das Verhältnis von Reduktionsmittel zu Goldsalz variierten, so dass auch größere Nanopartikel (16-147 nm) zugänglich wurden.⁸⁶ Diese jedoch zeigen eine elliptische Form und eine vergleichsweise breite Größenverteilung ($\geq 20\%$). Aktuelle mechanistische Studien über diese Turkevich-Synthese sphärischer Gold Nanopartikel zeigen, dass kettenartige Intermediate nachgewiesen werden können, die schließlich durch Ostwald-Reifung sphärische Partikel bilden.^{87, 88} Dies erklärt den Farbumschlag, der bei einer solchen Zitrat-Synthese zu beobachten ist. Nach Zugabe des Zitrats in der Siedehitze bildet sich zunächst aufgrund der kettenartigen Intermediate eine schwarze Lösung, die sich nach einiger Zeit durch die Bildung der Nanopartikel rot verfärbt.

Ein weiteres Verfahren zur Synthese von größeren Nanopartikeln trennt Nukleation und Wachstumsreaktion voneinander (s. o.), indem sphärische Gold Keime mit einer geringen Größenverteilung ($\leq 14\%$) in einer separaten Wachstumsreaktion vergrößert werden. Diese schrittweise Synthese ist generell zur Synthese großer Nanopartikel im Bereich von 20 bis 100 nm Durchmesser besser geeignet.⁸⁹⁻⁹³ Besonders schwache Reduktionsmittel wie Hydroxylamin Hydrochlorid werden eingesetzt, da sie die Reduktion an der Oberfläche bestehender Keime ermöglicht, jedoch keine neuen Keime entstehen lässt. So konnten Brown *et al.* sphärische Nanopartikel in einer mehrstufigen Wachstumsreaktion herstellen. Durch mehrfache Verdünnung der Partikel und einer konstanten Konzentration an Reduktionsmittel gelingt die Synthese monodisperser Nanopartikel.^{90, 94} Idealerweise befindet man sich bei dieser Keim-Wachstumsreaktion in Phase III (Abbildung 6), in der die Keime parallel wachsen, ohne dass neue Keime generiert werden, so dass die Größenverteilung besser kontrolliert werden kann. Dieses Wachstum bestehender Keime macht sphärische Nanopartikel mit kleiner Größenverteilung ($\leq 14\%$) zugänglich und eröffnet so Möglichkeiten für neue Studien über die besonderen Eigenschaften der Nanopartikel sowie neuartige Anwendungsgebiete beispielsweise im Bereich der Optik.

2.1.4 Stabilität kolloidaler Suspensionen

Eine kolloidale Suspension besteht aus kleinen Feststoffpartikeln in der Größenordnung von $\sim 1\text{-}500\text{ nm}$, die in einer kontinuierlichen flüssigen Phase dispergiert sind. Kolloidale Systeme sind metastabil, da sie eine große Oberfläche aufweisen und damit eine hohe Oberflächenenergie besitzen. Durch Agglomeration wird die Gesamtoberfläche verringert und so ein thermodynamisch stabilerer Zustand erreicht. Der Begriff Stabilität hat in der Kolloidchemie eine andere Bedeutung, als in der Thermodynamik. Eine stabile kolloidale Lösung ist definiert als ein System, welches einer Flockulation oder Aggregation standhalten kann und im beobachteten Zeitfenster den Disperistätszustand beibehält.⁹⁵

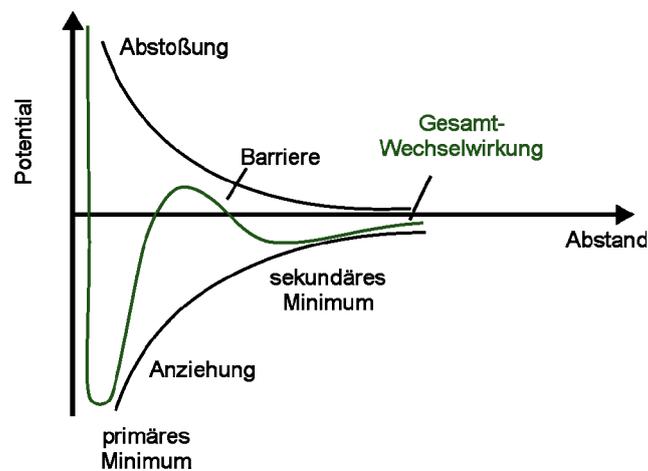


Abbildung 7: Potential-Abstandsverlauf. Die attraktiven Wechselwirkungen werden nach der DLVO Theorie getrennt von den repulsiven Kräften betrachtet und schließlich zu einer Gesamtwechselwirkungskurve summiert. Nähert sich ein Objekt an, so erfährt es im sekundären Minimum schwache Anziehungskräfte, die durch Lösungsmittelleffekte oder die kinetische Energie der Partikel kompensiert werden können. Die Barriere ist das Maß für die Stabilität der Suspension; ist sie hoch, sind die Partikel stabil. Wird sie abgesenkt beispielsweise durch Zugabe eines Elektrolyten, können sich die Partikel annähern und koagulieren.

Um stabile kolloidale Suspensionen herzustellen, ist es daher von Bedeutung, die verschiedenen wirkenden Kräfte zu kennen. Die erste Theorie über die Stabilität von Suspensionen wurde unabhängig sowohl von Derjaguin und Landau (1941)⁹⁶, als auch von Verwey und Overbeek (1948)⁹⁷ beschrieben und ist heute als DLVO Theorie bekannt. Auch wenn nicht alle Beobachtungen mit ihr quantitativ beschrieben werden können, erklärt sie doch eine Vielzahl von experimentellen Befunden.⁹⁵ In der DLVO Theorie werden die attraktiven Wechselwirkungen der dispergierten Partikel, sowie die repulsiven Wechselwirkungen getrennt betrachtet und durch Summation eine Gesamtwechselwirkung berechnet, die den Zustand des Systems wiedergibt.⁹⁵ Die dispergierten Partikel üben attraktive van-der-Waals Wechselwirkungen aufeinander aus, welche als Potential-Abstandsfunktion in Abbildung 7 dargestellt werden. Diese Kraft ist in erster Näherung umgekehrt proportional zum Quadrat des Kolloidabstandes. Gleichzeitig besitzen beispielsweise zitrat-stabilisierte Gold Nanopartikel eine negative Oberflächenladung, die durch die in Lösung frei diffundierenden Gegenionen ausgeglichen wird. Es bilden sich eine starre (Nernstpotential) und eine diffuse Doppelschicht aus, die exponentiell mit dem Abstand zur der Oberfläche abnimmt. Nähern sich zwei Partikel an, so überlagern sich die Doppelschichten nur bis zu einem gewissen Grad und bilden so eine Barriere, die die Partikel voneinander trennt. Die abstoßende elektrostatische Kraft ist eine Funktion des Oberflächen-

potentials, welches aus der Oberflächenladung, dem Kolloidabstand sowie der Elektrolytkonzentration der Lösung errechnet werden kann. Verringert sich die Doppelschichtdicke durch Zugabe von Elektrolyt, vermindert sich gleichzeitig die elektrostatische Abstoßung und mit ihr die Barriere zur Agglomeration. Die abstoßenden Wechselwirkungen sind ebenfalls in Abbildung 7 als Funktion des Partikelabstandes dargestellt. Die interpartikulären Gesamtwechselwirkungen werden schließlich durch Addition der einzelnen Kräfte erhalten. Nähert sich nun ein Partikel auf den Abstand des sekundären Minimums an, so erfährt es schwach attraktive Wechselwirkungen, die durch thermische Energie der Partikel oder Mediumseffekte kompensiert werden können.²⁹ Die Höhe der Barriere entscheidet über die Annäherung der Partikel und damit über die Stabilität der Dispersion. Sie hängt von verschiedenen Faktoren wie der Elektrolytkonzentration und der Oberflächenladung ab; niedrige Oberflächenladungen oder hohe Ionenstärken des Elektrolyten führen zu einem schnellen Abfall des Potentials in der diffusen Doppelschicht und somit zu einer geringen Energiebarriere. Daher können geladene Liganden, die das Potential der Doppelschicht beeinflussen, eine elektrostatische Stabilisierung der Partikel bewirken. Der Einfluss der Ionenstärke des Elektrolyten wird zudem genutzt, um ein Maß für die Stabilität der Suspension einzuführen. Wird die Ionenstärke durch Zugabe eines Salzes sukzessiv erhöht, nimmt die elektrostatische Abstoßung mit zunehmendem Abstand der Partikel schneller ab als bei geringer Ionenstärke, und Koagulation tritt ein. Die Salzkonzentration, bei der die Suspension gerade noch stabil ist, gilt als Kritische Koagulationskonzentration (CCC).⁹⁸ Des Weiteren werden zur Stabilisierung von Suspensionen sterisch anspruchsvolle Liganden wie Polymere eingesetzt, die eine starke Bindung zur Partikeloberfläche ausbilden. Die Polymerschicht muss die Partikel dicht und vollständig umgeben, um die Partikelannäherung zu verhindern. Gleichzeitig sollten die Polymere vom Lösungsmittel gut solvatisiert werden. Nähern sich zwei polymerbeschichtete Partikel an, so sind zwei Vorgänge denkbar.^{99, 100} Nach der Theorie der Volumeneinengung können sich die Polymerschichten nicht durchdringen und es erfolgt eine Kompression der Polymerschicht. Damit ist eine Abnahme der Entropie der Makromoleküle verbunden, da sie im komprimierten Zustand weniger Konformationen einnehmen können, als im entspannten Zustand.⁹⁹ Dies wird als sterische Hinderung oder sterische Stabilisierung beschrieben. Im Gegensatz dazu, können sich nach der Theorie des Volumenausschlusses die Polymere durchdringen. Diese Annäherung bewirkt ebenfalls eine Entropieabnahme und zudem eine lokale Konzentrationserhöhung der Polymere sowie eine Verdrängung der Lösungsmittelmoleküle aus der Kontaktzone. Dies hat eine Änderung der Enthalpie zur Folge, da bei diesem Vorgang die Polymere anstelle der Lösungsmittelmoleküle von anderen Polymeren umgeben werden. Hierbei kann die Polymerbeschichtung sowohl einen gesamt stabilisierenden als auch destabilisierenden Einfluss ausüben.⁹⁵ Diese Theorie erklärt zudem den proteinresistenten Charakter mancher Polymerschichten.¹⁰⁰⁻¹⁰² Werden Gold Nanopartikel in wässriger Lösung mit einer Polyethylenglykolschicht (PEG) funktionalisiert, so ergibt sich für eine Proteinannäherung eine Verdrängung der Wassermoleküle aus der PEG-Schicht und eine Kompression der Schicht selbst. Damit sind Entropieabnahme und Enthalpiezunahme verbunden und somit eine Zunahme der freien Enthalpie. Daher werden Proteine nicht adsorbiert sondern abgestoßen.¹⁰⁰⁻¹⁰² Wie dargestellt, beeinflusst eine Vielzahl von komplexen Wechselwirkungen die Stabilität einer Suspension. Die unterschiedlichen Vorgehensweisen zur Stabilisierung von Gold Nanopartikeln werden im Weiteren erläutert.

2.1.5 Stabilisierung der Nanopartikel Suspension

Um eine hinreichende Stabilisierung der kolloidalen Suspension zu gewährleisten, aber auch die Einführung bioaktiver Spezies zu ermöglichen, müssen effiziente Systeme entworfen werden, die diese Voraussetzungen vereinen. Eine Vielzahl von Methoden zur Stabilisierung und Funktionalisierung von Nanopartikeln sind bekannt. Bei allen Vorgehensweisen können die Liganden über verschiedene Mechanismen, darunter physikalische Adsorption oder kovalente Kopplung an die Oberfläche gebunden werden.¹⁴ Einige Beispiele der Wechselwirkungen werden im Weiteren anhand der Bindung von Polymeren dargestellt, gefolgt von einer näheren Betrachtung PEG-basierter Polymere sowie niedermolekularer Liganden.

Anbindung der Liganden

Polymere können über verschiedene Mechanismen an Nanopartikel gebunden werden. Im Folgenden werden die wichtigsten Wechselwirkungen einzeln vorgestellt.

Bereits während der Synthese von Nanopartikeln werden verschiedene Liganden zur Stabilisierung der kolloidalen Suspension bereit gestellt. Diese werden beispielsweise durch physikalische Adsorption aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen angebonden. In der von Turkevich etablierten Natriumzitat-Synthese zur Herstellung von Nanopartikeln dienen die Zitratanionen nicht nur als Reduktionsmittel, sondern gleichfalls als schwach stabilisierende Liganden, indem die Anionen mit der positiv geladenen Oberfläche der Nanopartikel wechselwirken.⁸⁴ Neben Natriumzitat können ebenfalls Polyelektrolyte zur Synthese von Nanopartikeln eingesetzt werden. So werden Polykationen, wie Poly(diallyl-dimethylammoniumchlorid) (PDDA) mit Gold(III)-chlorid erhitzt, um elektrostatisch stabilisierte Gold Nanopartikel darzustellen. In der Reaktion bindet Goldchlorid an die Polykationen, wodurch nach Erhitzen und Reduktion stabile Partikel entstehen.¹⁰³ Ebenfalls ohne die Zugabe weiterer Reduktionsmittel werden Gold Nanopartikel nach einem ähnlichen Mechanismus in einer einstufigen Reaktion durch Zugabe von Polyaminen dargestellt.¹⁰⁴

Neben der physikalischen Adsorption der Liganden, können diese ebenfalls durch kovalente Koordination an die Oberfläche gebunden werden. Funktionelle Gruppen wie Thiole, Amine oder Phosphane werden hierzu eingesetzt.²³ Die Bindung der weichen Lewis Säure Gold mit der weichen Lewis Base des Thiols ist besonders stark und wird in der Literatur häufig zur Stabilisierung und Funktionalisierung genutzt.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Die genaue Art der Bindung wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Aktuelle röntgenkristallographische Untersuchungen von Au₁₁₂ und Au₂₅ Clustern zeigen keine direkte Koordination der Liganden an ein Goldatom, sondern eine überbrückende Koordination des Thiols an mehrere Gold Atome.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Weiterhin binden einige Goldatome der Oberfläche zwei Thiole und werden nicht mehr als Teil des Kerns angesehen, sondern bilden mit den Liganden eine Zwischenschicht.¹¹² Neben Untersuchungen der Art der Gold-Thiol Bindung wurden ebenfalls umfassende Studien zur Struktur der gebildeten Monolagen der Liganden durchgeführt (s.u.).

Verschiedene Thiol-derivatisierte Liganden werden zur Stabilisierung kolloidaler Suspensionen eingesetzt. Diese können vorher synthetisiert und anschließend mit den Nanopartikeln umgesetzt werden. Dazu eignen sich neben thiolierten Dendrimeren^{113, 114} auch Diblock-Copolymere,¹¹⁵ die aufgrund immer weiter fortgeschrittenen Synthesestrategien zugänglich

werden. Neben der Vorgehensweise, Polymere nach erfolgter Synthese an die Partikel zu binden (*engl.* grafted to) können auch Ankergruppen auf der Oberfläche angebunden werden, die im Folgenden auf der Oberfläche polymerisiert werden (*engl.* grafted from).¹¹⁶ Ein Vorteil dieser Methode im Gegensatz zur direkten Anbindung des Polymers ist die Ausbildung einer dichten Monolage der Polymere auf der Oberfläche. Die niedermolekularen Initiatoren, die als Ankergruppen fungieren, behindern sich sterisch nicht in gleichem Maß, wie langkettige Polymere.¹¹⁶ Jedoch ist die Charakterisierung der Polymere nach der Synthese auf der Oberfläche der Nanopartikel erschwert, weshalb die Methode der vorherigen Synthese und anschließender Anbindung häufiger genutzt wird.¹¹⁷

Zusätzlich zur Koordination der Thiolgruppen an die Goldoberfläche können weitere Wechselwirkungen der Liganden zur Stabilisierung einer kolloidalen Suspension beitragen. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen einzelnen Liganden werden beispielsweise ausgenutzt, um Nanopartikel von organischen Lösungsmitteln in wässrige Systeme zu überführen (Abbildung 8 a, Abbildung 9 c). Für diesen Phasentransfer werden Alkylthiol-stabilisierte Nanopartikel mit amphiphilen Polymeren versetzt. Der hydrophobe Teil des Polymers, bestehend aus Alkylketten interkaliert mit den Primärliganden des Partikels, während die hydrophilen Reste aus Maleinsäureanhydrid in die Lösung zeigen.^{118, 119} In einem weiteren Schritt wird ein Linker bestehend aus Bis(6-aminohexyl)amin zugegeben, welcher mit den Anhydriden in einer Additions-Eliminierungsreaktion eine Amidbindung ausbildet. Dadurch wird das Polymer an der Peripherie der Nanopartikel fixiert. Gleichzeitig werden durch die Bildung des Carboxylates negative Ladungen eingeführt, welche im wässrigen Medium elektrostatisch stabilisieren. Auf diese Weise können Nanopartikel, die in organischer Phase synthetisiert wurden, in ein wässriges System überführt werden. Die hydrophoben Wechselwirkungen können auch direkt in Thiol-derivatisierten Polymeren genutzt werden. Hierzu werden amphiphile Polymere über die Affinität des Thiols an Gold Nanopartikel gebunden. Gleichzeitig bilden hydrophobe Reste van-der-Waals Wechselwirkungen aus. Diese Difunktionalität der Liganden erhöht die Stabilität der Nanopartikel maßgeblich. Werden Gold Nanopartikel beispielsweise mit thiolierten Tween-Derivaten (Polyethylenglykol Sorbitanfettsäureester) funktionalisiert

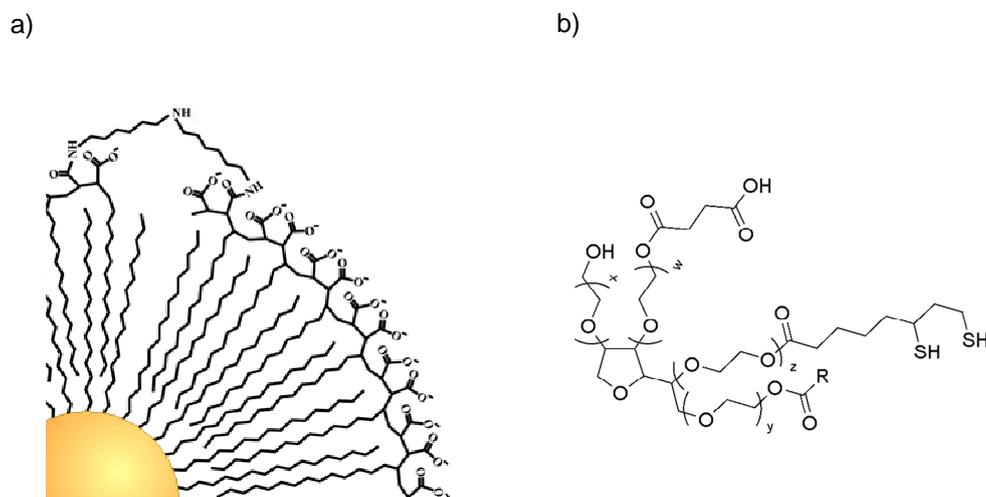


Abbildung 8: Beispiele zur Derivatisierung und Stabilisierung der Gold Nanopartikel über hydrophobe Wechselwirkungen. a) Einführung amphiphiler Polymere zum Phasentransfer.¹¹⁸ b) Tween-Derivat als Chelatligand zur Stabilisierung der Nanopartikel, $w + x + y + z = 20$, $R = C_{11}H_{23}$.¹²⁰

(Abbildung 8 b), bilden deren hydrophobe Reste van-der-Waals Wechselwirkungen aus, die die Stabilität der Partikel zusätzlich erhöhen. Diese Nanopartikel sind über einen breiten pH-Bereich (pH 1-14) und bei hohen Ionenkonzentrationen (bis zu 5 M NaCl) stabil.¹²⁰

PEG passivierte Nanopartikel

Für biologische und medizinische Anwendungen werden bevorzugt langkettige Polyethylenglykol (PEG)-Derivate zur Bildung einer Monolage eingesetzt, da sie die Wasserlöslichkeit und Stabilität der Nanopartikel aufgrund sterischer Effekte steigern.¹²¹⁻¹²⁴ Des Weiteren verbessern PEG-Derivate die Biokompatibilität und vermindern zugleich eine unspezifische Adsorption von Proteinen (s. Kapitel 2.1.4).^{101, 102, 125, 126} So zeigen PEG-modifizierte Moleküle eine erhöhte Wasserlöslichkeit, reduzierte immunogene Aktivität in Organismen, sowie eine erhöhte Lebensdauer in der Blutbahn. Dieser proteinresistente Charakter kann nicht nur bei Nanopartikeln, sondern ebenfalls bei Wirkstoffen oder PEGylierten Proteinen beobachtet werden.¹²⁷⁻¹³¹

PEG ist als hydrophiles Polymer sowohl in organischen, als auch in wässrigen Medien löslich und erlaubt daher eine einfache Derivatisierung der Endgruppe sowie die Kopplung biologischer Moleküle unter milden Bedingungen. In wässriger Lösung binden zwei bis drei Wassermoleküle pro Ethylenglykoleinheit an PEG.¹²⁷ Aufgrund dieses hohen Grades an Solvatisierung und des flexiblen Rückgrads erscheint PEG in Lösung um ein Vielfaches größer, als Proteine derselben Molmasse. Aufgrund des proteinresistenten Charakters von PEG, werden PEG-funktionalisierte Gold Nanopartikel beispielsweise als Kontrastmittel für die Computertomographie (CT) getestet. In diesem Fall werden thiolierte PEG-Derivate zur Funktionalisierung der Nanopartikel eingesetzt. Der Röntgenabsorptionskoeffizient der Partikel ist wesentlich höher als der eines gängigen Kontrastmittels. Durch die PEGylierung wird zudem eine erhöhte Lebensdauer der Partikel in der Blutbahn im Vergleich zu Ultravist beobachtet.¹³² Neben solchen monofunktionalisierten PEG-Derivaten wird zudem eine Vielzahl heterobifunktionaler PEG-Derivate zur Passivierung von Nanopartikeln eingesetzt. Sie können verschiedene reaktive Gruppen tragen, wie Amine oder Carbonsäuren¹³³ oder auch stark elektronenziehende Substituenten wie 2,2,2-Trifluoroethyl Ester¹³⁴. Weiterhin werden thiolierte PEG-Derivate mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Coumarinderivaten funktionalisiert, um sie anschließend an Gold Nanopartikel zu immobilisieren.^{135, 136} Die einfache Substituierung der PEG-Liganden zusammen mit den proteinresistenten Eigenschaften eröffnet eine Vielzahl an Anwendungen auf dem Gebiet der Nanotechnologie.

Niedermolekulare Liganden

Neben langkettigen Polymeren werden ebenfalls niedermolekulare thiolierte Liganden zur Stabilisierung der kolloidalen Suspension eingesetzt. Diese bilden Monolagen auf der Oberfläche der Nanopartikel aus. Weitreichende Untersuchungen der spontanen Bildung von Monolagen auf zweidimensionalen Metalloberflächen werden in der Literatur beschrieben.^{106, 137} Eine bedeutende Substanzklasse für die Entstehung dieser selbstassemblierten Monolagen (*engl.* self assembled monolayers, SAMs) sind Organothiole, die an homogene Goldsubstrate unter Ausbildung einer kristallinen oder semikristallinen Phase binden. Das Organothiol besteht aus drei wesentlichen Einheiten: Der als Ankergruppe eingesetzten Thiolfunktion, einer Verbindungseinheit und einer funktionellen Endgruppe. Die Verbindungseinheit besteht aus

Alkylketten, die über intermolekulare Wechselwirkungen eine langweitrreichende Ordnung der Dünnschicht ausbilden. Die Grenzflächeneigenschaften der SAMs werden vorrangig von der funktionellen Endgruppe bestimmt. SAMs aus Alkylthiolen mit einer terminalen Methylgruppe sind beispielsweise hydrophob, während SAMs mit terminalen Hydroxylgruppen hydrophile Oberflächen ausbilden.¹⁰⁶

Die Bildung von SAMs auf zweidimensionalen Substraten kann auf die Gold Nanopartikel übertragen werden.¹³⁸ In einer Zweiphasenreaktion können kleine Gold Nanopartikel (zwischen 1,5 und 5 nm Durchmesser) mittels der Brust-Shiffrin Methode synthetisiert werden.¹³⁹ Robuste niedermolekulare Thiole, wie beispielsweise Dodekanthiol, die in reduktiven Reaktionsbedingungen stabil sind, werden hier bereits während der Synthese der Nanopartikel zugegeben. Gold(III)-chlorid wird mit Tetraäthylammoniumbromid als Phasentransferkatalysator in die Toluolphase überführt und durch Zugabe von Natriumborhydrid reduziert. Die Farbe der organischen Phase wechselt als Folge der Zugabe des starken Reduktionsmittels von orange nach tief braun und zeigt damit die Bildung der Nanopartikel an. Die Analyse mittels TEM-Aufnahmen zeigt, dass die dargestellten Partikel einen Durchmesser zwischen 1-3 nm besitzen. Durch Variation des Verhältnisses von Thiol zu Gold(III)-chlorid kann die Größe der Nanopartikel gesteuert werden. Die rasche Zugabe des Reduktionsmittels und gekühlte Lösungen ergeben kleinere und monodisperse Partikel.²³ Die Monodispersität der Partikel kann zusätzlich durch einen anschließenden Reifungsprozess (*engl.* digestive ripening) erhöht werden. Dazu werden die Partikel in Anwesenheit der Alkylthiole zum Sieden erhitzt. Die resultierenden Partikel besitzen neben der geringeren Größenverteilung einen geringeren durchschnittlichen Durchmesser.¹⁴⁰ Wird statt Dodekanthiol *p*-Merkaptophenol als grenzflächenaktiver Zusatz eingesetzt, können Nanopartikel in einer Einphasenreaktion dargestellt werden.¹⁴¹ Alternativ werden wasserlösliche Thiole als Liganden eingesetzt, die besonders für die biologische Anwendung von Interesse sind. Hierzu eignen sich beispielsweise Glutathion, Tiopronin oder Coenzym A.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Diese Brust Shiffrin Methode oder verwandte Reaktionen revolutionierten die Synthese kleiner Nanopartikel.

Zusammenfassung der Funktionalisierungsreaktionen der Nanopartikel

Die Funktionalisierung der Nanopartikel nach der Synthese kann im Fall der mit Zitrat hergestellten Partikel erfolgen, indem Thiol-derivatisierte Liganden zu den Partikeln gegeben werden. Diese Liganden besitzen eine höhere Affinität zu Gold und verdrängen die schwach an die Oberfläche gebundenen Zitrationen (Abbildung 9).¹⁴⁶ Auch die nach der Brust-Shiffrin Methode synthetisierten Partikel, die häufig als Monolagen geschützte Goldcluster (*engl.* monolayer-protected gold clusters, MPCs) bezeichnet werden, können in einer einfachen Reaktion derivatisiert werden. Dies erfolgt durch einen Ligandenaustausch, wie er von Murray *et al.* erstmals beschrieben wurde (Abbildung 9 a).^{143, 147} Nach einem assoziativen Mechanismus werden die zugegebenen Thiole in die vorhandene Monolage integriert, während sich simultan gebundene Thiole von der Oberfläche lösen.¹⁴⁷ Durch die inhomogene Form der Partikel wird die Austauschreaktion an weniger dicht gepackten Stellen der Oberfläche initiiert, wie beispielsweise Kristallecken. Anschließend diffundieren die eingeführten Liganden auf der Oberfläche, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat.¹⁴⁸ Die Bindung des Thiols an Gold ist generell ein dynamischer und reversibler Prozess.

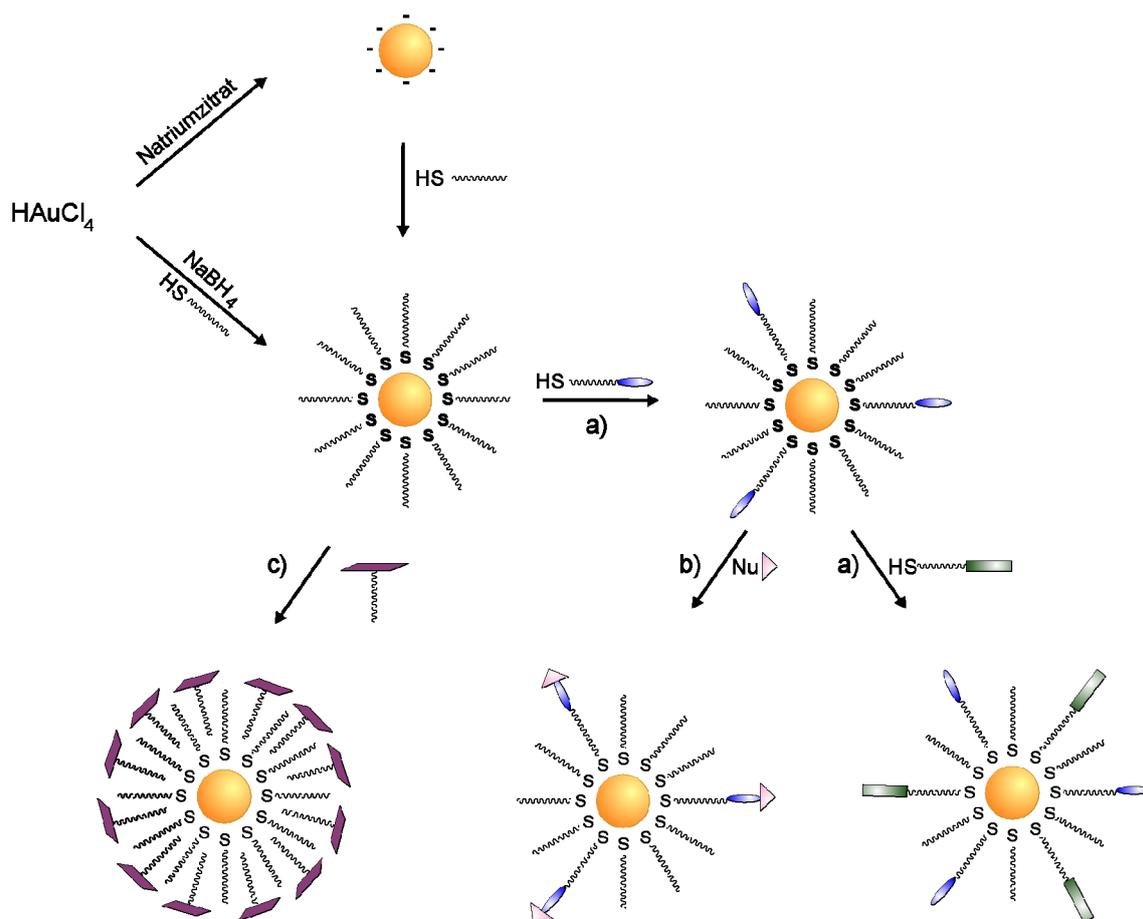


Abbildung 9: Überblick über verschiedene Funktionalisierungsstrategien der Gold Nanopartikel. Die über Natriumzitat hergestellten Nanopartikel können durch Inkubation mit Thiolen derivatisiert werden. Nanopartikel aus der Brust Shiffrin Synthese sind bereits mit einer Thiol-Monolage stabilisiert. a) In einer Ligandenaustauschreaktion nach Murray *et al.* werden thiolierte Liganden in die Monolage integriert. b) Exemplarisch können in einer nukleophilen Substitution die eingeführten funktionellen Gruppen der Monolage derivatisiert werden. c) Über hydrophobe Wechselwirkungen der Monolage mit entsprechend hydrophoben Molekülen können ebenfalls funktionelle Gruppen eingeführt werden.¹⁵⁰

Wird eine Gold Oberfläche mit Thiolen inkubiert, bildet sich zunächst eine Monolage geringer Dichte aus, die sich nach längerer Inkubationszeit von Tagen in eine maximal dichte Monolage umlagert.¹⁴⁹ Rotello *et al.* zeigten, dass Thiolderivate auf der Oberfläche keine starren Systeme ausbilden, sondern eine gewisse Mobilität besitzen. Die Liganden lagern sich um, wenn sie mit einem Zielmolekül in Wechselwirkung treten.¹⁵⁰ Gold Nanopartikel werden hierzu mit Pyren, Diaminopyridin und Alkylthiolen dekoriert und anschließend mit Flavin versetzt. Durch Wasserstoff-Brückenbindungen bildet sich ein supramolekularer Komplex, der die Umlagerung der Liganden auf der Partikeloberfläche induziert. Mittels ¹H-NMR kann diese Umlagerung beobachtet werden.¹⁵¹ Die häufig eingesetzte Methode des Ligandenaustausches nach Murray *et al.* bietet die Möglichkeit, multifunktionale Nanopartikel herzustellen. In einer mehrstufigen Ligandenaustauschreaktion können die verschiedenen Liganden in die Monolage integriert werden. Werden Thiole mit reaktiven Kopfgruppen im Ligandenaustausch eingesetzt, können diese mit einer nachfolgenden Reaktion an der Peripherie der Passivierungsschicht derivatisiert werden, wie in Abbildung 9 b am Beispiel der nukleophilen Substitution dargestellt. Zur Vollständigkeit ist in Abbildung 9 c weiterhin die Anbindung über hydrophobe Wechselwirkungen dargestellt, die in „Anbindung der Liganden“ beschrieben wurde.

Stabilität der Monolage in Abhängigkeit der Zeit

Organothiol funktionalisierte Nanopartikel zeichnen sich durch eine hohe Stabilität der Monolage aus. Werden diese Proben jedoch für längere Zeit an Luft gelagert, nimmt die Stabilität der Monolage ab. Der Alterungsprozess der Monolage kann auf die Desorption der Thiol-Liganden aufgrund einer Oxidation der Thiole zurück geführt werden.^{147, 152, 153}

Diese Desorption der Liganden kann durch radioaktiv markierte Thiole beobachtet werden.¹⁵⁴ Vermutlich werden die Thiolgruppen im Alterungsprozeß zu Sulfonaten oxidiert und so von der Goldoberfläche gelöst.¹⁵⁵ Die entstandenen Sulfonate besitzen nicht die gleiche Affinität zu Gold wie Thiole und können durch Aufreinigung von der Oberfläche entfernt werden. Dieses Phänomen wird ebenfalls für SAMs auf zweidimensionalen Goldoberflächen beobachtet.¹⁰⁶ Jedoch ist der Mechanismus der Alterung nicht vollständig erfasst. Die oxidative Spezies ist jedoch vermutlich Ozon, welches durch UV-Photolyse von Sauerstoff gebildet wird.^{156, 157} Ob Ozon selbst oder Sauerstoffatome im Singulett-Zustand, die durch Zersetzung des Ozons auf der Metalloberfläche gebildet werden, ist nicht bekannt.

Dieser Alterungsprozess muss bei der Präparation biofunktionalisierter Nanopartikel berücksichtigt werden, in der die spezifische Wechselwirkung der Konjugate mit einem Zielmolekül untersucht werden sollen.

2.1.6 Biofunktionalisierung der Nanopartikel

Drei generelle Vorgehensweisen bei der Funktionalisierung der Nanopartikel mit Biomolekülen können unterschieden werden (Abbildung 10): Bei der Ersten wird ausschließlich die bioaktive Spezies an die Nanopartikel angebunden (Abbildung 10 links). Diese dient neben der Funktionalisierung auch der Stabilisierung der Partikel. Des Weiteren ist die Einführung einer Monolage möglich, die die Stabilisierung der Partikel gewährleistet. Das Biomolekül wird in diese integriert und direkt an die Partikeloberfläche gebunden (Abbildung 10 Mitte). Im dritten Fall wird wieder zunächst eine stabilisierende Monolage auf der Oberfläche der Partikel ausgebildet. Die biofunktionale Spezies wird hier jedoch an die Peripherie der Monolage gebunden (Abbildung 10 Rechts). Im Folgenden werden einige Beispiele für die drei verschiedenen Methoden der Anbindung vorgestellt.

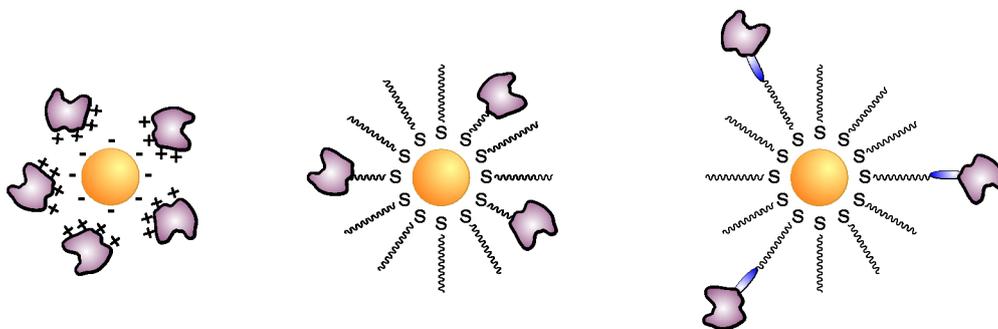


Abbildung 10: Beispiele der verschiedenen Methoden der Biofunktionalisierung. Links: direkte, elektrostatische Anbindung des Biomoleküls; Mitte: Anbindung des Biomoleküls über Integration in die Passivierungsschicht; Rechts: Anbindung des Biomoleküls an die Peripherie der Passivierungsschicht.

Direkte Anbindung des Biomoleküls

Eine Adsorption der Liganden wird häufig angewendet, um Proteine und Antikörper direkt an die Oberfläche der Nanopartikel zu binden. Die hieraus resultierenden Konjugate finden beispielsweise im Immunogold-Verfahren Anwendung.^{158, 159} Sind die Nanopartikel z.B. nach der Synthese mit einer anionischen Zitratschicht stabilisiert, so werden positiv geladene Proteine u. a. durch elektrostatische Wechselwirkung gebunden. Zitratstabilisierte Gold und Silber Nanopartikel können auf diese Weise pH-abhängig beispielsweise mit Immunglobulin G (IgG) funktionalisiert werden. Die positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten des Proteins gehen eine attraktive Wechselwirkung mit den negativ geladenen Carboxylationen des Partikels ein.¹⁵⁹ Neben der elektrostatischen Adsorption von Proteinen kommen auch weitere Wechselwirkungen wie beispielsweise eine kovalente Anbindung funktioneller Gruppen des Proteins wie Amine oder Thiole für eine Immobilisierung in Betracht. Die Art der Wechselwirkung kann bei der direkten Bindung von Protein und Nanopartikel nicht gesteuert werden.

Diese direkte Bindung von Proteinen an Nanopartikel besticht durch ihre Einfachheit, sie weist jedoch auch einige Nachteile auf.^{160, 161} Einerseits ist die resultierende Stabilisierung der Partikel relativ gering und zudem pH-Wert abhängig. Andererseits kann die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche der Nanopartikel nicht gesteuert werden. Erfolgt darüber hinaus die Anbindung über Thiol Gruppen, die für den Erhalt der Aktivität und der Tertiärstruktur des Proteins von großer Bedeutung sind, kann durch die Bindung dieser strukturerhaltenden funktionellen Gruppen an die Oberfläche der Nanopartikel die Aktivität herabgesetzt werden, oder die dreidimensionale Struktur des Proteins wird durch Denaturierung gänzlich zerstört.^{98, 162}

Eine Ausnahme bildet das Enzym Pepsin, welches wie die Zitrat-stabilisierten Nanopartikel eine geringe negative Ladung aufweist. Wird dieses an Gold Nanopartikel immobilisiert, binden vermutlich die im Enzym enthaltenen Thiol- und Aminogruppen an die Gold Oberfläche. Trotz der Bindung bleibt die Aktivität des Enzyms erhalten und das Enzym zeigt im Vergleich zum nicht immobilisierten Enzym zudem eine erhöhte Stabilität.¹⁶³

Neben der direkten Anbindung von Proteinen, eignen sich Thiol-terminierte Oligonukleotide aufgrund ihrer negativen Ladung zur Stabilisierung von Nanopartikel Suspensionen. Die resultierenden DNA-funktionalisierten Partikel sind in hohen Salzkonzentrationen (bis 2 M NaCl) stabil und können bis zu einem gewissen Grad dem Angriff reaktiver Moleküle wie Dithiothreitol, einem ungeladenen Dithiol, welches zum Schutz von Proteinen vor Oxidation verwendet wird, widerstehen.¹⁶⁴ Diese Oligonukleotid-funktionalisierten Nanopartikel werden beispielsweise als sensoraktive Substanzen eingesetzt (s. Kapitel 2.1.2), in denen die Erkennungsmechanismen der DNA mit den optischen Eigenschaften der Nanopartikel kombiniert werden.¹⁶

Biofunktionalisierung stabiler Partikel

Nach der oben beschriebenen Ligandenaustauschreaktion nach Murray *et al.* können bioaktive Moleküle direkt an die Oberfläche der stabilisierten Nanopartikel gebunden werden. Franzen und Feldheim *et al.* beispielsweise immobilisierten auf diese Weise ein Peptid (RME), welches die Rezeptor-vermittelte Endozytose induziert. Dieses Peptid wurde in verschiedenen langkettigen PEG-Monolagen integriert, um den Einfluss der Kettenlänge auf die Aufnahme der

biofunktionalisierten Nanopartikel in HeLa Zellen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kettenlänge der PEG-Derivate die Anzahl aufgenommener Partikel nicht beeinflusst.⁵⁷

Des Weiteren wurde kürzlich die Herstellung von Nanopartikeln beschrieben, die neben einer Funktionalisierung mit „antisense“ Oligonukleotiden zusätzlich mit synthetischen Peptiden derivatisiert werden konnten. In einer einstufigen Synthese wurden beide thiolierten Verbindungen an die Nanopartikel gebunden, wobei durch die Stöchiometrie der Reaktionslösung die Zusammensetzung der gemischten Monolage der Oberfläche beeinflusst werden konnte. Diese multifunktionalen Oligonukleotid-Peptid-Nanopartikel zeigten im Zellmodell eine erhöhte perinukleäre Lokalisation sowie eine erhöhte Genregulationsaktivität.⁵²

Die Nanopartikel werden hier über die negativen Ladungen der funktionellen Oligonukleotide stabilisiert, die zudem die Aktivität der Genregulation beeinflussen.

In einer alternativen Vorgehensweise wird die Einführung einer ausschließlich stabilisierenden Komponente bewerkstelligt, in der die Funktion von dem stabilisierenden Beitrag getrennt wird. Mittels kombinatorischer Chemie wurde in diesem Zusammenhang ein Stabilisierungssystem entwickelt, welches die Nanopartikel hinreichend stabilisiert und gleichzeitig die weitere Funktionalisierung erlaubt. Dieses System basiert auf dem Vorbild der Proteine, welche in wässrigen Lösungen dispergiert vorliegen. Eine Vielzahl an synthetischen Peptiden, in denen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht wurden, wurde auf ihre Effizienz getestet, Nanopartikel zu stabilisieren. Levy *et al.* entwarfen auf diese Weise ein Pentapeptid (CALNN), welches eine dichte Monolage um das Partikel bildet und durch hydrophobe Wechselwirkungen Wassermoleküle ausschließt.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Die Peripherie des Peptids besteht aus hydrophilen Resten, die eine Wasserlöslichkeit der Konjugate gewährleistet. Durch eine Mischung aus CALNN und funktionalisierten, beispielsweise biotinylierten CALNN-Derivaten, können Ankergruppen zur weiteren Modifizierung eingeführt werden. Auch Peptide, die eine CALNN-Sequenz tragen, können so direkt an die Nanopartikel gebunden werden.^{161, 166, 168}

Funktionalisierung an die Peripherie der Monolage

Die Funktionalisierung von Nanopartikeln durch Immobilisierung des gewünschten Moleküls an die Peripherie der Passivierungsmonolage trennt Stabilisierung und Funktionalisierungsreaktion voneinander. Beide Reaktionen können nun einzeln kontrolliert und optimiert werden. Durch die spezifische chemische Bindung des bioaktiven Moleküls an die Peripherie der Passivierungsschicht ist das Molekül regioselektiv gebunden und zugleich frei zugänglich. Dadurch kann die spezifische Wechselwirkung der biologischen Spezies mit dem gewünschten Rezeptor gewährleistet werden. Kleine Nanopartikel wurden beispielsweise mit einer stabilisierenden Monolage aus Thiolderivaten funktionalisiert und anschließend durch Alkylierung¹⁶⁹ oder Acylierung^{134, 170-172} weiter modifiziert.

Die Anbindung von Proteinen kann zudem für die Einführung bioaktiver Peptide genutzt werden, indem sie als Linker fungieren. Franzen und Feldheim *et al.* konjugierten bioaktive Peptide wie NLS (*engl.* nuclear localisation sequence), die den Eintritt in den Zellkern vermitteln, an freie Amine der Lysin Gruppen in BSA. Nach Aufreinigung werden die so hergestellten Konjugate an Gold Nanopartikel gebunden. Durch Variation der BSA Konzentration während der Partikelfunktionalisierung kann die Anzahl an immobilisierten Peptiden gesteuert werden und damit gleichzeitig die Aufnahme der Nanopartikel in den Zellkern.^{53, 60, 173, 174}

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel, funktionalisiert mit ω -Amino PEG-Derivaten, über einen heterobifunktionalen Linker mit siRNA (*engl.* small interfering RNA) derivatisiert werden können. Der Linker SPDP (*N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat) besteht aus einer NHS-Gruppe, die mit den Aminogruppen der Passivierungsschicht reagiert, und einer Disulfid-Gruppe, über welche die thiolierte siRNA in einer Disulfidaustauschreaktion an die Nanopartikel gebunden wird. Anschließend werden die funktionalisierten Nanopartikel mit verschiedenen endfunktionalisierten Poly(β -aminoestern) beschichtet, die den intrazellulären DNA Transport vermitteln. Diese Konjugate sind vielversprechende Konstrukte, um als Transportsysteme eingesetzt zu werden (s. Kapitel 2.1.2).⁶⁸ Bei dieser Anwendung muss die Anzahl bioaktiver Moleküle maximiert werden. Für eine gute Kontrolle über die Anbindung der bioaktiven Spezies an der Peripherie der Passivierungsschicht eignen sich im Besonderen gemischte Monolagen.¹⁷⁵⁻¹⁷⁹ Diese bestehen aus Molekülen mit identischem, der Stabilisierung dienenden Grundgerüst, die sich in der funktionellen, freien Kopfgruppe unterscheiden. Eine Komponente der Monolage trägt eine unreaktive Gruppe, wie beispielsweise Carboxylationen, und dient ausschließlich der Stabilisierung der Partikel. Die anderen Moleküle der Monolage besitzen reaktive Ankergruppen als Kopfgruppen, die zur Biofunktionalisierung eingesetzt werden können.¹⁸⁰ Durch Variation der Konzentration dieser Ankergruppen kann die Anzahl der bioaktiven Spezies pro Partikel indirekt beeinflusst werden. In diesem Fall bestimmt nicht mehr die Oberfläche des Partikels selbst die Reaktivität, sondern die Kopfgruppen der Passivierungsschicht, welche auf der Oberfläche gebunden sind. Daher steht eine Vielzahl an Kopplungsreaktionen zur Verfügung: Bekannte Biokonjugationstechniken¹⁸¹, sowie etablierte Methoden der „Click Chemie“^{182, 183} können nun zur Kopplung eingesetzt werden. Kleine Nanopartikel, die nach der Brust-Shiffrin Methode hergestellt wurden, konnten beispielsweise mit einer gemischten Monolage aus thioliertem Triethylenglykol und Tiopronin funktionalisiert werden. Die Zusammensetzung der Monolage wurde mittels ¹H-NMR analysiert. Triethylenglykol diente hierbei der Stabilisierung der Partikel, während Tiopronin nach Biotinylierung als reaktive Ankergruppe zur Immobilisierung von Streptavidin eingesetzt werden konnte.¹⁸⁰

2.1.7 Methoden zur Charakterisierung der Konjugate

Zwei wesentliche Merkmale, die die Eigenschaften von Gold Nanopartikeln bestimmen, sind ihre Größe und ihre Oberflächenfunktionalisierung. Im Folgenden sollen einige Beispiele zur Bestimmung und Charakterisierung beider Merkmale vorgestellt werden.

Methoden zur Größenbestimmung der Kolloide

Gold Nanopartikel können aufgrund ihrer geringen Ausdehnung mit optischen Standard Mikroskopie-Techniken nicht aufgelöst werden. Die Größe und Morphologie von Nanopartikeln bis hin zu atomarer Auflösung kann jedoch mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht werden.¹⁸⁴ Größere Partikel ab einem Durchmesser von 10 nm werden ebenfalls im Rasterelektronenmikroskop (REM) charakterisiert. Weiterhin kann die Größe der Nanopartikel mit UV/Vis-Spektroskopie abgeschätzt werden.¹⁸⁵

Soll die Größe von passivierten Gold Nanopartikeln untersucht werden, kann der Durchmesser des Goldkerns im TEM ermittelt werden. Allerdings gestaltet sich die Charakterisierung der Passivierungsschicht als problematisch.¹⁸⁶ Organische Moleküle besitzen eine zu geringe elektronische Dichte, so dass diese im Elektronenmikroskop selbst nicht oder nur schwer dargestellt werden können. Biologische Proben werden daher zunächst mit Schwermetallen wie Osmium markiert.^{187, 188} Zudem kann die Dicke der Polymerschicht durch Trocknung der Probe und die anschließende Messung im Hochvakuum verändert werden.¹⁸⁶

Zusätzlich werden Methoden wie die Dynamische Lichtstreuung (DLS) eingesetzt, um den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel, Aggregationseffekte und den Grad an Polydispersität in Lösung zu bestimmen.^{158, 179, 189-191} Der hydrodynamische Radius ermöglicht eine Aussage über das Volumen des gesamten Nanopartikels, also des Metallkerns zusammen mit der Polymerschicht.

Die dynamische Lichtstreuung wertet das an suspendierten Nanopartikeln gestreute Licht eines Lasers aus. Trifft kohärentes, monochromatisches Licht auf kleine Partikel, wird Licht in alle Richtungen gestreut (Rayleigh-Streuung). Das Streulicht, welches von verschiedenen Streuzentren induziert wird, interferiert. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung ändern sich die Abstände der Streuzentren zueinander ständig. Dies führt zu kleinen Fluktuationen in der Streuintensität, die - zeitlich analysiert - Informationen über die Bewegungsgeschwindigkeit der Teilchen liefern. Durch die unterschiedlich schnellen Bewegungen von großen und kleinen Makromolekülen oder Nanopartikeln entsteht eine definierte Korrelationsfunktion, aus der über einen mathematischen Fit der Diffusionskoeffizient D der Nanopartikel bestimmt werden kann. Aus diesem wiederum kann der hydrodynamische Radius R_h der gelösten Probe über die Stokes-Einstein Beziehung ermittelt werden (s. Gleichung 5).¹⁹²

Andere Techniken zur Bestimmung der Polymerschichtdicke von Nanopartikeln, die auch zur Aufreinigung der Partikel eingesetzt werden können, basieren beispielsweise auf analytischer Ultrazentrifugation, oder Größenausschluss-Chromatographie z. B. in Kombination mit ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma).^{193, 194} In der Größenausschluss-Chromatographie können allerdings nur Nanopartikel analysiert werden, die kleiner als 20 nm sind. Lichtstreuung besitzt hier den Vorteil, dass auch größere Nanopartikel vermessen werden können. Eine Kombination verschiedener Techniken erlaubt schließlich eine genaue Größenbestimmung von Nanopartikeln.

Methoden zur Charakterisierung der Stabilität der Suspension sowie der Oberflächenfunktionalisierung

Die genaue Charakterisierung der Zusammensetzung der Monolage eines Partikels ist für das Verständnis der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit ihrer Umgebung auf molekularer Ebene von großer Bedeutung. Hier sind sowohl die stabilisierenden als auch die reaktiven Moleküle auf der Partikeloberfläche von Interesse. Durch die Bindung mehrerer aktiver Moleküle an ein Nanopartikel ist eine kooperative Wirkung der Liganden möglich. Um diese zu untersuchen, muss die Stabilität der Liganden sowie die Zusammensetzung der Monolage auf der Oberfläche charakterisiert werden.

Verschiedene Methoden zur Charakterisierung der Stabilität von Suspensionen werden eingesetzt. UV/Vis-Spektroskopie wird hierzu häufig genutzt, bei welcher die Veränderung der Plasmonresonanz der Nanopartikel bei zunehmendem Salzgehalt gemessen wird (s. Kapitel

2.1.4).¹⁶⁵ In einer weiteren Methode wird die Zugabe von Cyanid eingesetzt, um die Stabilität der passivierten Nanopartikel zu bestimmen. Abhängig von der Struktur der Liganden bzw. im Besonderen der gebildeten Monolage gelangt das Cyanidion mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zum Goldkern, wo es das Gold komplexiert und damit das Volumen des Partikels reduziert. Diese Komplexbildung kann durch Abnahme der Absorption mit UV/Vis-Spektroskopie verfolgt werden.¹⁹⁵

Zudem wird die thermische Stabilität der Thiol-Gold Bindung mit Thermogravimetrischer Analyse (TGA) untersucht, indem die Massenänderung mit steigender Temperatur verfolgt wird.^{40, 125, 145, 195, 196}

Zur Analyse der Zusammensetzung der Liganden an kleinen, 2 nm großen Nanopartikeln eignen sich XPS, IR oder ¹H-NMR.^{144, 145, 147} Für größere Nanopartikel sind diese Methoden ungeeignet, da die Proben eine sehr geringe Konzentration an Nanopartikeln aufweisen (im nanomolaren Bereich). Fluoreszenz-basierte Messungen sind im Vergleich deutlich sensitiver und wurden beispielsweise von Mirkin *et al.* zur Charakterisierung der Oberflächenbelegung von Thiol-funktionalisierten Oligonukleotiden an 13-250 nm Gold Nanopartikeln eingesetzt.^{197, 198} Die in dieser Studie eingesetzten Oligonukleotide sind fluoreszenz-markiert und können nach Ligandenaustausch mit Dithiothreitol (DTT) detektiert werden.

Um nicht fluoreszente Ankergruppen einer gemischten Monolage zu quantifizieren, können ebenfalls fluoreszenz-basierte Messungen eingesetzt werden. In diesem Fall werden die immobilisierten funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Partikel mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert oder mit Fluorescamin reagiert, welches erst nach Reaktion mit Aminen Fluoreszenz zeigt und zur Quantifizierung dieser eingesetzt wird.¹⁹⁹⁻²⁰² Weller *et al.* etablierten die Quantifizierung primärer Aminogruppen an der äußeren Schale Silikat-beschichteter 2,2 nm großen Gold Nanopartikeln.²⁰⁵ Des Weiteren kann die Anzahl an reaktiven Aminogruppen in einer PEG-basierten Monolage von 4,0 nm großen Eisenoxid Nanopartikeln mittels Fluorescamine bestimmt werden.¹³⁴ Diese Systeme unterscheiden sich jedoch vom System der Monolagen-stabilisierten Gold Nanopartikel, da in Anwesenheit großer Gold Nanopartikel die Fluoreszenzintensität aufgrund der Fluoreszenzlöschung nicht quantitativ detektiert werden können. Die Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der Oberflächenfunktionalisierung großer Gold Nanopartikel ist Bestandteil dieser Arbeit.

2.2 Das biologische System

2.2.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Die Aminosäure *L*-Glutamat ist der häufigste erregende Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem (ZNS).²⁰⁴ Er kann mit ionotropen Kationenkanälen der postsynaptischen Zelle in Wechselwirkung treten. Entsprechend ihrer Spezifität für selektive Agonisten können diese Rezeptoren in drei Gruppen unterteilt werden: (I) AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat)-Rezeptoren, (II) KA (Kainat)-Rezeptoren und (III) NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren.²⁰⁵ Die verschiedenen Subtypen der ionotropen Glutamatrezeptoren zeigen deutliche Unterschiede in ihrem Aktivierungs-, Deaktivierungs-, und Desensitivierungsverhalten, sowie teilweise auch bezüglich ihrer Ionenselektivität und Leitfähigkeit. Glutamatrezeptoren des AMPA-Typs besitzen eine schnelle Anstiegs- und Abfallkinetik und sind besonders für Natrium und Kaliumionen permeabel.²⁰⁶ Im Gegensatz zu diesen auch als non-NMDA-Rezeptoren bezeichneten Ionenkanälen ist die Kinetik der NMDA-Rezeptoren deutlich verlangsamt (im Millisekundenbereich), dafür aber länger anhaltend in der Rezeptorantwort. Des Weiteren zeigen die NMDA-Rezeptoren im Vergleich zu non-NMDA-Rezeptoren eine hohe Permeabilität für Calciumionen.^{207, 208}

2.2.2 Der Aufbau der NMDA-Rezeptoren

Der NMDA-Rezeptor ist ein Proteinkomplex, der aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist. Diese Untereinheiten werden grundsätzlich in drei verschiedene Klassen unterteilt und von unterschiedlichen Genen kodiert.^{209, 210} Die erste Klasse besteht aus der NR1 Untereinheit, die zweite Klasse beinhaltet vier NR2 Untereinheiten (NR2A-NR2D). Für die dritte Klasse wurden zwei NR3 Untereinheiten (NR3A und NR3B) identifiziert. Alternatives Spleißen generiert acht Varianten der NR1 Untereinheit, wodurch die Rezeptorvielfalt weiterhin erhöht wird.²¹¹ NMDA-Rezeptoren sind stets heteromer aus vier Untereinheiten aufgebaut, wobei die NR1 Untereinheit für die Funktionalität Voraussetzung ist. Homomere Rezeptoren hingegen bilden keine funktionellen Ionenkanäle.²⁰⁸ Die Mehrzahl der NMDA-Rezeptoren setzen sich aus NR1 und NR2A oder NR2B Untereinheiten zusammen und sind somit Gegenstand aktueller Forschung.²¹² Die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors bestehen aus vier Bereichen, wie in Abbildung 11 schematisch am Beispiel der NR2B Untereinheit dargestellt.^{213, 214} Das C-terminale Ende, welches für die intrazelluläre Kommunikation verantwortlich ist, befindet sich im zytoplasmatischen Raum der Zelle. Daran schließt sich der Membranbereich an, welcher aus drei Transmembran-Domänen und einem „re-entrant loop“ besteht, der den Ionenkanal bildet. Im extrazellulären Bereich befinden sich zwei große Domänen: Die Agonist-Bindungs-Domäne (ABD) und die N-terminale Domäne (NTD). Die N-terminale Domäne besteht wiederum aus zwei Segmenten S1 und S2, die eine venusmuschelähnliche Struktur besitzen.⁹

Eine Besonderheit der NMDA-Rezeptoren ist die Notwendigkeit der Bindung zweier Agonisten zur Rezeptoraktivierung.²⁰⁷ Neben der Anwesenheit von *L*-Glutamat, welches an die ABD der NR2 Untereinheit bindet, wird gleichzeitig die Wechselwirkung von Glycin mit der ABD der NR1 Untereinheit benötigt, um eine Kanalaktivierung zu generieren. Glycin wird daher auch als Koagonist des NMDA-Rezeptors bezeichnet.^{8, 204, 208}

Weiterhin ist die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren spannungsabhängig. Ionenströme können durch NMDA-Rezeptoren nur vermittelt werden, wenn gleichzeitig eine Depolarisation der Membran vorliegt. Diese spannungsabhängige Blockade von NMDA-Rezeptoren beruht auf Magnesiumionen, die während des Ruhepotentials der Synapse die Kanalporen verschließen.²¹⁵⁻²¹⁷ Erst nach Überschreitung einer bestimmten Depolarisation der Membran werden die Mg^{2+} -Ionen aus der Kanalpore verdrängt, und ein Ionenfluss kann stattfinden. Diese Spannungsänderung kann durch Aktivierung anderer Ionenkanäle, wie beispielsweise AMPA-Rezeptoren erfolgen. Neben den bereits erwähnten Bindungsstellen von *L*-Glutamat und Glycin weist der NMDA-Rezeptor weitere Bindungsstellen für strukturell unterschiedliche Verbindungen auf, die die Aktivität des Kationenkanals beeinflussen. Neben der Bindungsstelle für Magnesiumionen im Kanal enthalten NMDA-Rezeptoren eine weitere Kanalbindungsstelle, die mit verschiedenen Antagonisten, den sogenannten Offenen-Kanal-Blockern besetzt werden kann (MK-801, Ketamin, Memantin).^{9, 218} Weiterhin kann der NMDA-Rezeptor durch Polyamine wie Spermin oder Spermidin allosterisch aktiviert werden. Die Modulation der Rezeptoraktivität wird zusätzlich von der Zusammensetzung der Untereinheiten im NMDA-Rezeptor beeinflusst.

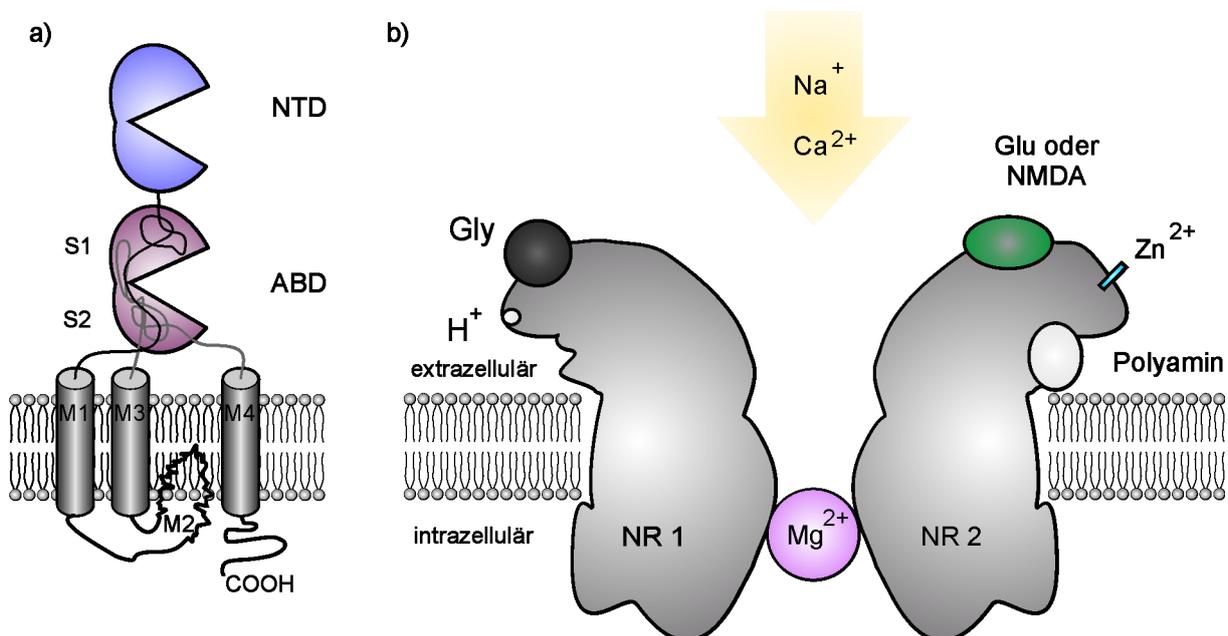


Abbildung 11: Die Struktur der NMDA-Rezeptoren. a) Membrantopographie der NR2B Untereinheit. Sie besteht aus vier Bereichen: Dem intrazellulären C-Terminus, dem Membranbereich mit drei Transmembran-Domänen M1, M3, M4 und dem „re-entrant loop“ M2, und zwei extrazellulären Domänen (ABD und NTD). b) wichtige Bindungsstellen des NMDA-Rezeptors. Die NR1 Untereinheit besitzt eine Glycin- sowie eine pH-abhängige Bindungsstelle; die NR2 Untereinheit enthält Bindungsstellen für Glutamat oder NMDA, Zinkionen und eine allosterische Bindungsstelle für Polyamine. Des Weiteren weist der Kanal eine Bindungsstelle für Magnesiumionen auf.⁹

2.2.3 Der Einfluss der Zusammensetzung der NMDA-Rezeptor Untereinheiten

NMDA-Rezeptoren, die aus verschiedenen Untereinheiten assembliert sind, zeigen unterschiedliche Affinitäten zu pharmakologischen Substanzen. So zeigten Bindungsstudien an heteromeren Rezeptoren, dass Ifenprodil, ein nichtkompetitiver Antagonist eine wesentlich höhere Affinität zur NR2B-Untereinheit als zur NR2A-Untereinheit besitzt.^{219, 220} Rezeptoren aus NR1/NR2B Untereinheiten weisen zudem eine höhere Permeabilität für Calciumionen auf²⁰⁸, zeigen geringere Desensitivierung²²¹ und produzieren langsamere postsynaptische Potentiale, als Rezeptoren, welche aus NR1/NR2A Untereinheiten aufgebaut sind.^{217, 222} Dies hat zur Folge, dass die Aktivierung eines NR1/NR2B Rezeptors zu einer wesentlich höheren Calciumkonzentration in der postsynaptischen Zelle führt, als die Aktivierung eines NR1/NR2A Rezeptors. Zudem zeigt die Verteilung der aus verschiedenen Untereinheiten assemblierten NMDA-Rezeptoren eine entwicklungsabhängige Regulation und weist deutliche räumliche Unterschiede auf.^{209, 217, 223} Während die NR1 Untereinheit in allen Gehirnbereichen und allen Entwicklungsstadien exprimiert wird, besitzen die NR2 Untereinheiten ein entwicklungsabhängiges Expressionsmuster. Im embryonalen Stadium dominieren die NR2B und NR2D Untereinheiten, während NR2A und NR2C nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist im adulten Gehirn die NR2A Untereinheit ubiquitär exprimiert, wohingegen die NR2B Untereinheit weitgehend in Vorderhirnregionen, und die NR2C Untereinheit im Kleinhirn lokalisiert sind. Auch auf zellulärer Ebene kann eine Segregation der NMDA-Rezeptor Untereinheiten festgestellt werden. Verschiedene Studien zeigen, dass die NMDA-Rezeptoren neben einer hohen Dichte im synaptischen Spalt, auch eine geringere Dichte außerhalb der Synapse aufweisen. Die extrasynaptischen Rezeptoren sind vermehrt aus NR2B Untereinheiten zusammengesetzt, während die Rezeptoren in der Synapse eine erhöhte Dichte der NR2A Untereinheit aufweist.²²⁴⁻²²⁶ Diese Trennung der Untereinheiten ist jedoch nicht vollständig; zudem weisen die Rezeptoren in der Membran eine gewisse Mobilität auf.^{227, 228} Aufgrund der unterschiedlichen lokalen Verteilung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten, ihrer entwicklungsabhängigen Regulation und ihrer unterschiedlichen Affinität zu modulatorischen Substanzen kann auf eine unterschiedliche Funktion dieser Rezeptoren im komplexen System des ZNS geschlossen werden.

2.2.4 Die Funktion der NMDA-Rezeptoren

Der NMDA-Rezeptor ist hinsichtlich seines Koagonismus von Glycin und Glutamat sowie der spannungsabhängigen Magnesiumionen-Blockade einzigartig unter den ligandengesteuerten Ionenkanälen. Die Kanalaktivierung durch simultane Ereignisse in der Synapse ermöglicht Adaptionvorgänge der neuronalen Schaltkreise und wird als Voraussetzung für die Ausbildung von Lern- und Erinnerungsvermögen (Langzeitpotentierung) diskutiert. Der NMDA-Rezeptor zeigt zudem eine erhöhte Permeabilität für Calciumionen. Calciumionen wirken vermutlich als sekundärer Botenstoff (*engl.* second messenger) über verschiedene Signalkaskaden zu einer selektiven Verstärkung der aktivierten synaptischen Verbindung.^{229, 230}

Neben der physiologischen Bedeutung der NMDA-Rezeptoren im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität, ist die Beteiligung dieser Rezeptoren bei pathophysiologischen Vorgängen wie zerebraler Ischämie und Schädel-Hirn-Trauma wesentlich. Zusätzlich wird der NMDA-Rezeptor mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Huntington, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht.^{9, 218, 231}

Daher bietet sich dieser Rezeptor als pharmakologisches Ziel an, um ein Konzept zu entwickeln, neurodegenerative Erkrankungen zu verstehen und zu behandeln. Nicht-selektive Antagonisten für NMDA-Rezeptoren zeigten jedoch erhebliche psychomimetische und halluzinogene Nebenwirkungen, sowie Amnesie. Zudem können sie Neurotoxizität hervorrufen, so dass ihre pharmakologische Anwendung begrenzt ist. Wirkstoffe, die selektiv übermäßig aktivierte NMDA-Rezeptoren blockieren, zeigen ein besseres Nebenwirkungsprofil und werden bereits teilweise zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt. Memantin beispielsweise ist ein schwachaffiner „offener-Kanal-Blocker“, der zur Behandlung von Morbus Parkinson und Alzheimer eingesetzt wird.^{8, 232} Um Nebenwirkungen zu reduzieren, müssen Antagonisten entworfen werden, die selektiv neurodegenerative Rezeptoraktivität blockieren, während neuroprotektive Prozesse nicht eingeschränkt werden.

2.2.5 Neuroprotektive Signalwege versus Exzitotoxizität

Um wirksame, neuroprotektive Substanzen zu entwickeln, müssen Wirkstoffe gezielt mit den Strukturkomponenten der betroffenen Proteine interagieren. Daher ist es von Bedeutung, die genauen Mechanismen zu verstehen, die zum Überleben der Zelle oder zum Zelltod führen. Hier wird eine kurze Übersicht über neuroprotektive Signalwege gegeben, sowie Prozesse, die Exzitotoxizität auslösen. Eine detaillierte Beschreibung der Signalkaskaden und der involvierten Proteine findet sich in der Literatur.^{3, 233, 234}

Neuroprotektive Signalwege

Aus zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Studien geht hervor, dass der Calciumeinstrom, induziert durch die glutamaterge Aktivierung der synaptischen NMDA-Rezeptoren zwei post-translationalen Hauptsignalkaskaden auslöst: Den CaM Kinase IV (Calmodulin Kinase IV) und den Ras-ERK1/2 (*engl.* extracellular signal regulated protein kinase) Signalweg (Abbildung 12). Beide Wege lösen die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins BAD aus.^{4, 235, 236}

Gleichzeitig aktivieren beide Signalwege CREB (*engl.* cAMP response element binding protein), wodurch die CREB/CBP (*engl.* CREB binding protein) vermittelte Transkription gesteuert wird. Der rasche Signalweg verläuft über eine erhöhte nucleäre Calciumkonzentration, die über CaM Kinase IV die CREB Phosphorylierung induziert. Der zweite, langsamere Signalweg führt über Ras-ERK1/2, welche, in den Nukleolus überführt, die Phosphorylierung an CREB induziert. Die Aktivierung von CREB führt zu einer Wechselwirkung mit CRE (*engl.* cAMP response element) und damit zur Expression verschiedener Gene, darunter auch BDNF (*engl.* brain derived neurotrophic factor), welche neuroprotektive Wirkung aufweist.^{5, 237, 238}

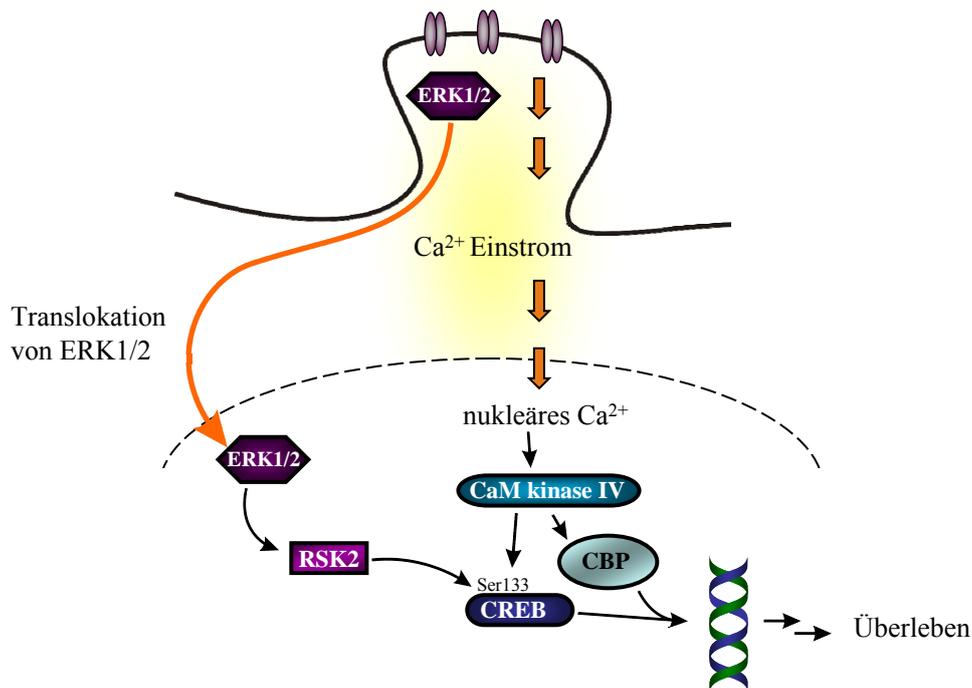


Abbildung 12: Synaptische NMDA-Rezeptoren kommunizieren über zwei Hauptsignalkaskaden zum Zellkern und steuern damit das Überleben der Zelle. Ein rascher Signalweg verläuft über einen Calciumtransienten, der in den Zellkern eindringt, CaM Kinase IV aktiviert und die CREB/CBP vermittelte Expression reguliert. Ein langsamerer Signalweg verläuft über Ras-ERK1/2, welche in den Nucleolus überführt, über RSK2 die CREB/CBP vermittelte Expression reguliert.³

Exzitotoxizität

Die genauen Mechanismen, die zur Exzitotoxizität führen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Zwei verschiedene Hypothesen über den Einfluss von NMDA-Rezeptoren bei dem Vorgang der Exzitotoxizität sind bekannt. Eine Hypothese geht davon aus, dass ausschließlich eine überhöhte Menge an L-Glutamat für den Zelltod verantwortlich ist (*engl.* calcium load hypothesis).²³⁹ Werden die NMDA-Rezeptoren durch eine erhöhte Konzentration an L-Glutamat aktiviert, erfolgt eine dramatische Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und die Zellen sterben gewissermaßen durch Übererregung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine erhöhte Calciumkonzentration, die durch andere Ionenkanäle, wie L-Typ Rezeptoren vermittelt wird, nicht zum Zelltod führt.^{240, 241} Gleichzeitig wurde gezeigt, dass exzessive synaptische Erregung *in vitro* nicht zum Zelltod führt.⁴ Das Überleben der Neurone ist von der Stärke und Dauer der Glutamat-Aktivierung beeinflusst. Jedoch spielt vermutlich der Ort des Calciumeintritts eine wesentliche Rolle (*engl.* source specificity hypothesis): NMDA-Rezeptoren, die sich in einer hohen Dichte im synaptischen Spalt befinden, sind vorrangig aus NR2A Untereinheiten zusammengesetzt und beeinflussen das Überleben der Zelle (s.o.). Gelingt hingegen L-Glutamat in den extrazellulären Raum, werden extrasynaptische Rezeptoren aktiviert, die vermehrt aus NR2B Untereinheiten assembliert sind. Auch dies führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese erhöhte Konzentration ist jedoch an andere nachgeschaltete Signalkaskaden gekoppelt, die letztendlich zum Zelltod führen (s.u.). Ob das Überleben der Zelle also ausschließlich mit der Calciumkonzentration, mit der Position der aktivierten NMDA-Rezeptoren oder der Rezeptorverteilung zusammenhängt, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Ein Argument für die „source specificity hypothesis“ bietet eine starke Verknüpfung von NMDA-Rezeptoren mit Mitochondrien. Calciumionen, welche durch NMDA-Rezeptoren in die postsynaptische Zelle gelangen, werden von Mitochondrien schneller aufgenommen, als beispielsweise Calciumionen, die durch Kainat Rezeptoren in die Zelle gelangen.²⁴² Diese verstärkte Aufnahme führt bei der Exzitotoxizität zur Depolarisation des Membranpotentials der Mitochondrien. Dadurch werden Calciumionen sowie Cytochrom C in das Zytoplasma freigesetzt. Weiterhin werden Superoxide gebildet und es kommt schließlich zum Zelltod.^{3, 8, 243}

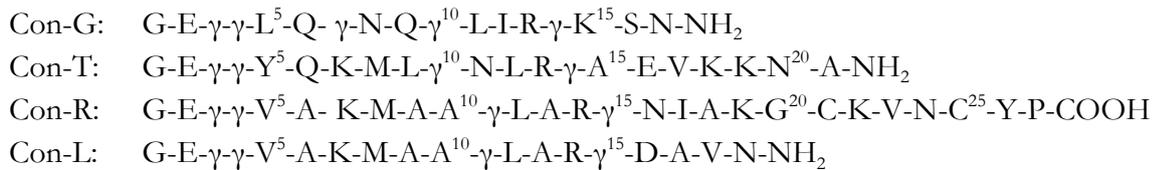
Zusätzlich führt die Aktivierung der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren nicht, wie bei der synaptischen Signaltransduktion, zur CREB vermittelten Genexpression. Ursache hierfür ist vermutlich die Kopplung der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren an einen dominanten Signalweg, der die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von CREB verursacht.³

Neben diesen zwei Prozessen, konnte ebenfalls eine erhöhte Synthese von Stickstoffmonoxid nachgewiesen werden. NMDA-Rezeptoren sind durch den intrazellulären C-Terminus an komplexe zytoplasmatische Proteine gebunden, die aufgrund ihrer elektronendichten Erscheinung im Elektronenmikroskop als postsynaptische Dichte (*engl.* postsynaptic density, PSD) beschrieben werden. Neben filamentösen Proteinen wie Tubulin und Aktin zählen Proteine der Signalweiterleitung zu den Bestandteilen der postsynaptischen Dichte. Darunter befindet sich auch PSD-95, welches NMDA-Rezeptoren an Signalmoleküle bindet, die für die synaptische Plastizität von Bedeutung sind.^{244, 245} Zusätzlich werden die NMDA-Rezeptoren über PSD-95 an die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase gekoppelt.²⁴⁶ Durch Aktivierung der NMDA-Rezeptoren wird die Stickstoffmonoxid Konzentration erhöht, die vermutlich zusätzlich die Aufnahme von Calciumionen in die Mitochondrien vermittelt.²⁴² Diese Stickstoffmonoxid-synthese sowie die Funktionsstörung der Mitochondrien führen letztendlich zum Zelltod.²⁴⁷

Der Zelltod eines Neurons als Folge ischämischer Zustände führt zur weiteren Ausschüttung von L-Glutamat in den extrazellulären Raum, wodurch weitere Neuronen sterben. Dies löst eine Kaskadenreaktion aus und führt zum Zelluntergang der betroffenen Gehirnareale mit anschließenden schweren Gehirnschäden.⁸

2.2.6 Conantokin G

Das Gift der Kegelschnecke der Gattung *Conus* beinhaltet eine Vielfalt an strukturell und pharmakologisch unterschiedlichen Peptiden. Sie werden unter dem Namen Conuspeptide zusammengefasst.^{248, 249} Alle bis heute charakterisierten Peptide zeigen Affinität zu Liganden- oder spannungsabhängigen Ionenkanälen. Die meisten Toxine besitzen eine Vielzahl an Disulfidbrücken, die die dreidimensionale Struktur bestimmen. Eine Ausnahme sind hier die Conantokine, die neben dem Mangel an Disulfidbrücken, einen hohen Anteil an der seltenen Aminosäure γ -Carboxyglutamat (γ) besitzen. Vier verschiedene Conantokine konnten bereits identifiziert werden: Con-G, Con-T, Con-R, Con-L.^{250, 251} Die Conantokine bilden die einzige Familie der Conuspeptide, die selektiv den NMDA-Rezeptor blockieren. Durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass Con-G in Abwesenheit von zweiwertigen Ionen keine Sekundärstruktur besitzt, während Con-R und Con-T etwa zu 50% und 20% eine helikale Struktur ausbilden.



In Anwesenheit einer hohen Konzentration an Calciumionen bildet ConG, wie Con-R zu 50% und Con-T zu 80% eine helikale Struktur aus.²⁴⁹ Die helikale Struktur ist für Peptide mit einer relativ geringen Anzahl an Aminosäuren ungewöhnlich, kann jedoch mit dem optimalen Abstand der Gla Reste erklärt werden, die in Anwesenheit von Calciumionen koordiniert werden können. Kürzlich wurde beobachtet, dass sich bei Con-G unter physiologischen Calciumkonzentrationen ein Gleichgewicht zwischen Monomer und antiparallelem Dimer einstellt. Die Kristallstruktur dieses antiparallelen Dimers konnte bestimmt werden.²⁵² Wiederum wird der Abstand der Gla Reste für dieses Gleichgewicht verantwortlich gemacht. Con-G besitzt einen Gla Abstand, der durch $i, i+4$ beschrieben werden kann und für eine Helix-Helix Anordnung optimal ist. Die antiparallele Dimerisierung ist jedoch für die Aktivität von Con-G keine Voraussetzung, wie durch Aminosäure-Austausch-Experimente gezeigt werden konnte. Wird in Con-G der Gla Rest an Position 7 durch Lysin ausgetauscht (ConG[Gla⁷Lys]), so bildet sich keine Struktur höherer Ordnung aus. Die inhibitorische Aktivität dieses Con-G Derivats wurde durch den Austausch nicht gemindert. Weiterhin wird die Aktivität der antiparallelen und parallelen Con-G Dimere in transfizierten HEK 293 Zellen untersucht. Das antiparallele Dipeptid zeigt, ähnlich wie das Monomer eine inhibitorische Aktivität bei NR1/NR2B Rezeptoren, während das parallele Dimer keine inhibitorische Wirkung auf den NMDA-Rezeptor ausübt.²⁵³

Weitere Struktur-Wirkungsstudien mittels Aminosäureaustauschs belegen, dass besonders die fünf N-terminalen Aminosäuren für die inhibitorische Wirkung essenziell sind. Eine Voraussetzung für die Aktivität ist die Aminosäure Gla an Position 4.^{254, 255} Erstaunlicherweise zeigt das Pentapeptid (G-E- γ - γ -X) allein keine inhibitorische Wirkung. Daraus ist zu schließen, dass der C-Terminus in einer gewissen Weise in die Bindung an den NMDA-Rezeptor involviert ist.²¹²

Die pharmakologische Wirksamkeit der Conantokine konnte in Studien anhand von Modellsystemen getestet werden. Donevan und Mc Cabe zeigten in *Xenopus* Oocyten, die rekombinante NMDA-Rezeptoren exprimierten, dass Con-G selektiv an die NR2B Untereinheit der NMDA-Rezeptoren bindet.²⁵⁶ Während durch Zugabe von Con-G die durch NMDA hervorgerufenen Ströme in NR1a/NR2B Rezeptoren inhibiert werden, zeigt Con-G bei anderen NR2 Untereinheiten keine Wirkung. Con-R inhibiert NMDA-Rezeptoren, die sowohl aus NR2A als auch aus NR2B Untereinheiten assembliert sind. In neusten Studien wird dargestellt, dass Con-G vermutlich an das S2 Segment der ABD (s.o.) der NR2B Untereinheit bindet.²⁵⁷

Diese Untereinheiten-Selektivität von Con-G im Vergleich zu Con-R und Con-T ist besonders für die Pharmakologie von Interesse. Con-G kann als Templat für Wirkstoff-Design und für mechanistische Studien zur Charakterisierung der Funktion der NMDA-Rezeptoren eingesetzt werden. Untereinheiten-Selektivität erlaubt eine gezielte Applikation des Wirkstoffs in der Gehirnregion, in der bestimmte Untereinheiten vermehrt auftreten und für eine Fehlfunktion verantwortlich gemacht werden. So können die Nebenwirkungen potentieller pharmakologischer Substanzen reduziert werden.

Durch Anwendung der Nanopartikel als sterisch anspruchsvolle Werkzeuge in der vorliegenden biologischen Fragestellung soll die Hypothese der unterschiedlichen Funktionen der synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren untersucht werden. Dazu werden gut charakterisierte Gold Nanopartikel benötigt, die mit dem hier vorgestellten NMDA-Rezeptorantagonisten Con-G funktionalisiert werden. Die Darstellung, Charakterisierung sowie Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Funktionalität der Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate ist Gegenstand dieser Arbeit.

3 Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollen stabile Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate zur Anwendung im biologischen System hergestellt werden. Diese Nanopartikel sollen adressierbare Peptide auf der Oberfläche der Nanopartikel anbieten, um Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen in primären hippocampalen Neuronen zu untersuchen.

Synaptisch und extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren vermitteln vermutlich unterschiedliche Signalwege in hippocampalen Neuronen, die entweder zum Überleben oder aber zum Zelltod führen (s. Kapitel 1). Um mittels Nanopartikeln die Rezeptoren aufgrund ihrer Position in der postsynaptischen Zelle zu unterscheiden und damit die Hypothese der unterschiedlichen Signalwege zu überprüfen, werden sterisch anspruchsvolle Partikel benötigt, die eine größere Ausdehnung besitzen, als die Breite des synaptischen Spalts. Dieser beträgt für primäre hippocampale Neuronen im Durchschnitt 23 nm, wie durch die Auswertung von TEM-Schnitten ermittelt wurde (s. Kapitel 3.8.1). Werden diese Nanopartikel mit dem in der Einleitung beschriebenen NMDA-Rezeptorantagonisten Con-G funktionalisiert (s. Kapitel 2.2.6), werden ausschließlich die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren blockiert. Die synaptischen NMDA-Rezeptoren, die von den an den Nanopartikeln immobilisierten Antagonisten nicht erreicht werden, können dadurch selektiv und unabhängig angesprochen werden.

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, müssen hierfür zunächst Nanopartikel mit einem Durchmesser von ≥ 30 nm hergestellt werden. Die entsprechenden Untersuchungen zur Synthese sind in Kapitel 3.1 dargestellt. Eine besondere Herausforderung stellt anschließend die Stabilisierung der Nanopartikeln mit einem solchen Durchmesser dar, diese stärker zur Aggregation neigen, als Nanopartikel mit einem kleineren Durchmesser. Eine wichtige Voraussetzung für die hier beschriebene Anwendung der Nanopartikel im biologischen System ist jedoch eine geringe Tendenz der Partikel zur Aggregation. Experimente in diesem Zusammenhang sind in Kapitel 3.2 dargestellt. Anschließend wird die Charakterisierung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der stabilisierten Partikel durchgeführt. Die Untersuchungen zur Stabilität der Suspension sind in Kapitel 3.2.3, die Charakterisierung der Schichtdicke der an die Nanopartikel gebundenen Polymere in Kapitel 3.3 und die quantitative Bestimmung reaktiver Ankergruppen innerhalb der Polymerschicht findet sich in Kapitel 3.4. Im Weiteren werden die hochstabilen Nanopartikel mit dem biologisch aktiven Peptid Con-G konjugiert (Kapitel 3.5), welches die NMDA-Rezeptoren spezifisch blockiert. Diese Konjugate werden ebenfalls quantitativ bezüglich der durchschnittlichen Anzahl an Peptiden pro Partikel charakterisiert. Die in dieser Arbeit hergestellten Nanopartikel-Peptid-Konjugate werden in einem nicht neuronalen Modellsystem (Kapitel 3.7) bestehend aus transient transfizierten HEK 293 Zellen auf ihre Anwendbarkeit und Reaktivität getestet. Erste Untersuchungen zur Funktion der Konjugate in primären hippocampalen Neuronen finden sich wiederum in Kapitel 3.8.

3.1 Synthese der Nanopartikel

Zur Herstellung von Peptid-funktionalisierten Gold Nanopartikeln werden zunächst, wie in Abbildung 2 (Kapitel 1.1) dargestellt, die anorganischen Kerne synthetisiert. Dabei ist die gezielte Darstellung kontrollierbarer Größen von Nanopartikeln von Bedeutung. Zudem müssen die hergestellten Nanopartikel eine geringe Größenverteilung besitzen, um eine Diffusion der kleinen Partikel in den synaptischen Spalt zu verhindern. Im Folgenden werden zwei generelle Methoden zur Darstellung von Gold Nanopartikeln mit einer Größe von 12 nm bis 62 nm vorgestellt, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

3.1.1 Direkte Synthese

Erstmals wurde die gezielte Synthese von Gold Nanopartikeln in der Literatur von Turkevich *et al.* beschrieben⁸⁴, die später von Frens auf eine Synthese von Gold Nanopartikeln verschiedener Größen erweitert wurde.⁸⁶ Hier werden Gold Nanopartikel in einer einstufigen Reaktion durch Reduktion von Gold(III)-chlorid mit Natriumzitat dargestellt.⁸⁴ Durch Variation des Verhältnisses von Goldsalz zu Reduktionsmittel kann der Durchmesser der entstehenden Nanopartikel beeinflusst werden.⁸⁶

Die Synthese der Nanopartikel wurde in dieser Arbeit zunächst analog dieser in der Literatur beschriebenen Darstellung durchgeführt, wobei Nanopartikel verschiedener Größen hergestellt wurden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der entsprechend reproduzierten Partikel sind in Abbildung 13 dargestellt.

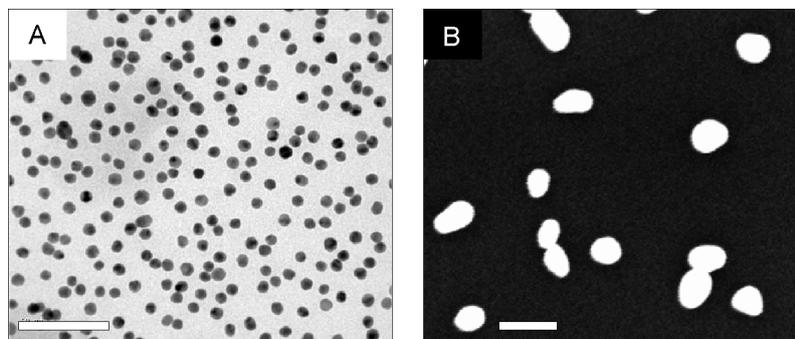


Abbildung 13: Exemplarische Gold Nanopartikel Proben hergestellt nach der direkten Zitratsynthese A: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Gold Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 22 ± 3 nm B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Gold Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 60 ± 12 nm; der Maßstab entspricht 100 nm.

Die Auswertung der Größe der resultierenden Partikel erfolgt mit einer frei zugänglichen Software (Image J) und wird anhand der in A gezeigten Nanopartikel näher erläutert. Zur Analyse der Größe werden in der Literatur grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze herangezogen. Unter der Annahme, dass die hergestellten Nanopartikel eine sphärische Form besitzen (sphärische Analyse), wird der Durchmesser über die Bestimmung der Fläche der Partikel in elektronenmikroskopischen Aufnahmen analysiert. Über die geometrische Formel $A = 0,25\pi d^2$ kann der Durchmesser der Nanopartikel aus der Messung deren Fläche erhalten werden. Bei der zweiten Methode wird eine Ellipse an das Partikel angepasst, welche die Größe

des Partikels über eine Haupt- und eine Nebenachse beschreibt. Das Verhältnis aus Haupt- und Nebenachse wird als Elliptizität (G) bezeichnet. Bei einem Wert von $G = 1$ handelt es sich um vollständig sphärische Partikel. Die Anpassung der Ellipse sowie die Bestimmung der Größe der Fläche der Nanopartikel werden über eine automatische Auswertung mit Image J erhalten. Die resultierenden Umrisse der Nanopartikel nach der automatisierten Auswertung durch Anpassung einer Ellipse sowie durch Bestimmung der Kreisfläche sind in Abbildung 14 A und B dargestellt. Sowohl die an die Konturen der Nanopartikel angepassten Ellipsen (Abbildung 14 A), als auch die automatisch umrandeten Konturen der Nanopartikel (Abbildung 14 B) stimmen mit den Größen der Nanopartikel in der Originalaufnahme gut überein.

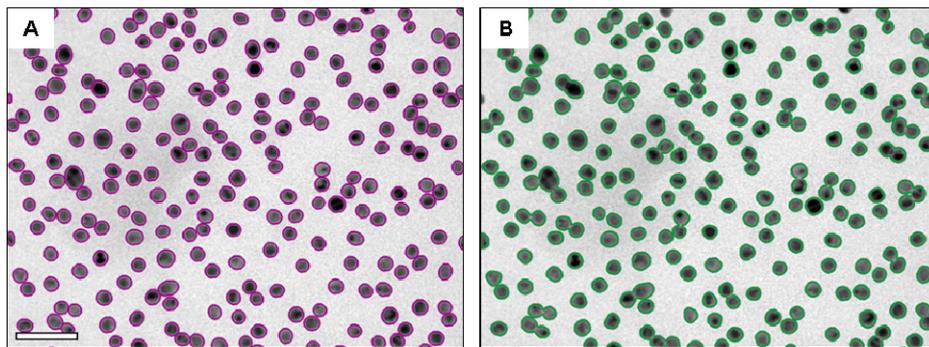


Abbildung 14: Vergleich der aus der automatisierten Auswertung erhaltenen Konturen der Partikel mit der Originalabbildung. A: Anpassung von Ellipsen an die Konturen der Nanopartikel aus A. B: Anpassung von Umrandungen zur Bestimmung der Partikelgröße. Der Maßstab beträgt 100 nm.

Die an die Umrisse der Nanopartikel angepassten Ellipsen werden durch eine Haupt- und eine Nebenachse beschrieben, welche in Abbildung 15 a in einem Histogramm dargestellt werden. Der durchschnittliche Durchmesser der Nanopartikel ergibt sich hierbei aus dem Mittelwert beider Achsen. Die Auswertung mittels Ellipse zeigt, dass nahezu sphärische Nanopartikel vorliegen, da das Maximum der Hauptachse annähernd mit dem der Nebenachse zusammenfällt. Für die Hauptachse ergibt sich ein durchschnittlicher Wert von 24 nm, für die Nebenachse 20 nm. Die Standardabweichung der Haupt- und Nebenachse beträgt jeweils 12%, eine geringe Abweichung für die Synthese von Nanopartikeln. Zudem stimmt die hier ermittelte Standardabweichung mit der in der Literatur angegebenen Standardabweichung überein.⁸⁴

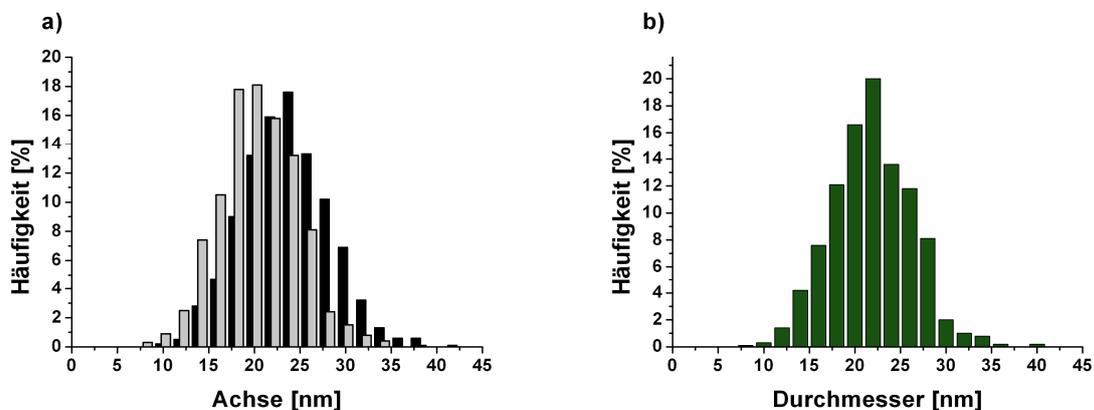


Abbildung 15: Größenverteilung der Gold Nanopartikel. a) ■: Hauptachse (24 ± 3 nm). ■: Nebenachse ($20 \pm 2,5$ nm), gemäß Abbildung 14 A b) ■: Durchmesser bestimmt über die Fläche der Nanopartikel ($20 \pm 2,4$ nm), Abbildung 14 B. Es wurden 500 Partikel analysiert.

In einer weiteren Analyse wird bei denselben Nanopartikeln der Durchmesser über die Fläche der Partikel bestimmt (s. Abbildung 15 b). Unter der Annahme, dass sphärische Partikel vorliegen, kann wie oben beschrieben anhand der Gleichung zur Berechnung der Kreisfläche der Durchmesser der Nanopartikel bestimmt werden. Die resultierende Verteilung ist in Abbildung 15 b dargestellt. Hierbei ergibt sich ein Durchmesser von $20 \pm 2,4$ nm, der mit den Werten der Auswertung mittels Ellipse gut übereinstimmt. Folglich ist die Annahme der sphärischen Form der Partikel korrekt und beide Ansätze sind zur Auswertung sphärischer Partikel geeignet. Der Vergleich der automatisch an die Konturen der Nanopartikeln angepassten Ellipse (Abbildung 14 A) sowie der Umrandung zur Bestimmung der Fläche der Nanopartikel (Abbildung 14 B) zeigt, dass zudem die automatische Erfassung der Partikel zur Auswertung der Größe geeignet ist. Die Automatisierung ermöglicht eine rasche Erfassung einer hohen Anzahl an Nanopartikeln (500-1000 Partikel), wodurch eine statistische Auswertung einer großen Anzahl an Nanopartikeln möglich ist, anders als beispielsweise bei einer zeitaufwendigen, manuellen Auswertung.

Für den Einsatz der Nanopartikel im biologischen System der primären hippocampalen Neuronen wird jedoch ein größerer Durchmesser (≥ 30 nm) der Nanopartikel benötigt, um die Diffusion der Partikel in den synaptischen Spalt zu verhindern. Daher wurde die von Frens beschriebene Synthese reproduziert, um Nanopartikel mit einem ausreichend großen Durchmesser herzustellen. Eine exemplarische REM-Aufnahme ist in Abbildung 13 B gezeigt. Diese größeren Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 60 nm weisen eine bereits optisch erkennbare, breite Größenverteilung sowie eine überwiegend elliptische Form auf. Sie lassen sich aufgrund ihrer Form nicht über die Kreisfläche, sondern ausschließlich über die Methode der Ellipse charakterisieren. Damit ist die Auswertung über die Anpassung einer Ellipse generell besser zur Charakterisierung von Nanopartikeln geeignet, da sie nicht nur auf sphärische, sondern gleichfalls auf stäbchenförmige Partikel angewendet werden kann. Im Folgenden wird daher die Methode der Ellipse zur Auswertung herangezogen.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, fallen die Maxima der Verteilung der Haupt- und Nebenachsen nicht aufeinander. Für die Hauptachse ergibt sich eine durchschnittliche Länge von 67 ± 15 nm, für die Nebenachse ein Wert von 52 ± 7 nm. Die Standardabweichung der Hauptachse beträgt 24%, die der Nebenachse 14%. Die Standardabweichung liegt zudem deutlich über den Werten, die für die kleinen 20 nm Partikel erhalten wurden.

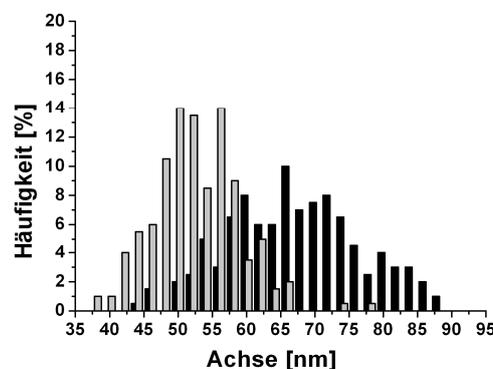


Abbildung 16: Histogramm der hergestellten Nanopartikel ausgewertet über die Anpassung einer Ellipse. ■: Hauptachse: 67 ± 15 nm, ■: Nebenachse: 52 ± 7 nm. Die Standardabweichung (2σ) ergibt sich aus der Halbwertsbreite der angepassten Gaußfunktionen. Es werden 1200 Partikel analysiert.

Die hohe Standardabweichung sowie die stark elliptische Form zeigen, dass die direkte Zitrat-Synthese nach Frens für die Synthese sphärischer Partikel von 12 bis ~ 20 nm geeignet ist, nicht aber für sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ≥ 30 nm.

Die hergestellten Nanopartikel sollen eine Diffusion des Antagonisten in den synaptischen Spalt vermeiden und müssen somit eine geringe Größenverteilung aufweisen, um die Blockierung der synaptischen NMDA-Rezeptoren gänzlich auszuschließen (s. Kapitel 1.1). Mit der in Abbildung 16 dargestellten breiten Verteilung kann der Ausschluss der Partikel aus dem synaptischen Spalt nicht garantiert werden. Zusätzlich werden die eingesetzten Nanopartikel im weiteren Verlauf funktionalisiert und bezüglich ihrer Oberflächenfunktionalisierung charakterisiert. Auch für diese Charakterisierung ist, wie in Kapitel 3.4 gezeigt, eine sphärische Form der Partikel für eine genaue Analyse Voraussetzung, ebenso wie eine geringe Größenverteilung. Die Qualität der Nanopartikel, wie sie mittels der direkten Zitrat-Synthese hergestellt werden können, reicht daher für die Anforderungen der in dieser Arbeit vorgestellten Anwendung der Nanopartikel nicht aus. Eine Alternative für die Darstellung großer Nanopartikel ist eine mehrstufige, keimvermittelte Synthese, wie bereits in Kapitel 2.1.3 detailliert beschrieben. Diese Synthesestrategie wird daher im Folgenden für die Darstellung großer Nanopartikel gewählt.

Eine wesentliche Voraussetzung für diese keimvermittelte Synthese ist der Einsatz monodisperser Keime. Solche Partikel werden nach einer geringen Modifikation der Synthese nach Turkevich hergestellt, die von Grabar *et al.* beschrieben wurde.⁸⁵ Die Konzentration an Gold(III)-chlorid wird von 0,26 mM, wie sie in der Synthese nach Turkevich eingesetzt wurde, auf 1 mM erhöht, wodurch reproduzierbar sphärische Partikel mit einem kleineren Durchmesser (12 nm) erhalten werden können. Die nach dieser Vorschrift hergestellten Partikel sind in Abbildung 17 dargestellt.

Zur Analyse der Partikel werden elektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen. Die hergestellten Keime können sowohl im Rasterelektronenmikroskop (REM), als auch im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) abgebildet werden. REM-Messungen beschleunigen die experimentelle Arbeit im Vergleich zu TEM-Messungen, da die Probenhandhabung im REM einfacher ist, als im TEM und die Messung selbst mittels REM weniger zeitaufwendig ist. Um zu überprüfen, ob sich statt TEM-Aufnahmen ebenfalls REM-Aufnahmen zur Auswertung der Keime eignen, werden dieselben Keime mit beiden elektronenmikroskopischen Verfahren abgebildet und deren Größe analysiert. Die resultierenden Größenverteilungen der Hauptachsen sind in Abbildung 17 dargestellt. Bei der Analyse im REM müssen Bilder mit einer Vergrößerung dargestellt werden, die an die Auflösungsgrenze des REM heranreicht. In REM-Aufnahmen hängt die ausgewertete Partikelgröße daher stark von den Geräteeinstellungen, wie Kontrast, Helligkeit und Auflösung ab. Werden Kontrast oder Helligkeit zu hoch eingestellt, erscheinen die dargestellten Partikel sehr hell, wie dies beispielsweise in Abbildung 13 B der Fall ist. Hierdurch kann die Analyse der Keime einen größeren Durchmesser ergeben, als dies tatsächlich der Fall ist. Zusätzlich wird die Grenzfläche zweier nah beieinander liegender Partikel bei einer solchen Einstellung nicht aufgelöst. Um die elliptische Form der Partikel zu erkennen, ist die Qualität des Bildes jedoch ausreichend. Im TEM können grundsätzlich im Vergleich zum REM Bilder mit einer größeren Vergrößerung aufgenommen werden. Zur Abbildung der Keime gelangt man daher nicht in den Bereich der Auflösungsgrenze, so dass sich hier die Einstellung des Kontrastes und der Helligkeit nicht so stark auf die Bildqualität und damit die analysierte Größe der Partikel auswirken.

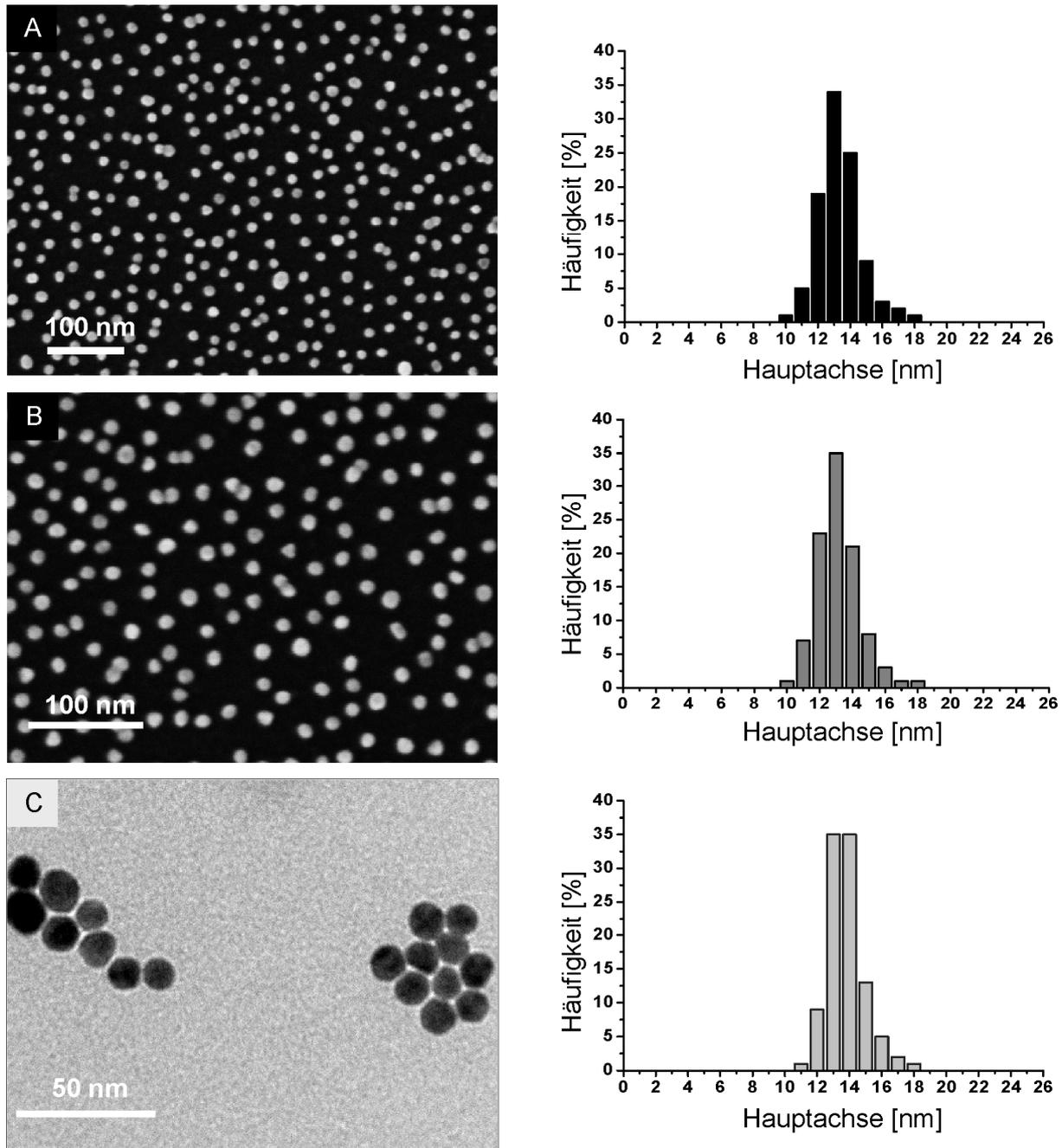


Abbildung 17: Vergleich der Größenauswertung der Keime mittels REM und TEM. A: REM-Aufnahme in 100k Vergrößerung (5000 Partikel ausgewertet) B: REM-Aufnahme in 150k Vergrößerung (2000 Partikel ausgewertet); REM Bilder aufgenommen von Dr. R. Fiammengio C: TEM-Aufnahme in 200k Vergrößerung (500 Partikel ausgewertet) mit den zugehörigen Größenverteilungen der Hauptachse.

Hierdurch wird eine genauere Analyse der Größe der Partikel ermöglicht. Um zu überprüfen, ob REM-Aufnahmen zur Größenauswertung der Partikel herangezogen werden können, werden die Einstellungen im REM durch einen Vergleich mit TEM Bildern zunächst angepasst werden und für folgende Messungen etwa konstant gehalten. Typischerweise liegen die Werte der Helligkeit zwischen 8-10%, die des Kontrasts zwischen 36-39%, je nach Beschaffenheit der Probe und Größe der Nanopartikel. Mit diesen Einstellungen sind auch die Konturen zweier nah beieinander liegender Partikel und einzelne Facetten der Partikel erkennbar. Ein entsprechender Vergleich zwischen REM und TEM Aufnahmen zeigt Abbildung 17.

Tabelle 1: Vergleich der Größenverteilung mittels REM und TEM.

| Messung | Hauptachse [nm] | Nebenachse [nm] | Mittelwert [nm] | Stw [%] |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
| REM 100k (A) | 12,9 | 11,5 | 12,3 | 12,2 |
| REM 150k (B) | 12,7 | 11,4 | 12,0 | 11,0 |
| TEM 200k (C) | 13,4 | 12,0 | 12,7 | 10,3 |

Dieselben Nanopartikel wurden sowohl im REM (Abbildung 17 A, B) als auch im TEM (Abbildung 17 C) analysiert. Die Aufnahmen in Abbildung 17 A, B zeigen eine durchschnittliche Hauptachse von 13 nm. Diese stimmt mit der aus TEM-Aufnahmen analysierten Größe von 13,4 nm gut überein (Tabelle 1). Des Weiteren weisen Haupt- und Nebenachse der unterschiedlichen Aufnahmen annähernd gleiche Werte auf. Die vorliegenden Nanopartikel besitzen somit, wie oben gezeigt, eine annähernd sphärische Form. Diese kann anhand der Elliptizität (G) abgeschätzt werden, welche aus dem Quotienten der Haupt- und Nebenachse (s.o.) errechnet wird. Für die hier synthetisierten Nanopartikel liegt die Elliptizität je nach Auswertung zwischen 1,05 und 1,07. Die Standardabweichung, ermittelt aus der Auswertung der REM Bilder mit 100k Vergrößerung liegt mit ~12% etwas über der aus der TEM-Auswertung ermittelten Standardabweichung von ~10%. Die geringe Abweichung zeigt, dass mit den gewählten Einstellungen (s.o.) und der hohen Auflösung eine Auswertung der Nanopartikel mittels REM-Aufnahmen möglich ist.

3.1.2 Keimvermittelte Synthese

In der keimvermittelten Synthese werden in mehreren Stufen kleine, monodisperse Partikel in einer Wachstumsreaktion vergrößert. Idealerweise wird in dieser mehrstufigen Synthese die Nukleation vollständig unterbunden, so dass die vorhandenen Keime synchron wachsen und die hergestellten großen Partikel eine geringe Größenverteilung aufweisen. Eine ausführliche Beschreibung der Trennung von Nukleation und Wachstum, die auf LaMer zurückgeht⁸³, findet sich in Kapitel 2.1.3. Brown *et al.* stellten in einer mehrstufigen Synthese mit Hydroxylamin Hydrochlorid als mildes Reduktionsmittel monodisperse Nanopartikel bis zu einer Größe von ~100 nm her, indem sie die Wachstumslösung stufenweise verdünnten, und gleichzeitig durch Zugabe des Reduktionsmittels dessen Konzentration in der Reaktionslösung konstant hielten.⁹⁰ Durch die Wahl des milden Reduktionsmittels wird die Reduktion der Goldsäure an der Oberfläche existierender Keime katalysiert, nicht aber die Bildung neuer Keime. Dadurch entstehen sphärische Partikel mit einer Standardabweichung von 12%. Neben den sphärischen Partikeln detektierten Brown *et al.* eine zweite Population von 5-10% stäbchenförmigen Partikeln, die vermutlich durch eine erhöhte Wachstumsrate entlang einer bevorzugten Raumachse gebildet werden.⁹⁰ Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel, die im Rahmen dieser Arbeit reproduziert wurden, sind in Abbildung 18 dargestellt.

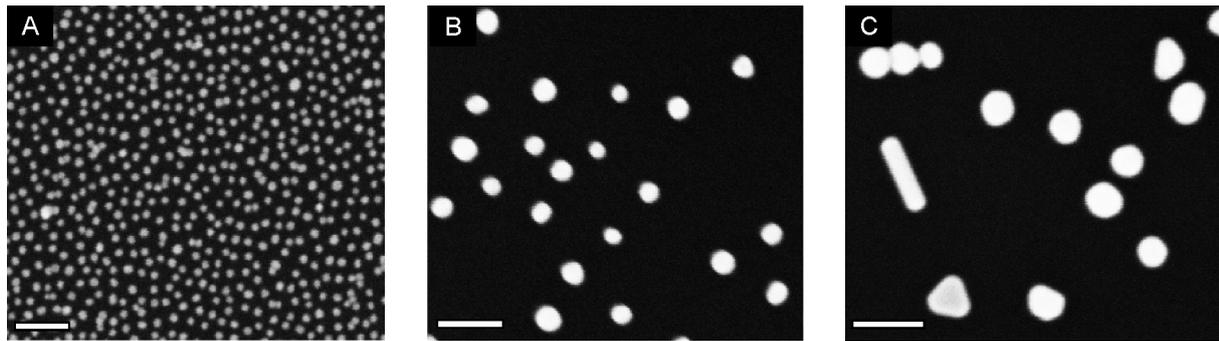


Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold Nanopartikel hergestellt in einer stufenweisen Keimwachstumsreaktion nach Brown *et al.* A: 13 nm Keime, B: 36 ± 4 nm C: 55 ± 6 nm. Der Maßstab beträgt 100 nm.

Die nach Brown *et al.* hergestellten Partikel zeigen die in der Literatur angegebene Standardabweichung sowie die beschriebene zweite Population an stäbchenförmigen Partikeln, wie in Abbildung 18 C zu sehen. Zu einem geringen Anteil (5%) werden außerdem dreieckige Partikel detektiert. Diese stufenweise Synthese hat gegenüber der Zitratsynthese den Vorteil, dass die Reduktion mittels Hydroxylamin Hydrochlorid bereits bei Raumtemperatur stattfindet. Die Durchführung dieser Wachstumsreaktion ist in Abbildung 19 a schematisch dargestellt. Über mehrfache Verdünnungsschritte werden die gewünschten Nanopartikel synthetisiert. Jedoch muss durch die einzelnen Verdünnungsschritte eine aufwendige Partikelauflösung durchgeführt werden, um die Partikel in hinreichend hoher Konzentration zu erhalten. Um diese Zentrifugationsschritte zu umgehen, wird in dieser Arbeit die keimvermittelte Synthese modifiziert. In einer einstufigen Wachstumsreaktion können mit dem hier vorgestellten Verfahren monodisperse Nanopartikel synthetisiert werden, wie in Abbildung 19 b schematisch dargestellt. Als Keime dienen monodisperse Gold Nanopartikel, die nach der Zitratsynthese von Grabar *et al.*⁸⁵ hergestellt werden. Eine Gold(III)-chlorid-Lösung wird mit einer Spritzenpumpe in einer kontrollierten Geschwindigkeit zur Lösung aus Reduktionsmittel und Keimen zugegeben. Durch die kontrollierte Zugabe können automatisiert und kontrolliert monodisperse Nanopartikel bis zu einer Größe von 62 nm hergestellt werden, ohne aufwendige Aufreinigung oder zahlreiche Verdünnungsschritte durchzuführen. Resultierende Proben dieser Wachstumsreaktion sind in Abbildung 20 dargestellt.

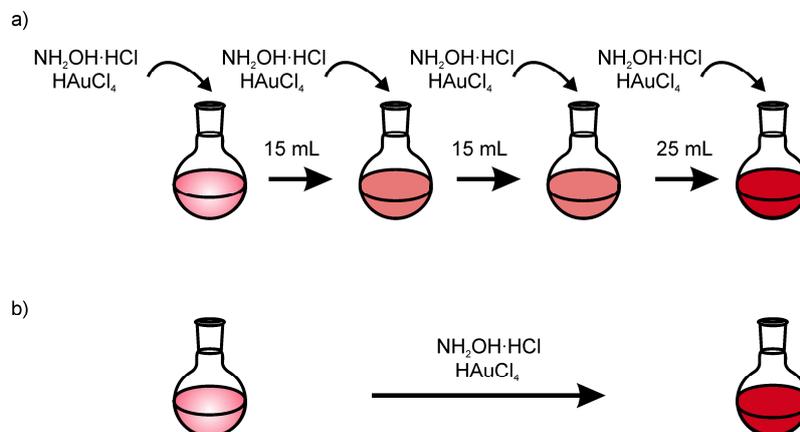


Abbildung 19: Schematische Darstellung des keimvermittelten Wachstums. a) Stufenweise Synthese nach Brown *et al.* b) In dieser Arbeit beschriebene einstufige Wachstumsreaktion.

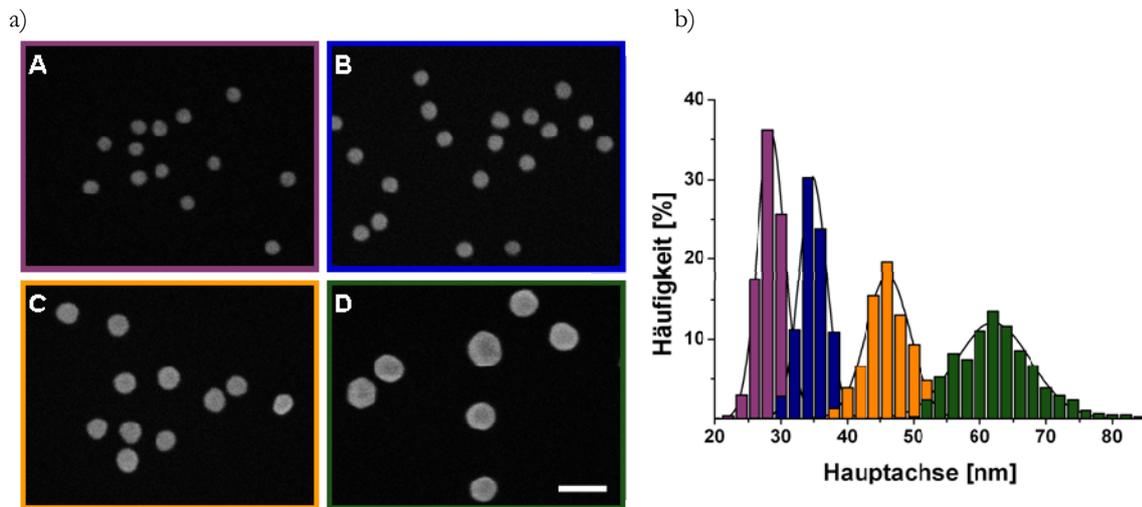


Abbildung 20: Auswertung der keimvermittelten Wachstumsreaktion. a) REM-Aufnahmen der Gold Nanopartikel Proben A \blacksquare : 28 ± 2 nm ($G = 1,08$); B \blacksquare : 34 ± 3 nm ($G = 1,06$); C \blacksquare : 46 ± 4 nm ($G = 1,10$); D \blacksquare : 62 ± 6 nm ($G = 1,13$). Der Maßstab beträgt 100 nm. b) Histogramm der Größenverteilung der Hauptachsen der jeweiligen Proben aus a). Es wurden mindestens 450 Partikel analysiert.

Die in Abbildung 20 dargestellten Partikel zeigen eine annähernd sphärische Form und eine geringe Größenverteilung von 10%. Weiterhin werden weniger als 3% Stäbchen und etwa 1% Dreiecke detektiert. Die sphärische Form der Partikel kann anhand der Elliptizität (G) abgeschätzt werden (s.o.). Wie in der Bildunterschrift (Abbildung 20) angegeben, liegen diese nahe eins, dem Wert, der einen vollkommenen Kreis beschreibt, während die in Abbildung 13 B gezeigten Partikel aus der Zitratsynthese nach Frens eine Elliptizität von 1,3 besitzen. Wenn monodisperse, einheitliche Partikel benötigt werden, ist die hier dargestellte keimvermittelte Synthese somit besser geeignet, als die direkte Synthese nach Frens.

Die in dieser Arbeit beschriebene einstufige Wachstumsreaktion kann visuell verfolgt werden, wie in Abbildung 21 a dargestellt. Der molare Extinktionskoeffizient der Nanopartikel nimmt mit steigendem Volumen der Partikel zu und so nimmt die Intensität der Rotfärbung der Lösung gleichermaßen mit wachsendem Partikeldurchmesser zu. Weiterhin kann das Fortschreiten der Reaktion mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt werden.¹⁸⁵ Zum Vergleich der jeweiligen Proben werden die UV/Vis-Spektren in Abbildung 21 b normiert.

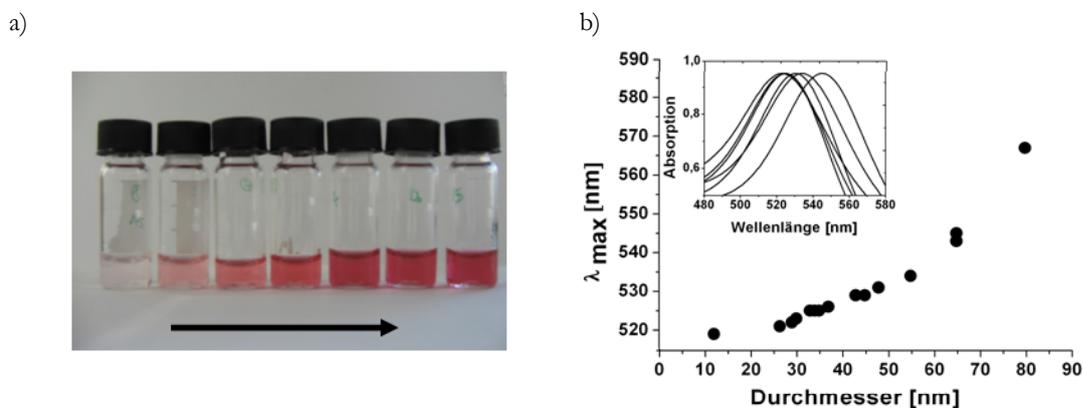


Abbildung 21: Verlauf der Wachstumsreaktion a) Partikelproben aus der Wachstumsreaktion; die Größe der Partikel nimmt in Pfeilrichtung zu; b) Das Resonanzmaximum in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers. Kleiner Ausschnitt: Normierte UV/Vis-Spektren der Proben verschiedener Größen.

Neben dem Extinktionskoeffizienten ist auch das Maximum der Plasmonresonanz von der Größe der Nanopartikel abhängig. Während des Wachstums erfolgt daher eine Verschiebung der Plasmonresonanz zu höheren Wellenlängen, wie in Abbildung 21 b im UV/Vis-Spektrum zu sehen. Wird die Plasmonresonanz in einer Kalibrierungskurve als Funktion des jeweilig bestimmten Partikeldurchmessers aufgetragen, kann der Durchmesser der Probe durch die Lage des Resonanzmaximums abgeschätzt werden.¹⁸⁵

Die Konzentration der in der Wachstumsreaktion eingesetzten Nanopartikel (c_{AuNP}) kann nach Formel 1 berechnet werden, wenn eine sphärische Form der Partikel vorausgesetzt wird.

$$c_{AuNP} = \frac{c_{Au}}{m_{AuNP}} = \frac{c_{Au}}{\frac{4}{3}\pi r^3 \rho} \quad (1)$$

Neben der Dichte ρ von Gold ($19,3 \text{ g/dm}^3$) wird der Radius (r) der Partikel benötigt, der mittels Auswertung der REM-Aufnahmen ermittelt wird. Die Konzentration des Goldes (c_{Au}) wird mittels ICP-OES (Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma) bestimmt, wobei die Nanopartikel hierzu vor der Messung mit Königswasser aufgelöst werden. Mit diesen zwei gemessenen Werten wird die Konzentration der Partikelkeime errechnet. Ist die Annahme der sphärischen Form der Partikel zulässig und die Bestimmung der beiden gemessenen Werte hinreichend exakt, sollte nach der Zugabe verschiedener Mengen an Gold(III)-chlorid eine Korrelation zwischen dem Durchmesser der gewachsenen Partikel und der Menge des zugefügten Goldsalzes bestehen. Voraussetzung hierfür ist zudem die vollständige Reduktion des zugegebenen Goldsalzes.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, stimmen die gemessenen Durchmesser der gewachsenen Nanopartikel in Abhängigkeit des zugegebenen Volumens an Gold(III)-chlorid gut mit dem errechneten Verlauf der Kurve überein. Damit wird zum Einen die Annahme der sphärischen Form bestätigt. Zum anderen zeigt dies die Zulässigkeit der hier durchgeführten Konzentrationsbestimmung der Nanopartikel, denn nur wenn die Konzentration der Keime korrekt ist, korrelieren die Durchmesser der gewachsenen Nanopartikel mit der berechneten Größe. Die gesamte Menge der eingesetzten Goldsäure wird vollständig an der Oberfläche vorhandener Keime reduziert und die erneute Keimbildung wird in dieser Synthese unterbunden.

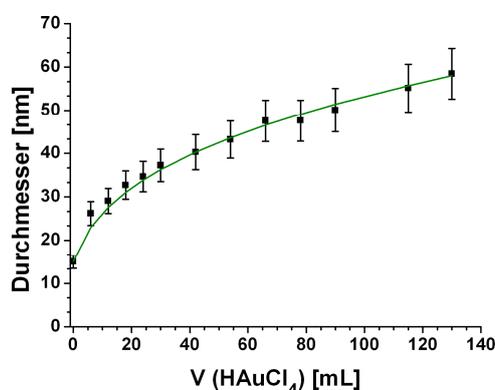


Abbildung 22: Durchmesser der Nanopartikel in Abhängigkeit von der Zugabe an Gold(III)-chlorid. ■: Proben der Gold Nanopartikel, —: theoretischer Verlauf der Größenverteilung in Abhängigkeit der Zugabe an Gold(III)-chlorid. Es wurden insgesamt $8,64 \times 10^{12}$ Keime mit einem Durchmesser von $14,8 \text{ nm}$ eingesetzt. Die Konzentration an Gold(III)-chlorid betrug $6,5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nun durch die genaue Zugabe einer errechneten Menge an Goldsäure der Durchmesser der entstehenden Nanopartikel vorhergesagt werden kann. Durch einfache Berechnung der benötigten Menge an Goldsäure kann damit die Synthese so durchgeführt werden, dass die erhaltenen Nanopartikel die gewünschte Größe besitzen. Dieses Vorgehen ermöglicht einen einfachen Zugang zu reproduzierbar monodispersen Nanopartikeln mit einem gewünschten Durchmesser. Durch die vorgestellte einstufige Wachstumsreaktion können gezielte Größen an monodispersen Gold Nanopartikeln synthetisiert werden, ohne aufwendige Aufreinigungen oder Verdünnungen durchzuführen. Die kontrollierte Darstellung der gewünschten Größe an Nanopartikeln erlaubt zudem eine Erleichterung und Beschleunigung der experimentellen Arbeit, da während der Synthese keine Proben zur Größenbestimmung entnommen werden müssen, um Nanopartikel mit einem kontrollierten Durchmesser herzustellen. Damit ist die hier beschriebene einstufige Wachstumsreaktion für viele verschiedene Anwendungsbereiche interessant, in denen sphärische und monodisperse Nanopartikel vorausgesetzt werden.

3.2 Stabilisierung der Gold Nanopartikel

In kolloidalen Suspensionen ist das Verhältnis von Oberflächenatomen zu Atomen im Volumen hoch, wodurch sie eine hohe Oberflächenenergie besitzen. Durch Agglomeration wird die Gesamtoberfläche verringert und so ein thermodynamisch stabilerer Zustand erreicht. Ein stabiles kolloidales System ist daher in der Kolloidchemie als ein Systemzustand definiert, welcher einer Flockulation oder Aggregation standhalten kann und den momentanen Dispersitätszustand beibehält (s. Kapitel 2.1.4).⁹⁵ Es ist bekannt, dass Gold Nanopartikel als metastabile Objekte in wässrigem Medium mit hoher Ionenstärke nicht stabil sind, sondern ihren Dispersitätszustand ändern. Dieser Prozess wird durch eine Blaufärbung der Suspension angezeigt, der auf eine Kopplung der Plasmonresonanz der Partikel zurückzuführen ist. Gelangen Nanopartikel durch Aggregation in räumliche Nähe zueinander, werden die Nanopartikel vom Licht nicht mehr homogen polarisiert, wodurch vermehrt Moden höherer Ordnung auftreten. Da diese Moden höherer Ordnung weniger energiereich sind, verschiebt sich die Plasmonresonanz größerer Nanopartikel wie auch die der Aggregate zu höheren und damit weniger energiereichen Wellenlängen.³⁰ Diesen Effekt macht man sich beispielsweise in der Entwicklung von kolorimetrischen Nachweisen zunutze (s. Kapitel 2.1.2). In anderen Anwendungen der Nanopartikel werden jedoch stabile kolloidale Systeme benötigt. Daher bedient man sich zur Stabilisierung der Suspension verschiedener oberflächenaktiver Zusätze wie Proteinen¹⁷⁴, Peptiden¹⁶⁵ oder auch DNA¹⁹¹ (s. Kapitel 2.1.5). Um zusätzlich die unspezifische Bindung von Proteinen aus der Lösung zu verringern, und die Wasserlöslichkeit der Partikel zu erhöhen, werden zudem Polymere wie beispielsweise Ethylenglykol-Derivate zur Passivierung eingesetzt. Diese können als niedermolekulare Liganden oder in Form von Polymeren mit entsprechend längeren Ketten eingesetzt werden. Untersuchungen zur Stabilisierungseffizienz unterschiedlicher Liganden werden im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Niedermolekulare Liganden

Für eine erfolgreiche Unterscheidung der synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren werden in dieser Arbeit Gold Nanopartikel mit einem Durchmesser ≥ 30 nm benötigt, die aufgrund ihrer räumlichen Ausdehnung nicht in den synaptischen Spalt diffundieren können. Nach der erfolgreichen Darstellung der Partikel mit einem entsprechenden Durchmesser (s. Kapitel 3.1.2), die eine geringe Größenverteilung besitzen, sollen diese nun funktionalisiert werden, um die Nanopartikel in hohen Salzkonzentrationen sowie in Zellkulturmedium in Suspension zu halten (s. Kapitel 1). In Lösungen hoher Salzkonzentration wird das Oberflächenpotential der Partikel herabgesetzt, so dass sich die Partikel annähern können und im Falle nicht ausreichender Stabilisierung aggregieren. Diese Tendenz zur Aggregation ist für große Nanopartikel nach der DLVO Theorie stärker ausgeprägt, als für kleine Nanopartikel (s. Kapitel 2.1.4). Dies ist auf attraktive van-der-Waals Wechselwirkungen zurückzuführen, welche von der Ausdehnung der beteiligten Partikel abhängt.

Zur Stabilisierung werden zunächst Liganden untersucht, die in der Literatur zur Passivierung kleiner Nanopartikel mit einem Durchmesser von 2 nm eingesetzt werden.^{122, 258, 259} Diese Liganden sind in Abbildung 23 dargestellt. Kleine Partikel üben eine geringere attraktive Wechselwirkung aufeinander aus als große Nanopartikel. Trotz dieser Tendenz werden für die Stabilisierung größerer Partikel mit einem Durchmesser von 40 nm zunächst diese aus der Literatur bekannten niedermolekularen Thiole untersucht, die kleine Nanopartikel hinreichend vor Aggregation schützen.

Der thiolierte Tetraethylenglykolmonomethylether **1**, sowie 11-Meraptoundekansäure **2** und Tetraethylenglykol mit einer zusätzlichen Alkylkette **3** wurden zunächst auf ihre Fähigkeit untersucht, die Suspension der hergestellten Nanopartikel zu stabilisieren. Zum Vergleich wurden sowohl Nanopartikel mit einem Durchmesser von 15 nm und Nanopartikel mit einem Durchmesser von 40 nm eingesetzt.

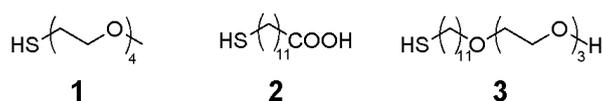


Abbildung 23: Niedermolekulare Thiole zur Stabilisierung der Gold Nanopartikel Suspension.

Liganden **1**, **2** und **3** werden jeweils einzeln zu der Suspension der 15 nm Partikel gegeben. Nanopartikel mit einem Durchmesser von 15 nm, die mit einer Monolage aus Liganden **1** funktionalisiert wurden, sind nur bis zu einer Salzkonzentration von 30 mM stabil. Dieser Wert der kritischen Koagulationskonzentration (Kapitel 2.1.4) ist mit dem Wert unfunktionalisierter Nanopartikel vergleichbar (s. Kapitel 3.2.3). Demgegenüber können 15 nm Partikel mit Ligand **3** bis zu einer Salzkonzentration von ≤ 400 mM stabilisiert werden. Thiol **3** kann vermutlich aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen der Alkylkette eine dichtere Monolage auf der Oberfläche der Nanopartikel ausbilden und ist daher befähigt, die Partikel zu stabilisieren. Die ebenfalls eingeführte PEG-Kette erhöht zudem die Löslichkeit der Partikel. Thiol **2** verringert die Löslichkeit der Partikel aufgrund der hydrophoben Alkylkette und ist trotz der Carbonsäure als Ladungsträger als alleiniger Ligand der Monolage in 15 nm Partikeln nicht geeignet.

Nanopartikel mit einem Durchmesser von 40 nm sind wesentlich weniger stabil (s.o.), als kleinere Nanopartikel und aggregieren schon unmittelbar nach Zugabe der Liganden **1**, **2** oder **3**.

Daher wird im nächsten Schritt zur Stabilisierung großer Nanopartikel untersucht, ob gemischte Monolagen dieser Liganden eine höhere Stabilisierungseffizienz aufweisen. In gemischten Monolagen werden die Eigenschaften verschiedener Liganden kombiniert. Durch synergetisches Zusammenwirken der Eigenschaften der verschiedenen Liganden kann der Grad an Stabilisierung möglicherweise erhöht werden. In einem Verhältnis von 1 zu 1 werden daher 11-Meraptoundekansäure **2** und die Ethylenglykol-Derivate **1** oder **3** zu den Nanopartikeln gegeben. Das Thiol **2**, welches mit einer Carbonsäure substituiert ist, soll aufgrund der negativen Ladung eine elektrostatische Stabilisierung der eingesetzten Partikel mit einem Durchmesser von 40 nm bewirken. In der Passivierungsreaktion mit Liganden **1** und **2** aggregieren die Partikel jedoch direkt nach der Zugabe der Liganden. Die vier Ethylenglykol-Einheiten reichen offenbar nicht aus, um eine Annäherung der Partikel zu verhindern und diese somit vor Aggregation zu schützen. Zusätzlich ist die Monolage aus Alkyl- und Ethylenglykolketten vermutlich nicht sehr dicht gepackt, so dass die Partikel untereinander interagieren können. Thiole **2/3** sollten aufgrund der negativen Ladung der Carbonsäure **2** und der Alkylkette des Tetraethylenglykols **3** eine dichtere Monolage und damit eine stärkere Stabilisierung der Partikel bewirken. Die resultierenden Partikel sind in der Tat bis zu einer Salzkonzentration von ≤ 170 mM NaCl stabil. Dies ist jedoch für die Anwendung im biologischen System nicht ausreichend. Damit sind die vorgestellten niedermolekularen Liganden zur Stabilisierung kleiner, 2 nm großen Partikel geeignet, nicht aber für die in dieser Arbeit benötigten größeren Nanopartikel mit einem Durchmesser von ≥ 30 nm.

3.2.2 Polyethylenglykol Derivate

Um eine Stabilisierung größerer Nanopartikel mit einem Durchmesser ≥ 30 nm zu bewirken, die in dieser Arbeit im biologischen System eingesetzt werden sollen, werden daher im Weiteren langkettige Polyethylenglykol-Derivate (PEG 3000) getestet (Abbildung 24). Diese Liganden können aufgrund sterischer Effekte eine stabilisierende Wirkung auf die kolloidale Suspension ausüben. Zwei verschiedene Systeme werden untersucht, darunter kommerziell erhältliche Thiol-funktionalisierte Polyethylenglykol-Derivate mit durchschnittlich $m = 68$ Ethylenglykol-Einheiten, sowie synthetisierte Alkyl-PEG 600-Derivate mit einer zusätzlichen Alkylkette und durchschnittlich $n = 12$ Ethylenglykol-Einheiten. Langkettige Polymere bestehen aus einer Verteilung verschiedener Kettenlängen und liegen nicht, wie die vorgestellten niedermolekularen Thiol-Liganden als ein definiertes Molekül vor.

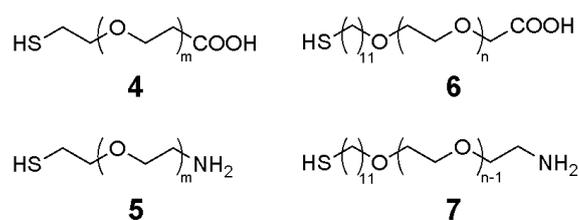


Abbildung 24: Langkettige Polyethylenglykol-Derivate zur Stabilisierung der Nanopartikel.^b

^b Liganden **6** und **7** wurden von Dr. Roberto Fiammengio synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Verteilung der Polymere kann im MALDI TOF Massenspektrum (MALDI: *engl.* matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation, TOF: *engl.* time-of-flight) detektiert werden. Diese Art der Massenspektrometrie ermöglicht die Charakterisierung von Polymeren mit einem hohen Molekulargewicht. Exemplarisch wird diese Verteilung für Polymer **6** gezeigt. Wie im Ausschnitt des Massenspektrums dargestellt (Abbildung 25), besteht Polymer **6** aus unterschiedlichen Kettenlängen mit durchschnittlich $n = 12$ Ethylenglykol Einheiten. Die farblich unterschiedlich markierten Serien ergeben sich aus dem Addukt des Polymers mit unterschiedlichen Kationen.

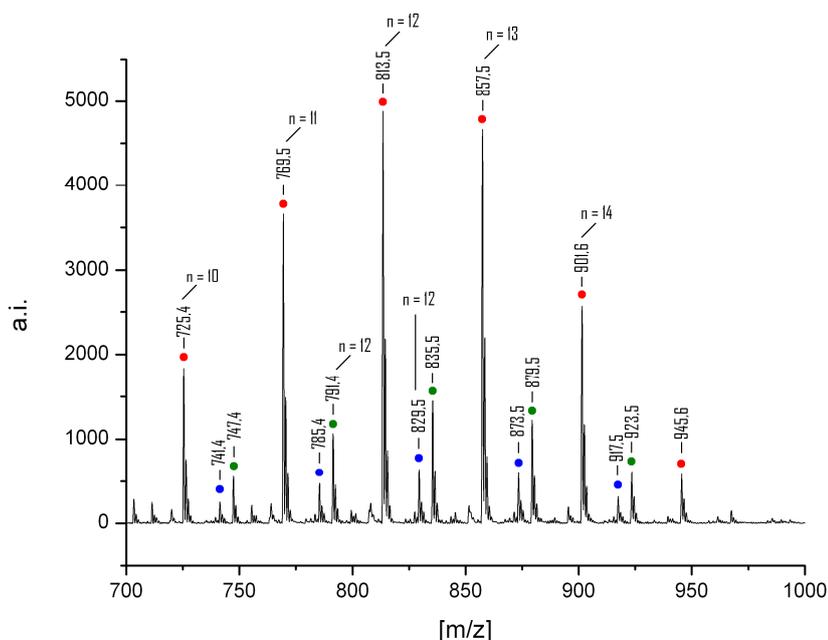


Abbildung 25: Repräsentatives MALDI TOF Massenspektrum von Polymer 6. Die verschiedenen Serien entsprechen dem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) des Polymers als Addukt mit dem jeweiligen Kation: ● = $[M + Na]^+$; ● = $[M + K]^+$; ● = $[M + H]^+$. Daten gemessen von Herrn Heiko Rudy, Spektrum aufbereitet von A. Lint und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die in Abbildung 24 dargestellten Thiol-Liganden **4** und **6** sollen eingesetzt werden, um die hergestellten Nanopartikel vor Aggregation zu schützen. Um eine hinreichende Stabilisierungseffizienz zu generieren, sind diese Liganden mit einer Carbonsäure substituiert. Dadurch kann neben der sterischen Stabilisierung eine elektrostatische Abstoßung der Partikel induziert werden. Wie im UV/Vis-Spektrum zu sehen (Abbildung 26), sind Thiole **4** und **6** in einer Monolage befähigt, die großen Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 35 nm bis zu einer getesteten Salzkonzentration ≤ 2 M zu stabilisieren. Nicht funktionalisierte Nanopartikel hingegen aggregieren bei dieser Salzkonzentration direkt (s. Abbildung 27). Durch die Funktionalisierung der Nanopartikel verschiebt sich das Maximum der Plasmonresonanz im Vergleich zu den nicht passivierten Nanopartikeln zu höheren Wellenlängen. Nicht funktionalisierte Partikel besitzen eine Plasmonresonanz von 526 nm. Nach der Funktionalisierung liegt die Plasmonresonanz bei 528 nm für das PEG 3000 und bei 527 nm für das Alkyl-PEG 600 System. Diese Verschiebung ist zwar gering, jedoch reproduzierbar zu messen. Aufgrund der stark erhöhten Stabilität kann die erfolgreiche Bindung der Thiole an die Oberfläche der Nanopartikel bestätigt werden. Diese Stabilität wird im Weiteren mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht.

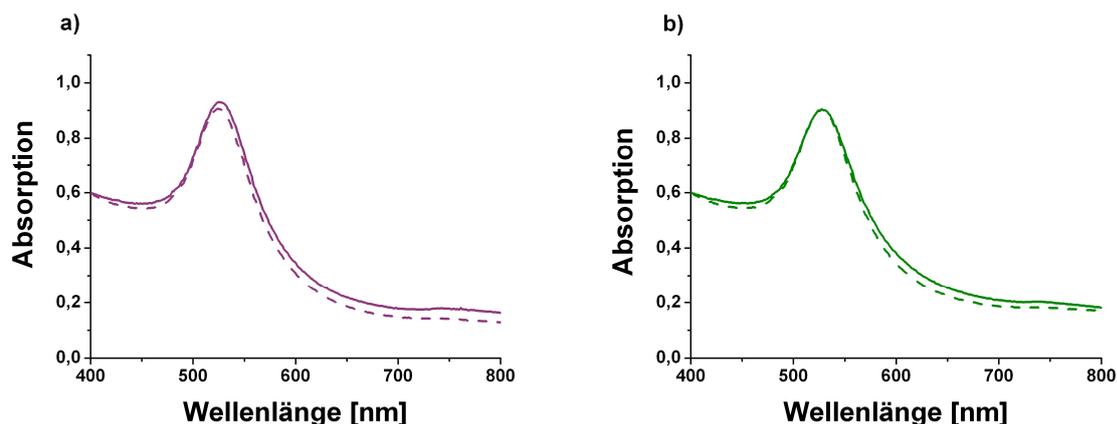


Abbildung 26: Normiertes UV/Vis-Spektren von Gold Nanopartikeln. a) Nanopartikel passiviert mit PEG 3000 Thiolen **4**: dispergiert in Wasser; (—): dispergiert in 2M NaCl-Lösung (---). b) Nanopartikel passiviert mit Alkyl-PEG 600 Thiolen **6**: dispergiert in Wasser; (---): dispergiert in 2M NaCl-Lösung (—). $\varnothing = 35 \pm 4$ nm.

3.2.3 Untersuchung der Stabilität mittels UV/Vis-Spektroskopie

Die in dieser Arbeit hergestellten Nanopartikel sollen nach erfolgreicher Stabilisierung mit bioaktiven Peptiden funktionalisiert werden. Daher werden im nächsten Schritt die Nanopartikel mit einer gemischten Monolage aus ω -Amino und ω -Carbonsäure substituierten Liganden **4/5** bzw. **6/7** geschützt. Die Carbonsäure stabilisiert die Nanopartikel aufgrund der negativen Ladung (s. Kapitel 3.2.2), während die Aminogruppen der späteren Funktionalisierung dienen sollen (s. Kapitel 3.5). Nanopartikel, die ausschließlich mit Thiolen **5** und **7** passiviert werden, aggregieren bereits in der Reaktionslösung und sind daher als Passivierungsliganden nicht geeignet. Aminogruppen besitzen ebenfalls eine geringe Bindungsaffinität zu Gold. Daher können die ω -Amino Thiole an zwei unterschiedliche Partikel verbrückend binden, wodurch die Partikel koagulieren.⁹⁵ Um die Stabilisierung der Nanopartikel mit Thiolen **4/5** und **6/7** zu untersuchen, werden verschiedene Zusammensetzungen der gemischten Monolage getestet, indem das Verhältnis von ω -Amino Thiolen **5/7** zu ω -Carbonsäuren **4/6** variiert wird. Der Anteil der ω -Amino Thiole **5** und **7** kann anhand des Molenbruchs $x(\text{NH}_2)$ beschrieben werden. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten der Konzentration an ω -Amino Thiolen **5** oder **7** und der gesamten Ligandenkonzentration. Nanopartikel mit verschiedenen Passivierungszusammensetzungen sind bis zu einem Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ von 0,33 während Reaktion und Aufarbeitung stabil und werden im Weiteren in Medien hoher Salzkonzentrationen getestet. Als empirische Größe zur Auswertung der Stabilität der Suspensionen wird der Aggregationsparameter berechnet.¹⁶⁵ Dieser wird aus UV/Vis-Spektren erhalten, indem die Fläche zwischen 600 und 700 nm integriert wird, die das UV/Vis-Spektrum begrenzt. Als Referenz A_0 gilt die integrierte Fläche der initialen Probe, die in Wasser dispergiert wird. Diese ist in Abbildung 27 a schraffiert dargestellt. Der Aggregationsparameter der Proben wird nach $(A-A_0)/A_0$ errechnet, wobei A die Fläche des UV/Vis-Spektrums zwischen 600 und 700 nm der jeweiligen Salzkonzentration beschreibt.¹⁶⁵ Diese ist für unfunktionalisierte Nanopartikel in Abbildung 27 b schraffiert dargestellt.

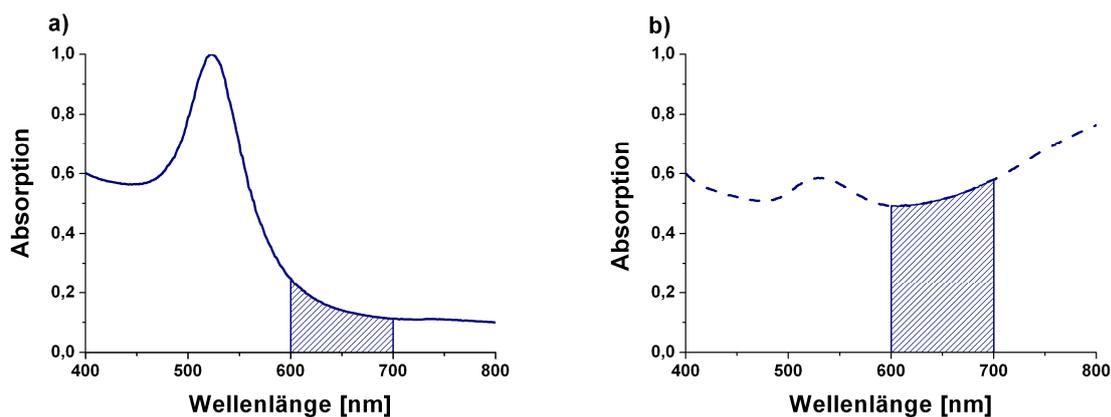


Abbildung 27: Normierte UV/Vis-Spektren von unfunktionalisierten Gold Nanopartikeln. a) In wässriger Lösung b) In 0,4 M Salzlösung. Zur Bestimmung des Aggregationsparameters wird jeweils die schraffierte Fläche zwischen 600 und 700 nm integriert. Die Fläche in a) beschreibt die Fläche der initialen Probe (A_0), die Fläche in b) die der Probe (A). Nach $(A-A_0)/A_0$ berechnet sich der Aggregationsparameter. $\varnothing = 35 \pm 4$ nm.

Die Fläche, die durch das UV/Vis-Spektrum zwischen 600 und 700 nm begrenzt wird, nimmt im Vergleich zur wässrigen Lösung in a) für eine Salzkonzentration von 400 mM zu. Dies bedeutet, dass die unfunktionalisierten Nanopartikel bereits durch Zugabe von 400 mM Salzkonzentration aggregiert sind (s. Kapitel 5.3.2). Daraus resultiert gleichermaßen eine Zunahme des Aggregationsparameters. Anhand dieser Zunahme des Aggregationsparameters kann somit der Grad der Aggregation abgeschätzt werden. Dieser Aggregationsparameter ist für die verschiedenen Proben in Abhängigkeit der Salzkonzentration in Abbildung 28 aufgetragen.

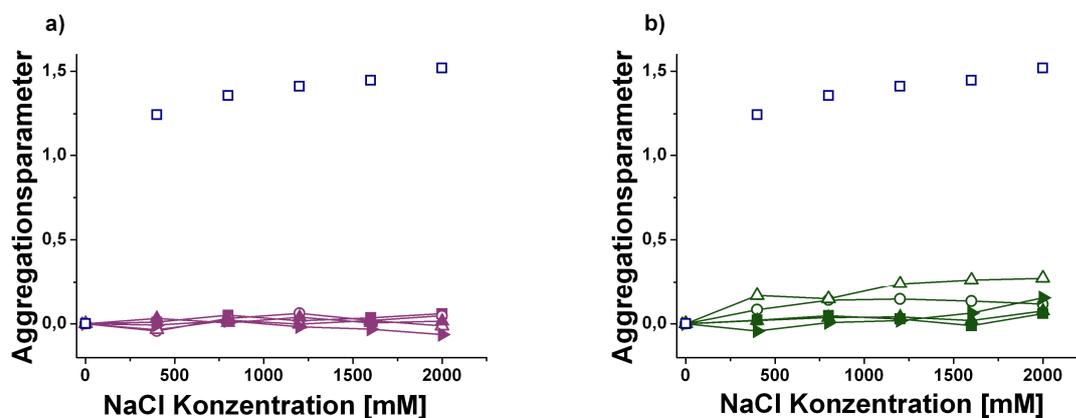


Abbildung 28: Der Aggregationsparameter als Funktion der Salzkonzentration der Lösung. \square : nicht funktionalisierte Nanopartikel a) PEG 3000 passivierte Nanopartikel mit verschiedenen Molenbrüchen $x(\text{NH}_2)$; \blacksquare : 0,09, \circ : 0,17, \triangle : 0,23, \blacktriangle : 0,27, \blacktriangleright : 0,33. b) Alkyl-PEG 600 passivierte Partikel mit verschiedenen Molenbrüchen $x(\text{NH}_2)$: \blacksquare : 0,09, \circ : 0,17, \triangle : 0,23, \blacktriangle : 0,27, \blacktriangleright : 0,33. $\varnothing = 35 \pm 4$ nm.

Die eben beschriebenen unfunktionalisierten Nanopartikel (\square) aggregieren erwartungsgemäß bereits in der ersten gemessenen Salzkonzentration von 400 mM NaCl. Messungen dieser unfunktionalisierten Nanopartikel in geringeren Salzkonzentrationen zeigen, dass diese Partikel bereits bei einer Konzentration von 28 mM NaCl aggregieren. Die Proben hingegen, die mit verschiedenen Molenbrüchen $x(\text{NH}_2)$ der ω -Amino Thiolen **5** und **7** passiviert werden, zeigen eine gute Stabilität bis zu einer Salzkonzentration von mindestens 2 M NaCl. Die PEG 3000 basierten Thiole **4/5**, sowie die Alkyl-PEG 600 basierten Thiole **6/7** sind somit befähigt, die Nanopartikel auch in hohen Salzkonzentrationen vor Aggregation zu schützen.

In der Literatur werden Peptide eingesetzt, die mittels kombinatorischer Chemie entwickelt wurden, um Nanopartikel nach dem Vorbild stabiler Proteine zu schützen. Diese wurden bis zu einer Salzkonzentration von 1,5 M Natriumchlorid getestet. Dieses Peptid mit der Sequenz CALNN stabilisiert die 12 nm große Partikel bis zu einer Salzkonzentration von 1 M NaCl.¹⁶⁵ Damit sind die hier vorgestellten PEG-passivierten Nanopartikel mit einem Durchmesser von 35 nm stabiler gegenüber Aggregation im Vergleich zu den 12 nm CALNN-geschützten Partikeln.

Da die präparierten Proben im zellulären System eingesetzt werden sollen, wird im Weiteren die Stabilität in Zellkulturmedium (DMEM) über einen Zeitraum von 24 Stunden getestet (Abbildung 29). Zellkulturmedium enthält neben einer hohen Anzahl an verschiedenen Salzen zudem kleine Moleküle, die Thiolgruppen enthalten, wie beispielsweise Cystein ($c = 0,5 \text{ mM}$). Diese thiolhaltigen Moleküle können in einer Ligandenaustauschreaktion die langkettigen, stabilisierenden PEG-Thiole von der Oberfläche abzulösen. Daher muss eine Lösungsmittelvermittelte Aggregation ebenfalls in Zellkulturmedium untersucht werden, um zu überprüfen, ob die passivierten Nanopartikel auch in diesem Medium stabil sind.

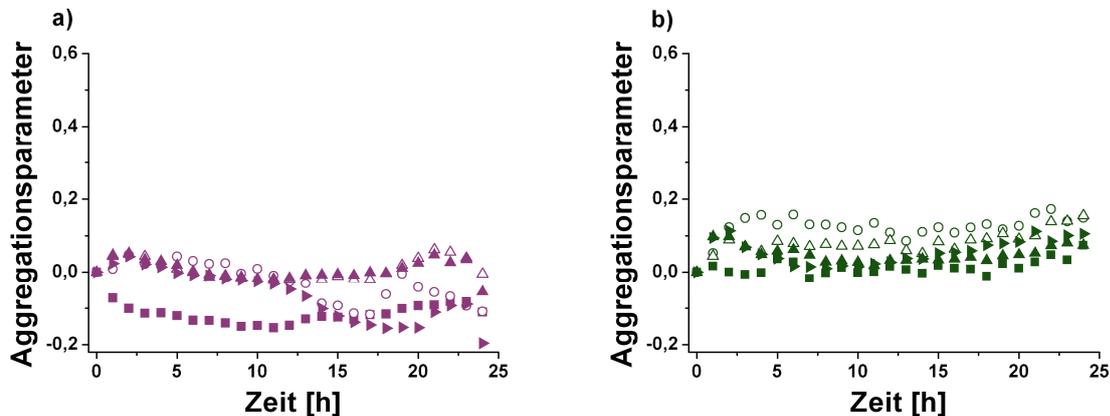


Abbildung 29: Der Aggregationsparameter in Zellkulturmedium als Funktion der Zeit. a) PEG 3000 Thiole 4/5 passivierte Nanopartikel mit verschiedenen Molenbrüchen $x(\text{NH}_2)$; ■: 0,09, ○: 0,17, △: 0,23, ▲: 0,27, ►: 0,33. b) Alkyl-PEG 600 Thiol 6/7 passivierte Partikel mit verschiedenen Molenbrüchen $x(\text{NH}_2)$; ■: 0,09, ○: 0,17, △: 0,23, ▲: 0,27, ►: 0,33. $\varnothing = 35 \pm 4 \text{ nm}$.

Da die nicht passivierten Nanopartikel unmittelbar nach Zugabe des Zellkulturmediums aggregieren, können in diesen Zeitmessungen die unfunktionalisierten Partikel nicht als Referenz dargestellt werden. Nanopartikel, welche entweder mit PEG 3000 basierten Thiolen 4/5, oder mit Alkyl-PEG 600 basierten Thiolen 6/7 funktionalisiert werden, sind in Zellkulturmedium im gesamten gemessenen Zeitfenster von 24 Stunden stabil. Wie in Abbildung 29 gezeigt, ändert sich der Aggregationsparameter der Proben nicht. Dies gilt für alle getesteten Zusammensetzungen der Passivierungsschicht mit einem Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ zwischen 0,09 und 0,33 der ω -Amino Thiole 5 in a) und der ω -Amino Thiole 7 in b). Da die hier hergestellten Nanopartikel ausreichende Stabilität in Zellkulturmedium beweisen, können diese PEG-stabilisierten Nanopartikel im Folgenden bezüglich ihrer Schichtdicke (s. Kapitel 3.3) sowie ihrer Oberflächenfunktionalisierung charakterisiert werden (s. Kapitel 3.4). Die Funktionalisierung mit dem bioaktiven Peptid wird anschließend in Kapitel 3.5 beschrieben.

3.3 Charakterisierung der Schichtdicke

Zur Stabilisierung der Gold Nanopartikel Suspension werden die Partikel mit Polymeren funktionalisiert. Durch diese Polymerschicht besitzen die resultierenden Partikel im Vergleich zu den ursprünglichen Partikeln einen größeren Durchmesser. Weiterhin interagieren die immobilisierten Polymere mit dem Lösungsmittel und werden von diesem solvatisiert. Hierdurch wird der effektive Durchmesser des Gesamtsystems ebenfalls beeinflusst. Um die effektive Größe solcher Partikel einschließlich der Polymerschicht zu bestimmen, muss eine Methode eingesetzt werden, die neben dem anorganischen Kern auch die organische Polymerschicht sensitiv detektiert. Techniken, wie beispielsweise SAXS (Kleinwinkel-Röntgenstreuung) oder REM und TEM können die Größe des Metallkerns sensitiv detektieren. Diese sind aber weniger sensitiv für die Bestimmung der Ausdehnung der Hülle, da letztere weder eine hohe Röntgenstreuung induziert,^{126, 191} noch eine ausreichende Elektronendichte aufweist.¹⁸⁶

Eine weitere Schwierigkeit stellt die starke Solvation der in dieser Arbeit eingesetzten PEG-Derivate dar. Im Durchschnitt binden zwei bis drei Wassermoleküle pro Ethylenglykoleinheit.¹²⁷ Durch diese hohe Konzentration an Wasser ist die Polymerschicht für viele Detektionsmethoden praktisch unsichtbar.

Die Bestimmung der effektiven Gesamtgröße der Nanopartikel ist für die hier vorgestellte Anwendung bedeutend. Der Durchmesser der Partikel darf zur Unterscheidung synaptischer und extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren nicht kleiner als die Spaltbreite der Synapse sein. Diese beträgt in hippocampalen Neuronen durchschnittlich 23 nm (s. Kapitel 3.8.1). Größere Nanopartikel besitzen jedoch generell eine höhere Tendenz zur Aggregation als kleinere Partikel. Somit ist die Synthese und Verwendung möglichst kleiner Gold Nanopartikel erstrebenswert. Durch eine genaue Bestimmung der Gesamtgröße der Partikel, also des Kerns zuzüglich der Schale, kann der Durchmesser des reinen Goldpartikels minimiert und folglich die Aggregationstendenz erniedrigt werden. Solche kleineren Nanopartikel könnten zudem vermutlich in der Membran verborgene extrasynaptische NMDA-Rezeptoren erreichen, die für die größeren Nanopartikel nicht adressierbar sind.

Zur Bestimmung der effektiven Gesamtgröße der Nanopartikel werden zwei unterschiedliche Verfahren vorgestellt, die in dieser Arbeit eingesetzt werden. Wie in der Literatur beschrieben, eignet sich die Auswertung der TEM- oder REM-Aufnahmen indirekt zur Bestimmung der Schichtdicke.¹⁸⁶ Bilden die passivierten Partikel auf dem TEM Grid eine dichte Packung, so berühren sich die einzelnen, passivierten Partikel nicht. Über diesen Abstand der Partikel kann die Schichtdicke der Polymerschicht abgeschätzt werden. Da die Probe jedoch zur Messung getrocknet werden muss, können Solvationseffekte nicht berücksichtigt werden. Zusätzlich addieren sich bei dieser Art der Auswertung die Standardabweichung der Größenverteilung der Partikel sowie die der Dicke der Polymerschicht.^c Eine weitere generelle Schwierigkeit bei dieser Art der Messung liegt in der Probenpräparation. Die Nanopartikel müssen eine weitestgehend dichte Packung bilden, um nicht vereinzelt auf dem Grid vorzuliegen, da nur so der Abstand zweier Partikel die Polymerschichtdicke liefert. Gleichzeitig wird angenommen, dass sich die Polymerliganden nicht durchdringen.

^c Die Polymere bestehen aus einer Verteilung verschiedener Kettenlängen.

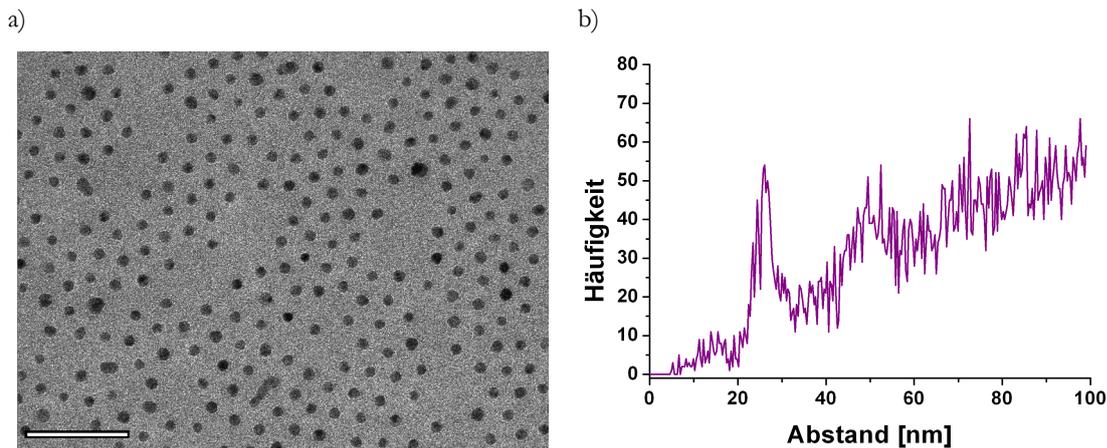


Abbildung 30: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Gold Nanopartikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 15 nm und die zugehörige Auswertung des Abstandes der Partikelzentren. Der Maßstab beträgt 100 nm. Die Partikel sind mit Thiolen **4** und **5** passiviert, wobei der Molenbruch des Amins **5** $x(\text{NH}_2)$ 0,4 beträgt. Das erste Maximum des Partikelabstandes liegt bei 26 nm, somit ergibt sich für die Polymerschicht eine minimale Dicke von 5,5 nm. TEM-Aufnahme angefertigt von Fania Geiger.

Ist dies entgegen der Annahme der Fall, verringert sich der Abstand zweier Kerne zusätzlich zu den vorher erwähnten Trocknungseffekten. Der erhaltene effektive Durchmesser dieser Methode wird somit als Minimaldurchmesser der funktionalisierten Partikel angesehen. Abbildung 30 zeigt eine TEM-Aufnahme von PEG 3000 passivierten Partikeln mit einem Golddurchmesser von 15 nm und die zugehörige Auswertung des Abstandes der Partikel, mit der die Polymerschichtdicke bestimmt wird. Mit einem mathematischen Programm können die Abstände der jeweiligen Partikelzentren bestimmt werden.^d Das erste Maximum der Abstandsfunktion (h) entspricht somit einer Länge der doppelten Passivierungsschicht ($2p$) zuzüglich des doppelten Radius ($2r$) des Partikels ($h = 2r + 2p$). Das erste Maximum der Abstandsbestimmung liegt bei 26 nm. Dies entspricht gleichzeitig dem effektiven Partikeldurchmesser, wobei die Polymerschicht mit einer Dicke von 5,5 nm erheblich zum Gesamtdurchmesser beiträgt.

Auch passivierte Nanopartikel mit einem Durchmesser von 30 nm werden diesbezüglich mit Elektronenmikroskopie analysiert. Sowohl PEG 3000 basierte Thiole **4/5** als auch Alkyl-PEG 600 Thiol **6/7** passivierte Nanopartikel werden mittels der Abstandsmessung analysiert. Die zugehörigen REM-Aufnahmen sind in Abbildung 31 dargestellt. Die effektiven Durchmesser betragen hier für das Alkyl-PEG 600 System **6/7** 36 nm und für das PEG 3000 System **4/5** 40 nm, woraus die minimale Dicke der Polymerschicht ermittelt werden kann. Für PEG 3000 basierte Thiole **4/5** ergibt sich ein Wert von 5 nm, der nach dieser Messung gut mit dem Wert der PEG 3000 passivierten Partikel mit einem Durchmesser von 15 nm übereinstimmt (s.o.). Für PEG 3000 basierte Thiole **4/5** ergibt sich ein Wert von 5 nm, der nach dieser Messung gut mit dem Wert der PEG 3000 passivierten Partikel mit einem Durchmesser von 15 nm übereinstimmt (s.o.). Die Größe der Nanopartikel scheint die Dicke der Passivierungsschicht erwartungsgemäß nicht erheblich zu beeinflussen. Für Alkyl-PEG 600 basierte Thiole **6/7** ergibt sich ein Wert von 3 nm.

^d Programm geschrieben von Dr. Stefan Kudera und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

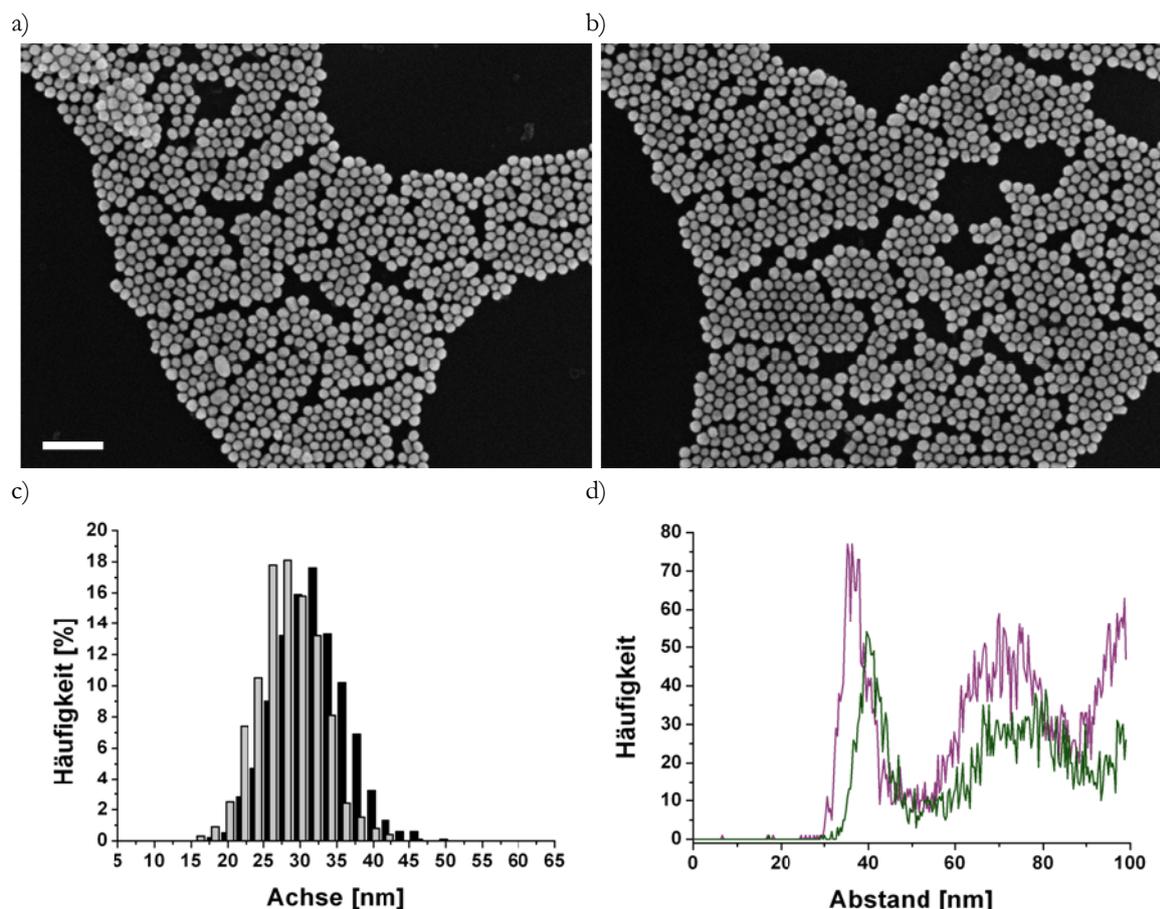


Abbildung 31: Auswertung der Polymerschichtdicke durch Abstandsmessungen der Partikelzentren von 30 nm Partikeln. a) REM-Aufnahmen von Alkyl-PEG 600 Thiolen 6/7 passivierte Nanopartikel b) REM-Aufnahmen von PEG 3000 Thiolen 4/5 passivierte Nanopartikel. Der Maßstab beträgt 200 nm c) Größenverteilung der Haupt- und Nebenachse der unfunktionalisierten Nanopartikel. ■: Hauptachse, ■: Nebenachse. Der durchschnittliche Durchmesser beträgt 30 ± 3 nm. d) Abstandsmessung der Partikelzentren der jeweiligen REM-Aufnahmen aus a) ■: 36 nm (Polymerschichtdicke: 3 nm) und b) ■: 40 nm (Polymerschichtdicke: 5 nm).

Da mit dieser Methode der Einfluss der Solvationseffekte nicht untersucht werden kann, wird als ergänzende Charakterisierungsmethode die Dynamische Lichtstreuung (DLS) eingesetzt, um den effektiven Durchmesser der Partikel in Lösung zu bestimmen. DLS ist eine etablierte Technik, mit der hydrodynamische Radien¹⁸⁹ und Aggregationseffekte^{190, 260} von Suspensionen bestimmt werden können. In der dynamischen Lichtstreuung wird das an suspendierten Nanopartikeln gestreute Licht in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Trifft monochromatisches Licht auf kleine Partikel, die als Diskontinuität im Dispersionsmedium angesehen werden können, wird dieses durch die sogenannte Rayleigh-Streuung in alle Richtungen gestreut. Die Brownsche Molekularbewegung der Streuzentren führt zu einer zeitlich veränderten Interferenz des Streulichts zweier räumlich benachbarter Partikel. Diese Interferenzen erzeugen eine detektierbare zeitliche Fluktuation in der Streulichtintensität, die Informationen über die Diffusion der Teilchen liefert. Durch die unterschiedlich schnellen Bewegungen von großen und kleinen Nanopartikeln entsteht eine definierte Korrelationsfunktion, aus der über eine mathematische Auswertung der Diffusionskoeffizient D der dispergierten Partikel bestimmt werden kann.¹⁹² Über die Stokes-Einstein Beziehung (Formel 2) wiederum kann aus dem Diffusionskoeffizienten der hydrodynamische Radius R_h der dispergierten Probe ermittelt werden. Hierbei beschreibt D den Diffusionskoeffizienten, k_B die Boltzmann Konstante, T die

Temperatur und η die Viskosität des Lösungsmittels. Per Definition entspricht der hydrodynamische Radius R_h dem Radius einer wechselwirkungsfreien harten Kugel, welche den gleichen Diffusionskoeffizienten besitzt wie das untersuchte Teilchen.¹⁹² Die Messung der Dynamischen Lichtstreuung erlaubt also die Größenbestimmung des Gesamtpartikels, der aus dem Kern zuzüglich der Polymerschicht besteht. Durch die Messung in Lösung werden ebenfalls Solvatationseffekte berücksichtigt.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta R_H} \quad (2)$$

Die vorgestellten ersten Experimente der DLS werden in Kooperation mit Dr. Reinhard Sigel, Adolphe Merkle Institute, Fribourg durchgeführt. Die hier eingesetzte Apparatur ermöglicht, anders als in herkömmlichen Zetasizern, eine sensitive und zudem winkelabhängige Messung der Streuintensität. Für harte, monodisperse, kugelförmige Partikel ist der Diffusionskoeffizient D unabhängig vom Streuwinkel. Eine Winkelabhängigkeit weist dagegen auf Abweichungen vom idealisierten Modell hin. Zur Ermittlung des korrekten Radius werden die Intensitätsfluktuationen (I) in Abhängigkeit der Zeit (t) bei verschiedenen Streuwinkeln vermessen.

Hierbei sind Messungen bei kleineren Winkeln sensitiver für Staubpartikel, da diese in Vorwärtsrichtung streuen, während Messungen bei größeren Streuwinkeln durch vorhandene Staupartikel weniger stark beeinflusst werden. Die Messung bei größeren Streuwinkeln reduziert zudem die auftretende Mehrfachstreuung.²⁶¹

Der Streuwinkel wird als Streuvektor q angegeben, wobei n den Brechungsindex der Lösung, λ die Wellenlänge des Lasers und θ den Streuwinkel beschreiben.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3)$$

Aus diesen Intensitätsfluktuationen wird mathematisch die Autokorrelationsfunktion $G(t)$ ermittelt, die die Intensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander korreliert. Für ideal monodisperse und harte Partikel kann diese Autokorrelationsfunktion einfach gefittet werden, wobei $1/\tau = \Gamma = Dq^2$ gilt und D_{app} den apparenten Diffusionskoeffizienten und Γ die mittlere Zeit der Autokorrelationsfunktion beschreiben:

$$G(t) = e^{-D_{app} \cdot q^2 t} = e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4)$$

Da die vermessenen Partikel eine geringe Polydispersität besitzen, muss die Größenverteilung berücksichtigt werden. Die Korrelationsfunktion kann nicht mehr durch eine einfache Exponentialfunktion ausgedrückt werden. Stattdessen müssen die pro Partikelgröße erstellten Exponentialfunktionen überlagert werden. Die einzelnen Funktionen müssen zusätzlich durch die entsprechenden Streuintensitätsbeiträge der einzelnen Partikelfraktionen gewichtet werden. Zur manuellen Auswertung der Partikel wird das Programm CONTIN eingesetzt.²⁶²

$$G(t) = \int P(R) e^{-D(R)q^2 t} dR \quad (5)$$

$$G(t) = \int \bar{P}(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \quad (6)$$

Hiermit können bimodale Verteilungen ermittelt werden, vorausgesetzt, die inversen Relaxationszeiten der Partikel unterscheiden sich deutlich mehr als ein Faktor 2. Durch eine mathematische Umformung wird die Verteilung ($\bar{P}(\Gamma)$) der inversen Relaxationszeit ermittelt. Wird die Verteilung $P(\tau)$ gegen $\log \tau$ aufgetragen, kann eine Gaußfunktion an die Verteilung angepasst werden. Die Auftragung der Relaxationszeit τ gegen das Quadrat des Streuvektors q^2 muss eine Gerade mit einer Steigung ergeben, da die Relaxationszeit vom Streuwinkel abhängt. Größere Winkel haben kürzere Relaxationszeiten während bei kleineren Streuwinkeln die Zeit länger dauert, in der die Interferenz der Partikel abgefallen ist. Zeigen die gemessenen Gaußfunktionen diese Eigenschaft, so kann der Diffusionskoeffizient D_0 ermittelt werden, indem D_{app} gegen q^2 aufgetragen wird und der Graph gegen 0 extrapoliert wird.

$$D_{app}(q^2) = D_0(1 + cq^2 R_g^2) \quad (7)$$

Durch diese manuelle Auswertung mit dem Programm CONTIN kann die Qualität der Daten in jedem Schritt beurteilt werden, anders als bei herkömmlichen Zetasizern mit automatischer Auswertung.

Nanopartikel mit einem Durchmesser von 13 nm werden mit DLS nach dem beschriebenen Verfahren vermessen (Tabelle 2). Die synthetisierten Nanopartikel ohne Funktionalisierung (Eintrag 1) besitzen einen hydrodynamischen Durchmesser von 18 nm. Dieser ist ohne Passivierung bereits größer, als der aus TEM-Aufnahmen analysierte Radius von 13 nm. Die passivierten Nanopartikel (Einträge 2 und 3) hingegen besitzen nach der DLS einen hydrodynamischen Durchmesser von 25,2 nm (Alkyl-PEG 600) und 33,4 nm (PEG 3000). Aus dem Vergleich der Durchmesser der passivierten Partikel mit dem der nicht passivierten Partikel lässt sich die Schichtdicke der Polymere bestimmen. Diese sind mit 3,6 bzw. 7,7 nm wie zu erwarten etwas größer, als die Werte der elektronenmikroskopischen Abstandsbestimmung. Diese Unterschiede der Polymerdicke können auf Solvatationseffekte in der DLS oder auf die Wechselwirkung der Liganden in den Abstandsmessungen zurückgeführt werden. Für unfunktionalisierte Nanopartikel, die nach REM-Auswertung einen durchschnittlichen Durchmesser von 30 ± 3 nm besitzen, wird ein hydrodynamischer Durchmesser von 60 nm gemessen. Die mit PEG 3000 Thiolen **4/5** bzw. mit Alkyl-PEG 600 Thiolen **6/7** passivierten Nanopartikel ergaben ebenfalls jeweils einen hydrodynamischen Durchmesser von 60 nm. Möglicherweise ist die Polydispersität der 30 nm Probe, die zwar im Vergleich mit anderen Gold Nanopartikel Synthesen gering ist, für die Messung der DLS zu hoch.²⁶³ Zusätzlich kann die Anwesenheit von Aggregaten die Messung empfindlich beeinflussen, so dass die Unterschiede der Passivierungsschicht nicht detektiert werden können. Die Streuintensität eines Streuzentrums korreliert mit der sechsten Potenz seines Radius. Sind demnach Aggregate in der Probe vorhanden, stören diese die Messmethode empfindlich. Im Weiteren soll eine verbesserte Aufreinigung die Partikel von den Aggregaten trennen, damit auch die Polymerschichtdicke der 30 nm Partikel auch mittels DLS bestimmt werden kann.

Verschiedene PEG-Polymere werden in der Literatur auf ihren Beitrag zum Partikeldurchmesser untersucht.¹⁸⁶ Dabei sollte die Dicke der Polymerschicht mit der effektiven Länge der Polymere übereinstimmen.

Tabelle 2: Partikelgrößenbestimmung mittels Dynamischer Lichtstreuung.

| Eintrag | Passivierung | D_{REM}^1 | $D_{\text{h}}^2(\sigma)$ | d_{polymer}^3 |
|----------|--------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | - | 13,0 | 18,0 (0,74) | - |
| 2 | 6/7 | - | 25,2 (0,48) | 3,6 |
| 3 | 4/5 | - | 33,4 (1,02) | 7,7 |

¹Gold Nanopartikel ausgewertet mittels TEM: Hauptachse = $13,8 \pm 1$ nm, Nebenachse = $12,4 \pm 1$ nm, daraus wird der durchschnittliche Radius ermittelt. ²Hydrodynamischer Durchmesser aus Dynamischer Lichtstreuung ³Schichtdicke des Polymers errechnet durch Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser der Proben. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt für beide Passivierungssysteme 0,14.

Betrachtet man eine gestreckte PEG-Kette, kann die maximale Dicke der Ligandenhülle abgeschätzt werden. Da vollständig gestreckte Ketten aus entropischen Gründen nicht vorliegen, sollte die effektive Länge des Polymers geringer sein, als die Kettenlänge bei vollständiger Streckung. Unter der Annahme, dass eine Ethylenglykol-Einheit eine Länge von $2,42\text{\AA}$ besitzt^e, kann für die aus durchschnittlich 68 Einheiten bestehende PEG 3000 Thiole **4/5** eine gestreckte Länge von ~ 16 nm berechnet werden. Für die maximale Länge der Alkyl-PEG 600 Thiole **6/7** ergibt sich ein entsprechender Wert von $\sim 4,2$ nm, wobei für die Berechnung der Maximallänge der Alkylkette einen Wert von 10\AA angenommen wurde. Damit liegen die in dieser Arbeit bestimmten Schichtdicken innerhalb der maximal möglichen Ausdehnung des Polymers.

Die Messung der Polymerschichtdicken stellt aufgrund der hohen Solvation der Ethylenglykoleinheiten eine Herausforderung dar, da die Polymere für viele Messmethoden nicht detektierbar sind. Nicht alle Methoden sind zur Charakterisierung der Schichtdicke gleich gut geeignet. Daher sollte eine Kombination verschiedener Methoden zu einer verlässlichen Bestimmung der Schichtdicke beitragen.^{186, 189} Die ersten Messungen kleiner Nanopartikel mittels DLS sowie die Abstandsbestimmungen in REM- oder TEM-Aufnahmen sind in diesem Zusammenhang vielversprechend. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Schichtdicke größerer Partikel sollen mittels DLS durchgeführt werden, in denen Nanopartikel vermessen werden, die stärker aufgereinigt wurden.

Für die folgenden ersten Zelleexperimente werden jedoch Nanopartikel verwendet, deren Größe auch ohne Berücksichtigung der Polymerschicht einen Eintritt in den synaptischen Spalt verhindern kann. Partikel mit einem Durchmesser von 30 nm sollten in diesem Zusammenhang ausreichen. Überträgt man zudem die mittels DLS gemessene Polymerschichtdicke der 13 nm Partikel auf die Partikel mit einem Durchmesser von 30 nm, so kann sicher gestellt werden, dass die extrasynaptischen von den synaptischen NMDA-Rezeptoren unterschieden werden können.

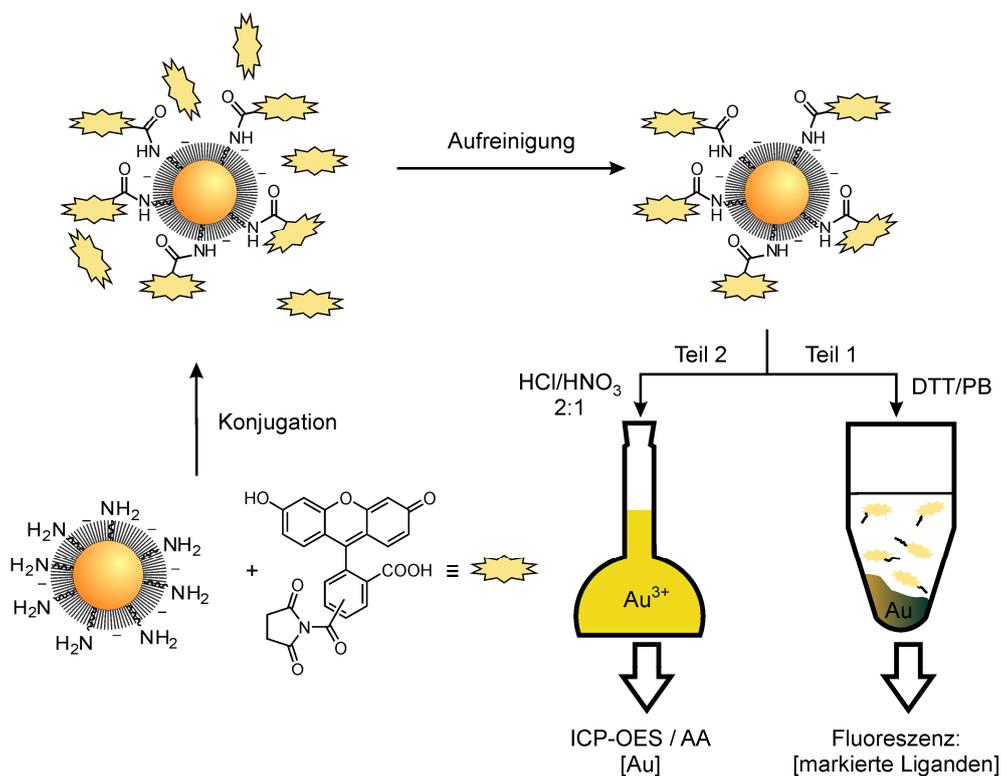
^e Für sp^3 hybridisierte Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung wird eine Länge von 154 pm, für eine Kohlenstoff-Sauerstoffbindung eine Länge von 143 pm angenommen.

3.4 Fluoreszenz-basierte Charakterisierung der Anzahl reaktiver Liganden

Neben der Charakterisierung der Schichtdicke ist die Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel von großer Bedeutung. Verschiedene Methoden zur Charakterisierung der Anzahl an Liganden einer gemischten Monolage an Nanopartikeln sind bekannt; ^1H NMR zählt zu einer beliebten Technik in diesem Zusammenhang.²⁶⁴ Jedoch ist sie im Falle der hier genutzten Nanopartikel ungeeignet, da die vorliegenden Proben eine sehr geringe Konzentration (im nanomolaren Bereich) an Nanopartikeln aufweisen. Fluoreszenzbasierte Messungen sind im Vergleich deutlich sensitiver und werden beispielsweise zur Charakterisierung der Oberflächenbelegung von Thiol-funktionalisierten Oligonukleotiden an 13-250 nm Gold Nanopartikeln eingesetzt.^{197, 198} Die in dieser Studie eingesetzten Oligonukleotide sind fluoreszenzmarkiert. In der vorliegenden Arbeit jedoch soll die Anzahl an Ankergruppen ermittelt werden, an denen Biomoleküle gebunden werden können. Diese während der Bildung der Monolage unmarkierten Ankergruppen sollen nach der Immobilisierung an der Goldoberfläche quantifiziert werden. Dabei ist sowohl die Anzahl an adressierbaren Bindungsstellen für den Linker am Gold von Interesse, also die Anzahl an adressierbaren Aminogruppen, sowie die Anzahl an Peptiden, die via Linker **10** (s. Kapitel 3.5) ans Gold gebunden werden. Diese Charakterisierung der Anzahl an reaktiven Aminogruppen wird mittels quantitativer Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden. Die Bestimmung der Anzahl an immobilisierten Peptiden findet sich in Kapitel 3.6.

3.4.1 Charakterisierung der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel

Die Nanopartikel werden mit einer gemischten Monolage aus ω -amino- und ω -carboxyterminierten Thiolen **4/5** und **6/7** geschützt. Anschließend soll bestimmt werden, wie viele Aminogruppen an der Peripherie der Nanopartikel für eine weitere Konjugation zugänglich sind und damit für eine Funktionalisierung zur Verfügung stehen. Hierbei ist zu erwähnen, dass mit dem vorgestellten Verfahren nicht die Gesamtzahl der Liganden, sondern die Zahl der reaktiven Liganden gemessen wird. Als Modellsystem zur Untersuchung der Konjugation wird die Acylierung mit NHS-Estern gewählt, da diese aufgrund der milden Reaktionsbedingungen in einer Vielzahl von Biokonjugationsreaktionen eingesetzt wird. Mit einer in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Ausbeute von 95% kann diese Reaktion als quantitativ angenommen werden.¹⁸¹ Die prinzipielle Abfolge einer solchen Bestimmung ist in Schema 1 dargestellt. Direkt nach der Passivierung und Aufarbeitung der Nanopartikel, erfolgt die Konjugation mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Dazu werden die Partikel mit 5(6)-Carboxyfluorescein NHS-Ester umgesetzt, welches *in situ* aus *N*-Hydroxysuccinimid, 5(6)-Carboxyfluorescein und 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid (EDC) in DMF dargestellt wird. Um die Probe von überschüssigem Fluoreszenzfarbstoff zu befreien, werden die Nanopartikel mittels Ultra- und Gelfiltration aufgereinigt.



Schema 1: Strategie zur Durchführung der fluoreszenzbasierten Bestimmung der Anzahl reaktiver Aminogruppen pro Partikel.

Die fluoreszenzmarkierte Probe wird anschließend in zwei Teile geteilt. Der erste Teil (Teil 1) dient der Bestimmung der Konzentration an fluoreszenzmarkierten Aminogruppen. Er wird mit Dithiothreitol in Phosphatpuffer (DTT/PB) versetzt, welches die Thiol-Liganden effektiv von der Goldoberfläche ablöst.^{197, 265, 266} Die Intensität der Fluoreszenz der freigesetzten Liganden kann anschließend gemessen werden. Der Vergleich der Intensitäten mit denen der Kalibrierungskurve liefert die Konzentration der reaktiven Aminogruppen auf der Partikeloberfläche (Abbildung 69). Der zweite Teil der Probe (Teil 2) dient der Konzentrationsbestimmung der Gold Nanopartikel. Zur Messung der Probe wird diese in Königswasser aufgelöst und danach mittels Atomabsorption (AAS) oder Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) analysiert, wodurch die Gesamtkonzentration des Goldes in der Probe erhalten wird. Die Anzahl der Gold Nanopartikel kann anhand der gemessenen Goldkonzentration und dem mittleren Durchmesser der Nanopartikel berechnet werden, welcher mittels REM oder TEM bestimmt wird.¹⁶⁵ Da die eingesetzten Nanopartikel eine annähernd sphärische Form sowie eine geringe Größenverteilung besitzen, erlaubt diese Berechnung eine Bestimmung der Konzentration der Nanopartikel (s. Kapitel 3.1). Schließlich wird die durchschnittliche Anzahl an adressierbaren Aminogruppen pro Partikel errechnet, indem die Konzentration an fluoreszenzmarkierten Aminogruppen (Teil 1) durch die Konzentration an Gold Nanopartikeln (Teil 2) dividiert wird.

Um die Reproduzierbarkeit der Messung abzuschätzen, werden in den markierten Messungen (Tabelle 3) Zweifachbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich werden Kontrollen angefertigt, um die Selektivität der Anbindung zu bestimmen. In den Kontrollen wird nicht der hergestellte NHS-Ester, sondern ausschließlich 5(6)-Carboxyfluorescein zu der Nanopartikel Probe gegeben. Die resultierende Fluoreszenz der Kontrolle kann von der Intensität des Puffers als Referenz

nicht unterschieden werden. Dies bestätigt, dass 5(6)-Carboxyfluorescein ohne Aktivierung nicht an die Nanopartikel bindet und keine unspezifische Adsorption des Fluoreszenzfarbstoffes auftritt. Durch *in situ*-Aktivierung des Fluoreszenzfarbstoffes als NHS-Ester kann dieser kovalent über eine Amidbindung an die Aminogruppen der Oberfläche gebunden werden.

Des Weiteren wird kontrolliert, ob während der Ablösung der Liganden mittels DTT das Gold vollständig aus der Reaktionslösung entfernt wird. Dieser Schritt ist essentiell für die Bestimmung der Konzentration an Aminogruppen und damit für das gesamte Verfahren. Ohne Auflösung des Goldes der Probe ist das Fluoreszenzsignal stark geschwächt und kann nicht quantitativ ausgewertet werden. Daher wird zur Kontrolle nach Ablösen der Liganden die Lösung aus Teil 1 mit ICP-OES vermessen. Die Konzentration des Goldes liegt hierbei unterhalb der Detektionsgrenze (s. Kapitel 3.7.6) und kann damit vernachlässigt werden. Für Eintrag 27 wird zusätzlich die Anzahl an Aminogruppen bestimmt, ohne das Gold vorher aufzulösen. Die Anzahl an Aminogruppen ohne Auflösen des Goldes ergibt einen Wert von 70 ± 10 Aminogruppen pro Partikel. Dieser ist hier um 40% geringer, als der Wert, der mit Auflösung des Goldes erhalten wird.

Aus insgesamt 127 Messungen wird der Standardfehler ermittelt, welcher mit der Bestimmung der Konzentration an Aminogruppen verbunden ist. Dieser kann innerhalb eines 95% Konfidenzintervalls auf $\leq 14\%$ gesetzt werden, was für eine indirekte Bestimmung zufriedenstellend ist. Die Ergebnisse der vermessenen Proben sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Daten sind nach den verschiedenen Passivierungssystemen getrennt aufgelistet (PEG 3000 basierte Thiole **4** und **5** links und Alkyl-PEG 600 basierte Thiole **6** und **7** rechts) und als Doppel- oder Einzelmessungen markiert. Jeder Eintrag beschreibt Proben, die aus unabhängigen Wachstums- sowie Passivierungsreaktionen dargestellt werden, während die unterschiedlichen Buchstaben Proben desselben Wachstums aber unterschiedlicher Passivierungsreaktion symbolisieren (s. Abbildung 32). Die Einträge, in denen gleiche Nanopartikel aus unabhängigen Passivierungsreaktionen charakterisiert werden, können herangezogen werden, um die Streuung der Daten zu analysieren. In sieben von acht Fällen (Einträge 6 a, b, 7 a, b, 9 a-c, 10 a, b, 17 a, b, 23 a, b, 25 a, b) überschneiden sich die Fehler der Messungen jeweils, so dass in diesen Proben bezüglich der Aminokonzentration kein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann. Im verbleibenden Eintrag (Eintrag 5 a/5 b) grenzen die Werte nach Berücksichtigung des Standardfehlers aneinander an. Ausgehend von diesen Daten ist es möglich, Gold Nanopartikel reproduzierbar mit einer spezifischen Anzahl an Aminogruppen zu präparieren, wenn Nanopartikel von derselben Wachstumsreaktion eingesetzt werden. Weiterhin kann anhand dieses Verfahrens die Streuung der Aminokonzentrationen von vollständig unabhängigen Präparationen analysiert werden. Dazu werden Gold Nanopartikel herangezogen, die in unterschiedlichen Wachstumsreaktionen dargestellt und in separaten Passivierungsreaktionen funktionalisiert werden. Die Daten dieser unabhängigen Präparationen der Nanopartikel zeigen eine stärkere Streuung bezüglich der Anzahl reaktiver Aminogruppen pro Partikel, als die Daten der Nanopartikel aus demselben Wachstum. Wie in Abbildung 32 a dargestellt, sind die Größenverteilungen der verschiedenen Nanopartikel Proben vergleichbar und liegen innerhalb des Fehlers. Die gemessenen Werte der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel (Abbildung 32 b, Einträge 6, 7, 8, 9, 10) streuen jedoch stärker als die Proben derselben Wachstumsreaktion. Obwohl die Reaktionsbedingungen konstant gehalten wurden, variiert die Anzahl an Aminogruppen pro Partikel bis zu einem Faktor 3 (Einträge 6, 7, 8).

Tabelle 3: Durchschnittliche Anzahl an Aminogruppen pro Partikel (N[NH₂]).^a

| Eintrag | Ø (nm) | N[NH ₂] | Eintrag | Ø (nm) | N[NH ₂] |
|--------------|--------|-------------------------|-------------------|--------|------------------------|
| PEG 3000 4/5 | | | Alkyl-PEG 600 6/7 | | |
| 1 | 65 ± 7 | 1017 ± 156 ^b | 19 | 65 ± 7 | 904 ± 127 ^b |
| 2 | 55 ± 6 | 692 ± 97 ^b | 20 | 55 ± 6 | 633 ± 89 ^b |
| 3 | 45 ± 5 | 457 ± 64 ^b | 21 | 45 ± 5 | 422 ± 59 ^b |
| 4 | 41 ± 4 | 506 ± 71 ^b | 22 | 41 ± 4 | 475 ± 66 ^b |
| 5a | 41 ± 4 | 613 ± 86 | | | |
| 5b | | 477 ± 41 | | | |
| 6a | 35 ± 4 | 221 ± 31 | 23a | 35 ± 4 | 223 ± 34 |
| 6b | | 281 ± 39 | 23b | | 211 ± 30 |
| 7a | 34 ± 4 | 319 ± 45 | | | |
| 7b | | 294 ± 41 | | | |
| 8 | 32 ± 3 | 136 ± 19 | | | |
| 9a | 32 ± 3 | 388 ± 54 | 24 | 32 ± 3 | 202 ± 28 |
| 9b | | 385 ± 32 | | | |
| 9c | | 365 ± 51 | | | |
| 10a | 31 ± 3 | 233 ± 33 ^b | 25a | 31 ± 3 | 220 ± 30 ^b |
| 10b | | 259 ± 36 ^b | 25b | | 180 ± 12 ^b |
| 11 | 30 ± 3 | 130 ± 18 | 26 | 30 ± 3 | 139 ± 19 |
| 12 | 30 ± 3 | 131 ± 18 ^b | 27 | 30 ± 3 | 175 ± 24 ^b |
| 13 | 29 ± 3 | 180 ± 25 ^b | 28 | 29 ± 3 | 172 ± 24 ^b |
| 14 | 29 ± 3 | 206 ± 29 ^b | 29 | 29 ± 3 | 223 ± 31 ^b |
| 15 | 29 ± 3 | 196 ± 27 ^b | 30 | 29 ± 3 | 140 ± 20 ^b |
| 16 | 29 ± 3 | 222 ± 21 ^b | 31 | 29 ± 3 | 207 ± 29 ^b |
| 17a | 29 ± 3 | 238 ± 33 | 32 | 29 ± 3 | 201 ± 28 ^b |
| 17b | | 209 ± 29 | 33 | 29 ± 3 | 175 ± 23 ^b |
| 18 | 15 ± 3 | 165 ± 23 ^b | 34 | 15 ± 3 | 170 ± 24 ^b |

^aBestimmungen werden als Duplikate durchgeführt, sofern nicht anders symbolisiert. Jeder Eintrag beschreibt Proben, die in unabhängigen Wachstums- und Passivierungsreaktionen hergestellt werden. Die Einträge mit unterschiedlichen Buchstaben beschreiben Proben, die aus derselben Wachstumsreaktion, aber unabhängigen Passivierungen hergestellt werden. Der angegebene Standardfehler ergibt sich aus dem 95 % Konfidenzintervall (s. 5.3.2). Die Standardabweichung des Durchmessers der Nanopartikel Ø ergibt sich aus der Halbwertsbreite ($2 \times \sigma$) der Gauß-Verteilung, die an die Größenverteilung der Nanopartikel angepasst wird. Die linken Spalten der Tabelle beziehen sich auf Nanopartikel, die mit Thiolen 4/5, passiviert wurden, während die rechten Spalten die Ergebnisse der Nanopartikel mit einer Monolage aus 6/7 darstellen. In allen Einträgen ist der Molenbruch $x(\text{NH}_2) = 0,14$.

^bBestimmung als Einzelnachweis durchgeführt.

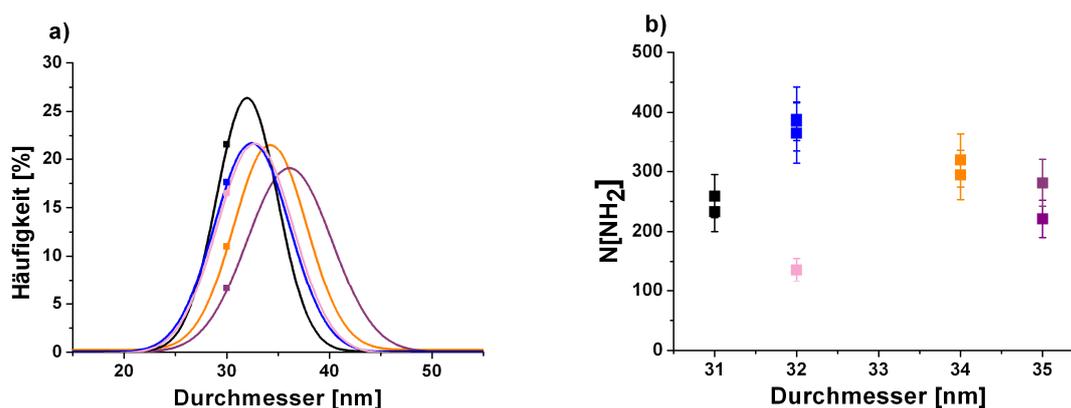


Abbildung 32: Vergleich unabhängiger Präparationen von Nanopartikeln. a) An die Größenverteilung angepasste Gaußfunktion der verschiedenen Nanopartikel Präparationen mit vergleichbarem Durchmesser. ■: Einträge 10 a, b; ■: Einträge 9 a, b, c; ■: Eintrag 8; ■: Einträge 7 a, b; ■: Einträge 6 a, b. b) Durchschnittliche Anzahl der Aminogruppen pro Partikel ($N[\text{NH}_2]$) der in a) jeweils dargestellten Proben. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14.

Dies deutet an, dass durch die Wachstumsreaktion Nanopartikel mit geringer Variation generiert werden, auch wenn die Größenverteilung in der TEM oder REM Auswertung keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Die einzelnen Proben können sich in der Rauigkeit der Oberfläche oder in der Anzahl der Defektstellen unterscheiden. Diese geringen Unterschiede der Nanopartikel erklärt die Bildung einer Monolage, die von Probe zu Probe variiert. Durch die Etablierung dieses Verfahrens können diese Unterschiede nun detektiert werden. Es ist daher von Bedeutung, die Monolage jeder Probe zu analysieren, die im biologischen System eingesetzt werden soll.

Trotz eines relativ geringen Größenbereiches der Nanopartikel, die in diesen Messungen betrachtet werden (15-65 nm), ist eine Korrelation zwischen der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel und dem Durchmesser der Nanopartikel zu erwarten. Mit zunehmendem Partikeldurchmesser vergrößert sich die Oberfläche, so dass gleichzeitig auch die Anzahl der Liganden zunehmen sollte. Werden die Daten aus Tabelle 3 gegen die Oberfläche der jeweiligen Nanopartikel aufgetragen, ergibt sich eine relativ starke Korrelation ($R^2_{\text{Alkyl-PEG } 600} = 0,91$, $R^2_{\text{PEG } 3000} = 0,85$).

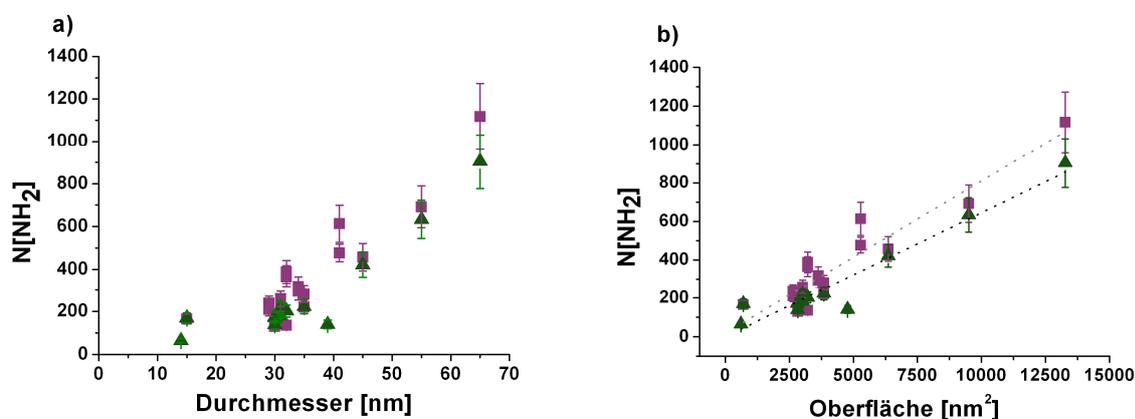


Abbildung 33: Anzahl an reaktiven Aminogruppen pro Partikel ($N[\text{NH}_2]$). a) In Abhängigkeit des Durchmessers, b) In Abhängigkeit der Oberfläche. ■: Anzahl der Aminogruppen des PEG 3000 Systems 4/5, ▲: Alkyl-PEG 600 Systems 6/7, ●●●: Linearer Fit des Alkyl-PEG 600 Systems 6/7, ●●●: Linearer Fit des PEG 3000 Systems 4/5. Der Standardfehler ergibt sich aus dem 95% Konfidenzintervall, s. 5.3.2). Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt in allen Messungen 0,14.

Dies kann trotz der oben beschriebenen Variationen der Monolagen unabhängig präparierter Nanopartikel beobachtet werden. Beide Passivierungssysteme (PEG 3000 Thiole **4/5** und Alkyl-PEG 600 Thiole **6/7**) zeigen eine vergleichbare Anzahl reaktiver Aminogruppen pro Partikel. Da PEG 3000 Thiole **4/5** wesentlich langkettiger als Alkyl-PEG 600 Thiole **6/7** sind und die Alkylketten durch hydrophobe Wechselwirkung eine dichte Belegung der Oberfläche ausbilden sollten, ist zu erwarten, dass im Vergleich mehr Alkyl-PEG 600 als PEG 3000 Liganden auf der Oberfläche binden. Der Vergleich beider Systeme zeigt jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl an Aminogruppen pro Nanopartikel (s. Abbildung 33). Um zu überprüfen, ob die Anzahl der reaktiven Aminogruppen pro Partikel durch Zugabe unterschiedlicher Mengen der ω -Amino-Komponente **5** oder **7** während der Passivierungsreaktion kontrolliert werden kann, wurden Proben mit verschiedenen Mengen an ω -Amino-Komponenten **5/7** (Molenbrüche $x(\text{NH}_2)$ zwischen 0,09 und 0,33) passiviert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Daten zeigen eine lineare Korrelation der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an ω -Amino-Thiol. Diese Abhängigkeit wird für beide Passivierungssysteme **4/5** und **6/7** beobachtet und demonstriert die Möglichkeit, Nanopartikel mit gezielten funktionellen Gruppen herzustellen. Gleichzeitig zeigt es, dass das hier entwickelte Verfahren zur quantitativen Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl an Aminogruppen pro Partikel ($\text{N}[\text{NH}_2]$) in einer Probe geeignet ist.

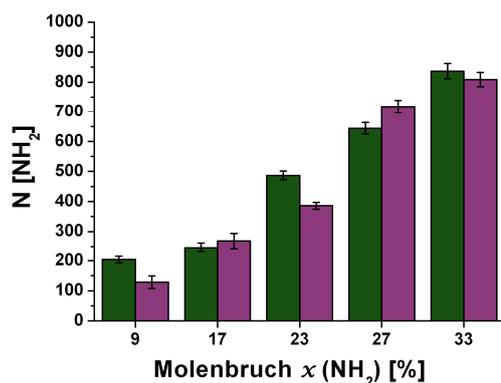


Abbildung 34: Die durchschnittliche Anzahl an adressierbaren Aminogruppen pro Partikel ($\text{N}[\text{NH}_2]$) nimmt mit dem Molenbruch der in der Passivierungsreaktion eingesetzten ω -Amino funktionalisierten Thiole **5** und **7** zu. ■: Alkyl-PEG Passivierungssystem **6/7**, ■: PEG 3000 System **4/5**. Der Durchmesser der Nanopartikel \varnothing beträgt 30 ± 3 nm.

Gold Nanopartikel, die ausschließlich mit ω -Amino-Thiolen **5** oder **7** funktionalisiert werden, sind nicht stabil und aggregieren während der Passivierungsreaktion (s. Kapitel 3.2.3). Daher kann die Anzahl an Liganden für Nanopartikel, die ausschließlich die Aminokomponente tragen, nur durch Extrapolation der gezeigten Daten ermittelt werden. Diese Extrapolation ergibt für einen hypothetischen Molenbruch von $x(\text{NH}_2) = 1$ etwa ~ 2800 Aminogruppen pro Partikel für das PEG 3000 System **4/5** und ~ 2700 Liganden für das Alkyl-PEG 600 System **6/7**. Dies verdeutlicht, dass sich beide Systeme in der Belegung der Oberfläche nicht unterscheiden (s.o.). Wird angenommen, dass diese durch Extrapolation erhaltene Zahl an Liganden mit der Gesamtzahl der Liganden identisch ist, kann im Folgenden die Fläche berechnet werden, die ein Ligand auf der Oberfläche einnimmt. Mit einer Fläche von $\sim 1 \text{ nm}^2$ ist diese etwa dreimal größer als die Fläche, die Murray *et al.* für 2,8 nm große, mit PEG 5000 passivierte Gold Nanopartikel errechnen.²⁶⁷ Somit muss die Dichte der Liganden bei Murray *et al.* größer sein, als bei den hier

dargestellten Nanopartikeln. Es ist bekannt, dass kleine Nanopartikel aufgrund der starken Krümmung eine höhere Dichte an Liganden besitzen, als größere Nanopartikel. Daher ist die hier berechnete Fläche konsistent mit der Literatur und unterstützt die Annahme, dass die extrapolierte Anzahl an Aminogruppen pro Partikel mit der Gesamtanzahl an Liganden näherungsweise übereinstimmt.

3.4.2 Untersuchung der Passivierungsschicht in Abhängigkeit der Zeit

Obwohl Thiole häufig zur Passivierung von Nanopartikeln eingesetzt werden, ist in der Literatur gezeigt, dass die Qualität der Monolage aufgrund der Desorption von Liganden mit der Zeit abnimmt.¹⁵²⁻¹⁵⁵ Dieser Prozess wird durch die Oxidation des Schwefelatoms ausgelöst, welches an die Goldoberfläche bindet. Um das Zeitfenster für nachfolgende Experimente zu bestimmen, werden die hergestellten Nanopartikel bezüglich ihrer Stabilität in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.

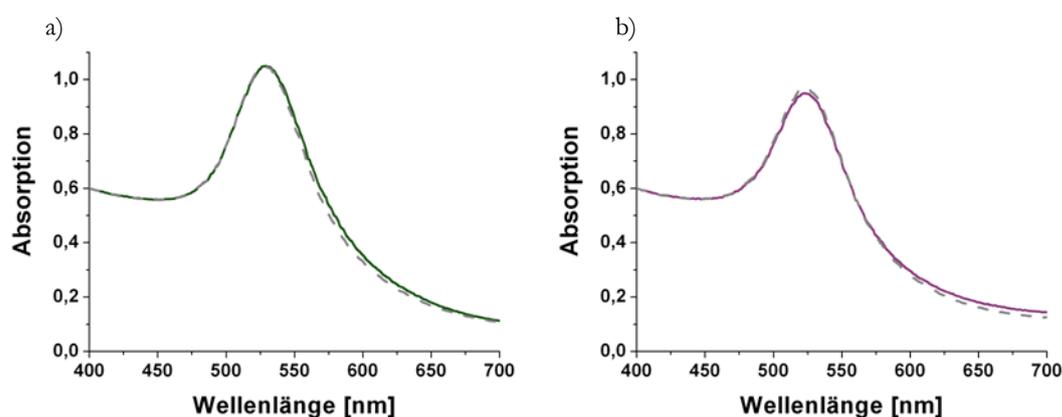


Abbildung 35: Vergleich der UV/Vis-Spektren von Gold Nanopartikeln zum Zeitpunkt $t = 0$ (---) und nach sieben Monaten (—) a) Nanopartikel passiviert mit PEG 3000 basierten Thiolen **4/5** b) Passivierung mit Alkyl-PEG 600 basierten Thiolen **6/7**. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14, der Durchmesser der Nanopartikel \varnothing beträgt 31 ± 3 nm.

Makroskopisch sind die dargestellten Suspensionen über Monate stabil und behalten ihre charakteristische rote Färbung. Mit UV/Vis-Spektroskopie wird auch nach sieben Monaten keine wesentliche Veränderung der Absorptionsspektren detektiert (Abbildung 35). Weiterhin werden die Proben elektronenmikroskopisch untersucht, um Veränderungen der Morphologie der Partikel während dieser Zeitspanne festzustellen. Abbildung 36 zeigt Gold Nanopartikel direkt nach der Wachstumsreaktion sowie PEG 3000 **4/5** und Alkyl-PEG 600 **6/7** passivierte Nanopartikel sieben Monate nach Durchführung der Passivierungsreaktion. Die Morphologie der Nanopartikel, deren Durchmesser und Größenverteilung ändern sich während der beobachteten Zeitspanne nicht.

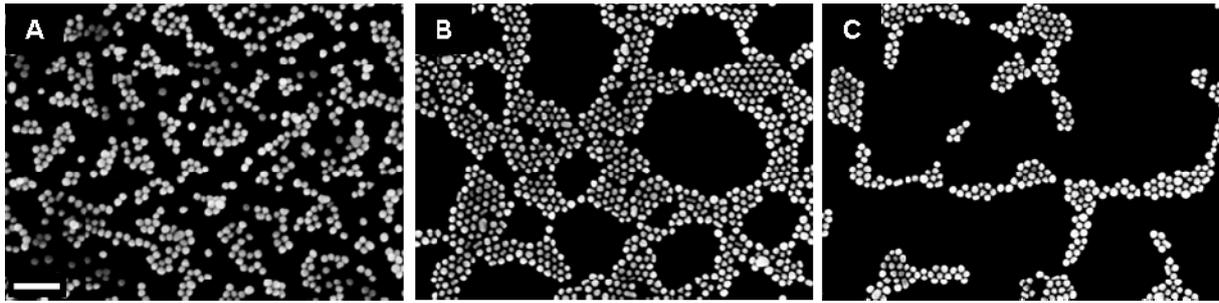


Abbildung 36: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gold Nanopartikel a) Nach der Wachstumsreaktion ($\varnothing = 31 \pm 3$ nm) b) PEG 3000 Thiole **4/5** passivierte Partikel nach sieben Monaten ($\varnothing = 31 \pm 3$ nm) c) Alkyl-PEG 600 Thiole **6/7** passivierte Nanopartikel nach sieben Monaten ($\varnothing = 31 \pm 3$ nm). Die übergeordneten Strukturen der Nanopartikel bilden sich durch Trocknungseffekte auf den aminosilanisierten Oberflächen der Siliziumscheiben. Der Maßstab beträgt 200 nm. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14.

Im nächsten Schritt soll die Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel auf ihre Alterung hin untersucht werden. Die Anzahl an reaktiven Aminogruppen pro Partikel wird in Abhängigkeit der Zeit bestimmt, um zu überprüfen, ob sie als Konsequenz der Alterung der Suspension desorbieren. Daher werden Gold Nanopartikel Proben nach der Passivierung und Aufreinigung bei Raumtemperatur gelagert. Diese Lagerungsart wird gewählt, um den Einfluss der Alterung unter Standard Laborbedingungen zu bestimmen. Um den Prozess der Desorption zu verlangsamen, können Nanopartikel generell auch bei 4°C gelagert werden. Nach verschiedenen Zeitintervallen (1 bis 56 Tage) werden Proben entnommen, um die Anzahl der reaktiven Aminogruppen zu bestimmen (Schema 2A). Es wurden jeweils fünf Proben der Gold Nanopartikel mit Thiolen **4/5** und Thiolen **6/7** passiviert und vermessen. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 37 a und b graphisch dargestellt und im Anhang (Tabelle 11) zusammengefasst. Alle vermessenen Proben zeigen eine deutliche Abnahme der Anzahl reaktiver Aminogruppen, die nach etwa 20 Tagen einen Plateauwert erreicht. Die stärkste Abnahme an $\text{N}[\text{NH}_2]$ wird für alle Proben in den ersten 14 Tagen beobachtet. Für sieben von zehn Messungen kann am Ende der Beobachtungsphase (42-56 Tage) eine Abnahme zwischen 48% und 75% beobachtet werden. Für die übrigen Proben liegt die Abnahme bei 24% und 33%. Der Betrag der Abnahme variiert von Probe zu Probe, was anfängliche Unterschiede der unabhängig hergestellten Proben reflektiert (s.o.). Auch geringe Abweichungen in der Lagerung der einzelnen Proben (Länge des Schüttelns, Dauer der Öffnung der Probe, etc.) können diese unterschiedliche Abnahme erklären. Die Proben, die aus gleichen Wachstumsreaktionen, aber unabhängigen Passivierungsreaktionen stammen, weisen einen sehr ähnlichen Alterungsprozess auf. Beim Vergleich beider Passivierungssysteme PEG 3000 **4/5** und Alkyl-PEG 600 **6/7** wird nur in Abbildung 37 a eine unterschiedliche Reduktion der Liganden sichtbar. Abbildung 37 b hingegen zeigt keine stärkere Abnahme der Anzahl reaktiver Liganden für ein bestimmtes Passivierungssystem und damit keine ausgeprägte Alterung eines einzelnen Systems. Die Zeitabhängigkeit beider Systeme scheint ähnlich zu sein, oder die geringe Varianz der einzelnen unabhängig präparierten Nanopartikel Proben sind größer, als die Unterschiede im Desorptionsverhalten der verschiedenen Passivierungssysteme. In diesen Messungen wird angenommen, dass die Abnahme der Anzahl an Aminogruppen durch die Desorption der Liganden initiiert wird. Um auszuschließen, dass die gemessene Abnahme beispielsweise durch Umlagerung der Liganden auf der Oberfläche ausgelöst wird, nach der die Aminogruppen für eine Konjugationsreaktion nicht mehr zugänglich sind, wird eine weitere Zeitreihe durchgeführt.

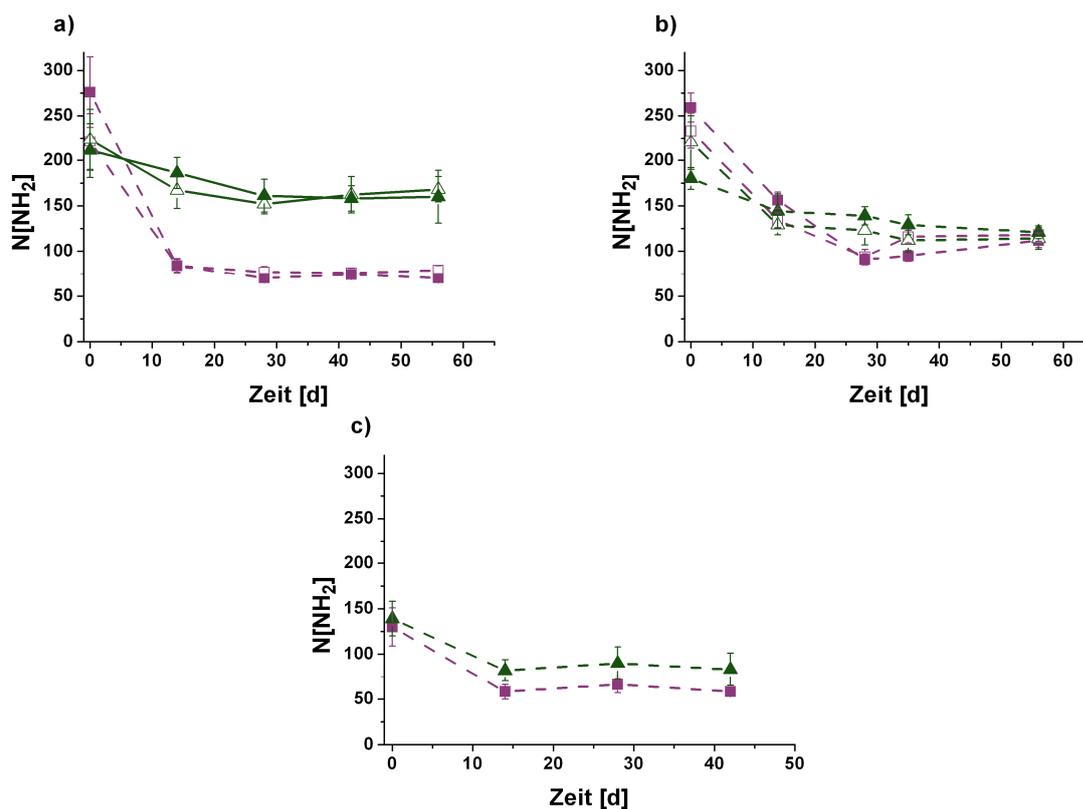
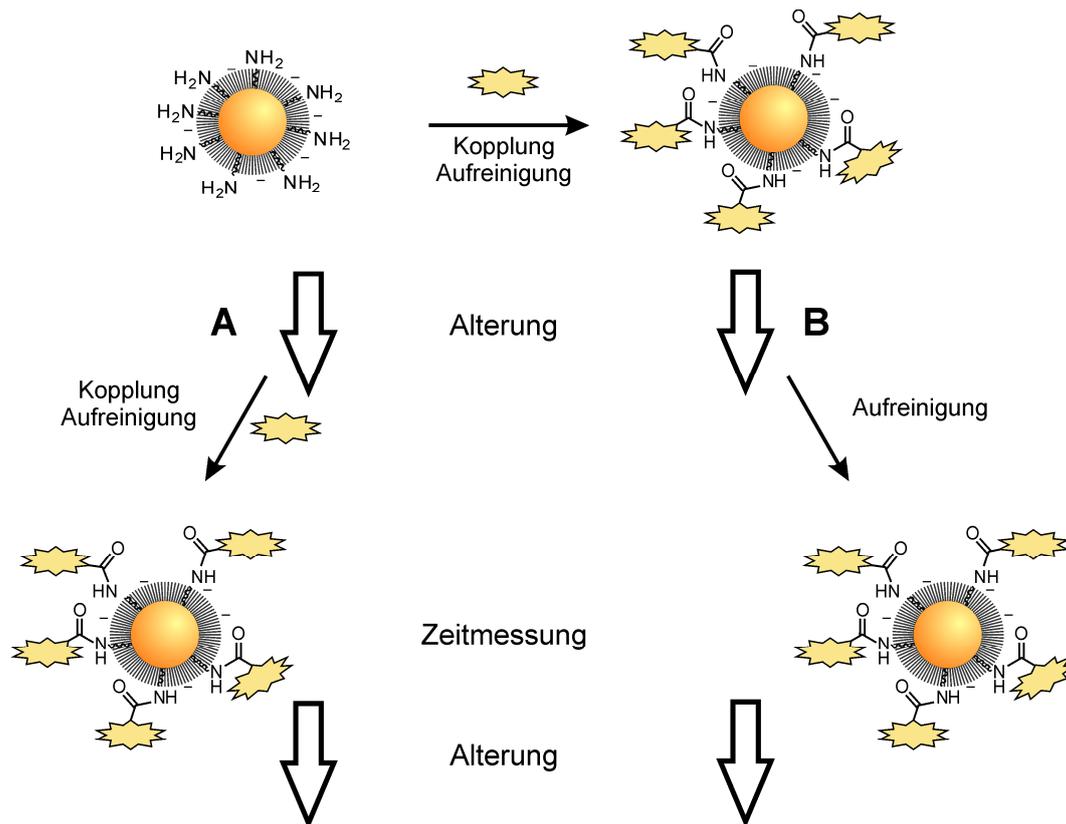


Abbildung 37: Durchschnittliche Anzahl an Aminogruppen pro Partikel ($N[\text{NH}_2]$) in Abhängigkeit von der Zeit. ■: Anzahl der Aminogruppen des PEG 3000 Systems 4/5; ▲: Anzahl der Aminogruppen des Alkyl-PEG 600 Systems 6/7. □/■ und ▲/△ zeigen Daten, die von der gleichen Wachstumsreaktion, aber unabhängigen Passivierungen stammen a) und b) zeigen Nanopartikel aus unterschiedlichen Wachstumsreaktionen: a) $\varnothing = 35 \pm 4$ nm b) $\varnothing = 31 \pm 3$ nm. Die Proben wurden direkt vor der Messung fluoreszenzmarkiert. c) zeigt die Alterung der Proben, die an Tag 0 fluoreszenzmarkiert und anschließend gelagert wurden. $\varnothing = 30 \pm 3$ nm. Der Molenbruch beträgt in allen Proben $x(\text{NH}_2) = 0,14$.

Es werden passivierte Nanopartikel hergestellt, welche den Fluoreszenzfarbstoff bereits zum Zeitpunkt $t = 0$ gebunden haben (Schema 2B). Nach Reaktion mit dem NHS-Ester werden die Proben aufgereinigt und im Dunkeln gelagert. Diese Partikel werden ebenfalls auf eine Zeitabhängigkeit der Oberflächenfunktionalität geprüft, indem nach verschiedenen Zeitintervallen Proben entnommen und mit Ultrafiltration und Gelfiltration aufgereinigt werden, um desorbierte fluoreszenzmarkierte PEG-Moleküle zu entfernen. Anschließend werden die aufgereinigten Proben im Hinblick auf die Anzahl der Aminogruppen pro Partikel analysiert (Abbildung 37 c). Bei diesen Proben ist eine signifikante Abnahme der $N[\text{NH}_2]$ zu beobachten, die mit der oben beschriebenen Abnahme vergleichbar ist. Für Gold Nanopartikel, die mit 4/5 passiviert sind, ergibt sich eine Reduktion um 55%, für Nanopartikel passiviert mit 6/7 eine Reduktion um 40%. Da auch bei dieser Art der Probenpräparation eine signifikante Abnahme der markierten Amine zu verzeichnen ist, kann daraus geschlossen werden, dass die Desorption der Liganden für die Alterung der Passivierungsmonolage verantwortlich ist. Eine detaillierte Untersuchung aller Faktoren, die die Desorption der Liganden beeinflussen, soll nicht Bestandteil dieser Arbeit sein. Jedoch zeigen die hier dargestellten Daten, dass die Alterung der Nanopartikel unter Standardbedingungen in dem beobachteten Zeitrahmen eine beträchtliche Veränderung der Monolage zur Folge hat, die mit UV/Vis-Spektroskopie nicht detektiert werden kann.



Schema 2: Verfahren der Zeitabhängigkeitsmessungen. In A werden die passivierten Gold Nanopartikel gelagert und nach den jeweiligen Zeitintervallen gekoppelt und gemessen (s. Abbildung 37 a und b). In B werden die passivierten Gold Nanopartikel direkt nach Herstellung mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und anschließend gelagert. Nach den jeweiligen Zeitintervallen werden die Proben aufgereinigt und gemessen (s. Abbildung 37 c).

Generell zeigt das hier etablierte fluoreszenz-basierte Verfahren, dass Nanopartikel einer Wachstumsreaktion mit einer definierten Anzahl an reaktiven Aminogruppen funktionalisiert werden können. Da jedoch unterschiedlich präparierte Nanopartikel eine Streuung der Anzahl an Aminogruppen aufweisen, die zudem von der Desorption der Liganden mit der Zeit beeinflusst wird, werden alle Gold Nanopartikel Proben, die im biologischen System eingesetzt werden, zuvor mit dem hier beschriebenen Verfahren charakterisiert. Dieses Verfahren erlaubt die Herstellung und Charakterisierung kontrollierter Oberflächenfunktionalitäten, die für das Verständnis und die Interpretation von zu untersuchenden biologischen Prozessen hilfreich sind.

3.5 Peptid-Funktionalisierung der stabilisierten Partikel

Verschiedene Methoden zur Funktionalisierung von Nanopartikeln sind bekannt (s. Kapitel 2.1.6). Häufig wird die direkte Anbindung von Thiol-funktionalisierten Biomolekülen an die Goldoberfläche genutzt, um beispielsweise die Löslichkeit in Wasser zu erhöhen, eine wichtige Voraussetzung, wenn biologische Grenzflächen untersucht werden.^{121, 175, 196} Gleichzeitig muss die unspezifische Proteinadsorption minimiert werden, um ein stabiles System zu generieren. In diesem Zusammenhang haben sich Polyethylenglykol (PEG)-Derivate als sehr wirkungsvoll erwiesen.^{131, 132} Um im Weiteren die spezifische Wechselwirkung der Nanopartikel mit einem Rezeptor zu garantieren, werden Signalmoleküle, wie beispielsweise Peptide, an die Nanopartikel immobilisiert. Diese Peptide werden jedoch möglicherweise durch die Passivierungsketten abgeschirmt, wodurch eine spezifische Wechselwirkung der Peptide unterbunden wird. Um dies zu verhindern, empfiehlt es sich, die Peptide an der äußeren Peripherie der Passivierungsmonolage zu immobilisieren. Thiole **5** und **7** werden daher in dieser Arbeit in die Passivierungsschicht integriert, um primäre Amine an die äußere Schicht der Passivierung einzuführen. Diese funktionellen Gruppen können nachfolgend durch einfache chemische Kopplungsreaktionen derivatisiert werden.¹⁸¹ Passivierungsliganden, wie ω -Amino Thiole¹³³ wurden bisher selten eingesetzt und sind damit als Liganden für Gold Nanopartikel praktisch unerforscht.^{146, 268}

Gold Nanopartikel passiviert mit einer gemischten Monolage aus PEG 3000 Thiolen **4/5** oder Alkyl-PEG 600 Thiolen **6/7** besitzen eine gute Wasserlöslichkeit und eine gute Stabilität gegenüber Aggregation (s. Kapitel 3.2). Daher sind diese Systeme sehr gut geeignet, um Peptide an die äußere Peripherie der Monolage zu binden. Auf diesem Weg kann die Funktionalisierung ohne Beeinflussung der Stabilität der Suspension durchgeführt werden.

Zur Kopplung werden zwei synthetische Peptide gewählt. Peptid **8** besitzt die Aminosäuresequenz des natürlich vorkommenden Peptids Conantokin-G (Con-G), welches im Toxin von Kegelschnecken enthalten ist (Kapitel 2.2.6). Aufgrund der seltenen Aminosäure γ -Carboxyglutamat (γ) ist Peptid **8** stark negativ geladen. Zusätzlich trägt Peptid **8** ein Cystein am C-Terminus, welches eine Funktionalisierung ermöglicht. Um die Anbindung des Peptids zu charakterisieren, ist es außerdem an der Aminosäure Lysin mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. Con-G ist ein NMDA-Rezeptor Antagonist, der selektiv mit der NR2B Untereinheit interagiert. Diese Untereinheit besitzt in der Population der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren eine erhöhte Dichte (s. Kapitel 2.2).

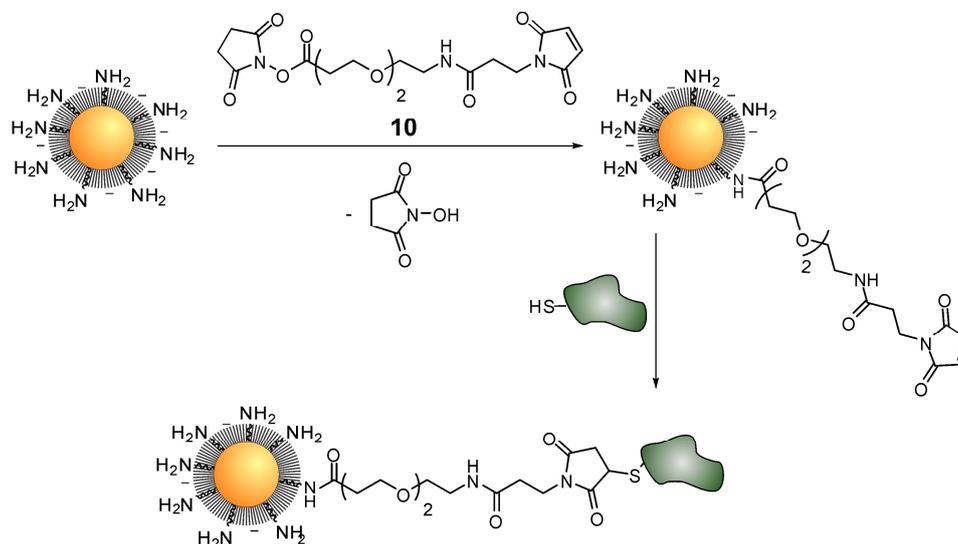
Tabelle 4: Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide.

| Name | Aminosäuresequenz |
|-----------------|---|
| Peptid 8 | G-E- γ - γ -L-Q- γ -N-Q- γ -L-I-R- γ -K(TAMRA)-S-N-C-NH ₂ |
| Peptid 9 | G-E-U-U-L-Q-U-N-Q-U-L-I-R-U-K(TAMRA)-S-N-C-NH ₂ |

γ = γ -Carboxyglutamat; U = γ -Glutamat

Durch die selektive Inhibition dieser Rezeptoruntereinheit und die Kombination aus sterisch anspruchsvollem Nanopartikel und diesem Peptid sollen die NMDA-Rezeptoren aufgrund ihrer örtlichen Position unterschieden werden und ein möglicher Zusammenhang zwischen Lokalisation und Funktion ermittelt werden.

Peptid **9** wird als Kontrollpeptid eingesetzt und ist ebenfalls an der Aminosäure Lysin fluoreszenzmarkiert. Statt der γ -Carboxyglutamat Reste trägt es jedoch γ -Glutamate (U), so dass das Peptid bei NMDA-Rezeptoren keine inhibitorische Wirkung zeigt. Die Aminosäuresequenzen der Peptide sind in Tabelle 4 dargestellt. Um Peptide **8** und **9** an die äußere Passivierungsschicht zu binden, wird ein heterobifunktionaler Linker **10** (Schema 3) eingesetzt, der einen NHS-Ester und eine Maleimid-Gruppe trägt. In einer zweistufigen Reaktion wird zunächst der instabile NHS-Ester mit den Aminogruppen der Passivierungsschicht unter Ausbildung einer Amidbindung umgesetzt. Anschließend reagiert die Maleimid-Gruppe in einer Michaeladdition mit der Thiolgruppe des Peptids. Die Reaktion ist in Schema 3 dargestellt.



Schema 3: Funktionalisierung der Gold Nanopartikel mit Thiol-derivatisiertem Peptid mittels eines heterobifunktionalen Linkers **10.**

Zunächst soll qualitativ getestet werden, ob der Linker **10** an die Aminogruppen der Nanopartikel bindet. Der Nachweis der Maleimid-Gruppe an der Peripherie der Passivierungsschicht erfolgt über eine 1,4-Addition an Thiol-derivatisierte magnetische Mikropartikel. Diese Mikropartikel sind kommerziell erhältlich und werden aufgrund der magnetischen Eigenschaften zur Aufreinigung von Proteinen eingesetzt. Gleichzeitig sind sie groß genug (1-20 μm), um sie mit elektronenmikroskopischen Methoden sichtbar zu machen. Abbildung 38 a zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der magnetischen Mikropartikel. Als Kontrollen werden passivierte Nanopartikel ohne Linker **10** mit den Mikropartikeln inkubiert, um zu überprüfen, ob diese auch ohne die Bindung des Linkers mit den Mikropartikeln reagieren (Abbildung 38 b). Außerdem werden unfunktionalisierte Nanopartikel eingesetzt, die erwartungsgemäß an die Thiol funktionalisierten Mikropartikel binden (Abbildung 38 c). Wie deutlich zu sehen, binden nur die Nanopartikel an die Mikropartikel, die nicht passiviert sind (c).

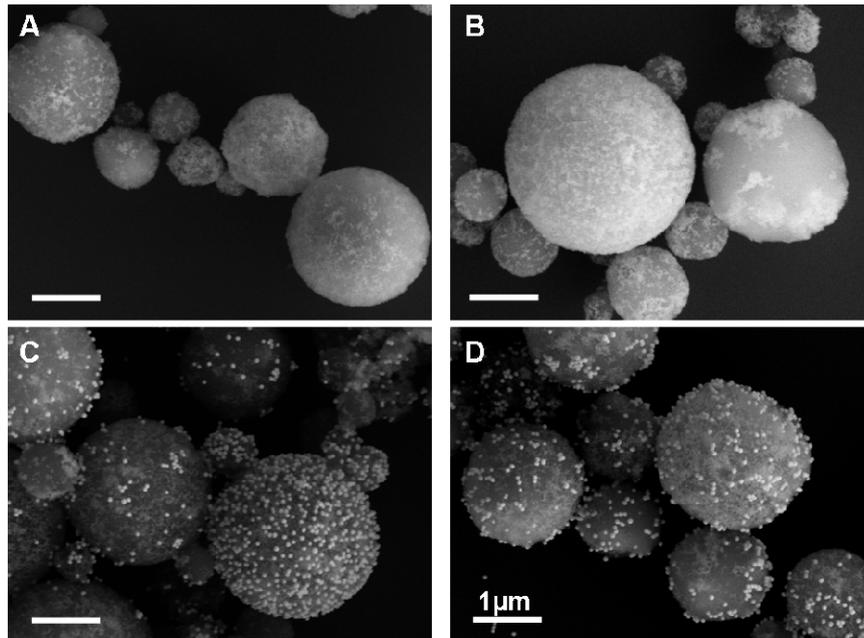


Abbildung 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Thiol-derivatisierten Magnetopartikeln. Magnetopartikel a) ohne Gold Nanopartikel b) mit PEG 3000 4/5 passivierten Nanopartikeln c) inkubiert mit unfunktionalisierten Nanopartikeln d) inkubiert mit PEG 3000 4/5 passivierten Nanopartikeln, die zuvor mit dem Linker **10** reagiert werden. Der Durchmesser der Nanopartikel \varnothing beträgt 30 ± 3 nm. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14.

Für den Nachweis der gezielten Anbindung werden die passivierten Nanopartikel zunächst mit dem Linker **10** umgesetzt und anschließend mittels Ultrafiltration und Gelfiltration aufgereinigt, um sie von überschüssigem Linker zu befreien. Im Folgenden werden sie mit den Thiol-derivatisierten Mikropartikeln inkubiert und mit Hilfe eines Magneten aufgereinigt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Probe sind in Abbildung 38 d dargestellt. Wie deutlich zu erkennen, binden in diesem Experiment die funktionalisierten Nanopartikel an die magnetischen Mikropartikel. Dies ist ein Hinweis, dass die Nanopartikel der Probe Maleimidgruppen tragen und so über den Linker an die Mikropartikel binden.

Im Weiteren wird die Anbindung der Peptide untersucht. Dazu werden beide Passivierungssysteme (Alkyl-PEG 600 basierte Thiole **6/7** und PEG 3000 basierte Thiole **4/5**) nach Anbindung des Linkers mit Peptiden **8** und **9** reagiert und aufgereinigt.

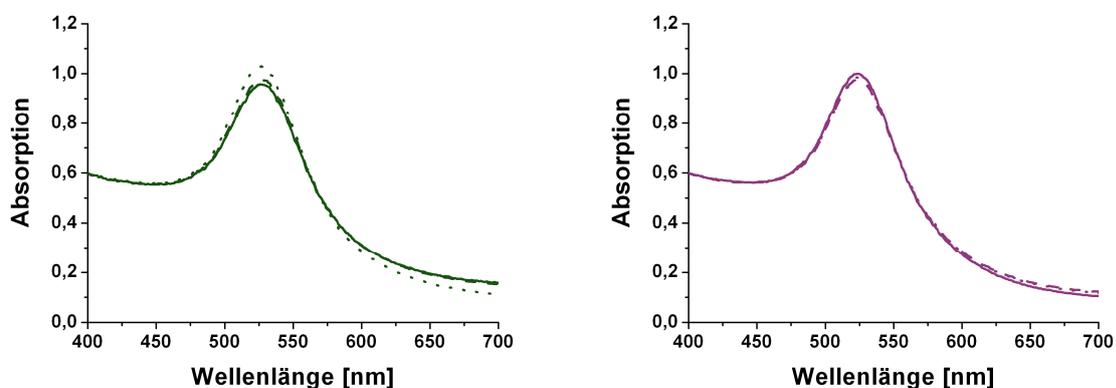


Abbildung 39: UV/Vis-Spektren der passivierten Gold Nanopartikel (—), der Peptid **8 funktionalisierten Nanopartikel (— —) und der Peptid **9** funktionalisierten Nanopartikel (····).** ■: PEG 3000 System, ■: Alkyl-PEG 600 System. Der Durchmesser der Nanopartikel \varnothing beträgt 35 ± 4 nm, der Der Molenbruch $x(\text{NH}_2) = 0,14$.

Die UV/Vis-Spektren der passivierten Nanopartikel und der Konjugate sind in Abbildung 39 dargestellt. Sowohl für das PEG 3000 System, als auch für das Alkyl-PEG600 System wird nach der Anbindung keine Verschiebung der Plasmonresonanz festgestellt, wie es für die Passivierungsreaktion mit 4/5 oder 6/7 zu beobachten war (s. Kapitel 3.2.2). Durch die Anbindung der Peptide an der Peripherie der Nanopartikel sind diese im vorliegenden Fall zu weit von der Oberfläche entfernt, um eine Verschiebung des Resonanzmaximums zu bewirken. Daher kann mittels UV/Vis-Spektroskopie keine Aussage über die erfolgreiche Anbindung getroffen werden. Um diese qualitativ zu prüfen, wird im Weiteren Gelelektrophorese durchgeführt. In Abbildung 40 ist dies repräsentativ für Peptid 8 und den beiden Passivierungssystemen dargestellt.

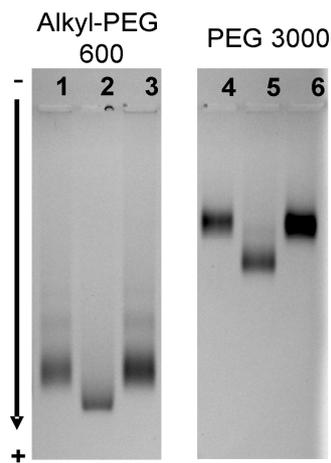


Abbildung 40: Agarosegelelektrophorese der Gold Nanopartikel. Alkyl-PEG 600 Thiole 6/7 (Spuren 1-3) sowie PEG 3000 Thiole 4/5 (Spuren 4-6) werden untersucht. Reihe 1/4: passivierte Nanopartikel, Reihe 2/5: Nanopartikel-Peptid Konjugate (Peptid 8) funktionalisiert via Linker 10, Spuren 3/6: passivierte Nanopartikel ohne Linker mit Peptid 8. Der Molenbruch der Aminokomponenten 5/7 beträgt $x(\text{NH}_2) = 0,14$. Der Durchmesser der Nanopartikel beträgt \varnothing beträgt 30 ± 3 nm.

Die negativ geladenen Nanopartikel-Peptid-Konjugate wandern zur positiven Elektrode, wobei die elektrophoretische Mobilität der Alkyl-PEG 6/7 passivierten Nanopartikel größer ist, als die der PEG 3000 4/5 passivierten Partikel (Spuren 1 und 4). Dies kann mit der unterschiedlichen Länge der Polymerkette erklärt werden. Je größer das Gesamtpartikel, desto langsamer wandert es im vernetzten Agarosegel. Gleichzeitig beeinflusst die Ladung des Partikels die elektrophoretische Mobilität. Die Nanopartikel-Peptid-Konjugate sind aufgrund der gebundenen Peptide stärker negativ geladen, als die passivierten Nanopartikel. Daher ist die elektrophoretische Mobilität der Konjugate höher, als die der passivierten Nanopartikel (Spuren 2/5 im Vergleich zu Spuren 1/4). Als Kontrolle werden die passivierten Nanopartikel ohne Linker 10 mit dem Peptid inkubiert. Anhand dieser Kontrolle soll die unspezifische Bindung des Peptids am passivierten Nanopartikel untersucht werden. Sowohl für das Alkyl-PEG 600 (Spur 3), als auch für das PEG 3000 System (Spur 6) sind die elektrophoretischen Mobilitäten mit denen der passivierten Nanopartikel vergleichbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Peptide nur an den Linker und nicht direkt an die Oberfläche der Nanopartikel binden.

Des Weiteren ist es von Bedeutung, dass die Gold Nanopartikel von ungebundenem Peptid getrennt werden, da die Nanopartikel-Peptid-Konjugate gezielt die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren blockieren sollen. Sind ungebundene Peptide in der Lösung, können diese in den synaptischen Spalt diffundieren und so die Unterscheidung der extrasynaptischen und synaptischen NMDA-Rezeptoren verhindern.

Tabelle 5: Prozentuale Rückgewinnung der Gold Nanopartikel nach Aufreinigung.

| x(NH ₂) [%] | C _{4/5} [nM] | Rückgewinnung | x(NH ₂) [%] | C _{6/7} [nM] | Rückgewinnung |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-------------------------|-----------------------|---------------|
| | PEG 3000 4/5 | | Alkyl-PEG 600 6/7 | | |
| 9 | 4,50 | 87% | 9 | 4,54 | 87% |
| 17 | 4,58 | 88% | 17 | 4,54 | 87% |
| 23 | 4,58 | 88% | 23 | 3,74 | 72% |
| 27 | 3,90 | 75% | 27 | 3,27 | 63% |
| 33 | 4,20 | 81% | 33 | 3,37 | 65% |

Daher werden sowohl Größenausschlusschromatographie, als auch Ultrafiltration zur Aufreinigung der Nanopartikel eingesetzt. Die prozentuale Rückgewinnung der Nanopartikel ist in Tabelle 5 dargestellt. Durch die eingesetzten Passivierungsschichten aus PEG 3000 Thiolen 4/5 und Alkyl-PEG 600 Thiolen 6/7 kann zum Einen die Konzentration der Nanopartikel mit einem Durchmesser von 30 ± 3 nm bis zu 4 nM erhöht werden, eine sehr hohe Konzentration für Nanopartikel diesen Durchmessers. Zum Anderen gelingt eine Rückgewinnung nach Aufreinigung zwischen 63% und 88% der Gold Nanopartikel. Das bedeutet, dass durch diese Aufreinigung nur ein geringer Verlust der Probe zu verzeichnen ist. Die Anbindung der Peptide konnte damit qualitativ nachgewiesen werden. Die quantitative Bestimmung der Anbindung der Peptide findet sich in Kapitel 3.6.

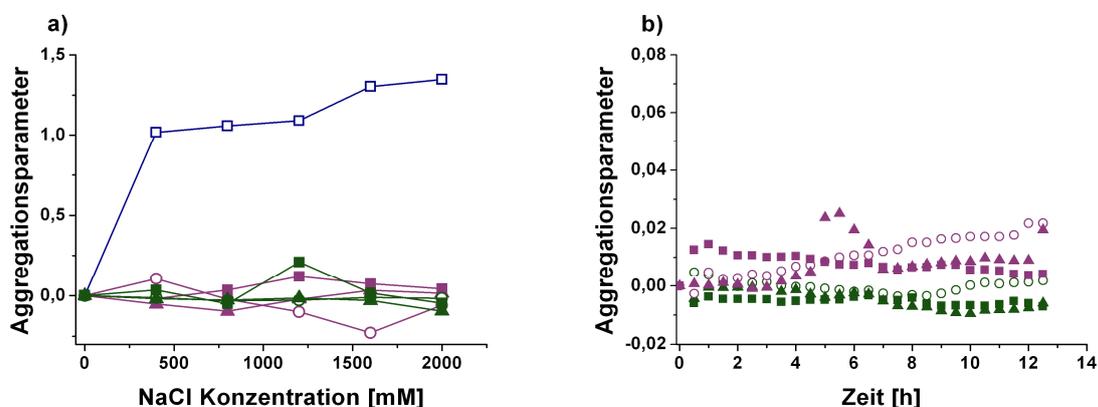


Abbildung 41: Aggregationsparameter der Gold Nanopartikel a) in verschiedenen Salzkonzentrationen b) in Zellkulturmedium als Funktion der Zeit. □: unfunktionalisierte Nanopartikel; ○: PEG 3000 Thiol 4/5 passivierte Nanopartikel; ○: Alkyl-PEG 600 Thiol 6/7 passivierte Partikel, ■/■: Peptid 9 gekoppelte Partikel, ▲/▲: Peptid 8 gekoppelte Partikel. Der Durchmesser der Nanopartikel \varnothing beträgt 35 ± 4 nm, der Molenbruch $x(\text{NH}_2) = 0,14$.

Im Weiteren sollen die Nanopartikel-Peptid-Konjugate auf ihre Stabilität in hohen Salzkonzentrationen und Zellkulturmedium hin untersucht werden. In Abbildung 41 a sind die Aggregationsparameter in Abhängigkeit von der Salzkonzentration dargestellt. Während die unpassivierten Gold Nanopartikel mit zunehmendem Salzgehalt der Lösung aggregieren, sind sowohl die passivierten Nanopartikel, also auch die Peptid-funktionalisierten Nanopartikel beider Passivierungssysteme bis zu einer Konzentration von 2 M NaCl stabil. Dies stimmt mit den in Kapitel 3.2.3 erhaltenen Ergebnissen der Stabilisierung der passivierten Nanopartikel überein. Eine höhere Konzentration an Salz wird nicht getestet, da sie für Experimente am

biologischen System nicht von Bedeutung sind. In Abbildung 41 b werden dieselben Proben in Zellkulturmedium gelöst und UV/Vis-Spektren nach Intervallen von 30 Minuten gemessen. Der Aggregationsparameter zeigt, dass die Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate über einen beobachteten Zeitraum von 13 Stunden nicht aggregieren. Für ein in dieser Arbeit eingesetztes Zeitfenster von 30 Minuten ist diese Stabilitätsmessung ausreichend. Es können somit erfolgreich Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate hergestellt werden, die im biologischen System eingesetzt werden können.

3.6 Bestimmung der Anzahl an gebundenen Peptiden

Nachdem die Passivierungsschicht der Nanopartikel bezüglich ihrer funktionellen Gruppen quantitativ analysiert wurde (s. Kapitel 3.4.1), soll im Weiteren die Funktionalisierung mittels des heterobifunktionalen Linkers **10** näher charakterisiert werden. Zur Konjugation werden die passivierten Nanopartikel mit dem Linker inkubiert und nach Aufreinigung mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid umgesetzt. Anschließend wird die Reaktion aufgereinigt und so von ungebundenem Peptid getrennt. Um auszuschließen, dass ungebundenes, fluoreszenzmarkiertes Peptid in der kolloidalen Lösung zurückbleibt, wird das Fluoreszenzsignal des Überstandes gemessen. Ist dieses von der Referenz des Puffers nicht zu unterscheiden, ergibt dies für das ungebundene Peptid verglichen mit der Kalibrierungskurve eine Konzentration kleiner 0,37 nM. Dies entspricht einer Lösung die nahezu frei von ungebundenem Peptid ist. Die Bestimmung der Anzahl an gebundenen Peptiden wird analog des in Kapitel 3.4 vorgestellten Verfahren zur Bestimmung der Anzahl an Aminogruppen durchgeführt.

Die Probe der Peptid-funktionalisierten Partikel wird in zwei Teile aufgeteilt. Ein Teil (Teil 1) dient der Konzentrationsbestimmung der Peptide nach Behandlung mit DTT/PB. Mit dem zweiten Teil der Probe (Teil 2) wird die Konzentration der Gold Nanopartikel mittels ICP-OES oder AAS bestimmt. Die durchschnittliche Anzahl an Peptiden pro Partikel errechnet sich, indem die Konzentration an Peptid in der Lösung (Teil 1) durch die Konzentration der Nanopartikel (Teil 2) dividiert wird.

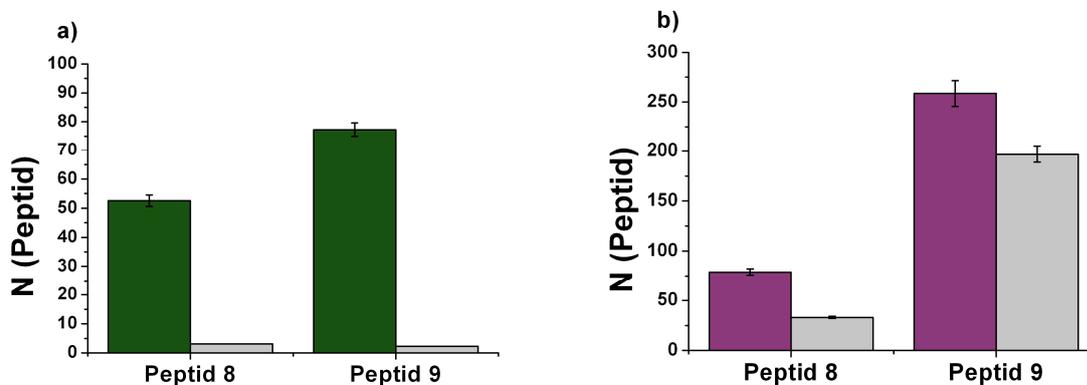


Abbildung 42: Anzahl der gebundenen Peptide pro Partikel (N_{Peptide}) für $\varnothing = 30 \pm 3$ nm Partikel. Kontrollexperimente ohne Linker sind in grau dargestellt. a) ■: Alkyl-PEG 600 6/7 passivierte Nanopartikel konjugiert mit Peptiden **8** und **9**. b) ■: PEG 3000 passivierte Nanopartikel konjugiert mit Peptiden **8** und **9**. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14.

Als Kontrolle wird die Reaktion ohne Linker **10** durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Cystein-terminierten Peptide auch ohne Linker an die Nanopartikel binden. Beide Passivierungssysteme und die in Kapitel 3.5 vorgestellten fluoreszenzmarkierten Peptide **8** und **9** werden mit diesem Verfahren untersucht. Die resultierenden Daten sind in Tabelle 6 zusammengefasst. In Abbildung 42 a ist eine Kopplungsreaktion mit Alkyl-PEG 600 Thiolen **6/7** passivierten Nanopartikeln exemplarisch dargestellt. Die Gold Nanopartikel tragen 53 ± 7 (Eintrag 21, Tabelle 6) Peptide **8** und 77 ± 11 Peptide **9** pro Partikel. Zunächst bestätigt dies die erfolgreiche Immobilisierung von Peptiden an die Nanopartikel, wie schon in der Gelelektrophorese gezeigt werden konnte (Kapitel 3.5). Die geringfügig höhere Anzahl an Peptid **8** im Vergleich zu Peptid **9** kann durch die stärkere negative Ladung des Peptids erklärt werden. Durch die elektrostatische Abstoßung wird eine geringere Anzahl an Peptiden angebunden. In der Kontrolle (grau dargestellt) ohne Linker **10** ist eine vernachlässigbar geringe Anzahl an Peptiden zu detektieren. Die Thiol-terminierten Peptide können also nicht durch die Passivierungsschicht an die Oberfläche der Nanopartikel diffundieren, um so mit den Nanopartikeln zu reagieren. Vermutlich schirmen die hydrophoben Wechselwirkungen der Alkylketten den Goldkern hinreichend ab, um eine Diffusion zu unterbinden.

Tabelle 6: Durchschnittliche Anzahl der gebundenen Peptide pro Partikel (N_{Peptide}).

| Eintrag | \emptyset [nm] | N_8 | $N_{8,K}$ | N_9 | $N_{9,K}$ |
|----------------|------------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| PEG3000 | | | | | |
| <i>1</i> | 65 ± 7 | 482 ± 24 | 390 ± 20 | 625 ± 22 | 418 ± 15 |
| <i>2</i> | 55 ± 6 | 453 ± 20 | 205 ± 16 | 530 ± 23 | 338 ± 17 |
| <i>3</i> | 45 ± 5 | 323 ± 12 | 252 ± 11 | 365 ± 14 | 266 ± 12 |
| <i>4a</i> | 41 ± 4 | - | - | 681 ± 30^b | 474 ± 16^b |
| <i>4b</i> | | - | - | 552 ± 17^b | 467 ± 20^b |
| <i>4c</i> | | - | - | 335 ± 11^b | 142 ± 4^b |
| <i>5a</i> | 35 ± 4 | - | - | 125 ± 6 | 100 ± 5 |
| <i>5b</i> | | - | - | 168 ± 6 | 121 ± 5 |
| <i>6a</i> | 35 ± 4 | - | - | 558 ± 18^b | 491 ± 17^b |
| <i>6b</i> | | - | - | 149 ± 7^b | 77 ± 5^b |
| <i>6c</i> | | - | - | 94 ± 3^b | 56 ± 2^b |
| <i>7a</i> | 32 ± 3 | - | - | 115 ± 4^b | 84 ± 3^b |
| <i>7b</i> | | - | - | 112 ± 3^b | 97 ± 3^b |
| <i>7c</i> | | - | - | 160 ± 5^b | 125 ± 5^b |
| <i>8a</i> | 32 ± 3 | 75 ± 4 | 43 ± 3 | 149 ± 6 | 143 ± 5 |
| <i>8b</i> | | 79 ± 3 | 43 ± 2 | 146 ± 5 | 120 ± 5 |
| <i>9</i> | 32 ± 3 | 79 ± 3 | 33 ± 1 | 259 ± 13 | 197 ± 8 |
| <i>10</i> | 30 ± 3 | 53 ± 7 | 21 ± 3 | 182 ± 5 | 108 ± 4 |
| <i>11a</i> | 30 ± 3 | - | - | 167 ± 5^b | 106 ± 4^b |
| <i>11b</i> | | - | - | 129 ± 5^b | 56 ± 2^b |
| <i>12</i> | 29 ± 3 | 64 ± 9 | 48 ± 7 | 40 ± 6 | - |
| <i>13</i> | 29 ± 3 | 80 ± 7 | 88 ± 8 | 43 ± 6 | - |
| <i>14</i> | 29 ± 3 | 86 ± 7 | 86 ± 8 | 62 ± 9 | - |
| <i>15</i> | 29 ± 3 | 108 ± 9 | 125 ± 10 | 84 ± 12 | - |

| Eintrag | \emptyset [nm] | N_8 | $N_{8, \kappa}$ | N_9 | $N_{9, \kappa}$ |
|---------------|------------------|----------|-----------------|----------|-----------------|
| PEG600 | | | | | |
| 16 | 65 ± 7 | 559 ± 22 | 0 | 613 ± 17 | 0 |
| 17 | 55 ± 6 | 414 ± 15 | 0 | 438 ± 13 | 0 |
| 18 | 45 ± 5 | 363 ± 11 | 0 | 396 ± 32 | 0 |
| 19a | 35 ± 4 | - | - | 103 ± 4 | 2 ± 0 |
| 19b | | - | - | 96 ± 6 | 2 ± 0 |
| 20a | 32 ± 3 | 10 ± 1 | 3 ± 0 | 35 ± 1 | 3 ± 0 |
| 20b | | 11 ± 1 | 4 ± 0 | 31 ± 1 | 3 ± 0 |
| 21 | 32 ± 3 | 53 ± 4 | 2 ± 0 | 77 ± 2 | 3 ± 0 |
| 22 | 30 ± 3 | 69 ± 3 | 0 | 113 ± 5 | 0 |
| 23 | 30 ± 3 | 64 ± 5 | 0 | 120 ± 4 | 0 |
| 24 | 30 ± 3 | 61 ± 3 | 0 | 121 ± 4 | 0 |
| 25 | 29 ± 3 | 34 ± 4 | - | 51 ± 6 | - |
| 26 | 29 ± 3 | 62 ± 5 | - | 80 ± 8 | - |
| 27 | 29 ± 3 | 73 ± 7 | - | 78 ± 8 | - |
| 28 | 29 ± 3 | 55 ± 6 | - | 71 ± 7 | - |

Bestimmungen wurden als Einzelmessungen durchgeführt, sofern nicht anders symbolisiert. Einträge 1-15 wurden mit PEG 3000 basierten Thiolen **4/5** passivierten Gold Nanopartikeln durchgeführt, Einträge 16- 28 mit Alkyl-PEG 600 basierten Thiolen **6/7**. Die Peptide N_8 und N_9 wurden mit Linker an die Nanopartikel gekoppelt, während in $N_{8, \kappa}$ und $N_{9, \kappa}$ der Linker nicht zur Reaktion zugegeben wurde. Jeder Eintrag beschreibt Proben, die in unabhängigen Wachstums- und Passivierungsreaktionen hergestellt wurden. Die Einträge mit unterschiedlichen Buchstaben beschreiben Proben aus derselben Wachstumsreaktion, aber unabhängigen Passivierungen. Der angegebene Standardfehler ergibt sich aus den Standardabweichungen der ICP-OES und der Fluoreszenzmessungen (s. 5.3.2). Die Standardabweichung des Durchmessers der Nanopartikel \emptyset ergibt sich aus der Halbwertsbreite ($2 \times \sigma$) der Gauß-Verteilung, die an die Größenverteilung der Nanopartikel angepasst wurde. In allen Einträgen ist der Molenbruch $x(\text{NH}_2) = 0.14$. ^bBestimmungen als Duplikat durchgeführt.

Der Vergleich zu PEG 3000 Thiolen **4/5** passivierten Nanopartikeln zeigt hingegen einen interessanten Effekt (Abbildung 42 b). Es sind insgesamt mehr Peptide pro Partikel gebunden. Allerdings zeigt die Kontrolle ohne Linker **10** (grau) eine erhebliche Anzahl an Peptiden. Dies bedeutet, dass die Peptide in diesem System direkt an die Partikeloberfläche binden und nicht ausschließlich über den Linker immobilisiert werden. Die direkte Bindung der Peptide reduziert die Kontrollierbarkeit des Systems. Durch die Polymere der Passivierungsschicht können die biologisch aktiven Peptide verdeckt und abgeschirmt werden, so dass die diese vermutlich nicht gezielt mit Rezeptoren in Wechselwirkung treten können. Diese direkte Bindung der Peptide an Nanopartikel, die mit PEG 3000 basierten Thiolen **4/5** passiviert sind, ist in allen durchgeführten Bestimmungen zu beobachten (Tabelle 6 und Abbildung 43). Beispielsweise zeigen Nanopartikel desselben Wachstums aber unabhängigen Passivierungs- und Funktionalisierungsreaktionen bereits eine starke Streuung in der Anbindung der Peptide (Einträge 4 a, b, c, und 6a, b, c). Auch beim Vergleich von Nanopartikeln aus unterschiedlichen Wachstumsreaktionen kann keine Korrelation der Anzahl der Peptide gefunden werden (Einträge 3 und 4 a, b, c). Die beträchtliche Streuung der Anzahl an Peptiden pro Partikel beim PEG 3000 System **4/5** ist in Abbildung 43 ebenfalls graphisch dargestellt. Die Ursache dieser Streuung beruht darauf, dass zwei konkurrierende Reaktionen gleichzeitig auftreten. Zum Einen die Anbindung über den Linker und zum Anderen eine Ligandenaustauschreaktion, in welcher

die Peptide direkt an die Partikeloberfläche binden. Das Passivierungssystem basierend auf Alkyl-PEG 600 Thiolen **6/7** auf der anderen Seite schirmt die Oberfläche der Nanopartikel hinreichend ab, um die direkte Anbindung der Thiol-terminierten Peptide zu verhindern. Dies kann in allen durchgeführten Messungen beobachtet werden (Tabelle 6). Daher ist die Konjugationsreaktion mittels Linker bei dem Alkyl-PEG 600 System besser kontrollierbar. Sowohl die Nanopartikel aus derselben Wachstumsreaktion und unabhängigen Passivierungen (Einträge 19 a, b und 20 a, b), als auch vollständig unabhängig präparierte Proben (Einträge 22, 23, 24, 26, 27, 28) mit vergleichbaren Nanopartikelgrößen zeigen eine gute Übereinstimmung der Werte.

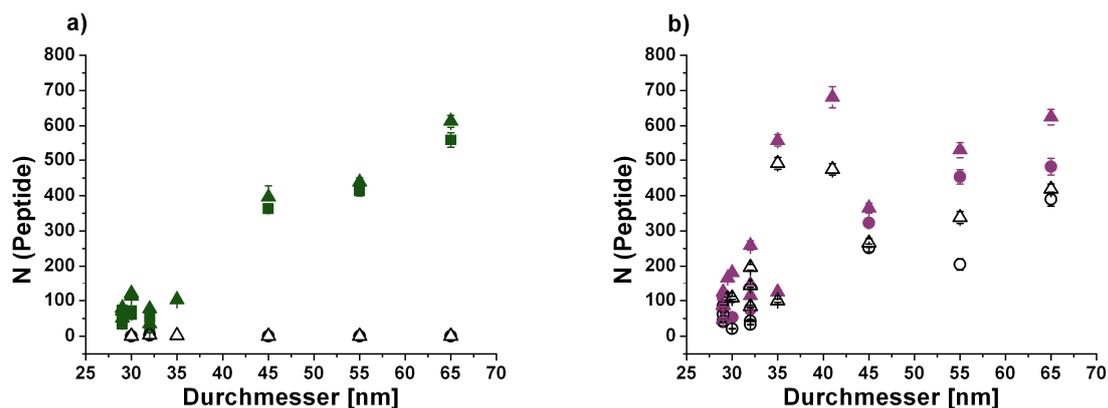


Abbildung 43: Durchschnittliche Anzahl an gebundenen Peptiden pro Partikel (N_{Peptide}) als Funktion des Partikeldurchmessers. a) Alkyl-PEG 600 Thiol **6/7** passivierte Nanopartikel b) PEG 3000 Thiol **4/5** passivierte Partikel. $\blacktriangle/\blacktriangle$ beschreiben Peptid **8**, \bullet/\bullet Peptid **9**. \circ/\triangle : Kontrollexperimente ohne Linker. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14 in allen Messungen. Die Daten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Generell gilt, je größer die Nanopartikel, desto mehr Peptide sind gebunden. Im nächsten Schritt soll überprüft werden, ob die Anzahl an gebundenen Peptiden durch Variation der Konzentration an Aminokomponente beeinflusst werden kann. Wie in Kapitel 3.4 bereits gezeigt wurde, kann die Anzahl der adressierbaren Aminogruppen in der Passivierungsschicht durch die Zusammensetzung der Liganden während der Passivierungsreaktion beeinflusst werden. Daher werden diese Proben mit einem Überschuss an Peptiden über den Linker konjugiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt. Durch Steuerung der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel kann gleichzeitig die Anzahl an Peptiden pro Partikel beeinflusst werden. Sowohl Peptid **8** als auch Kontrollpeptid **9** zeigen diesen Effekt.

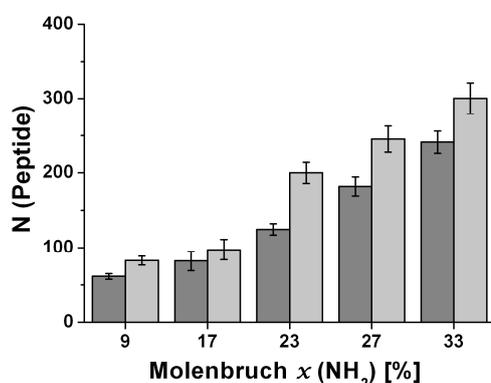


Abbildung 44: Durchschnittliche Anzahl an Peptiden (N_{Peptide}) als Funktion der Konzentration an Alkyl-PEG 600 basierten Thiolen **6/7 während der Passivierungsreaktion.** \blacksquare : Peptid **8**, \square : Peptid **9**. Der Durchmesser der Nanopartikel \varnothing beträgt 30 ± 3 nm in allen Proben.

Werden also Proben mit einer hohen Anzahl an Peptiden benötigt, können diese entweder durch Variation der Größe der Nanopartikel oder aber durch Veränderung der Zusammensetzung der Passivierungsschicht erzeugt werden.

Im Weiteren kann die Ausbeute der Kopplungsreaktion berechnet werden, indem die Anzahl an reaktiven Aminogruppen als Gesamtzahl vorhandener Bindungsstellen mit der Anzahl an Peptiden pro Partikel verglichen wird. Wie in Tabelle 7 gezeigt, liegt die Ausbeute der Kopplungsreaktion zwischen 26% und 41%. Für eine zweistufige Reaktion mit einem heterobifunktionalen Linker ist diese Ausbeute zufriedenstellend. Die Bestimmung der Ausbeute von Reaktionen mit Nanopartikeln wird selten durchgeführt, da die möglichen Bindungsstellen an Nanopartikeln nicht hinreichend genau bestimmt werden konnten. Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren ermöglicht jedoch diese Angabe und damit die Berechnung der Ausbeute der Kopplungsreaktion.

Tabelle 7: Ausbeute der Kopplungsreaktion.

| $x(\text{NH}_2)$ [%] | $N[\text{NH}_2]$ | N_8 | N_9 | Ausbeute 8 | Ausbeute 9 |
|----------------------|------------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|
| 9 | 204 ± 11 | 61 ± 4 | 83 ± 6 | 30 | 41 |
| 17 | 246 ± 15 | 82 ± 13 | 97 ± 14 | 33 | 39 |
| 23 | 487 ± 15 | 125 ± 7 | 200 ± 14 | 26 | 41 |
| 27 | 644 ± 20 | 182 ± 13 | 245 ± 18 | 28 | 38 |
| 33 | 837 ± 25 | 241 ± 15 | 300 ± 21 | 29 | 36 |

Ausbeute der Kopplungsreaktion in Abhängigkeit des Molenbruchs $x(\text{NH}_2)$ während der Passivierungsreaktion. $N[\text{NH}_2]$ gibt die maximale Anzahl an möglichen Bindungsstellen an, N_8 und N_9 die Anzahl an gebundenen Peptiden pro Partikel. Daraus errechnet sich die Ausbeute der Reaktion. Der Durchmesser der Partikel \varnothing beträgt 30 ± 3 nm.

Mit der oben beschriebenen Konjugationsreaktion ist es möglich, bis zu ~ 300 Peptide pro Nanopartikel anzubinden. Diese Anzahl kann mit anderen Peptiden, aus der Literatur verglichen werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die in Tabelle 8 dargestellten Konjugate nicht über gemischte PEG-stabilisierte Monolagen an die Nanopartikel gekoppelt werden. Vielmehr werden Thiol-derivatisierte Peptide direkt (Einträge 3, 5) oder als Teil einer gemischten Monolage (Einträge 1, 2, 4) direkt an die Partikeloberfläche gebunden.

Dabei werden verschiedene Liganden zur Bildung der gemischten Monolage verwendet. Beispielsweise werden kurzkettige Ethylenglykol-Derivate (Eintrag 4), Polyethylenglykol-Derivate (Eintrag 3) oder Oligonukleotide (Eintrag 1) eingesetzt. Auch die Charakterisierung der Konjugate weicht von dem hier beschriebenen Verfahren ab. Die Konzentration an Peptid kann für kleine Nanopartikel mittels $^1\text{H-NMR}$ (Eintrag 4), für größere Partikel mittels Aminosäure Analyse (Eintrag 3), oder Fluoreszenz bestimmt werden (Einträge 1, 3). Trotz dieser Unterschiede befindet sich die in dieser Arbeit bestimmte Anzahl an Peptiden in der Größenordnung der publizierten Werte. Das hier dargestellte System bietet jedoch den Vorteil, Thiol-funktionalisierte Peptide an die Peripherie der Nanopartikel anzubinden. Die Anzahl der

immobilisierten Peptide ist zudem durch Änderung der Zusammensetzung der Liganden während der Passivierungsreaktion steuerbar.

Die dargestellte Methode ermöglicht somit die Synthese von Nanopartikeln mit einer kontrollierbaren Oberflächenfunktionalisierung, die gezielte Untersuchungen von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen erlauben. Die genaue Charakterisierung des Systems hilft, die untersuchten Wechselwirkungen zu interpretieren und zu verstehen (s. Kapitel 3.7.6).

Tabelle 8: Durchschnittliche Anzahl an Peptiden pro Partikel aus der Literatur.

| Eintrag | Peptid | Ø / gemischte Monolage | N _{Peptide} |
|-------------------------|---------------------------|---|----------------------|
| 1 ⁵² | NLS ^a | 13 nm/8:1 Oligonukleotid:Peptid (Passivierungsreaktion) | 30-50 |
| 2 ⁵⁷ | RME ^b | 10 nm/PEG-SH, MW 5000 Da | 600 |
| 3 ²⁶⁹ | CLPFFD-NH ₂ | 12,5 nm/Monolage | 460 |
| | CLPDDF-NH ₂ | | 420 |
| | CDLPFF-NH ₂ | | 203 |
| 4 ²⁷⁰ | Dodekapeptid ^c | 3,5 nm/3:1 HS-C8-TEG:Peptid | 62 |
| 5 ¹⁶⁵ | CALNN | 12,3 nm, Monolage | 800-900 |

^aFluorescein-markiertes NLS (H₂N-C[Fic]KKKKKKKGGRGDMFG-OH; ^bRhodamin-markiertes adenovirales RME: CKKKKKKSEDEYPYVPN; LGYKAHFAGRGR-OH.

3.6.1 Zeitabhängige Charakterisierung der Anzahl an gebundenen Peptiden

Die Zeitabhängigkeit der Passivierungsschicht kann auch im Bezug auf die Peptidkopplung untersucht werden. Passivierte Gold Nanopartikel werden hierzu gelagert und nach verschiedenen Zeitintervallen mit den Peptiden konjugiert (Schema 2A). In einem zweiten Experiment werden bereits konjugierte Partikel gelagert (Schema 2B). Die Änderung der Anzahl an Peptiden wird in beiden Ansätzen verfolgt (Tabelle 9). Es wird erwartet, dass die Anzahl an gebundenen Peptiden aufgrund der Desorption von Liganden mit der Zeit abnimmt, wie es bereits für die Anzahl an Aminogruppen pro Partikel gezeigt werden konnte. Werden die Peptide zur jeweiligen Zeit gekoppelt (Eintrag 1), so kann nach 42 Tagen eine Abnahme an Peptid **8** von 35% gemessen werden. Für Proben, die einmal gekoppelt und anschließend gelagert werden (Eintrag 2) wird eine Abnahme von 30% detektiert. Diese Ergebnisse stimmen gut überein und entsprechen den Daten, die für die Zeitabhängigkeit der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel gemessen wurden. Dies unterstützt die Annahme, dass das Phänomen der Alterung der Passivierungsschicht durch Desorption der Liganden verursacht wird. Dabei ist unerheblich, ob die Alkyl-PEG 600 Thiole **6/7** nicht funktionalisiert vorliegen, oder mit Fluoreszenzmolekülen markiert werden.

Tabelle 9: Durchschnittlich Anzahl an Peptiden 8 und 9 in Abhängigkeit von der Zeit.

| Eintrag | | Zeit (d) | N ₈ | N _{8,κ} | N ₉ | N _{9,κ} |
|----------------------|----------|----------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1^a | a | 1 | 53 ± 4 | 3 | | |
| | b | 14 | 41 ± 3 | 1 | | |
| | c | 42 | 37 ± 3 | 5 | | |
| 2^b | a | 1 | 69 ± 6 | 0 | 113 ± 9 | 0 |
| | b | 14 | 50 ± 3 | 1 | 86 ± 7 | 1 |
| | c | 28 | 51 ± 10 | 2 | 73 ± 8 | 1 |
| | d | 42 | 45 ± 11 | 4 | 64 ± 6 | 4 |

Gold Nanopartikel werden mit Alkyl-PEG 600 Thiolen **6/7** passiviert ($x(\text{NH}_2) = 0,14$). N₈, N₉ geben die Anzahl an Peptiden **8** bzw. **9** wieder, N_{8,κ} und N_{9,κ} stellen Kontrollexperimente ohne Linker dar. Eintrag 1 bezieht sich auf Tabelle 6, Eintrag 21; Eintrag 2 bezieht sich auf Tabelle 6, Eintrag 22. ^aProben werden zu den gezeigten Zeiten entnommen, mit dem Peptid konjugiert und vermessen. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14 in allen Messungen. ^bProben werden an Tag 1 konjugiert und gelagert. Zu den angezeigten Zeiten werden die Proben aufgereinigt und vermessen. Der Molenbruch $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14 in allen Messungen.

3.7 Anwendung im Modellsystem der HEK 293 Zellen

Studien zur Exzitotoxizität von NMDA-Rezeptoren werden häufig anhand von Modellsystemen durchgeführt. Die menschliche Zelllinie HEK 293 (*engl.* „human embryonic kidney“) wird beispielsweise zu diesem Zweck mit verschiedenen Rezeptoruntereinheiten transfiziert.^{271, 272} In diesem nicht-neuronalen Modellsystem werden gezielt NMDA-Rezeptoren dargeboten, um sie auf ihre Funktion und unterschiedliche Affinitäten in Bezug auf modulatorische Substanzen zu testen. Im Gegensatz dazu liegen im komplexen neuronalen System verschiedene Rezeptorzusammensetzungen gleichzeitig vor, deren Expression nicht kontrolliert werden kann.²⁷³ Zudem besitzen Neuronen nicht nur NMDA-Rezeptoren, sie exprimieren auch andere Ionenkanäle, wie beispielsweise AMPA Kanäle. Dadurch wird die gezielte Untersuchung der NMDA-Rezeptoren zusätzlich erschwert. Durch die Einführung des zu untersuchenden Rezeptors in ein System, welches diesen Rezeptor natürlicherweise nicht exprimiert (Transgenexpression), können Funktionalitäten deutlicher erkannt und interpretiert werden, als in natürlicher Umgebung - ein Vorteil, der für alle *in vitro* Studien gleichermaßen gilt. Voraussetzung für die Anwendung eines Modellsystems ist allerdings die Anwesenheit der für die Funktion entscheidenden Effektormoleküle, sowie die Verfügbarkeit der verschiedenen Klone der Rezeptoruntereinheiten.²⁷⁴

HEK 293 Zellen, welche mit NMDA-Rezeptoren transfiziert werden, gehen einen Zelltod ein, der dem Glutamat vermittelten Zelltod in Neuronen ähnelt.²²² Daher können modulatorische Substanzen getestet werden und mechanistische Studien über Glutamat-vermittelten transienten Calciumstrom durchgeführt werden, die einen Einblick in dessen Verlauf und die

Funktionalität des Rezeptors ermöglichen.^{222, 275} Ergänzend ist es möglich, Mutanten der NMDA-Rezeptoren zu exprimieren und auftretende Funktionsänderungen mit der zugehörigen Struktur zu korrelieren. Anhand dieses Modellsystems konnte gezeigt werden, dass das Peptid Con-G selektiv an die NR2B Untereinheit der NMDA-Rezeptoren bindet und damit spezifisch Rezeptoren inhibiert, welche aus dieser Untereinheit assembliert sind (s. Kapitel 2.2.6).²⁵⁶

Dieses Modellsystem soll nun eingesetzt werden, um die selektive Bindung der in dieser Arbeit hergestellten Peptid-funktionalisierten Nanopartikel an NMDA-Rezeptoren nachzuweisen. Dazu werden HEK 293 Zellen mit Plasmiden der NR1 und NR2B Untereinheiten kotransfiziert und anschließend mit biofunktionalisierten Nanopartikeln inkubiert. Hiermit kann überprüft werden, ob das Peptid trotz Oberflächenimmobilisierung selektiv mit dem NMDA-Rezeptor wechselwirkt. Generell besteht die Möglichkeit, dass die Aktivität des Peptids durch die Bindung an das Nanopartikel herabgesetzt wird, oder gänzlich gehemmt wird. Mechanistische Studien zeigen, dass die 5 N-terminalen Aminosäuren des Peptids für die Funktionalität des helikalen Con-G Voraussetzung sind (s. Kapitel 2.2.6). Eine Anbindung über ein zusätzliches Cystein am C-Terminus sollte daher die Aktivität des Peptids nicht einschränken. Weiterhin wurde berichtet, dass in Lösung gebildete antiparallele Dimere des Peptids ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf NMDA-Rezeptoren ausüben.²⁵³ Diese Dimerisierung kann auf der Oberfläche der Nanopartikel naturgemäß nicht erfolgen. Über einen Bindungsnachweis soll daher die erhaltene Funktionalität des Peptids daher bestätigt werden. Zunächst wird in diesem Zusammenhang die Optimierung des Modellsystems dargestellt (s. Kapitel 3.7.3), gefolgt von einem Bindungsnachweis der hergestellten Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate (s. Kapitel 3.7.6).

3.7.1 Plasmide der NR1 und NR2B Untereinheit

Zur Transfektion werden zwei Plasmide eingesetzt, welche die NR1 und die NR2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors kodieren.^f Das Plasmid der NR1a Untereinheit besteht aus 7 555 Basenpaaren und ist damit etwas kleiner als das der NR2B Untereinheit, welches aus 10 412 Basenpaaren aufgebaut ist. Das Plasmid der NR2B Untereinheit enthält zusätzlich die Gensequenz von GFP (*engl.* green fluorescent protein).

Um die Sequenz der vorliegenden zyklischen DNA zu bestätigen, wird zunächst ein Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Das zugehörige DNA Agarosegel ist in Abbildung 45 dargestellt. Nach Verdau mit dem Restriktionsenzym Pst 1 werden für das Plasmid der NR1 Untereinheit vier Banden unterschiedlicher Größe erwartet, die aus 5 353, 1 518, 483 bzw. 201 Basenpaaren aufgebaut sind. Das native Plasmid der NR1 Untereinheit ist in Spur 1, die DNA nach Verdau in Spur 2 aufgetragen. Ein Vergleich mit der DNA Leiter zeigt, dass die Größen der vier detektierten Banden mit den erwarteten Größen überein stimmen. Für die NR2B Untereinheit werden nach Verdau sieben Banden erwartet, die aus 6 470, 1 191, 864, 681, 576, bzw. 483 Basenpaaren bestehen. Das native Plasmid ist in Spur 3, die DNA nach Verdau in Spur 4 aufgetragen. Auch hier stimmen die sieben detektierten Banden mit den erwarteten Banden überein.

^f Das Plasmid der NR1 Untereinheit wird von Dr. G. Köhr, MPI für medizinische Forschung, Heidelberg zur Verfügung gestellt, das Plasmid der NR2B Untereinheit von Dr. Daniela Mauceri, IZN Universität Heidelberg.

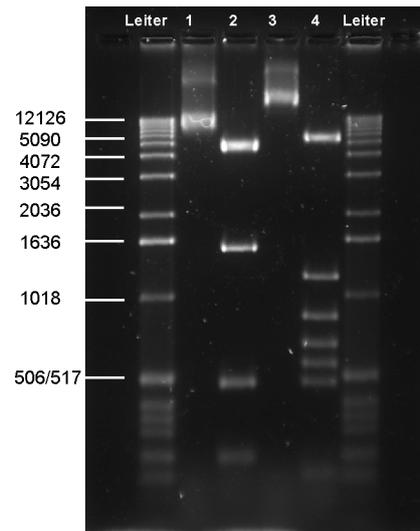


Abbildung 45: Agarose Gel der eingesetzten Plasmide. Nach der DNA Leiter sind in Spur 1 die native DNA der NR1 Untereinheit und in Spur 2 die NR1 Untereinheit nach Verdau mit dem Restriktionsenzym Pst I dargestellt. Spur 3 zeigt die native NR2B Untereinheit, Spur 4 den Verdau der NR2B Untereinheit mit dem Restriktionsenzym Pst I.

Aufgrund der Übereinstimmung der Größe der verschiedenen Banden kann darauf geschlossen werden, dass die Plasmide die angegebene Sequenz besitzen und aufgereinigt vorliegen. Zur Qualitätskontrolle wurden die Plasmide zusätzlich sequenziert. Um den in Anwesenheit von Glutamat auftretenden Zelltod der transfizierten HEK 293 Zellen zu verhindern, müssen die Zellen nach der Transfektion mit einem NMDA-Rezeptorblocker in Kultur gehalten werden.²⁷⁵ Es werden verschiedene NMDA-Rezeptorblocker getestet, um für den Bindungsnachweis eine ausreichende Anzahl lebender Zellen zur Verfügung zu stellen. Des Weiteren muss für diesen Bindungsnachweis die Transfektion der HEK 293 Zellen optimiert werden, um eine möglichst hohe Dichte an NMDA-Rezeptoren an der Zellmembran anzubieten. Hierzu werden die Plasmidkonzentration sowie deren Inkubationszeit variiert. Die beiden gegenläufigen Aspekte der Zellvitalität und Effizienz der Transfektion müssen optimiert und aufeinander abgestimmt werden. Die Untersuchungen zur Optimierung der Herstellung des Modellsystems der transfizierten HEK 293 Zellen werden im Folgenden beschrieben.

3.7.2 Auswahl des Antagonisten

Zunächst werden verschiedene literaturbekannte NMDA-Rezeptorblocker auf ihre Fähigkeit getestet, transfizierte HEK 293 Zellen vor dem programmierten Zelltod zu schützen. Dazu werden HEK 293 Zellen mit Plasmidkonstrukten der NR1 und der NR2B Untereinheit kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wird die Kultur zur Entfernung toter Zellen gewaschen, bevor die Anzahl der adhärennten Zellen analysiert wird. Diese Anzahl wird mit der Anzahl lebender Zellen gleichgesetzt. Zur Kontrolle werden Zellen ausschließlich mit dem Plasmid der NR1 sowie mit dem der NR2B Untereinheit transfiziert. Abbildung 46 a zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Proben. Die Probe der unbehandelten Kontrolle (A), sowie die Zellen, die nur mit jeweils einer Untereinheit transfiziert werden (B und

C), zeigen eine ähnliche Morphologie und Zelldichte. Einzelne Rezeptoruntereinheiten bilden keine funktionalen Rezeptoren, so dass die Zellen durch die Transfektion der Glutamatvermittelten exzitotoxischen Wirkung nicht ausgesetzt sind. Die Zellen, welche mit den Plasmiden der NR1 und NR2B Untereinheiten kotransfiziert werden (D), zeigen eine geringere Zelldichte und eine stärkere Aggregation der Zellen. Diese Beobachtungen werden in Abbildung 46 b quantifiziert. In den folgenden Graphen sind dazu die Transfektion der NR1 Untereinheit links schraffiert, die Transfektion der NR2B rechts schraffiert und die Kotransfektion in einer links/rechts schraffierten Säule dargestellt sind. Die Anzahl vitaler Zellen der unterschiedlich behandelten Kulturen wird 24 Stunden nach der Transfektion bestimmt und auf die der unbehandelten Kontrolle normiert (100%). Wie zu sehen, nimmt die Anzahl vitaler Zellen nach Transfektion mit einer Rezeptoruntereinheit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle geringfügig ab. Dies kann mit der Toxizität des Transfektionsreagenz Lipofectamin erklärt werden, da durch die alleinige Zugabe von Lipofectamin die Zellzahl ebenfalls geringfügig abnimmt. Lipofectamin bildet kationische Liposome, die mit der DNA aufgrund der entgegengesetzten Ladungen wechselwirken.

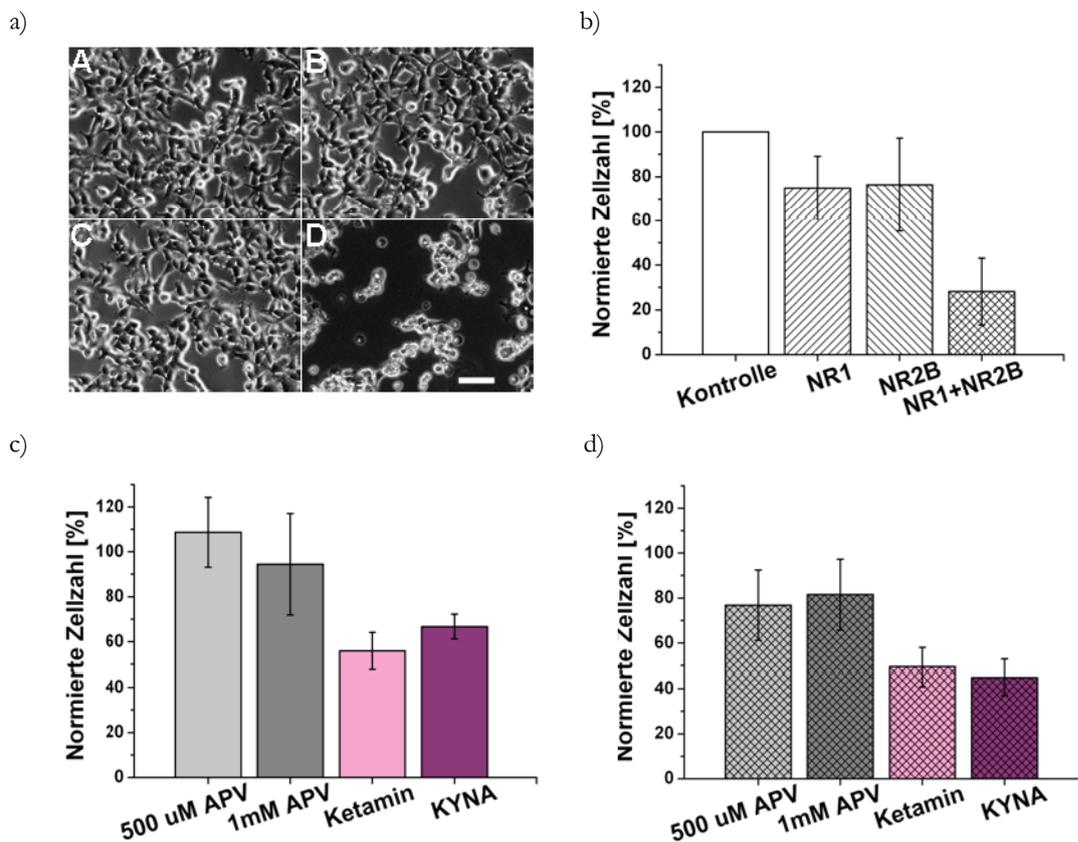


Abbildung 46: Untersuchung verschiedener literaturbekannter Antagonisten zur Optimierung der Anzahl lebender Zellen nach Transfektion der Plasmide der verschiedenen NMDA-Rezeptoruntereinheiten. a) Durchlichtaufnahmen von HEK 293 Zellen: A: unbehandelte Zellen, B: Transfiziert mit dem Plasmid der NR1 Untereinheit, C: Transfiziert mit dem Plasmid der NR2B Untereinheit D: Kotransfiziert mit Plasmiden der NR1 und NR2B Untereinheiten. Der Maßstab beträgt 100 μm . b) Normierte Zellzahl der verschiedenen transfizierten Zellen ohne Zugabe von Blocker. weiß: Kontrollkultur, links schraffiert: transfiziert mit dem Plasmid der NR1 Untereinheit, rechts schraffiert: transfiziert mit dem Plasmid der NR2B Untereinheit; links/rechts schraffiert: kotransfiziert mit beiden Plasmiden. c) Normierte Zellzahl untransfizierter Zellen nach Inkubation mit jeweiligem Rezeptorblocker. d) Normierte Zellzahl transfizierter Zellen in Anwesenheit des jeweiligen Blockers. Schraffur siehe b) Die Daten entstammen drei unabhängigen Experimenten, als Fehler ist die Standardabweichung angegeben. Zur Transfektion wurden 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid und 10 μL Lipofectamin 2000 pro Well einer 6-Wellplatte eingesetzt.

Nach Applikation der Lipofectamin-DNA-Komplexe auf die Zellen, fusionieren diese mit der Zellmembran, wodurch die DNA in die Zelle gelangt.²⁷⁶ Da Lipofectamin mit der Zellmembran interagiert, ist es generell für Zellen toxisch und darf nicht in zu hoher Konzentration eingesetzt werden.²⁷⁷ Sobald beide NMDA-Rezeptoruntereinheiten kotransfiziert werden, ist eine starke Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kultur zu detektieren. Ohne Zugabe des Rezeptorblockers liegt die Zellzahl 24 Stunden nach Transfektion nur noch bei $28 \pm 14\%$. Nach weiteren 24 Stunden können keine adhären Zellen mehr beobachtet werden. Diese Messungen bestätigen die in der Literatur beschriebenen Werte.²⁷⁴ Für HEK 293 Zellen, die transient mit Plasmiden der NR1 und NR2B Untereinheiten transfiziert werden, liegt die Anzahl lebender Zellen in der Literatur bei $(30,5 \pm 9,9\%)$. Die Kotransfektion im Verhältnis eins zu eins führt demnach zur Expression funktionaler Rezeptoren, die in HEK 293 Zellen eine exzitotoxische Wirkung hervorrufen. Wurden im Gegensatz dazu non-NMDA-Rezeptoren transfiziert, konnte kein Zelltod detektiert werden.²⁷⁴ Für den Bindungsnachweis der Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate wird eine möglichst hohe Anzahl vitaler Zellen benötigt, um die gebundenen Nanopartikel oberhalb der Nachweisgrenze detektieren zu können. Um des Weiteren vitale Zellen für eine experimentelle Durchführung zur Verfügung zu stellen, ist es daher von Bedeutung, einen Antagonisten einzusetzen, der diesen Zelltod verhindern kann. Verschiedene NMDA-Rezeptorblocker sind in der Literatur bekannt. Einige dieser Antagonisten sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: Auswahl verschiedener in der Literatur eingesetzter NR1/NR2B Rezeptor Antagonisten.

| Eintrag | Antagonist | Konzentration [mM] | Literatur |
|----------|---------------------|--------------------|-----------|
| 1 | Ketamin | 1 | 273, 278 |
| | | 0,2 | 275, 279 |
| 2 | APV ^a | 0,4 | 280 |
| | | 1 | 281-283 |
| 3 | KYNA ^b | 1 | 284 |
| 4 | MK 801 ^c | 0,1 | 273 |
| | | 0,01 | 284 |
| 5 | Memantin | 0,2 | 281, 283 |

^a 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, ^b 4-Hydroxychinolin-2-Carbonsäure, ^c Dizocilpin.

MK 801 dient hierbei aufgrund der hohen Affinität zu NMDA-Rezeptoren als irreversibler Antagonist und ist für die hier vorgestellte Anwendung daher nicht geeignet.²²⁸ Der Antagonist soll die transfizierten HEK 293 Zellen in Kultur vor Glutamat-vermitteltem Zelltod schützen, im Experiment jedoch werden funktionale NMDA-Rezeptoren benötigt. Daher muss der Rezeptorantagonist reversibel an die NMDA-Rezeptoren binden. Drei dieser NMDA-Rezeptorblocker werden auf ihre neuroprotektive Wirkung getestet. 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV)²⁷⁹, ein kompetitiver Antagonist (in grau dargestellt) wird neben Ketamin²⁷³ (rosa), einem nicht-kompetitiven „offenen Kanalblocker“ eingesetzt. Weiterhin wird 4-Hydroxychinolin-2-Carbonsäure (KYNA)²⁸⁴ (lila) getestet. Letzterer interagiert vermutlich mit der Glycin Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors (s. Kapitel 2.2.4). Alle drei Antagonisten

werden in der Literatur als NMDA-Rezeptorblocker beschrieben. Es wird zwar vermutet, dass APV an die NR2A Rezeptoruntereinheit bindet, allerdings wird diese Substanz auch bei Rezeptoren eingesetzt, die ausschließlich aus NR1 und NR2B Untereinheiten zusammengesetzt sind (s. Tabelle 10). Für die Rezeptoren, die aus NR1/NR2B Untereinheiten assembliert sind, wurde jedoch eine höhere Konzentration Antagonisten (APV) eingesetzt, als für Rezeptoren, die aus NR1/NR2A Untereinheiten zusammengesetzt sind.²⁷³

Zunächst werden diese Antagonisten in nicht transfizierten Zellen auf ihre Toxizität getestet. Abbildung 46 c zeigt die normierte Anzahl an Zellen, die jeweils mit 500 μ M, 1 mM APV, 1 mM Ketamin bzw. mit 1 mM KYNA drei Stunden inkubiert werden. Während APV in beiden Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl lebender Zellen ausübt, reduziert sich die Zellzahl bei Ketamin und KYNA Zugabe etwa um die Hälfte, obwohl die Zellen zuvor nicht transfiziert wurden. Nach Zugabe von Ketamin sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle $56 \pm 8\%$ adhärenente Zellen, nach Zugabe von KYNA $67 \pm 6\%$ adhärenente Zellen vorhanden. Dieser Effekt wurde in drei unabhängigen Experimenten beobachtet. Trotz dieser Reduktion der Anzahl lebender Zellen, werden die NMDA-Rezeptorblocker auf ihre Fähigkeit getestet, transfizierte HEK 293 Zellen vor NMDA-vermitteltem Zelltod zu schützen. Die verschiedenen Antagonisten werden hierzu mit transfizierten Zellen inkubiert (Abbildung 46 d). Die Anzahl lebender Zellen der verschiedenen Kulturen wird auf die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle (nicht gezeigt) normiert. APV schützt die mit beiden NMDA-Rezeptoruntereinheiten kotransfizierten Zellen in beiden getesteten Konzentrationen. Es werden für 500 μ M APV $77 \pm 16\%$, für 1 mM APV $82 \pm 16\%$ adhärenente Zellen detektiert. In den Proben, die mit Ketamin und KYNA inkubiert werden, können hingegen nur $50 \pm 9\%$ (Ketamin) bzw. $45 \pm 9\%$ (KYNA) adhärenente Zellen detektiert werden. Die Reduktion der lebenden Zellen kann zum Einen auf die vorher detektierte toxische Wirkung der Antagonisten, oder auf einen im Vergleich zu APV geringeren Schutz dieser Rezeptorblocker zurückgeführt werden. Für den geplanten Bindungsnachweis sind diese NMDA-Rezeptorblocker nicht geeignet. APV hingegen übt in einer Konzentration von 500 μ M einen protektiven Effekt auf die NR1 und NR2B exprimierenden HEK 293 Zellen aus. Möglicherweise verringert die Änderung des pH-Werts durch APV Zugabe neben dem Wirkstoff selbst die NMDA-vermittelte Toxizität.²⁷⁴ Die Erhöhung der Konzentration von APV auf 1 mM verstärkt diesen beobachteten Schutz nicht, so dass eine Konzentration von 500 μ M APV für die hier durchgeführte Transfektion ausreichend ist und für die folgende Optimierung der Transfektionseffizienz eingesetzt wird.

3.7.3 Optimierung der Transfektion von HEK293 Zellen

Im nächsten Schritt wird die Transfektion der HEK 293 Zellen mit Plasmiden, welche die NR1a oder die NR2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors kodieren, optimiert, um eine hohe Expression an NMDA-Rezeptoren für den Bindungsnachweis der Gold-Nanopartikel-Peptid-Konjugate zur Verfügung zu stellen. Dazu werden sowohl die Konzentration der Plasmide als auch die Inkubationszeit der Lipofectamin-Plasmid Lösung variiert. Die Transfektionseffizienz, welche als prozentualer Anteil positiv transfizierter Zellen einer Kultur definiert ist, wird mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Detektiert wird hier das Fluoreszenzsignal des GFPs, welches

rekombinant an die NR2B Untereinheit angefügt ist. Die Durchflusszytometrie dient der Erfassung von intra- oder extrazellulären Proteinen sowie von physikalischen Eigenschaften der Zellen, wie Größe oder Granularität. Die physikalischen Eigenschaften der Zellen werden anhand des von ihnen gestreuten Lichtes analysiert. Je nach Anordnung der Streulichtdetektoren unterscheidet man zwischen nach vorne gestreutem Licht (Forward Scatter, FS), welches Informationen über die Größe der Zellen liefert, und seitlich gestreutem Licht (Sideward Scatter, SS), aus dem auf die Granularität der Zellen rückgeschlossen werden kann. Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, verschiedene Zellmerkmale quantitativ zu bestimmen. Dazu können die betrachteten Proteine mit fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt, oder wie in diesem Fall mittels GFP detektiert werden.

Um im Durchflusszytometer zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden zu können, wird eine Propidiumiodid (PI)-Färbung vorgenommen. PI besitzt die Fähigkeit, in doppelsträngige DNA zu interkalieren und bei Anregung mit UV-Licht zu fluoreszieren. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu dem Nukleinsäuregehalt der Zelle. Wie auch andere Farbstoffe (Bsp. Trypanblau) kann PI nicht die intakten Zellmembranen lebender Zellen passieren und färbt deshalb nur die DNA toter Zellen an.

Mittels dieses Farbstoffausschlusstests kann zunächst ermittelt werden, ob die Membran inaktiven Zellen durch die Waschstreps aus der Probe entfernt wurden. Gleichzeitig kann festgestellt werden, dass GFP enthaltende Zellen, welche keine PI-Fluoreszenz aufweisen, sowohl erfolgreich transfiziert als auch vital sind. Repräsentative Messungen sind in Abbildung 47 dargestellt. In einem Punktwolkendiagramm, in der die Vorwärtsstreuung (FS) gegen die Seitwärtsstreuung (SS) aufgetragen wird, wird zunächst die zu messende Zellpopulation markiert, um sie von Zellfragmenten oder Staub zu trennen. Nur die in Rechteck F befindlichen Zellen werden anschließend analysiert. Der Anteil an fluoreszenten Zellen kann in einem Histogramm sowohl für den GFP-Fluoreszenzkanal, als auch für den PI-Kanal einzeln dargestellt werden. In diesen Histogrammen wird anhand von Kontrollexperimenten mit im jeweiligen Kanal nicht fluoreszierenden Zellen ein Schwellenwert festgelegt, der die positiv fluoreszenten Zellen von den nicht fluoreszenten Zellen trennt. Die positiv GFP-markierten Zellen befinden sich in Bereich G (Abbildung 47), die PI gefärbten Zellen liegen wiederum in Bereich H. Um die verschiedenen Experimente vergleichen zu können, wird immer die gleiche Einstellung der Umrandung der gemessenen Population (F) sowie der Schwellenwerte G und H gewählt. In Abbildung 47 a sind die Messungen der PI-behandelten, untransfizierte Zellen dargestellt. In dem Punktwolkendiagramm ist eine definierte Population der Zellen zu erkennen, die durch das Rechteck F umrandet wurde. Weiterhin ist in den Einzelhistogrammen des grünen und roten Kanals nur die nicht fluoreszente Population vorhanden. Nach den Transfektionen des Plasmids der NR1 Untereinheit b) und dem der NR2B Untereinheit c) zeigen die Zellen eine vergleichbare Granularität und Größe, wie die unbehandelten Zellen in a). Die mit dem Plasmid der NR2B Untereinheit positiv transfizierten Zellen können durch die Expression des GFPs detektiert werden. Die Transfektionseffizienz liegt in diesem Fall bei 49%. Werden jedoch beide Plasmide kotransfiziert (d), nimmt die Homogenität der Zellpopulation im Punktwolkendiagramm ab. Die transfizierten Zellen scheinen eine geringere Größe zu besitzen, als die nicht transfizierten Zellen, was durch die Verschiebung der Population in der Vorwärtsstreuung angezeigt wird. Dies konnte in allen durchflusszytometrischen Messungen beobachtet werden.

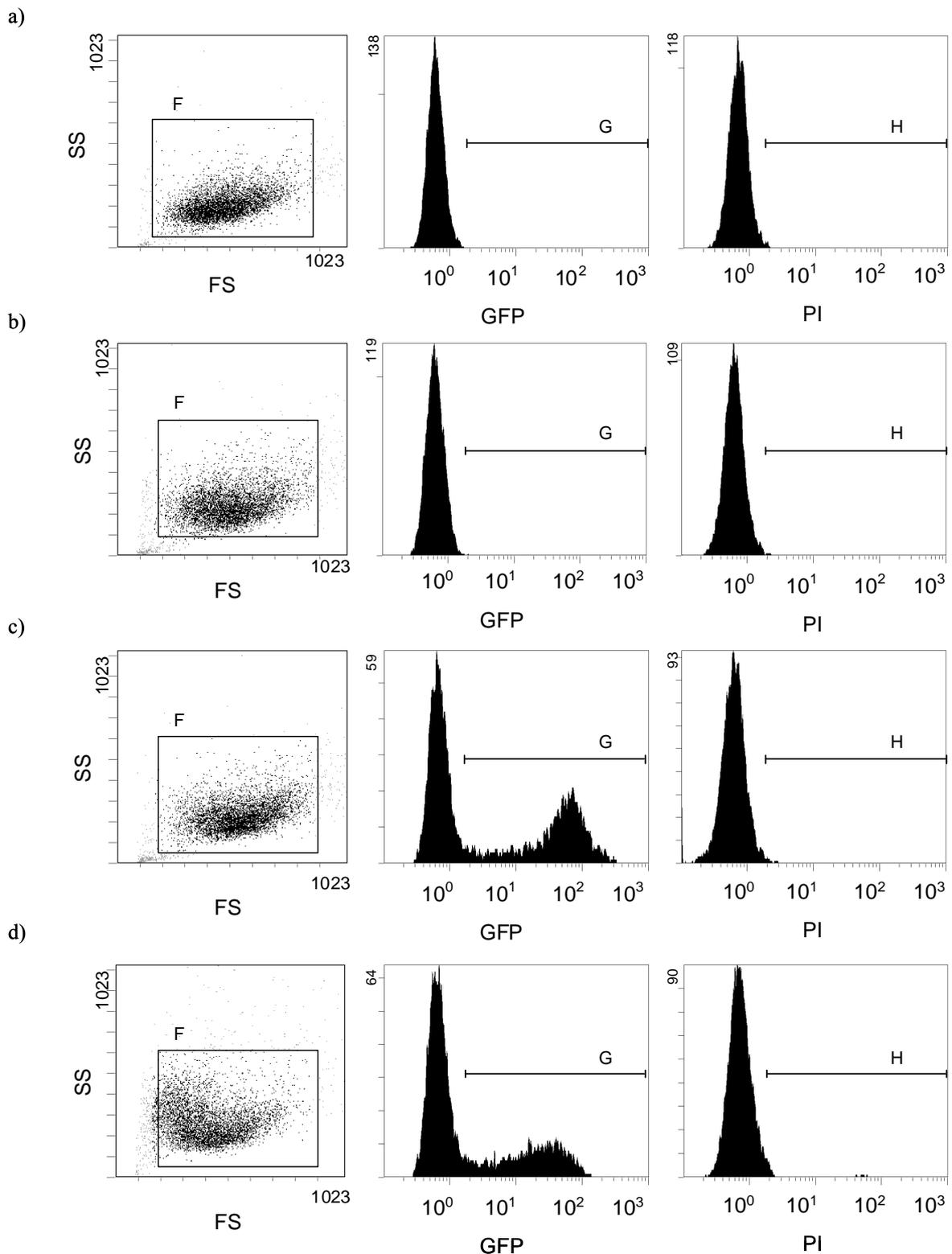


Abbildung 47: Durchflusszytometrische Messungen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz als Punktwolkeendiagramm und als Histogramm. a) Unbehandelte Zellen; G (GFP): 0,5%, H (PI): 1,9%; b) NR1 transfizierte HEK 293 Zellen: GFP: 0,8%, PI: 2,1%; c) NR2B transfizierte Zellen: GFP: 49%, PI: 2,4%; d) NR1 und NR2B kotransfizierte Zellen: GFP: 39%, PI: 5,4%. Im Bereich F wurden 10 000 Zellen gemessen. Zur Transfektion wurden 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid und 10 μL Lipofectamin 2000 pro 6-Wellplatte eingesetzt.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz eines einzelnen Fluoreszenzkanals ist die Darstellung als Histogramm sinnvoll, da hier direkt der Anteil an fluoreszenten Zellen sichtbar wird. Um jedoch die Auswertung zwei verschiedener Fluoreszenzkanäle durchzuführen, eignet sich im Besonderen eine zweidimensionale Auftragung. In einer zweidimensionalen Auftragung werden beide zu detektierenden Fluoreszenzkanäle in einem Graphen aufgetragen. Hierbei ist die Fluoreszenz des grünen Kanals (GFP) gegen die Fluoreszenz des roten Kanals (PI) aufgetragen. Dadurch können Zellen identifiziert werden die sowohl GFP als auch PI positiv sind. Dies ist in einem Histogramm wie in Abbildung 47 dargestellt nicht möglich. Der Graph wird in der zweidimensionalen Auftragung in vier Quadranten unterteilt. In Quadrant 1 liegen die PI-positiven Zellen, in 2 die Zellen, die sowohl PI- als auch GFP-positiv sind. Quadrant 3 beschreibt die Zellpopulation, die weder PI- noch GFP-positiv sind und Quadrant 4 die Zellen, die GFP positiv sind. Die Positionierung der Quadranten erfolgt mit Hilfe von Kontrollexperimenten, in denen kein Fluoreszenzfarbstoff bzw. jeweils nur ein Fluoreszenzfarbstoff enthalten ist. Statt der Einteilung in Quadranten, werden häufig Ellipsen um die verschiedenen Zellpopulationen gezogen, die die positiven Zellen von den negativen Populationen trennen. Durch Anwendung unterschiedlicher Methoden der Auswertung kann das Resultat der Transfektionseffizienz der Zellen variieren. Um einen möglichst realistischen Wert der Transfektionseffizienz zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die Auswertung der Einteilung in Quadranten eingesetzt.

In Abbildung 48 a und b sind die Messungen der unbehandelten Zellen sowie die der ausschließlich mit dem Plasmid der NR1 Untereinheit transfizierten Zellen dargestellt, die jeweils mit PI inkubiert wurden. Wie zu ersehen, wird nur eine geringe Anzahl toter Zellen detektiert (Quadrant 1) und 99% der unbehandelten Zellen befinden sich in Quadrant 3, sind also wie erwartet weder für PI noch GFP positiv. Für die Transfektion des Plasmids der NR1 Untereinheit befinden sich etwa 98% der Zellen im Quadrant 3. Da nur das Plasmid der NR2B Untereinheit die Sequenz des GFPs kodiert, weisen die NR1 transfizierten Zellen keine Fluoreszenz im grünen Kanal auf. Abbildung 48 c zeigt die Messungen der Zellen, die ausschließlich mit dem Plasmid der NR2B Untereinheit transfiziert werden. Wie zu erwarten, werden hier GFP-positive Zellen detektiert (Quadrant 4). Die Transfektionseffizienz beträgt für diese exemplarische Transfektion des Plasmids der NR2B Untereinheit 48%. In Abbildung 48 d werden die Zellen vermessen, die sowohl mit dem Plasmid der NR1, als auch mit dem der NR2B Untereinheit transfiziert wurden. Die Anzahl an toten Zellen ist ebenfalls gering, da diese Zellen durch den unmittelbar vorher durchgeführten Waschvorgang entfernt werden konnten. Die Transfektionseffizienz, die durch die Fluoreszenz des GFPs detektiert wird, liegt etwas niedriger (36%), als bei der ausschließlichen Transfektion des Plasmids der NR2B Untereinheit (c). Es ist zu erwähnen, dass die Transfektionseffizienz nur anhand des Fluoreszenzsignals der NR2B Untereinheit gemessen wird. Analog zu diesem Beispiel wird im Folgenden die Transfektionseffizienz der verschiedenen Optimierungsexperimente ermittelt. Zudem wird die Anzahl lebender, adhärenter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle analog dem Vorgehen der Auswahl des Antagonisten bestimmt (s. Kapitel 3.7.2). Zur Optimierung der Transfektion wird zunächst in drei unabhängigen Experimenten die Konzentration an Plasmid variiert. Als Blocker werden zu allen Proben 500 μ M APV gegeben, um die Zelltodrate nach der Transfektion zu verringern.

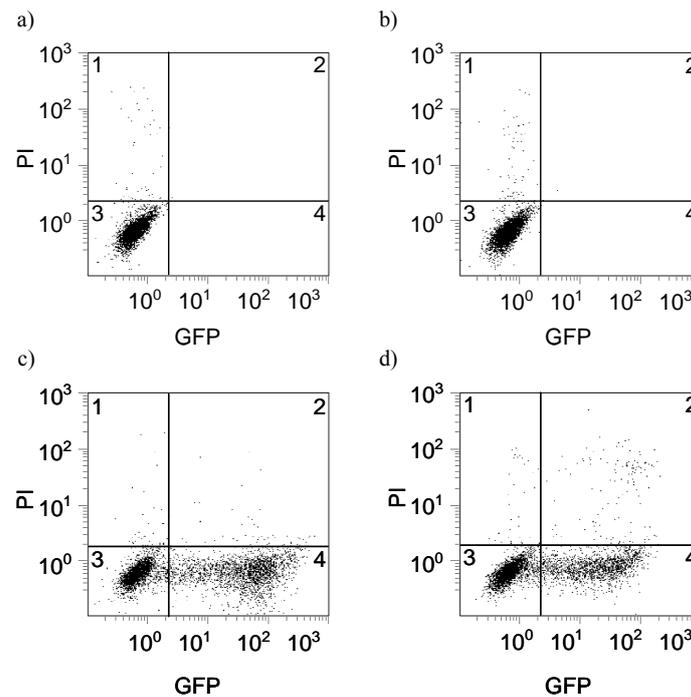


Abbildung 48: Durchflusszytometrische Messungen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz in Zweidimensionaler Auftragung. Die Intensität des grünen Kanals (GFP) ist gegen die Intensität des roten Kanals (PI) aufgetragen. Die Graphen sind in vier Quadranten unterteilt. Anhand der eingezeichneten Schwellenwerte können nicht transfizierte Zellen von fluoreszenten Zellen unterschieden werden. a) Unbehandelte Zellen; 1: 1%; 2: 0,2%; 3: 98,6%; 4: 0,2%; b) NR1 transfizierte HEK 293 Zellen: 1: 1,5%; 2: 0,3%; 3: 97,7%; 4: 0,5%; c) NR2B transfizierte Zellen: 1: 0,7%; 2: 1,2%; 3: 50,2%; 4: 47,9%; d) NR1 und NR2B kotransfizierte Zellen: 1: 0,7%; 2: 3,0%; 3: 60,2%; 4: 36,1%. In Bereich F (Abbildung 47) wurden 10 000 Zellen vermessen. Zur Transfektion wurden $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid und $10 \mu\text{L}$ Lipofectamin 2000 pro 6-Wellplatte eingesetzt.

Sowohl eine ausschließliche Transfektion mit dem Plasmid der NR2B Untereinheit (links schraffiert), als auch eine Kotransfektion beider Plasmide (links/rechts schraffiert) werden durchgeführt. In Abbildung 49 a und b sind für beide Fälle die Anzahl lebender Zellen nach der Transfektion in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration dargestellt. Zellen, die ausschließlich mit dem Plasmid der NR2B Untereinheit transfiziert werden, zeigen mit zunehmender Plasmidkonzentration eine geringe Abnahme der Anzahl lebender Zellen. Für $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid werden $76 \pm 6\%$ lebender Zellen detektiert. Eine zehnfach erhöhte Konzentration von $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid ergibt eine Anzahl lebender Zellen von $49 \pm 8\%$. Im Fall der kotransfizierten Zellen liegt die Anzahl lebender Zellen (50 b) unterhalb der NR2B-Plasmid transfizierten Zellen (50 a). Hier nimmt die Anzahl lebender Zellen außerdem mit zunehmender Plasmidkonzentration stark ab. Für eine jeweilige Plasmidkonzentration von $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ liegt die Anzahl lebender Zellen bei $33 \pm 5\%$. Aufgrund einer höheren Passagierung der Zellen ist die Anzahl lebender Zellen in diesen Experimenten geringer verglichen mit den Experimenten zur Auswahl des Antagonisten (Abbildung 46). Im Folgenden wurde darauf geachtet, die Passagierung der verwendeten Zellen gering zu halten.

In Abbildung 49 c und d sind die Transfektionseffizienzen in Abhängigkeit der eingesetzten Plasmidkonzentration aufgetragen. Wie zu erwarten nimmt die Transfektionseffizienz mit steigender Plasmidkonzentration zu. Für die ausschließliche Transfektion des Plasmids der NR2B Untereinheit (c) liegt diese zwischen $23 \pm 1\%$ bei $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid und $45 \pm 6\%$ bei Zugabe von $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid. Diese Tendenz ist ebenfalls für die Kotransfektion beider

Plasmide zu beobachten. Obwohl die Transfektionseffizienz mit steigender Plasmidkonzentration leicht zunimmt (d), sind diese Bedingungen durch die starke Reduktion der Anzahl lebender Zellen für ein Experiment zum Bindungsnachweis der funktionalisierten Nanopartikel nicht geeignet.

Für weitere Transfektionen wurde nach diesen Messungen eine Stammlösung einer Konzentration von $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ des jeweiligen Plasmids eingesetzt. Die Anzahl lebender Zellen ist mit $53 \pm 8\%$ akzeptabel. Die Transfektionseffizienz in drei unabhängig durchgeführten Experimenten beträgt hier im Durchschnitt $42 \pm 7\%$.

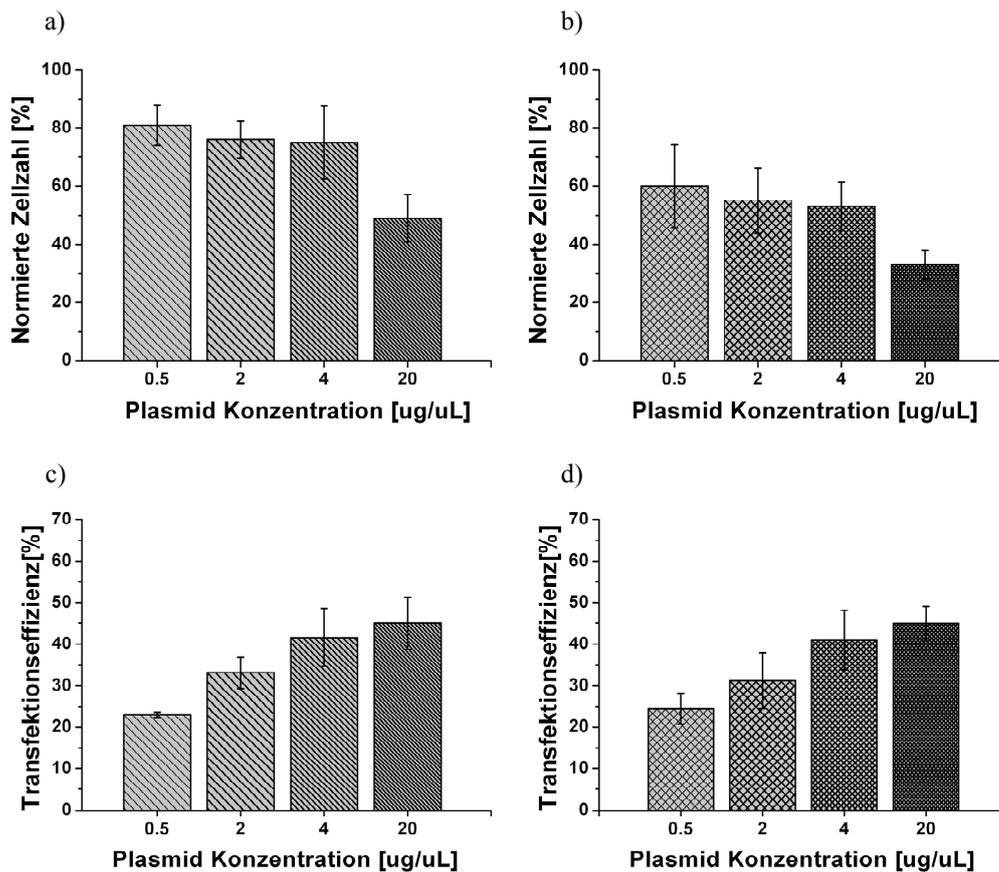


Abbildung 49: Optimierung der Transfektionseffizienz und der Anzahl lebender Zellen durch Variation der Plasmidkonzentration. a) Prozentuale Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von NR2B transfizierten Zellen. b) Prozentuale Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von NR1 und NR2B kotransfizierten Zellen. Die Plasmidkonzentration bezieht sich auf die jeweilige Untereinheit. c) Transfektionseffizienz ermittelt über Durchflusszytometrie der NR2B transfizierten Zellen d) Transfektionseffizienz der NR1 und NR2B kotransfizierten Zellen. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Zur Transfektion wurde die angegebene Plasmidkonzentration und $10 \mu\text{L}$ Lipofectamin 2000 pro Well einer 6-Wellplatte eingesetzt und für 3 Stunden inkubiert.

Im nächsten Schritt soll überprüft werden, ob durch die Änderung der Inkubationszeit der Plasmid-Lipofectamin-Lösung die Transfektionseffizienz gesteigert werden kann. Hierzu werden ebenfalls drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen entweder ausschließlich das Plasmid der NR2B Untereinheit, oder die Plasmide der NR1 und NR2B Untereinheiten kotransfiziert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 dargestellt.

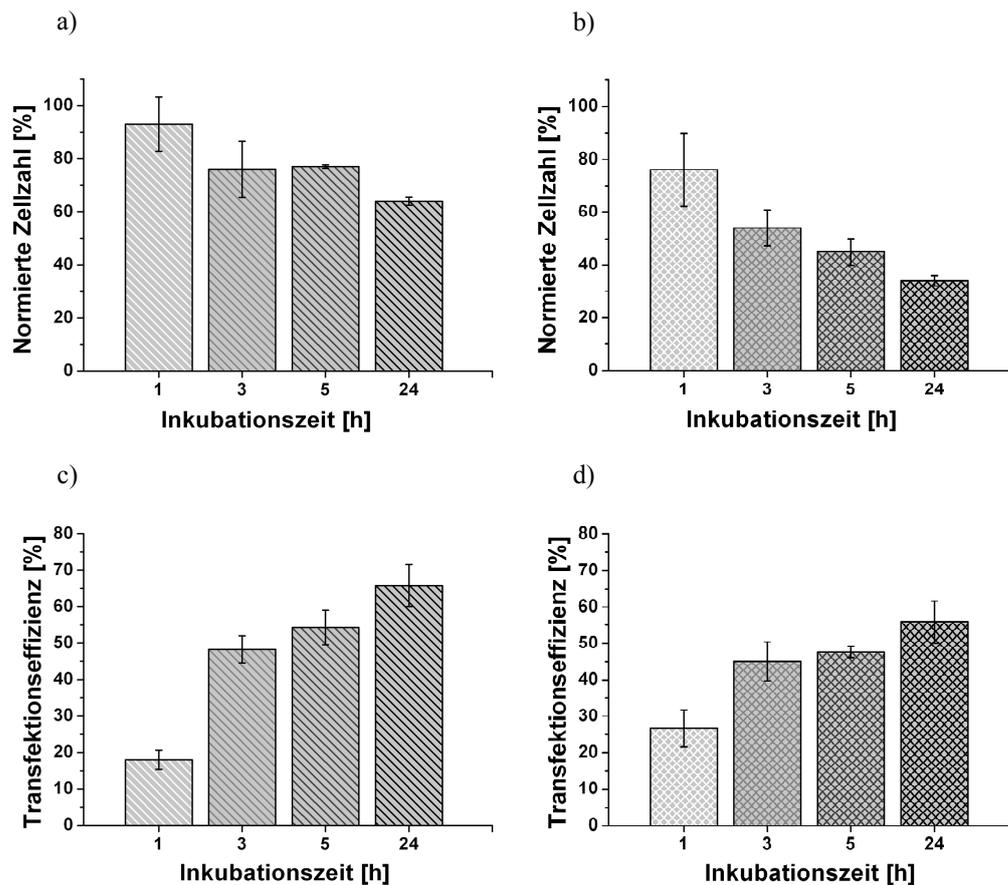


Abbildung 50: Optimierung der Transfektionseffizienz und der Anzahl lebender Zellen durch Variation der Inkubationszeit. a) Relative Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von NR2B transfizierten Zellen. b) Prozentuale Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von NR1 und NR2B kotransfizierten Zellen. c) Transfektionseffizienz ermittelt über Durchflusszytometrie der NR2B transfizierten Zellen d) Transfektionseffizienz der NR1 und NR2B kotransfizierten Zellen. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Durch die Transfektion der NR2B Untereinheit nimmt die Anzahl der lebenden Zellen im Verlauf der Inkubationszeit geringfügig ab (a). Nach einer Inkubation von 24 Stunden werden $64 \pm 2\%$ lebende Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe gemessen. Werden hingegen beide Plasmide kotransfiziert (b), nimmt die Anzahl lebender Zellen deutlich ab. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle noch $34 \pm 2\%$ lebende Zellen detektierbar. Wie erwartet steigt die Transfektionseffizienz (Abbildung 50 c und d) mit der Zeit. Wird nur die NR2B Untereinheit transfiziert beträgt sie nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden $66 \pm 6\%$. Bei einer Kotransfektion erhöht sich die Transfektionseffizienz durch die Verlängerung der Inkubationszeit nicht bedeutend. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden sind $45 \pm 5\%$, nach 5 Stunden $48 \pm 2\%$, nach 24 Stunden $56 \pm 6\%$ der Zellen transfiziert. Auf Basis dieser Ergebnisse wird die Plasmid-Lipofectamin Lösung für die nachfolgenden Zellexperimente für 3 Stunden inkubiert, um die Anzahl an lebenden Zellen so hoch wie möglich zu halten.

Die in der Literatur bestimmte Transfektionseffizienz von HEK 293 Zellen mit verschiedenen Plasmiden der NMDA-Rezeptoruntereinheiten beträgt je nach Bedingung 60-80%.^{273, 285} Rinoul *et al.* transfizierten HEK 293 Zellen mit $3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid und $10 \mu\text{L}$ Lipofectamin, Aneqawa *et al.* nutzen hingegen die Calciumphosphat Methode zur Transfektion.²⁸⁶ Letztere bestimmten die

Transfektionseffizienz über die Kotransfektion eines weiteren Plasmids, welches die Gensequenz des GFPs kodiert. Dieses Plasmid wurde mit den Plasmiden der NR1 und NR2B Untereinheit in einem Verhältnis von 1:1:1 transfiziert. Plasmide, welche die Gensequenz des GFP kodieren, bestehen möglicherweise aus weniger Basenpaaren und werden je nach vorhandenem Promotor stärker exprimiert, als die Plasmide der NMDA-Rezeptoren, die zudem als funktionale NMDA-Rezeptoren einen toxischen Effekt ausüben. Diese indirekte Bestimmung der Transfektionseffizienz ist damit weniger genau, als die direkte Bestimmung der Transfektionseffizienz über eine rekombinante Expression der GFP-markierten Untereinheit.

Da bis jetzt die Transfektionseffizienz nur über die Expression des GFPs der NR2B Rezeptoruntereinheit bestimmt wurde, muss die Expression der NR1 Untereinheit im Folgenden nachgewiesen werden. Die Analyse der Koexpression der GFP-markierten NR2B Untereinheit mit der nicht fluoreszenten NR1 Untereinheiten, die für die Bildung funktionaler Rezeptoren Voraussetzung ist, wird in Kapitel 3.7.4 dargestellt.

3.7.4 Nachweis der NR1 Untereinheit

Die oben beschriebenen Experimente werden ausgewertet, indem die NR2B Untereinheit mittels Fluoreszenz durch die Expression des GFPs detektiert wird. Durch Immunfärbungen und durchflusszytometrische Untersuchungen soll im nächsten Schritt die NR1 Untereinheit nachgewiesen werden, da nur die Expression beider Untereinheiten funktionale Rezeptoren liefert. Die NR1 Untereinheit wird nach Fixierung mit einem NR1 spezifischen Erstantikörper markiert und über einen zweiten fluoreszenzkonjugierten Antikörper detektiert. Der Zweitantikörper besitzt als fluorophore Gruppe R-Phycoerythrin (R-PE), welches ein Emissionsmaximum bei 565 nm besitzt.

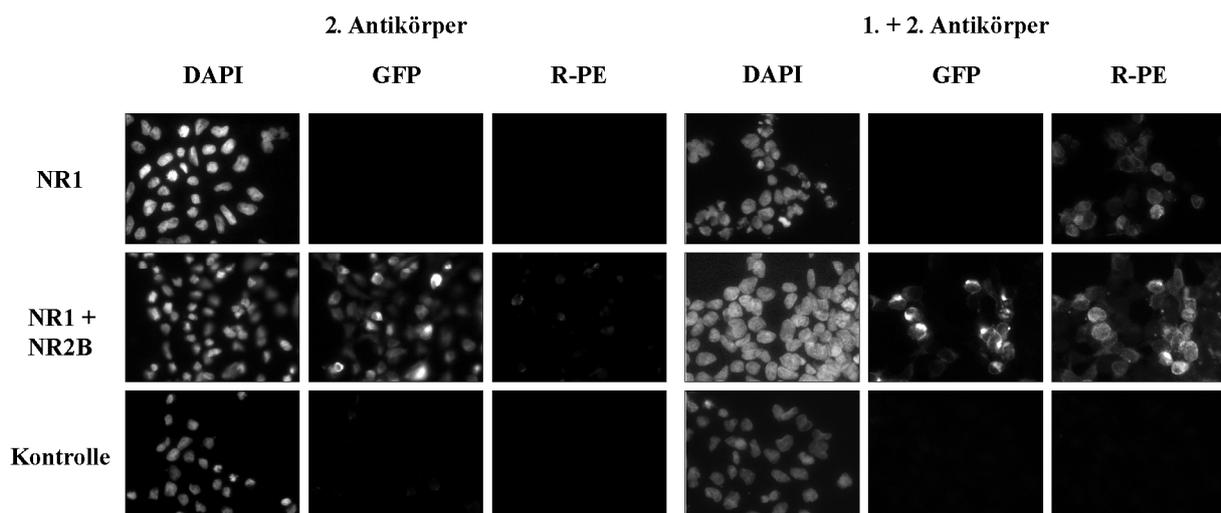


Abbildung 51: Fluoreszenzaufnahmen der Immunfärbung. Links sind die Kontrollen dargestellt, in denen nur der zweite Antikörper inkubiert wird. Rechts sind die Experimente dargestellt, in denen Erst- und Zweitantikörper inkubiert werden. Es werden Zellen, die nur die NR1 Untereinheit exprimieren (erste Reihe), die beide Untereinheiten exprimieren (zweite Reihe) und unbehandelte Zellen (dritte Reihe) untersucht. Der Zellkern wird mit DAPI angefärbt, welches zusammen mit der Fluoreszenz des GFPs sowie der des Zweitantikörpers (R-PE) abgebildet wird. Die horizontale Seitenlänge einer Fluoreszenzaufnahme beträgt 225 µm.

Die mittels Fluoreszenzmikroskopie erhaltenen Aufnahmen der antikörpermarkierten transfizierten Zellen sind zusammen mit den entsprechenden Kontrollen in Abbildung 51 dargestellt. Die Zellen werden ausschließlich mit dem Plasmid der NR1 Untereinheit (Reihe 1), oder mit dem der NR1 und NR2B Untereinheit kotransfiziert (Reihe 2). Außerdem werden unbehandelte Zellen zur Kontrolle eingesetzt (Reihe 3). Um die unspezifische Adsorption des Zweitantikörpers zu untersuchen, werden die Zellen nach dem Blocken mit BSA zunächst nur mit dem Zweitantikörper inkubiert (links). Zur Visualisierung der Zellkerne werden diese mit DAPI angefärbt, welches neben dem Fluoreszenzsignal des rekombinanten NR2B-GFP Proteins sowie dem Signal des fluoreszenzmarkierten Antikörpers (R-PE) aufgenommen wird. Werden die verschiedenen Zellproben sowohl mit Erst- als auch Zweitantikörper inkubiert, kann die NR1 Untereinheit spezifisch nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz wird sowohl für die Zellen, die ausschließlich mit der NR1 Untereinheit transfiziert werden, als auch für die mit Plasmiden beider Untereinheiten transfizierten Zellen detektiert. Unbehandelte Zellen hingegen zeigen erwartungsgemäß keine Fluoreszenz im grünen (GFP) und im roten (R-PE) Kanal. Um auszuschließen, dass die Bindung des Zweitantikörpers unspezifisch erfolgt, wird zudem ausschließlich der Zweitantikörper inkubiert.

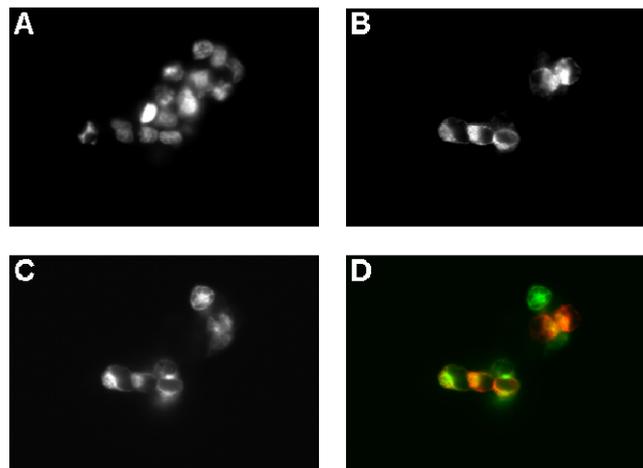


Abbildung 52: Fluoreszenzaufnahmen der mit Plasmiden der NR1 und NR2B kotransfizierten HEK 293 Zellen. A: Zellkern mit DAPI gefärbt; B: Immunfärbung der NR1 Untereinheit (R-PE); C: Fluoreszenz der NR2B Untereinheit (GFP); D: Überlagerung der roten (R-PE) und grünen (GFP) Fluoreszenz. Die Seitenlänge einer Fluoreszenzaufnahme entspricht 225 μm .

Wie in Abbildung 51 links zu sehen, liegt nur eine schwache unspezifische Adsorption des Zweitantikörpers vor. Damit wird die Expression der NR1 Untereinheit bestätigt. Eine vergrößerte Darstellung der kotransfizierten Zellen ist in Abbildung 52 dargestellt. In A sind die Zellkerne gezeigt, die mit DAPI angefärbt werden. Weiterhin ist auch hier die Fluoreszenz des roten (R-PE, B) und des grünen (GFP, C) Kanals gezeigt. In D sind der rote und der grüne Fluoreszenzkanal überlagert abgebildet. Durch den Vergleich der Zellkernfärbung mit DAPI (A) mit der Fluoreszenz des R-PE (B) und des GFPs (C) wird deutlich, dass nicht alle Zellen transfiziert sind. Jedoch kann in einigen Zellen die NR2B Untereinheit durch grüne Fluoreszenz und die NR1 Untereinheit durch rote Fluoreszenz detektiert werden. Weiterhin sind Zellen vorhanden, die sowohl rote, als auch grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Zellen sind positiv kotransfiziert, da beide Rezeptoruntereinheiten in einer Zelle lokalisiert werden können. Die Kolokalisation von grüner und roter Fluoreszenz zeigt in der Überlagerung eine gelbe Färbung.

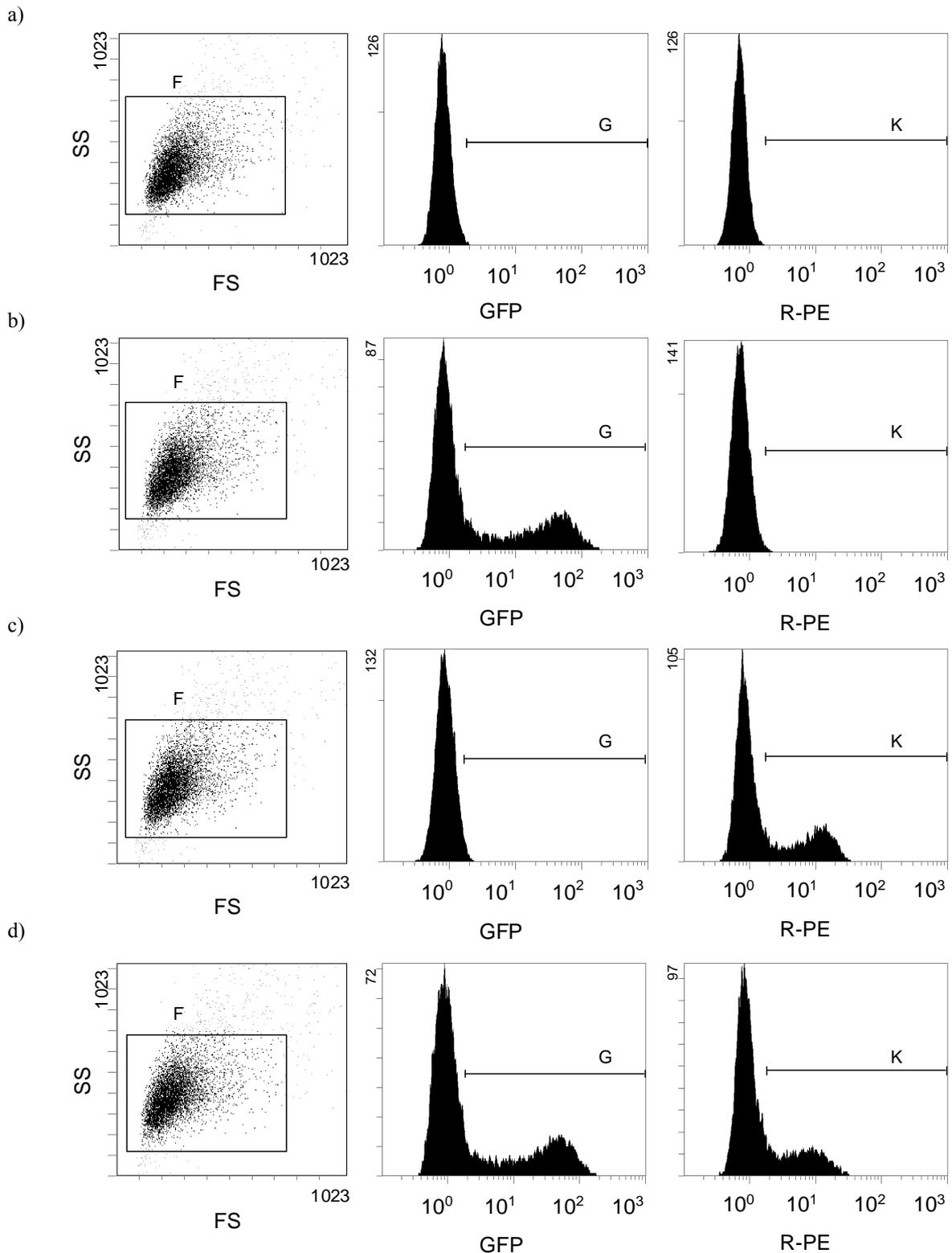


Abbildung 53: Durchflusszytometrische Messungen zur Quantifizierung der Kotransfektion als Punktwolkendiagramm und als Histogramm. a) unbehandelte Zellen; GFP (G): 0,7%, R-PE (K): 0,9%; b) NR2B transfizierte HEK 293 Zellen; GFP: 38%, R-PE: 0,9%; c) NR1 transfizierte Zellen; GFP: 0,7%; R-PE: 36%; d) NR1 und NR2B kotransfizierte Zellen; GFP: 37%, R-PE: 35%. In Bereich F wurden 10 000 Zellen analysiert. . Zur Transfektion wurden 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid und 10 μL Lipofectamin 2000 pro 6-Wellplatte eingesetzt und für 3 Stunden inkubiert.

Die Anzahl dieser kotransfizierten Zellen soll im nächsten Schritt quantifiziert werden. Dies erfolgt mittels Durchflusszytometrie, wobei die exprimierte NR1 Untereinheit wie oben beschrieben mit einem Antikörper markiert werden muss. Zur Immunfärbung werden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die resultierenden Punktwolkendiagramme sowie die Histogramme der einzelnen Fluoreszenzkanäle sind in Abbildung 53 dargestellt. Durch diese Probenpräparation besitzt die detektierte Zellpopulation, die mit Rechteck F umrandet wird, im Vergleich zu nicht fixierten Zellen eine veränderte Morphologie. Dies ist durch Vergleich der Punktwolkendiagramme in Abbildung 47 und Abbildung 53 ersichtlich. Diese Änderung ist sowohl für die nicht transfizierten Zellen, als auch für die einzeln transfizierten Zellen zu beobachten. Zudem verändert sich die Morphologie der Zellen durch Kotransfektion beider Plasmide nicht, wie es im Fall der nicht fixierten Zellen detektiert wurde (Abbildung 47). Die Effizienz der Transfektion des NR2B Plasmids kann, wie oben gezeigt, über die rekombinante Expression des GFPs nachgewiesen werden. Nach Immunfärbung wird die Transfektion der NR1 Untereinheit über die Fluoreszenz des Zweitantikörpers nachgewiesen (R-PE). Die Analyse der Transfektion der einzelnen Untereinheiten kann, wie oben bereits beschrieben, über die Darstellung der Histogramme erfolgen. Hierbei können die nicht transfizierten Zellen einfach von den transfizierten Zellen unterschieden werden. Die Transfektionseffizienz der Kotransfektion (d) beträgt für das Plasmid der NR1 Untereinheit beispielsweise 35%, für das Plasmid der NR2B Untereinheit 37%. Zur Bestimmung des Anteils an kotransfizierten Zellen eignet sich auch hier die zweidimensionale Auftragung, wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben. Hierbei wird wieder die Fluoreszenz des grünen Kanals (GFP) gegen die Fluoreszenz des roten Kanals (R-PE) aufgetragen und die Zellpopulation wird in vier Quadranten unterteilt.

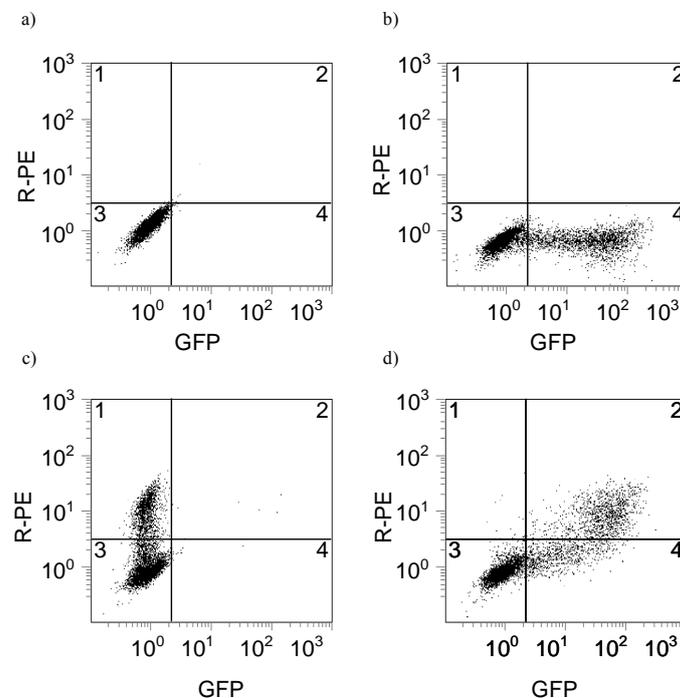


Abbildung 54: Durchflusszytometrische Messungen zur Quantifizierung der Kotransfektionseffizienz. Die Intensität des grünen Kanals (GFP) ist gegen die Intensität des roten Kanals (R-PE) aufgetragen. Die Graphen sind in vier Quadranten unterteilt. Anhand der eingezeichneten Schwellenwerte können negative nicht fluoreszente Zellen von transfizierten Zellen unterschieden werden. a) unbehandelte Zellen: 1: 0,1%; 2: 0,2%; 3: 99,5%; 4: 0,2%; b) NR2B transfizierte HEK 293 Zellen: 1: 0,1%; 2: 0,5%; 3: 60,3%; 4: 39,1%; c) NR1 transfizierte Zellen: 1: 33,9%; 2: 0,9%; 3: 64,3%; 4: 0,9%; d) NR1 und NR2B kotransfizierte Zellen: 1: 2,1%; 2: 31,0%; 3: 58,5%; 8,4%.

In Quadrant 1 liegen die R-PE-positiven Zellen, demnach die Zellen, die NR1 exprimieren. In Quadrant 2 liegen die Zellen, die sowohl R-PE- als auch GFP-positiv sind und damit die NR1 und NR2B Untereinheiten exprimieren. Quadrant 3 beschreibt die Zellpopulation, die weder R-PE- noch GFP-positiv sind und Quadrant 4 zeigt die Zellen, die GFP positiv sind, was eine NR2B-Expression anzeigt. Die Quadranten werden anhand von Kontrollexperimenten positioniert, in denen kein Fluoreszenzfarbstoff bzw. jeweils nur ein Fluoreszenzfarbstoff enthalten ist. Abbildung 54 a zeigt die Messung der untransfizierten Zellen. Die Schwellenwerte der Quadranten werden so gewählt, dass 99,5% der unbehandelten Zellen im Quadrant 3 liegen. Abbildung 54 b zeigt die Zellen, die mit dem Plasmid der NR2B Untereinheit transfiziert wurden. Diese zeigen eine Fluoreszenz im grünen Kanal, wobei die Transfektionseffizienz für dieses Experiment bei 39% liegt. Die Zellen, die mit der NR1 Untereinheit transfiziert wurden, sind in Abbildung 54 c abgebildet. Diese zeigen aufgrund der Antikörperfärbung eine Fluoreszenz im roten Kanal. Die Transfektionseffizienz beträgt hier 34%. Abbildung 54 d zeigt die Messung der kotransfizierten Zellen. 31% der Zellen befinden sich in Quadrant 2 und sind damit sowohl GFP- als auch R-PE positiv. Es werden also beide NMDA-Rezeptoruntereinheiten koexprimiert. Die Transfektionseffizienz mit beiden Plasmiden ist erwartungsgemäß geringer, als die Effizienz der Einzeltransfektionen. Dies beruht auf der Bildung funktioneller Rezeptoren, die den Zelltod vermitteln. Nach der Optimierung der Transfektionseffizienz und dem Nachweis der Kolo-kalisation der beiden Untereinheiten soll dieses Modellsystem nun eingesetzt werden, um einen Bindungsnachweis der Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate durchzuführen.

3.7.5 Bindungsnachweis mittels REM

Die Anbindung der Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate wird zunächst qualitativ mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Dazu werden die transfizierten Zellen zunächst in einem Waschvorgang vom Antagonisten befreit, um funktionale Rezeptoren darzubieten. Danach werden die Zellen 30 Minuten mit den funktionalisierten Gold Nanopartikeln inkubiert. Um nicht gebundene Nanopartikel zu entfernen, werden die Zellen anschließend gewaschen. Zur Visualisierung im Elektronenmikroskop werden die mit Nanopartikel inkubierten Zellen fixiert und Kritisch-Punkt getrocknet. Die Aufnahmen der Zellen in verschiedenen Vergrößerungen sind in Abbildung 55 dargestellt. Die transfizierten Zellen werden mit Nanopartikeln inkubiert, die über den Linker **10** mit Peptid **8** funktionalisiert sind. Als Kontrolle dienen Nanopartikel, die über den Linker **10** mit dem biologisch nicht aktiven Kontrollpeptid **9** funktionalisiert werden. Wie zu sehen, binden nur Gold Nanopartikel an die transfizierten Zellen, die mit dem biologisch aktiven Peptid **8** funktionalisiert werden (links). Nanopartikel, die mit Peptid **9** funktionalisiert werden, können in den REM-Aufnahmen nicht detektiert werden (rechts). Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann geschlossen werden, dass die Anbindung der mit Peptid **8** funktionalisierten Nanopartikel über eine Wechselwirkung mit dem NMDA-Rezeptor erfolgt. Die hergestellten Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate wechselwirken spezifisch mit den dargebotenen NMDA-Rezeptoren in HEK 293 Zellen.

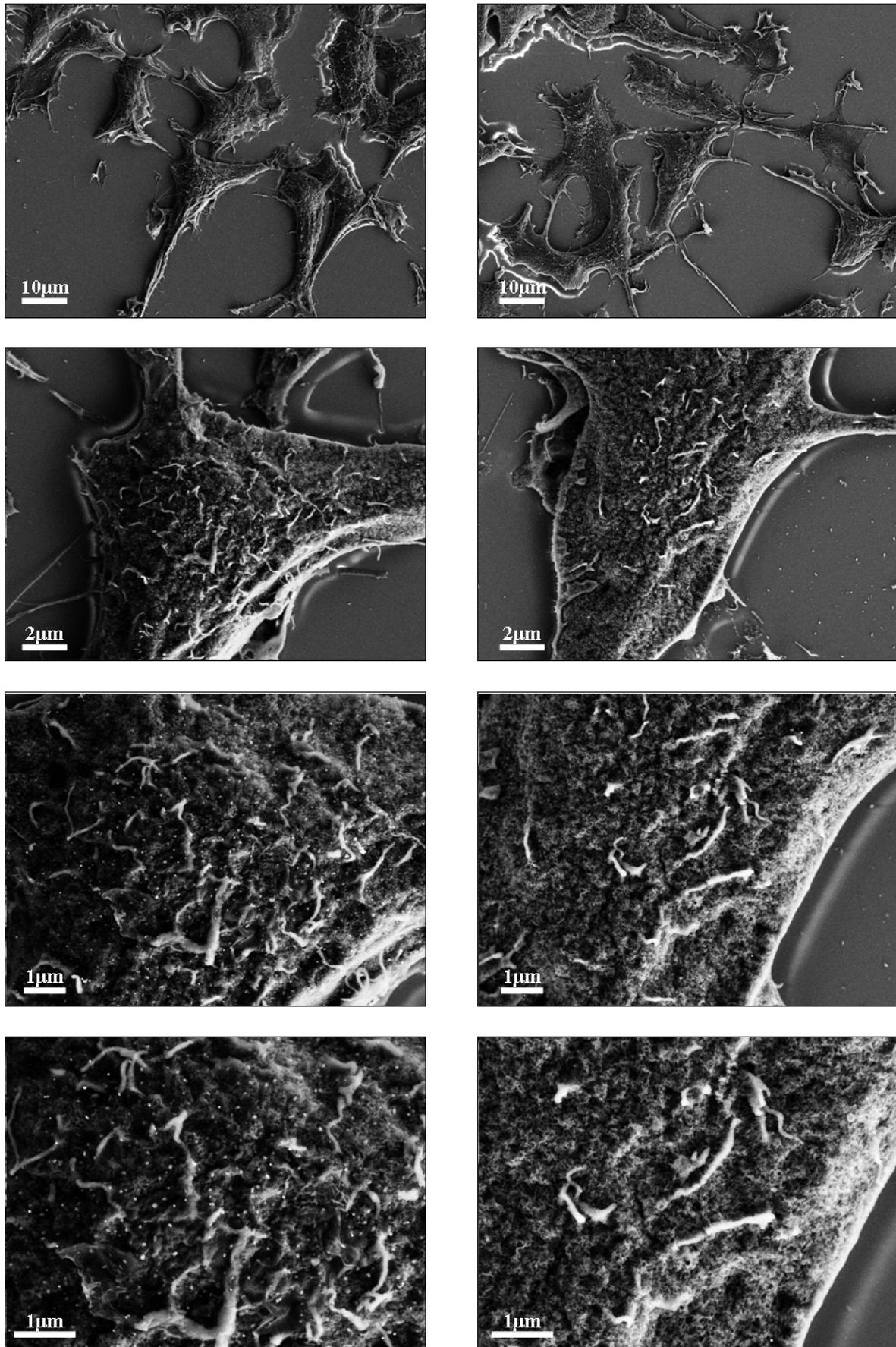
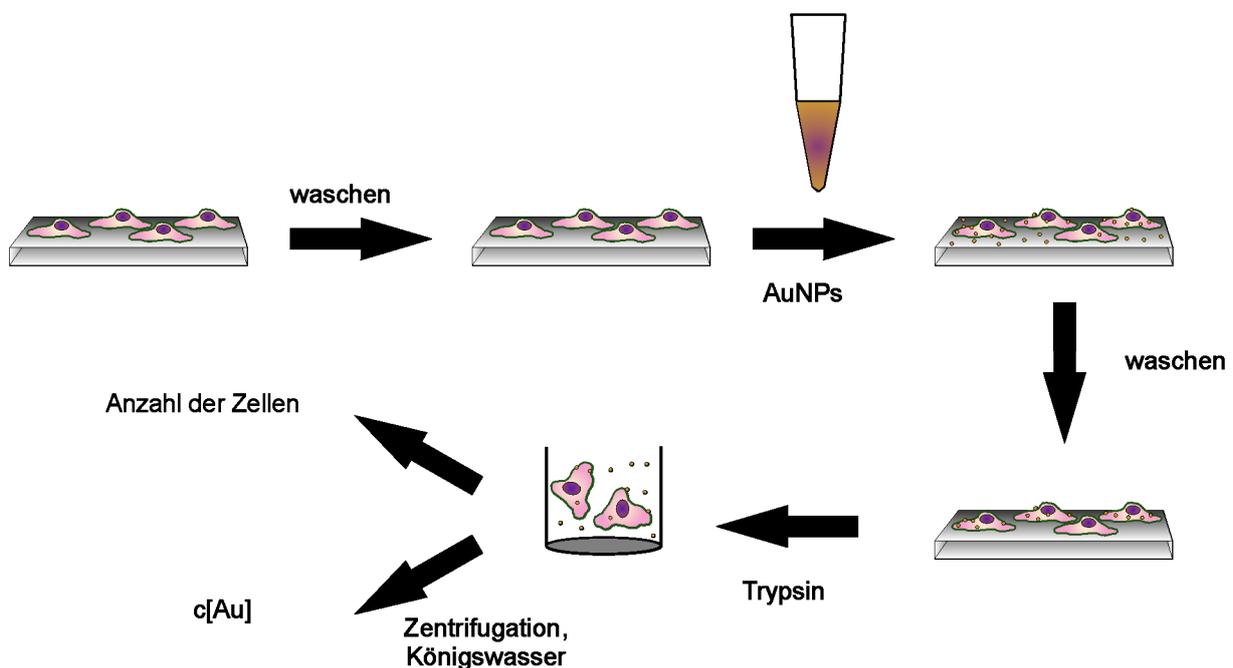


Abbildung 55: REM-Aufnahmen kotransfizierten HEK 293 Zellen mit Gold Nanopartikeln. Links: funktionalisiert mit Peptid 8, rechts: funktionalisiert mit Peptid 9 in unterschiedlichen Vergrößerungen.

3.7.6 Bindungsstudie

Wie in den REM-Aufnahmen gezeigt werden konnte, wechselwirken die Peptid-konjugierten Gold Nanopartikel mit den in HEK 293 exprimierten NMDA-Rezeptoren. Um diese Bindung quantitativ zu bestätigen, werden Bindungsstudien nach Schema 4 durchgeführt. Zunächst werden die transfizierten Zellen in einem Waschvorgang von Antagonisten befreit (s.o.), um funktionale Rezeptoren darzubieten. Danach werden die Zellen mit den funktionalisierten Gold Nanopartikeln inkubiert. Um nicht gebundene Nanopartikel zu entfernen, werden die Zellen anschließend gewaschen. Nach der Aufreinigung wird die Zellzahl der vorliegenden Proben bestimmt, indem die Zellen zunächst mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst werden. Die Suspension enthält neben den abgelösten Zellen die zuvor gebundenen Nanopartikel. Dieser Suspension wird eine Probe entnommen, um die Anzahl der Zellen zu bestimmen. Die verbleibende Lösung wird zentrifugiert, um die Gold Nanopartikel zu sedimentieren. Der Überstand wird verworfen und der Rückstand aus Zellen und Gold Nanopartikeln wird für eine Stunde mit Königswasser behandelt, um die zuvor gebundenen Partikel aufzulösen. Die in diesen Proben vorhandene Konzentration an Gold kann anschließend mittels ICP-OES gemessen werden und liefert nach Berücksichtigung des Durchmessers der Nanopartikel und der Dichte von Gold die Konzentration der Nanopartikel (s. Kapitel 3.1.2). Der Quotient aus der über ICP-OES Messungen bestimmten Anzahl an Nanopartikeln und der gemessenen Anzahl an Zellen pro Probe ergibt die durchschnittliche Anzahl an gebundenen Nanopartikeln pro Zelle.



Schema 4: Vorgehensweise zum Nachweis der spezifischen Wechselwirkung der funktionalisierten Gold Nanopartikel mit in HEK 293 exprimierten NMDA-Rezeptoren. Die transfizierten Zellen werden gewaschen, um den Antagonisten zu entfernen. Anschließend werden sie mit den funktionalisierten Gold Nanopartikeln inkubiert und aufgereinigt. Zur Bestimmung der Anzahl an gebundenen Nanopartikeln pro Zelle, werden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Ein Teil der Probe dient der Bestimmung der Anzahl an Zellen, ein anderer Teil wird zentrifugiert, um die zuvor gebundenen Nanopartikel zu sedimentieren. Zur Bestimmung der Konzentration an Gold werden die Partikel mit Königswasser aufgelöst und mittels ICP-OES vermessen.

Verschiedene Proben werden für den Bindungsnachweis hergestellt (Abbildung 56). Gold Nanopartikel mit einem Durchmesser von 29 ± 3 nm werden mit Alkyl-PEG 600 basierten Thiolen **6** und **7** passiviert (**11**) und anschließend mit Peptid **8** (**12**) bzw. dem Kontrollpeptid **9** (**13**) funktionalisiert. Die Anzahl der Peptide pro Partikel (N_{Peptide}) sind in Tabelle 6, Eintrag 25 (Kapitel 3.6) zusammengefasst.

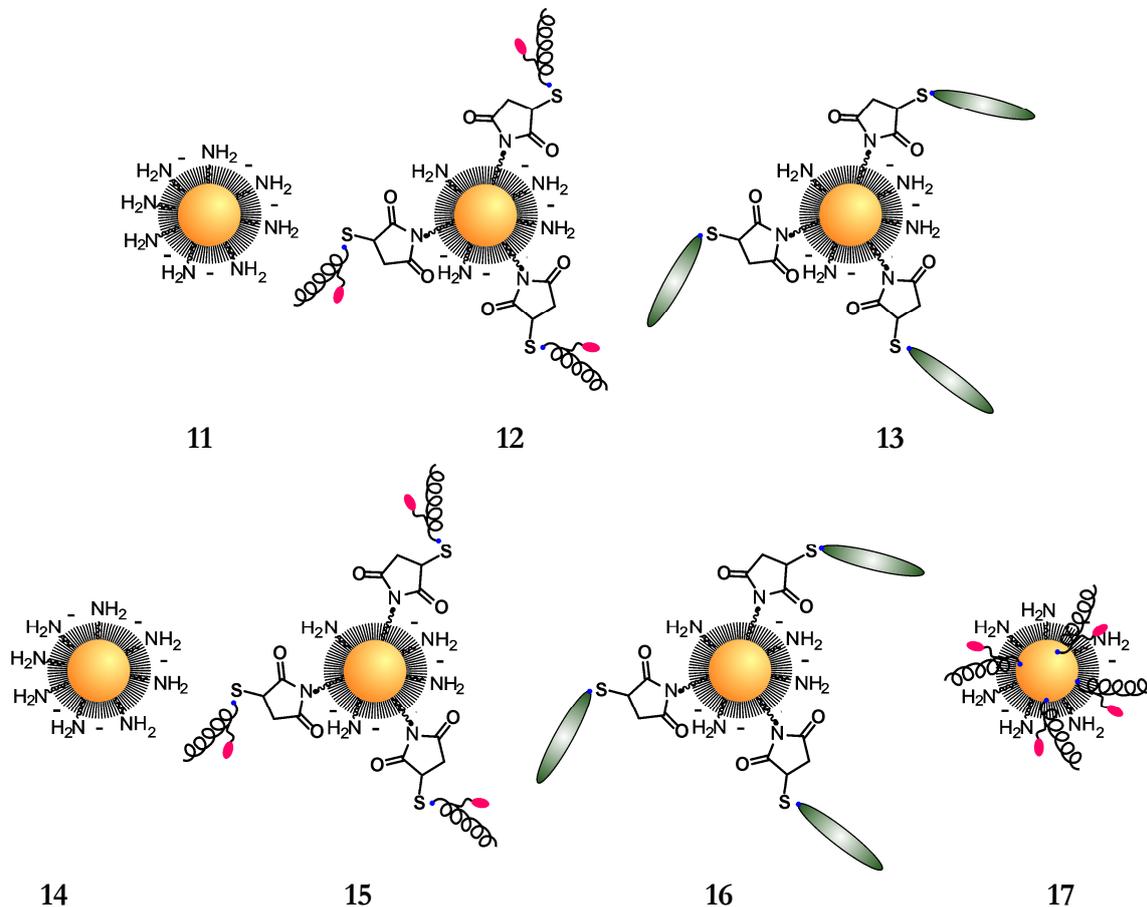


Abbildung 56: Verschiedene Gold Nanopartikel Proben, die zum Bindungsnachweis mit HEK 293 Zellen inkubiert werden. Alkyl-PEG 600 Thiol **6/7** passivierte Gold Nanopartikel: **11** ohne Peptid; **12**: funktionalisiert mit Peptid **8** via Linker **10**; **13**: funktionalisiert mit Peptid **9** via Linker **10**; PEG 3000 Thiole **4/5** passivierte Gold Nanopartikel: **14**: ohne Peptid; **15**: funktionalisiert mit Peptid **8** via Linker **10**; **16**: funktionalisiert mit Peptid **9** via Linker **10**; **17**: funktionalisiert mit Peptid **8** ohne Linker.

Des Weiteren werden die gleichen Nanopartikel mit PEG 3000 basierten Thiolen **4** und **5** passiviert (**14**) und anschließend mit Peptid **8** (**15**) und dem Kontrollpeptid **9** (**16**) funktionalisiert. Wie die Quantifizierung der Anzahl gebundener Peptide zeigte (s. Kapitel 3.6), schirmt eine Passivierungsschicht aus Thiolen **4** und **5** die Nanopartikeloberfläche nicht hinreichend ab, um die direkte Bindung des Peptids an die Oberfläche der Nanopartikel zu unterbinden. Daher wird für das PEG 3000 System eine weitere Probe hergestellt, in der Peptid **8** ohne den in den anderen Systemen verwendeten Linker **10** an die Nanopartikel bindet (**17**). Hiermit soll getestet werden, ob auch direkt an Gold gebundenes Peptid mit den Rezeptoren wechselwirken kann. Die Anzahl der Peptide pro Partikel sind in Tabelle 6 Eintrag 12 zusammengefasst. Diese verschiedenen Gold Nanopartikel Proben werden mit NR1 und NR2B kotransfizierten Zellen, sowie mit NR1 und NR2B einzeln transfizierten Zellen und unbehandelten Zellen inkubiert. Die Transfektionseffizienz dieser Zellen beträgt 30%.

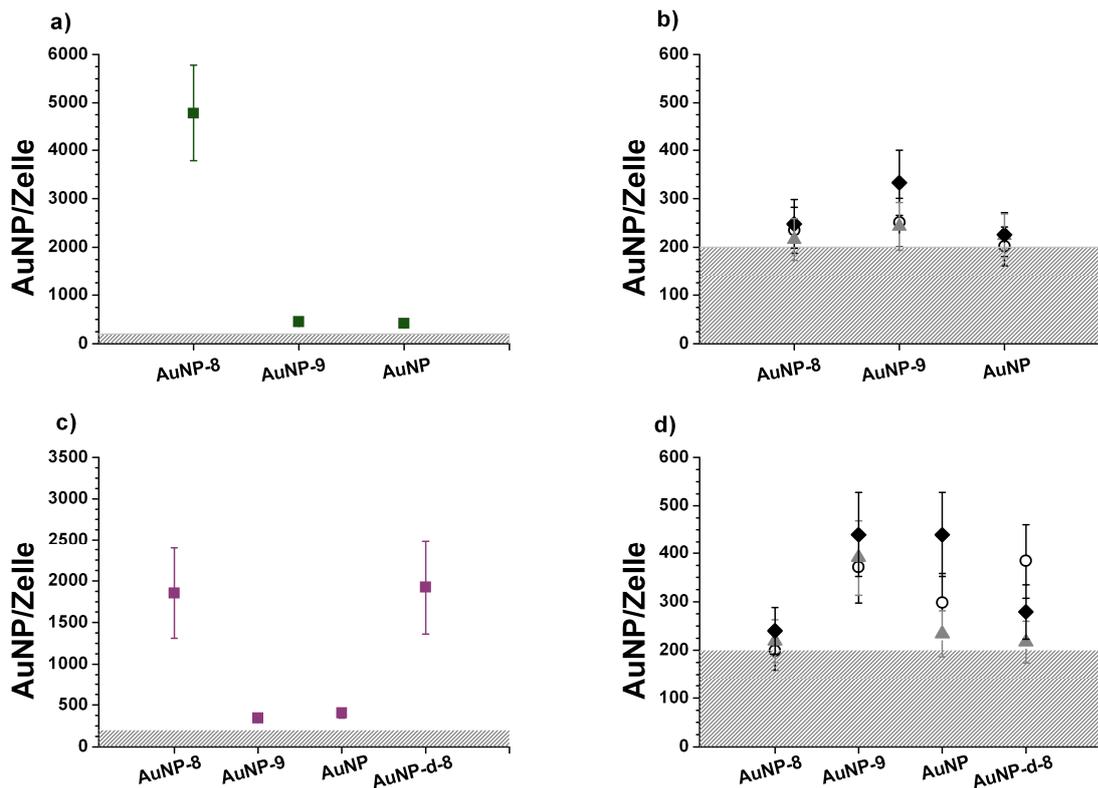


Abbildung 57: Anzahl der gemessenen Gold Nanopartikel pro Zelle. a) ■: Anzahl der Alkyl-PEG 600 Thiol 4/5 passivierten Nanopartikel funktionalisiert mit Peptid 8 (AuNP-8), mit dem Kontrollpeptid 9 (AuNP-9) und ohne Peptid (AuNP) pro Zelle. b) Kontrolleexperimente mit Gold Nanopartikeln inkubiert mit: ◆: untransfizierten Zellen, ▲: NR1 transfizierten Zellen, ○: NR2B transfizierten Zellen. c) ■: Anzahl der PEG 3000 Thiol 6/7 passivierten Nanopartikel funktionalisiert mit Peptid 8 (AuNP-8), mit dem Kontrollpeptid 9 (AuNP-9), ohne Peptid (AuNP) und mit direkt gebundenem Peptid 8 (AuNP-d-8) pro Zelle. d) Kontrolleexperimente mit Gold Nanopartikeln inkubiert mit: ◆: untransfizierten Zellen, ▲: NR1 transfizierten Zellen, ○: NR2B transfizierten Zellen. Der schraffierte Bereich gibt die Detektionsgrenze der ICP-OES Messung an (200 Partikel/Zelle). Es werden 2 unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt. Der Molenbruch der Aminokomponente $x(\text{NH}_2)$ beträgt 0,14 in allen Passivierungen. Die Anzahl an eingesetzten Zellen in einer Probe beträgt $\sim 5 \times 10^5$.

Der schraffierte Bereich in Abbildung 57 gibt die Detektionsgrenze der ICP-OES Messungen bezogen auf die Anzahl der Nanopartikel pro Zelle an. Dieser Wert ergibt sich aus der dreifachen Standardabweichung der Messung der Basislinie.

Abbildung 57 a zeigt die Anzahl an Nanopartikeln pro Zelle für Alkyl-PEG 600 passivierte Nanopartikel. Werden die an der Peripherie mit dem bioaktiven Peptid 8 funktionalisierten Nanopartikel (12) mit den kotransfizierten Zellen inkubiert, so können 4781 ± 997 Partikel pro Zellen detektiert werden. Für Partikel mit Kontrollpeptid 9 (13) sowie für unfunktionalierte Nanopartikel (11) hingegen wird eine geringe Anzahl an Nanopartikeln gemessen. Für Probe 13 sind es 451 ± 43 Partikel pro Zelle, für Probe 11 417 ± 66 . Die Kontrolleexperimente (Abbildung 57 b), in denen die verschiedenen Alkyl-PEG 600 Proben (11, 12, 13) mit Zellen inkubiert werden, die ausschließlich mit Plasmiden der NR1 (▲) oder der NR2B Untereinheit (○) transfiziert werden, zeigen ebenfalls eine geringe Anzahl der Partikel pro Zelle. Weiterhin werden als Kontrollen unbehandelte Zellen (◆) mit den verschiedenen Nanopartikel Proben (11, 12, 13) versetzt. Wie die anderen Kontrollen zeigen auch diese Messungen eine geringe Anzahl an Partikeln pro Zelle, die nah an der Detektionsgrenze liegt.

Ähnliche Beobachtungen wurden für das PEG 3000 Passivierungssystem gemacht, obwohl in diesem Passivierungssystem eine wesentlich höhere Anzahl an Peptiden gebunden wurde. Die in

Abbildung 56 dargestellten Proben werden mit kotransfizierten Zellen inkubiert. Bei Inkubation mit den kovalent funktionalisierten Nanaopartikeln **15** werden durchschnittlich $1\,853 \pm 543$ Partikel pro Zelle gemessen, für die Kontroll-Nanopartikel **16** hingegen nur 344 ± 26 Partikel pro Zelle. Für Partikel **14**, die kein Peptid gebunden haben, werden nach der Aufreinigung durchschnittlich 404 ± 61 Partikel pro Zelle gemessen. Weiterhin werden Gold Nanopartikel **17** vermessen, an deren Oberfläche das Peptid **8** direkt angebunden ist. Interessanterweise zeigen Probe **17**, in der das Peptid direkt gebunden ist, und Probe **15**, in der die Anbindung über den Linker vermittelt wird, keine Unterschiede bezüglich der Anzahl an gebundenen Partikeln auf. Wie oben beschrieben binden bei Inkubation mit Probe **15** $1\,853 \pm 543$ Partikel pro Zelle, bei Inkubation mit Probe **17** $1\,924 \pm 564$ Partikel pro Zelle. Die starke Zunahme der Partikel pro Zelle in Proben **12** und **15** muss damit auf eine Wechselwirkung der immobilisierten Peptide mit den exprimierten NMDA-Rezeptoren zurückgeführt werden. Diese kann sowohl für Peptide beobachtet werden, die an der Peripherie der Nanopartikel binden (**15**), als auch für Peptide, die in die Passivierungsschicht integriert werden (**17**). Weiterhin werden Kontrollen durchgeführt (Abbildung 57 d), in denen die verschiedenen Nanopartikelproben zum Einen mit untransfizierten Zellen zum Anderen mit Zellen inkubiert werden, die mit Plasmiden der NR1 und NR2B Untereinheit einzeln transfizierten wurden. Wie in Abbildung 57 d zu sehen, ist die Anzahl der detektierten Nanopartikel pro Zelle für alle Kontrollexperimente gering. Dies bedeutet, dass die unspezifische Bindung der Nanopartikel an die Membran der Zellen gering ist. Feldheim *et al.* untersuchten ebenfalls, ob Peptide, die in einer PEG-Passivierungsschicht integriert werden, spezifische Wechselwirkungen eingehen können. Dazu wurden Gold Nanopartikel mit PEG 5000 Thiolen bzw. mit PEG 900 Thiolen passiviert und mit Peptiden umgesetzt, die Rezeptor-vermittelte Endozytose auslösen (RME). Es wurde erwartet, dass die Nanopartikel mit gemischten Monolagen aus PEG 5000 und RME Peptid in geringerer Menge ins Zytoplasma der Zelle aufgenommen werden, als diejenigen mit einer gemischten Monolage aus PEG900 und RME Peptid. Allerdings konnte auch hier die sterische Abschirmung des Peptids durch die längeren PEG-Ketten nicht beobachtet werden. Vermutlich können die Peptide aufgrund der Beweglichkeit der PEG-Ketten mit dem Rezeptor wechselwirken.⁵⁷

In einem analogen Experiment, welches die Reproduzierbarkeit des in dieser Arbeit dargestellten Bindungsnachweises bestätigen soll, werden die Proben aus Abbildung 56 als Triplikate hergestellt. Die entsprechenden Werte der ermittelten Anzahl an Peptiden pro Partikel sind in Tabelle 6 (Einträge 13, 14, 15 für das PEG 3000 System; Einträge 26, 27, 28 für das Alkyl-PEG 600 System) zusammengefasst. In diesem Experiment (Abbildung 58) ist die Anzahl der eingesetzten Zellen höher, als im vorher diskutierten Experiment. Auch die Transfektionseffizienz ist hier höher (50%), als in dem in Abbildung 57 dargestellten Experiment. Daher wird für diese Bestimmung in allen Proben eine höhere Anzahl an Partikeln pro Zelle detektiert. Durch die höhere Anzahl an Zellen und der damit verbundenen höheren Gesamtzelloberfläche, die potentiell mit den Nanopartikeln interagieren kann, wird in diesem Experiment eine höhere unspezifische Adsorption der Nanopartikel detektiert. Dies ist für beide Passivierungssysteme zu beobachten. Nanopartikel, die mit dem Kontrollpeptid **9** funktionalisiert werden (Proben **13**, **16**) zeigen durchschnittlich $2\,206 \pm 359$ (**13**) und $2\,715 \pm 227$ (**16**) Partikel pro Zelle. Trotz der erhöhten unspezifischen Bindung der Partikel, ist die Anzahl der mit Peptid **8** funktionalisierten Nanopartikel (Proben **12**, **15**) signifikant höher, als in allen gezeigten Kontrollen. Inkubation mit Probe **12** liefert $8\,619 \pm 631$, Probe **15** $8\,929 \pm 348$

Partikel pro Zelle. In diesen Experimenten ist zudem ein deutlicher Unterschied zwischen Proben zu detektieren, in denen Peptide an der Peripherie gebunden sind (**15**) und Proben, in denen das Peptid direkt in die Passivierungsschicht integriert wird (**17**). Für Probe **15** werden 8929 ± 348 Partikel pro Zelle gemessen, für Probe **17** hingegen 4733 ± 138 Partikel pro Zelle. Daraus kann geschlossen werden, dass in diesem Experiment die direkt gebundenen Peptide durch die PEG-Passivierungsschicht teilweise abgeschirmt werden und so nicht in gleichem Maße mit den Rezeptoren wechselwirken können, wie Peptide, die an der Peripherie der Passivierungsschicht gebunden sind.

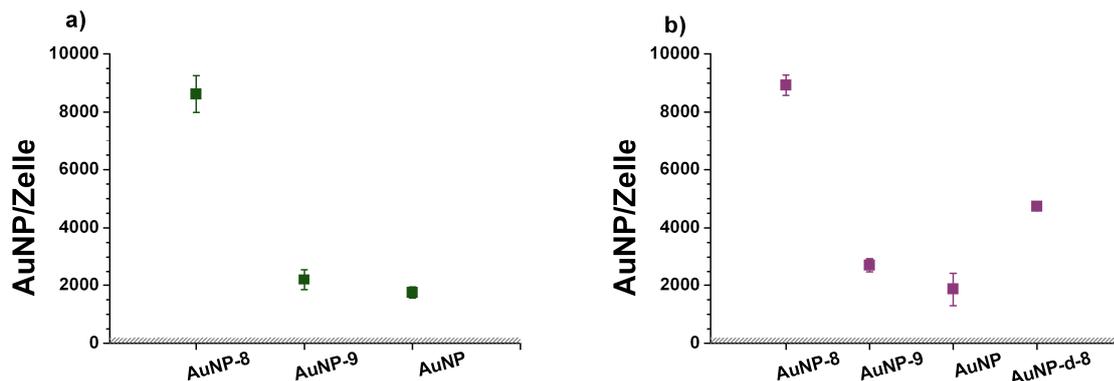


Abbildung 58: Anzahl der gemessenen Gold Nanopartikel pro Zelle. a) Anzahl der Alkyl-PEG 600 Thiol **6/7** passivierten Nanopartikel, funktionalisiert via Linker **10** mit Peptid **8** (AuNP-8), mit dem Kontrollpeptid **9** (AuNP-9) und ohne Peptid pro Zelle. b) Anzahl der PEG 3000 **4/5** passivierten Nanopartikel funktionalisiert mit Peptid **8** (AuNP-8), mit dem Kontrollpeptid **9** (AuNP-9), ohne Peptid (AuNP) und mit direkt gebundenem Peptid **8** (AuNP-d-8) pro Zelle. Der schraffierte Bereich gibt die Detektionsgrenze der ICP-OES Messung an (200 Partikel/Zelle). Es werden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Der Molenbruch der Aminokomponente $x(\text{NH}_2)$ beträgt in allen Passivierungen 0,14. Die Anzahl an eingesetzten Zellen im Bindungsnachweis beträgt $\sim 1 \times 10^6$ in einer Probe.

Diese Experimente zeigen, dass Peptid **8**, welches über den Linker **10** an die Nanopartikel gebunden ist, spezifisch mit transient transfizierten NMDA-Rezeptoren wechselwirkt. Diese Bindungsnachweise bestätigen, dass die zweistufige Synthese zur Funktionalisierung der Nanopartikel für die Anwendung im biologischen System von Vorteil ist, da die Peptide nicht, wie in Abbildung 58 b gezeigt, teilweise durch die Polymerschicht abgeschirmt werden können. Die hier dargestellten Nanopartikel können durch ihre spezifische Wechselwirkung mit dem biologischen Ziel genutzt werden, um neue Erkenntnisse über Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen zu gewinnen.

Im nächsten Schritt wird überprüft, welchen Einfluss die eingesetzte Konzentration der Nanopartikel auf die Anzahl an gebundenen Nanopartikeln ausübt. Dazu werden verschiedene Mengen von Probe **12** zu kotransfizierten Zellen gegeben und nach bereits beschriebenem Protokoll aufgearbeitet. Die Anzahl an Partikeln pro Zelle wird bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 59 dargestellt. Diese Dosis-Wirkungskurve wird in der Pharmakologie genutzt, um einen Zusammenhang der verabreichten Dosis eines Wirkstoffes und seiner Wirkung zu ermitteln. Wie in Abbildung 59 zu sehen, besteht eine Korrelation zwischen der Konzentration des eingesetzten Wirkstoffes (der Peptid-Nanopartikel-Konjugate) und der Signalstärke, in diesem Fall der Anzahl an detektierten Partikeln pro Zelle.

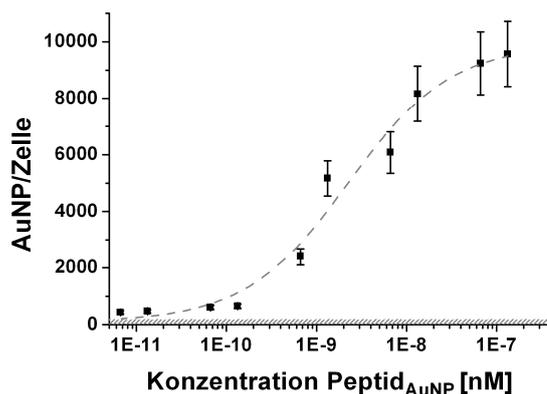


Abbildung 59: Dosis-Wirkungskurve der mit Peptid 8 funktionalisierten Nanopartikel in halblogarithmischer Auftragung. Funktionalisierte Nanopartikel werden in verschiedenen Konzentrationen, hier als Konzentration an Peptid dargestellt (80 Peptide pro Partikel) zu transfizierten Zellen gegeben und die Anzahl an gebundenen Nanopartikeln wird nach Schema 4 bestimmt. Die Bindungskonstante K_D kann aus einem logistischen Fit ermittelt werden. Die Gold Nanopartikel wurden mit Alkyl-PEG 600 basierten Thiolen **6** und **7** passiviert, wobei der Molenbruch der eingesetzten Nanopartikel $x(\text{NH}_2)$ 0,14 betrug.

Durch Anpassung einer logistischen Kurve wird die Bindungskonstante der Peptid-Nanopartikel-Konjugate ermittelt. Gleichzeitig kann die Konzentration an Peptid-Nanopartikel-Konjugaten bestimmt werden, in der alle Rezeptoren blockiert werden, da sich die Kurve dem Maximalwert asymptotisch annähert. Das vorliegende Sättigungsverhalten bestätigt eine biologisch aussagekräftige Bindung der Konjugate. Würden die Wechselwirkungen der Peptid-Nanopartikel-Konjugate mit den Rezeptoren auf unspezifischer Interaktion basieren, besäße die Dosis-Wirkungskurve eine lineare Korrelation. Durch die begrenzte Anzahl an Rezeptoren in der Zellmembran, liegt in der Probe eine endliche Anzahl an Erkennungsregionen zur spezifischen Wechselwirkung vor. Daher muss sich die Dosis-Wirkungskurve einem Maximalwert asymptotisch annähern. Für die eingesetzten Nanopartikel mit einem Durchmesser von 29 ± 3 nm, die durchschnittlich 80 Peptide pro Partikel gebunden haben, ergibt die Anpassung einer logistischen Kurve bezogen auf die Konzentration des Peptids eine Bindungskonstante von $2,2 \pm 0,8$ nM. Diese Bindungskonstante ist wesentlich geringer, als die des ungebundenen Peptids in Lösung, welche $2,3 \mu\text{M}$ beträgt.²⁸⁷ Die Bindungskonstante stellt ein Maß für die Stärke der Bindung zwischen Rezeptor und Ligand dar. Der Unterschied der Bindungskonstante der Konjugate und der freien Peptide kann auf multivalente Effekte zurückgeführt werden, da mehrere Peptide an ein Nanopartikel gebunden sind, die die Fähigkeit besitzen, mit dem Rezeptor in Wechselwirkung zu treten. Vergleicht man diese Dosis-Wirkungskurve mit den durchgeführten Bindungsnachweisen (Abbildung 57, Abbildung 58), werden unter den herrschenden Bedingungen 80% der Rezeptoren blockiert. Die Konzentration der hergestellten Nanopartikel reichte also aus, um, wie bereits oben gezeigt, eine Wirkung zu detektieren.

3.8 Anwendung im neuronalen System

Im nicht-neuronalen Modellsystem der transfizierten HEK 293 Zellen kann eine spezifische Wechselwirkung der konstruierten Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate sowohl visuell in REM-Aufnahmen, als auch quantitativ über den in Schema 4 vorgestellten Bindungsassay nachgewiesen werden. Dies soll nun auf das komplexe System der primären hippocampalen Neuronen übertragen werden. Die dargestellten Experimente wurden von Dr. Oliver Dick in der Arbeitsgruppe von Prof. Hilmar Bading in der Neurobiologie in Heidelberg im Rahmen einer Kolaboration durchgeführt.

3.8.1 Primäre hippocampale Neuronen

Die primären hippocampalen Neuronen werden aus Ratten präpariert und auf Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Glasplättchen ausplattiert. Nach 12 Tagen hat sich ein neuronales Netzwerk auf einer Monolage der ebenfalls in der Kultur vorhandenen Gliazellen ausgebildet. Eine typische Kokultur ist in Abbildung 60 A dargestellt. Um die hippocampalen Neuronen von den Gliazellen zu unterscheiden, werden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern markiert. Die Fluoreszenzaufnahme der Kokultur ist in Abbildung 60 B dargestellt, wobei die Zellkerne mit Hoechst angefärbt werden. Die hippocampalen Neurone werden mit einem monoklonalen Antikörper gegen neuronale Nuklei (rot), die Gliazellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen saures Gliafaserprotein (GFAP, grün) markiert.

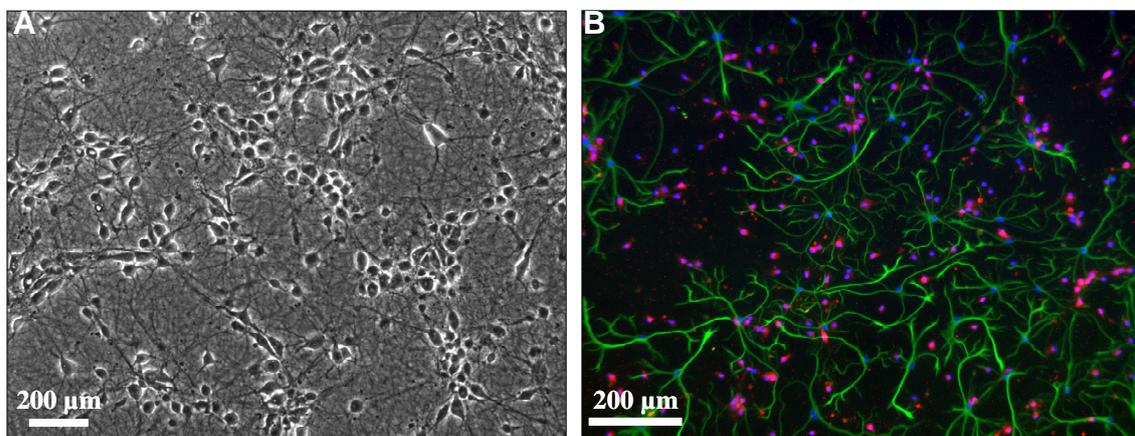


Abbildung 60: Primäre hippocampale Neuronen in Kultur. A: Durchlichtaufnahme des neuronalen Netzwerkes auf den Gliazellen. B: Fluoreszenzaufnahme; blau: Zellkerne mit Hoechst gefärbt, grün: Gliazellen angefärbt mit polyclonalem Antikörper gegen saures Gliafaserprotein (*engl.* glial fibrillary acidic protein), rot: Zellkerne der Neurone angefärbt mit monoclonalem Antikörper gegen neuronale Nuklei.

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Signalwege der synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren sollen die Rezeptoren aufgrund ihrer räumlichen Lage unterschieden werden. Zu diesem Zweck werden Gold Nanopartikel eingesetzt, die aufgrund ihrer Größe eine Diffusion in den synaptischen Spalt verhindern sollen. Um die genaue Größe zu ermitteln, die die Nanopartikel mindestens besitzen müssen, um im neuronalen System eingesetzt zu werden, wird zunächst die Spaltbreitenverteilung der Synapsen analysiert.

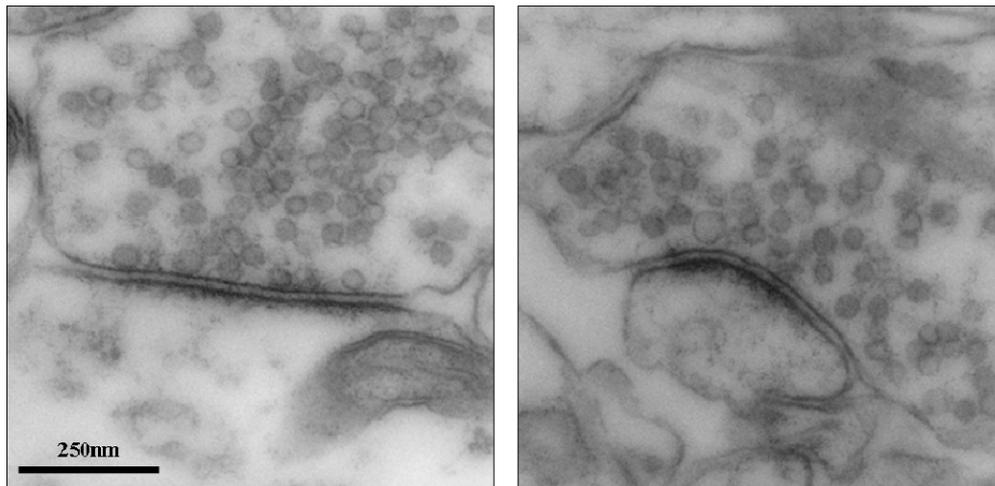


Abbildung 61: TEM-Schnitte zur Bestimmung der Spaltbreite der Synapse in primären hippocampalen Neuronen. Die Synapsen sind aufgrund der postsynaptischen Dichte und der präsynaptischen Vesikel gut zu erkennen.[§]

In diesem Zusammenhang werden TEM-Schnitte der Zellkultur angefertigt, in denen die Synapsen nach Uranylacetatfärbung aufgrund der postsynaptischen Dichte und der präsynaptischen Vesikel gut zu erkennen sind. Exemplarische TEM-Schnitte sind in Abbildung 61 dargestellt. Zur Bestimmung der Spaltbreite der Synapsen in primären hippocampalen Neuronen werden 129 Synapsen ausgemessen, wobei die maximale Breite der Synapse zur Bestimmung herangezogen wird. Die Verteilung der Spaltbreite ist in Abbildung 62 dargestellt.

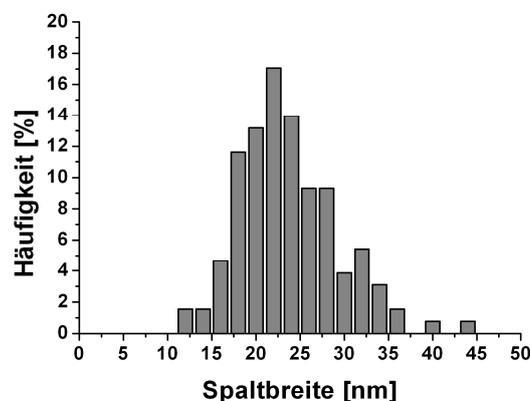


Abbildung 62: Histogramm der Verteilung der Spaltbreite von Synapsen in primären hippocampalen Neuronen. Es werden 129 Synapsen in TEM-Schnitten ausgewertet.[§]

Die Spaltbreite der Synapsen beträgt durchschnittlich 23 nm. Zu beachten ist hier, dass durch die Abbildung der Synapse im TEM möglicherweise kleinere Spaltbreiten bestimmt werden, als in der Realität vorhanden. Zur Präparation werden die Schnitte in ein Harz eingebettet und unter Ultrahochvakuum vermessen. Daher wird bei der Ausmessung der Synapsen der jeweils maximale Wert ermittelt, um diese Problematik zu berücksichtigen. Gold Nanopartikel mit einem Durchmesser von ≥ 30 nm sollten demnach ausreichen, um eine Diffusion in den synaptischen Spalt zu verhindern. Daher werden Nanopartikel dieses Durchmessers für die folgenden Experimente hergestellt.

[§] Die hier dargestellten Messungen wurden von Dr. Oliver Dick, Abteilung Prof. H. Bading, Interdisziplinäres Zentrum für Neurobiologie, Universität Heidelberg, durchgeführt.

3.8.2 Bestimmung des Zelltods

Die protektive Wirkung und damit die Funktionalität der Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate soll mittels eines Zelltodassays untersucht werden. Die neuronalen Zellen werden hierzu mit NMDA inkubiert, welches durch Aktivierung aller NMDA-Rezeptoren den Zelltod in primären hippocampalen Neuronen auslöst. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ werden die Zellen fixiert und der Zellkern wird mit Hoechst angefärbt. Tote Zellen besitzen einen kondensierten Zellkern, der in der Fluoreszenzaufnahme heller erscheint, als der Zellkern lebender Zellen, wie in Abbildung 63 dargestellt. Durch die unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz können lebende von pygnotischen Zellen unterschieden und quantifiziert werden. In den unbehandelten Zellen (A) sind deutlich weniger instabile Hoechst-Kerne zu erkennen, während in der mit NMDA behandelten Probe (B) eine wesentlich höhere Anzahl pygnotischer Zellen detektiert wird. Durch Zugabe von NMDA werden sowohl die synaptischen, als auch die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren aktiviert. Diese Gesamtaktivierung löst in hippocampalen Neuronen den Zelltod aus.⁴

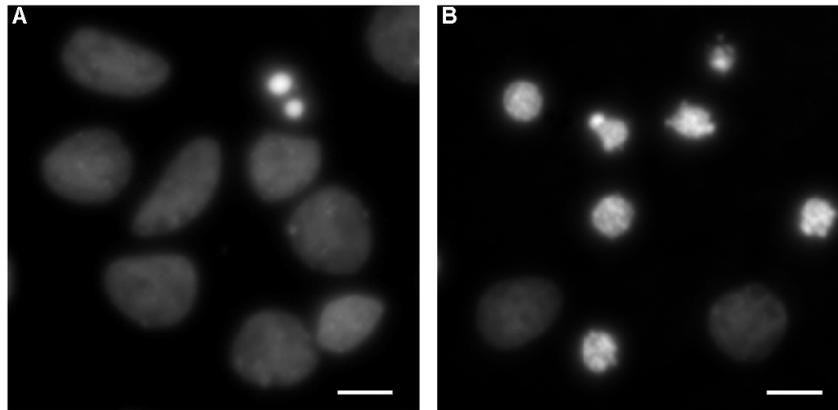


Abbildung 63: Fluoreszenzaufnahmen der mit Hoechst angefärbten Zellkerne der primären hippocampalen Neurone. A: Kontrollexperiment; B: Neurone, die mit NMDA behandelt wurden. Der Maßstab beträgt 10 μm .⁸

Um die optimale Konzentration an NMDA zu bestimmen, die in primären hippocampalen Neuronen den Zelltod auslöst, werden verschiedene Konzentrationen an NMDA appliziert und die Anzahl toter Zellen ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 64 a dargestellt. In unbehandelten Zellen liegt eine Zelltodrate von $6 \pm 2\%$ vor. NMDA Konzentrationen von 5 und 10 μM lösen keinen toxischen Effekt in hippocampalen Neuronen aus. Die Anzahl toter Zellen beträgt für 5 μM $3 \pm 1\%$ und für 10 μM $5 \pm 3\%$. Eine Konzentration von 20 μM NMDA, die für 10 Minuten inkubiert wird, reicht hingegen aus, um $40 \pm 15\%$ der Neurone zu töten. Der Fehler dieser Bestimmung ist jedoch relativ groß.

Zusätzlich wird die Inkubationszeit der NMDA Lösung variiert. Diese Messungen sind in Abbildung 64 b dargestellt. Inkubationszeiten kürzer als 10 Minuten zeigen einen geringen toxischen Effekt. Um einen deutlichen Zelltod auszulösen, werden daher 20 μM NMDA für 10 Minuten inkubiert.

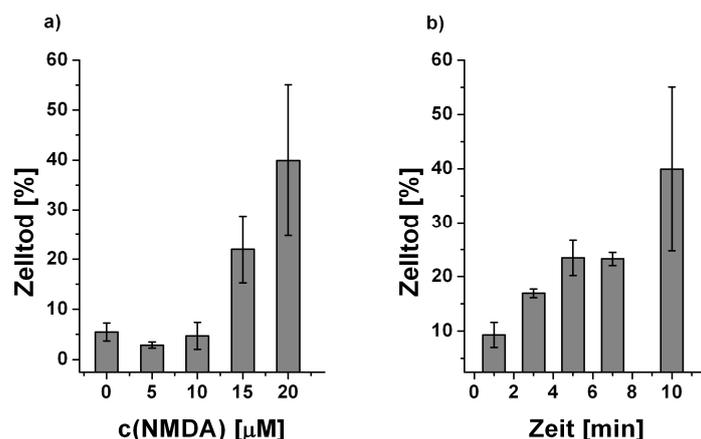


Abbildung 64: Prozentualer Zelltod nach NMDA Inkubation. a) Zugabe verschiedener Konzentrationen an NMDA, die 10 Minuten inkubiert werden. b) Unterschiedliche Inkubationszeit der NMDA Lösung (20 µM). Der prozentuale Anteil toter Zellen wird in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt.⁸

Im Weiteren wird die protektive Wirkung von löslichem Con-G ermittelt, welches selektiv an die NR2B Untereinheit bindet und dadurch den NMDA Rezeptor blockiert. Verschiedene Konzentrationen an Con-G werden 20 Minuten vor Zugabe von NMDA zu den Zellen gegeben. Abbildung 65 zeigt zwei unterschiedlich präparierte Proben hippocampaler Neurone, die mit Konzentrationen zwischen 1000 nM und 10 nM Con-G behandelt werden. In als Kontrolle untersuchten unbehandelten Zellen liegt der prozentuale Zelltod bei $5 \pm 1\%$ in a) bzw. bei $20 \pm 9\%$ in b). Ohne Zugabe von Con-G ist in beiden Experimenten ein großer prozentualer Anteil an toten Zellen vorhanden, der durch die Zugabe von NMDA ausgelöst wird (s.o.). In a) liegt dieser bei $64 \pm 1\%$, in b) $66 \pm 7\%$.

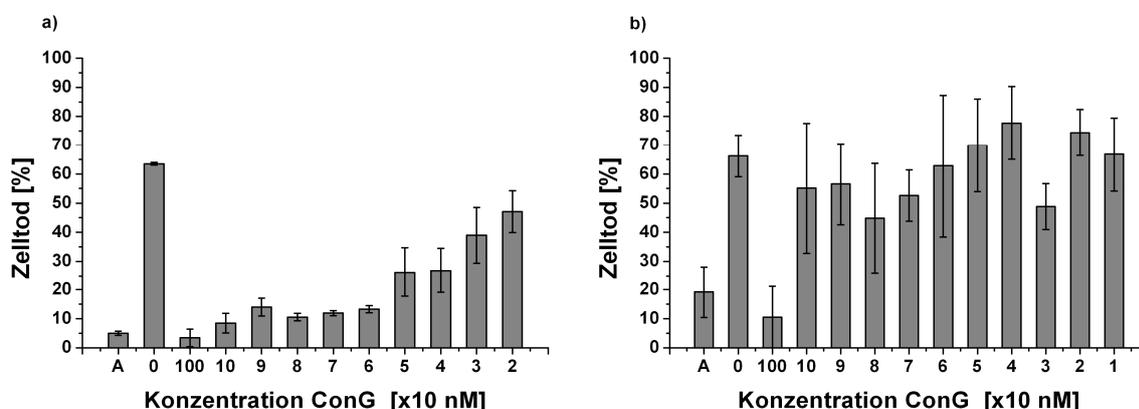


Abbildung 65: Protektive Wirkung von Con-G nach NMDA Zugabe in hippocampalen Neuronen. In a) und b) werden zwei verschiedene Zellpräparationen untersucht. A beschreibt unbehandelte Zellen. Die eingesetzten Konzentrationen von Con-G liegen zwischen 1000 nM und 10 nM.⁸

Eine Konzentration von 1 µM Con-G verhindert diesen Zelltod in beiden Experimenten, während geringere Konzentrationen an Con-G nur in Zellpräparation a) einen protektiven Effekt zeigen. Generell sind die Fehlerbalken in b) verglichen mit dem in a) dargestellten Experiment relativ groß. Diese Neuronen zeigen größere Abweichungen in der Reaktion auf die modulatorischen Substanzen. Auch die unbehandelten Zellen in b) weisen verglichen mit der Kontrolle in a) eine hohe Zelltodrate auf ($20 \pm 9\%$). Dadurch kann die protektive Wirkung des Con-G nicht deutlich beobachtet werden. Der Vergleich dieser unabhängig durchgeführten Experimente zeigt, dass der protektive Effekt des Antagonisten stark von den jeweilig

präparierten Kulturen abhängt. Unterschiedlich präparierte primäre Kokulturen unterscheiden sich stärker voneinander, als Zellen innerhalb einer Zelllinie, so dass die Auswertung der Experimente mit primären Zellen erschwert wird. Daher werden Kontrollexperimente durchgeführt, in denen sowohl unbehandelte Zellen untersucht werden, NMDA-inkubierte Zellen und Zellen, die vor NMDA Zugabe mit Con-G behandelt wurden. Anhand dieser Kontrollen kann überprüft werden, inwiefern die präparierte Kultur für die Zelltodbestimmung eingesetzt werden kann. Für nachfolgende Experimente wird eine Konzentration von 1 μ M Con-G eingesetzt, um zu überprüfen, ob in der vorliegenden hippocampalen Kultur ein protektiver Effekt zu verzeichnen ist.

Für Experimente mit Gold Nanopartikeln werden Peptide **8** und **9** an die Nanopartikel immobilisiert. Peptid **8** besitzt die Aminosäuresequenz von Con-G mit einem zusätzlichen Cystein am C-Terminus und einem am Lysin gebundenen Fluoreszenzfarbstoff. Peptid **9** dient als Kontrollpeptid (siehe Kapitel 3.5). Um die protektive Wirkung des Peptid **8** zu testen, sowie zu bestätigen, dass Peptid **9** als Kontrollpeptid keine biologische Aktivität besitzt, werden zunächst die ungebundenen Peptide in Zelltodexperimenten mit hippocampalen Neuronen eingesetzt (Abbildung 66).

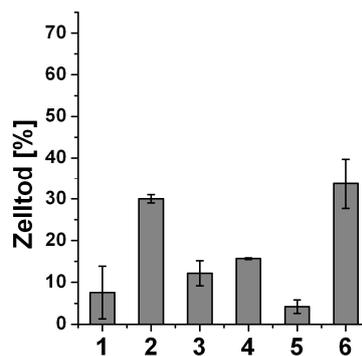


Abbildung 66: Biologische Aktivität der verwendeten Peptide nach NMDA Zugabe. 1: unbehandelte Zellen; 2: hippocampale Neuronen behandelt mit NMDA; 3: Neuronen mit nativem Con-G (G-E- γ - γ -L-Q- γ -N-Q- γ -L-I-R- γ -K-S-N-NH₂); 4: Neuronen mit Cystein terminiertem Con-G (G-E- γ - γ -L-Q- γ -N-Q- γ -L-I-R- γ -K-S-C-N-NH₂); 5: Neuronen mit Peptid **8** (G-E- γ - γ -L-Q- γ -N-Q- γ -L-I-R- γ -K(TAMRA-S-C-N-NH₂), 6: Neuronen mit Peptid **9** (G-E-U-U-L-Q-U-N-Q-U-L-I-R-U-K(TAMRA)-S-C-N-NH₂).⁸

Die unbehandelten Zellen (1) zeigen in diesem Experiment einen Zelltod von $7 \pm 6\%$. Dieser Zelltod wird durch Zugabe von NMDA (2) auf $30 \pm 1\%$ erhöht. Des Weiteren werden Con-G (3), Cystein-terminiertes Con-G (4), sowie Peptid **8** (5) zu den hippocampalen Neuronen zugegeben. Die getesteten Con-G Derivate zeigen einen protektiven Effekt gegenüber NMDA-vermittelter Toxizität und die gemessene Zelltodrate entspricht nahezu der der unbehandelten Kontrolle. Der Vergleich von Peptid **9** (6) mit der Kontrolle, die ausschließlich mit NMDA behandelt wird (2) zeigt hingegen, dass Peptid **9** keinen protektiven Effekt gegen NMDA vermittelten Zelltod ausübt. Es kann demnach als Kontrollpeptid eingesetzt werden.

Im Weiteren werden Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate auf ihren Effekt in hippocampalen Neuronen untersucht. Dazu werden PEG 3000 Thiole **4** und **5** sowie Alkyl-PEG 600 Thiole **6** und **7** zur Passivierung eingesetzt und das Peptid **8** wird via Linker angebunden. Weiterhin werden die Reaktionslösung sowie die letzte Waschlösung der Partikelauflösung untersucht.

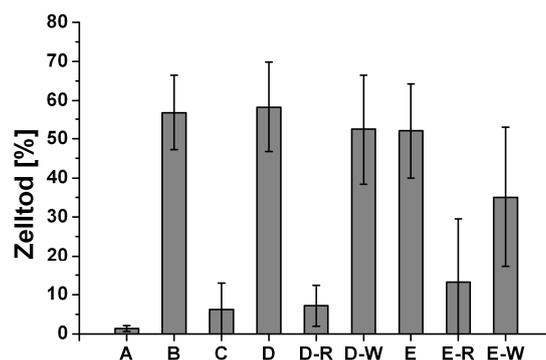


Abbildung 67: Bestimmung der Zelltodrate hippocampaler Neuronen nach NMDA Zugabe. A: unbehandelte Zellen; B: Neuronen mit NMDA behandelt; C: Neuronen nach Behandlung mit löslichem Con-G; D: Zellen inkubiert mit Gold Nanopartikeln passiviert mit PEG 3000 Thiolen **4/5** ($x(\text{NH}_2)=0,01$), funktionalisiert mit Peptid **8** via Linker **10**; D-R: Reaktionslösung der Funktionalisierung der Gold Nanopartikel; D-W: Letzte Waschlösung der Gold Nanopartikel; E: Zellen inkubiert mit Gold Nanopartikeln passiviert mit Alkyl-PEG 600 Thiolen **6/7** ($x(\text{NH}_2)=0,1$), funktionalisiert mit Peptid **8** via Linker **10**; D-R: Reaktionslösung der Funktionalisierung der Gold Nanopartikel; D-W: Letzte Waschlösung der Gold Nanopartikel.⁸

Die Reaktionslösung dient dem Nachweis, dass das in der Kopplungsreaktion eingesetzte Peptid Aktivität zeigt. Die letzte Waschlösung soll neben der Fluoreszenzbestimmung (s. Kapitel 3.6) bestätigen, dass die Konzentration an ungebundenem Peptid in Lösung so gering ist, dass keine biologische Aktivität gemessen werden kann. Abbildung 67 zeigt die Auswertung eines repräsentativen Experiments. Die unbehandelten Zellen (A) sowie die mit löslichem Con-G behandelten Zellen (C) zeigen eine geringe Zelltodrate von $1 \pm 1\%$ für A und $6 \pm 7\%$ für C, während die mit NMDA inkubierten Zellen (B) zu $57 \pm 10\%$ sterben. Die Proben der Gold Nanopartikel-Konjugate (D, E) zeigen, wie die vermessenen Waschlösungen (D-W, E-W) keinen protektiven Effekt. Dies ist in beiden Passivierungssystemen zu beobachten, wohingegen das in der Kopplungsreaktion eingesetzte Peptid **8** einen protektiven Effekt ausübt (D-R; E-R). Generell kann in keinem der durchgeführten Experimente eine protektive Wirkung der Nanopartikel nachgewiesen werden.

Nach der für HEK 293 gemessenen Dosis-Wirkungskurve (s. Kapitel 3.7.6) ist die Bindungskonstante der eingesetzten Nanopartikel-Peptid-Konjugate um einen Faktor 1000 kleiner, als die Bindungskonstante des ungebundenen Con-G. Überträgt man diese höhere Avidität der Konjugate auf das System der hippocampalen Neurone, in der eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Con-G einen zuverlässigen Schutz bietet, sollte die eingesetzte Konzentration der Peptide in den Nanopartikel Proben (durchschnittlich 130 nM) ausreichen, um in hippocampalen Neuronen einen protektiven Effekt zu detektieren. Um eine zu geringe Konzentration an immobilisierten Peptiden auszuschließen, wurden zusätzlich kleine Nanopartikel (12 nm Durchmesser) präpariert, die in einer höheren Konzentration vorliegen können, als größere Nanopartikel. Dadurch soll die Konzentration der immobilisierten Peptide so stark erhöht werden, dass sie mit der Konzentration der ungebundenen Peptide in Lösung vergleichbar ist. Die eingesetzte Endkonzentration der an 12 nm große Partikel immobilisierten Peptide beträgt $1 \mu\text{M}$. Auch in diesen stark konzentrierten Proben kann in hippocampalen Neuronen kein Effekt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind die Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate nicht funktional und üben daher keinen protektiven Effekt auf die Neuronen aus. Oder die Peptide sind aufgrund der Konjugation an die Nanopartikel

verhindert, mit der Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors in Wechselwirkung zu treten. Dem widerspricht allerdings, dass eine Wechselwirkung der funktionalisierten Nanopartikel mit den auf der Oberfläche der HEK 293 Zellen exprimierten NMDA-Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (s. Kapitel 3.7.6). Durch diese spezifische Wechselwirkung kann auf eine Funktionalität der Konjugate geschlossen werden. Die NMDA-Rezeptoren sind in der postsynaptischen Membran nicht fest verankert, sondern besitzen eine gewisse Mobilität.²²⁸ Es ist möglich, dass durch die Anwesenheit der funktionalen Konjugate die Rezeptoren in der Synapse in den extrasynaptischen Bereich wandern und damit die Konzentration der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren stark erhöht wird. Möglicherweise werden zudem von den sterisch anspruchsvollen Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugaten nicht alle Rezeptoren in der postsynaptischen Membran der hippocampalen Neuronen erreicht, um mit diesen in Wechselwirkung zu treten. Dadurch kann dann in einer statistischen Auswertung der gesamten Zellpopulation kein signifikanter Schutz detektiert werden. Zusätzlich ist die hier eingesetzte Bestimmung unkontrollierbaren Schwankungen der Vitalität der Neuronenkultur ausgesetzt, so dass in vielen Bestimmungen keine Aussage über den ausgeübten Schutz der Konjugate getroffen werden kann. Der hier eingesetzte Nachweis ist für die Untersuchung der Aktivität der Konjugate daher nicht geeignet. Im nächsten Schritt sollte daher ein alternativer Nachweis zur Funktionalität der Konjugate durchgeführt werden. Dieser kann beispielsweise durch „Calcium-Imaging“ erfolgen, indem die intrazelluläre Konzentration an Calcium in der Zelle sehr empfindlich detektiert werden kann.⁴ Die Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate sollten durch Blocken der NMDA-Rezeptoren diesen Calciumeinstrom nach NMDA Aktivierung verhindern. Dieses Verfahren der Detektion der intrazellulären Konzentration des Calciums setzt zum Nachweis der Funktionalität an einem früheren Stadium der Aktivierung an. Statt des Zelltods, der 24 Stunden nach Inkubation detektiert wird, wird der Auslöser des Zelltods, die Konzentration an Calcium detektiert. Dadurch könnte die Funktionalität der Konjugate möglicherweise deutlicher erkannt werden. Statt der statistischen Auswertung der Aktivität der funktionalisierten Nanopartikel kann zudem beispielsweise eine Einzelzellmessung in diesem Zusammenhang hilfreich sein. Elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Zellen (Patch-Clamp-Technik), in denen der Strom der Ionenkanäle gemessen werden kann, werden hierzu in der Literatur eingesetzt.^{228, 232, 275} Durch diese Einzelzellmessungen sollte die Funktionalität der hergestellten Gold-Nanopartikel-Peptid-Konjugate nachgewiesen werden können, die in den durchgeführten Bindungsstudien (s.o.) bereits eine zuverlässige Wechselwirkung mit den NMDA-Rezeptoren zeigten.

3.8.3 Auswertung der Bindung mittels REM

Da der eingesetzte Zelltodassay zur Bestimmung der Aktivität der Konjugate nicht geeignet ist, soll die Anbindung der Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate zusätzlich, ähnlich wie im Modellsystem der transfizierten HEK 293 Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht werden. Dazu werden die Zellen mit Nanopartikeln inkubiert und danach mit Medium gewaschen, um nicht gebundene Nanopartikel zu entfernen. Anschließend werden die Zellen fixiert und Kritisch-Punkt getrocknet, damit sie im Elektronenmikroskop visualisiert werden können. Die Aufnahmen der Zellen in verschiedenen Vergrößerungen sind in Abbildung 68 dargestellt. Die Neuronen werden mit Nanopartikeln inkubiert, die über den Linker **10** mit Peptid **8** funktionalisiert sind. Als Kontrolle dienen Nanopartikel, die mit dem biologisch nicht aktiven Kontrollpeptid **9** funktionalisiert werden. Wie zu sehen, binden die mit Peptid **8** funktionalisierten Nanopartikel an die Zellmembran (links). Im Gegensatz dazu können in der Kontrolle (rechts) annähernd keine Nanopartikel nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die funktionalisierten Nanopartikel mit den exprimierten NMDA-Rezeptoren auf der Membran der Neurone wechselwirken. Der in HEK 293 Zellen positive Bindungsnachweis im Elektronenmikroskop ist demnach auf das neuronale System übertragbar. Die hergestellten Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate wechselwirken spezifisch mit den dargebotenen NMDA-Rezeptoren und können somit im Folgenden für mechanistische Studien zur Untersuchung der verschiedenen Signalwege der hippocampalen Neuronen eingesetzt werden.

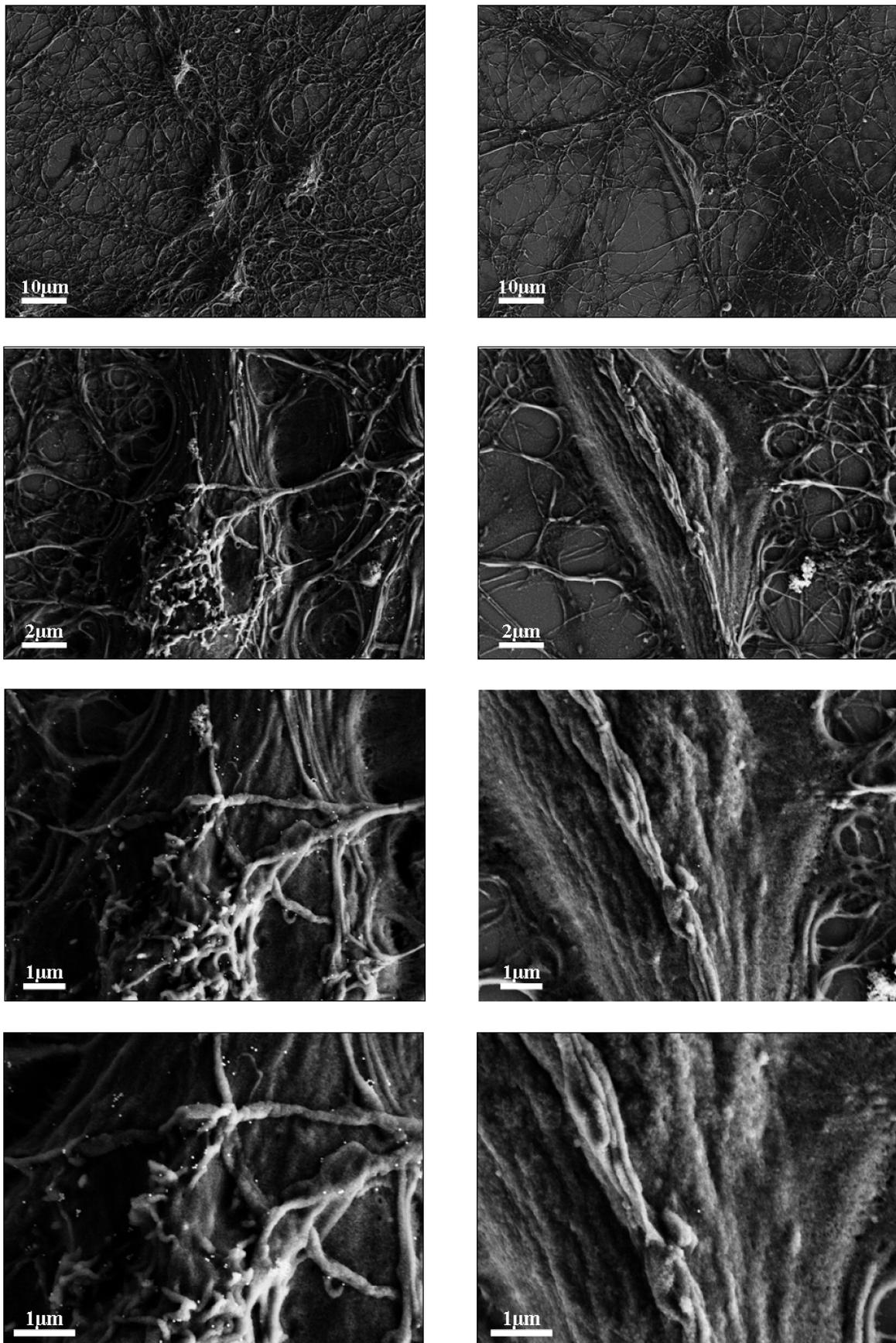


Abbildung 68: REM Aufnahmen der primären hippocampalen Neuronen mit Gold Nanopartikeln. Links: funktionalisiert mit Peptid 8, rechts: funktionalisiert mit Peptid 9 in unterschiedlichen Vergrößerungen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines generellen Konzepts zur Herstellung und Stabilisierung von Gold Nanopartikeln und ihrer Funktionalisierung mit Peptiden im Hinblick auf ihre Anwendung in biologischen Systemen. Mittels dieser Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate sollen extrasynaptische von synaptischen NMDA-Rezeptoren aufgrund ihrer räumlichen Lage unterschieden werden, um deren unterschiedliche Funktion im neuronalen System zu untersuchen. Besitzen Gold Nanopartikel einen Durchmesser, der größer als die Breite des synaptischen Spalts ist, können diese nicht in den Spalt diffundieren. Sind die verwendeten Nanopartikel mit NMDA-Rezeptorantagonisten funktionalisiert, können ausschließlich die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren blockiert werden, ohne dass die synaptischen NMDA-Rezeptoren erreicht werden. Mittels dieser funktionalen Gold Nanopartikel kann die unterschiedliche Rolle der synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren untersucht werden.

Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Synthese der funktionalisierten Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugate. Zunächst wird in diesem Zusammenhang eine Synthese entwickelt, die es erlaubt, Gold Nanopartikel mit einem Durchmesser von ≥ 30 nm herzustellen, die eine geringe Größenverteilung besitzen. Die in dieser Arbeit entwickelte Synthese erlaubt die kontrollierte Herstellung sphärischer Nanopartikel mit einem gewünschten Durchmesser bis etwa 60 nm. Es wird gezeigt, dass durch eine exakte Bestimmung der Konzentration an Goldkeimen und eine entsprechende Berechnung der Menge der Wachstumsreagenzien die Größe der entstehenden Partikel bereits vor der Synthese festgelegt werden kann. Die entwickelte Synthese sphärischer, monodisperser Gold Nanopartikel ist neben der Anwendung im neuronalen System für viele weitere Anwendungsbereiche interessant.

Neben der Synthese der Nanopartikel stellt auch ihre Stabilisierung eine wichtige Voraussetzung dar. Um diese synthetisierten Nanopartikel vor Aggregation in biologischen Medien zu schützen, werden diese mit einer gemischten Monolage aus thiolierten Polyethylenglykol (PEG)-Liganden versehen. Die Liganden schützen die Goldpartikel aufgrund sterischer Abschirmung und elektrostatischer Wechselwirkungen. Zusätzlich reduzieren die PEG-Liganden die unspezifische Adsorption von Proteinen und steigern die Biokompatibilität der Partikel. Die Liganden sind mit Carbonsäure- und Aminogruppen derivatisiert, die in einer gemischten Monolage auf der Partikeloberfläche angebunden werden. Erstere führen bei ausreichend hohem pH-Wert eine negative Ladung auf der Partikeloberfläche ein und stabilisieren diese damit elektrostatisch. Letztere hingegen dienen der weiteren Funktionalisierung. Die hier vorgestellte Methode der gemischten Monolage erlaubt eine gute Kontrolle über die Oberflächenfunktionalisierung, sowie die Stabilisierung der Nanopartikel und kann einen Zugang zu multifunktionellen Biomolekül-Nanopartikel-Konjugaten schaffen.

Zwei verschiedene Passivierungssysteme gemischter Monolagen werden hierzu verglichen. Diese bestehen zum Einen aus synthetisierten Alkyl-PEG 600 und zum Anderen aus kommerziell erhältlichen PEG 3000 basierten Thiolen. Die resultierenden passivierten Nanopartikel sind in beiden Fällen über Monate stabil und besitzen zudem eine hohe Stabilität bezüglich Aggregation in hochkonzentrierten Salzlösungen bis mindestens 2 M NaCl. In Zellkulturmedium zeigen sie überdies in einem gemessenen Zeitraum von 24 Stunden keine messbare Aggregation. Neben

der Charakterisierung der Schichtdicke der Polymere werden die passivierten Nanopartikel auf die chemische Zusammensetzung ihrer Passivierungsschicht untersucht. Hierzu wird ein fluoreszenz-basiertes Verfahren entwickelt, in welchem die Anzahl an reaktiven Aminogruppen bestimmt werden kann, die an die Nanopartikel immobilisiert sind. Ausgehend von Nanopartikeln derselben Synthese ist es möglich, Partikel mit einer gemischten Monolage herzustellen, die eine definierte und einstellbare Anzahl an nach außen zeigender Aminogruppen auf der Oberfläche tragen. Die Bestimmung dieser Aminogruppen erfolgt innerhalb eines 95% Konfidenzintervalls von 14%. Über zeitabhängige Messungen kann zudem eine starke Abnahme dieser reaktiven Aminogruppen festgestellt werden, obwohl weder in REM-Aufnahmen, noch in UV/Vis-Spektren eine Veränderung der Morphologie der Partikel festgestellt wird. Die Reduktion der Aminogruppen mit der Zeit kann auf die Desorption der Liganden von der Goldoberfläche zurückgeführt werden. Daher sollten die Proben für jedes Experiment zeitnah hergestellt werden.

Die Aminogruppen werden als funktionelle Gruppen zur weiteren Anbindung von biologischen Molekülen gewählt, da sie sich hervorragend für Kopplungsreaktionen eignen. Über die Reaktion mit einem heterobifunktionalen Linker, der mit einem NHS-Ester und einer Maleimid-Gruppe substituiert ist, kann das biologisch relevante Peptid an die äußere Peripherie der Nanopartikel gebunden werden. Das in dieser Arbeit eingesetzte fluoreszenz-markierte Peptid basiert auf der Aminosäuresequenz von Con-G, einem bekannten NMDA-Rezeptorantagonisten, welches in dem Toxin der Kegelschnecken erhalten ist. Neben diesem biologisch aktiven Peptid wird ein ebenfalls fluoreszenz-markiertes Kontrollpeptid getestet, welches in hippocampalen Neuronen keine biologische Wirkung besitzt. Die Immobilisierung der Peptide wird qualitativ mit Agarosegel Elektrophorese sowie quantitativ analog der Bestimmung der Anzahl an Aminogruppen analysiert. Auch hier kann anhand von zeitabhängigen Messungen dieser Nanopartikel-Peptid-Konjugate die Desorption der Liganden detektiert werden.

Interessanterweise zeigen die beiden untersuchten Passivierungssysteme ein unterschiedliches Verhalten bezüglich Anbindung der Peptide. Während Alkyl-PEG 600 passivierte Nanopartikel in Kontrollen ohne Linker annähernd keine thiolierten Peptide binden, zeigen PEG 3000 passivierte Partikel nach Inkubation der Peptide auch ohne Linker eine detektierbare Bindung der Peptide. Die PEG 3000 Polymere schirmen die Gold Nanopartikeloberfläche demnach nicht hinreichend ab, um eine Diffusion des Peptids zur Oberfläche zu verhindern, so dass eine gewisse Anzahl an Peptiden direkt an die Oberfläche der Partikel gebunden wird. Das Alkyl-PEG 600 Passivierungssystem auf der anderen Seite verhindert, vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen, die Diffusion und damit die direkte Bindung des Peptids an die Oberfläche der Partikel. Somit ist das Alkyl-PEG 600 System besser als das PEG 3000 basierte System zur definierten Herstellung biofunktionaler Nanopartikel geeignet.

Um die Wechselwirkung der Peptid funktionalisierten Nanopartikel mit NMDA-Rezeptoren zu untersuchen, wird zunächst ein Modellsystem verwendet, in welchem HEK 293 Zellen mit Plasmiden der NMDA-Rezeptoruntereinheiten transfiziert werden. Mittels dieser Zellexperimente kann die spezifische Wechselwirkung der Peptid-funktionalisierten Gold Nanopartikel sowohl qualitativ mittels REM-Aufnahmen, als auch quantitativ in einer Bindungsstudie nachgewiesen werden. Hierzu wird die Menge an Gold analysiert, die nach Aufreinigung an der transfizierten Zellkultur binden. In allen vorgestellten Experimenten ist diese Menge an gebundenen Gold Nanopartikel-Peptid-Konjugaten wesentlich höher, als in den

durchgeführten Kontrollexperimenten. In einer Dosis-Wirkungskurve wird zudem die Bindungskonstante der Peptid-Nanopartikel-Konjugate bestimmt, die um einen Faktor 1000 höher ist, als die des löslichen Con-G. Dies bestätigt, dass die hergestellten biofunktionalisierten Nanopartikel für die Anwendung im biologischen System geeignet sind.

In ersten Zelltoduntersuchungen in dem primären System der hippocampalen Neuronen kann die Funktionalität der Peptid-Nanopartikel-Konjugate bisher nicht bestätigt werden. Allerdings kann eine erhöhte Bindung der biofunktionalisierten Nanopartikel visuell in REM-Aufnahmen detektiert werden. Die Anzahl der mit dem bioaktiven Peptid funktionalisierten Nanopartikel ist wesentlich höher, als die der Nanopartikel, welche mit dem Kontrollpeptid derivatisiert wurden.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit die generelle Herstellung und Charakterisierung biofunktionalisierter Nanopartikel mit einem Durchmesser von 13-60 nm beschrieben, welche sich aufgrund ihrer hohen Stabilität und der definierten und kontrollierbaren Anzahl biofunktionaler Peptide für die Anwendung in biologischen Systemen eignen. Die dargestellten Nanopartikel besitzen eine solche Ausdehnung, dass sie, funktionalisiert mit mehreren identischen Bindungsstellen, mit mehreren präsentierten Rezeptoren simultan in Wechselwirkung treten können. Diese Konjugate stellen somit ein interessantes Werkzeug zur Untersuchung von „Rezeptor-Clustering“ mittels multivalenter Liganden dar.

Der nächste notwendige Schritt besteht im Nachweis der Aktivität der Peptid-Nanopartikel-Konjugate im neuronalen System. Hierzu sollen einzelne Neurone auf die Aktivität des Rezeptors untersucht werden. Verschiedene etablierte Methoden können hier angewendet werden. Beispielsweise könnten elektrophysiologische Untersuchungen in diesem Zusammenhang von Interesse sein. Auch die Technik des „Calcium-Imagings“, in welcher die intrazelluläre Konzentration an Calcium detektiert wird, kann Aufschluss über die Funktionalität der Konjugate liefern. Die Konzentration des Calciumeinstroms in Anwesenheit eines Agonisten sollte im Falle funktionaler Nanopartikel durch Blockierung der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren im Vergleich zu nicht blockierten Zellen vermindert werden. Auf diese Weise könnte die Aktivität der Konjugate nicht nur über die Anbindung der Partikel, sondern gleichfalls über die hemmende Funktion dieser bestätigt werden.

Neben der Untersuchungen der Funktionalität der biofunktionalen Nanopartikel, sollte auch die Charakterisierung der Schichtdicke der passivierten Nanopartikel weitergeführt werden. Mittels DLS könnten zudem die Peptid-funktionalisierten Nanopartikel vermessen werden, um den Einfluss des Peptids auf die Schichtdicke zu ermitteln.

Die hier vorgestellte Methode zur Funktionalisierung der Gold Nanopartikel eignet sich zudem nicht ausschließlich zur Anbindung des in dieser Arbeit vorgestellten bioaktiven Peptids. Durch die Übertragbarkeit der Funktionalisierungsstrategie können im Weiteren andere biologisch aktive Verbindungen an die Nanopartikel gebunden werden. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Peptide interessant, die die Rezeptor-vermittelte Endozytose auslösen. Die Aufnahme der funktionalisierten Nanopartikel könnte hierbei über eine Detektion des Goldes erfolgen. Gleichzeitig können neben Peptiden auch weitere biologische Fragestellungen adressiert werden, in denen thiolhaltige Kohlenhydrate oder Oligonukleotide an die Peripherie der Nanopartikel gebunden werden. Wird eine orthogonale Funktionalisierungsstrategie

eingesetzt, ist zudem basierend auf dem hier vorgestellten System die Herstellung multifunktionaler Nanopartikel denkbar.

Besonders die in dieser Arbeit beschriebene Bestimmung der Anzahl der biologisch aktiven Verbindungen ist für die Untersuchung verschiedener Rezeptor-Epitop- oder Schlüssel-Schloss-Wechselwirkungen von Relevanz und kann der Untersuchung verschiedenster biologischer Fragestellungen im Sinne der Quantitativen Biologie dienen.

5 Material und Methoden

5.1 Messtechniken

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen werden mit einem Gerät der Firma Zeiss, Modell Ultra 55, ausgestattet mit einer Gemini-Elektronenkanone bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV angefertigt. Dazu werden die Proben auf einer amino-silanisierten Siliziumscheibe getropft und nach 5 Minuten mit Wasser gewaschen. Die Probe wird im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Silanisierung der Siliziumscheibe wird diese zunächst in Caroscher Säure, bestehend aus Wasserstoffperoxid (30%) und konz. Schwefelsäure (1:3), gereinigt. Nach 30 Minuten werden die Scheiben mit Wasser, Ethanol und Toluol gewaschen. Anschließend werden sie in einer Lösung aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (5 mM) in Toluol inkubiert. Nach Reinigung mit Toluol, Ethanol und Wasser mit jeweils 5 mL werden die Siliziumscheiben im Stickstoffstrom getrocknet und können etwa 3 Monate gelagert werden.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen werden mit einem Gerät der Firma Phillips, Modell CM 200, mit einer LaB6-Kathode bei 200 kV Beschleunigungsspannung angefertigt. Die Bilder werden mit einer Weitwinkelkamera vom Typ Erlangshen (CS500W, Model 782) der Firma Gatan aufgenommen.

Als Probenträger dienen 400 Mesh-Kupfernetzchen (Grids) der Firma Plano, die mit einem Kohlenstofffilm belegt wurden. Für die Benetzung der Grids werden zunächst 10 μ L Ethanol auf dem Netz für fünf Minuten inkubiert und mit einem Filterpapier abgezogen. Das Kupfernetzchen wird anschließend 5 Minuten auf einem Tropfen Probe abgelegt. Überschüssige Lösung wird danach mit einem Filterpapier abgezogen.

Statistische Auswertung mittels Image J

Der Durchmesser der Partikel und die Haupt- und Nebenachsen werden aus REM- oder TEM-Aufnahmen mit der Software Image J (entwickelt vom National Institute of Health (NIH), USA) ermittelt. Zunächst wird der Maßstab festgelegt (für eine REM-Aufnahme in 50k Vergrößerung beträgt dieser 95 Pixel für 200 nm). Anschließend werden die Aufnahmen durch Anpassung eines Schwellenwertes (Funktion: *engl.* Threshold) in ein binäres Bild umgewandelt. In diesem binären Bild können zusammenhängende Partikel mit der Funktion „Watershed“ getrennt werden. Anschließend wird automatisiert eine Ellipse an die Umrisse der Partikel angepasst, wobei zusätzlich die Fläche der Partikel analysiert wird. Es werden mindestens 3 verschiedene Bilder für die Auswertung einer Größenverteilung herangezogen und mindestens 500 Partikel analysiert. Diese Daten werden als Histogramm mit einer Klassenbreite von 1 oder 2 nm (je nach Größe der Partikel) aufgetragen und mit einer Gaußfunktion gefittet. Die Standardabweichung σ wird aus der Halbwertsbreite (2σ) der Gaußverteilung erhalten. Die Lage des Maximums gibt den durchschnittlichen Durchmesser, die Haupt- oder Nebenachse an.

Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)

Die Konzentration an Gold wird mit ICP-OES (Spectro, CIROS CCD) oder AA (Perkin-Elmer, PE 5000) gemessen. Dazu werden 10-200 μL der Probe mit 0,5 mL konzentrierter Salzsäure und 0,25 mL konzentrierter Salpetersäure versetzt, eine Minute inkubiert und anschließend mit 10 mL Wasser verdünnt. Durch einen Vergleich mit einer Kalibrierungskurve kann die Konzentration an Gold bestimmt werden. Die Konzentration an Gold kann unter Berücksichtigung des Durchmessers der Nanopartikel (REM/TEM Auswertung) und der Dichte der Partikel nach Formel 5 in die Konzentration der Partikel umgerechnet werden. Die ICP-OES Messungen werden am Max-Planck-Institut Stuttgart, Zentrale Wissenschaftliche Einrichtung-Analytische Chemie von Albrecht Meyer, Gerhard Werner und Samir Hammoud durchgeführt.

UV/Vis Spektroskopie (UV/Vis) und Fluoreszenzspektroskopie

UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie werden am TEKAN Infinite M200 durchgeführt. Für UV/Vis Messungen werden die verdünnten Proben in 96-Wellplatten (Greiner Bio One) pipettiert und die Absorption zwischen 300 und 700 nm wird gemessen.

Für Fluoreszenzmessungen werden 200 μL der verdünnten Proben in 96-Wellplatten (Greiner Bio One, schwarz) pipettiert und das Fluoreszenzsignal wird als Vierfachbestimmung gemessen.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Gold Nanopartikel Proben werden durch einen 0,2 Membranfilter filtriert und in eine Einmalküvette überführt. Die Messung der DLS erfolgt bei 20°C mit einem kommerziellen Goniometer mit einem digitalen Korrelator (ALV, Langen, Deutschland) und einem Helium-Neon Laser (Polytec, Waldbrunn, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 633 nm.²⁸⁸ Die Auswertung der Daten basiert auf dem Programm CONTIN, welches eine inverse Laplace Transformation durchführt. An die resultierende bimodale Verteilung $p(\ln(t))$ der Relaxationszeit t werden mit folgenden zwei Verteilungen gefittet, wobei a_i die Amplitude und σ_i die Breite der Verteilung p_i dargestellt.

$$p_i(\ln(t)) = \frac{a_i \cdot \exp[-(\ln(t) - \ln(\bar{\tau}_i))^2]}{\left(\frac{2\sigma_i^2}{2\pi\sigma_i^2}\right)} \quad (8)$$

Aus den mittleren Relaxationszeiten $\bar{\tau}_i$ ($i = 1,2$) der zwei Verteilungen wird die apparente Diffusionskonstante $D_{i,app}$ über:

$$D_{i,app} = \frac{1}{\bar{\tau}_i Q^2} \quad (9)$$

ermittelt, wobei Q die Länge des Streuvektors ($Q = 4\pi n/\lambda \times \sin(\theta/2)$), θ der Streuwinkel, λ die Wellenlänge des Lasers und n den Brechungsindex der Lösung beschreibt. Der Diffusionskoeffizient D_i wird durch lineare Extrapolation von $D_{i,app}$ gegen $Q = 0$ erhalten. Über die Stokes-Einstein Gleichung kann ($R_{H,i} = k_B T / (6\pi\eta D_i)$) wiederum der Hydrodynamische Radius $R_{H,i}$ der Partikelpopulation i ($i = 1,2$) errechnet werden. Hierbei ist k_B die Boltzmann Konstante und η die Viskosität.

Zellzähler

Mit einem Beckman Coulter Partikelzähler (Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer) wird die Anzahl der Zellen bestimmt. Dazu werden Zellen für 2 Minuten trypsiniert und mit Medium verdünnt (1 mL). Nach Zentrifugation wird der Zellrückstand in 1 mL PBS aufgenommen. Die Zellsuspension (100 μ L) wird mit 10 mL einer isotonischen Lösung (Isoton II, Beckman Coulter) verdünnt. Die Größe der Zellen wird auf einen Minimal- und einen Maximaldurchmesser von 12-40 μ m festgelegt und die Suspension wird dreimal vermessen.

Fluoreszenzaufnahmen

Die Aufnahmen stammen von einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit integrierter Xenonlampe und einer Orca Kamera der Firma Hamamatsu. Für Fluoreszenzaufnahmen wird ein 63 \times C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, 63 \times /1.20 W Korr UV-VIS-IR) und folgende Filter verwendet: DAPI Filter (Zeiss, Exzitation: 365 nm; Emission: 445 \pm 50 nm), EGFP Filter (Zeiss, Exzitation: 470 \pm 40 nm; Emission: 525 \pm 50 nm) und das mCherry HC Filterset (Exzitation: 562 \pm 40 nm, Emission: 641 \pm 75 nm). Für Phasenkontrastaufnahmen wird ein 10 \times Luftobjektiv (Zeiss, EC Plan-Neofluar 10 \times /0.3 Phase 1 infinity/-) verwendet.

Durchflusszytometer

Mit einem Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter (cytomics FC 500) ausgestattet mit einem Argonlaser wird die Transfektionseffizienz der HEK 293 Zellen bestimmt. Ein „Dual Laser Filter Block“ der Firma Beckman Coulter dient der Einstellung der verschiedenen Fluoreszenzkanäle. GFP wird im ersten Kanal (FL1) mit einem Bandpassfilter von 525 nm gemessen, die PI-Fluoreszenz im dritten Kanal (FL3) mit einem Bandpassfilter von 620 nm, die R-PE-Fluoreszenz wird im zweiten Kanal (FL2) mit einem Bandpassfilter von 575 nm detektiert. Für jede Messung werden innerhalb der im Punktwolkendiagramm ausgewählten Zellpopulation 10 000 Zellen analysiert.

5.2 Materialien

Alle verwendeten Puffer werden, wenn nicht anders beschrieben, im höchsten Reinheitsgrad von Merck bezogen, alle verwendeten Lösungsmittel werden im höchsten Reinheitsgrad von Sigma Aldrich bezogen. Gold(III)-chlorid (HAuCl_4) wird von Sigma Aldrich bezogen, Natriumzitat von Sigma, Hydroxylamin Hydrochlorid ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), 3-Aminopropyltriethoxysilan, 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl Carbodiimid Hydrochlorid (EDC), *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) von Acros Organics, 5(6)-Carboxyfluorescein von Novabiochem, *N,N*-Dimethylformamid (DMF) in Peptidsynthesequalität von Fluka, der Heterobifunktionale Linker **10** von Pierce, Dithiothreitol (DTT) von Serva, Agarose von Biozym. PEG3000 Thiole **4** und **5** werden von RAPP Polymere GmbH (Tübingen, Germany) erworben. Alkyl-PEG 600 Thiole **6** und **7** werden nach der Literatur synthetisiert.²⁸⁹ Peptide **8** (Sequenz: GE γ LQ γ NQ γ LIR γ K(TAMRA)SNC-NH₂, γ -Carboxyglutamat) wird in einer Auftragsynthese von PSL-Peptide Specialty Laboratories (Heidelberg, Germany) bezogen. Peptide **9** (Sequenz: GEUULQUNQULIRUK(TAMRA)SNC-

NH₂, U = γ -Glutamat) wird ebenfalls in einer Auftragsynthese von Biosyntan (Berlin, Germany) bezogen.

DMEM, 0,05%Trypsin/EDTA und hitzeinaktiviertes Fötale Rinderserum werden von Gibco bezogen. Paraformaldehyd (16% in Methanol) wird von Alfa Aesar, Glutaraldehyd (25%) für Elektronenmikroskopie von Merck, Poly-L-Lysin (0,1% w/v in Wasser) von Sigma, Propidiumiodid (PI) (1 mg/mL Lösung) von Sigma Aldrich, DAPI von Carl Roth, Lipofectamin 2000 von Invitrogen, NR1 Antikörper (MAB1586) von Millipore, R-PE von Sigma, 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV), Ketamin, 4-Hydroxyquinoline-2-Carbonsäure (KYNA) von Sigma Aldrich, DNA Aufreinigungskit (Pure Link Maxi Präparation) von Invitrogen, LB-Medium von Sigma, Restriktionsenzym Pst 1 von Invitrogen, Beladungspuffer für Agarose Gelelektrophorese von Fermentas, DNA Leiter (1 kB) von Invitrogen, Triton X-100 (10% in Wasser) von Sigma Aldrich, BSA von Serva, Mowiol von Biomeda (Forster City, CA), GFAP Antikörper von Sigma (G4546), NeuN Antikörper von Chemikon (MAB 377), Hoechst 33258 von Serva, NMDA von Sigma, Das Plasmid der NR1 Untereinheit wird von Dr. G. Köhr, MPI für medizinische Forschung, Heidelberg bereitgestellt, das Plasmid der NR2B Untereinheit von Dr. Daniela Mauceri, IZN Universität Heidelberg.

5.3 Experimenteller Teil

Alle Glasgefäße werden vor Gebrauch mit Königswasser (HCl (37%)/ HNO₃ (65%) 3:1) gereinigt. Das verwendete deionisierte Wasser wird über ein Aufreinigungssystem (TKA GenPure Wasserreinigungssystem) bezogen und weist einen spezifischen Widerstand von 18,2 M Ω cm auf. Alle Lösungen der Gold Nanopartikel Synthese und des Wachstums werden durch eine 0,2 μ m degenerierte Zellulosemembran (Whatman[®]) filtriert. Die Aufreinigung der passivierten Nanopartikel mittels Ultrafiltration erfolgt über eine Amicon[®] Ultra-4 Zentrifugationsfiltereinheit (Millipore), die aus regenerierter Zellulose besteht und eine Ausschlussgröße von 100 kDa besitzt. Zur Aufreinigung über Gelfiltration werden vorgepackte NAP-10[™] Säulen von GE Healthcare eingesetzt.

In der Zellkultur werden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitsarbeitsbank durchführt. Alle Lösungen sowie Plastikgefäße werden autoklaviert oder steril bezogen. Die Zellen werden als Monolagenkulturen in Schräghalsflaschen (Cellstar Gewebekulturflaschen, 250 ml, 75 cm², Greiner Bio One) bei 37°C und 5% CO₂ in Brutschränken kultiviert.

5.3.1 Herstellung der Nanopartikel

Einstufige Gold Nanopartikel Synthese nach Turkevich⁸⁴

Eine wässrige Gold(III)-chlorid Lösung (0,26 mM, 95 mL) wird unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wird eine wässrige Natriumzitratlösung (38,8 mM, 5,0 mL) gegeben und die Reaktion wird für weitere 5 Minuten am Siedepunkt gehalten. Die resultierenden Partikel sind in Abbildung 13 A dargestellt und in Abbildung 15 ausgewertet. Sie besitzen eine Hauptachse von 24 ± 3 nm und eine Nebenachse von $20 \pm 2,5$ nm.

Einstufige Gold Nanopartikel Synthese nach Frens⁸⁶

Eine wässrige Gold(III)-chlorid Lösung (0,5 mM, 50 mL) wird unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wird eine wässrige Natriumzitratlösung (38,8 mM, 0,5 mL) gegeben und die Reaktion wird für weitere 5 Minuten am Siedepunkt gehalten. Die resultierenden Partikel sind in Abbildung 13 B dargestellt und in Abbildung 16 ausgewertet. Sie besitzen eine Hauptachse von 67 ± 15 nm und eine Nebenachse von 52 ± 7 nm.

Synthese der Gold Nanopartikel Keime

Zur Synthese der Gold Nanopartikel Keime wird in einem 500 mL Dreihalskolben eine wässrige Gold(III)-chlorid Lösung (1 mM, 100 mL) unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Unter starkem Rühren wird zu dieser Lösung möglichst rasch eine warme Lösung aus Natriumzitat in Wasser (38,8 mM, 10 mL) gegeben. Die Lösung wird für weitere 30 Minuten bei 100°C gehalten und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die resultierende rote Lösung wird durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert und für die folgende Reaktion eingesetzt. Die Konzentration der erhaltenen Partikel wird mittels ICP-OES bestimmt und beträgt exemplarisch für 12,0 nm Partikel ~ 6 nM.

Wachstum der Gold Nanopartikel nach Brown et al.⁹⁰

Zur Synthese der Keime wird eine wässrige Gold(III)-chlorid Lösung (0,5 mM, 50 mL) zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wird eine wässrige Natriumzitratlösung (38,8 mM, 1 mL) gegeben und die Reaktion wird für weitere 5 Minuten am Siedepunkt gehalten. Die resultierenden Partikel besitzen einen Durchmesser von 13 ± 1 nm (Abbildung 18 A). 15 mL dieser Keime werden zu einer Lösung aus 135 mL Wasser, 1,25 mL Hydroxylamin Hydrochlorid (0,2 M) und 1,5 mL Gold(III)-chlorid (0,26 mM) gegeben. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt. Die erhaltenen Gold Nanopartikel besitzen einen Durchmesser von 18 ± 2 nm (REM-Aufnahmen nicht gezeigt). Aus dieser Lösung werden 25 mL Gold Nanopartikel entnommen und zu einer Lösung aus 0,56 mL Hydroxylamin Hydrochlorid (0,2 M) und 1 mL Gold(III)-chlorid (0,26 mM) in 75 mL Wasser gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Nanopartikel besitzen einen Durchmesser von 36 ± 4 nm (Abbildung 18 B). Aus dieser Lösung werden 55 mL entnommen und in eine Lösung aus 0,375 mL Hydroxylamin Hydrochlorid (0,2 M), 1 mL Gold(III)-chlorid (0,26 mM) in 75 mL Wasser gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierenden Partikel besitzen einen Durchmesser von 41 ± 4 nm (REM-Aufnahmen nicht gezeigt). Aus dieser Lösung werden wiederum 50 mL entnommen und in eine Lösung aus 0,375 mL Hydroxylamin Hydrochlorid (0,2 M), 1 mL Gold(III)-chlorid (0,26 mM) in 50 mL Wasser gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierenden Partikel besitzen einen Durchmesser von 55 ± 6 nm (Abbildung 18 C). Zur Aufreinigung werden die verschiedenen Gold Nanopartikel Proben zentrifugiert.

Wachstum der Gold Nanopartikel

Gold Keime (15 mL, 6,5 nM) werden zu einer wässrigen Lösung aus Hydroxylamin Hydrochlorid (240 mL, 10 mM) gegeben und gerührt. Zur Synthese von 30 nm Partikeln wird zu dieser Lösung mit einer konstanten Geschwindigkeit (50 mL/h) über eine Spritzenpumpe (kd Scientific) eine wässrige Lösung aus Gold(III)-chlorid gegeben (255 mL, 0,65 mM). Die

tiefrote Lösung wird anschließend einmal zentrifugiert (40 Minuten, 4160×g) und in 9 mL Wasser aufgenommen. Nach der Zentrifugation bildet sich ein unlöslicher Rückstand, welcher verworfen wird.

Passivierung der Gold Nanopartikel

In einem Standardprotokoll werden Gold Nanopartikel (1 mL, 5,2 nM) zu einer Lösung aus Passivierungsliganden **4/5** oder **6/7** (1 mM Endkonzentration, gelöst in EtOH) mit verschiedenen Molenbrüchen $x(\text{NH}_2) = 0,09; 0,17; 0,23; 0,27; 0,33$ gegeben und mit 0,3 M (400 μL) NaHCO_3 Lösung gepuffert. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur für 48–72 Stunden gerührt. Anschließend werden die Gold Nanopartikel von überschüssigem Thiol mittels Ultrafiltration gereinigt, indem mit 1×4 mL H_2O ; 4×4 mL Ethanol/40 mM NaHCO_3 Puffer, pH 8,4 (2:8) und 3×4 mL 40 mM NaHCO_3 Puffer, pH 8,4 gewaschen wird. Die Zentrifugation wird jeweils bei 1600×g für 10 Minuten durchgeführt. Danach wird die Suspension mittels Gelfiltration, eluiert mit 40 mM NaHCO_3 Puffer aufgereinigt und in NaHCO_3 Puffer (40 mM, pH 8,5) suspendiert.

Funktionalisierung der passivierten Nanopartikel mit magnetischen Mikropartikeln

Die Thiol funktionalisierten Magnetpartikel (Magna Medics) werden nach der Beschreibung des Herstellers aufgereinigt. Dazu werden die magnetischen Partikel über Ultrafiltration von stabilisierenden Verbindungen gereinigt. Es werden 200 μL der Magnetopartikel 2× mit 4 mL Natriumphosphat Puffer gewaschen und anschließend in 200 μL Natriumphosphat Puffer aufgenommen.

Vor der Kopplungsreaktion wird der NaHCO_3 Puffer (40 mM) der Gold Nanopartikel (50 μL , ~1–5 nM) mittels Ultrafiltration gegen Natriumphosphat Puffer (50 μL , 100 mM, pH 7,0) ausgetauscht. 50 μL der Gold Nanopartikel (~1–5 nM) dispergiert in 100 mM Natriumphosphat Puffer (pH 7,0) werden mit Linker **10** (50 mM in DMF, 5 μL) inkubiert und für 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Aufreinigung von überschüssigem Linker wird mit Ultrafiltration durchgeführt, indem die Partikel mit 4×4 mL Ethanol/20 mM Natriumphosphat Puffer (2:8), pH 7,0 und 2×4 mL H_2O gewaschen werden. Weiterhin werden die Gold Nanopartikel mit Gelfiltration, eluiert mit Natriumphosphat Puffer, pH 7,0 gereinigt. Die aufgereinigten Nanopartikel (1 mL) werden anschließend mit den aufgereinigten Mikropartikeln (50 μL) über Nacht bei 4°C geschüttelt. Zur Aufreinigung der Konjugate wird ein Magnetfeld eingesetzt, so dass der Überstand der Lösung 7× mit 40 mM NaHCO_3 ausgetauscht werden kann. Die resultierende Suspension wird mittels REM analysiert.

Als Kontrolle werden passivierte Gold Nanopartikel (50 μL) mit 5 μL DMF ohne Linker **10** inkubiert und wie oben aufgereinigt. Sie werden in 1 mL Natriumphosphat Puffer, pH 7,0 aufgenommen. Anschließend werden diese Partikel mit den aufgereinigten Mikropartikeln über Nacht bei 4°C inkubiert (50 μL). Die Aufreinigung erfolgt analog zur Aufreinigung der Probe. Des Weiteren werden nicht funktionalisierte Partikel (50 μL) in 1 mL Wasser verdünnt und mit den Mikropartikeln inkubiert. Diese Kontrollen werden ebenfalls mittels REM analysiert.

Funktionalisierung der Passivierten Gold Nanopartikel mit Peptiden 8/9

Vor der Kopplungsreaktion wird der NaHCO₃ Puffer (40 mM) der Gold Nanopartikel (200 µL, ~1-5 nM) mittels Ultrafiltration gegen Natriumphosphat Puffer (650 µL, 100 mM, pH 7,0) ausgetauscht. Die Suspension wird anschließend mit einer Lösung aus Linker in DMF (20 µL, 50 mM) versetzt und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur Aufreinigung werden die Nanopartikel mittels Ultrafiltration mit 4×4 mL Ethanol/20 mM Natriumphosphat Puffer (2:8), pH 7,0 und 2×4 mL H₂O gewaschen. Weiterhin werden die Gold Nanopartikel mit Gelfiltration, eluiert mit Wasser gereinigt. Das Eluat wird mit Ultrafiltration aufkonzentriert und in 350 µL 40 mM NaHCO₃ Puffer aufgenommen. Zur Konjugation werden Peptid **8** (20 µL, 360 µM in 40 mM NaHCO₃ Puffer) oder Peptid **9** (18,5 µL, 390 µM in 40 mM NaHCO₃ Puffer) zur Suspension gegeben und die Reaktion wird über Nacht bei 4°C geschüttelt. Überschüssiges Peptid wird mittels Ultrafiltration entfernt, indem mit 1×4 mL H₂O; 4×4 mL Ethanol/40 mM NaHCO₃ Puffer, pH 8,4 (2:8); 3×4 mL 40 mM NaHCO₃ Puffer, pH 8,4 gewaschen wird. Danach wird die Suspension mittels Gelfiltration, eluiert mit 40 mM NaHCO₃ Puffer gereinigt. Mittels Ultrafiltration wird die Suspension anschließend aufkonzentriert und in 350 µL 40 mM NaHCO₃ Puffer aufgenommen.

5.3.2 Charakterisierung der Nanopartikel

Salzaggregationstests mittels UV/Vis-Spektroskopie

Um die Stabilität der kolloidalen Lösung zu bestimmen, werden Proben von passivierten und Peptid funktionalisierten Gold Nanopartikeln hergestellt. Verschiedene Volumina einer NaCl-Stammlösung (3 M, 10 mL, 1,75 g) und Wasser werden pipettiert, um finale Salzkonzentrationen zwischen 0,4 M und 2 M zu erhalten. In diese verschiedenen Lösungen werden Gold Nanopartikel (10 µL, ~4 nM) pipettiert, die Lösungen werden geschüttelt, für 30 Minuten inkubiert und in eine 96-Wellplatte überführt. Anschließend wird ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen, um die Änderungen der Absorption zu detektieren.

Stabilitätstest im Medium mittels UV/Vis

Um die Stabilität der kolloidalen Lösung in Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Zeit zu bestimmen, werden Gold Nanopartikel (10 µL, 4 nM) mit 200 µL Zellkulturmedium (DMEM) verdünnt und in eine 96-Wellplatte überführt. UV/Vis-Spektren werden alle 30 Minuten für 24 Stunden aufgenommen, wobei jeweils vor einer Messung 1 Minute geschüttelt wird. Um die Stabilität der Suspension zu bestimmen wird der Aggregationsparameter errechnet.

Aggregationsparameter

Der Aggregationsparameter als ein empirischer Parameter beschreibt die Stabilität der kolloidalen Suspension. Er errechnet sich nach $(A-A_0)/A_0$, wobei A die integrierte Fläche darstellt, die das UV/Vis-Spektrum der Probe zwischen 600 und 700 nm einschließt. A₀ ist definiert als die integrierte Fläche, welche das UV/Vis-Spektrum der initialen Probe begrenzt. Für Salzaggregationsmessungen sind dies Gold Nanopartikel, die in Wasser dispergiert sind. Für

Medium-Zeit-Messungen werden Gold Nanopartikel zum Zeitpunkt $t = 0$ herangezogen, die in Medium verdünnt werden. Aggregieren die Partikel, vergrößert sich die Fläche zwischen 600 und 700 nm, die durch das UV/Vis-Spektrum der Probe (A) begrenzt wird. Dadurch erhöht sich gleichermaßen der Aggregationsparameter (s. Abbildung 27).

Agarose Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird mit einem 0,5% Agarose Gel durchgeführt. Zur Herstellung des Gels werden 0,125 g Agarose in 25 mL Borsäure Puffer (SB) pH 8,5²⁹⁰ eingerührt, zum Sieden erhitzt und bei einer Temperatur von $\sim 50^\circ\text{C}$ in den Träger gegossen. Die verwendeten Taschen besitzen eine Größe von 10 μL . Die Gold Nanopartikel (10 μL , ~ 2 nM) werden mit 10 μL einer Lösung aus Glycerin und SB Puffer (9:1) verdünnt und in die 10 μL großen Taschen geladen. Für eine Stunde wird eine Spannung von 70 V angelegt. Das resultierende Agarosegel wird mit einem Imager (LAS 300) der Firma Fuji aufgenommen.

Durchführung des fluoreszenz-basierten Verfahrens zur Bestimmung der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel

Eine Lösung des 5(6)-Carboxyfluorescein NHS-Esters wird hergestellt, indem 5(6)-Carboxyfluorescein (5,60 mg, 14,9 μmol) in 200 μL DMF gelöst wird. Zu dieser Lösung werden NHS (2,11 mg, 18,7 μmol , 1,2 Äquivalente) und EDC (3,60 mg, 18,7 μmol , 1,2 Äquivalente) zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. In einem typischen Experiment werden 100–200 μL einer ~ 1 -5 nM Lösung passivierter Gold Nanopartikel in 40 mM NaHCO_3 mit 40 mM NaHCO_3 Puffer auf 1 mL verdünnt. Danach werden 20 μL des hergestellten NHS-Esters (74 mM) zugegeben und die Reaktion wird für 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Als Kontrolle werden 20 μL 5(6)-Carboxyfluorescein (74 mM in DMF) zu einer verdünnten Gold Nanopartikel Probe gegeben und die Reaktion wird für 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Anschließend werden die Gold Nanopartikel aufgereinigt, um überschüssiges Fluorophor abzutrennen. Die Reaktionslösung wird zunächst mittels Ultrafiltration aufgereinigt, indem die Nanopartikel mit 2×4 mL $\text{N}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, pH 9,4, 2×4 mL Ethanol /40 mM NaHCO_3 , pH 8,4 (2:8), 3×4 mL 40 mM NaHCO_3 , pH 8,4 gewaschen werden. Anschließend werden die Nanopartikel mittels Gelfiltration, eluiert mit NaHCO_3 Puffer gereinigt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals jeder Waschlösung wird gemessen und sie erreicht nach Aufreinigung die Intensität des Hintergrunds, um sicher zu stellen, dass die Nanopartikel Suspension frei von ungebundenem Fluorophor ist. Zu diesem Zeitpunkt wird die Reaktionslösung geteilt.

Teil (1): 100–200 μL der aufgereinigten Gold Nanopartikel werden zum gleichen Volumen an DTT-PB Puffer (1 M DTT in 0,18 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,9) gegeben. Das Reaktionsgefäß wird mit Parafilm gut verschlossen und über Nacht bei 40°C geschüttelt. Danach wird dieser Teil zunächst für 15 Minuten ins Ultraschallbad überführt und zentrifugiert (10 Minuten, 13 000 rpm). Vier Aliquote des Überstandes werden $10 \times$ mit 40 mM NaHCO_3 Puffer verdünnt und in eine 96-Wellplatte pipettiert. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wird gemessen (Anregung: 480 nm, Emission: 520 nm) wodurch die Konzentration der Aminogruppen anhand eines Vergleichs mit einer Kalibrierungskurve bestimmt werden kann.

Teil (2): 100-200 μL der aufgereinigten Gold Nanopartikel werden mit 0,5 mL konzentrierter Salzsäure und 0,25 mL konzentrierter Salpetersäure versetzt, um die Gold Nanopartikel aufzulösen, und mit 10 mL Wasser verdünnt. Die Konzentration an Gold wird entweder mit ICP-OES oder AAS gemessen, wobei eine Dreifachbestimmung angefertigt wird.

Kalibrierungskurven für die Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Anzahl an Aminogruppen

Die Konzentration an fluoreszenzmarkierten Aminogruppen, die nach Inkubation mit DTT freigesetzt werden, kann anhand eines Vergleichs mit einer Kalibrierungskurve berechnet werden. Es können sowohl Fluorescein oder 5(6)-Carboxyfluorescein als Referenz eingesetzt werden, da zwischen den beiden Kalibrierungskurven kein signifikanter Unterschied besteht (Abbildung 69 a). Da das Fluoreszenzsignal von Fluorescein zudem stark vom pH-Wert abhängt, wird getestet, ob die Zugabe von DTT einen Einfluss auf die Intensität besitzt. Daher wird eine Kalibrierungskurve aufgenommen, in der 5(6)-Carboxyfluorescein mit einer DTT-PB Lösung (1 M DTT in 0,18 M Natriumphosphat Puffer pH 7,9) und Wasser versetzt wird, um die finale Konzentration der Fluoreszenzbestimmung zu erhalten. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen der Kalibrierungskurve in Puffer (blau) und in DTT-PB Lösung (grau) festgestellt werden (Abbildung 69 b). Ein linearer Fit wird an die gemessene Eichkurve angepasst ($R^2 = 0,999$), dessen Geradengleichung zur Bestimmung der Konzentration der Probe herangezogen wird.

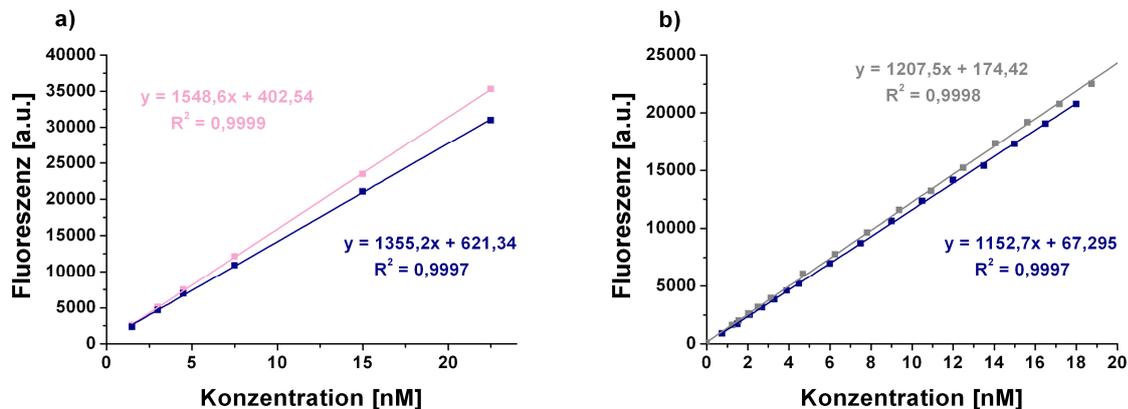


Abbildung 69: Beispiele von Kalibrierungskurven zur Bestimmung der Konzentration an Fluorophor. a) 5(6)-Carboxyfluorescein (blau) und Fluorescein (rosa), b) 5(6)-Carboxyfluorescein in 40 mM NaHCO₃ (blau), 5(6)-Carboxyfluorescein in 40 mM NaHCO₃, 23 mM Phosphatpuffer und 125 mM DTT (grau).

In einem typischen Experiment werden 100 mL einer Stammlösung ($c = 2,84 \times 10^{-4}$ M) hergestellt, indem 10,68 mg 5(6)-Carboxyfluorescein in 50 mM Na₂B₄O₇ · 10 H₂O, pH 9,4 gelöst werden. Die Stammlösung wird im Dunkeln bei 4°C gelagert. Für jede Messung wird eine verdünnte Lösung von 5(6)-Carboxyfluorescein ($c = 1,5 \times 10^{-5}$ M) mit 40 mM NaHCO₃ Puffer pH 8,4 hergestellt. Für eine Kalibrierungskurve wird diese Lösung bis zur Endkonzentration mit 40 mM NaHCO₃ verdünnt. Generell werden 6 bis 20 verschiedene Konzentrationsproben für eine Kalibrierungskurve präpariert.

Bestimmung des Standardfehlers bei der Messung der durchschnittlichen Anzahl an adressierbaren Aminogruppen pro Partikel ($N[\text{NH}_2]$)²⁸⁹

Um den Standardfehler der $N[\text{NH}_2]$ Werte zu bestimmen wird folgender Ansatz gewählt:

- Für Bestimmungen, die als Duplikate ($N_{\text{NH}_2}^1$ and $N_{\text{NH}_2}^2$) gemessen werden, kann ΔN_{NH_2} wie folgt berechnet werden:

$$\Delta N_{\text{NH}_2} = \pm 0.5 \times \left| N_{\text{NH}_2}^1 - N_{\text{NH}_2}^2 \right|$$

- Für Einzelnachweise wird die Standardabweichung sd_{NH_2} aus der Fortpflanzung der einzelnen Standardabweichungen der Fluoreszenzmessung sd_{Fluor} und der ICP-OES Messungen $sd_{\text{ICP-OES}}$ errechnet:

Es gilt:

$$N_{\text{NH}_2} = \frac{[\text{Fluor}]}{[\text{AuNPs}]} \quad (10)$$

wobei: $[\text{Fluor}]$ = Konzentration der fluoreszenzmarkierten Moleküle
 $[\text{AuNPs}]$ = Konzentration der Gold Nanopartikel, errechnet aus der Konzentration an Gold in der Lösung (ICP-OES oder AAS) und der Partikelgröße (analysiert via REM oder TEM)

Die Standardabweichung berechnet sich nach:

$$sd_{\text{NH}_2} = N_{\text{NH}_2} \times \sqrt{\left(\frac{sd_{\text{Fluor}}}{I_{\text{Fluor}}}\right)^2 + \left(\frac{sd_{\text{ICP-OES}}}{I_{\text{ICP-OES}}}\right)^2} \quad (11)$$

wobei: I_{Fluor} = Intensität des Fluoreszenzsignals
 $I_{\text{ICP-OES}}$ = Intensität des ICP-OES (oder AAS) Signals

Die Standardabweichung der ICP-OES (und AAS) Messungen $\frac{sd_{\text{ICP-OES}}}{I_{\text{ICP-OES}}}$ liegt unterhalb 3%,

daher wird dieser Wert für die Berechnung der Standardabweichung sd_{NH_2} eingesetzt. Die

errechnete relative Standardabweichung $\frac{sd_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ für ~ 90% von 127 durchgeführten Messungen

liegt zwischen 4% und 7% (Abbildung 70).

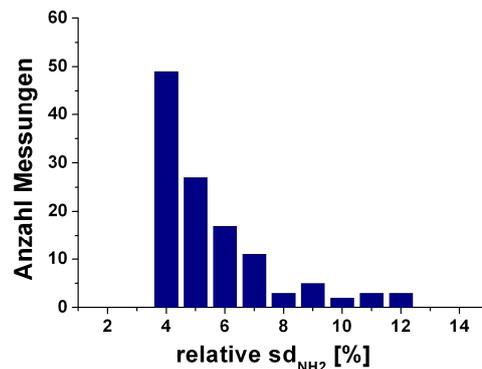


Abbildung 70: Verteilung der relativen Standardabweichung sd_{NH_2} von 127 Messungen.

Eine Abschätzung des 95% Konfidenzintervalls für die Bestimmung der Anzahl an Aminogruppen pro Partikel N_{NH_2} kann durch Vergleich von $\frac{\Delta N_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ und $\frac{sd_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ nach

folgendem Schema erhalten werden (für Bestimmungen, die als Duplikate durchgeführt wurden):

wenn $\frac{\Delta N_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ und $\frac{sd_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}} \leq 7\%$ wird der Standardfehler aus $\pm 2 \times 7\% = 14\%$ berechnet.

wenn $7\% < \frac{\Delta N_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}} \leq \frac{sd_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ wird der Standardfehler aus $\pm 2 \times \frac{sd_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ berechnet.

wenn $7\% < \frac{sd_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}} \leq \frac{\Delta N_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ wird der Standardfehler aus $\pm \frac{\Delta N_{\text{NH}_2}}{N_{\text{NH}_2}}$ berechnet.

Für Einzelmessungen wird der Standardfehler von N_{NH_2} über $\pm 2 \times sd_{\text{NH}_2}$ berechnet.

Die Standardfehler in Tabelle 3 entsprechen entweder $\pm \Delta N_{\text{NH}_2}$ oder $\pm 2 \times sd_{\text{NH}_2}$.

Zeitabhängige Untersuchung der Zusammensetzung der Monolage

Die Zeitabhängigkeit der Zusammensetzung wird nach zwei Methoden bestimmt. A) In Analogie zur Bestimmung der Anzahl an Aminogruppen, werden die Proben gelagert und zu den dargestellten Zeitintervallen mit 5(6)-Carboxyfluorescein NHS-Ester zur Reaktion gebracht. Die Aufreinigung und Bestimmung erfolgen, wie in der Durchführung des fluoreszenz-basierten Verfahrens zur Bestimmung der Anzahl an Aminogruppen beschrieben. Die zugehörigen Daten der in Abbildung 37 gezeigten Graphen sind in Tabelle 11 (Anhang) dargestellt. B) In einer zweiten Untersuchung werden die Nanopartikel zum Zeitpunkt $t=0$ mit 5(6)-Carboxyfluorescein NHS-Ester zur Reaktion gebracht und aufgereinigt. Nach den dargestellten Zeitintervallen werden die Proben gereinigt und anschließend analog der beschriebenen Vorgehensweise vermessen. Die Daten sind in Tabelle 11^a (Anhang) erfasst.

Durchführung der fluoreszenzbasierten Bestimmung der Anzahl gebundener Peptide pro Partikel

Vor der Kopplungsreaktion wird der NaHCO_3 Puffer (40 mM) der Gold Nanopartikel (200 μL , $\sim 1\text{-}5$ nM) mittels Ultrafiltration gegen Natriumphosphat Puffer (650 μL , 100 mM, pH 7,0) ausgetauscht. Die Suspension wird anschließend mit einer Lösung aus Linker **10** in DMF (20 μL , 50 mM) versetzt und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur Aufreinigung werden die Nanopartikel mittels Ultrafiltration mit 2×4 mL Ethanol/20 mM Phosphat Puffer, pH 7,0 (2:8) und 2×4 mL H_2O gewaschen. Weiterhin werden die Gold Nanopartikel mit Gelfiltration, eluiert mit Wasser gereinigt. Das Eluat wird mit Ultrafiltration aufkonzentriert und in 350 μL 40 mM NaHCO_3 Puffer aufgenommen. Zur Konjugation wird Peptid **8** (20 μL , 360 μM in 40 mM NaHCO_3 Puffer) bzw. Peptid **9** (18,5 μL , 390 μM in 40 mM NaHCO_3 Puffer) zur Suspension gegeben und die Reaktion wird über Nacht bei 4°C geschüttelt. Überschüssiges Peptid wird mittels Ultrafiltration entfernt, indem mit 1×4 mL H_2O ; 4×4 mL Ethanol/40 mM NaHCO_3 Puffer, pH 8,4 (2:8), 3×4 mL 40 mM NaHCO_3 Puffer, pH 8,4 gewaschen wird. Danach wird die Suspension mittels Gelfiltration, eluiert mit 40 mM NaHCO_3 Puffer gereinigt. Mittels

Ultrafiltration wird die Suspension anschließend aufkonzentriert und in 350 μL 40 mM NaHCO_3 Puffer aufgenommen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wird für jedes Filtrat gemessen und erreicht nach der Aufreinigung die Intensität des Hintergrunds.

Als Kontrollexperiment, um die direkte Bindung des Peptids zu untersuchen, wird eine Probe passivierter Nanopartikel wie oben behandelt, jedoch ohne den Linker **10** im ersten Funktionalisierungsschritt. Stattdessen werden 20 μL DMF zur Reaktion gegeben.

Zur Bestimmung der Anzahl an gebundenen Peptiden werden die Proben der Peptid-funktionalisierten Nanopartikel in zwei Teile aufgeteilt:

Teil (1): 100-200 μL der aufgereinigten Gold Nanopartikel werden zum gleichen Volumen an DTT-PB Puffer (1 M DTT in 0,18 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,9) gegeben. Das Reaktionsgefäß wird mit Parafilm gut verschlossen und über Nacht bei 40°C geschüttelt. Danach wird dieser Teil zunächst für 15 min ins Ultraschallbad überführt und dann zentrifugiert (10 Minuten, 13 000 rpm). Vier Aliquote des Überstandes werden 10 \times mit 40 mM NaHCO_3 Puffer verdünnt, in eine 96-Wellplatte pipettiert und die Intensität des Fluoreszenzsignals gemessen (Anregung: 546 nm, Emission 586 nm). Die Konzentration der Peptide wird anschließend anhand eines Vergleichs mit einer Kalibrierungskurve bestimmt (s.u.).

Teil (2): 100-200 μL der aufgereinigten Gold Nanopartikel werden mit 0,5 mL konzentrierter Salzsäure und 0,25 mL konzentrierter Salpetersäure versetzt, um die Gold Nanopartikel aufzulösen, und mit 10 mL Wasser verdünnt. Die Konzentration an Gold wird entweder mit ICP-OES oder AAS gemessen, wobei eine Dreifachbestimmung angefertigt wird.

Anfertigung der Kalibrierungskurve zur Bestimmung der Anzahl an gebundenen Peptiden

Die Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Peptid wird anhand eines Vergleichs mit der Kalibrierungskurve ermittelt. 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) wird als Referenzverbindung eingesetzt.

In einem typischen Experiment werden 100 mL einer Stammlösung ($c = 2,521 \times 10^{-4}$ M) hergestellt, indem 10,58 mg TAMRA in 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O} \sim \text{pH } 9,4$ gelöst werden. Die Stammlösung wird im Dunkeln bei 4°C gelagert. Für jede Messung wird eine verdünnte Lösung von TAMRA ($c = 1,5 \times 10^{-5}$ M) mit 40 mM NaHCO_3 Puffer pH 8,4 hergestellt.

Für eine Kalibrierungskurve wird diese Lösung bis zur Endkonzentration mit 40 mM NaHCO_3 Puffer verdünnt. Generell werden 6 bis 20 verschiedene Konzentrationsproben für eine Kalibrierungskurve präpariert. Abbildung 71 zeigt zwei repräsentative Kalibrierungskurven in einem niedrigen (a) und einem hohen (b) Konzentrationsbereich.

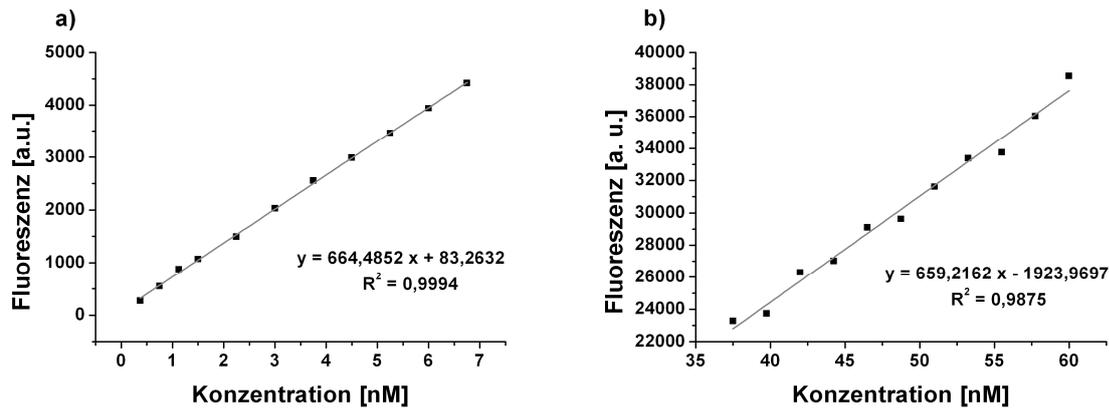


Abbildung 71: Zwei exemplarische Kalibrierungskurven mit 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin für die Bestimmung der Anzahl an Peptiden N_{Peptide} a) geringer Konzentrationsbereich (0,375–6,750 nM) b) hoher Konzentrationsbereich (37,5–60,0 nM).

5.3.3 DNA Präparation

Das Plasmid der NR1 Untereinheit wird von Dr. G. Köhr, MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg, das Plasmid der NR2B Untereinheit von Dr. Daniela Mauceri, IZN Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Transformation der cDNA in Bakterien wird in Heidelberg von Dr. Oliver Dick durchgeführt. Die transformierten Bakterien werden in 250 mL LB-Medium mit Ampizillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) über Nacht bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Anschließend wird die DNA nach einem Protokoll von Invitrogen (Maxi-Präparation) aufgereinigt. Dazu werden die in LB-Medium über Nacht gewachsenen Bakterien für 10 Minuten bei 4000 \times g zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Es werden 10 mL der Resuspensionslösung mit RNase A zum Rückstand gegeben und die Bakterien werden resuspendiert, bis eine homogene Lösung vorliegt, die in ein 50 mL Falcon Gefäß überführt wird. Anschließend werden 10 mL Lysepuffer zugegeben, das Gefäß wird vorsichtig geschüttelt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 10 mL Puffer zur Ausfällung (*engl.* Precipitation Buffer) zugegeben, das Gefäß wird vorsichtig gedreht und die Lösung wird für 10 Minuten bei 12 000 \times g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmide enthält, wird auf eine mit Puffer äquilibrierte Ionentauschersäule (Invitrogen) geladen. Die Säule wird mit 60 mL Waschpuffer gewaschen. Um die DNA zu eluieren, wird der zugehörige Puffer auf die Säule gegeben und die Plasmide werden in einem 50 mL Falcon Gefäß gesammelt. Zur Aufreinigung der DNA werden 10 mL Isopropanol zur Lösung gegeben und die Lösung wird für 30 Minuten bei 15 000 \times g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Rückstand wird in 5 mL Ethanol (70%) resuspendiert. Die Lösung wird für 10 Minuten bei 15 000 \times g bei 4°C zentrifugiert. Der Rückstand wird an Luft getrocknet. Anschließend wird das Plasmid in DNase freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der DNA wird mit dem TEKAN Plattenleser über die Absorption bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. In 100 μL Aliquots (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) wird die DNA anschließend bei -20°C gelagert, die Gebrauchslösung wird anschließend bei 4°C gelagert.

Verdau mit Restriktionsenzym

Für den Verdau der Plasmide werden jeweils 16 µL nukleasefreies Wasser, 2 µL Reaktionspuffer (10×); 1 µg/ µL Plasmid und das Restriktionsenzym (0,5-2 µL, 5-10 U) zusammen pipettiert und für 2 Stunden bei 37°C ohne Schütteln inkubiert.

Agarose Gel

Die Gelelektrophorese wird mit einem 1% Agarose Gel durchgeführt. Zur Herstellung des Gels werden 0,25 g Agarose in 25 mL TAE Puffer, pH 8,0 eingerührt, zum Sieden erhitzt und bei einer Temperatur von ~50°C in den Träger gegossen. Die eingesetzte Tasche besitzt eine Größe von 20 µL. Es werden 20 µL der Enzymreaktion mit 4 µL des Beladungspuffers (6×) gemischt und in eine 20 µL große Tasche des Gels pipettiert. Weiterhin wird die unverdaute DNA in gleicher Konzentration mit dem Beladungspuffer gemischt und ebenfalls in die Tasche des Gels überführt. Eine 1 kB DNA Leiter dient der Größenbestimmung der DNA Fragmente. Für 1 Stunde wird eine Spannung von 70 V angelegt. Die DNA wird nachträglich mit „SYBR safe gel stain“ (Invitrogen) angefärbt. Das resultierende Agarosegel wird mit einem Imager (LAS 300) der Firma Fuji aufgenommen.

5.3.4 HEK 293 Zellen

Kultivierung der HEK 293 Zellen

HEK-293 Zellen werden von der Deutschen Sammlung für Microorganismen und Zellkultur (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Diese werden in Kulturmedium (DMEM mit 10% FBS) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage werden die Zellen passagiert. Dazu werden diese mit PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, in frischem Medium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung (1:10 bis 1:1) in neue Flaschen überführt.

Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen

Zur Beschichtung von Glasplättchen werden diese mit konzentrierter Salzsäure gereinigt und mit Wasser gewaschen. Anschließend werden diese 1 Stunde in Ethanol inkubiert. Nach weiterem Waschen mit Wasser werden die Glasplättchen für 30 Minuten bei 37°C mit einer Poly-L-Lysin Lösung (0,01% w/v) inkubiert. Danach werden sie gründlich mit Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die beschichteten Glasplättchen können bei 4°C für einen Monat gelagert werden.

Transfektion mit Lipofectamin

Zur Transfektion werden 3×10^5 Zellen in 3 mL Kulturmedium auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen oder in einer 6-Wellplatte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gehalten. Anschließend wird das Medium durch 2 mL DMEM ohne FBS mit Blocker (500 µM APV) ausgetauscht. Es werden Lösungen aus a) Lipofectamin 2000 (10 µL) in 100 µL DMEM ohne FBS und b) DNA (4 µg pro eingesetzte DNA) in 100 µL DMEM ohne FBS separat hergestellt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Lipofectamin Lösung a) wird zur DNA Lösung b) pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach

wird diese Lösung vorsichtig am Rand der Vertiefung zu den Zellen pipettiert. Die Vertiefungsplatte wird kurz kreisförmig geschüttelt und dann für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 3 Stunden wird das Medium der Transfektion abgenommen und die Zellen werden mit 3 mL DMEM mit 10% FBS und 500 µM APV versetzt und 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

24 Stunden nach Transfektion wird die Transfektionseffizienz und die Zelltodrate bestimmt. Dazu werden die Zellen 2× mit Kulturmedium und 1× mit PBS mit jeweils 2 mL vorsichtig gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit 700 µL Trypsin bei 37°C und 5% CO₂ von der Vertiefungsplatte abgelöst. Nach 2 Minuten wird 1 mL Kulturmedium zugegeben und die Zellen werden in ein 15 mL Falcon Gefäß überführt. Die Vertiefungsplatte wird mit 1 mL Medium gewaschen. 100 µL dieser Zellsuspension werden zur Bestimmung der Zellzahl abgenommen.

Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie

In einem Durchflusszytometer werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. Das Durchflusszytometer wird zu Beginn jeder Messung mit kommerziell erhältlichen Fluoreszenzpartikeln (Beckman Coulter, Flow-Check™ Fluorospheres) kalibriert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie werden 1×10⁶ Zellen in 1 mL PBS in ein Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt. Zunächst wird die Spannung der Detektoren auf die Zelllinie eingestellt. Dies kann in einem Punktwolkendiagramm beobachtet werden, in dem die Vorwärtsstreuung gegen die Seitwärtsstreuung aufgetragen wird. In dieser Darstellung wird zudem die gemessene Zellpopulation markiert, um sie von Zellfragmenten oder Staub zu trennen. Innerhalb dieser Markierung werden 10 000 Zellen analysiert. Die Basislinie der Fluoreszenz und damit der Schwellenwert wird mittels nicht fluoreszenter Zellen festgelegt. Die Markierung der gemessenen Zellpopulation im Punktwolkendiagramm sowie die Schwellenwerte der einzelnen Fluoreszenzkanäle werden für alle Proben beibehalten. Für eine gleichzeitige Detektion von PI und GFP muss berücksichtigt werden, dass die Emissionsspektren dicht beieinander liegen. Durch eine elektronische Kompensation vor Beginn der eigentlichen Messreihe wird diese Überschneidung herausgerechnet.

Zur Bestimmung der Anzahl an toten Zellen wird PI (0,5 µg/µL, 20 µL) zur Probe (1 mL) gegeben, für 15 Minuten inkubiert und ohne weitere Aufreinigung gemessen. Abbildung 47 zeigt Punktwolkendiagramme sowie Histogramme exemplarischer Proben. In Abbildung 48 sind diese Proben in einer zweidimensionalen Auftragung dargestellt.

Antikörperfärbung

Zur Antikörperfärbung werden Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen ausgesät und wie oben beschrieben transfiziert. Anschließend werden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen werden diese mit 0,5% Triton X-100 (1 mL pro 6-Wellplatte) für 10 Minuten bei Raumtemperatur gehalten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit einer Lösung aus 2% BSA und 10% FBS in PBS bei 4°C über Nacht geblockt. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und

anschließend mit dem Erstantikörper (700 μL ; 1:1000) für eine Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wird der Zweitantikörper in 2% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS (700 μL ; 1:600) für 45 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Die Proben werden dreimal mit PBS für 10 Minuten gewaschen und anschließend zur Anfärbung des Zellkerns mit DAPI (700 μL ; 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) für 10 Minuten inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten für 10 Minuten mit PBS werden die Zellen mit Wasser gewaschen und mit Mowiol auf einen Objektträger aufgeklebt. Nach 24 Stunden Trocknung werden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt.

Durchflusszytometrie zur Quantifizierung der kotransfizierten Zellen

Die Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Messung wird nach einer Beschreibung der Firma Invitrogen durchgeführt (Fix and Perm). Die transfizierten Zellen werden von der Vertiefungsplatte durch Zugabe von 700 μL Trypsin abgelöst, mit 700 μL Kulturmedium versetzt und zentrifugiert (3 Minuten, 300 \times g). Zur Fixierung werden 100 μL der Fixierlösung zu 5×10^5 Zellen zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 3 mL PBS und 5% FBS zugegeben und die Zellsuspension wird für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Zellen werden in 100 μL Permeabilisierungsreagenz resuspendiert und geschüttelt. Der Erstantikörper (300 μL ; 1:1000) wird zugegeben und es wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Aufreinigung werden 3 mL PBS und 5% FBS zugegeben und die Suspension wird für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wird mit dem Zweitantikörper (1:600) in 100 μL Permeabilisierungsreagenz und 500 μL PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Aufreinigung werden 3 mL PBS und 5% FBS zugegeben und die Suspension wird für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Zellen werden in PBS aufgenommen und mit Durchflusszytometrie vermessen. Die Punktwolkendiagramme sowie Histogramme der einzelnen Fluoreszenzkanäle sind in Abbildung 53 dargestellt. In Abbildung 54 ist eine zweidimensionale Auswertung der Immunfärbung dargestellt.

5.3.5 Bindungsnachweis

Bindungsnachweis

Die Zellen werden nach oben beschriebener Vorschrift transfiziert. Nach 24 Stunden werden die Zellen 2 \times mit Kulturmedium und 1 \times mit PBS mit jeweils 2 mL gewaschen, um tote Zellen und den Blocker zu entfernen. Anschließend werden die Gold Nanopartikel (1×10^{11} Partikel in 50 μL NaHCO_3 Puffer) in 700 μL Kulturmedium ohne Blocker zu den Zellen pipettiert und 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Um ungebundene Partikel zu entfernen, werden die Zellen 2 \times mit Kulturmedium und 1 \times mit PBS mit jeweils 2 mL gewaschen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass HEK 293 Zellen als eine semi-adhärenzte Zelllinie nur schwach auf der Kulturschale haften. Es muss somit vorsichtig gewaschen werden, um zwar die ungebundenen Partikel zu entfernen, nicht aber die Zellen selbst. Danach werden die Zellen mit 700 μL Trypsin/EDTA von der Vertiefungsplatte abgelöst. Nach 2 Minuten wird 1 mL Kulturmedium zugegeben und die Zellen werden in ein 15 mL Falcon Gefäß überführt. Die Kulturschale wird mit 1 mL Medium gewaschen. 100 μL dieser Zellsuspension wird zur Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Zur Bestimmung der Anzahl an gebundenen Nanopartikeln wird die Suspension

anschließend für 45 Minuten mit 4160 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellrückstände mit den zuvor gebundenen Nanopartikeln mit Königswasser versetzt (0,5 mL konzentrierte Salzsäure und 0,25 mL konzentrierte Salpetersäure). Nach einer Stunde wird die Lösung in ein 10 mL Messkolben überführt und das Falcon Gefäß mit jeweils 1 mL Wasser 5× gewaschen. Die Waschlösung wird ebenfalls in den Messkolben überführt. Die Konzentration an Gold wird mittels ICP-OES bestimmt. Als Detektionsgrenze gilt die dreifache Standardabweichung der Basislinie. Diese Konzentration an Gold beträgt 0,05 µg/mL (für 29 nm Partikel ergibt dies $2,03 \times 10^8$ Partikel/mL). Bezogen auf die Anzahl der Zellen ($\sim 1 \times 10^6$) ergibt dies eine Detektionsgrenze von 200 Partikeln/Zelle.

Zur Messung der Dosis-Wirkungskurve werden verschiedene Konzentrationen an Peptid **8** funktionalisierten Gold Nanopartikeln (Endkonzentration $c = 1 \times 10^{12} - 5 \times 10^7$ Partikel/mL in 200 µL 40 mM NaHCO₃ Puffer) zu den Zellen in 700 µL Kulturmedium pipettiert, kreisförmig geschüttelt und ebenfalls 30 Minuten inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgt analog der oben beschriebenen Aufarbeitung.

Probenpräparation für REM Aufnahmen

Für REM-Aufnahmen werden Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen ausgesät und zur Adhäsion 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Transfektion (s.o.) werden die Zellen mit Gold Nanopartikeln für 30 Minuten inkubiert und gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd und 1,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für 2 Stunden fixiert. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (20%-100% Ethanol in Wasser) werden die Proben anschließend dehydriert, wobei die Proben in jeder Lösung für mindestens 15 Minuten inkubiert werden. Nach der Kritisch-Punkt-Trocknung der Proben (Bal-Tec Kritisch-Punkt-Trockner, CPD 030) werden diese mit einem Kohlenstofffilm bedampft (Bal-Tec MED 20 coating system). Anschließend können die Proben im REM untersucht werden.

5.3.6 Neuronale Zellen

Die Experimente mit neuronalen Zellen werden in Kooperation mit der Universität Heidelberg, Abteilung Prof. H. Bading, Neurobiologie von Dr. Oliver Dick durchgeführt.

Zellkultur

Hippocampale Neuronen aus neugeborenen Sprague Dawley Ratten werden analog der Beschreibung der Literatur präpariert.²⁹¹ Das Wachstumsmedium wird hier mit B27 (Gibco/BRL oder Invitrogen), 3% Rattenserum und 1 mM Glutamin ergänzt. Die Neuronen werden auf 12 mm Glasplättchen oder 4-Wellplatten in einer Dichte von 400 bis 600 Zellen/mm² ausgesät. Alle Experimente werden nach einer Kultivierungsphase von 10-12 Tagen durchgeführt, nach der die hippocampalen Neurone ein Netzwerk und synaptische Kontakte ausgebildet haben.^{4, 292}

Zelltodbestimmung

Zur Bestimmung des Zelltods werden die Neurone mit 20 µM N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) für 10 Minuten bei 37°C behandelt. Danach wird NMDA ausgewaschen und die Zellen werden

für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Fixierung werden die Neurone mit 4% Paraformaldehyd und 4% Saccharose für 15 Minuten inkubiert, mit PBS gewaschen und mittels 0,5 µg/µL Hoechst 33528 der Zellkern angefärbt. Der Zelltod wird mittels Lichtmikroskop (Leica DM IRBE, 40×Vergrößerung) ermittelt, indem das Verhältnis von kondensierten Zellkernen (tote Zellen) zu den nicht kondensierten Zellkernen (lebende Zellen) in jeweils 20 Bildern mit Image J ausgewertet wird. Die Fluoreszenzaufnahmen werden mit einer CCD Kamera (Spot Insight 2; Visitron Systems, Puchheim, Germany) aufgenommen.

Gold Nanopartikel Experimente

Die Neurone werden mit den verschiedenen Gold Nanopartikel Proben jeweils in der gleichen Konzentration für 20 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wird der Zelltod durch Zugabe von NMDA (20 µM) für 10 Minuten ausgelöst. Im Anschluss werden die hippocampalen Neurone 3× mit Medium gewaschen und für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Bestimmung des Zelltods erfolgt analog des oben beschriebenen Verfahrens.

Probenpräparation zur Herstellung von Ultradünnschnitten für TEM-Aufnahmen

Für optimalen Erhalt der Ultrastruktur werden hippocampale Neurone in Kultur für 2 Stunden in einem Gemisch von 2,5% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in 0,1M Cacodylat-Puffer (CA) (pH 7,4) fixiert. Anschließend werden die Zellen mehrfach in 0,1M CA gewaschen und danach in einem Gemisch von 1,5% Kalium-Ferro-Cyanid und 1% Osmium-Tetroxid in 0,1M CA für 2 Stunden nachfixiert. Auf die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90% und zweimal 100% Ethanol für je 15 Minuten) und Propylenoxid (5 Minuten) folgt die Einbettung der Schnitte in einem Gemisch aus Propylenoxid und Eponharz (1:1) über Nacht im Abzug. Die Gefäße werden nicht verschlossen, so dass das Propylenoxid verdampfen kann. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen für 2 Stunden in frischem Eponharz inkubiert, bevor sie mit frischem Eponharz überschichtet wurden. Anschließend werden die eingebetteten Zellen für 3 Tage bei 60°C aufbewahrt, damit das Eponharz aushärten kann. Mittels eines Ultramikrotoms (Ultracut, Reichert) werden Ultradünnschnitte von 50-70 nm Dicke für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen angefertigt.

6 Literaturverzeichnis

1. Kandel, E. R., Schwartz, James H.; Jessell, Thomas M., *Neurowissenschaften: eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford, : 1996.
2. Ryan, T. J.; Grant, S. G. N., The origin and evolution of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, 10, (10), 701-712.
3. Hardingham, G. E.; Bading, H., The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* **2003**, 26, (2), 81-89.
4. Hardingham, G. E.; Fukunaga, Y.; Bading, H., Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* **2002**, 5, (5), 405-414.
5. Hardingham, G. E.; Arnold, F. J. L.; Bading, H., Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat. Neurosci.* **2001**, 4, (3), 261-267.
6. Sattler, R.; Tymianski, M., Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.* **2000**, 78, (1), 3-13.
7. Chazot, P. L., The NMDA receptor NR2B subunit: A valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, (3), 389-396.
8. Chen, H.-S. V.; Lipton, S. A., The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* **2006**, 97, (6), 1611-1626.
9. Mony, L.; Kew, J. N.; Gunthorpe, M. J.; Paoletti, P., Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157, (8), 1301-1317.
10. Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A. M.; Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C., Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, (12), 1721-1730.
11. Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R., Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, (3), 943-950.
12. Sperling, R. A.; Rivera Gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J., Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1896-1908.
13. Wilson, R., The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 2028-2045.
14. Katz, E.; Willner, I., Nanobiotechnology: integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, (45), 6042-6108.
15. Bhushan, B., *Handbook of Nanotechnology*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2004.
16. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.* **2005**, 105, (4), 1547-1562.
17. Chen, P. C.; Mwakwari, S. C.; Oyelere, A. K., Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol., Sci. Appl.* **2008**, 1, 45-66.
18. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat. Mater.* **2008**, 7, (6), 442-453.
19. Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Au nanoparticles target cancer. *Nano Today* **2007**, 2, (1), 18-29.
20. Bhattacharya, R. M., Priyabrata, Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, (11), 1289-1306.
21. Boisselier, E.; Astruc, D., Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, (6), 1759-1782.

22. Ofir, Y.; Samanta, B.; Rotello, V. M., Polymer and biopolymer mediated self-assembly of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, (9), 1814-1825.
23. Daniel, M.-C.; Astruc, D., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, 104, (1), 293-346.
24. Wagner, F. E.; Haslbeck, S.; Stievano, L.; Calogero, S.; Pankhurst, Q. A.; Martinek, K. P., Before striking gold in gold-ruby glass. *Nature* **2000**, 407, (6805), 691-692.
25. Leonhardt, U., Optical metamaterials: Invisibility cup. *Nat Photon* **2007**, 1, (4), 207-208.
26. Edwards, P. E.; Thomas, J. M., Fein verteiltes Gold - Faradays Beitrag zu den heutigen Nanowissenschaften. *Angew. Chem.* **2007**, 119, (29), 5576-5582.
27. Faraday, M., The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1857**, 147, 145-181.
28. Thomas, J. M., Colloidal metals: past, present and future. *Pure Appl. Chem.* **1988**, 60, (10), 1517-1528.
29. Schmid, G., *Nanoparticles: From Theory to Application*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 2004.
30. Link, S.; El-Sayed, M. A., Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2000**, 19, (3), 409-453.
31. Sönnichsen, C., Plasmons in metal nanostructures. *Dissertation* **2001**, Ludwig-Maximilians-Universität München.
32. Hu, M.; Chen, J.; Li, Z.-Y.; Au, L.; Hartland, G. V.; Li, X.; Marquez, M.; Xia, Y., Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, (11), 1084-1094.
33. Schultz, D. A., Plasmon resonant particles for biological detection. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, (1), 13-22.
34. Raschke, G.; Kowarik, S.; Franzl, T.; Soennichsen, C.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Nichtl, A.; Kuerzinger, K., Biomolecular Recognition Based on Single Gold Nanoparticle Light Scattering. *Nano Lett.* **2003**, 3, (7), 935-938.
35. De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M., Applications of nanoparticles in biology. *Adv. Mater.* **2008**, 20, (22), 4225-4241.
36. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, (11), 1307-1315.
37. Han, G.; Ghosh, P.; De, M.; Rotello, V. M., Drug and gene delivery using gold nanoparticles. *NanoBiotechnol.* **2007**, 3, (1), 40-45.
38. de la Fuente, J. M.; Penades, S., Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1760, (4), 636-651.
39. Otsuka, H.; Akiyama, Y.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K., Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with α -lactosyl-w-mercapto-poly(ethylene glycol). *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, (34), 8226-8230.
40. Takae, S.; Akiyama, Y.; Otsuka, H.; Nakamura, T.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K., Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: regulated interaction of RCA120 lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (2), 818-824.
41. Rojo, J.; Diaz, V.; De la Fuente, J. M.; Segura, I.; Barrientos, A. G.; Riese, H. H.; Bernad, A.; Penades, S., Gold glyconanoparticles as new tools in antiadhesive therapy. *ChemBioChem* **2004**, 5, (3), 291-297.
42. Faulk, W. P.; Taylor, G. M., An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* **1971**, 8, (11), 1081-3.
43. Roth, J.; Zuber, C.; Komminoth, P.; Sata, T.; Li, W. P.; Heitz, P. U., Applications of immunogold and lectin-gold labeling in tumor research and diagnosis. *Histochem. Cell Biol.* **1996**, 106, (1), 131-48.

44. Slot, J. W.; Geuze, H. J., A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* **1985**, 38, (1), 87-93.
45. Holgate, C. S.; Jackson, P.; Cowen, P. N.; Bird, C. C., Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J. Histochem. Cytochem.* **1983**, 31, (7), 938-944.
46. Hacker, G. W.; Grimelius, L.; Danscher, G.; Bernatzky, G.; Muss, W.; Adam, H.; Thurner, J., Silver acetate autometallography: an alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues. *J. of Histotechnol.* **1988**, 11, (4), 213-21.
47. Lackie, P. M., Immunogold silver staining for light microscopy. *Histochem. Cell Biol.* **1996**, 106, (1), 9-17.
48. Takumi, Y.; Ramirez-Leon, V.; Laake, P.; Rinvik, E.; Ottersen, O. P., Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* **1999**, 2, (7), 618-624.
49. Kharazia, V. N.; Weinberg, R. J., Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. *J. Comp. Neurol.* **1999**, 412, (2), 292-302.
50. Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W., Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, (3), 145-150.
51. Breunig, M. B., S.; Goepferich, A., Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, (1), 112-128.
52. Patel, P. C.; Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Mirkin, C. A., Peptide antisense nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, (45), 17222-17226.
53. Tkachenko, A. G.; Xie, H.; Liu, Y.; Coleman, D.; Ryan, J.; Glomm, W. R.; Shipton, M. K.; Franzen, S.; Feldheim, D. L., Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug. Chem.* **2004**, 15, (3), 482-490.
54. De la Fuente, J. M.; Berry, C. C.; Riehle, M. O.; Curtis, A. S. G., Nanoparticle Targeting at Cells. *Langmuir* **2006**, 22, (7), 3286-3293.
55. Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W., Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, 6, (4), 662-668.
56. Salmaso, S.; Caliceti, P.; Amendola, V.; Meneghetti, M.; Magnusson, J. P.; Pasparakis, G.; Alexander, C., Cell up-take control of gold nanoparticles functionalized with a thermoresponsive polymer. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, (11), 1608-1615.
57. Liu, Y.; Shipton, M. K.; Ryan, J.; Kaufman, E. D.; Franzen, S.; Feldheim, D. L., Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide-Poly(ethylene glycol) Monolayers. *Anal. Chem.* **2007**, 79, (6), 2221-2229.
58. Sandhu, K. K.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Smith, S. W.; Rotello, V. M., Gold Nanoparticle-Mediated Transfection of Mammalian Cells. *Bioconjug. Chem.* **2001**, 13, (1), 3-6.
59. Nativo, P.; Prior, I. A.; Brust, M., Uptake and Intracellular Fate of Surface-Modified Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2008**, 2, (8), 1639-1644.
60. Tkachenko, A. G.; Xie, H.; Coleman, D.; Glomm, W.; Ryan, J.; Anderson, M. F.; Franzen, S.; Feldheim, D. L., Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (16), 4700-4701.
61. De la Fuente, J. M.; Berry, C. C., Tat Peptide as an Efficient Molecule To Translocate Gold Nanoparticles into the Cell Nucleus. *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, (5), 1176-1180.
62. Hong, R.; Han, G.; Fernandez, J. M.; Kim, B.-j.; Forbes, N. S.; Rotello, V. M., Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, (4), 1078-1079.

63. Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Han, M. S.; Mirkin, C. A., Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science* **2006**, 312, (5776), 1027-1030.
64. Zheng, D.; Seferos, D. S.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A., Aptamer Nanoflares for Molecular Detection in Living Cells. *Nano Lett.* **2009**, 9, (9), 3258-3261.
65. Agasti, S. S.; Chompoosor, A.; You, C.-C.; Ghosh, P.; Kim, C. K.; Rotello, V. M., Photoregulated Release of Caged Anticancer Drugs from Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, (16), 5728-5729.
66. Elbakry, A.; Zaky, A.; Liebl, R.; Rachel, R.; Goepferich, A.; Breunig, M., Layer-by-Layer Assembled Gold Nanoparticles for siRNA Delivery. *Nano Lett.* **2009**, 9, (5), 2059-2064.
67. Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A., Gene Regulation with Polyvalent siRNA-Nanoparticle Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, (6), 2072-2073.
68. Lee, J.-S.; Green, J. J.; Love, K. T.; Sunshine, J.; Langer, R.; Anderson, D. G., Gold, Poly(β -amino ester) Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. *Nano Lett.* **2009**, 9, (6), 2402-2406.
69. Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A., Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, (6), 2115-2120.
70. El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A., Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* **2006**, 239, (1), 129-135.
71. Skirtach, A. G.; Dejugnat, C.; Braun, D.; Susha, A. S.; Rogach, A. L.; Parak, W. J.; Mohwald, H.; Sukhorukov, G. B., The Role of Metal Nanoparticles in Remote Release of Encapsulated Materials. *Nano Lett.* **2005**, 5, (7), 1371-1377.
72. Angelatos, A. S.; Radt, B.; Caruso, F., Light-Responsive Polyelectrolyte/Gold Nanoparticle Microcapsules. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, (7), 3071-3076.
73. Skirtach, A. G.; Munoz Javier, A.; Kreft, O.; Kehler, K.; Piera Alberola, A.; Moewald, H.; Parak, W. J.; Sukhorukov, G. B., Laser-induced release of encapsulated materials inside living cells. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, (28), 4612-4617.
74. Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Plasmon Coupling in Nanorod Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation Simulation, and Exciton-Coupling Model. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, (37), 18243-18253.
75. Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A., Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* **1997**, 277, (5329), 1078-81.
76. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **1996**, 382, (6592), 607-609.
77. Moller, R.; Fritzsche, W., Metal nanoparticle-based detection for DNA analysis. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2007**, 8, (5), 274-85.
78. Chen, Y.; Gu, X.; Nie, C.-G.; Jiang, Z.-Y.; Xie, Z.-X.; Lin, C.-J., Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. *Chem. Commun.* **2005**, (33), 4181-4183.
79. Grzelczak, M.; Perez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzan, L. M., Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, (9), 1783-1791.
80. Jongnam, P.; Jin, J.; Soon Gu, K.; Youngjin, J.; Taeghwan, H., Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, (25), 4630-4660.
81. Tao, A. R.; Habas, S.; Yang, P., Shape control of colloidal metal nanocrystals. *Small* **2008**, 4, (3), 310-325.
82. Markov, I. V., *Crystal Growth for Beginners* World Scientific Publishing: 1995.
83. LaMer, V. K. D., Robert H., Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, (11), 4874.

84. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., The nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, No. 11, 55-75.
85. Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J., Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* **1995**, 67, (4), 735-43.
86. Frens, G., Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature (Lond.), Phys. Science* **1973**, 241, (105), 20-2.
87. Pong, B.-K.; Elim, H. I.; Chong, J.-X.; Ji, W.; Trout, B. L.; Lee, J.-Y., New Insights on the Nanoparticle Growth Mechanism in the Citrate Reduction of Gold(III) Salt: Formation of the Au Nanowire Intermediate and Its Nonlinear Optical Properties. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, (17), 6281-6287.
88. Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X., Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J. Am. Chem. Soc., ACS ASAP*.
89. Brown, K. R.; Lyon, L. A.; Fox, A. P.; Reiss, B. D.; Natan, M. J., Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles. 3. Controlled Formation of Conductive Au Films. *Chem. Mater.* **2000**, 12, (2), 314-323.
90. Brown, K. R.; Walter, D. G.; Natan, M. J., Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. 2. Improved control of particle size and shape. *Chem. Mater.* **2000**, 12, (2), 306-313.
91. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* **2001**, 17, (22), 6782-6786.
92. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chem. Mater.* **2001**, 13, (7), 2313-2322.
93. Jana, N. R.; Peng, X., Single-Phase and Gram-Scale Routes toward Nearly Monodisperse Au and Other Noble Metal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (47), 14280-14281.
94. Brown, K. R.; Natan, M. J., Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in solutions and on Surfaces. *Langmuir* **1998**, 14, (4), 726-728.
95. Dörfler, H. D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. Springer Verlag Berlin Heidelberg 2002.
96. Derjaguin, B. L., L., Theory of stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim. U.R.S.S.* **1941**, 14, 633-622.
97. Verwey, E. J. W. O., J.T.G., *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 1948.
98. Glomm, W. R., Functionalized Gold nanoparticles for applications in bionanotechnology. *J. Dispersion Sci. Technol.* **2005**, 26, (3), 389-414.
99. Grasso, D.; Subramaniam, K.; Butkus, M.; Strevett, K.; Bergendahl, J., A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems. *Rev. Environ. Sci. Biotech.* **2002**, 1, (1), 17-38.
100. Lee, J. H. L., H. B.; Andrade J. H., Blood Compatibility of Polyethylene Oxide Surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **1995**, 20, 1043-1079.
101. Zdyrko, B.; Varshney, S. K.; Luzinov, I., Effect of Molecular Weight on Synthesis and Surface Morphology of High-Density Poly(ethylene glycol) Grafted Layers. *Langmuir* **2004**, 20, (16), 6727-6735.
102. Zdyrko, B.; Klep, V.; Luzinov, I., Synthesis and Surface Morphology of High-Density Poly(ethylene glycol) Grafted Layers. *Langmuir* **2003**, 19, (24), 10179-10187.
103. Chen, H.; Wang, Y.; Wang, Y.; Dong, S.; Wang, E., One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles. *Polymer* **2006**, 47, (2), 763-766.
104. Sun, X.; Dong, S.; Wang, E., One-step polyelectrolyte-based route to well-dispersed gold nanoparticles: Synthesis and insight. *Mater. Chem. Phys.* **2006**, 96, (1), 29-33.
105. Giersig, M.; Mulvaney, P., Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. *Langmuir* **2002**, 9, (12), 3408-3413.

106. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, 105, (4), 1103-1169.
107. Pasquato, L.; Pengo, P.; Scrimin, P., Functional gold nanoparticles for recognition and catalysis. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, (24), 3481-3487.
108. Badia, A.; Gao, W.; Singh, S.; Demers, L.; Cuccia, L.; Reven, L., Structure and Chain Dynamics of Alkanethiol-Capped Gold Colloids. *Langmuir* **1996**, 12, (5), 1262-1269.
109. Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D., Structure of a Thiol Monolayer-Protected Gold Nanoparticle at 1.1Å Resolution. *Science* **2007**, 318, (5849), 430-433.
110. Heaven, M. W.; Dass, A.; White, P. S.; Holt, K. M.; Murray, R. W., Crystal Structure of the Gold Nanoparticle [N(C₈H₁₇)₄][Au₂₅(SCH₂CH₂Ph)₁₈]. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (12), 3754-3755.
111. Zhu, M.; Aikens, C. M.; Hollander, F. J.; Schatz, G. C.; Jin, R., Correlating the Crystal Structure of A Thiol-Protected Au₂₅ Cluster and Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (18), 5883-5885.
112. Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W., Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir* **2009**.
113. Zheng, J.; Stevenson, M. S.; Hikida, R. S.; Van Patten, P. G., Influence of pH on Dendrimer-Protected Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, (6), 1252-1255.
114. Chechik, V.; Crooks, R. M., Monolayers of Thiol-Terminated Dendrimers on the Surface of Planar and Colloidal Gold. *Langmuir* **1999**, 15, (19), 6364-6369.
115. Han, D.-H.; Pan, C.-Y., Synthesis and characterization of water-soluble gold nanoparticles stabilized by comb-shaped copolymers. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, 46, (1), 341-352.
116. Laschewsky, A.; Ouari, O.; Mangeney, C.; Jullien, L., Reactive hydrogels grafted on gold surfaces. *Macromol. Symp.* **2001**, 164, 323-340.
117. Mangeney, C.; Ferrage, F.; Aujard, I.; Marchi-Artzner, V.; Jullien, L.; Ouari, O.; Rekaï El, D.; Laschewsky, A.; Vikholm, I.; Sadowski Janusz, W., Synthesis and properties of water-soluble gold colloids covalently derivatized with neutral polymer monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (20), 5811-21.
118. Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Raedler, J.; Natile, G.; Parak, W. J., Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, 4, (4), 703-707.
119. Lin, C.-A. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T.-Y.; Li, P.-Y.; Zanella, M.; Chang, W. H.; Parak, W. J., Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small* **2008**, 4, (3), 334-341.
120. Wu, H.; Zhu, H.; Zhuang, J.; Yang, S.; Liu, C.; Cao, Y. C., Water-soluble nanocrystals through dual-interaction ligands. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, (20), 3730-3734.
121. Gentilini, C.; Evangelista, F.; Rudolf, P.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Pasquato, L., Water-Soluble Gold Nanoparticles Protected by Fluorinated Amphiphilic Thiolates. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (46), 15678-15682.
122. Kanaras, A. G.; Kamounah, F. S.; Schaumburg, K.; Kiely, C. J.; Brust, M., Thioalkylated tetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters. *Chem. Commun.* **2002**, (20), 2294-2295.
123. Foos, E. E.; Snow, A. W.; Twigg, M. E.; Ancona, M. G., Thiol-Terminated Di-, Tri-, and Tetraethylene Oxide Functionalized Gold Nanoparticles: A Water-Soluble, Charge-Neutral Cluster. *Chem. Mater.* **2002**, 14, (5), 2401-2408.
124. Zheng, M.; Li, Z.; Huang, X., Ethylene glycol monolayer protected nanoparticles: synthesis, characterization, and interactions with biological molecules. *Langmuir* **2004**, 20, (10), 4226-35.

125. Zheng, M.; Davidson, F.; Huang, X., Ethylene glycol monolayer protected nanoparticles for eliminating nonspecific binding with biological molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (26), 7790-7791.
126. Zhang, F.; Skoda, M. W. A.; Jacobs, R. M. J.; Zorn, S.; Martin, R. A.; Martin, C. M.; Clark, G. F.; Goerigk, G.; Schreiber, F., Gold nanoparticles decorated with oligo(ethylene glycol) thiols: protein resistance and colloidal stability. *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, (49), 12229-12237.
127. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, (4), 459-476.
128. Zareie, H. M.; Boyer, C.; Bulmus, V.; Nateghi, E.; Davis, T. P., Temperature-Responsive Self-Assembled Monolayers of Oligo(ethylene glycol): Control of Biomolecular Recognition. *ACS Nano* **2008**, 2, (4), 757-765.
129. Veronese, F. M., Peptide and protein PEGylation. A review of problems and solutions. *Biomaterials* **2001**, 22, (5), 405-417.
130. Gref, R.; Luck, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Muller, R. H., 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloid Surface B* **2000**, 18, (3,4), 301-313.
131. van Vlerken, L. E.; Vyas, T. K.; Amiji, M. M., Poly(ethylene glycol)-modified Nanocarriers for Tumor-targeted and Intracellular Delivery. *Pharm. Res.* **2007**, 24, (8), 1405-1414.
132. Kim, D.; Park, S.; Lee, J. H.; Jeong, Y. Y.; Jon, S., Antibiofouling Polymer-Coated Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for in Vivo X-ray Computed Tomography Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, (24), 7661-7665.
133. Tshikhudo, T. R.; Wang, Z.; Brust, M., Biocompatible gold nanoparticles. *Mater. Sci. Technol.* **2004**, 20, (8), 980-984.
134. Latham, A. H.; Williams, M. E., Versatile Routes toward Functional, Water-Soluble Nanoparticles via Trifluoroethyl-ester-PEG-Thiol Ligands. *Langmuir* **2006**, 22, (9), 4319-4326.
135. Li, J.; Crasto, C. F.; Weinberg, J. S.; Amiji, M.; Shenoy, D.; Sridhar, S.; Buble, G. J.; Jones, G. B., An approach to heterobifunctional poly(ethyleneglycol) bioconjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, (24), 5558-5561.
136. Fu, W.; Shenoy, D.; Li, J.; Crasto, C.; Jones, G.; Dimarzio, C.; Sridhar, S.; Amiji, M., Biomedical applications of gold nanoparticles functionalized using hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) spacer. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **2005**, 845, 223-228.
137. Nuzzo, R. G.; Allara, D. L., Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, (13), 4481-4483.
138. Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C.-J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W., Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. *Langmuir* **1998**, 14, (1), 17-30.
139. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R., Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, (7), 801-2.
140. Prasad, B. L. V.; Stoeva, S. I.; Sorensen, C. M.; Klabunde, K. J., Digestive Ripening of Thiolated Gold Nanoparticles: The Effect of Alkyl Chain Length. *Langmuir* **2002**, 18, (20), 7515-7520.
141. Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C., Synthesis and reactions of functionalized gold nanoparticles. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, (16), 1655-6.

142. Schaaff, T. G.; Knight, G.; Shafiqullin, M. N.; Borkman, R. F.; Whetten, R. L., Isolation and Selected Properties of a 10.4 kDa Gold:Glutathione Cluster Compound. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, (52), 10643-10646.
143. Templeton, A. C.; Chen, S.; Gross, S. M.; Murray, R. W., Water-soluble, isolable gold clusters protected by tiopronin and coenzyme A monolayers. *Langmuir* **1999**, 15, (1), 66-76.
144. Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P.; Murray, R. W., Monolayer-Protected Cluster Molecules. *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, (1), 27-36.
145. Tan, H.; Zhan, T.; Fan, W. Y., Direct Functionalization of the Hydroxyl Group of the 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) Ligand Attached to Gold Nanoclusters. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, (43), 21690-21693.
146. Lin, S.-Y.; Tsai, Y.-T.; Chen, C.-C.; Lin, C.-M.; Chen, C.-h., Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, (7), 2134-2139.
147. Hostetler, M. J.; Templeton, A. C.; Murray, R. W., Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. *Langmuir* **1999**, 15, (11), 3782-3789.
148. Hong, R.; Fernandez, J. M.; Nakade, H.; Arvizo, R.; Emrick, T.; Rotello, V. M., In situ observation of place exchange reactions of gold nanoparticles. Correlation of monolayer structure and stability. *Chem. Commun.* **2006**, (22), 2347-2349.
149. Haehner, G.; Woell, C.; Buck, M.; Grunze, M., Investigation of intermediate steps in the self-assembly of n-alkanethiols on gold surfaces by soft x-ray spectroscopy. *Langmuir* **2002**, 9, (8), 1955-1958.
150. You, C.-C.; Verma, A.; Rotello, V. M., Engineering the nanoparticle-biomacromolecule interface. *Soft Matter* **2006**, 2, (3), 190-204.
151. Boal, A. K.; Rotello, V. M., Fabrication and Self-Optimization of Multivalent Receptors on Nanoparticle Scaffolds. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (4), 734-735.
152. Herdt, A. R.; Drawz, S. M.; Kang, Y.; Taton, T. A., DNA dissociation and degradation at gold nanoparticle surfaces. *Colloid Surface B* **2006**, 51, (2), 130-139.
153. Scott, J. R.; Baker, L. S.; Everett, W. R.; Wilkins, C. L.; Fritsch, I., Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry Exchange Studies of Air Oxidized Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold. *Anal. Chem.* **1997**, 69, (14), 2636-2639.
154. Schlenoff, J. B.; Li, M.; Ly, H., Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, (50), 12528-36.
155. Schoenfish, M. H.; Pemberton, J. E., Air Stability of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Silver and Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, (18), 4502-4513.
156. Norrod, K. L.; Rowlen, K. L., Ozone-Induced Oxidation of Self-Assembled Decanethiol: Contributing Mechanism for Photooxidation? *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, (11), 2656-2657.
157. Heister, K.; Frey, S.; Ulman, A.; Grunze, M.; Zharnikov, M., Irradiation Sensitivity of Self-Assembled Monolayers with an Introduced "Weak Linker". *Langmuir* **2004**, 20, (4), 1222-1227.
158. Khlebtsov, N. G.; Bogatyrev, V. A.; Khlebtsov, B. N.; Dykman, L. A.; Englebienne, P., A multilayer model for gold nanoparticle bioconjugates. Application to study of gelatin and human IgG adsorption using extinction and light scattering spectra and the dynamic light scattering method. *Colloid Journal (Translation of Kolloidnyi Zhurnal)* **2003**, 65, (5), 622-635.
159. Shenton, W.; Davis, S. A.; Mann, S., Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody-antigen recognition. *Adv. Mater.* **1999**, 11, (6), 449-452.
160. Levy, R., Peptide-capped gold nanoparticles: towards artificial proteins. *ChemBioChem* **2006**, 7, (8), 1141-1145.

161. Wang, Z.; Levy, R.; Fernig, D. G.; Brust, M., The Peptide Route to Multifunctional Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, (3), 497-500.
162. Jiang, X.; Shang, L.; Wang, Y.; Dong, S., Cytochrome c Superstructure Biocomposite Nucleated by Gold Nanoparticle: Thermal Stability and Voltammetric Behavior. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (6), 3030-3036.
163. Gole, A.; Dash, C.; Ramakrishnan, V.; Sainkar, S. R.; Mandale, A. B.; Rao, M.; Sastry, M., Pepsin-Gold Colloid Conjugates: Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity. *Langmuir* **2001**, 17, (5), 1674-1679.
164. Li, Z.; Jin, R.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L., Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, (7), 1558-1562.
165. Levy, R.; Thanh, N. T. K.; Doty, R. C.; Hussain, I.; Nichols, R. J.; Schiffrin, D. J.; Brust, M.; Fernig, D. G., Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (32), 10076-10084.
166. Jeong, K. J.; Butterfield, K.; Panitch, A., A Novel Assay To Probe Heparin-Peptide Interactions Using Pentapeptide-Stabilized Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, 24, (16), 8794-8800.
167. Wang, Z.; Levy, R.; Fernig, D. G.; Brust, M., Kinase-Catalyzed Modification of Gold Nanoparticles: A New Approach to Colorimetric Kinase Activity Screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, (7), 2214-2215.
168. Sun, L.; Liu, D.; Wang, Z., Functional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes as Cell-Targeting Agents. *Langmuir* **2008**, 24, (18), 10293-10297.
169. Templeton, A. C.; Hostetler, M. J.; Kraft, C. T.; Murray, R. W., Reactivity of Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules: Steric Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, (8), 1906-1911.
170. Templeton, A. C.; Hostetler, M. J.; Warmoth, E. K.; Chen, S.; Hartshorn, C. M.; Krishnamurthy, V. M.; Forbes, M. D. E.; Murray, R. W., Gateway Reactions to Diverse, Polyfunctional Monolayer-Protected Gold Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, (19), 4845-4849.
171. Roux, S.; Garcia, B.; Bridot, J.-L.; Salome, M.; Marquette, C.; Lemelle, L.; Gillet, P.; Blum, L.; Perriat, P.; Tillement, O., Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol. *Langmuir* **2005**, 21, (6), 2526-2536.
172. Templeton, A. C.; Cliffel, D. E.; Murray, R. W., Redox and Fluorophore Functionalization of Water-Soluble, Tiopronin-Protected Gold Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, (30), 7081-7089.
173. Ryan, J. A.; Overton, K. W.; Speight, M. E.; Oldenburg, C. N.; Loo, L.; Robarge, W.; Franzen, S.; Feldheim, D. L., Cellular Uptake of Gold Nanoparticles Passivated with BSA-SV40 Large T Antigen Conjugates. *Anal. Chem.* **2007**, 79, (23), 9150-9159.
174. Xie, H.; Tkachenko, A. G.; Glomm, W. R.; Ryan, J. A.; Brennaman, M. K.; Papanikolas, J. M.; Franzen, S.; Feldheim, D. L., Critical Flocculation Concentrations, Binding Isotherms, and Ligand Exchange Properties of Peptide-Modified Gold Nanoparticles Studied by UV-Visible, Fluorescence, and Time-Correlated Single Photon Counting Spectroscopies. *Anal. Chem.* **2003**, 75, (21), 5797-5805.
175. Uzun, O.; Hu, Y.; Verma, A.; Chen, S.; Centrone, A.; Stellacci, F., Water-soluble amphiphilic gold nanoparticles with structured ligand shells. *Chem. Commun.* **2008**, (2), 196-198.
176. Choo, H.; Cutler, E.; Shon, Y.-S., Synthesis of Mixed Monolayer-Protected Gold Clusters from Thiol Mixtures: Variation in the Tail Group, Chain Length, and Solvent. *Langmuir* **2003**, 19, (20), 8555-8559.
177. Choi, S.; Murphy, W. L., Multifunctional Mixed SAMs That Promote Both Cell Adhesion and Noncovalent DNA Immobilization. *Langmuir* **2008**, 24, (13), 6873-6880.

178. Vanderpuije, B. N. Y.; Han, G.; Rotello, V. M.; Vachet, R. W., Mixed Monolayer-Protected Gold Nanoclusters as Selective Peptide Extraction Agents for MALDI-MS Analysis. *Anal. Chem.* **2006**, 78, (15), 5491-5496.
179. Fischer, N. O.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Rotello, V. M., Inhibition of chymotrypsin through surface binding using nanoparticle-based receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, (8), 5018-5023.
180. Zheng, M.; Huang, X., Nanoparticles Comprising a Mixed Monolayer for Specific Bindings with Biomolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (38), 12047-12054.
181. Hermanson, G. T.; Editor, *Bioconjugate Techniques*. 1995; p 786 pp.
182. Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Dirvianskyte, N.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Brust, M., Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2006**, 17, (6), 1373-1375.
183. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, (11), 2004-2021.
184. Grabar, K. C.; Brown, K. R.; Keating, C. D.; Stranick, S. J.; Tang, S.-L.; Natan, M. J., Nanoscale Characterization of Gold Colloid Monolayers: A Comparison of Four Techniques. *Anal. Chem.* **1997**, 69, (3), 471-477.
185. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, 79, (11), 4215-4221.
186. Sperling, R. A.; Liedl, T.; Duhr, S.; Kudera, S.; Zanella, M.; Lin, C. A. J.; Chang, W. H.; Braun, D.; Parak, W. J., Size Determination of (Bio)conjugated Water-Soluble Colloidal Nanoparticles: A Comparison of Different Techniques. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, (31), 11552-11559.
187. Watson, M. L., Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1958**, 4, (4), 475-8.
188. Watson, M. L., Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1958**, 4, 727-30.
189. Wang, Z.; Tan, B.; Hussain, I.; Schaeffer, N.; Wyatt, M. F.; Brust, M.; Cooper, A. I., Design of Polymeric Stabilizers for Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles in Water. *Langmuir* **2006**, 23, (2), 885-895.
190. Zhang, S.; Leem, G.; Srisombat, L.-o.; Lee, T. R., Rationally Designed Ligands that Inhibit the Aggregation of Large Gold Nanoparticles in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (1), 113-120.
191. Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C., What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (19), 4640-4650.
192. Berne, B. J. P., R, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover Publ Inc: 2000.
193. Scheffer, A. E., C.; Sperling, M.; Buscher, W., ICP-MS as a new tool for the determination of gold nanoparticles in bioanalytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, (1), 249-252.
194. Helfrich, A.; Bruechert, W.; Bettmer, J., Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques. *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, 21, (4), 431-434.
195. Agasti, S. S.; You, C.-C.; Arumugam, P.; Rotello, V. M., Structural control of the monolayer stability of water-soluble gold nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, (1), 70-73.
196. Foos, E. E.; Snow, A. W.; Twigg, M. E., Synthesis and Characterization of Water Soluble Gold Nanoclusters of Varied Core Size. *J. Cluster Sci.* **2002**, 13, (4), 543-552.

197. Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A., Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Anal. Chem.* **2006**, 78, (24), 8313-8318.
198. Demers, L. M.; Mirkin, C. A.; Mucic, R. C.; Reynolds, R. A., III; Letsinger, R. L.; Elghanian, R.; Viswanadham, G., A Fluorescence-Based Method for Determining the Surface Coverage and Hybridization Efficiency of Thiol-Capped Oligonucleotides Bound to Gold Thin Films and Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2000**, 72, (22), 5535-5541.
199. Nakamura, H.; Tamura, Z., Fluorometric determination of secondary amines based on their reaction with fluorescamine. *Anal. Chem.* **1980**, 52, (13), 2087-92.
200. Guzman, N. A.; Moschera, J.; Bailey, C. A.; Iqbal, K.; Malick, A. W., Assay of protein drug substances present in solution mixtures by fluorescamine derivatization and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **1992**, 598, (1), 123-31.
201. Udenfriend, S.; Stein, S.; Bohlen, P.; Dairman, W.; Leimgruber, W.; Weigele, M., Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science* **1972**, 178, (63), 871-2.
202. Lorenzen, A.; Kennedy, S. W., A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* **1993**, 214, (1), 346-8.
203. Schroedter, A.; Weller, H., Ligand design and bioconjugation of colloidal gold nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, (17), 3218-3221.
204. Hollmann, M.; Heinemann, S., Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **1994**, 17, 31-108.
205. Watkins, J. C.; Krogsgaard-Larsen, P.; Honore, T., Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **1990**, 11, (1), 25-33.
206. Edmonds, B.; Gibb, A. J.; Colquhoun, D., Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 495-519.
207. Seeburg, P. H., The TINS/TIPS Lecture the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* **1993**, 16, (9), 359-365.
208. Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S. F., The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **1999**, 51, (1), 7-61.
209. Monyer, H.; Sprengel, R.; Schoepfer, R.; Herb, A.; Higuchi, M.; Lomeli, H.; Burnashev, N.; Sakmann, B.; Seeburg, P. H., Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **1992**, 256, (5060), 1217-21.
210. Kutsuwada, T.; Kashiwabuchi, N.; Mori, H.; Sakimura, K.; Kushiya, E.; Araki, K.; Meguro, H.; Masaki, H.; Kumanishi, T.; et al., Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* **1992**, 358, (6381), 36-41.
211. Zukin, R. S.; Bennett, M. V. L., Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* **1995**, 18, (7), 306-13.
212. Prorok, M.; Castellino, F. J., The molecular basis of conantokin antagonism of NMDA receptor function. *Curr. Drug Targets* **2007**, 8, (5), 633-642.
213. Mayer, M. L., Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **2006**, 440, (7083), 456-462.
214. Paoletti, P.; Neyton, J., NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2007**, 7, (1), 39-47.
215. Mayer, M. L.; Westbrook, G. L.; Guthrie, P. B., Voltage-dependent block by magnesium(2+) of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* **1984**, 309, (5965), 261-3.
216. Nowak, L.; Bregestovski, P.; Ascher, P.; Herbet, A.; Prochiantz, A., Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* **1984**, 307, (5950), 462-5.
217. Monyer, H.; Burnashev, N.; Laurie, D. J.; Sakmann, B.; Seeburg, P. H., Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **1994**, 12, (3), 529-40.

218. Farlow Martin, R., NMDA receptor antagonists. A new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Geriatrics* **2004**, 59, (6), 22-7.
219. Williams, K., Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* **1993**, 44, (4), 851-9.
220. Gallagher, M. J.; Huang, H.; Pritchett, D. B.; Lynch, D. R., Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, (16), 9603-11.
221. Krupp, J. J.; Vissel, B.; Heinemann, S. F.; Westbrook Gary, L., Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific. *Mol. Pharmacol.* **1996**, 50, (6), 1680-1688.
222. Vicini, S.; Wang, J. F.; Li, J. H.; Zhu, W. J.; Wang, Y. H.; Luo, J. H.; Wolfe, B. B.; Grayson, D. R., Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.* **1998**, 79, (2), 555-566.
223. Watanabe, M.; Inoue, Y.; Sakimura, K.; Mishina, M., Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *NeuroReport* **1992**, 3, (12), 1138-40.
224. Tovar, K. R.; Westbrook, G. L., The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J. Neurosci.* **1999**, 19, (10), 4180-4188.
225. Albeni, B. C., The NMDA Receptor/Ion Channel Complex: A Drug Target for Modulating Synaptic Plasticity and Excitotoxicity. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, 13, 3185.
226. Koehr, G., NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.* **2006**, 326, (2), 439-446.
227. Rao, A.; Craig, A. M., Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* **1997**, 19, (4), 801-812.
228. Tovar, K. R.; Westbrook, G. L., Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **2002**, 34, (2), 255-264.
229. Malenka, R. C.; Nicoll, R. A., Neuroscience: Long-term potentiation - A decade of progress? *Science* **1999**, 285, (5435), 1870-1874.
230. Nicoll, R. A.; Malenka, R. C., Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, 868, 515-525.
231. Chen, M.; Lu, T.-J.; Chen, X.-J.; Zhou, Y.; Chen, Q.; Feng, X.-Y.; Xu, L.; Duan, W.-H.; Xiong, Z.-Q., Differential Roles of NMDA Receptor Subtypes in Ischemic Neuronal Cell Death and Ischemic Tolerance. *Stroke* **2008**, 39, (11), 3042-3048.
232. Bresink, I.; Benke, T. A.; Collett, V. J.; Seal, A. J.; Parsons, C. G.; Henley, J. M.; Collingridge, G. L., Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, 119, (2), 195-204.
233. Zhang, S.-J.; Steijaert, M. N.; Lau, D.; Schuetz, G.; Delucinge-Vivier, C.; Descombes, P.; Bading, H., Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* **2007**, 53, (4), 549-562.
234. Vanhoutte, P.; Bading, H., Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, 13, (3), 366-371.
235. Walton, M. R.; Dragunow, M., Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci.* **2000**, 23, (2), 48-53.
236. Bonni, A.; Brunet, A.; West, A. E.; Datta, S. R.; Takasu, M. A.; Greenberg, M. E., Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **1999**, 286, (5443), 1358-1362.
237. Wittmann, M., Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Hippocampal Neurons: Regulation of Nuclear Shape and Cell Fate. *Dissertation* **2006**, Universität Heidelberg.

238. Hardingham, G. E., Synapse-to-nucleus calcium signalling. *Molecular Biology of the Neuron (2nd Edition)* **2006**, 249-269.
239. Eimerl, S.; Schramm, M., The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J. Neurochem.* **1994**, 62, (3), 1223-6.
240. Tymianski, M.; Charlton, M. P.; Carlen, P. L.; Tator, C. H., Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* **1993**, 13, (5), 2085-104.
241. Sattler, R.; Charlton, M. P.; Hafner, M.; Tymianski, M., Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J. Neurochem.* **1998**, 71, (6), 2349-2364.
242. Peng, T.-I.; Greenamyre, J. T., Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular Pharmacology* **1998**, 53, (6), 974-980.
243. Luetjens, C. M.; Bui, N. T.; Sengpiel, B.; Munstermann, G.; Poppe, M.; Krohn, A. J.; Bauerbach, E.; Kriegelstein, J.; Prehn, J. H. M., Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J. Neurosci.* **2000**, 20, (15), 5715-5723.
244. Migaud, M.; Charlesworth, P.; Dempster, M.; Webster, L. C.; Watabe, A. M.; Makhinson, M.; He, Y.; Ramsay, M. F.; Morris, R. G. M.; Morrison, J. H.; O'Dell, T. J.; Grant, S. G. N., Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **1998**, 396, (6710), 433-439.
245. Sheng, M.; Kim, M. J., Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* **2002**, 298, (5594), 776-780.
246. Sattler, R.; Xiong, Z.; Lu, W.-Y.; Hafner, M.; MacDonald, J. F.; Tymianski, M., Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* **1999**, 284, (5421), 1845-1848.
247. Lipton, P., Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **1999**, 79, (4), 1431-568.
248. Layer, R. T.; Wagstaff, J. D.; White, H. S., Conantokins: Peptide antagonists of NMDA receptors. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, (23), 3073-3084.
249. Prorok, M.; Warder, S. E.; Blandl, T.; Castellino, F. J., Calcium Binding Properties of Synthetic g-Carboxyglutamic Acid-Containing Marine Cone Snail "Sleeper" Peptides, Conantokin-G and Conantokin-T. *Biochemistry (Mosc).* **1996**, 35, (51), 16528-16534.
250. McIntosh, J. M.; Olivera, B. M.; Cruz, L. J.; Gray, W. R., gamma -Carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, (23), 14343-6.
251. Mena, E. E.; Gullak, M. F.; Pagnozzi, M. J.; Richter, K. E.; Rivier, J.; Cruz, L. J.; Olivera, B. M., Conantokin-G: a novel peptide antagonist to the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor. *Neurosci. Lett.* **1990**, 118, (2), 241-4.
252. Cnudde, S. E.; Prorok, M.; Dai, Q.; Castellino, F. J.; Geiger, J. H., The Crystal Structures of the Calcium-Bound con-G and con-T[K7g] Dimeric Peptides Demonstrate a Metal-Dependent Helix-Forming Motif. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, (6), 1586-1593.
253. Dai, Q.; Sheng, Z.; Geiger, J. H.; Castellino, F. J.; Prorok, M., Helix-Helix Interactions between Homo- and Heterodimeric g-Carboxyglutamate-containing Conantokin Peptides and Their Derivatives. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, (17), 12641-12649.
254. Prorok, M.; Castellino, F. J., Structure-function relationships of the NMDA receptor antagonist conantokin G peptides. *Curr. Drug Targets* **2001**, 2, (3), 313-322.
255. Castellino, F. J.; Prorok, M., Conantokins: inhibitors of ion flow through the N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Curr. Drug Targets* **2000**, 1, (3), 219-235.
256. Donevan, S. D.; McCabe, R. T., Conantokin G is an NR2B-selective competitive antagonist of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* **2000**, 58, (3), 614-623.
257. Sheng, Z.; Liang, Z.; Geiger, J. H.; Prorok, M.; Castellino, F. J., The selectivity of conantokin-G for ion channel inhibition of NR2B subunit-containing NMDA receptors is regulated by amino acid residues in the S2 region of NR2B. *Neuropharmacology* **2009**, 57, (2), 127-136.

258. Bartz, M.; Kuther, J.; Nelles, G.; Weber, N.; Seshadri, R.; Tremel, W., Monothiol-derived from glycols as agents for stabilizing gold colloids in water: synthesis, self-assembly and use as crystallization templates. *J. Mater. Chem.* **1999**, 9, (5), 1121-1125.
259. Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M., Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* **2004**, 15, (4), 897-900.
260. Fritz, G.; Schadler, V.; Willenbacher, N.; Wagner, N. J., Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. *Langmuir* **2002**, 18, (16), 6381-6390.
261. D'Souza, L.; Suchopar, A.; Richards, R. M., In situ approaches to establish colloidal growth kinetics. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 279, (2), 458-463.
262. Aichmayer, B.; Margolis, H. C.; Sigel, R.; Yamakoshi, Y.; Simmer, J. P.; Fratzl, P., The onset of amelogenin nanosphere aggregation studied by small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering. *J. Struct. Biol.* **2005**, 151, 239-249.
263. Wilcoxon, J. P.; Martin, J. E.; Schaefer, D. W., Aggregation in colloidal gold. *Phys. Rev. A* **1989**, 39, (5), 2675.
264. Pengo, P.; Polizzi, S.; Pasquato, L.; Scrimin, P., Carboxylate-Imidazole Cooperativity in Dipeptide-Functionalized Gold Nanoparticles with Esterase-like Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (6), 1616-1617.
265. Thaxton, C. S.; Hill, H. D.; Georganopoulou, D. G.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A., A Bio-Bar-Code Assay Based upon Dithiothreitol-Induced Oligonucleotide Release. *Anal. Chem.* **2005**, 77, (24), 8174-8178.
266. Letsinger, R. L.; Elghanian, R.; Viswanadham, G.; Mirkin, C. A., Use of a steroid cyclic disulfide anchor in constructing gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2000**, 11, (2), 289-91.
267. Wuelfing, W. P.; Gross, S. M.; Miles, D. T.; Murray, R. W., Nanometer Gold Clusters Protected by Surface-Bound Monolayers of Thiolated Poly(ethylene glycol) Polymer Electrolyte. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, (48), 12696-12697.
268. Rucareanu, S.; Gandubert, V. J.; Lennox, R. B., 4-(N,N-Dimethylamino)pyridine-Protected Au Nanoparticles: Versatile Precursors for Water- and Organic-Soluble Gold Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2006**, 18, (19), 4674-4680.
269. Olmedo, I.; Araya, E.; Sanz, F.; Medina, E.; Arbiol, J.; Toledo, P.; Alvarez-Lueje, A.; Giralt, E.; Kogan, M. J., How Changes in the Sequence of the Peptide CLPFFD-NH₂ Can Modify the Conjugation and Stability of Gold Nanoparticles and Their Affinity for beta -Amyloid Fibrils. *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, (6), 1154-1163.
270. Pengo, P.; Baltzer, L.; Pasquato, L.; Scrimin, P., Substrate modulation of the activity of an artificial nanoesterase made of peptide-functionalized gold nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, (3), 400-404.
271. Cik, M.; Chazot, P. L.; Stephenson, F. A., Optimal expression of cloned NMDAR1/NMDAR2A heteromeric glutamate receptors: A biochemical characterization. *Biochem. J.* **1993**, 296, (3), 877-83.
272. Fodor, L.; Nagy, J., Pharmacological Analysis of Recombinant NR1a/2A and NR1a/2B NMDA Receptors Using the Whole-Cell Patch-Clamp Method. In *Patch-Clamp Methods and Protocols*, 2007; pp 3-13.
273. Anegawa, N. J.; Guttmann, R. P.; Grant, E. R.; Anand, R.; Lindstrom, J.; Lynch, D. R., N-Methyl-d-aspartate receptor mediated toxicity in nonneuronal cell lines: characterization using fluorescent measures of cell viability and reactive oxygen species production. *Mol. Brain Res.* **2000**, 77, (2), 163-175.
274. Anegawa, N. J.; Lynch, D. R.; Verdoorn, T. A.; Pritchett, D. B., Transfection of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in a Nonneuronal Cell Line Leads to Cell Death. *Journal of Neurochemistry* **1995**, 64, (5), 2004-2012.
275. Banke, T. G.; Traynelis, S. F., Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **2003**, 6, (2), 144.

276. Dalby, B.; Catesa, S.; Harrisa, A.; Ohkia, E. C.; Tilkinsb, M.; Priceb, P. J.; Ciccarone, V. C., Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **2004**, *33*, (2), 95-103.
277. Sambrook J; W, R. D., *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 3rd. Edition 3 ed.; Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour: 2001; Vol. Volume 1-3.
278. Anders, D. L.; Blevins, T.; Sutton, G.; Chandler, L. J.; Woodward, J. J., Effects of c-Src tyrosine kinase on ethanol sensitivity of recombinant NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Clinical and Experimental Research* **1999**, *23*, (2), 357-362.
279. Blevins, T.; Mirshahi, T.; Chandler, L. J.; Woodward, J. J., Effects of acute and chronic ethanol exposure on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors expressed in HEK 293 cells. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, (6), 2345-2354.
280. Dickinson, R.; Peterson, B. K.; Banks, P.; Simillis, C.; Martin, J. C. S.; Valenzuela, C. A.; Maze, M.; Franks, N. P., Competitive Inhibition at the Glycine Site of the N-Methyl-D-aspartate Receptor by the Anesthetics Xenon and Isoflurane. *Anesthesiology* **2007**, *107*, 756-767.
281. Chen, N.; Moshaver, A.; Raymond, L. A., Differential Sensitivity of Recombinant N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subtypes to Zinc Inhibition. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 1015-1023.
282. Harvey-Girard, E.; Dunn, R. J., Excitatory Amino Acid Receptors of the Electrosensory System: The NR1/NR2B N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *J. Neurophysiol.* **2003**, *89*, 822-832.
283. Chen, N.; Luo, T.; Raymond, L. A., Subtype-Dependence of NMDA Receptor Channel Open Probability. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, (16), 6844-6854.
284. Domingues, A.; Almeida, S.; Da Cruz e Silva, E. F.; Oliveira, C. R.; Rego, A. C., Toxicity of beta -amyloid in HEK293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Neurochem. Int.* **2007**, *50*, (6), 872-880.
285. Rintoul, G. L.; Raymond, L. A.; Baimbridge, K. G., Calcium buffering and protection from excitotoxic cell death by exogenous calbindin-D28k in HEK 293 cells. *Cell Calcium* **2001**, *29*, (4), 277-287.
286. Chen, C.; Okayama, H., High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, *7*, (8), 2745-52.
287. Klein, R. C.; Prorok, M.; Galdzicki, Z.; Castellino, F. J., The amino acid residue at sequence position 5 in the conantokin peptides partially governs subunit-selective antagonism of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, (29), 26860-26867.
288. Aichmayer, B.; Margolis, H. C.; Sigel, R.; Yamakoshi, Y.; Simmer, J. P.; Fratzl, P., The onset of amelogenin nanosphere aggregation studied by small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering. *J. Struct. Biol.* **2005**, *151*, 239-249.
289. Maus, L.; Spatz, J. P.; Fiammengo, R., Quantification and Reactivity of Functional Groups in the Ligand Shell of PEGylated Gold Nanoparticles via a Fluorescence-Based Assay. *Langmuir* **2009**, *25*, (14), 7910-7917.
290. Brody, J. R.; Kern, S. E., Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* **2004**, *36*, (2), 214-6.
291. Bading, H.; Greenberg, M. E., Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* **1991**, *253*, (5022), 912-14.
292. Hardingham, G. E.; Arnold, F. J.; Bading, H., Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, (3), 261-7.

7 Anhang

Zugehörige Daten der in Abbildung 37 gezeigten Graphen:

Tabelle 11: Durchschnittliche Anzahl an Aminogruppen pro Partikel in Abhängigkeit der Alterung der Lösung.

| Passivierung: | (4 + 5) | | (6 + 7) | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Zeit (d) | $N_{NH_2} (1)$ | $N_{NH_2} (2)$ | $N_{NH_2} (1)$ | $N_{NH_2} (2)$ |
| $\varnothing = 35 \pm 4$ nm | | | | |
| 0 | 221 ± 31 | 276 ± 39 | 223 ± 34 | 211 ± 30 |
| 14 | 84 ± 8 | 84 ± 7 | 167 ± 20 | 186 ± 17 |
| 28 | 77 ± 6 | 70 ± 5 | 152 ± 11 | 161 ± 18 |
| 42 | 76 ± 5 | 74 ± 5 | 162 ± 20 | 158 ± 14 |
| 56 | 79 ± 5 | 70 ± 4 | 168 ± 14 | 160 ± 29 |
| $\varnothing = 31 \pm 3$ nm | | | | |
| 0 | 233 ± 20 | 259 ± 16 | 220 ± 30 | 180 ± 12 |
| 14 | 134 ± 8 | 156 ± 9 | 129 ± 11 | 144 ± 19 |
| 28 | 94 ± 8 | 91 ± 6 | 123 ± 16 | 139 ± 10 |
| 35 | 116 ± 7 | 95 ± 6 | 112 ± 13 | 129 ± 11 |
| 56 | 118 ± 7 | 112 ± 8 | 114 ± 12 | 121 ± 7 |
| $\varnothing = 32 \pm 3$ nm | | | | |
| 0 | 136 ± 19 | | 202 ± 28 | |
| 14 | 96 ± 6 | | 156 ± 13 | |
| 28 | 87 ± 13 | | 102 ± 17 | |
| 42 | 43 ± 5 | | 92 ± 12 | |
| $\varnothing = 30 \pm 3$ nm^a | | | | |
| 0 | 130 ± 21 | | 139 ± 19 | |
| 14 | 58 ± 8 | | 82 ± 12 | |
| 28 | 66 ± 9 | | 90 ± 18 | |
| 42 | 58 ± 5 | | 83 ± 18 | |

(1) und (2) beschreiben Proben, die aus gleichen Wachstumsreaktionen aber unabhängigen Passivierungen stammen. Daten sind mit 95% Konfidenzintervallen gezeigt. ^a Markierung der Aminogruppen mit 5(6)-Carboxyfluorescein NHS-Ester zum Zeitpunkt $t = 0$ Tage. Nach 14, 28, und 42 Tagen werden Proben der fluoreszenz-markierten Nanopartikel entnommen, aufgereinigt und analysiert.

8 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Joachim Spatz danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die interessante und motivierende Themenstellung. Insbesondere möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das in mich gesetzte Vertrauen bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hilmar Bading danke ich für die Übernahme des Koreferates, sowie für die hervorragende Kollaboration, die dieses Thema möglich gemacht hat.

Für die kompetente Betreuung und die hilfreichen Diskussionen möchte ich ganz herzlich Herrn Dr. Roberto Fiammengo danken, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und dessen Wissen und Erfahrung im Laboralltag eine große Hilfe war.

Weiterhin danke ich Dr. Malte Wittmann, der mir durch seine Hilfsbereitschaft den Einstieg in das biologische Themengebiet erleichterte, und Dr. Oliver Dick, der mir einen Einblick in die biologische Denkweise ermöglicht hat. Dr. Oliver Dick danke ich ganz besonders für die unkomplizierte und freundschaftliche Zusammenarbeit während der Promotion.

Für die ICP-OES Messungen danke ich Albrecht Meyer, Gerhard Werner und Samir Hammoud (Zentrale Wissenschaftliche Einrichtung, Analytische Chemie des Max-Planck-Instituts, Stuttgart). Durch die gute Zusammenarbeit und die flexiblen Terminabsprachen wurde die Anwendung am biologischen System erst möglich.

Für die Einführung in die Zellkultur und die stete Hilfsbereitschaft danke ich Henriette Ries, sowie Dr. Tobias Wolfram, die sich immer für mich Zeit genommen haben und ab und zu die „Pflege der kleinen Schweine“ übernommen haben.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Cornelia Thediek für die Einführung in die Durchflusszytometrie sowie die immer spontane Hilfsbereitschaft während der Messungen.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Reinhard Sigel, Adolphe Merkle Institute, Fribourg für die Messungen der Dynamischen Lichtreuung bedanken, sowie für die geduldigen Erklärungen und Beantwortung der Fragen zur Theorie.

Für die Bereitstellung der Plasmide danke ich Dr. Georg Köhr, MPI für medizinische Forschung, Heidelberg und Dr. Daniela Mauceri, IZN Universität Heidelberg; für die Bereitstellung des Programms zur Bestimmung der Polymerschichtdicke danke ich Dr. Stefan Kudara.

Weiterhin danke ich Marion Kelsch (Stuttgarter Zentrum für Elektronenmikroskopie) für die ersten transmissionselektronenmikroskopischen Messungen und die darauf folgende kompetente Einweisung.

Für die hilfreichen Korrekturen und Anmerkungen zu dieser Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Roberto Fiammengo, der seine Weihnachtsferien dafür geopfert hat. Dr. Oliver Dick und Dr. Tobias Wolfram danke ich für die Überarbeitung des biologisch orientierten Teils der Arbeit.

Auch bedanke ich mich bei Dr. Christian Kreutz, Ann-Kathrin Schmieder, Nicole Plath, Ulrike Schmitz-Ziffels, Dr. Eva Bock und Dr. Heike Böhm für die Korrekturen und guten Vorschläge zur Gestaltung der Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung während der Promotion möchte ich mich an dieser Stelle bei der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanken.

Im administrativen Bereich danke ich Frau Pfeilmeier und Frau Hess für ihren Einsatz im Kampf mit allen anfallenden organisatorischen Aufgaben.

Dem gesamten AK Spatz möchte ich für die fröhliche und kooperative Arbeitsatmosphäre sowie für die schöne Zeit während der Promotion danken. Besonders sind hier Dr. Eva Bock, „der liebe Herr Nachbar“ (Dr. Stefan Kudera), Dr. Claudia Pacholski, und Christine Mollenhauer zu erwähnen, die den Laboralltag mit mir gestaltet haben. „Anne“ (Ann-Kathrin Schmieder) danke ich für die schönen Autofahrten und Spaziergänge, für die Unterstützung und fürs Zuhören. Wir sind ein gutes Team! Fania Geiger, Julia Schölermann und Tabea Mundinger danke ich für die Aufmunterung, die Unterstützung und ihre Hilfe im Laboralltag. Meinem Büro, Stefan Quint, Christoph Morhard, Sebastian Lechner und Dr. Iain Dunlop danke ich für die schöne Atmosphäre („Haken der Maulwurfn“).

Ioanis Grigoridis möchte ich für die gute Betreuung der Elektronenmikroskope danken, Ferdinand Belz für die Betreuung eines Herzstücks des AKs: der Kaffeemaschine!

Nicole Plath möchte ich für die langjährige Freundschaft danken, in der wir uns gegenseitig aus so manchem Tief gezogen haben. Ist schon Wahnsinn, was wir gemeinsam erlebt haben! Dr. Eva Bock möchte ich für die gemeinsame Zeit während der Promotion danken, in der wir mit Spaziergängen, „Pfälzer Wein-Abenden“ und Sportstunden im Fitness Studio dem Alltagsstress getrotzt haben. Für das „Rundum-Sorglos-Paket mit Verpflegung“ danke ich meiner Freundin Dr. Heike Böhm, die sich mit ihrer Truppe vor allem während der Schreibphase rührend um mich gekümmert haben und immer für mich da waren. Meiner „Schokoladenquelle“ Dr. Tobias Wolfram danke ich für die Nervennahrung in schwierigen Zeiten. Timo Burek und meinen umliegenden Kollegen danke ich für die PC-Hilfe, wenn der Computer wieder „brannte“.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Joachim Bargon aussprechen, der mich während meiner gesamten Studienzeit sehr unterstützt und immer für mich da war.

Meinen Freunden, Maike Weißkopf, Ulrike Schmitz-Ziffels und Jochen Schmitz, Solveig Tismer, Laura Silberhorn und Antonia Fürst danke ich für die Freundschaft und Unterstützung, innerhalb und außerhalb des Studiums.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Bruder und meinen Eltern, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Meinem Freund Christian Kreutz danke ich für die immerwährende enorme Unterstützung und Aufmunterung während der harten Lernzeiten, wie auch an den ruhigeren Tagen. Ohne Deinen Rückhalt wären das Studium und die Promotion nur schwer möglich gewesen.